Universitäts-Frauenklinik
Universitätsklinikum Ulm
Ärztlicher Direktor Prof. Dr. Rolf Kreienberg

Charakterisierung von Proteinkomplexen des Tetraspanins CD9 mit Bedeutung für die Migration mikrovaskulärer retinaler Endothelzellen

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

von
Eva-Maria Kuhn

aus
Weinheim

2009

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin
1. Berichterstatter:	PD Dr. Helmut Deißler
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Gabriele Lang
Tag der Promotion:	27.07.2009

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

I

Abkürzungsverzeichnis III

1. Einleitung

1.1 Die Proteinfamilie der Tetraspanine 1
1.2 Diabetische Retinopathie 5
1.2 Ziele der Arbeit 9

2. Materialen und Methoden

2.1 Materialien 10
2.2 Methoden
2.2.1 Molekularbiologische Methoden 20
2.2.2 Zellbiologische Methoden 24
2.2.3 Proteinbiochemische Methoden 30

3. Ergebnisse

3.1 Expression der Tetraspanine CD9, CD63, CD81, CD82 und CD151
3.1.1 Expression für Tetraspanine kodierender RNAs 38
3.1.2 Analyse der Zelloberflächen-Expression der Tetraspanine 39
3.1.3 Subzelluläre Lokalisation von CD9 im Vergleich zu CD63 40
3.1.4 Einfluss der Zelldichte auf die Transkription der Tetraspanine CD9, CD63 und CD151 43
3.2 Analyse der postranslationalen Modifikation des CD9 in iBREC
3.2.1 Untersuchung der Glykosylierung des CD9 in iBREC 44
3.2.2 Untersuchung des Phosphorylierungszustands des CD9 in iBREC 45
3.3 Identifikation von Interaktionspartnern des CD9 in iBREC
3.3.1 Analyse der möglichen Interaktion des CD9 mit der Proteinkinase C 46

3.3.2 Analyse putativer Interaktionspartner des CD9 in iBREC 48
3.3.3 Analyse der Interaktion des CD9 mit CD29 50
3.3.4 Analyse der Interaktion des CD9 mit ADAM10 54
3.3.5 Einfluss von Glukose auf die CD9-Expression und die Interaktion von CD9 mit CD29 und ADAM10 in iBREC 56

4. Diskussion
4.1 Die Tetraspanine CD9, CD63, CD81 und CD151 werden in mikrovaskulären Endothelzellen der Retina exprimiert 60
4.2 CD9 wird in iBREC glykosyliert, aber nicht phosphoryliert 62
4.3 CD9 bildet Komplexe mit β_1-Integrinen und ADAM10 63
4.4 Die Glukosekonzentration hat keinen Einfluss auf die Expression und Lokalisation von CD9 und seine Bindung an Komplexpartner 70

5. Zusammenfassung 72

6. Literaturverzeichnis 74

Danksagung 86

Abkürzungsverzeichnis

4α-PDD	4α- Phorbol-12,13-(didecanoat)
Abb.	Abbildung
ADAM-Proteinfamilie	Metallabhängige Proteasen, die eine Disintegrin- und Metalloproteasen-Domäne besitzen "a disintegrin and metalloprotease domain"
AGEs	Glykierungsendprodukte, "advanced glycation end products"
AS	Aminosäure
B2M	β2 – Mikroglobulin
bFGF	"basic fibroblast growth factor"
GF 109203X	2-[1-(3-Dimethylaminopropyl)-1H-indol-3-yl]-3-(1H-indol-3-yl)-maleimid (Bisindolylmaleimide I)
Ro 31-6045	2,3-bis(1H-indol-3-yl)-N-methylmaleimid (Bisindolylmaleimide V)
BSA	Rinderserumalbumin, "bovine serum albumin"
bp	Basenpaar
cDNA	zu RNA komplementäre Desoxyribonukleotinsäure, "complemtary deoxyribonucleic acid"
CIP	alkalische Phosphatase aus dem Kälberdarm, "calf intestinal phosphatase"
DAG	1,2-Diacyl-sn-glyzerin
DAPI	4',6 – Diamidino – 2-phenylindol-dihydrochlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, "deoxyribonucleic acid"
dNTP	2'-Deoxyribonukleosid-5'-triphosphat

DR	diabetische Retinopathie
EBGM	“Endothelial Cell Basal Medium MV”
EC1	kleine extrazelluläre Schleife von Tetraspaninen
EC2	große extrazelluläre Schleife von Tetraspaninen
ECGM	“Endothelial Cell Growth Medium MV”
ECGM-hG	“Endothelial Cell Growth Medium MV” mit erhöhtem Glukosegehalt
ECGS/H	“Endothelial Cell Growth Supplement/Heparin”
ECM	extrazelluläre Matrix, “extracellular matrix”
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor, “epidermal growth factor“
ER	endoplasmatisches Retikulum
ESI	“electrospray ionization“
EWI-Proteine	Proteine der Immunoglobulin-Familie, die ein konserviertes Aminosäuremotiv (Glu-Trp-Ile) besitzen
FACS	Durchflusszytometrie, “Fluorescence-activated cell sorting”
FAM	6-Carboxyfluorescein
FCS	fötales Kälberserum, “fetal calf serum”
gi-Nummer	In BI-Datenbanken verwendete Zahl zur eindeutigen Bezeichnung von Sequenzen
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HUVEC	Endothelzellen der menschlichen Nabelschnur, “human umbilical vein endothelial cells”

IAPD	3-(1-(3-Imidazol-1-ylpropyl)-1H-indol-3-yl)-4-anilino-1H-pyrrole-2,5-dion
IF	Immunfluoreszenzfärbung
iBREC	Immortalisierte Endothelzellen aus der Rinderretina, “immortalized bovine retinal endothelial cells”
ICAM-1	interzelluläres Adhäsionsmolekül 1 “inter-cellular adhesion molecule 1“
Ig	Immunglobulin
IL	intrazelluläre Schleife
IGF-1	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor 1, “insulin-like growth factor 1“
kDa	Kilodalton
LC	Flüssigkeitschromatografie, “liquid chromatography“
M	molare Masse; in Einheiten: mol/l
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure, “messenger ribonucleic acid“
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie,
m/V	Masse pro Volumen
nano-LC-ESI-MS/MS	Massenspektrometrisches Analyseverfahren, in dem Flüssigkeitschromatografie, Elektrospray-Ionisation und Tandem-Massenspektrometrie kombiniert werden
NCBI	“National Center for Biotechnology Information“
n. s.	nicht signifikant
OD	optische Dichte
p. a.	pro analysi
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PC7	Proteinkonvertase 7 “protein convertase 7“

PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung, “phosphate-buffered saline“, ohne Magnesium- und Kalziumchlorid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, “polymerase chain reaction”
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RAGE	Rezeptor für “advanced glycation end products”
RNA	Ribonukleinsäure, “ribonucleic acid”
RT	reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat, ”sodium dodecyl sulfate“
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung, “tris-buffered-saline”
TGF-α	transformierender Wachstumsfaktor α “transforming growth factor α”
TM	Transmembrandomäne
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
u	“Unit”
UV	Ultraviolett
V/V	Volumen pro Volumen
VCAM-1	Endothelzell Adhäsionsmolekül 1 “vascular cell adhesion molecule 1”
VECad	Endothel-spezifisches Cadherin “vascular endothelial cadherin“
VEGF	“vascular endothelial growth factor”
vWF	von Willebrand-Faktor
WB	Western blot

1 Einleitung

1.1 Die Proteinfamilie der Tetraspanine

1.1.1 Vorkommen und Struktur der Tetraspanine

Tetraspanine sind eine Familie von hoch konservierten Membranproteinen, die erst 1990 als Gruppe zusammengehöriger Proteine mit gemeinsamen strukturellen Merkmalen erkannt wurden [69]. In Säugern konnten bisher 32, in *Drosophila melanogaster* 35 und in *Caenorhabditis elegans* 20 Tetraspanine identifiziert werden [30]. Zudem exprimieren auch Pilze und Schwämme einige Tetraspanine [53]. Da viele Tetraspanine in ursprünglicheren bis hin zu höher entwickelten Organismen exprimiert werden, kann auf eine grundlegende physiologische Bedeutung dieser Proteinfamilie geschlossen werden. Die meisten Tetraspanine, wie z. B. auch CD9, werden in sehr vielen verschiedenen Geweben exprimiert [58], manche sind als Teil funktioneller Membrankomplexe nur in hochspezialisierten Zellen nachweisbar [52].

Tetraspanine bestehen aus 200 – 350 Aminosäuren (AS) und haben eine Größe von 25 kDa bis 50 kDa. Als Membranproteine durchspannen sie die Zellmembran viermal, wovon sich der Name dieser Proteinfamilie ableitet. Von anderen Membranproteinen mit vier Transmembrandomänen wie z. B. den Claudinen [66] sind Tetraspanine klar durch ihre untereinander bestehende Sequenzhomologie zu unterscheiden. Sowohl der Carboxyl- als auch der Amino-Terminus dieser Proteine ragen in das Zytoplasma und 13-31 AS bilden eine extrazelluläre Schleife (*short extracellular loop*, EC1) variabler Struktur. Neben einem sehr kleinem, nur wenige AS großem intrazellulären Abschnitt (*intracellular loop*, IL), in dem palmitoylierte Cysteine die Interaktion mit anderen Proteinen unterstützen können [85], existiert noch eine zweite, relativ große extrazelluläre Schleife mit 69 bis 132 AS (*large extracellular loop*, EC2). Diese ist unterteilt in eine hoch konservierte Region mit 3 α-Helices und eine variable Region, in der fast alle bekannten Interaktionsstellen von Tetraspaninen mit anderen Proteinen liegen [31]. Die erste, dritte und vierte Transmembrandomänen (TM) enthalten in der typischen hydrophoben Umgebung einzelne polare AS wie Asparagin, Glutaminsäure und

Glutamin mit unbekannter Funktion, sowie palmitoylierbare Cysteine in Membrannähe [8, 31]. In EC2 findet man bei allen Tetraspaninen das Cystein-Cystein-Glycin-Motiv; darüber hinaus besitzen mehr als die Hälfte alle Tetraspanine dort ein Prolin-X-X-Cystein-Motiv, wobei X eine beliebige Aminosäure ist [31].

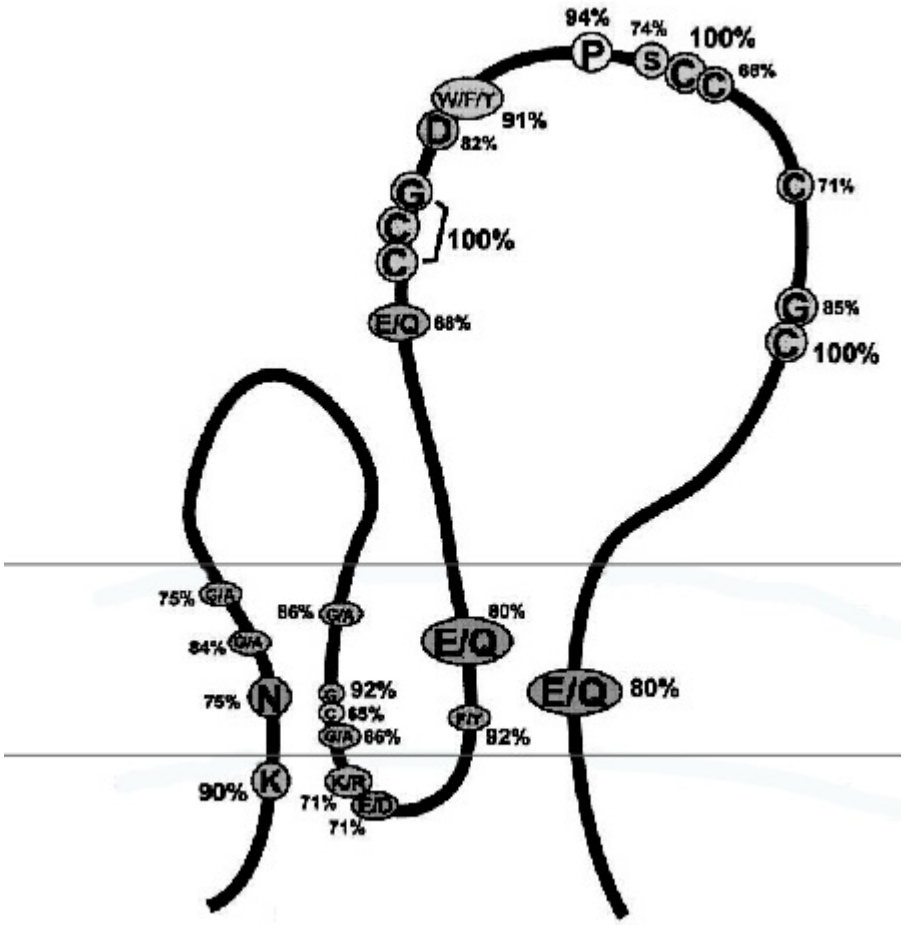

Abb. 1: Darstellung der Tetraspaninstruktur mit konservierten Aminosäuren.
Dargestellt ist die Struktur eines typischen Tetraspanins mit kurzen intrazellulären Enden. Die angegebenen relative Häufigkeiten der einzelnen Aminosäuren beziehen sich auf den Vergleich aller bekannten Tetraspanine [30].

1.1.2 Funktionen der Tetraspanine

Schon früh erkannte man das Potential dieser Membranproteine mit anderen Tetraspaninen und Proteinen anderer Art zu interagieren und so eine Art

Tetraspanin-Netzwerk zu bilden. Zu den identifizierten Interaktionspartnern von Tetraspaninen gehören zum Beispiel Vertreter der Ig-Proteinfamilie, Proteoglykane, Integrine, Wachstumfaktoren und deren Rezeptoren, sowie an der intrazellulären Signalweiterleitung beteiligte Enzyme [10]. Neuere Veröffentlichungen zeigen auch eine Funktion von Tetraspaninen bei der Regulation der Spaltung des Tumornekrosefaktors α (TNF-α) und des epidermalen Wachstumfaktors (EGF) durch ADAM10, eine metallabhängige Protease mit Disintegrinfunktion [4].

Bei der Bindung von Tetraspaninen an andere Proteine unterscheidet man zwischen primärer, sekundärer und tertiärer Interaktion [31]. Die primäre oder auch direkte Interaktion setzt eine spezifische und stabile Assoziation eines Tetraspanins mit dem Partnermolekül voraus. Dies kann die Bildung von Homodimeren, -tertiären, oder –tetrameren sein, aber auch die Bindung an andere Transmembranproteine wie Integrine, EWI-Proteine oder CD19, die schon im endoplasmatischen Retikulum (ER) erfolgen kann. Diese relativ stabilen Komplexe bleiben selbst nach Solubilisierung mit stringenten Detergenzien (z. B. Digitonin oder Triton X-100) erhalten [8, 31]. Die Assoziation von primären Tetraspanin-Partner-Komplexen untereinander wird als sekundäre oder auch indirekte Interaktion bezeichnet. Diese kann durch relativ milde Detergenzien (Brij 96 oder Brij 97), insbesondere in Anwesenheit von zweifach geladenen Kationen wie Ca^{2+} oder Mg^{2+}, zerstört werden. Für die Bildung von sekundären Komplexen ist die Palmitoylierung einzelner Tetraspaninkomponenten wichtig, so dass diese sekundären Assoziationen vermutlich erst im Golgi-Apparat entstehen. So wurde gezeigt, dass die indirekte Wechselwirkung der Tetraspanine CD9 und CD151 durch Mutation membrannaher, üblicherweise palmitoylierter Cysteine unterbunden wird [52]. Tertiäre Interaktionen führen zu hochmolekularen, relativ unlöslichen Proteinkomplexen [31]. Die sich in einem dynamischen Gleichgewicht aus primären, sekundären und tertiären Komplexen in einer Zellmembran befindende übergeordnete Struktur wird Tetraspanin-Netzwerk (*tetraspanin web*) oder Tetraspanin-angereicherte Mikrodomäne (*tetraspanin enriched microdomain*) genannt. Je nach Zelltyp und –zustand setzt sich das Tetraspanin-Netzwerk aus unterschiedlichen Tetraspaninen mit verschiedenen assoziierten Proteinen

zusammen und trägt so zu den zelltypspezifischen Funktionen und deren Regulation bei [53].

1.1.3 Das Tetraspanin CD9

Schon 1981 wurde das Tetraspanin CD9 als Oberflächenmarker leukämischer Zellen beschrieben [42], konnte aber erst 1991 von Boucheix et al. aufgrund seiner Sequenzhomologie der Proteinfamilie der Tetraspanine zugeordnet werden [9]. Die Domänenstruktur des 228 AS großen CD9 ist in Abbildung 2 dargestellt. Beide intrazellulären Enden, die in das Zellinnere ragen, sind kurz und bestehen nur aus aus 11 bzw. 8 AS (siehe Abbildung 2). Bei der gelelektrophoretischen Analyse tritt CD9 häufig in Form zweier Banden bei ca. 22 kDa und 27 kDa auf, die möglicherweise auf unterschiedliche Glykosylierung zurückzuführen sind [80]. Eine mögliche N-Glykosylierungsstelle ist das Asparagin 52 [9]. Zudem wird CD9 an den Cysteinen innerhalb der Transmembrandomänen palmitoyliert. Diese Modifikation erlaubt es dem CD9, erst mit anderen Tetraspaninen wie CD81 und CD53 zu interagieren [15, 24].

Das Tetraspanin CD9 wird in nahezu allen Geweben von Säugern exprimiert. An der Plasmamembran lokalisiert, interagiert CD9 mit zahlreichen anderen Proteinen [31]. Dort ist es in funktionellen Komplexen insbesondere an der Regulation von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion, Proliferation, Adhäsion und Migration von Zellen beteiligt. Hierbei wesentliche Komplexpartner sind Integrine wie $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$ und $\alpha_6\beta_1$ [8], EWI-F und EWI-1 [84], CD9P-1 [3], das Tetraspanin CD81 [3], die Proteinkinase C-Isoformen α und β [3, 95] und Claudin-1 [46]. Mit β_1-Integrinen zusammen spielt CD9 zum Beispiel eine wichtige Rolle bei der Migration von Ovarzellen [45] und Endothelzellen [21, 43]. Zudem ist CD9 im Komplex mit ICAM-1 und CD151 regulatorisch an der Adhäsion von Leukozyten an humane Nabelschnurendothelzellen (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) beteiligt [6]. Auch ist CD9 zusammen mit Integrinen und Vertretern der ADAM-Proteinfamilie wichtig für die Verschmelzung von Spermium und Eizelle [75]. Ein besonderes Interesse an Tetraspaninen ergibt sich daraus, dass bei verschiedenen Arten von malignen Tumoren diese Moleküle verändert exprimiert

werden, wobei meist eine Herabregulierung mit zunehmender Malignität der Tumoren korreliert. Eine veränderte Expression von CD9 wurde beispielsweise gefunden bei: Blasen- [61], Zervix- [77], Ovarial- [22, 32] und Mammakarzinomen [34, 38, 39, 62, 63, 81], sowie bei Gehirntumoren [40] und Leukämie [47]. Beim Zervixkarzinom wird typischerweise die Expression von CD9 im Verlauf der Tumorprogression herunterreguliert, aber es findet eine starke Hochregulierung der Expression statt, wenn die Tumorzellen durch das Endothel in die Blutgefäße eindringen [77].

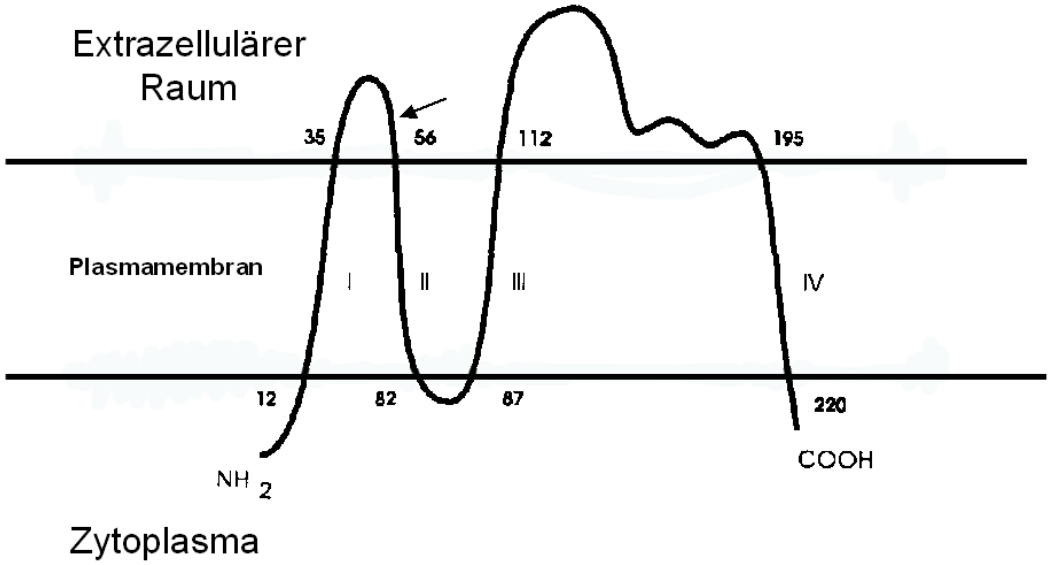

Abb. 2: Domänenstruktur des CD9-Proteins.

Die Nummerierung der Aminosäuren beginnt mit dem Methionin des nativen Proteins. I, II, III und IV bezeichnen die vier Transmembrandomänen. Die putative Glykosylierungsstelle ist mit einem Pfeil gekennzeichnet [9].

1.2 Diabetische Retinopathie

Noch vor der Entdeckung des Insulins in den zwanziger Jahren beschrieb Theodor Leber 1875 die *Retinitis diabetica* (diabetische Retinopathie, DR) als eine Folge von *Diabetes mellitus*. Obwohl schon damals die Dringlichkeit einer frühzeitigen und konsequenten Therapie erkannt wurde, entwickelte bis vor ca. 20 Jahren fast jeder Patient mit Typ 1-Diabetes und etwa 80% der Patienten mit Typ 2-Diabetes

eine diabetische Netzhauterkrankung. Trotz verbesserter und neuer Therapien zählt die DR auch heute noch zu den Hauptursachen für Erblinden im Erwachsenalter und da *Diabetes mellitus* schon längst nicht nur in den westlichen Industrieländern verbreitet ist, erkranken viele Menschen inzwischen auch in Staaten wie Indien und der Volksrepublik China.

Im Krankheitsverlauf der DR unterscheidet man zwischen einem nicht proliferativen und einem proliferativen Stadium. Die nicht proliferative DR ist häufig symptomarm. Im Bereich der Netzhaut entwickeln sich Mikroaneurysmen, intraretinale Blutungen, Ablagerungen von Lipiden, Netzhautödeme, intraretinale mikrovaskuläre Anomalien und sogenannten „Cotton-Wool“-Herde. Die proliferative DR ist gekennzeichnet durch präretinale Neovaskularisationen, aber auch einer Rubeosis der Regenbogenhaut, sowie Glaskörperblutungen und schließlich Netzhautablösung.

1.2.1 Molekulare Mechanismen der Entstehung und Entwicklung der diabetischen Retinopathie

Die morphlogischen Befunde der DR beruhen auf der Schädigung des retinalen vaskulären Endothels durch chronische Hyperglykämie im Rahmen des *Diabetes mellitus*. Diese führt zur Aktivierung alternativer zellulärer Stoffwechselwege, z. B. des Sorbitolstoffwechsels, und verstärkt auch die nicht-enzymatische Glykosylierung von Proteinen. Im Gegensatz zu Muskel- oder Fettgewebszellen, die Glukose insulinabhängig über den Glut-4-Rezeptor aufnehmen, haben Endothelzellen der inneren Blut-Retina-Schranke Glut-1-Rezeptoren, die Glukose insulin- und natriumabhängig über erleichterte Diffusion in das Zytosol transportieren [26, 73]. Da Endothelzellen die Glukoseaufnahme über die Glut-1-Rezeptoren nicht aktiv steuern können [12], liegt diese deutlich höher als der Glukoseverbrauch der Zellen. Dadurch findet verstärkt Glykolyse statt und es entstehen neben Stoffwechselprodukten wie Diacylglyzerin (DAG) vermehrt auch freie Sauerstoffradikale, die die Zellen schädigen [57]. DAG aktiviert in vaskulären Zellen die Proteinkinase C (PKC), die bei vaskulären Komplikationen des *Diabetes mellitus* eine wichtige Rolle spielt. So hat die PKC Einfluss auf die Zellmigration

und -proliferation, die Bildung der extrazellulären Matrix und die Permeabilität der mikrovaskulären Blutgefäße in der Retina [89].

Ein weiterer wichtiger Faktor für die Entstehung der DR ist die vermehrte Bildung des Wachstumsfaktors VEGF (*vascular endothelial growth factor*), die möglicherweise auch durch die PKC stimuliert wird [89]. Umgekehrt wird die Aktivität der PKC durch VEGF erhöht, so dass neue Medikamente entwickelt wurden, die nach Injektion in den Glaskörper dort das überschüssige VEGF abfangen [37]. Die erhöhte Expression angiogener Faktoren wie VEGF (oder auch IGF-1) führt zu einer gesteigerten Permeabilität des Endothels, wodurch es zur Ausbildung eines Makulaödems kommt [82]. Zudem führt die erhöhte Menge an Wachstumsfaktoren zur Neubildung labiler mikrovaskulärer Gefäße vor der Retina. Darüber hinaus induziert VEGF die Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 an der Plasmamembran mikrovaskulärer endothelialer Zellen [36]. Hier scheint es an der zu Beginn und im Verlauf der DR häufig zu beobachtenden vermehrten Anheftung von Leukozyten an die Endothelzellen in der Retina beteiligt zu sein [18, 41].

Als weitere Ursache für die DR-typischen Veränderungen im Endothel wird die Bildung von Glykierungsendprodukten (*advanced glycation end products*, AGEs), die man vermehrt bei diabetischen Patienten findet, diskutiert. Diese Stoffwechselprodukte stören die Funktion glykosylierter Enzyme und vermindern die Elastizität der Kapillaren, was deren Verengung begünstigt [88].

Auch die die retinalen Gefäße umgebenden Perizyten sind von der Hyperglykämie betroffen: Bei höheren Glukosekonzentrationen wird der Polyol-Stoffwechselweg in den Zellen aktiviert und es reichert sich Fruktose in den Perizyten an. Dies führt zu einem osmotischen Gradienten und dadurch bedingt zum Absterben der die Endothelzellen regulierenden Perizyten und Folgeprozessen [23].

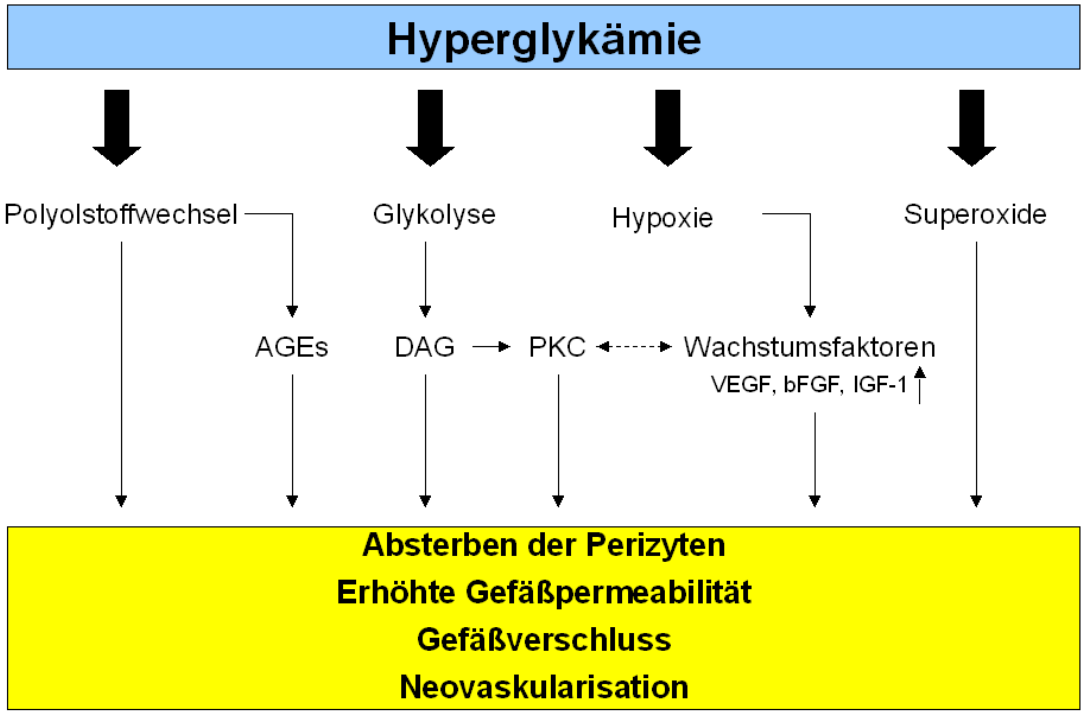

Abb. 3: Prozesse bei Entstehung und Fortschreiten der diabetischen Retinopathie. Dargestellt sind die Prozesse in mikrovaskulären retinalen Endothelzellen und Perizyten, die für die Entstehung und das Fortschreiten der DR als wichtig angesehen werden. AGEs: “advanced glycation end products”, DAG: Diacylglyzerin, PKC: Proteinkinase C VEGF: “vascular endothelial growth factor”, bFGF: “basic fibroblast growth factor”, IGF-1: “insulin-like growth factor 1”

1.3 Ziele der Arbeit

Die bei der diabetischen Retinopathie (DR) deregulierten Prozesse wie Proliferation, Migration, Adhäsion, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion sowie Neovaskularisation sind in verschiedenen Typen normaler und maligner Zellen von funktionellen Tetraspaninkomplexen (z. B. mit den Tetraspaninen CD9, CD63, CD82 oder CD151) abhängig. Auch sind viele der bereits identifizierten Komplexpartner von Tetraspaninen als für die Entstehung der DR wichtige Moleküle erkannt worden: Integrine, ICAM-1, metallabhängige Proteasen und die PKC. Zudem wurde für die Tetraspanine CD9 und CD151 bereits eine Bedeutung für die Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen [54] und die Migration von Endothelzellen [21, 43] nachgewiesen. Dennoch wurden bisher nur wenige Vertreter der Proteinfamilie der Tetraspanine hinsichtlich ihrer Bedeutung für normale und krankheitsbedingte Prozesse im Auge untersucht. Insbesondere zur Expression und funktionellen Relevanz von Tetraspaninen in retinalen mikrovaskulären Endothelzellen gab es bisher keine Untersuchungen. Deshalb sollte am Modell der immortalisierten mikrovaskulären Endothelzellen aus der Rinderretina (*immortalized bovine retinal endothelial cells*, iBREC) nach einer initialen Bestimmung der in diesen Zellen exprimierten Tetraspanine mit wahrscheinlicher funktioneller Relevanz (CD9, CD81, CD82, CD151) untersucht werden, mit welchen Proteinen das funktionell bereits gut untersuchte Tetraspanin CD9 in iBREC Komplexe bildet. Neben der massenspektrometrischen Identifizierung von Interaktionspartnern nach Co-Immunpräzipitiationen sollten auch Nachweise potentiell bindender Proteine, z.B. der PKC-Isoformen α und β, einbezogen werden. Außerdem sollte durch vertiefte funktionelle Untersuchungen die Rolle von CD9 bei Migration und Adhäsion von iBREC geklärt werden. Mit Blick auf eine mögliche Bedeutung für die DR sollte schließlich der Einfluss von Glukose und der PKC auf Funktion, subzelluläre Lokalisation und Komplexe des CD9 untersucht werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und biologische Substanzen

2-[1-(3-Dimethylaminopropyl)-1H-indol-3-yl]-3-(1H-indol-3-yl)-(maleimid) (Bisindolylmaleimide I)	Calbiochem/Merck, Darmstadt
2,3-*bis*(1H-indol-3-yl)-N-methylmaleimid (Bisindolylmaleimide V)	Calbiochem/Merck, Darmstadt
2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure (HEPES)	Roth, Karlsruhe
3-[1-(3-Imidazol-1-ylpropyl)-1H-indol-3-yl]-4-anilino-1H-pyrrole-2,5-(dion) (Proteinkinase C_β Inhibitor)	Calbiochem/Merck, Darmstadt
4α- Phorbol-12,13-(didecanoat) (4αPDD)	Calbiochem/Merck, Darmstadt
6-Aminohexansäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Accutase	PAA Laboratories, Pasching
Brij® 97	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fibronektin aus menschlichem Plasma	Becton Dickinson, Heidelberg
Ficoll	Sigma-Aldirch, Taufkirchen
Geneticin	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Glukose	Sigma-Aldrich, Taufkrichen
β-Mercaptoethanol	Bio-Rad, München
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
PBS (ohne Magenesium- und Kalziumchlorid)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Calbiochem/Merck, Darmstadt
Proteaseinhibitoren “Complete Mini, EDTA-free“	Roche Applied Science, Mannheim
Proteinkinase C_β-Inhibitor LY379196	Eli Lilly, Indianapolis, USA
Rinderserumalbumin (BSA)	Serva Bioproducts, Heidelberg
“StartingBlock (TBS)” Blockierpuffer	Thermo Scientific, Bonn

Tunicamycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tween® 20 “SigmaUltra”	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
“Vectashield” Eindeckmedium	Vector Labs, Burlingame, USA

Alle verwendeten und hier nicht aufgeführten Standardchemikalien wurden in p. a.-Qualität von Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma - Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

2.1.2 Kulturmedien und Zusätze

“Endothelial Basal Growth Medium MV“ (EBGM) mit optionalen Zusätzen: humaner epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), “Endothelial Cell Growth Supplement/Heparin“, fötales Kälberserum (FCS), Hydrokortison	PromoCell, Heidelberg
“Endothelial Low Serum Growth Medium MV” (ECGM) mit vorgemischtem “Supplement-Mix“	PromoCell, Heidelberg

2.1.3 Kits, Reagenzmischungen, Enzyme und Nukleinsäuren

Alkalische Phosphatase	New England Biolabs, Frankfurt
BCA-Proteinassay-Reagenz	Thermo Scientific, Bonn
“FastStart” Taq DNA Polymerase	Roche Applied Science, Mannheim
“Imperial” Proteinanfärbe-Reagenz	Thermo Scientific, Bonn
“PageRuler (Plus)” (vorgefärbte Standardprotein-Mischung)	Fermentas, St. Leon-Rot
Nukleotid-Mischung für die PCR	Roche Applied Science, Mannheim
“peqGOLD“ 100 bp DNA – Leiter Plus	Peqlab, Erlangen
Protein G Plus/Protein A-Agarose	Calbiochem/Merck, Darmstadt

“ProteoExtract “ Zellfraktionierungs-Kit	Calbiochem/Merck, Darmstadt
“RNeasy Mini“ RNA-Isolierungs-Kit	Qiagen, Hilden
“SuperSignal West Extended Duration”-Substrat	Thermo Scientific, Bonn
TaqMan-Reagenzien zur reversen Transkription	Applied Biosystems, Darmstadt

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Agarose-Fertiggele “E-Gel” 2% (GP)	Invitrogen, Karlsruhe
Doppelkammer-Glasobjektträger	Becton Dickinson, Heidelberg
Filterpapier 3MM Chr	Whatman, Maidstone, UK
FACS-Polystyrolröhrchen, 5 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Immun-Blot PVDF-Membranen, 0,2 µm	Bio-Rad, München
“Lab-Tek II“ Doppelkammer-Glasobjektträger	Nunc, Langenselbold
“Precise” Protein-Fertiggele	Thermo Scientific, Bonn
Reaktionsgefäße, 0,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße, 1,5 ml und 2 ml	Sarstedt, Nürnberg
Röntgenfilm “Hyperfilm MP“	Amersham/GE Healthcare, München
Zellkulturflaschen, 25 cm^2 und 75 cm^2	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellkulturschalen, ∅ 150 mm	Sarstedt, Nürnberg
Zellkulturplatten, 12 – Loch	Becton Dickinson, Heidelberg
Zellkulturplatten, 96 – Loch	Nunc, Langenselbold
Zellkultur-Membraneinsätze, Porengröße 8 µm	Becton Dickinson, Heidelberg

2.1.5 Zelllinie

iBREC: Immortalisierte Endothelzellen der Rinderretina [20]	Zellbank des Forschungslabors der Universitätsaugenklinik Ulm

2.1.6 Synthetische Oligonukleotide

2.1.6.1 Primer für die konventionelle Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Folgende PCR-Primer wurden von der Firma Thermo Electron, Ulm bezogen. Zur Analyse von zu mRNA komplementärer DNA (cDNA) wurden die Primer so ausgewählt, dass genomische DNA (mit Introns) nicht zu PCR-Produkten führt.

CD9 *forward* 1	5´- CGG TCA AAG GAG GCA CCA AGT G -3´
CD9 *forward* 2	5´- TGG ACT ATG GCT CCG ATT CGA CTC -3´
CD9 *reverse* 1	5´- TCT GGA CTT CCT TGA TCA CCT CCT C -3
CD63 *forward* 1	5´- TGG CGG TGG AAG GAG GAA TG -3´
CD63 *reverse* 1	5´- GGA TCG ATG CCG TCT GGT TGT C -3‘
CD81 *forward* 1	5´- CCTGCT CCT CGT CTT CAA TTT CGT C -3´
CD81 *forward* 2	5´- GCA GAC CAC CAA CCT CCT GTA TCT G -3´
CD81 *reverse* 1	5´- GGC AA GAG GAT GAT CAC CAG GCA G -3´
CD82 *forward* 1	5´- GG TCA GCC TGC ATC AAA GTC AC -3´
CD82 *forward* 2	5´- TGG CGG CCT ACG TCT TCA TCA G -3´
CD82 *reverse* 1	5´- CAC TTC ACC TGA GCC TGC ACG TAG -3´
CD151 *forward* 1	5´- TCG ACA ACA TGT GGC ACC GTC -3´
CD151 *reverse* 1	5´- CAG GTT CCT CCG CTC CTT GAA G -3´

2.1.6.2 Fluoreszenzfarbstoff-markierte Sonden und Primer für die quantitative Echtzeit-PCR

Die folgenden Oligonukleotide wurden von der Firma Qiagen, Hilden bezogen. Die Tetraspanin – spezifischen „Quanti-Tect“-Sonden waren mit dem Fluoreszenzfarbstoff 6-Carboxyfluorescein (FAM) markiert, die β2-Mikroglobulin (B2M)-Sonde mit Fluoreszenfarbstoff “Yakima Yellow“.

CD9 Sonde	5´- GAA GAA CAA GGA CGA -3´
CD9 *forward*	5´- CGA GGA CAC CTA ACA ACA A -3´

CD9 *reverse*	5´- TGA CGA CAC CAA ACT GGC C -3´
CD151 Sonde	5´- TCT GGC TGG CTG GTC T -3´
CD151 *forward*	5´- GTA CCT GCT CTT CAC CTT -3´
CD151 *reverse*	5´- TTC TCG CTG ATG TAG TCC G -3´
CD63 Sonde	5´- CCA TCT TCT TGT CCC T -3´
CD63 *forward*	5´- GGA GAA CTA CTG TCT TAT GAT -3´
CD63 *reverse*	5´- AAC GAC CGA TAC ACA AAT CTC T -3´
B2M Sonde	5´- AAG ACA CCC ACC AGA A -3´
B2M *forward*	5´- GTC CTC CAA AGA TTC AAG TGT A -3´
B2M *reverse*	5´- TGG GAC AGC AAG GTA GAA AGA -3´

2.1.7 Antikörper

2.1.7.1 Primäre Antikörper

anti-ADAM10 (human) — GeneTex, San Antonio, USA
aus Kaninchen, polyklonal, gereinigtes IgG
Kreuzreaktion mit Rind
Verwendete Konzentration für WB: 2 µg/ml
Verwendete Konzentration für IF: 2 µg/ml

anti-ADAM10 (human) — Acris, Himmelreich
aus Kaninchen, polyklonal, gereinigtes Ig
Kreuzreaktion mit Rind
Verwendete Konzentration für: 2 µg/ml
Verwendete Konzentration für IF: 2 µg/ml

anti-CD9 (Rind) (Klon IVA50) — Acris, Himmelreich
Maus IgG_2
Verwendete Konzentration für WB: 1 µg/ml
Verwendete Konzentration für IF: 1 µg/ml
Verwendete Konzentration für FACS: 10 µg/ml

anti-CD63 (Rind) (Klon CC25) Maus IgG_1 Verwendete Verdünnung für IF: 1:40 Verwendete Verdünnung für FACS: 1:40	Acris, Himmelreich
anti-CD151 (human) (Klon 210127) Maus IgG_{2b} Kreuzreaktion mit Rind Verwendete Konzentrationen für IF: 2-8 µg/ml Verwendete Konzentration für FACS: 10 µg/ml	R&D Systems, Wiesbaden
anti-CD151 (human) aus Kaninchen, polyklonal, gereinigtes Ig Kreuzreaktion mit Rind Verwendete Konzentrationen für IF: 2-8 µg/ml Verwendete Konzentration für FACS: 10 µg/ml	R&D Systems, Wiesbaden
anti-CD151 (human) aus Kaninchen, polyklonal, gereinigtes Ig Kreuzreaktion mit Rind Verwendete Konzentrationen für IF: 2-8 µg/ml Verwendete Konzentration für FACS: 10 µg/ml	ProteinTech Group, Chicago, USA
anti-CD29 (human) (Klon TS2/16) Maus IgG_1 Kreureaktion mit Rind Verwendete Konzentration für IF: 4 µg/ml	BioLegend, San Diego, USA
anti-CD49e (human) (Klon SAM-1) Maus IgG_1 Kreuzreaktion mit Rind Verwendete Konzentration für IF: 10 µg/ml	SouthernBiotech, Birmingham, UK

anti-Occludin (human) aus Kaninchen, polyklonal, gereinigtes Ig Kreuzreaktion mit Rind Verwendete Konzentration für WB: 1 µg/ml	Invitrogen, Karlsruhe
anti-PKC$_{\alpha}$ (Rind) (Klon MC5) Maus IgG$_{2a}$ Verwendete Konzentration für WB: 2 µg/ml Verwendete Konzentration für IF: 2 µg/ml	Abcam, Cambridge, UK
anti-PKC$_{\beta II}$ (Rind) (Klon 28) Maus IgG$_1$ Verwendete Konzentration für IF: 2 µg/ml	AbD Serotec, Oxford, UK
anti-Transgelin2 (human) aus Kaninchen, polyklonal, gereinigtes Ig Kreuzreaktion mit Rind Verwendete Konzentration für WB: 2 µg/ml Verwendete Konzentration für IF: 4 µg/ml	ProteinTech Group, Chicago, USA
anti-αTubulin (human) (Klon DM1A) Maus IgG$_1$ Kreuzreaktion mit Rind Verwendete Konzentration für WB: 5 µg/ml	Abcam, Cambridge, UK
Kontroll-Antikörper UNLB-IgG (Klon 15H6) Maus IgG$_1$ Verwendung in gleicher Konzentration wie Antikörper gegen das Zielprotein	SouthernBiotech, Birmingham, UK
Kontroll-Antikörper UNLB-IgG (Klon HOPC-1) Maus IgG$_{2a}$ Verwendung in gleicher Konzentration wie Antikörper gegen das Zielprotein	SouthernBiotech, Birmingham, UK

anti-Vimentin (Rind) (Klon RV202) Abcam, Cambridge, UK
Maus IgG_1
Verwendete Konzentration für WB: 2 µg/ml
Verwendete Konzentration für IF: 4 µg/ml

2.1.7.2 Detektionsantikörper

anti-Kaninchen, Alexa Fluor 488-markiert Invitrogen, Karlsruhe
aus Ziege, polyklonal, gereinigtes IgG
Verwendete Konzentration für IF: 2 µg/ml
Verwendete Konzentration für FACS: 1 µg/ml

anti-Kaninchen, Alexa Fluor 594-markiert Invitrogen, Karlsruhe
aus Ziege, polyklonal, gereinigtes IgG
Verwendete Konzentration für IF: 2 µg/ml

anti-Kaninchen, HRP-Konjugat Thermo Scientific, Bonn
aus Ziege, polyklonal, gereinigtes IgG
Verwendete Konzentration für WB: 0,1 ng/ml bis 5 µg/ml

anti-Maus, Alexa Fluor 488-markiert Invitrogen, Karlsruhe
aus Ziege, polyklonal, gereinigtes IgG
Verwendete Konzentration für IF: 2 µg/ml
Verwendete Konzentration für FACS: 1 µg/ml

anti-Maus, Alexa Fluor 594-markiert Invitrogen, Karlsruhe
aus Ziege, polyklonal, gereinigtes IgG
Verwendete Konzentration für IF: 2 µg/ml

anti-Maus, HRP-Konjugat Thermo Scientific, Bonn
aus Ziege, polyklonal, gereinigtes IgG
Verwendete Konzentration für WB: 0,1 ng/ml bis 5 µg/ml

2.1.8 spezielle Geräte

Absaugpumpe AC	HLC, Biotech, Bovenden, NL
ABI Prism 7700 Gene Analyzer	Applied Biosystems, Darmstadt
Brutschrank Hera Cell 150	Heraeus/Thermo Scientific, Bonn
Brutschrank BB 6060 CV	Heraeus/Thermo Scientific, Bonn
Concentrator 5301 (“Speed Vac”)	Eppendorf, Hamburg
“Cryo“ Einfrierbox	Nalgene, Hereford, UK
Elektrophorese-Netzgerät E-Gel Power Base	Invitrogen, Karlsruhe
Elektrophorese-Netzgerät PowerPac Basic™	Bio-Rad, München
Elektroblotter PerfectBlue „Semi-Dry“	Peqlab, Erlangen
Elektrophoresekammer Perfect Blue Twins S	Peqlab, Erlangen
Fluoreszenzmikroskop DM 4000B mit Software “Leica Application Suite“ und Software “Leica FW4000“	Leica, Wetzlar
Flusszytometer FACS Calibur mit Software “Cell Quest Pro 2000“	Becton Dickinson, Heidelberg
Geldokumentationssystem “MultiImage Light Cabinet”	Alpha InnoTech, Kasendorf
Lichtmikroskop Axiovert 35	Zeiss, Jena
Magnetrührer RCT basic	IKA Labortechnik, Staufen
Mikrotiterplatten-Photometer Spectra Image Spectrum III	Tecan Group, Crailsheim
Mikrotiterplatten-Photometer Sunrise TW mit Software “Megellan Standard”	Tecan Group, Crailsheim
pH-Messgerät MP230	Mettler – Toledo, Gießen
PCR-Gerät GeneAmp PCR System 9600	Perkin Elmer, Waltham, USA
Schüttler Gyro Rocker SSL3	Stuart, Staffordshire, UK
Sicherheitswerkbank Hera Safe HS12	Heraeus/Thermo Scientific, Bonn
Spektrophotometer DU 640	Beckman Instruments, München
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg

Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Biofuge 13	Heraeus/Thermo Scientific, Bonn
Tischzentrifuge Labofuge	Heraeus/Thermo Scientific, Bonn
Überkopfmischer 34528	Snijder Micro Systems, Deurne, NL
Wasserbad Typ 1013	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Zentrifuge Labofuge 400R	Heraeus/Thermo Scientific, Bonn

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Präparation von RNA

Für die Präparation von Gesamt-RNA wurden 1,5 x 10^6 Zellen mit kaltem PBS gewaschen und anschließend mit einem Zellschaber abgeschabt. Die durch Zentrifugation für 5 min bei 300 x g und 4°C gewonnen Zellpellets wurden zur Präparation der Gesamt-RNA mit dem „RNeasy Mini Kit“ (siehe 2.1.3) eingesetzt. Dabei wurde nach Angaben des Herstellers gearbeitet und abschließend die RNA mit Wasser eluiert. Die RNA wurde nach photometrischer Bestimmung ihrer Konzentration (siehe 2.2.1.2) bei –80°C gelagert.

2.2.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration einer Nukleinsäurelösung wurde spektralphotometrisch durch die Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm in einer Quarzglasküvette bestimmt. Eine Extinktionseinheit entspricht ungefähr 50 µg/ml doppelsträngiger DNA (dsDNA), 33 µg/ml einzelsträngiger Oligonukleotid-DNA oder 40 µg/ml RNA. Die Reinheit der Nukleinsäurelösung, insbesondere bezüglich eines Restanteils an Proteinen wurde über das Verhältnis der Extinktionen der Lösung bei 260 nm und 280 nm ($E_{260/280}$) abgeschätzt. Bei reinen Nukleinsäurelösungen erhält man Werte zwischen 1,8 und 2,0; niedrigere Werte deuten auf eine Verunreinigung durch Proteine hin.

2.2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese können Nukleinsäuren auf Grund ihrer elektrischen Ladung nach Größe aufgetrennt werden. Abhängig von der Größe der aufzutrennenden DNA bzw. RNA-Moleküle wird die Konzentration der Agarose im Gel gewählt. Für die durchgeführten Analysen konnten 2 %-Agarose-Fertiggele

(siehe 2.1.4) verwendet werden. In diesen ist bereits der Farbstoff Ethidiumbromid enthalten, durch den Nukleinsäuren bei Anregung mit UV-Licht in der Farbe rot-orange (λ = 560 nm) sichtbar werden. Vor dem Auftragen in die Probentaschen wurden die DNA-Proben mit 6x-Probenpuffer (1/5 des Gesamtvolumens) vermischt. Die Elektrophorese wurde in einem Feld von 8 V/cm durchgeführt bis der Farbstoff des Probenpuffers sich 2 cm vor Gelende befand. Das durch UV-Beleuchtung (λ = 312 nm) auf einem Transilluminator sichtbare Bandenmuster wurde mit Hilfe eines Video-Geldokumentationsgeräts aufgezeichnet.

6x DNA-Probenpuffer: 15 % (m/V) Ficoll, 0,25 % (m/V) Bromphenolblau

2.2.1.4 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wurde in dieser Arbeit zur enzymatischen *in vitro*-Vervielfältigung bestimmter cDNA-Abschnitte eingesetzt. Diese wurden durch zwei Oligonukleotide (Primer, siehe 2.1.6.1), die den zu amplifizierenden Bereich begrenzen, definiert. Für die Reaktion, die aus sich wiederholenden Zyklen der DNA-Doppelstrangdenaturierung, der Anbindung beider Primer und ihrer Verlängerung besteht, wurden Reaktionspuffer, hitzestabile Taq DNA-Polymerase und dNTPs von Roche Applied Science (siehe 2.1.3) verwendet.

Standardansatz einer Polymerase-Kettenreaktion:

5,0 µl	10 x PCR-Puffer
1,0 µl	Nukleotid-Mischung, 10 mM insgesamt
3,0 µl	10 nM Primer „forward“
3,0 µl	10 nM Primer „reverse“
0,4 µl	Taq-DNA-Polymerase (5 u/µl)
3,0 µl	cDNA (20 ng/µl)
34,6 µl	Wasser

PCR-Standardprogramm:

4 min	94°C	
30 sec	94°C (Denaturierung)	35 Zyklen
30 sec	60°C (Primeranlagerung)	
1 min	72°C (Elongation)	
7 min	72°C	

Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte durch Agarose-Gelelktrophorese (siehe 2.2.1.3).

2.2.1.4.1 Reverse Transkription als Teil einer RT-PCR

Zu isolierter RNA komplementäre einzelsträngige DNA (cDNA) wurde mittels *reverser Transkription* (RT) synthetisiert. Dazu wurden die „TaqMan Reverse Transcription Reagents“ (siehe 2.1.3) nach Herstellangaben verwendet. Der Standard-Reaktionsansatz bestand aus 1x RT-Puffer mit 2,5 mM $MgCl_2$, je 500 µM der vier dNTPs, 2,5 µM einer Mischung aller möglichen Hexanukleotide, 0,4 U/µl RNAseinhibitor und 1,25 µl reverser Transkriptase. Pro 10 µl Reaktionsvolumen wurden 200 ng RNA in cDNA umgeschrieben, indem die auf Eis gemischten Komponenten des Reaktionsansatzes in einem PCR-Gerät bei folgenden Bedingungen inkubiert wurden:

10 min	25°C
30 min	48°C
5 min	95°C

Die so erhaltene cDNA wurde bei -20°C gelagert.

2.2.1.4.2 Quantitative Echtzeit-PCR

Die *quantitative Echtzeit-PCR* beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR, erlaubt aber zusätzlich eine Quantifizierung der PCR-Produkte während der Amplifikation. Die Messung der von der Produktemenge abhängigen Fluoreszenzsignale findet dabei bei den meisten Varianten dieser Methode während des Anlagerungsschrittes oder der Elongation in jedem Zyklus statt. In dieser Arbeit wurde mittels *reverser Transkription* hergestellte cDNA amplifiziert, was einen Rückschluss auf die Stärke der Transkription bestimmter Gene erlaubte.

Statt der verbreiteten Hydrolyse-Sonden (TaqMan-Prinzip) wurden „QuantiProbe"-Sonden verwendet, die zusammen mit den PCR-Primern von Qiagen als „QuantiTect Custom Assay" (siehe 2.1.6.2) bezogen wurden. Die „QuantiProbe"-Sonden sind sequenzspezifische zweifach-markierte Oligonukleotide. Am 3'-Ende sind sie mit einem Fluoreszenzfarbstoff und am 5'-Ende mit einem Quencher markiert. In Lösung bilden die „QuantiProbe"-Sonden Strukturen, in denen das Fluoreszenzsignal vom Quencher unterdrückt wird. Wenn die Sonde während der PCR mit ihrer Zielsequenz hybridisiert, entfernen sich Fluorophor und Quencher voneinander und das Fluoreszenzsignal kann detektiert werden. Tetraspanin-spezifische Sonden waren mit FAM markiert und konnten zusammen mit einer Yakima Yellow®-markierten Sonde gegen das als konstant exprimiert angenommene β2-Mikroglobulin (B2M) in Duplex-Reaktionen eingesetzt werden.

Standard-Duplexansatz zur Echtzeit-PCR:

12,5 µl	2 x QuantiTect PCR MasterMix
1,25 µl	20 x Primer-Mischung (Tetraspanin)
1,25 µl	20 x QuantiProbe-Sonde(Tetraspanin)
1,25 µl	20 x Primer-Mischung (B2M)
1,25 µl	20 x QuantiProbe-Sonde (B2M)
5,0 µl	cDNA (20 ng/µl)
2,0 µl	Wasser

PCR-Bedingungen:

15 min	95°C	
45 sec	94°C (Denaturierung)	45 Zyklen
45 sec	56°C (Primeranlagerung)	
45 sec	76°C (Elongation)	

Die PCR mit Detektion der Fluoreszenzsignale wurde mit einem „ABI Prism 7700 Gene Analyzer“ durchgeführt.

Die Transkriptmenge der Tetraspanine wurde auf die des β2-Mikroglobulins bezogen, dessen Expression als konstant angenommen wurde. Dazu wurden zunächst Mittelwerte der Ct–Werte (Zahl der PCR-Zyklen, bei der während der PCR ein festgelegter Fluoreszenzgrenzwert überschritten wird) der Dreifachbestimmungen berechnet. Für jede Probe wurde dann die Differenz der Ct-Werte von B2M und dem untersuchten Tetraspanin (ΔCt) gebildet. Unter der Annahme, dass beide Amplifikationen mit gleicher Effizienz verlaufen und im differenziellen Bereich eine dem theoretischen Wert (~ 2^n) entsprechende Produktbildung erfolgt, entspricht $2^{\Delta Ct}$ dem Verhältnis der Mengen der cDNAs des untersuchten Tetraspanins und B2M [13]. Beobachtete Unterschiede der $2^{\Delta Ct}$-Werte zwischen verschieden behandelten Proben als Einzelwerte von Mehrfachbestimmungen wurden mit dem Mann-Whitney-Test auf ihre statistische Signifikanz geprüft.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Kultivierung von immortalisierten retinalen Endothelzellen

Für alle durchgeführten Experimente wurden durch humane Telomerase immortalisierte mikrovaskuläre retinale Enothelzellen aus dem Rinderauge (*immortalized bovine retinal endothelial cells, iBREC*) verwendet [20]. Die Zellinie exprimiert typische Endothelzellmarker wie z. B. den von Willebrandt-Faktor (vWF) und das “vascular endothelial cadherin“ (VECad).

Für die Kultivierung von iBREC wurde spezielles Kulturmedium für mikrovaskuläre Endothelzellen (Endothelial Cell Growth Medium MV, ECGM) der Firma PromoCell verwendet. Dieses basiert grundsätzlich auf der Rezeptur des MCDB131-Mediums [44], dem zusätzlich noch FCS, Wachstumsfaktoren, Hydrokortison sowie 300 mg/l Geneticin zur Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks zugesetzt wurde. Um den Einfluss eines erhöhtem Glukosegehalts im extrazellulären Raum auf die Zellen zu untersuchen, wurde dem Medium Glukose einer Konzentration von bis zu 10 g/l zugefügt (ergab ECGM-hG). Für spezielle Assays wurde auch serum-freies Kulturmedium (Endothelial Cell Basal Medium MV, EBGM) verwendet. Alle Oberflächen auf denen die iBREC kultiviert wurden, mussten zuvor 1 Stunde zur Beschichtung mit Fibronektinlösung (50 µg/ml) inkubiert werden.

Die adhärenten iBREC wurden in 6 ml Medium bei 37°C in einer Atmosphäre mit 5 % CO_2 und maximaler Luftfeuchtigkeit in 25 cm^2-Kulturflaschen (Greiner bio-one) kultiviert. Zur weiteren Kultivierung wurde 1/8 der Gesamtmenge der eine konfluente Schicht bildenden Zellen (dann ca. 1,5 x 10^6 Zellen/Flasche) in ein neues Kulturgefäß überführt. Hierfür wurden die Zellen mit Kalzium- und Magnesium-freiem PBS gewaschen und durch Inkubation mit 1 ml Accutase-Fertiglösung für 5 min im Brutschrank vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst. Nach vollständigem Ablösen der Zellen wurde die Protease durch Zugabe von 10 ml serumhaltigem Medium inaktiviert, bevor die Zellsuspension in ein 15 ml-Röhrchen zum Abzetrifugieren der Zellen in 7 min bei 210 x g überführt wurde. Das Zellpellet wurde in 8 ml frischem Medium resuspendiert und 1 ml der Zellsuspension in ein neues Kulturgefäß mit 5 ml frischem Medium gegeben.

ECGM:	Promocell-Medium mit folgenden Zusätzen (Endkonzentrationen): 0,4% (V/V) ECGS/H, 5% (V/V) FCS, 10 ng/ml EGF, 1 g/l Glukose, 10 mM $MgCl_2$, 2,8 µM Hydrokortison, 300 mg/l Geneticin
EBGM:	wie ECGM, jedoch ohne FCS
ECGM-hG:	wie ECGM, aber mit 2-10 g/l Glukose

PBS:	1 mM KH_2PO_4, 155 mM NaCl, 3 mM NaH_2PO_4, pH 7,4
Fibronektin-Stammlösung:	0,05 mg/ml Fibronektin in PBS
Glukose-Stammlösung:	50% (m/V) Glukose in H_2O, sterilfiltriert

2.2.2.2 Inhibierung der Glykosylierung von Proteinen

Zur Hemmung der N-Glykosylierung von Proteinen *in vivo* wurde Tunicamycin aus *Streptomycetes lysosuperficus* verwendet, das spezifisch die Bildung des Dolichol-PP-N-Acetylglucosamins hemmt. Die N-Gykosylierung in iBREC neu-synthetisierter Proteine wurde durch Zugabe von 2,5 µg Tunicamycin/ml ECGM für 48 h gehemmt.

Tunicamycin-Stammlösung:	1 mg/ml in 80% (V/V) Ethanol und 20% (V/V) 20 mM NaOH

2.2.2.3 Inhibierung und Stimulierung der Proteinkinase C - Aktivität

Um die Aktivität der Proteinkinase C (PKC) in iBREC zu hemmen bzw. zu stimulieren wurden dem Kulturmedium ECGM verschiedene Substanzen zugefügt. Mögliche Effekte auf Expression und Lokalisation verschiedener Proteine wurden nach bestimmten Inkubationszeiten durch Immunfluoreszenzfärbungen (siehe 2.2.2.5), FACS- (siehe 2.2.2.4) oder *Western blot*–Analysen (siehe 2.2.3.6) untersucht.

Zur Stimulierung der PKC wurden dem Kulturmedium (ECGM) für 24 h bis 48 h 100 nM Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) zugefügt. Als Kontrolle wurde das nichtreaktive, analoge 4α-Phorbol-12,13-didecanoat (4α-PDD) in gleicher Konzentration eingesetzt.

Die Aktivität der PKC wurde mit verschiedenen Substanzen in einem Zeitraum von 3 h bis zu 48 h gehemmt: Bisindolylmaleimide I (GF 109203X) und LY379196 wurden in einer Konzentration von 10 nM in ECGM eingesetzt. Um spezifisch die PKC_β zu inhibieren, wurde 3-(1-(3-Imidazol-1-ylpropyl)-1H-indol-3-yl)-4-anilino-1H-

pyrrole-2,5-dion (IAPD) in einer Konzentration von 30 nM verwendet. In Kontrolleexperimenten wurde parallel das nicht-hemmende Bisindolylmaleimide V (Ro 31-6045) in der jeweiligen Konzentration benutzt.

2.2.2.4 Durchflusszytometrie

Die Expression von Oberflächenproteinen in iBREC wurde durch durchflusszytometrische FACS-Anaylsen bestimmt. Dazu wurden konfluente Zellen einer 25 cm^2-Kulturflasche (ca. 1,5 x 10^6 Zellen) mit Accutase abgelöst und in kaltem PBS aufgenommen. Das durch Zentrifugation für 7 min bei 210 x g gewonnene Zellpellet wurde in 250 µl kaltem PBS/1% FCS resuspendiert, in ein FACS-Röhrchen überführt und 1 h auf Eis mit einem zugesetzten, gegen das Zielprotein gerichteten Antikörper (siehe 2.1.7.1) inkubiert. Die Zellen wurden nach einmaligem Waschen mit 3 ml kaltem PBS und Abzentrifugieren in 250 µl einer Lösung in PBS/1% FCS des Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sekundärantikörpers (AlexaFluor 488-Konjungat; siehe 2.1.7.2) resuspendiert und für 1 h auf Eis gestellt. Nach erneutem Waschen mit 3 ml PBS (1 x) und Zentrifugieren wurden die Zellen in 500 µl 0,02 % (m/V) EDTA in PBS aufgenommen. Zum Ausschluss von beschädigten Zellen mit permeabler Membran wurde der Zellsuspension vor der Analyse Propidiumiodid in einer Endkonzentration von 4,5 µg/ml zugefügt. Um die Spezifität der Antikörperreaktion zu überprüfen, wurden zur Kontrolle Zellen mit einem Kontrollantikörper (gegen ein nicht in Zellen vorkommendendes Hapten) gleichen Typs anstelle des Erstantikörpers unter gleichen Bedingungen behandelt. Die Fluoreszenz der Zellen wurden mit dem Flusszytometer („Fluorescence Activated Cell Sorter“) FACS Calibur (Becton Dickinson) gemessen und mit der Software „Cell Quest Pro“ ausgewertet. Dazu wurden je Probe 75 000 lebende, intakte Zellen hinsichtlich ihrer Fluoreszenzintensität in einem Bereich von 488 nm analysiert. Signale, die stärker waren als in der jeweiligen Kontrolle, wurden als Tetraspanin-spezifische Fluoreszenz betrachtet, deren Intensität von der Stärke der Expression abhängt. Beschädigte Zellen mit permeabler Membran, in die Propidiumiodid (Absorbtion bei 590 nm) eindringen konnte, wurden ausgeschlossen.

2.2.2.5 Immunfluoreszenzfärbung

Zur Vorbereitung einer Immunfluoreszenzfärbung wurden die iBREC auf Zweikammer-Glasobjektträgern in einer Dichte von 10^5 Zellen / Kammer ausgesät und 3 Tage unter Standardbedingungen kultiviert. Die Zellen wurden dann mit kaltem PBS, dem Protease-Inhibitoren (Complete Mini, EDTA-free; siehe 2.1.3) zugesetzt waren, gewaschen. Alle folgenden Waschschritte (jeweils 1 x 1 min, 3 x 3 min) wurden mit leicht gekühltem PBS (~ 15°C) in einer Färbeküvette für Objektträger durchgeführt. Die Zellen wurden 9 min mit vorgekühlten Methanol und anschließend 1 min mit vorgekühlten Aceton bei –20°C fixiert. Nach Waschen mit PBS wurden mit 10% FCS in PBS in 30 min bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer Stellen unspezifischer Proteinbindung blockiert. Es folgten die Inkubationen mit dem gegen das Zielproteingerichteten Erstantikörper und anschließend mit dem Fluoreszenzfarbstoff-markierten Zweitantikörper (abhängig vom Typ des Erstantikörpers, siehe 2.1.7.2) im Dunkeln jeweils für 1 h bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer. Die Primärantikörper wurden in verschiedenen Konzentrationen in 1% FCS/PBS verdünnt (siehe 2.1.7.1); die Detektionsantikörper wurden in einer Endkonzentration von 2 µg/ml eingesetzt. Nach dem Blockieren und den Antikörperreaktionen wurden die Zellen jeweils mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden abschließend mit „Vectashield Mounting Medium“ (mit oder ohne DAPI zur Gegenfärbung der Zellkerne) eingedeckt, bevor die antigenspezifische Fluoreszenz durch Fluoreszenzmikroskopie mit einem Leica DM4000B (Leica Microsystem) analysiert wurde.

Um die Expression und subzelluläre Lokalisation zweier Proteine gleichzeitig zu bestimmen, wurden die Zellen nach dem Blockieren nacheinander wie für die Einzelfärbungen beschrieben (siehe oben) mit Kombinationen von Primär- und dazugehörigem Sekundärantikörper inkubiert. Diese Methode konnte auch bei Primärantikörpern des gleichen Typs angewendet werden, wenn zuerst ein $F(ab')_2$-Sekundärantikörper verwendet wurde. Um die Spezifität der Antikörper beurteilen und eventuelle Kreuzreaktionen erkennen zu können, wurden immer parallel Einzelfärbungen durchgeführt.

2.2.2.6 Migrationsassay

Die Migration von iBREC (kultiviert unter Standardbedingungen oder in Medium mit 4,5 g/l Glukose) durch die Poren einer Membran wurde in einer modifizierten Boyden-Kammer [50], die aus einer 12-Loch Zellkulturplatte und Einsätzen mit einer porösen Polyethylenterephthalat-Membran (8 µm Porengröße, Durchmesser 1 cm^2) bestand, gemessen. Zunächst wurde die untere Kammer mit serumfreiem Medium (EBGM), das 5 µg/ml Fibronektin oder (als Kontrolle) 5 µg/ml BSA enthielt, befüllt. Die Membraneinsätze wurden anschließend eingesetzt und 1 h bei 37°C vorinkubiert, bevor je 400 µl EBGM und 100 µl einer Suspension von 10^5 Zellen im gleichen Medium hineingegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert wurden. Um den Einfluss potentiell inhibierender Antikörper gegen CD9, CD29, CD49e oder ADAM10 zu untersuchen, wurden je 4 x 10^5 iBREC für 30 min bei 37°C in 400 µl EBGM in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß im Wasserbad mit diesen Antikörpern oder einem Konroll-IgG (jeweils 8 bis 10 µg) inkubiert, bevor je 100 µl dieser Zellsupension (10^5 Zellen) in die vorinkubierten Membraneinsätze gegeben wurden. Für jede der getesteten experimentellen Bedingungen wurden mindestens drei Parallelbestimmungen durchgeführt. iBREC, die nicht durch die Poren gewandert waren und sich nach der Inkubation noch immer auf der Oberseite der Membran befanden, wurden mit Hilfe eines sterilen Wattestäbchens entfernt. Die Membraneinsätze wurden anschließend zweimal mit kaltem PBS gewaschen, wonach sich nur die auf die Unterseite der Membran gewanderten Zellen in den Einsätzen befanden. Diese wurden in vorgekühltem Methanol 15 min bei –20°C fixiert und noch einmal mit kaltem PBS gewaschen. Die Membranen wurden mit einem Skalpell aus den Einsätzen gelöst, auf Objekträger gelegt und mit DAPI-haltigem Eindeckmedium und Deckgläschen bedeckt. In vier zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern pro Membraneinsatz wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie die Zahl der gewanderten Zellen bestimmt. Beobachtete Unterschiede wurden mit dem Mann-Whitney-Test auf ihre Signifikanz hin überprüft. Zur Normierung wurde die Anzahl der migrierten Zellen in Kontrollansätzen als Basiswert (100%) definiert.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Zelllyse und Solubilisierung von Membranproteinen

Zur Herstellung von Zelllysaten wurden iBREC mit kaltem PBS gewaschen, abgeschabt und in ein 15 ml-Röhrchen überführt. Die Zellsupension wurde 7 min bei 210 x g zentrifugiert. Das vom Überstand befreite Zellpellet wurde in 1,5 ml kaltem Lysepuffer pro 10^8 Zellen resuspendiert und 1 h auf Eis unter leichtem Schwenken inkubiert. Unlösliche Zellbestandteile wurden danach durch zwanzigminütige Zentrifugation bei 14 000 x g und 4°C abgetrennt. Der die löslichen und solubilisierten Proteine enthaltende Überstand wurde in frische 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und nach dem Einfrieren mit flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert.

Lysepuffer: 1 % Brij 97 (V/V) in 40 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2,5 mM $MgCl_2$, 2,5 mM $CaCl_2$, „Complete Mini, EDTA-free"-Proteaseinhibitoren

2.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentrationen

Zur Bestimmung des Gesamtproteingehalts von Zelllysaten wurde der „BCA Protein Assay" von Thermo Scientific (siehe 2.2.3.1) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Messung bei 570 nm und die Auswertung der Daten erfolgte mit einem Mikrotiterplatten-Photometer „Tecan Sunrise TW" und der dazugehörigen Software „Megellan". Es wurden Dreifachbestimmungen mit BSA als Eichprotein durchgeführt. Die Probenkonzentrationen wurden mit einer Eichgerade aus neun verschiedenen BSA-Konzentrationen von 25 µg/ml bis 2 mg/ml berechnet. Dabei wurden die Proben so verdünnt, dass deren zu bestimmenden Konzentrationen sich im linearen Bereich der Eichgeraden (0,05 bis 1,5 mg/ml) befanden.

2.2.3.3 *In-vitro*-Dephosphorylierung

Um zu überprüfen, ob das Tetraspanin CD9 phophoryliert vorliegt, wurden aus

2,7 x 10^7 iBREC 600 µl Zelllysat hergestellt (siehe 2.2.3.1). Die darin enthaltenen Proteine wurden mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) *in vitro* dephosphoryliert. Dazu wurden 54 µl Zelllysat mit 6 µl CIP-Reaktionspuffer und 30 u CIP 1 h bei 37°C inkubiert. Als Negativkontrolle wurde die gleiche Menge Zelllysat ohne CIP (aber mit Reaktionspuffer) gleich behandelt. Als weitere Kontrolle wurde das unbehandelte Zelllysat bei der nachfolgenden Analyse durch *Western blot* (siehe 2.2.3.7) mit einem anti-CD9-Antikörper zum Vergleich aufgetragen.

2.2.3.4 Proteinfraktionierung

Mit dem „ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction Kit“ (siehe 2.1.3) wurden nach Herstellerangaben subzellulären Fraktionen der Proteine aus Zytosol, Membranen und Organellen, Zellkern und Zytoskelett gewonnen. Die iBREC wurden vorher in 25 cm^2-Kulturflaschen in verschiedenen Kulturmedien (ECGM, ECGM-hG oder ECGM mit PKC-Modulatoren) bis zum Erreichen einer konfluenten Zellschicht kultiviert. Die Proteine der einzelnen Fraktionen wurde mit einem Vakuumkonzentrator auf ¼ des Ausgangsvolumens konzentriert bevor deren Proteingehalt (siehe 2.2.3.2) gemessen wurde. Beim folgenden Vergleich des Vorkommens bestimmter Proteine in den verschiedenen Kompartimenten durch *Western blot*–Analysen (siehe 2.2.3.6) wurden von jeder Fraktion 4 µg pro Spur des Gels eingesetzt.

2.2.3.5 Co-Immunpräzipitation

Um potentielle Interaktionspartner des Tetraspanins CD9 identifizieren zu können, wurden zunächst Zelllysate (siehe 2.2.3.1) ausgehend von zehn Kulturschalen (Ø 15 cm) konfluenter iBREC (ca. 10^7 zellen) hergestellt. Zu 300 - 500 µl dieser Proteinlösung wurde der gegen das Zielprotein gerichtete Antikörper (Endkonzentration 1 µg/100 µl) pipettiert. Zur Bildung der Antigen-Antikörper-Komplexe wurde die Lösung leicht schwenkend auf Eis inkubiert. In einem weiter gleich behandelten Kontrollansatz zum Ausschluss unspezifisch bindender

Proteine wurde parallel ein Teil des Solubilisats mit einem Kontrollantikörper des gleichen Typs versetzt.

Währendessen wurden für jeden Ansatz pro µg eingesetzten Antikörpers 15 µl einer Suspension von Protein G Plus/Protein A-Agarose in 1 ml Lysepuffer (siehe 2.2.3.1) gewaschen, wobei die Partikel durch Zentrifugieren (wie auch bei allen folgenden Schritten 3 min bei 200 x g) abgetrennt wurden. Die vorbehandelten Protein A/G-Partikel wurden nach Zugabe der mit Antikörper inkubierten Proteinlösungen 1 h bei 4°C langsam rotierend bewegt, um das Sedimentieren der Protein A/G-Agarose zu verhindern. Anschließend wurden die Protein A/G-Partikel (mit gebundenem Antigen-Antikörper-Komplex) abzentrifugiert und unspezifisch gebundene Proteine durch dreimaliges Waschen mit je 1 ml Lysepuffer entfernt. Nach weitgehendem Entfernen des Überstandes nach dem letzten Waschschritt erfolgte die Elution und Dissoziation der Komplexe durch zehnminütige Inkubation bei 60°C mit 1 % SDS (V/V) in Wasser. Nach Zentrifugation wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und zur Analyse vorbereitet oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zunächst bei -80°C gelagert.

2.2.3.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde grundsätzlich nach Laemmli (1970), aber mit einem modifizierten Gel-Puffer-System durchgeführt. Es wurden Fertiggele (siehe 2.4.1) mit verschiedenen Acrylamidkonzentrationen (8% bis 12% bzw. Gradientengele von 4-20%) verwendet. Die Proteinlösungen, z.B. Immunpräzipitate, wurden mit ¼ ihres Volumens Probenpuffer vermischt und 5 min bei 95°C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Proben neben einem aus farbstoffmarkierten Proteinen bestehenden Größenstandard in die Probentaschen des Gels pipettiert. Die Elektrophorese fand in dem für die verwendeten Gele vorgesehen Tris-HEPES-SDS-Laufpuffer bei einer Feldstärke von 7 V/cm bis zu einer optimalen Auftrennung der Markerproteine statt.

5 x Probenpuffer (nicht reduzierend):	375 mM Tris-HCl pH 6,8, 30% (V/V) Glyzerin, 15% (m/V) SDS, 0,05% (V/V) Bromphenolblau
5 x Probenpuffer (reduzierend):	5 x Probenpuffer mit zusätzlich 10% (V/V) β-Mercaptoethanol
Tris-HEPES-SDS-Laufpuffer:	100 mM Tris, 100 mM HEPES, 3 mM SDS, pH 8,0

2.2.3.7 Immunblot von Proteinen *(Western blot)*

Bei diesem Verfahren werden Proteine mittels SDS-PAGE nach ihrer Größe aufgetrennt und auf eine Membran übertragen, auf der dann einzelne Proteine mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden können. Zum Übertragen der nach Molekülgrößen aufgetrennten Proteine auf Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membranen unter Erhalt des Bandenmusters wurde das „Semi-Dry"-Blotverfahren angewandt [48].

Der elektrophoretische Transfer erfolgte mit einem horizontal ausgerichteten Elektroblotter von der Kathode (oben) zur Anode (unten) in einer wie folgt, möglichst luftblasenfrei aufgebauten Transfereinheit: Vier Filterpapiere getränkt in Blotpuffer I, zwei Filterpapiere, sowie darauf die PVDF-Membran getränkt in Blotpuffer II, Polyacrylamidgel, vier Filterpapiere getränkt in Blotpuffer III. Die verwendeten PVDF-Membranen wurden zunächst mit Methanol benetzt, durch Waschen mit Wasser hydrophilisiert und wie die Polyacrylamidgele in Blotpuffer II präequilibriert. Der Proteintransfer erfolgte in 1 h bei einer konstanten Stromstärke von 1,5 mA/cm^2 Membranfläche bei Raumtemperatur.

Nach dem Transfer der Proteine aus dem Gel auf die PVDF-Membran wurde diese 1 h in Blockierpuffer inkubiert, um alle Proteinbindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Der gegen das nachzuweisende Protein gerichtete Antikörper wurde in Blockierpuffer auf die durch Versuche ermittelte optimale Konzentration (siehe 2.1.7.1) verdünnt. In dieser Lösung wurde die Membran entweder 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C unter Schwenken inkubiert. Nach fünfmaligen Waschen (jeweils 5 min; 2 x TBS, 1 x TBSTween, 2 x

TBS) wurde der in Blockierpuffer verdünnte Detektionsantikörper (anti-Maus- oder anti-Kaninchen-IgG an Peroxidase gekoppelt; siehe 2.1.7.2) für 60 min bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben. Der Nachweis der sich an der Membranoberflächen gebildeten Immunkomplexe erfolgte nach fünf Waschschritten mit TBS bzw. TBSTween (s.o.) durch Aufbringen des SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (siehe 2.1.3) nach Angaben des Herstellers. Die Chemilumineszenzsignale wurden durch Autoradiografie sichtbar gemacht.

Blotpuffer I:	300 mM Tris, 20 % (V/V) Methanol (pH 10,4)
Blotpuffer II:	25 mM Tris, 20 % (V/V) Methanol (pH 10,4)
Blotpuffer III:	25 mM Tris, 40 mM 6-Aminohexansäure, 0,02 % (m/V) SDS, 20 % (V/V) Methanol (pH 9,4)

Bei allen Blotpuffern ergeben sich die pH-Werte aus den Komponenten und es sollte keine Nachjustierung erfolgen.

TBS:	40 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4
TBSTween:	40 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,05% (V/V) Tween 20, pH 7,4

2.2.3.8 Coomassiefärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen

Durch SDS-PAGE aufgetrennte Proteine wurden durch Anfärbung der Banden mit dem Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau R-250 sichtbar gemacht. Hierzu wurden die Gele viermal 5 min in destilliertem Wasser gewaschen und anschließend mit der fertigen Farblösung des “Imperial Protein Stain“-Kit (siehe 2.1.3) 2 h bei Raumtemperatur unter Schwenken gefärbt. Das Entfärben in destilliertem Wasser erfolgte anschließend über Nacht bei 4°C.

2.2.3.9 Silberfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen

Die Silberfärbung wurde durchgeführt, wenn ihre hohe Sensitivität im Vergleich zur Coomassiefärbung erforderlich war. Nach der Commassiefärbung wurden die Polyacrylamidgele vollständig mit destillierten Wasser entfärbt und die Proteinbanden anschließend mit dem „Fire –Silver -Staining- Kit“ (siehe 2.1.3) nach Herstellerangaben gefärbt.

2.2.3.10 Massenspektrometrische Identifizierung von Proteinen über Peptidmassen

Zur Identifikation potentieller Interaktionspartner des Tetraspanins CD9 wurde eine Co-Immunpräzipitation ausgehend von einer großen Zellzahl (2,4 x 10^9 Zellen) mit sich anschließender Identifizierung der gebundenen Proteine über massenspektrometrisch bestimmte Peptidemassen durchgeführt. Die Proteine wurden nach der Co-Immunpräzipitation (siehe 2.2.3.5) mit SDS-PAGE analysiert, im Gel mit Coomassie R-250 (siehe 2.2.3.8) gefärbt und anschließend einer Silberfärbung (siehe 2.2.3.9) unterzogen. Proteinbanden, die in der Probe der Co-Immupräzipitation mit einem anti-CD9-Antikörper (Maus-IgG_2, Klon IVA50) im Vergleich zu Kontroll-Co-Immunpräzipitation mit einem Maus-IgG_2 zusätzlich auftraten, wurden ausgeschnitten. Die massenspektrometrische Identifizierung der Proteine wurde von der Firma „Proteome Factory AG“ (Berlin) durchgeführt.

Zur Vorbereitung der präparativen Co-Immunpräzipitationen wurden die iBREC in Kulturschalen (Ø 15cm) bis zur Konfluenz vermehrt, mit kaltem PBS gewaschen, abgeschabt und 7 min bei 210 x g abzentrifugiert. Die vom Überstand befreiten Zellpellets wurden bis zu ihrer Verwendung bei -80°C gelagert. Insgesamt 2,4 x 10^9 so gewonnene Zellen wurden in 50 ml Lysepuffer (siehe 2.2.3.1) 1 h unter leichtem Schwenken auf Eis solubilisiert. Durch Zentrifugieren (20 min bei 14 000 x g und 4°C) wurden unlösliche Zellbestandteile abgetrennt. Zu den 37 ml des gewonnenen Zelllysats wurden 40 µg anti-CD9-Antikörper gegeben. In einem Kontrollansatz wurde dem restlichen Zelllysat (13 ml) 14,5 µg anti-Maus-IgG_2

zugesetzt. Während der einstündigen Inkubation mit den Antikörpern auf Eis wurden die Solubilisate leicht geschwenkt.

Die Immunpräzipitation wurde wie beschrieben (siehe 2.2.3.5) durchgeführt mit 7,5 µl Protein G Plus/Protein A-Agarose pro µg der eingesetzten Antikörper und drei Waschschritten (1 x Lysepuffer, 2 x TBS), in denen die Partikel in einem Puffervolumen von je 10 ml resuspendiert wurden. Die Eluate wurden in neue 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und durch Verdampfung von Wasser unter schonenden Bedingungen in einem Vakuumkonzentrator auf ein Fünftel ihres Volumens konzentriert, bevor sie in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C zwischengelagert wurden.

Je 20 µl der Immunpräzipitate wurden unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen in einem 4 - 20 % Gradientengel durch SDS-PAGE analysiert. Zum Vergleich wurden zusätzlich in Probentaschen des Gels die verwendeten Antikörper aufgetragen. Die Proteine wurden mit Coomassie gefärbt (siehe 2.2.3.8) und die Bandenmuster des CD9-Immunpräzipitats mit denen der Kontrollprobe verglichen. Die so als spezifisch für die Präzipitation mit dem anti-CD9-Antikörper erkannten Banden wurden ausgeschnitten. Anschließend wurde die Gele einer Silberfärbung unterzogen (siehe 2.2.3.9), wonach zusätzlich erkennbare spezifische Proteinbanden ausgeschnitten wurden. Die ausgeschnitten Gelstücke wurden von der Firma Proteome Factory AG wie folgt kurz beschrieben prozessiert:

Die Proteine wurden noch im Gel mit Trypsin in Peptide gespalten. Diese wurden auf eine C18-Säule (Zorbax SB C18, 75 µm x 150 mm; Agilent Technologies) aufgetragen und durch Spülen mit einer Lösung aus 3% Acetonitril in 0,1% Ameisensäure von Salzen befreit. Anschließend wurden die Peptide in 40 min mit einem Gradienten von 5 – 40% Acetonitril in 0,1% Ameisensäure eluiert und massenspektrometrisch analysiert. Die erhaltenen Peptidmassen erlaubten die Identifizierung der Proteine mit geeigneter Software („Mascot search engine 1.9.0“; Matrix Science, London), die Daten in Proteindatenbanken nutzt, um mögliche Peptide bekannter Proteine zum Vergleich heranzuziehen. Die Firma Proteome Factory AG benutzte ein System aus folgenden Geräten: Agilent 1100

nanoLC System (Agilent Technologies, Böblingen), PicoTip Emitter (New Objective, Massachusetts) und das Massenspektrometer Esquire 3000 plus (Bruker, Bremen).

Die Relevanz der so ermittelten potentiellen Interaktionspartner von CD9 wurde durch weitere Co-Immunpräzipitationen mit anschließender *Western blot*-Detektion der Kandidatenproteine, sowie durch Doppel-Immunfluoreszenz-färbungen untersucht.

3 Ergebnisse

3.1 Expression der Tetraspanine CD9, CD63, CD81, CD82 und CD151 in iBREC

3.1.1 Expression für Tetraspanine kodierender RNAs

In dieser ersten Untersuchung zu Expression und funktioneller Relevanz von Tetraspaninen in retinalen mikrovaskulären Endothelzellen wurde zunächst ein grundlegendes Tetraspanin-Expressionsprofil (CD9, CD63, CD81, CD82, CD151) ermittelt. Dazu wurde aus den Zellen die Gesamt-RNA isoliert und eine RT-PCR mit Tetraspanin-spezifischen Primern durchgeführt. Zur Verifizierung der Spezifität der Signale wurden verschiedene Primerpaar für die einzelnen Tetraspanine verwendet (siehe Tabelle 1). Auch entsprachen die Größen der erhaltenen PCR-Produkte in allen Fällen den vorher aus den Sequenzen berechneten Werten. Mit den CD82-spezifischen Primern wurde kein PCR-Produkt erhalten, während von den anderen getesteten Tetraspaninen CD9-, CD63-, CD81- und CD151-spezifische Transkripte in iBREC deutlich nachgewiesen werden konnten (siehe Abbildung 4).

Tabelle 1: PCR-Primer zum spezifischen Nachweis von Tetraspanin-Transkripten (siehe 2.1.6.1) und Größe der Amplikons.

Amplikon	PCR-Primerpaar	Größe des erwarteten Produkts [bp]
CD9 A	CD9/F1 und CD9/R1	356
CD9 B	CD9/F2 und CD9/R1	269
CD63	CD63/F1 und CD63/R1	404
CD81 A	CD81/F1 und CD81/R1	274
CD81 B	CD81/F2 und CD81/R1	192
CD82 A	CD82/F1 und CD82/R1	442
CD82 B	CD82/F2 und CD82/R1	285
CD151	CD151/F1 und CD151/R1	245

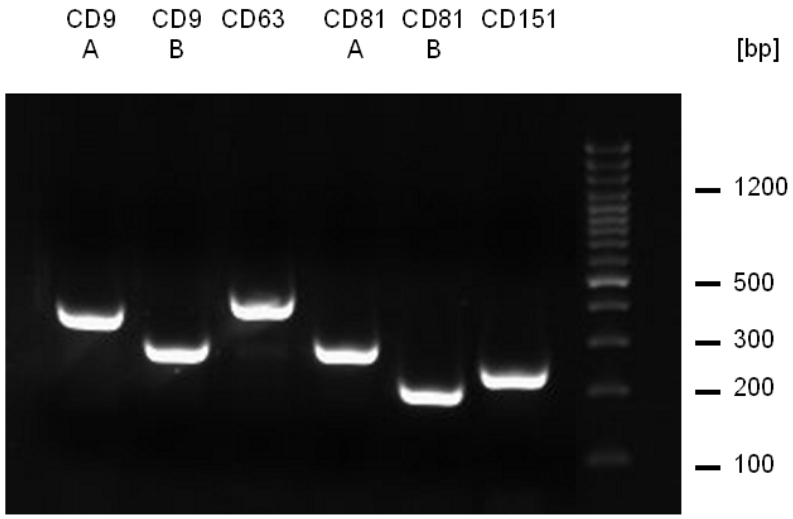

Abb. 4: Amplifikation von cDNA-Abschnitten der Tetraspanine CD9, CD63, CD81 und CD151.

Die RT-PCR wurde ausgehend von Gesamt-RNA aus iBREC durchgeführt. Dargestellt ist die Analyse der erhaltenen PCR-Produkte durch Agarose-Gelelektrophorese in einem 2%-Gel.

3.1.2 Analyse der Zelloberflächen-Expression der Tetraspanine

Um festzustellen, ob nach der Transkription der kodierenden DNA-Abschnitte tatsächlich auch die Proteine CD9, CD63 und CD151 in iBREC synthetisiert werden, wurden diese auf den Zellen mittels Durchflusszytometrie gemessen. Dazu wurden die bis zur Konfluenz vermehrten iBREC geerntet und mit einem Tetraspanin-spezifischen Antikörper (oder einem Kontroll-IgG) in Kombination mit einem Fluoreszenzfarbstoff–markierten Sekundärantikörper gefärbt. Eine starke CD9-spezifische Fluoreszenz in Abbildung 5A ließ erkennen, dass erhebliche Mengen des CD9-Proteins in konfluenten iBREC in der Plasmamembran vorkommen. Auch das Protein CD63 konnte deutlich auf der Zelloberfläche der iBREC nachgewiesen werden, auch wenn die CD63-spezifische Fluoreszenzintensität geringer war (siehe Abbildung 5B). Dagegen konnte auf der Zelloberfläche der iBREC das CD151-Protein nicht nachgewiesen werden, obwohl die für CD151–kodierende mRNA in diesen Zellen synthetisiert wird. Die Expression des CD81-Proteins in iBREC konnte nicht untersucht werden, da es kein Rinder-spezifischer anti-CD81-Antikörper erhältlich war.

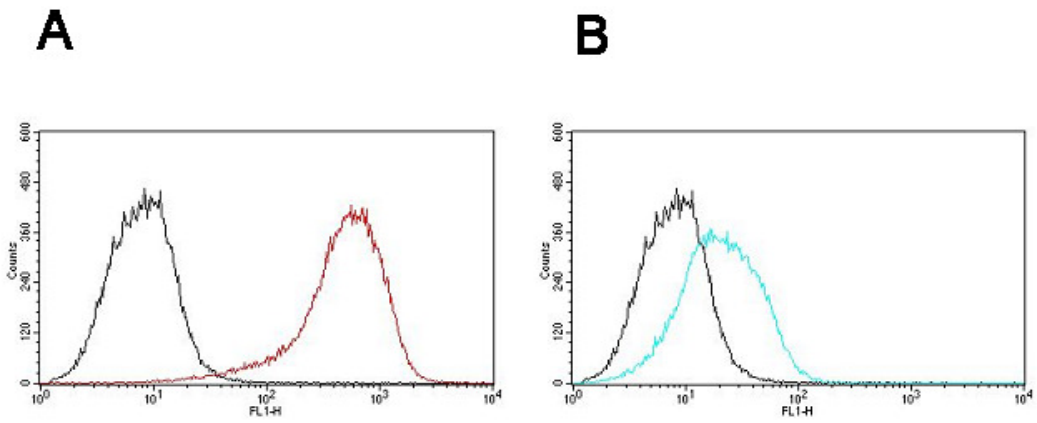

Abb. 5: Flusszytometrische Bestimmung der Zelloberflächenexpression der Proteine CD9 und CD63 in iBREC.

In den Histogrammen sind die ermittelten Zellzahlen (Ordinatenachsen) für die gemessenen Fluoreszenzintensitäten (Abszissenachsen) dargestellt. In Kontrollansätzen wurden Zellen anstelle des Primärantikörpers mit einem unreaktiven Maus-IgG inkubiert (schwarze Kurve).

A: Starke CD9-spezifische Fluoreszenz (rote Kurve).

B: Deutliche CD63-spezifische Fluoreszenz (türkisfarbene Kurve).

3.1.3 Subzelluläre Lokalisation von CD9 im Vergleich zu CD63

Die subzellulären Lokalisationen von CD9 und CD63 wurden mit Immunfluoreszenz-Mikroskopie bestimmt. Es zeigte sich (siehe Abbildung 6A), dass CD9 in konfluenten iBREC vorwiegend in der Plasmamembran lokalisiert ist, allerdings ist auch eine spezifische intrazelluläre Färbung zu erkennen. Dagegen konnte CD63 ausschließlich intrazellulär, in Form einer auf Lokalisation in Vesikeln hindeutenden granulären Anfärbung dargestellt werden. Der Vergleich von konfluenten und nicht konfluenten iBREC zeigte deutlich, dass CD9 erst nach Erreichen vollständiger Konfluenz der Zellen hauptsächlich in der Plasmamembran vorliegt. In subkonfluenten iBREC befindet sich dagegen CD9 vorwiegend in den Ausläufern der zueinander Kontakt suchenden iBREC und im Zellinnern. Diese intrazelluläre, vesikuläre Färbung wird mit zunehmender Zelldichte schwächer, bleibt aber auch in konfluenten iBREC teilweise erhalten. Die subzelluläre Lokalisation von CD63 wird nicht von der Dichte der Zellen beeinflusst (nicht abgebildet).

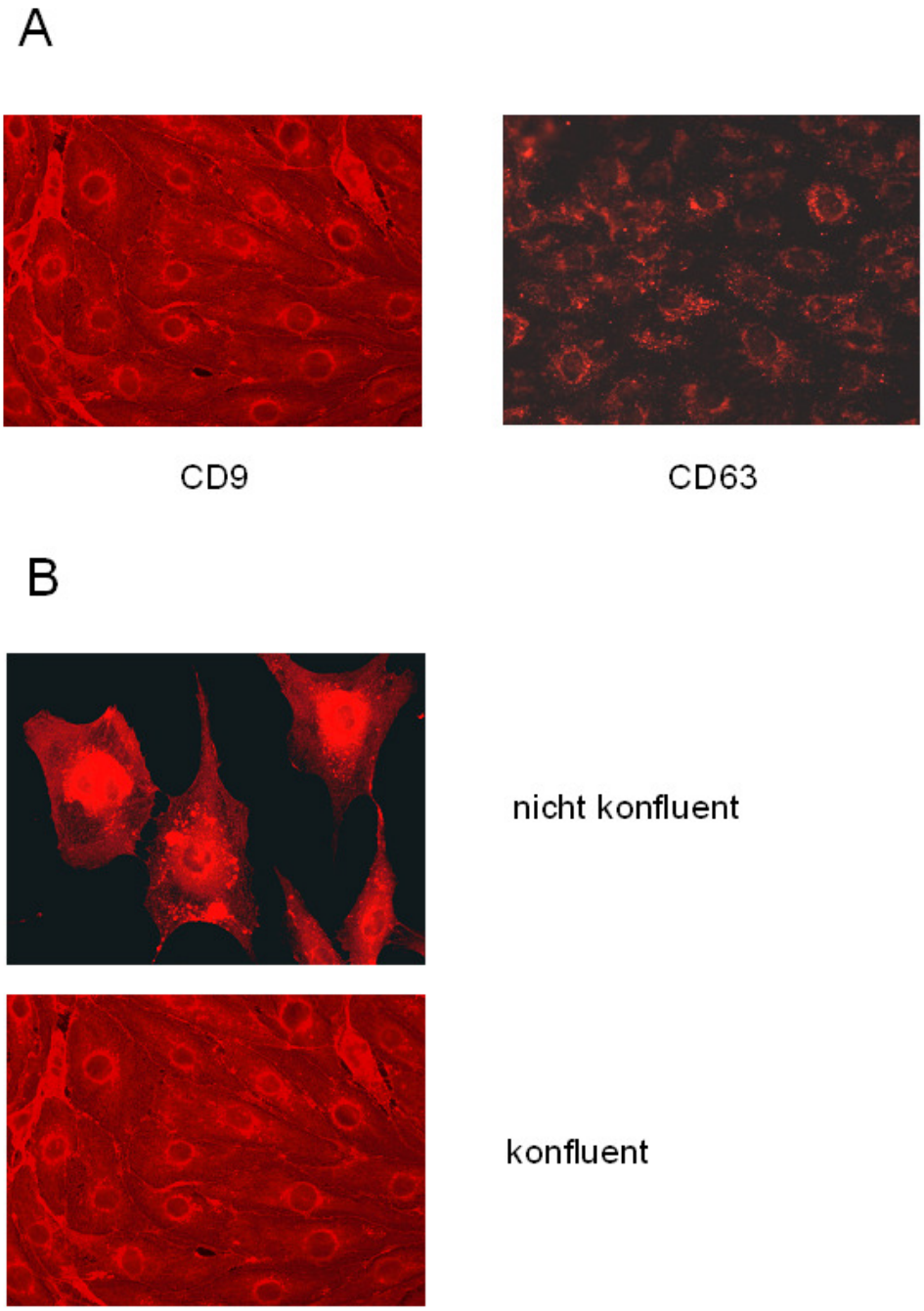

Abb. 6: Bestimmung der subzellulären Lokalisation von CD9 und CD63 in iBREC.
Dargestellt sind die Zellen nach Immunfluoreszenzfärbungen in 400-facher Vergrößerung.
A: In konfluenten iBREC ist CD9 vor allem intrazellulär mit besonders intensiver Färbung um den Zellkern lokalisiert, aber auch in der Plasmamembran zu erkennen. CD63 ist ausschließlich im Zytosol nachzuweisen.
B: Während in nicht konfluenten iBREC CD9 hauptsächlich als vesikuläre intrazelluläre Anfärbung dargestellt werden kann, liegt es in konfluenten Zellen teilweise in der Plasmamembran vor.

Um die subzelluläre Lokalisation von CD9 in konfluenten iBREC genauer zu untersuchen, wurden die Proteine verschiedener Zellkompartimente (Zytosol, Plasmamembran / andere Membranen, Nukleus und Zytoskelett) ausgehend von intakten Zellen nacheinander extrahiert. Durch *Western blot* wurde neben CD9 auch das Zytoskelett-Protein Vimentin als Organellenmarker bestimmt, um die korrekte Fraktionierung zu bestätigen. Tatsächlich konnte Vimentin nur in der Zytoskelett-Fraktion nachgewiesen werden (siehe Abbildung 7). Deutliche Mengen des CD9 konnten nur in den Proteinfraktionen der Plasmamembran und des Zytoskeletts nachgewiesen werden, nicht aber im organellfreiem Zytosol (siehe Abbildung 7), was eine Lokalisation in Zytoskelett-assoziierten Organellen bestätigt.

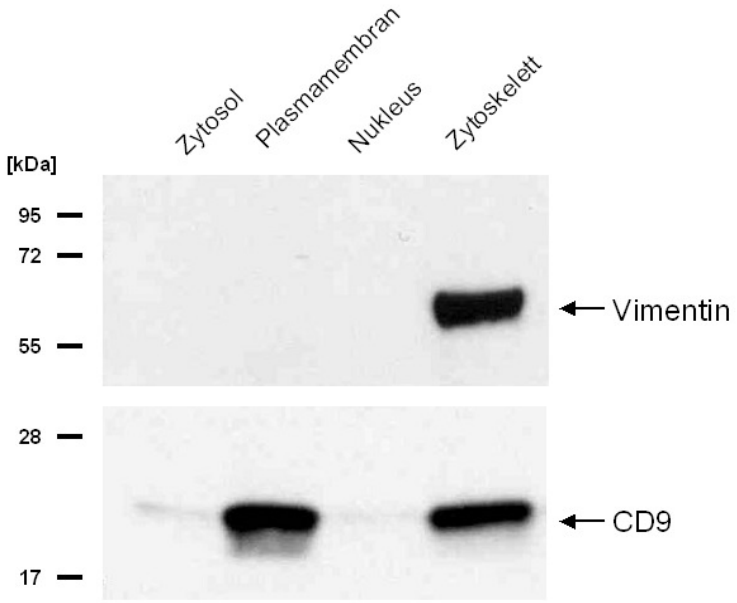

Abb. 7: Nachweis von CD9 in subzellulären Proteinfraktionen aus konfluenten iBREC.

Die Proteinfraktionen wurden hinsichtlich des Vorkommens von CD9 (unterer Blot) und des Zytoskelett-Markers Vimentin (oberer Blot) mittels *Western blot* geprüft. Vor dem spezifischen Nachweis dieser Proteine wurden von jeder Fraktion 4 µg in einem 12%igem SDS-Polyacrylamidgel getrennt. Erkennbar ist, dass CD9 in den Proteinfraktionen der Plasmamembran und des Zytoskeletts detektiert werden kann; Vimentin wie erwartet nur in der Zytoskelett-Fraktion.

3.1.4 Einfluss der Zelldichte auf die Transkription der Tetraspanine CD9, CD63 und CD151

Da die subzelluläre Lokalisation von CD9 von der Zelldichte der iBREC abhängig ist, wurde untersucht, ob die durch Transkription oder anders regulierte Menge Tetraspanin-spezifischer mRNAs mit der Zelldichte korreliert. Dazu wurden ausgehend von Gesamt-RNA von konfluenten und nicht konfluenten iBREC mittels Echtzeit-RT-PCR die relativen Mengen der für CD9, CD63, und CD151 kodierenden mRNAs bestimmt. Die Menge CD9-spezifischer Transkripte entsprach – unter der Annahme gleich effizienter Amplifikation – ungefähr der Menge der B2M-mRNA, CD151-spezifische Transkripte wurden mit etwa halber Häufigkeit bestimmt, während CD63-kodierende mRNA nur in geringen Mengen nachgewiesen werden konnte (nicht abgebildet).

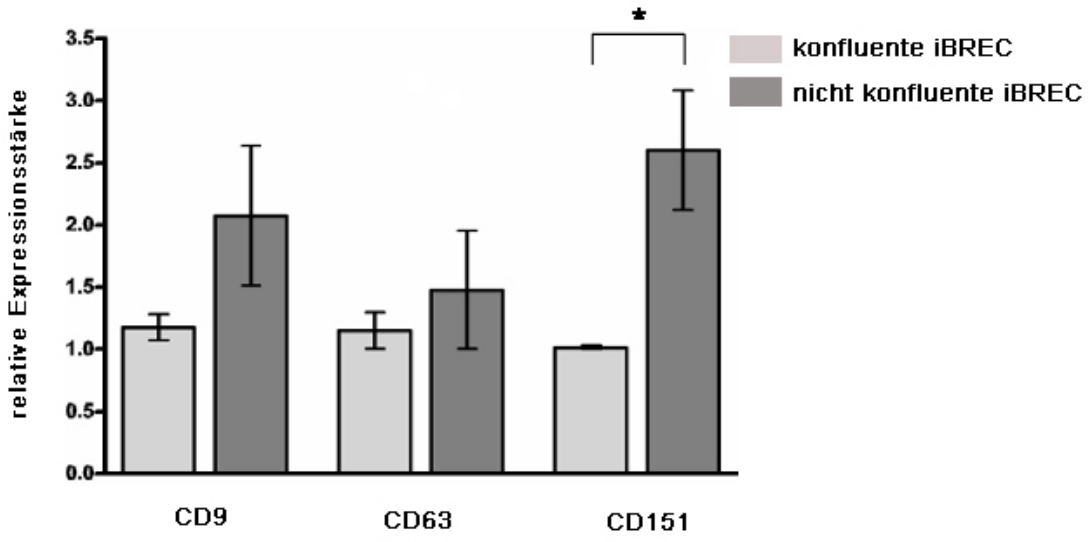

Abb. 8: Vergleich der relativen mRNA-Expression von CD9, CD63 und CD151 in konfluenten und nicht konfluenten iBREC.

Durch quantitative Echtzeit-RT-PCR wurden die Mengen der für die Tetraspanine CD9, CD63 oder CD151 kodierenden mRNAs in konfluenten und nicht konfluenten iBREC bestimmt. Beruhend auf der Annahme, dass die reverse Transkription und nachfolgende Amplifikationen der Tetraspanin- und B2M-kodierenden mRNAs gleich effizient war, wurden die Transkriptmengen der einzelnen Tetraspanine in Relation zur Menge der B2M-mRNA berechnet. Zur übersichtlicheren Darstellung wurde anschließend für jede gemessene mRNA auf den für konfluente Zellen ermittelten Wert normiert. Von den beobachteten Unterschieden war die stärkere CD151-Expression in nicht konfluenten Zellen statistisch signifikant (* $p < 0,05$; Mann-Whitney-Test).

3.2 Analyse der postranslationalen Modifikation des CD9 in iBREC

3.2.1 Untersuchung der Glykosylierung des CD9 in iBREC

Andere Arbeitsgruppen haben bereits gezeigt, dass ein Teil des CD9 glykosyliert vorliegt [80]. Ob dies auch in iBREC der Fall ist, wurde durch Inhibierung der N-Glykosylierung der Proteine untersucht. Dazu wurde konfluenten iBREC 2,5 µg/ml Tunicamycin für 48 h zugesetzt und mögliche Veränderungen des CD9 in Brij 97-Lysaten durch Western blot analysiert. Dabei zeigte sich (siehe Abbildung 9), dass in iBREC zwei Formen des CD9-Proteins vorliegen, von denen die kleinere mit einer scheinbaren molaren Masse von 26 kDa die Hauptmenge ausmacht und die größere (ca. 40 kDa) nur in relativ geringen Mengen durch *Western blot* nachgewiesen werden konnte. Nach Hemmung der N-Glykosylierung durch Inkubation der Zellen mit Tunicamycin konnte im Zell-Solubilisat die größere CD9-Variante nicht mehr nachgewiesen werden, während Menge und Migration der kleineren Form unverändert schienen.

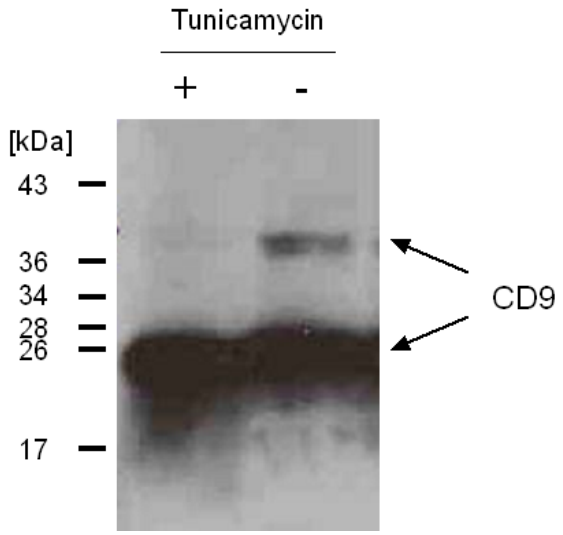

Abb. 9: Einfluss der Inhibierung der Glykosylierung von Proteinen in iBREC auf CD9.

Konfluente iBREC wurden 48 h mit 2,5 µg/ml Tunicamycin (+) bzw. mit demselben Volumen des zum Lösen des Tunicamycins verwendeten Gemisches aus Ethanol (80%) und Natronlauge (20 mM, 20%) (-) in ECGM inkubiert. Die *Western blot*-Analyse der Zell-Solubilisate zeigte, dass nach Inhibierung der Glykosylierung mit Tunicamycin die in geringem Anteil vorliegende größere CD9-Form (~ 40 kDa) nicht mehr in iBREC vorhanden war.

3.2.2 Untersuchung des Phosphorylierungszustands des CD9 in iBREC

Da die Phosphorylierung einzelner Aminosäuren bei der Interaktion von Proteinen untereinander häufig eine wichtige Rolle spielt [25] und frühe Publikationen zu CD9 Hinweise auf eine mögliche derartige Modifikation enthielten [80], wurde die Phosphorylierung des CD9 in iBREC durch *in vitro*-Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase (CIP) untersucht. In *Western blot*-Analysen so behandelter und unbehandelter Zell-Solubilisate mit Antikörpern gegen CD9 und Occludin (Positivkontrolle) zeigte sich, dass sich das Laufverhalten von Occludin veränderte, nicht aber das von CD9 (siehe Abbildung 10).

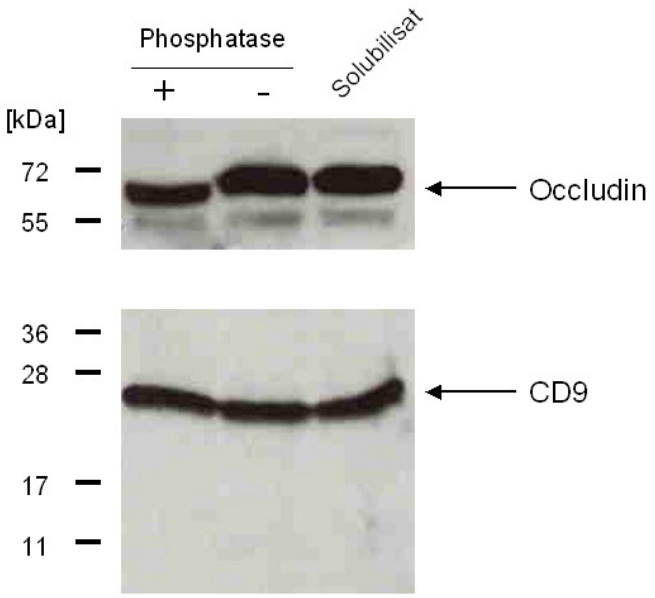

Abb. 10: *in vitro* Dephosphorylierung von solubilisierten iBREC-Proteinen.
Brij 97-Solubilisat aus konfluenten iBREC wurde mit alkalischer Phosphatase 1 h bei 37°C inkubiert. Als Negativkontrolle wurde das gleiche Volumen Solubilisat mit Reaktionspuffer ohne Enzym versetzt (-) bzw. unbehandeltes Solubilisat analysiert. Die *Western blot*-Analyse mit Antikörpern gegen CD9 (unten) und Occludin (Positivkontrolle, oben) ergab, dass sich durch die Phosphatasebehandlung nur das Laufverhalten der Hauptform von Occludin (~ 65 kDa) veränderte, nicht aber das des CD9.

3.3 Identifikation von Interaktionspartnern des CD9 in iBREC

3.3.1 Analyse der möglichen Interaktion des CD9 mit der Proteinkinase C

Eine mögliche Interaktion des CD9 mit der Proteinkinase C (PKC) wurde untersucht, da sie für einen anderen Zelltyp bereits beschrieben worden war [95]. Dies erschien besonders interessant, weil die PKC mikrovaskulärer Zellen im Krankheitsbild der diabetischen Retinopathie (DR) eine wichtige Rolle spielt [89] und dabei Prozesse (wie Zellmigration) beeinflusst, an denen auch eine Beteiligung des Tetraspanins CD9 bereits nachgewiesen wurde [21]. Zunächst wurde ein möglicher direkter Einfluss der Stimulierung der PKC-Aktivität auf die Expression von CD9 und PKC_{α} geprüft. Dazu wurde die PKC konfluenter iBREC 48 h PMA stimuliert. Die Mengen der CD9- und PKC_{α}-Proteine in Solubilisaten der mit PMA behandelten iBREC war gegenüber den unbehandelten oder mit dem nicht wirksamen Analog 4αPDD inkubierten Kontrollzellen nicht merklich verändert (siehe Abbildung 11A). Auch konnte eine direkte Interaktion der Proteine miteinander durch Immunpräzipitationen mit Antikörpern gegen CD9 und PKC_{α} nicht nachgewiesen werden: Lediglich CD9 als primäres Antigen, nicht aber PKC_{α} konnte mit dem anti-CD9-Antikörper immunpräzipitiert werden (Abbildung 11B).

Die mögliche Interaktion von CD9 und der $PKC_{\beta II}$-Isoform, die für vaskuläre Komplikationen im Verlauf der DR eine besondere Rolle spielt [89], wurde durch Immunfluoreszenzfärbungen von unbehandelten und mit PMA stimulierten iBREC untersucht (siehe Abbildung 12). Die für die beiden Proteine spezifischen Anfärbungen zeigten eine grundsätzlich verschiedene intrazelluläre Lokalisation der $PKC_{\beta II}$-Isoform im Zellkern und des CD9 in der Plasmamembran. Die subzelluläre Lokalisation beider Proteine konnte auch nicht durch Stimulierung (oder Inhibierung mit GF 109203X oder IAPD, diese Ergebnisse nicht gezeigt) der PKC beeinflusst werden, so dass eine Interaktion von CD9 mit der $PKC_{\beta II}$-Isoform in iBREC unwahrscheinlich erschien und nicht weiter untersucht wurde.

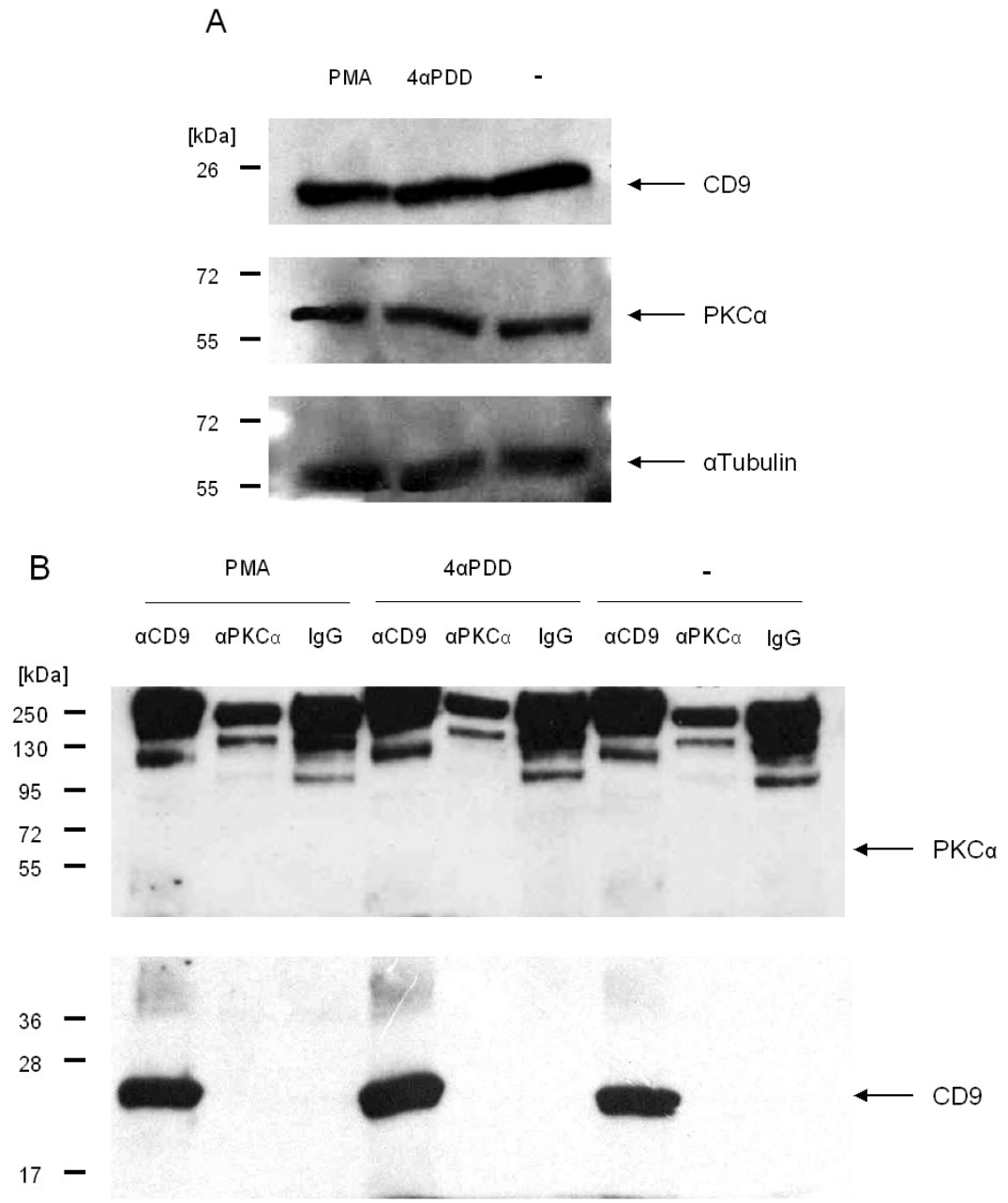

Abb. 11: Analyse der Expression von PKCα und CD9 und einer möglichen Bindung aneinander mit und ohne Stimulierung der PKC-Aktivität.

Konfluente iBREC wurden 48 h mit 100 nM PMA stimuliert (bzw. in Kontrollansätzen mit 4αPDD oder ohne Zusatz (-) inkubiert), bevor Brij 97-Solubilisate hergestellt wurden.

A: Die Analyse der Solubilisate zeigte, dass die Stimulierung der PKC durch PMA keinen Einfluss auf die Expression von CD9, PKC_{α} und αTubulin (als konstant exprimiert betrachtete interne Kontrolle) hat.

B: In allen drei anti-CD9-Immunpräzipitaten kann nur CD9, aber nicht PKC_{α} nachgewiesen werden. Der verwendete anti-PKC_{α}–Antikörper war für eine Immunpräzipitation ungeeignet, hätte aber co-präzipitiertes PKC_{α} im *Western blot* erkannt (11A).

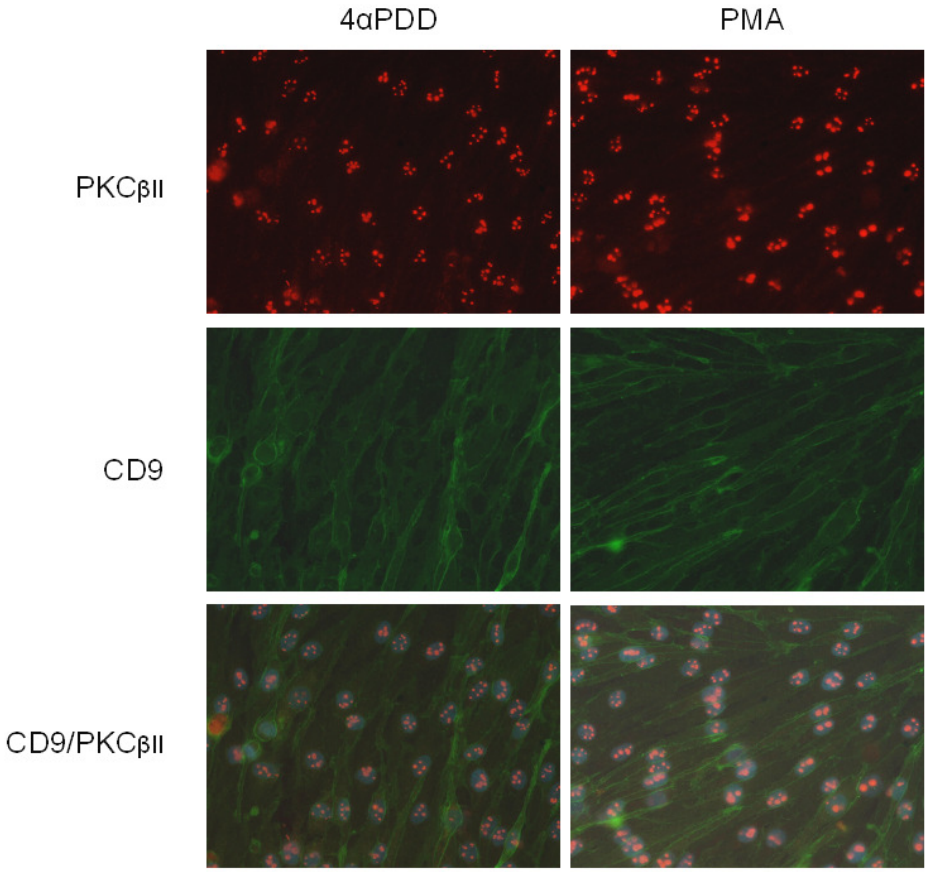

Abb. 12: Bestimmung der subzellulären Lokalisation von CD9 und $PKC_{\beta II}$ nach Stimulierung der PKC-Aktivität mit PMA.

Konfluente iBREC wurden 48 h mit 100 nM PMA zur Stimulierung der PKC-Aktivität bzw. 4αPDD als Negativkontrollsubstanz inkubiert und Doppel-Immunfluoreszenzfärbungen von CD9 (grüne Fluoreszenz) und $PKC_{\beta II}$ (rot) durchgeführt. CD9 war vorwiegend in der Plasmamembran, die $PKC_{\beta II}$ dagegen ausschließlich im Zellkern lokalisiert, was auch nicht durch PMA beeinflusst wurde.

3.3.2 Analyse putativer Interaktionspartner des CD9 in iBREC

In verschiedenen Zelltypen wurden schon zahlreiche Interaktionspartner des CD9, z. B. zahlreiche Integrine und andere Tetraspanine, identifiziert [3, 8, 31, 95]. Um zu untersuchen, ob CD9 in iBREC auch mit diesen Proteinen interagiert oder ob in mikrovaskukären Endothelzellen andere CD9-Komplexe vorhanden sind, wurden ausgehend von großen Zellzahlen Co-Immunpräziptationen mit einem Antikörper gegen CD9 durchgeführt. Die Proteine der Immunpräzipitate wurden anschließend

in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit dem Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau R250 gefärbt. Neben den Antikörperbanden erkannte man in der Spur des anti-CD9-Immunpräzipitats auch Proteinbanden, die nicht im Immunpräzipitat mit einem Kontrollantikörper gleichen Typs nachzuweisen waren. Die massenspektrometrische Identifizierung mittels nanoLC-ESI-MS/MS der in den spezifischen Banden enthaltenen Proteine wurde von der Firma Proteome Factory (Berlin) durchgeführt. Die Identifizierung putativer Interaktionspartner von CD9 erfolgte durch den Vergleich der durch proteolytische Spaltung erhaltenen Peptidmassen mit den theoretischen Peptidmassen der Spaltprodukte jedes Proteins in der Proteindatenbank des NCBI. In Tabelle 2 sind die so identifizierten möglichen Komplexpartner von CD9 in iBREC aufgelistet. Neben der metallabhängigen Protease ADAM10, der Integrin-Untereinheit β_1 (CD29) und dem Tetraspanin CD81 zeigten sich auch die Zytoskelett-Proteine Aktin, Vimentin und Transgelin 2 als potentielle CD9-Bindungspartner. Die bei der Gelelektrophorese beobachteten scheinbaren molaren Massen der Proteine stimmten dabei ungefähr mit den auf Grundlage der Sequenzen für die unmodifizierten Kandidatenproteine berechneten überein. Lediglich die Lage der Bande, aus der die CD29-Peptide stammten, war mit ~50 kDa bei einer deutlich geringeren Masse.

Zur Verifizierung der Relevanz der durch massenspektrometrische Analyse erhaltenen Kandidatenproteine wurden Co-Immunpräzipitationen mit einem anti-CD9-Antikörper gefolgt von *Western blot*-Analysen, in der die Interaktionspartner mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden sollten, durchgeführt. Vimentin und Transgelin 2 konnten dabei zwar im Zellsolubilisat nachgewiesen werden, jedoch nicht in den Immunpräzipitaten (Ergebnisse nicht abgebildet). Bestätigt werden konnten dagegen durch die nachfolgend beschriebenen Analysen die Interaktionen mit CD29 und ADAM10.

Tabelle 2: Massenspektrometrische Identifizierung mit einem anti-CD9-Antikörper co-immunpräzipitierter Komplexpartner von CD9 in iBREC.

Aus den bei Immunpräzipitation mit einem anti-CD9-Antikörper und nachfolgender SDS-PAGE aufgetretenen spezifischen Banden potentieller CD9-Bindungspartner wurden die enthaltenen Proteine durch proteolytische Spaltung mit Trypsin und massenspektrometrischer Peptidmassenbestimmung identifiziert. In den meisten Fällen, konnten mehrere Peptide einem Kandidatenprotein zugeordnet werden. In der Tabelle ist zur eindeutigen Zuordnung die gi-Nummer der NCBI-Datenbank, unter der die Aminosäuresequenz des jeweiligen Proteins angegeben ist, enthalten. M: molare Masse.

Proteinname	gi-Nummer	Anzahl der identifizierten Peptide	$M_{beobachtet}$ [kDa]	$M_{berechnet}$ [kDa]
ADAM10	27806209	1	70	84
Zytoplasmat. Aktin Isoform 2	194676388	5	50	42
Integrin-Untereinheit β1	520521	4	50	85
Vimentin	289450	4	60	54
CD81	78042548	2	25	26
Transgelin 2	61888874	3	25	22

3.3.3 Analyse der Interaktion des CD9 mit CD29

Durch die begrenzte Auswahl an verfügbaren Antikörpern gegen Rinderproteine, die für die vorgesehenen Anwendungen geeignet waren, konnte die Interaktion von CD9 mit CD29 nur geprüft werden, indem nach Immunpräzipitation mit dem anti-CD29-Antikörper nachfolgend ein *Western blot* zum Nachweis des mitpräzipitierten CD9 durchgeführt wurde. Tatsächlich konnte CD9 deutlich im anti-CD29-Präzipitat nachgewiesen werden, während in den Proben der Kontrollansätze (mit Kontroll-Antikörpern gleichen Typs) nur schwache Hintergrundsignale erhalten wurden (siehe Abbildung 13).

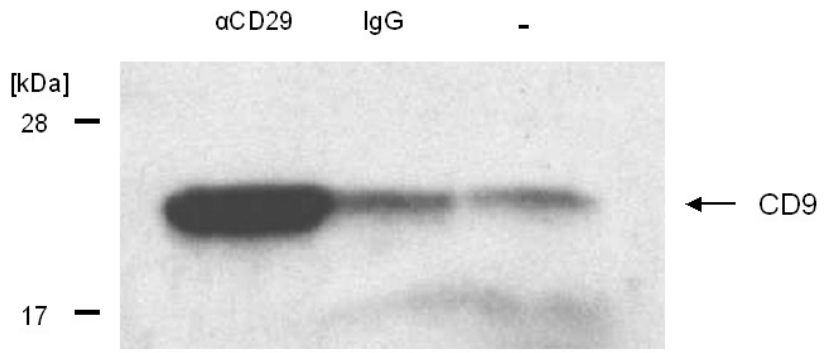

Abb. 13: Co-Immunpräzipitation mit einem anti-CD29-Antikörper.
Eine Immunpräzipitation mit einem gegen die β_1-Untereinheit von Integrinen gerichteten anti-CD29-Antikörper (bzw. mit einem Kontroll-Maus-IgG) wurde mit Brij 97-Solubilisat konfluenter iBREC durchgeführt. Die Immunpräzipitate wurden mittels *Western blot* hinsichtlich der Anwesenheit von CD9 analysiert. Deutliche Mengen des CD9 konnten im anti-CD29-Immunpräzipitat nachgewiesen werden. Die schwachen Hintergrundsignale bei den Kontrollansätzen könnten auf nach dem Waschen noch anhaftende Reste des Solubilisats an die Agarose-Partikel zurückzuführen sein.

Die als Bindungspartner von CD9 identifizierte Integrin-Untereinheit β_1 kann mit verschiedenen α-Untereinheiten Integrine bilden, die für die Bindung der Zellen an die extrazelluläre Matrix (ECM) wesentlich sind. Der Kontakt zur ECM ist für iBREC wie auch für primäre retinale mikrovaskuläre Endothelzellen Voraussetzung für deren Proliferation [90]. Da Fibronektin bei der Kultivierung von iBREC hinsichtlich der Adhäsion und Proliferation sich als besonders stimulierend gezeigt hatte, wurde eine mögliche Co-Lokalisation von CD9 mit dem klassischen Fibronektin-Rezeptor aus den Integrin-Untereinheiten β_1 (CD29) und α_5 (CD49e) durch Immunfluoreszenzfärbungen untersucht. Dazu wurden Doppelfärbungen mit Kombinationen aus Antikörpern gegen CD29, CD49e und CD9 und Sekundärantikörpern mit rot und grün fluoreszierenden Farbstoffen durchgeführt (siehe Abbildung 14). Mögliche Kreuzreaktionen der Sekundärantikörper wurden jeweils durch Einzelfärbungen der Zielproteine ausgeschlossen.

Die in Abbildung 14 dargestellten Fluoreszenzaufnahmen zeigen eine deutliche Co-Lokalisation von CD9 und den (ebenfalls zusammen vorkommenden) Integrin-Untereinheiten CD29 und CD49e vorwiegend in der Plasmamembran.

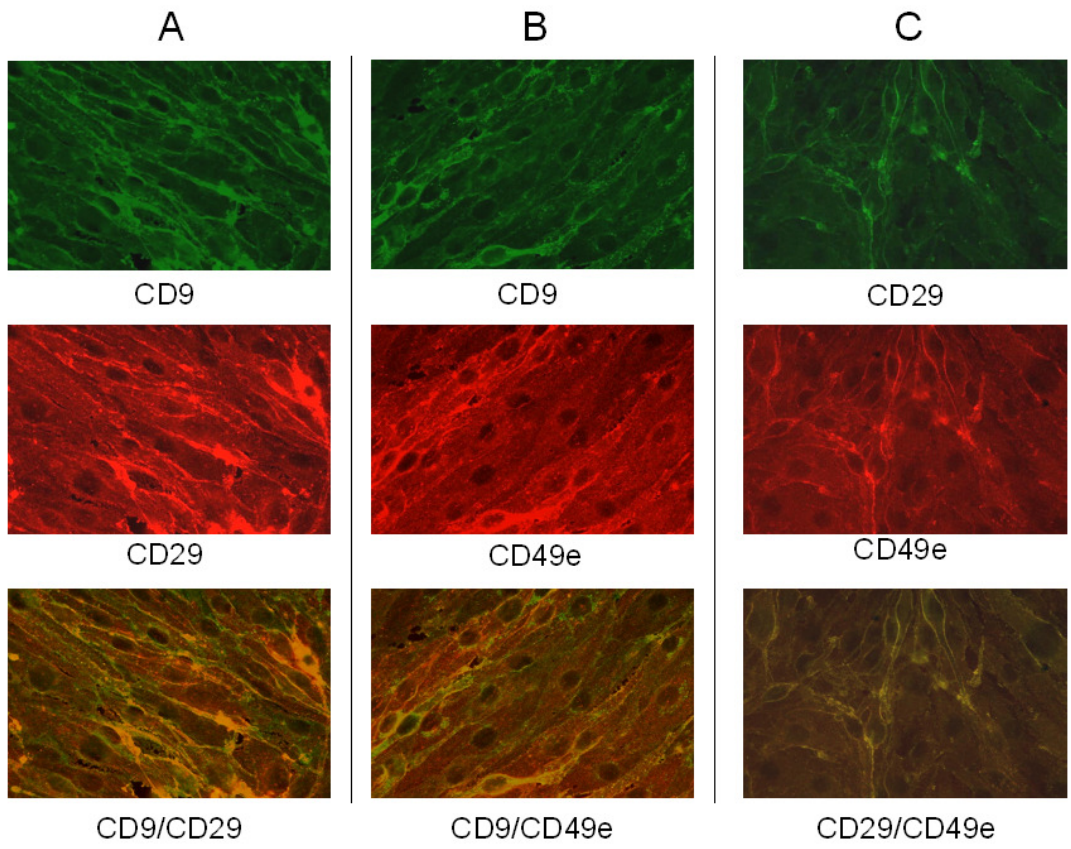

Abb. 14: Bestimmung der subzellulären Lokalisation von CD9, CD29 und CD49e in konfluenten iBREC durch Doppel-Immunfluoreszenzfärbungen.
Dargestellt ist die antigenspezifische grüne bzw. rote Fluoreszenz und die überlagerten Signale in 400-facher Vergrößerung.
A: CD9 und CD29 sind beide hauptsächlich an der Plasmamembran lokalisiert. Die Überlagerung der Bilder zeigt eine weitgehende Co-Lokalisation der Proteine.
B: CD9 und CD49e sind vorwiegend in der Plasmamembran co-lokalisiert.
C: Die Integrin-Untereinheiten CD29 und CD49e sind in iBREC zusammen lokalisiert.

Frühere Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass CD9 an der Adhäsion und Migration von iBREC wesentlich beteiligt ist [21]. Da für diese Prozesse auch der Fibronektin-Rezeptor bestehend aus Integrin-Untereinheiten β_1 (CD29) und α_5 (CD49e) eine wichtige Rolle spielen kann [90] und in dieser Arbeit eine Interaktion mit CD9 nachgewiesen worden war, wurde ein Einfluss von Antikörpern gegen CD9 und CD29 bzw. CD49e auf die Migration von iBREC untersucht, um einen ersten Hinweis auf eine funktionelle Relevanz zu erhalten.

Bei diesen Versuchen wurde die Migration durch die Poren einer Membran gegen Fibronektin als Migrationsstimulus gemessen (siehe Abbildung 15). Es zeigte sich, dass deutlich weniger Zellen in Anwesenheit eines Antikörpers gegen CD9, CD29 oder CD49e durch die Membran wanderten. Die Wirkung des anti-CD9-Antikörpers ist stärker als die des anti-CD29-Antikörpers, die Kombination verstärkt aber nicht den Effekt der Bindung an CD9 alleine (Abb. 15A). Die extrem starke Hemmung der Migration durch den anti-CD49e-Antikörper kann mit dem anti-CD9-Antikörper nicht erreicht werden, ihre Kombination verstärkt nicht den Effekt der Bindung an die Integrin-Untereinheit α_5 alleine (Abb. 15B).

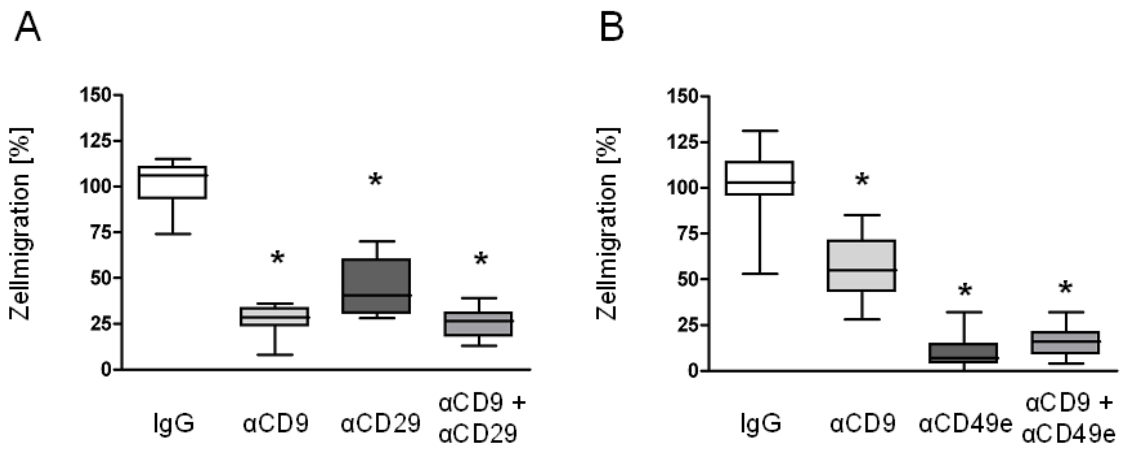

Abb. 15: Hemmung der Migration von iBREC mit Antikörpern gegen CD9, CD29 und CD49e.

Beobachtet wurde die Migration von 10^5 Zellen, die mit anti-CD9-, anti-CD29- bzw. anti-CD49e-Antikörper oder einem Kontroll-IgG inkubiert wurden. Dargestellt sind die durch eine poröse Membran gewanderten Zellen bezogen auf die Kontrollzellen, wobei die Anzahl der migrierten Kontrollzellen als 100% definiert wurde.

A: Antikörper gegen CD9 und CD29 hemmen die Migration von iBREC. Die Inhibierung durch den anti-CD9-Antikörper wird durch die Zugabe des anti-CD29-Antikörpers nicht signifikant verstärkt.

B: Die Migration wird von Antikörpern gegen CD9 und CD49e gehemmt. Der sehr starke Effekt des anti-CD49e-Antikörpers wird durch Kombination mit dem anti-CD9-Antikörper nicht signifikant verändert. * $p < 0{,}0006$ (Mann-Whitney-Test) im Vergleich zur Kontrolle.

3.3.4 Analyse der Interaktion des CD9 mit ADAM10

Von den anderen in der Tabelle 2 aufgelisteten potenziellen Komplexpartnern des CD9 konnte neben CD29 durch Co-Immunpräzipitation ADAM10 eindeutig bestätigt werden (siehe Abbildung 16). Im Brij 97-Solubilisat der iBREC konnten mit dem verwendeten Antikörper drei ADAM10-Formen mit scheinbaren molaren Massen von 120 kDa, 95 kDa und 70 kDa nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich bei den beiden größeren Varianten vermutlich um unprozessierte Membranproteine, die N-terminal noch die Pro-Domäne aufweisen, während die kleinste Form das durch die Proprotein-Konvertasen Furin und PC7 prozessierte Protein darstellt [2]. Im anti-CD9-Immunpräzipitat kann ausschließlich die prozessierte Form von ADAM10 als Interaktionspartner des CD9, nicht aber die anderen ADAM10-Formen, nachgewiesen werden.

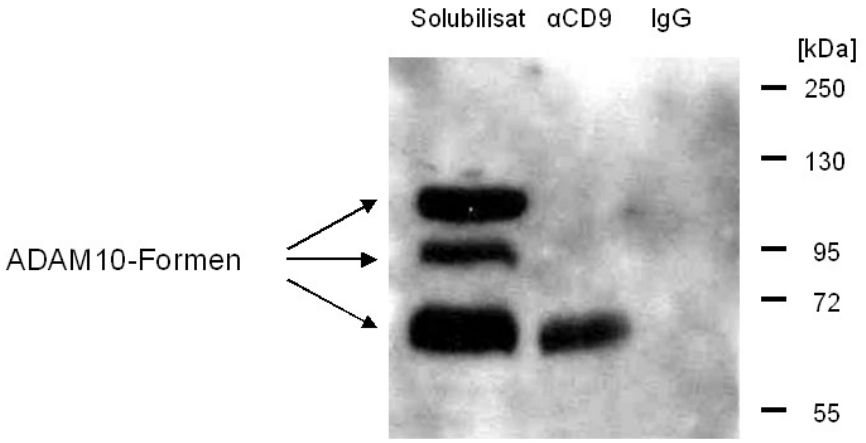

Abb. 16: Co-Immunpräzipitation mit einem anti-CD9-Antikörper und Nachweis von ADAM10.

Das anti-CD9-Immunpräzipitat aus Brij 97-Solubilisat konfluenter iBREC wurde mittels *Western blot* auf Anwesenheit von ADAM10 analysiert. Von den drei ADAM10-Formen, die im Solubilisat nachgewiesen werden konnten (linke Spur), konnte nur die kleinste als Interaktionspartner des CD9 nachgewiesen werden (mittlere Spur). Eine Immunpräzipitation mit einem Kontroll-Antikörper (rechte Spur) ergab keine Bande und bestätigte so die Spezifität der anti-CD9-Präzipitation.

Um zu untersuchen, ob auch ADAM10 bei mikrovaskulären Endothelzellen direkt an der Zellmigration beteiligt ist, wurde ein Migrationsassay mit iBREC in Anwesenheit eines anti-ADAM10- bzw. anti-CD9-Antikörpers durchgeführt (siehe Abbildung 17). Dabei hemmten Antikörper gegen CD9 oder ADAM10 die Migration durch die Membran ähnlich stark. Bei Kombination dieser beiden Antikörper beobachtete man eine signifikant ($p = 0{,}0001$ gegenüber anti-CD9, $p = 0{,}0002$ gegenüber anti-ADAM10; Mann-Whitney-U-Test) verstärkte Hemmung gegenüber den Wirkungen der einzelnen Antikörper.

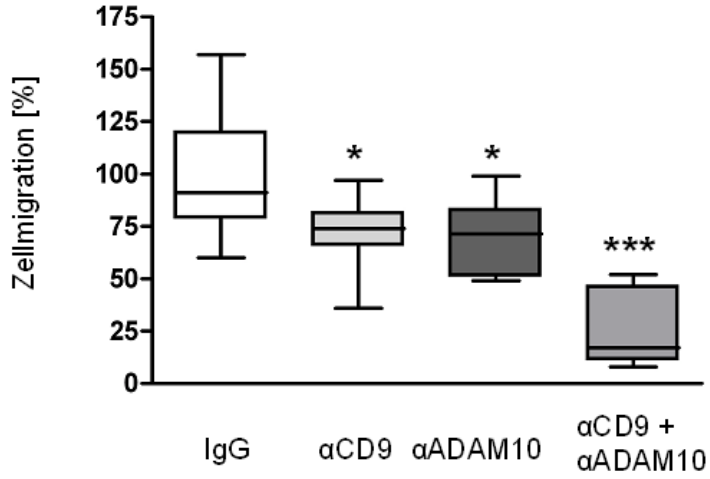

Abb. 17: Hemmung der Migration von iBREC mit Antikörpern gegen CD9 und ADAM10.

iBREC wurden mit Antikörpern gegen CD9 oder ADAM10 (oder mit einem Kontroll-IgG) inkubiert, bevor die Zahl der durch eine poröse Membran gewanderten Zellen bestimmt wurde. Beide Antikörper hemmten die Migration von iBREC signifikant: * $p< 0{,}02$ (Mann-Whitney-U-Test) gegenüber dem Kontrollansatz. In Kombination zeigte sich eine viel stärkere Hemmung als mit einem der beiden Antikörper: ***$p < 0{,}0006$ gegenüber der Wirkung des anti-CD9- oder anti-ADAM10-Antikörpers.

Außerdem wurde mit Co-Immunpräzipitationen überprüft, ob ADAM10 mit CD29 und CD9 in einem (gemeinsamen) Komplex vorliegt. Es wurden Immunpräzipitationen mit anti-CD9- und anti-CD29-Antikörpern durchgeführt und ADAM10 in einer anschließenden *Western blot*-Analyse nachgewiesen. Tatsächlich konnte von den drei ADAM10-Formen, die im Zelllysat detektiert wurden, die kleinste in beiden Immunpräzipitaten nachgewiesen werden

(Abbildung 18). ADAM10 konnte also sowohl mit CD9 als auch mit CD29 präzipitiert werden, was auf direkte oder indirekte (in größeren Komplexen) Interaktion mit beiden Proteinen hindeutet.

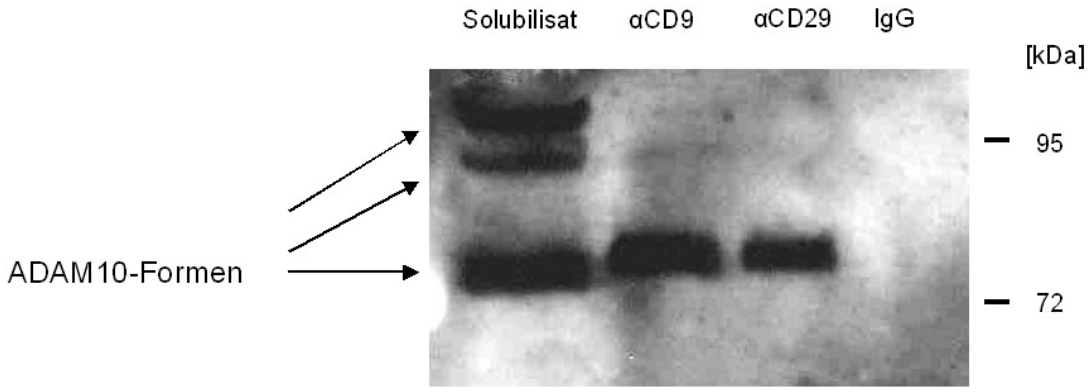

Abb. 18: Co-Immunpräzipitationen mit anti-CD9- und anti-CD29-Antikörpern und Nachweis von ADAM10.

Mit Solubilisat aus konfluenten iBREC wurden Immunpräzipitationen mit anti-CD9- oder anti-CD29- Antikörper (bzw. als Kontrolle mit Maus-IgG) durchgeführt. Die gebundenen Proteine wurden mittels *Western blot* analysiert und dabei ADAM10 mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers nachgewiesen. Im Zelllsolubilisat kamen drei ADAM10-Formen (siehe Abbildung 16) vor. Deutliche Mengen der kleinsten ADAM10-Variante konnten im anti-CD9- und im anti-CD29-Immunpräzipitat, nicht aber gebunden an den Kontroll-Antikörper, nachgewiesen werden.

3.3.5 Einfluss von Glukose auf die CD9-Expression und die Interaktion von CD9 mit CD29 und ADAM10 in iBREC

Um Zellkulturbedingungen zu schaffen, die einer erhöhten Blutzucker-konzentration als eine der Hauptursachen für die im Verlauf der DR auftretenden Veränderungen in retinalen Zellen entsprechen, wurden iBREC eine bis mehrere Wochen in Kulturmedium mit erhöhten Glukosekonzentration von 2,5 bis 10 g/l kultiviert und mit kultivierten iBREC in normalem Medium verglichen. Ausgangspunkt der Untersuchungen zur Auswirkung auf CD9 war die Beobachtung, dass die Migration von iBREC durch Medium mit 4,5 g/l Glukose stimuliert wurde und mit einem anti-CD9-Antikörper gehemmt werden konnte [21]. Da neben einem Einfluss auf die Gesamtmenge des CD9 oder auf den Anteil von

CD9 in bestimmten Komplexen auch eine Veränderung der subzellulären Lokalisation möglich erschien, wurden aus den unter unterschiedlichen Bedingungen kultivierten iBREC Proteine aus Zytosol, Membranen (Plasmamembran und Organellen), Zellkern und Zytoskelett vor der Analyse durch fraktionierende Extraktion voneinander getrennt und durch *Western blot* analysiert (siehe Abbildung 19). Dabei kam CD9 unabhängig von der Glukosekonzentration im Kulturmedium in den Proteinfraktionen der Plasmamembran und des Zytoskeletts vor. Obwohl durch quantitative Echtzeit-PCR keine erhöhte Menge des CD9-Transkripts nach Kultivierung in Medium mit erhöhtem Glukosegehalt erkennbar war (Ergebnisse nicht abgebildet), war die Menge an CD9-Protein in den Membran- und Zytoskelettfraktionen erhöht (siehe Abbildung 19).

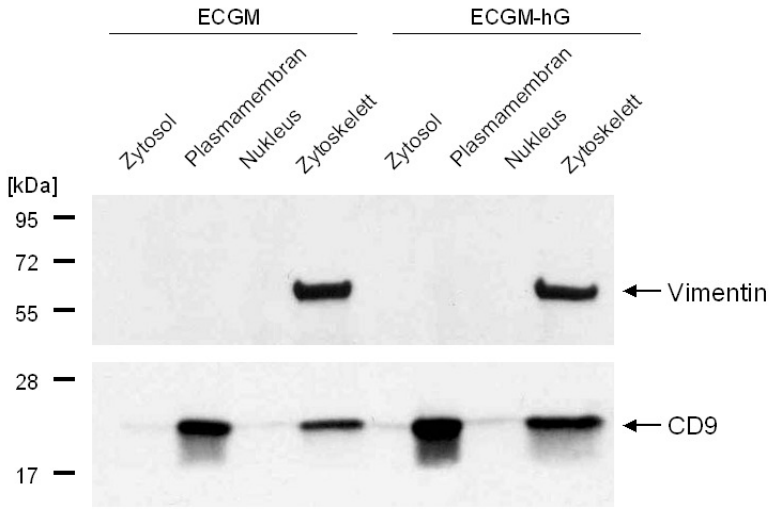

Abb. 19: Einfluss der Glukosekonzentration im Kulturmedium auf Expression und subzelluläre Verteilung von CD9 in iBREC.

iBREC wurden in Standardmedium ECGM oder ECGM-hG (mit 4,5 g/l Glukose) eine Woche kultiviert und die konfluenten Zellen anschließend zur Gewinnung subzellulärer Proteinfraktionen mit Hilfe des „ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction Kits“ aufgearbeitet. Das Vorkommen von CD9 in den Fraktionen wurde mittels *Western blot*, bei dem pro Spur eines Polyacrylamidgels 4 µg Gesamtprotein aufgetragen wurden, analysiert (unten). Um die korrekte subzelluläre Fraktionierung der Proteine zu bestätigen, wurde zusätzlich das Zytoskelett-Protein Vimentin nachgewiesen (oben). Es zeigte sich, dass der erhöhte Gehalt an Glukose im Kulturmedium keinen deutlichen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von CD9 hat, allerdings konnte unter solchen Bedingungen mehr CD9-Protein in den Proteinfraktionen der Plasmamembran und des Zytoskeletts detektiert werden.

Mit Brij 97-Solubilisaten der mit erhöhter Glukosekonzentration im Medium eine Woche kultivierten iBREC wurden auch Immunpräzipitationen durchgeführt, um zu prüfen, ob die in dieser Arbeit nachgewiesenen Protein-Protein-Interaktionen verändert wurden. Dies schien möglich, da in den verwandten HUVEC (humane Endothelzellen der Nabelschnur) Überexpression des Fibronektin-Rezeptors und Deregulation verschiedener metallabhängiger Proteasen, unter ihnen auch Vertreter der ADAM-Proteinfamilie [71, 78, 92], beobachtet worden war.

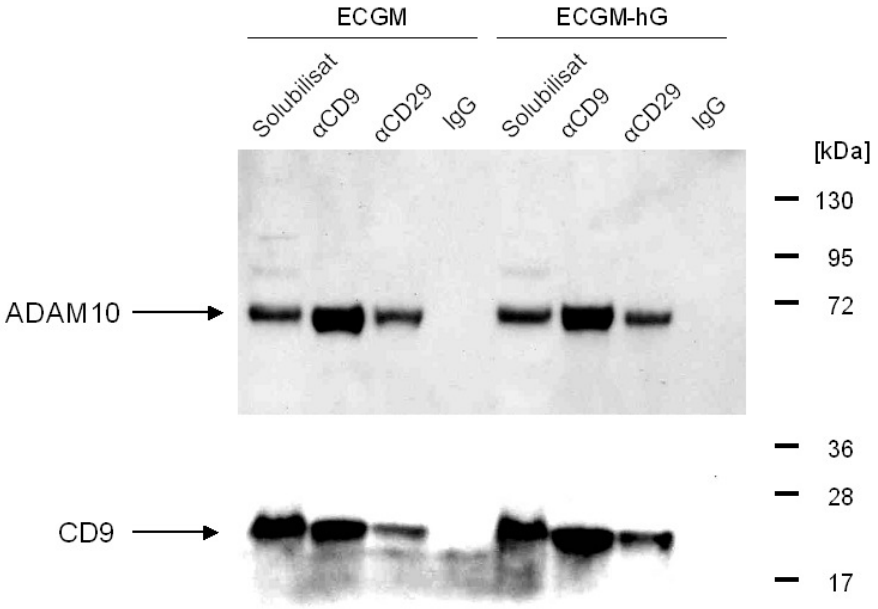

Abb. 20: Einfluss von Glukose auf die Interaktionen von CD9 mit CD29 und ADAM10.

iBREC wurden eine Woche in ECGM-hG (mit 4,5 g/l Glukose) oder in Standardmedium ECGM kultiviert. Mit Brij 97-Solubilisaten der Zellen wurden Immunpräzipitationen mit Antikörpern gegen CD9 oder CD29 (bzw. mit einem Kontroll-Maus-IgG) durchgeführt und in den Präzipitaten durch *Western blot* ADAM10 (oben) und CD9 (unten) nachgewiesen. Auf die Interaktion von ADAM10 mit CD9 und CD29 hat die erhöhte Glukosekonzentration im Kulturmedium keinen Einfluss. Auch die Assoziation von CD9 und CD29 verändert sich nur geringfügig.

Die Interaktion von CD9 und CD29 mit ADAM10 wurde durch die Erhöhung des Glukosegehaltes im Medium nicht beeinflusst (siehe Abbildung 20), denn mit einem anti-CD9- und einem anti-CD29-Antikörper ließen sich etwa gleiche

Mengen ADAM10 co-immunpräzipitieren. Der Nachweis von CD9 in den verschiedenen Immunpräzipitaten zeigte, dass die Interaktion von CD9 mit CD29 auch bei der Kultivierung der Zellen mit ECGM-hG bestehen blieb, wobei die Menge an CD9, die mit CD29 assoziiert vorlag, sogar durch den Einfluss der Glukose etwas vergrößert schien (siehe Abbildung 20).

4 Diskussion

4.1 Die Tetraspanine CD9, CD63, CD81 und CD151 werden in mikrovaskulären Endothelzellen der Retina exprimiert

Tetraspanine assoziieren in der Plasmamembran mit einer Vielzahl von anderen Proteinen in sogenannten Tetraspanin-Netzwerken und sind so an der Regulation von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen, Proliferation, Adhäsion und Migration von Zellen beteiligt. Diese Prozesse sind unter anderem grundlegende Voraussetzungen für die Neovaskularisation die bei Patienten mit malignen Erkrankungen und anderen Krankheitsprozessen wie der diabetischen Retinopathie (DR) auftritt. In der Tumorforschung spielen die Funktionen und Komplexpartner der Tetraspanine eine immer größere Rolle. Bis auf wenige Ausnahmen werden Tetraspanine nahezu ubiqitär exprimiert [33]. Auch in makrovaskulären Endothelzellen, z. B. in menschlichen Endothelzellen der Nabelschnur (HUVEC), wurden bereits verschiedene Tetraspanine (CD9, CD63, CD81, CD82 und CD151) nachgewiesen [6]. An experimentellen Modellen mit HUVEC konnte gezeigt werden, dass insbesondere CD9, CD63 und CD151 bei der Wundheilung, Proliferation, Migration und Adhäsion an eine extrazelluläre Matrix eine Rolle spielen [43, 94, 97]. Da es bisher aber keine entsprechenden Untersuchungen an mikrovaskulären Endothelzellen gab, diese aber eine besondere Bedeutung in Krankheitsprozessen wie der DR haben, bei der die Neovaskularisation in der Retina zum typischen Krankheitsbild zählt, erschien die Charakterisierung der von dieser Zellart exprimierten Tetraspanine interessant. Mit immortalisierten mikrovaskulären Endothelzellen der Rinderretina (iBREC) stand eine ideale Modellzelllinie zur Verfügung, die in allen bisher untersuchten Eigenschaften mit entsprechenden Primärzellen übereinstimmt ohne die in Primärkulturen störenden Perizyten zu enthalten [20]. Tatsächlich konnten auch in iBREC durch RT-PCR mit Tetraspanin-spezifischen Primern für CD9, CD63, CD81 und CD151 kodierende Transkripte nachgewiesen werden. Dagegen konnte mit dieser Methode keine CD82-mRNA in diesen Zellen gefunden werden, obwohl dieses Tetraspanin in HUVEC exprimiert wird [6]. Dies könnte einen grundsätzlichen Unterschied zwischen mikro- und makrovaskulären

Endothelzellen darstellen. Endgültig konnte die Frage der CD81-Expression auf Proteinebene nicht geklärt werden, da keine Rinder-spezifischen anti-CD81-Antikörper verfügbar waren. Trotz hoher Homologie der Aminosäuresequenzen der CD81-Proteine aus Mensch und Rind konnten gegen menschliches CD81 gerichtete Antikörper wegen fehlender Kreuzreaktivität nicht genutzt werden. Aus diesem Grund konnten die Ergebnisse der mRNA-Analyse auch nur für die Tetraspanine CD9, CD63 und CD151 durch durchflusszytometrische Bestimmung der Proteine an der Zelloberfläche oder Immunfluoreszensfärbungen fixierter Zellen ergänzt werden. An der Zelloberfläche konnten CD9 und CD63, nicht aber CD151 nachgewiesen werden. Da verschiedene anti-CD151-Antikörper für die durchflusszytometrische Analyse verwendet wurden, erscheint es unwahrscheinlich, dass eine gewebespezifische Expression von CD151-Varianten vorliegt, die die von den Antikörpern erkannten Epitope nicht enthalten [28]. Die sich daraus ergebende Annahme, dass CD151 in iBREC ausschließlich intrazellulär vorliegt, wurde durch Immunfluoreszenzfärbung nicht konfluenter Zellen, die eine diffuse spezifische Fluoreszenz im Zellinneren ergab, bestätigt [21]. Ähnlich wie bei HUVEC beobachtet [83], war die CD151-spezifische Fluoreszenz bei konfluenten iBREC schwächer. Neben der Zelloberflächenexpression konnten CD9 und CD63 – wie in anderen Zelltypen [32] - auch intrazellulär in Form vesikulärer Immunfluoreszenzsignale nachgewiesen werden. Ein Teil der CD63 enthaltenden vesikelartigen Strukturen in iBREC konnten in der eigenen Arbeitsgruppe durch Doppel-Immunfluoreszenzfärbungen als Weibel-Palade-Vesikel identifiziert werden [21]; bei den anderen handelt es sich wahrscheinlich um späte Endosomen und Lysosomen [70]. Die Lokalisation des CD9 ist – im Gegensatz zu CD63 - von der Zelldichte der iBREC abhängig: In nicht-konfluenten iBREC ist es hauptsächlich intrazellulär lokalisiert, während in konfluenten Zellen neben einer verbleibenden schwächeren intrazellulären Färbung eine ausgeprägte Plasmamembranfärbung zu beobachten ist. Interessanterweise gibt es bisher kaum Veröffentlichungen, in denen eine intrazelluläre Lokalisation des CD9 erwähnt wird; lediglich Houle et al. haben sie im Rahmen immunohistochemischer Untersuchungen von Ovarialkarzinomen beschrieben [32]. Es gibt zwar Hinweise darauf, dass das Tetraspanin-Netzwerk über die Mitglieder der Ig-Proteinfamilie EWI-2 und EWI-F, die auch an CD9 binden können, mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden ist [76], bisher wurde aber

die direkte Assoziation von CD9 mit dem Zytoskelett nicht gezeigt. Durch fraktionierte Solubilisierung der Proteine verschiedener subzellulärer Kompartimente von iBREC mit anschließendem Nachweis des CD9 in *Western blot*–Analysen konnte in dieser Arbeit erstmals ein deutlicher Hinweis darauf erhalten werden, dass CD9 – zumindest in den untersuchten mikrovaskulären Endothelzellen - teilweise mit dem Zytoskelett assoziiert vorliegt.

Die Expression einiger der Proteine, die an der Migration und Adhäsion von Zellen beteiligt sind, wie etwa Integrine, wird während der Kultivierung der zunehmenden Zelldichte angepasst. So nehmen Transkript- und Proteinmenge der Integrin Untereinheit α_5 in retinalem Pigmentepithel mit Erreichen einer höheren Zelldichte ab [72]. Beim Vergleich von konfluenten und nicht konfluenten iBREC konnte ein Unterschied in den für CD9 und CD63 kodierenden Transkripten nicht festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass die in konfluenten iBREC durch Immunfluoreszenzfärbungen beobachtete vermehrte Expression des CD9 und dessen Lokalisation an der Plasmamembran nicht aus einer vermehrten Genexpression des CD9 resultiert. Interessanterweise konnte aber eine in nicht konfluenten Zellen 2,5-fach höhere Menge des CD151-Transkripts gemessen werden, was sich auch auf die Proteinmenge auswirkt, wie unter anderem durch Immunfluoreszenzfärbungen von konfluenten und nicht konfluenten iBREC gezeigt werden konnte [21, 83]. In Übereinstimmung mit Untersuchungen an anderen Zelltypen [55] könnte dieser Unterschied darauf hindeuten, dass CD151 an der Migration sich vermehrender Zellpopulationen beteiligt ist, in ruhenden Zellen aber für die Aufrechterhaltung des Zustandes durch Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion nicht oder nicht in gleichen Mengen benötigt wird.

4.2 CD9 wird in iBREC glykosyliert aber nicht phosphoryliert

Die meisten Tetraspanine (wichtige Ausnahmen sind CD81 und NET-2) besitzen Glykosylierungsstellen. Den unterschiedlichen Größen der beiden extrazellulären Schleifen entsprechend, sind diese häufiger im EC2 lokalisiert, allerdings ist für CD9 nur eine N-Glykosylierung am EC1 beschrieben [10, 80]. Glykosylierung von Proteinen ist unter anderem wichtig für die korrekte Faltung, aber auch für ihre

Interaktion mit anderen Proteinen. Eine Glykosylierung des CD9 wurde, neben seiner Modifikation durch kovalent gebundene Lipide, schon früh von Seehafer et al. postuliert, die die bei *Western blot*-Analysen häufig beobachtete Doppelbande mit dem Vorliegen von unterschiedlich glykosylierten CD9-Varianten erklärten [80]. Nach Klonierung der CD9-cDNA konnte in der Aminosäuresequenz (AS 52/53) eine mögliche Glykosylierungsstelle in EC1 lokalisiert werden [9]. Es stellte sich die Frage, ob das CD9-Protein auch in mikrovaskulären Endothelzellen glykosyliert wird. Im Gegensatz zu anderen Zelltypen konnte in Zellextrakten von iBREC fast ausschließlich nur eine Bande in *Western* blot-Analysen detektiert werden. Die CD9-spezifische Doppelbande konnte nur dann nachgewiesen werden, wenn die in einer Spur analysierte Proteinmenge sehr hoch war. Die die Hauptbande begleitende schwache Bande des langsamer migrierenden CD9-Proteins war nach Inhibierung der N-Glykosylierung mittels Tunicamycin nicht mehr nachzuweisen. Dies deutet auf eine teilweise N-Glykosylierung des CD9-Proteins auch in mikrovaskulären Endothelzellen hin.

Obwohl keine Hinweise vorlagen, dass Tetraspanine durch Phosphorylierung *in vivo* modifiziert werden, gab es die Vermutung, dass die in *Western blot*-Analysen diffus erscheinende CD9-spezifische Doppelbande auf Phosphorylierung einer oder mehrerer AS basiert. Deshalb wurden zuvor solubilisierte Proteine *in vitro* dephosphoryliert, um so eine direkte Regulation durch die bei der DR möglicherweise eine wichtige Rolle spielenden Proteinkinase C (PKC) auszuschließen. Bei dieser Erkrankung ist die Aktivität der PKC erhöht, was auch die Phosphorylierung verschiedener anderer Proteinen zur Folge hat [89]. Eine Phosphorylierung des *thight-junction* Proteins Occludin konnte in iBREC gezeigt werden, für CD9 spielt eine solche Modifikation aber tatsächlich keine Rolle.

4.3 CD9 bildet Komplexe mit β_1-Integrinen und ADAM10

Die Hauptaufgabe der Tetraspanine besteht wahrscheinlich darin, in sogenannten Tetraspanin-Netzwerken Komplexe mit anderen Proteinen zu bilden und so deren Funktionen zu regulieren. Das CD9 ist eines der am Besten untersuchten Tetraspanine, was auch auf seine wichtige physiologische Funktion bei der

Fertilisation und der häufig bei malignen Zellen verschiedenen Ursprungs beobachteten Fehlregulation zurückzuführen ist [87, 98]. Eine Interaktion des CD9 mit Mitgliedern verschiedenster Proteinfamilien konnte in zahlreichen Zelltypen bereits nachgewiesen werden, darunter mit anderen Tetraspaninen (CD81, CD151), Integrinen und anderen Adhäsionsmolekülen (CD42, CD44, CD47), verschiedenen Molekülen des Immunsystems (CD4, CD19, CD46), aber auch Vertretern der Ig-Proteinfamilie (EWI-F und EWI-2) und dem Inhibitor des Prostaglandin-Rezeptors F2 (CD9P-1) [10, 31]. Für makrovaskuläre Endothelzellen wurden bisher die Interaktionen von CD9 mit EWI-F, ICAM-1, VCAM-1 und CD29 beschrieben [6]. In dieser Arbeit wurden Komplexpartner von CD9 in mikrovaskulären Endothelzellen nach Co-Immunpräzipitationen durch Peptidmassenbestimmung identifiziert, darunter waren schon bekannte Komplexpartner wie die Integrin-Untereinheit β_1 (CD29) und das Tetraspanin CD81, aber auch neue wie verschiedene Zytoskelett-Proteine (Aktin, Transgelin 2 und Vimentin) sowie ADAM10, ein Vertreter der ADAM-Proteinfamilie metallabhängiger Proteasen mit einer Disintegrin-Domäne. Für diese Identifizierung der Proteine durch übereinstimmende Massen verschiedener Peptide musste eine ausreichend große Menge der an CD9 bindenden Proteine bereitgestellt werden. Daher musste ein Solubilsiat aus einer relativ großen Zellzahl hergestellt werden, um die in den Immunpräzipitaten neben CD9 enthaltenen Proteine nach Gelelektrophorese mit dem Farbstoff Brilliant-Blau R-250 nahe an der Nachweisgrenze anfärben zu können. Durch die sich aus den Eigenschaften der verwendeten iBREC ergebende Beschränkung der kultivierbaren Zellmengen, konnten ausgehend von den einzelnen analysierten Proteinbanden nur wenige Peptidmassen erhalten und einem bestimmten Protein zugeordnet werden. Daher wurden die identifizierten Proteine nur als potentielle CD9-Bindungspartner betrachtet, deren mögliche Interaktion mit CD9 durch weitere Experimente überprüft wurde. Die Interaktion von CD9 mit den Zytoskelett-Proteinen Aktin, Transgelin 2 und Vimentin konnte weder durch Co-Immunpräzipitationen mit anschließender *Western blot*-Analyse noch mit Doppel-Immunfluoreszenzfärbungen bestätigt werden. Die beobachtete Assoziation des CD9 an das Zytoskelett scheint nicht über eine Bindung an diese Proteine zu erfolgen. Angesichts der starken Abhängigkeit von Protein-Protein-Interaktionen von den experimentellen Bedingungen kann eine Interaktion mit diesen

Zytoskelett-Proteinen jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden. Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass CD9 eher über EWI-2 und EWI-F mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden ist [76].

Eindeutig konnte dagegen mit einem anti-CD29-Antikörper CD9 co-immunpräzipitiert werden und auch Doppel-Immunfluoreszenzfärbungen zeigten eine Co-Lokalisation in Übereinstimmung mit der Annahme einer Interaktion von CD9 mit der Integrin-Untereinheit β_1, die mit der Integrin-Untereinheit α_5 (CD49e) verbunden sein kann. Dies legt nahe, dass CD9 mit CD29 und CD49e in einem Komplex vorliegt, zumal die Integrin-Untereinheiten β_1 und α_5 zusammen den klassischen Fibronektin-Rezeptor bilden, der für die Wechselwirkung von Endothelzellen mit der extrazellulären Matrix wichtig ist [1]. In ersten Versuchen zur funktionellen Relevanz in iBREC konnte in der eigenen Arbeitsgruppe schon gezeigt werden, dass ein Antikörper, der an CD9 bindet, die Adhäsion und die Migration dieser Zellen auf mit Fibronektin beschichteten Oberflächen hemmt [21]. Darauf aufbauend wurde in dieser Arbeit die Wirkung eines anti-CD9-Antikörpers in Kombination mit Antikörpern gegen die Integrin-Untereinheiten β_1 (anti-CD29) und α_5 (anti-CD49e) auf die Migration von iBREC weiter untersucht. Die Migration der Zellen wurde dabei von allen eingesetzten Antikörpern jeweils sehr stark, aber in keinem Fall vollständig, gehemmt. In direkten Vergleichen hemmte der Antikörper gegen CD9 stärker als der gegen CD29, aber nicht so stark wie der gegen CD49e und synergistische Effekte konnten in beiden Kombinationen nicht beobachtet werden. Unter der Annahme, dass jeder Antikörper eine der Komponenten eines Komplexes und so dessen sich auf die Migration auswirkende Funktion weitgehend hemmt, lässt sich folgern, dass die Integrin-Untereinheit α_5 entscheidend ist. Von dieser sind wohl aber nur Teile der vorhandenen Moleküle mit der Untereinheit β_1 oder dem Tetraspanin CD9 direkt assoziiert, da eine vollständige Inhibierung der Migration mit Antikörpern gegen CD29 bzw. CD9 nicht zu erreichen war. Möglicherweise sind die beobachteten Unterschiede der hemmenden Wirkung der Antikörper aber auch auf deren unterschiedliche Effizienz bei der Beeinflussung der Proteinkomplexe zurückzuführen. Auf jeden Fall kann aber von einer wichtigen Rolle des CD9 zusammen mit den Integrin-Untereinheiten β_1 und α_5 bei der Migration mikrovaskulärer Endothelzellen ausgegangen werden. Wahrscheinlich ist die Interaktion der drei Proteine

untereinander dabei entscheidend. Furuya et al. konnten bereits zeigen, dass die Expression verschiedener Integrin-Untereinheiten, darunter auch β_1 und α_5, in CD9-defizienten Zellen (mit gestörter Adhäsion an eine extrazelluläre Matrix) wesentlich geringer ist [27]. Interessanterweise gibt es auch Hinweise auf eine von seiner Bindung an Integrine unabhängigen Funktion des CD9 bei Adhäsion und Migration, für die eine in EC2 (AS168 bis AS192) lokalisierte potenzielle Fibronektin-Bindungsdomäne verantwortlich sein könnte [56].

Migration und Adhäsion von Endothelzellen sind wesentliche Prozesse bei der Neovaskularisierung, die auch bei der DR zu einem der Hauptprobleme zählt, weil die Bildung instabiler mikrovaskulärer Blutgefäße in der Retina häufig zu Einblutungen in den Glaskörper und Erblindung des Patienten führt. Tatsächlich reduziert die Hemmung von CD29 durch einen spezifischen Inhibitor (JSM6427; Jerini AG, Berlin) die Neovaskularisierung im Choroid [86]. In dem Tiermodell der Sauerstoff-induzierten Retinopathie verminderte sich nach intraocularer Injektion von JSM6427 die Neubildung retinaler Blutgefäße [59]. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigen aber, dass CD9 offensichtlich stärker an der Migration von mikrovaskulären Endothelzellen beteiligt ist als CD29 und dass eine gleichzeitige Hemmung von CD49e möglicherweise einen größeren Einfluss auf die Migration mikrovaskulärer Zellen hat. Womöglich wäre die gemeinsame Inhibierung von CD9 und CD49e ein noch aussichtsreicherer neuer Therapieansatz, um die Neovaskularisierung in der Retina zu hemmen.

Obwohl seine ursprüngliche Identifizierung auf nur einem zugeordneten Peptid beruhte, konnte die Interaktion des CD9 mit ADAM10, einem Vertreter der ADAM-Proteinfamilie, durch nachfolgende Co-Immunpräzipitation mit anschließender *Western blot*-Analyse eindeutig bestätigt werden, wobei die Intensität der erhaltenen Bande darauf hindeutet, dass ein erheblicher Teil dieses Proteins gebunden an CD9 vorliegt. Die Vertreter der ADAM-Proteinfamilie (ADAM steht für „***a d****isintegrin* ***a****nd* ***m****etalloprotease domain“*) können den Metzinkin-Proteasen, einer Untergruppe der zinkabhängigen Proteasen zugeordnet werden [79]. Neben der Spaltung von Proteinen werden ADAM-Proteine mit vielfältigen Funktionen in Zusammenhang gebracht: Transport von Zytokinen und deren Rezeptoren sowie Wachstumsfaktoren an die Zelloberfläche, Aktivierung verschiedener Signalwege

und Kontrolle der Migration von Zellen. Zudem sind sie an der Entwicklung von Muskelgewebe, der Fertilisation und an der Regulation der Zelldifferenzierung beteiligt [79]. Die ADAM-Proteinfamilie besteht aus mehr als 30 Proteinen, die alle unter anderem eine Disintegrin- und eine für metallabhängige Proteasen typische Domäne besitzen. ADAM-Proteine werden als inaktive Vorstufen synthetisiert aus denen die Pro-Domäne am N-terminalen Ende durch eine Proprotein-Konvertase abgespalten wird [2]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in iBREC drei ADAM10-Formen nebeneinander vorliegen. Vermutlich handelt es sich bei den beiden größeren Varianten um das unprozessierte Protein, das noch die Pro-Domäne aufweist. Die Proteinbande mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 70 kDa stellt vermutlich das durch die Proprotein-Konvertasen PC7 und Furin prozessierte ADAM10 dar [2]. Interessanterweise bildet CD9 aber nur mit der im *trans*-Golgi-Netzwerk durch die Proprotein-Konvertase aktivierte Form des ADAM10 einen Komplex. Dies wurde auch schon bei hämatopoetischen Zelllinien beobachtet [4]. Ein proteolytisch aktives ADAM10 ist in der Lage, von wichtigen Membranproteinen wie dem transformierenden Wachstumsfaktor α (TGF-α), L-Selektin und dem Rezeptor für AEGs (RAGE) die extrazellulären Domänen abzuspalten (*ectodomain shedding*) und so deren Funktion zu modulieren [49, 96]. Auf diese Funktion des ADAM10 wirkt sich auch seine Einbindung in das Tetraspanin-Netwerk aus. Beispielsweise vermindert die Interaktion von ADAM10 mit CD9, aber auch mit CD82, auf noch nicht vollständig geklärte Weise die Spaltung und somit die Freisetzung des Tumornekrose-Faktors α (TNF-α) in den extrazellulären Raum [4]. Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass bei Patienten mit *Diabetes mellitus* die Konzentration von TNF-α im Serum deutlich erhöht ist. In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass diese erhöhte Konzentration an TNF-α im Anfangsstadium der DR zu einem Verlust der mikrovaskulären Endothelzellen in der Retina führt [7], wobei rückkoppelnd die Expression von ADAM10 stimuliert wird [11]. Zusätzlich bewirkt TNF-α die vermehrte Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1, die die mit der DR einhergehende Entzündungsreaktion durch die vermehrte Adhäsion der Leukozyten an die Endothelzellen begünstigt [16]. ADAM10 erhöht darüber hinaus die Permeabilität von Endothelzellen durch die Abspaltung der extrazellulären Domäne des Endothel-spezifischen Cadherins VECad [78]. Die erhöhte Serumkonzentration von TNF-α bei Patienten mit *Diabetes mellitus* und die

dadurch verstärkte Expression von ADAM10 in den mikrovaskulären Endothelzellen könnte so eine erhöhte Permeabilität der Blut-Retina-Schranke zur Folge haben. Daraus folgt, dass die Aufrechterhaltung der Interaktion von CD9 mit ADAM10 und die daraus resultierende Inhibierung der TNF-α-Sekretion einen Prozess darstellen könnte, der sich bei Entstehung und dem Fortschreiten der DR verändert. Angesichts der Rolle des ADAM10 an der Regulation extrazellulär verfügbarer Wachstumsfaktoren und Rezeptorfragmenten erstaunt es nicht, dass es an der Regulation von Migration und Proliferation in verschiedenen Zelltypen beteiligt ist [79]. *In vitro*-Experimente haben gezeigt, dass die Inhibierung der ADAM10-Expression durch siRNAs oder spezifische Antikörper die übermäßige Proliferation von Krebszellen, von denen manche Arten ADAM10 überexprimieren, reduziert [64]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ADAM10 auch bei der Migration von mikrovaskulären Endothelzellen eine Rolle spielt. Die Hemmung der Migration von iBREC durch einen anti-ADAM10-Antikörper konnte durch Kombination mit einem anti-CD9-Antikörper zu einem deutlich verstärkten Gesamteffekt ergänzt werden. Möglicherweise ist vor allem die Interaktion von CD9 und ADAM10 entscheidend für die Migration von iBREC, allerdings ist auch denkbar, dass ein gemeinsamer Komplex aus CD9, ADAM10 und Integrinen die wesentliche Rolle spielt. Zwar besitzt ADAM10 in seiner Disintegrin-Domäne keine RGD-Sequenz (die typische Integrin-Bindungsstelle), aber es gibt Hinweise darauf, dass ADAM-Proteine auf bisher ungeklärte Weise trotzdem mit verschiedenen Integrin-Untereinheiten direkt interagieren können [79]. Tatsächlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die aktive ADAM10-Isoform auch mit CD29 einen Komplex bildet. Auf Basis der bisherigen Erkenntnisse lässt sich nicht entscheiden, ob für die Migration der Endothelzellen und somit auch für die Neovaskularisierung ein gemeinsamer Komplex von CD9, ADAM10 und CD29 wesentlich ist und dass CD9 einen regulatorischen Einfluss auf dessen Aktivität hat, ähnlich wie im Fall der Sekretion von TNF-α [4]. Alternativ dazu könnten verschiedene Heterodimere (CD9/CD29, CD9/ADAM10, ADAM10/CD29) nebeneinander existieren und möglicherweise ein dynamisches Gleichgewicht bilden. Die Zusammensetzungen der die Migration bestimmenden Komplexe und ihre relativen Einflüsse muss durch weitere Experimente geklärt werden. Allerdings kann schon jetzt festgestellt werden, dass CD9, ADAM10 und Integrine,

wahrscheinlich vor allem der klassische Fibronektinrezeptor, für die Migration der iBREC von herausragender Bedeutung sind.

Die Aktivierung der PKC durch Hyperglykämie und die vermehrte Expression des Wachstumsfaktors VEGF bei Patienten mit *Diabetes mellitus* wird als eine der Hauptursachen für die Entwicklung einer DR diskutiert [37, 89]. Die vermehrte Glukose-Aufnahme der Zellen führt aufgrund der gesteigerten Glykolyse zu einer *de novo*-Synthese von Diacylglyzerin (DAG), das wiederum die PKC-Aktivität stimuliert [37]. Es gibt Hinweise darauf, dass die PKC die Genexpression verschiedener Wachstumsfaktoren, darunter möglicherweise auch die des VEGF, reguliert und deren Transkription im aktivierten Zustand verstärkt [37]. Die PKC ist so - über verschiedene Signaltransduktionswege - an der Regulation der Angiogenese bzw. Neovaskularsierung beteiligt [89]. Die Aktivierung der PKC soll ihre Translokation vom Zytosol an die Plasmamembran oder, wie für Myoblasten beschrieben, in die Region des Perinukleus bewirken [89]. Diese Beobachtung konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden: iBREC, deren PKC-Aktivität durch 100 nM PMA stimuliert wurde, zeigten auch nach 48 h eine unveränderte zytosolische Lokalisation der PKC-Isoformen und auch die Inhibierung der PKC-Aktivität durch verschiedene Substanzen hatte keinen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation. Auch auf die subzelluläre Lokalisation von CD9 hatten weder die Stimulierung noch die Inhibierung der PKC-Aktivität einen Einfluss, auch wenn bei Immunfluoreszenzfärbung es manchmal schien, dass die Menge des CD9 an der Plasmamembran nach Aktivierung der PKC erhöht war. Dieser Eindruck konnte aber durch FACS-Analysen und mit Membranprotein-Fraktionen durchgeführten *Western blot*-Analysen nicht bestätigt werden. Allerdings konnte von Zhang et al. gezeigt werden, dass in Zelllinien hämatopoetischen Ursprungs, die zuvor mit PMA inkubiert worden waren, verschiedene Tetraspanine wie CD81, CD82, CD53 und auch CD9 mit der PKC_{α}-Isoform direkt interagieren. Zusätzlich wurde ein Komplex aus CD81 und der $PKC_{\beta II}$-Isoform nachgewiesen [95]. Die Anteile der mit den jeweiligen Tetraspaninen assoziierten PKC-Moleküle lagen allerdings bei nur 3-5% der PKC-Gesamtmenge. Bei unbehandelten Zellen konnte in diesen Untersuchungen keine Bindung der Tetraspanine an die PKC-Isoformen beobachtet werden [95]. In iBREC konnte auch nach Stimulation der PKC keine entsprechende Interaktion von CD9 mit einer der beiden PKC-Isoformen

nachgewiesen werden. Dass offenbar CD9 – anders als nach den Ergebnissen von Zhang et al. [95] vermutet - nicht an die PKC_{α} bindet, kann ein grundsätzlicher Unterschied der Zelltypen sein. Womöglich lag eine nur geringe Menge der mit CD9 assoziierten PKC_{α} unterhalb der Nachweisgrenze im *Western blot* vor. Allerdings wäre ein solch geringer Anteil CD9-assoziierter PKC kaum von funktioneller Relevanz.

4.4 Die Glukosekonzentration hat keinen Einfluss auf die Expression und Lokalisation von CD9 und seine Bindung an Komplexpartner

Spätfolgen des *Diabetes mellitus* sind darauf zurückzuführen, dass eine erhöhte Glukosekonzentration langfristig zu Gefäßkomplikationen führt, die sich als Ateriosklerose, Herzinfarkt, Nephropathie und auch Retinopathie zeigen. Von den auslösenden Veränderungen der Stoffwechselvorgänge sind vor allem Endothelzellen der Blut-Retina-Schranke betroffen, da sie die Glukoseaufnahme nicht aktiv steuern können [12]. Neben anderen Effekten stimuliert die vermehrte Glukoseaufnahme retinaler Endothelzellen deren Migration [21] und die Adhäsion von Leukozyten durch stärkere Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 [50]. Bei beiden Prozessen sind Tetraspanine nachweislich beteiligt [6, 21, 54]. Allerdings konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass erhöhte Glukosekonzentrationen im Kulturmedium keinen Effekt auf die Expression, subzelluläre Lokalisation oder Interaktion von CD9 mit CD29 und ADAM10 haben. Über die Auswirkungen von Hyperglykämie auf Tetraspanine ist allgemein bisher nur wenig bekannt. Erst kürzlich wurde gezeigt, dass in kultivierten kardialen Fibroblasten die Expression des Tetraspanins TSPN-2 bis zum vierfachen Ausgangswert gesteigert wird, wenn diese Zellen vermehrt Glukose aufnehmen [5]. Bei den mit erhöhter Glukosekonzentration kultivierten iBREC schien CD9 vermehrt in der Plasmamembran vorzuliegen, allerdings konnte diese Beobachtung nicht hinreichend gut reproduziert werden, um als gesichert betrachtet werden zu können. Wahrscheinlich spielt dabei eine Rolle, dass die Lokalisation von CD9 in iBREC von der Zelldichte abhängt, die auch bei identischen Versuchsansätzen leicht unterschiedlich sein konnte, wozu auch eine

Beeinflussung der Proliferation durch die Glukose einen Beitrag geleistet haben könnte.

Durch vermehrte Aufnahme von Glukose steigern retinale Endothelzellen ihre Eigensynthese von Fibronektin und auch die Expression des Fibronektin-Rezeptors bestehend aus den Integrin-Untereinheiten α_5 (CD49e) und β_1 (CD29) [14, 16, 35, 74]. Dies wird als eine mögliche Erklärung für die verstärkte Migration von Endothelzellen bei Hyperglykämie gesehen. Wie gezeigt interagieren CD9 und der Fibronektin-Rezeptor in iBREC miteinander und sind wahrscheinlich in einem Komplex für die Migration von Endothelzellen wichtig. In iBREC, die eine Woche in Medium mit hoher Glukosekonzentration kultiviert wurden, konnte kein Einfluss auf die Interaktionen von CD9 mit CD29 bzw. von ADAM10 mit CD9 beobachtet werden. Interessanterweise stimuliert Kulturmedium mit erhöhtem Glukosegehalt aber die Migration von iBREC. Diese kann aber weiterhin mit einem anti-CD9-Antikörper gehemmt werden [21]. Für die Erhöhung der Migrationsrate von Endothelzellen, die in Medium mit erhöhtem Glukosegehalt kultiviert wurden [21, 35] scheint eine Umorganisation der Komplexe aus CD9, CD29 und ADAM10 nach den jetzigen Erkenntnissen aber keine Voraussetzung zu sein.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war, die Bedeutung des an grundlegenden Prozessen, die auch für die Entstehung der diabetischen Retinopathie (DR) wichtig sind, beteiligten Tetraspanins CD9 für mikrovaskuläre Endothelzellen zu klären. Dieses Tetraspanin wird – neben CD63 – von den untersuchten immortalisierten mikrovaskulären Endothelzellen der Rinderretina (iBREC) stark exprimiert. In diesen Zellen ist CD9 in der Plasmamembran lokalisiert, kommt aber auch intrazellulär in vesikulären Strukturen, die mit dem Zytoskelett assoziiert sind, vor. Eine stark N-glykosylierte Form des CD9, die allerdings nur einen sehr kleinen Teil der Gesamtmenge ausmacht, konnte in iBREC nachgewiesen werden, nicht aber eine Modifikation durch Phosphorylierung. Da Tetraspanine an der Modulation verschiedener Funktionen in Multiprotein-Komplexen beteiligt sind, war die Identifizierung von Bindungspartnern des CD9 wesentliches Ziel dieser Arbeit. Durch massenspektrometrische Peptidanalysen co-immunpräzipitierter Proteine konnten einige putative Komplexpartner des CD9 in Endothelzellen ermittelt werden. Von diesen konnten ADAM10 und die Integrin-Untereinheit β_1 (CD29) bereits in Folgeexperimenten sicher als Interaktionspartner verifiziert werden. Zumindest ein Teil des mit CD9 einen Komplex bildenden CD29 liegt verbunden mit der Integrin-Untereinheiten α_5 (CD49e) als klassischer Fibronektin-Rezeptor vor. Hemmung der Migration von iBREC durch Antikörper gegen CD9, CD29 und CD49e, aber auch gegen ADAM10, zeigte die funktionelle Relevanz dieser assoziierten Proteine. Dabei verstärkten sich die Wirkungen von anti-CD9- und anti-ADAM10-Antikörpern. Die nachgewiesene Interaktion von CD9 mit ADAM10 beschränkte sich ausschließlich auf die durch eine Proprotein-Konvertase prozessierte Form. Durch Co-Immunpräzipitation konnte gezeigt werden, dass auch ADAM10 in Endothelzellen mit der Integrin-Untereinheit β_1 assoziiert ist, was einen größeren Komplex aus CD9, CD29 und ADAM10 vermuten lässt. Die Interaktion von CD9 mit CD29 bzw. mit ADAM10 und auch die subzelluläre Lokalisation des CD9 werden nicht durch die Glukosekonzentration im Kulturmedium der iBREC beeinflusst.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass CD9 in mikrovaskulären Endothelzellen in Proteinkomplexen mit den Integrin-Untereinheiten α_5 und β_1,

sowie mit der Metallabhängigen Protease ADAM10 eine Rolle bei der Migration dieser Zellen spielt. Diese Arbeit stellt so eine wichtige Grundlage zur weiteren Erforschung der Mechanismen der Neovaskularisation bei krankheitsbedingten Prozessen wie der diabetischen Retinopathie dar.

Literaturverzeichnis

1) Akiyama SK: Integrins in cell adhesion and signaling. Hum Cell 9: 181-186 (1996)

2) Anders A, Gilbert S, Garten W, Postina R, Fahrenholz F: Regulation of the alpha-secretase ADAM10 by its prodomain and proprotein convertases. FASEB J 15: 1837-1839 (2001)

3) André M, Le Caer JP, Greco C, Planchon S, El Nemer W, Boucheix C, Rubinstein E, Chamot-Rooke J, Le Naour F: Proteomic analysis of the tetraspanin web using LC-ESI-MS/MS and MALDI-FTICR-MS. Proteomics 6: 1437-1449 (2006)

4) Arduise C, Abache T, Li L, Billard M, Chabanon A, Ludwig A, Mauduit P, Boucheix C, Rubinstein E, Le Naour F: Tetraspanins regulate ADAM10-mediated cleavage of TNF-α and epidermal growth factor. J Immunol 181: 7002-13 (2008)

5) Augustus AS, Buchanan J, Gutman E, Rengo G, Pestell RG, Fortina P, Koch WJ, Bensadoun A, Abel ED, Lisanti MP: Hearts lacking caveolin-1 develop hypertrophy with normal cardiac substrate metabolism. Cell Cycle 7: 2509-2518 (2008)

6) Barreiro O, Yáñez-Mó M, Sala-Valdés M, Gutiérrez-López MD, Ovalle S, Higginbottom A, Monk PN, Cabañas C, Sánchez-Madrid F: Endothelial tetraspanin microdomains regulate leukocyte firm adhesion during extravasation. Blood 105: 2852-61 (2005)

7) Behl Y, Korthapalli P, Desta T, DiPiazza A, Roy S, Graves DT: Diabetes-enhanced tumor necrosis factor-alpha production promotes apoptosis and loss of retinal microvascular cells in type 1 and type 2 of diabetic retinopathy. Am J Pathol 172: 1411-1418 (2008)

8) Berditchevski F. Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye. J Cell Sci 114: 4143-4151 (2001)

9) Boucheix C, Benoit P, Frachet P, Billard M, Worthington RE, Gagnon J, Uzan G: Molecular cloning of the CD9 antigen: a new familiy of cell surface proteins. J Biol Chem 266: 117-122 (1991)

10) Boucheix C, Rubinstein E: Tetraspanins. Cell Mol Life Sci 58: 1189-1205 (2001)

11) Boulday G, Coupel S, Coulon F, Soulillou JP, Charreau B: Antigraft antibody-mediated expression of metalloproteinases on endothelial cells. Differential expression of TIMP-1 and ADAM-10 depends on antibody specificity and isotype. Circ Res 88: 430-437 (2001)

12) Brownlee M: The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. Diabetes 54: 1615–1625 (2005)

13) Bustin SA: Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. J Mol Endocrinol. 25: 169-193 (2000)

14) Cagliero E, Roth T, Roy S, Lorenzi M: Characteristics and mechanisms of high-glucose-induced overexpression of basement membrane components in cultured human endothelial cells. Diabetes 40: 102-110 (1991)

15) Charrin S, Manié S, Oualid M, Billard M, Boucheix C, Rubinstein E: Differential stability of tetraspanin/tetraspanin interactions: role of palmitoylation. FEBS Lett. 516: 139-144 (2002)

16) Chen W, Esselman WJ, Jump DB, Busik JV: Anti-inflammatory effect of docosahexaenoic acid on cytokine-induced adhesion molecule expression in human retinal vascular endothelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 46: 4342-4347 (2005)

17) Chen S, Mukherjee S, Chakraborty C, Chakrabarti S: High glucose-induced, endothelin-dependent fibronectin synthesis is mediated via NF-kappa B and AP-1. Am J Physiol Cell Physiol 284: 263-272 (2008)

18) Chibber R, Ben-Mahmud BM, Chibber S, Kohner EM: Leukocytes in diabetic retinopathy. Curr Diabetes Rev 3: 3-14 (2007).

19) Danen EH, Yamada KM: Fibronectin, integrins, and growth control. J Cell Physiol 189: 1-13 (2001)

20) Deissler H, Deissler H, Lang GK, Lang GE: Generation and characterization of iBREC:novel hTERT-immortalized bovine retinal endothelial cells. Int J Mol Med 16: 65-70 (2005)

21) Deissler H, Kuhn EM, Lang GE, Deissler H: Tetraspanin CD9 is involved in the migration of retinal microvascular endothelial cells. Int J Mol Med 20: 643-52 (2007)

22) Drapkin R, Crum CP, Hecht JL: Expression of candidate tumor markers in ovarian carcinoma and bengin ovary: evidence for a link between epithelial phenotype and neoplasia. HUM Pathol 35: 1014-1021 (2004)

23) Ejaz S, Chekarova I, Ejaz A, Sohail A, Lim CW: Importance of pericytes and mechanisms of pericyte loss during diabetes retinopathy. Diabetes Obes Metab 10: 53-63 (2008)

24) Espenel C, Margeat M, Dosset P, Arduise C, Le Grimellec C, Royer C, Boucheix C, Rubinstein E, Milhiet P: Single-molecule analysis of CD9 dynamics and partitioning reveals mutiple modes of interaction in the tetraspanin web. J Cell Biol 182: 765-776 (2008)

25) Eulenfeld R, Schaper F: A new mechanism for the regulation of Gab1 recruitment to the plasma membrane. J Cell Sci 122: 55-64 (2009)

26) Fernandes R, Carvalho AL, Kumagai A, Seica R, Hosoya K, Terasaki T, Murta J, Pereira P, Faro C: Downregulation of retinal GLUT1 in diabetes by ubiquitinylation. Mol Vis. 10: 618-628 (2004)

27) Furuya M, Kato H, Nishimura N, Ishiwata I, Ikeda H, Ito R, Yoshiki T, Ishikura H: Down-regulation of CD9 in human ovarian carcinoma cell might contribute to peritoneal dissemination: morphologic alteration and reduced expression of beta1 integrin subsets. Cancer Res 65: 2617-2625 (2005)

28) Geary SM, Cambareri AC, Sincock PM, Fitter S, Ashman LK: Differential tissue expression of epitopes of the tetraspanin CD151 recognised by monoclonal antibodies. Tissue Antigens 58: 141-153 (2001)

29) Giebel SJ, Menicucci G, McGuire PG, Das A: Matrix metalloproteinases in early diabetic retinopathy and their role in alteration of the blood-retinal barrier. Lab Invest 85: 597-607 (2005)

30) Hemler ME: Specific tetraspanin functions. J Cell Biol 155: 1103-1107 (2001)

31) Hemler ME: Tetraspanin functions and associated microdomains. Nat Rev 6: 801-811 (2005)

32) Houle CD, Ding XY, Foley JF, Afshari CA, Barrett JC, DAvis BJ: Loss of expression and altered localization of KAI1 and CD9 protein are associated with eptithelial ovarian cancer progression. Gynecol Oncol 86: 69-78 (2002)

33) Hu CC, Liang FX, Zhou G, Tu L, Tang CH, Zhou J, Kreibich G, Sun TT: Assembly of urothelial plaques: tetraspanin function in membrane protein trafficking. Mol Biol Cell 16: 3937-3950 (2005)

34) Huang H, Groth J, Sossey-Alaoui K, Hawthorn L, Beall S, Geradts J: Aberrant expression of novel and previously described cell membrane markers in human breast cancer cell lines und tumors. Clin Cancer Res 11: 4357-4364 (2005)

35) Huang Q, Sheibani N: High glucose promotes retinal endothelial cell migration through activation of Src, PI3K/Akt1/eNOS, and ERKs. Am J Physiol Cell Physiol 295: 1647-1657 (2008)

36) Hughes JM, Brink A, Witmer AN, Hanraads-de Riemer M, Klaassen I, Schlingemann RO: Vascular leucocyte adhesion molecules unaltered in the human retina in diabetes. Br J Ophthalmol 88: 566-572 (2004)

37) Idris I, Donnelly R: Protein kinase C beta inhibition: A novel therapeutic strategy for diabetic microangiopathy. Diab Vasc Dis Res 3: 172-178 (2006)

38) Jackson P, Marreiros A, Russel PJ: KAI1 tetraspanin and metastasis supressor. Int J Biochem Cell Biol 37: 530-534 (2005)

39) Jamil F, Pestron D, Shousa S: CD9 immunohistochemical staining of breast carcinoma: unlikely to provide useful prognostic information for routine use. Histopathology 39: 572-577 (2001)

40) Kawashima M, Doh-uraK, Mekada E, Fukui M, Iwaki T: CD9 expression in solid non-neuroepithelial tumors and infiltrative astrocytic tumors. J Histochem Cytochem 50: 1195-1203 (2002)

41) Kern TS: Contributions of inflammatory processes to the development of the early stages of diabetic retinopathy. Exp Diabetes Res 2007: 95103-95117 (2007)

42) Kersey JH, LeBien TW, Abramson CS, Newman R, Sutherland R, Greaves M: P-24: a human leukemia-associated and lymphohemopoietic progenitor cell surface structure identified with monoclonal antibody. J Exp Med 153: 726-731 (1981)

43) Klein-Soyer C, Azorsa DO, Cazenave JP, Lanza F: CD9 participates in endothelial cell migration during in vitro wound repair. Arterioscler Thromb Vasc Biol 20: 360-409 (2000)

44) Knedler A, Ham RG: Optimized medium for clonal growth of human microvascular endothelial cells with minimal serum. In Vitro Cell Dev Biol 23: 481-491 (1987)

45) Kotha J, Longhurst C, Appling W, Jennings LK: Tetraspanin CD9 regulates beta 1 integrin activation and enhances cell motility to fibronectin via a PI-3 kinase-dependent pathway. Exp Cell Res 314: 1811-1822 (2008)

46) Kovalenko OV, Yang XH, Hemler ME: A novel cysteine cross-linking method reveals a direct association between claudin-1 and tetraspanin CD9. Mol Cell Proteomics 6: 1855-1867. (2007)

47) Kubista B, Erovic BM, Klinger H, Sulzbacher I, Trieb K: CD9 expression is not a prognostic factor in human osteosarcoma. Cancer Lett 209: 105-110 (2004)

48) Kyhse-Andersen J: Electroblotting of mutiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. J Biochem Biophys Methods 10: 203-209 (1984)

49) Le Gall SM, Bobé P, Reiss K, Horiuchi K, Niu XD, Lundell D, Gibb DR, Conrad D, Saftig P, Blobel CP: ADAMs 10 and 17 represent differentially regulated components of a general shedding machinery for membrane proteins such as transforming growth factor alpha, L-Selectin, and tumor necrosis factor alpha. Mol Biol Cell 20: 1785-1794 (2009)

50) Leal EC, Aveleira CA, Castilho AF, Baptista FI, Ambrósio AF: Müller cells do not influence leukocyte adhesion to retinal endothelial cells. Ocul Immunol Inflamm 16: 173-179 (2008)

51) Leavesley DI, Schwartz MA, Rosenfeld M, Cheresh DA: Integrin beta 1- and beta 3-mediated endothelial cell migration is triggered through distinct signal mechanisms. J Cell Biol 121: 163-170 (1993)

52) Levy S, Shoham T: Protein-protein interaction in the tetraspanin-web. Physiology (Bethesda) 20: 218-224 (2005 a)

53) Levy S, Shoham T: The tetraspanin-web modulates immune-signalling complexes. Nat Rev Immunol 5: 136-148 (2005 b)

54) Ley K, Zhang H: Dances with leukocytes: how tetraspanin-enriched microdomains assemble to form endothelial adhesive platforms. J Cell Biol 183: 375-376 (2008)

55) Liu L, He B, Liu WM, Zhou D, Cox JV, Zhang XA: Tetraspanin CD151 promotes migration by regulating integrin trafficking. J Biol Chem 282: 31631-31642 (2007)

56) Longhurst CM, Jacobs JD, White MM, Crossno JT Jr, Fitzgerald DA, Bao J, Fitzgerald TJ, Raghow R, Jennings LK: Chinese hamster ovary cell motility to fibronectin is modulated by the second extracellular loop of CD9. Identification of a putative fibronectin binding site. J Biol Chem 277: 32445-32452 (2002)

57) Madsen-Bouterse SA, Kowluru RA: Oxidative stress and diabetic retinopathy: pathophysiological mechanisms and treatment perspectives. Rev Endocr Metab Disord 9: 315-327 (2008)

58) Maecker HT, Todd SC, Levy S: The tetraspanin superfamiliy: molecular fascilliators. FASEB J 11: 428-442 (1997)

59) Maier AK, Kociok N, Zahn G, Vossmeyer D, Stragies R, Muether PS, Joussen AM: Modulation of hypoxia-induced neovascularization by JSM6427, an integrin alpha5beta1 inhibiting molecule. Curr Eye Res 32: 801-812 (2007)

60) Merlak M, Kovacević D, Balog T, Marotti T, Misljenović T, Mikulicić M, Dekaris I: Expression of vascular endothelial growth factor in proliferative diabetic retinopathy. Coll Antropol 32: 39-43 (2008)

61) Mhawech P, Herrmann F, Coassin M, Guillou L, Iselin CE: Motility-related protein 1 (MRP-1/CD9) expression in urothelial bladder carcinoma and its relation to tumor recurrence and progression. Cancer 98: 1649-1657 (2003)

62) Miyake M, Nakano K, Ieki Y, Adachi M, Huang CL, Itoi S, Koh T, Taki T: Motility-related protein 1 (MRP-1/CD9) expression: inverse correlation with metastases in breast cancer. Cancer Res 55: 4127-4131 (1995)

63) Miyake M, Nakano K, Itoi SI, Koh T, Taki T: Motility-related protein-1 (MRP-1/CD9) reduction as factor of poor prognosis in breast cancer. Cancer Res 56: 1244-1249 (1996)

64) Mochizuki S, Okada Y: ADAMs in cancer cell proliferation and progression. Cancer Sci 98: 621-628 (2007)

65) Moriarty P, Dickson AJ, Erichsen JT, Boulton M: Protein kinase C isoenzyme expression in retinal cells. Ophthalmic Res 32: 57-60 (2000)

66) Morin PJ: Claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy. Cancer Res 65: 9603-9606 (2005)

67) Mu H, Zhang XM, Liu JJ, Dong L, Feng ZL: Effect of high glucose concentration on VEGF and PEDF expression in cultured retinal Müller cells. Mol Biol Rep Dec 24. [Epub ahead of print] (2008)

68) Ning A, Cui J, Maberley D, Ma P, Matsubara J: Expression of integrins in human proliferative diabetic retinopathy membranes. Can J Ophthalmol. 43: 683-688 (2008)

69) Oren, R, Takahashi, S, Doss, C, Levy, R, and Levy, S: TAPA-1, the target of an antiproliferative antibody, defines a new family of transmembrane proteins. Mol Cell Biol 10: 4007-4015 (1990)

70) Pols MS, Klumperman J: Trafficking and function of the tetraspanin CD63. Exp Cell Res 315: 1584-1592 (2009)

71) Ponnuchamy B, Khalil RA: Role of ADAMs in endothelial cell permeability: cadherin shedding and leukocyte rolling. Circ Res 102:1 139-1142 (2008)

72) Proulx S, Guérin SL, Salesse C: Effect of quiescence on integrin alpha5beta1 expression in human retinal pigment epithelium. Mol Vis 9: 473-481 (2003)

73) Rajah TT, Olson AL, Grammas P: Differential glucose uptake in retina- and brain-derived endothelial cells. Microvasc Res 62: 236-242 (2001)

74) Roth T, Podestá F, Stepp MA, Boeri D, Lorenzi M: Integrin overexpression induced by high glucose and by human diabetes: potential pathway to cell dysfunction in diabetic microangiopathy. Proc Natl Acad Sci U S A 90: 9640-9644 (1993)

75) Rubinstein E, Ziyyat A, Wolf JP, Le Naour F, Boucheix C: The molecular players of sperm-egg fusion in mammals. Semin Cell Dev Biol 17: 254-263 (2006)

76) Sala-Valdés M, Ursa A, Charrin S, Rubinstein E, Hemler ME, Sánchez-Madrid F, Yáñez-Mó M: EWI-2 and EWI-F link the tetraspanin web to the actin cytoskeleton through their direct association with ezrin-radixin-moesin proteins. J Biol Chem 281: 19665-19675 (2006)

77) Sauer G, Windisch J, Kurzeder C, Heilmann V, Kreienberg R, Deissler H: Progression of cervical carcinomas is associated with down-regulation of CD9 but strong local re-expression at sites of transendothelial invasion. Clin Cancer Res 9: 6426-6431 (2003)

78) Schulz B, Pruessmeyer J, Maretzky T, Ludwig A, Blobel CP, Saftig P, Reiss K: ADAM10 regulates endothelial permeability and T-Cell transmigration by proteolysis of vascular endothelial cadherin. Circ Res 102:1192-1201 (2008)

79) Seals DF, Courtneidge SA: The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. Genes Dev 17: 7-30 (2003)

80) Seehafer J, Longenecker BM, ShawAR: Biochemical characterization of human carcinoma surface antigen associated with protein kinase c activity. Int J Cancer 35: 821-829 (1984)

81) Seymour L, Bezdowa WR, Meyer K: Tumor factor predicting for prognosis in metastatic breast cancer. The presence of P24 predicts for response to treatment und duration of survival. Cancer 66: 2390-2394 (1990)

82) Simó R, Carrasco E, García-Ramírez M, Hernández C: Angiogenic and antiangiogenic factors in proliferative diabetic retinopathy. : Curr Diabetes Rev. 2: 71-98 (2006)

83) Sincock PM, Fitter S, Parton RG, Berndt MC, Gamble JR, Ashman LK: PETA-3/CD151, a member of the transmembrane 4 superfamily, is localised to the plasma membrane and endocytic system of endothelial cells, associates with multiple integrins and modulates cell function. J Cell Sci 112:833-844 (1999)

84) Stipp CS, Kolesnikova TV, Hemler ME: EWI-2 is a major CD9 and CD81 partner and member of a novel Ig protein subfamily. J Biol Chem. 276: 40545-40554 (2001)

85) Stipp CS, Kolesnikova TV, Hemler ME: Functional domains in tetraspanin proteins. Trends Biochem Sci 28: 106-112 (2006)

86) Umeda N, Kachi S, Akiyama H, Zahn G, Vossmeyer D, Stragies R, Campochiaro PA : Suppression and regression of choroidal neovascularization by systemic administration of an alpha5beta1 integrin antagonist. Mol Pharmacol 69: 1820-1828 (2006)

87) Vjugina U, Evans JP: New insights into the molecular basis of mammalian sperm-egg membrane interactions. Front Biosci 13: 462-476 (2008)

88) Wang Y, Vom Hagen F, Pfister F, Bierhaus A, Feng Y, Gans R, Hammes HP: Receptor for advanced glycation end product expression in experimental diabetic retinopathy. Ann N Y Acad Sci 1126:42-45 (2008)

89) Way KJ, Katai N, King GL: Protein kinase C and the development of diabetic vascular complications. Diabetic Medicine 18: 945-959 (2001)

90) Wilson SH, Ljubimov AV, Morla AO, Caballero S, Shaw LC, Spoerri PE, Tarnuzzer RW, Grant MB: Fibronectin fragments promote human retinal endothelial cell adhesion and proliferation and ERK activation through alpha5beta1 integrin and PI 3-kinase. Invest Ophthalmol Vis Sci 44: 1704-1715 (2003)

91) Wolf S: Current status of anti-vascular endothelial growth factor therapy in Europe. Jpn J Ophthalmol 52: 433-439 (2008)

92) Wride MA, Geatrell J, Guggenheim JA: Proteases in eye development and disease. Birth Defects Res C Embryo Today 78:90-105 (2001)

93) Yamamoto M, Ramirez SH, Sato S, Kiyota T, Cerny RL, Kaibuchi K, Persidsky Y, Ikezu T: Phosphorylation of claudin-5 and occludin by rho kinase in brain endothelial cells. Am J Pathol 172: 521-533 (2008)

94) Yañez-Mó M, Barreiro O, Gonzalo P, Batista A, Megías D, Genís L, Sachs N, Sala-Valdés M, Alonso MA, Montoya MC, Sonnenberg A, Arroyo AG, Sánchez-Madrid F: MT1-MMP collagenolytic activity is regulated through association with tetraspanin CD151 in primary endothelial cells. Blood 112: 3217-3226 (2008)

95) Zhang XA, Bontrager AL, Hemler ME: Transmembrane-4 superfamily proteins associate with activated protein kinase C (PKC) and link PKC to specific beta(1) integrins. J Biol Chem. 276:25005-25013 (2001)

96) Zhang L, Bukulin M, Kojro E, Roth A, Metz VV, Fahrenholz F, Nawroth PP, Bierhaus A, Postina R: Receptor for advanced glycation end products is subjected to protein ectodomain shedding by metalloproteinases. J Biol Chem 283: 35507-35516 (2008)

97) Zheng ZZ, Liu ZX: Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Akt pathway mediates CD151-induced endothelial cell proliferation and cell migration. Int J Biochem Cell Biol 39: 340-348 (2007)

98) Zöller M: Tetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis. Nat Rev Cancer 9: 40-55 (2009)

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei allen, die diese Promotionsarbeit ermöglichten:

Herrn PD. Dr. rer. nat. Helmut Deißler danke ich für die freundliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe im Forschungslabor der Frauenklinik und die Übernahme der Betreuung meiner Doktorarbeit. Sein Engagement, sein Fachwissen und seine Geduld ermöglichten diese Arbeit erst.

Für ihre Ideen, Geduld und Unterstützung möchte ich mich auch bei Frau Dr. rer. nat. Heidrun Deißler, Leiterin des Forschungsbereiches der Augenklinik Ulm, bedanken. Ohne ihre Hilfestellung wäre diese Doktorarbeit nicht möglich gewesen.

Frau Prof. Dr. med. Gabriele Lang danke ich für die Anschlußfinanzierung meiner Stelle und die Möglichkeit meine Arbeit zu präsentieren, sowie für ihr Interesse und ihren Glauben an das „Tetraspanin-Projekt“.

Herzlichen Dank auch an die Mitarbeiter des Augenlabors und des EOLs für alle guten Tipps, grenzenlose Motivation und jede Menge Spaß.

Herrn Dr. biol. hum. Claus-Jürgen Scholz danke ich für seine wertvollen und praktischen Tipps im Laboralltag.

Frau Marlen Keimling danke ich für die Unterstützung bei den FACS-Analysen.

Ein besonderer Dank gilt meinem Mann, meiner gesamten Familie und Freunden für viel Verständnis, Geduld und Interesse an meiner Arbeit.