

**Die Bedeutung kleiner RhoGTPasen der Rho-
Subfamilie und ihrer Effektoren für die
Funktion und angiogenetische Kapazität
humaner Endothelzellen**

**Dissertation
zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

angefertigt am Institut für Pharmazie
Abteilung Klinische Pharmazie und Pharmakotherapie
(AG Prof. Dr. Benndorf)

vorgelegt von
Herrn Michael Hauke
geboren am 26.10.1989 in Lutherstadt Wittenberg

Gutachter: Prof. Dr. Ralf A. Benndorf

Prof. Dr. Guido Posern

Prof. Dr. Sönke Behrends

Tag der Verteidigung: 01.11.2023

Vorsitzender der Promotionskommission: Prof. Dr. Peter Imming

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
1. Einleitung	5
1.1. Kleine GTP-bindende Proteine als molekulare Schalter.....	6
1.2. RhoGTPasen als Subfamilie der kleinen GTP-bindenden Proteine.....	7
1.2.1. Struktur der RhoGTPasen.....	8
1.2.2. Die RhoGTPasen RhoA, RhoB und RhoC.....	10
1.2.3. Interaktion von RhoA, RhoB und RhoC mit RhoGDIs, RhoGEFs und RhoGAPs.....	13
1.2.4. Effektorbindung an RhoA, RhoB und RhoC.....	17
1.2.5. Regulation der RhoGTPasen durch Phosphorylierung und Ubiquitinierung.....	20
1.3. Das Endothel.....	22
1.3.1. Morphologische Heterogenität.....	23
1.3.2. Funktionelle Heterogenität.....	24
1.3.3. Angiogenese.....	25
1.3.4. VEGF - <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>	27
1.3.5. Physiologische Rolle des Endothels.....	29
1.3.6. Dysfunktion des Endothels - Atherosklerose.....	30
1.4. Der Thromboxan A ₂ -Rezeptor.....	31
2. Material und Methoden	34
2.1. Zellkultur.....	34
2.2. Herstellung, Reinigung und Titerbestimmung lentiviraler Vektoren.....	34
2.3. Lentivirale Transduktion von HUVEC und HCAEC.....	35
2.4. Rho-Aktivitätsassay.....	37
2.5. FRET-basierte Stimulationsuntersuchungen mit einem RhoA-Wildtyp-Biosensor.....	38
2.6. Zellproliferation.....	39
2.7. Propidiumiodid-Färbung.....	40
2.8. Aktinfärbung und morphologische Analysen von HUVEC.....	41

2.9.	Paxillin-Färbung zur Visualisierung von fokalen Adhäsionen	41
2.10.	Sphäroid-basierter <i>Sprouting</i> -Assay	42
2.11.	<i>Tube-Formation</i> -Assay	43
2.12.	<i>Scratch</i> -Assay.....	43
2.13.	<i>In vivo</i> -Angiogeneseassay - Xenograft	44
2.14.	Co-Immünpräzipitation von Rho-Interaktionspartnern.....	47
2.15.	RNA-Sequenzierung und differentielle Genexpressionsanalysen	48
2.16.	Western Blot.....	49
2.17.	RNA-Isolation und <i>Real-Time</i> PCR.....	52
2.18.	Transformation von <i>Escherichia coli</i> und Plasmid-Präparation	54
2.19.	Statistische Auswertung	55
3.	Ergebnisse	56
3.1.	Aktivität der verwendeten Rho-Varianten	56
3.2.	RhoA-Stimulationsversuche mit Thrombin und VEGF	58
3.3.	Einfluss der RhoGTPasen auf die Morphologie und fokalen Adhäsionen von HUVEC	59
3.4.	Einfluss der RhoGTPasen auf die Proliferation von HUVEC	64
3.5.	Einfluss der RhoGTPasen auf das Zellüberleben von HUVEC	67
3.6.	<i>Tube-Formation</i> -Assay	69
3.7.	<i>Scratch</i> -induzierte Migration von Endothelzellen mit RhoA, RhoB und RhoC.....	70
3.7.1.	<i>Scratch</i> -induzierte Migration von HUVEC unter basalen Bedingungen.....	71
3.7.2.	<i>Scratch</i> -induzierte Migration von HUVEC nach Hemmung von RhoGTPasen durch C3 Transferase aus <i>Clostridium botulinum</i>	73
3.7.3.	<i>Scratch</i> -induzierte Migration von HCAEC unter basalen Bedingungen und nach Hemmung von RhoGTPasen durch C3 Transferase aus <i>Clostridium botulinum</i> ..	74
3.7.4.	Einfluss einer Hemmung der direkten bzw. indirekten Rho-Effektoren ROCK, LIMK1, LIMK2 und Myosin II auf RhoGTPase-vermittelte anti-migratorische Effekte in HUVEC	76

3.7.5.	<i>Scratch</i> -induzierte Migration von HUVEC nach <i>Knockdown</i> der potentiellen Rho-Effektoren CIT, DIAPH1, RHPN1 und RHPN2	80
3.8.	Sphäroid-basierter <i>Sprouting</i> -Assay	85
3.8.1.	HUVEC-Sphäroid-basierter <i>Sprouting</i> -Assay unter basalen Bedingungen	85
3.8.2.	HUVEC-Sphäroid-basierter <i>Sprouting</i> -Assay mit einer Hemmung der RhoGTPasen durch C3 Transferase aus <i>Clostridium botulinum</i>	88
3.8.3.	HCAEC-Sphäroid-basierter <i>Sprouting</i> -Assay unter basalen Bedingungen und nach Hemmung der RhoGTPasen durch C3 Transferase aus <i>Clostridium botulinum</i> ...	89
3.8.4.	Einfluss einer Hemmung der direkten bzw. indirekten Rho-Effektoren ROCK, LIMK1, LIMK2 und Myosin II auf RhoGTPase-vermittelte anti-angiogenetische Effekte in HUVEC	92
3.8.5.	<i>Knockdown</i> der Rho-Effektoren CIT, DIAPH1, RHPN1 und RHPN2 in HUVEC und ihr Einfluss auf Rho-vermittelte Hemmeffekte im Sphäroid-basierten <i>Sprouting</i> -Assay	97
3.9.	<i>In vivo</i> -Angiogenese-Assay - Xenograft	100
3.10.	Transkriptomanalysen RhoGTPase-exprimierender HUVEC	104
3.10.1.	Validierung ausgewählter differentiell exprimierter Gene aus der globalen Transkriptomanalyse mittels qPCR.....	108
3.11.	Interaktomanalyse zur Identifizierung potentieller Rho-Interaktionspartner in humanen Endothelzellen.....	117
4.	Diskussion	121
4.1.	Aktivität und Interaktom der untersuchten RhoGTPase-Varianten	123
4.2.	Effekte der RhoGTPasen auf die Endothelzellmorphologie und Zellviabilität	125
4.3.	Einfluss von RhoA, RhoB und RhoC auf die angiogenetische Kapazität humaner Endothelzellen.....	129
4.4.	<i>In vivo</i> -Angiogenese-Analyse - Xenograft-Assay.....	134
4.5.	Abschließende Betrachtung der funktionellen Untersuchungen.....	135
5.	Zusammenfassung	138
6.	Anhang	140
6.1.	Übersicht der Plasmide für den shRNA-vermittelten Gen- <i>Knockdown</i>	140

6.2.	Nachweis des shRNA-vermittelten <i>Knockdowns</i> der Rho-Interaktionspartner CIT, DIAPH1, RHPN1 und RHPN2 mittels <i>Real-Time</i> PCR	141
6.3.	Übersicht der verwendeten pharmakologischen Inhibitoren.....	142
6.4.	Histogramme der PI-FACS-Analysen in HUVEC.....	142
6.5.	Ergänzende Daten zur Transkriptomanalyse.....	143
6.6.	Vektorkarten für die Expression der Wildtyp-Proteine von RhoA, RhoB und RhoC in humanen Endothelzellen	145
7.	Abbildungsverzeichnis	146
8.	Tabellenverzeichnis	150
9.	Formelverzeichnis	150
10.	Abkürzungsverzeichnis	151
11.	Literaturverzeichnis	153
	Eidesstattliche Erklärung	169
	Danksagung	170
	Angaben zur Person	171

1. Einleitung

Zellen stellen als kleinste funktionelle Einheiten die grundlegenden Bausteine lebender Organismen dar. Ihre Funktionalität beruht dabei auf geordneten, biochemischen Prozessen. Sie sind somit in der Lage, ein komplexes Netzwerk aus unzähligen Einzelreaktionen zu orchestrieren. Dabei müssen nicht nur intrazelluläre Signalwege aufeinander abgestimmt, sondern auch externe Stimuli, wie beispielsweise physikalische oder chemische Reize, wahrgenommen und in intrazelluläre Prozesse umgesetzt bzw. eingebunden werden. Dadurch können Zellen auf ihren allgemeinen Umgebungszustand, ein verändertes Nährstoffangebot oder den Kontakt zu benachbarten Zellen reagieren. Die Vorgänge, die eine Aufnahme des extrazellulären Signals an der Zelloberfläche und dessen Übermittlung in intrazelluläre Signalketten umfassen, werden als Signaltransduktion bezeichnet.

Grundlegende, zelluläre Vorgänge, wie die Proliferation, Migration, Differenzierung oder auch die Apoptose als programmierter Zelltod, stellen eine Reaktion der Zellen auf äußere Signale dar. Werden nun Signalwege durch externe Stimuli oder gentechnische Manipulation *in vitro* dauerhaft beeinflusst, kann das zelluläre Verhalten aufgrund dieser Fehlregulation erheblich beeinflusst werden.

GTP (Guanosin triphosphat)-bindende Proteine stellen in ihrer Funktion als molekulare Schalter entscheidende Regulatoren intrazellulärer Signalprozesse dar. Sie vermitteln die Weiterleitung extrazellulärer Stimuli an intrazelluläre Signalnetzwerke. Man unterscheidet hierbei zwischen membranständigen, heterotrimeren G-Proteinen und den kleinen GTPasen der Ras-Superfamilie. Mit über 60 Vertretern [2] ist die Ras-Superfamilie die größte Klasse der Guaninnukleotid-bindenden Proteine. Aufgrund von Sequenzhomologien lässt sich diese Superfamilie in 5 Subfamilien unterteilen [3]. Dazu zählen die Ras-Proteine (*Rat sarcoma*), die Rho-Proteine (*Ras homologous*), die Rab-Proteine (*Ras-like Proteins from Rat Brain*), die Arf-Proteine (*ADP-ribosylation Factor*) und die Ran-Proteine (*Ras-related Nuclear Transport*). Eine Unterfamilie dieser GTP-bindenden Proteine, die Gruppe der kleinen RhoGTPasen, ist zentraler Bestandteil der Untersuchungen dieser Arbeit. Deshalb soll zunächst im Allgemeinen die Funktionsweise der kleinen GTP-bindenden Proteine der Ras-Superfamilie betrachtet und anschließend näher auf die untersuchten RhoGTPasen eingegangen werden.

1.1. Kleine GTP-bindende Proteine als molekulare Schalter

Kleine, membranassoziierte, monomere GTPasen werden unter dem Begriff der Ras-Superfamilie der Guaninnukleotid-bindenden Proteine zusammengefasst. Sie sind 20-30 kDa große Schaltermoleküle, die komplexe, regulatorische Zellprozesse kontrollieren [4, 5], in dem sie zwischen einem aktiven (GTP-gebunden) und einem inaktiven (GDP-gebunden) Zustand wechseln (Abbildung 1) [6]. Da die intrinsische GTPase-Aktivität der kleinen Guaninnukleotid-bindenden Proteine nur sehr gering ist [7], das heißt die Hydrolyse des GTP zu GDP nur langsam abläuft, sind die GTPasen der Ras-Superfamilie alleine nicht als schnelle Schalter für zelluläre Prozesse geeignet. Deshalb werden für den Übergang von einem zum anderen Aktivitätszustand sogenannte GEFs (*Guaninnucleotide Exchange Factors*) als Aktivatoren und GAPs (*GTPase-activating Proteins*) als Inaktivatoren, benötigt. Dabei beschleunigen die GEFs durch Assoziation an die membranständige GTPase die Dissoziation des GDP aus dem inaktiven Schalterprotein. Daraufhin bindet die GTPase bevorzugt an GTP, da die Affinität zum GDP durch die GEFs herabgesetzt ist und GTP zusätzlich intrazellulär in einer deutlich höheren Konzentration vorliegt als GDP [7]. Aus der GTP-Bindung resultiert nun die Aktivierung der GTPase und die Dissoziation des GEFs [8-10]. Effektorproteine binden bevorzugt an die GTP-gebundene, aktive Form der GTPasen, werden dadurch selbst reguliert und leiten somit das Signal weiter [11].

Die GAPs als GTPase-aktivierende Regulatoren beschleunigen die GTP-Hydrolyse, also die Abspaltung des γ -Phosphates, und damit die Inaktivierung der GTPase [12, 13].

Für einige kleine GTPasen, wie die Rab- und die RhoGTPasen, sind darüber hinaus weitere regulatorische Proteine, die GDIs (*Guaninenucleotide Dissociation Inhibitors*) beschrieben worden [14, 15]. Dabei binden die GDIs an die inaktive GTPase-Form und verhindern somit eine unmittelbare, erneute Aktivierung durch GEFs und lösen sie zusätzlich aus ihrer Membranlokalisation (Abbildung 1) [16]. Aufgrund der GDI-Bindung verbleiben die GTPasen in ihrem inaktiven Zustand im Zytosol, entgehen somit zusätzlich einer Effektorbindung und einer proteolytischen Degradation [16]. Die für die GTPase-Aktivierung entscheidende Membranständigkeit wird durch eine Bindung der GDIs an den prenylierten C-Terminus der GTPase verhindert [17, 18]. Um die GDI-gebundene GTPase einer erneuten GTP-Beladung und damit einer Aktivierung zugänglich zu machen, erfolgt die Verdrängung des Inhibitors durch einen GEF und der GTPase-Zyklus kann sich wiederholen [19].

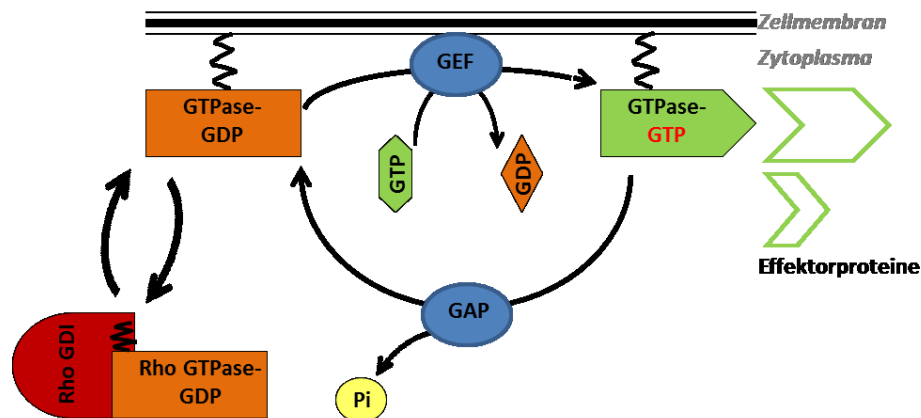


Abbildung 1: Der Aktivitätszyklus kleiner, membranständiger GTPasen. Kleine, monomere GTPasen besitzen zwei Aktivitätszustände, einen inaktiven (GDP-gebunden) und einen aktiven (GTP-gebunden). Sie dienen der Signalweiterleitung von intra- und extrazellulären Stimuli. Soll nun ein Signal weitergeleitet werden, muss ein GEF-vermittelter Austausch von GDP zu GTP in der GTPase erfolgen. Im aktiven (GTP-gebundenen) Zustand sind GTPasen in der Lage mit verschiedenen Effektorproteinen zu interagieren und intrazelluläre Signalnetzwerke zu regulieren. GTPase-aktivierende Proteine (GAP) katalysieren die Hydrolyse von GTP zu GDP und führen zur Inaktivierung der GTPase. Die Familie der RhoGTPasen kann in ihrem inaktiven Zustand durch GDI gebunden und von einer erneuten Aktivierung abgeschirmt im Zytosol verbleiben. Abbildung modifiziert nach [2].

1.2. RhoGTPasen als Subfamilie der kleinen GTP-bindenden Proteine

Eine Subfamilie in der großen Klasse der GTP-bindenden Proteine der Ras-Superfamilie stellen die RhoGTPasen (*Ras homologous*) dar, die sich durch hohe Aminosäuresequenz- und Strukturhomologie auszeichnen [7]. Erstmals konnte das *RHO*-Gen 1985 aus der Nacktschnecke *Aplysia californica* (Kalifornischer Seehase) isoliert werden [20]. Bis heute sind 20 RhoGTPasen im menschlichen Genom identifiziert worden [21], die sich wiederum in bis zu 8 Gruppen unterteilen lassen (Tabelle 1) [21, 22]. Sie entsprechen in ihrer Funktionsweise als molekulare Schalter dem bereits allgemein für die kleinen GTP-bindenden Proteine beschriebenen Zyklus (Abbildung 1) aus GTP-Bindung (aktiv) und GDP-Bindung (inaktiv). Dabei interagieren die bekannten, humanen RhoGTPasen mit rund 80 GEFs (Aktivatoren), mehr als 70 GAPs (Inaktivatoren) und 3 GDIs [2, 7, 16, 23].

Die bekanntesten Vertreter der RhoGTPasen sind Cdc42 (*Cell Division Cycle 42*), Rac1 (*Ras-related C3 Botulinum Toxin Substrate 1*) und RhoA, da sie als erste über ihre Funktion in der morphologischen Zellorganisation nach extrazellulären Stimuli identifiziert werden konnten [24].

Tabelle 1: RhoGTPase-Familie. Auflistung aller Mitglieder der RhoGTPase-Familie mit ihrer Zuordnung zu den entsprechenden Subfamilien und ihrer C-terminalen Prenylierung (GG: Geranylgeranylierung; F: Farnesylierung; P: Palmylierung). Modifiziert nach [21].

RhoGTPase	Subfamilie	C-terminale Prenylierung	RhoGTPase	Subfamilie	C-terminale Prenylierung
RhoA	Rho	GG	RhoU	Rho U/V	P
RhoB	Rho	GG, F, P	RhoV	Rho U/V	P
RhoC	Rho	GG	RhoD	Rho D/F	GG
Rac1	Rac	GG, P	RhoF	Rho D/F	GG
Rac2	Rac	GG	Rnd 1	Rnd	F
Rac3	Rac	GG	Rnd 2	Rnd	F
RhoG	Rac	GG	Rnd 3	Rnd	F
Cdc42	Cdc42	GG, P	RhoH	Rho H	F
RhoJ	Cdc42	GG	Rho BTB 1	Rho BTB	keine
RhoQ	Cdc42	GG	Rho BTB 2	Rho BTB	keine

1.2.1. Struktur der RhoGTPasen

Die dreidimensionale Struktur der RhoGTPasen ist durch die zentrale G-Domäne, die aus einem 6-strängigen β -Faltblatt besteht, charakterisiert (Abbildung 3). Für alle GTPasen der Ras-Superfamilie ist die G-Domäne das entscheidende Strukturmerkmal [3, 25, 26]. Sie vermittelt die entscheidende Guaninnukleotidbindung [7]. Die G-Domäne setzt sich aus 5 konservierten Sequenzmotiven (G1 - G5) zusammen (Abbildung 2). Hierbei koordiniert das G1 Motiv (auch *P-Loop*, Aminosäuren 12-19) das β -Phosphat des Nukleotids und das für die Nukleotidbindung wichtige Magnesium-Ion. Die G4 und G5 Motive (Aminosäuren 117-120, bzw. 160-163) vermitteln die Interaktion mit der Guaninbase. Abhängig vom gebundenen Nukleotid (GDP oder GTP) kommt es zu Änderungen der Proteinkonformation bei RhoGTPasen. Diese strukturellen Veränderungen begrenzen sich auf zwei Konsensussequenzen, die als *Switch I* (Aminosäuren 27-43) und *Switch II* (Aminosäuren 57-68) bezeichnet werden (Abbildung 2). In diesen Sequenzbereichen befinden sich auch die G2 (Aminosäuren 34-40) und G3 (Aminosäuren 59-62) Motive. Im GTP-gebundenen Zustand koordiniert die *Switch II*-Region das nukleophile Wassermolekül, welches für die γ -Phosphat-Hydrolyse benötigt wird. Die unterschiedlichen Konformationen der *Switch I*- und *Switch II*-Regionen in Abhängigkeit von GDP- oder GTP-Anwesenheit und damit einhergehender Diskriminierung zwischen aktivem und inaktivem GTPase-Zustand sind die entscheidende

Voraussetzung für die Effektorbindung. Viele Interaktionspartner können nur an eine der beiden Konformationen binden.

Umgeben werden die β -Faltblattstränge der G-Domäne von insgesamt 6 α -Helices (Abbildung 3), zu denen auch die Rho-Insert-Domäne (α_i Helix) zählt (Aminosäuren 123-137). Diese kommt nur bei RhoGTPasen vor und stellt damit das strukturelle Alleinstellungsmerkmal der RhoGTPasen unter den GTPasen dar (Abbildung 2). Relevant wird die Insert-Domäne hauptsächlich bei der Bindung von GEFs an RhoGTPasen [27] und Bindung sowie Aktivierung von Effektorproteinen, wie IQGAP (*Ras GTPase-activating-like Protein*) [28], ROCK (Rho-Kinasen) [29], DIAPH1 (*Diaphanous Related Formin 1*) [30] und der NADPH Oxidase (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase*) [31].

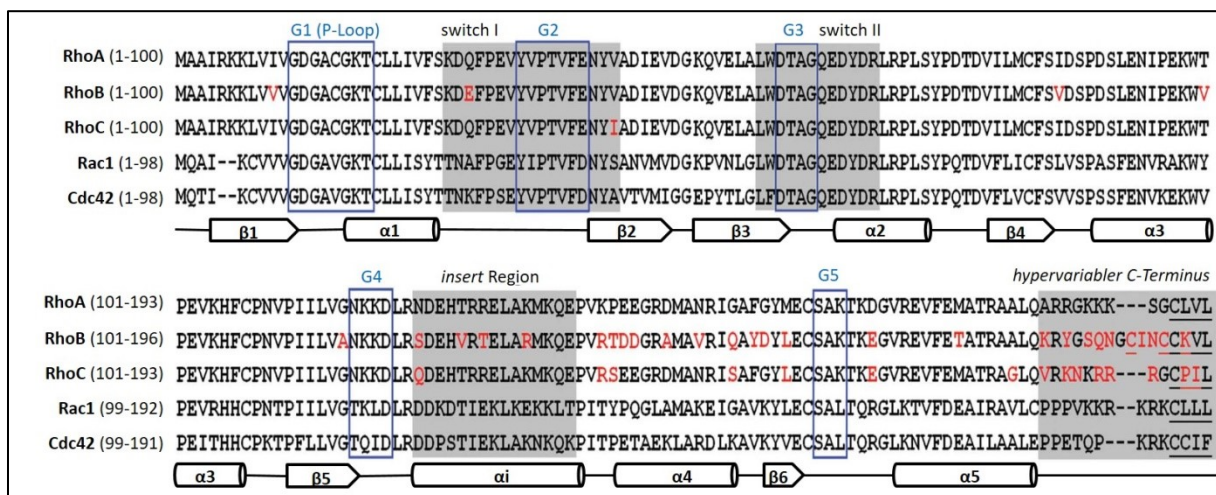


Abbildung 2: Sequenzalignement der GTPasen RhoA, RhoB, RhoC, Rac1 und Cdc42. Die Aminosäuresequenzbereiche der G Motive sind blau markiert. Sequenzen der Switch-Regionen, der Insert-Region und des hypervariablen C-Terminus sind grau hinterlegt und entsprechend beschriftet. Aminosäuren, die eine post-translationale Prenylierung festlegen, sind unterstrichen. Sequenzabweichungen von RhoB und RhoC im Vergleich zu RhoA sind rot hervorgehoben. Entsprechende Sekundärstrukturelemente sind unter der Aminosäuresequenz abgebildet (α -Helices als Zylinder, β -Faltblätter als Pfeile). Modifiziert nach [7].

Ein weiteres Strukturmerkmal stellt der C-Terminus der RhoGTPasen dar (Abbildung 2). Er besitzt neben einer hypervariablen Region eine Aminosäuresequenzbox, die CAAX-Box, an welcher post-translationale Isoprenylierungen vorgenommen werden (Tabelle 1) [5, 7]. Dieser Sequenzbereich beginnt mit einem Cystein (C), gefolgt von zwei aliphatischen Aminosäuren (A) und einer beliebigen Aminosäure (X). Hierbei definiert die letzte Aminosäure die Art der Isoprenylierung [32-35]. Serin, Glutamin, Methionin und Alanin vermitteln eine Farnesylierung durch die Farnesyltransferase, wohingegen Leucin eine Geranylgeranylierung durch die Geranylgeranyltransferase induziert [32-36]. Nach erfolgter Isoprenylierung werden die drei C-terminalen Aminosäuren der CAAX-Box durch eine Endopeptidase entfernt und die nun freie Carboxylgruppe des Cysteins durch eine Methyltransferase methyliert. [37, 38].

Einige Vertreter der RhoGTPasen werden zusätzlich zu, oder an Stelle der Prenylierung palmitoyliert (Tabelle 1), meist an einem Cystein oberhalb der CAAX-Box [21, 39].

Ausgehend von der post-translationalen Prenylierung erfolgt die subzelluläre Lokalisation der GTPase und vor allem die für den Aktivitätszyklus entscheidende Verankerung der GTPase in der Zellmembran [3, 40].

1.2.2. Die RhoGTPasen RhoA, RhoB und RhoC

In der Familie der RhoGTPasen zeichnen sich die drei Vertreter RhoA (*Ras homolog Family Member A*), RhoB (*Ras homolog Family Member B*) und RhoC (*Ras homolog Family Member C*) durch eine hohe Sequenzhomologie aus. Die Isoformen stimmen in 88% ihrer primären Aminosäuresequenz überein [41] und ihre Gene wurden zeitgleich entdeckt [20]. Im menschlichen Genom sind die Gene auf den Chromosomen 3 (RhoA), 2 (RhoB) und 1 (RhoC) lokalisiert [42]. Dabei ist das *RHOA*-Gen aufgrund der größeren Anzahl an Exons und Introns länger als das *RHOC*-Gen, weshalb angenommen wird, dass *RHOC* durch eine unvollständige Duplikation von *RHOA* entstanden ist [43]. *RHOB* ist hingegen kürzer als *RHOA* und *RHOC* und besteht aus lediglich einem Exon. Es wird vermutet, dass *RHOB* aus einer Integration eines reversen *RHOA*-Transkriptes hervorgegangen ist [44].

Die Translation dieser drei *RHO*-Gene resultiert in den bereits genannten Isoformen mit hoher Sequenz- und Strukturübereinstimmung in Proteinen mit einer Größe von rund 21 kDa. Trotz weitgehender Homologie weisen RhoA, RhoB und RhoC sowohl unterschiedliche intrazelluläre Lokalisationen, als auch verschiedene regulatorische Funktionen und Bindungspartner auf [43, 45].

So wird die spezifische, intrazelluläre Lokalisation der drei RhoGTPasen durch unterschiedliche post-translationalen Prenylierungen des C-Terminus determiniert (Tabelle 1). Besonders in diesem Proteinbereich sind die Abweichungen in der Aminosäuresequenz auffällig. RhoA und RhoC werden am Cystein der CAAX-Box im hypervariablen C-Terminus ausschließlich geranylgeranyliert [41], wohingegen RhoB einen Farnesyl- oder Geranylgeranylrest tragen und zusätzlich noch an den Cysteinen 189 und 192 palmitoyliert werden kann. Daraus resultiert die überwiegend membranständige Lokalisation von RhoA und RhoC [46], die nur in GDI-assoziiierter Form in das Zytoplasma übergehen [16]. Post-translational modifiziertes RhoB weicht hingegen von dieser typischen Lokalisation ab. Es zeigt nur bei einfacher Geranylgeranylierung eine Membranständigkeit, wobei diese Form ausschließlich durch einen mutierten C-Terminus, oder die Behandlung mit Farnesyltransferase-Inhibitoren, gebildet werden kann [47]. Typischerweise kann RhoB vor

allem in Endosomen und multivesikulären Körpern (späten Endosomen) detektiert werden [46, 47]. Des Weiteren ist eine Lokalisation von RhoB im Nukleus beschrieben worden [48]. Weitere Aminosäuresequenzunterschiede im hypervariablen C-Terminus von RhoA, RhoB und RhoC beeinflussen neben der Prenylierung auch die Oberflächenladung der GTPasen in diesem Bereich. Die Aminosäuren-Zusammensetzung im C-Terminus von RhoA und RhoC ergibt ein basisches, positiv geladenes, C-terminales Proteinende, während der RhoB C-Terminus überwiegend polare Aminosäuren, wie Serin und Glutamin enthält (Abbildung 2). Daraus resultiert ein Isoform-spezifischer Diskriminierungsbereich für die Interaktion mit dem GEF SmgGDS. Über ihren basischen C-Terminus können RhoA und RhoC mit SmgGDS interagieren, wodurch es zum Nukleotidaustausch und zur Aktivierung der RhoGTPase kommt. RhoB wird hingegen nicht aktiviert [49].

Dagegen sind die strukturellen Unterschiede und Aminosäuresequenzabweichungen in anderen RhoGTPase-charakteristischen Domänen, wie der *Insert*-Region und der G-Domäne, deutlich geringer. Einzelne Sequenzunterschiede wirken sich vor allem auf die Verteilung von Ladungen an der Proteinoberfläche aus und nehmen so vermutlich Einfluss auf die Isoform-spezifische Interaktion mit GEFs, GAPs, GDIs und Effektorproteine [7].

So zeigen RhoA und RhoB in der *Switch* I-Region (Aminosäuren 27-43) an Position 43 ein Valin, wohingegen RhoC ein raumgreifenderes Isoleucin aufweist. Diese Abweichung definiert wahrscheinlich eine Isoform-spezifische RhoGEF-Interaktion zwischen RhoA und RhoB und deren Aktivator XPLN, während XPLN nicht mit RhoC assoziiert [50, 51].

Die *Insert*-Region (Aminosäuren 123-137) besteht bei RhoA und RhoC aus identischen Aminosäuren. Der einzige Unterschied besteht in der Aminosäure 123, die beim RhoA ein Asparagin und beim RhoC ein Glutamin ist. Aufgrund der in diesem Fall nahezu identischen Aminosäureseitenkette, erscheint diese Abweichung strukturell und funktionell vernachlässigbar. RhoB zeigt im *Insert*-Bereich dagegen an 4 Positionen eine Abweichung in der Aminosäureabfolge (Abbildung 2). An Position 123 trägt auch RhoB mit einem Serin eine polare Aminosäure, allerdings weist dieses eine andere und kürzere Seitenkette auf, als Asparagin (RhoA) und Glutamin (RhoC). Weiterhin weist RhoB ein hydrophobes Valin an Stelle des polaren Threonins (RhoA, RhoC) an Position 127 auf und ein Arginin an Position 133 im Gegensatz zum Lysin (RhoA, RhoC). Somit bleibt die positive Ladung der Aminosäure 133 zwar erhalten, es wird jedoch eine veränderte Seitenkette eingefügt. Ein deutlicherer Unterschied tritt am Aminosäurerest 129 auf, an dem RhoB ein polares Threonin trägt, RhoA und RhoC hingegen ein positiv geladenes Arginin aufweisen. Ob durch diese veränderte Aminosäuresequenz RhoB-spezifische Interaktionen vermittelt werden, ist noch

unbekannt [7]. Es kann jedoch darüber spekuliert werden, da sowohl Rac1, als auch Cdc42 in der *Insert*-Region eine verschiedene Aminosäuresequenz aufweisen und darüber Isoform-spezifische Effektor-Interaktionen ausüben.

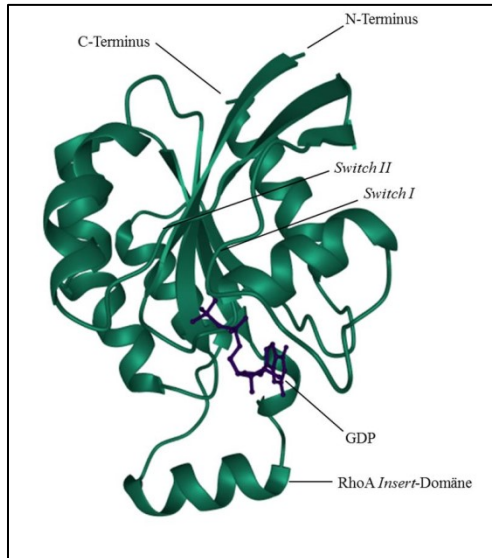


Abbildung 3: 3D-Struktur des RhoA. Die Sekundärstruktur von inaktivem (GDP-gebundenem) RhoA ist in der *Ribbon*-Darstellung abgebildet (PDB: 1FTN). Gut zu erkennen sind die zentral gelegenen 6 β -Faltblätter der G-Domäne, welche wiederum von insgesamt 6 α -Helices flankiert werden. Dabei ragt die RhoGTPase-spezifische *Insert*-Domäne etwas aus der kompakten Proteinstruktur heraus. Die *Switch I*- und *Switch II*-Regionen, deren räumliche Anordnung je nach GDP- oder GTP-Bindung variiert, liegen als unstrukturierte *Loop*-Bereiche vor. Dadurch wird die Flexibilität der Proteinstruktur in Folge eines Nukleotidaustausches gewährleistet. In der dargestellten Proteinstruktur sind keine post-translationalen Prenylierungen des C-Terminus abgebildet. Das gebundene GDP ist als *Stick*-Darstellung in dunkelblau zu erkennen.

Wie alle RhoGTPasen unterliegen auch die Isoformen RhoA, RhoB und RhoC dem typischen Aktivierungszyklus mit einem Wechsel zwischen GTP-Bindung (aktiv) und GDP-Bindung (inaktiv). Um die Rolle dieser kleinen RhoGTPasen bei zellulären Vorgängen aufklären zu können und potentielle Interaktionspartner identifizierbar zu machen, haben sich Mutationen zur dauerhaften Aktivierung (konstitutiv aktiv) und permanenten Inaktivierung (dominant negativ) etabliert. Diese Mutanten basieren auf analogen Aminosäuresubstitutionen des Ras [52]. Aktivierende Punktmutationen im RhoA, RhoB und RhoC werden an Position 14 (Valin für Glycin) und 63 (Leucin für Glutamin) eingeführt [7, 52, 53]. Eine dauerhafte Inaktivierung lässt sich durch den Ersatz des Threonins an Position 19 durch ein Asparagin erreichen [54, 55]. Dadurch kommt es zu einer deutlich verringerten Nukleotidaffinität in der GTP-Bindungstasche, wodurch überwiegend GDP in der GTPase verbleibt und diese verstärkte Interaktionen mit den aktivierenden GEF-Molekülen zeigt [7].

Die beiden aktivierenden Punktmutationen G14V und Q63L liegen in der Nukleotid-Bindungstasche und beeinträchtigen die Hydrolyse des γ -Phosphates im GTP. Durch den Austausch des Glutamins 63 wird die Koordination des für die Hydrolyse relevanten Wassermoleküls an dieser Stelle verhindert, weshalb die GTP-Hydrolyse unterbleibt [56]. In Folge der sterischen G14V-Mutation kommt es ebenfalls zu einem GTP-Arrest in der Bindungstasche, da das Valin mit den räumlich benachbarten Glycin 62 und Glutamin 63

wechselwirkt und es so zu einer leichten, räumlichen Verschiebung des Glutamins 63 kommt, die die γ -Phosphat-Hydrolyse verhindert [56].

Trotz des identischen Aktivitätszustandes konnten für die konstitutiv aktiven Rho-Mutanten funktionelle Unterschiede beobachtet werden. So zeigten sich in Fibroblasten aus Ratten morphologische Unterschiede nach der Transfektion mit RhoA G14V und RhoA Q63L [57]. Hierbei zeigten Q63L-transfizierte Zellen verstärkte Stressfasern und fokale Adhäsionen, während G14V mildere Wirkungen zeigte und die dominant negative RhoA-Mutante dem Wildtyp-Phänotyp entsprach. Außerdem wurden unterschiedliche subzelluläre Lokalisationen der Mutanten in MDCK-Zellen (*Madin Darby Canine Kidney Cells*) und ein differenziertes RhoGDI-Bindungsverhalten beschrieben [58]. Weiterführende Untersuchungen zum GDI-Bindungsverhalten und GTP-Bindungszustand der beiden aktiven Rho-Mutanten ergaben, dass rekombinantes RhoA G14V auch im GTP-gebundenen Zustand durchaus in der Lage ist, an RhoGDI zu binden. Über eine Co-Expression von RhoGDI und einer aktiven Variante konnte durch anschließende Immobilisierung des RhoGDI deutlich mehr RhoA G14V als RhoA Q63L isoliert werden. Erwartungsgemäß zeigen dabei beide konstitutiv aktiven Varianten eine geringere Interaktion als das Wildtyp-Protein [53, 59]. Auch der GTP-Bindungszustand der G14V- und Q63L-Variante des RhoA variiert erheblich. Während die isolierte G14V-Mutante zu 45% im GTP-gebundenem und zu 55% im GDP-gebundenem Zustand vorliegt, weist die Q63L-Variante mit 92% GTP-Bindung und 8% GDP-Bindung deutliche Unterschiede auf [53]. Ihre dauerhafte Aktivität durch die verminderte GTP-Hydrolyse verdeutlicht sich zusätzlich durch die Bestimmung des GTP-Umsatzes in *in vitro*-Untersuchungen, die für RhoA G14V $3,8 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ und für RhoA Q63L $5,1 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ beträgt. Damit hydrolysieren die beiden Mutanten GTP um circa das 20fache langsamer als der RhoA Wildtyp ($100 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$) [53, 59].

1.2.3. Interaktion von RhoA, RhoB und RhoC mit RhoGDIs, RhoGEFs und RhoGAPs

Für die gesamte Familie der RhoGTPasen sind aktuell lediglich 3 RhoGDI Isoformen für deren Inhibierung bekannt [60]. RhoGDI 1 (auch RhoGDI α) ist ein Mitglied der RhoGDIs mit ubiquitärer Expression und Interaktionspartnern wie RhoA, RhoC, Rac1 und Cdc42 [61, 62]. Hauptsächlich in hämatopoetischen Zellen wird der zweite Vertreter RhoGDI 2 (auch RhoGDI β , LY-GDI, D4-GDI) exprimiert [63, 64]. Daneben konnte RhoGDI 2 auch in Ovarialkarzinomzellen detektiert werden [65]. Interessanterweise konnten einige interagierende RhoGTPasen wie RhoA, Cdc42, Rac1 und Rac2 nur *in vitro* identifiziert

werden [60], wohingegen die Interaktion *in vivo* nicht bestätigt werden konnte [66]. Außerdem scheint RhoGDI 2 seine Interaktionspartner, die ähnlich denen von RhoGDI 1 sind, mit signifikant geringerer Affinität zu binden [67]. Das dritte Mitglied der RhoGDI Familie ist RhoGDI 3 (auch RhoGDI γ), welches sich durch eine N-terminale Verlängerung der Proteinsequenz von den anderen RhoGDIs unterscheidet. Hierdurch wird RhoGDI 3 an den Golgi-Komplex und andere zelluläre Membranareale gekoppelt [68]. RhoGDI 3 wird nur schwach exprimiert und scheint hauptsächlich RhoB und das weniger untersuchte RhoG zu binden [68-70]. Somit liegen RhoA-, RhoB- und RhoC-Isoform-spezifische Präferenzen für die Interaktion mit RhoGDIs (RhoGDI 1 für RhoA und RhoC, RhoGDI 3 für RhoB) vor. Allerdings ist nach wie vor unklar, ob diese spezifischen Interaktionen durch Sequenzunterschiede und/oder unterschiedliche intrazelluläre Lokalisation der drei RhoGTPasen determiniert werden.

Bei der Betrachtung der Rolle von GDIs bei der Einschränkung der RhoGTPase-Aktivität ist zu beachten, dass GDIs die Freisetzung von GDP verhindern, aber nicht *per se* dessen Bindung. Die Beladung von Nukleotid-freier RhoGTPase kann auch im GDI-assoziierten Zustand mit GTP oder GDP erfolgen [71]. Somit können auch an GTP-gebundene, aktivierte GTPasen zu einem geringen Teil GDIs binden, wodurch dann deren intrinsische und GAP-stimulierte GTP-Hydrolyse inhibiert wird [72].

Allgemein erfolgt die Interaktion der RhoGDIs mit den RhoGTPasen über die 2 Domänen der GDIs. Die N-terminale regulatorische Domäne interagiert mit der *Switch I*- und *Switch II*-Region der RhoGTPase, während die C-terminale Domäne ebenfalls an die *Switch II*-Region und die $\alpha 3$ -Helix bindet (Abbildung 4). Damit sind die *Switch*-Regionen als wichtige Effektorbindungsstellen sterisch abgedeckt und stehen für eine Interaktion mit anderen Proteinen nicht zur Verfügung. Zusätzlich vermittelt die C-terminale Domäne die Auflösung der Membranassoziation der RhoGTPasen durch Bindung des entsprechenden Lipidankers [7].

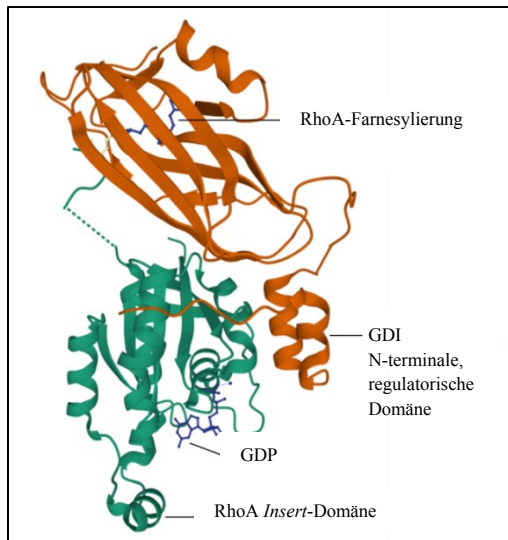


Abbildung 4: 3D-Struktur der RhoA - RhoGDI Bindung. Die Sekundärstrukturen von inaktivem (GDP-gebundenem) RhoA (türkis) mit seinem RhoGDI (orange) sind in der *ribbon* Darstellung gezeigt (PDB: 5FR2). Dabei ist die vollständige Bindung des Farnesyl-Membranankers von RhoA durch die C-terminale Domäne des RhoGDIs erkennbar. Dadurch wird die RhoGTPase aus ihrer Membranverankerung entfernt und liegt zytosolisch vor. Weitere Interaktionen der RhoGTPase mit Effektoren werden durch zwei α -Helices der N-terminalen, regulatorischen Domäne des GDIs verhindert. Diese liegen über den für Interaktionen wichtigen *Switch*-Regionen der RhoGTPase und schirmen diese ab. Strukturell unaufgeklärte Bereiche im C-Terminus der GTPase sind gestrichelt dargestellt. GDP ist in blau als *Stick*-Darstellung gezeigt.

Entscheidende Aminosäuren für die GTPase - GDI Interaktion sind Threonin 37, Tyrosin 66, Arginin 68, Leucin 69 und Leucin 72, die für die Isoformen RhoA, RhoB und RhoC identisch sind [73-75]. Wodurch genau die Isoform-spezifischen Unterschiede in der GDI-Interaktion zustande kommen (RhoGDI 1 für RhoA und RhoC, RhoGDI 3 für RhoB), ist zurzeit immer noch unklar und bedarf weiterer Aufklärung.

Die vergleichsweise kleine Anzahl von 3 RhoGDIs steht im Gegensatz zu rund 80 aktivierenden RhoGEFs im humanen Genom [23]. RhoGEFs binden an beide *Switch*-Regionen der RhoGTPasen und weisen somit überlappende Bindungsstellen mit RhoGAPs, RhoGDIs und Effektorproteinen auf [76].

Die Klasse der RhoGEFs lässt sich in zwei unabhängige Genfamilien unterteilen. Zum einen gibt es die größere Gruppe der Dbl Familie mit 69 Mitgliedern und zum anderen die DOCK (*Dedicator of Cytokinesis*) Familie mit 11 Vertretern [8, 77]. Proteine der DOCK Familie aktivieren Rac und Cdc42, allerdings nicht RhoA, RhoB und RhoC. Deshalb soll im weiteren Verlauf nicht genauer auf diese Gruppe der RhoGEFs eingegangen werden.

Alle Mitglieder der Dbl-Familie besitzen eine katalytische Dbl-homologe Domäne (DH-Domäne) und C-terminal dazu eine Pleckstrin-Homologiedomäne (PH-Domäne) [8]. Diese funktionale Einheit aus DH- und PH-Domäne stellt die minimale strukturelle Voraussetzung für die Bindung an eine RhoGTPase und den Nukleotid-Austausch dar. Häufig werden die beiden Domänen noch von weiteren Protein-Protein- und Protein-Lipid-Interaktionsdomänen in variierender Anzahl flankiert, wodurch die intrazelluläre Lokalisation und die Proteinassoziation der RhoGEFs reguliert werden kann [23]. Die große Anzahl an RhoGEFs weist darauf hin, dass eine GTPase häufig durch mehrere GEFs aktiviert werden kann und dementsprechend die Bindungsspezifität der GEFs nur gering ist. Deshalb muss wiederum die

Regulation der RhoGEFs räumlich und zeitlich fein abgestimmt sein, um ein präzises GTPase-Signaling zu ermöglichen. Bekannte Vertreter der RhoGEFs, die spezifisch RhoA, RhoB und RhoC, aber nicht Rac1 oder Cdc42 aktivieren, sind LARG (*Leukemia-associated RhoGEF*) und p190RhoGEF [78, 79]. Außerdem ist für den RhoGEF Ect2 (*Epithelial Cell Transforming Sequence 2*) eine spezifische Aktivierung von RhoA und RhoB, nicht aber von Rac1 und Cdc42, gezeigt worden [80, 81]. Ob Ect2 lediglich diese beiden Isoformen aktivieren kann, oder zusätzlich auch RhoC, bleibt allerdings noch unklar.

RhoGEFs, die zwischen den Isoformen RhoA, RhoB und RhoC unterscheiden können und spezifische Aktivierung zeigen sind selten. Das bereits genannte XPLN zeigt eine Aktivierung für RhoA und RhoB, allerdings nicht für RhoC [51], während SmgGDS RhoA und RhoC, nicht aber RhoB aktiviert [49]. Mit besonderem Fokus auf endotheliale RhoGEFs und RhoGAPs haben van Buul *et al.* eine Übersicht zusammengetragen, die maßgebliche Einflüsse von p115-RhoGEF und GEF-H1 auf die Rho-Aktivierung in Endothelzellen beschreibt [82]. Auf Seiten der RhoGAPs spielen hauptsächlich Arhgap18, Arhgap29, ARAP3 und p190RhoGAP eine Rolle bei der Rho-Inaktivierung. Sowohl für die genannten RhoGEFs als auch für die RhoGAPs sind überwiegend Interaktionen mit RhoA, dem am häufigsten untersuchten Vertreter der drei Isoformen RhoA, RhoB und RhoC, beschrieben. Eine Regulation von RhoB und RhoC kann dennoch nicht ausgeschlossen werden.

Die aktiven GTP-gebundenen RhoGTPasen werden durch RhoGAPs zur GTP-Hydrolyse stimuliert und nehmen in Folge dessen ihren inaktiven Zustand an. Bisher sind rund 80 verschiedene RhoGAPs in Säugern bekannt [25], allerdings zeigen auch sie, ähnlich wie RhoGEFs, wenig Spezifität in Bezug auf ihre Interaktion mit RhoGTPasen. So sind bisher auch keine RhoGAPs bekannt, die zwischen RhoA, RhoB und RhoC differenzieren können. Mit p190RhoGAP konnte ein Vertreter dieser RhoGTPase inaktivierenden Proteine identifiziert werden, der an RhoA, aber nicht an Rac1 und Cdc42, bindet und dieses inaktiviert [83]. Eine Unterscheidung zwischen RhoA, RhoB und RhoC ist diesem RhoGAP aber nicht möglich [84, 85]. Es finden sich auch Hinweise, dass die GTPase-Spezifität eines RhoGAPs entscheidend vom zellulären Kontext abhängig ist. Für das RhoGAP ARHGAP21 (oder auch ARHGAP10) konnte eine Regulation von RhoA und RhoC, aber nicht für Cdc42, in humanen Prostata-Krebszellen gefunden werden [86]. Dem gegenüber stehen Befunde mit isolierten Proteinen und in HeLa Zellen, in denen eine überwiegende Inaktivierung von Cdc42 und weniger von RhoA durch ARHGAP21 gezeigt wurde [87].

Für eine Inaktivierung der GTP-gebundenen RhoGTPase, interagieren die GAPs mit dem G1 Motiv (*P-Loop*) der G-Domäne und den *Switch I*- und *Switch II*-Regionen [88]. Hierdurch

wird ein Arginin (Arginin-Finger) des GAP für die GTP-Hydrolyse der RhoGTPase zur Verfügung gestellt, wodurch die intrinsische Hydrolysegeschwindigkeit der GTPase erhöht wird (Abbildung 5). Das GAP-Arginin stabilisiert negative Ladungen während des Übergangs der GTP-Hydrolyse und positioniert außerdem das Glutamin 63 der RhoGTPase im *Switch II* für die Aktivierung eines Wassermoleküls (Abbildung 5). Ein nukleophiler Angriff des Wassermoleküls auf das γ -Phosphat des GTPs wird dadurch möglich und die GTP-Hydrolyse kann vollzogen werden [25, 89, 90].

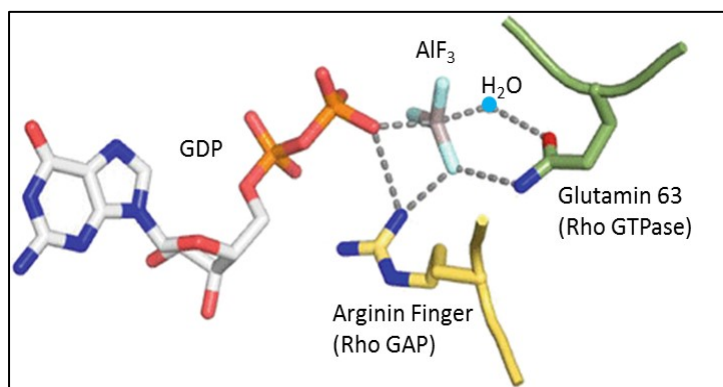


Abbildung 5: Arginin-Finger der GAP-RhoGTPase-Interaktion. Die Arginin-Seitenkette des GAPs (gelb) stabilisiert negative Partialladungen während der GTP-Hydrolyse und das Glutamin 63 aus der *Switch II*-Region der GTPase (grün). AlF_3 fungiert als nicht-hydrolysierbares γ -Phosphatanalog bei der Strukturaufklärung. Stickstoff ist blau, Sauerstoff rosa (GDP) und rot (Q63) und Phosphat orange dargestellt. Das für die GTP-Hydrolyse wichtige Wassermolekül erscheint hellblau. Modifiziert nach [1].

1.2.4. Effektorbindung an RhoA, RhoB und RhoC

Strukturelle Veränderungen der drei RhoGTPasen RhoA, RhoB und RhoC als Folge eines GDP- oder GTP-Austausches finden sich vor allem in den beiden *Switch*-Regionen (Aminosäuren 27-43 und 57-68). Dies legt nahe, dass Effektorproteine besonders diese Sequenzabschnitte für die Diskriminierung des Aktivitätszustandes nutzen müssen. Darüber hinaus sind aber auch weitere Regionen der GTPase für Isoform-spezifische Interaktionen mit Effektoren notwendig. So werden neben den *Switch*-Regionen weitere Sequenzabschnitte im N-terminalen GTPase-Bereich, wie der *P-Loop*, für eine vollständige Effektorbindung benötigt [88]. Aber auch der C-Terminus und die Helix 5 (α_5 , Aminosäuren 167-179) stellen bedeutende Effektorbindungsstellen dar [88, 91]. Hingegen scheint die *Insert*-Region (α_i , Aminosäuren 123-137), als das individuellste Strukturmerkmal der RhoGTPasen, nicht in die Bindung von Effektoren involviert zu sein [29, 88]. Sie spielt dafür eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der Rho-Kinase (ROCK), einem der zentralsten Effektoren von RhoA, in Folge der ROCK-RhoA-Interaktion [29].

Generell hat das Verständnis über die Effektoraktivierung durch RhoGTPasen zu einer Theorie geführt, bei der sich die aktivierte RhoGTPase über eine Protein-Protein-Interaktion an eine GTPase-Bindungsstelle im Effektorprotein anlagert, das HR1 Motiv (Leucin-Zipper-

ähnliches Motiv), und somit die autoinhibitorische Effektor-Konformation aufricht (Abbildung 6). Dadurch wird die funktionale Domäne des Effektors für nachgeschaltete Signalprozesse frei [11].

Neben dem HR1 Motiv kann die Effektor-RhoGTPase-Interaktion durch andere Strukturbereiche des Effektorproteins vermittelt werden. So binden die Rho-Kinasen ROCK-1 und ROCK-2 und CIT (*Citron* Kinase) durch jeweils unterschiedliche Sequenzbereiche in ihren C-Termini an RhoA, RhoB und RhoC [92].

Tabelle 2: Übersicht ausgewählter Effektoren der RhoGTPasen RhoA, RhoB und RhoC. Aufgelistet sind Effektoren, für die eine direkte Interaktion mit der jeweiligen RhoGTPase bekannt (+) oder unbekannt (?) ist. + = schwache Interaktion, ++ = moderate Interaktion, +++ = starke Interaktion, MBS = *Myosin Binding Subunit*. Modifiziert nach [43].

Effektor	RhoA	RhoB	RhoC
ROCK-1/-2	++	+	+++
mDia	++	+	++
PRK 1/2 (PKN)	++	++	++
Rhotekin	+++	+	+++
Rhophilin	+++	+	++
<i>Citron</i> Kinase	++	+	+++
MBS	+++	?	?
DBI (Transkriptionsfaktor)	+	++	?

Viele relevante Effektoren binden an alle drei Isoformen RhoA, RhoB und RhoC (Tabelle 2). Dazu zählen Kinasen, wie die Rho-Kinasen (ROCK-1 und ROCK-2), PRK (auch PKN, *Protein Kinase C-related Kinase*) und CIT, sowie Formine, wie mDia (*Mammalian Diaphanous*) und FMNL (*Formin-like Proteins*). Darüber hinaus interagieren RhoA, RhoB und RhoC auch mit Rhotekin und Rhophilin (Tabelle 2), deren genaue physiologische Bedeutung lediglich in speziellen Zelltypen erarbeitet werden konnte [93, 94]. In den meisten Zelltypen hingegen ist ihre Bedeutung bisher unzureichend oder noch gar nicht charakterisiert worden.

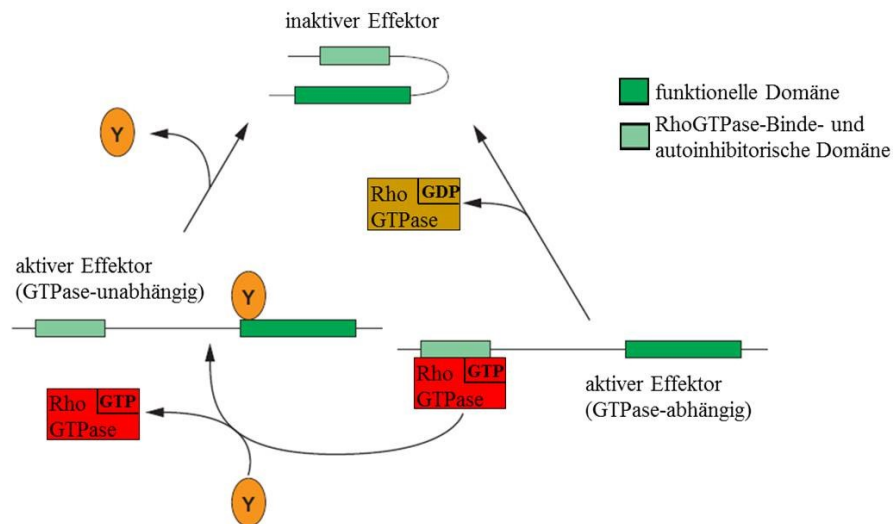


Abbildung 6: Allgemeines Modell für die Aktivierung von Rho-Effektorproteinen. Aktive Effektorproteine liegen vor, wenn die aktive (GTP-gebundene) RhoGTPase an die RhoGTPase-Bindungsstelle des Effektors gebunden hat. Dann ist die funktionelle Domäne des Effektorproteins frei und kann nachgeschaltete Signale vermitteln. Der Effektor kann außerdem aktiv bleiben, wenn die aktive RhoGTPase eine Modifizierung (Y), zum Beispiel (Auto-)Phosphorylierung oder Bindung an ein anderes aktivierendes Protein vermittelt, die Interaktion mit dem Effektor selbst aber verliert. In diesem Fall erfolgt die Effektorinaktivierung durch das Entfernen der Effektormodifikation. Erfolgt die GTP-Hydrolyse in der RhoGTPase und geht sie somit in ihren inaktiven (GDP-gebundenen) Zustand über, löst sich die Assoziation von GTPase und Effektor. Dadurch kann die nun freie autoinhibitorische Domäne des Effektors eine intramolekulare Bindung zur funktionellen Domäne eingehen und es kommt zur Effektorinaktivierung. Modifiziert nach [11].

Trotz größtenteils identischer Effektormoleküle besitzen die RhoGTPasen RhoA, RhoB und RhoC unterschiedliche zelluläre Funktionen. RhoA spielt eine Schlüsselrolle in der Aktomyosin-Regulation und -Kontraktion (Abbildung 7), während RhoB durch seine überwiegend endosomale Lokalisation Einfluss auf den Vesikeltransport, aber auch DNA-Reparatur und Apoptose ausübt und RhoC bei der Zytoskelettorganisation und der Zellmotilität von Bedeutung ist [43, 95, 96]. Insbesondere wurde die Bedeutung der drei RhoGTPasen für zelluläre Prozesse, die vom Aktinzytoskelett abhängen (Abbildung 7), wie Zytokinese, Endozytose, Migration und Morphogenese, untersucht [55, 97-102]. Somit greifen RhoA, RhoB und RhoC in grundlegende Vorgänge wichtiger zellulärer Prozesse ein, was unter anderem ihre Relevanz bei Prozessen wie Migration, Proliferation, Kanzerogenese und Apoptose verdeutlicht.

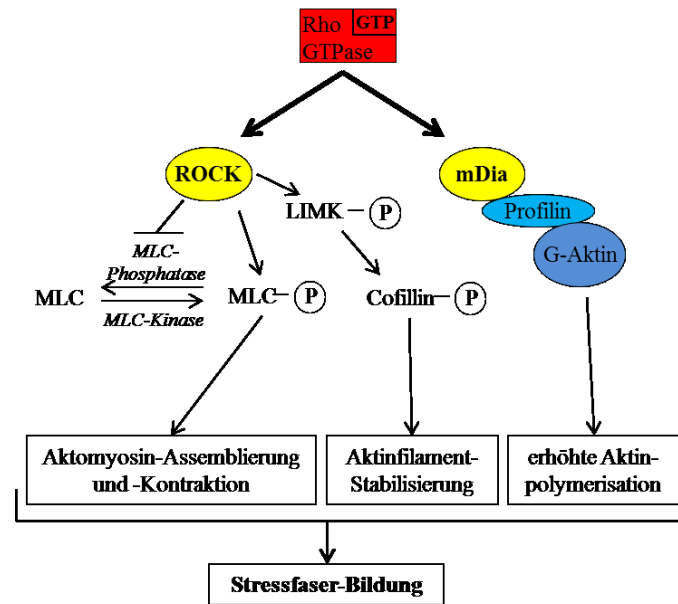


Abbildung 7: Signalweg aktiver RhoGTPasen bei der Aktinassemblierung und Stressfaserbildung. Generell können die aktiven RhoGTPasen RhoA, RhoB und RhoC über zwei relevante Effektorproteine, die Rho Kinasen (ROCK) und das Formin mDia, Einfluss auf die Aktinassemblierung ausüben. Aktive RhoGTPasen binden an mDia und heben somit dessen auto-inhibitorische Konformation auf. Dadurch ist die FH1-Domäne des mDia zugänglich und kann das Aktin-bindende (globuläres Aktin, G-Aktin) Profilin an schnell wachsende Enden des filamentösen Aktins rekrutieren. Aktivierte Rho-Kinasen inhibieren zum einen durch Phosphorylierung die LIM-Kinasen (LIMK), welche ihrerseits durch Phosphorylierung Cofilin inhibieren und dadurch bestehende Aktinfilamente vor einem *Turnover* schützen. Zum anderen erhöht ROCK das intrazelluläre Level an phosphorylierter (aktiver) Myosin-leichte-Kette (MLC) durch dessen Phosphorylierung und durch gleichzeitige Inhibierung der MLC-Phosphatase. Aktives MLC stimuliert die ATPase-Aktivität des Myosin II und fördert die Assemblierung von Aktomyosinfilamenten. Modifiziert nach [11].

Ihre Funktionen werden hierbei durch fein abgestimmte zeitliche und räumliche Aktivitätsmuster und ebenso durch unterschiedliche Bindungsaffinitäten zu den entsprechenden Effektormolekülen definiert. Proteininteraktionsstudien mit den Effektoren ROCK und CIT ergaben höhere Affinitäten für RhoC als für RhoA und RhoB. Zusätzlich scheint ROCK durch RhoC in Epithelzellen stärker aktiviert zu werden [103, 104], wobei die strukturellen Gründe für diese Befunde aufgrund der hohen Sequenzhomologie in den relevanten Interaktionsbereichen unklar bleiben.

1.2.5. Regulation der RhoGTPasen durch Phosphorylierung und Ubiquitinierung

Eine weitere Ebene der RhoGTPase-Regulation ergibt sich durch Phosphorylierung und Ubiquitinierung von RhoA, RhoB und RhoC. Besonders gut untersucht ist die PKA- (Proteinkinase A) und PKG- (Proteinkinase G) vermittelte Phosphorylierung von RhoA an Serin 188 am hypervariablen C-Terminus der GTPase. Die Phosphorylierung fungiert als Rho-Inaktivierungssignal, welches in einer RhoGDI-Bindung und der damit einhergehenden Membrandissoziation mündet und RhoA vor proteolytischer Degradation bewahrt [105].

Durch die RhoA-Phosphorylierung am Serin 188 wird auch die Interaktion zwischen GTPase und der Rho-Kinase inhibiert und damit nachgeschaltetes *Signaling* verhindert [106]. Wichtig anzumerken sind hierbei die Sequenzunterschiede zwischen RhoA, RhoB und RhoC an dieser regulatorischen Position (entspricht Asparagin 191 im RhoB und Arginin 188 im RhoC), die eine entsprechende Phosphorylierung bei RhoB und RhoC nicht ermöglichen [7]. Dadurch erhalten Zellen eine weitere Option zur Regulation des RhoA-Signalnetzwerkes.

Gleichermaßen wird RhoB durch eine Serin-Phosphorylierung an Position 185 durch die Casein Kinase 1 (CK 1) post-translational modifiziert, wobei die physiologische Bedeutung dieser Modifikation weiterer Untersuchungen bedarf [107].

Auch RhoC zeigt eine spezifische Serin-Phosphorylierung an Position 73 durch Akt (Proteinkinase B), die trotz Sequenzübereinstimmung bei RhoA nicht beobachtet werden kann. Anders als für RhoA und RhoB beschrieben, bewirkt diese Modifikation einen positiven Einfluss für das RhoC *Downstream-Signaling* und die RhoC-induzierte Invasivität von Karzinomzellen [108].

Der Protein-*Turnover* kleiner GTPasen wird durch Ubiquitinierung, also dem Anhängen von Ubiquitinmonomeren oder -polymeren, mit Hilfe von E3-Ubiquitinligasen reguliert [109]. Nachfolgend kommt es dann zur Degradation der markierten GTPase durch das 26S-Proteasom.

RhoA wird durch drei unterschiedliche E3-Ligasekomplexe ubiquitiniert, zu denen die FBXL19 Ubiquitinligase-, die SMURF1 Ligase- und der CUL3-RING-Ligasekomplexe zählen [110-116]. Die Ubiquitinierung von RhoA durch drei unabhängige Komplexe kann einer Zelle als wichtiges mechanistisches Werkzeug für die Modulierung des RhoA-Levels an bestimmten intrazellulären Stellen oder als Antwort auf spezifische Signale dienen. Als Ubiquitinierungsstellen des RhoA sind die Lysine 6 und 7 aus dem β 1-Faltblatt, das Lysin 51 aus dem β 3-Faltblatt und Lysin 135 aus der *Insert*-Region bekannt [109]. Der SMURF1-Ligasekomplex fügt in identischer Weise an den Lysinen 6 und 7 auch im RhoB-Protein Ubiquitinreste an, was zur Degradation und zur kürzesten Halbwertszeit des RhoB (30 min) unter den drei Isoformen führt [117]. Interessant ist, dass die anderen Lysine an Position 51 und 135, die gleichermaßen in der RhoB- und RhoC-Sequenz zu finden sind, nicht modifiziert werden und für RhoC generell noch keine Degradationsmarkierung identifiziert werden konnte [109].

1.3. Das Endothel

Alle Blut- und Lymphgefäße, von Venen und Arterien, bis hin zu kleinen Blut- und Lymphkapillaren, besitzen auf ihrer dem Lumen zugewandten Seite ein Monolayer von dicht aneinander grenzenden flachen Zellen, den sogenannten Endothelzellen (Abbildung 8). Während die Wand kleinerer Gefäße meist einschichtig ist, ist jene von größeren Gefäßen dreischichtig. Dabei bilden die Endothelzellen in größeren Blutgefäßen gemeinsam mit der nachfolgenden Basallamina und der Lamina elastica interna die Tunica interna (auch Tunica intima). Daran schließen sich weiter in Richtung des umliegenden Gewebes die Tunica media und die Lamina elastica externa an. Die äußerste Schicht der Gefäßwand größerer Blutgefäße bildet die Adventitia (Abbildung 8).

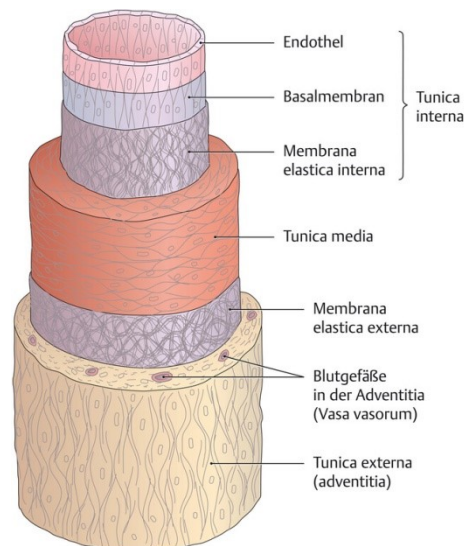


Abbildung 8: Wandaufbau eines Blutgefäßes. [118]

Entwicklungsbiologisch entstehen Endothelzellen aus dem Mesoderm durch Differenzierung von Angioblasten und Hämangioblasten [119, 120]. Seit der Entdeckung des Endothels im Jahr 1865 durch Wilhelm His, hat die intensive Forschung an den Zellen des Endothels weitreichende Erkenntnisse über dessen Funktion erbracht und auch das Verständnis für die Bedeutung dieser Zellen im Gefäßsystem vertieft [121]. Hierbei hat die unabhängig etablierte Isolation und Kultivierung humaner Endothelzellen aus der Nabelschnur durch Jaffe und Kollegen (1973) sowie Gimbrone und Mitarbeitern (1974) einen bedeutenden Fortschritt gebracht [122, 123]. Durch die *in vitro*-Kultivierung von Endothelzellen ist es seitdem einfacher, sie unter kontrollierten Bedingungen zu manipulieren, den Einfluss einer veränderten extrazellulären Umgebung zu analysieren und somit die Zellbiologie detaillierter zu verstehen.

Neben der wichtigen Athrombogenität und seiner Barrierefunktion und der damit einhergehenden selektiven Permeabilität zwischen Blut und Gewebe nimmt das Endothel auch regulierenden Einfluss auf den Gefäßtonus, den Blutfluss sowie die Homöostase von Gerinnung und Fibrinolyse [124].

Typischerweise liegen Endothelzellen im adulten Organismus in einer Art Ruhezustand mit einer durchschnittlichen Lebensspanne von mehr als einem Jahr vor. Der Begriff Ruhezustand bedeutet hierbei, dass sie nicht aktiv proliferieren [125]. Davon weichen beispielsweise Endothelzellen im corpus luteum (Gelbkörper) und im Uterus durch eine periodische Verstärkung der Zellproliferation ab, aber auch Endothelzellen im heranreifenden fetalen und neonatalen Organismus sowie Endothelzellen in regenerierenden Geweben oder Tumoren [126]. Somit liegen Endothelzellen in den Blutgefäßen nahezu aller Gewebe des adulten Organismus meist als beständige Barriere zwischen Blutstrom und umliegendem Gewebe vor.

1.3.1. Morphologische Heterogenität

Im menschlichen Organismus gibt es verschiedene, meist organspezifische Subtypen von Endothelien, die einen lokal angepassten Stoffaustausch gewährleisten. Dabei unterscheiden sich die drei Subtypen in ihrer Durchlässigkeit für Moleküle aus dem Blut (Abbildung 9). Nahezu undurchlässig für im Blut gelöste Stoffe ist das kontinuierliche Endothel, welches beispielsweise für die Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke verantwortlich ist. Durch die Ausbildung von *Tight Junctions* (auch *Zonula occludens*) zwischen den dicht liegenden Endothelzellen kann der notwendige Stoffaustausch zwischen Gewebe und Blut ausschließlich durch hochselektive Transportmechanismen bewerkstelligt werden [127].

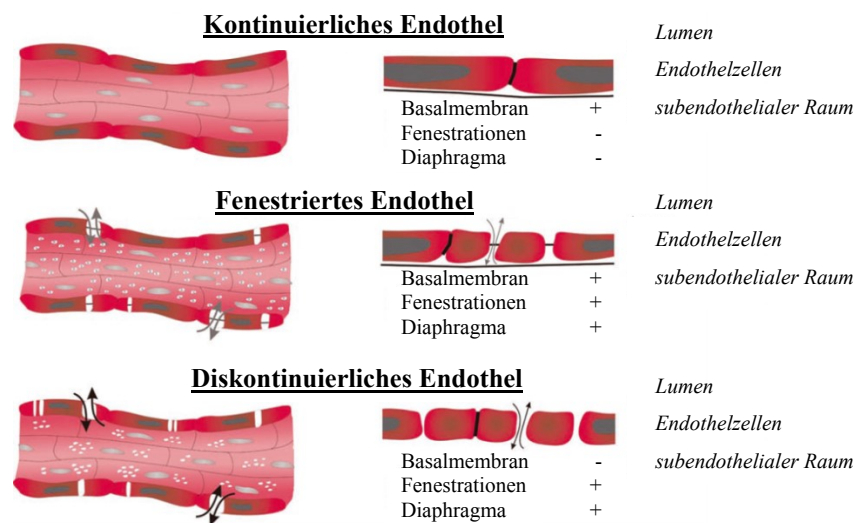


Abbildung 9: Subtypen des Endothels. Dargestellt sind Längsschnitte (links) und Detailausschnitte (rechts) der drei Endothelsubtypen, dem kontinuierlichen, dem fenestrierten und dem diskontinuierlichen Endothel. Deutlich hervorgehoben sind die vertikal in der Endothelschicht angeordneten *Tight Junctions* und die zum subendothelialen Raum abschließende Basalmembran (kontinuierliches und fenestriertes Endothel). Die Durchlässigkeit steigt durch das Vorhandensein von Fenestrationen (Wechselpfeile im fenestrierten und diskontinuierlichen Endothel), wobei eine erhöhte Größenselektivität durch Diaphragmen im fenestrierten Endothel gegeben ist. Modifiziert nach [128].

Um einiges durchlässiger ist dagegen das fenestrierte Endothel, da hier auch die Passage größerer Moleküle ermöglicht wird. Diese Aussparungen (Fenestrae) sind rund 70 nm große transzelluläre Poren, die die gesamte Endothelzelle durchspannen [125]. Eine Mehrheit der Poren weisen 5 - 6 nm starke Diaphragmen als Barriere auf, wodurch eine erhöhte Größenselektivität beim Durchtritt von Molekülen und Zellen gegeben ist (Abbildung 9). Fenestriertes Endothel ist typisch für endokrine Drüsen, Nierenglomeruli und Darmgewebe. Die Porengröße nimmt bei der dritten Art des Endothels, dem diskontinuierlichen Endothel, auf 100 - 200 nm zu und ermöglicht so einen massiv verstärkten Stoff- und Zellaustausch zwischen Blutstrom und Gewebe (Abbildung 9). Zusätzlich fehlt häufig auch das Diaphragma in den einzelnen Poren [129]. Diskontinuierliches Endothel ist typisch für Leberblutgefäße. Als weitere Charakteristika der morphologischen Heterogenität von Endothelzellen findet man Variationen bezüglich der Dicke, Form und Ausrichtung [128].

1.3.2. Funktionelle Heterogenität

Die funktionelle Heterogenität der Endothelzellen (Tabelle 3) wird auf zwei verschiedene Arten realisiert [128]. Organspezifische Endothelzellen können entweder ausschließlich für ein bestimmtes Gewebe spezifische endotheliale Funktionen übernehmen oder sie können allgemeine Funktionen des Endothels auf eine gewebespezifische Weise ausführen. Dies

bedeutet, dass allgemeine Endothelfunktionen wie Permeabilität und Zellmigration in verschiedenen Gefäßabschnitten unterschiedlich reguliert werden.

Tabelle 3: Physiologische und pathologische Funktionen des Endothels.
Entnommen aus [128].

Funktionen des Endothels
❖ Barrierefunktion und Transport
❖ vaskuläre Permeabilität und Gefäßtonus
❖ Hämostase und Thrombose
❖ Entzündung
❖ zelluläre Transmigration
❖ Metabolismus und Katabolismus
❖ <i>Scavenging</i> und <i>Clearence</i>
❖ Sekretion von Angiokinen
❖ Angiogenese
❖ vaskuläre Reparatur und <i>Remodelling</i>

Durch die definierte Expression von Oberflächenmolekülen wie dem endothelialen Leukozytenadhäsionsprotein (E-Selektin), interzellulärem Zelladhäsionsmolekül (ICAM) und vaskulärem Zelladhäsionsmolekül (VCAM) regulieren Endothelzellen die heterogene Adhäsion von Neutrophilen, Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten und steuern darüber die Extravasation der Abwehrzellen in das umliegende Gewebe. Während die Adhäsion und Transmigration der Leukozyten in den postkapillaren Venolen beispielsweise in der Lunge Selektin-abhängig ist, wird sie in den Leberendothelzellen Selektin-unabhängig vermittelt [130]. Ein Beispiel für eine gewebespezifische endotheliale Funktion stellt die renale Filterfunktion dar, die über eine spezifische Glykokalyx des glomerulären Endothels vermittelt wird [131].

1.3.3. Angiogenese

Die funktionelle Heterogenität von Endothelzellen ist vielschichtig und umfasst neben den exemplarisch beschriebenen Funktionen bei der Permeabilität und der Leukozytenmigration weitere Funktionen für die Hämostase, angeborene und adaptive Immunität und die Angiogenese (Tabelle 3) [125]. Von fundamentaler Bedeutung für die Homöostase des Blutgefäßsystems und für seine Entwicklung ist dabei die Angiogenese.

Man spricht von Angiogenese, wenn sich neue Blutgefäße, insbesondere neue Kapillaren, aus bestehenden Blutgefäßen durch Aussprossung bilden [132]. Somit übernehmen angiogenetische Prozesse den dynamischen Auf- und Ausbau eines komplexen Gefäßsystems. Grundlage dafür stellt das bereits in der Embryonalentwicklung durch Vaskulogenese der Angioblasten (Endothelvorläuferzellen) angelegte Gefäßnetz dar [133]. Das Blutgefäßsystem ist das erste Organsystem, das sich während der Embryonalentwicklung ausbildet. Es ist demnach von grundlegender Bedeutung für die Entwicklung und Funktion aller Organe und Gewebe. Eine Versorgung aller Zellen mit Nährstoffen und Sauerstoff, sowie der Abtransport von Stoffwechselprodukten und Kohlendioxid werden durch das Blutgefäßsystem gewährleistet.

Dies legt nahe, dass die Angiogenese sowohl bei physiologischen Prozessen, als auch bei pathologischen Vorgängen relevant ist [134]. Die physiologische Angiogenese hat eine Relevanz bei der Entwicklung, Reproduktion und Anpassung des Gewebes an körperliche Aktivität und muskuläre Hypertrophie. Dabei kann die Dauer der angiogenetischen Vorgänge zwischen einigen Tagen (Ovulation), Wochen oder Monaten (Entwicklung der Plazenta während der Schwangerschaft) variieren. Im Gegensatz dazu ist die pathologische Angiogenese zeitlich weniger begrenzt. Sie wird hauptsächlich bei der Wundheilung und dem Tumorwachstum bedeutsam, da sie die Versorgung des Tumorgewebes sicherstellt und dadurch ein pathologisches Wachstum ermöglicht.

Mechanistisch können zwei Formen der Angiogenese unterschieden werden. Zum einen entstehen neue Kapillaren durch klassisches Aussprossen von Endothelzellen (*Sprouting Angiogenesis*), zum anderen können neue Gefäße durch Einstülpung (*Intussusception*) von bereits bestehenden Gefäßen gebildet werden (*Non-Sprouting Angiogenesis*) (Abbildung 10) [133]. Ein wesentlicher Stimulus für die Bildung von neuen Gefäßen in normalem Gewebe, Tumoren, atherosklerotischen Plaques und bei diabetischer Retinopathie ist ein Mangel an Sauerstoff. Des Weiteren sind mechanistische Faktoren, wie ein gesteigerter Blutfluss und Scherkräfte, von Bedeutung.

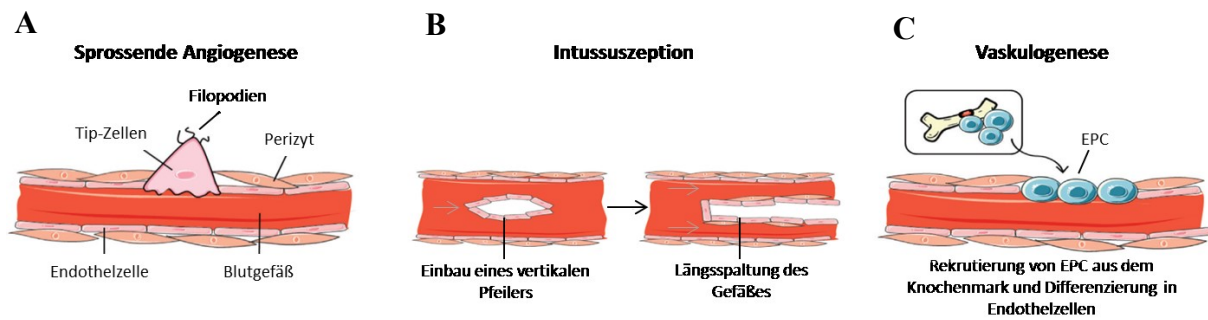


Abbildung 10: Mechanismen der Blutgefäßneubildung. Schematischer Längsschnitt durch ein Blutgefäß (rotes Lumen) mit Endothelzellauskleidung und anliegenden Perizyten. (A) Neue Blutgefäße bilden sich durch sprossende Angiogenese, indem spezialisierte, nach extraluminal orientierte Endothelzellen (Tip-Zellen) Gradienten angiogenetischer Faktoren wahrnehmen (über Filopodien) und so die Richtung des Gefäßwachstums vermitteln. Nachfolgende Endothelzellen proliferieren und ergeben eine lumenbildende, kapillare Sprosse. (B) Eine zweite Möglichkeit der Angiogenese stellt die Intussuszeption dar, bei der durch Längsspaltung eines bestehenden Gefäßes durch das Einziehen eines vertikalen Pfeilers eine Teilung des ursprünglichen Gefäßes erfolgt. Flussrichtung im Gefäß erfolgt in Pfeilrichtung. (C) Seltener erfolgt Neovaskularisierung durch Rekrutierung von zirkulierenden Endothelvorläuferzellen (*Endothelial Progenitor Cells*, EPC), die sich dann in Endothelzellen differenzieren und dadurch die Bildung von Blutgefäßen ermöglichen. Nicht dargestellt ist die Arteriogenese als eine effiziente Art der Blutgefäßbildung (natürlicher Bypass) nach dem Verschluss größerer Arterien (Stenosen). Durch das Wachstum von Kollateralarterien im Prozess der Arteriogenese können durch die Stenose verursachte Blutzirkulationsdefizite ausgeglichen werden. Abbildung modifiziert nach [135].

Initial spielen vor allem eine Stickstoffmonoxid-induzierte Vasodilatation sowie eine VEGF-vermittelte erhöhte Gefäßpermeabilität eine wichtige Rolle [136, 137]. Transkriptionsfaktoren, wie HIF-1 α (*Hypoxia Inducible Factor*), HIF-1 β und HIF-2 α sind entscheidende Steuerungsfaktoren einer hypoxieinduzierten Angiogenese [136]. Unter Sauerstoffmangel kommt es zur Bildung von stabilen Heterodimeren aus Untereinheiten dieser Transkriptionsfaktoren, die an eine Hypoxieerkennungssequenz (*Hypoxia Recognition Site*) in der Promotorregion von hypoxieregulierten Genen, zum Beispiel VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) und dessen Rezeptoren VEGFR1 und VEGFR2, aber auch PDGF (*Platelet-derived Growth Factor*) und bFGF (*Basic Fibroblast Growth Factor*), binden und so eine angiogenetische Antwort auslösen [138-140].

Die Sezernierung von Kollagenasen und Matrixmetalloproteasen führen zum teilweisen Abbau der Basalmembran [141], wodurch die nun aktivierten Endothelzellen in Richtung des umliegenden Gewebes migrieren können (Abbildung 10A). Weitere wesentliche Elemente dieses komplexen Prozesses sind die durch Wachstumsfaktoren (VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, PlGF - *Placenta Growth Factor*) stimulierte Endothelzellproliferation, die Ausbildung eines Lumens und der Erhalt oder Umbau der neu gebildeten Gefäße [142].

1.3.4. VEGF - *Vascular Endothelial Growth Factor*

VEGF und seine Rezeptoren sind sowohl für das Wachstum und die Differenzierung von Endothelzellen während der Embryonalentwicklung als auch unter physiologischen und

pathologischen Zuständen in den Gefäßen des ausgewachsenen Organismus von besonderer Bedeutung (Abbildung 11) [133]. Dabei ist VEGF als pro-angiogenetischer Faktor hauptsächlich in die Initiierung der Kapillarneubildung involviert [132]. Im Gegensatz zu anderen angiogenetischen Wachstumsfaktoren stimuliert VEGF allerdings nicht nur das Gefäßwachstum, sondern erhöht zusätzlich auch die Gefäßpermeabilität [143]. VEGF besitzt nicht nur bei der Gefäßbildung eine Relevanz, sondern übt zusätzlich auch als lebenserhaltender Faktor für Endothelzellen und neu gebildete Gefäße eine wichtige Funktion aus [144].

Zur VEGF-Genfamilie werden aktuell 6 Vertreter gerechnet, zu denen VEGF-A, VEGF-B (*VEGF-related Factor*), VEGF-C (*VEGF-related Protein*), VEGF-D (*C-Fos-induced Growth Factor*), VEGF-E und PlGF (*Placental Growth Factor*) zählen (Abbildung 11) [145-149]. Zusätzlich gibt es vom humanen VEGF-A fünf alternative Spleißvarianten, die Unterschiede in ihrer Sekretion und gewebespezifischen Expression zeigen [150]. Entsprechend der Aminosäureanzahl werden sie als VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆ bezeichnet. Dabei ist die Variante VEGF₁₆₅ in den meisten Geweben die dominierende sezernierte Isoform [150].

Ihre Wirkung vermitteln die VEGF-Vertreter durch Bindung und Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen, zu denen VEGFR1, VEGFR2 und VEGFR3 zählen [151]. VEGFR2 interagiert mit VEGF-A, VEGF-B und VEGF-E und ist der relevanteste für die Vaskulogenese und Angiogenese, mit einer essenziellen Funktion für die Entwicklung und das Überleben von Endothelzellen (Abbildung 11) [145, 152, 153]. Im Gegensatz dazu ist VEGFR1 nicht zwingend für die Endothelerhaltung erforderlich, nimmt aber über die Bindung von VEGF-A und VEGF-B eine bedeutende Funktion während der Embryonalentwicklung ein und könnte eine Funktion als *Decoy*-Rezeptor innehaben (Abbildung 11) [154]. Der dritte VEGF-Rezeptor (VEGFR-3) spielt vor allem bei der Lymphangiogenese eine Rolle und nutzt dazu seine Aktivierung durch VEGF-C und VEGF-D (Abbildung 11) [145].

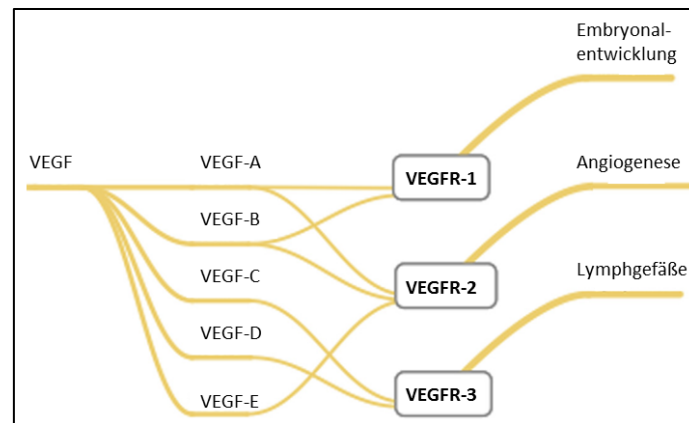


Abbildung 11: Die Familie der vaskulären Wachstumsfaktoren (VEGFs), ihre Rezeptoren und biologischen Funktionen. Modifiziert nach [145].

1.3.5. Physiologische Rolle des Endothels

Eine grundlegende physiologische Rolle des Endothels ist es, durch seine anti-thrombotische luminaire Oberfläche die Adhäsion und Koagulation der Blutplättchen zu verhindern und den ungehinderten Blutfluss zu ermöglichen. Unter physiologischen Bedingungen kommt es nur zu wenig Interaktionen von im Blustrom zirkulierenden Zellen mit der Endothelzelloberfläche [121]. Dabei synthetisieren und setzen Endothelzellen wichtige antikoagulatorische Regulatoren der Blutgerinnung frei, wie Prostacyclin (PGI_2), Thrombomodulin, Heparan, gewebspezifischer Plasminogenaktivator (t-PA) und Stickstoffmonoxid und verfügen zudem über eine athrombogene Glykokalyx [125, 155]. Aber auch prokoagulatorische Moleküle, zum Beispiel der von Willebrand Faktor (vWF), der Plasminogenaktivator Inhibitor-1 (PAI-1) und der Gewebefaktor (*Tissue Factor*), werden durch Endothelzellen synthetisiert [125, 156]. Darüber hinaus kommt dem gesunden Endothel eine entscheidende Bedeutung bei der Regulation des Tonus der Blutgefäße zu. Über die Synthese vasoaktiver Moleküle, wie Stickstoffmonoxid (NO), Endothelin-1 und Prostacyclin, beeinflussen Endothelzellen parakrin den Tonus der glatten Gefäßmuskulatur und hierüber den Vasotonus und somit die lokale Organdurchblutung [121].

Intaktes Endothel zeichnet sich demnach durch eine ausgeglichene Regulation von antiadhäsiven und adhäsiven, antithrombotischen und thrombotischen, vasodilatierenden und vasokonstriktorisches und antiproliferativen und proliferativen Prozessen aus. Hinzu kommt eine ausgewogene Permeabilität um die wichtige endotheliale Barrierefunktion aufrecht zu erhalten [121]. Stellt sich ein Ungleichgewicht hin zu gesteigert adhäsiven, thrombotischen und proliferativen Vorgängen ein, gepaart mit Vasokonstriktion und gesteigerter Permeabilität, führt das zur Endotheldysfunktion, einem wichtigen Charakteristikum kardiovaskulärer Erkrankungen und atherosklerotischer Gefäßveränderungen.

Die in diesem Prozess proinflammatorisch aktivierten Endothelzellen exprimieren an ihrer Oberfläche Adhäsionsmoleküle, die dann das Adhären von Leukozyten erleichtern. Zu diesen Oberflächenmolekülen zählen VCAM-1, ICAM-1, E-Selektin und P-Selektin [121, 157]. Die gesteigerte Adhäsion von Zellen an das aktive Endothel wird begleitet von chemotaktischen Mechanismen, die zur transendothelialen Migration von Leukozyten und Monozyten beitragen. Entscheidend beeinflusst werden sowohl die Anzahl der Zellen als auch die Migration von stark proinflammatorischen Zytokinen. Die Interleukine IL-1 und IL-6, aber auch TNF- α , Angiotensin II und oxidiertes LDL, führen zu einer Verstärkung der Zelladhäsion sowie der Migration [121, 158-160]. Die Passage der Leukozyten aus dem Blutstrom in das umliegende Gewebe erfolgt durch eine mehrstufige Adhäsionskaskade, welche aus einem initialen Andocken, dem *Rolling*, dem finalen Arrest und der Transmigration besteht.

Das Anheften und *Rolling* der Leukozyten wird durch endotheliale E- und P-Selektine und den entsprechenden Glykosylierungen auf der Leukozytenoberfläche vermittelt [125, 157]. Daran schließt sich die finale Adhäsion an, welche durch Integrine der Leukozyten, beispielsweise LFA-1 und $\alpha 4\beta 1$ /VLA-4, und ICAM-1 sowie VCAM-1 der Endothelzellen zustande kommt [161, 162]. Die Extravasion der Leukozyten durch die Endothelzellschicht kann dann auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen. Zum einen ist es möglich, dass die Transmigration zwischen benachbarten Endothelzellen (parazellulärer Weg) abläuft, zum anderen konnte ein Weg direkt durch Endothelzellen (transzellulärer Weg) gezeigt werden [163]. Notwendig für die Transmigration sind PECAM-1/CD31, CD99 und JAM-1 [164-166].

1.3.6. Dysfunktion des Endothels - Atherosklerose

Der oben beschriebene Vorgang der Monozyteninfiltration spielt auch bei der Atherosklerose eine grundlegende Rolle. In Folge einer endothelialen Dysfunktion, einhergehend mit der Akkumulation von LDL-Molekülen in der Tunica intima, die nachfolgend oxidieren, kommt es zur Einwanderung von Monozyten und zur Bildung des *Lipid Cores* [145]. Die transmigrierten Monozyten, hauptsächlich Makrophagen, nehmen über *Scavenger*-Rezeptoren (Lox-1) das oxidierte LDL auf und speichern es als Lipidtropfen. Da diese Phagozytose unkontrolliert abläuft, akkumulieren Lipidtropfen in den Makrophagen, es folgt deren Transformation zu Schaumzellen und schlussendlich die Apoptose der Makrophagen [145]. Es kommt zur erneuten Freisetzung von oxidiertem LDL in der Intima, was zu gesteigerten inflammatorischen Prozessen führt. Aufgrund der Inflammation, einhergehend mit übermäßiger Zytokinfreisetzung, unter anderem von TNF α und IL1 β , und gesteigerter *Toll*-

Like Rezeptor (TLR4) Expression in den Monozyten [167], kommt es zum stetigen Anwachsen des Plaques und einer fortschreitenden Gefäßverengung. Verstärkt wird die Größenzunahme des Plaques durch Einwanderung von glatten Muskelzellen aus der Media und Sezernierung von fibrösen Elementen, die eine bindegewebsartige Kappe formen [168]. Die Komplexität des Plaques kann durch Calcifizierung und Einblutungen aus kleinen Blutgefäßen weiter zunehmen, was zu einem Gefäßverschluss durch Thrombusbildung führen kann, wenn vulnerable Plaques einreißen und dabei die Integrität des Endothels verletzt wird. Rupturierte Plaques können daher durch thrombotische Gefäßverschlüsse, aber auch durch das Ablösen von Plaqueinhalten (Thromboembolien) zu Myokardinfarkten und Schlaganfällen führen, die rund 50% aller Todesfälle in der westlichen Zivilisation ausmachen [168].

1.4. Der Thromboxan A₂-Rezeptor

Der Thromboxan A₂-Rezeptor (auch TXA₂-Rezeptor oder TP-Rezeptor von *T Prostanoid Receptor*) ist ein in Wirbeltieren vorkommender membranständiger, G-Protein gekoppelter Rezeptor. Das humane TP-Rezeptorgen lokalisiert auf Chromosom 19 und kodiert für 3 Exons und 2 Introns [169]. Durch alternatives Spleißen entstehen im menschlichen Organismus zwei Isoformen, TP_α und TP_β, welche sich in der Länge des C-Terminus unterscheiden, sonst aber Sequenzhomologe sind und gleiche Affinitäten zu ihrem natürlichen Liganden, dem Thromboxan A₂ (TXA₂), zeigen (Abbildung 12) [170]. Zunächst konnte 1991 die TP_α-Isoform aus Plazentagewebe identifiziert und drei Jahre später die TP_β-Isoform aus Endothelzellen der Nabelschnur isoliert werden [171, 172]. Seit ihrer Entdeckung sind die beiden Isoformen in einer breiten Anzahl verschiedener Gewebe, wie Plazenta, Gehirn, Dünndarm und dem Thymus, und diversen Zellen, beispielsweise vaskulären glatten Muskelzellen, Thrombozyten und Endothelzellen, gefunden worden (zusammengefasst durch Nakahata, 2008, [173]).

Da sich nur die C-Termini der beiden TP-Isoformen unterscheiden (Abbildung 12), werden ihre funktionellen Unterschiede über diesen Rezeptorteil vermittelt. Beide Rezeptor-Formen interagieren intrazellulär mit heterotrimeren G-Proteinen, wie G_{12/13}, G_{q/11} und G_{i/o} [174]. Entscheidende Funktionen der TP-Isoformen stellen unter anderem die Thrombozytenaggregation und die Kontraktion glatter Muskelzellen dar.

Über den Isoform-spezifischen C-Terminus werden des Weiteren auch post-translationale Modifizierungen vorgenommen, wie Phosphorylierung und Palmitoylierung (Abbildung 12),

die ihrerseits die Rezeptoraktivität und Lokalisation (TP α exklusiv membranständig, TP β zytoplasmatisch und membranständig) regulieren [175].

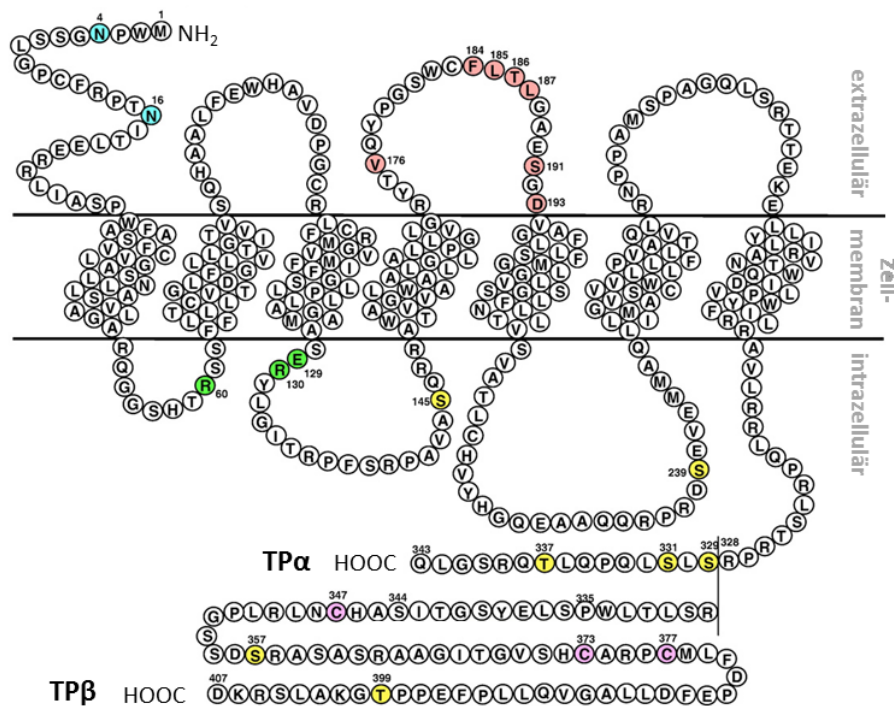


Abbildung 12: Strukturschema und Aminosäuresequenz der TP-Rezeptor-Isoformen TP α und TP β . Schematisch sind die Anordnung der für einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor typischen 7 Transmembranhelices dargestellt. Der extrazelluläre N-Terminus wird über diese Helices und je 3 extra- und intrazelluläre Loops mit dem zytoplasmatisch gelegenen C-Terminus verknüpft. Die Rezeptor-Isoformen unterscheiden sich lediglich ab Arginin 328 (R328) in der Länge und Aminosäurezusammensetzung des C-Terminus. Glykosylierungsstellen im N-Terminus türkis, Ligandeninteraktionsstelle im zweiten extrazellulären Loop rot, G-Proteinbindungsstelle in den intrazellulären Loops 1 und 2 grün, Phosphorylierungsstellen gelb, Palmitoylierungsstellen im C-Terminus von TP β pink. Abbildung modifiziert nach [173].

Ihre biologische Wirkung vermitteln die TP-Rezeptor-Isoformen *in vitro* und *in vivo* durch Bindung mit zirkulierenden Liganden, wie dem Arachidonsäurederivat Thromboxan A₂, anderen Eicosanoiden, wie dem Prostaglandin H₂ (PGH₂) und dem F2-Isoprostan 8-iso-PGF_{2 α} [170, 176, 177]. Intrazellulär werden durch die Kopplung des TP-Rezeptors an heterotrimere G-Proteine Effektoren rekrutiert, welche in die Remodellierung des Zytoskeletts, die Zellspannung, Adhäsion und Proliferation eingreifen [178]. Die genannten Prozesse werden, wie weiter oben bereits beschrieben, stark durch kleine monomere RhoGTPasen kontrolliert. So konnte auch für den TP-Rezeptor eine Signalkaskade über die G α_{13} -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine und RhoA mit seinen *Downstream* Effektoren gezeigt werden [173, 179-181]. Im Einklang mit diesen Befunden war die TP-Rezeptor-vermittelte Hemmung des VEGF-induzierten Gefäßwachstums in humanen Endothelzellen ROCK-abhängig und durch pharmakologische ROCK-Hemmung aufhebbar [181-183]. Darüber hinaus hat unsere

Arbeitsgruppe vor kurzem eine TP-Rezeptor-getriebene und COX-2-abhängige auto/parakrine positive Rückkopplungsschleife aufgedeckt, durch die der Rezeptor in der Lage ist, unabhängig von exogenen Quellen von TP-Rezeptor-Liganden eine anhaltende Selbstaktivierung auszulösen und dadurch eine endotheliale Dysfunktion zu verursachen und die Angiogenese zu beeinträchtigen [180]. In diesen Untersuchungen konnten wir auch eine dauerhafte Erhöhung der RhoA-Aktivität in TP-Rezeptor-überexprimierenden humanen Endothelzellen beobachten. Interessanterweise führte konstitutive RhoA-Aktivität wiederum zu einer Zunahme der TP-Rezeptor-Expression, was ebenfalls auf eine positive Rückkopplungsschleife hinweist [184].

Der TP-Rezeptor ist für das vaskuläre Endothel ein überaus relevanter Effektor, da er die Entstehung der endothelialen Dysfunktion und der Atherosklerose fördert und aus diesem Grund einen zentralen Forschungsschwerpunkt unserer Arbeitsgruppe darstellt. Zusammen mit der bekannten Verknüpfung der Signalkaskade des TP-Rezeptors und der kleinen RhoGTPase RhoA gab dies den Anlass, in der vorliegenden Arbeit systematisch die Rolle der kleinen GTPasen RhoA, RhoB und RhoC auf die Funktion von humanen Endothelzellen zu untersuchen. Zudem gehören die genannten Proteine, insbesondere RhoA und RhoC, zu den am stärksten exprimierten Vertretern der kleinen RhoGTPasen in humanen Endothelzellen, was diesen Untersuchungen zusätzliche Relevanz verleiht [185].

2. Material und Methoden

2.1. Zellkultur

In der vorliegenden Arbeit wurden HEK-293T Zellen (humane embryonale Nierenzellen, ATCC® CRL 11268™), HUVEC (humane Endothelzellen aus der Nabelschnur, PromoCell) und HCAEC (humane Endothelzellen aus Koronararterien, PromoCell) verwendet. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ in einem Inkubationsschrank (MCO-19AIC, Panasonic). Das Ablösen dieser adhärent wachsenden Zelllinien erfolgte mit 0,05% Trypsin-EDTA (Gibco) in 1x PBS (Gibco). Zum Abstoppen der Zelldissoziation wurde das entsprechende Kulturmedium mit 10% FCS verwendet, anschließend die Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer bestimmt und die benötigte Zellzahl für das Passagieren der Zellen oder deren experimentelle Nutzung in das entsprechende Kulturgefäß überführt.

Die HEK-293T Zellen wurden in T-75 Zellkulturflaschen (Greiner) in DMEM, versetzt mit 10% FCS, 1% GlutaMAX™ (Gibco) und 1% Penicillin/Streptomycin, kultiviert.

HUVEC und HCAEC wurden in einem Basalmedium für Endothelzellen (EBM-2 bzw. MV für HCAEC, PromoCell), versehen mit 2% FCS bzw. 5% FCS für HCAEC, EGF, bFGF, IGF-1, VEGF-A, Ascorbinsäure, Heparin und Hydrocortison (*Supplement Mix* für EBM-2 bzw. MV, PromoCell), kultiviert. Hierfür wurden alle genutzten Zellkulturflaschen und Multi-Well-Platten vorher für 30 min mit 0,2% Gelatine in 1x PBS beschichtet. Zellen der Passagen 2-7 wurden für experimentelle Untersuchungen, wie Transfektion, lentivirale Transduktion, Proliferations- und Apoptoseanalysen, Sphäroid-basiertem *Sprouting*-Assay, *Tube-Formation*-Assays, Migrationsuntersuchungen und Xenograft-Experimente, verwendet.

2.2. Herstellung, Reinigung und Titerbestimmung lentiviraler Vektoren

Die Herstellung, Reinigung und Titerbestimmung der genutzten lentiviralen Vektoren (Tabelle 4) erfolgte nach einem Protokoll von Kutner *et al.* [186]. Dazu wurden HEK-293T Zellen in beschichtete 150 cm² Zellkulturplatten (Sarstedt) in einer Zelldichte von 8*10⁶ Zellen/Platte in 25 ml DMEM (10% FCS, 1% GlutaMAX, 1% Penicillin/Streptomycin) ausgesät. Nach 24 h erfolgte, bei einer Konfluenz von 30-40%, die Transfektion mittels Calciumchlorid. Hierfür wurden die HEK-293T Zellen zunächst mit Chloroquin in einer finalen Konzentration von 25 µM versetzt. Anschließend wurden 21 µg/Platte pMD2.G (Plasmid für die Expression des VSV-G Glycoproteins) und 39 µg/Platte psPAX2

(lentivirales Verpackungsplasmid der 2. Generation) zusammen mit 60 µg/Platte des gewünschten Transgen tragenden Plasmids (basierend auf pHIV-SFiG-1335-, bzw. GIPZ™-Plasmiden) gemischt, mit 2 M CaCl₂-Lösung (367 µl/Platte) versetzt und auf 3 ml Gesamtvolumen mit Wasser aufgefüllt. Der Transfektionsmix wurde vervollständigt, indem 3 ml 2x HBS (50 mM HEPES, 1,5 mM Na₂HPO₄, 280 mM NaCl, 10mM KCl, 12 mM Saccharose, pH 7,07) zu getropft und gevortext wurde. Der DNA/CaCl₂/HBS Mix wurde dann tropfenweise in das Medium der HEK-293T Zellen gegeben. Nach 20 h erfolgte ein Mediumwechsel. Zwei Tage nach der Transfektion wurde der Überstand abgenommen, bei 500xg für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und anschließend durch einen 0,45 µm Filter (Sarstedt) filtriert. Die Konzentrierung der lentiviralen Partikel erfolgte im Anschluss durch Zugabe einer 50%igen Polyethylenglykollösung (PEG 6000), 4 M NaCl und 1x PBS (Gibco), anschließender Inkubation für 90 min auf Eis mit 3maligem Schwenken und abschließender Zentrifugation (7000xg, 10 min, 4°C). Das erhaltene Pellet wurde in 1 ml 50 mM Tris/HCl, pH 7,4, resuspendiert und bei -80°C gelagert.

Die Titerbestimmung der lentiviralen Vektoren erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Hierfür wurden zunächst 30.000 HUVEC/*Well* in 12-*Well* Platten ausgesät. Die Transduktion mit 3 verschiedenen Volumina der Virussuspension erfolgte nach 24 h jeweils in Doppelbestimmung. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Zellzahl pro *Well* bestimmt. 72 h nach der Transduktion wurden die HUVEC geerntet und der Anteil EGFP positiver Zellen mittels FACS (*Attune*® *Acoustic Focusing* Durchflusszytometer, ThermoFisher Scientific) ermittelt. Der Virustiter (*Transducing Units* (TU) ml⁻¹) wurde dann nach folgender Formel berechnet:

Formel 1: Berechnung des Virustiters. $TU = \frac{F \cdot N \cdot D \cdot 1000}{v}$

Hierbei ist F der Prozentsatz fluoreszierender Zellen, N die Zellzahl pro *Well* zum Transduktionszeitpunkt, D der Verdünnungsfaktor der verwendeten Virussuspension und V das eingesetzte Volumen der Virussuspension pro *Well*.

2.3. Lentivirale Transduktion von HUVEC und HCAEC

Für die lentivirale Transduktion wurden HUVEC und HCAEC mit VSV-G pseudotypisierten lentiviralen Partikeln inkubiert. Die verwendeten Viruspartikel für die Überexpression der verschiedenen Rho-Varianten basierten auf dem pHIV-SFiG-1335-Transferplasmid (Tabelle 4 und Anhang: Abbildung 58). Alle Viruspartikel für einen shRNA-vermittelten *Knockdown* basierten dagegen auf dem GIPZ™-Vektor (Tabelle 4 und Anhang: Tabelle 11). Alle

Viruspartikel vermittelten neben der Expression des Zielgens auch die Expression des Reportergens EGFP.

Die Transduktion der Endothelzellen erfolgte mit einer *Multiplicity of Infection* (MOI) von 500 für die Überexpression der Rho-Varianten, beziehungsweise einer MOI von 100 für den shRNA-vermittelten *Knockdown*. 24 h nach der Transduktion wurde ein Mediumwechsel vorgenommen. Infizierte Zellen wurden für 48 h – 72 h bis zur Verwendung in funktionalen Untersuchungen oder Genexpressionsanalysen kultiviert. Der Erfolg der Infektion wurde mittels *Real-Time* PCR oder Western Blot untersucht. Zusätzlich erfolgte eine Expressionskontrolle mittels Durchflusszytometrie über das co-exprimierte EGFP.

Tabelle 4: Übersicht aller verwendeten Viren.

Virusbezeichnung	Beschreibung	verwendete MOI (<i>Multiplicity of Infection</i>)
pHIV	Kontrollvirus Überexpression, EGFP-Expression	500
pHIV - 3xHA	Expression eines 3fach HA- <i>Tags</i> , EGFP-Expression	500
RhoA G14V	RhoA konstitutiv aktiv mit N-term. 3xHA, Mutation Gly→ Val	500
RhoA Q63L	RhoA konstitutiv aktiv mit N-term. 3xHA, Mutation Gln→ Leu	500
RhoA T19N	RhoA dominant negativ mit N-term. 3xHA, Mutation Thr→ Asn	500
RhoA WT	RhoA Wildtyp mit N-term. 3xHA	500
RhoB G14V	RhoB konstitutiv aktiv mit N-term. 3xHA, Mutation Gly→ Val	500
RhoB Q63L	RhoB konstitutiv aktiv mit N-term. 3xHA, Mutation Gln→ Leu	500
RhoB T19N	RhoB dominant negative mit N-term. 3xHA, Mutation Thr→ Asn	500
RhoB WT	RhoB Wildtyp mit N-term. 3xHA	500
RhoC G14V	RhoC konstitutiv aktiv mit N-term. 3xHA, Mutation Gly→ Val	500
RhoC Q63L	RhoC konstitutiv aktiv mit N-term. 3xHA, Mutation Gln→ Leu	500
RhoC T19N	RhoC dominant negative mit N-term. 3xHA, Mutation Thr→ Asn	500
RhoC WT	RhoC Wildtyp mit N-term. 3xHA	500
shKtr.	Kontrollvirus <i>Knockdown</i> , EGFP-Expression	100
shDIAPH1_1	shRNA gegen Diaphanous Homolog 1	100
shDIAPH1_2	shRNA gegen Diaphanous Homolog 1	100
shRHPN1_1	shRNA gegen Rhophilin-1	100
shRHPN1_2	shRNA gegen Rhophilin-1	100
shRHPN2_1	shRNA gegen Rhophilin-2	100
shRHPN2_2	shRNA gegen Rhophilin-2	100

shCIT_1	shRNA gegen Citron Rho-interagierende Kinase	100
shCIT_2	shRNA gegen Citron Rho-interagierende Kinase	100

2.4. Rho-Aktivitätsassay

Die Mutationen der kleinen RhoGTPasen RhoA, RhoB und RhoC, die einen Einfluss auf die Aktivität dieser zellulären Schaltermoleküle haben (G14V und Q63L konstitutiv aktiv, T19N dominant negativ) und die Wildtyp-Formen der genannten Rho-Proteine wurden hinsichtlich ihrer Aktivität untersucht. Dazu wurde ein Rho-Aktivitäts Kit der Firma Cytoskeleton (*Rho Activation*-Assay Biochem Kit™) verwendet. Hierbei wurde sich die Bindung von aktivem, GTP-gebundenem Rho an die Rho-Bindedomäne des Rhotekins zu Nutze gemacht. Die Rho-Bindedomäne (Aminosäuren 7-89) des Rho-Effektors Rhotekin wurde bei dem verwendeten Kit über eine Glutathion-S-Transferase/Glutathion-Bindung an Sepharosepartikel gekoppelt. Somit wurde ein *Pulldown* aktivierter Rho-Moleküle mittels Rhotekin-Sepharosepartikeln ermöglicht.

In Vorbereitung des *Pulldowns* wurden zunächst 300 µg Protein aus HUVEC-Lysaten gewonnen. Hierfür wurden HUVEC mit den jeweiligen Rho-Varianten, beziehungsweise der entsprechenden Kontrolle transduziert und 72 h nach Transduktion mittels Zellysepuffer (20 mM Tris/HCl (pHI 7,5), 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton, 2.5 mM Natriumpyrophosphat, 1 mM b-Glycerophosphat, 1 mM Na₃VO₄, 1 µg/ml Leupeptin, Cell Signaling Technology) entsprechend der Herstellerangaben lysiert. Hierzu wurde dem Lysepuffer zur Vermeidung von Proteindegradation ein Protease- und Phosphatase-Inhibitorcocktail (ThermoFisher Scientific) zugesetzt. Zur Abtrennung von Zellbruchstücken wurde das Zelllysat anschließend für 5 min bei 4°C und 15.000xg (Zentrifuge 5417R, Eppendorf) zentrifugiert. Es folgte eine Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bradford (Roti® Quant, Carl Roth) entsprechend der Herstellerangaben. 20 µg Protein wurden für den Nachweis der Rho-Überexpression durch Western Blot-Analysen abgenommen.

Für den *Pulldown* wurden anschließend gleiche Proteinmengen in ein 1,5 ml Reagiergefäß eingesetzt und mit 25 µg Rhotekin-Sepharosepartikeln gemischt. Die Bindung aktiver, GTP-gebundener Rho-Moleküle erfolgte für 1 h bei 4°C unter Verwendung eines Überkopfschüttlers (RS-RR 5, Phoenix Instrument). Danach wurden die Partikel bei 5000xg für 1 min bei 4°C pelletiert, der Überstand verworfen und mit 200 µl des Kit eigenen Waschpuffers gewaschen. Die Partikel wurden erneut pelletiert (5000xg, 1 min, 4°C) und der Überstand verworfen. Gebundene Proteine wurden durch Zugabe von 20 µl 2x Laemmli-

Probenpuffer (125 mM Tris pH 6,8, 20% Glycerol, 4% SDS, 0,005% Bromphenolblau, 5% β -Mercaptoethanol) und anschließendem Erhitzen auf 90°C für 2 min (Thermoschüttler TS-100C, biosan) eluiert und denaturiert. Die Sepharosepartikel wurden erneut sedimentiert und der Überstand für Western Blot Analysen eingesetzt.

2.5. FRET-basierte Stimulationsuntersuchungen mit einem RhoA-Wildtyp-Biosensor

Die in der Literatur kontrovers diskutierte Stimulation der RhoA-Aktivität durch VEGF wurde in der vorliegenden Arbeit durch Verwendung eines FRET-basierten RhoA-Biosensors, der das RhoA Wildtyp-Protein enthielt, untersucht. Hierfür wurden zunächst HUVEC in 96-Well Glasbodenplatten (Greiner), beschichtet mit 50 μ g/ml Fibronectin (Santa Cruz Technology), in einer Dichte von 10.000 Zellen/Well ausgesät und über Nacht bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchte kultiviert. Anschließend erfolgte die Transfektion der Endothelzellen mit dem RhoA-FRET-Biosensor [10, 187] unter Verwendung des TurboFect-Reagenz (ThermoFisher Scientific), entsprechend den Herstellervorgaben. *Live-Cell* FRET-Aufnahmen und Zeitraffer-Aufnahmen wurden an einem konfokalen Nikon A1R Mikroskop mit einem 60x Öl-Immersionsobjektiv (plan apo lambda, Nikon, n.a.=1,4) bei 37°C durchgeführt. Bilder wurden mit dem NIS-Elements FRET-Modul (Nikon) bearbeitet und ausgewertet. Der FRET-Donor mCerulean3 wurde bei einer Wellenlänge von 457 nm (Argon Laser) angeregt und die entsprechende Emission des Donors bei 465 - 500 nm (DD-Bilder) sowie des Akzeptors bei 525 - 555 nm (DA-Bilder), detektiert. Zusätzlich wurde der FRET-Akzeptor mVenus bei einer Wellenlänge von 514 nm angeregt und die Emission bei 525 - 555 nm (AA-Bilder) gemessen. Die Berechnung des FRET Index wurde mit Hilfe von Proben ausschließlich mit Donor bzw. Akzeptor kalibriert und der Korrekturfaktor für den Donor-*Crosstalk* (α) und die direkte Akzeptor-Anregung (β) in den DA-Bildern bestimmt. Abbildungen mit dem farbcodierten FRET-Index wurden als Intensität des korrigierten FRET-Bildes, normalisiert durch die Intensität des DD-Bildes entsprechend Formel 2 berechnet.

Formel 2: Berechnung des FRET-Index.

$$FRET\ Index = 100\% \times (DA - \alpha DA - \beta AA) \div DD$$

2.6. Zellproliferation

Das Proliferationsverhalten von HUVEC nach Überexpression der einzelnen Rho-Varianten wurde mittels BrdU-Einbau in die DNA und über Immunfluoreszenzfärbung des Proliferationsmarkers Ki-67 untersucht.

Die Inkorporation von BrdU (5-Brom-2-desoxyuridin) in neu synthetisierte DNA wurde mit Hilfe eines Zellproliferations-ELISA-Kits (Roche) entsprechend der Herstellerangaben analysiert. Hierzu wurden zunächst 2.500 HUVEC/*Well* in eine Gelatine beschichtete 96-*Well*-Platte (Greiner) ausgesät und 24 h nach Zellaussaat transduziert. Die Zugabe des BrdU in das Kulturmedium erfolgte 72 h nach der Transduktion für 3 h mit einer finalen Konzentration von 100 μ M, bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit. Anschließend wurden die Zellen für 30 min bei Raumtemperatur mit der Kit eigenen Fixierungslösung fixiert und direkt im Anschluss mit einer Peroxidase-gekoppelten, murinen, monoklonalen BrdU-Antikörperverdünnung (1:100) für 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Zellen drei Mal mit 1x PBS gewaschen, für 3-5 min mit der Kit eigenen Substratlösung (Tetramethylbenzidin) inkubiert und die Substratreaktion schließlich mit 1 M Schwefelsäure gestoppt. Unmittelbar im Anschluss wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm mit Hilfe eines Tecan Infinite F200pro Plattenlesegerätes (Tecan) gemessen.

Für die Immunfluoreszenzfärbung des Proliferationsmarkers Ki-67 wurden zunächst 20.000 HUVEC/*Well* auf runden, Gelatine-beschichteten Glasdeckgläschen (Durchmesser 1 cm, Th.Geyer) in 12-*Well*-Platten angezogen und, wie beschrieben, transduziert. 72 h nach Transduktion erfolgte die Zellfixierung in einer 4%igen PFA-Lösung für 15 min und anschließend eine Permeabilisierung und Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen (3% BSA, 0,2% Tween 20, 2% Triton X-100 in 1x TBS) für 1 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Die Deckgläschen wurden dann mit einer 1:400 Verdünnung des Ki-67 Antikörpers (Ki-67 (8D5) Maus, Cell Signaling Technology) in *Signal Stain (R) Ab Diluent* (Cell Signaling Technology) über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Präparate 3x in 1x PBS (Gibco) gewaschen und mit einem sekundären anti-Maus Antikörper aus der Ziege (Alexa Fluor® 594 Ziege anti-Maus, Dianova) in einer 1:1000 Verdünnung wiederum mit *Signal Stain (R) Ab Diluent* (Cell Signaling Technology) für 1 h bei Raumtemperatur in einer dunklen, feuchten Kammer inkubiert. Die Anfärbung der Zellkerne erfolgte mit dem DNA-Farbstoff Hoechst 33342 (16,2 μ M, life technologies). Abschließend erfolgte ein erneutes, 3-maliges Waschen mit 1x PBS und das Einbetten der Deckgläschen auf Objektträgern (Thermo Scientific) mit Hilfe von

Signal Stain® *Mounting Medium* (Cell Signaling Technology). Die Aufnahme repräsentativer Bilder erfolgte mit einem Nikon A1R Konfokalmikroskop (Nikon). Für die Quantifizierung der Ki-67-Färbung wurde das Verhältnis aus Ki-67-positiven Zellkernen unter den EGFP-positiven Zellen ermittelt. Auch hierbei diente das co-exprimierte EGFP als Reporter für eine erfolgreiche Transduktion der HUVEC.

2.7. Propidiumiodid-Färbung

Propidiumiodid (PI) bindet an zelluläre DNA durch Interkalation in den DNA-Strang. Dabei bindet sequenzunabhängig ein Farbstoffmolekül pro 4-5 Basenpaare [188]. Unter PI-DNA Interaktion weist das Propidiumiodid ein spezifisches Emissionsmaximum bei 617 nm auf.

Intakte Zellmembranen können vom PI nicht durchdrungen werden, weshalb sich eine Zellfärbung mit PI zur Unterscheidung von lebensfähigen und toten Zellen eignet.

Um einen Einfluss der Überexpression der in der vorliegenden Arbeit verwendeten RhoA, RhoB und RhoC Varianten (G14V und Q63L - konstitutiv aktiv, T19N dominant negativ, Wildtyp) auf die Zellvitalität und das Zellüberleben zu untersuchen, wurden entsprechend transduzierte HUVEC mittels PI gefärbt und analysiert. Dazu wurden 15.000 HUVEC in einer 24-Well-Platte (Greiner) ausgesät und mit den verschiedenen Rho-Varianten und dem entsprechenden Kontrollkonstrukt transduziert (Tabelle 4). 72 h nach Transduktion erfolgte die Zellernte durch Trypsinierung (Trypsin-EDTA-Lösung, Gibco), anschließender Resuspendierung der Zellsuspension in 10% FCS/1x PBS und Überführung in 1,5 ml Reagiergefäße. In Vorbereitung der PI-Färbung wurden die HUVEC für 3 min bei 4°C und 400 xg zentrifugiert, der Überstand verworfen und einmal mit 1x PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (3 min, 4°C, 400 xg) wurde das Zellpellet in einer PI-Färbelösung (20 µg/ml PI in HUVEC Basalmedium) resuspendiert und die Endothelzellen für 5 min bei Raumtemperatur im Dunkeln gefärbt. Anschließend wurden die Zellen in dieser Färbelösung unter Lichtausschluss bis zur Messung auf Eis gelagert. Die Messung der EGFP- und PI-Emission bei 475 nm bzw. 619 nm erfolgte nach Kompensation der jeweiligen Einzelspektren am *Attune*® *Acoustic Focusing* Durchflusszytometer (ThermoFisher Scientific). Für die Auswertung zum Einfluss der Überexpression von RhoA, RhoB und RhoC in ihren verschiedenen Aktivitätszuständen wurde der relative Anteil PI-positiver Zellen in der Population der EGFP-positiven HUVEC (entspricht den erfolgreich transduzierten Zellen) berechnet.

2.8. Aktinfärbung und morphologische Analysen von HUVEC

Für die Aktinfärbung mittels Phalloidin wurden zunächst 20.000 HUVEC/*Well* auf runden, Gelatine beschichteten Glasdeckgläschen (Durchmesser 1 cm, Th.Geyer) in 12-*Well*-Platten angezogen und, wie beschrieben, transduziert. 72 h nach Transduktion folgte die Zellfixierung in einer 4%igen PFA-Lösung für 15 min bei Raumtemperatur und anschließender Permeabilisierung mit 0,1% Triton X-100 in 1x PBS für 15 min bei Raumtemperatur. Darauf erfolgte die Aktinfärbung mit Phalloidin Alexa Fluor® 633 (Invitrogen) in einer finalen Konzentration von 1,65 μM in 1% BSA/1x PBS. Die Inkubation der fixierten Endothelzellen mit der Phalloidinlösung wurde für 1 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer vorgenommen. Dabei bindet das Phalloidin spezifisch und mit hoher Affinität (K_d 20 nM) ausschließlich an filamentöses Aktin in einem stöchiometrischen Verhältnis von einem Phalloidinmolekül pro Aktinuntereinheit [189]. Abschließend erfolgten zwei Waschschriffe in 1x PBS und das Einbetten der Deckgläschen auf Objektträgern (Thermo Scientific) mit Hilfe von *Signal Stain® Mounting Medium* (Cell Signaling Technology). Die Aufnahme mikroskopischer Bilder erfolgte mit einem 40x Objektiv am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop "LSM 710" (Carl-Zeiss). Die Ermittlung der Zelllänge und -breite erfolgte mittels *NIS Elements Imaging Software* (Nikon).

2.9. Paxillin-Färbung zur Visualisierung von fokalen Adhäsionen

Die Färbung von Paxillin als Bestandteil fokaler Adhäsionen erfolgte in HUVEC, die die entsprechenden Rho-Varianten exprimierten, 72 h nach der Transduktion. Dazu wurden die auf Deckgläschen kultivierten Zellen zunächst mit 1x PBS gewaschen und in 4% Formaldehyd-Lösung für 15 min bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend erfolgte ein weiterer Waschschriff in 1x PBS und die Zellpermeabilisierung in 0,1% Triton X-100/1xPBS für 15 min bei Raumtemperatur. Rückstände der Permeabilisierungslösung wurden durch 3-maliges Waschen in 1x PBS (je 5 min) entfernt und unspezifische Bindungsstellen mit 10% Ziegenerum, 1% BSA in 1x PBS-T (0,1% Tween-20) blockiert. Der primäre Paxillin-Antikörper (Abcam, 1:100 Verdünnung in *Signal Stain (R) Ab Diluent*, Cell Signaling Technology) wurde für 90 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer auf den Zellproben inkubiert. Abschließend wurde wiederum 3 Mal mit 1x PBS gewaschen (je 5 min), 1h bei Raumtemperatur mit einem Alexa Fluor® 594-gekoppelten sekundären Antikörper inkubiert, erneut mit 1x PBS gewaschen und die Deckgläschen mittels *Signal Stain®*

Mounting Medium (Cell Signaling Technology) eingebettet. Die Proben wurden an einem Nikon A1R, mit einem 60x-Ölimmersionsobjektiv, mikroskopiert.

2.10. Sphäroid-basierter *Sprouting*-Assay

Die Fähigkeit zur Aussprossung der HUVEC und HCAEC aus Endothelzellsphäroiden wurde nach einem Protokoll von Korff und Augustin [190] untersucht. Dazu wurden die HUVEC bzw. HCAEC zunächst, wie beschrieben, kultiviert und transduziert. 24h nach der Transduktion erfolgte die Zellernte mittels Trypsin-EDTA (Gibco) und eine Zellzahlbestimmung. Unter Verwendung des RhoGTPase-Inhibitors C3 Transferase aus *Clostridium botulinum* (Cytoskeleton) wurden die Endothelzellen vor der Zellernte für 6 h mit 1 µg/ml in basalem Medium kultiviert und anschließend, wie nachfolgend beschrieben, weiter behandelt. Die verwendete Zellzahl ermittelte sich aus der benötigten Anzahl an *Wells* pro Bedingung und der Vorgabe 20.000 Zellen pro *Well*, was einer Zellzahl von 400 Endothelzellen/Sphäroid bei 50 Sphäroiden/*Well* entspricht, einzusetzen. Das entsprechende Volumen der Zellsuspension wurde mit 0,25 ml/*Well* Methocel (20% Methylzellulose in Opti-MEM™, Gibco) gemischt und auf insgesamt 1,25 ml/*Well* mit Kulturmedium aufgefüllt. Für die Ausbildung von Sphäroiden (Endothelzellaggregaten) wurden anschließend *Hanging-Drops* mit einem Volumen von je 25 µl in quadratische Zellkulturschalen (142 cm², Greiner) ausgebracht und über Nacht bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchte inkubiert. Die Ausbildung runder, gleichmäßig geformter Sphäroide wurde mikroskopisch überprüft. Anschließend erfolgte die Ernte der Sphäroide durch vorsichtiges Waschen der quadratischen Zellkulturschalen mit 5 ml/Schale 1x PBS (Gibco) und anschließender Zentrifugation bei Raumtemperatur für 7 min bei 1.000 rpm (Laborzentrifuge 4-16ks, Sigma). Das Sphäroid-Pellet wurde danach in einer Mischung aus 0,25 ml/*Well* eisgekühltem, neutralisiertem Rattenkollagen, supplementiert mit 31,25 µl/*Well* 10x Medium 199 (Sigma) und 0,25 ml/*Well* Methocel, versetzt mit 20% FCS, vorsichtig resuspendiert. Abschließend wurden 0,5 ml/*Well* des Sphäroid/Kollagen/Methocel-Gemisches in eine 48-*Well*-Suspensionsplatte (Greiner) überführt und eine Polymerisierung des Kollagens bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchte für 30 min herbeigeführt. Das angiogenetische *Sprouting* bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchte wurde dann für 24 h in An- und Abwesenheit von 20 ng/ml VEGF sowie verschiedener, pharmakologischer Inhibitoren (Tabelle 5), gelöst in basalem HUVEC-Medium (EBM-2, PromoCell) mit 2,5% FCS, untersucht. Eine Fixierung der Sphäroide im Kollagen erfolgte durch Zugabe von 0,5 ml/*Well* einer 4%igen PFA-Lösung für 15 min. Anschließend konnten die fixierten Sphäroide in den 48-*Well*-Platten in 1x PBS (Gibco) bei

4°C gelagert werden. Für die Quantifizierung des *Sprout*-Verhaltens wurden je 10 Sphäroide pro Bedingung und Experiment mit Hilfe eines 10x Objektivs am Nikon *Eclipse* TS100 (Nikon) fotografiert. Anschließend wurde die kumulative *Sprout*länge an jedem Sphäroid mittels *NIS Elements Imaging Software* (Nikon) bestimmt.

Tabelle 5: Verwendete pharmakologische Inhibitoren und Konzentrationen.

Name	Verwendung	stock Konzentration	finale Konzentration	Lösungsmittel
Y-27632	ROCK-Inhib.	10 mM	10 µM	DMSO
BMS4	LIMK1-Inhib.	50 mM	0,5 µM	DMSO
LX7101	LIMK2-Inhib.	10 mM	3 µM	DMSO
Blebbistatin	Myosin II-Inhib.	15 mM	30 µM	DMSO

2.11. *Tube-Formation-Assay*

Analysen zur Ausbildung von Mikrokapillaren humaner Endothelzellen (HUVEC) wurden in 96-*Well* Angiogenese µ-Platten (10 µl/*Well*, Ibidi) durchgeführt. In Vorbereitung erfolgte die Zugabe von 10 µl/*Well* Matrigel, einem Proteingemisch der extrazellulären Matrix des murinen Engelbreth-Holm-Swarm Sarkoms (Wachstumsfaktoren reduziert, Corning Life Science), und dessen Polymerisierung für 30 min bei 37°C. HUVEC wurden 48 h nach der Transduktion mittels Trypsin-EDTA-Lösung geerntet und anschließend die Zellzahl bestimmt. Für den *Tube-Formation-Assay* wurden 17.000 HUVEC/*Well* auf das Matrigel gegeben und für 18 h in EBM-2 HUVEC Basalmedium mit 2% FCS in gesättigter Luftfeuchte bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Das Vermessen der Gesamttubellänge erfolgte mit Hilfe eines 10x Objektivs am Nikon *Eclipse* TS100 (Nikon) und der *NIS Elements Imaging Software* (Nikon).

2.12. *Scratch-Assay*

Die Untersuchung der gerichteten Migration von HUVEC und HCAEC erfolgte durch das Setzen einer Wunde (*Scratch*) im konfluenten Zellmonolayer und der anschließenden Beobachtung der gerichteten Zellbewegung zum Schließen der Wunde. Für den sogenannten *Scratch-Assay* wurden zunächst 5.000 Endothelzellen/*Well* in eine Gelatine beschichtete 96-*Well*-Platte (Greiner) ausgesät und am folgenden Tag transduziert. 72 h nach der Transduktion erfolgte das Einbringen der Wunde, mit Hilfe einer 100 µl Pipettenspitze, händisch. Gelöste Zellen wurden durch einmaliges Waschen mit 1x PBS (Gibco) entfernt. Anschließend erfolgte

die Zugabe von EBM-2 Basalmedium mit 2,5% FCS und optional verschiedener pharmakologischer Inhibitoren (Tabelle 5). Bei Verwendung des RhoGTPase Inhibitors C3 Transferase aus *Clostridium botulinum* (Cytoskeleton) wurden die HUVEC bzw. HCAEC 72 h nach Transduktion zunächst mit 1 µg/ml Inhibitor in basalem Medium für 8 h inkubiert. Anschließend erfolgten das Einbringen der Wunde und die Einstellung von 2,5% FCS im Medium. Die gerichtete, zweidimensionale Bewegung der HUVEC wurde mit Hilfe eines Nikon A1R Konfokalmikroskops und einem 10x Objektiv (Nikon) verfolgt. Hierbei konnten die Zellen anhand des co-exprimierten EGFPs nach Anregung durch einen 405 nm Laser beobachtet werden. Für die Zeitrafferaufnahmen der Zellbewegung wurden im Abstand von 20 min über einen Zeitraum von 24 h Aufnahmen durchgeführt. Über den gesamten Beobachtungszeitraum wurden die Zellen in einem okolab *Cage*-Inkubator (okolab) bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchte kultiviert. Die Ermittlung der Bewegungsgeschwindigkeit in µm/min erfolgte durch das Ausmessen der zurückgelegten Wegstrecke vom Startpunkt zum Zeitpunkt 0 min bis zum entsprechenden Messpunkt zum gewählten Auswertzeitpunkt. Diese Auswertung erfolgte mit der NIS *Elements Imaging Software* (Nikon).

2.13. *In vivo*-Angiogeneseassay - Xenograft

Die Fähigkeit von Rho-überexprimierenden HUVEC (konstitutiv aktiv (Q63L), dominant negativ (T19) zur Bildung von Gefäßstrukturen wurde mittels Sphäroid-basiertem Xenograft-Assay *in vivo* untersucht. Hierbei wird den Tieren ein *Plug*, bestehend aus Matrigel (Proteinmischung aus Engelbreth-Holm-Swarm-Maussarkomzellen), Zellmedium, Methocel (Methylzellulose in Basalmedium) und HUVEC-Sphäroiden appliziert. Die Gefäßneubildung aus den humanen Endothelzellen nach 21 Tagen wurde nach Explantation der *Plugs* mittels Immunfärbung analysiert.

Dieser Tierversuch wurde entsprechend den Vorgaben des deutschen Tierschutzgesetzes sowie ethischen und gesetzlichen Vorgaben des Landesverwaltungsamtes Sachsen-Anhalt (Genehmigungsnummer: 42502-2-1419MLU) durchgeführt. In Übereinstimmung mit den FELASA-Richtlinien wurden die Mäuse in Gruppen von maximal 5 Tieren pro Käfig (individuell belüftete Käfige, IVC), nach Geschlechtern getrennt, in einer spezifisch Pathogen freien Umgebung mit einem 12 h Licht / 12 h Dunkelheit Rhythmus bei ca. 22°C gehalten. Die Mäuse hatten jederzeit Zugang zu Wasser und Futter (Standardnagerdiät, Altromin) *ad libitum*. Der Allgemeinzustand der Tiere wurde täglich überprüft und bei Versuchsende

erfolgte das Töten der Mäuse durch zervikale Dislokation, nach vorangegangener Isoflurannarkose.

Für den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Xenograft-Assay wurden immundefiziente NOD-scid IL2rg^{null} (NSGTM)-Mäuse beider Geschlechter im Alter zwischen 10 und 12 Wochen eingesetzt (Jackson Laboratory, stock #005557). Das Fehlen von B- und T-Zellen in dieser Mauslinie war essenziell um eine Immunreaktion auf die artfremden, humanen Endothelzellen und damit deren Eliminierung zu verhindern.

Die Durchführung erfolgte nach einem Protokoll von Laib *et al.* [191]. Für den Sphäroid-basierten Xenograft-Assay wurden transduzierte HUVEC 72 h nach Transduktion mittels 0,05% Trypsin-EDTA-Lösung (Gibco) geerntet. Es wurden 150.000 HUVEC/*Plug* kalkuliert und die entsprechende Zellzahl in 25 ml/*Plug* Vollmedium mit 20% Methocel aufgenommen. Anschließend erfolgte die Aggregation der HUVEC zu Sphäroiden in *Hanging-Drops* zu je 25 µl über Nacht in quadratischen Zellkulturschalen (142 cm², Greiner) bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchte. Die erfolgreiche Bildung von Sphäroiden wurde mikroskopisch überprüft. Pro *Plug* wurden anschließend 5 ml 1x PBS+10% FCS genutzt um alle Sphäroide vorsichtig von den Zellkulturschalen zu waschen. Die Sphäroide wurden bei 150xg für 5 min und Raumtemperatur sedimentiert (Laborzentrifuge 4-16ks, Sigma) und der Überstand bis auf 5 ml verworfen. Zur verbliebenen Suspension wurden 5 ml Basalmedium gegeben und anschließend erneut zentrifugiert (150xg, 5 min, Raumtemperatur). Danach wurde der Überstand vollständig abgenommen, das Sphäroidpellet in 1 ml/*Plug* HUVEC Basalmedium schonend resuspendiert, in ein 2 ml Schraubdeckelröhrchen (Sarstedt) überführt und zentrifugiert (1.300xg, 5 min, Raumtemperatur). Das Pellet wurde dann in 300 µl/*Plug* einer Mischung aus 1,2% Methocel (Carboxymethylcellulose in Basalmedium), Fibrinogen (Merck) und Basalmedium im Verhältnis 1:1:1 (vol/vol/vol) aufgenommen. Diesem Mix wurde kurz vor der Resuspension je 500 ng/ml humanes VEGF-A (Peprotec) sowie FGF-2 (Peprotec) zugegeben.

Unmittelbar vor der Applikation wurde dem Mix aus Sphäroiden, Methocel, Fibrinogen und Medium 300 µl eisgekühltes Matrigel (*High Concentration*, Corning) mit Hilfe einer Verdrängungspipette (MR-100, Mettler Toledo) sowie 4 µl Thrombin (1 U/µl) zugesetzt. Gemischt und aufgezo-gen wurde die stark viskose Flüssigkeit mit einer sterilen 1 ml Spritze (Injekt®-F, Braun). Die Injektion der *Plugs* erfolgte unter sterilen Bedingungen, subkutan links und rechts der abdominalen Mittellinie auf Höhe der Hinterbeine mit Hilfe einer 27G Kanüle.

Die Entnahme der *Plugs* erfolgte 21 Tage nach der Applikation. Hierfür wurden die Mäuse unter Isoflurannarkose durch zervikale Dislokation getötet. Unmittelbar danach wurden die *Plugs* entnommen und direkt in 1,5 ml/*Plug* 4%iger PFA-Lösung über Nacht bei 4°C fixiert. Anschließend erfolgte das Entwässern der *Plugs* durch eine aufsteigende Alkoholreihe, beginnend bei 75% Ethanol, 85% Ethanol, 96% Ethanol, Isopropanol und abschließend 2 Mal Xylol. Die Entwässerung wurde in einem Gewebeeinbettautomaten (ThermoFisher) mit einer Verweildauer von 2 h pro Schritt bei Raumtemperatur vorgenommen. Final erfolgte die Paraffinierung für 2 h bei 60°C und das direkte Einbetten der *Plugs* in Paraffinblöcke.

In Vorbereitung der Blutgefäßfärbung wurden 5 µm dicke Schnitte der *Plugs* angefertigt, auf Objektträger (Menzel-Gläser Superfrost®, Thermo Scientific) gebracht und für 60 min bei 50°C auf den Objektträgern fixiert. Das Entparaffinieren der Schnitte erfolgte mit Hilfe einer absteigenden Alkoholreihe beginnend mit 3-maligem Waschen in Xylol gefolgt von 2 Schritten in Isopropanol, 96% Ethanol, 70% Ethanol, 50% Ethanol und Wasser (jeweils 5 min). Bedingt durch die Fixierung mit Formaldehyd musste anschließend eine Antigenwiederherstellung erfolgen. Dazu wurden die Schnitte in einer Pufferlösung aus 1 Teil 0,1 M Zitronensäure-Monohydrat-Lösung und 4,55 Teilen 0,1 M Natriumcitrat-Dihydrat-Lösung bei pH 6 für 3-mal je 5 min in einer Mikrowelle erhitzt. Die Pufferlösung sollte nicht sieden. Aus diesem Grund wurde zwischen jedem Schritt für 1 min pausiert. Abschließend wurde der Ansatz zum Abkühlen bei Raumtemperatur belassen. Es folgte ein Waschschrift in 1x PBS für 5 min.

Für die Färbung wurden die Schnitte zunächst mit einer wasserabweisenden Barriere (*Liquid Blocking Staining Guard Pen*, science services) umrandet und anschließend in einer Blockierlösung (3% BSA, 0,2% Tween-20, 2% Triton X-100 in 1x PBS) zum Absättigen unspezifischer Antikörperbindungsstellen für 60 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Die humanen Endothelzellen in den neu gebildeten Gefäßstrukturen wurden mit dem Fluorescein-gekoppeltem *Ulex europaeus* Agglutinin I (Vector Laboratories), einem etablierten Endothelzellmarker, der an α -gebundene Fucosereste auf der Zelloberfläche bindet, über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer gefärbt (1:150 Verdünnung in *Signal Stain (R) Ab Diluent*, Cell Signaling Technology). Die Anfärbung der Zellkerne erfolgte mit dem DNA-Farbstoff Hoechst 33342 (16,2 µM, life technologies). Schnitte der Xenograft-*Plugs* wurden zur Visualisierung der Plugdurchblutung ebenso mit einem Antikörper gegen murines Hämoglobin gefärbt (Tabelle 6). Hierzu erfolgte nach dem Blockierungsschritt eine Antikörper-Inkubation (1:250 Verdünnung in *Signal Stain (R) Ab Diluent*, Cell Signaling Technology) über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer. Nach 3-

maligem Waschen mit 1x PBS erfolgte die Detektion durch Inkubation (1 h bei Raumtemperatur) mit einem Alexa Fluor® 594-gekoppelten sekundären Antikörpers (1:200 Verdünnung in *Signal Stain (R) Ab Diluent*, Cell Signaling Technology). Direkt nach der Färbung wurden die Schnitte mit *Signal Stain® Mounting Medium* (Cell Signaling Technology) eingedeckelt und bei 4°C gelagert.

Die Aufnahmen zur Ermittlung der Gefäßfläche erfolgte mit Hilfe eines 20x Objektivs am Nikon *Eclipse TS100* (Nikon). Die Bestimmung der Gefäßfläche in Relation zur Plugfläche erfolgte mittels *NIS Elements Imaging Software* (Nikon).

2.14. Co-Immunpräzipitation von Rho-Interaktionspartnern

Die Identifikation von Interaktionspartnern der verschiedenen Rho-Varianten (konstitutiv aktiv, dominant negativ und Wildtyp) erfolgte aus HUVEC-Zelllysaten. Dazu wurden zunächst 400.000 HUVEC/T-75 Zellkulturflasche (Gelatine beschichtet, Greiner) ausgesät und 5 h nach Aussaat mit den entsprechenden lentiviralen Partikeln mit einer MOI von 500 transduziert. 72 h nach Transduktion wurden die HUVEC mittels Trypsin-EDTA (Gibco) abgelöst, zentrifugiert (500xg, 5 min, Raumtemperatur) und in 1x PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine fraktionierte Zelllyse mit Hilfe des *NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents Kit* (Thermo Scientific). Hierbei konnten zytoplasmatische Zellbestandteile gemeinsam mit Membranbestandteilen von nukleären Bestandteilen getrennt werden. Die Prozedur sah dabei zunächst eine Aufnahme des gewaschenen Zellpellets in 100 µl CER I (*Cytoplasmic Extraction Reagent I*), supplementiert mit Protease- und Phosphatase-Inhibitorcocktail (ThermoFisher Scientific), vor. Das weitere Vorgehen folgte den Herstellerangaben, so dass die HUVEC zunächst vollständig resuspendiert und anschließend für 10 min auf Eis inkubiert wurden. Anschließend wurden für die Ruptur der Zellmembran 5,5 µl CER II (*Cytoplasmic Extraction Reagent II*) zugesetzt, gemischt und für 1 min auf Eis inkubiert. Die Abtrennung der Zellkerne erfolgte nach erneutem Vortexen und Zentrifugation für 5 min bei 4°C und 16.000xg (Zentrifuge 5417R, Eppendorf). Die Proteinfractionen des Zytoplasmas und der Zellmembran wurden in ein neues 1,5 ml Reagiergefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

Für die Co-Immunpräzipitation potenzieller Rho-Interaktionspartner wurden die entsprechenden Rho-Varianten über den fusionierten, dreifachen HA-Tag gezielt mit Hilfe eines HA-Antikörpers (monoklonaler anti-HA Antikörper aus der Maus, Sigma-Aldrich) aus dem zytoplasmatischen Zellextrakt (mit Membrananteilen) gefischt. Als Kontrolle diente die Expression des alleinigen dreifachen HA-Tags in HUVEC. Für die Co-Immunpräzipitation

wurden zunächst 3 µg Antikörper an 0,9 mg Protein G-gekoppelte, magnetische Partikel (Dynabeads® Protein G, life technologies) für 2 h bei Raumtemperatur immobilisiert. Anschließend wurde die Antikörperlösung entfernt, in dem das 1,5 ml Reagiergefäß im entsprechenden Magneten (DynaMag™-2, life technologies) positioniert und die magnetischen Partikel an der Gefäßwand fokussiert wurden. Nach gleichem Vorgehen wurden die Antikörper gekoppelten Partikel entsprechend der Herstellerangaben gewaschen und danach mit dem zytoplasmatischen HUVEC-Extrakt über Nacht bei 4°C im Überkopfschüttler (RS-RR 5, Phoenix Instrument) inkubiert. Das Waschen der nun Antigen beladenen, magnetischen Partikel erfolgte nach Herstellervorgaben, gefolgt von der Elution mit Hilfe von 20 µl des Kit eigenen Elutionspuffers. Die Proteinkonzentration im Eluat wurde mittels NanoVue™ Plus Spectrophotometers (GE Healthcare) bestimmt.

Proteinmengen von 1,5 – 3 µg in den einzelnen Eluaten wurden anschließend zur Identifikation von Rho-Interaktionspartnern massenspektrometrisch untersucht. Dazu wurden die Eluate durch die Mitarbeiter der *Core Facility – Proteomic Mass Spectrometry* an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter der Leitung von Dr. Matthew Fuszard weiter prozessiert und analysiert. Sie nutzten dabei die SP3-Methode (*Single-Pot Solid-Phase-Enhanced Sample Preparation*) nach einem Protokoll von Sielaff *et al.* [192]. Hierbei wurden die Proteine an speziellen, carboxylierten, magnetischen Partikeln gebunden, gereinigt und enzymatisch in Peptide aufgespalten. Diese Peptide konnten anschließend massenspektrometrisch identifiziert werden. Die Ergebnisse wurden mit der frei verfügbaren Scaffold 4 Proteomics Software ausgewertet.

2.15. RNA-Sequenzierung und differentielle Genexpressionsanalysen

Die Untersuchung differentiell exprimierter Gene in Folge einer Überexpression von konstitutiv aktivem (Q63L) oder dominant negativem (T19N) RhoA, RhoB oder RhoC erfolgte im Vergleich zu Kontroll-transduzierten HUVEC. Dazu wurde die Gesamt-RNA mittels TRIZOL™ - Reagenz (ThermoFisher Scientific) gemäß den Herstellerangaben isoliert. RNA-Integrität und Größenverteilung wurden mit einem Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) und durch Agarose-Gelelektrophorese getestet. Für die Bibliothekspräparation diente 1 µg RNA pro Probe als Ausgangsmaterial. RNA-seq-Bibliotheken wurden mit dem NEBNext® Ultra™ RNA Library Prep Kit für Illumina® (New England BioLabs) gemäß den Empfehlungen des Herstellers generiert und vom Novogene Bioinformatics Institute (Beijing, China) als 150-bp *Paired-End Reads* auf einer Illumina Novaseq 6000 Plattform sequenziert. Die Qualität der Roh-*Reads* wurde zunächst mit Novogene eigenen Skripten

bewertet. Saubere Reads wurden in den weiteren Schritten verwendet, nachdem schlechte Qualität, Adapter und Poly-N aus den Rohdaten entfernt wurden. Die *Reads* wurden mit HiSat2 (v2.0.5) [193] an das menschliche Genom (GRCh38) *aligned*. Ensembl (GRCh38.p13) wurde für die Annotationen verwendet [194]. Die den einzelnen Genen zugeordneten *Read*-Zahlen wurden mit HTSeq (v0.6.1) [195] bestimmt und anschließend wurden die Fragmente pro Kilobase des Transkripts pro Million zugeordneter *Reads* (FPKM) jedes Gens auf der Grundlage der Genlänge und der dem jeweiligen Gen zugeordneten *Read*-Zahlen berechnet. Die differentielle Genexpressionsanalyse wurde mit dem DESeq2-Softwarepaket (v1.20.0) [196] durchgeführt. Die resultierenden P-Werte wurden mit dem Benjamini- und Hochberg-Ansatz angepasst, um die Falschentdeckungsrate (FDR) zu kontrollieren. Gene mit einem adjustierten $P < 0,05$ wurden als differenziell exprimiert klassifiziert. *Gene Ontology* (GO)-*Pathway*-Anreicherungsanalysen wurden mit dem GOseq R-Softwarepaket (v1.34.1) [197] durchgeführt. GO-Terme mit einem adjustierten $P < 0,05$ wurden als signifikant angereichert betrachtet. Hierarchisches *Clustering* von differenziell exprimierten Genen wurde mit FPKM-Werten als Eingabe im *Heatmap*-Paket durch *Clustering* von Zeilen und Spalten in R durchgeführt. Validierungen der Ergebnisse erfolgten mittels *Real-Time* PCR entsprechend der Vorgehensweise im Abschnitt „RNA-Isolation und *Real-Time* PCR“.

2.16. Western Blot

Für den Nachweis überexprimierter und endogener Proteinlevel wurden HUVEC, HCAEC und HEK-293T Zellen mit einem Zelllysepuffer (20 mM Tris/HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton, 2,5 mM Natriumpyrophosphate, 1 mM b-Glycerophosphat, 1 mM Na₃VO₄, 1 µg/ml Leupeptin, Cell Signaling Technology) entsprechend der Herstellerangaben lysiert. Hierzu wurde dem Lysepuffer zur Vermeidung von Proteindegradation ein Protease- und Phosphatase-Inhibitorcocktail (ThermoFisher Scientific) zugesetzt. Zur Abtrennung von Zellbruchstücken wurde das Zelllysate anschließend für 5 min bei 4°C und 15.000xg (Zentrifuge 5417R, Eppendorf) zentrifugiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte mit einer Methode nach Bradford (Roti® Quant, Carl Roth) entsprechend der Herstellerangaben. Gewünschte Proteinmengen wurden in einem 4x Harnstoffpuffer (200 mM Tris (pH 6,8), 5% (w/v) SDS, 0,1 mM EDTA, 8 M Harnstoff, 0,1 % (v/v) Bromphenolblau, 20 % (v/v) β-Mercaptoethanol) aufgenommen und für 10 min bei 37°C (Thermoschüttler TS-100C, biosan) denaturiert. Mit Hilfe eines 10%igen, denaturierenden SDS-Polyacrylamidgels wurden je 20 µg Gesamtprotein elektrophoretisch für 30 min bei 80 V und 60 min bei 100 V in einem Laufpuffer (25 mM Tris, 19,2 mM

Glycin, 0,01% SDS) mittels Mini-Protean® Systems (BIO-RAD) aufgetrennt. Der Transfer auf Nitrozellulosemembran (Sartorius Stedim Biotech) erfolgte in einem sogenannten *Wet/Tank*-Blotverfahren (BIO-RAD) in Blotpuffer (25 mM Tris, 19,2 mM Glycin, 20% Methanol) für 60 min bei 350 mA. Nach dem Transfer erfolgte das Absättigen unspezifischer Antikörperbindungsstellen in 5% Magermilchlösung (Carl Roth, 5% Magermilchpulver in 1x TBS + 0,1% Tween-20) für 1 h bei Raumtemperatur auf einem Laborschüttler (RS-RS 5, Phoenix Instrument). Die Inkubation der Nitrozellulosemembranen mit den entsprechenden primären Antikörpern (Tabelle 6) erfolgte über Nacht bei 4°C auf einem Laborschüttler. Am folgenden Tag wurden die Membranen zunächst 2-mal für je 10 min mit 1x TBS-T (1x TBS + 0,1% Tween-20) gewaschen und im Anschluss für 90 min bei Raumtemperatur mit den entsprechenden Meerrettichperoxidase-gekoppelten sekundären Antikörpern in 2,5% Magermilch unter schütteln inkubiert (Tabelle 7). Abschließend wurde erneut 2-mal mit 1x TBS-T für 20 min gewaschen und die Detektion des Antigens vorgenommen. Die Antigen gebundenen Antikörper wurden mit einer Mischung aus ECL 1 (100 mM Tris (pH 8,5), 25 mM Luminol, 9 mM Coumarinsäure) und ECL 2 (100 mM Tris (pH 8,5), 0,64 µl/ml 30% H₂O₂) mittels Chemi Doc™ Imaging Systems (BIO-RAD) detektiert.

Tabelle 6: Übersicht aller verwendeten primären Antikörper.

Antikörper	Verdünnung	Verwendung	Hersteller
<i>Rabbit anti-RhoA</i>	1:1.000 in 5% BSA/TBS-T	Western Blot	Cell Signaling Technology, Inc.
<i>Rabbit anti-RhoB</i>	1:1.000 in 5% BSA/TBS-T	Western Blot	Cell Signaling Technology, Inc.
<i>Rabbit anti-RhoC</i>	1:1.000 in 5% BSA/TBS-T	Western Blot	Cell Signaling Technology, Inc.
<i>Rabbit anti-HA Tag</i>	1:1.000 in 5% BSA/TBS-T	Western Blot	Cell Signaling Technology, Inc.
<i>Mouse anti-β-Aktin</i>	1:5.000 in 5% Milch/TBS-T	Western Blot	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
<i>Rabbit anti-GFP</i>	1:1.000 in 5% BSA/TBS-T	Western Blot	Cell Signaling Technology, Inc.
<i>Rabbit anti-Caspase 14</i>	1:1.000 in 5% BSA/TBS-T	Western Blot	Cell Signaling Technology, Inc.
<i>Rabbit anti-Rap1A/Rap1B</i>	1:1.000 in 5% BSA/TBS-T	Western Blot	Cell Signaling Technology, Inc.
<i>Rabbit anti-IQGAP1</i>	1:1.000 in 5% BSA/TBS-T	Western Blot	Cell Signaling Technology, Inc.
<i>Mouse anti-HA Tag</i>	1:1.000 in <i>Signal Stain Ab Diluent</i> 3 µg in <i>Binding buffer</i>	Immunfärbung Co-IP	Sigma-Aldrich
<i>Mouse anti-Ki-67</i>	1:400 in <i>Signal Stain Ab Diluent</i>	Immunfärbung	Cell Signaling Technology, Inc.
<i>Rabbit anti-Paxillin [E228]</i>	1:100 in <i>Signal Stain Ab Diluent</i>	Immunfärbung	Abcam
<i>Rabbit anti Hämoglobin (Untereinheit α, murin) [EPR3608]</i>	1:250 in <i>Signal Stain Ab Diluent</i>	Immunfärbung	Abcam
<i>Ulex europaeus Agglutinin I</i>	1:150 in <i>Signal Stain Ab Diluent</i>	Immunfärbung	Vector Laboratories

Tabelle 7: Übersicht aller verwendeten sekundären Antikörper.

Antikörper	Verdünnung	Verwendung	Hersteller
<i>Goat anti-Mouse HRP</i>	1:5.000 in 2,5% Milch/TBS-T	Western Blot	Dianova
<i>Goat anti-Rabbit HRP</i>	1:5.000 in 2,5% Milch/TBS-T	Western Blot	Dianova
<i>Goat anti-Mouse Alexa Fluor®594</i>	1:1.000 in <i>Signal Stain Ab Diluent</i>	Immunfärbung	Dianova
<i>Goat anti-Rabbit Alexa Fluor®594</i>	1:1.000 in <i>Signal Stain Ab Diluent</i>	Immunfärbung	Dianova

2.17. RNA-Isolation und *Real-Time* PCR

Die Isolation der Gesamtzell-RNA erfolgte mittels Phenol/Chloroform-Extraktion. Hierfür wurden die Zellen zunächst, wie beschrieben im gewünschten Format kultiviert und transduziert. 72 h nach Transduktion wurden die HUVEC mit einer TRIZOL-Lösung (38% Phenol, 0,8 M Guanidinthiocyanat, 0,4 M Ammoniumthiocyanat, 0,1 M Natriumacetat, 5% Glycerol) überschichtet und homogenisiert. Um eine vollständige Zellyse und die Dissoziation des Nukleoproteinkomplexes zu ermöglichen, wurde für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lösung in ein 1,5 ml Reagiergefäß (Sarstedt) überführt und mit 0,2 ml Chloroform/1 ml TRIZOL versetzt. Im Folgenden wurde für 15 s gemischt, für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und zur Phasentrennung für 15 min bei 4°C und 12.000xg zentrifugiert (Zentrifuge 5417R, Eppendorf). Die wässrige Phase wurde in ein neues 1,5 ml Reagiergefäß überführt und mit 0,5 ml/1 ml TRIZOL 100% Isopropanol (Th.GEYER) versetzt, gevortext und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurde die präzipitierte RNA durch Zentrifugation für 30 min bei 12.000xg und 4°C pelletiert. Co-präzipitierte Salze wurden durch 2-maliges Waschen mit 75% Ethanol und anschließender Zentrifugation (12.000xg, 10 min, 4°C) entfernt. Das erhaltene Pellet wurde anschließend bei Raumtemperatur getrocknet und schließlich in 10 – 15 µl DEPC behandeltem Wasser resuspendiert. Die Bestimmung der RNA-Reinheit (Quotient der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm) und die Quantifizierung (Absorption bei 260 nm) erfolgten durch die Messung der Absorptionen bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm mittels Nano Quant™ Platte (Tecan) im Plattenlesegerät Tecan Infinite F200pro (Tecan). Die Berechnung erfolgte mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes.

Formel 3: Lambert-Beer'sches Gesetz.

$$E = c * d * e$$

Hierbei ist E die Extinktion bei einer definierten Wellenlänge, c ist die Konzentration der absorbierenden Substanz in der Flüssigkeit (in mol/l), d ist die Schichtdicke des durchstrahlten Körpers (in cm) und e der spezifische Extinktionskoeffizient (in l/mol*cm).

Die RNA-Konzentration berechnet sich dann nach der Formel.

Formel 4: Berechnung RNA-Konzentration.

$$c [\mu\text{g/ml}] = E_{260 \text{ nm}} * \text{Verdünnungsfaktor} * 40 \mu\text{g/ml}$$

wobei E die optische Dichte bei 260 nm, c die RNA-Konzentration in µg/ml und der spezifische Extinktionskoeffizient für einzelsträngige RNA 40 µg/ml ist.

Vor der Durchführung einer quantitativen *Real-Time* PCR musste die isolierte RNA in cDNA mittels reverser Transkription umgeschrieben werden. Dies erfolgte mit dem *FastGene*

Scriptase Basic cDNA-Synthese-Kit (Nippon). Für die cDNA-Synthese wurden zunächst 1 µg RNA und hexamer Primer (100 µM) entsprechend der Herstellerangaben gemischt und anschließend für 5 min bei 42°C und 10 min bei 25°C im T100™ Thermal Cycler (BIO-RAD) inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 10x *FastGene Scriptase Basic* Puffer, *FastGene Scriptase Basic* (200U/µl, reverse Transkriptase), einem dNTP-Mix und RNase-Inhibitor nach Herstellervorgaben. Der Gesamtansatz wurde mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 20 µl gebracht. Die reverse Transkription erfolgte bei 42°C für 60 min mit abschließender Inaktivierung der Transkriptase bei 90°C für 5 min im T100™ Thermal Cycler (BIO-RAD).

Die Quantifizierung der mRNA-Expression erfolgte mittels *7500 Real-Time PCR Systems* (Applied Biosystems). Es wurden in *96-Well-PCR-Platten* (Sarstedt) 100 ng cDNA mit TaqMan™ Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) und den entsprechenden TaqMan Assays gemischt (Tabelle 8). Die Amplifikation folgte einem PCR-Programm mit einem initialen Schritt bei 50°C für 2 min, einer Einzelstranglinearisierung der cDNA bei 95°C für 10 min und anschließenden 40 Zyklen mit einem Wechsel aus 15 s Denaturierung bei 95°C und Hybridisierung und Synthese für 1 min bei 60°C. Die Auswertung erfolgte über eine relative Quantifizierung durch Berechnung der ΔC_T - und $\Delta\Delta C_T$ -Werte [198].

Tabelle 8: Übersicht aller verwendeten TaqMan Assays.

Genname	Herstellernummer	Farbstoff	Beschreibung
CIT	Hs 00294611_m1	FAM	Citron Rho-interagierende Kinase
DIAPH1	Hs 00946556_m1	FAM	Diaphanous Homolog 1
RHPN1	Hs 00379557_m1	FAM	Rhophilin-1
RHPN2	Hs 00369111_m1	FAM	Rhophilin-2
AQP1	Hs01028916_m1	FAM	Aquaporin-1
ITGB4	Hs00236216_m1	FAM	Integrin beta 4 (CD104)
CXCL8	Hs00174103_m1	FAM	Interleukin-8
HDAC9	Hs01081558_m1	FAM	Histondeacetylase 9
NOS3	Hs01574659_m1	FAM	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
KDR	Hs00911700_m1	FAM	VEGF-Rezeptor (<i>Kinase Insert Domain Receptor (a Type III Receptor Tyrosine Kinase)</i>)
TP-Rezeptor	Hs00169054_m1	FAM	Thromboxan A2-Rezeptor
GFP	AJT96DY	VIC	Grün fluoreszierendes Protein
Hprt I	Hs02800695_m1	VIC	Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase 1 <i>Housekeeping Gen</i>

2.18. Transformation von *Escherichia coli* und Plasmid-Präparation

Das Einbringen von Plasmid-DNA in *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterien war essenziell um die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmide amplifizieren und für die Herstellung lentiviraler Partikel, beziehungsweise für die Transfektion von HUVEC einsetzen zu können. Um Plasmid-DNA in *E. coli* einbringen zu können, mussten zunächst kompetente Bakterien erzeugt werden. Hierfür wurde eine Übernachtskultur von *E. coli Top 10* in 3 ml LB-Medium (0,5% Hefeextrakt, 1% Trypton, 1% NaCl in destilliertem Wasser) bei 37°C unter Schütteln angesetzt. Diese Vorkultur wurde danach in 200 ml vorgewärmten LB-Medium überführt und bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm von 0,5 bis 0,7 bei 37°C unter Schütteln kultiviert. Anschließend erfolgte ein Abkühlen der Bakteriensuspension für 10 min auf Eis und das Pellettieren der *E. coli* bei 4.000 rpm, 4°C für 10 min (Zentrifuge Z383K, Hermle). Das Bakterienpellet wurde dann in 10 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert, für 5 min auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert (4.000 rpm, 4°C, 10 min). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 2 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung gelöst und mit 225 µl 88% Glycerol versetzt. Abschließend wurden die kompetenten *E. coli* aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Für die Transformation der kompetenten Bakterien wurden 300 ng der gewünschten Plasmid-DNA mit 50 µl kompetenten *E. coli* gemischt und zunächst für 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurde zur DNA-Aufnahme ein Hitzeschock für 2 min bei 42°C (Thermoschüttler TS-100C, biosan) gesetzt und anschließend für 2 min auf Eis gekühlt. Dem Ansatz wurden 800 µl LB-Medium zugesetzt und für 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. 20 µl der *E. coli* Suspension wurden auf eine LB-Agarplatte (0,5% Hefeextrakt, 1% Trypton, 1% NaCl, 1,5% Agar-Agar in destilliertem Wasser) gegeben, welcher das entsprechende Resistenzantibiotikum zugesetzt wurde, und mittels sterilem Drigalskispatel ausgestrichen. Die LB-Agarplatte wurde dann über Nacht bei 37°C bebrütet. Am folgenden Tag konnte eine Bakterienkolonie isoliert und in 4 ml Antibiotikum supplementiertem LB-Medium kultiviert werden. In Vorbereitung einer Plasmidpräparation mit dem endotoxinfreien Plasmid Maxi Kit (Qiagen) wurde die 4 ml Vorkultur über Nacht in 120 ml LB-Medium, versetzt mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum, überführt und bei 37°C unter schütteln kultiviert. Die Plasmidisolierung erfolgte entsprechend der Herstellerangaben mit Hilfe des *EndoFree Plasmid Maxi Kits* (Qiagen). Das gewonnene DNA-Pellet wurde in 150 µl TE-Puffer (Qiagen) gelöst und die DNA-Konzentration mittels Nano Quant™ Platte (Tecan) im Plattenlesegerät Tecan Infinite F200pro (Tecan) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt (Formel 3).

2.19. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mittels Einweg-Varianzanalyse (*One-Way Analysis of Variance*) mit nachfolgendem Bonferroni-Test bei multipler Testung bzw. für ungepaarte Stichproben mittels t-Test. Für die statistische Auswertung wurde die Software Graph Pad Prism 6 (Graph Pad Software, Inc.) genutzt. Alle Graphen stellen den Mittelwert \pm Standardabweichung dar. Das Signifikanzniveau betrug $\alpha = 0,05$.

3. Ergebnisse

Die RhoGTPasen (**Ras-homologe** GTPasen) stellen mit ihren 5 Unterfamilien Rho, Rac, Rnd, Cdc42 und RhoBTB einen erheblichen Anteil an zellulären Regulatoren bei der intrazellulären Signaltransduktion dar. Diese kleinen GTPasen vermitteln maßgeblich die Weiterleitung von Signalen ausgehend von membranständigen Rezeptoren, die extrazelluläre Stimuli aufnehmen, hin zu Effektoren im Zellinneren. Somit spielen diese kleinen GTPasen eine entscheidende Rolle bei verschiedensten Zellfunktionen.

Eine der am besten untersuchten RhoGTPase-Familien ist die Rho-Unterfamilie mit ihren Vertretern RhoA, RhoB und RhoC. Diese 3 GTPasen weisen mit rund 87% eine sehr hohe Aminosäuresequenzübereinstimmung auf [95], unterscheiden sich jedoch in ihrer zellulären Funktion und Lokalisation. RhoB findet sich hauptsächlich in späten Endosomen und Lysosomen [46] und hat einen Einfluss auf Zellproliferation, DNA-Reparatur, Apoptose und den Membranvesikeltransport. RhoA und RhoC sind dagegen überwiegend zytoplasmatisch und membranständig lokalisiert [46]. Dabei ist RhoA vor allem über seine Bedeutung für die Aktinorganisation und die Zellkontraktilität charakterisiert. Für RhoC dagegen war bislang kein Einfluss auf die Zellbewegung beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Rolle der drei RhoGTPasen RhoA, RhoB und RhoC und ihr Einfluss auf die Funktion humaner Endothelzellen aus der Nabelschnur (HUVEC) und aus humanen Koronararterien (HCAEC) unter Verwendung konstitutiv aktiver (G14V und Q63L), dominant negativer (T19N) und Wildtyp (WT)-Varianten untersucht, um die teils kontroverse Rolle der RhoGTPasen im Prozess der endothelialen Homöostase und Angiogenese aufzuklären. Die Ergebnisse werden im Folgenden dargestellt.

3.1. Aktivität der verwendeten Rho-Varianten

Die Aktivität und damit einhergehend die Unterscheidung zwischen GTP- und GDP-Bindung der genutzten Rho-Varianten (konstitutiv aktiv, dominant negativ und Wildtyp) wurde mittels immobilisiertem Rhotekins analysiert (Abbildung 13). Genauer bindet die Rho-Bindedomäne (RBD) des Rho-Effektors Rhotekin dabei insbesondere an aktive, GTP-gebundene Rho-Varianten, die aus HUVEC-Lysaten überexprimierender HUVEC isoliert werden konnten. Dazu wurden gleiche Gesamtproteinmengen der verschiedenen Überexpressionen eingesetzt ((Abbildung 13), totales Rho und Aktin). Die nach dem *Pulldown* der RBD-gekoppelten Sepharosepartikel gewonnenen Rho-Proteine konnten über den fusionierten, N-terminalen *Ha-Tag* im Western Blot detektiert werden.

Die konstitutiv aktiven Rho-Varianten G14V und Q63L, welche durch den Aminosäureaustausch im katalytischen Zentrum eine stark gehemmte GTP-Hydrolysefähigkeit aufweisen und sich damit nahezu dauerhaft im GTP-gebundenen Zustand befinden, zeigten nach Überexpression die erwartete Bindung an die immobilisierte Rho-Bindedomäne. Hierbei ist jedoch auffällig, dass die Q63L-Varianten von RhoA, RhoB und RhoC eine deutlich höhere Affinität zu den *Beads* mit der Rho-Bindedomäne des Rhotekins aufwiesen als die G14V-Varianten (Abbildung 13, aktives Rho). Die erhöhte Aktivität, gleichbedeutend mit verstärkter GTP-Bindung und daraus resultierender Rhotekin-Interaktion, der Q63L-Mutation im Vergleich zur G14V-Variante konnte bereits von Longenecker *et al.* gezeigt werden [53] und findet sich auch bei den in der vorliegenden Arbeit genutzten aktiven Rho-Konstrukten wieder. Neben den konstitutiv aktiven Varianten wiesen auch die jeweiligen Wildtyp-Proteine eine starke Bindung an die Rho-Bindedomäne auf (Abbildung 13, aktives Rho). Dies zeigt, dass in den überexprimierten Wildtyp-Formen der untersuchten RhoGTPasen das Gleichgewicht zwischen GDP- und GTP-gebundener GTPase auf der Seite der GTP-gebundenen und damit aktiven Form liegt und die Erhöhung des Expressionsgrads der jeweiligen Wildtyp-Variante auch die Menge des aktiven Rho-Proteins erhöht. Aufgrund der höheren, intrazellulären GTP-Konzentrationen im Vergleich zu den GDP-Konzentrationen und der höheren Affinität zu GTP [53], erscheint dieser Befund plausibel. Eine Bindung der dominant negativen, also dauerhaft GDP-gebundenen T19N-Varianten zeigte nur ein schwaches Interaktionssignal (Abbildung 13, aktives Rho). Die Rho-Bindedomäne präferiert die GTP-gebundene Konformation der Rho-Proteine und bindet nur bei einem Überangebot an GDP-gebundenen Proteinen mit diesen. Durch die Überexpression der inaktiven T19N-Varianten in HUVEC lagen diese Varianten im Vergleich zu bindungsfähigen, endogenen Rho-Proteinen in den Zelllysaten in einem deutlichen Überschuss vor und wurden dadurch in geringerem Maße präzipitiert. Das Fehlen eines HA-Antikörper Signals in den Kontroll-transduzierten Zellen zeigte die Spezifität des genutzten anti-HA-Antikörpers (Abbildung 13, totales Rho und aktives Rho).

Das totale Rho-Signal verdeutlicht die Überexpression der einzelnen Rho-Varianten in HUVEC bei einer MOI von 500.

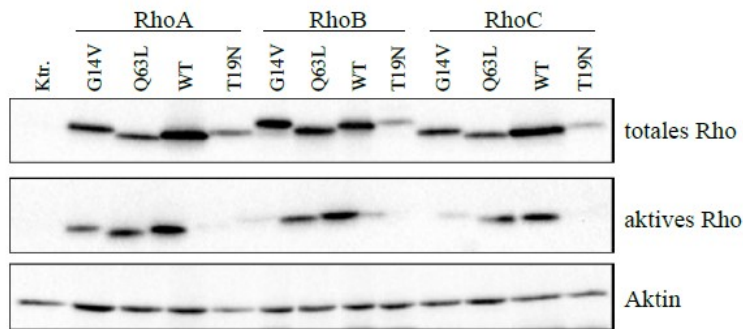


Abbildung 13: Western Blot-Analyse zur Abschätzung der Rho-Aktivität. HUVEC-Lysate zur Expressionskontrolle (totales Rho) der verschiedenen Rho-Varianten (G14V und Q63L konstitutiv aktiv; T19N dominant negativ; WT Wildtyp) und von Kontroll-transduzierten Zellen (Ktr.). Der Aktin-Nachweis (Aktin) dient zur Kontrolle vergleichbarer Proteinmengen für die Rho-Überexpression. Mit dem Rhotekin-Agarose *Bead Pulldown* von GTP-gebundenen, aktiven Rho-Proteinen (aktives Rho) konnten die aktiven Varianten der RhoGTPasen RhoA, RhoB und RhoC identifiziert werden. Die Detektion der überexprimierten Rho-Varianten und der durch den *Pulldown* isolierten Rho-Proteine erfolgte über den fusionierten HA-Tag an den Rho-Varianten unter Verwendung eines HA-Antikörpers.

3.2. RhoA-Stimulationsversuche mit Thrombin und VEGF

VEGF, als ein zentraler Wachstumsfaktor von Endothelzellen und auch in der vorliegenden Arbeit verwendeter Stimulator der angiogenetischen Eigenschaften humaner Endothelzellen, wurde in der Literatur immer wieder als möglicher RhoA-Aktivator beschrieben [199, 200], wobei andere Gruppen diese Befunde nicht bestätigen konnten [185]. Um diesen kontrovers diskutierten Befund zu klären, wurde ein validiertes FRET-RhoA-Biosensor-System verwendet, um die Aktivierung von RhoA in humanen Endothelzellen nach Stimulation mit VEGF zu untersuchen. Als Indikator für eine erfolgreiche Stimulation des RhoA-Biosensors wurden HUVEC mit dem etablierten RhoA-Aktivator Thrombin [201] inkubiert und der FRET-Index bestimmt (Abbildung 14). Dabei konnte 3 min nach Zugabe von 1 U/ml Thrombin bereits ein schneller Anstieg des FRET-Index, gleichbedeutend mit einem gesteigerten FRET bzw. einer Aktivierung des RhoA-Biosensors, beobachtet werden. Diese Aktivierung klang anschließend gleichmäßig ab, bis nach ca. 12 min keine veränderte RhoA-Aktivität der stimulierten HUVEC im Vergleich zu HUVEC, die Lösungsmittel-behandelt wurden (Kontrolle), detektiert werden konnte (Abbildung 14B - C). Ein stimulatorischer Effekt des VEGF konnte in diesem Ansatz nicht beobachtet werden (Abbildung 14B - C), auch eine Langzeit-Stimulation humaner Endothelzellen mit VEGF führte nicht zur Veränerung der RhoA-Aktivität (Abbildung 14D). Eine Hemmung der RhoA-Aktivität durch den Rho-Inhibitor C3 Transferase aus *Clostridium botulinum* [202, 203] konnte hingegen beobachtet werden und bestätigte neben den vorgenannten Thrombin-Versuchen die grundsätzliche Eignung des verwendeten RhoA-Biosensor-Systems für die Detektion von Stimuli mit positiver und negativer Auswirkung auf die RhoA-Aktivität (Abbildung 14E).

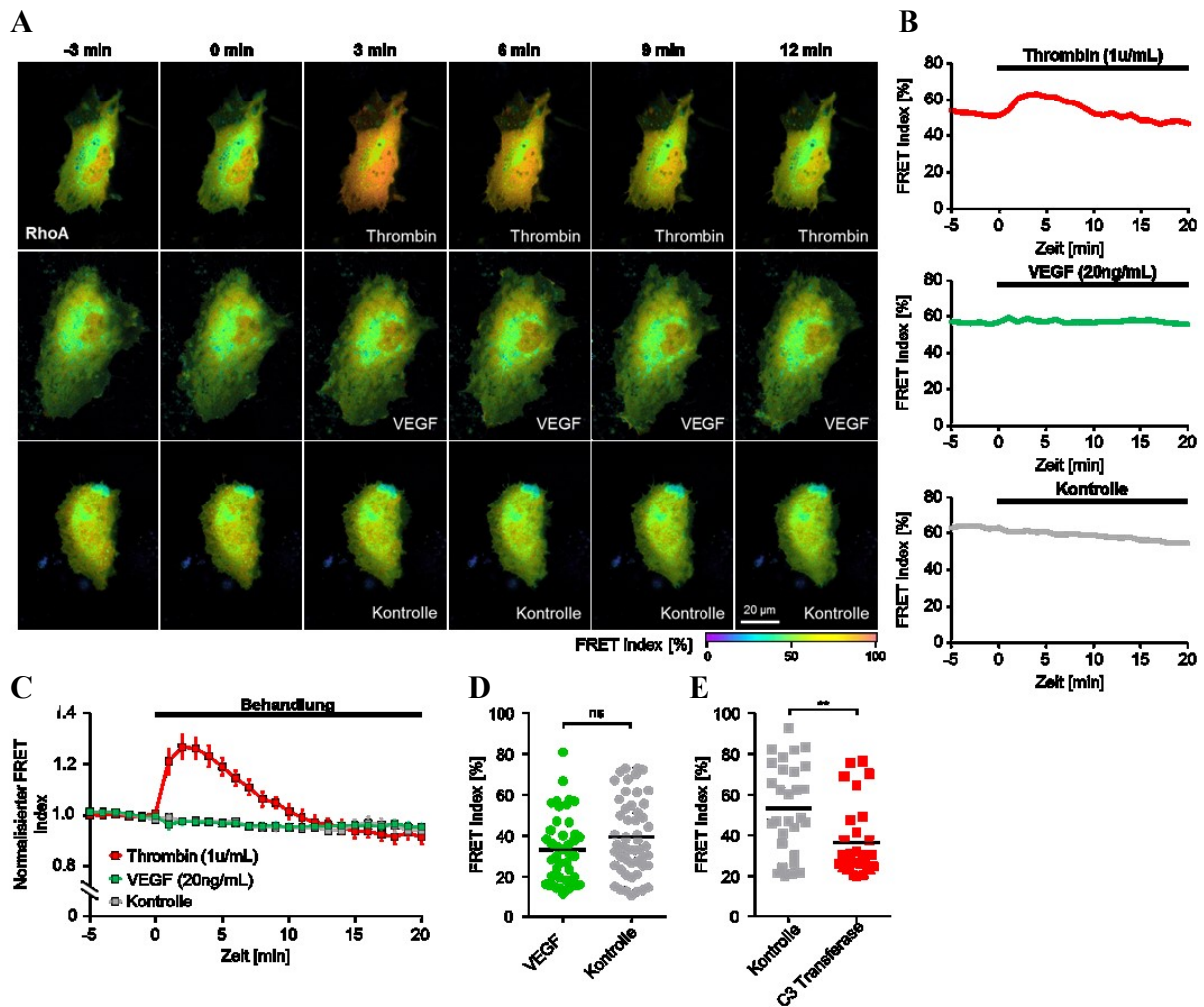


Abbildung 14: FRET-basierte Stimulationsanalysen eines RhoA-Biosensors mit VEGF und Thrombin. Repräsentative Abbildungen von HUVEC, transfiziert mit einem RhoA-Biosensor, im zeitlichen Verlauf vor einer (-3min - 0 min) und nach einer Thrombin- (1 U/ml) bzw. VEGF-Stimulation (20 ng/ml) und entsprechend Kontroll-stimulierten Zellen. Der farbcodierte FRET-Index, wobei rot eine hohe FRET-Effizienz und violett eine geringe FRET-Effizienz repräsentiert, verdeutlicht den dynamischen Wechsel der RhoA-Aktivität nach Thrombin-Zugabe. Maßstabsbalken = 20 μ m (A). Auftragung des FRET-Index aus (A) im zeitlichen Verlauf nach Thrombin-, VEGF- bzw. Lösungsmittelzugabe (B). Durchschnittlicher, normalisierter FRET-Index nach Zugabe von Thrombin (n=9), VEGF (n=12) und Lösungsmittel (Kontrolle, n=6) (C). Langzeitstimulation von HUVEC, transfiziert mit einem RhoA-Biosensor, mit VEGF bzw. entsprechendem Lösungsmittel (Kontrolle) für 18 h. n = 43 - 52 (D). Langzeitinkubation von HUVEC, transfiziert mit einem RhoA-Biosensor, mit dem RhoA-Inhibitor C3 Transferase aus *Clostridium botulinum* bzw. entsprechendem Lösungsmittel (Kontrolle) für 18 h. n = 29 - 30 (E). ns = nicht signifikant, ** = P<0,01.

3.3. Einfluss der RhoGTPasen auf die Morphologie und fokalen Adhäsionen von HUVEC

Einflüsse der RhoGTPasen auf die Morphologie und Aktinarchitektur von verschiedenen Zellypen sind beschrieben worden [2, 21, 43], weshalb im Speziellen in der vorliegenden Arbeit die Auswirkungen der verschiedenen Varianten von RhoA, RhoB und RhoC auf die Endothelzell-Morphologie untersucht wurde. Dabei lag der Fokus vor allem auf der Bildung

von kompakten Aktinfilamentbündeln, so genannten Stressfasern (Abbildung 15). Sie geben Zellen in Kombination mit fokalen Adhäsionen eine gewisse Steifigkeit und vermitteln über Aktinbindende-Proteine wie Myosin Zellkontraktilität [204, 205]. In migrierenden und mitotischen Zellen werden Stressfasern dynamisch auf- und abgebaut.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Visualisierung von filamentösem Aktin durch fluoreszenzmarkiertes Phalloidin. Als Expressionskontrolle für die verwendeten Rho-Varianten konnte das co-exprimierte EGFP genutzt werden. Kontroll-transduzierte HUVEC exprimieren nur das EGFP.

Für Kontroll-transduzierte HUVEC zeigte sich in der Aktinfärbung eine überwiegende Zellkortex-assoziierte Aktinlokalisierung (Abbildung 15A, Ktr.). Die zytoplasmatischen Zellbereiche wiesen nur eine geringe Anzahl von gebündelten Aktinfilamenten auf. Morphologisch konnte das typische „Kopfsteinpflaster“ Erscheinungsbild der HUVEC beobachtet werden. Unter Kontrollbedingungen zeigten sich nur wenige Zellen mit einer langgestreckten, spindelförmigen Morphologie.

Bei Betrachtung von HUVEC, die RhoA-Varianten überexprimieren, fiel der verstärkte Nachweis von Stressfasern unter Einfluss der aktiven Mutanten (G14V und Q63L) auf (Abbildung 15A). Diese gebündelten Aktinfilamente durchspannten die gesamte Zelle und erschienen in der typischen parallelen Anordnung. Weiterhin erschienen die Zellen gespannter, was sich in einer länglicheren Morphologie und in einem erhöhten Verhältnis aus Länge zu Breite äußerte (Abbildung 15B). Inaktives (T19N) und Wildtyp-RhoA erzeugten keine evidenten Stressfasern, obwohl auch das Wildtyp-Protein eine deutliche GTP-Bindung im Rhotekin-*Pulldown* zeigte. Auch erschienen diese Endothelzellen in ihrer Morphologie wie Kontrollzellen (Abbildung 15B).

Auch aktives RhoB bewirkte die Bildung von Aktinstressfasern, einhergehend mit einem spindelförmigen, länglich gespannten Zellphänotyp (Abbildung 15A, C). Desweiteren erschienen die Zellen etwas kleiner als Kontrollzellen und Zellen mit einer RhoA-Überexpression. Interessanterweise bewirkte auch das RhoB-Wildtyp-Protein eine starke Stressfaserbildung, allerdings ohne Auswirkung auf die Zellmorphologie. Inaktives RhoB wies die kortikale Aktinakkumulation auf, die auch für Kontrollzellen beobachtet werden konnte.

RhoC vermittelte mit seinen aktiven Varianten identische Effekte wie RhoA und RhoB (Abbildung 15A). Allerdings zeigten diese RhoC-überexprimierenden Endothelzellen eine schwächere Neigung, den beschriebenen spindelförmigen Phänotyp auszubilden (Abbildung 15D). Wie bereits für RhoA beschrieben, führten auch eine Überexpression der RhoC T19N-

Variante bzw. des RhoC-Wildtyp-Proteins zu keiner vermehrten Stressfaserformierung und induzierten keine veränderte Morphologie im Vergleich zu Kontroll-transduzierten Endothelzellen.

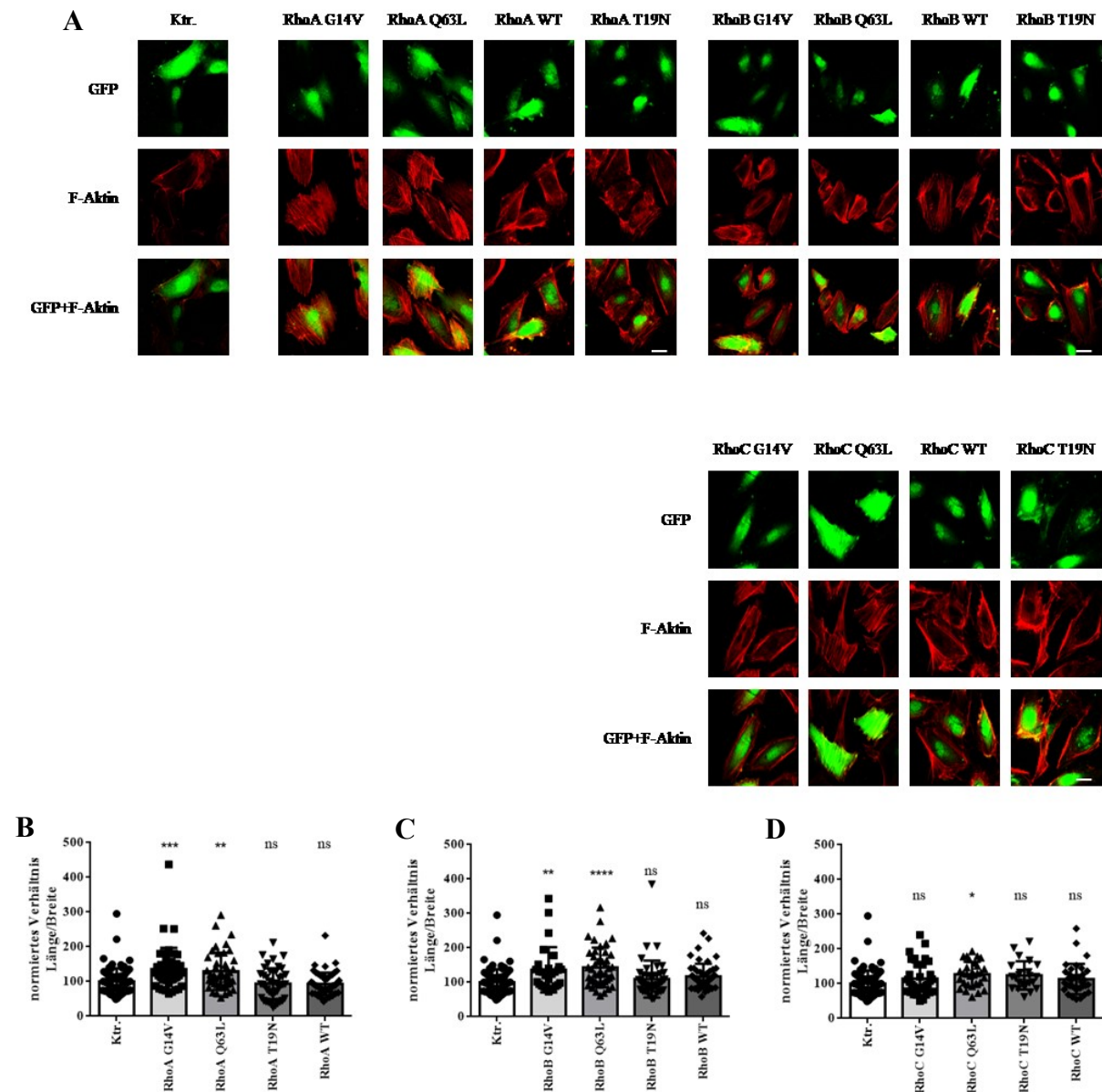


Abbildung 15: Stressfaserbildung und Morphologie von HUVEC unter Einfluss der Überexpression verschiedener Mutanten der RhoGTPasen RhoA, RhoB und RhoC. (A) Repräsentative, mikroskopische Aufnahmen fixierter Endothelzellen (HUVEC) auf Glasdeckgläsern bei denen die Expression der entsprechenden konstitutiv aktiven (G14V und Q63L), dominant negativen (T19N) und Wildtyp (WT)-Varianten von RhoA, RhoB und RhoC durch das co-exprimierte EGFP (GFP) detektiert werden konnte. Filamentöses Aktin (Aktin) wurde durch Fluoreszenz-markiertes Phalloidin visualisiert. Maßstabsbalken = 100 μ m. (B, C, D) Morphologische Analysen von HUVEC zur Bestimmung eines spindelförmig versteiften Phänotyps durch Berechnung des Länge-zu-Breite-Verhältnisses der Zellen für RhoA (B), RhoB (C) und RhoC (D). ns = nicht signifikant, * = $P < 0,05$ bis **** = $P < 0,0001$. n = 34 - 43.

Im Zusammenhang mit der Analyse der Aktin-Stressfaserbildung durch die untersuchten Rho-Varianten erfolgte zusätzlich die immunhistochemische Anfärbung von fokalen Adhäsionen

in Rho-überexprimierenden HUVEC (Abbildung 16). Fokale Adhäsionen sind essenziell für die Verankerung des Aktin-Zytoskeletts an die extrazelluläre Matrix und unterliegen bei migrierenden Zellen einem ständigen Auf- und Abbau, während sie bei sessilen Zellen stabil bleiben. Neben ihrer reinen Funktion in der Verankerung des Aktin-Zytoskeletts ist die Untersuchung der Fokalkontakte für die Charakterisierung der verschiedenen Rho-Aktivitätszustände interessant, da RhoGTPasen, insbesondere RhoA, regulierenden Einfluss auf deren Ausbildung haben [206, 207]. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Detektion fokaler Adhäsionen durch die immunhistochemische Anfärbung des Proteins Paxillin (Abbildung 16A), als eine zentrale Komponente der Fokalkontakte [208].

Hierbei zeigte sich, dass RhoA-, RhoB- und RhoC-Aktivität, im Vergleich zu kontrolltransduzierten Endothelzellen, zu einer signifikanten Zunahme der Paxillin-positiven Fläche in Bezug zur Gesamtzellfläche führte (Abbildung 16B - D). Lediglich für RhoA G14V konnte nur ein nicht-signifikanter Trend zur Erhöhung der Paxillin-positiven Fläche beobachtet werden. Zusätzlich verstärkten auch die Wildtyp-Proteine von RhoA und RhoB die Ausbildung fokaler Adhäsionen, während die Expression des RhoC-Wildtyp-Proteins und der dominant negativen Rho-Varianten keine Veränderung der Fokalkontaktfläche bewirkten. Interessanterweise verursachten eine Deregulation der Rho-Aktivität durch Expression konstitutiv aktiver und dominant negativer Rho-Varianten sowie die Expression der Wildtyp-Proteine von RhoA und RhoB grundsätzlich eine signifikante durchschnittliche Vergrößerung der einzelnen Paxillin-positiven Strukturen (Abbildung 16E - G). Dies verdeutlicht die Notwendigkeit einer fein ausgewogenen Rho-Aktivitäts-Regulierung für die Fokalkontakt-Dynamik.

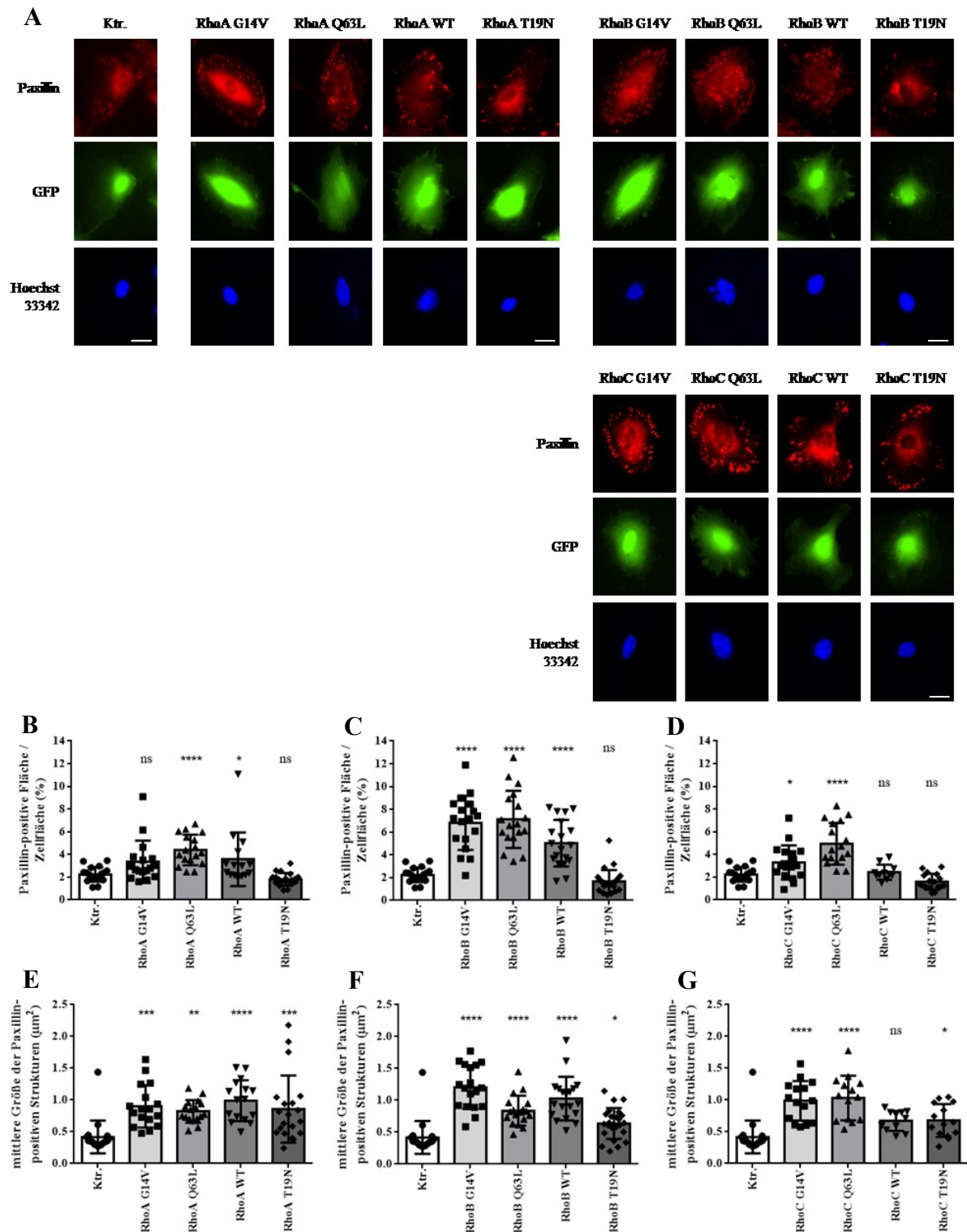


Abbildung 16: Ausbildung fokaler Adhäsionen in HUVEC unter dem Einfluss der Überexpression verschiedener Mutanten der RhoGTPasen RhoA, RhoB und RhoC. (A) Repräsentative mikroskopische Aufnahmen von HUVEC mit einer immunhistochemischen Färbung von Paxillin als Bestandteil fokaler Adhäsionen und einer Zellkernfärbung durch Hoechst 33342. Die Endothelzellen exprimierten konstitutiv aktive (G14V, Q63L), dominant negative (T19N) bzw. Wildtyp-Proteine (WT) von RhoA, RhoB oder RhoC. Eine erfolgreiche Expression ließ sich durch das co-exprimierte EGFP beobachten. Maßstabsbalken = 20 µm. **(B, C, D)** Quantifizierung der Paxillin-positiven Fläche bezogen auf die Gesamtzellfläche von HUVEC mit einer Expression der RhoA- **(B)**, RhoB- **(C)**, bzw. RhoC-Varianten **(D)**. **(E, F, G)** Bestimmung der mittleren Größe der Paxillin-positiven Strukturen in HUVEC mit einer Expression der RhoA- **(E)**, RhoB- **(F)**, bzw. RhoC-Varianten **(G)**. ns = nicht signifikant, * = $P < 0,05$ bis **** = $P < 0,0001$. n = 15 - 20.

3.4. Einfluss der RhoGTPasen auf die Proliferation von HUVEC

Die Auswirkungen der Überexpressionen von konstitutiv aktivem, dominant negativem und Wildtyp RhoA, RhoB und RhoC auf die Proliferationseigenschaften von humanen Endothelzellen wurde mittels Ki-67-Immunfärbung (Abbildung 17) und BrdU (5-Brom-2-Deoxyuridin)-Inkorporation (Abbildung 18) abgeschätzt.

Bei der Untersuchung des etablierten Proliferationsmarkers Ki-67 [209, 210] wurden ausschließlich Zellen mit positiver EGFP-Fluoreszenz berücksichtigt. Das EGFP diente hierbei als Reporter für eine Überexpression der jeweiligen Rho-Variante. Endothelzellen ohne EGFP-Signal wurden nicht berücksichtigt (Abbildung 17A, GFP). Die Markierung des Ki-67 mittels monoklonalen Antikörpers zeigte die zu erwartende Lokalisation dieses Proteins im Nukleus der Endothelzellen (Abbildung 17A, Ki-67). Dieser wiederum wurde durch die Färbung mit Hilfe des DNA-Farbstoffes Hoechst 33342 visualisiert (Abbildung 17A, Hoechst 33342). Eine Überlagerung der EGFP-Fluoreszenz mit dem Signal des Ki-67 ermöglichte es die Anzahl EGFP-positiver und Ki-67-doppelt-positiver HUVEC zu ermitteln (Abbildung 17A, GFP+Ki-67). Kontrollvektor-transduzierte HUVEC, die ausschließlich das EGFP exprimierten, dienten dabei als Kontrolle und deren Verhältnis von Ki-67-positiven und EGFP-positiven Zellen wurde als Referenz herangezogen (Abbildung 17A, Ktr.).

Die Überexpression von RhoA bewirkte in seinen aktiven Formen G14V und Q63L eine signifikante Reduktion des Verhältnisses Ki-67+/EGFP+ auf rund 40% für RhoA G14V und circa 60% für RhoA Q63L. Das zeigt eine deutliche Reduktion der Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 durch dauerhaft aktiviertes RhoA. RhoA T19N als permanent inaktive Form des RhoA hatte dagegen keinen signifikanten Einfluss auf die Ki-67-Expression und damit die Endothelzellproliferation (Abbildung 17B). Dennoch war ein Trend hin zu einer leichten Zunahme der Proliferation im Vergleich zu den Kontrollzellen erkennbar. Die Überexpression des RhoA-Wildtyps zeigte keinen signifikanten Unterschied im Ki-67-Signal, verglichen mit den Kontrollzellen. Ein Trend hin zu einer reduzierten Proliferationsrate war dennoch zu beobachten (Abbildung 17B, RhoA WT).

Die Untersuchungen zum Einfluss einer RhoB-Überexpression auf die Proliferation von HUVEC zeigte eine signifikante Reduktion der Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 durch Überexpression von aktiven RhoB-Varianten (Abbildung 17C). Hierbei zeigten die G14V- und Q63L-Varianten mit einer Reduktion des Ki-67+/EGFP+ Verhältnisses auf rund 50% des Kontrollzellniveaus einen identischen Einfluss. Dominant negatives RhoB T19N erhöhte dagegen signifikant die Ki-67-Expression um circa 25%, ein Hinweis auf eine Zunahme der Endothelzellproliferation. Die Überexpression von Wildtyp-RhoB zeigte

hingegen, anders als RhoA, einen stark hemmenden Einfluss auf die Ki-67-Expression. Eine verstärkte Expression von Wildtyp-RhoB führte, genau wie die Expression der aktiven RhoB-Varianten, zu einer rund 50%-igen Abnahme der Ki-67-Expression im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 17C, RhoB WT). Damit war der Einfluss von RhoB-Wildtyp mit dem Einfluss der konstitutiv aktiven RhoB-Formen vergleichbar.

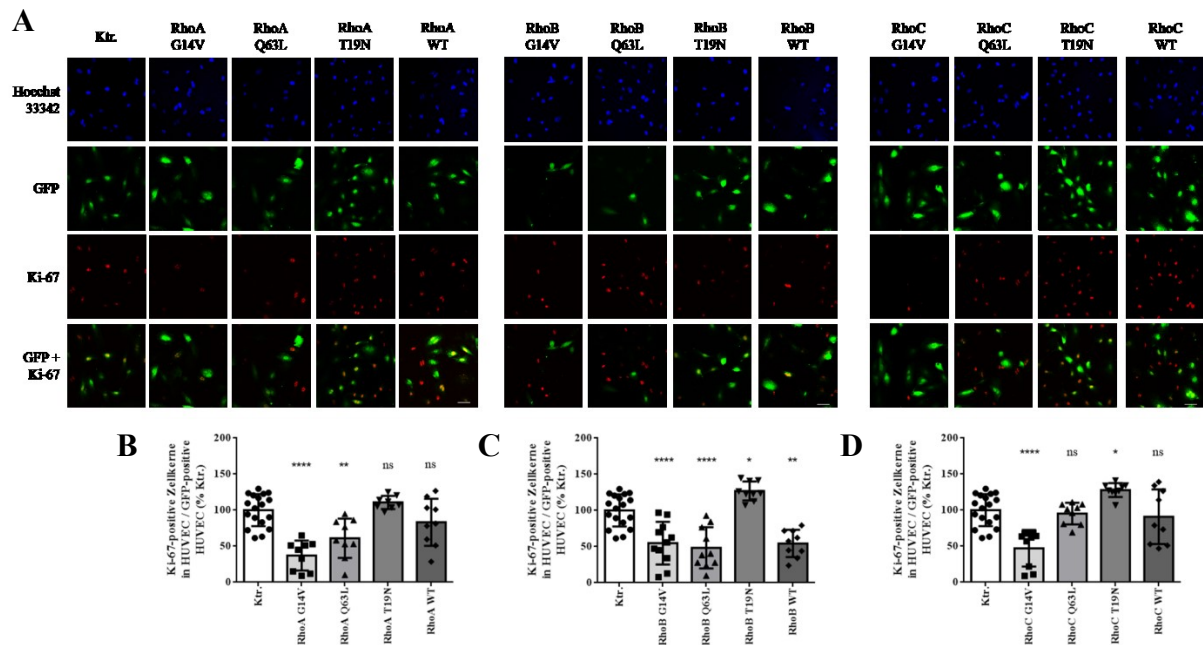


Abbildung 17: Analyse der HUVEC-Proliferation unter Einfluss von RhoGTPasen abgeschätzt mittels Ki-67-Färbung. (A) Repräsentative, mikroskopische Aufnahmen fixierter Endothelzellen (HUVEC), bei denen die Zellkerne mittels Hoechst (Hoechst 33342) visualisiert wurden. Die Expression der entsprechenden konstitutiv aktiven (G14V und Q63L), dominant negativen (T19N) und Wildtyp (WT)-Varianten von RhoA, RhoB und RhoC konnte durch das co-exprimierte EGFP detektiert werden (GFP). Der nukleäre Proliferationsmarker Ki-67 wurde mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers markiert. Das Proliferationsverhalten der Zellen wurde anhand EGFP-positiver und Ki-67-positiver Endothelzellen deutlich. Maßstabsbalken = 50 μ m (B, C, D) Quantifizierung der EGFP- und Ki-67-doppelt-positiven Endothelzellen nach Überexpression der aktiven, inaktiven und Wildtyp-Proteine von RhoA (B), RhoB (C) und RhoC (D). ns = nicht signifikant, * = $P < 0,05$ bis **** = $P < 0,0001$. n = 9 - 18 Bildausschnitte.

Für die Überexpression der verschiedenen RhoC-Formen ergaben sich ganz unterschiedliche Befunde. Zunächst bewirkte auch hier die konstitutiv aktive Form RhoC G14V einen signifikanten Rückgang der Ki-67-Signale auf rund 50% des Kontrollniveaus (Abbildung 17D). Interessanterweise wies die zweite aktive Mutante RhoC Q63L keinen Einfluss auf Ki-67-Signale auf, obwohl ihre Aktivität über die Interaktion mit der Rho-Bindedomäne des Rhotekins eindeutig belegt werden konnte (Abbildung 13). Und auch eine erfolgreiche Überexpression dieser RhoC-Mutante ließ sich am EGFP-Signal beobachten (Abbildung 17A). Einen solch gravierenden Unterschied zwischen den beiden konstitutiv aktiven Varianten fand sich nur für RhoC. Die Anwesenheit von inaktivem RhoC T19N bewirkte wiederum eine signifikant erhöhte Expression der Ki-67-Positivität, analog zum RhoB T19N.

RhoC in seiner Wildtyp-Form verhielt sich ähnlich wie RhoA-Wildtyp und wies einen tendenziell leicht inhibierenden Einfluss auf die Ki-67-Positivität auf (Abbildung 17D).

Neben der Detektion des Ki-67 als Proliferationsmarker kann auch der Einbau des Thymidinanalogons 5-Brom-2-Deoxyuridin (BrdU) in die zelluläre DNA während der Proliferation als Indikator für die Zellteilung genutzt werden (Abbildung 18). Hierfür wurde die Gesamtheit der Endothelzellen in einem *Well* einer 96-*Well*-Platte mit BrdU inkubiert, das BrdU mittels Peroxidase-gekoppeltem Antikörper detektiert und abschließend die Peroxidaseaktivität photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Für den Einfluss der verschiedenen RhoA-Varianten zeigten sich hierbei zur Ki-67-Färbung vergleichbare Ergebnisse (Abbildung 18A). Die Überexpression aktiver RhoA-Varianten (G14V und Q63L) führte zu einem signifikant verringerten BrdU-Einbau (rund 47 % und 75%) im Vergleich zum BrdU-Einbau Kontroll-transduzierter HUVEC, damit also zu einer reduzierten DNA-Syntheseleistung als Hinweis auf eine verlangsamte Proliferation. RhoA T19N als dominant negative RhoA-Variante zeigte keinen Einfluss auf den BrdU-Einbau humaner Endothelzellen und auch die Überexpression des RhoA-Wildtyps beeinflusste den BrdU-Einbau nicht (Abbildung 18A). Einen Trend der Wildtyp-Form hin zu einem reduzierten BrdU-Einbau, wie für die Ki-67-Expression beobachtet, konnte nicht nachgewiesen werden.

Auch die Analyse des BrdU-Einbaus nach RhoB-Überexpression ergab mit den Ki-67-Daten vergleichbare Ergebnisse. Aktives RhoB bewirkte einen signifikant verringerten Einbau des BrdU (circa 60%) verglichen mit der Kontrolle und damit einen Hinweis auf eingeschränkte Zellproliferation (Abbildung 18B). Wiederum ließ sich für die T19N-Variante des RhoB ein leicht stimulierender, wenn auch nicht signifikanter, Einfluss auf die Zellteilung im BrdU-Assay beobachten (Abbildung 18B, RhoB T19N). Die Überexpression des RhoB-Wildtyps zeigte auch für die BrdU-Inkorporation ein eindeutig aktives Verhalten der GTPase und hemmt die DNA-Synthese im selben Maß wie die konstitutiv aktiven Formen G14V und Q63L (Abbildung 18B).

Die Befunde des BrdU-Assays waren für RhoC mit denen der Ki-67-Expression vergleichbar. Auch hierbei beeinflusste nur die G14V-Mutante die BrdU-Inkorporation signifikant negativ (74%), wohingegen die ebenfalls aktive Q63L-Variante keinen Effekt ausübte (Abbildung 18C). Des Weiteren konnte weder für die T19N- noch die Wildtyp-Form des RhoC ein signifikanter Einfluss auf den BrdU-Einbau beobachtet werden (Abbildung 18C).

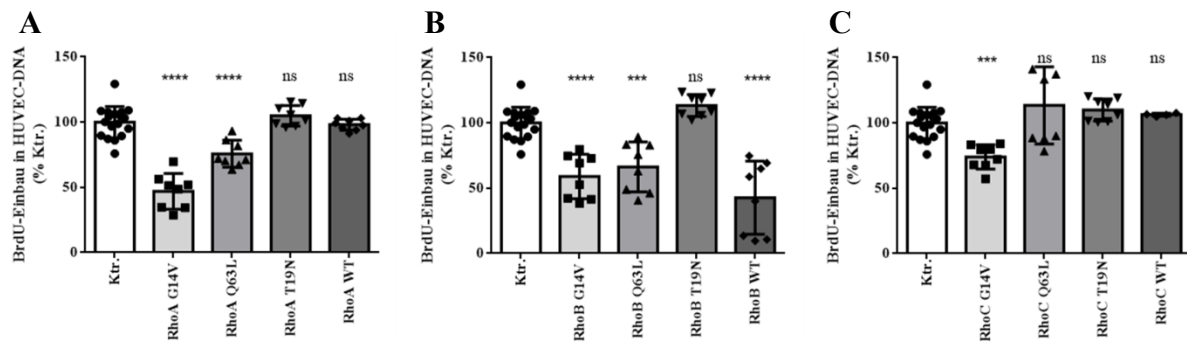


Abbildung 18: Abschätzung der Endothelzell-Proliferation unter Einfluss von RhoGTPasen mittels BrdU-Inkorporation. HUVEC mit einer Überexpression von konstitutiv aktivem (G14V, Q63L), dominant negativem (T19N) und Wildtyp-Protein (WT) der RhoGTPasen RhoA (A), RhoB (B) und RhoC (C) wurden hinsichtlich des BrdU-Einbaus in die DNA analysiert. ns = nicht signifikant, *** = $P < 0,001$ bis **** = $P < 0,0001$. n = 8.

Zusammenfassend lässt sich bei der Beurteilung der Einflüsse verschiedener Rho-Aktivitätsformen feststellen, dass die konstitutiv aktiven Varianten G14V und Q63L einen erheblichen, negativen Einfluss auf Marker der Zellproliferation ausübten. Dies gilt für alle drei analysierten RhoGTPasen, mit Ausnahme von RhoC Q63L, welches interessanterweise ohne Einfluss blieb. Die inaktiven Mutanten von RhoA, RhoB und RhoC zeigten hingegen tendenziell eher einen positiven Einfluss auf die genannten Marker der Zellvermehrung, was auf inhibitorische Einflüsse insbesondere der endogen gebildeten RhoB- und RhoC-Isoformen in diesem Zusammenhang hindeutet. Bei den Wildtyp-Proteinen von RhoA und RhoC ließ sich dagegen kein (BrdU-Assay), beziehungsweise ein minimaler negativer Effekt auf die Zellteilung (Ki-67-Expression) feststellen. Eindeutig war hingegen die signifikante Reduktion der besagten Proliferationsmarker durch Überexpression des RhoB-Wildtyps.

3.5. Einfluss der RhoGTPasen auf das Zellüberleben von HUVEC

Mit Hilfe der Proliferationsmarker Ki-67 und BrdU konnten Effekte der Überexpressionen von konstitutiv aktiven (G14V, Q63L), dominant negativen (T19N) und Wildtyp-Proteinen der RhoGTPasen RhoA, RhoB und RhoC herausgearbeitet werden. Um das Bild der Rolle dieser kleinen GTPasen auf die Zellhomöostase in Endothelzellen weiterführend zu untersuchen, wurde ein möglicher Einfluss der RhoGTPase-Expression auf das Zellüberleben analysiert. Dazu wurden erfolgreich transduzierte HUVEC (EGFP-positiv) mit Propidiumiodid (PI) in Suspension gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert (Abbildung 19, Histogramme im Anhang: Abbildung 54). PI kann dabei die Zellmembran vitaler Zellen nicht durchdringen und färbt lediglich tote Zellen, beziehungsweise Zellen mit gestörter Membranintegrität.

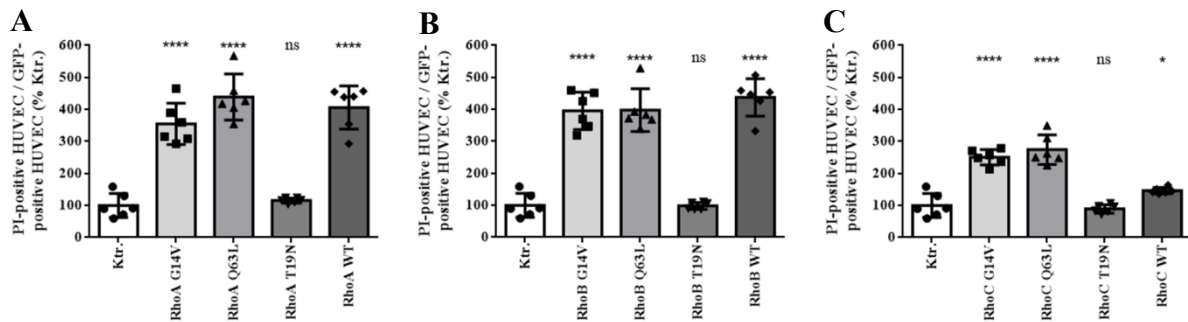


Abbildung 19: Einfluss von RhoGTPasen auf die Zellviabilität von HUVEC (Propidiumiodid-Färbung). HUVEC nach einer Überexpression von konstitutiv aktivem (G14V, Q63L), dominant negativem (T19N) und Wildtyp-Protein (WT) der RhoGTPasen RhoA (A), RhoB (B) und RhoC (C) wurden mittels Durchflusszytometrie hinsichtlich des Propidiumiodid (PI)-Gehaltes im Zellkern auf ihre Viabilität untersucht. Als Vergleich dienten Kontroll-transduzierte HUVEC (Ktr.). ns = nicht signifikant, * = $P < 0,05$ bis **** = $P < 0,0001$. $n = 6$.

Die Überexpression von aktivem RhoA (G14V und Q63L) und RhoA-Wildtyp erhöhte den Anteil PI-positiver Zellen um circa das 4fache im Vergleich zu Kontroll-transduzierten HUVEC. Wohingegen dominant negatives (inaktives, T19N) RhoA keinen signifikanten Einfluss auf die Membranintegrität und die PI-Aufnahme zeigte (Abbildung 19A).

Ähnliche Befunde konnten nach Überexpression der verschiedenen RhoB-Varianten beobachtet werden. Auch hier führten aktive RhoB-Varianten sowie der Wildtyp zu einer signifikanten Erhöhung der PI-positiven Endothelzellen auf das 4fache des Kontrollniveaus. Dominant negatives RhoB bewirkte wiederum keine veränderte PI-Inkorporation (Abbildung 19B).

RhoC vermittelte nach Überexpression seiner konstitutiv aktiven Formen deutlich moderatere Effekte. Hier wurde der Anteil der PI-positiven Zellen in der Population der transduzierten Zellen lediglich um das 2,5fache erhöht. Auch zeigte sich ein verminderter Effekt für das RhoC-Wildtyp-Protein. RhoC T19N führte, wie die inaktiven RhoA- und RhoB-Varianten, zu keiner signifikanten Veränderung der endothelialen Membranpassage des PI (Abbildung 19C).

Somit konnte mit Blick auf die Untersuchungen der Zellviabilität gezeigt werden, dass RhoGTPasen nicht nur die Proliferation von humanen Endothelzellen beeinträchtigen, sondern auch zu einer Beeinträchtigung der endothelialen Zellviabilität führten. Die durch die RhoC-Varianten (G14V, Q63L, Wildtyp) ausgelösten Effekte waren hierbei deutlich moderater. Die inaktiven T19N-Mutanten von RhoA, RhoB und RhoC wiesen dagegen keinen oder einen leicht stimulierenden Einfluss auf das Zellüberleben bzw. die Zellproliferation auf.

3.6. *Tube-Formation-Assay*

Beim *Tube-Formation-Assay* wurden die humanen Endothelzellen hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Ausbildung kapillarähnlicher Strukturen auf einer extrazellulären Matrix, in der vorliegenden Arbeit Matrigel™, untersucht. Diese Untersuchung ergab somit Hinweise zum Einfluss der untersuchten RhoGTPasen auf das angiogenetische Potential humaner Endothelzellen. Hierfür wurde die Gesamtlänge des gebildeten Kapillarnetzwerkes gemessen. Der Einfluss von dominant negativen (inaktiven), konstitutiv aktiven und Wildtyp-Formen der RhoGTPasen RhoA, RhoB und RhoC auf die Kapillarbildung soll im Folgenden beschrieben werden (Abbildung 20).

Verglichen mit den Kontroll-transduzierten Endothelzellen, die sich gleichmäßig zu einem nahezu vollständig geschlossenem Netz aus unterschiedlich breiten Zelloassoziaten organisierten (Abbildung 20A, Ktr.), fällt bei der Überexpression von aktivem RhoA (RhoA G14V und RhoA Q63L) die fast vollständig fehlende Ausbildung von *Tubes* auf. Lediglich separierte Kapillarnetzwerke mit nur wenigen Knotenpunkten und dünnen *Tube*-Strukturen bildeten sich aus. Daneben zeigten sich vor allem unstrukturierte Zellaggregate (Abbildung 20A). Die Gesamttubellänge nach Überexpression dieser Rho-Varianten sank dadurch auf unter 50% im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 20B). Ähnliche Beobachtungen konnten für die dauerhaft aktiven Formen von RhoB und RhoC gemacht werden. Hierbei verringerte sich die Gesamttubellänge im Mittel allerdings nicht so stark wie unter dem Einfluss von RhoA (Abbildung 20C und D). Besonders in den Randbereichen der *Wells* bildeten sich bei RhoB und RhoC Netzwerke aus, die dennoch häufig nicht flächig verknüpft waren und nur wenige Knotenpunkte aufwiesen (Abbildung 20A).

Die dominant negativen T19N-Mutanten der analysierten RhoGTPasen hatten dagegen keinen Einfluss auf die Reorganisation der Endothelzellen zu Kapillarnetzwerken. Es entstanden im Erscheinungsbild und der Gesamttubellänge mit der Kontrolle vergleichbare *Tube*-Systeme (Abbildung 20A - D).

Deutliche Unterschiede gab es hingegen nach Überexpression der Wildtyp-Proteine von RhoA, RhoB und RhoC. Während RhoA keinen signifikanten Einfluss auf die Gesamttubellänge hatte, verringerte sich die Länge des Kapillarnetzes unter dem Einfluss von RhoB-Wildtyp um rund 50% (Abbildung 20C). Zusätzlich erschienen viele Endothelzellen unorganisiert und vereinzelt (Abbildung 20A, RhoB WT). Im Kontrast dazu zeigte sich nach Expression von RhoC-Wildtyp ein Kapillarnetz, welches in Erscheinungsbild und Gesamtlänge mit den Kontrollzellen vergleichbar war (Abbildung 20A und D).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die konstitutiv aktiven Rho-Varianten G14V und Q63L von RhoA, RhoB und RhoC einen negativen Einfluss auf die geordnete Ausbildung eines strukturierten Kapillarnetzwerkes ausübten und somit störend auf die Ausbildung neuer Blutgefäße einwirken können. Der Einfluss war hier bei Anwesenheit von RhoA besonders stark. Zusätzlich störte auch die Überexpression des RhoB-Wildtyp-Proteins diesen angiogenetischen Prozess. Die Wildtyp-Formen von RhoA und RhoC sowie die dominant negativen Varianten von RhoA, RhoB und RhoC beeinflussten die Ausbildung von kapillarähnlichen Strukturen hingegen augenscheinlich nicht.

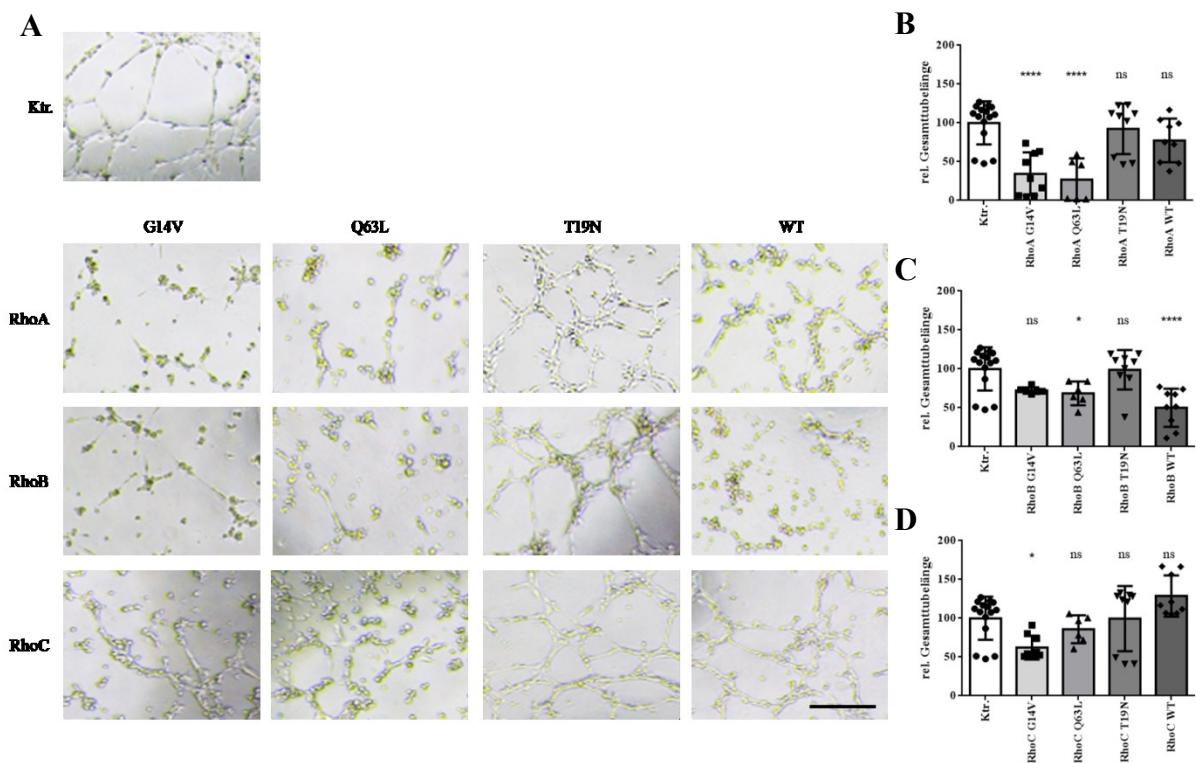


Abbildung 20: Tube-Formation-Assay mit RhoA-, RhoB- und RhoC-überexprimierenden HUVEC. Repräsentative Durchlicht-mikroskopische Aufnahmen der zweidimensionalen Ausbildung kapillarähnlicher Strukturen aus einem HUVEC-Monolayer auf Matrigel™ (A). Maßstabsbalken = 125 μ m. Bestimmung der relativen Gesamttubellänge der Netzwerke nach Expression von konstitutiv aktivem (G14V, Q63L), dominant negativem (T19N) und Wildtyp-Proteinen (WT) von RhoA (B), RhoB (C) und RhoC (D). ns = nicht signifikant, * = $P < 0,05$ bis **** = $P < 0,0001$. n = 6 - 9.

3.7. Scratch-induzierte Migration von Endothelzellen mit RhoA, RhoB und RhoC

Die gerichtete Bewegung in Folge von Stimuli (Chemokinese und Chemotaxis) von Endothelzellen in umliegendes Gewebe ist im Prozess der Angiogenese von entscheidender Bedeutung. Der Einfluss von verschiedenen aktiven und inaktiven Formen der kleinen RhoGTPasen RhoA, RhoB und RhoC auf die gerichtete Zellbewegung humaner

Endothelzellen in einen zellfreien Bereich („Wunde“) soll im Folgenden beschrieben werden. Beim *Scratch*-Assay (Wundheilungsassay) wurde aus einem konfluenten Endothelzellrasen mittels einer Pipettenspitze ein Teil der Zellen entfernt. Anschließend wurde die Migration der HUVEC in diese zellfreie „Wunde“ über einen Zeitraum von bis zu 20 h mit Hilfe von *Live-Cell Imaging* beobachtet und die Migrationsgeschwindigkeit aus dem Verhältnis der zurückgelegten Wegstrecke der Zellfront und der dafür benötigten Zeit ermittelt.

3.7.1. *Scratch*-induzierte Migration von HUVEC unter basalen Bedingungen

Zunächst wurde der Einfluss von RhoA, RhoB und RhoC in ihren verschiedenen Aktivitätsformen auf die zweidimensionale Migration von Endothelzellen untersucht. Dabei diente das co-exprimierte EGFP als Marker für eine erfolgreiche Überexpression der jeweiligen Rho-Variante und gleichzeitig ermöglicht es eine optische Verfolgung der Endothelzellen (Abbildung 21A). Bei HUVEC, die als Kontrolle dienten und ausschließlich das EGFP exprimierten, sah man 9 h nach dem Einfügen der Wunde einen nahezu vollständigen Schluss des zellfreien Bereichs. Gut zu beobachten war auch die wellenförmige Migrationsfront nach 9 h. Diese wird durch *Leading Cells*, die in bestimmten Bereichen der Zellfront die folgenden Zellen gewissermaßen ziehen, hervorgerufen (Abbildung 21A, Ktr.). In Folge einer Überexpression von aktivem RhoA (G14V und Q63L) verlangsamte sich die Migrationsgeschwindigkeit um rund 40% (RhoA G14V), beziehungsweise rund 60% (RhoA Q63L), im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 21B). Es war deutlich zu erkennen, dass der zellfreie Bereich bei vergleichbarer Größe nicht annähernd so schnell geschlossen werden konnte, wie durch die Kontrollzellen (Abbildung 21A). Auffällig war dabei, dass die beiden aktiven RhoA-Varianten die Migration unterschiedlich stark zu hemmen schienen, was möglicherweise auf unterschiedliche nachgeschaltete Signaltransduktion oder Expressionsunterschiede zurückgeführt werden könnte. Der Einfluss der Q63L-Mutation wirkte sich in diesem Zusammenhang deutlich stärker auf die Endothelzellmotilität aus. Dagegen beeinflusste dominant negatives RhoA (T19N) die Migrationsgeschwindigkeit der Endothelzellen nicht signifikant (Abbildung 21B). Eine verstärkte Anwesenheit vom RhoA-Wildtyp-Protein inhibierte die Migration der untersuchten Endothelzellen ähnlich stark wie die Expression konstitutiv aktiver Varianten. Eine Verlangsamung der relativen Bewegungsgeschwindigkeit um circa 40% verglichen mit der Kontrolle deutete auf ein hohes endogenes Aktivitätsniveau des RhoA-Wildtyps in humanen Endothelzellen hin (Abbildung 21B). Nach Überexpression der beiden konstitutiv aktiven RhoB-Formen G14V und Q63L war ein erheblicher Rückgang der Zellbewegung um etwa 60% im Vergleich zu

Kontrollzellen zu beobachten (Abbildung 21C). Die Endothelzellen waren in ihrer Beweglichkeit stark eingeschränkt und schienen zum Teil auf ihrer Position arretiert zu werden (Abbildung 21A). Hingegen führte die Überexpression von dominant negativem RhoB zu einer Steigerung der gerichteten Migration *in vitro* (Abbildung 21C). Ähnlich wie beim RhoA-Wildtyp zeigte auch die Überexpression des RhoB-Wildtyps einen signifikant hemmenden Einfluss auf die Endothelzell-Motilität (Abbildung 21C). RhoB scheint somit für die *Scratch*-induzierte Migration von humanen Endothelzellen von erheblicher Bedeutung zu sein, da alle RhoB-Varianten die Zellbewegung beeinflussen (Abbildung 21C). Die Überexpression von RhoC-Varianten hatte hingegen einen schwächeren Einfluss auf die Motilität von humanen Endothelzellen. Die beiden aktiven RhoC-Varianten G14V und Q63L zeigten im Vergleich zu RhoA und RhoB einen geringeren, inhibierenden Einfluss auf die gerichtete Zellmigration (Abbildung 21D). Ähnlich wie für RhoA, konnte auch für RhoC ein stärkerer Einfluss der Q63L-Variante auf die Zellbewegung beobachtet werden. Die Überexpression der dominant negativen T19N-Variante des RhoC und auch die Überexpression des Wildtyp-Proteins beeinflussten die gerichtete Migration von HUVEC hingegen nicht (Abbildung 21D). Hiermit zeigte sich für die Überexpression der Wildtyp-Formen ein deutlicher Unterschied zwischen RhoA, RhoB und RhoC.

Man kann somit zusammenfassen, dass bei der gerichteten Migration von HUVEC besonders RhoA und RhoB durch ihre aktiven Mutationen und durch ihre Wildtyp-Formen einen stark hemmenden Einfluss ausübten. RhoC zeigte diesbezüglich ein abweichendes Verhalten, da hier die Anhebung des Wildtyp-Protein-Expressionsniveaus ohne Einfluss auf die Zellmotilität blieb und lediglich die Expression der konstitutiv aktiven RhoC Q63L-Variante einen hemmenden Effekt ausübte, der zudem nicht so stark ausfiel wie für RhoA und RhoB. Die inaktiven Formen von RhoA und RhoC beeinflussten die *Scratch*-induzierte Zellbewegung hingegen nicht, während die Expression von RhoB T19N die Endothelzell-Migration signifikant steigerte.

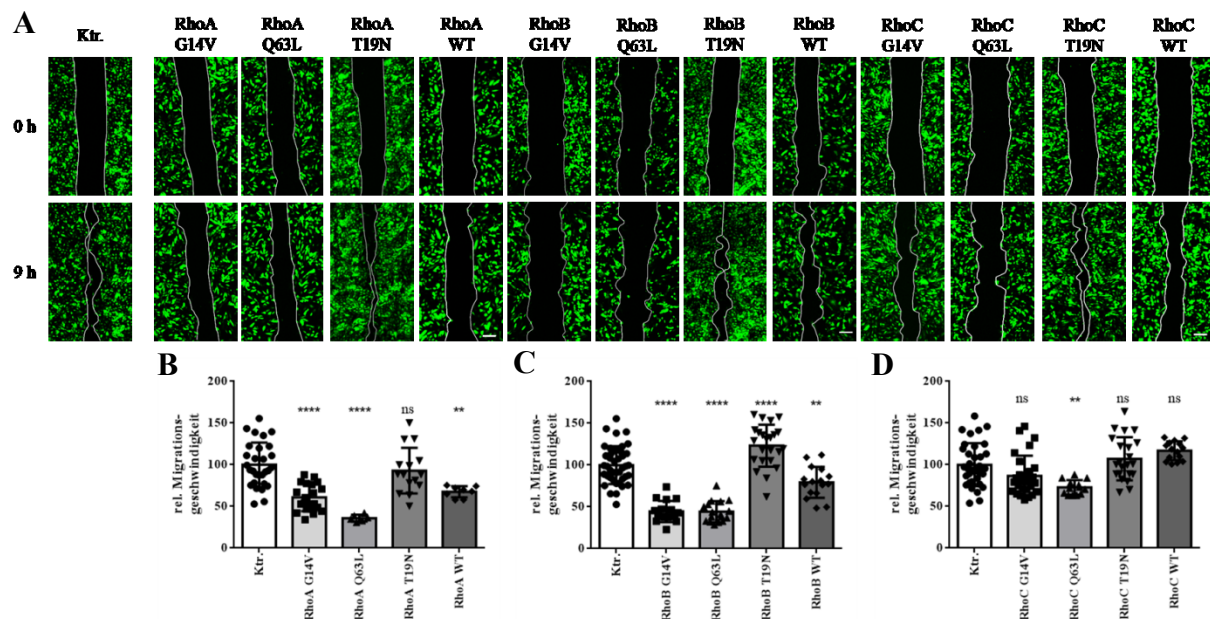


Abbildung 21: Scratch-induzierte Migration von HUVEC nach Expression von RhoA-, RhoB- und RhoC-Varianten unter basalen Bedingungen. In einen konfluenten HUVEC-Monolayer wurde mechanisch eine Wunde (*Scratch*) eingebracht und die Zellfront zum Zeitpunkt 0 h mikroskopisch festgehalten und markiert (0 h). Nach 9 h erfolgte eine erneute Markierung der entsprechenden Zellfront (9 h). Es wurden kontroll-transduzierte, EGFP-exprimierende HUVEC (Ktr.) und HUVEC mit Expressionen von aktiven (G14V, Q63L), inaktiven (T19N) und Wildtyp-Proteinen (WT) der RhoGTPasen RhoA, RhoB und RhoC analysiert. Maßstabsbalken = 200 µm (A). Die relativen Migrationsgeschwindigkeiten für die verschiedenen Varianten von RhoA (B), RhoB (C) und RhoC (D) ergaben sich aus der zurückgelegten Strecke der Zellfront und der Migrationszeit zum Analysezeitpunkt, normiert auf die EGFP-exprimierenden Kontrollzellen (Ktr.). ns = nicht signifikant, ** = $P < 0,01$ bis **** = $P < 0,0001$. n = 8 - 20.

3.7.2. Scratch-induzierte Migration von HUVEC nach Hemmung von RhoGTPasen durch C3 Transferase aus *Clostridium botulinum*

Die Reversibilität der beobachteten Effekte aktiver Rho-Varianten und der Wildtyp-Proteine von RhoA und RhoB wurde durch Inhibierung der RhoGTPasen mit einem spezifischen Rho-Inhibitor analysiert. Als Rho-Inhibitor fand dabei das Exoenzym C3 Transferase aus *Clostridium botulinum* Anwendung. Dieses Enzym ist ein etablierter Rho-Inaktivator, der eine ADP-Ribosylierung am Asparagin 41 in der Effektorbindedomäne von RhoA, RhoB und RhoC bewirkt [203]. Ein Einfluss des Inhibitors auf die Motilität Kontroll-transduzierter HUVEC konnte nicht beobachtet werden (Abbildung 22, Ktr.). Hingegen konnte der Inhibitor die motilitätshemmenden Effekte von konstitutiv aktiven RhoA-Varianten (G14V und Q63L) um ca. 30% (G14V) bzw. ca. 25% (Q63L) reduzieren. Die Motilität RhoA-Wildtyp-überexprimierender Zellen wurde zudem durch den Rho-Inhibitor normalisiert (Abbildung 22A).

Der Einfluss der C3 Transferase auf die durch die Überexpression von aktiven RhoB-Varianten induzierte Migrationshemmung war hingegen deutlich geringer (Abbildung 22B).

So konnte keine signifikante Zunahme der Migrationsgeschwindigkeit durch Behandlung mit der C3 Transferase beobachtet werden, während die Hemmung des RhoB-Wildtyp-Proteins zu einer quasi Normalisierung der vormals stark inhibierten *Scratch*-induzierten Migration der Endothelzellen führte.

Ähnliche Befunde konnten für die Inhibierung der RhoC-Varianten erhoben werden, wobei die Migration von RhoC G14V-, RhoC Q63L- und RhoC-Wildtyp-überexprimierenden Endothelzellen um jeweils circa 20% beschleunigt werden konnte (Abbildung 22C).

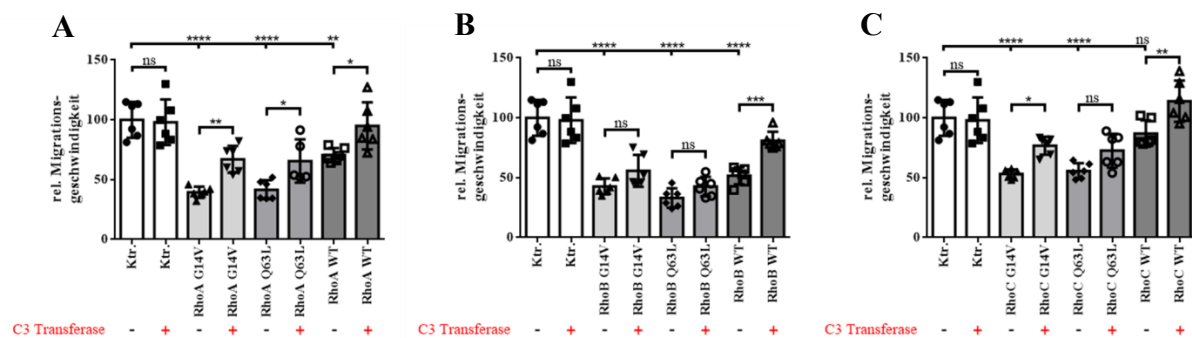


Abbildung 22: *Scratch*-induzierte Migration von HUVEC in Anwesenheit von RhoA, RhoB und RhoC unter RhoGTPase-Inhibierung durch C3 Transferase aus *Clostridium botulinum*. Die relative Migrationsgeschwindigkeit, normiert auf Kontroll-transduzierte HUVEC (Ktr.), ergab sich aus der Migrationsdauer und der in dieser Zeit zurückgelegten Wegstrecke der Zellfront. Untersucht wurden neben Kontroll-transduzierten Zellen, HUVEC mit einer Überexpression von konstitutiv aktiven (G14V, Q63L) und Wildtyp-Proteinen (WT) der RhoGTPasen RhoA (A), RhoB (B) und RhoC (C) in Anwesenheit (+) von 1 $\mu\text{g/ml}$ C3 Transferase, beziehungsweise der entsprechenden Lösungsmittelkontrolle (-). ns = nicht signifikant, * = $P < 0,05$ bis **** = $P < 0,0001$. n = 6.

3.7.3. *Scratch*-induzierte Migration von HCAEC unter basalen Bedingungen und nach Hemmung von RhoGTPasen durch C3 Transferase aus *Clostridium botulinum*

Die Einflüsse der untersuchten RhoGTPasen auf das Migrationsverhalten von Endothelzellen wurden zunächst in HUVEC als häufig in Angiogenese-Studien verwendete Modellzelllinie untersucht. Um zudem den Einfluss der RhoGTPasen auf die Motilität primärer Endothelzellen arteriellen Ursprungs zu untersuchen, wurden die Analysen in humanen koronararterielle Endothelzellen (HCAEC - *Human Coronary Artery Endothelial Cells*) wiederholt. Grundsätzlich migrierten HCAEC langsamer als HUVEC, weshalb für diese Zelllinie die Migration über 16 h beobachtet wurde (Abbildung 23A). Eine erfolgreiche Expression der jeweiligen Rho-Variante, bzw. des Kontroll-Vektors, wurde analog zu den HUVEC-Experimenten durch das co-exprimierte EGFP visualisiert.

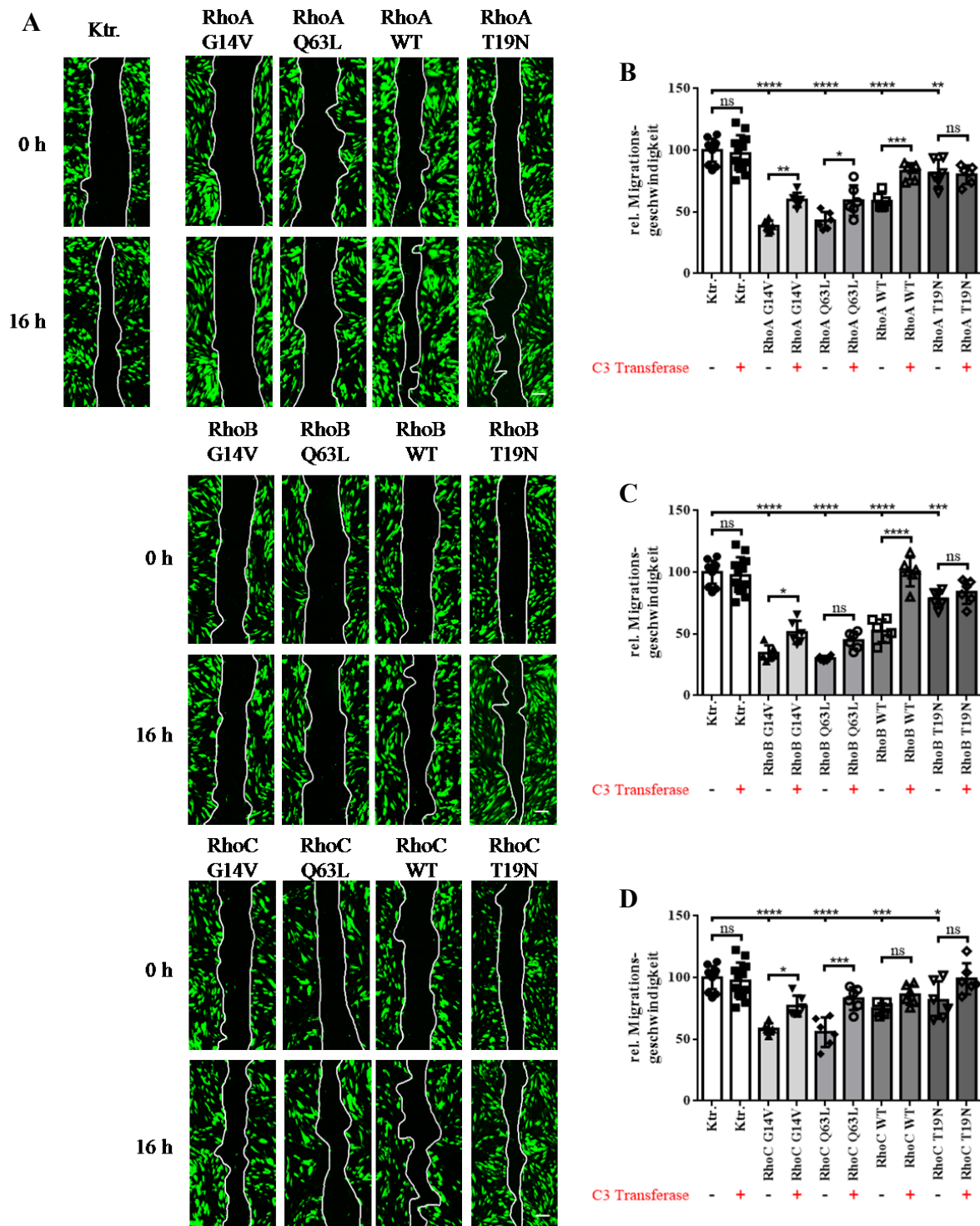


Abbildung 23: Scratch-induzierte Migration von HCAEC in Anwesenheit von RhoA, RhoB und RhoC unter basalen Bedingungen und unter RhoGTPase-Inhibierung durch C3 Transferase aus *Clostridium botulinum*. In einen konfluenten HCAEC-Monolayer wurde mechanisch eine Wunde (Scratch) eingebracht und die Zellfront zum Zeitpunkt 0 h mikroskopisch festgehalten und markiert (0 h). Nach 16 h erfolgte eine erneute Markierung der entsprechenden Zellfront (16 h). Es wurden HCAEC mit einer EGFP-Expression (Ktr.) und HCAEC mit Expressionen von aktiven (G14V, Q63L), inaktiven (T19N) und Wildtyp-Proteinen (WT) der RhoGTPasen RhoA, RhoB und RhoC analysiert. Maßstabsbalken = 200 μ m (A). Die relativen Migrationsgeschwindigkeiten für die verschiedenen Varianten von RhoA (B), RhoB (C) und RhoC (D) ergaben sich aus der zurückgelegten Strecke der Zellfront und der Migrationszeit zum Analysezeitpunkt, normiert auf die EGFP-exprimierenden Kontrollzellen (Ktr.). Die Migrationsgeschwindigkeit wurde in An- (+) und Abwesenheit (-) des RhoGTPase-Inhibitors C3 Transferase (1 μ g/ml) bestimmt. ns = nicht signifikant, * = $P < 0,05$ bis **** = $P < 0,0001$. n = 6 - 12.

Die Beobachtungen in HCAEC bestätigten die Befunde aus den HUVEC-Experimenten und zeigten eine signifikante, Migrations-hemmende Wirkung insbesondere durch erhöhte RhoA- und RhoB-Aktivität (Abbildung 23B - C). Darüberhinaus zeigten in HCAEC, anders als in HUVEC beobachtet, auch beide konstitutiv aktiven RhoC-Varianten (G14V und Q63L) sowie die Expression des RhoC-Wildtyp-Proteins eine signifikante Reduktion der Endothelzellmigration, die im Vergleich zu den Effekten von RhoA und RhoB aber deutlich moderater ausfielen (Abbildung 23D). Interessant ist der Befund, dass die Expressionen der dominant negativen Varianten von RhoA, RhoB und RhoC in HCAEC ebenfalls die Endothelzellmotilität mäßig, aber signifikant, verringerten, was einen eindeutigen Unterschied zu den Einflüssen dieser Varianten auf HUVEC darstellte.

Die Hemmung der RhoGTPasen in HCAEC durch den Zusatz der C3 Transferase in das Zellmedium beeinflusste die Zellmigration Kontroll-transduzierter HCAEC nicht, wohingegen die Rho-induzierten Hemmeffekte signifikant, aber nicht vollständig antagonisiert werden konnten (Abbildung 23B - D). Eine zusätzliche RhoGTPase-Hemmung durch C3 Transferase in HCAEC mit einer Expression der dominant negativen Rho-Varianten (T19N) führte nicht zu einer signifikanten Veränderung der Zellmotilität. Somit konnten die Befunde zu den Einflüssen der untersuchten RhoGTPasen aus den HUVEC-Experimenten in HCAEC als weiterem Endothelzelltyp bestätigt werden. Ausnahmen stellten hierbei allerdings die inaktiven Rho-Varianten dar, die im Unterschied zu ihrer Expression in HUVEC, in HCAEC eine geringfügige, aber signifikante Reduktion der Endothelzellmotilität bewirkten.

3.7.4. Einfluss einer Hemmung der direkten bzw. indirekten Rho-Effektoren ROCK, LIMK1, LIMK2 und Myosin II auf RhoGTPase-vermittelte anti-migratorische Effekte in HUVEC

Um einen Hinweis auf die Rolle bekannter Rho-Effektoren während der gerichteten Migration von Endothelzellen im *Scratch*-Assay zu erlangen, erfolgte eine pharmakologische Hemmung der Rho-Kinasen ROCK-1 und ROCK-2 sowie der ROCK-Effektoren LIM Kinasen 1 und 2 (LIMK1, LIMK2) und Myosin II. Dabei wurde BMS4 als LIMK1-Inhibitor verwendet [211]. LX7101 fungierte in der gewählten Konzentration vor allem als LIMK2-Inhibitor, kann aber in höherer Konzentration auch die zelluläre ROCK-Aktivität reduzieren [212]. Y-27632 ist ein Inhibitor beider ROCK-Isoformen (ROCK-1 und ROCK-2) [213]. Blebbistatin inhibiert keinen unmittelbaren Rho-Effektor, hemmt aber die Myosin II-Aktivität und beeinflusst über seine Aktin-regulierende Wirkung Zellmigration [214, 215].

Unter der Behandlung der HUVEC während der gerichteten Migration mit LX7101 wurde eine nicht-signifikante Beschleunigung der Bewegungsgeschwindigkeit Kontroll-transduzierter Zellen um circa 30% beobachtet (Abbildung 24).

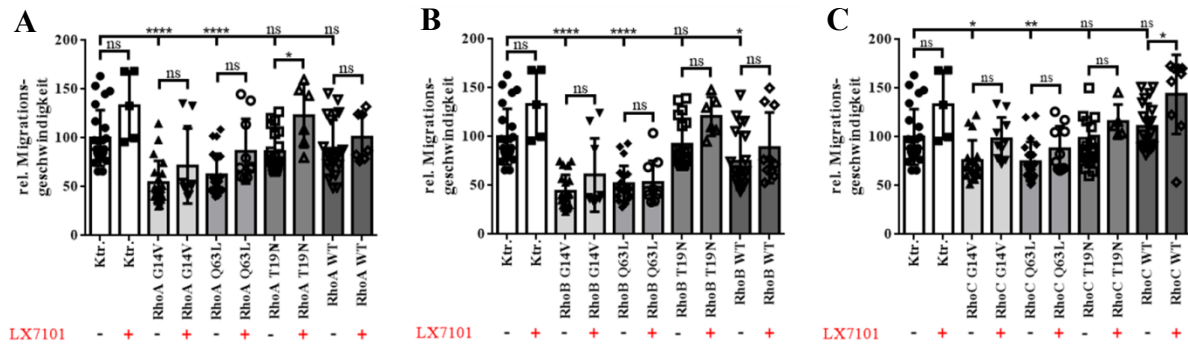


Abbildung 24: Scratch-induzierte Migration von HUVEC nach Überexpression von RhoA-, RhoB- und RhoC-Varianten in An- und Abwesenheit des LIMK2-Inhibitors LX7101. Untersucht wurden neben Kontroll-transduzierten Zellen HUVEC nach Überexpression von konstitutiv aktiven (G14V, Q63L), dominant negativ (T19N) und Wildtyp-Proteinen (WT) der RhoGTPasen RhoA (A), RhoB (B) und RhoC (C) in Anwesenheit (+) von 3 μ M LX7101 (LIMK2-Inhibitor) beziehungsweise der entsprechenden Lösungsmittelkontrolle (-). ns = nicht signifikant, * = $P < 0,05$ bis **** = $P < 0,0001$. n = 12 - 24.

Unter dem Einfluss des LIMK2-Inhibitors konnte ein nicht signifikanter Trend zur verstärkten *Scratch*-induzierten Motilität von Endothelzellen mit Überexpression konstitutiv aktiver RhoA-Varianten beobachtet werden (Abbildung 24A), die allerdings erheblich schwächer als in Kontroll-transduzierten Zellen ausfiel. Eine signifikante Zunahme der Migrationsgeschwindigkeit zeigte sich hingegen unter LX7101-Behandlung bei HUVEC mit einer Überexpression der inaktiven RhoA T19N-Variante (Abbildung 24A). Die starke Hemmung der Zellbewegung nach Überexpression von aktivem RhoB (G14V und Q63L) konnte durch Behandlung mit LX7101 nicht antagonisiert werden (Abbildung 24B). Auf den inhibierenden Effekt der RhoB-Wildtyp-Überexpression hatte der LIMK2-Inhibitor, ähnlich wie für den RhoA-Wildtyp beschrieben, ebenfalls keinen signifikanten Einfluss. Auch für inaktives RhoB T19N konnte, wie bereits für RhoA T19N gezeigt, unter LX7101-Behandlung der größte Einfluss auf die Beschleunigung der gerichteten Migration beobachtet werden (Abbildung 24B). RhoC-überexprimierende Endothelzellen zeigten unter LX7101-Einfluss ein ähnliches Verhalten, wie nach RhoA-Überexpression (Abbildung 24). Die Endothelzellmigration nach RhoC-Wildtyp-Überexpression wurde zudem durch pharmakologische LIMK2-Hemmung signifikant beschleunigt (Abbildung 24C).

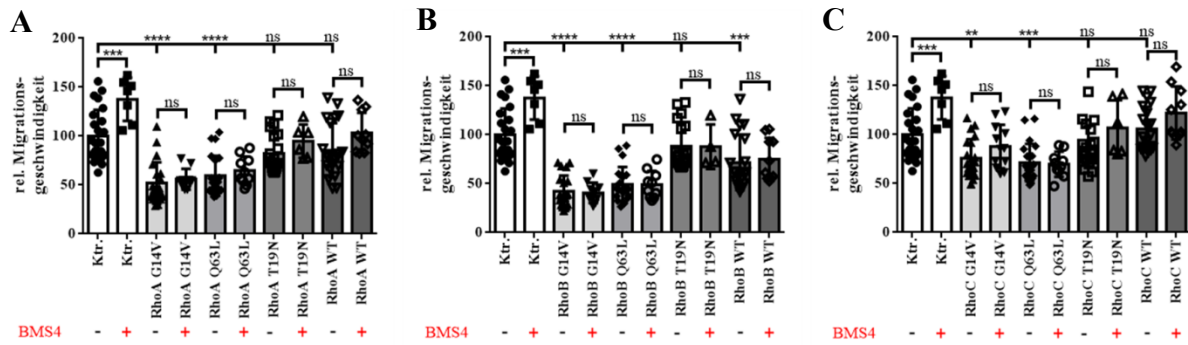


Abbildung 25: Scratch-induzierte Migration von HUVEC nach Überexpression von RhoA-, RhoB- und RhoC-Varianten in An- bzw. Abwesenheit des LIMK1-Inhibitors BMS4. Untersucht wurden neben Kontroll-transduzierten Zellen HUVEC mit einer Überexpression von konstitutiv aktiven (G14V, Q63L), dominant negativen (T19N) und Wildtyp-Proteinen (WT) der RhoGTPasen RhoA (A), RhoB (B) und RhoC (C) in Anwesenheit (+) von 0,5 μ M BMS4 (LIMK1-Inhibitor) beziehungsweise der entsprechenden Lösungsmittelkontrolle (-). ns = nicht signifikant, ** = $P < 0,01$ bis **** = $P < 0,0001$. n = 12 - 24.

Eine Hemmung der LIMK1 durch BMS4 erhöhte signifikant die Migrationsgeschwindigkeit Kontroll-transduzierter Endothelzellen um 35% (Abbildung 25, Ktr.). Ein Einfluss auf die Migrationseigenschaften nach RhoA-, RhoB- und RhoC-Überexpression konnte hingegen nicht beobachtet werden (Abbildung 25A-C). Diese Befunde deuten somit darauf hin, dass der LIMK1 keine entscheidende Bedeutung bei der Transduktion Rho-vermittelter Effekte auf die gerichtete Zellbewegung zukommt.

Die pharmakologische Inhibierung der Rho-Kinasen (ROCK1 und ROCK2) mittels Y-27632 führte bei Kontroll-transduzierten HUVEC zu einer signifikanten Erhöhung (um 80%) der Migrationsgeschwindigkeit im *Scratch*-Assay (Abbildung 26, Ktr.). Eine Aufhebung des Motilitäts-hemmenden Effekts der aktiven RhoA-Varianten G14V und Q63L konnte dagegen nicht beobachtet werden (Abbildung 26A). Stimulierend auf die Migration wirkte sich die ROCK-Inhibierung auf Zellen mit einer vermehrten Expression der inaktiven RhoA-Variante, die unter basalen Bedingungen keinen Einfluss auf das Migrationsverhalten ausübte, aus (Abbildung 26A, T19N). Nach Überexpression des RhoA-Wildtyp-Proteins konnte ebenfalls eine leichte Beschleunigung der Migration um 35% beobachtet werden (Abbildung 26A).

Für die Überexpression der vier untersuchten RhoB-Varianten stellte sich der Einfluss der ROCK-Hemmung in vergleichbarer Weise dar, wie die Beobachtungen nach RhoA-Überexpression. Eine Antagonisierung der durch die aktiven RhoB-Varianten vermittelten Effekte konnte nicht beobachtet werden (Abbildung 26B). Eine signifikante Beschleunigung der Zellmotilität durch ROCK-Hemmung wurde in RhoB T19N-überexprimierenden Zellen und weniger stark auch in RhoB-Wildtyp-überexprimierenden Zellen beobachtet (Abbildung 26B).

Ein migrationsstimulierender Effekt der pharmakologischen ROCK-Hemmung konnte nach Überexpression von RhoC nachgewiesen werden. Die hemmenden Effekte der beiden konstitutiv aktiven RhoC-Mutanten G14V und Q63L konnten durch Y-27632 signifikant reduziert werden (Abbildung 26C), erreichten allerdings nicht das Niveau Y-27632-behandelter Kontroll-Zellen. Auch nach Expression von RhoC T19N und RhoC-Wildtyp wurde die Migration in Folge einer ROCK-Hemmung beschleunigt (Abbildung 26C).

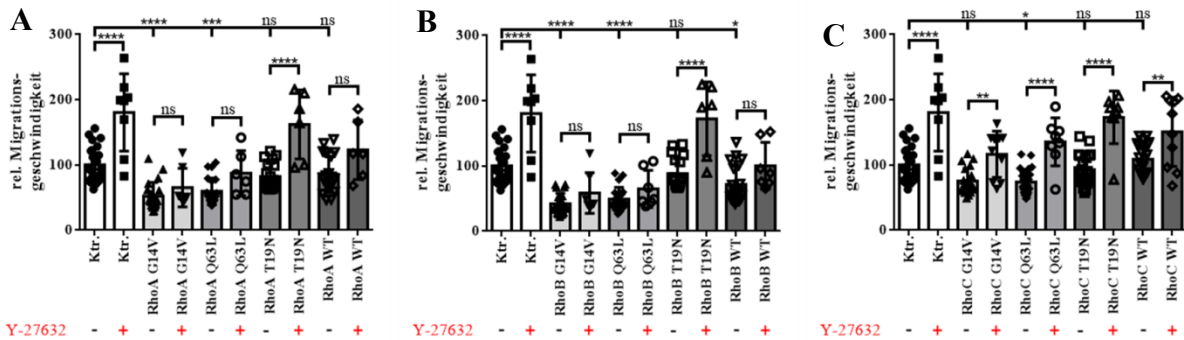


Abbildung 26: Scratch-induzierte Migration von HUVEC nach Überexpression von RhoA-, RhoB- und RhoC-Varianten in An- bzw. Abwesenheit des ROCK-Inhibitors Y-27632. Untersucht wurden neben Kontroll-transduzierten Zellen HUVEC mit einer Überexpression von konstitutiv aktiven (G14V, Q63L), dominant negativen (T19N) und Wildtyp-Proteinen (WT) der RhoGTPasen RhoA (A), RhoB (B) und RhoC (C) in Anwesenheit (+) von 10 μ M Y-27632 (ROCK-Inhibitor) beziehungsweise der entsprechenden Lösungsmittelkontrolle (-). ns = nicht signifikant, * = $P < 0,05$ bis **** = $P < 0,0001$. n = 8 - 24.

Zusammengenommen beschleunigte eine Hemmung der Rho-Kinase durch Y-27632 generell die *Scratch*-induzierte Migration. Eine Antagonisierung der migrationshemmenden Effekte aktiver RhoA- und RhoB-Varianten sowie der jeweiligen Wildtyp-Proteine konnte jedoch nicht beobachtet werden. Ebenso konnten die durch RhoC-vermittelten Hemmeffekte durch eine Y-27632-bewirkte ROCK-Hemmung zwar antagonisiert werden, ein Angleichen der Migrationsgeschwindigkeit auf das Niveau Kontroll-transduzierter Zellen wurde allerdings nicht erreicht. Somit scheint die Vermittlung Motilitäts-hemmender Effekte der untersuchten RhoGTPasen in HUVEC nicht oder nicht ausschließlich über den Rho/Rho-Kinase Signalweg zu erfolgen.

Neben der Hemmung der indirekten bzw. direkten Rho-Effektoren LIMK1, LIMK2 und der Rho-Kinasen 1 und 2 wurde die pharmakologische Hemmung von Myosin II durch Blebbistatin und dessen Einfluss auf die Rho-vermittelten Motilitäts-hemmenden Effekte analysiert (Abbildung 27). In diesem Zusammenhang sei bemerkt, dass Rho-Kinasen den Phosphorylierungsstatus der leichten Kette des Myosin II verstärken und hierüber die Myosin II Aktivität erhöhen können [216]. Aktiviertes Myosin II ist entscheidend für die Kontraktilität von Endothelzellen. Blebbistatin verhindert die ATPase-Aktivität des Myosins

durch seine Bindung und beeinflusst somit die zelluläre Kontraktilität, besonders die Retraktion des hinteren Zellpols im Rahmen der Zellmigration.

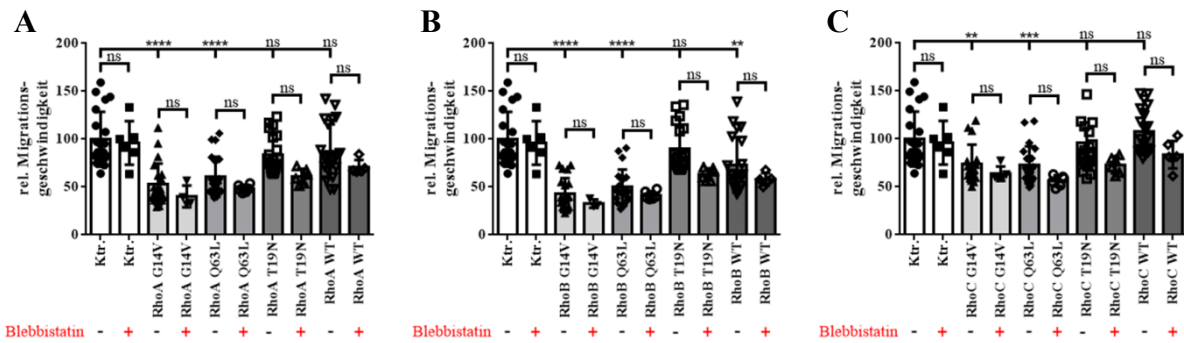


Abbildung 27: Scratch-induzierte Migration von HUVEC nach Überexpression von RhoA-, RhoB- und RhoC-Varianten in An- bzw. Abwesenheit eines pharmakologischen Myosin II-Inhibitors. Untersucht wurden neben Kontroll-transduzierten Zellen HUVEC mit einer Überexpression von konstitutiv aktiven (G14V, Q63L), dominant negativen (T19N) und Wildtyp-Proteinen (WT) der RhoGTPasen RhoA (A), RhoB (B) und RhoC (C) in Anwesenheit (+) von 30 μ M Blebbistatin (Myosin II-Inhibitor) beziehungsweise der entsprechenden Lösungsmittelkontrolle (-). ns = nicht signifikant, * = $P < 0,01$ bis **** = $P < 0,0001$. n = 6 - 20.

Der Einfluss von Blebbistatin auf RhoA-überexprimierende HUVEC zeigte sich durch eine leichte, aber nicht signifikante Verlangsamung der *Scratch*-induzierten Migration. Sowohl die durch aktives RhoA (G14V und Q63L) bereits gehemmte, als auch die durch RhoA T19N unbeeinflusste basale Migrationsgeschwindigkeit wurde durch Blebbistatin zusätzlich um circa 20% reduziert (Abbildung 27A). Ebenso wurde die Zellbewegung nach Überexpression des RhoA-Wildtyp-Proteins durch Behandlung mit Blebbistatin verlangsamt (Abbildung 27A, RhoA WT). Ähnliche Befunde konnten für die Überexpression der verschiedenen RhoB- und RhoC-Varianten in Anwesenheit des Myosin II-Inhibitors Blebbistatin (Abbildung 27B und C) erhoben werden. Eine Verminderung der Myosin II-Aktivität und damit einhergehend eine herabgesetzte Zellkontraktilität wirkte sich demnach generell eher hemmend auf die HUVEC-Motilität aus.

3.7.5. Scratch-induzierte Migration von HUVEC nach *Knockdown* der potentiellen Rho-Effektoren CIT, DIAPH1, RHPN1 und RHPN2

Neben der pharmakologischen Hemmung bekannter Rho-Effektoren sollte auch der Einfluss von 4 weiteren potentiellen Rho-Interaktionspartnern auf die *Scratch*-induzierte Migration unter Überexpression von RhoA, RhoB und RhoC durch *Knockdown* untersucht werden. Dies erfolgte mit der Intention, den migrationshemmenden Effekt der konstitutiv aktiven Rho-Varianten G14V und Q63L, sowie der Wildtyp-Proteine zu antagonisieren. Die endogene Expression der Rho-Effektoren wurde durch einen shRNA-vermittelten *Knockdown*, mit Hilfe

jeweils zweier verschiedener shRNA-Konstrukte, in humanen Endothelzellen der Nabelschnur (HUVEC) herunterreguliert (Anhang: Abbildung 53).

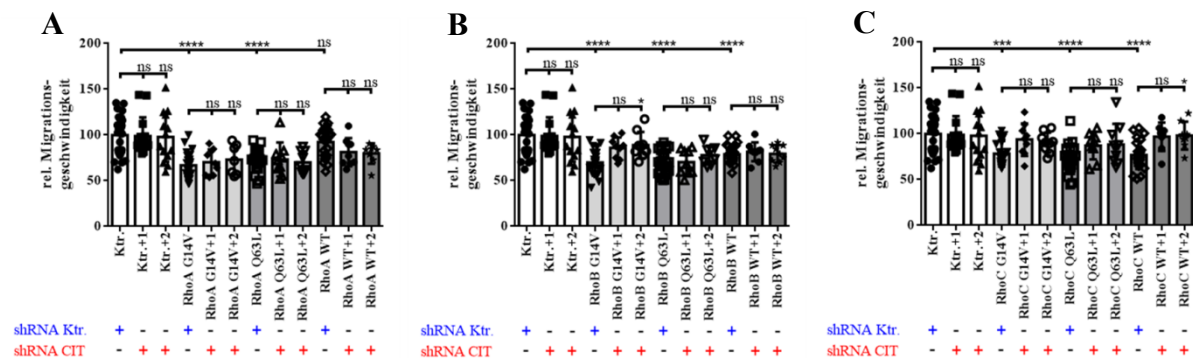


Abbildung 28: Scratch-induzierte Migration von HUVEC nach Überexpression von RhoA-, RhoB- und RhoC-Varianten und zusätzlichem Knockdown der Citron Rho-interacting Serine/Threonine Kinase (CIT). HUVEC mit einer Überexpression der konstitutiv aktiven (G14V, Q63L) und Wildtyp-Proteinen der RhoGTPasen RhoA (A), RhoB (B) und RhoC (C) wurden zusätzlich über lentivirale Vektoren mit shRNAs (1 und 2) zum Knockdown der CIT (shRNA CIT +) beziehungsweise einer nicht zielgerichteten Kontroll-shRNA (shRNA Ktr. +), modifiziert. ns = nicht signifikant, * = $P < 0,05$ bis **** = $P < 0,0001$. n = 9 - 30.

Die Citron Rho-interacting Serine/Threonine Kinase (CIT) spielt als Rho-Interaktionspartner vor allem bei der Zytokinese eine wichtige Rolle. Darüber hinaus ist auch ein Einfluss auf die Migration von Mammakarzinomzellen beschrieben worden [217].

Zunächst konnte festgestellt werden, dass ein Knockdown der CIT keinen signifikanten Einfluss auf die Motilität Kontroll-transduzierter HUVEC hatte (Abbildung 28, Ktr.+1, Ktr.+2). In HUVEC mit einer Überexpression von aktiven RhoA-Varianten (G14V und Q63L) bzw. RhoA-Wildtyp führte der zusätzliche CIT-Knockdown zu keiner Veränderung des migrationshemmenden Effekts (Abbildung 28A). Interessanterweise führte der Knockdown von CIT zu einer Normalisierung der RhoB G14V-vermittelten Migrationshemmung von HUVEC, während der RhoB Q63L- sowie der RhoB-Wildtyp-vermittelte Hemmeffekt durch den CIT-Knockdown nicht beeinflusst wurden (Abbildung 28B). Möglicherweise zeigt sich hier ein heterogener Einfluss der Varianten auf nachgeschaltete Effektoren in humanen Endothelzellen. Beachtenswert war, dass der CIT-Knockdown in HUVEC nach einer Überexpression von RhoC G14V, Q63L und RhoC-Wildtyp zu einer Normalisierung der Migration führte, was auf eine Rolle von CIT in der Motilitäts-hemmenden Signaltransduktion von RhoC hinweist (Abbildung 28C).

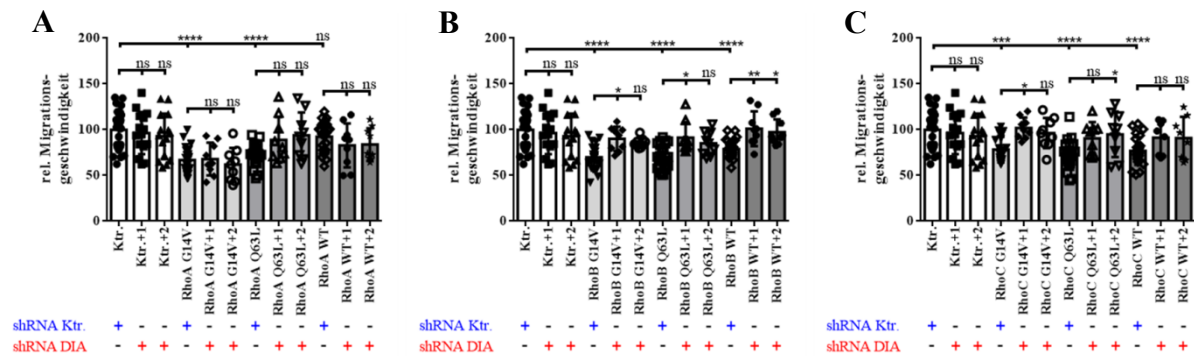


Abbildung 29: Scratch-induzierte Migration von HUVEC nach Überexpression von RhoA-, RhoB- und RhoC-Varianten und zusätzlichem Knockdown des Diaphanous-related Formin 1 (DIAPH1). HUVEC mit einer Überexpression der konstitutiv aktiven (G14V, Q63L) und Wildtyp-Proteinen der RhoGTPasen RhoA (A), RhoB (B) und RhoC (C) wurden zusätzlich über lentivirale Vektoren mit shRNAs (1 und 2) zum Knockdown des DIAPH1 (shRNA DIA +) beziehungsweise einer nicht zielgerichteten Kontroll-shRNA (shRNA Ktr. +), modifiziert. ns = nicht signifikant, * = $P < 0,05$ bis **** = $P < 0,0001$. n = 9 - 30.

Das *Diaphanous-related Formin 1* (DIAPH1) übt als ein Vertreter der Formine eine zentrale Rolle in der Zytoskelettdynamik aus [218, 219] und ist damit wichtig für die Aktinpolymerisation und -reorganisation. Dies sind wesentliche Prozesse bei der Zellbewegung. Darüber hinaus wurde der Effekt von RhoA auf DIAPH1 während der Migration bereits diskutiert [21]. Aus diesem Grund wurde der *Knockdown* von DIAPH1 in An- bzw. Abwesenheit gesteigerter RhoA-, RhoB- und RhoC-Expressionen während der *Scratch*-induzierten Migration analysiert (Abbildung 29A - C). Der *Knockdown* von DIAPH1 in Kontrollzellen hatte keinen signifikanten Einfluss auf die basale Migrationsgeschwindigkeit von HUVEC (Abbildung 29, Ktr.) und beeinflusste zudem weder den Hemmeffekt von RhoA G14V bzw. RhoA Q63L noch den Hemmeffekt von RhoA-Wildtyp (Abbildung 29A). Hingegen führte der *Knockdown* von DIAPH1 zu einer signifikanten Abschwächung des RhoB-vermittelten Hemmeffekts auf die endotheliale Migration (RhoB G14V, RhoB Q63L und RhoB-Wildtyp-Protein, Abbildung 29B). In Zellen mit einer Überexpression des RhoB-Wildtyps induzierte ein DIAPH1-*Knockdown* eine Normalisierung der Migrationsgeschwindigkeit auf Kontrollniveau. Diese Befunde weisen daher auf eine wichtige Rolle des DIAPH1 in der Transduktion migrationshemmender Signale durch RhoB hin. Auch bei der Überexpression von konstitutiv aktivem RhoC und einhergehendem DIAPH1-*Knockdown* wurde die Bewegungsgeschwindigkeit der HUVEC signifikant erhöht und auf das Niveau der Kontrollzellen angehoben (Abbildung 29C). Eine beschleunigte Migration zeigte sich auch nach RhoC-Wildtyp Überexpression und DIAPH1-*Knockdown* in HUVEC (Abbildung 29C).

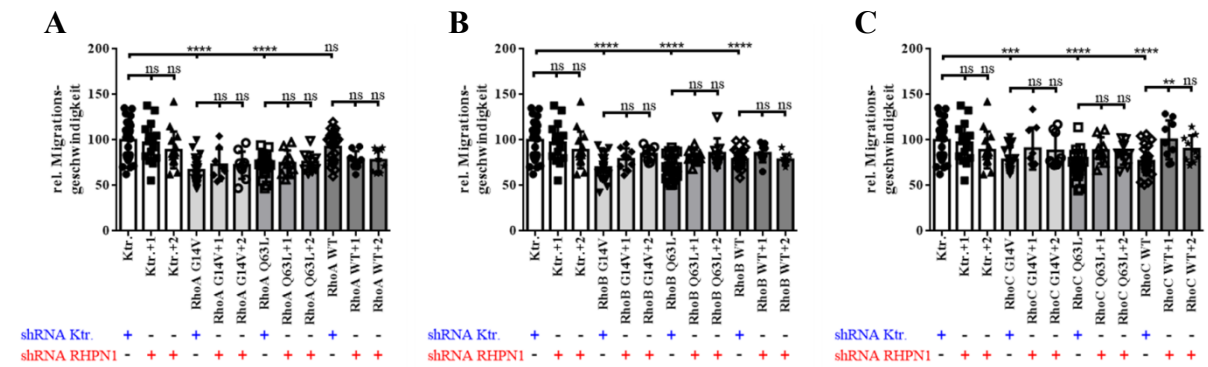


Abbildung 30: Scratch-induzierte Migration von HUVEC nach Überexpression von RhoA-, RhoB- und RhoC-Varianten und zusätzlichem Knockdown des RhoGTPase Bindeproteins 1 (RHPN1). HUVEC mit einer Überexpression der konstitutiv aktiven (G14V, Q63L) und Wildtyp-Proteinen der RhoGTPasen RhoA (A), RhoB (B) und RhoC (C) wurden zusätzlich über lentivirale Vektoren mit shRNAs (1 und 2) zum *Knockdown* des RHPN1 (shRNA RHPN1 +) beziehungsweise einer nicht zielgerichteten KontrollshRNA (shRNA Ktr. +), modifiziert. ns = nicht signifikant, ** = $P < 0,01$ bis **** = $P < 0,0001$. n = 9 - 30.

Die beiden RhoGTPase Bindeproteine 1 und 2 (RHPN1 und RHPN2) spielen bei der Organisation des Aktinzytoskeletts eine Rolle und regulieren die Assemblierung von filamentösem Aktin (F-Aktin) in Abhängigkeit von RhoA in HeLa Zellen [220]. Genauere Erkenntnisse über die entsprechenden Vorgänge in humanen Endothelzellen waren jedoch noch unbekannt. Außerdem ist für RHPN2 eine RhoB-abhängige Lokalisierung in späten Endosomen von COS-7-Zellen beschrieben worden, so dass eine Interaktion mit RhoB vermutet wird [221]. Um nun einen Einfluss von RHPN1 und 2 auf die gerichtete Migration von HUVEC in Anwesenheit von RhoA, RhoB und RhoC zu untersuchen, erfolgte auch für diese Rho-Interaktionspartner ein shRNA-vermittelter *Knockdown* (Abbildung 30, Abbildung 31). Dabei zeigte sich zunächst, dass der *Knockdown* von RHPN1 keinen Einfluss auf das Migrationsverhalten der Kontrollzellen ausübte (Abbildung 30). Auch die Hemmeffekte der konstitutiv aktiven RhoA-Varianten wurden durch RHPN1-*Knockdown* nicht beeinflusst. Die Bewegungsgeschwindigkeit der RhoA-Wildtyp-überexprimierenden Zellen verringerte sich durch den RHPN1-*Knockdown* zudem zusätzlich (Abbildung 30A). Hingegen konnte in den Analysen der RhoB-Varianten beobachtet werden, dass der RHPN1-*Knockdown* eine, statistisch allerdings nicht signifikante, Zunahme der Migrationsgeschwindigkeit induzierte (Abbildung 30B). Ein RHPN1-*Knockdown* führte dagegen zu einer partiellen Antagonisierung der RhoC-vermittelten Hemmeffekte auf die HUVEC-Motilität (Abbildung 30C). Dies könnte auf eine Rolle des RHPN1 als Effektor der RhoC-induzierten Migrationshemmung hindeuten.

Die Effekte auf die Zellbewegung nach Überexpression von RhoC stellten sich verglichen mit RhoA und RhoB anders dar. Ein *Knockdown* von CIT und DIAPH1 resultierte jeweils in einer Antagonisierung der hemmenden Effekte auf die gerichtete Zellbewegung. Zusätzlich konnte eine Reduktion der RhoC-vermittelten Hemmeffekte nach RHPN1- und RHPN2-*Knockdown* beobachtet werden. Es ist demzufolge vorstellbar, dass RhoC die größte Effektorbreite der hier untersuchten RhoGTPasen aufweist und Effekte auf die endotheliale Motilität über CIT, DIAPH1 und möglicherweise auch über RHPN1 und RHPN2 vermitteln kann.

3.8. Sphäroid-basierter *Sprouting*-Assay

Eine wichtige Fähigkeit von Endothelzellen bei der Angiogenese stellt die Ausbildung neuer Kapillargefäße aus bereits bestehenden Gefäßstrukturen dar. Hierbei stimulieren pro-angiogenetische Faktoren, wie beispielsweise der *Vascular Endothelial Cell Growth Factor* (VEGF) die Bildung sogenannter *Tip Cells*, die in umliegendes Gewebe eindringen. Diesen Zellen können weitere Endothelzellen folgen (*Stalk Cells*) und neue, Lumen-gefüllte Gefäße formen. Die Fähigkeit zur angiogenetischen Sprossung und das Phänomen der *Tip Cell-Stalk Cell Competition* kann mit Hilfe des Sphäroid-*Sprouting*-Assays nachvollzogen werden.

Auf diesem Prinzip aufbauend wurde der angiogenetische Einfluss der RhoGTPasen RhoA, RhoB und RhoC in ihren aktiven, inaktiven und Wildtyp-Formen im Sphäroid-basierten *Sprouting*-Assay untersucht. Dazu wurden HUVEC-Zellaggregate (Sphäroide) in einer dreidimensionalen Kollagenmatrix eingebettet und die Aussprossung mit Hilfe von VEGF stimuliert. Hierbei war zunächst zu beobachten, dass HUVEC, unabhängig von der vorgenommenen lentiviralen Infektion mit RhoA-, RhoB-, RhoC- oder Kontrollvektoren und je nach eingesetzter Zellzahl, kompakte, rundliche Zellaggregate (Sphäroide) mit einer Größe von circa 150 µm Durchmesser bildeten (Abbildung 32A).

3.8.1. HUVEC-Sphäroid-basierter *Sprouting*-Assay unter basalen Bedingungen

In Anwesenheit von VEGF zeigten Kontroll-transduzierte HUVEC-Zellaggregate die Bildung zahlreicher Aussprossungen (*Sprouts*) mit einer Länge von bis zu 200 µm. Die *Sprouts* verteilten sich gleichmäßig auf der Sphäroidoberfläche und waren kaum verzweigt (Abbildung 32A). Nach Überexpression der konstitutiv aktiven RhoA-Varianten G14V und Q63L war eine signifikante Minderung im *Sprouting*-Verhalten zu beobachten. Die Anzahl der *Sprouts* war verringert und auch die Sproutlänge war auffallend vermindert. So betrug die relative Gesamtsproutlänge für diese beiden RhoA-Formen nur noch 30% (RhoA G14V),

beziehungsweise 40% (RhoA Q63L) verglichen mit der Kontrolle (Abbildung 32B). Dominant negatives (inaktives) RhoA T19N bewirkte, mit Hinblick auf die bestehende Literatur etwas überraschend [200] keine Veränderung der Gesamtsproutlänge (Abbildung 32B). Das Erscheinungsbild dieser HUVEC-Aggregate glich unter Anwesenheit von VEGF somit dem der Kontrollsphäroide. Eine Überexpression des RhoA-Wildtyp-Proteins induzierte wiederum eine Reduktion der *Sprouting*-Aktivität, was auf eine erhebliche Grundaktivität des RhoA-Systems in humanen Endothelzellen schließen lässt. Anders als bei den aktiven RhoA-Varianten beobachtet, zeigten sich unter Wildtyp-Einfluss *Sprouts* mit einer Länge, die der Kontrolle entsprachen, die Anzahl der Aussprossungen war jedoch deutlich reduziert. Dies führte zu einer um 40% verringerten Gesamtsproutlänge (Abbildung 32B).

Eine Überexpression der vier untersuchten RhoB-Varianten führte zu RhoA-ähnlichen Ergebnissen. Auch hier reduzierten die beiden aktiven Formen die *Sprout*-Anzahl und die Gesamtsproutlänge im Vergleich zur Kontrolle (55% für RhoB G14V; 65% für RhoB Q63L) drastisch (Abbildung 32C). Die RhoB T19N-Mutante veränderte die Qualität und Quantität der Sprossung im Vergleich zur Kontrolle hingegen erneut überraschend nicht. Der Einfluss des RhoB-Wildtyps war nicht so ausgeprägt, wie die für den RhoA-Wildtyp beobachteten inhibitorischen Effekte. Dennoch führte auch die Überexpression des RhoB-Wildtyp-Proteins zu einer leicht verminderten, allerdings statistisch nicht signifikanten, Hemmung der Aussprossung der Endothelzellaggregate, was erneut auf eine Reduktion der Zahl der *Sprouts* zurückzuführen war (Abbildung 32C).

Auch die beiden konstitutiv aktiven RhoC-Varianten bewirkten eine signifikante Reduktion der Gesamtsproutlänge auf 45% (RhoC G14V) und 35% (RhoC Q63L) der Kontrolle (Abbildung 32D). Ähnlich wie bei RhoA und RhoB, führten diese beiden RhoC-Varianten zu einer Reduktion der *Sprout*-Anzahl und -Länge (Abbildung 32A). Hierbei waren bei der G14V-Mutante mehr Verzweigungen der *Sprouts* zu erkennen als bei der Q63L-Mutante (Abbildung 32A). Die RhoC T19N-Variante übte keinen signifikanten Einfluss auf das *Sprouting*-Verhalten humaner Endothelzellen aus, aber auch hier erschienen die *Sprouts* verzweigter als bei den vergleichbaren RhoA-, RhoB- und Kontrollsphäroiden. Im Gegensatz zu den Wildtyp-Formen von RhoA und RhoB, zeigte der RhoC-Wildtyp keine Beeinflussung der Gesamtsproutlänge (Abbildung 32D).

Zusammenfassend kann für das *Sprouting*-Verhalten von HUVEC-Sphäroiden in Anwesenheit von VEGF beobachtet werden, dass die konstitutiv aktiven Varianten von RhoA, RhoB und RhoC die Aussprossung in vergleichbarer Weise signifikant reduzieren. Dagegen haben die jeweiligen dominant negativen T19N-Mutanten keinen Einfluss auf die

Sprout-Anzahl oder die Gesamtsproutlänge. Diese Befunde sind im Einklang mit Ergebnissen aus Untersuchungen mit einem RhoA-Biosensor (siehe: RhoA-Stimulationsversuche mit Thrombin und VEGF), die nahelegen, dass eine VEGF-Stimulation von HUVEC keine nachweisbare RhoA-Aktivierung erzeugt. Die Befunde für die drei untersuchten RhoGTPase-Wildtyp-Formen stellen sich hingegen differenzierter dar. RhoA zeigte einen inhibitorischen Einfluss auf die Gesamtsproutlänge (signifikante Reduktion um 40%) und wies damit einen deutlich stärkeren Einfluss als die RhoB- und RhoC-Wildtypen auf.

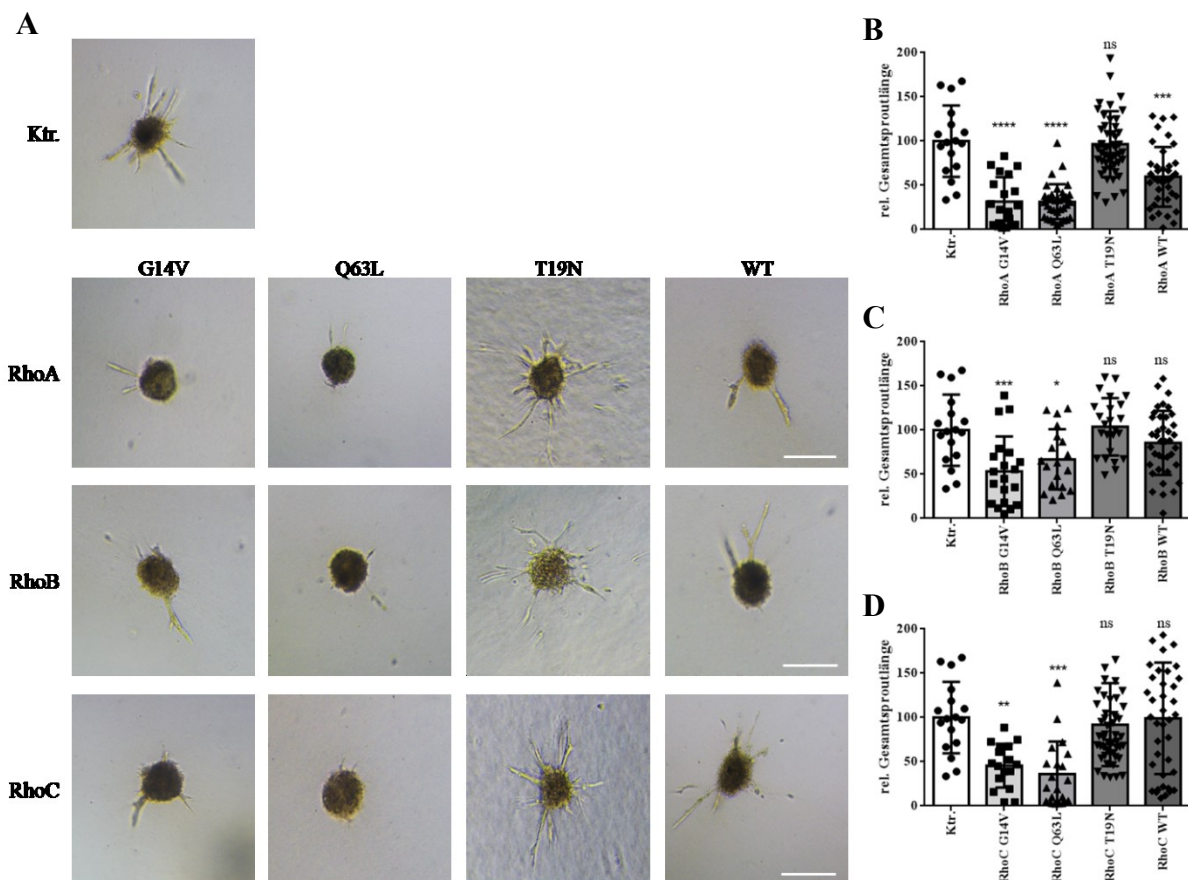


Abbildung 32: VEGF-induzierte *Sprout*-Bildung im Sphäroid-basierten HUVEC-*Sprouting*-Assay nach Überexpression von RhoA-, RhoB- oder RhoC-Varianten. HUVEC-Zellaggregate (Sphäroide) mit einer Überexpression konstitutiv aktiver (G14V, Q63L), dominant negativer (T19N) und Wildtyp-Proteinen der RhoGTPasen RhoA, RhoB und RhoC wurden in einem Gemisch aus Rattenkollagen und Methocel mit 20% FCS eingebettet. Die Bildung von dreidimensionalen Aussprossungen wurde für 24 h unter Anwesenheit von 20 ng/ml VEGF beobachtet. Maßstabsbalken = 200 µm (A). Der Einfluss der untersuchten Varianten von RhoA (B), RhoB (C) und RhoC (D) auf das Sprossverhalten von HUVEC-Sphäroiden ermittelte sich durch die Gesamtlänge der Aussprossungen. ns = nicht signifikant, * = $P < 0,05$ bis **** = $P < 0,0001$. n = 30 - 50.

3.8.2. HUVEC-Sphäroid-basierter *Sprouting*-Assay mit einer Hemmung der RhoGTPasen durch C3 Transferase aus *Clostridium botulinum*

Um die Reversibilität der Rho-vermittelten Hemmeffekte auf das HUVEC-*Sprouting* zu überprüfen, erfolgte die Hemmung der RhoGTPasen mit dem Exoenzym C3 Transferase aus *Clostridium botulinum* (Abbildung 33A). Auffällig dabei war die 2,5fache Erhöhung der Gesamtsproutlänge in HUVEC-Sphäroiden der Kontrollgruppe. Somit wirkte sich die Hemmung endogen exprimierter RhoGTPasen, entgegen anderer Befunde [200], deutlich fördernd auf die angiogenetische Sprossbildung aus (Abbildung 33B). Zudem führte die Exoenzym C3 Transferase auch zu einer Antagonisierung der Hemmeffekte aktiver RhoA-Varianten, wobei für RhoA G14V und das Wildtyp-Protein Gesamtsproutlängen im Bereich der Kontrollbedingungen beobachtet wurden. Lediglich die Effekte der RhoA Q63L-Mutante ließen sich hierdurch nicht vollständig normalisieren, was Hinweise auf alternative Effektor-domänen der konstitutiv aktiven Varianten, welche nicht von der ADP-Ribosylierung betroffen sind, geben könnte. Allerdings konnte auch für diese Variante eine 8,5fache Erhöhung der Gesamtsproutlänge durch Zugabe der C3 Transferase erreicht werden (Abbildung 33B). Im Gegensatz zu RhoA wurde der Hemmeffekt aktiver RhoB-Varianten (G14V und Q63L) nur unvollständig durch die C3 Transferase antagonisiert. Hingegen führte die C3 Transferase zu einer fast vollständigen Antagonisierung RhoB-Wildtyp-vermittelter Effekte mit einer 6fachen Steigerung der Gesamtsproutlänge (Abbildung 33C).

Für den Einfluss der C3 Transferase auf die Hemmeffekte der RhoC-Varianten konnten ähnliche Effekte wie für RhoA beobachtet werden (Abbildung 33D). Die deutlichsten Einflüsse des Rho-Inhibitors zeigten sich hierbei für RhoC G14V und den RhoC-Wildtyp, wobei hier sogar eine Steigerung der Sproutlänge über das Maß der entsprechenden Kontrollgruppe hinaus detektiert werden konnte (1,6fach für RhoC G14V und 1,7fach für RhoC-Wildtyp). Die Effekte des Rho-Inhibitors waren, wie für RhoA beobachtet, geringer ausgeprägt für die Q63L-Mutante des RhoC (4,8fache Steigerung der Gesamtsproutlänge im Vergleich zu RhoC Q63L). Entsprechend zeigten sich auch hier Unterschiede zwischen den beiden aktiven Varianten, die auf eine erhöhte Aktivität der Q63L-Mutante hindeuten könnten. In diesem Zusammenhang können Unterschiede in der Transduktionseffizienz, des zellulären Expressionsniveaus und potentiell auch durch die C3 Transferase nicht blockierte Protein-Protein-Interaktion eine Rolle spielen.

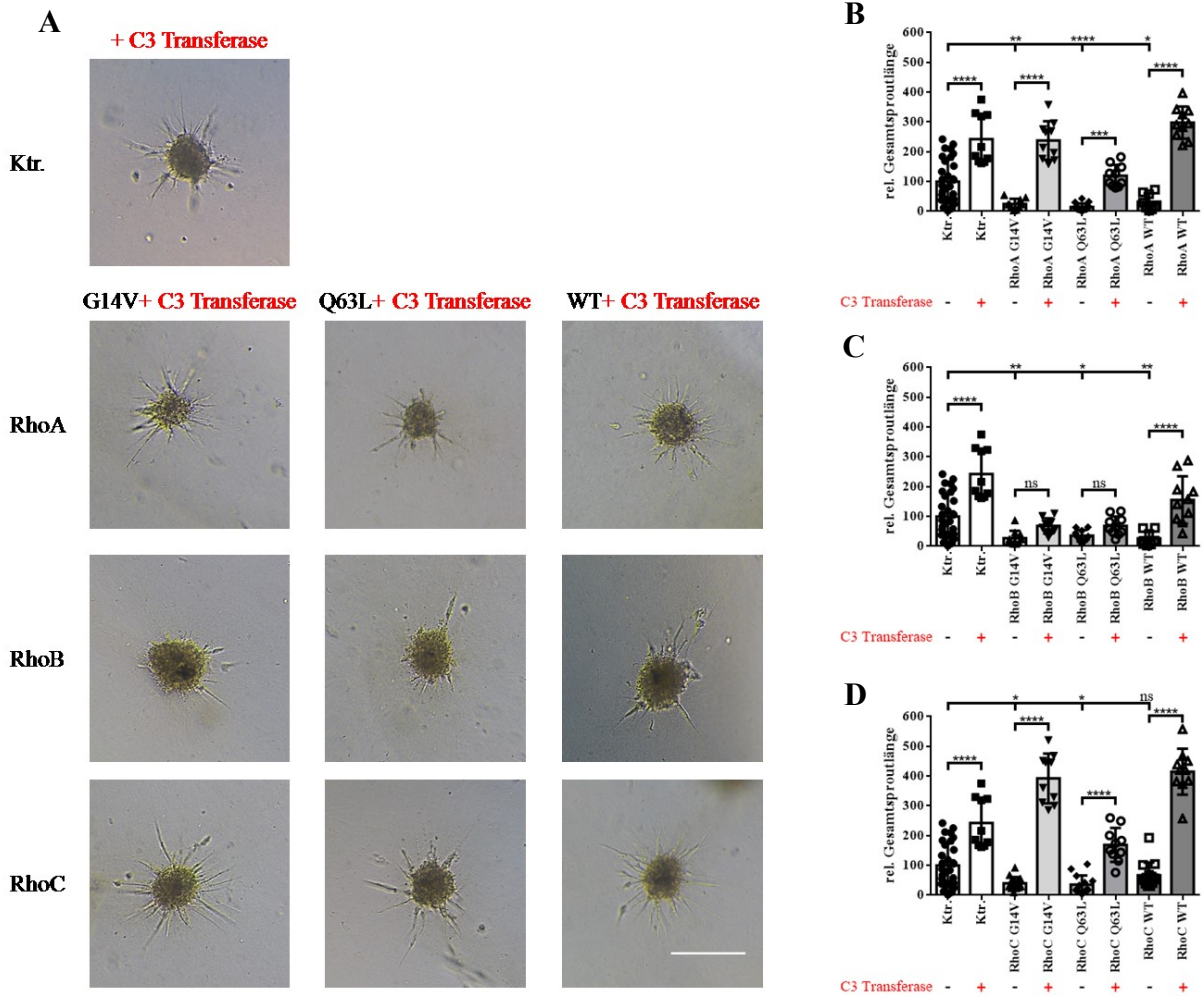


Abbildung 33: VEGF-induzierte *Sprout*-Bildung im Sphäroid-basierten HUVEC-*Sprouting*-Assay nach Überexpression von RhoA-, RhoB- und RhoC-Varianten in Anwesenheit der RhoGTPase-hemmenden C3 Transferase aus *Clostridium botulinum*. HUVEC-Zellaggregate (Sphäroide) mit einer Überexpression konstitutiv aktiver (G14V, Q63L) und Wildtyp-Proteinen der RhoGTPasen RhoA, RhoB und RhoC wurden in einem Gemisch aus Rattenkollagen und Methocel mit 20% FCS eingebettet. Die Bildung von dreidimensionalen Aussprossungen wurde für 24 h unter Anwesenheit von 20 ng/ml VEGF beobachtet. Maßstabsbalken = 200 μ m (A). Die relative Gesamtsproutlänge ergab sich aus der Summe aller Aussprossungen, normiert auf Kontroll-transduzierten HUVEC (Ktr.). Untersucht wurden neben Kontroll-transduzierten Zellen, HUVEC mit einer Überexpression von konstitutiv aktiven (G14V, Q63L) und Wildtyp-Proteinen (WT) der RhoGTPasen RhoA (A, B), RhoB (A, C) und RhoC (A, D) in Anwesenheit (+) von 1 μ g/ml C3 Transferase aus *Clostridium botulinum*, beziehungsweise der entsprechenden Lösungsmittelkontrolle (-). ns = nicht signifikant, * = $P < 0,05$ bis **** = $P < 0,0001$. n = 10 - 15.

3.8.3. HCAEC-Sphäroid-basierter *Sprouting*-Assay unter basalen Bedingungen und nach Hemmung der RhoGTPasen durch C3 Transferase aus *Clostridium botulinum*

Die erhaltenen Befunde nach Expression der untersuchten RhoGTPasen RhoA, RhoB und RhoC im HUVEC-Sphäroid-basierten *Sprouting*-Assay wurden zusätzlich auch in humanen arteriellen Endothelzellen (*Human Coronary Artery Endothelial Cells*, HCAEC) überprüft. Hierzu wurden HCAEC-Sphäroide methodisch analog zu den HUVEC-Experimenten

untersucht (Abbildung 34). Dabei konnten die Beobachtungen aus den HUVEC-Versuchen in HCAEC weitestgehend bestätigt werden (Abbildung 34B - D). So führte konstitutive RhoA-, RhoB- und RhoC-Aktivität auch in HCAEC-Sphäroiden zu einer signifikanten Beeinträchtigung des endothelialen *Sproutings* (Ausnahme RhoC G14V, dessen Überexpression einen nicht-signifikanten Trend zur *Sprout*-Hemmung induzierte). Die Expression der dominant negativen Rho-Varianten (T19N) zeigte in Übereinstimmung mit den HUVEC-Ergebnissen auch in HCAEC keinen signifikanten Einfluss auf die *Sprout*bildung (Abbildung 34B - D). Ein Unterschied zwischen den Ergebnissen für HUVEC und HCAEC wurde für die Überexpression der RhoA- bzw. RhoB-Wildtyp-Proteine festgestellt, die nach der Expression in HCAEC keine signifikant hemmende Wirkung (RhoA) bzw. eine stark hemmende Wirkung auf das *Sprouting*-Verhalten (RhoB) zeigten (Abbildung 34B - C). Durch die Expression des RhoA Wildtyp-Proteins in HCAEC konnte zumindest ein nicht-signifikanter Trend zur Hemmung der *Sprout*bildung beobachtet werden, was grundsätzlich die in HUVEC-Versuchen gefundene inhibierende Wirkung dieser Variante bestätigte.

Die RhoGTPase Hemmung durch C3 Transferase-Behandlung führte, wie bereits in entsprechenden Versuchen bei HUVEC beobachtet, in Kontroll-transduzierten HCAEC zum *Hypersprouting* und somit zu einer stark erhöhten *Sprout*bildung. Die durch RhoA- und RhoC-Aktivität induzierten Hemmeffekte konnten durch die Behandlung mit C3 Transferase vollständig aufgehoben werden. Ebenso waren die Hemmeffekte durch eine Expression des RhoB-Wildtyp-Proteins vollständig reversibel, wohingegen die *Sprout*-Hemmung durch konstitutive RhoB-Aktivität in übereinstimmender Weise mit den HUVEC-Befunden nur partiell aufgehoben werden konnte. Ein Einfluss der RhoGTPase-Hemmung durch C3 Transferase nach Expression dominant negativer RhoA-, RhoB- oder RhoC-Varianten (T19N) konnte nicht beobachtet werden (Abbildung 34B - D).

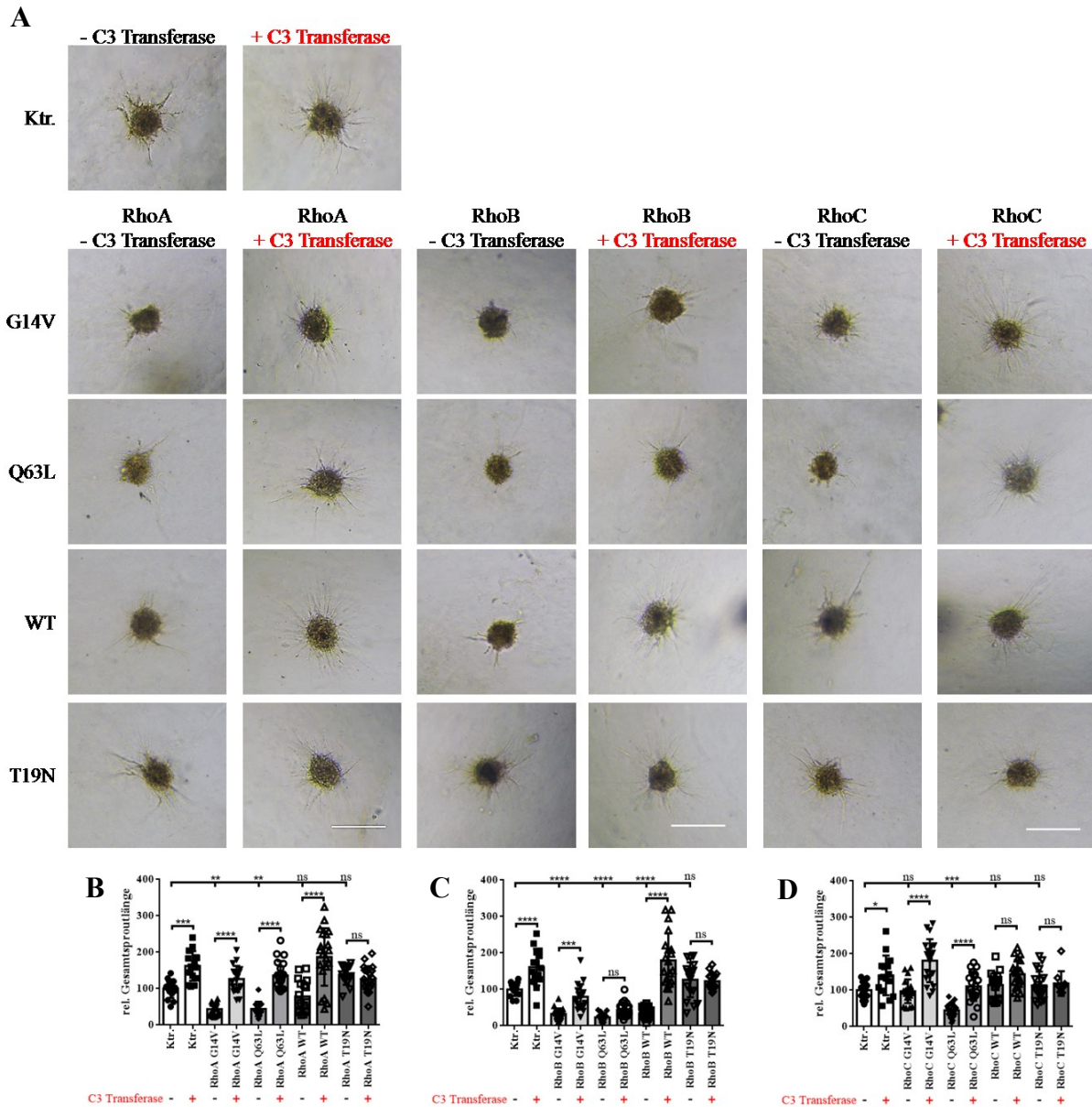


Abbildung 34: VEGF-induzierte *Sprout*-Bildung im Sphäroid-basierten HCAEC-*Sprouting*-Assay nach Überexpression von RhoA-, RhoB- und RhoC-Varianten in An- bzw. Abwesenheit der RhoGTPase-hemmenden C3 Transferase aus *Clostridium botulinum*. HCAEC-Zellaggregate (Sphäroide) mit einer Überexpression konstitutiv aktiver (G14V, Q63L), dominant negativer (T19N) und Wildtyp-Proteinen der RhoGTPasen RhoA, RhoB und RhoC wurden in einem Gemisch aus Rattenskollagen und Methocel mit 20% FCS eingebettet. Die Bildung von dreidimensionalen Aussprossungen wurde für 24 h unter Anwesenheit von 20 ng/ml VEGF beobachtet. Maßstabsbalken = 200 μ m (A). Die relative Gesamtsproutlänge ergab sich aus der Summe aller Aussprossungen, normiert auf Kontroll-transduzierte HCAEC (Ktr.). Untersucht wurden neben Kontroll-transduzierten Zellen, HCAEC mit einer Überexpression von konstitutiv aktiven (G14V, Q63L), dominant negativen (T19N) und Wildtyp-Proteinen (WT) der RhoGTPasen RhoA (B), RhoB (C) und RhoC (D) in Anwesenheit (+) von 1 μ g/ml C3 Transferase aus *Clostridium botulinum* beziehungsweise der entsprechenden Lösungsmittelkontrolle (-). ns = nicht signifikant, * = $P < 0,05$ bis **** = $P < 0,0001$. n = 13 - 20.

3.8.4. Einfluss einer Hemmung der direkten bzw. indirekten Rho-Effektoren ROCK, LIMK1, LIMK2 und Myosin II auf RhoGTPase-vermittelte anti-angiogenetische Effekte in HUVEC

Auch im dreidimensionalen HUVEC-Sphäroid-basierten *Sprouting*-Assay wurde der Einfluss einer pharmakologischen Hemmung der direkten bzw. indirekten Rho-Effektoren ROCK, LIMK1, LIMK2 sowie Myosin II untersucht. BMS4 fungierte dabei als LIMK1-Inhibitor [211], LX7101 als LIMK2-Inhibitor [212] und das verwendete Y-27632 als nicht selektiver ROCK1/2-Inhibitor [213]. Blebbistatin wurde als Myosin II-Hemmstoff verwendet. Es übt einen Aktin-assoziierten Einfluss auf die Migration aus [214, 215] und damit möglicherweise auch auf das *Sprouting*-Verhalten von HUVEC. Unter Zugabe des LIMK2-Inhibitors LX7101 konnte zunächst eine Zunahme der Sproutlänge um 80% in Kontroll-transduzierten, VEGF-stimulierten HUVEC-Sphäroiden beobachtet werden (Abbildung 35). Auch nach Überexpression der RhoA-Varianten RhoA G14V, RhoA Q63L und dem RhoA-Wildtyp, die alle eine Verringerung der Gesamtsproutlänge hervorriefen, kam es unter Behandlung mit LX7101 zu einer erheblichen Steigerung der Sproutlänge (Abbildung 35A) um 70% (RhoA G14V), 60% (RhoA Q63L) und 56% (RhoA-Wildtyp). Allerdings konnte durch die pharmakologische Blockade der LIMK2 nicht das Niveau der Kontrollzellen erreicht werden. Diese Befunde deuten auf eine eher untergeordnete aber mögliche Beteiligung der LIMK2 an der RhoA-vermittelten Hemmung der HUVEC-*Sprout*-Bildung hin. Ähnlich stellten sich die Befunde nach RhoB-Überexpression (G14V, Q63L und Wildtyp) dar (Abbildung 35B). Hier wurde die Sproutlänge unter LX7101-Zugabe nach Expression von RhoB G14V um 80% und damit in vergleichbarer Weise wie bei Kontroll-transduzierten Zellen erhöht. Zudem konnte eine nicht signifikante Antagonisierung der RhoB Q63L-vermittelten und eine signifikante Hemmung der RhoB-Wildtyp-vermittelten Hemmeffekte auf das VEGF-induzierte angiogenetische *Sprouting* beobachtet werden. Die Einflüsse einer LX7101-Behandlung auf RhoC G14V-, Q63L- oder RhoC-Wildtyp-exprimierende HUVEC waren vergleichbar mit den Ergebnissen für RhoA- und RhoB-exprimierende HUVEC. Allerdings führte eine LIMK2-Hemmung nur zu einer nicht signifikanten Antagonisierung der Hemmeffekte konstitutiv aktiver RhoC-Varianten (Abbildung 35C), während das angiogenetische *Sprouting* RhoC-Wildtyp-exprimierender HUVEC deutlich und signifikant verstärkt wurde (Abbildung 35C).

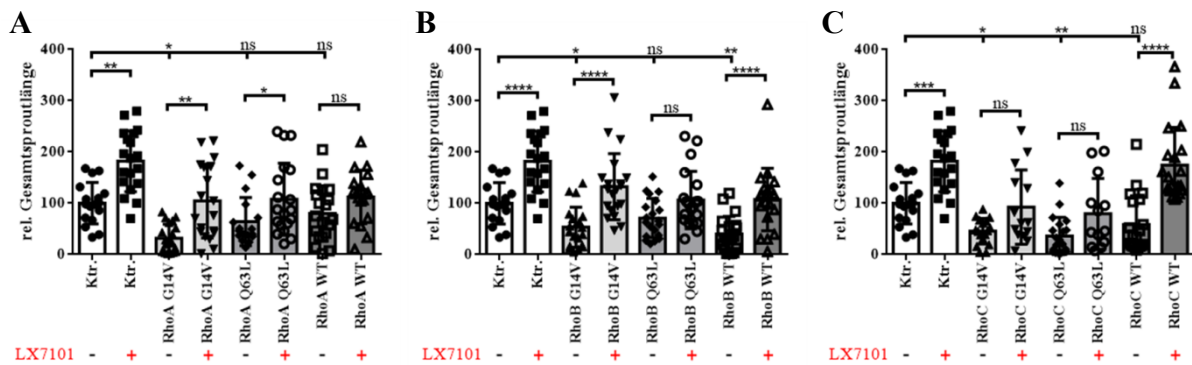


Abbildung 35: VEGF-induzierte *Sprout*-Bildung im Sphäroid-basierten HUVEC-*Sprouting*-Assay nach Überexpression von RhoA-, RhoB- und RhoC-Varianten in An- bzw. Abwesenheit des pharmakologischen LIMK2-Inhibitors LX7101. Die relative Gesamtsproutlänge ergab sich aus der Summe aller Aussprossungen, normiert auf Kontroll-transduzierte HUVEC (Ktr.). Untersucht wurden neben Kontroll-transduzierten Zellen HUVEC mit einer Überexpression von konstitutiv aktiven (G14V, Q63L) und Wildtyp-Proteinen (WT) der RhoGTPasen RhoA (A), RhoB (B) und RhoC (C) in Anwesenheit (+) von 3 μ M LX7101 (LIMK2-Inhibitor) beziehungsweise der entsprechenden Lösungsmittelkontrolle (-). ns = nicht signifikant, * = $P < 0,05$ bis **** = $P < 0,0001$. n = 17 - 20.

Im Gegensatz zur Hemmung der LIMK2 durch LX7101 hatte die alleinige Hemmung der LIMK1 durch BMS4 keine stimulierende Wirkung auf die VEGF-induzierte *Sprouting*-Aktivität in Kontrollsphäroiden (Abbildung 36). Zudem führte eine LIMK1-Hemmung nicht zur Antagonisierung RhoA-vermittelter Hemmeffekte der G14V-Variante oder des RhoA-Wildtyps. Hingegen antagonisierte BMS4 RhoA Q63L-vermittelte Hemmeffekte signifikant. Interessanterweise scheinen sich somit die beiden konstitutiv aktiven RhoA-Varianten hinsichtlich ihrer nachgeschalteten LIMK1-Aktivierung zu unterscheiden (Abbildung 36A). Im Gegensatz dazu hatte eine LIMK1-Hemmung keinen Einfluss auf RhoB-vermittelte anti-angiogenetische Effekte (Abbildung 36B). Für die Q63L- und die Wildtyp-Form des RhoB zeigte sich sogar ein Trend zur Verstärkung des Hemmeffekts unter BMS4-Behandlung (Abbildung 36B). Auch in RhoC-überexprimierenden HUVEC verstärkte die LIMK1-Hemmung, allerdings nicht signifikant, die anti-angiogenetischen Effekte der konstitutiv aktiven Varianten, was darauf hindeutet, dass RhoC Effektoren aktiviert, welche eine nachgeschaltete Aktivierung der LIMK2 begünstigen (Abbildung 36C). Somit scheint insbesondere aktives RhoC seine hemmenden Einflüsse auf die *Sprout*-Bildung über eine Aktivierung der LIMK2 zu vermitteln und darüber möglicherweise eine erhöhte Aktinfilament- und Mikrotubulistabilität zu generieren [222].

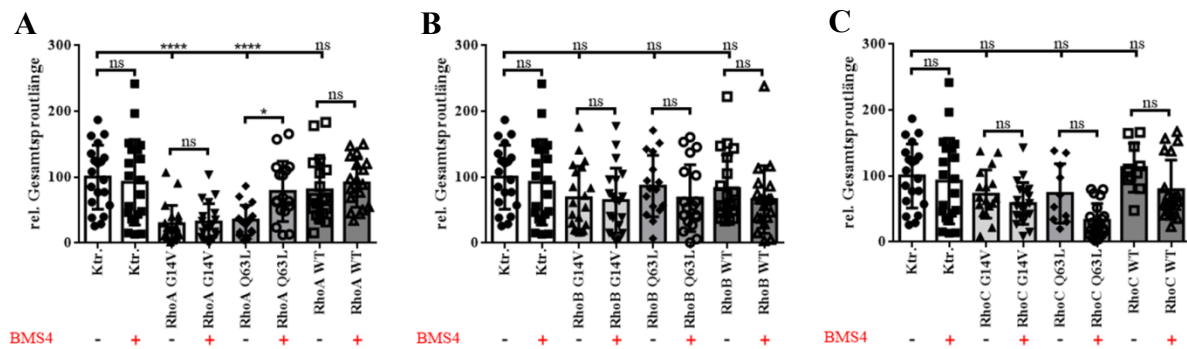


Abbildung 36: VEGF-induzierte *Sprout*-Bildung im Sphäroid-basierten HUVEC-*Sprouting*-Assay nach Überexpression von RhoA-, RhoB- und RhoC-Varianten in An- bzw. Abwesenheit des pharmakologischen LIMK1-Inhibitors BMS4. Die relative Gesamtsproutlänge ergab sich aus der Summe aller Aussprossungen, normiert auf Kontroll-transduzierte HUVEC (Ktr.). Untersucht wurden neben Kontroll-transduzierten Zellen HUVEC mit einer Überexpression von konstitutiv aktiven (G14V, Q63L) und Wildtyp-Proteinen (WT) der RhoGTPasen RhoA (A), RhoB (B) und RhoC (C) in Anwesenheit (+) von 0,5 μ M BMS4 (LIMK1-Inhibitor) beziehungsweise der entsprechenden Lösungsmittelkontrolle (-). ns = nicht signifikant, * = $P < 0,05$ bis **** = $P < 0,0001$. n = 18 - 20.

Die Hemmung von Rho-Kinasen mittels Y-27632 führte in Kontroll-transduzierten Sphäroiden zu einer 100%igen Zunahme der Gesamtsproutlänge (Abbildung 37). Somit scheint eine Hemmung der Rho-Kinasen *per se* pro-angiogenetische Einflüsse auf HUVEC auszuüben. Dieser Effekt konnte auch in Rho-überexprimierenden HUVEC beobachtet werden (Abbildung 37A). Für die aktive Q63L-Mutante und das Wildtyp-Protein des RhoA konnten unter dem Einfluss von Y-27632 ebenfalls eine Zunahme der Gesamtsproutlänge beobachtet werden, wobei RhoA-vermittelte Hemmeffekte insbesondere der G14-Variante nicht auf Kontrollniveau antagonisiert werden konnten. Im Gegensatz dazu hatte die pharmakologische Hemmung der ROCK keinen signifikanten Einfluss auf anti-angiogenetische Effekte nach einer RhoB-Überexpression in HUVEC (Abbildung 37B). Diese Befunde deuten darauf hin, dass anti-angiogenetische Effekte des RhoB nicht von der Aktivierung der ROCK abhängen. Auch für die gesteigerte Expression der beiden aktiven RhoC-Mutanten G14V und Q63L zeigte sich lediglich eine nicht signifikante Antagonisierung des anti-angiogenetischen Effekts durch Y-27632-Behandlung. Die antagonisierende Wirkung bzw. der pro-angiogenetische Effekt des ROCK-Inhibitors war zudem nicht so ausgeprägt, wie für die entsprechenden RhoA-Varianten beobachtet und fehlte gänzlich nach Überexpression des RhoC-Wildtyp-Proteins (Abbildung 37C).

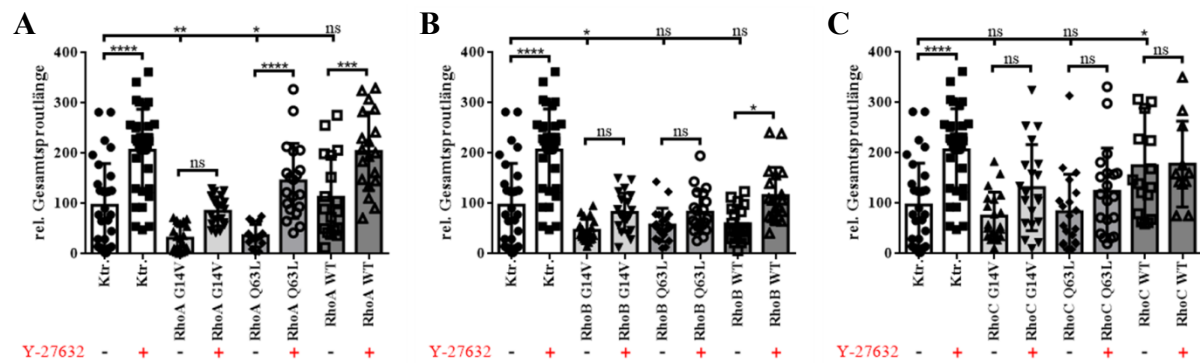


Abbildung 37: VEGF-induzierte *Sprout*-Bildung im Sphäroid-basierten HUVEC-*Sprouting*-Assay nach Überexpression von RhoA-, RhoB- und RhoC-Varianten in An- bzw. Abwesenheit des pharmakologischen ROCK-Inhibitors Y-27632. Die relative Gesamtsproutlänge ergab sich aus der Summe aller Aussprossungen, normiert auf Kontroll-transduzierte HUVEC (Ktr.). Untersucht wurden neben Kontroll-transduzierten Zellen HUVEC mit einer Überexpression von konstitutiv aktiven (G14V, Q63L) und Wildtyp-Proteinen (WT) der RhoGTPasen RhoA (A), RhoB (B) und RhoC (C) in Anwesenheit (+) von 10 μ M Y-27632 (ROCK-Inhibitor) beziehungsweise der entsprechenden Lösungsmittelkontrolle (-). ns = nicht signifikant, * = $P < 0,05$ bis **** = $P < 0,0001$. n = 20 - 34.

Blebbistatin als Myosin II-Inhibitor führte durch einen starken Anstieg der *Sprout*-Anzahl, zahlreichere Verzweigungen und längere Aussprossungen zu einem signifikanten Anstieg der Gesamtsproutlänge bei Kontrollsphäroiden (Abbildung 38). Die Verringerung der Zellspannung durch die pharmakologische Hemmung des Myosin II wirkte sich somit fördernd auf das *Sprouting* aus und führte zum *Hypersprouting* [223].

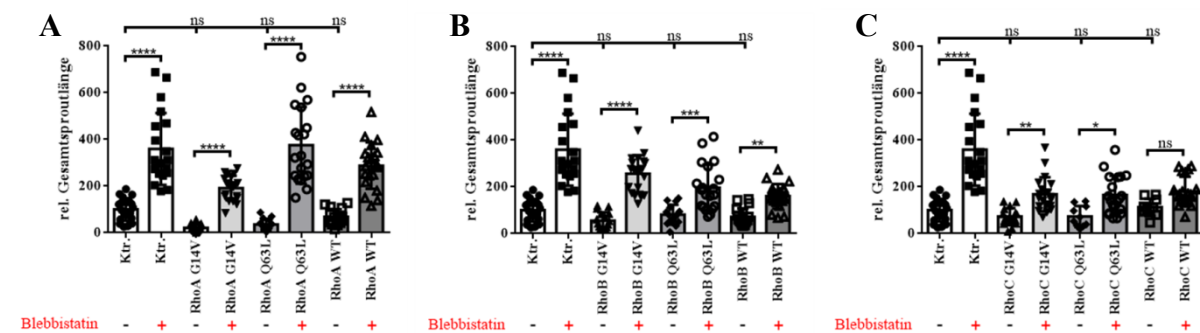


Abbildung 38: VEGF-induzierte *Sprout*-Bildung im Sphäroid-basiertern HUVEC-*Sprouting*-Assay nach Überexpression von RhoA-, RhoB- und RhoC-Varianten in An- bzw. Abwesenheit des pharmakologischen Myosin II-Inhibitors Blebbistatin. Die relative Gesamtsproutlänge ergab sich aus der Summe aller Aussprossungen normiert auf Kontroll-transduzierte HUVEC (Ktr.). Untersucht wurden neben Kontroll-transduzierten Zellen, HUVEC mit einer Überexpression von konstitutiv aktiven (G14V, Q63L) und Wildtyp-Proteinen (WT) der RhoGTPasen RhoA (A), RhoB (B) und RhoC (C) in Anwesenheit (+) von 30 μ M Blebbistatin (Myosin II-Inhibitor) beziehungsweise der entsprechenden Lösungsmittelkontrolle (-). ns = nicht signifikant, * = $P < 0,05$ bis **** = $P < 0,0001$. n = 15 - 20.

Zudem antagonisierte Blebbistatin die RhoA-vermittelten Hemmeffekte der konstitutiv aktiven Varianten und des Wildtyps in RhoA-überexprimierenden HUVEC-Sphäroiden (Abbildung 38A). Hingegen führte Blebbistatin nicht zur Normalisierung von RhoB- bzw. RhoC-vermittelten Hemmeffekten auf das VEGF-induzierte *Sprouting* aus HUVEC-Sphäroiden (Abbildung 38B und C).

Zusammenfassend deuten die Analysen zum Einfluss einer pharmakologischer Hemmung der LIMK1 und 2, der ROCK1 und 2 sowie der Myosin II-Aktivität somit darauf hin, dass ROCK, LIMK2 und Myosin II als Negativregulatoren bzw. Modulatoren der Sproutbildung aus HUVEC-Sphäroiden fungieren und ihre Blockade *Hypersprouting* induzieren kann. Ein verstärktes Sprouting ist hierbei vermutlich auf die verringerte Zellspannung zurückzuführen, da die Rho-Kinasen, die LIM-Kinasen als nachgeschaltete Effektoren der Rho-Kinasen und auch Myosin II Zellspannung durch Förderung der Bildung von Aktinstressfasern begünstigen. Zudem ist verstärktes angiogenetisches *Sprouting* bereits als Folge einer ROCK-Blockade oder eines ROCK-*Knockdowns* beschrieben worden [181, 223]. In diesem Zusammenhang konnte für die LX7101-vermittelte Hemmung der LIMK2 gezeigt werden, dass sie die RhoA-, RhoC- und geringer auch die RhoB-vermittelte Hemmung des angiogenetischen *Sproutings* partiell antagonisierte, während eine pharmakologische Blockade der LIMK1 durch BMS4 den inhibitorischen Effekt der RhoGTPasen, mit paradoxer Ausnahme der RhoA Q63L-Variante im Trend sogar verstärkte. Möglicherweise führte die LIMK1-Blockade zu einem Überwiegen LIMK2-vermittelter Signale in Endothelzellen. Die pharmakologische Blockade der ROCK durch Y-27632 beeinflusste teilweise RhoA-vermittelte Hemmeffekte auf das angiogenetische *Sprouting* von humanen Endothelzellen, weniger hingegen RhoB- und RhoC-induzierte Hemmeffekte. Dies könnte darauf hindeuten, dass RhoA seinen hemmenden Einfluss auf die Gesamtsproutlänge über die Aktivierung von Rho-Kinasen, welche bekannte Effektoren des RhoA darstellen [216], induziert, während Rho-Kinasen als RhoB- und RhoC-Effektoren vermutlich eine geringere Bedeutung in diesem Zusammenhang zukommen. Die Inhibierung von Myosin II durch Blebbistatin führt zu einem *Hypersprouting* von endothelial differenzierten Sphäroiden aus murinen, embryonalen Stammzellen [223]. Dieses Phänomen zeigte sich auch für HUVEC-Sphäroide [181]. Die Hemmung von Myosin II-Aktivität durch Blebbistatin konnte zudem zum Teil RhoA-vermittelte Hemmeffekte auf das HUVEC-*Sprouting* antagonisieren, während RhoB- und RhoC-vermittelte Hemmeffekte sich hierdurch kaum beeinflussen ließen. Somit deuten diese Befunde darauf hin, dass die anti-angiogenetische Zellspannung [223] und Stressfaserassemblierung, welche durch RhoA-Aktivität in Endothelzellen und anderen Zelltypen vermittelt wird [224], ihren negativen Einfluss unter Blebbistatin-Behandlung von HUVEC-Sphäroiden verliert und so eine Zunahme der Sprossung fast auf Kontrollniveau erreicht werden konnte.

Neben dem ROCK-LIMK-Myosin II-Signalweg bzw. der Zellspannung scheinen jedoch noch weitere Signale an der Vermittlung anti-angiogenetischer Effekte, insbesondere von RhoB

und RhoC, beteiligt zu sein. So konnte durch die pharmakologische Blockade der genannten Signalmoleküle keine Normalisierung des angiogenetischen *Sproutings* auf das Niveau Kontroll-transduzierter Endothelzellen erreicht werden.

3.8.5. *Knockdown* der Rho-Effektoren CIT, DIAPH1, RHPN1 und RHPN2 in HUVEC und ihr Einfluss auf Rho-vermittelte Hemmeffekte im Sphäroid-basierten *Sprouting*-Assay

Zusätzlich zur pharmakologischen Hemmung potenzieller Rho-Interaktionspartner des ROCK-LIMK-Myosin II-Signalwegs wurden auch im Sphäroid-basierten *Sprouting*-Assay, durch shRNA-vermittelten *Knockdown* (Anhang: Abbildung 53) die Rolle der Rho-Effektoren CIT, DIAPH1, RHPN1 und RHPN2 untersucht. Für alle genannten Effektoren ist beschrieben, dass sie einen Einfluss auf das Aktinzytoskelett und dessen Dynamik sowie Stabilität haben [218, 220, 221]. Hierüber beeinflussen sie die Zellbewegung, Zellteilung und Zellmorphologie. Um ihren Einfluss auf die Ausbildung von angiogenetischen *Sprouts* aus HUVEC-Sphäroiden, welche die konstitutiv aktiven Mutanten und die Wildtyp-Proteine der RhoGTPasen RhoA, RhoB und RhoC exprimierten, zu analysieren, wurde parallel ein shRNA-vermittelter *Knockdown* durchgeführt. Damit sollte untersucht werden, ob diese Effektoren eine Bedeutung für die *Sprout*-hemmende Wirkung der genannten RhoGTPasen besitzen. Die *Sprout*-Bildung wurde auch in diesem experimentellen Ansatz durch VEGF stimuliert.

Zunächst konnte festgestellt werden, dass der *Knockdown* der CIT in Kontrollsphäroiden keinen signifikanten Einfluss auf das *Sprouting*-Verhalten von HUVEC-Sphäroiden ausübte.

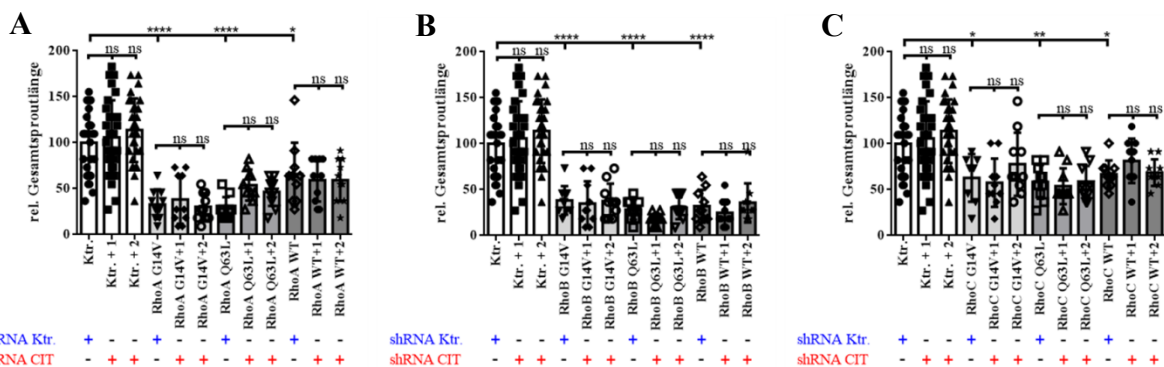


Abbildung 39: VEGF-induzierte *Sprout*-Bildung im Sphäroid-basierten HUVEC-*Sprouting*-Assay nach Überexpression von RhoA-, RhoB- und RhoC-Varianten sowie einem shRNA-vermitteltem *Knockdown* der CIT. HUVEC mit einer Überexpression der konstitutiv aktiven (G14V, Q63L) und Wildtyp-Proteine der RhoGTPasen RhoA (A), RhoB (B) und RhoC (C) wurden zusätzlich über lentivirale Vektoren mit shRNAs (1 und 2) zum *Knockdown* der CIT (shRNA CIT +) beziehungsweise einer nicht zielgerichteten Kontroll-shRNA (shRNA Ktr. +) modifiziert. Die relative Gesamtsproutlänge, normiert auf Kontroll-transduzierte HUVEC (Ktr. + shRNA Ktr. +), ergab sich aus der Summe der Gesamtsproutlängen. ns = nicht signifikant, * = $P < 0,05$ bis **** = $P < 0,0001$. n = 10 - 30.

Der RhoA G14V- bzw. RhoA Wildtyp-vermittelte Rückgang des Sproutings konnte zudem nicht durch einen *Knockdown* der CIT beeinflusst werden (Abbildung 39A). Hingegen kam es durch den *CIT-Knockdown* zur partiellen Reduktion des RhoA Q63L-induzierten Hemmeffekts, was auf einen funktionellen Unterschied der beiden konstitutiv aktiven Varianten mit Hinblick auf Effektorpräferenz und einem mutationsbedingten, veränderten Interaktionsverhalten zwischen aktivem RhoA und CIT hindeuten könnte (Abbildung 39A). Ebenso wurden die RhoB- und RhoC-vermittelten Hemmeffekte auf das angiogenetische *Sprouting* durch einen *Knockdown* von CIT nicht verändert (Abbildung 39B und C).

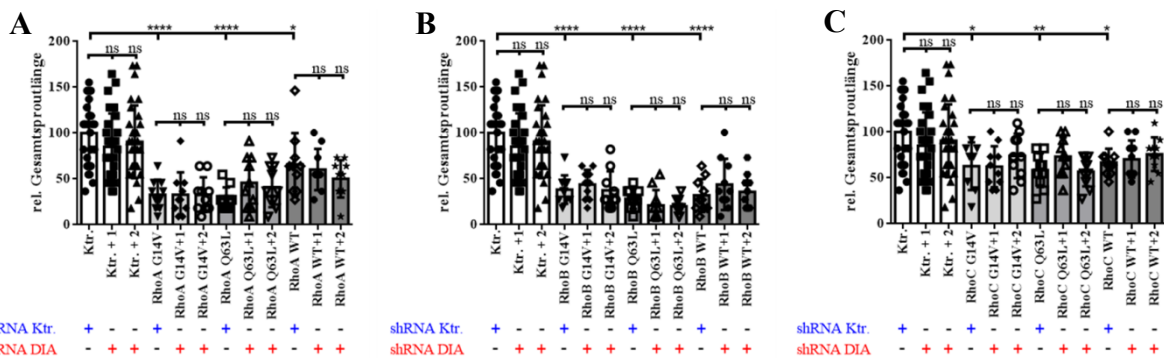


Abbildung 40: VEGF-induzierte *Sprout*-Bildung im Sphäroid-basierten *Sprouting*-Assay nach Überexpression von RhoA-, RhoB- und RhoC-Varianten sowie einem shRNA-vermittelten *Knockdown* des DIAPH1. HUVEC mit einer Überexpression der konstitutiv aktiven (G14V, Q63L) und Wildtyp-Proteine der RhoGTPasen RhoA (A), RhoB (B) und RhoC (C) wurden zusätzlich über lentivirale Vektoren mit shRNAs (1 und 2) zum *Knockdown* des DIAPH1 (shRNA DIA +) beziehungsweise einer nicht zielgerichteten KontrollshRNA (shRNA Ktr. +), modifiziert. Die relative Gesamtsproutlänge, normiert auf Kontroll-transduzierte HUVEC (Ktr. + shRNA Ktr. +) ergab sich aus der Summe der Gesamtsproutlängen. ns = nicht signifikant, * = $P < 0,05$ bis **** = $P < 0,0001$. n = 10 - 30.

Zunächst wurde beobachtet, dass der *Knockdown* von DIAPH1 nicht zu einer signifikanten Veränderung der durch VEGF-Stimulation induzierten Sproutbildung führte (Abbildung 40). Zudem hatte der DIAPH1-*Knockdown* keinen Einfluss auf den anti-angiogenetischen Effekt der aktiven Mutanten und der Wildtyp-Proteine von RhoA, RhoB und RhoC (Abbildung 40A - C). Der *Knockdown* von RHPN1 und RHPN2 in HUVEC-Sphäroiden hatte weder auf das *Sprouting* von Kontroll-transduzierten noch auf das *Sprouting* RhoGTPase-überexprimierender HUVEC-Sphäroide einen signifikanten Einfluss (Abbildung 41 und Abbildung 42A - C).

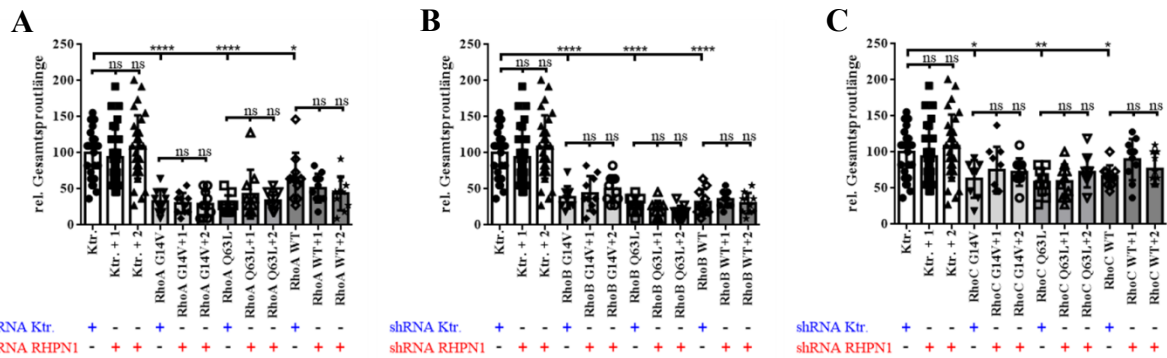


Abbildung 41: VEGF-induzierte *Sprout*-Bildung im Sphäroid-basierten HUVEC-*Sprouting*-Assay nach Überexpression von RhoA-, RhoB- und RhoC-Varianten und einem shRNA-vermittelten *Knockdown* des RHPN1. HUVEC mit einer Überexpression der konstitutiv aktiven (G14V, Q63L) und Wildtyp-Proteinen der RhoGTPasen RhoA (A), RhoB (B) und RhoC (C) wurden zusätzlich über lentivirale Vektoren mit shRNAs (1 und 2) zum *Knockdown* des RHPN1 (shRNA RHPN1 +) beziehungsweise einer nicht zielgerichteten KontrollshRNA (shRNA Ktr. +), modifiziert. Die relative Gesamtsproutlänge, normiert auf Kontroll-transduzierte HUVEC (Ktr. + shRNA Ktr. +) ergab sich aus der Summe aller Aussprossungen. ns = nicht signifikant, * = $P < 0,05$ bis **** = $P < 0,0001$. n = 10 - 30.

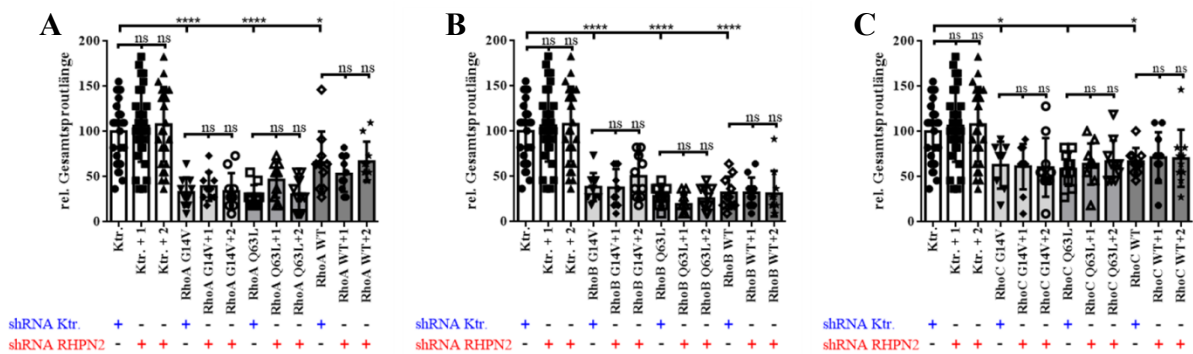


Abbildung 42: VEGF-induzierte *Sprout*-Bildung im Sphäroid-basierten HUVEC-*Sprouting*-Assay nach Überexpression von RhoA-, RhoB- und RhoC-Varianten und einem shRNA-vermittelten *Knockdown* des RHPN2. HUVEC mit einer Überexpression der konstitutiv aktiven (G14V, Q63L) und Wildtyp-Proteinen der RhoGTPasen RhoA (A), RhoB (B) und RhoC (C) wurden zusätzlich über lentivirale Vektoren mit shRNAs (1 und 2) zum *Knockdown* des RHPN2 (shRNA RHPN2 +) beziehungsweise einer nicht zielgerichteten KontrollshRNA (shRNA Ktr. +), modifiziert. Die relative Gesamtsproutlänge, normiert auf Kontroll-transduzierte HUVEC (Ktr. + shRNA Ktr. +) ergab sich aus der Summe aller Aussprossungen. ns = nicht signifikant, * = $P < 0,05$ bis **** = $P < 0,0001$. n = 10 - 30.

Zusammenfassend beeinflusste der *Knockdown* der untersuchten Rho-Effektoren CIT, DIAPH1, RHPN1 und RHPN2 weder das angiogenetische *Sprouting* von Kontroll-transduzierten HUVEC noch den RhoGTPase-vermittelten Hemmeffekt auf das angiogenetische *Sprouting in vitro*. Lediglich nach CIT *Knockdown* war ein Trend zur Erhöhung der Gesamtsproutlänge von RhoA Q63L-exprimierenden HUVEC-Sphäroiden zu erkennen.

Somit zeigten sich erhebliche Unterschiede hinsichtlich des Einflusses der potenziellen Interaktionspartner auf die RhoGTPase-vermittelten Hemmeffekte im Sphäroid-basierten *Sprouting*-Assay einerseits und dem *Scratch*-Assay zur Untersuchung der

Endothelzellmigration andererseits. So scheinen CIT, DIAPH1 und RHPN1 die hemmenden Effekte des aktiven RhoC auf die gerichtete Endothelzellbewegung zu vermitteln, da ein *Knockdown* dieser Effektoren die RhoC-induzierten Hemmeffekte partiell antagonisierte. Ähnliches konnte für die Hemmeffekte von RhoB und den *Knockdown* seines Effektors DIAPH1 mit Hinblick auf die Endothelzellmotilität beobachtet werden.

3.9. *In vivo*-Angiogenese-Assay - Xenograft

Um den Einfluss der RhoGTPase-Varianten von RhoA, RhoB und RhoC auf das angiogenetische Potential von humanen Endothelzellen *in vivo* zu analysieren, wurden entsprechend transduzierte HUVEC-Sphäroide in einer Matrigelumgebung in immunsupprimierte NSGTM Mäuse injiziert und die Beteiligung der humanen Endothelzellen an der Neovaskularisation dieser Xenograft-*Plugs* nach Explantation mittels Fluorescein-gekoppeltem Ulex Europaeus Agglutinin I (UEA I) histomorphometrisch analysiert und quantifiziert. Das UEA I bindet an α -verlinkte Fucosereste von Glycoproteinen und Glycolipiden und stellt somit einen spezifischen Marker für humane Endothelzellen dar. Zudem wurde durch einen Antikörper-gestützten Nachweis von murinem Hämoglobin die Durchblutung und somit der Anschluss der Neugefäße an den bestehenden murinen Blutkreislauf untersucht.

Die Fluoresceinfärbung der humanen Endothelzellen in den Xenograft-*Plugs* zeigte für die Kontroll-transduzierten HUVEC und die dominant negativen T19N-Mutanten von RhoA, RhoB und RhoC eine klar erkennbare, strukturierte Bildung von Mikrokapillaren, welche häufig über ein erkennbares Gefäßlumen mit hier lokalisierten murinen Erythrozyten verfügten (Abbildung 43A, Abbildung 44). In diesem experimentellen Ansatz hatte die Überexpression dominant negativer Rho-Varianten, mit Ausnahme der RhoC T19N-Variante, keinen signifikanten Einfluss auf wesentliche Parameter der *Plug*-basierten Neubildung von Blutgefäßen (Gesamtfläche, Anzahl- bzw. durchschnittliche Größe der neugebildeten Blutgefäße, Abbildung 43B - G). Hingegen kam es unter dem Einfluss der RhoC T19N-Überexpression zu einer Zunahme der durchschnittlichen Größe neugebildeter Blutgefäße (Abbildung 43J). Somit scheint, anders als in der Literatur beschrieben, die gezielte Hemmung von RhoA-, RhoB- und RhoC-vermittelten Signalen in HUVEC keinen signifikanten Einfluss auf die angiogenetische Kapazität von Endothelzellen *in vivo* auszuüben. Im Gegensatz dazu führte die konstitutive Aktivität (Q63L-Varianten) von RhoA, RhoB und RhoC zu einer signifikanten Abnahme der Neovaskularisation der *Plugs* (Abbildung 43B - D). Des Weiteren waren die UEA I-positiven, humanen Gefäßstrukturen

deutlich kleiner und vereinzelter im Vergleich zu Gefäßstrukturen, welche sich aus Kontroll-transduzierten und Rho T19N-exprimierenden HUVEC entwickelt hatten (Abbildung 43A). Die Anzahl der Fluorescein-gefärbten humanen Endothelzellen war bei allen Rho Q63L-Mutanten signifikant herabgesetzt (Abbildung 43E - G). Diese Befunde deuten somit darauf hin, dass eine konstitutive Aktivierung der RhoGTPasen RhoA, RhoB und RhoC nicht nur *in vitro* sondern auch *in vivo* einen relevanten anti-angiogenetischen Effekt ausüben. Unabhängig von der Expression der eingebrachten humanen Endothelzellen zeigten die *Plugs* mit Hilfe der Zellkernfärbung (Hoechst 33342) einen hohen zellulären Anteil, welcher nicht humanen, endothelialen Ursprungs war (Abbildung 43A). Eine genaue Charakterisierung dieser Zellen wurde nicht vorgenommen. Möglicherweise handelt es sich hierbei um eingewanderte murine Makrophagen [225] und die Vaskularisierung des Matrigelplugs durch murine Endothelzellen und Angiogeneseprozesse.

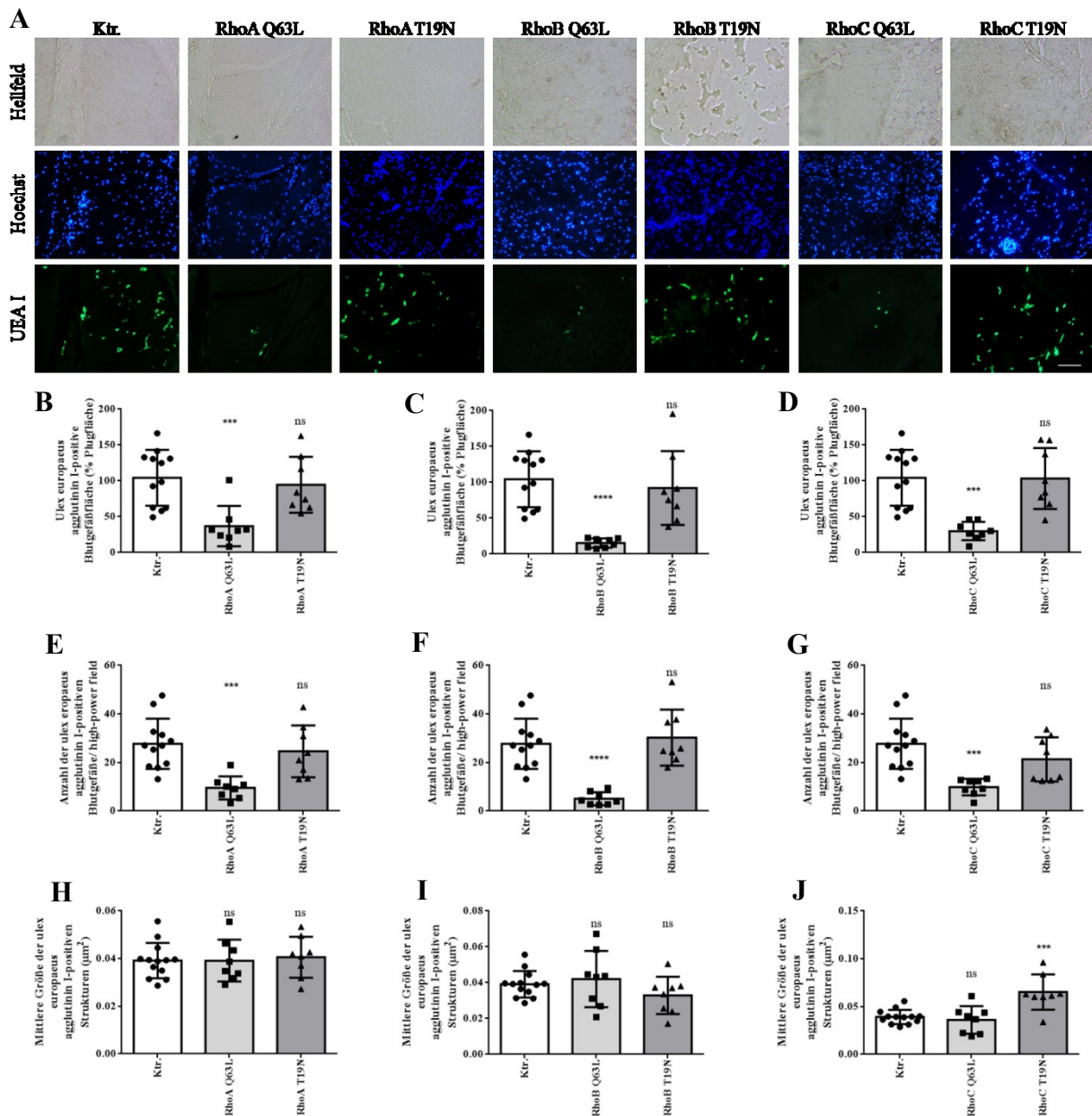


Abbildung 43: *In vivo*-Xenograft-Assay zur Analyse des Einflusses der RhoGTPasen RhoA, RhoB und RhoC auf die angiogenetischen Eigenschaften von humanen Endothelzellen. HUVEC-Sphäroide nach Überexpression von konstitutiv aktiven Rho-Mutanten (Q63L) und dominant negativen Rho-Mutanten (T19N), beziehungsweise Sphäroide aus Kontroll-transduzierten HUVEC (Ktr.) wurden in einer Mischung aus Matrigel, Methocel und Wachstumsfaktoren eingebettet. Diese Mischung wurde immundefizienten NSGTM-Mäusen injiziert und nach 21 Tagen explantiert. Die fixierten, Paraffin-konservierten *Plugs* wurden in 5 µm Schnitten auf Objektträgern fixiert und anschließend Zellkerne mit Hoechst 33342 und humane Endothelzellen mit UEA I-Lektin (FITC-gekoppelt) gefärbt. Die Färbungen wurden neben einer Durchlichtaufnahme des Schnittes fluorezenzmikroskopisch analysiert. Maßstabsbalken = 100 µm. (A) Die Blutgefäßfläche (in % zur Gesamtplugfläche), basierend auf den UEA I-Lektin gefärbten HUVEC und normiert auf *Plugs* mit Kontroll-transduzierten HUVEC, wurde für RhoA (B), RhoB (C) und RhoC (D) ermittelt. Zusätzlich erfolgte eine Auswertung der Anzahl an UEA I-Lektin-positiven Strukturen pro *Plug* für eine Überexpression der untersuchten Varianten von RhoA (E), RhoB (F) und RhoC (G). Zusätzlich erfolgte eine Bestimmung der mittleren Größe der Lektin-positiven Strukturen nach RhoA- (H), RhoB- (I) bzw. RhoC-Expression (J). ns = nicht signifikant, *** = P<0,001 bis **** = P<0,0001. n = 8 - 12.

Die Verknüpfung der aus HUVEC neu formierten Mikrokapillarstrukturen in den *Plugs* an das Blutgefäßsystem des murinen Wirts wurde durch eine immunhistochemische Färbung von

murinem Hämoglobin untersucht. Hierbei konnte die funktionelle Verbindung von Blutgefäßen humanen Ursprungs mit dem murinen Blutkreislauf durch die Kolo-kalisation von murinem Hämoglobin und humanen Endothelzellen (Lektinfärbung) nachgewiesen werden (Abbildung 44).

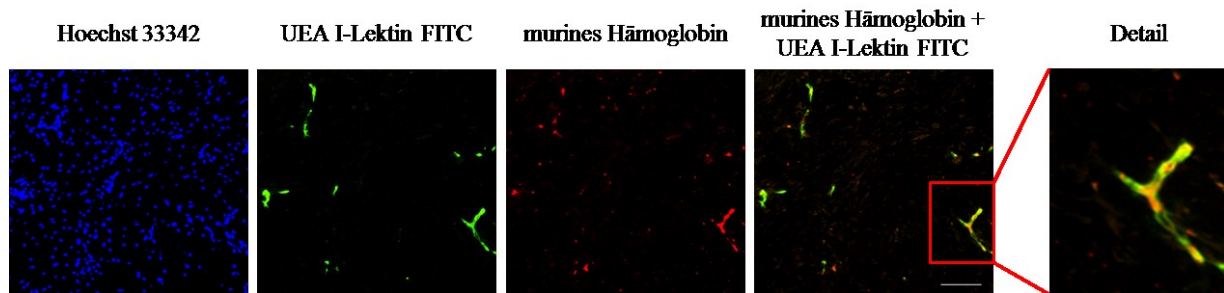


Abbildung 44: Repräsentative, immunhistochemische Doppelfärbung von humanen Endothelzellen und murinem Hämoglobin des *in vivo*-Xenograft-Assays. Ein 5 μm *Plug*-Schnitt wurde zur Anfärbung von Zellkernen (Hoechst 33342), humanen Endothelzellen (UEA I-Lektin FITC) und murinem Hämoglobin co-färbt und mikroskopisch analysiert. Die Kolo-kalisation von Blutgefäßen humanen Ursprungs und murinem Hämoglobin zeigte die Verknüpfung der *Plug*-Vaskularisierung (humaner Endothelzellursprung) mit dem Blutkreislauf der Maus. Maßstabsbalken = 100 μm .

Eine Quantifizierung der *Plug*-Durchblutung unter dem Einfluss der verschiedenen konstitutiv aktiven (Q63L) und dominant negativen (T19N) Rho-Varianten über die Anfärbung des murinen Hämoglobins (Abbildung 45A) ergab eine signifikant verringerte *Plug*-Durchblutung durch RhoA- und RhoC-Aktivität (Abbildung 45B, D). RhoB Q63L bewirkte hingegen lediglich einen nicht-signifikanten Trend zu einer reduzierten *Plug*-Durchblutung (Abbildung 45C). Die mittlere Größe der Hämoglobin-positiven Strukturen wurde durch keine der exprimierten Rho-Varianten im Vergleich zu kontroll-transduzierten HUVEC beeinflusst (Abbildung 45H - J). Interessanterweise wiesen, ähnlich den aktiven Varianten, alle exprimierten inaktiven Rho-Varianten einen leichten, allerdings nicht signifikanten, Trend zur Reduktion der Hämoglobin-positiven Fläche zur *Plug*-Fläche und der Anzahl Hämoglobin-positiver Strukturen in den Xenograft-*Plugs* auf (Abbildung 45B - G).

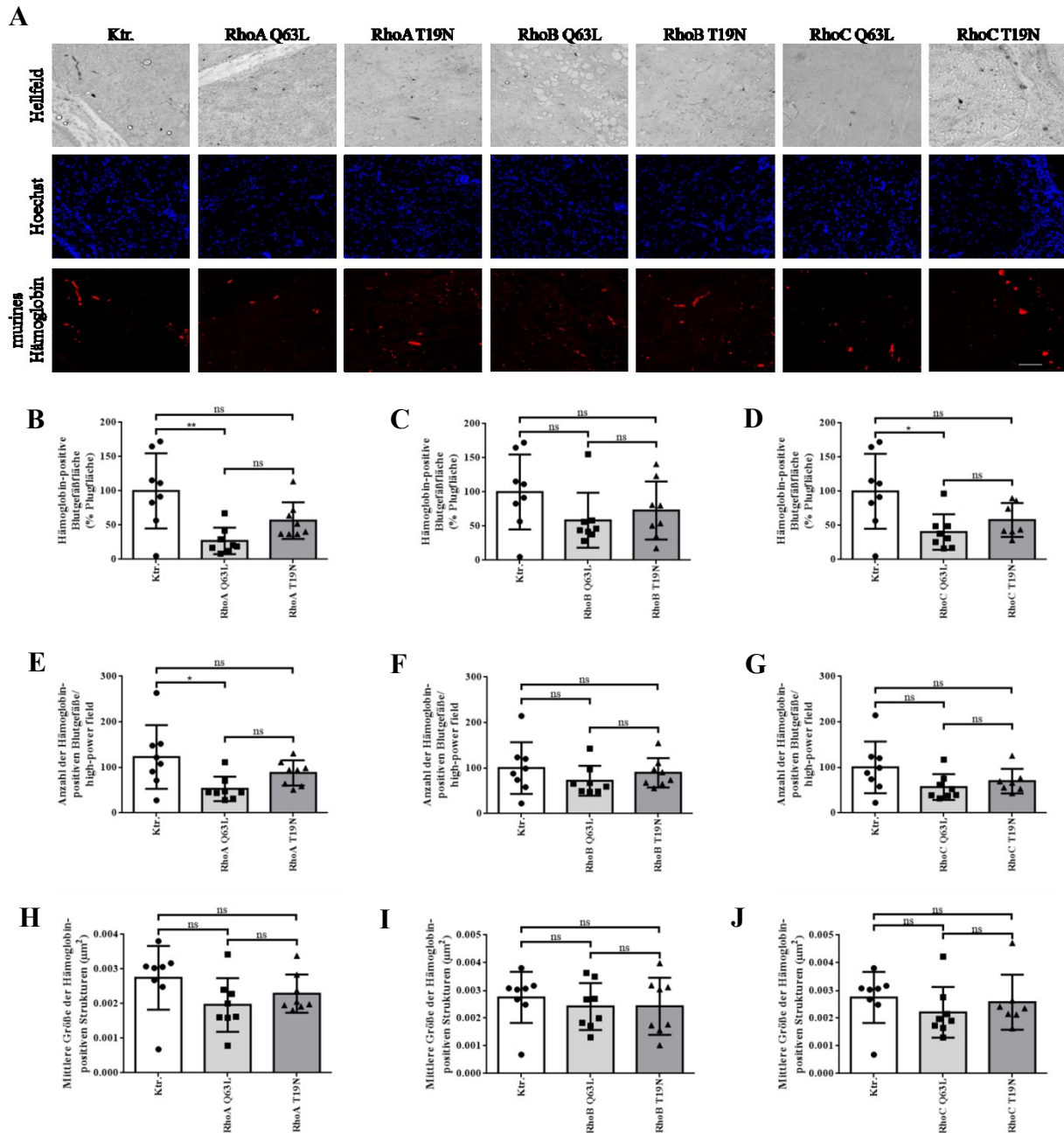


Abbildung 45: Abschätzung der *Plug*-Durchblutung (*in vivo*-Xenograft-Assays) anhand der histologisch ermittelten Hämoglobin-positiven *Plug*-Fläche. Xenograft-*Plugs* wurden in 5 μm Schnitten auf Objektträgern fixiert und anschließend Zellkerne mit Hoechst 33342 sowie murines Hämoglobin mittels Immunfluoreszenzanalysen visualisiert und nachfolgend Computer-gestützt morphometrisch analysiert. Maßstabsbalken = 100 μm . (A) Die Hämoglobin-positive Fläche (in % zur Gesamtplugfläche), basierend auf der Hämoglobinfärbung und normiert auf *Plugs* mit Kontroll-transduzierten HUVEC, wurde für RhoA (B), RhoB (C) und RhoC (D) ermittelt. Zusätzlich erfolgte eine Auswertung der Anzahl an Hämoglobin-positiven Strukturen pro *Plug* für eine Überexpression der untersuchten Varianten von RhoA (E), RhoB (F) und RhoC (G). Zusätzlich erfolgte eine Bestimmung der mittleren Größe der Hämoglobin-positiven Strukturen nach RhoA- (H), RhoB- (I) bzw. RhoC-Expression (J). ns = nicht signifikant, *** = $P < 0,001$ bis **** = $P < 0,0001$. $n = 7 - 8$.

3.10. Transkriptomanalysen RhoGTPase-exprimierender HUVEC

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten konstitutiv aktiven (Q63L) und dominant negativen (T19N) Mutanten von RhoA, RhoB und RhoC zeigten in den beschriebenen

funktionellen Analysen die Bedeutung dieser Schaltermoleküle auf das Verhalten humaner Endothelzellen (HUVEC und HCAEC). Um weiterführende Erkenntnisse über die Genregulation der aktiven Mutanten RhoA Q63L, RhoB Q63L und RhoC Q63L, sowie deren inaktiven Formen RhoA T19N, RhoB T19N und RhoC T19N zu gewinnen, wurde eine globale Transkriptomanalyse mittels RNA-Sequenzierung in entsprechend transduzierten Zellen durchgeführt. Hierfür wurde RNA aus RhoGTPase-Varianten-überexprimierenden und Kontroll-transduzierten HUVEC gewonnen und durch die Firma Novogene analysiert. Der Nachweis der RhoGTPase-Überexpression erfolgte vor der Analyse aus den gleichen Zellproben (jeweils Teilung des Zellmaterials für die Protein- und RNA-Gewinnung) mittels Western Blot und Nachweis des fusionierten HA-Tags der Rho-Varianten (Anhang: Abbildung 55). Zunächst zeigte sich in der Transkriptomanalyse, dass unter dem Einfluss konstitutiver RhoA-Aktivität (RhoA Q63L-Überexpression) 7768 Gene differentiell, im Vergleich zu Kontroll-transduzierten HUVEC, reguliert wurden. Davon wurden 513 Gene hochreguliert, wohingegen 7255 Genen herunterreguliert wurden (Tabelle 9). Die Überexpression von konstitutiv aktivem RhoB Q63L führte zu 6487 differentiell regulierten Genen (2200 hochregulierte Gene, 4287 herunterregulierte Gene). RhoC Q63L bedingte eine differentielle Regulation von 5212 Genen (909 hochregulierte Gene und 4303 herunterregulierte Gene (Tabelle 9). Hierbei gab es eine beträchtliche Anzahl von Genen, die durch die drei konstitutiv aktiven Varianten gleichermaßen verstärkt (454 Gene) bzw. geringer (2866 Gene) exprimiert wurden (Anhang: Abbildung 56). Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass die Reduktion basaler RhoA-Aktivität (RhoA T19N) zur differentiellen Regulation von 2172 Genen (24 hoch- und 2148 herunterregulierte Gene) führte, während die Reduktion der endothelialen RhoB-Aktivität (RhoB T19N) zur differentiellen Expression von nur 7 Genen (*Downregulation*) und die Reduktion der RhoC-Aktivität (RhoC T19N) zur differentiellen Regulation von 203 Genen (52 hoch- und 151 herunterregulierte Gene) führten (Anhang: Abbildung 56). Zudem zeigte sich, dass unter den hochregulierten Genen 20 und unter den herunterregulierten Genen 3 gleichermaßen von den dominant negativen Rho-Varianten beeinflusst wurden. Besonders stark überschritten sich dabei das Spektrum der sowohl durch RhoA T19N als auch durch RhoC T19N herunterregulierten Gene (104 differentiell exprimierte Gene). Diese Befunde deuten somit darauf hin, dass die basale RhoA-Aktivität einen stärkeren Einfluss auf die endotheliale Genexpression hat als die basale RhoB- oder RhoC-Aktivität.

Tabelle 9: Differentially Expressed Genes (DEGs) der Transkriptomanalyse.

RhoGTPase Variante	Verstärkte Transkription (gesamt)	Verringerte Transkription (gesamt)	Verstärkte Transkription (spezifisch)	Verringerte Transkription (spezifisch)
RhoA Q63L	513	7255	17	2346
RhoB Q63L	2200	4287	1344	403
RhoC Q63L	909	4303	61	224
RhoA T19N	24	2148	4	2042
RhoB T19N	0	7	0	1
RhoC T19N	52	151	32	44

Gene Ontology (GO)-Pathway-Anreicherungsanalysen der durch RhoA-Aktivität (Referenzgruppe RhoA T19N-überexprimierende HUVEC) induzierten differentiell regulierten Gene (DEG) zeigten eine Anreicherung für GO-Terms, wie z.B: Zellteilung, Zellzyklus, mitotische Zellteilung, Zellproliferation, Zelladhäsion, Lokomotion, Zellmotilität, Zellmorphogenese, Zytoskelettorganisation und extrazelluläre Matrixorganisation (Anhang: Abbildung 57). Zudem konnten sehr ähnliche Anreicherungen von GO-Terms für die DEG konstitutiv aktiver RhoB- und RhoC-Varianten (jeweils im Vergleich zum Einfluss dominant negativer Varianten) gezeigt werden (Anhang: Abbildung 57). KEGG-Analysen (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) zeigten zudem Hinweise auf eine Rho-vermittelte Aktivitätsänderung im mechanistisch relevanten PI3-Akt-Signalweg. Eine Dysregulation dieses zentralen Signalnetzwerkes rund um die Serin/Threonin Kinase Akt (Proteinkinase B) kann in der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen, wie z.B. Krebs, Diabetes, neurologischer Schädigungen und kardiovaskulärer Erkrankungen beobachtet werden [226].

DEG mit überwiegend verminderter Expression wurden durch konstitutive Aktivität von RhoA im Bereich Zellmetabolismus und Zellzyklus sowie RNA-Transport und RNA-Degradation beobachtet. Somit ergeben sich für RhoA neben bekannten Funktionen bei der Transkriptionsregulation [227, 228] auch potentielle Einflüsse auf endothelialen RNA-transport und Stabilität. Eine gezielte Verschiebung des Gleichgewichts von inaktivem hin zu aktivem RhoA förderte zudem die Transkription von Genen für strukturelle Zellprozesse, die für die Regulation von Aktinzytoskelett und fokalen Adhäsionen von Bedeutung sind. Ähnliches gilt für *Targetgenes* des PI3-Akt-Signalwegs durch RhoA in humanen Endothelzellen. Dies ist zudem im Einklang mit bereits publizierten Befunden anderer Arbeitsgruppen, die eine pharmakologische RhoA-Hemmung mit Akt-Aktivierung und einer Beeinflussung der Dynamik von fokalen Adhäsionen in Verbindung bringen [229, 230].

Konstitutive RhoB-Aktivität war in KEGG-Analysen mit einer systematischen Genexpressionsveränderung in den Signalbereichen Aktinzytoskelett, fokale Adhäsionen und PI3-Akt-Signalwegen assoziiert. Damit gibt es relevante Überschneidungen RhoB- und RhoA-vermittelter Signalketten in humanen Endothelzellen. Zusätzlich war konstitutive RhoB-Aktivität auch mit bioinformatischen Hinweisen zu Aktivitätsänderungen im MAPK-Signalweg (*Mitogen-activated Protein Kinase-Weg*) assoziiert. Inhibitorisch scheint sich konstitutive RhoB-Aktivität auf Prozesse im Bereich metabolischer Signalwege, der DNA-Replikation und des Zellzyklus auszuwirken. Des Weiteren führte RhoB auch zu einer Beeinflussung von Genen mit Relevanz für den RNA-Transport und die RNA-Degradation. Eine Zunahme der RhoC-Aktivität war, ähnlich wie die Zunahme der RhoA- und RhoB-Aktivität, mit einer systematischen Genexpressionsänderung in den Signalbereichen PI3-Akt-Signalweg, MAPK-Signalweg, fokale Adhäsionen sowie Zelladhäsion verbunden. Im Gegensatz zu RhoA und RhoB wies RhoC unter den KEGG-Signalwegen keine Verbindung zu Komponenten des Aktinzytoskeletts auf. Mit Hinblick auf die Systematik herunterregulierter DEG durch aktives RhoC fielen vor allem Signalwege auf, die das RNA-*Handling* betreffen. So wurden auch durch RhoC Bestandteile des RNA-Transports und der RNA-Degradation in ihrer Expression vermindert. Dies betrifft zudem Gene aus dem Bereich von mRNA-Überwachungsmechanismen (*mRNA Surveillance Pathways*), die eine mRNA-Qualitätsprüfung gewährleisten und fehlerhafte mRNA degradieren, Vorgänge der DNA-Replikation, der Basenfehlpaarungsreparatur (*Mismatch Repair*) und der DNA-Basenläsionsreparatur (*Base Excision Repair*) in humanen Endothelzellen. Somit zeigte sich ein Einfluss von RhoC unter anderem auf die DNA-Reparatur, der in Zellen des Gebärmutterhalskrebses ebenfalls nachvollzogen werden konnte [231]. Eine Hemmung der RhoC-Aktivität bewirkte unter anderem die vermehrte Transkription von Genen der Endozytose und der Zelladhäsion. Herunterreguliert wurden hingegen Gene, die die Zelladhäsion, fokale Adhäsionen, extrazelluläre Matrix-Rezeptor-Interaktionen und das Aktinzytoskelett betreffen. Außerdem wurden, wie schon übereinstimmend für RhoA beschrieben, Gene des PI3-Akt-Signalwegs beeinflusst.

Generell zeigten sich in der KEGG-Analyse erhebliche Überschneidungen der durch RhoA, RhoB oder RhoC regulierten Gene und zudem Hinweise auf identisch regulierte Signalwege. Diese Befunde weisen deutlich auf die enge Verwandtschaft der RhoGTPasen und der damit einhergehenden, teilweise gleichgerichteten zellulären Effekte hin.

3.10.1. Validierung ausgewählter differentiell exprimierter Gene aus der globalen Transkriptomanalyse mittels qPCR

Die globale Transkriptomanalyse ergab eine Vielzahl an differentiell regulierten Genen (DEG), die in ihrer Gesamtheit nicht umfassend überprüft und aufgearbeitet werden konnten. Deshalb erfolgte die Validierung ausgewählter, besonders stark regulierter Gene.

CXCL8 (IL-8)

Das CXCL8 (CXC-Motiv Chemokin 8) oder auch Interleukin-8 (IL-8) ist als Zytokin bei inflammatorischen Vorgängen an der Rekrutierung von Leukozyten in das umliegende Gewebe beteiligt. Darüber hinaus ist eine pro-angiogenetische Wirkung auf Endothelzellen bekannt [232, 233]. Als chemotaktisches Zytokin fördert CXCL8 die Migration von Endothelzellen in das umliegende Gewebe und darüber hinaus auch die Endothelzellpermeabilität [232, 234]. Weiterhin ist für humane Endothelzellen bereits beschrieben, dass die RhoA-Aktivität, neben der Aktivität von Rac1, durch eine erhöhte CXCL8-Konzentration gesteigert wird [232, 235]. Aus diesen Gründen stellt CXCL8 ein interessantes DEG aus den Transkriptomanalysen dar.

In den letztgenannten Analysen konnte eine erhebliche Steigerung der CXCL8-Expression in HUVEC mit einer Überexpression konstitutiv aktiver RhoGTPase-Varianten anhand der FPKM-Werte (*Fragments Per Kilo Base of Transcript Per Million Mapped Reads*) beobachtet werden (Abbildung 46A). Vor allem RhoB-vermittelt stieg der mRNA-Gehalt des CXCL8 in HUVEC stark an. Auch RhoA- und RhoC-induziert zeigte sich eine vergleichbare Expressionserhöhung des CXCL8 in HUVEC. Dies deutet darauf hin, dass Rho-Aktivität einen pro-inflammatorischen Phänotyp von humanen Endothelzellen begünstigen könnte. Hingegen führte die Reduktion der Rho-Aktivität durch Expression von T19N-Varianten lediglich zu einer im Trend reduzierten Expression des Zytokins auf mRNA-Ebene (Abbildung 46A). Diese Befunde wurden zusätzlich auch mittels qPCR validiert und zeigten nahezu identische Ergebnisse (Abbildung 46A, B).

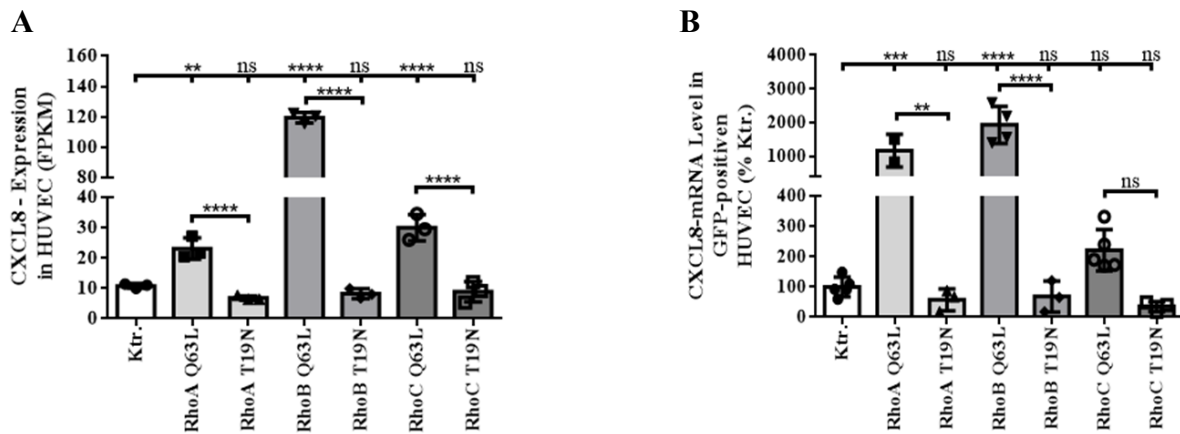


Abbildung 46: Genexpressionsanalyse von CXCL8 (IL-8) in HUVEC nach Überexpression konstitutiv aktiver und dominant negativer Varianten von RhoA, RhoB und RhoC. (A) RNAseq-Daten der aktiven (Q63L) und inaktiven (T19N) Varianten von RhoA, RhoB und RhoC bezogen auf Kontroll-transduzierte Endothelzellen (Ktr.). Aufgetragen sind die Mittelwerte der FPKM (*Fragments Per Kilobase of Transcript Per Million Mapped Reads*), n=3. (B) Validierung der relativen CXCL8-Expression nach Überexpression aktiver (Q63L) und inaktiver (T19N) Varianten von RhoA, RhoB und RhoC mittels quantitativer *Real-Time* PCR, normiert auf Kontroll-transduzierte HUVEC (Ktr.). ns = nicht signifikant, ** = P<0,01 bis **** = P<0,0001. n = 3.

ITGB4

Integrine spielen bei der Organisation der Zelladhäsion von Zellen an die extrazelluläre Matrix und an benachbarte Zellen eine entscheidende Rolle. Sie durchspannen als Transmembranproteine die Zellmembran und nehmen dadurch neben der Zelladhäsion auch wichtige Aufgaben in der Signalübertragung von der Extrazellulärmatrix auf das Aktinzytoskelett wahr. Sie bestehen als Heterodimere aus einer alpha- und einer beta-Untereinheit. Dabei können verschiedene alpha-Untereinheiten mit verschiedenen beta-Untereinheiten interagieren und so einzigartige Bindungseigenschaften der Zelle vermitteln [236]. Ihren Einfluss auf die Dynamik des Aktinzytoskeletts und damit verknüpft auf die Zelladhäsion üben diese Adhäsionsmoleküle über nachgeschaltete RhoGTPasen aus und vermitteln darüber hinaus auf diesem Weg auch Signale zur Zellteilung und Migration [236]. Bei der Analyse des globalen Transkriptomts von humanen Endothelzellen fiel die Regulation des Integrins alpha-6/beta-4 (ITGB4) auf. Dieses wurde unter Anwesenheit der konstitutiv aktiven Mutanten der RhoGTPasen RhoA, RhoB und RhoC deutlich verringert exprimiert (FPKM-Werte, Abbildung 47A). Die Reduktion der Aktivität der untersuchten RhoGTPasen hatte hingegen keinen signifikanten Einfluss auf die ITGB4-Expression (RhoB T19N und RhoC T19N), oder eine nur leichte Tendenz zur Expressionssteigerung des Integrins (RhoA T19N, Abbildung 47A).

Die Validierung der Transkriptomdaten für das ITGB4 mittels quantitativer *Real-Time* PCR zeigte für die drei untersuchten Q63L-Mutanten übereinstimmend ein herunterreguliertes Integrin-mRNA-Level (Abbildung 47B). Auch konnte eine signifikante Expressions-

steigerung von ITGB4 durch Reduktion der RhoA-Aktivität beobachtet werden, während die Reduktion der RhoB- bzw. RhoC-Aktivität keinen Einfluss auf die mRNA-Level von ITGB4 in HUVEC hatten (Abbildung 47B). Somit scheint die Aktivität insbesondere von RhoA, aber auch RhoB und RhoC einen Einfluss auf die Expression des Integrins ITGB4 in HUVEC auszuüben. Bereits beschrieben werden konnte ein Zusammenhang zwischen ITGB4 und RhoA in Kolonkarzinomzellen. Hierbei wurde allerdings RhoA durch das Integrin in Lamellipodien aktiviert und steuerte damit die Migration dieser Zellen [237].

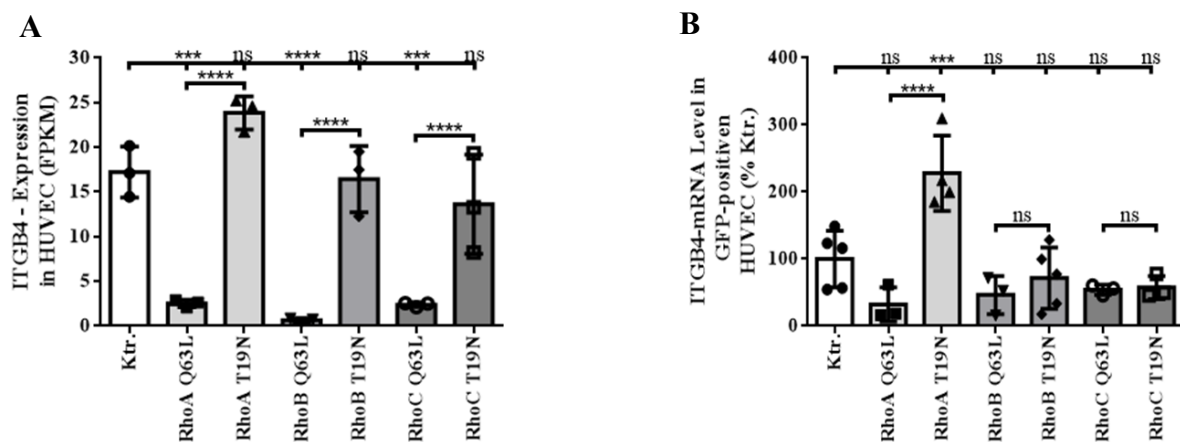


Abbildung 47: Genexpressionsanalyse von ITGB4 in HUVEC nach Überexpression konstitutiv aktiver und dominant negativer Varianten von RhoA, RhoB und RhoC. (A) RNAseq-Daten der aktiven (Q63L) und inaktiven (T19N) Varianten von RhoA, RhoB und RhoC bezogen auf Kontroll-transduzierte Endothelzellen (Ktr.). Aufgetragen sind die Mittelwerte der FPKM (*Fragments Per Kilobase of Transcript Per Million Mapped Reads*), n=3. (B) Validierung der relativen ITGB4-Expression nach Überexpression aktiver (Q63L) und inaktiver (T19N) Varianten von RhoA, RhoB und RhoC mittels quantitativer *Real-Time* PCR, normiert auf Kontroll-transduzierte HUVEC (Ktr.). ns = nicht signifikant, *** = P<0,001 bis **** = P<0,0001. n = 3.

AQP1

Beim Aquaporin 1 (AQP1) handelt es sich um ein Transmembranprotein mit 6 Transmembranhelices, welches als Homotetramer für den Transport von Wasser und Kationen durch die Zellmembran verantwortlich ist [238, 239]. Ein Zusammenhang zwischen RhoGTPasen und AQP1 ist bereits durch Jiang *et al.* beschrieben worden. Sie konnten zeigen, dass in HT20 Kolonkarzinomzellen eine gesteigerte Expression von AQP1 eine Aktivitätszunahme für RhoA und Rac1 in migrierenden Zellen verursacht [240]. Diese Assoziation wird durch die Interaktion von AQP1 mit der fokalen Adhäsionskinase (FAK) weiter verfestigt, welche durch Co-Immunpräzipitation in mesenchymalen Stammzellen verifiziert werden konnte [241] und als ein zentraler Vermittler der AQP1-Signaltransduktion fungiert [238]. Für die Tumorinvasion und Metastasierung wurde wiederum die FAK-vermittelte und PI3-Akt-Signalweg-abhängige Rolle von RhoA und Rac1 beschrieben [242].

Über die FAK als gemeinsamer Vermittler scheint somit eine wechselseitige Regulation der RhoGTPasen durch AQP1 vorstellbar [242].

Die Auswertung der FPKM-Werte für AQP1 in der globalen Transkriptomanalyse ergab eine signifikante Reduktion der AQP1 mRNA-Level durch Erhöhung der Aktivität von RhoA, RhoB und RhoC (Abbildung 48A). Dabei verringerten RhoA und RhoC die AQP1-Expression gleichermaßen stark auf 33% des Kontrollniveaus. RhoB bewirkte sogar eine um 91% herabgesetzte Expression von AQP1. Die Reduktion der Aktivität von RhoB führte entsprechend gegenläufig zu einer Verstärkung der AQP1-Expression, während die Inaktivierung von RhoA und RhoC durch Expression der T19N-Varianten keine Veränderung der AQP1-Expression bewirkten (Abbildung 48A).

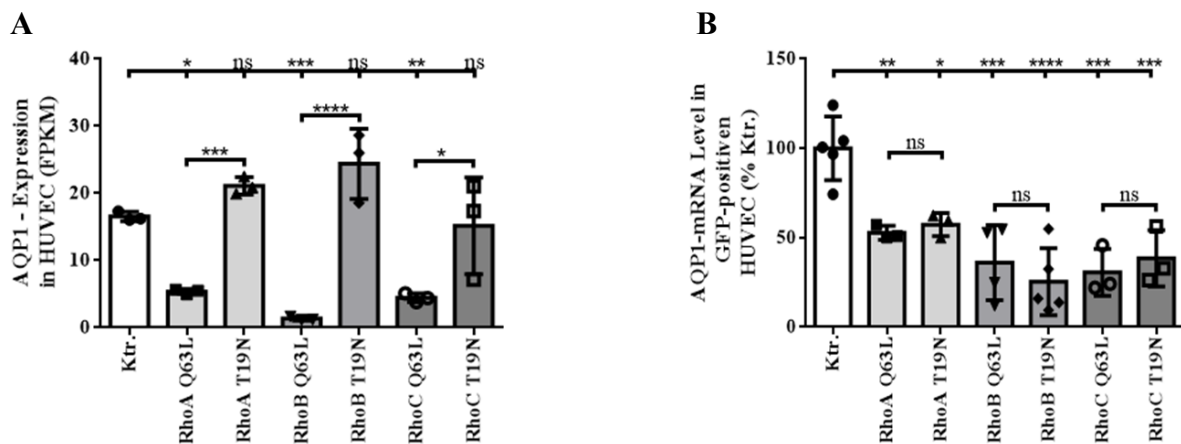


Abbildung 48: Genexpressionsanalyse von AQP1 in HUVEC nach Überexpression konstitutiv aktiver und dominant negativer Varianten von RhoA, RhoB und RhoC. (A) RNAseq-Daten der aktiven (Q63L) und inaktiven (T19N) Varianten von RhoA, RhoB und RhoC bezogen auf Kontroll-transduzierte Endothelzellen (Ktr.). Aufgetragen sind die Mittelwerte der FPKM (*Fragments Per Kilobase of Transcript Per Million Mapped Reads*), $n=3$. (B) Validierung der relativen AQP1-Expression nach Überexpression aktiver (Q63L) und inaktiver (T19N) Varianten von RhoA, RhoB und RhoC mittels quantitativer *Real-Time* PCR, normiert auf Kontroll-transduzierte HUVEC (Ktr.). ns = nicht signifikant, * = $P<0,05$ bis **** = $P<0,0001$. $n = 3$.

Eine Überprüfung der Transkriptombefunde mittels quantitativer *Real-Time* PCR bestätigte die Beobachtungen zur signifikanten Reduktion der AQP1-Expression durch RhoA-, RhoB- und RhoC-Aktivierung (Abbildung 48B). Auffällig war allerdings, dass in der *Real-Time* PCR-Überprüfung der RNAseq-Befunde auch für die dominant negativen Varianten von RhoA, RhoB und RhoC eine Verringerung der AQP1-Expression beobachtet wurde (Abbildung 48B). Dies steht somit im Widerspruch zu den Befunden der globalen Transkriptomanalyse und sollte daher durch weitere unabhängige Experimente wiederholt überprüft werden. Unzweifelhaft erscheint hingegen, dass konstitutive Aktivität von RhoA, RhoC und besonders RhoB die AQP1-Expression in HUVEC reduzierte.

HDAC9

Die Familie der Histon Deacetylasen (HDAC) stellt eine Proteinklasse mit starkem Einfluss auf die Gentranskription dar. Sie bewirken unter anderem die Deacetylierung von Lysinresten im N-terminalen Bereich von Histonen und damit einhergehend eine verstärkte Chromatin-kondensierung und verringerte Transkription von Zielgenen. HDAC9 gehört in der Familie der Histon Deacetylasen zur Klasse 2a, die durch ihr Pendeln zwischen Nukleus und Zytoplasma charakterisiert ist [243]. Somit stellen die HDACs der Klasse 2a, zu denen auch HDAC4, 5 und 7 gehören, eine Verbindung in der Signalweiterleitung zwischen Zytoplasma und Nukleus her. Neben ihrer enzymatischen Funktion der Histon-Deacetylierung sind für die HDACs weitere Substrate, vor allem Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B und STAT1, bekannt [244].

Betrachtet man nun die Ergebnisse der globalen Transkriptomanalyse nach Überexpression der aktiven Q63L-Varianten von RhoA, RhoB und RhoC, so fällt der massive Anstieg der HDAC9 mRNA-Level auf (Abbildung 49A). Die Zunahmen, basierend auf den FPKM-Werten, reichen von einer ca. 12fachen Steigerung (RhoC Q63L) bis zu einer Steigerung um das ungefähr 14fache bei RhoA und RhoB Q63L im Vergleich zu Kontroll-transduzierten HUVEC. Diese Befunde konnten zudem mittels quantitativer *Real-Time* PCR verifiziert werden (Abbildung 49B). Hierbei konnte eine Zunahme der HDAC9-Expression um das 6- (RhoC Q63L) bis 7fache (RhoA und RhoB Q63L) der mRNA-Menge von HDAC9 beobachtet werden. Signifikante Änderungen der HDAC9-Expression im Vergleich zu Kontrollzellen, basierend auf den FPKM-Werten, sind nach Expression der dominant negativen T19N-Varianten der untersuchten RhoGTPasen nicht zu beobachten gewesen (Abbildung 49A). Diese Befunde bestätigten sich auch in der zur Validierung der RNAseq-Ergebnisse vorgenommenen quantitativen *Real-Time* PCR (Abbildung 49B). Die stark gesteigerte Expression von HDAC9 durch konstitutive Aktivität der untersuchten RhoGTPasen könnte verschiedene Gründe haben. Zum einen ist bekannt, dass HDAC9 in Endothelzellen kleiner Hirngefäße inflammatorische und apoptotische Signale vermittelt, wobei eine reduzierte HDAC9-Expression Inflammation und Apoptose verringert [245]. Die Regulation von HDAC9 durch aktive RhoGTPasen könnte somit für die beobachteten pro-inflammatorischen Effekte verantwortlich sein und einen Mechanismus Rho-vermittelter endothelialer Dysfunktion darstellen (Abbildung 19). Zum anderen ist aber auch vorstellbar, dass die konstitutiv aktiven RhoGTPasen über ihre Effektoren PKN/PKC-related Kinases und die Rho-Kinasen (ROCK) die Histon Deacetylase 9 phosphorylieren und damit inaktivieren [246]. Für RhoA konnte dieser Einfluss auf HDAC5 gezeigt werden [246]. Die Inaktivierung

resultiert möglicherweise dann über einen *Feedback-Loop* in einer Transkriptionssteigerung. Diese interessanten Aspekte der Rho-vermittelten Signaltransduktion sollen in Nachfolgeprojekten der Arbeitsgruppe bearbeitet werden.

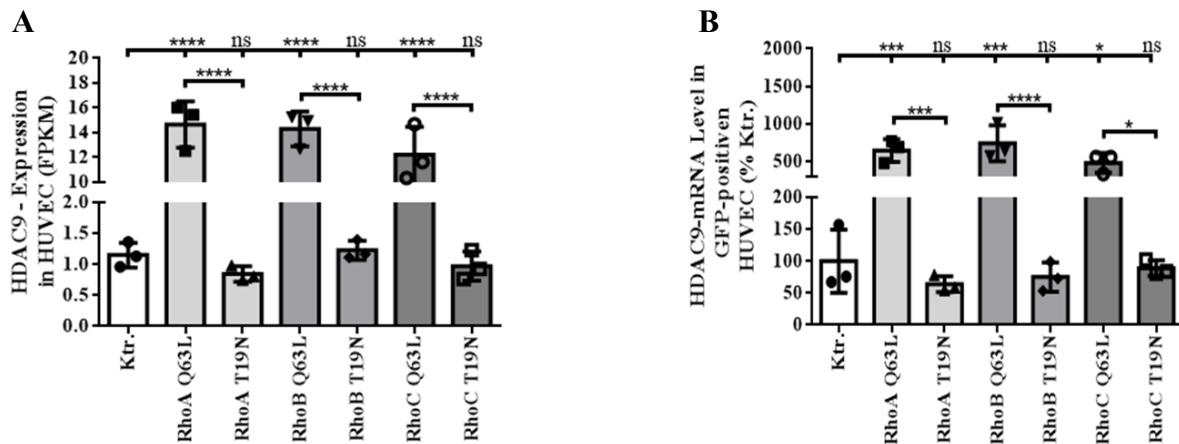


Abbildung 49: Genexpressionsanalyse von HDAC9 in HUVEC nach Überexpression konstitutiv aktiver und dominant negativer Varianten von RhoA, RhoB und RhoC. (A) RNAseq-Daten der aktiven (Q63L) und inaktiven (T19N) Varianten von RhoA, RhoB und RhoC bezogen auf Kontroll-transduzierte Endothelzellen (Ktr.). Aufgetragen sind die Mittelwerte der FPKM (*Fragments Per Kilobase of Transcript Per Million Mapped Reads*), n=3. (B) Validierung der relativen HDAC9-Expression nach Überexpression aktiver (Q63L) und inaktiver (T19N) Varianten von RhoA, RhoB und RhoC mittels quantitativer *Real-Time* PCR, normiert auf Kontroll-transduzierte HUVEC (Ktr.). ns = nicht signifikant, * = $P < 0,05$ bis **** = $P < 0,0001$. n = 3.

NOS3 (eNOS)

Die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS, NOS3) katalysiert die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) aus der Aminosäure L-Arginin. Somit nimmt sie über die NO-Bildung unter anderem wichtige Einflüsse auf den Gefäßtonus und den Blutdruck, die Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Endothelzelloberfläche und die Oxidationshemmung von *Low Density-Lipoproteinen* (LDL) [247].

Ihre Regulation durch die verschiedenen Aktivitätszustände der drei untersuchten RhoGTPasen in humanen Endothelzellen wurde mittels globaler Transkriptomanalyse analysiert (Abbildung 50A). Dabei zeigte sich eine Halbierung der Transkriptmenge nach Überexpression von aktivem RhoA und RhoC (Q63L). RhoB Q63L bewirkte einen deutlich stärkeren Effekt, da hier nur noch 25% der eNOS mRNA im Vergleich zu Kontroll-transduzierten HUVEC detektiert werden konnte (Abbildung 50A). Die dominant negativen T19N-Varianten von RhoB und RhoC bewirkten hingegen keine signifikanten Änderungen der eNOS-Expression. Dagegen kam es unter dem Einfluss von RhoA T19N zu einer marginalen, aber signifikanten Erhöhung der eNOS mRNA-Level (Abbildung 50A). Diese Befunde sind im Einklang mit Befunden anderer Arbeitsgruppen, die auf eine Reduktion der eNOS-Expression durch aktives RhoA und den nachgeschalteten RhoA-ROCK-Signalweg

hinweisen [248, 249]. Es konnte zudem gezeigt werden, dass RhoA im aktiven Zustand nicht nur die Genexpression der eNOS reduziert, sondern zusätzlich auch die für die eNOS-Aktivität essenzielle Phosphorylierung am Serin-1177 verhindert, indem es ROCK-vermittelt die Proteinkinase B (Akt) hemmt [250]. Diese Ergebnisse wären im Einklang mit den bereits dargestellten KEGG-Analysen, die eine Hemmung des PI3-Akt-Signalweges nahelegen. RhoB und RhoC scheinen zudem einen vergleichbaren Effekt wie RhoA auf die eNOS und ihre Genexpression auszuüben.

Die Beobachtungen der globalen Transkriptomanalysen konnten durch quantitative *Real-Time* PCR mit im Wesentlichen deckungsgleichen Ergebnissen reproduziert werden (Abbildung 50B). Hingegen zeigten sich für die drei inaktiven T19N-Varianten ebenfalls reduzierende Effekte auf die eNOS-Expression (Abbildung 50B).

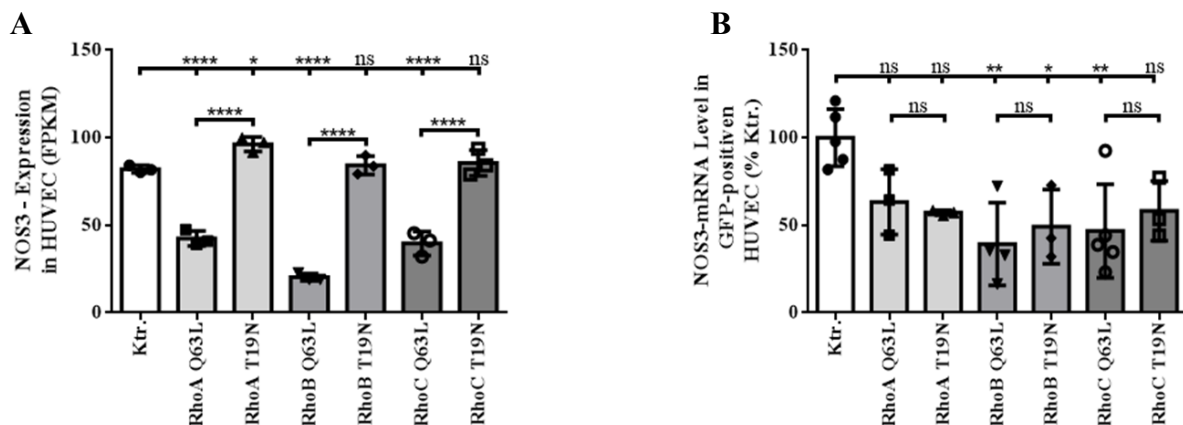


Abbildung 50: Genexpressionsanalyse von NOS3 in HUVEC nach Überexpression konstitutiv aktiver und dominant negativer Varianten von RhoA, RhoB und RhoC. (A) RNAseq-Daten der aktiven (Q63L) und inaktiven (T19N) Varianten von RhoA, RhoB und RhoC bezogen auf Kontroll-transduzierte Endothelzellen (Ktr.). Aufgetragen sind die Mittelwerte der FPKM (*Fragments Per Kilobase of Transcript Per Million Mapped Reads*), n=3. **(B)** Validierung der relativen NOS3-Expression nach Überexpression aktiver (Q63L) und inaktiver (T19N) Varianten von RhoA, RhoB und RhoC mittels quantitativer *Real-Time* PCR, normiert auf Kontroll-transduzierte HUVEC (Ktr.). ns = nicht signifikant, * = P<0,05 bis **** = P<0,0001. n = 3.

VEGFR-2 (KDR)

Der VEGFR-2 (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2*) oder auch *Kinase Insert Domain Receptor* (KDR) ist eine endotheliale Rezeptortyrosinkinase und bindet den endothelspezifischen Wachstumsfaktor VEGF [251]. In Folge der VEGF-Bindung (bevorzugt VEGF-A) erfolgt eine Dimerisierung, Autophosphorylierung und damit Aktivierung der Rezeptor-Kinase-Aktivität [252]. Diese Aktivierung des VEGFR-2 als Rezeptortyrosinkinase startet nun die intrazelluläre Signalkaskade, in deren Folge angiogenetische Prozesse wie Migration und Proliferation in Endothelzellen beeinflusst werden. Zu den zytoplasmatischen Substraten des VEGFR-2 zählen unter anderem auch RhoGTPasen. So ist bereits beschrieben

worden, dass die VEGF-A-induzierte Rezeptoraktivierung zu einer RhoA-Stimulation führt, aus der wiederum eine Aktin-Stressfaser-Bildung und die endotheliale Hyperpermeabilität resultiert [253]. Darüber hinaus reguliert der VEGFR-2 die Bildung von fokalen Adhäsionen während der Endothelzellmigration und regelt somit auch einen Signalweg, der durch die untersuchten RhoGTPasen RhoA, RhoB und RhoC ebenfalls beeinflusst wird [254, 255]. Allerdings konnten im Rahmen von FRET-Biosensor-basierten RhoA-Aktivitätsassays keine stimulatorischen Effekte von VEGF-A auf die RhoA-Aktivität in humanen Endothelzellen nachgewiesen werden, was den Ergebnissen in den zuvor genannten Publikationen widerspricht. In umgekehrter Weise kann eine RhoA-abhängige Phosphorylierung und die damit verbundene Aktivierung des VEGFR-2 erfolgen [256]. Interessanterweise scheint hingegen eine Rho-unabhängige Aktivierung der ROCK zu einer Inhibierung des VEGFR-2 zu führen [257], Ergebnisse, die in den gezeigten *in vitro*-Experimenten nachvollzogen werden konnten.

Um zu untersuchen, ob diese vielschichtigen Regulationen zwischen RhoGTPasen und dem VEGFR-2 auch die Transkription des Rezeptorgens in HUVEC unter Anwesenheit von RhoA, RhoB oder RhoC beeinflussen, wurden die FPKM-Werte der globalen Transkriptionsanalysen diesbezüglich analysiert (Abbildung 51A). Dabei zeigten sich für die konstitutiv aktiven (Q63L) Rho-Varianten unterschiedliche Einflüsse. So beeinflusste RhoC-Aktivität die Expression des VEGFR-2 nicht, wohingegen RhoA eine nicht signifikante Reduktion der VEGFR-2 mRNA-Expression bewirkte. Den größten Effekt bei der Transkriptomanalyse induzierte die aktive RhoB-Variante (Q63L) mit einer signifikanten Verringerung der mRNA-Level um 38% (Abbildung 51A). Die dominant negativen (inaktiven) RhoGTPase-Formen veränderten die Expression des VEGFR-2 hingegen nicht. Die Validierung der Ergebnisse aus der globalen Transkriptomanalyse mittels quantitativer *Real-Time* PCR erbrachte vergleichbare Ergebnisse zum Einfluss von RhoA auf die VEGFR-2-Expression in HUVEC (Abbildung 51B). Im Gegensatz zur Transkriptomuntersuchung zeigten sich in den qPCR-Analysen allerdings eine von RhoB Q63L unbeeinflusste VEGFR-2-Expression sowie eine nicht signifikante RhoC Q63L-vermittelte Reduktion der VEGFR-2 mRNA-Expression (Abbildung 51B). Darüber hinaus konnte ein Trend zur Reduktion der VEGFR-2-Expression nach Überexpression dominant negativer Rho-Varianten von RhoA und RhoC beobachtet werden (Abbildung 51B). Die Ergebnisse deuten somit zusammenfassend darauf hin, dass konstitutiv aktives RhoA die VEGFR-2-Expression vermindert, während die Reduktion der Aktivität der drei RhoGTPasen keinen, oder einen geringfügig hemmenden Einfluss, auf die VEGFR-2 Expression ausübt.

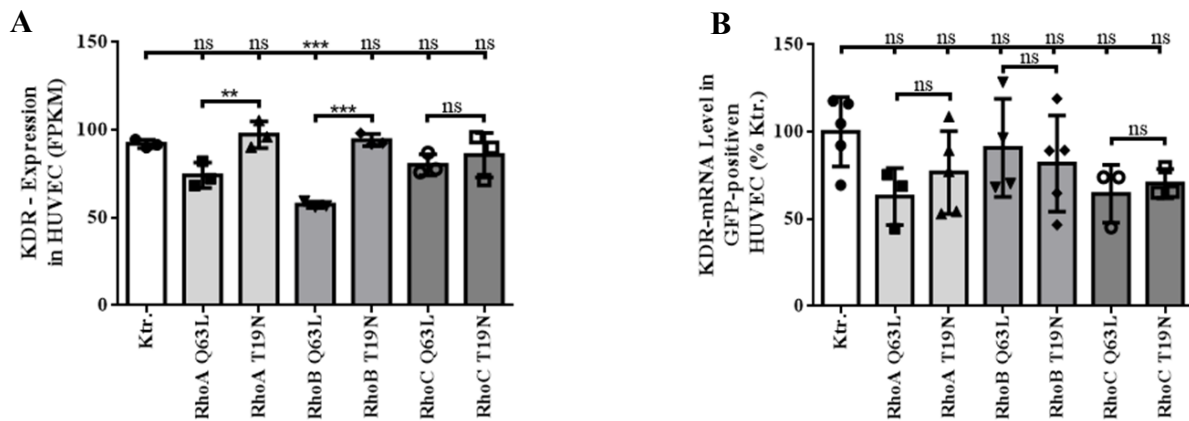


Abbildung 51: Genexpressionsanalyse des VEGFR-2 (KDR) in HUVEC nach Überexpression konstitutiv aktiver und dominant negativer Varianten von RhoA, RhoB und RhoC. (A) RNAseq-Daten der aktiven (Q63L) und inaktiven (T19N) Varianten von RhoA, RhoB und RhoC bezogen auf Kontroll-transduzierte Endothelzellen (Ktr.). Aufgetragen sind die Mittelwerte der FPKM (*Fragments Per Kilobase of Transcript Per Million Mapped Reads*), $n=3$. (B) Validierung der relativen VEGFR-2-Expression nach Überexpression aktiver (Q63L) und inaktiver (T19N) Varianten von RhoA, RhoB und RhoC mittels quantitativer *Real-Time* PCR, normiert auf Kontroll-transduzierte HUVEC (Ktr.). ns = nicht signifikant, ** = $P<0,01$ bis **** = $P<0,0001$. $n=3$.

Thromboxan A_2 -Rezeptor (TP-Rezeptor)

Der TP-Rezeptor ist für das vaskuläre Endothel ein relevanter Effektor, da er die Entstehung der endothelialen Dysfunktion und der Atherosklerose fördert. Seine Effekte vermittelt der Rezeptor dabei über die $G_{\alpha 13}$ -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine und RhoA mit seinen nachgeschalteten Effektoren [173, 179]. So kann der TP-Rezeptor das Zytoskelett, die Zellspannung, Adhäsion und Proliferation regulieren [178] sowie VEGF-induziertes Gefäßwachstum in humanen Endothelzellen hemmen [258]. Diese Übereinstimmungen in der funktionellen Relevanz des TP-Rezeptors und der untersuchten konstitutiv aktiven RhoGTPasen RhoA, RhoB und RhoC sowie die bekannte mechanistische Verbindung von TP-Rezeptor und RhoA machen den TP-Rezeptor zu einem interessanten Ziel-Gen der Transkriptomanalysen. Hierfür zeigten die FPKM-Werte unter Expression der konstitutiv aktiven (Q63L) Varianten von RhoA, RhoB und RhoC eine signifikante Steigerung der TP-Rezeptor mRNA-Expression in HUVEC, wohingegen die entsprechenden dominant negativen Rho-Varianten (T19N) keinen Einfluss auf die TP-Transkriptmenge im Vergleich zu Kontroll-transduzierten Endothelzellen aufwiesen (Abbildung 52A). Die Validierung dieser Transkriptombefunde durch eine quantitative *Real-Time* PCR bestätigten im Trend die Beobachtungen (Abbildung 52B). Die hierbei beobachtete Steigerung des TP-Rezeptor mRNA-Levels war jedoch für keine der drei untersuchten konstitutiv aktiven Rho-Varianten signifikant.

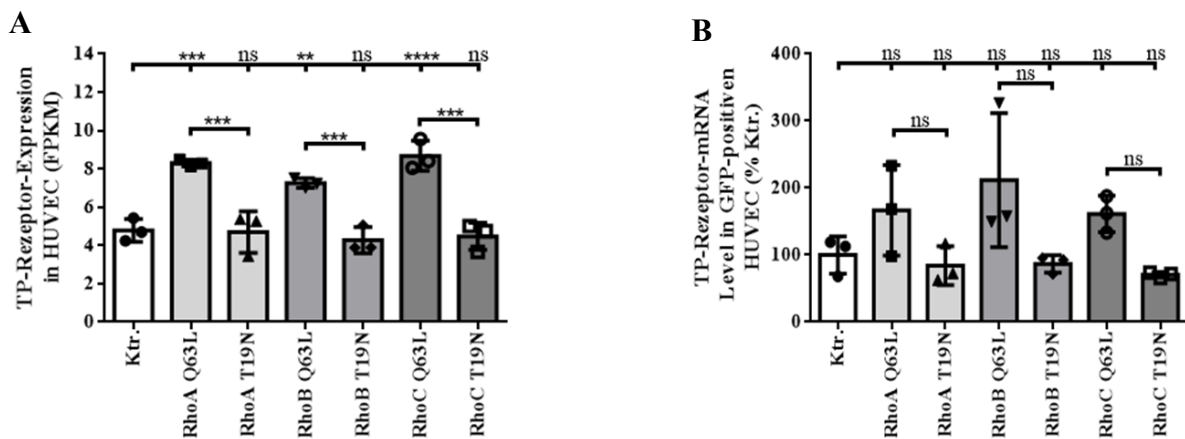


Abbildung 52: Genexpressionsanalyse des TP-Rezeptors in HUVEC nach Überexpression konstitutiv aktiver und dominant negativer Varianten von RhoA, RhoB und RhoC. (A) RNAseq-Daten der aktiven (Q63L) und inaktiven (T19N) Varianten von RhoA, RhoB und RhoC bezogen auf Kontroll-transduzierte Endothelzellen (Ktr.). Aufgetragen sind die Mittelwerte der FPKM (*Fragments Per Kilobase of Transcript Per Million Mapped Reads*), n=3. (B) Validierung der relativen TP-Rezeptor-Expression nach Überexpression aktiver (Q63L) und inaktiver (T19N) Varianten von RhoA, RhoB und RhoC mittels quantitativer *Real-Time* PCR, normiert auf Kontroll-transduzierte HUVEC (Ktr.). ns = nicht signifikant, ** = $P < 0,01$ bis **** = $P < 0,0001$. n = 3.

3.11. Interaktomanalyse zur Identifizierung potentieller Rho-Interaktionspartner in humanen Endothelzellen

Zur Identifizierung von potentiellen Interaktionspartnern der in dieser Arbeit untersuchten RhoGTPasen RhoA, RhoB und RhoC wurden die zuvor bereits beschriebenen Rho-Varianten (konstitutiv aktiv, dominant negativ und Wildtyp-Protein) in humanen Endothelzellen exprimiert, die Zellen lysiert und die exprimierten Rho-Proteine über ihren fusionierten HA-Tag immunpräzipitiert. Da die Zellyse unter nicht-denaturierenden Bedingungen erfolgte, bestand somit die Möglichkeit neben den exprimierten Rho-Varianten auch potentielle Interaktionspartner für den jeweiligen Aktivitätszustand zu präzipitieren. Die erhaltene Präzipitat-Fraktion wurde anschließend massenspektrometrisch, für jede Probe als Triplikat, in der *Core Facility - Proteomic Mass Spectrometry* der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg analysiert. Dadurch konnten potentielle Rho-Interaktionspartner identifiziert werden, deren Relevanz im Rho-Signaling in weiterführenden Projekten charakterisiert werden können.

Tabelle 10: Auswahl potentieller Interaktionspartner der RhoGTPasen RhoA, RhoB und RhoC aus massenspektrometrischen Analysen. HUVEC mit einer Expression der jeweils HA-markierten Wildtyp-Proteine (WT) bzw. konstitutiv aktiver (G14V, Q63L) oder dominant negativer (T19N) Varianten von RhoA, RhoB und RhoC wurden lysiert und potentielle Interaktionspartner co-immunpräzipitiert. Zusätzlich erfolgte eine Aktivierung der Wildtyp-RhoGTPase durch Stimulation mit U-46619 (+U), bzw. eine Hemmung der Rho-Aktivität des Wildtyp-Proteins durch den Rho-Inhibitor C3 Transferase (+I). Als Kontrolle dienten HUVEC mit einer Expression des dreifachen HA-Tags. Die aufgelisteten Zahlenwerte geben die Anzahl der spezifisch für das entsprechende Protein gefundenen Peptid-Sequenzen (*Exclusive Unique Peptides*) an. n = 3. RhoGDI1: *Rho Protein GDP-Dissociation Inhibitor1*; RhoGDI2: *Rho Protein GDP-Dissociation Inhibitor2*; BIG1: *Brefeldin A-inhibited Guanine Nucleotide-Exchange Protein1* (RhoGEF); GDS1: *Rap1 GTPase GDP-Dissociation Stimulator 1*; DOCK4: *Dedicator of Cytokinesis4* (RhoGEF); IQGAP1: *Ras GTPase-activating-like Protein IQGAP1*; DIA1: *Diaphanous-related Formin-1*; PKN1: *Protein Kinase N1*

Interaktionspartner Expression	Rho GDI1	Rho GDI2	BIG1	GDS1	DOCK4	IQGAP1	DIA1	PKN1	Cofilin-1
Kontrolle	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RhoA G14V	22	33	5	6	5	101	26	17	14
RhoA Q63L	-	-	-	2	-	135	3	-	7
RhoA T19N	-	-	-	56	-	-	-	-	3
RhoA WT	51	49	-	8	-	60	3	-	7
RhoA WT+U	76	58	19	16	17	52	5	16	7
RhoA WT+I	13	1	-	3	-	14	-	-	4
RhoB G14V	-	2	8	24	6	60	19	10	17
RhoB Q63L	29	34	9	43	6	31	-	15	10
RhoB T19N	15	21	6	13	6	80	21	1	13
RhoB WT	11	15	19	10	16	38	15	33	12
RhoB WT+U	8	17	27	18	14	10	9	26	4
RhoB WT+I	4	8	17	12	7	6	8	12	3
RhoC G14V	34	50	5	37	6	177	22	2	10
RhoC Q63L	-	2	13	16	12	216	26	12	5
RhoC T19N	1	4	-	33	-	5	-	2	2
RhoC WT	95	130	6	66	5	121	3	38	6
RhoC WT+U	99	63	68	66	55	243	10	76	5
RhoC WT+I	2	-	-	6	-	11	-	-	2

Aus der Vielzahl identifizierter Proteine nach Präzipitation der verschiedenen Rho-Varianten aus Endothelzelllysaten wurden einige relevante und charakteristische Rho-assoziierte Vertreter in Tabelle 10 zusammengetragen. Dazu zählen Rho-Aktivitätsregulatoren, wie RhoGDIs (RhoGDI1, RhoGDI2), RhoGEFs (BIG1, GDS1, DOCK4) und RhoGAPs (IQGAP1) sowie *Downstream*-Rho-Effektoren, wie das *Diaphanous-related Formin-1* (DIA1), die Protein Kinase N1 (PKN1) und Cofilin-1.

Die identifizierten RhoGDIs 1 und 2 zeigten eine bevorzugte Interaktion mit den RhoA- und RhoC-Wildtyp-Proteinen, wohingegen nach RhoB-Expression weniger dieser GDIs

präzipitiert wurden. Dies deckt sich mit früheren Befunden anderer Arbeitsgruppen [16]. Der RhoB-spezifische RhoGDI3 [70] konnte unter dem gewählten experimentellen Ansatz in Endothelzellen nicht gefunden werden. Interessant ist, dass nach Stimulation der Rho-Aktivität durch Zugabe von U-46619 verstärkt RhoGDIs an RhoA- und RhoC-Wildtyp-Proteine binden. Dies zeigt möglicherweise das Verhindern einer Rho-Überaktivität nach Stimulation durch Rho-GDI-Bindung und damit einhergehender Inaktivierung der Wildtyp-Proteine. Weiterhin war auffällig, dass die inaktiven T19N-Varianten von RhoA und RhoC nicht die zu erwartende Präzipitation der GDIs bewirkten, obwohl RhoGDIs typischerweise an die inaktive (GDP-gebundene) Konformation von Rho-Proteinen binden [59]. Eine Interaktion von RhoGDIs mit aktiven Rho-Proteinen ist hingegen nicht ausgeschlossen [59], wobei sich für RhoA und RhoC mögliche Unterschiede in der Interaktionspräferenz zwischen der G14V- und Q63L-Mutante zeigten.

Als Rho-Protein-aktivierende Interaktionspartner (RhoGEFs) konnten die Proteine BIG1, GDS1 und DOCK4 identifiziert werden. Hierbei zeigte sich, dass ein *Pulldown* der jeweiligen Wildtyp-Proteine im Rahmen der Aktivitätsregulation der Wildtyp-Varianten im Vergleich zur Expression der definierten Aktivitätsmutanten vorteilhaft erscheint, da dies zu klareren Interaktionsmustern führte. Eine mögliche Präferenz von RhoA, RhoB oder RhoC gegenüber einem der drei genannten RhoGEFs kann aus den erhaltenen Daten jedoch nicht abgeleitet werden. IQGAP1 zeigte seine charakteristische Eigenschaft als ein den aktiven RhoGTPase-Zustand stabilisierendes *Scaffold*-Protein besonders deutlich für RhoA und RhoC, wohingegen eine eindeutige Diskriminierung verschiedener Aktivitätszustände von RhoB nicht ableitbar war. Eine solche Interaktion von IQGAP1 war bisher lediglich für die RhoGTPasen Cdc42 und Rac1 gezeigt worden, nicht aber für RhoA und insbesondere RhoC [259]. Diese mögliche Proteininteraktion bedarf aber noch nachfolgender experimenteller Bestätigung. Eng verknüpft mit IQGAP1 ist das Formin Dia1 [260], welches bevorzugt durch RhoA- und RhoC-Aktivität co-präzipitiert werden konnte. Erneut zeigte der Aktivitätsgrad von RhoB keinen eindeutigen Zusammenhang zur RhoB-DIA1-Interaktion. Somit konnten Befunde einer RhoA-Dia1-Interaktion bestätigt [261] und eine bisher nicht beschriebene potentielle Interaktion von aktivem RhoC mit DIA1 beobachtet werden.

Ein weiterer wichtiger Rho-Effektor ist die PKN1 [262], deren Interaktion mit RhoA, RhoB und RhoC bereits beschrieben worden ist [263, 264] und in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden konnte. Somit scheint PKN1 auch in Endothelzellen ein zentraler Effektor der untersuchten RhoGTPasen zu sein und deren Effekte auf die Zell-Adhäsion, Zellmigration, Zellüberleben und Zellzyklusregulation zu vermitteln.

Cofilin-1 nimmt beim RhoGTPase-vermittelten Aktinfilament-*Turnover* eine zentrale Funktion *downstream* der LIMK ein und vermittelt in seiner nicht-phosphorylierten Form den Abbau von filamentösem Aktin und inhibiert die Polymerisation von globulärem Aktin. Interessant ist, dass eine Interaktion dieses nachgeschalteten Effektorproteins mit RhoA, RhoB und RhoC, scheinbar bevorzugt mit den aktiven Rho-Varianten, gefunden werden konnte. In welchem Maße diese Interaktion funktionell relevant sein könnte, muss durch weiterführende Projekte geklärt werden.

Abschließend muss im Zusammenhang mit den in der vorliegenden Arbeit gemachten Befunden zu möglichen Rho-Interaktionspartnern angemerkt werden, dass es sich hierbei um vorläufige Daten handelt, die in weiterführenden Projekten bestätigt werden müssen. Unterschiede der identifizierten Interaktionspartner zwischen den verschiedenen Aktivitätszuständen können zwar einen Hinweis auf funktionell relevante Bindung sein, sie könnten aber auch Artefakte einer ungleichmäßigen Expression der entsprechenden Rho-Variante sein. Weiterhin war das Fehlen einer zu erwartenden Interaktion der ROCK, als einer der zentralsten Rho-Effektoren, mit den untersuchten RhoGTPasen [265] in der Interaktom-Analyse auffällig. Somit lieferte die vorgenommene Interaktom-Analyse unter den gewählten experimentellen Bedingungen interessante Grundlagen für weitere Untersuchungen möglicher Rho-Interaktionspartner, ohne einen Anspruch auf Vollständigkeit und weiterführende Identifizierung von Interaktionsproteinen zu erfüllen.

4. Diskussion

Übergeordnetes Ziel der vorliegenden Arbeit war die systematische Charakterisierung der Einflüsse der drei RhoGTPase Isoformen, RhoA, RhoB und RhoC, auf die Zellhomöostase und angiogenetische Kapazität von humanen Endothelzellen *in vitro* und *in vivo*. Zu den weiteren Zielen der Arbeit gehörte es, Rho-vermittelte Signale auf die Genexpression humaner Endothelzellen mittels globaler Transkriptom- und nachfolgender Validierungsanalysen zu entschlüsseln, um die anti-angiogenetischen Effekte der RhoGTPasen weiterführend charakterisieren und hieran beteiligte Signalwege und Zellprozesse identifizieren zu können. Des Weiteren wurden die Bedeutung bereits bekannter Rho-Effektoren für die Vermittlung der anti-angiogenetischen Rho-Signale durch pharmakologische Blockade und shRNA-vermittelten Knockdown analysiert und zudem durch massenspektrometrische Analysen immunpräzipitatorisch aufgereinigter RhoGTPasen potentielle Rho-Interaktionspartner/-Effektoren in humanen Endothelzellen identifiziert.

RhoGTPasen als Proteinfamilie mit 20 humanen Vertretern, spielen als Schaltermoleküle in allen eukaryotischen Zellen eine fundamentale Rolle und nehmen Schlüsselpositionen bei der Regulation des Aktinzytoskeletts, des intrazellulären Vesikeltransports, der Mikrotubulidynamik, der Etablierung der Zellpolarität und der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren ein. Regulierend wirken sie durch den Wechsel zwischen GTP-gebundenem (aktivem) und GDP-gebundenem (inaktivem) Zustand [2]. In der vorliegenden Arbeit fanden dabei Mutanten der RhoGTPasen RhoA, RhoB und RhoC Verwendung, die zum einen den dauerhaft inaktiven (dominant negativen) Zustand, zum anderen den dauerhaft aktiven (konstitutiv aktiven) Zustand einnahmen. Dies wurde durch Aminosäureaustausche an den Positionen 14 (Gly → Val) und 63 (Gln → Leu) für die genutzten aktiven Mutanten und an Position 19 (Thr → Asn) für die verwendete dominant negativen Rho-Variante erreicht. Hierbei handelt es sich um etablierte Rho-Mutationen, die bereits seit vielen Jahren Anwendung finden und deren Proteinkristallstrukturen aufgeklärt sind [52, 53, 56, 266, 267], allerdings bislang noch nicht systematisch für die Analyse des Einflusses der RhoGTPasen auf die angiogenetische Endothelzellfunktion und -Homöostase eingesetzt wurden. Verglichen wurden die Einflüsse der Mutanten zudem mit einer Überexpression der Wildtyp-Proteine von RhoA, RhoB und RhoC und Kontroll-transduzierten HUVEC und HCAEC, die eine ausschließlich endogene Rho-Expression aufwiesen. Die Expression der RhoGTPasen in ihren verschiedenen „Schalterstellungen“ hat den Vorteil, dass verschiedene Aktivierungszustände der Rho-Signalwege „fixiert“ simuliert werden können. Es muss

dadurch nicht auf externe Stimuli zur Aktivierung der RhoGTPasen, beispielsweise durch Thrombin [268] oder erhöhte Serumkonzentrationen im Medium [227, 269], zurückgegriffen werden, die neben RhoGTPasen zahlreiche weitere Signalwege aktivieren. Bei der Inaktivierung der Rho-Signalkaskade konnte zudem auf das Ausschalten der RhoGTPase durch RNAi verzichtet werden, welche das Problem aufweisen, dass die GTPase durch den *Knockdown* auch Protein-Protein-Interaktionen entzogen wird, die auch im inaktiven Zustand der RhoGTPasen Einfluss auf die Aktivität von zellulären Signalwegen nehmen können. Darüber hinaus kann die im experimentellen Ansatz der Arbeit verwendete Überexpression von Wildtyp-Formen der genannten RhoGTPasen hilfreich sein, um den Einfluss von Stimuli auf die Funktion von Endothelzellen zu charakterisieren, welche das endogene Expressionsniveau von RhoGTPasen erhöhen.

Grundsätzlich ist es aufgrund der komplexen Signalwege und der potentiell promiskuitiven Effektorbindung von 20 kleinen RhoGTPasen schwierig, die Rolle einzelner RhoGTPasen isoliert im zellulären Kontext zu betrachten [270]. Es kommt bei RhoGTPase-gesteuerten Prozessen wie der Zellmigration, der Tumorinvasivität, der Zellpolarität, dem Vesikeltransport und der Aktinorganisation auf zeitlich und räumlich fein orchestrierte Aktivität und Inaktivität verschiedener RhoGTPasen an [271-273]. Dies wird deutlich bei der Betrachtung von RhoGTPase-Einflüssen auf die Zellmigration. Hierbei ist ein geordnetes Zusammenspiel mehrerer Vertreter der RhoGTPasen von Bedeutung. So vermittelt Rac zunächst an der Zellfront die Ausstülpung von Lamellipodien durch die WAVE-Arp2/3 abhängige Aktinpolymerisation, während aktives RhoA über den Rho-Kinase (ROCK)-Signalweg für die Stabilisierung des neu gebildeten Aktinskeletts sorgt. Gleichzeitig muss die RhoA- und RhoC-Aktivität am nachfolgenden Zellende gering sein, um einen Aktin-*Turnover* zu gewährleisten [21]. Kommt es hingegen auch an anderen Randbereichen der Zelle zu einer verringerten RhoA- und RhoC-Aktivität, so führt dies zu einer unkontrollierten Ausbildung von Lamellipodien [274]. Die Richtung der Migration wird zusätzlich noch durch die Aktivität von Cdc42 vorgegeben. Cdc42 vermittelt zum einen die Ausbildung von Filopodien und reguliert zum anderen durch Rac-GEF-Lokalisation und gerichteten Vesikeltransport die Rac-Aktivität an der Zellfront [275].

Ein weiteres Beispiel für die Komplexität der RhoGTPase-Wechselwirkungen konnte in Endothelzellen durch RNAi-vermittelten *Knockdown* einer der drei in dieser Arbeit untersuchten RhoGTPasen gezeigt werden [276, 277]. In Folge eines RNAi-vermittelten *Knockdowns* einer Isoform konnten gesteigerte Expressionen und Aktivitäten der beiden anderen Isoformen beobachtet werden. Somit scheinen die RhoGTPasen RhoA, RhoB und

RhoC nicht nur Hand in Hand zelluläre Vorgänge zu regulieren, sondern auch die An- oder Abwesenheit einer GTPase durch Regulation einer anderen kompensieren zu können. Vor diesem Hintergrund erscheint der Ansatz der Überexpression von konstitutiv aktiven, dominant negativen und von Wildtyp-Formen der drei untersuchten RhoGTPasen besonders geeignet, die verschiedenen Aktivitätszustände als Regulatoren und Interaktionspartner isoliert zu untersuchen.

4.1. Aktivität und Interaktion der untersuchten RhoGTPase-Varianten

Die Aktivität der jeweiligen Wildtyp-Formen, sowie zweier konstitutiv aktiver Mutanten (Q63L, G14V) und einer dominant negativen Mutante (T19N) von RhoA, RhoB und RhoC wurde nach lentiviraler Expression in HUVEC und unter Verwendung von HUVEC-Lysaten sowie Rhotekin-Agarose *Beads* analysiert. Dabei interagierte die Rho-Bindedomäne (RBD-Domäne) des Rhotekins mit aktivem (GTP-gebundenem) Rho, wodurch über die Zentrifugation der Agarose-Partikel ein *Pulldown* aktiver Rho-Proteine möglich wurde [278]. Interessanterweise zeigten dabei die beiden aktiven Varianten einen Unterschied in ihrem Aktivitätsmaß bzw. ihrer Fähigkeit mit der RBD-Domäne des Rhotekins in Wechselwirkung zu treten. Die Q63L-Mutanten der untersuchten RhoGTPasen zeigten in diesem Zusammenhang eine deutlich stärkere Interaktion, als die G14V-Mutanten, obwohl keine evidenten Unterschiede im zellulären Expressionsniveau und der subzellulären Verteilung der Varianten beobachtet werden konnten [184]. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit bereits publizierten Befunden anderer Arbeitsgruppen, welche für die Variante RhoA G14V ein Verhältnis von 55% GDP- zu 45% GTP-Bindung beobachten konnten, während die RhoA Q63L-Variante in dieser Untersuchung zu 92% GTP- und nur zu 8% GDP-gebunden vorlag [53]. Weisen diese beiden RhoA-Varianten eine GTP-Assoziation auf, dann erfolgt die GTP-Hydrolyse mit einer Geschwindigkeit von $3,8 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ (G14V) bzw. $5,1 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ (Q63L) und somit deutlich langsamer als beim Wildtyp-Protein ($100 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$) [53, 59]. Das heißt, sie verbleiben 20- bis 25-mal länger in ihrer aktiven Konformation als das Wildtyp-Protein und können somit eine erheblich verstärkte Rho-Signaltransduktion induzieren. Trotzdem erklären diese Geschwindigkeiten nicht, warum die G14V-Mutanten bei ähnlicher biologischer Aktivität in Endothelzellen eine deutlich geringere Interaktion mit der RBD des Rhotekins aufweisen. Hierbei sollten daher auch mutationsbedingte Konformationsunterschiede zu den Q63L-Varianten und den Wildtyp-Proteinen berücksichtigt werden. Tatsächlich konnte ein zum Teil sehr unterschiedliches Effektorbindungsverhalten der beiden aktiven Mutanten auch in den in dieser Arbeit durchgeführten massenspektrometrischen Interaktionsstudien

beobachtet werden, was diese Hypothese unterstützt. Auch zeigen neueste Erkenntnisse, dass die Mutation G14V im RhoA trotz einer GTP-Bindung einen inaktiven Konformationszustand einnehmen kann, was eine von der Q63L-Variante abweichende Effektorbindung erklären könnte [279]. Dominant negatives (inaktives) Rho kann entsprechend der Angaben des Aktivitätsassay-Herstellers präzipitiert werden, wenn es in einem starken Überschuss zum aktiven Rho vorliegt. Die Überexpression der T19N-Varianten vergrößert den Pool von inaktivem Rho im Vergleich zum endogenen Rho-Pool um ein Vielfaches, wodurch vermutlich geringe Mengen der T19N-Mutanten ebenfalls präzipitiert wurden. Besonders inaktives RhoB scheint hierbei, trotz benachteiligter Proteinkonformation, in den Experimenten der vorliegenden Arbeit vergleichsweise gut durch die RBD des Rhotekins gebunden werden zu können. Die starke Bindung von Wildtyp-Varianten des RhoA, RhoB und RhoC im Rhotekin *Pulldown* erklärt sich vermutlich zum einen aus der Tatsache, dass der GTP-Gehalt in der Zelle deutlich höher ist als der GDP-Gehalt und die Wildtyp-Proteine dadurch bevorzugt in der GTP-gebundenen Form vorliegen [7], zum anderen ist eine bevorzugte Bindung des nicht-mutierten Rho-Proteins durch die RBD des Rhotekins aus sterischen Gründen durchaus nachvollziehbar. Dies deckt sich mit Ergebnissen eigener massenspektrometrischer Protein-Protein-Interaktionsstudien, die zeigen, dass inaktivierende und aktivierende Mutationen der RhoGTPasen zu einer Veränderung des Interaktionsspektrums führen, welche vermutlich nicht mit dem Aktivitätsgrad der RhoGTPasen korreliert, sondern vielmehr auf die aberrante räumliche Struktur der mutierten Proteine zurückzuführen sein könnte.

Zudem erbrachte die Analyse des durch die TP-Rezeptor-Aktivierung induzierten Rho-Wildtyp-Protein-Interaktoms im Vergleich zum Interaktom des basalen Aktivitätszustands unter Standard-Kulturbedingungen und des Interaktoms nach Inaktivierung von Rho-Wildtyp-Proteinen durch den Rho-Inhibitor C3 Transferase zusätzliche relevante Informationen hinsichtlich einer gezielten Variation des Aktivitätszustandes von Wildtyp-Formen der untersuchten RhoGTPasen im Vergleich zum Interaktom der konstitutiv aktiven und dominant negativen Mutanten. Nach TP-Rezeptor-Aktivierung bzw. Rho-Hemmung konnten beispielsweise eine Zunahme bzw. Aufhebung der Interaktion von RhoA und RhoC mit bereits aus anderen Zelltypen beschriebenen Rho-Effektoren, wie PKN1 und Dia1, in humanen Endothelzellen nachgewiesen werden, was die methodische Qualität des gewählten experimentellen Ansatzes verdeutlicht. Ähnliches gilt auch für die identifizierten RhoGEF (z.B. BIG1, DOCK4), die als Rho-Protein-aktivierende Interaktionspartner eindeutiger Interaktionsmuster mit den Wildtyp-Proteinen zeigten, als mit den Rho-Mutanten. So wurden

in der vorliegenden Arbeit Rho-Interaktionspartner, die aus anderen zellulären Zusammenhängen bekannt sind, als Rho-Interaktionspartner in menschlichen Endothelzellen bestätigt. Im Zusammenhang mit Rho-Interaktionsstudien muss angemerkt werden, dass die Identifikation Rho-Isoform-spezifischer Interaktionspartner aufgrund der Promiskuität zahlreichen Effektoren nicht trivial zu sein scheint [280]. Auch ist die Identifikation von Rho-Effektoren vom Ursprung des Gewebe- bzw. Zelllysats abhängig [281], weshalb einzelne Rho-Effektor-Interaktionen unter den gewählten Bedingungen dieser Arbeit möglicherweise nicht detektiert werden konnten. Hier ist vor allem auf das Fehlen der ROCK als zentrale Rho-Effektoren [280] im gewonnenen Datensatz der Interaktomanalysen hinzuweisen. Über die Gründe dieses unerwarteten Fehlens kann nur spekuliert werden. Es scheint möglich, dass mit dem gewählten methodischen Ansatz nur die am stärksten gebundenen Proteine isoliert und in der Interaktomanalyse nachgewiesen wurden. Möglicherweise können in methodischen Ansätzen, in denen Rho-assoziierte Proteine direkt biotinyliert und somit für nachfolgende Analysen markiert werden, detailliertere Interaktomstudien erreicht werden [280]. Eine weitere mögliche Erklärung für die fehlende Detektion der Rho-ROCK-Interaktion könnte zudem in der fraktionierten Endothelzelllyse liegen, die die Detektion zytoplasmatischer Interaktionen bevorzugen könnte. Allerdings ist ein zytoplasmatisches Vorkommen beider ROCK-Isoformen zumindest in anderen Zelltypen beschrieben wurden [282, 283]. Folglich sind daher weiterführende Analysen nötig um Gründe der fehlenden Rho-ROCK-Interaktion in humanen Endothelzelllysaten zu klären und zudem um die Befunde aus der Interaktomanalyse zu validieren.

Zusammengenommen erscheint die systematische vergleichende biologische Aktivitätsanalyse der konstitutiv aktiven, dominant negativen Rho-Varianten und den Wildtyp-Formen der RhoGTPasen in humanen Endothelzellen mit Blick auf funktionelle Protein-Protein-Interaktions-Muster in humanen Endothelzellen daher hochrelevant. Diese Arbeit trägt durch ihren experimentellen Ansatz zur weiteren Entschlüsselung von Unterschieden der RhoGTPasen RhoA, RhoB und RhoC in den Bereichen Effektorbindung, Protein-Protein-Interaktionen, Signaltransduktion und zelluläre Funktion bei.

4.2. Effekte der RhoGTPasen auf die Endothelzellmorphologie und Zellviabilität

Die drei GTPasen RhoA, RhoB und RhoC sind vor allem für ihre regulatorische Relevanz in der Tumorbilogie bekannt [96, 254, 274, 284, 285], wo sie unter anderem über ihre Aktin-

organisierenden Eigenschaften Einfluss auf Tumorinvasivität und Metastasierung nehmen. Dabei stimuliert RhoA die Zellzyklusprogression, Migration und Invasion über Rho-Kinasen [286]. RhoC wirkt über die Formine FMNL2 und FMNL3 induzierend auf die Lamellipodienextension und fördert hierüber hauptsächlich Tumor-Metastasierung [96, 274, 284]. Im Gegensatz zu RhoA und RhoC nimmt das RhoB-Expressionsniveau in verschiedenen humanen Tumoren mit zunehmendem Malignitätsgrad ab, beziehungsweise steigt die RhoB-Aktivität nach DNA-Schädigung und vermittelt einen Zellzyklusarrest [287], weshalb dieser Rho-Isoform eine Rolle als Tumorsuppressor zugeschrieben wird [288, 289]. Die aktinregulierenden Einflüsse der drei untersuchten RhoGTPasen zeigten sich in Abhängigkeit ihres Aktivitätszustandes durch Phalloidinfärbung des Aktins auch in humanen Endothelzellen. Die aktiven Varianten von RhoA, RhoB und RhoC bewirkten in HUVEC die Ausbildung von Stressfasern und induzierten einen kontraktilen Zellphänotyp, welcher sich in einer spindelförmigen Zellmorphologie zeigte. Typisch ist die klassische Stressfaserbildung und gesteigerte Acto-Myosin-basierte Zellkontraktion für RhoA und RhoB, ausgelöst durch Thrombin, VEGF oder Hypoxie [290, 291]. Hingegen hatte die Expression aktiver RhoC-Mutanten einen geringeren Einfluss auf die Ausbildung von Stressfasern und induzierten eine weniger kontraktile Zellmorphologie als RhoA und RhoB, was möglicherweise auf eine Rolle von RhoC im Prozess des Aktin-*Turnovers* zurückgeführt werden kann [21]. Ein relevanter Einfluss der inaktiven Mutanten auf diese endothelialen Prozesse konnte hingegen nicht beobachtet werden, was im Wesentlichen mit Ergebnissen nach RNAi-vermitteltem *Knockdown* der RhoGTPasen übereinstimmt [277], funktionell aber nicht mit dem in eigenen Versuchen beobachteten *Hypersprouting*-Phänomen von humanen Endothelzellen nach C3 Transferase-vermittelter Hemmung von RhoGTPasen im Einklang steht [184]. Interessant ist, dass die Überexpression der Wildtyp-Proteine, trotz nachweislicher Erhöhung der zellulären Bioverfügbarkeit GTP-gebundener Rho-Proteine und der damit einhergehenden Erhöhung des Aktivitätsniveaus der RhoGTPasen einen im Mittel schwächeren anti-angiogenetischen Phänotyp als die konstitutiv aktiven Varianten in humanen Endothelzellen induzierten. Vorstellbar wären hier gegenregulierende Mechanismen durch die Anpassung entsprechender RhoGAP-Spiegel und die einhergehende verstärkte Inaktivierung der GTPasen, die bei konstitutiver, mutationsbedingter Rho-Aktivität hingegen ineffektiv bleiben.

Der Einfluss der verschiedenen Varianten von RhoA, RhoB und RhoC auf Zellviabilität und Zellproliferation wurde mit Hilfe der PI-Inkorporation sowie Ki-67-Färbung und BrdU-Assays abgeschätzt. Auch hinsichtlich des Einflusses der drei Rho-Isoformen auf Apoptose und Proliferation sind verschiedene Studien in Tumorzelllinien publiziert, während für

Endothelzellen nur wenige Daten verfügbar sind. Hierbei zeichnet sich für RhoA ein unklares Bild ab, da sowohl stimulierende Wirkungen auf verschiedene Tumorzellen [285], nach neuesten Erkenntnissen aber auch inhibierende Effekte in Brustkrebszellen [292] beschrieben wurden. Ähnliches gilt für RhoC, dessen shRNA-vermittelter *Knockdown* zu einer verringerten Proliferation von Glioblastomzellen führte [293], während die RhoC-Überexpression in Brustkrebszellen eine reduzierte DNA-Synthese und Zellviabilität bewirkte [292]. Eindeutiger scheint die Rolle von RhoB in Tumorgewebe zu sein. Allgemein wird aktives RhoB als Tumorsuppressor angesehen [289], da seine Expression in vielen entarteten Geweben reduziert ist [288]. Daten aus Untersuchungen an Endothelzellen aus der Nabelschnur zeigten hingegen keinen Einfluss eines RNAi-vermittelten *Knockouts* von RhoB auf die Zellviabilität [276]. Gleiches trifft auf die inaktive T19N-Mutante des RhoB in der vorliegenden Arbeit zu. Somit beeinflusst weder der *Knockdown*, noch eine permanente Inaktivierung von RhoB die Zellviabilität von HUVEC. Dies könnte darauf rückgeführt werden, dass die Menge funktionellen RhoB-Proteins in Endothelzellen durch Ubiquitinierung und nachfolgenden Abbau im Ubiquitin-Proteasom-System der Zellen niedrig gehalten wird, so dass sich eine weitere Absenkung des Aktivitätsniveaus nur geringfügig auswirkt. Eine gesteigerte Expression des RhoB-Wildtyps und die konstitutive Aktivität von RhoB reduzierte hingegen das Überleben humaner Endothelzellen, vermutlich durch verringerte Proliferation und Zellviabilität. Dies macht einen ähnlichen Einfluss von RhoB auf Endothelzellen, wie auf Tumorzellen vorstellbar. Genaue Mechanismen sind noch immer unbekannt, es konnte aber ein Zusammenhang zwischen verminderter RhoB-Expression durch verschiedene Histondeactylasen (HDAC) und Tumorentstehung beobachtet werden [294, 295]. Ebenso ist die Rolle des RhoB für die Apoptoseinduktion nach DNA-Schädigung beschrieben [80], vermittelt durch die nukleären GEFs Ect2 und Net1. Es ist demnach vorstellbar, dass RhoB in seinen aktiven Formen und ebenso als aktivierbares Wildtyp-Protein, in HUVEC Vorgänge nach DNA-Schädigung simuliert und hierüber die Zellviabilität und Zellproliferation verringert.

Ähnliche Befunde konnten nach Expression der untersuchten RhoA-Varianten erhoben werden, wobei die mechanistischen Grundlagen dieser Effekte bislang unklar sind. In diesem Kontext konnten Zahra *et al.* 2019 zeigen, dass ein RhoA-*Knockdown* in HUVEC die VEGF-stimulierte Proliferation vermindert, wohingegen der RhoA-*Knockdown* unter basalen Bedingungen ohne Einfluss blieb. Hier muss festgestellt werden, dass wir den von Zahra und Kollegen beschriebenen VEGF-inhibitorischen Effekt der RhoA-Inaktivierung, allerdings mit anderer Methodik, in dieser Arbeit nicht nachvollziehen konnten [296].

Eine experimentelle Analyse der Tumorangiogenese bei Mäusen ergab, dass die endothelspezifische Ausschaltung von $G\alpha_{13}$ mit einer Reduktion von Tumorwachstum und -vaskularisierung assoziiert war. Da $G\alpha_{13}$ als wichtiger *Upstream*-Aktivator von RhoA fungiert und die $G\alpha_{13}$ -vermittelte RhoA-Aktivierung möglicherweise die NF κ B-induzierte VEGFR-2-Expression steuert, wurde auf eine pro-angiogenetische Funktion von endotheliale RhoA in der Tumervaskularisierung geschlossen [297]. Dies steht in klarem Widerspruch zu den Befunden aus HUVEC und HCAEC in der vorliegenden Arbeit, welche zeigen, dass konstitutive RhoA-Aktivität in humanen Endothelzellen VEGFR-2-Expression reduziert und nicht induziert. Spekuliert werden kann an dieser Stelle über die Mechanismen, die zu anti-proliferativen und pro-apoptischen RhoA-Effekten in humanen Endothelzellen führen. So wurde beschrieben, dass RhoA über seine Effektoren mDia und ROCK Einfluss auf den Zellzyklus nehmen kann [298]. Welche Zellzyklusinhibitoren in HUVEC durch RhoA aktiviert werden, muss allerdings in zukünftigen Forschungsprojekten geklärt werden.

Neben den widersprüchlichen Erkenntnissen zur Rolle von RhoC in verschiedenen Krebszellen [292, 293], lieferten Hoepfner und Kollegen 2015 Ergebnisse zur Funktion von RhoC in humanen Endothelzellen [299]. Es konnte in HUVEC eine Aktivierung von RhoC durch eine VEGF-VEGFR-2-vermittelte Stimulation nachgewiesen werden. Über einen RhoC-*Knockdown* durch RNAi wurde die HUVEC-Proliferation signifikant vermindert, wobei die Autoren schlussfolgerten, dass RhoC den β -Catenin-Abbau verhindert und dadurch die Zellzyklusprogression fördert [299]. Analysen von humanen Lymphendothelzellen (LyECs, *Human Lymphatic Microvascular Endothelial Cells*) und humanen Endothelzellen aus dem Hirn (HBMVECs, *Human Brain Microvascular Endothelial Cells*) zeigten allerdings heterogene Reaktionen der untersuchten Zelltypen auf den RhoC-*Knockdown* [299]. Während die Proliferation von Lymphendothelzellen wie bei den HUVEC vermindert wurde, hatte der RhoC-*Knockdown* keinen Effekt auf die Proliferation von HBMVECs. Hingegen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Reduktion der RhoC-Aktivität einen stimulierenden Einfluss auf die Zellproliferation von HUVEC hatte (Ki-67-Expression). Möglicherweise kann die Diskrepanz zu den Befunden von Hoepfner und Kollegen auf den *Knockdown* von RhoC und die damit verbundene Reduktion von RhoC-abhängigen Protein-Protein-Interaktionen zurückgeführt werden. Im Widerspruch zu den Arbeiten von Hoepfner *et al.* zeigte sich zudem ein proliferationshemmender und zelltodfördernder Einfluss von konstitutiv aktivem RhoC, welcher allerdings im Vergleich zu RhoA- und RhoB-vermittelten Effekten moderater ausfiel. Auch blieb die Expressionserhöhung des RhoC-Wildtyp-Proteins in HUVEC ohne signifikanten Effekt auf die Proliferation der Zellen und führte zur

geringfügigen, aber signifikanten Abnahme der Zellviabilität. Dies weist auf eine unterschiedliche Effektivität und Mechanismen von RhoA, RhoB und RhoC in der Regulation von Zellviabilität humaner Endothelzellen hin. Grundsätzlich wird ein ausgewogener Wechsel zwischen Aktivierung und Inaktivierung von RhoGTPasen und Cdc42 als Voraussetzung für eine regelrecht ablaufende Zytokinese angenommen, was eine Hemmung der Zytokinese durch Zunahme der RhoGTPase-Aktivität erklären könnte [2]. Relevante Effektoren der Rho-Isoformen im Kontext der Proliferation müssen in weiterführenden Studien identifiziert werden, wobei ein Einfluss auf Cycline [299] und den Zellzyklusinhibitor p21 [287] bereits beschrieben wurde.

4.3. Einfluss von RhoA, RhoB und RhoC auf die angiogenetische Kapazität humaner Endothelzellen

Der Einfluss der drei kleinen RhoGTPasen auf angiogenetische Prozesse wurde *in vitro* durch Analyse der Kapillarbildung (2D: *Tube-Formation-Assay*; 3D: Sphäroid-basierter *Sprouting-Assay*), der Proliferation (BrdU-Inkorporation, Ki-67-Expression) und der Migration im *Scratch-Assay* (Wundheilungsassay) untersucht. Zudem erfolgte mit Hilfe des Xenograft-Assays die Untersuchung der Einflüsse von RhoA, RhoB und RhoC auf die angiogenetische Kapazität von humanen Endothelzellen und die Gefäßneubildung in immunsupprimierten Mäusen *in vivo*.

Für RhoA, den am besten untersuchten Vertreter der drei untersuchten RhoGTPasen, liegen kontroverse Erkenntnisse über seinen Einfluss auf die Migration von Endothelzellen vor. Einerseits zeigten einige Studien, dass RhoA-Aktivierung essentiell für die VEGF-induzierte Endothelzellmigration ist [199, 200, 296, 300], andere Studien konnten diese Befunde hingegen nicht bestätigen [301]. Die Studienlage für RhoB und RhoC ist dagegen deutlich übersichtlicher. Howe und Addison zeigten eine reduzierte Migration im *Scratch-Assay* nach RNAi-vermitteltem *Knockdown* von RhoB [276]. Im Gegensatz dazu induzierte ein RhoC-*Knockdown* eine Zunahme der HUVEC-Motilität [299]. Allerdings gibt es auch zur Rolle des RhoC im Prozess der Endothelzellmigration hiervon abweichende Beobachtungen. Die Gruppe um Zhao und Kollegen beobachteten eine gestörte Zellmotilität nach RhoC-*Knockdown* [302]. In dieser Studie wurde zudem ein regulatorischer Einfluss von RhoC auf ERK1 und ERK2, p38 MAPK und die Phosphorylierung der MLC2 (*Myosin Light Chain 2*) postuliert. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass TP-Rezeptor-Aktivierung angiogenetisches *Sprouting* humaner Endothelzellen durch Aktivierung von RhoA und RhoC

inhibierte [181]. Die Bedeutung der RhoGTPasen für die endotheliale Zellfunktion war somit sehr widersprüchlich.

Um nun die Einflüsse von RhoA, RhoB und RhoC auf die Endothelzellmigration zu klären, wurde zunächst der entsprechende Effekt der konstitutiv aktiven bzw. der dominant negativen Rho-Varianten sowie der Einfluss der Wildtyp-Proteine in transduzierten HUVEC im zweidimensionalen *Scratch*-Assay analysiert. Die erhaltenen Befunde stehen dabei teilweise im klaren Widerspruch zur veröffentlichten Studienlage. So störte konstitutive RhoA-Aktivität die Endothelzell-Motilität, wobei ein vergleichbarer Effekt auch durch eine Überexpression der RhoA-Wildtyp-Form hervorgerufen wurde. Dies deutet darauf hin, dass bereits die Grundaktivität von RhoA ausreicht, um bei steigendem Expressionslevel inhibitorische Effekte auf die endotheliale Motilität auszuüben. Sehr ähnliche Befunde konnten für RhoB erhoben werden. Die Bedeutung von RhoB für die HUVEC-Migration wird dadurch unterstrichen, dass die Reduktion der RhoB-Aktivität (RhoB T19N) die Endothelzellmotilität fördert. Eine untergeordnete Rolle bei der Migration scheint im gewählten experimentellen Ansatz RhoC zuzukommen, da hier zum einen die aktiven Mutanten weniger stark motilitätshemmend wirkten und zum anderen weder das Wildtyp-Protein noch die dominant negative Variante Einfluss auf die Migration hatten.

Es ist somit anzunehmen, dass der experimentelle Ansatz zur Untersuchung von Rho-vermittelten Effekten auf die Endothelzellmigration auch die Ergebnisse beeinflusst. Häufig wurde von anderen Arbeitsgruppen der RNAi-vermittelte *Knockdown* von RhoGTPasen gewählt [276, 296, 299], welcher wiederum als Gegenregulation die verstärkte Expression anderer RhoGTPasen nach sich ziehen kann [276, 299]. Allerdings zeigte sich in Versuchen mit dem RhoGTPase-Inhibitor Exoenzym C3 Transferase aus *Clostridium botulinum*, der die Inaktivierung von sowohl RhoA als auch RhoB und RhoC induziert [203], dass die Hemmung endogen exprimierter RhoGTPasen in humanen Endothelzellen (HUVEC und HCAEC) ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf die *Scratch*-induzierte Migration hatte [184]. In weiteren genutzten Ansätzen wurde die Bedeutung der Rho-Aktivität durch angiogenetische Stimuli, wie VEGF oder Sphingosin-1-Phosphat, angeregt und Hinweise auf die Relevanz der RhoGTPase durch Blockade von Rho-Effektoren, bevorzugt ROCK für RhoA, indirekt ermittelt [199, 200, 303]. Bereits van Nieuw Amerongen *et al.* diskutieren, dass Unterschiede im Stimulustyp in diesem Zusammenhang einen Einfluss auf den RhoGTPase-Effekt haben könnten [200]. Der Einsatz von Mutanten, die einen bestimmten Rho-Aktivitätszustand fixieren oder durch Erhöhung der Rho-Wildtyp-Proteinmenge die Bedeutung basaler Rho-Aktivität visualisieren, erscheint daher vorteilhaft, um die funktionale Auswirkung von Rho-

Aktivität systematisch analysieren zu können. Zumal die Effekte der eingesetzten Rho-Varianten durch den RhoGTPase-Inhibitor, C3 Transferase, signifikant reduziert werden konnten. Auch führte die Behandlung mit der C3 Transferase zu einem veritablen *Hypersprouting*-Phänotyp von humanen Endothelzellen unter VEGF-Stimulation, was ebenfalls für einen anti-angiogenetischen Effekt der RhoGTPasen RhoA, RhoB und RhoC spricht. Lediglich Effekte der aktiven RhoB-Mutanten G14V und Q63L wiesen eine unvollständige Reversibilität der Effekte durch C3 Transferase-Behandlung auf. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte eine verringerte GTP-Hydrolysekapazität von aktivem RhoB, verglichen mit RhoA und RhoC, sein. Da bevorzugt GDP gebundene GTPase durch den Inhibitor ribosyliert wird [202], erschwert eine verlängerte GTP-Bindung diesen Prozess. Weiterhin wäre denkbar, dass aktives RhoB, anders als RhoA und RhoC, durch seine möglichen Lokalisationen in Endosomen, multivesikulären Körperchen oder dem Nukleus einer Modifikation durch den Inhibitor entkommt [46-48], während das Wildtyp-Protein durch den schnellen Wechsel zwischen aktivem (GTP-gebunden) und inaktivem (GDP-gebunden) Zustand besser für die inhibierende Modifizierung verfügbar ist. Auch ist denkbar, dass weitere Effektor-domänen in konstitutiv aktiven Rho-Proteinen gebildet werden, welche durch die ADP-Ribosylierung unbeeinflusst bleiben und somit weiter für anti-angiogenetisch Signalbildung zur Verfügung stehen.

Mechanistisch deuten veröffentlichte Daten auf eine fördernde Rolle des RhoA/ROCK-Signalwegs im Rahmen der Endothelzellmigration hin [199, 296], während RhoC die Motilität von Endothelzellen über ERK1/2, p38 MAPK und MLC2 beeinflussen könnte [299]. Wie RhoB die Endothelzellmotilität beeinträchtigt, ist derzeit nicht bekannt. Vorstellbar ist, dass es über seine Aktin-regulierende Wirkung oder über die Regulation anderer RhoGTPasen seinen inhibitorischen Einfluss entfaltet [95]. Die Identifikation von nachgeschalteten Effektoren im RhoA/ROCK-Signalweg [11] erfolgte in der vorliegenden Arbeit durch pharmakologische Hemmung der ROCK1 und 2 durch Y-27632, der LIMK1 durch BMS4 und der LIMK2 durch LX7101. Eine verlässliche Hemmung wurde durch Einsatz der 10fachen IC₅₀-Konzentration gewährleistet, wobei intrazelluläre, effektive Konzentrationen oder die gehemmte Kinaseaktivität als *Read-Out* nicht bestimmt wurden. Die Hemmung der ROCK wirkte sich in Kontrollzellen und HUVEC nach Überexpression inaktiver Rho-Varianten steigernd auf die Migrationgeschwindigkeit von HUVEC aus. Allerdings konnten die inhibierenden Effekte von aktivem RhoA und RhoB auf die Endothelzellmotilität durch Y-27632 nicht aufgehoben werden. Lediglich der Hemmeffekt der jeweiligen Rho-Wildtyp-Proteine konnte partiell aufgehoben werden. Dies legt nahe, dass RhoA und RhoB anti-

migratorische Effekte nicht bzw. nicht ausschließlich über ROCK vermitteln. Entsprechend beeinflusste auch die Hemmung von nachgeschalteten LIM-Kinasen die inhibitorischen Rho-Effekte auf die Endothelzellmigration nicht. Im Unterschied dazu konnte durch ROCK-Hemmung eine Migrationssteigerung in RhoC-exprimierenden HUVEC beobachtet werden, die allerdings nicht zu einer Angleichung der Migrationsgeschwindigkeit an das Niveau Kontroll-transduzierter Endothelzellen führte und somit nur schwer mechanistisch zu bewerten ist. Anders als RhoA und RhoB scheint RhoC aber in einem größeren Ausmaß nachgeschaltete Rho-Kinasen als Effektoren zu nutzen. Allerdings nicht über den ROCK-LIMK-Weg, da weder die Hemmung von LIMK1 durch BMS4 noch die Hemmung von LIMK2 durch LX7101 signifikante Effekte zeigten. Spekuliert werden kann, dass RhoC über ROCK Einfluss auf die Aktivität von FAK (*Focal Adhesion Kinase*) und p38 nimmt und somit die Migration beeinflusst [207, 299]. Die Analyse weiterer potentieller Rho-Interaktionspartner, wie zum Beispiel CIT [217], DIA [21] und Rhophilin 1 und 2 [220, 221], erfolgte durch eine Kombination aus Überexpression der jeweiligen RhoGTPase-Variante und shRNA-vermitteltem *Knockdown* des Effektors. Interessanterweise konnte auch durch den *Knockdown* von Rho-Interaktionspartnern kein eindeutiger Effektor der migrationshemmenden RhoA-Wirkung identifiziert werden. Vorstellbar ist, dass in die Signaltransduktion von RhoA verschiedene gleichgerichtet wirkende Effektoren involviert sind, so dass der Ausfall eines RhoA-Effektors funktionell kompensiert wird. Verstärkt werden könnte dieses Phänomen durch die Überexpression von aktiven bzw. aktivierbaren RhoA-Molekülen, welche zu einer unphysiologischen, parallelen Aktivierung zahlreicher RhoA-Effektoren führen könnte. Hingegen scheint die motilitätshemmende Signaltransduktion von RhoB und RhoC verstärkt von der Aktivierung des Rho-Effektors DIAPH1 abzuhängen. Eine solche Effektorabhängigkeit ist ebenso für die Funktion von RhoC in Tumorgewebe postuliert worden [96]. Der Befund, dass RhoB über DIAPH1 Einfluss auf die Zellmigration nimmt, wurde bisher nicht beschrieben. Dies bestätigt die Annahme, dass RhoB Zellmotilität hauptsächlich über die Modifikation der Aktin-Organisation beeinflusst. Zusätzlich verändert RhoB den intrazellulären Transport anderer RhoGTPasen, wie Cdc42 und Rac, und kann hierüber prinzipiell koordinierte Zellbewegung beeinflussen [304].

Neben der Endothelzellmigration spielt die Fähigkeit eines vaskulären Endothelverbands zur Bildung neuer Kapillaren, in dieser Arbeit primär durch Analyse des angiogenetischen *Sproutings* und der endothelialen *Tube*-Bildung untersucht, eine grundlegende Rolle im Prozess der Angiogenese. In diesem Zusammenhang ist hauptsächlich die Rolle von RhoA untersucht worden. Hierbei zeigen Arbeiten anderer Arbeitsgruppen, dass RhoA-Aktivität

über eine Aktivierung des RhoA-ROCK-Signalwegs induzierte Kapillarneubildung fördert [199, 301, 305]. Diese Ergebnisse stehen allerdings im Widerspruch zu den Befunden anderer Arbeitsgruppen, die eine Verstärkung der VEGF-induzierten Kapillarbildung unter dem Einfluss pharmakologischer ROCK-Hemmung postulieren [200, 306, 307]. Im Einklang mit letzteren Resultaten konnte in der hier vorgelegten Arbeit gezeigt werden, dass VEGF-induziertes *Sprouting* aus HUVEC-Sphäroiden durch ROCK-Hemmung verstärkt wird und C3 Transferase-vermittelte Hemmung von endogen exprimiertem RhoA, RhoB und RhoC zu einem *Hypersprouting*-Phänotyp von HUVEC führte. Ähnlich widersprüchlich stellt sich das Literaturbild zum Einfluss von RhoC auf die Angiogenese dar. Während in einer Arbeit der RhoC-*Knockdown* in Endothelzellen die Ausbildung von *Tube*-Strukturen reduzierte [302], konnte in einer anderen Arbeit kein signifikanter Einfluss eines RhoC-*Knockdowns* auf die Bildung von Blutgefäßen beobachtet werden [299]. Erkenntnisse zur Bedeutung von RhoB für den Prozess der Angiogenese sind rar. Howe und Addison zeigten einen hemmenden Effekt des RhoB-*Knockdowns* auf die Kapillarbildung von Endothelzellen [276], während Gerald und Kollegen ein gesteigertes *Sprouting*-Verhalten nach RhoB-*Knockdown* nachweisen konnten [48].

In der vorliegenden Arbeit konnte für die zweidimensionale und dreidimensionale Kapillarbildung von HUVEC grundsätzlich ein hemmender Einfluss der aktiven GTPasen RhoA, RhoB und RhoC beobachtet werden. Im Fall von RhoA und RhoB zeigten auch die überexprimierten Wildtyp-Proteine einen erheblich negativen Einfluss hierauf, während die inaktiven Rho-Varianten keine signifikanten Effekte induzierten. Grundsätzlich zeigte die Überexpression von RhoC-Varianten dabei, wie bereits bei der Migration beobachtet, mildere Einflüsse als die Überexpression von RhoA- und RhoB-Varianten, wobei unklar ist, inwieweit diese Effekte auch durch Unterschiede im Expressionsniveau der RhoGTPasen erklärt werden können.

Die pharmakologische Blockade der ROCK wirkte sich in Kontrollzellen steigernd auf das angiogenetische *Sprouting* aus. Allerdings konnten die inhibierenden Effekte von aktivem RhoA, RhoB und RhoC auf das angiogenetische *Sprouting* durch diese Intervention nicht aufgehoben werden. Lediglich der Hemmeffekt der jeweiligen Rho-Wildtyp-Proteine konnte partiell antagonisiert werden. Dies legt nahe, dass RhoA, RhoB und RhoC hemmende Effekte auf das angiogenetische *Sprouting* nur partiell über ROCK vermitteln und dass die untersuchten konstitutiv aktiven Varianten ROCK-unabhängig inhibitorische Signale auf das angiogenetische *Sprouting* transduzieren. Dies gilt auch für die der ROCK nachgeschalteten Effektoren LIMK1 und LIMK2, deren pharmakologische Inaktivierung RhoGTPase-

vermittelte Hemmeffekte nicht wesentlich beeinflusste. Diese Befunde deuten somit auf andere Effektoren als den Rho-ROCK-LIMK-Signalweg in der Vermittlung anti-angiogenetischer Rho-Effekte hin. Die Daten zur pharmakologischen Inaktivierung des Rho-ROCK-LIMK2-Signalwegs legen aber nahe, dass die Sprossung von Endothelzellen grundlegend hierüber koordiniert bzw. limitiert wird. Im Einklang mit diesen Überlegungen zeigen Studien, dass Myosin II ebenfalls entscheidend an der Koordination von fokalen Adhäsionen und angiogenetischem Sprouting beteiligt ist. So vermindert eine Myosin II-Hemmung die Bildung fokaler Kontakte, trotz Anwesenheit konstitutiv aktiver RhoGTPasen [308, 309]. Da in der vorliegenden Arbeit auch gezeigt werden konnte, dass Rho-Hemmung und Blebbistatin als Myosin II-Inhibitor *Hypersprouting* induzierten, zeigt sich somit ein schlüssiger Signalweg, über den Rho-Aktivität angiogenetisches *Sprouting* negativ reguliert. So kann postuliert werden, dass aktives RhoA, RhoB und im geringeren Maße auch RhoC die Bildung und Dynamik von fokalen Adhäsionen (über ROCK-LIMK2 und Myosin II) beeinflussen und hierüber zu einer erhöhten Zellspannung beitragen. Auch hieraus könnte eine verminderte Kapazität von Endothelzellen neue Kapillarstrukturen zu bilden resultieren. Ähnliche zelluläre Beobachtungen machten auch Riveline und Kollegen im Rahmen von Forschungen an Fibroblasten [310].

Die mechanistischen Unterschiede Rho-vermittelter Hemmung von Endothelzellmigration und *-sprouting* könnten möglicherweise auf Unterschiede der extrazellulären Matrix im jeweiligen experimentellen Format zurückgeführt werden. Auf einem steifen Untergrund bilden sich größere fokale Kontakte als auf einem flexiblen Substrat, wie es bei den Analysen des angiogenetischen *Sproutings* Anwendung findet [311]. Auch kann die Proteinkomposition in den zellulären Matrix-Adhäsionskomplexen in Abhängigkeit der extrazellulären Matrix variieren [312]. Somit ist die Bildung von HUVEC-Adhäsionskomplexen auf starren und eher unphysiologischen Oberflächen, wie bei den Migrationsuntersuchungen, denkbar. Diese fokalen Kontakte sind möglicherweise unabhängig vom Rho-ROCK-LIMK-Signalweg reguliert und können folglich durch dessen Hemmung nicht antagonisiert werden.

4.4. *In vivo*-Angiogenese-Analyse - Xenograft-Assay

Untersuchungen zur Bedeutung von RhoA, RhoB und RhoC für den Gesamtorganismus wurden überwiegend im *Knockout*-Mausmodell durchgeführt und zeigten für RhoB und RhoC, dass entsprechend global defiziente Mäuse vital sind und ohne signifikante Entwicklungseinschränkungen wachsen [313, 314]. Für RhoB zeigen weiterführende Erkenntnisse, dass *Knockout*-Tiere durchaus eine verlangsamte vaskuläre Entwicklung

aufwiesen und verschlechterte Gefäßsprossung in der Retina zu beobachten waren [315]. Die gleiche Arbeitsgruppe konnte ebenfalls zeigen, dass RhoB-defiziente Mäuse neben einer herabgesetzten Neovaskularisierung eine gesteigerte Lymphangiogenese nach Wundsetzung und unter inflammatorischen Stimuli aufwiesen [48]. Grundsätzlich ist für die Rolle von RhoB und RhoC hinsichtlich der Endothelzellfunktion und vaskulären Entwicklung recht wenig bekannt, da sich *in vivo*-Studien hauptsächlich auf ihre Bedeutung in der Tumorbilogie fokussierten.

Ein globales RhoA-*Knockout*-Mausmodell ist bereits in der Embryonalentwicklung letal [316], während das konstitutive, gewebsspezifische Fehlen von RhoA in Endothelzellen die embryonale Letalität erhöht, darüber hinaus aber keine Beeinträchtigung der Embryonalentwicklung bewirkt. Deutlich milder verläuft eine postnatal induzierte RhoA-Defizienz im vaskulären Endothel, welche die Retina-Angiogenese nur geringfügig beeinträchtigt [296]. RhoB- und RhoC-*Knockout*-Mäuse zeigen hingegen keine Entwicklungsdefekte [316].

Die vorliegende Arbeit zeigt, in Übereinstimmung mit den funktionellen *in vitro*-Daten, eine Rho-vermittelte (Q63L-Varianten) herabgesetzte Kapillarbildung durch humane Endothelzellen im HUVEC-Xenograft-Assay *in vivo*. Eine Inaktivierung der drei RhoGTPasen (T19N-Mutanten) hatte hingegen keinen signifikanten Einfluss auf diesen Prozess. Somit zeigen *in vitro*- und *in vivo*-Daten ein konsistentes Bild zum Einfluss der drei kleinen RhoGTPasen auf die angiogenetische Kapazität von HUVEC. Gegensätzliche Daten zur Rolle der T19N-Mutation zeigen Zeng *et al.* und Hoang *et al.*, die den bereits häufig erwähnten hemmenden Einfluss des ausgeschalteten RhoA-ROCK-Signalweges auch *in vivo* beobachten konnten [301, 303].

4.5. Abschließende Betrachtung der funktionellen Untersuchungen

Die vorliegende Arbeit untersuchte erstmals systematisch die Einflüsse der drei Rho-Isoformen RhoA, RhoB und RhoC in verschiedenen Aktivitätszuständen auf die Funktion und Genexpression von humanen Endothelzellen und entschlüsselte das Interaktom dieser Varianten im besagten Zelltyp. Aufgrund der widersprüchlichen Datenlage zu dieser Thematik ist der systematische Ansatz von besonderer Bedeutung. Dabei konnten nach Überexpression der konstitutiv aktiven Mutanten Q63L und G14V teils erhebliche Beeinträchtigungen des Zellüberlebens und der angiogenetischen Kapazität von HUVEC und HCAEC *in vitro* und *in vivo* beobachtet werden. Dabei induzierte RhoC häufig einen milderen Phänotyp als RhoA oder RhoB. Eine Inaktivierung der RhoGTPasen blieb hingegen in den

meisten experimentellen Ansätzen ohne Einfluss auf die Endothelfunktion, zeigte aber einen erheblichen Einfluss auf das Transkriptom und das Rho-Interaktom humaner Endothelzellen. Mechanistische Analysen weisen auf ROCK und DIAPH1 als relevante Effektoren der Rho-vermittelten Migrationshemmung hin. Hierbei deuten die vorliegenden Daten darauf hin, dass einige der RhoC-vermittelten Effekte zumindest partiell über ROCK und DIAPH1 vermittelt werden, während RhoB scheinbar nur über DIAPH1 transduziert. Die Effekte des aktiven RhoA ließen sich hingegen durch keinen der gewählten Ansätze aufheben. Hierbei ist zu bemerken, dass die Komplexität der in der Literatur bereits beschriebenen möglichen Signalwege und die Anzahl möglicher Interaktionspartner und Effektoren für die drei RhoGTPasen eine klare Signalwegaufklärung erschwert. Zudem könnte dies auch durch die vielfach gezeigte wechselseitige Regulation der RhoGTPasen und die Promiskuität ihrer Effektoraktivierung bedingt sein und erfordert daher weiterführende Experimente. Die Befunde dieser Arbeit verdeutlichen allerdings, dass die Hemmung des Rho-ROCK-LIMK-Myosin II-Signalwegs durch C3 Transferase oder pharmakologische Hemmung der genannten Rho-*Downstream*-Effektoren die Bildung dreidimensionaler *Sprouts* aus HUVEC- und HCAEC-Zellverbänden erheblich verstärkt.

Ein häufig postulierter Aktivierungsweg für RhoA startet bei dem für die Endothelzellhomöostase wichtigen VEGFR-2 [297, 303]. Dabei konnte nicht nur die nachgeschaltete RhoA-Aktivierung durch den aktivierten VEGFR-2, sondern auch die Aktivierung und verstärkte mRNA-Expression des Rezeptors durch RhoA Q63L gezeigt werden [256, 297]. In dieser Arbeit konnten allerdings weder eine VEGF-induzierte RhoA-Aktivierung noch eine RhoA-vermittelte VEGFR-2-Expressionsinduktion beobachtet werden. Im Gegenteil führten alle untersuchten konstitutiv aktiven Rho-Isoformen zu einer signifikanten Reduktion der VEGFR-2-Expression. Denkt man nun den letzten Aspekt weiter und zieht in Betracht, dass eine dauerhafte VEGFR-2-Aktivierung möglicherweise zu dessen Ubiquitinierung und Degradation führt [317], sind hierüber potenziell die Beobachtungen zur Rho-vermittelten *Downregulation* des wichtigen VEGFR-2 auf Proteinebene erklärbar. Die persistierende Aktivierung des VEGFR-2 durch Phosphorylierung, ausgelöst durch konstitutiv aktives RhoA, resultiert in einer verstärkten Rezeptorinternalisierung und Degradation. Hierdurch wird dem endothelialen System ein entscheidender Mediator der Zellhomöostase, der vaskulären Entwicklung und Angiogenese entzogen [318]. Bedingt durch eine fortwährende Rezeptoraktivierung kommt es zum Ungleichgewicht im sonst üblichen Rezeptor-Recycling, einem Prozess aus Internalisierung nach Aktivierung, vesikulären Signalaktivitäten, Inaktivierung und Rücktransport an die Zelloberfläche [318, 319]. Hier

ergibt sich ein potenzieller Erklärungsansatz für die beobachteten RhoB-Effekte. RhoB könnte die aktivierende Phosphorylierung von VEGFR-2 durch seine Anwesenheit in endosomalen Vesikeln fördern und dadurch dessen Abbau begünstigen. Allerdings können diese Beobachtungen nicht die Befunde aus der Transkriptom-Analyse dieser Arbeit erklären, die eine Reduktion der VEGFR-2-mRNA durch konstitutiv aktives RhoA, RhoB und RhoC zeigen.

Um detaillierte Aufschlüsse zur intrazellulären Regulation und möglichen spezifischen Interaktionspartnern zu erlangen, könnten die in dieser Arbeit durchgeführten globalen Transkriptomanalysen und Co-Immunpräzipitationen richtungsweisend sein. Diese müssen in weiterführenden Projekten tiefergehend betrachtet werden und können letztlich zur Entschlüsselung der beobachteten Rho-vermittelten Effekte beitragen.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss die kleinen RhoGTPasen RhoA, RhoB und RhoC auf die Homöostase und angiogenetische Funktion humaner Endothelzellen haben. Diese drei Vertreter der Subfamilie der RhoGTPasen (*Ras homologous GTPases*) zeichnen sich durch eine Aminosäuresequenzhomologie von 88% aus und nehmen durch ihre Funktion als molekulare Schalter zentrale Positionen in der intrazellulären Signalweiterleitung ein. Ihre Schalterwirkung entfalten sie durch einen Wechsel zwischen GTP-gebundenem (aktiven) und GDP-gebundenem (inaktiven) Zustand. Die Regulation der Rho-Protein-Aktivität erfolgt durch Interaktion mit GEFs, GAPs und GDIs. Als molekulare Schalter nehmen die drei GTPasen über verschiedene Effektoren Einfluss auf die Organisation des Aktinzytoskeletts, die Proliferation, die Zellmigration, Differenzierung und Genexpression. Somit beeinflussen sie maßgeblich zentrale Prozesse, die in allen Geweben und damit auch im vaskulären Endothel Relevanz besitzen.

Konkret wurde der Einfluss verschiedener Aktivitätszustände von RhoA, RhoB und RhoC auf die Homöostase und angiogenetische Funktion humaner Endothelzellen aus der Nabelschnur (HUVEC) und aus Koronararterien (HCAEC) untersucht. Das Endothel kleidet als einzellige Schicht alle Lymph- und Blutgefäße aus und fungiert unter anderem als Barriere zwischen Blut und Gewebe, als Regulator des Blutdrucks und der Gerinnung. Hinzu kommen die Koordination von inflammatorischen Vorgängen und die Neubildung von Blutgefäßen im Prozess der Angiogenese. Zur experimentellen Beobachtung der Einflüsse von RhoA, RhoB und RhoC wurden in der Arbeit verschiedene Aktivitäts-Mutanten dieser RhoGTPasen (konstitutiv aktiv und dominant negativ), sowie die jeweiligen Wildtyp-Formen der RhoGTPasen, über ein lentivirales Vektorsystem in Endothelzellen überexprimiert.

Analysen der Endothelzellviabilität ergaben negative Effekte der aktiven Varianten aller drei GTPasen auf die Zellproliferation sowie eine Abnahme der Zellviabilität. Dabei zeigte RhoC deutlich mildere Effekte als RhoA und RhoB. Auch eine verstärkte Expression der Rho-Wildtyp-Formen reduzierte die Endothelzellviabilität und -proliferation, während die Expression dominant negativer Rho-Varianten hier keine signifikanten Effekte entfaltete. Grundlegende angiogenetische Prozesse, wie Zellmigration, angiogenetisches *Sprouting* und *Tube*-Bildung wurden *in vitro* untersucht und mit Hilfe von Xenotransplantaten von Sphäroiden in immuninkompetenten NSGTM-Mäusen auch *in vivo* analysiert. Dabei bestätigte sich der negative Einfluss von aktiven RhoGTPasen auf die angiogenetische Kapazität humaner Endothelzellen in allen experimentellen Ansätzen. Unter Anwesenheit von konstitutiv aktivem RhoA, RhoB oder RhoC migrierten HUVEC und HCAEC signifikant

langsamer und bildeten weniger Kapillaren aus. Auch hier entfaltete die endotheliale Überexpression der Wildtyp-Proteine im Vergleich zu den aktiven Rho-Mutanten ähnliche, wenn auch im Mittel mildere Effekte. Die Spezifität der Rho-vermittelten funktionellen Hemmungen konnte durch die Reversibilität nach Rho-Inaktivierung durch das Exoenzym C3 Transferase aus *Clostridium botulinum* nachgewiesen werden. Eine Hemmung der Rho-Signale durch Expression inaktiver Mutanten bewirkte hingegen, anders als in der Literatur beschrieben, keine signifikanten Effekte auf Migration, *Sprouting* und Kapillarbildung. Mit Blick auf die Motilitäts-hemmenden Effekte von RhoC ließen sich mechanistisch DIAPH1 und die Rho-Kinasen als potentielle Effektoren identifizieren. RhoB schien in diesem Zusammenhang bevorzugt über DIAPH1 zu transduzieren. Für RhoA konnten keine präferierten Effektoren identifiziert werden, was auf eine gewisse Breite und Promiskuität von RhoA in Bezug auf Effektoren hinweisen könnte. Der Rho-Rho-Kinase-LIMK-Myosin II-Signalweg könnte eine Rolle bei der Begrenzung angiogenetischer *Sprout*-Bildung spielen, obwohl durch pharmakologische Hemmung dieser Effektoren die inhibitorischen Effekte der konstitutiv aktiven Rho-Varianten nicht oder nur partiell antagonisiert werden konnten. Insbesondere die konstitutiv aktiven Rho-Varianten scheinen demnach andere Signalwege zu aktivieren.

Die vorgelegte Arbeit gibt einen konsistenten und vergleichenden Überblick sowie neue Informationen über die Auswirkung einer gezielten Aktivierung und Inaktivierung der RhoGTPasen RhoA, RhoB und RhoC auf die angiogenetische Funktion und Homöostase sowie das Transkriptom menschlicher Endothelzellen *in vitro*. Darüber hinaus konnten potentielle Signalwege und Effektoren für die zweidimensionale Endothelzellmigration und die dreidimensionale *de novo*-Kapillarbildung identifiziert werden.

Als Basis für weiterführende Untersuchungen können die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten zu differentiell regulierten Genen und Signalwegen aus der globalen Transkriptomanalyse von HUVEC mit entsprechender Expression der Rho-Aktivitäts-Mutanten dienen. Darüber hinaus konnten durch eine Interaktomanalyse neue potentielle Rho-Interaktionspartner in humanen Endothelzellen identifiziert werden.

6. Anhang

6.1. Übersicht der Plasmide für den shRNA-vermittelten Gen- *Knockdown*

Tabelle 11: Plasmide für den shRNA-vermittelten Gen-*Knockdown*.

Bezeichnung	<i>Sense</i> Sequenz	Haarnadelsequenz	Hersteller
pGIPZ-shRNA-DIAPH1_1	GGATTAATTG ATCAAATGA	TGCTGTTGACAGTGAGCGCGG GATTAATTGATCAAATGATTA GTGAAGCCACAGATGTAATCA TTTGATCAATTAATCCCTTGC CTACTGCCTCGGA	Dharmacon, Inc.
pGIPZ-shRNA-DIAPH1_2	CCAATTCTGCT CATAGAAA	TGCTGTTGACAGTGAGCGACC CAATTCTGCTCATAGAAATTA GTGAAGCCACAGATGTAATTT CTATGAGCAGAATTGGGCTGC CTACTGCCTCGGA	Dharmacon, Inc.
pGIPZ-shRNA-RHPN1_1	AGGCCAGGA ATGTGTGTT	TGCTGTTGACAGTGAGCGACA GGCCCAGGAATGTGTGTTTTA GTGAAGCCACAGATGTAAAA CACACATTCTGGGCCTGGTG CCTACTGCCTCGGA	Dharmacon, Inc.
pGIPZ-shRNA-RHPN1_2	GACTACATTG TGTCAGTGA	TGCTGTTGACAGTGAGCGACG ACTACATTGTGTCAGTGAATA GTGAAGCCACAGATGTATTCA CTGACACAATGTAGTCGCTGC CTACTGCCTCGGA	Dharmacon, Inc.
pGIPZ-shRNA-RHPN2_1	GAGTAAATTG CAGAATCAA	TGCTGTTGACAGTGAGCGAGG AGTAAATTGCAGAATCAAATA GTGAAGCCACAGATGTATTTG ATTCTGCAATTTACTCCGTGC CTACTGCCTCGGA	Dharmacon, Inc.
pGIPZ-shRNA-RHPN2_2	GAGATTATAT TGTCTCCAT	TGCTGTTGACAGTGAGCGCGG AGATTATATTGTCTCCATTTA GTGAAGCCACAGATGTAAAT GGAGACAATATAATCTCCTTG CCTACTGCCTCGGA	Dharmacon, Inc.
pGIPZ-shRNA-CIT_1	GTCATTTGCTG CAAGGGAA	TGCTGTTGACAGTGAGCGAGG TCATTTGCTGCAAGGGAAATA GTGAAGCCACAGATGTATTT CCTTGCAGCAAATGACCCTGC CTACTGCCTCGGA	Dharmacon, Inc.
pGIPZ-shRNA-CIT_2	CCAATAAACT TGCAGCAA	TGCTGTTGACAGTGAGCGCGC CAATAAACTTGCAGCAAATTA GTGAAGCCACAGATGTAATTT GCTGCAAGTTTATTGGCTTGC CTACTGCCTCGGA	Dharmacon, Inc.

6.2. Nachweis des shRNA-vermittelten *Knockdowns* der Rho-Interaktionspartner CIT, DIAPH1, RHPN1 und RHPN2 mittels *Real-Time PCR*

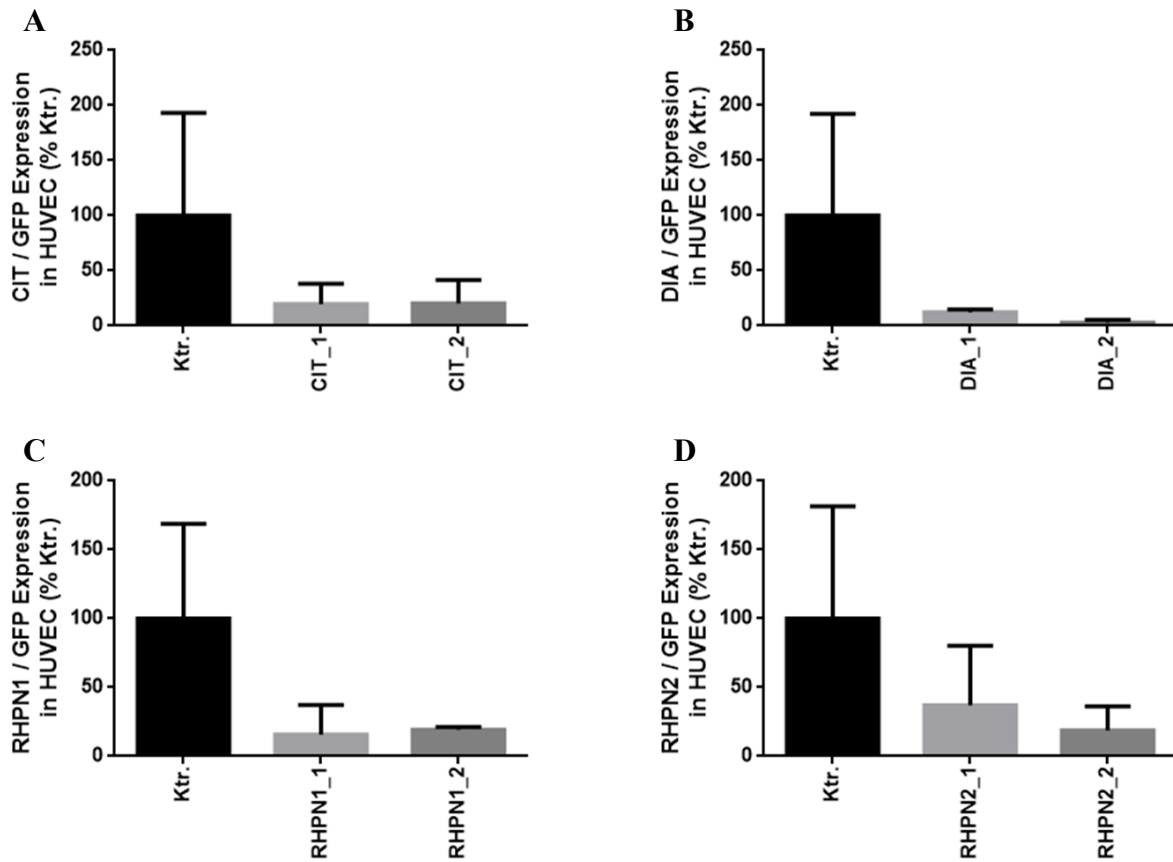


Abbildung 53: Nachweis des shRNA-vermittelten *Knockdowns* der Rho-Interaktionspartner CIT, DIAPH1, RHPN1 und RHPN2 in HUVEC mittels *Real-Time PCR*. Die Genexpression der Rho-Interaktionspartner CIT (*Citron Kinase*) (A), DIAPH1 (*Diaphanous Homolog 1*) (B), RHPN1 (*Rhophilin 1*) (C) und RHPN2 (*Rhophilin 2*) (D) wurde in HUVEC, transduziert mit lentiviralen Vektoren (MOI 100) zum shRNA-vermittelten *Knockdown* der Rho-Interaktionspartner, mittels quantitativer *Real-Time PCR* analysiert. n = 2.

6.3. Übersicht der verwendeten pharmakologischen Inhibitoren

Tabelle 12: Verwendete pharmakologische Inhibitoren und ihre IC₅₀ - Werte

Inhibitor	IC ₅₀ - Werte					Quelle
	LIMK 1	LIMK 2	ROCK 1	ROCK 2	Myosin II	
BMS4	22 nM	-	-	-	-	[211]
LX7101	24 +/- 3 nM	1,6 +/- 0,8 nM	-	10 +/- 4 nM	-	[320]
Y-27632	-	-	140 nM	800 nM	-	[213]; [321]
Blebbistatin	-	-	-	-	5,1 µM	[322]

6.4. Histogramme der PI-FACS-Analysen in HUVEC

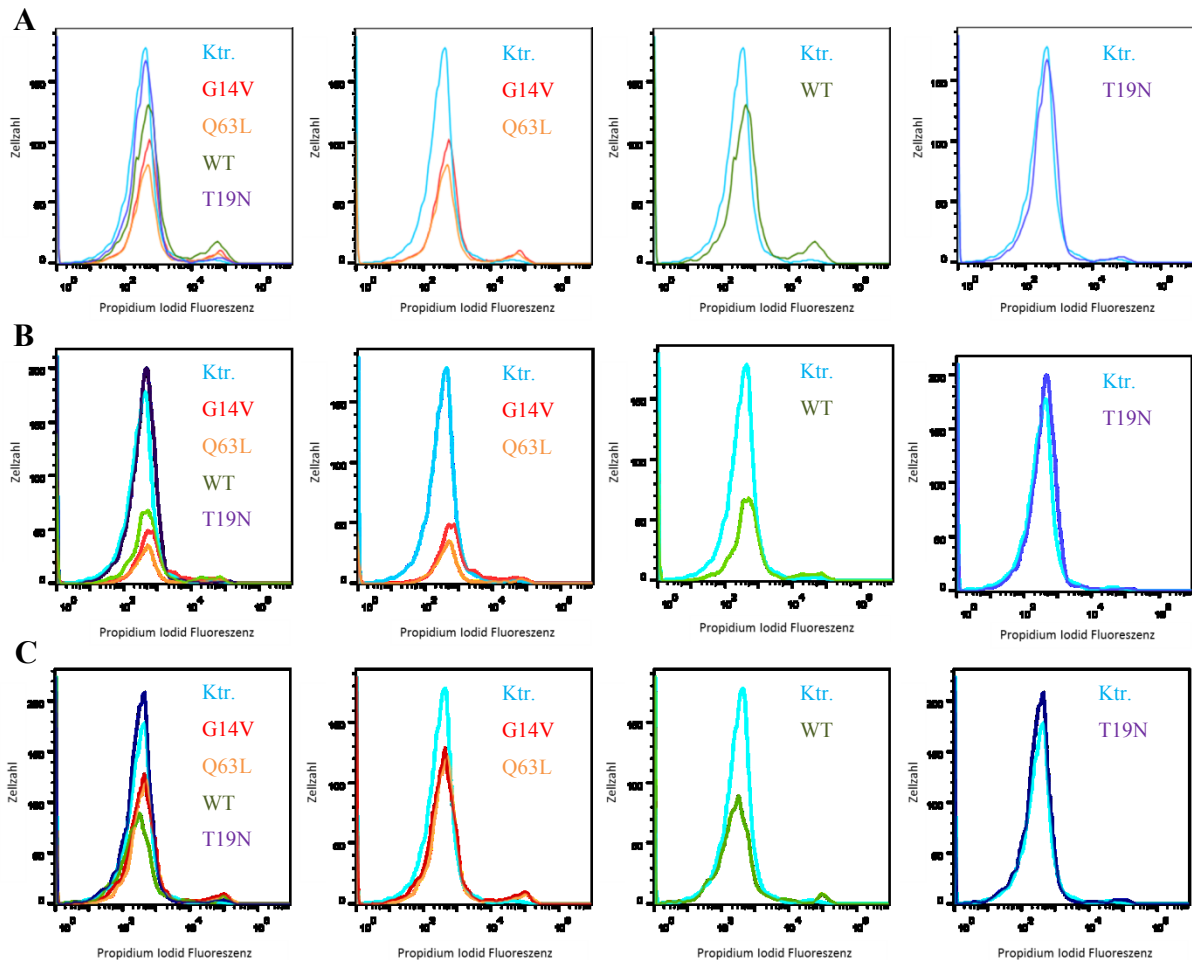


Abbildung 54: Durchflusszytometrische Analysen von HUVEC mit einer RhoA-, RhoB- oder RhoC-Überexpression zur Ermittlung der Propidiumiodid (PI)-Inkorporation. Dargestellt sind die Histogramme für die Analysen von HUVEC mit einer Expression konstitutiv aktiver (G14V und Q63L) und dominant negativer (T19N) Varianten sowie der Wildtyp-Proteine (WT) von RhoA (A), RhoB (B) und RhoC (C). *Gated* wurde vor der Ermittlung des PI-Signals auf die GFP-positivität der HUVEC, die durch das co-exprimierte EGFP eine erfolgreiche Expression der jeweiligen Rho-Variante anzeigte. Als Kontrolle dienten HUVEC, die nach lentiviraler Transduktion nur den Reporter EGFP exprimierten (Ktr.).

6.5. Ergänzende Daten zur Transkriptomanalyse

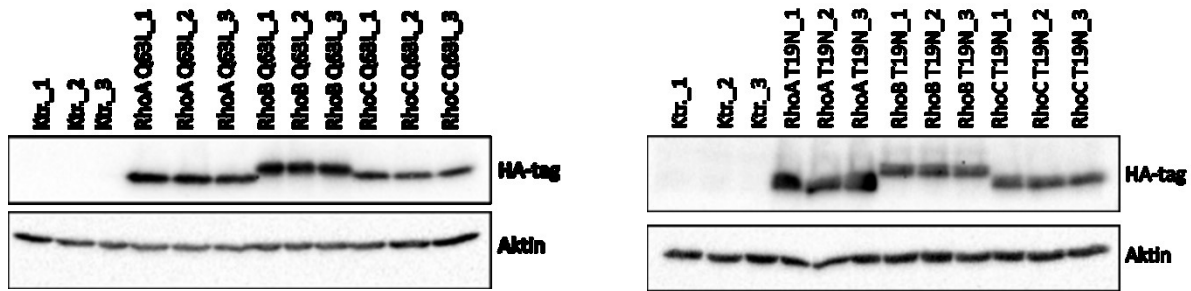


Abbildung 55: Expressionskontrolle der Proben für die Transkriptomanalysen. HUVEC mit einer Expression der konstitutiv aktiven (Q63L) Variante bzw. der dominant negativen (T19N) Variante der RhoGTPasen RhoA, RhoB und RhoC sowie Kontroll-transduzierte Zellen (Ktr.) wurden parallel zur RNA-Isolation für die Transkriptomanalyse auch für die Proteinisolierung lysiert. Abgebildet sind die Western Blot-Analysen zur Expression der jeweiligen Rho-Variante. Die Detektion erfolgte über den HA-Tag der überexprimierten Rho-Proteine mittels eines HA-Antikörpers (HA-Tag) und eines Meerrettich-Peroxidasegekoppelten sekundären Antikörpers. Die Auftragung identischer Proteinmengen wurde durch die Analyse des Aktin-Signals überprüft. Somit konnte eine erfolgreiche Expression der gewünschten Rho-Varianten in den für die Transkriptomanalysen vorgesehenen Zellen nachgewiesen werden.

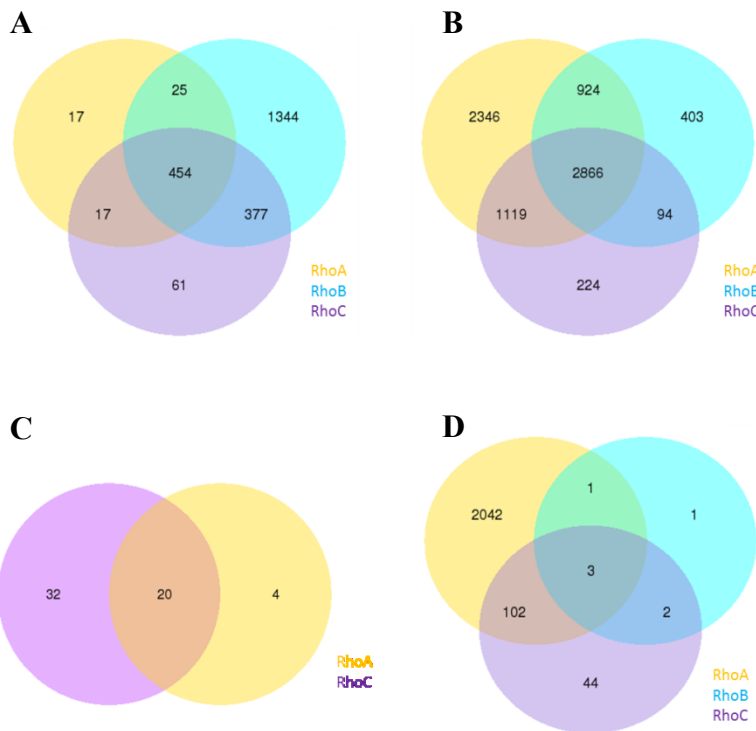


Abbildung 56: Venn-Diagramme zur Genregulation durch RhoA, RhoB und RhoC basierend auf globalen Transkriptomanalysen. Die Anzahl verstärkt transkribierter Gene in Folge einer Überexpression der konstitutiv aktiven Mutanten von RhoA, RhoB und RhoC (**A**) steht der Anzahl der vermindert transkribierten Genen nach Überexpression der entsprechenden Rho GTPase gegenüber (**B**). Auch der Einfluss einer Überexpression der jeweiligen dominant negativen (inaktiven) Rho-Mutante auf die Hoch- (**C**), beziehungsweise Herunterregulierung (**D**) von Genen wurde numerisch aufgetragen. Gene, die entsprechend von zwei oder allen Rho Varianten gleichermaßen reguliert werden, finden sich als gemeinsame Schnittmengen. Die Expression von dominant negativem RhoB führte zu keiner detektierbaren Hochregulation von Genen.

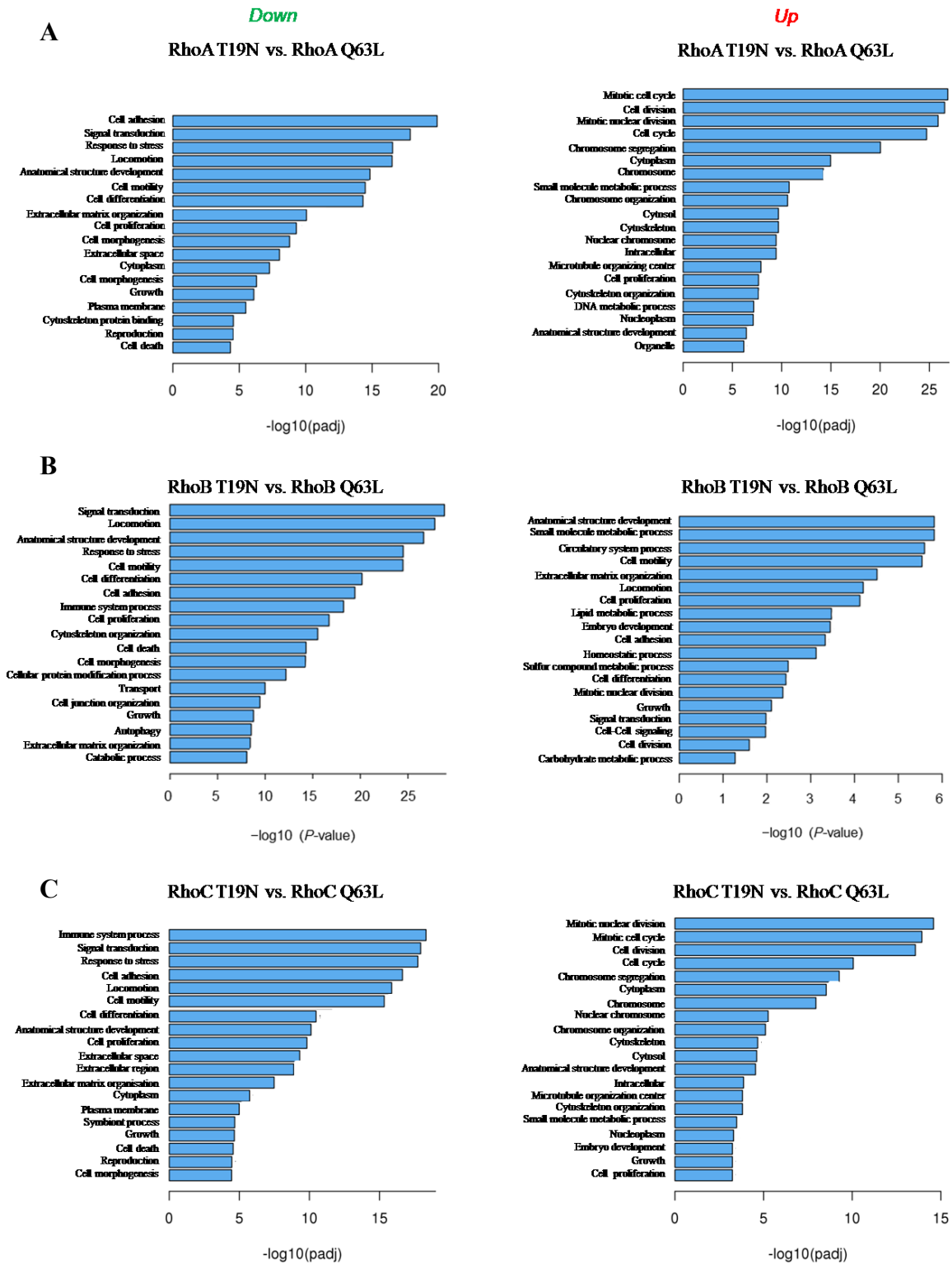


Abbildung 57: Ausgewählte, signifikant regulierte GO (*Gene Ontology*) biologische Prozesse der globalen Transkriptomanalyse in HUVEC nach Expression konstitutiv aktiver (Q63L) bzw. dominant negativer (T19N) Rho-Varianten. Signifikant herunterregulierte Signalwege (down) und signifikant hochregulierte Signalwege (up) sind für die Expression der konstitutiv aktiven und dominant negativen Varianten für RhoA (A), RhoB (B) und RhoC (C) aufgeführt.

6.6. Vektorkarten für die Expression der Wildtyp-Proteine von RhoA, RhoB und RhoC in humanen Endothelzellen

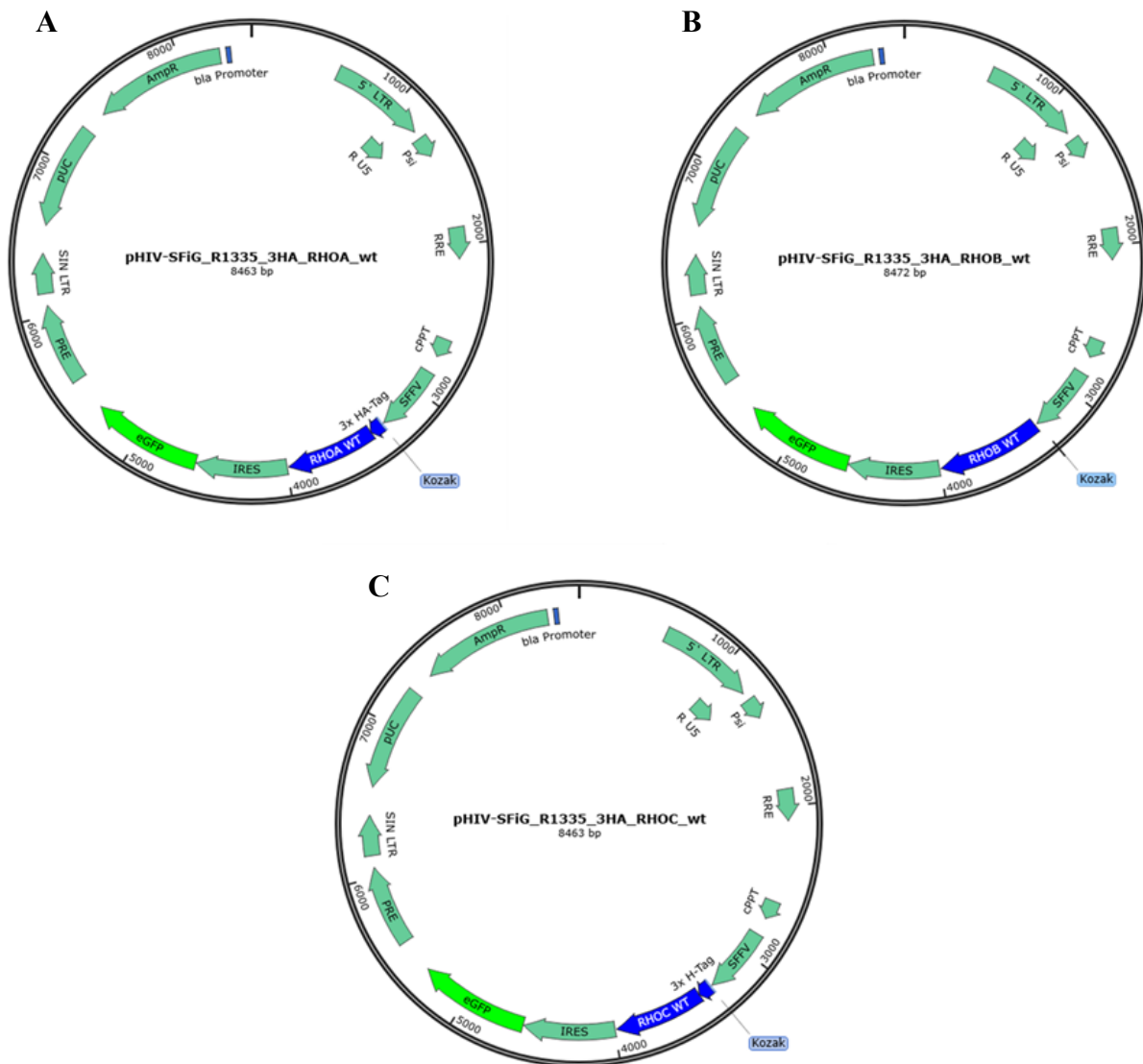


Abbildung 58: Vektorkarten der lentiviralen Transferplasmide für die Transduktion humaner Endothelzellen mit verschiedenen RhoGTPase-Varianten. Exemplarisch sind die Vektorkarten für die Wildtyp-Proteine von RhoA (A), RhoB (B) und RhoC (C) dargestellt. Markiert ist für jeden Vektor die Position der Kozak-Sequenz als Ribosomen-Bindungsstelle und damit Startpunkt der Translation. Das jeweilige HA-Tag-fusionierte Rho-Insert kann über die Schnittstellen der Restriktionsenzyme BamHI (Schnittstelle: 3309) und NotI (Schnittstelle: 3988) ausgetauscht werden, wodurch identische Vektoren für die konstitutiv aktiven (G14V und Q63L) und die dominant inaktiven (T19N) Rho-Varianten kreiert werden konnten.

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der Aktivitätszyklus kleiner, membranständiger GTPasen.....	7
Abbildung 2: Sequenzalignment der GTPasen RhoA, RhoB, RhoC, Rac1 und Cdc42.	9
Abbildung 3: 3D-Struktur des RhoA.	12
Abbildung 4: 3D-Struktur der RhoA - RhoGDI Bindung.....	15
Abbildung 5: Arginin-Finger der GAP- RhoGTPase-Interaktion.....	17
Abbildung 6: Allgemeines Modell für die Aktivierung von Rho-Effektorproteinen.....	19
Abbildung 7: Signalweg aktiver RhoGTPasen bei der Aktinassemblierung und Stressfaserbildung.....	20
Abbildung 8: Wandaufbau eines Blutgefäßes.....	22
Abbildung 9: Subtypen des Endothels.	24
Abbildung 10: Mechanismen der Blutgefäßneubildung..	27
Abbildung 11: Die Familie der vaskulären Wachstumsfaktoren (VEGFs), ihre Rezeptoren und biologischen Funktionen..	29
Abbildung 12: Strukturschema und Aminosäuresequenz der TP-Rezeptor-Isoformen TP _α und TP _β	32
Abbildung 13: Western Blot-Analyse zur Abschätzung der Rho-Aktivität.....	58
Abbildung 14: FRET-basierte Stimulationsanalysen eines RhoA-Biosensors mit VEGF und Thrombin.....	59
Abbildung 15: Stressfaserbildung und Morphologie von HUVEC unter Einfluss der Überexpression verschiedener Mutanten der RhoGTPasen RhoA, RhoB und RhoC.....	61
Abbildung 16: Ausbildung fokaler Adhäsionen in HUVEC unter dem Einfluss der Überexpression verschiedener Mutanten der RhoGTPasen RhoA, RhoB und RhoC.....	63
Abbildung 17: Analyse der HUVEC-Proliferation unter Einfluss von RhoGTPasen abgeschätzt mittels Ki-67-Färbung.	65
Abbildung 18: Abschätzung der Endothelzell-Proliferation unter Einfluss von RhoGTPasen mittels BrdU-Inkorporation.....	67
Abbildung 19: Einfluss von RhoGTPasen auf die Zellviabilität von HUVEC (Propidiumiodid-Färbung)..	68
Abbildung 20: <i>Tube-Formation-Assay</i> mit RhoA-, RhoB- und RhoC-überexprimierenden HUVEC.	70
Abbildung 21: <i>Scratch</i> -induzierte Migration von HUVEC nach Expression von RhoA-, RhoB- und RhoC-Varianten unter basalen Bedingungen.	73

Abbildung 22: <i>Scratch</i> -induzierte Migration von HUVEC in Anwesenheit von RhoA, RhoB und RhoC unter RhoGTPase-Inhibierung durch C3 Transferase aus <i>Clostridium botulinum</i> .	74
Abbildung 23: <i>Scratch</i> -induzierte Migration von HCAEC in Anwesenheit von RhoA, RhoB und RhoC unter basalen Bedingungen und unter RhoGTPase-Inhibierung durch C3 Transferase aus <i>Clostridium botulinum</i>	75
Abbildung 24: <i>Scratch</i> -induzierte Migration von HUVEC nach Überexpression von RhoA-, RhoB- und RhoC-Varianten in An- und Abwesenheit des LIMK2-Inhibitors LX7101.....	77
Abbildung 25: <i>Scratch</i> -induzierte Migration von HUVEC nach Überexpression von RhoA-, RhoB- und RhoC-Varianten in An- bzw. Abwesenheit des LIMK1-Inhibitors BMS4.....	78
Abbildung 26: <i>Scratch</i> -induzierte Migration von HUVEC nach Überexpression von RhoA-, RhoB- und RhoC-Varianten in An- bzw. Abwesenheit des ROCK-Inhibitors Y-27632.	79
Abbildung 27: <i>Scratch</i> -induzierte Migration von HUVEC nach Überexpression von RhoA-, RhoB- und RhoC-Varianten in An- bzw. Abwesenheit eines pharmakologischen Myosin II-Inhibitors.	80
Abbildung 28: <i>Scratch</i> -induzierte Migration von HUVEC nach Überexpression von RhoA-, RhoB- und RhoC-Varianten und zusätzlichem <i>Knockdown</i> der <i>Citron Rho-Interacting Serine/Threonine Kinase</i> (CIT).....	81
Abbildung 29: <i>Scratch</i> -induzierte Migration von HUVEC nach Überexpression von RhoA-, RhoB- und RhoC-Varianten und zusätzlichem <i>Knockdown</i> des <i>Diaphanous-Related Formin 1</i> (DIAPH1).....	82
Abbildung 30: <i>Scratch</i> -induzierte Migration von HUVEC nach Überexpression von RhoA-, RhoB- und RhoC-Varianten und zusätzlichem <i>Knockdown</i> des Rhoophilin RhoGTPase Bindeproteins 1 (RHPN1).....	83
Abbildung 31: <i>Scratch</i> -induzierte Migration von HUVEC nach Überexpression von RhoA-, RhoB- und RhoC-Varianten und zusätzlichem <i>Knockdown</i> des Rhoophilin RhoGTPase Bindeproteins 2 (RHPN2).....	84
Abbildung 32: VEGF-induzierte <i>Sprout</i> -Bildung im Sphäroid-basierten HUVEC- <i>Sprouting</i> -Assay nach Überexpression von RhoA-, RhoB- oder RhoC-Varianten.	87
Abbildung 33: VEGF-induzierte <i>Sprout</i> -Bildung im Sphäroid-basierten HUVEC- <i>Sprouting</i> -Assay nach Überexpression von RhoA-, RhoB- und RhoC-Varianten in Anwesenheit der RhoGTPase-hemmenden C3 Transferase aus <i>Clostridium botulinum</i>	89
Abbildung 34: VEGF-induzierte <i>Sprout</i> -Bildung im Sphäroid-basierten HCAEC- <i>Sprouting</i> -Assay nach Überexpression von RhoA-, RhoB- und RhoC-Varianten in An- bzw. Abwesenheit der RhoGTPase-hemmenden C3 Transferase aus <i>Clostridium botulinum</i>	91

Abbildung 35: VEGF-induzierte <i>Sprout</i> -Bildung im Sphäroid-basierten HUVEC- <i>Sprouting</i> -Assay nach Überexpression von RhoA-, RhoB- und RhoC-Varianten in An- bzw. Abwesenheit des pharmakologischen LIMK2-Inhibitors LX7101.....	93
Abbildung 36: VEGF-induzierte <i>Sprout</i> -Bildung im Sphäroid-basierten HUVEC- <i>Sprouting</i> -Assay nach Überexpression von RhoA-, RhoB- und RhoC-Varianten in An- bzw. Abwesenheit des pharmakologischen LIMK1-Inhibitors BMS4.....	94
Abbildung 37: VEGF-induzierte <i>Sprout</i> -Bildung im Sphäroid-basierten HUVEC- <i>Sprouting</i> -Assay nach Überexpression von RhoA-, RhoB- und RhoC-Varianten in An- bzw. Abwesenheit des pharmakologischen ROCK-Inhibitors Y-27632.....	95
Abbildung 38: VEGF-induzierte <i>Sprout</i> -Bildung im Sphäroid-basiertern HUVEC- <i>Sprouting</i> -Assay nach Überexpression von RhoA-, RhoB- und RhoC-Varianten in An- bzw. Abwesenheit des pharmakologischen Myosin II-Inhibitors Blebbistatin.....	95
Abbildung 39: VEGF-induzierte <i>Sprout</i> -Bildung im Sphäroid-basierten HUVEC- <i>Sprouting</i> -Assay nach Überexpression von RhoA-, RhoB- und RhoC-Varianten sowie einem shRNA-vermitteltem <i>Knockdown</i> der CIT.....	97
Abbildung 40: VEGF-induzierte <i>Sprout</i> -Bildung im Sphäroid-basierten <i>Sprouting</i> -Assay nach Überexpression von RhoA-, RhoB- und RhoC-Varianten sowie einem shRNA-vermittelten <i>Knockdown</i> des DIAPH1.....	98
Abbildung 41: VEGF-induzierte <i>Sprout</i> -Bildung im Sphäroid-basierten HUVEC- <i>Sprouting</i> -Assay nach Überexpression von RhoA-, RhoB- und RhoC-Varianten und einem shRNA-vermittelten <i>Knockdown</i> des RHPN1.....	99
Abbildung 42: VEGF-induzierte <i>Sprout</i> -Bildung im Sphäroid-basierten HUVEC- <i>Sprouting</i> -Assay nach Überexpression von RhoA-, RhoB- und RhoC-Varianten und einem shRNA-vermittelten <i>Knockdown</i> des RHPN2.....	99
Abbildung 43: <i>In vivo</i> -Xenograft-Assay zur Analyse des Einflusses der RhoGTPasen RhoA, RhoB und RhoC auf die angiogenetischen Eigenschaften von humanen Endothelzellen.	102
Abbildung 44: Repräsentative, immunhistochemische Doppelfärbung von humanen Endothelzellen und murinem Hämoglobin des <i>in vivo</i> -Xenograft-Assays.....	103
Abbildung 45: Abschätzung der <i>Plug</i> -Durchblutung (<i>in vivo</i> -Xenograft-Assays) anhand der histologisch ermittelten Hämoglobin-positiven <i>Plug</i> -Fläche.....	104
Abbildung 46: Genexpressionsanalyse von CXCL8 (IL-8) in HUVEC nach Überexpression konstitutiv aktiver und dominant negativer Varianten von RhoA, RhoB und RhoC.....	109
Abbildung 47: Genexpressionsanalyse von ITGB4 in HUVEC nach Überexpression konstitutiv aktiver und dominant negativer Varianten von RhoA, RhoB und RhoC.....	110

Abbildung 48: Genexpressionsanalyse von AQP1 in HUVEC nach Überexpression konstitutiv aktiver und dominant negativer Varianten von RhoA, RhoB und RhoC.....	111
Abbildung 49: Genexpressionsanalyse von HDAC9 in HUVEC nach Überexpression konstitutiv aktiver und dominant negativer Varianten von RhoA, RhoB und RhoC.....	113
Abbildung 50: Genexpressionsanalyse von NOS3 in HUVEC nach Überexpression konstitutiv aktiver und dominant negativer Varianten von RhoA, RhoB und RhoC.....	114
Abbildung 51: Genexpressionsanalyse des VEGFR-2 (KDR) in HUVEC nach Überexpression konstitutiv aktiver und dominant negativer Varianten von RhoA, RhoB und RhoC.....	116
Abbildung 52: Genexpressionsanalyse des TP-Rezeptors in HUVEC nach Überexpression konstitutiv aktiver und dominant negativer Varianten von RhoA, RhoB und RhoC.....	117
Abbildung 53: Nachweis des shRNA-vermittelten <i>Knockdowns</i> der Rho-Interaktionspartner CIT, DIAPH1, RHPN1 und RHPN2 in HUVEC mittels <i>Real-Time</i> PCR.....	141
Abbildung 54: Durchflusszytometrische Analysen von HUVEC mit einer RhoA-, RhoB- oder RhoC-Überexpression zur Ermittlung der Propidiumiodid (PI)-Inkorporation.....	142
Abbildung 55: Expressionskontrolle der Proben für die Transkriptomanalysen.....	143
Abbildung 56: Venn-Diagramme zur Genregulation durch RhoA, RhoB und RhoC basierend auf globalen Transkriptomanalysen.....	143
Abbildung 57: Ausgewählte, signifikant regulierte GO (<i>Gene Ontology</i>) biologische Prozesse der globalen Transkriptomanalyse in HUVEC nach Expression konstitutiv aktiver (Q63L) bzw. dominant negativer (T19N) Rho-Varianten.....	144
Abbildung 58: Vektorkarten der lentiviralen Transferplasmide für die Transduktion humaner Endothelzellen mit verschiedenen RhoGTPase-Varianten.....	145

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: RhoGTPase-Familie.....	8
Tabelle 2: Übersicht ausgewählter Effektoren der RhoGTPasen RhoA, RhoB und RhoC.	18
Tabelle 3: Physiologische und pathologische Funktionen des Endothels.....	25
Tabelle 4: Übersicht aller verwendeten Viren.....	36
Tabelle 5: Verwendete pharmakologische Inhibitoren und Konzentrationen.....	43
Tabelle 6: Übersicht aller verwendeten primären Antikörper.....	51
Tabelle 7: Übersicht aller verwendeten sekundären Antikörper.....	51
Tabelle 8: Übersicht aller verwendeten TaqMan Assays.....	53
Tabelle 9: <i>Differentially Expressed Genes</i> (DEGs) der Transkriptomanalyse.....	106
Tabelle 10: Auswahl potentieller Interaktionspartner der RhoGTPasen RhoA, RhoB und RhoC aus massenspektrometrischen Analysen.....	118
Tabelle 11: Plasmide für den shRNA-vermittelten Gen- <i>Knockdown</i>	140
Tabelle 12: Verwendete pharmakologische Inhibitoren und ihre IC ₅₀ - Werte	142

9. Formelverzeichnis

Formel 1: Berechnung des Virustiters.	35
Formel 2: Berechnung des FRET-Index.....	38
Formel 3: Lambert-Beer'sches Gesetz.....	52
Formel 4: Berechnung RNA-Konzentration.....	52

10. Abkürzungsverzeichnis

2x HBS	HEPES <i>buffered Saline</i> (2fach konzentriert)
AQP1	Aquaporin 1
bFGF	<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>
BrdU	5-Brom-2-desoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
Cdc42	<i>Cell Division Control Protein 42 Homolog</i>
cDNA	komplementäre DNA
CIT	<i>Citron Rho-interacting Serine/Threonine Kinase</i>
CK1	Casein Kinase 1
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIAPH1	<i>Diaphanous Related Formin 1</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DOCK	<i>Dedicator of Cytokinesis</i>
E. coli	<i>Escherichia Coli</i>
EBM-2	<i>Endothelial Basal Medium</i>
Ect 2	<i>Epithelial Cell Transforming Sequence 2</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
FELASA	<i>Federation of European Laboratory Animal Science Associations</i>
FPKM	<i>Fragments Per Kilo Base Per Million Mapped Reads</i>
GAP	<i>GTPase-activating Protein</i>
GDI	<i>GDP-dissociation Inhibitor</i>
GEF	<i>Guanine Nucleotide Exchange Factor</i>
HBMVEC	<i>Human Brain Microvascular Endothelial Cell</i>
HCAEC	<i>Human Coronary Artery Endothelial Cells</i>
HDAC	Histon Deacetylasen
HEK 293T	<i>Human Embryonic Kidney</i> (mit zusätzlicher Expression des großen T-Antigens aus <i>Simian-Virus 40</i>)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HIF	Hypoxia Inducible Factor
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i> (Endothelzellen aus der Nabelschnur)
IGF-1	<i>Insulin-like Growth Factor 1</i>
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-8	Interleukin 8
IQGAP 1	<i>Ras GTPase-activating-like Protein IQGAP1</i>
ITGB4	Integrin beta 4
IVC	<i>Individually Ventilated Cage</i>
KDR	<i>Kinase Insert Domain Receptor</i>

KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
LARG	<i>Leukemia-associated RhoGEF</i>
LDL	<i>Low Density Lipoproteine</i>
LIMK	<i>LIM-Kinasen</i>
LyEC	<i>Human Lymphatic Microvascular Endothelial Cell</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated Protein Kinase</i>
MDCK-Zellen	<i>Madin Darby Canine Kidney Cells</i>
MLC2	<i>Myosin Light Chain 2</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NOS3 / eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDGF	<i>Platelet-derived Growth Factor</i>
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
PIGF	<i>Placenta Growth Factor</i>
PKA	Proteinkinase A
PKC	Protein Kinase C
PKG	Proteinkinase G
PKN	Proteinkinase N
PRK	<i>Protein Kinase C-related Kinase</i>
Rac 1	<i>Ras-related C3 Botulinum Toxin Substrate 1</i>
RAP1A	<i>Ras-related Protein Rap-1A</i>
RAP1B	Ras-related protein Rap-1B
RBD	Rho-Bindedomäne
RhoA	<i>Ras Homolog Family Member A</i>
RhoB	<i>Ras Homolog Family Member B</i>
RhoC	<i>Ras Homolog Family Member C</i>
RHPN1	Rhopilin Rho GTPase binding protein 1
RHPN2	Rhopilin Rho GTPase binding protein 2
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
ROCK	Rho-Kinasen
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
TBS	<i>Tris-buffered Saline</i>
TLR4	<i>Toll-like Rezeptor 4</i>
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TP-Rezeptor	Thromboxan A2 Rezeptor
TXA2	Thromboxan A2
UEA I	<i>Ulex Europaeus Agglutinin I</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>

11. Literaturverzeichnis

1. Cherfils, J., *GEFs and GAPs: Mechanisms and Structures*. Wittinghofer A. (eds) Ras Superfamily Small G Proteins: Biology and Mechanisms 1. Springer, Vienna., 2014.
2. Etienne-Manneville, S. and A. Hall, *Rho GTPases in cell biology*. Nature, 2002. **420**(6916): p. 629-35.
3. Wennerberg, K., K.L. Rossman, and C.J. Der, *The Ras superfamily at a glance*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 5): p. 843-6.
4. Bourne, H.R., D.A. Sanders, and F. McCormick, *The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions*. Nature, 1990. **348**(6297): p. 125-32.
5. Bourne, H.R., D.A. Sanders, and F. McCormick, *The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism*. Nature, 1991. **349**(6305): p. 117-27.
6. Vetter, I.R. and A. Wittinghofer, *The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions*. Science, 2001. **294**(5545): p. 1299-304.
7. Schaefer, A., N.R. Reinhard, and P.L. Hordijk, *Toward understanding RhoGTPase specificity: structure, function and local activation*. Small GTPases, 2014. **5**(2): p. 6.
8. Rossman, K.L., C.J. Der, and J. Sondek, *GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(2): p. 167-80.
9. Schmidt, A. and A. Hall, *Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch*. Genes Dev, 2002. **16**(13): p. 1587-609.
10. van Unen, J., et al., *Plasma membrane restricted RhoGEF activity is sufficient for RhoA-mediated actin polymerization*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 14693.
11. Bishop, A.L. and A. Hall, *Rho GTPases and their effector proteins*. Biochem J, 2000. **348 Pt 2**: p. 241-55.
12. Scheffzek, K., M.R. Ahmadian, and A. Wittinghofer, *GTPase-activating proteins: helping hands to complement an active site*. Trends Biochem Sci, 1998. **23**(7): p. 257-62.
13. Bernards, A. and J. Settleman, *GAP control: regulating the regulators of small GTPases*. Trends Cell Biol, 2004. **14**(7): p. 377-85.
14. Olofsson, B., *Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling*. Cell Signal, 1999. **11**(8): p. 545-54.
15. Geyer, M. and A. Wittinghofer, *GEFs, GAPs, GDIs and effectors: taking a closer (3D) look at the regulation of Ras-related GTP-binding proteins*. Curr Opin Struct Biol, 1997. **7**(6): p. 786-92.
16. Garcia-Mata, R., E. Boulter, and K. Burridge, *The 'invisible hand': regulation of RHO GTPases by RHOGDIs*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. **12**(8): p. 493-504.
17. Sebti, S.M. and A.D. Hamilton, *Farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase I inhibitors and cancer therapy: lessons from mechanism and bench-to-bedside translational studies*. Oncogene, 2000. **19**(56): p. 6584-93.
18. Cox, A.D. and C.J. Der, *Farnesyltransferase inhibitors: promises and realities*. Curr Opin Pharmacol, 2002. **2**(4): p. 388-93.
19. Boulter, E. and R. Garcia-Mata, *RhoGDI: A rheostat for the Rho switch*. Small GTPases, 2010. **1**(1): p. 65-68.
20. Madaule, P. and R. Axel, *A novel ras-related gene family*. Cell, 1985. **41**(1): p. 31-40.
21. Ridley, A.J., *Rho GTPase signalling in cell migration*. Curr Opin Cell Biol, 2015. **36**: p. 103-12.
22. Boueux, A., et al., *Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes*. Mol Biol Evol, 2007. **24**(1): p. 203-16.

23. Goicoechea, S.M., S. Awadia, and R. Garcia-Mata, *I'm coming to GEF you: Regulation of RhoGEFs during cell migration*. Cell Adh Migr, 2014. **8**(6): p. 535-49.
24. Ridley, A.J., et al., *Cell migration: integrating signals from front to back*. Science, 2003. **302**(5651): p. 1704-9.
25. Cherfils, J. and M. Zeghouf, *Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs*. Physiol Rev, 2013. **93**(1): p. 269-309.
26. Wittinghofer, A. and I.R. Vetter, *Structure-function relationships of the G domain, a canonical switch motif*. Annu Rev Biochem, 2011. **80**: p. 943-71.
27. Thomas, C., et al., *Structural evidence for a common intermediate in small G protein-GEF reactions*. Mol Cell, 2007. **25**(1): p. 141-9.
28. McCallum, S.J., W.J. Wu, and R.A. Cerione, *Identification of a putative effector for Cdc42Hs with high sequence similarity to the RasGAP-related protein IQGAP1 and a Cdc42Hs binding partner with similarity to IQGAP2*. J Biol Chem, 1996. **271**(36): p. 21732-7.
29. Zong, H., K. Kaibuchi, and L.A. Quilliam, *The insert region of RhoA is essential for Rho kinase activation and cellular transformation*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(16): p. 5287-98.
30. Lammers, M., et al., *Specificity of interactions between mDia isoforms and Rho proteins*. J Biol Chem, 2008. **283**(50): p. 35236-46.
31. Nisimoto, Y., et al., *Rac binding to p67(phox). Structural basis for interactions of the Rac1 effector region and insert region with components of the respiratory burst oxidase*. J Biol Chem, 1997. **272**(30): p. 18834-41.
32. Casey, P.J., J.A. Thissen, and J.F. Moomaw, *Enzymatic modification of proteins with a geranylgeranyl isoprenoid*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(19): p. 8631-5.
33. Moores, S.L., et al., *Sequence dependence of protein isoprenylation*. J Biol Chem, 1991. **266**(22): p. 14603-10.
34. Reiss, Y., et al., *Sequence requirement for peptide recognition by rat brain p21ras protein farnesyltransferase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(3): p. 732-6.
35. Yokoyama, K., et al., *A protein geranylgeranyltransferase from bovine brain: implications for protein prenylation specificity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(12): p. 5302-6.
36. Roskoski, R., Jr. and P. Ritchie, *Role of the carboxyterminal residue in peptide binding to protein farnesyltransferase and protein geranylgeranyltransferase*. Arch Biochem Biophys, 1998. **356**(2): p. 167-76.
37. Gutierrez, L., et al., *Post-translational processing of p21ras is two-step and involves carboxyl-methylation and carboxy-terminal proteolysis*. EMBO J, 1989. **8**(4): p. 1093-8.
38. Hancock, J.F., K. Cadwallader, and C.J. Marshall, *Methylation and proteolysis are essential for efficient membrane binding of prenylated p21K-ras(B)*. EMBO J, 1991. **10**(3): p. 641-6.
39. Linder, M.E. and R.J. Deschenes, *New insights into the mechanisms of protein palmitoylation*. Biochemistry, 2003. **42**(15): p. 4311-20.
40. ten Klooster, J.P. and P.L. Hordijk, *Targeting and localized signalling by small GTPases*. Biol Cell, 2007. **99**(1): p. 1-12.
41. Ridley, A.J., *RhoA, RhoB and RhoC have different roles in cancer cell migration*. J Microsc, 2013. **251**(3): p. 242-9.
42. Cannizzaro, L.A., et al., *Chromosome localization of human ARH genes, a ras-related gene family*. Genomics, 1990. **6**(2): p. 197-203.
43. Wheeler, A.P. and A.J. Ridley, *Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility*. Exp Cell Res, 2004. **301**(1): p. 43-9.

44. Karnoub, A.E., et al., *Molecular basis for Rho GTPase signaling specificity*. Breast Cancer Res Treat, 2004. **84**(1): p. 61-71.
45. Eckenstaler, R., M. Hauke, and R.A. Benndorf, *A current overview of RhoA, RhoB, and RhoC functions in vascular biology and pathology*. Biochem Pharmacol, 2022. **206**: p. 115321.
46. Adamson, P., H.F. Paterson, and A. Hall, *Intracellular localization of the P21rho proteins*. J Cell Biol, 1992. **119**(3): p. 617-27.
47. Wherlock, M., et al., *Farnesyltransferase inhibitors disrupt EGF receptor traffic through modulation of the RhoB GTPase*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 15): p. 3221-31.
48. Gerald, D., et al., *RhoB controls coordination of adult angiogenesis and lymphangiogenesis following injury by regulating VEZF1-mediated transcription*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 2824.
49. Hamel, B., et al., *SmgGDS is a guanine nucleotide exchange factor that specifically activates RhoA and RhoC*. J Biol Chem, 2011. **286**(14): p. 12141-8.
50. Sloan, C.M., et al., *Divergence of Rho residue 43 impacts GEF activity*. Small GTPases, 2012. **3**(1): p. 15-22.
51. Arthur, W.T., et al., *XPLN, a guanine nucleotide exchange factor for RhoA and RhoB, but not RhoC*. J Biol Chem, 2002. **277**(45): p. 42964-72.
52. Krenkel, U., et al., *Three-dimensional structures of H-ras p21 mutants: molecular basis for their inability to function as signal switch molecules*. Cell, 1990. **62**(3): p. 539-48.
53. Longenecker, K., et al., *Structure of a constitutively activated RhoA mutant (Q63L) at 1.55 Å resolution*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2003. **59**(Pt 5): p. 876-80.
54. Feig, L.A. and G.M. Cooper, *Inhibition of NIH 3T3 cell proliferation by a mutant ras protein with preferential affinity for GDP*. Mol Cell Biol, 1988. **8**(8): p. 3235-43.
55. Ridley, A.J., et al., *The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling*. Cell, 1992. **70**(3): p. 401-10.
56. Ihara, K., et al., *Crystal structure of human RhoA in a dominantly active form complexed with a GTP analogue*. J Biol Chem, 1998. **273**(16): p. 9656-66.
57. Mayer, T., et al., *A mutant form of the rho protein can restore stress fibers and adhesion plaques in v-src transformed fibroblasts*. Oncogene, 1999. **18**(12): p. 2117-28.
58. Michaelson, D., et al., *Differential localization of Rho GTPases in live cells: regulation by hypervariable regions and RhoGDI binding*. J Cell Biol, 2001. **152**(1): p. 111-26.
59. Read, P.W., et al., *Human RhoA/RhoGDI complex expressed in yeast: GTP exchange is sufficient for translocation of RhoA to liposomes*. Protein Sci, 2000. **9**(2): p. 376-86.
60. DerMardirossian, C. and G.M. Bokoch, *GDI: central regulatory molecules in Rho GTPase activation*. Trends Cell Biol, 2005. **15**(7): p. 356-63.
61. Leonard, D., et al., *The identification and characterization of a GDP-dissociation inhibitor (GDI) for the CDC42Hs protein*. J Biol Chem, 1992. **267**(32): p. 22860-8.
62. Fukumoto, Y., et al., *Molecular cloning and characterization of a novel type of regulatory protein (GDI) for the rho proteins, ras p21-like small GTP-binding proteins*. Oncogene, 1990. **5**(9): p. 1321-8.
63. Lelias, J.M., et al., *cDNA cloning of a human mRNA preferentially expressed in hematopoietic cells and with homology to a GDP-dissociation inhibitor for the rho GTP-binding proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(4): p. 1479-83.
64. Scherle, P., T. Behrens, and L.M. Staudt, *Ly-GDI, a GDP-dissociation inhibitor of the RhoA GTP-binding protein, is expressed preferentially in lymphocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(16): p. 7568-72.

65. Jones, M.B., et al., *Proteomic analysis and identification of new biomarkers and therapeutic targets for invasive ovarian cancer*. Proteomics, 2002. **2**(1): p. 76-84.
66. Gorvel, J.P., et al., *Differential properties of D4/LyGDI versus RhoGDI: phosphorylation and rho GTPase selectivity*. FEBS Lett, 1998. **422**(2): p. 269-73.
67. Platko, J.V., et al., *A single residue can modify target-binding affinity and activity of the functional domain of the Rho-subfamily GDP dissociation inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(7): p. 2974-8.
68. Brunet, N., A. Morin, and B. Olofsson, *RhoGDI-3 regulates RhoG and targets this protein to the Golgi complex through its unique N-terminal domain*. Traffic, 2002. **3**(5): p. 342-57.
69. Adra, C.N., et al., *RhoGDIgamma: a GDP-dissociation inhibitor for Rho proteins with preferential expression in brain and pancreas*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(9): p. 4279-84.
70. Zalzman, G., et al., *RhoGDI-3 is a new GDP dissociation inhibitor (GDI). Identification of a non-cytosolic GDI protein interacting with the small GTP-binding proteins RhoB and RhoG*. J Biol Chem, 1996. **271**(48): p. 30366-74.
71. Ueda, T., et al., *Purification and characterization from bovine brain cytosol of a novel regulatory protein inhibiting the dissociation of GDP from and the subsequent binding of GTP to rhoB p20, a ras p21-like GTP-binding protein*. J Biol Chem, 1990. **265**(16): p. 9373-80.
72. Hart, M.J., et al., *A GDP dissociation inhibitor that serves as a GTPase inhibitor for the Ras-like protein CDC42Hs*. Science, 1992. **258**(5083): p. 812-5.
73. Hoffman, G.R., N. Nassar, and R.A. Cerione, *Structure of the Rho family GTP-binding protein Cdc42 in complex with the multifunctional regulator RhoGDI*. Cell, 2000. **100**(3): p. 345-56.
74. Longenecker, K., et al., *How RhoGDI binds Rho*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 1999. **55**(Pt 9): p. 1503-15.
75. Scheffzek, K., et al., *The Rac-RhoGDI complex and the structural basis for the regulation of Rho proteins by RhoGDI*. Nat Struct Biol, 2000. **7**(2): p. 122-6.
76. Snyder, J.T., et al., *Structural basis for the selective activation of Rho GTPases by Dbl exchange factors*. Nat Struct Biol, 2002. **9**(6): p. 468-75.
77. Meller, N., S. Merlot, and C. Guda, *CZH proteins: a new family of Rho-GEFs*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 21): p. 4937-46.
78. Jaiswal, M., et al., *Mechanistic insights into specificity, activity, and regulatory elements of the regulator of G-protein signaling (RGS)-containing Rho-specific guanine nucleotide exchange factors (GEFs) p115, PDZ-RhoGEF (PRG), and leukemia-associated RhoGEF (LARG)*. J Biol Chem, 2011. **286**(20): p. 18202-12.
79. Kristelly, R., G. Gao, and J.J. Tesmer, *Structural determinants of RhoA binding and nucleotide exchange in leukemia-associated Rho guanine-nucleotide exchange factor*. J Biol Chem, 2004. **279**(45): p. 47352-62.
80. Srougi, M.C. and K. Burridge, *The nuclear guanine nucleotide exchange factors Ect2 and Net1 regulate RhoB-mediated cell death after DNA damage*. PLoS One, 2011. **6**(2): p. e17108.
81. Solski, P.A., et al., *Requirement for C-terminal sequences in regulation of Ect2 guanine nucleotide exchange specificity and transformation*. J Biol Chem, 2004. **279**(24): p. 25226-33.
82. van Buul, J.D., D. Geerts, and S. Huveneers, *Rho GAPs and GEFs: controlling switches in endothelial cell adhesion*. Cell Adh Migr, 2014. **8**(2): p. 108-24.
83. Ridley, A.J., et al., *rho family GTPase activating proteins p190, bcr and rhoGAP show distinct specificities in vitro and in vivo*. EMBO J, 1993. **12**(13): p. 5151-60.

84. Wang, L., et al., *A novel strategy for specifically down-regulating individual Rho GTPase activity in tumor cells*. J Biol Chem, 2003. **278**(45): p. 44617-25.
85. Thomas, S., et al., *Src and caveolin-1 reciprocally regulate metastasis via a common downstream signaling pathway in bladder cancer*. Cancer Res, 2011. **71**(3): p. 832-41.
86. Lazarini, M., et al., *ARHGAP21 is a RhoGAP for RhoA and RhoC with a role in proliferation and migration of prostate adenocarcinoma cells*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1832**(2): p. 365-74.
87. Dubois, T., et al., *Golgi-localized GAP for Cdc42 functions downstream of ARF1 to control Arp2/3 complex and F-actin dynamics*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(4): p. 353-64.
88. Dvorsky, R. and M.R. Ahmadian, *Always look on the bright site of Rho: structural implications for a conserved intermolecular interface*. EMBO Rep, 2004. **5**(12): p. 1130-6.
89. Scheffzek, K., et al., *The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants*. Science, 1997. **277**(5324): p. 333-8.
90. Rittinger, K., et al., *Structure at 1.65 Å of RhoA and its GTPase-activating protein in complex with a transition-state analogue*. Nature, 1997. **389**(6652): p. 758-62.
91. Diekmann, D., et al., *Rac GTPase interacts with GAPs and target proteins through multiple effector sites*. EMBO J, 1995. **14**(21): p. 5297-305.
92. Fujisawa, K., et al., *Different regions of Rho determine Rho-selective binding of different classes of Rho target molecules*. J Biol Chem, 1998. **273**(30): p. 18943-9.
93. Ito, H., R. Morishita, and K.I. Nagata, *Functions of Rhotekin, an Effector of Rho GTPase, and Its Binding Partners in Mammals*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(7).
94. Lal, M.A., et al., *Rhophilin-1 is a key regulator of the podocyte cytoskeleton and is essential for glomerular filtration*. J Am Soc Nephrol, 2015. **26**(3): p. 647-62.
95. Vega, F.M. and A.J. Ridley, *The RhoB small GTPase in physiology and disease*. Small GTPases, 2018. **9**(5): p. 384-393.
96. Thomas, P., et al., *RhoC: a fascinating journey from a cytoskeletal organizer to a Cancer stem cell therapeutic target*. J Exp Clin Cancer Res, 2019. **38**(1): p. 328.
97. Drechsel, D.N., et al., *A requirement for Rho and Cdc42 during cytokinesis in Xenopus embryos*. Curr Biol, 1997. **7**(1): p. 12-23.
98. Cox, D., et al., *Requirements for both Rac1 and Cdc42 in membrane ruffling and phagocytosis in leukocytes*. J Exp Med, 1997. **186**(9): p. 1487-94.
99. Nobes, C.D. and A. Hall, *Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement*. J Cell Biol, 1999. **144**(6): p. 1235-44.
100. Mabuchi, I., et al., *A rho-like protein is involved in the organisation of the contractile ring in dividing sand dollar eggs*. Zygote, 1993. **1**(4): p. 325-31.
101. Allen, W.E., et al., *A role for Cdc42 in macrophage chemotaxis*. J Cell Biol, 1998. **141**(5): p. 1147-57.
102. Prokopenko, S.N., R. Saint, and H.J. Bellen, *Untying the Gordian knot of cytokinesis. Role of small G proteins and their regulators*. J Cell Biol, 2000. **148**(5): p. 843-8.
103. Kaibuchi, K., S. Kuroda, and M. Amano, *Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells*. Annu Rev Biochem, 1999. **68**: p. 459-86.
104. Sahai, E. and C.J. Marshall, *ROCK and Dia have opposing effects on adherens junctions downstream of Rho*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(6): p. 408-15.
105. Rolli-Derkinderen, M., et al., *Phosphorylation of serine 188 protects RhoA from ubiquitin/proteasome-mediated degradation in vascular smooth muscle cells*. Circ Res, 2005. **96**(11): p. 1152-60.
106. Nusser, N., et al., *Serine phosphorylation differentially affects RhoA binding to effectors: implications to NGF-induced neurite outgrowth*. Cell Signal, 2006. **18**(5): p. 704-14.

107. Tillement, V., et al., *Phosphorylation of RhoB by CK1 impedes actin stress fiber organization and epidermal growth factor receptor stabilization*. Exp Cell Res, 2008. **314**(15): p. 2811-21.
108. Lehman, H.L., et al., *Regulation of inflammatory breast cancer cell invasion through Akt1/PKBalpha phosphorylation of RhoC GTPase*. Mol Cancer Res, 2012. **10**(10): p. 1306-18.
109. Hodge, R.G. and A.J. Ridley, *Regulating Rho GTPases and their regulators*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2016. **17**(8): p. 496-510.
110. Tian, M., et al., *Binding of RhoA by the C2 domain of E3 ligase Smurf1 is essential for Smurf1-regulated RhoA ubiquitination and cell protrusive activity*. FEBS Lett, 2011. **585**(14): p. 2199-204.
111. Deglincerti, A., et al., *Coupled local translation and degradation regulate growth cone collapse*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 6888.
112. Chen, Y., et al., *Cullin mediates degradation of RhoA through evolutionarily conserved BTB adaptors to control actin cytoskeleton structure and cell movement*. Mol Cell, 2009. **35**(6): p. 841-55.
113. Ibeawuchi, S.R., et al., *Hypertension-causing Mutations in Cullin3 Protein Impair RhoA Protein Ubiquitination and Augment the Association with Substrate Adaptors*. J Biol Chem, 2015. **290**(31): p. 19208-17.
114. Wei, J., et al., *A new mechanism of RhoA ubiquitination and degradation: roles of SCF(FBXL19) E3 ligase and Erk2*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1833**(12): p. 2757-2764.
115. Wang, H.R., et al., *Regulation of cell polarity and protrusion formation by targeting RhoA for degradation*. Science, 2003. **302**(5651): p. 1775-9.
116. Ozdamar, B., et al., *Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity*. Science, 2005. **307**(5715): p. 1603-9.
117. Zalzman, G., et al., *Regulation of Ras-related RhoB protein expression during the cell cycle*. Oncogene, 1995. **10**(10): p. 1935-45.
118. Schünke, M., E. Schulte, and U. Schumacher, *Prometheus LernAtlas - Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem*. Thieme Verlag, 2011. **3. Auflage**.
119. Augustin, H.G., D.H. Kozian, and R.C. Johnson, *Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes*. Bioessays, 1994. **16**(12): p. 901-6.
120. Coultas, L., K. Chawengsaksophak, and J. Rossant, *Endothelial cells and VEGF in vascular development*. Nature, 2005. **438**(7070): p. 937-45.
121. Schwarzacher, S.P., *Das Endothel: parakrine und endokrine Funktionen*. J Kardiol 9: 121-4., 2002.
122. Gimbrone, M.A., Jr., R.S. Cotran, and J. Folkman, *Human vascular endothelial cells in culture. Growth and DNA synthesis*. J Cell Biol, 1974. **60**(3): p. 673-84.
123. Jaffe, E.A., L.W. Hoyer, and R.L. Nachman, *Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultured human endothelial cells*. J Clin Invest, 1973. **52**(11): p. 2757-64.
124. Aird, W.C., *Endothelial cell heterogeneity*. Crit Care Med, 2003. **31**(4 Suppl): p. S221-30.
125. Aird, W.C., *Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms*. Circ Res, 2007. **100**(2): p. 158-73.
126. Martelli, A., et al., *Spatio-temporal analysis of vascular endothelial growth factor expression and blood vessel remodelling in pig ovarian follicles during the periovulatory period*. J Mol Endocrinol, 2006. **36**(1): p. 107-19.
127. Bundgaard, M., *The three-dimensional organization of tight junctions in a capillary endothelium revealed by serial-section electron microscopy*. J Ultrastruct Res, 1984. **88**(1): p. 1-17.

128. Geraud, C., P.S. Koch, and S. Goerdt, *Vascular niches: endothelial cells as tissue- and site-specific multifunctional team players in health and disease*. J Dtsch Dermatol Ges, 2014. **12**(8): p. 685-9.
129. Wisse, E., *An electron microscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat liver sinusoids*. J Ultrastruct Res, 1970. **31**(1): p. 125-50.
130. McAvoy, E.F., et al., *The role of CD14 in neutrophil recruitment within the liver microcirculation during endotoxemia*. J Immunol, 2011. **186**(4): p. 2592-601.
131. Haraldsson, B. and M. Jeansson, *Glomerular filtration barrier*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2009. **18**(4): p. 331-5.
132. Risau, W., *Mechanisms of angiogenesis*. Nature, 1997. **386**(6626): p. 671-4.
133. Kalka, C., et al., [*Angiogenesis and vasculogenesis. Therapeutic strategies for stimulation of postnatal neovascularization*]. Herz, 2000. **25**(6): p. 611-22.
134. Folkman, J., *Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery?* Nat Rev Drug Discov, 2007. **6**(4): p. 273-86.
135. Zuazo-Gaztelu, I. and O. Casanovas, *Unraveling the Role of Angiogenesis in Cancer Ecosystems*. Front Oncol, 2018. **8**: p. 248.
136. Kimura, H. and H. Esumi, *Reciprocal regulation between nitric oxide and vascular endothelial growth factor in angiogenesis*. Acta Biochim Pol, 2003. **50**(1): p. 49-59.
137. Pamukcu, B., et al., *The role of monocytes in atherosclerotic coronary artery disease*. Ann Med, 2010. **42**(6): p. 394-403.
138. Semenza, G.L., et al., *Regulation of cardiovascular development and physiology by hypoxia-inducible factor 1*. Ann N Y Acad Sci, 1999. **874**: p. 262-8.
139. Atkinson, S. and S.B. Fox, *Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A and platelet-derived growth factor (PDGF) play a central role in the pathogenesis of digital clubbing*. J Pathol, 2004. **203**(2): p. 721-8.
140. Tang, N., et al., *Loss of HIF-1alpha in endothelial cells disrupts a hypoxia-driven VEGF autocrine loop necessary for tumorigenesis*. Cancer Cell, 2004. **6**(5): p. 485-95.
141. Sengupta, N. and T.T. MacDonald, *The role of matrix metalloproteinases in stromal/epithelial interactions in the gut*. Physiology (Bethesda), 2007. **22**: p. 401-9.
142. D'Amore, P.A. and R.W. Thompson, *Mechanisms of angiogenesis*. Annu Rev Physiol, 1987. **49**: p. 453-64.
143. Keck, P.J., et al., *Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF*. Science, 1989. **246**(4935): p. 1309-12.
144. Alon, T., et al., *Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity*. Nat Med, 1995. **1**(10): p. 1024-8.
145. Jaipersad, A.S., et al., *The role of monocytes in angiogenesis and atherosclerosis*. J Am Coll Cardiol, 2014. **63**(1): p. 1-11.
146. Maglione, D., et al., *Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(20): p. 9267-71.
147. Yamada, Y., et al., *Molecular cloning of a novel vascular endothelial growth factor, VEGF-D*. Genomics, 1997. **42**(3): p. 483-8.
148. Joukov, V., et al., *A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases*. EMBO J, 1996. **15**(7): p. 1751.
149. Olofsson, B., et al., *Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(6): p. 2576-81.
150. Ferrara, N., et al., *Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins*. Endocr Rev, 1992. **13**(1): p. 18-32.

151. Shibuya, M., et al., *Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family*. *Oncogene*, 1990. **5**(4): p. 519-24.
152. Kabrun, N., et al., *Flk-1 expression defines a population of early embryonic hematopoietic precursors*. *Development*, 1997. **124**(10): p. 2039-48.
153. Matthews, W., et al., *A receptor tyrosine kinase cDNA isolated from a population of enriched primitive hematopoietic cells and exhibiting close genetic linkage to c-kit*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(20): p. 9026-30.
154. Fong, G.H., et al., *Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium*. *Nature*, 1995. **376**(6535): p. 66-70.
155. Cines, D.B., et al., *Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders*. *Blood*, 1998. **91**(10): p. 3527-61.
156. Aird, W.C., *Vascular bed-specific hemostasis: role of endothelium in sepsis pathogenesis*. *Crit Care Med*, 2001. **29**(7 Suppl): p. S28-34; discussion S34-5.
157. D'Amore, N.G.d.P.a.P.A., *Arterial versus venous endothelial cells*. *Cell Tissue*, 2008.
158. Alvarez, A., et al., *Direct evidence of leukocyte adhesion in arterioles by angiotensin II*. *Blood*, 2004. **104**(2): p. 402-8.
159. Lehr, H.A., et al., *Oxidized LDL-induced leukocyte/endothelium interaction in vivo involves the receptor for platelet-activating factor*. *Arterioscler Thromb*, 1993. **13**(7): p. 1013-8.
160. Kunkel, E.J., U. Jung, and K. Ley, *TNF-alpha induces selectin-mediated leukocyte rolling in mouse cremaster muscle arterioles*. *Am J Physiol*, 1997. **272**(3 Pt 2): p. H1391-400.
161. Aurrand-Lions, M., C. Johnson-Leger, and B.A. Imhof, *The last molecular fortress in leukocyte trans-endothelial migration*. *Nat Immunol*, 2002. **3**(2): p. 116-8.
162. Butcher, E.C., *Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity*. *Cell*, 1991. **67**(6): p. 1033-6.
163. Carman, C.V. and T.A. Springer, *A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them*. *J Cell Biol*, 2004. **167**(2): p. 377-88.
164. Schenkel, A.R., et al., *CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions*. *Nat Immunol*, 2002. **3**(2): p. 143-50.
165. Ostermann, G., et al., *JAM-1 is a ligand of the beta(2) integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes*. *Nat Immunol*, 2002. **3**(2): p. 151-8.
166. Muller, W.A., et al., *PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes*. *J Exp Med*, 1993. **178**(2): p. 449-60.
167. Shantsila, E. and G.Y. Lip, *Monocytes in acute coronary syndromes*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009. **29**(10): p. 1433-8.
168. Lusis, A.J., *Atherosclerosis*. *Nature*, 2000. **407**(6801): p. 233-41.
169. Nusing, R.M., et al., *Characterization and chromosomal mapping of the human thromboxane A2 receptor gene*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(33): p. 25253-9.
170. Bauer, J., et al., *Pathophysiology of isoprostanes in the cardiovascular system: implications of isoprostane-mediated thromboxane A2 receptor activation*. *Br J Pharmacol*, 2014. **171**(13): p. 3115-31.
171. Raychowdhury, M.K., et al., *Alternative splicing produces a divergent cytoplasmic tail in the human endothelial thromboxane A2 receptor*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(30): p. 19256-61.
172. Hirata, M., et al., *Cloning and expression of cDNA for a human thromboxane A2 receptor*. *Nature*, 1991. **349**(6310): p. 617-20.
173. Nakahata, N., *Thromboxane A2: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology*. *Pharmacol Ther*, 2008. **118**(1): p. 18-35.

174. Hirata, T., et al., *Two thromboxane A2 receptor isoforms in human platelets. Opposite coupling to adenylyl cyclase with different sensitivity to Arg60 to Leu mutation.* J Clin Invest, 1996. **97**(4): p. 949-56.
175. Sasaki, M., et al., *Physiological significance of thromboxane A(2) receptor dimerization.* J Pharmacol Sci, 2006. **100**(4): p. 263-70.
176. Audoly, L.P., et al., *Cardiovascular responses to the isoprostanes iPF(2alpha)-III and iPE(2)-III are mediated via the thromboxane A(2) receptor in vivo.* Circulation, 2000. **101**(24): p. 2833-40.
177. Kent, K.C., et al., *Identification of functional PGH2/TxA2 receptors on human endothelial cells.* Circ Res, 1993. **72**(5): p. 958-65.
178. Kinsella, B.T., *Thromboxane A2 signalling in humans: a 'Tail' of two receptors.* Biochem Soc Trans, 2001. **29**(Pt 6): p. 641-54.
179. Moers, A., et al., *G13 is an essential mediator of platelet activation in hemostasis and thrombosis.* Nat Med, 2003. **9**(11): p. 1418-22.
180. Eckenstaler, R., et al., *A Thromboxane A2 Receptor-Driven COX-2-Dependent Feedback Loop That Affects Endothelial Homeostasis and Angiogenesis.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2022. **42**(4): p. 444-461.
181. Eckenstaler, R., et al., *Thromboxane A(2) receptor activation via G(alpha13)-RhoA/C-ROCK-LIMK2-dependent signal transduction inhibits angiogenic sprouting of human endothelial cells.* Biochem Pharmacol, 2022. **201**: p. 115069.
182. Benndorf, R.A., et al., *Isoprostanes inhibit vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration, tube formation, and cardiac vessel sprouting in vitro, as well as angiogenesis in vivo via activation of the thromboxane A(2) receptor: a potential link between oxidative stress and impaired angiogenesis.* Circ Res, 2008. **103**(9): p. 1037-46.
183. Eckenstaler, R., et al., *A Thromboxane A(2) Receptor-Driven COX-2-Dependent Feedback Loop That Affects Endothelial Homeostasis and Angiogenesis.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2022. **42**(4): p. 444-461.
184. Hauke, M., et al., *Active RhoA Exerts an Inhibitory Effect on the Homeostasis and Angiogenic Capacity of Human Endothelial Cells.* J Am Heart Assoc, 2022. **11**(12): p. e025119.
185. Reinhard, N.R., et al., *Spatiotemporal analysis of RhoA/B/C activation in primary human endothelial cells.* Sci Rep, 2016. **6**: p. 25502.
186. Kutner, R.H., X.Y. Zhang, and J. Reiser, *Production, concentration and titration of pseudotyped HIV-1-based lentiviral vectors.* Nat Protoc, 2009. **4**(4): p. 495-505.
187. Lin, B., et al., *Interplay between chemotaxis and contact inhibition of locomotion determines exploratory cell migration.* Nat Commun, 2015. **6**: p. 6619.
188. Waring, M.J., *Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids.* J Mol Biol, 1965. **13**(1): p. 269-82.
189. Wulf, E., et al., *Fluorescent phalloxin, a tool for the visualization of cellular actin.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4498-502.
190. Korff, T. and H.G. Augustin, *Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation.* J Cell Biol, 1998. **143**(5): p. 1341-52.
191. Laib, A.M., et al., *Spheroid-based human endothelial cell microvessel formation in vivo.* Nat Protoc, 2009. **4**(8): p. 1202-15.
192. Sielaff, M., et al., *Evaluation of FASP, SP3, and iST Protocols for Proteomic Sample Preparation in the Low Microgram Range.* J Proteome Res, 2017. **16**(11): p. 4060-4072.
193. Kim, D., B. Langmead, and S.L. Salzberg, *HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements.* Nat Methods, 2015. **12**(4): p. 357-60.

194. Yates, A., et al., *Ensembl 2016*. Nucleic Acids Res, 2016. **44**(D1): p. D710-6.
195. Trapnell, C., et al., *Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation*. Nat Biotechnol, 2010. **28**(5): p. 511-5.
196. Love, M.I., W. Huber, and S. Anders, *Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2*. Genome Biol, 2014. **15**(12): p. 550.
197. Young, M.D., et al., *Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias*. Genome Biol, 2010. **11**(2): p. R14.
198. Matt Xia, J.S., Patricia Hegerich, Xiaoqing You, Kathy Lee, Criss Walworth, and Eugene Spier, *DataAssist™ – Data Analysis Software for TaqMan® Real-Time PCR Data*. Proceedings of the International MultiConference of Engineers and Computer Scientists, 2010. **Vol I**.
199. Bryan, B.A., et al., *RhoA/ROCK signaling is essential for multiple aspects of VEGF-mediated angiogenesis*. FASEB J, 2010. **24**(9): p. 3186-95.
200. van Nieuw Amerongen, G.P., et al., *Involvement of RhoA/Rho kinase signaling in VEGF-induced endothelial cell migration and angiogenesis in vitro*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(2): p. 211-7.
201. Vouret-Craviari, V., et al., *Distinct signals via Rho GTPases and Src drive shape changes by thrombin and sphingosine-1-phosphate in endothelial cells*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 12): p. 2475-84.
202. Santiago-Lopez, A.J., C.A. Gutekunst, and R.E. Gross, *C3 Transferase Gene Therapy for Continuous RhoA Inhibition*. Methods Mol Biol, 2018. **1821**: p. 267-281.
203. Wilde, C. and K. Aktories, *The Rho-ADP-ribosylating C3 exoenzyme from Clostridium botulinum and related C3-like transferases*. Toxicon, 2001. **39**(11): p. 1647-60.
204. Nobes, C.D. and A. Hall, *Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia*. Cell, 1995. **81**(1): p. 53-62.
205. Ridley, A.J. and A. Hall, *The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors*. Cell, 1992. **70**(3): p. 389-99.
206. Burridge, K. and K. Wennerberg, *Rho and Rac take center stage*. Cell, 2004. **116**(2): p. 167-79.
207. Chaturvedi, L.S., H.M. Marsh, and M.D. Basson, *Role of RhoA and its effectors ROCK and mDial in the modulation of deformation-induced FAK, ERK, p38, and MLC motogenic signals in human Caco-2 intestinal epithelial cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2011. **301**(5): p. C1224-38.
208. Zamir, E. and B. Geiger, *Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 20): p. 3583-90.
209. Gerdes, J., et al., *Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation*. Int J Cancer, 1983. **31**(1): p. 13-20.
210. Weigel, M.T. and M. Dowsett, *Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction*. Endocr Relat Cancer, 2010. **17**(4): p. R245-62.
211. Sleebbs, B., Street, I. P., Bu, X., & Baell, J. B., *De novo synthesis of a potent LIMK1 inhibitor*. Synthesis, 2010. **7**: p. 1091 - 1096.
212. Harrison, B.A., et al., *Discovery and Development of LX7101, a Dual LIM-Kinase and ROCK Inhibitor for the Treatment of Glaucoma*. ACS Med Chem Lett, 2015. **6**(1): p. 84-8.
213. Uehata, M., et al., *Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension*. Nature, 1997. **389**(6654): p. 990-4.

214. Kamimura, M., et al., *Facile preparation of a photoactivatable surface on a 96-well plate: a versatile and multiplex cell migration assay platform*. *Phys Chem Chem Phys*, 2015. **17**(21): p. 14159-67.
215. Liu, Z., et al., *Blebbistatin inhibits contraction and accelerates migration in mouse hepatic stellate cells*. *Br J Pharmacol*, 2010. **159**(2): p. 304-15.
216. Shimokawa, H., S. Sunamura, and K. Satoh, *RhoA/Rho-Kinase in the Cardiovascular System*. *Circ Res*, 2016. **118**(2): p. 352-66.
217. Meng, D., et al., *Citron kinase (CIT-K) promotes aggressiveness and tumorigenesis of breast cancer cells in vitro and in vivo: preliminary study of the underlying mechanism*. *Clin Transl Oncol*, 2019. **21**(7): p. 910-923.
218. Faix, J. and R. Grosse, *Staying in shape with formins*. *Dev Cell*, 2006. **10**(6): p. 693-706.
219. Kuhn, S. and M. Geyer, *Formins as effector proteins of Rho GTPases*. *Small GTPases*, 2014. **5**: p. e29513.
220. Peck, J.W., et al., *The RhoA-binding protein, rhotillin-2, regulates actin cytoskeleton organization*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(46): p. 43924-32.
221. Steuve, S., et al., *Rhotillin-2 is targeted to late-endosomal structures of the vesicular machinery in the presence of activated RhoB*. *Exp Cell Res*, 2006. **312**(20): p. 3981-9.
222. Prunier, C., et al., *LIM kinases: cofilin and beyond*. *Oncotarget*, 2017. **8**(25): p. 41749-41763.
223. Wang, S., et al., *Intercellular Tension Negatively Regulates Angiogenic Sprouting of Endothelial Tip Cells via Notch1-Dll4 Signaling*. *Adv Biosyst*, 2017. **1**(1-2).
224. Wang, X., et al., *RhoA regulates Activin B-induced stress fiber formation and migration of bone marrow-derived mesenchymal stromal cell through distinct signaling*. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2017. **1861**(1 Pt A): p. 3011-3018.
225. Britto, D.D., et al., *Macrophages enhance Vegfa-driven angiogenesis in an embryonic zebrafish tumour xenograft model*. *Dis Model Mech*, 2018. **11**(12).
226. Manning, B.D., *AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream*. *Cell*, 2007. **129**.
227. Hill, C.S., J. Wynne, and R. Treisman, *The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF*. *Cell*, 1995. **81**(7): p. 1159-70.
228. Kim, J.G., et al., *Regulation of RhoA GTPase and various transcription factors in the RhoA pathway*. *J Cell Physiol*, 2018. **233**(9): p. 6381-6392.
229. Tripathi, B.K., et al., *Receptor tyrosine kinase activation of RhoA is mediated by AKT phosphorylation of DLC1*. *J Cell Biol*, 2017. **216**(12): p. 4255-4270.
230. Guilluy, C., et al., *Transglutaminase-dependent RhoA activation and depletion by serotonin in vascular smooth muscle cells*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(5): p. 2918-28.
231. Pranatharthi, A., et al., *RhoC regulates radioresistance via crosstalk of ROCK2 with the DNA repair machinery in cervical cancer*. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019. **38**(1): p. 392.
232. Chen, Y., et al., *Interleukin-17 induces angiogenesis in vitro via CXCL8 and CCL2 in retinal pigment epithelium*. *Mol Med Rep*, 2018. **17**(3): p. 4627-4632.
233. Li, A., et al., *IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis*. *J Immunol*, 2003. **170**(6): p. 3369-76.
234. Petreaca, M.L., et al., *Transactivation of vascular endothelial growth factor receptor-2 by interleukin-8 (IL-8/CXCL8) is required for IL-8/CXCL8-induced endothelial permeability*. *Mol Biol Cell*, 2007. **18**(12): p. 5014-23.
235. Yan, Z., et al., *Role of heparan sulfate in mediating CXCL8-induced endothelial cell migration*. *PeerJ*, 2016. **4**: p. e1669.
236. Lawson, C.D. and K. Burridge, *The on-off relationship of Rho and Rac during integrin-mediated adhesion and cell migration*. *Small GTPases*, 2014. **5**: p. e27958.

237. O'Connor, K.L., B.K. Nguyen, and A.M. Mercurio, *RhoA function in lamellae formation and migration is regulated by the alpha6beta4 integrin and cAMP metabolism*. J Cell Biol, 2000. **148**(2): p. 253-8.
238. Tomita, Y., et al., *Role of Aquaporin 1 Signalling in Cancer Development and Progression*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(2).
239. Raina, S., et al., *Molecular cloning and characterization of an aquaporin cDNA from salivary, lacrimal, and respiratory tissues*. J Biol Chem, 1995. **270**(4): p. 1908-12.
240. Jiang, Y., *Aquaporin-1 activity of plasma membrane affects HT20 colon cancer cell migration*. IUBMB Life, 2009. **61**(10): p. 1001-9.
241. Meng, F., et al., *Aqp1 enhances migration of bone marrow mesenchymal stem cells through regulation of FAK and beta-catenin*. Stem Cells Dev, 2014. **23**(1): p. 66-75.
242. Sulzmaier, F.J., C. Jean, and D.D. Schlaepfer, *FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications*. Nat Rev Cancer, 2014. **14**(9): p. 598-610.
243. Xiaona Chen, Y.H., Wenjun Fu, Amirhossein Sahebkar, Yuhui Tan, Suowen Xu, Hong Li, *Histone Deacetylases (HDACs) and Atherosclerosis: A Mechanistic and Pharmacological Review*. Front. Cell Dev. Biol., 2020. **8**.
244. Xing Lyu, M.H., Jieting Peng, Xiangyu Zhang and Yan Y Sanders, *HDAC inhibitors as antifibrotic drugs in cardiac and pulmonary fibrosis*. Therapeutic Advances in Chronic Disease, 2019. **10**: p. 1-19.
245. Weichen Shi, X.W., Ziyang Wang, Huirong Han, Yi Fu, Jiang Liu, Yan Zhang, Jian Guo, Chuanqiao Dong, Di Zhou, Quan Zhou, Yuxin Chen, Fan Yi, *HDAC9 exacerbates endothelial injury in cerebral ischaemia/reperfusion injury*. J. Cell. Mol. Med., 2016. **20**: p. 1139-1149.
246. Shurong Chang, S.B., Shijie Li and Eric N. Olson, *An expression screen reveals modulators of class II histone deacetylase phosphorylation*. PNAS, 2005. **102**: p. 8120–8125.
247. Siragusa, M. and I. Fleming, *The eNOS signalosome and its link to endothelial dysfunction*. Pflugers Arch, 2016. **468**(7): p. 1125-1137.
248. Vanesa Ramseyer, N.H.a.J.L.G., *TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA DECREASES NOS3 EXPRESSION PRIMARILY VIA RHO/RHO KINASE IN THE THICK ASCENDING LIMB*. Hypertension, 2012. **59**: p. 1145-1150.
249. Leszek Kalinowski, A.J.-J., Anna Siekierzycka, Sylwia Bartoszewska, Marcin Woźniak, Dawid Lejnowski, James F. Collawn and Rafal Bartoszewski, *Posttranscriptional and transcriptional regulation of endothelial nitric-oxide synthase during hypoxia: the role of microRNAs*. Cellular & Molecular Biology Letters, 2016. **21**.
250. Xiu-Fen Ming, H.V., Christine Barandier, Jean Ruffieux, Kozo Kaibuchi, Sandro Rusconi, and Zhihong Yang, *Rho GTPase/Rho Kinase Negatively Regulates Endothelial NitricOxide Synthase Phosphorylation through the Inhibition of ProteinKinase B/Akt in Human Endothelial Cells*. MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, 2002. **22**: p. 8467–8477.
251. Plate, K.H., et al., *Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its cognate receptors in a rat glioma model of tumor angiogenesis*. Cancer Res, 1993. **53**(23): p. 5822-7.
252. Takahashi, T., et al., *A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells*. EMBO J, 2001. **20**(11): p. 2768-78.
253. El Baba, N., et al., *The Role of Rho GTPases in VEGF Signaling in Cancer Cells*. Anal Cell Pathol (Amst), 2020. **2020**: p. 2097214.
254. Vega, F.M., et al., *RhoB regulates cell migration through altered focal adhesion dynamics*. Open Biol, 2012. **2**(5): p. 120076.

255. Abedi, H. and I. Zachary, *Vascular endothelial growth factor stimulates tyrosine phosphorylation and recruitment to new focal adhesions of focal adhesion kinase and paxillin in endothelial cells*. J Biol Chem, 1997. **272**(24): p. 15442-51.
256. Gingras, D., S. Lamy, and R. Beliveau, *Tyrosine phosphorylation of the vascular endothelial-growth-factor receptor-2 (VEGFR-2) is modulated by Rho proteins*. Biochem J, 2000. **348 Pt 2**: p. 273-80.
257. Brautigam, J., et al., *Narciclasine inhibits angiogenic processes by activation of Rho kinase and by downregulation of the VEGF receptor 2*. J Mol Cell Cardiol, 2019. **135**: p. 97-108.
258. Chang, Y., et al., *Nitric oxide-induced motility in aortic smooth muscle cells: role of protein tyrosine phosphatase SHP-2 and GTP-binding protein Rho*. Circ Res, 2002. **91**(5): p. 390-7.
259. Nouri, K., et al., *IQGAPI Interaction with RHO Family Proteins Revisited: KINETIC AND EQUILIBRIUM EVIDENCE FOR MULTIPLE DISTINCT BINDING SITES*. J Biol Chem, 2016. **291**(51): p. 26364-26376.
260. Brandt, D.T., et al., *Dial and IQGAPI interact in cell migration and phagocytic cup formation*. J Cell Biol, 2007. **178**(2): p. 193-200.
261. Watanabe, N., et al., *Cooperation between mDial and ROCK in Rho-induced actin reorganization*. Nat Cell Biol, 1999. **1**(3): p. 136-43.
262. Watanabe, G., et al., *Protein kinase N (PKN) and PKN-related protein rhotillin as targets of small GTPase Rho*. Science, 1996. **271**(5249): p. 645-8.
263. Maesaki, R., et al., *The structural basis of Rho effector recognition revealed by the crystal structure of human RhoA complexed with the effector domain of PKN/PRK1*. Mol Cell, 1999. **4**(5): p. 793-803.
264. Hutchinson, C.L., et al., *Differential binding of RhoA, RhoB, and RhoC to protein kinase C-related kinase (PRK) isoforms PRK1, PRK2, and PRK3: PRKs have the highest affinity for RhoB*. Biochemistry, 2013. **52**(45): p. 7999-8011.
265. Leung, T., et al., *The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(10): p. 5313-27.
266. Ghosh, P.M., et al., *Role of RhoA activation in the growth and morphology of a murine prostate tumor cell line*. Oncogene, 1999. **18**(28): p. 4120-30.
267. Bery, N., et al., *A Targeted Protein Degradation Cell-Based Screening for Nanobodies Selective toward the Cellular RHOB GTP-Bound Conformation*. Cell Chem Biol, 2019. **26**(11): p. 1544-1558 e6.
268. van Nieuw Amerongen, G.P., et al., *Activation of RhoA by thrombin in endothelial hyperpermeability: role of Rho kinase and protein tyrosine kinases*. Circ Res, 2000. **87**(4): p. 335-40.
269. Toksoz, D. and K.D. Merdek, *The Rho small GTPase: functions in health and disease*. Histol Histopathol, 2002. **17**(3): p. 915-27.
270. Phuyal, S. and H. Farhan, *Multifaceted Rho GTPase Signaling at the Endomembranes*. Front Cell Dev Biol, 2019. **7**: p. 127.
271. Pertz, O., *Spatio-temporal Rho GTPase signaling - where are we now?* J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 11): p. 1841-50.
272. Fritz, R.D. and O. Pertz, *The dynamics of spatio-temporal Rho GTPase signaling: formation of signaling patterns*. F1000Res, 2016. **5**.
273. Muller, P.M., et al., *Systems analysis of RhoGEF and RhoGAP regulatory proteins reveals spatially organized RAC1 signalling from integrin adhesions*. Nat Cell Biol, 2020.
274. Vega, F.M., et al., *RhoA and RhoC have distinct roles in migration and invasion by acting through different targets*. J Cell Biol, 2011. **193**(4): p. 655-65.

275. Etienne-Manneville, S., *Cdc42--the centre of polarity*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 8): p. 1291-300.
276. Howe, G.A. and C.L. Addison, *RhoB controls endothelial cell morphogenesis in part via negative regulation of RhoA*. Vasc Cell, 2012. **4**: p. 1.
277. Pronk, M.C.A., et al., *RhoA, RhoB and RhoC differentially regulate endothelial barrier function*. Small GTPases, 2019. **10**(6): p. 466-484.
278. Ren, X.D., W.B. Kiosses, and M.A. Schwartz, *Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton*. EMBO J, 1999. **18**(3): p. 578-85.
279. Lin, Y., et al., *Structure of an inactive conformation of GTP-bound RhoA GTPase*. Structure, 2021.
280. Bagci, H., et al., *Mapping the proximity interaction network of the Rho-family GTPases reveals signalling pathways and regulatory mechanisms*. Nat Cell Biol, 2020. **22**(1): p. 120-134.
281. Paul, F., et al., *Quantitative GTPase Affinity Purification Identifies Rho Family Protein Interaction Partners*. Mol Cell Proteomics, 2017. **16**(1): p. 73-85.
282. Chevrier, V., et al., *The Rho-associated protein kinase p160ROCK is required for centrosome positioning*. J Cell Biol, 2002. **157**(5): p. 807-17.
283. Kawabata, S., et al., *Interaction of Rho-kinase with myosin II at stress fibres*. Genes Cells, 2004. **9**(7): p. 653-60.
284. Kitzing, T.M., et al., *Formin-like 2 drives amoeboid invasive cell motility downstream of RhoC*. Oncogene, 2010. **29**(16): p. 2441-8.
285. Haga, R.B. and A.J. Ridley, *Rho GTPases: Regulation and roles in cancer cell biology*. Small GTPases, 2016. **7**(4): p. 207-221.
286. Vega, F.M. and A.J. Ridley, *Rho GTPases in cancer cell biology*. FEBS Lett, 2008. **582**(14): p. 2093-101.
287. Marlow, L.A., et al., *Reactivation of suppressed RhoB is a critical step for the inhibition of anaplastic thyroid cancer growth*. Cancer Res, 2009. **69**(4): p. 1536-44.
288. Huang, M. and G.C. Prendergast, *RhoB in cancer suppression*. Histol Histopathol, 2006. **21**(2): p. 213-8.
289. Prendergast, G.C., *Actin' up: RhoB in cancer and apoptosis*. Nat Rev Cancer, 2001. **1**(2): p. 162-8.
290. Szulcek, R., et al., *Localized RhoA GTPase activity regulates dynamics of endothelial monolayer integrity*. Cardiovasc Res, 2013. **99**(3): p. 471-82.
291. Wojciak-Stothard, B., et al., *Role of RhoB in the regulation of pulmonary endothelial and smooth muscle cell responses to hypoxia*. Circ Res, 2012. **110**(11): p. 1423-34.
292. Richter, L., V. Oberlander, and G. Schmidt, *RhoA/C inhibits proliferation by inducing the synthesis of GPRC5A*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 12532.
293. Tseliou, M., et al., *The Role of RhoA, RhoB and RhoC GTPases in Cell Morphology, Proliferation and Migration in Human Cytomegalovirus (HCMV) Infected Glioblastoma Cells*. Cell Physiol Biochem, 2016. **38**(1): p. 94-109.
294. Mazieres, J., et al., *Epigenetic regulation of RhoB loss of expression in lung cancer*. BMC Cancer, 2007. **7**: p. 220.
295. Wang, S., et al., *Histone deacetylase 1 represses the small GTPase RhoB expression in human nonsmall lung carcinoma cell line*. Oncogene, 2003. **22**(40): p. 6204-13.
296. Zahra, F.T., et al., *Endothelial RhoA GTPase is essential for in vitro endothelial functions but dispensable for physiological in vivo angiogenesis*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 11666.
297. Sivaraj, K.K., et al., *G13 controls angiogenesis through regulation of VEGFR-2 expression*. Dev Cell, 2013. **25**(4): p. 427-34.

298. Zhang, S., et al., *RhoA regulates G1-S progression of gastric cancer cells by modulation of multiple INK4 family tumor suppressors*. Mol Cancer Res, 2009. **7**(4): p. 570-80.
299. Hoepfner, L.H., et al., *RhoC maintains vascular homeostasis by regulating VEGF-induced signaling in endothelial cells*. J Cell Sci, 2015. **128**(19): p. 3556-68.
300. Vincent, L., et al., *Inhibition of endothelial cell migration by cerivastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor: contribution to its anti-angiogenic effect*. FEBS Lett, 2001. **495**(3): p. 159-66.
301. Hoang, M.V., M.C. Whelan, and D.R. Senger, *Rho activity critically and selectively regulates endothelial cell organization during angiogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(7): p. 1874-9.
302. Zhao, Z., et al., *Effects of RhoC downregulation on the angiogenesis characteristics of myeloma vascular endothelial cells*. Cancer Med, 2019. **8**(7): p. 3502-3510.
303. Zeng, H., D. Zhao, and D. Mukhopadhyay, *KDR stimulates endothelial cell migration through heterotrimeric G protein Gq/11-mediated activation of a small GTPase RhoA*. J Biol Chem, 2002. **277**(48): p. 46791-8.
304. Huang, M., et al., *RhoB links PDGF signaling to cell migration by coordinating activation and localization of Cdc42 and Rac*. J Cell Biochem, 2011. **112**(6): p. 1572-84.
305. Yin, L., et al., *Fasudil inhibits vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in vitro and in vivo*. Mol Cancer Ther, 2007. **6**(5): p. 1517-25.
306. Im, E. and A. Kazlauskas, *Src family kinases promote vessel stability by antagonizing the Rho/ROCK pathway*. J Biol Chem, 2007. **282**(40): p. 29122-9.
307. Kroll, J., et al., *Inhibition of Rho-dependent kinases ROCK I/II activates VEGF-driven retinal neovascularization and sprouting angiogenesis*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009. **296**(3): p. H893-9.
308. Chrzanowska-Wodnicka, M. and K. Burridge, *Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions*. J Cell Biol, 1996. **133**(6): p. 1403-15.
309. Helfman, D.M., et al., *Caldesmon inhibits nonmuscle cell contractility and interferes with the formation of focal adhesions*. Mol Biol Cell, 1999. **10**(10): p. 3097-112.
310. Rivelino, D., et al., *Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDial1-dependent and ROCK-independent mechanism*. J Cell Biol, 2001. **153**(6): p. 1175-86.
311. Pelham, R.J., Jr. and Y. Wang, *Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(25): p. 13661-5.
312. Katz, B.Z., et al., *Physical state of the extracellular matrix regulates the structure and molecular composition of cell-matrix adhesions*. Mol Biol Cell, 2000. **11**(3): p. 1047-60.
313. Hakem, A., et al., *RhoC is dispensable for embryogenesis and tumor initiation but essential for metastasis*. Genes Dev, 2005. **19**(17): p. 1974-9.
314. Liu, A.X., et al., *RhoB is dispensable for mouse development, but it modifies susceptibility to tumor formation as well as cell adhesion and growth factor signaling in transformed cells*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(20): p. 6906-12.
315. Adini, I., et al., *RhoB controls Akt trafficking and stage-specific survival of endothelial cells during vascular development*. Genes Dev, 2003. **17**(21): p. 2721-32.
316. Pedersen, E. and C. Brakebusch, *Rho GTPase function in development: how in vivo models change our view*. Exp Cell Res, 2012. **318**(14): p. 1779-87.
317. Duval, M., et al., *Vascular endothelial growth factor-dependent down-regulation of Flk-1/KDR involves Cbl-mediated ubiquitination. Consequences on nitric oxide production from endothelial cells*. J Biol Chem, 2003. **278**(22): p. 20091-7.

318. Simons, M., *An inside view: VEGF receptor trafficking and signaling*. Physiology (Bethesda), 2012. **27**(4): p. 213-22.
319. Gampel, A., et al., *VEGF regulates the mobilization of VEGFR2/KDR from an intracellular endothelial storage compartment*. Blood, 2006. **108**(8): p. 2624-31.
320. Boland, S., et al., *Design, synthesis and biological characterization of selective LIMK inhibitors*. Bioorg Med Chem Lett, 2015. **25**(18): p. 4005-10.
321. Davies, S.P., et al., *Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors*. Biochem J, 2000. **351**(Pt 1): p. 95-105.
322. Limouze, J., et al., *Specificity of blebbistatin, an inhibitor of myosin II*. J Muscle Res Cell Motil, 2004. **25**(4-5): p. 337-41.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Weiterhin versichere ich, dass die vorliegende Arbeit noch nicht an anderer Stelle eingereicht wurde. Die eingereichte schriftliche Fassung der Arbeit entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium.

Halle (Saale) im März 2023

Michael Hauke

Danksagung

Meine Arbeit konnte nur mit der Hilfe, Unterstützung, dem Zuspruch und der Motivation von zahlreichen Personen entstehen.

Allen voran möchte ich Prof. Benndorf für die Betreuung, Hilfestellung und die lehrreichen Jahre in seiner Arbeitsgruppe danken. Diese Arbeit hätte ohne seine Ideen, Zielvorgaben und Antworten auf meine Fragen nicht in dieser Form entstehen können. Außerdem hat er mir die Möglichkeit gegeben Methoden und Techniken zu erlernen, die mir weit über diese Arbeit hinaus von Nutzen sind und sein werden.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Posern und Prof. Behrends für die Bereitschaft die vorgelegte Arbeit zu begutachten.

Dr. Matthew Fuszard und seinem Team der *Core Facility - Proteomic Mass Spectrometry* gilt mein Dank für die Interaktomanalyse und die Unterstützung bei der Identifizierung potentieller Rho-Interaktionspartner.

Ein riesiges Dankeschön geht an das gesamte Team der Abteilung Klinische Pharmazie und Pharmakotherapie, namentlich Heike, Robert, Markus, Frau Frenzel, Sylvi, Anton, Herr Rattay, Dani, Jana und Aref, für den wunderbaren Umgang miteinander, das stets offene Ohr bei Problemen und Sorgen sowie die einfach schöne Zeit mit euch. Quasi schon fast mit zum Team gehörten Frank und Manu, bei denen ich mich auch ganz herzlich bedanken möchte, da sie stets mit Rat und Tat und den ein oder anderen ausgegangenen Reagenzien geholfen haben. Eine Person fehlt, die eine ganz besondere Erwähnung verdient hat, da sie mir wohl die meiste Zeit, die meisten Ratschläge, die meiste praktische Unterstützung und die meisten liebgewonnenen Gespräche geschenkt hat. Liebe Anne, dafür kann ich dir gar nicht genug danken! Es war einfach großartig mit dir zu arbeiten.

Ohne meine Familie, die mir immer wieder Zuspruch und unermesslich viel Unterstützung schenkt, hätte ich diese Arbeit wohl nie meistern können. Der Dank an dieser Stelle kann gar nicht ausdrücken, wie froh ich bin euch alle zu jeder Zeit an meiner Seite zu wissen. Einem Menschen möchte ich in diesem Zusammenhang ganz besonders danken, denn diese Arbeit hat uns zusammengebracht und zusammengeschweist. Jenny, Worte können an dieser Stelle gar nicht ausdrücken, wie dankbar ich bin dich in meinem Leben zu haben.

Persönliche Daten

Name: Michael Hauke
Geburtstag: 26.10.1989
Geburtsort: Lutherstadt Wittenberg
Staatsangehörigkeit: deutsch

Beruflicher Werdegang

seit 01/2022 Medizinische Hochschule Brandenburg, Standort Rüdersdorf
Wissenschaftlicher Mitarbeiter
Abt. Neurologie und Schmerztherapie
(Arbeitsgruppe Prof. Dr. Jens Schmidt)

10/2016 – 07/2021 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Promotionsstudium
angestrebter Abschluss: Dr. rer. nat
Institut für Pharmazie, Abt. Klinische Pharmazie und Pharmakotherapie
(Arbeitsgruppe Prof. Dr. Ralf Benndorf)

07/2014 - 08/2016 Universität Bremen
Wissenschaftlicher Mitarbeiter
Centre for Biomolecular Interactions Bremen
(Arbeitsgruppe Prof. Dr. Kathrin Mädler)

Studium

2011-2014 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Studiengang: Biochemie (Master)
Abschluss: Master of Science

2008-2011 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Studiengang: Biochemie (Bachelor)
Abschluss: Bachelor of Science

Schulische Ausbildung

2002-2008 Paul-Gerhardt-Gymnasium in Gräfenhainichen
Abschluss: Abitur

2000-2002 Sekundarschule „Johann Heinrich Pestalozzi“ in Zschornowitz

1996-2000 Grundschule Möhlau