

Aus dem Institut für Klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Univ.-Prof. Dr. H. Eichler

Die Rolle von CLIC1 als Modulator der Endothelzelladhäsion

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2023

vorgelegt von: Patrick Niewald
geb. am: 18.11.1991 in Bielefeld

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung; eigene Fragestellung	
2.1	Endothel	3
2.2	Angiogenese	5
2.3	Endothelzelladhäsion	7
2.4	Die CLIC-Proteine	8
2.5	Fragestellung	10
3	Material und Methodik	
3.1	Zellkultur	11
3.2	Knock-downs	11
3.3	CLIC1-Inhibition mit IAA-94	13
3.4	Stainings	13
3.5	Fluoreszenzmikroskopie und Zählung	14
3.6	Auswertung	15
4	Ergebnisse	
4.1	Der Knock-down von CLIC1 führt zu vermindertem Zellspreading	17
4.2	CLIC1 kolokalisiert in der Membran der HUVEC mit F-Aktin	22
4.3	Der Effekt von IAA-94 auf die Rekrutierung von CLIC1 in die Zellmembran	26
4.4	Der Einfluss des Knock-downs der Integrine β_1 und β_3 auf die CLIC1-Membranexpression	29
5	Diskussion	
5.1	Der Einfluss von CLIC1 auf das Zellspreading und die Endothelzelladhäsion	33
5.2	CLIC1 und CLIC4 – Einfluss auf unterschiedliche Phasen der Adhäsion	34
5.3	Die Bedeutung der CLIC1-Membranexpression für die Endothelzelladhäsion	34
5.4	Das Zusammenspiel von CLIC1 und F-Aktin während der Endothelzelladhäsion	35
5.5	Unterschiede zwischen den Integrinen bei der Endothelzelladhäsion	36
5.6	Relevanz der Ergebnisse aus den Experimenten mit CLIC1	37
6	Literaturverzeichnis	39
7	Abbildungsverzeichnis	49
8	Abkürzungsverzeichnis	50
9	Anhang	
9.1	Verwendete Geräte	52
9.2	Verwendete Reagenzien	52
10	Kongressbeiträge	54

11	Danksagung	55
12	Lebenslauf	56

1 Zusammenfassung

Endothelzellen stellen einen wichtigen Teil der Blutgefäße dar. Das Endothel ist ein komplexes Gewebe, das sich je nach Organ in seinem Aufbau unterscheidet. Es übernimmt verschiedene Funktionen im Rahmen von physiologischen Prozessen wie der Blutdruckregulation, der Hämostase und pathophysiologischen Prozessen wie Entzündungsreaktionen oder der Tumorangiogenese. Daher wurde es bereits in verschiedenen Arbeiten als Angriffspunkt für neue Therapien untersucht. Auch das Protein CLIC1 ist in Endothelzellen nachweisbar. Es gehört zu einer Familie von sechs Chloridionenkanälen, die sowohl als in der Zelle gelöste als auch in die Membran integrierte Form vorkommen können. In dieser Arbeit wird seine Rolle bei der Endothelzelladhäsion untersucht. Zunächst wurden dazu Experimente mit CLIC1-Knock-down durchgeführt, um die Zellmorphologie der in dieser Arbeit untersuchten HUVEC zu verschiedenen Zeitpunkten der Adhäsion zu analysieren. Der Knock-down von CLIC1 führte zu komplexen Veränderungen beim Zellspreading. Während die Mehrzahl der HUVEC im Vergleich zu den kontrolltransfizierten Zellen überhaupt kein Spreading vollzog, fiel bei den verbleibenden Zellen eine Verschiebung der Lamelli-/Filopodienbildung zugunsten der Stressfaserbildung auf. Darüber hinaus wurden diese Ergebnisse mit einem CLIC4-Knock-down verglichen. Die Schlussfolgerung war, dass CLIC1 eine Stunde nach dem Aussäen einen relevanten Einfluss auf das HUVEC-Spreading nimmt, aber nicht nach vier Stunden und dass nach vier Stunden CLIC4 den Spreadingvorgang mehr beeinflusst als CLIC1. Außerdem wurde das Zusammenspiel von CLIC1 mit dem für die Zellmorphologie maßgeblichen Protein F-Aktin untersucht. Hier zeigte sich zu frühen Zeitpunkten der Adhäsion eine CLIC1-F-Aktin-Kolokalisation, die zu späteren Zeitpunkten nicht mehr nachweisbar war. Hier war die Schlussfolgerung, dass der Einfluss von CLIC1 auf die Dynamik von F-Aktin kontextabhängig ist. Weiterhin wurden die Integrine β_1 und β_3 hinsichtlich ihres Einflusses auf die CLIC1-Membranexpression verglichen. Es konnte festgestellt werden, dass der Einfluss eines Integrin- β_3 -Knock-downs zu weniger CLIC1-Membranexpression führte als ein Integrin- β_1 -Knock-down. Integrine spielen eine große Rolle für die Zelladhäsion und vermitteln den Zell-Matrix-Kontakt. Dadurch wird eine Signalkaskade in der Zelle in Gang gesetzt. Diese Arbeit kann zur Forschung an den Grundlagen der Angiogeneseinhibition beitragen. Weitere Experimente sind aber nötig, um CLIC1 als Angriffspunkt zu etablieren.

Summary:

Endothelial cells are an essential part of blood vessels. The endothelium is a complex tissue, which differs in structure depending on the organ. Among its diverse functions are physiological functions such as blood pressure regulation or hemostasis and pathophysiological functions such as inflammation and tumor angiogenesis. With this end in view, blood vessels have been considered as therapeutic targets. The protein CLIC1 is part of a chloride ion channel family of six proteins, which can have a soluble form or be integrated into the cell membrane. In this study its role as a modulator of endothelial cell adhesion is analyzed. First, knock-down experiments of CLIC1 to analyze cell morphology at different points in time of adhesion were done. CLIC1 knockdown leads to complex changes in cell spreading. While the majority of HUVEC compared to control-transfected cells did not show any spreading, the remaining cells showed stress fiber rather than lamelli-/filopodia formation. In addition, these results were compared to a CLIC4 knockdown. The conclusion was that CLIC1 had a relevant influence on HUVEC spreading one hour after seeding, but not after four hours and that CLIC4 after four hours influenced spreading more than CLIC1. Furthermore, the colocalization of CLIC1 and F-actin was analyzed. There was CLIC1-F-actin colocalization at early, but not at later points in time. Here the conclusion was that the influence of CLIC1 on F-actin dynamics is context-dependent. Moreover, integrins β_1 and β_3 were compared with regards to their influence on CLIC1 membrane expression. The knockdown of integrin- β_3 led to less CLIC1 membrane expression than the knockdown of integrin- β_1 . Integrins play a huge roll for cell adhesion and mediate cell-matrix contact. This leads to a signal cascade within the cell. This study contributes to research about angiogenesis inhibition, but further experiments are mandatory to establish CLIC1 as a target.

2 Einleitung; eigene Fragestellung

2.1 Endothel

Das Endothel stellt einen für pathophysiologische Prozesse wichtigen Teil der Blutgefäße dar. Seine Funktionen sind vielfältig. Blutgefäße können in mehrere Kategorien, u. a. Arterien, Venen und Kapillaren, eingeteilt werden. In ihnen besteht die Intima als innere Schicht neben dem Stratum subendotheliale und der Membrana elastica interna aus Endothelzellen, die die Blutgefäße von innen auskleiden (79). Das Endothel ist kontinuierlich einschichtig, enthält im normalgewichtigen menschlichen Körper mehr als $1-3 \times 10^{13}$ Zellen (118), besitzt eine Oberfläche von ungefähr 1.000 m^2 und eine Masse von ungefähr 100 g (61). Die Überlebenszeit ruhender Endothelzellen beträgt mehrere Jahre (19). Es ist ein komplexes Gewebe, das sich in seiner Funktion den spezifischen Erfordernissen der Blutgefäße anpasst.

Je nach Durchlässigkeit des Endothels der Blutgefäße eines Gewebes sind Endothelzellen durch Tight Junctions, Gap Junctions, Desmosomen und Adherens Junctions, die jeweils aus Transmembranmolekülen und einem Netzwerk aus zytoskelettalen und zytoplasmatischen Proteinen bestehen, miteinander verbunden (9). Kontinuierliches Endothel ist in vielen Arterien, Venen sowie in Kapillaren des Gehirns oder des Herzens zu finden. Für den Stoffaustausch fungiert das Endothel als semipermeable Membran. Blutgefäße in der Niere oder endo- und exokrinen Drüsen weisen ein fenestriertes Endothel für einen erhöhten Durchtritt von Stoffen auf. Ein diskontinuierliches Endothel mit noch größeren Abständen zwischen den Endothelzellen, das einen noch ausgeprägteren Durchtritt von Stoffen ermöglicht, ist in sinusoidalen Gefäßen wie denen im Knochenmark oder Leber zu finden. Der Großteil des Stoffaustausches findet in den Kapillaren, bei Entzündungen vorrangig in den postkapillären Venulen, statt.

Das Endothel ist als parakrines und endokrines Organ (118) an der Homöostase des Blutflusses beteiligt und kann sich den Strömungsverhältnissen des Blutes durch Regulation des Gefäßtonus anpassen, indem es durch die Freisetzung u. a. von Stickstoffmonoxid auf Scherkräfte reagiert. Die Blutfluidität wird durch die Inhibierung der Plättchenaggregation durch Ausschüttung von 13-Hydroxyoktadiensäure aufrechterhalten (36). Das Endothel inhibiert einerseits Hämostase und Koagulation, indem es den Protein-C/Protein-S-Signalweg aktiviert. Andererseits können bei einem Endothelschaden diese beiden Prozesse aktiviert werden. Das Endothel ist auch an der Fibrinolyse beteiligt, indem es t-PA freisetzt (34). Außerdem spielen die Endothelzellen eine Rolle bei immunologischen Prozessen (92). Über Selektine auf der Membran der Endothelzelle können neutrophile Granulozyten ins Gewebe migrieren (83).

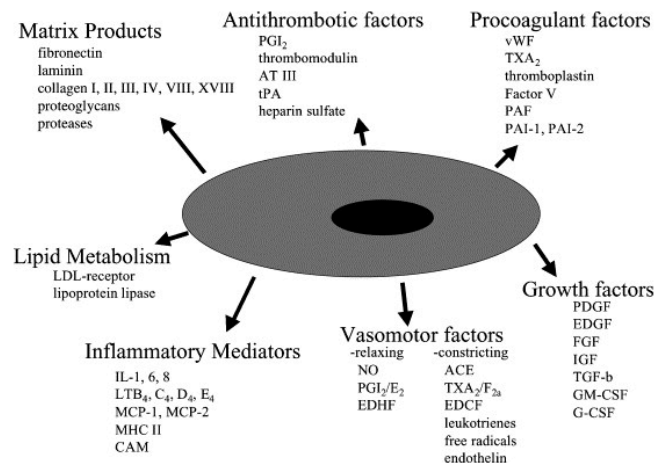


Abbildung 1:
Die Endothelzelle stellt Mediatoren für verschiedene physiologische Prozesse her (118).

Endothelzellen synthetisieren ACE und ACE2, die an der Blutdruckregulation beteiligt sind. Während der SARS-CoV-2-Pandemie wurde festgestellt, dass ACE2 ein Eintrittspunkt des Virus in die Lunge ist (133).

Die Funktion des Endothels kann durch Einwirkungen wie Inflammation, Atherosklerose, Nieren- und Herzinsuffizienz (98) beeinflusst werden. Verbrennungen oder allergische Reaktionen sorgen für eine erhöhte Durchlässigkeit des Endothels.

Das Endothel der Gefäße verschiedener Organe hat auf seiner Oberfläche Marker wie z. B. Integrine (16; 17; 97), an die Peptide wie die Aminosäuresequenz RGD auf Phagen spezifisch binden können, wodurch ein *vascular zip code* erstellt wurde (39; 91), der für gezielte Therapien genutzt werden kann. Durch ihn können u. a. Endothelien ruhender Gewebe von denen wachsender Gewebe unterschieden werden (3).

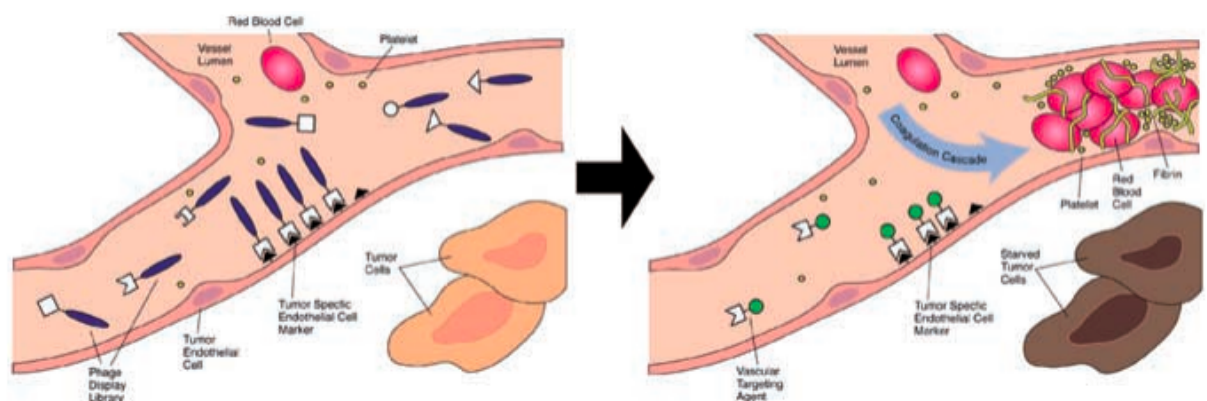


Abbildung 2:
Entdeckung des *vascular zip codes* (links), der für gezielte Therapien verwendet werden kann (rechts) (120).

2.2 Angiogenese

Organe wie die Blutgefäße entstehen in der Embryonalentwicklung aus tubulären Anlagen. Dies erleichtert ihnen die Versorgung mit Nährstoffen und den Gasaustausch (57). In der Embryonalentwicklung bilden sich während der Gastrulation aus mesodermalen Zellen Hämangioblasten, gemeinsame Vorläuferzellen von Endothel- und hämatopoetischen Zellen (18), wodurch die primitiven Blutinseln entstehen (45; 106). In deren Peripherie bilden sich aus Hämangioblasten die Vorläufer der reifen Endothelzellen. VEGF, bFGF, GM-CSF und IGF-1 sind an der Mobilisierung von Endothelvorläuferzellen aus dem Knochenmark beteiligt, Angiopoetine an der Gefäßausstülpung (19). Während der Vaskulogenese entsteht das vaskuläre Netzwerk aus Zellen durch die Migration der Endothelzellen und die Interaktion mit verschiedenen Zelltypen wie glatten Muskelzellen und Perizyten in den Gefäßen (84). Zu unterscheiden ist diese von der Angiogenese, die die Reifung und das Wachstum des Blutgefäßes darstellt. Bei Erwachsenen entstehen neue Blutgefäße meist durch Angiogenese, teilweise auch durch Vaskulogenese (18; 110).

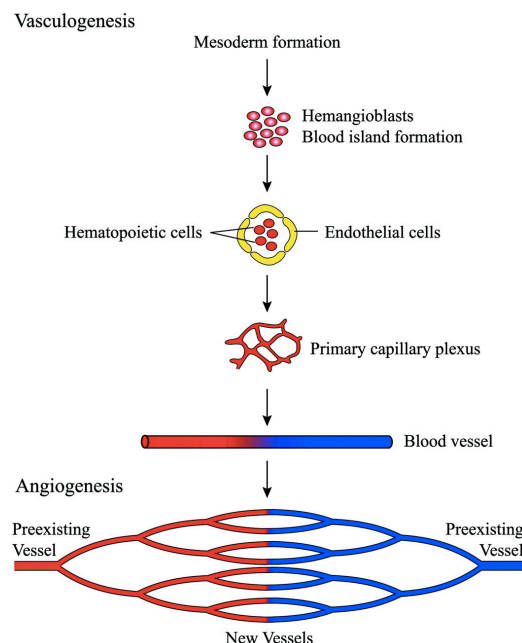


Abbildung 3:
Vaskulogenese und Angiogenese (69)

Während der Angiogenese wird zuerst die Basalmembran degradiert, die Endothelzellen proliferieren und migrieren an ihren Zielort, an dem VEGF-A ausgeschüttet wird (1). Hier kommt es zum endothelialen Sprouting (12), bei dem die Endothelzellen ein tubuläres Lumen bilden. Es werden zwei Phänotypen von Endothelzellen unterschieden. Zunächst sind die Tip Cells zu nennen, die lange Filopodien haben und durch die Integration von Signalen aus der Umgebung die Richtung der Aussprossung des Blutgefäßes vorgeben (108). Darüber hinaus sind die Stalk

Cells zu erwähnen, die weniger Filopodien und stattdessen Adhäsionen bilden, durch die die Aussprossung stabilisiert wird (43). Während der endothelialen Tubulogenese ist die Adhäsion von Endothelzellen entscheidend (50; 122). Dabei sind sowohl zelluläre Adhäsionsrezeptoren wie auch Proteine der EZM und zytoplasmatische sowie Membranproteine relevant (50). Es folgt die Reifung der Blutgefäße durch Hinzuziehen von Perizyten und glatten Muskelzellen (122). Dies erfordert eine enge zeitliche und räumliche Regulation (84).

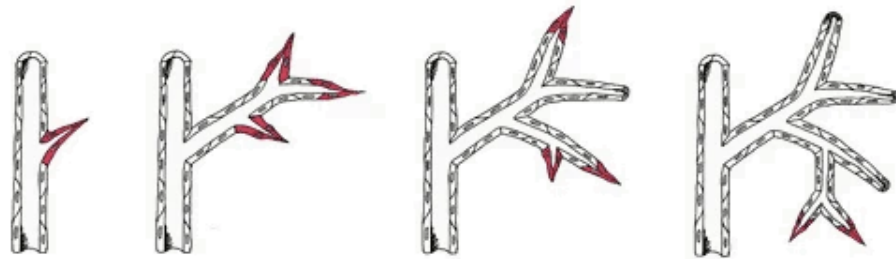


Abbildung 4:
Bei der Angiogenese wachsen die Blutgefäße durch Aussprossen (59)

Die Angiogenese läuft physiologisch u. a. bei der Wundheilung, der Ovulation (107) und der Reparatur des menstruierenden Uterus ab (38). Auch pathologische Prozesse wie die okuläre Neovaskularisierung (38), Arthritiden (33) oder maligne Neoplasien brauchen die Neubildung von Blutgefäßen.

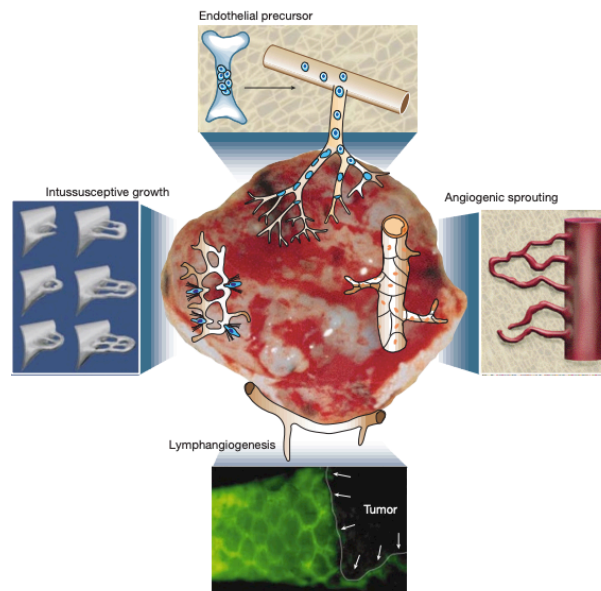


Abbildung 5:
Tumorangio- und Lymphangiogenese (18)

Bereits Anfang des 20. Jahrhunderts kam der Gedanke auf, dass das Wachstum von Tumoren die Angiogenese erfordert (44). Im Jahre 1971 wurde postuliert, dass Tumoren abhängig von der

Angiogenese wachsen und die Angiogeneseinhibition therapeutisch genutzt werden kann (37). Bereits nichtvaskularisierte Tumore, die größer als 1 mm³ sind, enthalten hypoxische Regionen. Säugetierzellen liegen deshalb nicht weiter als 100-200 µm von Blutgefäßen entfernt (19) und aktivieren bei weiteren Strecken den sogenannten angiogenen Switch. Das Gleichgewicht in den Tumorzellen wird hierbei durch einen niedrigen Sauerstoffpartialdruck, einen niedrigen pH-Wert oder eine Hypoglykämie (19) von den antiangiogenen zu den proangiogenen Molekülen wie z. B. VEGF-A, Integrine, PAI-1, NO, COX-2 und TSP-2 (19) verlagert (52). Die Angiogenese in Tumorzellen läuft in den drei Phasen Initiation, Proliferation/Invasion und Maturation ab (32).

2.3 Endothelzelladhäsion

Während der Adhäsion interagieren Proteine in den Endothelzellen. Die Morphologie der Zelle muss dazu dieser Aufgabe angepasst sein (87; 105). Morphologie und Funktion sind miteinander verknüpft (21). Die Morphologie der Zelle wird bestimmt durch ihr Zytoskelett. So unterscheidet sich bspw. der Aufbau des Zytoskeletts migrierender von jenem adhätierender Zellen. Seit den 1920er Jahren wurden Experimente mit Endothelzellen mit dem Ziel durchgeführt, u. a. ihre Morphologie näher zu beschreiben (73).

Das Zytoskelett besteht aus Aktinfilamenten, Mikrotubuli und Intermediärfilamenten. Dabei handelt es sich um Polymere. Es werden Motorproteine aktiviert, die dann zu Zellbewegung oder Zellteilung führen (86). Außerdem können die Filamente in der Zelle Netzwerke bilden und sie bei Stress stabilisieren (99). Aktinfilamente können sich in Zellen zu 15 verschiedenen Strukturen vereinen (22). Die Filamente des F-Aktins entstehen durch die Zusammenlagerung des G-Aktins, des globulären Monomers und sind 8-9 nm lang. Der größte Teil des Aktins befindet sich in Myozyten, doch auch andere Zelltypen wie Endothelzellen enthalten Aktin (28). In diesen macht es etwa 5-15 % der Gesamtproteinmenge aus (98). Zu den drei Bestandteilen des Aktinzytoskeletts gehören das Membranskelett, der kortikale Aktinring und die Aktinstressfasern (104). Das Zytoskelett ist verantwortlich für die strukturelle Integrität (87), verbindet die Plasmamembran und das endoplasmatische Retikulum mit dem Rest der Zelle und nimmt an intrazellulärem Transport teil (99). Pathologische Veränderungen des Zytoskeletts können bspw. einer Kardiomyopathie (55) oder einer fokalsegmentalen Glomerulosklerose (134) zugrunde liegen. Darüber hinaus ist es auch für Prozesse wie Migration (87), Endozytose, Zellteilung (58) und Zelladhäsion wichtig (87). Die Adhäsion ist für das Überleben von Zellen, ihr Spreading, ihre Proliferation und ihre Differenzierung von Bedeutung (80).

Die Endothelzellen adhätieren im Rahmen der Angiogenese auf der EZM, die aus Kollagen, Lamininen oder Proteoglykanen bestehen kann (50; 69). Auch für die Endothelzellmigration sind der ständige Auf- und Abbau von Adhäsionen nötig (71). Gesteuert wird die Migration durch die

Chemotaxis, z. B. durch VEGF oder bFGF, die Haptotaxis, z. B. durch die Bindung eines Integrins an ein Protein der EZM und die Mechanotaxis (69; 74).

Eine Vielzahl von Zelladhäsionsmolekülen nimmt an den Interaktionen zwischen der Zelle und der EZM teil (49). Die Endothelzellen exprimieren VE-Cadherin (129), das sie untereinander verbindet und N-Cadherin (93), das über die gesamte Plasmamembran verteilt ist und sie damit mit umgebenden Zellen verbindet. Die Kontakte zwischen Endothelzellen und extrazellulären Liganden wie Kollagen oder Fibronectin (60) sowie die Zellmigration werden über Integrine auf den Endothelzellen vermittelt. Sie haben die Funktion, die Zelle mit der extrazellulären Matrix zu verbinden (64) und die Anpassung der Zellmorphologie an ihre Umgebung zu fördern. Sie sind Glykoproteine, die aus einer α - und einer β -Untereinheit bestehen und einen extra- und intrazellulären Teil besitzen. Auf dieser Grundlage kommt es zum Cross-Talk zwischen Integrinen und dem VEGF-Rezeptor, der die Endothelzelladhäsion fördert (114). Integrin β_3 hat eine prominente Rolle bei der Angiogenese (114).

2.4 Die CLIC-Proteine

Alle eukaryotischen Zellen enthalten Chloridionenkanäle (7) in ihrer Plasmamembran oder den Membranen ihrer Zellorganellen (26). Die Kanäle sind an Prozessen wie der Zellvolumenregulation, der elektrischen Erregbarkeit oder der Zellkontraktion beteiligt (113). Sie können nach ihren strukturellen Gemeinsamkeiten verschiedenen Klassen wie den ligandengesteuerten Chloridionenkanälen (u. a. GABA_A-Rezeptor) oder den nicht-ligandengesteuerten Chloridionenkanälen (u. a. CFTR-Kanal) (2; 7) zugeordnet werden (7). Die CLC-Kanäle sind eine Klasse von spannungsgesteuerten Chloridionenkanälen (2), die als erste nicht-neuronale Chloridionenkanäle entdeckt wurden (85).

Die Proteine der CLIC-Familie, die Ende der 1980er Jahre entdeckt wurden (70), können als in der Zelle gelöste und als in Membranen eingebaute Proteine vorkommen. Wenn sie in intrazelluläre Membranen oder die Plasmamembran eingebaut sind, spielen sie eine Rolle als Chloridionenkanäle (76). Sie gehören zur p64-Chloridionenkanalfamilie (23) und haben keine strukturelle Ähnlichkeit (125) mit anderen Chloridionenkanalproteinen (30). Gemeinsam ist den CLIC-Familienproteinen ein Modul von ungefähr 240 Aminosäuren (75). Sie sind strukturell mit der Omega-Familie der Glutathion-S-Transferasen verwandt (5) und haben einen hohen Konservierungsgrad (76). In Vertebraten sind die Proteine CLIC1 bis CLIC6 vorhanden, die je nach Gewebe in unterschiedlichem Maße exprimiert werden (63).

Die CLIC-Proteine haben in der Zelle vielfältige Aufgaben. Das Protein CLIC2 moduliert die Aktivität des Ryanodinrezeptors (29). Außerdem wird es in Endothelzellen exprimiert und kann

die Metastasierung von Tumoren verhindern (124). Im Gegensatz dazu kann CLIC3 die Tumorangiogenese und die Invasivität der Tumorzellen fördern (56). Das Protein CLIC5A kommt vor allem in Skelettmuskelzellen vor (10). Durch seine Fähigkeit zur Bindung an F-Aktin (10) kommt CLIC5A in Zell-Zell-Kontakten an den Spitzen von Aktinfilamenten vor und befindet sich dabei in Podozyten der glomerulären Filtrationsbarriere (102). Darüber hinaus ist es in kochleären Haarzellen zu finden (119). Das Protein CLIC5B ist von Bedeutung für die Osteoklastenfunktion (31). Die Rolle von CLIC6 ist unbekannt (7).

CLIC1 wurde erstmals als NCC27 in der Kernmembran entdeckt (127) und danach in seiner Funktion als Chloridionenkanal beschrieben, der intrazellulär in Form von Monomeren gespeichert wird und Polymere formen kann. Es kann durch Oxidation von einer zur Glutathion-S-Transferase homologen Form zu derjenigen eines helikalen Dimers wechseln. Die oxidierte Form von CLIC1 kann in die Membran eingebaut werden (46). Dadurch gehört es zu den metamorphen Proteinen (76). Lange war es wissenschaftlich akzeptiert, dass natürliche Proteine eine evolutionär konservierte dreidimensionale Struktur haben, die sich aus ihrer Aminosäuresequenz und der daraus resultierenden Faltung ergibt. Einige Proteine wie CLIC1 (75) jedoch, die unterschiedliche Konformationen trotz derselben Aminosäuresequenz einnehmen können, veranlassen dazu, diese Ansicht zu ändern. Diese Interkonversion der Proteine kann durch Umweltfaktoren getriggert oder unabhängig ablaufen. Proteine müssen in vivo innerhalb kurzer Zeit ihre aktive Form einnehmen. Durch die Interkonversion können sie dazu direkt in die neue Form umgefaltet werden, ohne sich zuvor noch einmal entfalten zu müssen. Es ist davon auszugehen, dass die Proteine dieser entsprechenden Familien gemeinsame Vorfahren haben, obwohl sie sich strukturell wenig ähneln. Die intermediäre Struktur ist ihnen trotzdem gemeinsam (89).

CLIC1 ist in den Zellen vieler Organe zu finden. Es wird v. a. in Herz, Plazenta, Leber, Niere, Pankreas und weniger in Skelettmuskel, Lunge und Gehirn gebildet (10). Auch im Gefäßendothel ist CLIC1 vorhanden (81). CLIC1 spielt bei seiner weiten Verteilung in den Organen eine Rolle bei verschiedenen zellulären Prozessen (112). Im Signaltransduktionsweg der Zelle erfüllt CLIC1 verschiedene Aufgaben, die an seiner Lokalisation innerhalb der Zelle erkennbar sind. Erstens kann es unter bestimmten Bedingungen wie einem erniedrigten pH-Wert oder in einem oxidierenden Milieu in die Zellmembran eingebaut werden. Zweitens sind die CLIC-Proteine allgemein assoziiert mit der Rho-Familie der kleinen GTPasen (63), die den Aufbau des Zytoskeletts beeinflussen (54). Während der Mitose unterstützt CLIC1 außerdem die Zytokinese und die Auflösung des Zellkerns (128). Drittens ist der Einbau von CLIC-Proteinen in die Zellmembran oft mit einem Remodelling der Zellmembran verbunden (63).

Das Protein CLIC4 wurde zunächst in seiner Rolle bei der pH-Regulation in Large-dense-Core-Vesikeln beschrieben (23). Es wird v. a. in Herz, Plazenta und Niere exprimiert (10). Bei

zellulärem Stress hat CLIC4 eine aktivierende Funktion für die Apoptose (116). Außerdem ist es mit der Tubulogenese assoziiert (76). Auch Endothelzellen enthalten CLIC4 (81). Dieses konnte v. a. in ruhenden Gefäßen nachgewiesen werden (13). Es wurde bereits festgestellt, dass CLIC4 für die Angiogenese von Bedeutung ist (126).

2.5 Fragestellung

Die Angiogenese war in den letzten Jahren ein vielversprechendes Ziel der Therapie von Tumoren und anderen Krankheiten, die als angiogeneseabhängige Prozesse zusammengefasst wurden (40). Da das Wissen über die Funktion von Blutgefäßen in Tumoren und bei anderen Krankheiten stetig erweitert wurde, die Entstehung der Blutgefäße aber noch nicht komplett verstanden ist (122), ist es nötig, auch die Endothelzellen weiterhin als Angriffspunkte zu überprüfen. CLIC1 und CLIC4 sind die vorrangig in Endothelzellen nachweisbaren CLICs (88). Daher wurde in dieser Arbeit die Rolle von CLIC1 als Modulator der Endothelzelladhäsion untersucht. Darüber hinaus wurde analysiert, inwiefern CLIC1 einen Funktionsausfall von CLIC4 kompensieren kann. Da bei der Endothelzelladhäsion eine Bindung der Integrine an die EZM stattfindet, wurde außerdem in Bezug auf die Integrine β_3 und β_1 untersucht, wie sie sich bei der Interaktion mit CLIC1 zu Beginn der Adhäsion unterscheiden. Die Ergebnisse der Experimente sollen ebenfalls dazu beitragen, die biologische Funktion der beiden CLIC-Proteine zu verdeutlichen. Während Fehlfunktionen von Chloridionenkanälen anderer Familien Krankheiten wie der zystischen Fibrose, Epilepsie, dem Bartter-Syndrom oder der vitelliformen Makuladegeneration zugeordnet werden, erfolgte dies für Proteine der CLIC-Familie bisher nicht (117).

3 Material und Methodik

3.1 Zellkultur

Für die Experimente wurden humane Nabelschnurvenenendothelzellen von Lonza (HUVEC) verwendet. Als Kulturmedium diente EGM-2. Dazu wurden die EGM-2 SingleQuots, die aus FBS, Hydrocortison, Human fibroblast growth factor- β , VEGF, R3-Insuline-like growth factor-1, Ascorbinsäure, Human epidermal growth factor, Gentamicin/Amphotericin-B und Heparin bestanden, zu EBM-2 gegeben. Vor dem Auftauen der Zellen wurden Zellkulturflaschen mit EGM-2 gefüllt und bei 37 °C und 5 % CO₂ für etwa 30 Minuten inkubiert. Das Fläschchen mit den bei -80 °C gefrorenen Zellen wurde unter der Sterilbank kurz geöffnet und wieder verschlossen, um den Druck zu entlasten und anschließend im Wasserbad bei 37 °C erwärmt. Die Zellsuspension wurde mit einer Pipette gemischt und anschließend auf die Zellkulturflaschen verteilt, in denen sie dann bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubierten. Das Medium wurde 24 Stunden nach dem Aussäen der Zellen gewechselt, danach alle 48 Stunden. Für den Mediumwechsel wurde nach der Entnahme aus dem Inkubator unter dem Mikroskop zuerst die Adhäsion der Zellen in der Zellkulturflasche überprüft. Pro Zellkulturflasche wurden 15 ml EGM-2 aufgewärmt. Unter der Sterilbank wurde das alte Medium abgesaugt und das neue aufgegeben. Die Zellen wurden ungefähr alle zwei Tage gesplittet. Es wurden Trypsin-EDTA, HEPES BSS, Trypsin neutralizing solution und EGM-2 auf 37 °C erwärmt und neue Zellkulturflaschen vorbereitet. Die Zellen wurden mit 5 ml HEPES BSS gespült. In die Zellkulturflasche wurden 2 ml 0,05%iges Trypsin-EDTA bei 37 °C gegeben und auf den Zellen inkubiert, um die Zellen von der Zellkulturflasche abzulösen. Dies wurde unter dem Mikroskop unter Bewegen der Zellkulturflasche überprüft. Das Trypsin wurde durch 5 ml 10%iges FBS inaktiviert. Die abgelösten Zellen wurden in ein Röhrchen überführt und bei 1.000 rounds per minute, einer Beschleunigung von 200 g und 21 °C für fünf Minuten zentrifugiert. Das entstandene Zentrifugat wurde in EGM-2 resuspendiert und dann in die EGM-2-inkubierten Zellkulturflaschen ausgesät.

3.2 Knock-downs

Die HUVEC, in denen CLIC1 und CLIC4 einzeln oder kombiniert ausgeknockt wurden, wurden nach Adhäsionszeiten von einer und vier Stunden auf einer Kollagenmatrix fixiert. Außerdem wurde mit Integrin-Knock-downs experimentiert, um die Rolle der CLIC1-Proteine bei der Zelladhäsion weitergehend zu definieren. Die Zellen waren am ersten Tag in 15-cm-Schalen in 25 ml EBM-2 ausgesät worden, sodass sich auf einer Platte $5,3 \times 10^5$ Zellen befanden, die über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert wurden. Am zweiten Tag wurden sie mit On-Targetplus

Smartpools von Dharmacon transfiziert. Es wurden ein On-Targetplus non-targeting pool als Kontrolle, ein On-Targetplus CLIC1 smartpool, ein On-Targetplus CLIC4 smartpool, ein On-Targetplus Integrin β_3 smartpool und ein On-Targetplus Integrin β_1 smartpool gebildet. Die siRNA wurde zusammen mit Lipofectamine 2000 zu den HUVEC gegeben. Zunächst wurden beide in Opti-MEM gelöst. Um eine 10 nM siRNA-Lösung herzustellen, musste die im Lösungspuffer gelöste siRNA zu 4,07 ml Opti-MEM gegeben werden. Es wurden 65,14 μ l Lipofectamine 2000 in 4,005 ml Opti-MEM pro On-Targetplus smartpool gelöst. Die siRNA- und Lipofectamine-2000-Lösungen wurden miteinander gemischt und inkubierten 20 Minuten bei Raumtemperatur. Im Falle des Knock-downs von CLIC1&4 wurde eine doppelte Dosierung an siRNA für die Kontrolle verwendet. Bevor die siRNA- und Lipofectamine-2000-haltige Lösung zu den Zellen gegeben wurde, wurde das EBM-2 von den Zellen abgesaugt und die Zellen wurden mit 5 ml Opti-MEM gewaschen. Zu jedem Well wurde dann erneut Opti-MEM gegeben. Anschließend wurde die Lösung tropfenweise zu den entsprechenden Wells gegeben. Die Zellen inkubierten für weitere fünf Stunden. Danach wurde das Opti-MEM entfernt und die Zellen in EBM-2 für 67 Stunden inkubiert. Nach fünf Tagen folgte das Adhäsionsexperiment. Kollagenslides wurden zur Vorbereitung ungefähr zwei Stunden vor dem Experiment mit 300 μ l EBM-2 inkubiert. Die Zellen wurden aus dem Inkubator entnommen und das Medium abgesaugt. Anschließend wurden sie mit PBS unter langsamem Pipettieren gewaschen und mit 2 ml Trypsin-EDTA behandelt. Das Trypsin wurde durch 2 ml FBS + 8 ml PBS inaktiviert. Die Zellen wurden in ein 50 ml Röhrchen transferiert, die Zelllösung zentrifugiert und das entstandene Pellet mit 5 ml PBS gewaschen. Danach wurde es erneut zentrifugiert und in EBM-2 gelöst. Anschließend wurden die Zellen gezählt. Dazu wurden aus der entstandenen Lösung 2 μ l auf einen Objektträger pipettiert, mit Trypan Blue als Färbung versetzt und mit einem Deckglas abgedeckt. Unter dem Lichtmikroskop wurden die Zellen im Zählraster des Objektträgers gezählt, die sich im Feld, an der rechten und an der unteren Kante eines Kästchens befanden. Die Zellen wurden danach so suspendiert, dass sich in 500 μ l Medium 2×10^4 Zellen befanden. Hierauf wurde das Medium von den vorbereiteten Slides abgesaugt und die Lösung mit den Zellen in die Wells gegeben. Die Zellen inkubierten je nach vorgesehener Adhäsionszeit bei 37 °C. Vor der Fixierung wurde das Medium von den Zellen abpipettiert. Sie wurden zweimal mit 600 μ l PBS pro Well für fünf Minuten bei einer niedrigen Shakergeschwindigkeit gewaschen und mit 600 μ l eiskaltem 4%igem Formaldehyd pro Well für 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Das Formaldehyd wurde abgesaugt und die Zellmembranen mit 600 μ l 0,5%igem Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Die Wells wurden dann dreimal mit jeweils 500 μ l PBS für fünf Minuten bei langsamer Shakergeschwindigkeit gewaschen, die Zellen mit 500 μ l PBS pro Well gecovered und bei 4 °C für das Staining aufbewahrt. Die HUVEC, die nicht für das Adhäsionsexperiment verwendet wurden, wurden für die Proteinanalyse mittels Western Blot mit 2 \times SDS sample buffer lysiert. Die Western Blots wurden durch die Arbeitsgruppe durchgeführt.

3.3 CLIC1-Inhibition mit IAA-94

IAA-94 ist ein Chloridkanalinhibitor und basiert auf dem Chloridkanalmodulator Ethacrynsäure (76). Er wurde eingesetzt, um CLIC1 in den HUVEC zu inhibieren. Zunächst wurden die Zellen in 10 cm Schalen in jeweils 10 ml EBM-2 ausgesät und danach für eine Stunde mit 200 μ M IAA-94 behandelt. Dazu wurden pro 10 ml EBM-2 40 μ l IAA-94-Konzentrat hinzugefügt. Da IAA-94 in DMSO gelöst ist, wurde dem Kontrollmedium die äquivalente Menge von 40 μ l DMSO zugesetzt. Die Zellen inkubierten für eine Stunde bei 37 °C und 5 % CO₂. Zwei Stunden vor dem Adhäsionsexperiment wurden kollagenbeschichtete Slides mit 300 μ l EBM-2 inkubiert. Von den Zellen wurde das Medium abgesaugt und sie wurden mit PBS gewaschen. Danach wurden sie mit 1 ml Trypsin-EDTA trypsinisiert. Das Trypsin wurde durch 1 ml FBS + 8 ml PBS deaktiviert und die Zellsuspension in ein 50 ml Röhrchen transferiert. Sie wurde zentrifugiert und das entstandene Pellet mit 5 ml PBS gewaschen. Es wurde erneut zentrifugiert und das Pellet in EBM-2 gelöst, das jeweils das 200 μ M IAA-94 oder nur DMSO enthielt. Anschließend wurden die Zellen gezählt. Sie wurden erneut suspendiert, sodass sich in 300 μ l EBM-2 mit oder ohne IAA-94 2×10^4 Zellen befanden. Die HUVEC wurden dann auf die vorbereiteten Slides gegeben und inkubierten für 10, 30, 60 oder 240 Minuten bei 37 °C. Dazu wurde das Medium von den Slides abgesaugt und die Zellsuspension draufgegeben. Nach den entsprechenden Adhäsionszeiten wurden die Zellen fixiert (vgl. Teil 2.2).

3.4 Stainings

Für das Staining wurde zunächst eine 2%ige Lösung von BSA in PBS hergestellt. Die Zellen, die zuvor fixiert worden waren, wurden aus dem 4-°C-Kühlschrank entnommen und für 20 Minuten unter Agitation mit 400 μ l PBS + 2 % BSA pro Well geblockt. Die Zellen wurden mit einem in der Maus generierten Antikörper gegen CLIC1 oder isotypischem Maus-IgG als Negativkontrolle behandelt. Die Antikörperlösungen wurden in der Konzentration von 10 μ g/ml in PBS + 2 % BSA verwendet. Pro Well wurden 245 μ l Antikörperlösung verwendet. Die für das jeweilige Staining verwendete Konzentration des Anti-CLIC1-Antikörpers wurde nach der Gleichung $c_1 V_1 = c_2 V_2$ berechnet, wobei $c_1 = 0,31$ mg (Lagerungskonzentration des Anti-CLIC1-Antikörpers), $V_1 =$ benötigtes Volumen der Lagerungslösung des Anti-CLIC1-Antikörpers, $c_2 = 10$ μ g/ml = 0,01 mg/ml (im Experiment zu verwendende Antikörperkonzentration), $V_2 =$ im Experiment verwendetes Volumen (je nach Anzahl der im Experiment behandelten Wells) waren. Die Slides wurden vor dem Staining unter dem Mikroskop betrachtet und die Adhäsion der Zellen in der Übersicht überprüft. Mit den Antikörpern inkubierten die HUVEC für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Danach folgten zwei Waschschriffe für fünf Minuten mit 400 μ l PBS pro Well

und ein weiterer für fünf Minuten mit 400 µl PBS + 2 % BSA pro Well bei einer langsamen Shakergeschwindigkeit.

Während der Waschschriffe wurde die Lösung des sekundären Antikörpers hergestellt. Es handelte sich um Alexa-488-konjugierten Ziegen-Anti-Maus-IgG-F(ab')-Fragment-Antikörper, der Fluoreszenz im grünen Spektrum emittiert. Dieser lag in der Lagerungskonzentration 2 mg/ml vor und wurde im Verhältnis 1:100 verwendet. Zum Anfärben von Aktin wurden die Zellpräparate mit Alexa 546 Phalloidin im Verhältnis 1:40 in PBS + 2 % BSA inkubiert. Es wurden 245 µl pro Well zu den HUVEC gegeben, die anschließend für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubierten. Da es sich um fluoreszierende Detektionssysteme handelte, musste im abgedunkelten Raum gearbeitet werden. Nach der Inkubation wurden die HUVEC dreimal mit 400 µl PBS für jeweils fünf Minuten bei einer langsamen Shakergeschwindigkeit gewaschen.

Im Anschluss wurde der Aufsatz, der das Slide in Wells einteilte, entfernt. Dazu wurde eine Vorrichtung verwendet, die durch Einschieben die Fächerplatte vom Slide ablöst. Danach wurde auf jedes Well ein Tropfen Dapi, ein Fluoreszenzfarbstoff zur Visualisierung der Nuclei, gegeben. Abschließend wurde ein Deckplättchen auf dem Slide befestigt. Die Slides wurden bei 4 °C in einem Behälter aufbewahrt, der mit Plastikfolie versiegelt und zum Lichtschutz in Alufolie eingehüllt wurde.

3.5 Fluoreszenzmikroskopie und Zählung

Die HUVEC wurden mithilfe des Fluoreszenzmikroskops Nikon ECLIPSE Ni-U und des Programmes NIS Elements 4.20.00 Build 967 in einem Blaulichtfilter (durch Dapi angefärbte Zellkerne), einem Grünlichtfilter (durch Anti-CLIC1-Antikörper und Alexa 488 dargestelltes CLIC1) und einem Rotlichtfilter (durch Alexa 546 angefärbtes F-Aktin) fotografiert. Zunächst wurden zur Übersicht Bilder mit zehnfacher Vergrößerung, anschließend mit zwanzigfacher Vergrößerung, aufgenommen. Damit die Fotos verschiedener Präparate vergleichbar waren, wurden die Expositionszeiten im grünen und roten Farbkanal festgelegt. Hierbei musste darauf geachtet werden, dass die fluoreszierenden Antikörper nicht durch eine zu lange Exposition gebleicht wurden. Pro Well wurden mindestens vier Fotos aufgenommen. In NIS Elements wurden diese zunächst im Originaldateiformat jpeg2000 gespeichert und danach in das Format tiff umgewandelt. Anschließend wurden die Bilder der einzelnen Stainings entsprechend der Fragestellungen mithilfe von Photoshop CS5 Version 12.0 x32 ausgezählt. Die mit siCLIC1, siCLIC4 oder siCLIC1&4 behandelten HUVEC wurden nach Morphologie den Gruppen NS (non-spread), LP/FP (lamellipodien- und/oder filopodienpositiv) und SP (stressfaserpositiv)

zugeordnet. Zu den NS-HUVEC wurden Zellen gezählt, die keine sichtbaren Zellfortsätze oder F-Aktinstressfasern formten und eine rundliche Form behielten und scheinbar kleiner waren als gespreadete Zellen. Zu den LP/FP-HUVEC wurden diejenigen gezählt, die ein Spreading in Form von Lamellipodien und Filopodien zeigten, jedoch keine Aktinstressfasern. Lamellipodien sind flache Fortsätze der Zelle mit einer Dicke von 0,1-0,2 μm , die ein Aktinnetzwerk enthalten. Filopodien stellen kleine Fortsätze der Zelle mit einem Durchmesser von 0,1-0,3 μm dar (82). Zur Gruppe der SP-HUVEC wurden die Zellen gezählt, die Aktinstressfasern bildeten und eine gespannte Form hatten.

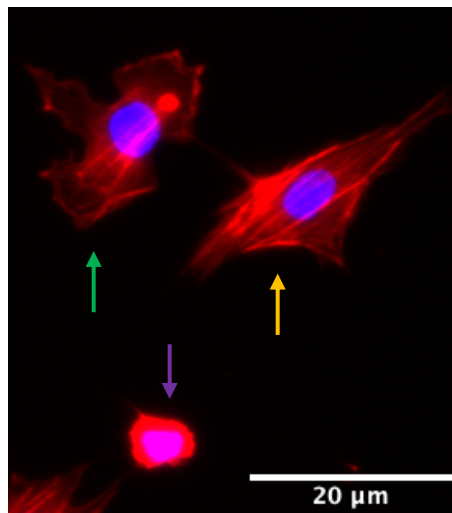


Abbildung 6: Beispiele für NS-, LP/FP- und SP-HUVEC
 siControl HUVEC 4 h, Vergrößerung 20 \times (DAPI, F-Aktin)
 Beispielhaft sind hier NS- (lila Pfeil), LP/FP- (grüner Pfeil) und SP-HUVEC (gelber Pfeil) in
 einem Bildausschnitt zu sehen.

In den mit IAA-94 behandelten Zellen wurden die Kolo-kalisation von CLIC1 und F-Aktin und die CLIC1-Membranexpression analysiert. Bei der CLIC1-Membranexpression wurden Zellen als positiv gezählt, bei denen zumindest ein Teil der äußeren Membranbegrenzung mit Anti-CLIC1 markiert wurde. Auch die Zellen, in denen ein Knock-down von Integrin β_3 und β_1 stattgefunden hatte, wurden hinsichtlich der CLIC1-Membranexpression gezählt. Bei der Analyse von F-Aktin in Lamellipodien wurden alle Zellen gezählt, die Lamellipodien zeigten. In diesen war F-Aktin erkennbar.

3.6 Auswertung

Zur Zählung der Zellen auf den Bildern hinsichtlich bestimmter Merkmale wurde das Count Tool von Photoshop verwendet. Die Daten wurden anschließend in Tabellen zusammengetragen. Der

Student's t-Test wurde verwendet, um zu überprüfen, ob zwischen den Vergleichsgruppen signifikante Unterschiede bestanden.

4 Ergebnisse

4.1 Der Knock-down von CLIC1 führt zu vermindertem Zellspreading

Adhärirt eine Endothelzelle auf einer Matrix, kommt es zum Zellspreading, einem von den GTPasen Rac und cdc42 abhängigen Prozess, bei dem die Zelle durch Polymerisierung von Aktin Ausläufer in Form von Lamellipodien und Filopodien bildet (24). In dieser Arbeit wurde untersucht, ob CLIC1 und CLIC4 einen Einfluss auf die Zellmorphologie und die Zelladhäsion haben. Um die Rolle von CLIC1 und CLIC4 bei der Adhäsion der HUVEC und ihren Einfluss auf das daraus folgende Zellspreading zu analysieren, waren in einem ersten Schritt CLIC1 und CLIC4 einzeln sowie im nächsten Schritt CLIC1 und CLIC4 gemeinsam in den HUVEC mittels siRNA ausgeknockt worden. Für diese Arbeit wurde ein F-Aktin-Staining der Zellen durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch betrachtet und als runde *Non-Spreaders (NS)* oder als *Lamellipodien-/Filopodienpositive (LP/FP)* bzw. als *Stressfaser-positive (SP)* Zellen kategorisiert. Unter Kontroll-siRNA kam es vier Stunden nach dem Aussäen in 25 % der HUVEC zum Spreading in Form von Lamellipodien- und/oder Filopodien. Der Anteil der lamellipodien-/filopodienpositiven Endothelzellen war nach vierstündiger Adhäsionszeit deutlich geringer als nach einstündiger Adhäsionszeit. Auch der Anteil der nicht-gespreadeten HUVEC war nach vier Stunden geringer als nach einer Stunde. Umgekehrt war der Anteil der stressfaserpositiven HUVEC nach vier Stunden höher als nach einer Stunde (*Abbildung 7*).

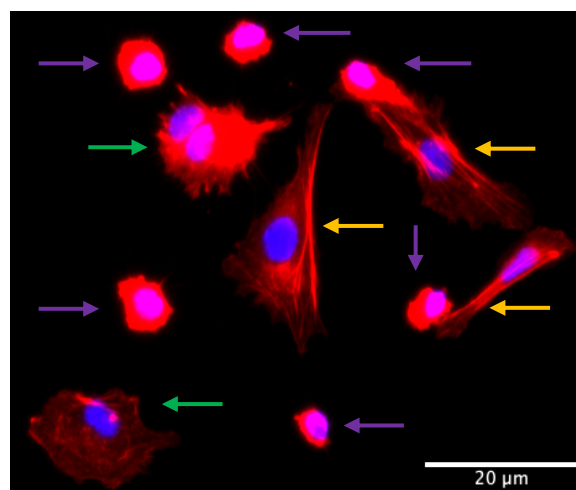


Abbildung 7: Morphologie der HUVEC

siControl HUVEC 4 h, Vergrößerung 20× (DAPI, F-Aktin)

Während der Anteil der lamellipodien-/filopodienpositiven und der nicht-gespreadeten HUVEC (grüne Pfeile) im Vergleich zu den HUVEC nach einer Stunde verringert war, war der Anteil der stressfaserpositiven HUVEC (gelbe Pfeile) erhöht (vgl. *Abbildung 8*).

LP/FP war 1 Stunde nach Aussäen mit 18 % der siCLIC1-behandelten HUVEC gegenüber 48 % den kontrolltransfizierten Zellen erheblich vermindert. Gleichzeitig wurde unter siCLIC1 mit 31 % gegenüber 17 % bei den kontrolltransfizierten Zellen eine signifikante Zunahme der SP-HUVEC beobachtet. Zusätzlich war der Anteil der NS-Zellen mit 49 % nach CLIC1-Knock-down gegenüber 34 % bei den kontrolltransfizierten Zellen signifikant erhöht (*Abbildung 7 und 8*).

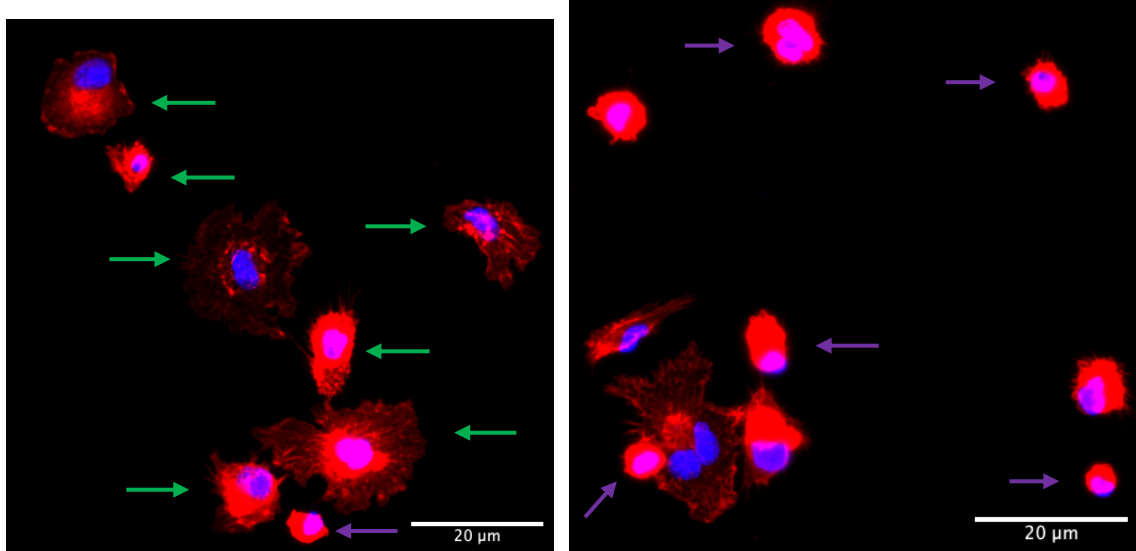


Abbildung 8: Morphologie der HUVEC

siControl (links), siCLIC1 (rechts) HUVEC 1 h, Vergrößerung 20× (DAPI, F-Aktin)

Während die mit Kontroll-siRNA transfizierten HUVEC nach einstündiger Adhäsion mehrheitlich ein Spreading in Form von Lamellipodien/Filopodien aufweisen (grüne Pfeile), sind die Zellen, die mit CLIC1-siRNA transfiziert wurden, signifikant häufiger nicht-gespreadet (lila Pfeile).

Die Transfektion mit siRNA gegen CLIC4 hatte hingegen keinen relevanten Effekt auf das endotheliale Spreading eine Stunde nach Aussäen. Hier zeigten sich 41 % LP/FP-HUVEC. Damit unterschieden sich die Zellen nach Behandlung mit siCLIC4 nicht signifikant von der Kontrolle. 38 % der Zellen und damit ein ähnlicher Anteil wie in der Kontrolle vollzogen kein Spreading. SP war ebenfalls unverändert mit 21 % nach siCLIC4 gegenüber 17 % nach Kontroll-siRNA.

Der Knock-down von CLIC1 führte zu komplexen Veränderungen beim Zellspreading. Während die Mehrzahl der HUVEC im Vergleich zu den kontrolltransfizierten Zellen überhaupt kein Spreading vollzog, fiel bei den verbleibenden Zellen eine Verschiebung der Lamelli-/Filopodienbildung zugunsten der Stressfaserbildung auf.

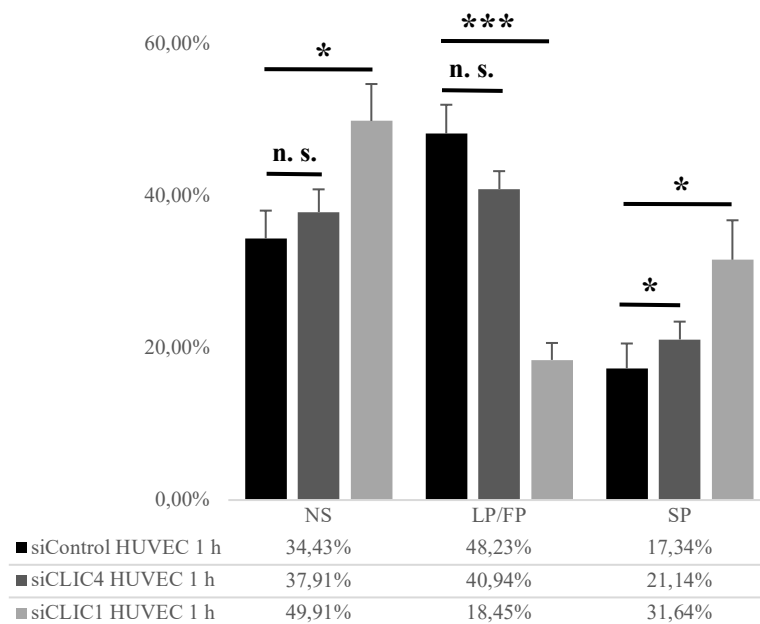


Abbildung 9: Vergleich der Morphologie der HUVEC nach CLIC1- oder CLIC4-Knock-down

Vergleich der Morphologie von HUVEC, in denen CLIC1 oder CLIC4 ausgeknockt wurde, mit einstündiger Adhäsionszeit.

* $\triangleq p < 0,05$, ** $\triangleq p < 0,01$, *** $\triangleq p < 0,0001$, n. s. \triangleq nicht signifikant

Der CLIC1-Knock-down führte im Vergleich zur Kontrolle zu signifikant mehr nicht-gespreadeten Zellen. Der Anteil der LP/FP-HUVEC war entsprechend signifikant verringert. Der Knock-down von CLIC4 hatte keinen relevanten Effekt auf das Spreading. Der Anteil der NS- und LP/FP-HUVEC unterschied sich nach siCLIC4 nicht signifikant von der Kontrolle.

Um festzustellen, ob CLIC1 den Funktionsverlust von CLIC4 in der frühen Phase der endothelialen Adhäsion kompensiert, wurde ein Doppel-Knock-down durchgeführt, bei dem HUVEC gleichzeitig mit siRNA gegen CLIC1 und CLIC4 transfiziert wurden. Die Zellen wurden wiederum nach einstündiger Adhäsionszeit hinsichtlich ihres F-Aktin-Färbungsmusters mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

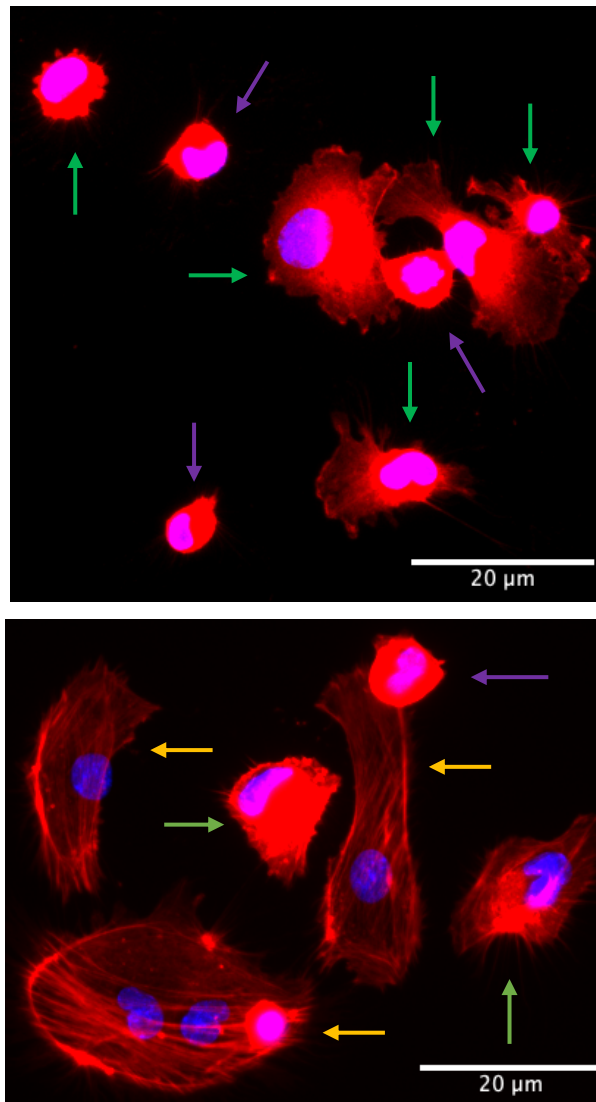


Abbildung 10: Morphologie der HUVEC nach Knock-down von CLIC1 und CLIC4

Fluoreszenzmikroskopische Bilder von HUVEC nach kombiniertem Knock-down von CLIC1 und CLIC4 (siCLIC1&4) nach einstündiger Adhäsionszeit

siControl (links), siCLIC1&4 (rechts) HUVEC 1 h, Vergrößerung 20× (DAPI, F-Aktin)

Beim Knock-down von CLIC1&4 zeigten sich verglichen mit der Kontrolle weniger LP/FP-HUVEC (grüne Pfeile) und mehr stressfaserpositive HUVEC (gelbe Pfeile). Bei den NS-HUVEC (lila Pfeile) gab es keinen relevanten Unterschied zwischen siCLIC1&4 und der Kontrolle.

In der Kontrolle, die in diesem Fall mit einer doppelten Dosierung an Kontroll-siRNA durchgeführt wurde, um der erhöhten Dosierung nach Doppel-Knock-down gerecht zu werden, wiesen 48 % der HUVEC innerhalb von einer Stunde Lamellipodien und/oder Filopodien auf, 9 % hatten Stressfasern und 42 % nahmen überhaupt nicht am Spreading teil (Abbildung 11). Insofern lag hier kein relevanter Unterschied zur Kontrolltransfektion mit der einfachen Dosis vor. Bei den mit CLIC1-CLIC4-siRNA behandelten Zellen waren 32 % lamellipodien- und/oder filopodienpositiv, 27 % stressfaserpositiv und 42 % nicht-gespreadet (Abbildung 10).

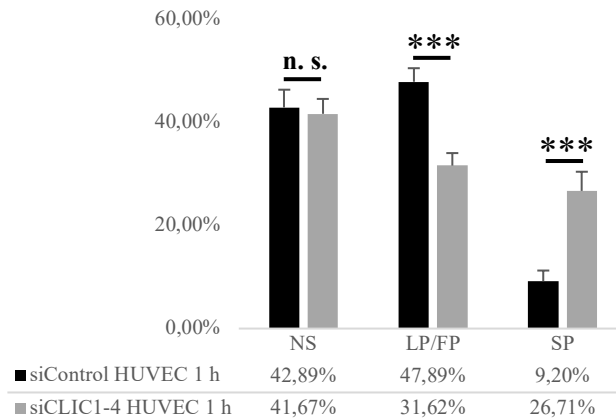


Abbildung 11: Vergleich der Morphologie der HUVEC mit Knock-down von CLIC1 und CLIC4 nach einstündiger Adhäsionszeit

* \triangleq $p < 0,05$, ** \triangleq $p < 0,01$, *** \triangleq $p < 0,0001$, n. s. \triangleq nicht signifikant

Nach dem Doppel-Knock-down kommt es zu weniger Spreading in Form von LP/FP und zu mehr Stressfaserbildung.

Die Interpretation dieser Versuchsreihe war, dass CLIC1 eine Stunde nach Aussäen eine wichtige Rolle beim Spreading spielt, CLIC4 jedoch zu diesem frühen Zeitpunkt keinen relevanten Einfluss nimmt.

Um den Einfluss von CLIC1 und CLIC4 auf spätere Phasen der HUVEC-Adhäsion zu dokumentieren, wurde mittels Knock-down der Einfluss von CLIC1 und CLIC4 auf das Spreading nach vierstündiger Adhäsion mittels F-Aktin-Staining und nachfolgender fluoreszenzmikroskopischer Analyse untersucht. Dabei zeigte sich, dass 41 % der siCLIC4-HUVEC im Vergleich zu 27 % nach Kontroll-siRNA NS waren. Entsprechend war bei den LP/FP- sowie die SP-HUVEC nach siCLIC4-Transfektion gegenüber den Kontrollzellen eine leichte, aber nicht-signifikante Reduktion zu finden (*Abbildung 12*). Bei den mit CLIC1-siRNA behandelten HUVEC ergab sich, dass 28 % nicht-gespreadet waren, 22 % waren lamellipodien- und/oder filopodienpositiv und 51 % stressfaserpositiv. Demnach unterschieden sich die siCLIC1-Zellen nach vier Stunden nicht signifikant von den kontrolltransfizierten Zellen. Zusammenfassend konnte mit der ersten Versuchsreihe gezeigt werden, dass CLIC1 eine Stunde nach dem Aussäen einen relevanten Einfluss auf das HUVEC-Spreading nimmt, aber nicht nach vier Stunden und dass nach vier Stunden CLIC4 den Spreadingvorgang mehr beeinflusst als CLIC1.

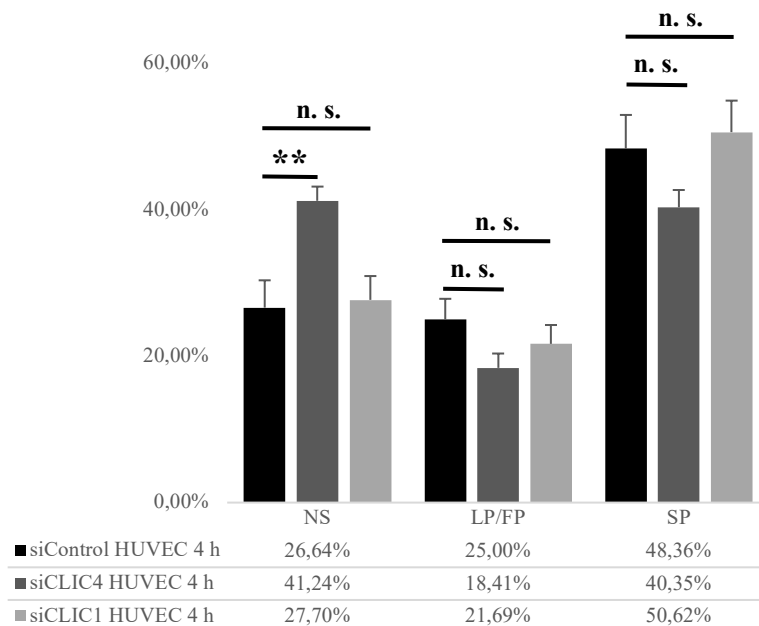


Abbildung 12: Auswertung der Morphologie der HUVEC nach vierstündiger Adhäsion

Vergleich von HUVEC, die mit siCLIC1 oder siCLIC4 behandelt wurden, nach vierstündiger Adhäsionszeit

* $\triangleq p < 0,05$, ** $\triangleq p < 0,01$, *** $\triangleq p < 0,0001$, n. s. \triangleq nicht signifikant

Der Knock-down von CLIC4 führt 4 Stunden nach dem Aussäen zu signifikant weniger Zellspreading. Zwischen dem Knock-down von CLIC1 und der Kontrolle bestand hingegen kein signifikanter Unterschied. CLIC4 beeinflusst den Spreadingvorgang zu späteren Zeitpunkten der Adhäsion mehr als CLIC1.

4.2 CLIC1 kolokalisiert in der Membran der HUVEC mit F-Aktin

Nachfolgend wurde die Dynamik der subzellulären Verteilung von CLIC1 in Endothelzellen jeweils 10 min, 30 min, 1 h und 4 h nach dem Aussäen auf kollagenbeschichteten Platten mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert, indem die Zellen darauf untersucht wurden, ob sie in ihrer Membran CLIC1 exprimierten. Als Gesamtheit für die Anteile dienten alle Zellen. In der vorherigen Versuchsserie konnte gezeigt werden, dass es durch den Knock-down von CLIC1 im Rahmen der initialen HUVEC-Adhäsion zu weniger Zellspreading kommt, indem ein geringerer Anteil der Zellen Lamellipodien bzw. Filopodien bildet. Da F-Aktin eines der für die Morphologie der Zelle verantwortlichen Proteine ist, wurde seine Kolokalisation mit CLIC1 analysiert, um zuerst eine CLIC1-Membranrekrutierung bei Adhäsion der Zelle nachzuweisen. Auch hier dienten als Gesamtheit weiterhin alle Zellen. Der Anteil der HUVEC, in denen es zur CLIC1-F-Aktin-Kolokalisation kam, sank im zeitlichen Verlauf kontinuierlich ab (*Abbildung 13*). Nach zehn Minuten war sie in 70 % der Zellen zu beobachten (*Abbildung 14*). Nach dreißig Minuten wurde sie in 47 % der HUVEC beobachtet. Eine Stunde nach dem Aussäen war sie auf

12 % abgefallen. Nach vier Stunden kam es ebenfalls in 12 % der Zellen zu einer Kolokalisation. Durch diese Versuchsreihe konnte gezeigt werden, dass sich CLIC1 zu frühen Zeitpunkten der Adhäsion in der Membran von Lamellipodien anreichert und es zu einer Kolokalisation mit F-Aktin kommt. In den später entstehenden Stressfasern ist eine Kolokalisation nicht erkennbar (Abbildung 15).

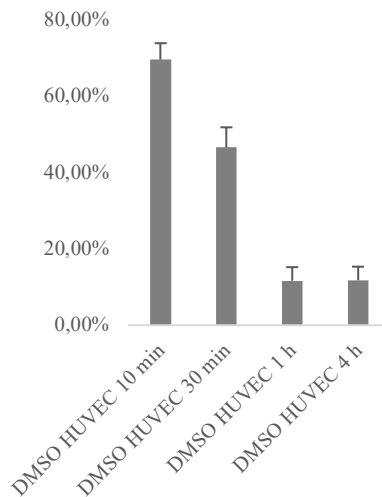


Abbildung 13: CLIC1-F-Aktin-Kolokalisation in HUVEC

CLIC1-F-Aktin-Kolokalisation in den HUVEC nach 10-, 30-minütiger, 1- und 4-stündiger Adhäsionszeit im zeitlichen Verlauf
Im zeitlichen Verlauf zeigte sich zu Beginn der Adhäsion ein hoher Anteil an HUVEC, in denen es zu einer Kolokalisation zwischen CLIC1 und F-Aktin kommt. Es wurde daher angenommen, dass sich CLIC1 in den Lamellipodien anreichert.

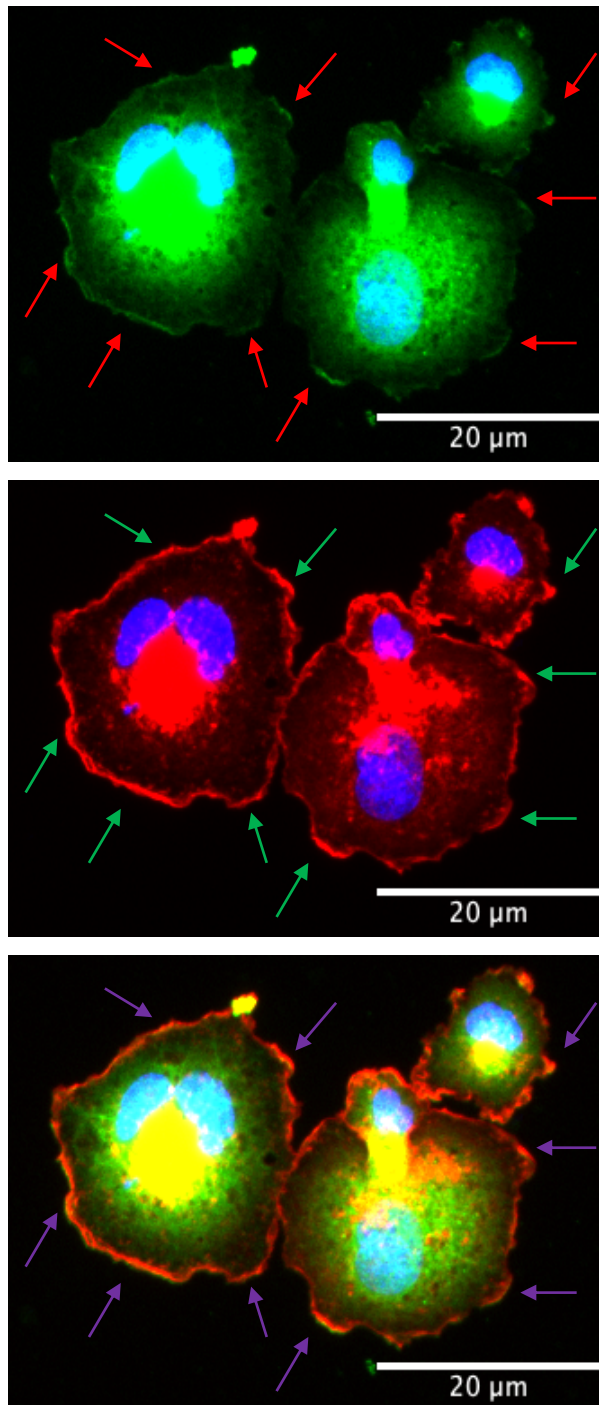


Abbildung 14: CLIC1-Membranexpression und CLIC1-F-Aktin-Kolokalisation in HUVEC nach zehnmütiger Adhäsionszeit

DMSO HUVEC 10 min, Vergrößerung 20× (DAPI, CLIC1, F-Aktin): CLIC1-Membranexpression und CLIC1-F-Aktin-Kolokalisation (oben CLIC1, in der Mitte F-Aktin, unten Merge)

Die Zellen weisen nach 10-minütiger Adhäsion mehrheitlich eine Kolokalisation von CLIC1 und F-Aktin auf (rote Pfeile für CLIC1-Membranexpression, gelbe Pfeile für F-Aktin und lila Pfeile für Kolokalisation). Dadurch konnte gezeigt werden, dass sich CLIC1 in Lamellipodien anreichert.

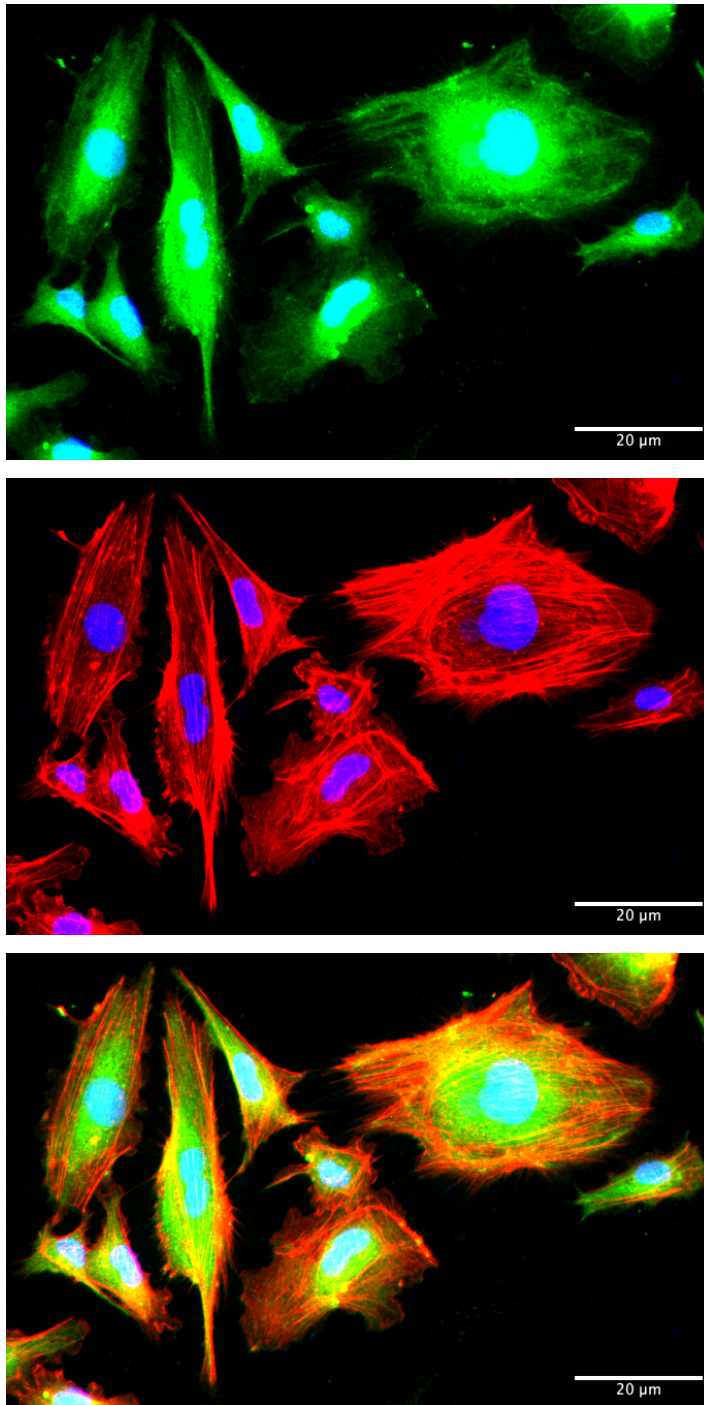


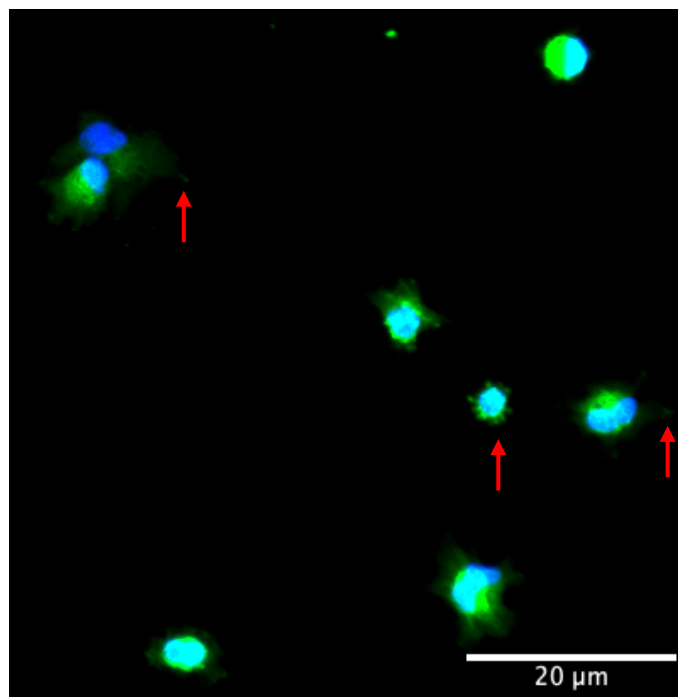
Abbildung 15: CLIC1- und F-Aktinverteilung in den HUVEC nach vierstündiger Adhäsionszeit

DMSO HUVEC 4 h, Vergrößerung 20× (DAPI, CLIC1, F-Aktin): CLIC1-Membranexpression und CLIC1-F-Aktin-Kolokalisation (oben CLIC1, in der Mitte F-Aktin, unten Merge)

Während es zu den frühen Zeitpunkten der Adhäsion noch zu einer Kolokalisation von CLIC1 und F-Aktin in den HUVEC kam, entspricht die CLIC1-Verteilung nach 4-stündiger Adhäsionszeit nicht mehr der Verteilung von F-Aktin.

4.3 Der Effekt von IAA-94 auf die Rekrutierung von CLIC1 in die Zellmembran

Die Zellen wurden mit dem synthetischen CLIC-Inhibitor IAA-94, der CLIC1 und CLIC4 inhibiert, behandelt. In den Zellen der Kontrolle wurde CLIC1 nach zehn Minuten in der Membran der meisten Zellen nachgewiesen. Die Analyse der Zellmorphologie unter siCLIC1 und siCLIC4 hatte gezeigt, dass CLIC1 die Endothelzelladhäsion vor allem zu Beginn beeinflusst, während CLIC4 eher einen Einfluss zu späteren Zeitpunkten hat. Bei der Adhäsion der Zelle auf der EZM kommt es zu einer Bindung der zellulären Integrine an Kollagen. Hierbei scheint CLIC1 mit den Integrinen zu interagieren. Es wurde gezeigt, dass es im zeitlichen Verlauf zu weniger Kolokalisation von CLIC1 mit F-Aktin kommt. Um nachzuweisen, dass IAA-94 die CLIC1-Membranrekrutierung vermindert, wurde eine weitere Versuchsreihe durchgeführt, in der der Anteil der Zellen bestimmt wurde, die CLIC1 in ihrer Membran exprimierten. Unter den Zellen von IAA-94 kam es nach zehn Minuten zu weniger CLIC1-F-Aktin-Kolokalisation. Wie in der Kontrolle fiel der Anteil der CLIC1-positiven Zellen unter den mit IAA-94 behandelten HUVEC kontinuierlich über die Zeit ab (*Abbildung 16*).



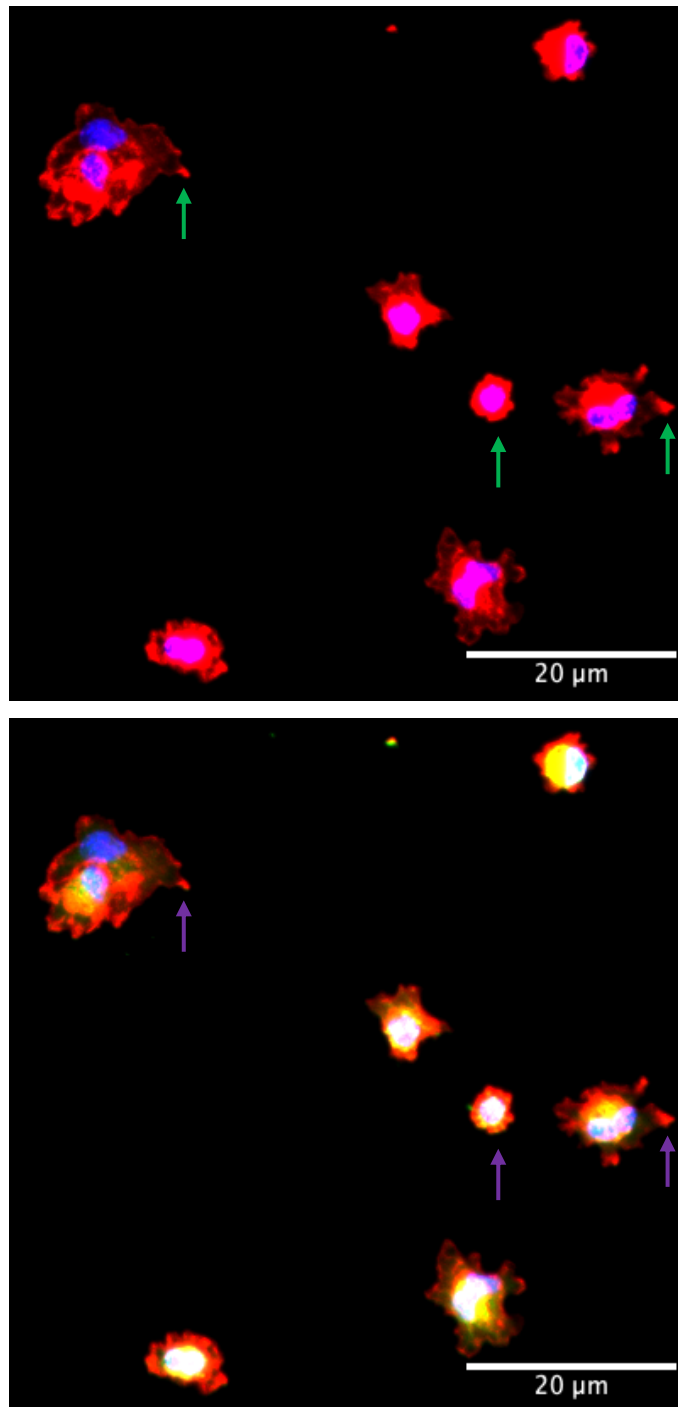


Abbildung 16: CLIC1-Membranexpression, CLIC1-F-Aktin-Kolokalisation in HUVEC, die mit IAA-94 behandelt wurden, nach zehnmütiger Adhäsionszeit
 IAA-94 HUVEC 10 min, Vergrößerung 40× (DAPI, CLIC1, F-Aktin): CLIC1-Membranexpression (oben), F-Aktin (Mitte) und CLIC1-F-Aktin-Kolokalisation (Merge, unten)

Nach Behandlung der HUVEC mit IAA-94 nach 10-minütiger Adhäsionszeit kommt es in weniger Zellen zur CLIC1-F-Aktin-Kolokalisation, weniger Zellen weisen eine CLIC1-Membranexpression auf (rote Pfeile für CLIC1-Membranexpression, grüne Pfeile für F-Aktin, lila Pfeile für CLIC1-F-Aktin-Kolokalisation, vgl. *Abbildung 14*).

Im Vergleich zu den Zellen der Kontrolle wurde zehn Minuten nach dem Aussäen eine CLIC1-Membranexpression in 52 % der IAA-94-Zellen gegenüber 70 % der DMSO-behandelten Kontrollzellen beobachtet. Nach dreißig Minuten lag der Anteil der CLIC1-membranpositiven IAA-94-Zellen nur noch bei 33 % im Vergleich zu 56 % bei den Kontrollzellen. Dieser signifikante Unterschied lässt sich eine und vier Stunden nach Beginn der Adhäsion nicht mehr beobachten. Zu diesem Zeitpunkt lag der Anteil der HUVEC, die CLIC1 in der Membran exprimierten nach IAA-94-Behandlung und bei den Kontrollzellen bei 18-22 % (*Abbildung 17*).

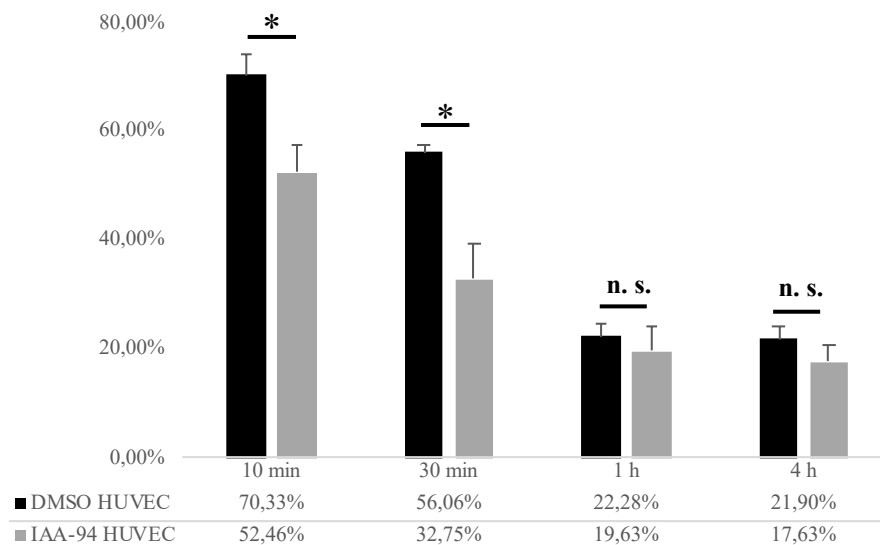


Abbildung 17: CLIC1-Membranexpression in HUVEC nach zehn-, dreißigminütiger, ein- und vierstündiger Adhäsionszeit

Vergleich der Kontrolle mit HUVEC, die mit IAA-94 behandelt wurden
 * $\triangleq p < 0,05$, ** $\triangleq p < 0,01$, *** $\triangleq p < 0,0001$, n. s. \triangleq nicht signifikant

Durch die Behandlung der HUVEC mit IAA-94 ist die CLIC1-Membranexpression im Vergleich zur Kontrolle nach 10- und 30-minütiger Adhäsionszeit signifikant verringert. Nach ein- und vierstündiger Adhäsionszeit ist CLIC1 in weniger Zellen nachweisbar, die Kontrolle unterscheidet sich nicht mehr signifikant von den mit IAA-94 behandelten Zellen.

Entsprechend wurde untersucht, wie sich die F-Aktinbildung in Zellen, die mit IAA-94 behandelt wurden, entwickelte. Von den Kontrollzellen bildeten nach 10 min 79 % Lamellipodien gegenüber 48 % der mit IAA-94 behandelten Zellen. Nach dreißig Minuten waren es bei der Kontrolle noch 23 % und bei IAA-94 18 %. Nach einer und vier Stunden blieb der Anteil der lamellipodienpositiven Zellen bei beiden auf einem niedrigen Niveau konstant (*Abbildung 18*). Es wurde deutlich, dass CLIC1 vor allem zu frühen Zeitpunkten die Adhäsion der HUVEC beeinflusst, ähnlich wie es bereits bei den Knock-down-Versuchen gezeigt wurde. Durch den Nachweis der Kolokalisation mit F-Aktin und die Beeinflussung der F-Aktinbildung in Lamellipodien konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass CLIC1 für die Funktion der Zelle relevant ist. Um zu überprüfen, warum zunächst eine Kolokalisation zwischen CLIC1 und F-

Aktin nachweisbar ist, die in den Stressfasern nicht mehr zu erkennen ist, sind weitere Experimente nötig.

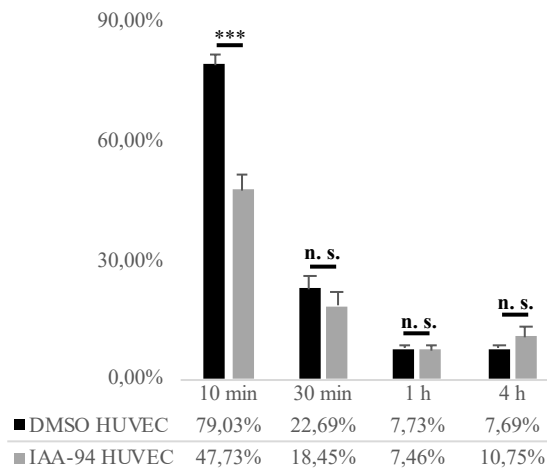


Abbildung 18: F-Aktin in Lamellipodien in HUVEC in zehn-, dreißigminütiger, ein- und vierstündiger Adhäsionszeit

Die Bildung von F-Aktin in Lamellipodien in HUVEC nimmt im zeitlichen Verlauf ab.

* $\triangleq p < 0,05$, ** $\triangleq p < 0,01$, *** $\triangleq p < 0,0001$, n. s. \triangleq nicht signifikant

Durch die verringerte Bildung von F-Aktin in Lamellipodien nach Behandlung von HUVEC mit IAA-94 konnte gezeigt werden, dass CLIC1 für die Funktion der Zelle relevant ist.

4.4 Der Einfluss des Knock-downs der Integrine β_1 und β_3 auf die CLIC1-Membranexpression

Die Integrine bestimmen die Aktindynamik der Zelle (28). Um ihren Einfluss auf die CLIC1-Membranexpression zu untersuchen, wurden Integrin β_1 und β_3 mit siRNA ausgeknockt (siITGNB1 und siITGNB3) und die HUVEC nach zehnminütiger Adhäsionszeit analysiert. Es wurde beobachtet, dass 57 % der Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen CLIC1 in der Membran exprimierten. Unter siITGNB1 war die Anzahl der Zellen mit CLIC1-Membranexpression mit 54 % vergleichbar zu den kontrolltransfizierten Zellen, während siITGNB3 mit 36 % zu einer deutlichen und signifikanten Reduktion der CLIC1-positiven Zellen führte (Abbildung 19).

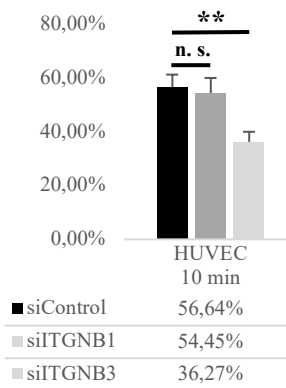


Abbildung 19: CLIC1-Membranexpression in HUVEC mit Knock-down von Integrin β_1 oder β_3

Vergleich von HUVEC nach 10-, 30-minütiger, 1- und 4-stündiger Adhäsionszeit
 $*$ $\triangleq p < 0,05$, $**$ $\triangleq p < 0,01$, $***$ $\triangleq p < 0,0001$, n. s. \triangleq nicht signifikant

Im Vergleich zur Kontrolle ist die CLIC1-Membranexpression nach Knock-down von Integrin β_3 signifikant verringert. Beim Knock-down von Integrin β_1 unterscheidet sie sich nicht signifikant von der Kontrolle.

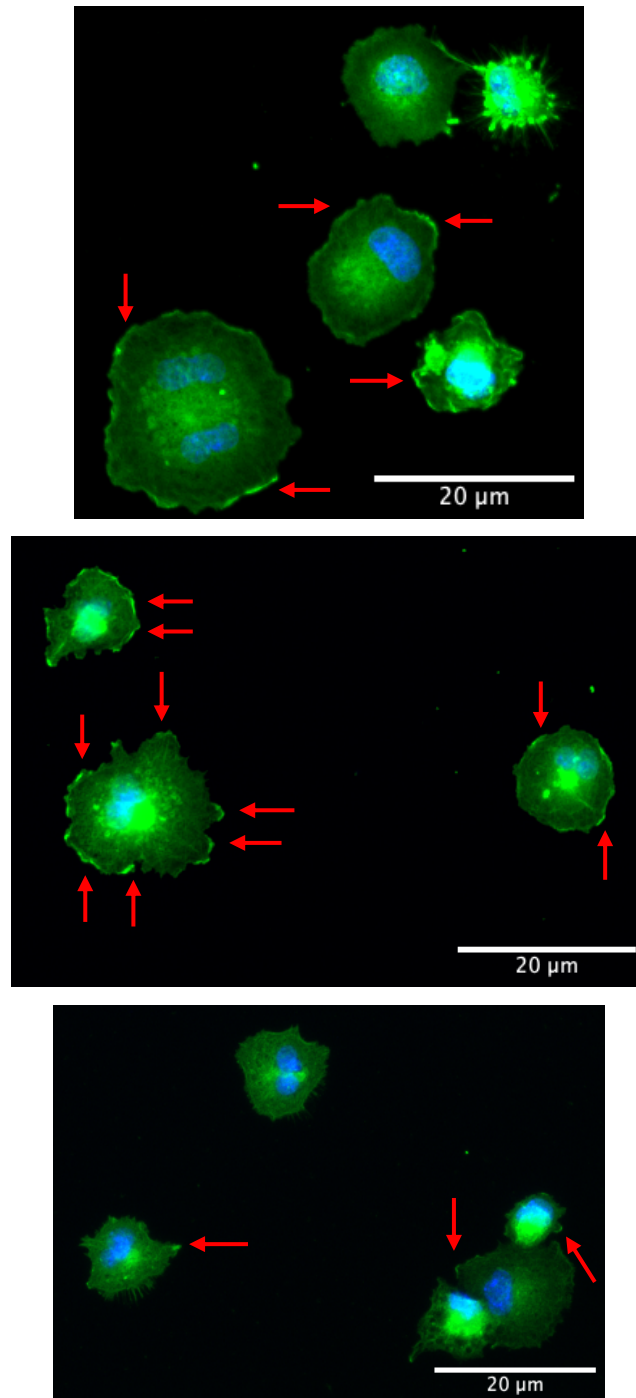


Abbildung 20: CLIC1-Membranexpression in HUVEC mit Knock-down von Integrin β_1 oder β_3

CLIC1-Membranexpression in siControl (oben), siITGNB1 (Mitte) und siITGNB3 HUVEC (unten) 10 min, Vergrößerung 20 \times (DAPI, CLIC1) Während die Zellen der Kontrolle und siITGNB1 nach zehnmütiger Adhäsion eine deutliche CLIC1-Membranexpression (rote Pfeile) aufweisen, ist diese bei siITGNB3 in signifikant weniger Zellen zu beobachten.

Um den Einfluss des Knock-downs von Integrin β_1 und β_3 auf die Adhäsion näher zu untersuchen, wurde als nächstes analysiert, in welchem Anteil der Zellen F-Aktin in Lamellipodien

nachweisbar war. In der Kontrolle kam es in 55 % der HUVEC zur Bildung von F-Aktin in Lamellipodien. Unter siITGNB1 kam es dazu in 60 % der Zellen. Von den siITGNB3-transfizierten Zellen bildeten hingegen 43 % F-Aktin in Lamellipodien (*Abbildung 21*). Integrin β_3 ist für die Endothelzelladhäsion funktionell relevant, da es die CLIC1-Membranexpression und die Zellmorphologie beeinflusst. Der Knock-down von Integrin β_1 hingegen führte nicht zu einem signifikanten Unterschied bei der Bildung von F-Aktin in Lamellipodien. Auch die CLIC1-Membranexpression war hier zuvor nicht signifikant vermindert.

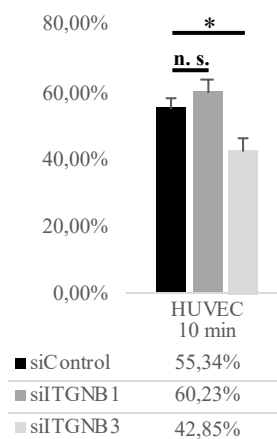


Abbildung 21: F-Aktin in Lamellipodien

Vergleich von HUVEC, die mit siControl, siITGNB1 oder siITGNB3 behandelt wurden, nach 10-minütiger Adhäsionszeit

* \triangleq $p < 0,05$, ** \triangleq $p < 0,01$, *** \triangleq $p < 0,0001$, n. s. \triangleq nicht signifikant

Der Knock-down von Integrin β_3 führte zu signifikant weniger F-Aktin in Lamellipodien. Auch hier lässt sich bestätigen, dass CLIC1 einen funktionellen Einfluss auf die Zelladhäsion hat. Diese Beobachtungen glichen sich mit denen aus dem Knock-down von CLIC1 und CLIC4.

5 Diskussion

5.1 Der Einfluss von CLIC1 auf das Zellspreading und die Endothelzelladhäsion

Bei der Endothelzelladhäsion und im ersten Schritt der Migration (14) bilden die Zellen Lamellipodien und Filopodien als protrusive Elemente (95). Während der Zellmigration werden ständig Adhäsionen gebildet und abgebaut, Migration und Adhäsion sind miteinander verbunden (95). Die Migration wird durch extrazelluläre Einflüsse wie Wachstumsfaktoren, Chemokine, mechanische Kräfte oder Proteine der EZM beeinflusst (95). Das Zellspreading in Form von Lamellipodien erlaubt es den Zellen, in ihrer Umgebung geeignete Orte für die Bildung von Fokaladhäsionen zu finden (41; 42). Später entstehen in Fokaladhäsionen aus dem F-Aktin Stressfasern (94; 96). Der genaue zeitliche Ablauf des Zellsreadings, in dem je nach Alter der Adhäsion deren Proteinzusammensetzung unterschiedlich ist, ist für die Adhäsion der Endothelzellen von Bedeutung (136). Können Lamellipodien und Filopodien nicht vollständig ausgebildet werden, werden sie in den Zellkörper zurückgezogen. Dies führt zur Bildung sogenannter Membrane- Ruffles (27). Die Veränderung der Zellmorphologie nach Bindung der Zelle an die EZM beruht auf dem Zusammenspiel von Wachstumsfaktorrezeptoren, Cadherinen, Integrinen und intrazellulären Signalkaskaden, die nach Interaktion mit der EZM zu spezifischen Veränderungen des Zytoskeletts führen (15). Die Rho-GTPasen sind am Aufbau des Aktinzytoskeletts beteiligt (65). Wird z. B. die Rho-GTPase *cdc42* ausgeknockt, kommt es zu verminderter Filopodienbildung, nach Ausknocken der Rho-GTPase *Rac* zu verminderter Lamellipodienbildung und nach Ausknocken von *RhoA* zu einer Störung der Stressfaserbildung (48; 109). Frühere Experimente mit Knock-down von *CLIC1* in Endothelzellen hatten zu weniger Kapillaraussprossung während der Angiogenese geführt (123). In den Experimenten deutete die verringerte Bildung von Lamellipodien und Filopodien und der gleichzeitig erhöhte Anteil nicht-gespreadeter Zellen bei *CLIC1*-Knock-down nach einer Stunde auf eine gestörte F-Aktinexpansion hin. Dahingegen war die Bildung von F-Aktinstressfasern nicht vermindert und funktionierte gut ohne *CLIC1*. Durch die Ergebnisse des Doppel-Knock-downs konnte bestätigt werden, dass *CLIC4* während der frühen Phase scheinbar keinen zusätzlichen Effekt zu *CLIC1* hatte. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass *CLIC1* die Funktion hat, die HUVEC-Adhäsion durch die Bildung von Lamellipodien und Filopodien zu fördern. Es ist hauptsächlich in den früheren Phasen aktiv. F-Aktinstressfasern sind neben anderen Zelltypen wie z. B. Fibroblasten in Endothelzellen zu finden. Sie entstehen durch die Zusammenlagerung von ungefähr 10 bis 30 Aktinfilamenten (121), die mit Myosin-II-Bündeln und α -Aktinin assoziiert sind (72; 82). In ihrem Aufbau und ihrer Rolle sind sie den Aktinfilamenten im Sarkomer von

Muskelzellen ähnlich. Stressfasern sind ein Zeichen reifer Adhäsionen (94). Sie wurden nicht nur in migrierenden (68), sondern auch in ruhenden Zellen nachgewiesen (25).

5.2 CLIC1 und CLIC4 – Einfluss auf unterschiedliche Phasen der Adhäsion

Das Protein CLIC4 wurde bei der Angiogenese u. a. in den Membranen der Vakuolen der Endothelzellen nachgewiesen, die miteinander fusionieren und das Gefäßlumen bilden. Durch den Knock-down von CLIC4 wird die Angiogenese gestört (126) und dadurch das Wachstum von Tumoren verhindert, wodurch es als neuer Therapieansatz gesehen wurde (117). Verringerte Expression von CLIC4 in Endothelzellen führte außerdem zu weniger Zellproliferation, kapillärer Netzbildung und Aussprossung sowie Lumenbildung (122). In HeLa- und MDA-MB-231-Zellen führte der Knock-down zu verminderter Adhäsion und vermindertem Zellspreading (4). Im Rahmen der Zelladhäsion ist bereits bekannt, dass CLIC4 durch die Aktivierung von RhoA in die Zellmembran eingebaut wird (6). Außerdem kolokalisiert CLIC4 im Rahmen der Zelladhäsion mit Integrin β_1 (4). Da CLIC4 vielfältige Aufgaben in Zellen hat, wurde untersucht, ob es ähnlich wie CLIC1 die Endothelzelladhäsion beeinflusst. Nach vierstündiger Adhäsionszeit wurde beobachtet, dass die Zellen von siCLIC4 so wie nach einstündiger Adhäsionszeit diejenigen von siCLIC1 häufiger nicht-gespreadet und seltener lamellipodien-/filopodienpositiv waren. Der Vergleich der Ergebnisse des CLIC1- und des CLIC4-Knock-downs zu beiden Zeitpunkten deutete auf einen CLIC1/CLIC4-Switch in den Zellen hin. CLIC4 hat zu Beginn der Adhäsion keinen nennenswerten Einfluss. Auch in früheren Experimenten konnte gezeigt werden, dass CLIC1 in neue, nicht jedoch in reife adhäsionsvermittelte Signalprozesse involviert war (100). Zu untersuchen wäre zukünftig, ob CLIC4 zu späteren Zeitpunkten mit F-Aktin in Stressfasern kolokalisiert. Es wurde geschlussfolgert, dass CLIC1 die Endothelzelladhäsion zu frühen Zeitpunkten beeinflusst, während CLIC4 diese Rolle erst später übernimmt.

5.3 Die Bedeutung der CLIC1-Membranexpression für die Endothelzelladhäsion

Da die Bildung von Lamellipodien und Filopodien elementar für die Zelladhäsion ist, sollte die Rolle von CLIC1 bei ihrem Aufbau untersucht werden. Unter siCLIC1 hatten weniger Zellen gespreadet. Um den Mechanismus, durch den CLIC1 die Lamellipodien- und Filopodienbildung fördert, zu verstehen, wurde seine Expression analysiert. Es wurde in einem großen Anteil der

Zellen kurz nach Beginn der Adhäsion eine CLIC1-Membranexpression gesehen. Im zeitlichen Verlauf fällt er ab und bleibt auf einem niedrigeren Niveau konstant. Durch die Behandlung mit IAA-94 zeigte sich weniger CLIC1-Membranexpression. Die CLIC1-Membranrekrutierung scheint adhäsionsabhängig zu erfolgen. Die Arbeitsgruppe hat in vorangegangenen Studien gezeigt, dass adhäsive Interaktionen von Zellen mit der EZM zur Rekrutierung von CLIC1 aus dem Zytoplasma in die Zellmembran führen (51; 67). Auch beim hepatozellulären Karzinom wurde in früheren Experimenten die CLIC1-Membranexpression untersucht. CLIC1 wurde in Membranprotrusionen nachgewiesen und schien die durch entstehende Adhäsionen ablaufenden Signalprozesse zu beeinflussen (100). Außerdem wurde festgestellt, dass Sphingosin-1-Phosphat zu CLIC1-Membranrekrutierung und über Rac1 und Rho zu Signalprozessen führt, die die Zellmigration und Stressfaserbildung fördern (81). CLIC1 enthält eine Transmembranregion (47). Die Membranform entsteht durch die Oxidation von Cystein an Position 24 und 59, wodurch ein Dimer gebildet wird (75). Zu anderen Zellen, in denen eine Membranexpression von CLIC1 nachgewiesen wurde, gehören Kolonkarzinomzellen (130). Die Behandlung mit IAA-94 führte hier zu weniger Migration und Invasion. Auch zur Untersuchung von Prozessen wie der Atherosklerose wurden Experimente mit einem CLIC1-Knock-down und mit IAA-94 behandelten Zellen durchgeführt. Diese führten zu dem Ergebnis, dass eine Überexpression von CLIC1 mit einer beschleunigten Atherosklerose assoziiert ist (132). Nicht nur in Blutgefäßen und damit indirekt beim Tumorwachstum, sondern auch in Tumorzellen selbst ist CLIC1 von Bedeutung. Versuche mit einem Knock-down von CLIC1 wurden bei der Untersuchung von Pankreaskarzinomzellen durchgeführt. Die Zellproliferation konnte dadurch reduziert werden (78). Auch eine Überexpression von CLIC1 in Magenkarzinomzellen (20), die als prognostischer Marker dienen kann, ist mit schlechterem Überleben assoziiert. Das gleiche wurde für Glioblastomzellen gezeigt. Daher wurde CLIC1 als therapeutischer Angriffspunkt vorgeschlagen (111). Das Vorkommen von CLIC1 in Zellen verschiedener Organe zeigt einerseits die Herausforderungen, andererseits auch die vielfältigen Möglichkeiten in der Therapie von Krankheiten. Da in den Experimenten dieser Arbeit der Knock-down von CLIC1 zu weniger Zellspreading geführt hatte, sollte herausgefunden werden, ob es ein Zusammenspiel von CLIC1 mit F-Aktin gab, das für die Zellmorphologie maßgeblich ist.

5.4 Das Zusammenspiel von CLIC1 und F-Aktin während der Endothelzelladhäsion

Für die aktinbasierten zytoskelettalen Strukturen ist F-Aktin die grundlegende Einheit (104). Die Zellmorphologie ändert sich durch die Reorganisation des Aktinzytoskeletts (115). F-Aktin ist eine hochdynamische Struktur und unterliegt ständiger Polymerisation und Depolymerisation

(104). Die Frage war, ob CLIC1 die Lokalisation von F-Aktin beeinflusst und ob es ein Zusammenspiel von CLIC1 und F-Aktin während der Endothelzelladhäsion gibt. Daher wurden die Zellen auf eine Kolokalisation untersucht. Auch andere CLIC-Proteine wurden bereits hinsichtlich des Zusammenspiels mit Aktin untersucht. CLIC5A fördert den Zusammenbau eines F-Aktin enthaltenden Komplexes und wurde ursprünglich als zytoskelettassoziiertes Protein entdeckt (11). In anderen Versuchen mit verschiedenen Zelltypen wurde die Kolokalisation von CLIC4 und CLIC5 mit F-Aktin nachgewiesen (10). Auch andere Proteine haben einen Einfluss auf Lokalisation und Funktion des F-Aktins. An der Verbindung zwischen F-Aktin und der Zellmembran bspw. ist phosphoryliertes Filamin beteiligt, indem es dieses mit Membranglykoproteinen verbindet und so den kortikalen F-Aktinring stabilisiert (115). Eine weitere Gruppe sind die aktinbindenden Proteine wie z. B. ADF, Cofilin (135), Thymosin β 4, DNase I oder CapZ (28). In den Studien dieser Arbeit wurde zu Beginn der HUVEC-Adhäsion eine deutliche CLIC1-F-Aktin-Kolokalisation in der Zellmembran beobachtet, die über die Zeit abnahm. Zu späteren Zeitpunkten, zu denen die Endothelzelladhäsion weniger dynamisch ist, entstanden in den HUVEC Stressfasern, in denen die beiden nicht mehr kolokalisierten. Es blieb unklar, ob die direkte Interaktion zwischen CLIC1 und F-Aktin von Bedeutung war. Die Rolle von CLIC1 bei Prozessen wie der Endothelzelladhäsion muss in einem weiter gefassten Umfeld beurteilt werden. Beim hepatozellulären Karzinom wird CLIC1 hochreguliert und ist so u. a. verbunden mit einer erhöhten Tumordinvasion, die bei ausgeknocktem CLIC1 vermindert ist. CLIC1 rekrutierte hier PIP5K1A und PIP5K1C in die Zellmembran, was zur Entstehung integrinvermittelter Zell-Matrix-Adhäsionen führte (100). Es wurde geschlussfolgert, dass der Einfluss von CLIC1 auf die Dynamik von F-Aktin und damit die Zellmorphologie kontextabhängig ist. Weitere Experimente sind nötig, um zu zeigen, ob CLIC4 auf die Stressfaserbildung Einfluss hat und hier mit F-Aktin kolokalisiert.

5.5 Unterschiede zwischen den Integrinen bei der Endothelzelladhäsion

Die Angiogenese hängt von den Kontakten zwischen Zelle und EZM ab. Diffus auf der Zelloberfläche verteilte Integrine nehmen an der Adhäsion teil (32; 49). Darüber hinaus regulieren sie Prozesse wie die Polarisation von Zellen und ihre Migration (131). Sie binden während der Angiogenese u. a. an das Kollagen Typ I und IV der EZM. Die dadurch in der Endothelzelle ausgelöste Kaskade führt zur Zelladhäsion (32; 95). Die integrinvermittelte Zelladhäsion kann den Zellzyklus beeinflussen (66). Die adhäsiven Eigenschaften der Integrine können durch die Veränderung der Bindung an das Aktinzytoskelett beeinflusst werden (49). Von den zahlreichen an der Angiogenese beteiligten Integrinen ist besonders Integrin β_3 zu erwähnen, das verschiedene Funktionen in Endothelzellen hat (32). Werden Endothelzellen z. B. Wachstumsfaktoren

exponiert, wird die Expression von Integrin β_3 verstärkt (16). Neben ihm wird auch Integrin β_1 hauptsächlich in Endothelzellen exprimiert (32; 137). Der Einfluss eines Knock-downs von CLIC1 auf die Expression der Integrine β_1 und β_3 wurde bereits zuvor untersucht. Hierbei wurden durch den Knock-down von CLIC1 beide Integrine stärker exprimiert. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass CLIC1 die Endothelzellmigration durch die Regulation der Expression der Integrine beeinflusst (123). In dieser Arbeit wurde untersucht, ob sich die Integrine β_1 und β_3 in ihrem Einfluss auf die CLIC1-Membranexpression und damit die Endothelzelladhäsion unterscheiden. Es zeigte sich, dass der Knock-down von Integrin β_3 zu weniger CLIC1 in der Membran geführt hatte als der Knock-down von Integrin β_1 . Dies deutete darauf hin, dass Integrin β_3 stärker mit CLIC1 interagiert als Integrin β_1 . Auch in vorherigen Experimenten hatte sich gezeigt, dass Integrin β_3 einen stärkeren Einfluss auf die Angiogenese hatte als Integrin β_1 (16). Es wurde ebenfalls untersucht, welcher Anteil der Zellen mit Knock-down von Integrin β_3 oder β_1 nach zehnminütiger Adhäsion Lamellipodien bildete. Dieser war in den Zellen mit Knock-down von Integrin β_3 verringert. Die Schlussfolgerung war, dass es ein Zusammenspiel von Integrin β_3 und CLIC1 bei der Lamellipodienbildung gibt. Ergänzend könnten weitere Integrine untersucht und auch hier ähnlich wie bei den Experimenten mit Knock-down von CLIC1 und CLIC4 verschiedene Zeitpunkte der Adhäsion analysiert werden.

5.6 Relevanz der Ergebnisse aus den Experimenten mit CLIC1

Der Knock-down von CLIC1 führte in den Experimenten zu einer verringerten Endothelzelladhäsion. Dieses und andere Ergebnisse dieser Arbeit reihen sich in die Ergebnisse anderer Arbeiten ein, die CLIC1 als Ziel neuer Therapien vorschlagen. Daneben wurde auch CLIC4 analysiert. Die Untersuchungen der CLIC-Proteine sind aufgrund ihrer strukturellen Homogenität noch immer eine Herausforderung (101). Die Inhibition der Angiogenese ist bereits Angriffspunkt für verschiedene Therapien. Zu nennen sind bspw. VEGF in der antiangiogenetischen Therapie des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms (103) und des klarzelligen Nierenzellkarzinoms (35). Zukünftig kann diese Entwicklung auch in die Richtung weiterer Proteine wie beim Ang-Tie-Signalweg gehen (8). Proteine, die wie CLIC1 in den Endothelzellen exprimiert werden und eine Rolle bei deren Adhäsion während der Angiogenese spielen, können ebenso ein zukünftiges Feld darstellen. Die Bedeutung der neuen Angriffspunkte in der antiangiogenetischen Therapie muss gegen das ubiquitäre Vorkommen der Proteine abgewogen werden. Die Mechanismen der Interaktion von CLIC1 mit den Integrienen und der CLIC1-Membranrekrutierung sowie des Zusammenspiels mit dem Zytoskelett müssen näher untersucht werden, damit CLIC1 als Angriffspunkt für Therapien genutzt werden kann. Ähnlich

wie bei CLIC1 muss auch bei den Integrinen für die Verwendung als Angriffspunkte von antiangiogenetischen Therapien die Wirkung gegen das weit verbreitete Vorkommen der Integrine abgewogen werden. Die Analyse der Rolle von CLIC1 bei der Endothelzelladhäsion in dieser Arbeit ist für eine antiangiogenetische Therapie mehr richtungsweisend als konkrete Handlungsmöglichkeit. Dabei muss berücksichtigt werden, dass Tumorblutgefäße sich von normalen Blutgefäßen unterscheiden. Die Wirkung neu entwickelter Medikamente könnte durch die Endothelzellzellen in Tumorblutgefäßen eingeschränkt sein. Endothelzellen in Tumoren haben eine aberrante Morphologie (62), sie bilden nicht immer eine homogene Endothelzellschicht. Die Tumorblutgefäße sind oft auch funktionell abnormal (53). Sie haben während ihrer Bildung weniger Schutzmechanismen und keine funktionierenden Perizyten, die sie umgeben. Außerdem haben Tumorendothelzellen durch die dauerhafte Aktivierung der Angiogenese u. a. mehr Verzweigungen, mehr Capillary-Leak und eine erhöhte Proliferation der Endothelzellen (52; 90). Darüber hinaus kann CLIC1, wie in einer vorherigen Arbeit dargestellt, näher bei seiner Bedeutung für die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies untersucht werden (77). Die Ergebnisse dieser Arbeit können zur Forschung an den Grundlagen der Angiogeneseinhibition beitragen. Weitere Experimente sind jedoch nötig, um CLIC1 als Angriffspunkt für Therapien zu etablieren.

6 Literaturverzeichnis

1. Adair TH, Montani JP (2010) Angiogenesis. In Granger DN, Granger JP (eds), Colloquium Series on Integrated Systems Physiology. Morgan & Claypool Publishers, San Rafael, Kalifornien, USA. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53238/> (27.06.2023)
2. Al-Awqati Q (1995) Chloride channels of intracellular organelles. *Current Opinion in Cell Biology* 7:504–508. doi: 10.1016/0955-0674(95)80006-9
3. Arap D, Pasqualini R, Ruoslahti E (1998) Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science* 279:377-380. doi: 10.1126/science.279.5349.377
4. Argenzio E, Margadant C, Leyton-Puig D, Janssen H, Jalink K, Sonnenberg A, Moolenaar WH (2014) CLIC4 regulates cell adhesion and β 1 integrin trafficking. *Journal of Cell Science* 127:5189–5203. doi: 10.1242/jcs.150623
5. Argenzio E, Moolenaar WH (2016) Emerging biological roles of Cl⁻ intracellular channel proteins. *Journal of Cell Science* 129:4165–4174. doi: 10.1242/jcs.189795
6. Argenzio E, Klarenbeek J, Kedziora KM, Nahidiazar L, Isogai T, Perrakis A, Jalink K, Moolenaar WH, Innocenti M (2018) Profilin binding couples chloride intracellular channel protein CLIC4 to RhoA-mDia2 signaling and filopodium formation. *The Journal of Biological Chemistry* 293:19161–19176. doi: 10.1074/jbc.RA118.002779
7. Ashley RH (2003) Challenging accepted ion channel biology: p64 and the CLIC family of putative intracellular anion channel proteins (Review). *Molecular Membrane Biology* 20:1–11. doi: 10.1080/09687680210042746
8. Augustin HG, Koh GY, Thurston G, Alitalo K (2009) Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 10:165–177. doi: 10.1038/nrm2639
9. Bazzoni G, Estrada OMM, Dejana E (1999) Molecular structure and functional role of vascular tight junctions. *Trends in Cardiovascular Medicine* 9:147-152. doi: 10.1016/S1050-1738(99)00022-5
10. Berryman M, Bretscher A (2000) Identification of a novel member of the chloride intracellular channel gene family (CLIC5) that associates with the actin cytoskeleton of placental microvilli. *Molecular Biology of the Cell* 11:1509–1521. doi: 10.1091/mbc.11.5.1509
11. Berryman M, Bruno J, Price J, Edwards JC (2004) CLIC-5A functions as a chloride channel in vitro and associates with the cortical actin cytoskeleton in vitro and in vivo. *The Journal of Biological Chemistry* 279:34794–34801. doi: 10.1074/jbc.M402835200
12. Blanco R, Gerhardt H (2013) VEGF and Notch in tip and stalk cell selection. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 3:a006569. doi: 10.1101/cshperspect.a006569
13. Bohman S, Matsumoto T, Suh K, Dimberg A, Jakobsson L, Yuspa S, Claesson-Welsh L (2005) Proteomic analysis of vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell differentiation reveals a role for chloride intracellular channel 4 (CLIC4) in tubular morphogenesis. *The Journal of Biological Chemistry* 280:42397–42404. doi: 10.1074/jbc.M506724200

14. Borm B, Requardt RP, Herzog V, Kirfel G (2005) Membrane ruffles in cell migration: indicators of inefficient lamellipodia adhesion and compartments of actin filament reorganization. *Experimental Cell Research* 302:83–95. doi: 10.1016/j.yexcr.2004.08.034
15. Boudreau N, Bissell MJ (1998) Extracellular matrix signaling: integration of form and function in normal and malignant cells. *Current Opinion in Cell Biology* 10:640–646. doi: 10.1016/s0955-0674(98)80040-9
16. Brooks PC, Clark RA, Chersesh DA (1994) Requirement of vascular integrin $\alpha v\beta 3$ for angiogenesis. *Science*, 264:569-571. doi: 10.1126/science.7512751
17. Burrows FJ, Thorpe PE (1994) Vascular targeting — a new approach to the therapy of solid tumors. *Pharmacology & Therapeutics* 64:155-174. doi: 10.1016/0163-7258(94)90037-X
18. Carmeliet P (2000) Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Medicine* 6:389-395. doi: 10.1038/74651
19. Carmeliet P, Rakesh KJ (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407:249-257. doi: 10.1038/35025220
20. Chen CD, Wang CS, Huang YH, Chien KY, Liang Y, Chen WJ, Lin KH (2007) Overexpression of CLIC1 in human gastric carcinoma and its clinicopathological significance. *Proteomics* 7:155–167. doi: 10.1002/pmic.200600663
21. Chen CS, Mrksich M, Huang S, Whitesides GM, Ingber DE (1997) Geometric control of cell life and death. *Science* 276:1425–1428. doi: 10.1126/science.276.5317.1425
22. Chhabra ES, Higgs HN (2007) The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nature Cell Biology* 9:1110–1121. doi: 10.1038/ncb1007-1110
23. Chuang JZ, Milner TA, Zhu M, Sung CH (1999) A 29 kDa intracellular chloride channel p64H1 is associated with large dense-core vesicles in rat hippocampal neurons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 19:2919–2928. doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-08-02919.1999
24. Clark EA, King WG, Brugge JS, Symons M, Hynes RO (1998) Integrin-mediated signals regulated by members of the rho family of GTPases. *The Journal of Cell Biology* 142:573–586. doi: 10.1083/jcb.142.2.573
25. Couchman JR, Rees DA (1979) The behaviour of fibroblasts migrating from chick heart explants: changes in adhesion, locomotion and growth, and in the distribution of actomyosin and fibronectin. *Journal of Cell Science* 39:149–165. doi: 10.1242/jcs.39.1.149
26. Cromer BA, Morton CJ, Board PG, Parker MW (2002) From glutathione transferase to pore in a CLIC. *European Biophysics Journal* 31:356–364. doi: 10.1007/s00249-002-0219-1
27. DeMali KA, Burrridge K (2003) Coupling membrane protrusion and cell adhesion. *Journal of Cell Science* 116:2389–2397. doi: 10.1242/jcs.00605
28. dos Remedios CG, Chhabra D, Kekic M, Dedova IV, Tsubakihara M, Berry DA, Nosworthy NJ (2003) Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiological Reviews* 83:433–473. doi: 10.1152/physrev.00026.2002

29. Dulhunty AF, Hewawasam R, Liu D, Casarotto MG, Board PG (2011) Regulation of the cardiac muscle ryanodine receptor by glutathione transferases. *Drug Metabolism Reviews* 43:236–252. doi: 10.3109/03602532.2010.549134
30. Edwards JC, Tulk B, Schlesinger PH (1998) Functional expression of p64, an intracellular chloride channel protein. *The Journal of Membrane Biology* 163:119–127. doi: 10.1007/s002329900376
31. Edwards JC, Cohen C, Xu W, Schlesinger PH (2006) c-Src control of chloride channel support for osteoclast HCl transport and bone resorption. *The Journal of Biological Chemistry* 281:28011–28022. doi: 10.1074/jbc.M605865200
32. Eliceiri BP, Cheresch DA (1998) The role of alphav integrins during angiogenesis. *Molecular Medicine* 4:741–750. doi: 10.1007/BF03401768
33. Elshabrawy HA, Chen Z, Volin MV, Ravella S, Virupannavar S, Shahrara S (2015) The pathogenic role of angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Angiogenesis* 18:433–448. doi: 10.1007/s10456-015-9477-2
34. Emeis JJ (1995) The control of tPA and PAI-1 secretion from the vessel wall. *Vascular Medicine Review* 6:153-166. doi: 10.1177/1358863X9500600208
35. Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Siebels M, Negrier S, Chevreau C, Solska E, Desai AA, Rolland F, Demkow T, Hutson TE, Gore M, Freeman S, Schwartz B, Shan M, Simantov R, Bukowski RM, TARGET Study Group (2007) Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *The New England Journal of Medicine* 356:125–134. doi: 10.1056/NEJMoa060655
36. Félétou M (2011) The Endothelium, Part I: Multiple functions of the endothelial cells - focus on endothelium-derived vasoactive mediators. In: Granger DN, Granger JP (eds) *Colloquium Series on Integrated Systems Physiology*. Morgan & Claypool Publishers, San Rafael, Kalifornien, USA, pp 1-306
37. Folkman J (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *The New England Journal of Medicine* 285:1182–1186. doi: 10.1056/NEJM197111182852108
38. Folkman J (1995). *Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis.* *The New England Journal of Medicine* 333:1757–1763. doi: 10.1056/NEJM199512283332608
39. Folkman J (1999) Angiogenic zip code. *Nature Biotechnology* 17:749. doi: 10.1038/11676
40. Folkman J (2007) Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery?. *Nature Reviews. Drug Discovery* 6:273–286. doi: 10.1038/nrd2115
41. Galbraith CG, Yamada KM, Galbraith JA (2007) Polymerizing actin fibers position integrins primed to probe for adhesion sites. *Science* 315:992–995. doi: 10.1126/science.1137904
42. Geiger B, Bershadsky A, Pankov R, Yamada KM (2001) Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 2:793–805. doi: 10.1038/35099066
43. Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, Jeltsch M, Mitchell C, Alitalo K, Shima D, Betsholtz C (2003) VEGF guides angiogenic sprouting

- utilizing endothelial tip cell filopodia. *The Journal of Cell Biology* 161:1163–1177. doi: 10.1083/jcb.200302047
44. Goldmann E (1908) The growth of malignant disease in man and the lower animals, with special reference to the vascular system. *Proceedings of the Royal Society of Medicine* 170:1236–1240. doi: 10.1016/S0140-6736(01)65002-5
 45. Gonzalez-Crussi F (1971) Vasculogenesis in the chick embryo. An ultrastructural study. *The American Journal of Anatomy* 130:441–460. doi: 10.1002/aja.1001300406
 46. Goodchild SC, Howell MW, Cordina NM, Littler DR, Breit SN, Curmi PM, Brown LJ (2009) Oxidation promotes insertion of the CLIC1 chloride intracellular channel into the membrane. *European Biophysics Journal* 39:129–138. doi: 10.1007/s00249-009-0450-0
 47. Goodchild SC, Angstmann CN, Breit SN, Curmi PM, Brown LJ (2011) Transmembrane extension and oligomerization of the CLIC1 chloride intracellular channel protein upon membrane interaction. *Biochemistry* 50:10887–10897. doi: 10.1021/bi2012564
 48. Guillou H, Depraz-Depland A, Planus E, Vianay B, Chaussy J, Grichine A, Albigès-Rizo C, Block MR (2008) Lamellipodia nucleation by filopodia depends on integrin occupancy and downstream Rac1 signaling. *Experimental Cell Research* 314:478–488. doi: 10.1016/j.yexcr.2007.10.026
 49. Gumbiner BM (1993) Proteins associated with the cytoplasmic surface of adhesion molecules. *Neuron* 11:551–564. doi: 10.1016/0896-6273(93)90068-3
 50. Gumbiner BM (1996) Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 84:345–357. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81279-9
 51. Gurski LA, Knowles LM, Basse PH, Maranchie JK, Watkins SC, Pilch J (2015) Relocation of CLIC1 promotes tumor cell invasion and colonization of fibrin. *Molecular Cancer Research : MCR* 13:273–280. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-14-0249
 52. Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57–70. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9
 53. Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, McLean JW, Thurston G, Roberge S, Jain RK, McDonald, DM (2000) Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *The American Journal of Pathology* 156:1363–1380. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65006-7
 54. Heasman SJ, Ridley AJ (2008) Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 9:690–701. doi: 10.1038/nrm2476
 55. Hein S, Kostin S, Heling A, Maeno Y, Schaper J (2000) The role of the cytoskeleton in heart failure. *Cardiovascular Research* 45:273–278. doi: 10.1016/s0008-6363(99)00268-0
 56. Hernandez-Fernaund J.R, Ruengeler E, Casazza A, Neilson LJ, Pulleine E, Santi A, Ismail S, Lilla S, Dhayade S, MacPherson IR, McNeish I, Ennis D, Ali H, Kugeratski FG, Al Khamici H, van den Biggelaar M, van den Berghe PV, Cloix C, McDonald L, Millan D, Hoyle A, Kuchnio A, Carmeliet P, Valenzuela SM, Blyth K, Yin H, Mazzone M, Norman JC, Zanivan S (2017) Secreted CLIC3 drives cancer progression through its glutathione-dependent oxidoreductase activity. *Nature Communications* 8:14206. doi: 10.1038/ncomms14206

57. Hogan BLM, Kolodziej PA (2002) Organogenesis: molecular mechanisms of tubulogenesis. *Nature Reviews Genetics* 3:513-523. doi: 10.1038/nrg840
58. Hohmann T, Dehghani F (2019) The Cytoskeleton-A Complex Interacting Meshwork. *Cells* 8:362. doi: 10.3390/cells8040362
59. Huang S, Ingber DE (1999) The structural and mechanical complexity of cell-growth control. *Nature Cell Biology* 1:E131–E138. doi: 10.1038/13043
60. Hynes RO (1987) Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 48:549–554. doi: 10.1016/0092-8674(87)90233-9
61. Jaffe EA (1987) Cell biology of endothelial cells. *Human Pathology* 18:234-239. doi: 10.1016/S0046-8177(87)80005-9
62. Jain RK (2005) Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 307:58–62. doi: 10.1126/science.1104819
63. Jiang L, Phang JM, Yu J, Harrop SJ, Sokolova AV, Duff AP, Wilk KE, Alkhamici H, Breit SN, Valenzuela SM, Brown LJ, Curmi PM (2014) CLIC proteins, ezrin, radixin, moesin and the coupling of membranes to the actin cytoskeleton: a smoking gun?. *Biochimica et Biophysica Acta* 1838:643–657. doi: 10.1016/j.bbamem.2013.05.025
64. Johnson MS, Lu N, Denessiouk K, Heino J, Gullberg D (2009) Integrins during evolution: evolutionary trees and model organisms. *Biochimica et Biophysica Acta* 1788:779–789. doi: 10.1016/j.bbamem.2008.12.013
65. Jones MC, Zha J, Humphries MJ (2019) Connections between the cell cycle, cell adhesion and the cytoskeleton. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 374:20180227. doi: 10.1098/rstb.2018.0227
66. Kamranvar SA, Rani B, Johansson S (2022) Cell Cycle Regulation by Integrin-Mediated Adhesion. *Cells* 11:2521. doi: 10.3390/cells11162521
67. Knowles LM, Malik G, Hood BL, Conrads TP, Pilch J (2012) CLT1 targets angiogenic endothelium through CLIC1 and fibronectin. *Angiogenesis* 15:115–129. doi: 10.1007/s10456-011-9247-8
68. Kreis TE, Birchmeier W (1980) Stress fiber sarcomeres of fibroblasts are contractile. *Cell* 22:555–561. doi: 10.1016/0092-8674(80)90365-7
69. Lamalice L, Le Boeuf F, Huot J (2007) Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circular Research* 100:782-794. doi: 10.1161/01.RES.0000259593.07661.1e
70. Landry DW, Akabas MH, Redhead C, Edelman A, Cragoe EJ, Jr Al-Awqati Q (1989). Purification and reconstitution of chloride channels from kidney and trachea. *Science* 244:1469–1472. doi: 10.1126/science.2472007
71. Lauffenburger DA, Horwitz AF (1996) Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84:359–369. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81280-5
72. Lazarides E, Burridge K (1975) Alpha-actinin: immunofluorescent localization of a muscle structural protein in nonmuscle cells. *Cell* 6:289–298. doi: 10.1016/0092-8674(75)90180-4

73. Lewis WH, Webster LT (1921) WANDERING CELLS, ENDOTHELIAL CELLS, AND FIBROBLASTS IN CULTURES FROM HUMAN LYMPH NODES. *The Journal of Experimental Medicine* 34:397–405. doi: 10.1084/jem.34.4.397
74. Li S, Huang NF, Hsu S (2005) Mechanotransduction in endothelial cell migration. *Journal of Cellular Biochemistry* 96:1110–1126. doi: 10.1002/jcb.20614
75. Littler DR, Harrop SJ, Fairlie WD, Brown LJ, Pankhurst GJ, Pankhurst S, DeMaere MZ, Campbell TJ, Bauskin AR, Tonini R, Mazzanti M, Breit SN, Curmi PM (2004) The intracellular chloride ion channel protein CLIC1 undergoes a redox-controlled structural transition. *The Journal of Biological Chemistry* 279:9298–9305. doi: 10.1074/jbc.M308444200
76. Littler DR, Harrop SJ, Goodchild SC, Phang JM, Mynott AV, Jiang L, Valenzuela SM, Mazzanti M, Brown LJ, Breit SN, Curmi PM (2010). The enigma of the CLIC proteins: Ion channels, redox proteins, enzymes, scaffolding proteins?. *FEBS Letters* 584:2093–2101. doi: 10.1016/j.febslet.2010.01.027
77. Lu D, Le Y, Ding J, Dou X, Mao W, Zhu J (2021) CLIC1 Inhibition Protects Against Cellular Senescence and Endothelial Dysfunction Via the Nrf2/HO-1 Pathway. *Cell Biochemistry and Biophysics* 79:239–252. doi: 10.1007/s12013-020-00959-6
78. Lu J, Dong Q, Zhang B, Wang X, Ye B, Zhang F, Song X, Gao G, Mu J, Wang Z, Ma F, Gu J (2015) Chloride intracellular channel 1 (CLIC1) is activated and functions as an oncogene in pancreatic cancer. *Medical Oncology* 32:616. doi: 10.1007/s12032-015-0616-9
79. Lüllmann-Rauch R, Paulsen R (2012) Taschenlehrbuch Histologie (4., vollständig überarbeitete Auflage). Georg Thieme Verlag, Stuttgart, pp 257-260
80. Mao S, Zhang Q, Li H, Zhang W, Huang Q, Khan M, Lin JM (2018) Adhesion analysis of single circulating tumor cells on a base layer of endothelial cells using open microfluidics. *Chemical Science* 9:7694–7699. doi: 10.1039/c8sc03027h
81. Mao Y, Kleinjan ML, Jilishitz I, Swaminathan B, Obinata H, Komarova YA, Bayless KJ, Hla T, Kitajewski JK (2021) CLIC1 and CLIC4 mediate endothelial S1P receptor signaling to facilitate Rac1 and RhoA activity and function. *Science Signaling* 14:eabc0425. doi: 10.1126/scisignal.abc0425
82. Mattila PK, Lappalainen P (2008) Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 9:446–454. doi: 10.1038/nrm2406
83. McEver RP (1994) Role of selectins in leukocyte adhesion to platelets and endothelium. *Annals of the New York Academy of Sciences* 714:185-189. doi: 10.1111/j.1749-6632.1994.tb12043.x
84. Michiels C (2003) Endothelial cell functions. *Journal of Cellular Physiology* 196:430-443. doi: 10.1002/jcp.10333
85. Miller C (1982) Open-state substructure of single chloride channels from Torpedo electroplax. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 299:401–411. doi: 10.1098/rstb.1982.0140
86. Mizuno D, Tardin C, Schmidt CF, Mackintosh FC (2007) Nonequilibrium mechanics of active cytoskeletal networks. *Science* 315:370–373. doi: 10.1126/science.1134404

87. Mofrad MRK (2009) Rheology of the cytoskeleton. *Annual Review of Fluid Mechanics* 41:433-453. doi: 10.1146/annurev.fluid.010908.165236
88. Money TT, King RG, Wong MH, Stevenson JL, Kalionis B, Erwich JJ, Huisman MA, Timmer A, Hiden U, Desoye G, Gude NM (2007) Expression and cellular localisation of chloride intracellular channel 3 in human placenta and fetal membranes. *Placenta* 28:429–436. doi: 10.1016/j.placenta.2006.08.002
89. Murzin AG (2008) Biochemistry. Metamorphic proteins. *Science* 320:1725–1726. doi: 10.1126/science.1158868
90. Nagy JA, Chang SH, Shih SC, Dvorak AM, Dvorak HF (2010) Heterogeneity of the tumor vasculature. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 36:321–331. doi: 10.1055/s-0030-1253454
91. Narasimhan K (2002) Zip codes: deciphering vascular addresses. *Nature Medicine* 8:116. doi: 10.1038/nm0202-116
92. Nathan C (2002) Points of control in inflammation. *Nature* 420:846–852. doi: 10.1038/nature01320
93. Navarro P, Ruco L, Dejana E (1998) Differential localization of VE- and N-cadherins in human endothelial cells: VE-cadherin competes with N-cadherin for junctional localization. *The Journal of Cell Biology* 140:1475–1484. doi: 10.1083/jcb.140.6.1475
94. Oakes PW, Beckham Y, Stricker J, Gardel ML (2012) Tension is required but not sufficient for focal adhesion maturation without a stress fiber template. *The Journal of Cell Biology* 196:363–374. doi: 10.1083/jcb.201107042
95. Parsons JT, Horwitz AR, Schwartz, MA (2010) Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 11:633–643. doi: 10.1038/nrm2957
96. Partridge MA, Marcantonio EE (2006) Initiation of attachment and generation of mature focal adhesions by integrin-containing filopodia in cell spreading. *Molecular Biology of the Cell* 17:4237–4248. doi: 10.1091/mbc.e06-06-0496
97. Pasqualini R, Koivunen E, Ruoslahti E (1997) α v Integrins as receptors for tumor targeting by circulating ligands. *Nature Biotechnology* 15:542–546, doi: 10.1038/nbt0697-542
98. Patterson CE, Lum H (2001) Update on pulmonary edema: the role and regulation of endothelial barrier function. *Endothelium* 8:75-105. doi: 10.3109/10623320109165319
99. Pegoraro AF, Janmey P, Weitz DA (2017) Mechanical Properties of the Cytoskeleton and Cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 9:a022038. doi: 10.1101/cshperspect.a022038
100. Peng JM, Lin SH, Yu MC, Hsieh SY (2021) CLIC1 recruits PIP5K1A/C to induce cell-matrix adhesions for tumor metastasis. *The Journal of Clinical Investigation* 131:e133525. doi: 10.1172/JCI133525
101. Peretti M, Angelini M, Savalli N, Florio T, Yuspa SH, Mazzanti M (2015) Chloride channels in cancer: Focus on chloride intracellular channel 1 and 4 (CLIC1 AND CLIC4) proteins in tumor development and as novel therapeutic targets. *Biochimica et Biophysica Acta* 1848:2523–2531. doi: 10.1016/j.bbamem.2014.12.012

102. Pierchala BA, Muñoz MR, Tsui CC (2010). Proteomic analysis of the slit diaphragm complex: CLIC5 is a protein critical for podocyte morphology and function. *Kidney International* 78:868–882. doi: 10.1038/ki.2010.212
103. Piperdi B, Merla A, Perez-Soler R (2014) Targeting angiogenesis in squamous non-small cell lung cancer. *Drugs* 74:403–413. doi: 10.1007/s40265-014-0182-z
104. Prasain N, Stevens T (2009) The actin cytoskeleton in endothelial cell phenotypes. *Microvascular Research* 77:53–63. doi: 10.1016/j.mvr.2008.09.012
105. Revenu C, Athman R, Robine S, Louvard D (2004) The co-workers of actin filaments: from cell structures to signals. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 5:635–646. doi: 10.1038/nrm1437
106. Risau W, Flamme I (1995) Vasculogenesis. *Annual Review of Cell and Development Biology* 11:73–91. doi: 10.1146/annurev.cb.11.110195.000445
107. Risau W (1997) Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386:671–674. doi: 10.1038/386671a0
108. Rocha SF, Schiller M, Jing D, Li H, Butz S, Vestweber D, Biljes D, Drexler HC, Nieminen-Kelhä M, Vajkoczy P, Adams S, Benedito R, Adams RH (2014) Esm1 modulates endothelial tip cell behavior and vascular permeability by enhancing VEGF bioavailability. *Circular Research* 115:581–590. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.304718
109. Sadok A, Marshall CJ (2014) Rho GTPases: masters of cell migration. *Small GTPases* 5:e29710. doi: 10.4161/sgtp.29710
110. Schattemann GC, Awad O (2004) Hemangioblasts, angioblasts, and adult endothelial cell progenitors. *The Anatomical Record. Part A, Discoveries in Molecular, Cellular and Evolutionary Biology* 276A:13–21. doi: 10.1002/ar.a.10131
111. Setti M, Savalli N, Osti D, Richichi C, Angelini M, Brescia P, Fornasari L, Carro MS, Mazzanti M, Pelicci G (2013). Functional role of CLIC1 ion channel in glioblastoma-derived stem/progenitor cells. *Journal of the National Cancer Institute* 105:1644–1655. doi: 10.1093/jnci/djt278
112. Singh H, Ashley RH (2006) Redox regulation of CLIC1 by cysteine residues associated with the putative channel pore. *Biophysical Journal* 90:1628–1638. doi: 10.1529/biophysj.105.072678
113. Singh H (2010) Two decades with dimorphic Chloride Intracellular Channels (CLICs). *FEBS Letters* 584:2112–2121. doi: 10.1016/j.febslet.2010.03.013
114. Somanath PR, Malinin NL, Byzova TV (2009) Cooperation between integrin alphavbeta3 and VEGFR2 in angiogenesis. *Angiogenesis* 12:177–185. doi: 10.1007/s10456-009-9141-9
115. Stossel TP, Condeelis J, Cooley L, Hartwig JH, Noegel A, Schleicher M, Shapiro SS (2001) Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 2:138–145. doi: 10.1038/35052082
116. Suh KS, Mutoh M, Nagashima K, Fernandez-Salas E, Edwards LE, Hayes DD, Crutchley JM, Marin KG, Dumont RA, Levy JM, Cheng C, Garfield S, Yuspa SH (2004) The organellar chloride channel protein CLIC4/mtCLIC translocates to the nucleus in

- response to cellular stress and accelerates apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 279:4632–4641. doi: 10.1074/jbc.M311632200
117. Suh KS, Mutoh M, Gerdes M, Yuspa SH (2005) CLIC4, an intracellular chloride channel protein, is a novel molecular target for cancer therapy. *The journal of investigative dermatology. Symposium Proceedings* 10:105–109. doi: 10.1111/j.1087-0024.2005.200402.x
 118. Sumpio BE, Riley JT, Dardik A (2002) Cells in focus: endothelial cell. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 34:1508–1512. doi: 10.1016/S1357-2725(02)00075-4
 119. Tavasoli M, Al-Momany A, Wang X, Li L, Edwards JC, Ballermann BJ (2016) Both CLIC4 and CLIC5A activate ERM proteins in glomerular endothelium. *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 311:F945–F957. doi: 10.1152/ajprenal.00353.2016
 120. Thorpe PE, Ran S (2002) Mapping zip codes in human vasculature. *The Pharmacogenomics Journal* 2:205–206. doi: 10.1038/sj.tpj.6500119
 121. Tojkander S, Gateva G, Lappalainen P (2012) Actin stress fibers--assembly, dynamics and biological roles. *Journal of Cell Science* 125:1855–1864. doi: 10.1242/jcs.098087
 122. Tung JJ, Hobert O, Berryman M, Kitajewski J (2009) Chloride intracellular channel 4 is involved in endothelial proliferation and morphogenesis in vitro. *Angiogenesis* 12:209–220. doi: 10.1007/s10456-009-9139-3
 123. Tung JJ, Kitajewski J (2010) Chloride intracellular channel 1 functions in endothelial cell growth and migration. *Journal of Angiogenesis Research* 2:23. doi: 10.1186/2040-2384-2-23
 124. Ueno Y, Ozaki S, Umakoshi A, Yano H, Choudhury ME, Abe N, Sumida Y, Kuwabara J, Uchida R, Islam A, Ogawa K, Ishimaru K, Yorozuya T, Kunieda T, Watanabe Y, Takada Y, Tanaka J (2019) Chloride intracellular channel protein 2 in cancer and non-cancer human tissues: relationship with tight junctions. *Tissue Barriers* 7:1593775. doi: 10.1080/21688370.2019.1593775
 125. Ulmasov B, Bruno J, Woost PG, Edwards JC (2007) Tissue and subcellular distribution of CLIC1. *BMC Cell Biology* 8:8. doi: 10.1186/1471-2121-8-8
 126. Ulmasov B, Bruno J, Gordon N, Hartnett ME, Edwards JC (2009) Chloride intracellular channel protein-4 functions in angiogenesis by supporting acidification of vacuoles along the intracellular tubulogenic pathway. *The American Journal of Pathology* 174:1084–1096. doi: 10.2353/ajpath.2009.080625
 127. Valenzuela SM, Martin DK, Por SB, Robbins JM, Warton K, Bootcov MR, Schofield PR, Campbell TJ, Breit SN (1997) Molecular cloning and expression of a chloride ion channel of cell nuclei. *The Journal of Biological Chemistry* 272:12575–12582. doi: 10.1074/jbc.272.19.12575
 128. Valenzuela SM, Mazzanti M, Tonini R, Qiu MR, Warton K, Musgrove EA, Campbell TJ, Breit SN (2000). The nuclear chloride ion channel NCC27 is involved in regulation of the cell cycle. *The Journal of Physiology* 529:541–552. doi: 10.1111/j.1469-7793.2000.00541.x

129. Vestweber D (2008) VE-cadherin: the major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 28:223–232. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.158014
130. Wang P, Zhang C, Yu P, Tang B, Liu T, Cui H, Xu J (2012) Regulation of colon cancer cell migration and invasion by CLIC1-mediated RVD. *Molecular and Cellular Biochemistry* 365:313–321. doi: 10.1007/s11010-012-1271-5
131. Winograd-Katz SE, Fässler R, Geiger B, Legate KR (2014) The integrin adhesome: from genes and proteins to human disease. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 15:273–288. doi: 10.1038/nrm3769
132. Xu Y, Zhu J, Hu X, Wang C, Lu D, Gong C, Yang J, Zong L (2016) CLIC1 Inhibition Attenuates Vascular Inflammation, Oxidative Stress, and Endothelial Injury. *PloS One* 11:e0166790. doi: 10.1371/journal.pone.0166790
133. Yan R, Zhan Y, Li Y, Xia L, Guo Y, Zhou Q (2020) Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science* 367:1444–1448. doi: 10.1126/science.abb2762
134. Yao J, Le TC, Kos CH, Henderson JM, Allen PG, Denker BM, Pollak MR (2004). Alpha-actinin-4-mediated FSGS: an inherited kidney disease caused by an aggregated and rapidly degraded cytoskeletal protein. *PLoS Biology* 2:e167. doi: 10.1371/journal.pbio.0020167
135. Yeoh S, Pope B, Mannherz HG, Weeds A (2002) Determining the differences in actin binding by human ADF and cofilin. *Journal of Molecular Biology* 315:911–925. doi: 10.1006/jmbi.2001.5280
136. Zaidel-Bar R, Ballestrem C, Kam Z, Geiger B (2003) Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells. *Journal of Cell Science* 116:4605–4613. doi: 10.1242/jcs.00792
137. Zutter MM, Santoro SA (1990) Widespread histologic distribution of the alpha 2 beta 1 integrin cell-surface collagen receptor. *The American Journal of Pathology* 137:113–120. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1877693/pdf/amjpathol00103-0119.pdf> (29.03.2023)

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Endothelzelle stellt Mediatoren für verschiedene physiologische Prozesse her

Abbildung 2: Entdeckung des vascular zip codes, der für gezielte Therapien verwendet werden kann

Abbildung 3: Vaskulogenese und Angiogenese

Abbildung 4: Bei der Angiogenese wachsen die Blutgefäße durch Aussprossen

Abbildung 5: Tumorangiogenese

Abbildung 6: Beispiele für NS-, LP/FP- und SP-HUVEC

Abbildung 7: Morphologie der HUVEC nach vierständiger Adhäsion

Abbildung 8: Morphologie der HUVEC nach einstündiger Adhäsion

Abbildung 9: Vergleich der Morphologie der HUVEC nach CLIC1- oder CLIC4-Knock-down

Abbildung 10: Morphologie der HUVEC nach Knock-down von CLIC1 und CLIC4

Abbildung 11: Vergleich der Morphologie der HUVEC mit Knock-down von CLIC1 und CLIC4 nach einstündiger Adhäsionszeit

Abbildung 12: Auswertung der Morphologie der HUVEC nach vierständiger Adhäsion

Abbildung 13: CLIC1-F-Aktin-Kolokalisation in HUVEC

Abbildung 14: CLIC1-Membranexpression und CLIC1-F-Aktin-Kolokalisation in HUVEC nach zehnminütiger Adhäsionszeit

Abbildung 15: CLIC1- und F-Aktinverteilung in den HUVEC nach vierständiger Adhäsionszeit

Abbildung 16: CLIC1-Membranexpression, CLIC1-F-Aktin-Kolokalisation in HUVEC, die mit IAA-94 behandelt wurden, nach zehnminütiger Adhäsionszeit

Abbildung 17: CLIC1-Membranexpression in HUVEC nach zehn-, dreißigminütiger, ein- und vierständiger Adhäsionszeit

Abbildung 18: F-Aktin in Lamellipodien in HUVEC in zehn-, dreißigminütiger, ein- und vierständiger Adhäsionszeit

Abbildung 19: Anteile der HUVEC mit CLIC1-Membranexpression mit Knock-down von Integrin β_1 oder β_3

Abbildung 20: CLIC1-Membranexpression in HUVEC mit Knock-down von Integrin β_1 oder β_3

Abbildung 21: F-Aktin in Lamellipodien

8 Abkürzungsverzeichnis

ADF:	actin-depolymerizing factor
bFGF:	basic fibroblast growth factor
BSA:	bovine serum albumin
CFTR:	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CLC:	chloride channel
CLIC1:	chloride intracellular channel 1
COX-2:	Cyclooxygenase-2
DMSO:	Dimethylsulfoxid
EBM-2:	endothelial basal medium 2
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
EGM-2:	endothelial growth medium 2
EZM:	extrazelluläre Matrix
FBS:	fetal bovine serum
GABA:	γ -Aminohydroxybuttersäure
GM-CSF:	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HEPES-BSS:	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethansulfonic acid buffered saline solution
HUVEC:	human umbilical venous endothelial cells
IAA-94:	R(+)-Indanyloxyaceic acid 94
IGF-1:	Insuline-like growth factor 1
mRNA:	messenger ribonucleic acid
NCC27:	nuclear chloride channel-27
NFM:	non-fat milk
NO:	Stickstoffmonoxid
Opti-MEM:	Opti Minimum essential medium without serum
PAI-1:	plasminogen-activator inhibitor 1
PBS:	phosphate-buffered saline
RGD:	Arg-Gly-Asp
SDS:	sodium dodecyl sulfate
siRNA:	small interfering ribonucleic acid
siCLIC1:	chloride intracellular channel 1 small interfering ribonucleic acid
siCLIC4:	chloride intracellular channel 4 small interfering ribonucleic acid

siCLIC1-CLIC4: chloride intracellular channel 1 and 4 small interfering
ribonucleic acid

siControl: control small interfering ribonucleic acid

t-PA: Gewebeplasminogenaktivator

TSP-2: Thrombospondin-2

VEGF(-A): vascular endothelial growth factor (A)

9 Anhang

9.1 Verwendete Geräte

<u>Gerät</u>	<u>Hersteller</u>
Absauganlage	Vacusaft Comfort (INTEGRA Biociences)
Computerprogramme	Adobe Photoshop CS5 Version 12.0 x32 NIS Elements 4.20.00 Build 967
Gefrierschrank	UF755G (Dometic) (-80°C)
Fluoreszenzmikroskop	Nikon ECLIPSE Ni-U
Kühlschrank	MP 355S (Dometic)
Laborabzug	R1500 (Delta System 30)
Phasenkontrastmikroskop	PrimoVert (Carl Zeiss)
Pipetten	Rainin (Classic PR-2; -10; -20; -200; -1000)
Shaker	Polymax 1040 (Heidolph)
Sterilbank	Hera Safe KS (Thermoscientific)
Vortexer	Vortexer lab dancer (VWR)
Waage	Analysewaage (Sartorius)
Wasserbad	TW8 (Julabo)
Zentrifuge	Heraeus Pico™ & Fresco™ 17/21

9.2 Verwendete Zellen und Reagenzien

<u>Zellen und Reagenzien</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Katalognummer</u>
Alexa Fluor™ 488 goat anti-mouse IgG	Thermo Fisher Scientific	A-11017
Alexa Fluor™ 546 Phalloidin	Thermo Fisher Scientific	A22283
Anti-CLIC1 antibody (monoclonal mouse)	Abcam	ab77214
BSA	Thermo Fisher Scientific	11493823
Dapi	Sigma-Aldrich	F6057
EBM™-2 Basal Medium	Lonza	CC-3156
EGM-2™	Lonza	CC-3162
EGM-2™ SingleQuots	Lonza	CC-4176
FBS	Sigma-Aldrich	11550356
HEPES BSS	Lonza	CC-5024
HUVEC	Lonza	C2519A
R(+)-IAA-94	Sigma-Aldrich	I117-10MG-I
Lipofectamine 2000	Thermo Fisher Scientific	1668

Mouse IgG1 Negative Control (monoclonal)	Millipore	MABC002
On-Targetplus CLIC1 smartpool	Thermo Scientific Dharmacon®	L-009530-00
On-Targetplus CLIC4 smartpool	Thermo Scientific Dharmacon®	L-013553-00
On-Targetplus Integrin β_1 smartpool	Thermo Scientific Dharmacon®	L-004506-00
On-Targetplus Integrin β_3 smartpool	Thermo Scientific Dharmacon®	L-004124-00
On-Targetplus non-targeting pool	Thermo Scientific Dharmacon®	D-001810-10-20
Opti-MEM	Thermo Fisher Scientific	31985-062
PBS	Thermo Fisher Scientific	
Triton X-100	Sigma-Aldrich	T9284-100ML
Trypsin-EDTA	Thermo Fisher Scientific	11580626

10 Kongressbeiträge

- Postervortrag mit dem Titel „*CLIC1 supports mechanisms related to thrombosis and vascular repair*” durch PD Dr. Jan Pilch, 61. Jahrestagung der Society of Thrombosis and Hemostasis Research, 2017, Basel
- Postervortrag mit dem Titel „*CLIC1 cooperates with integrins to promote thrombus formation and angiogenesis*” durch PD Dr. Jan Pilch, 60. Jahrestagung der American Society of Hematology, 2018, San Diego, Kalifornien
- Postervortrag mit dem Titel „*Chloride intracellular channel 1 supports mechanisms related to thrombosis and angiogenesis*” durch PD Dr. Jan Pilch, Tagung der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie, 2018, Lübeck

11 Danksagung

Ich danke Herrn Univ.-Prof. Dr. Eichler für die Möglichkeit der Promotion an seinem Institut zu diesem spannenden Thema und das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Besonders danke ich meinen Betreuern PD Dr. Jan Pilch und Dr. phil. Lynn M. Knowles, PhD, für die gute Betreuung und Erreichbarkeit für Fragen zu jedem Zeitpunkt. Sie haben für mich viel Zeit investiert, auch außerhalb des Labors. Das weiß ich zu schätzen.

Ebenfalls möchte ich mich herzlich bei den Mitarbeiterinnen des Labors, den Mitdotorandinnen und Mitdotoranden Daniela Kagiri, Alina Burkhardt und Martin Bernhard für den kollegialen Umgang bedanken, die mich unter Einsatz ihrer Zeit in die Laborarbeit eingeführt haben.

Ich möchte meiner Familie dafür danken, dass sie mich moralisch unterstützt hat und besonders meiner Verlobten Jana, dass sie mich jederzeit ermutigt hat, diese Arbeit fertigzustellen und viel Geduld mit mir hatte.

12 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

Tag der Promotion: 15. April 2024
Dekan: Univ.-Prof. Dr. Michael D. Menger
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Hermann Eichler
Univ.-Prof. Dr. Matthias W. Laschke