

#### 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Beteiligung von Integrinen an der neuronalen Differenzierung von PC12-Zellen untersucht, von besonderer Bedeutung war dabei die Rolle der cytoplasmatischen Domäne der  $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit bei Integrin-vermittelten Prozessen in PC12-Zellen. Deren Funktion wurde mittels Transfektion von cDNA-Konstrukten, die für chimäre Rezeptoren kodieren, die aus der extrazellulären, der transmembranären Domäne des IL2-Rezeptors und der  $\alpha 3$ -cytoplasmatischen Sequenz des  $\alpha 3\beta 1$ -Integrins bestehen, untersucht. Die Transfektion der chimären Proteine in PC12-Zellen ließen schließen, dass das  $\alpha 3\beta 1$ -Integrin nicht an der Zell-Matrix-Wechselwirkung beteiligt ist, jedoch eine wesentliche Rolle bei der Zell-Proliferation und vor allem beim Neuritenwachstum spielt. Weiterhin konnte die Beteiligung der  $\alpha 3$ -cytoplasmatischen Sequenz bei der Reorganisation des Cytoskeletts gezeigt werden, da IL2R- $\alpha 3$ -transfizierte Zellen auf den spezifischen Liganden trotz NGF-Stimulation nicht mehr in der Lage waren zu differenzieren. Darüber hinaus wurde der Einfluss der  $\alpha 3$ -cytoplasmatischen Domäne an der Regulation der kleinen GTPasen Rac1 und RhoA sowie die Modulation der MAP-Kinasen-Aktivität untersucht.

##### 4.1. Expression von Mitgliedern der $\beta 1$ -Integrin-Familie in PC12-Zellen

Als eukaryontisches Zellsystem für die funktionelle Untersuchung der  $\alpha 3$ -cytoplasmatischen Domäne von  $\alpha 3\beta 1$ -Integrin werden PC12-Zellen gewählt. Diese Zellen stammen aus dem Nebennierenmark der Ratte und differenzieren nach NGF-Stimulation zu sympathischen Neuronen [Greene & Tischler, 1976] [Togari & Guroff, 1985]. Sie stellen neben primären Neuronen ein gängiges Zellsystem zur Untersuchung der Integrin-vermittelten Matrix-Wechselwirkung, von Proliferation und Neuritenwachstum dar. Im Westernblot und mittels FACS-Analysen kann unter Verwendung von geeigneten Antisera [Löster et al., 1994] [Löster et al., 1995] die  $\beta 1$ -Integrin-Untereinheit mit einem Molekulargewicht von 130 kDa sowie die  $\alpha 1$ -Integrin-Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 190 kDa in PC12-Zellen und Ratten-Lungen-Fibroblasten- (RLF) Lysaten nachgewiesen werden.

Die Stärke der Banden deutet auf eine hohe Expression des  $\alpha 1\beta 1$ -Integrins in PC12-Zellen hin. Das  $\alpha 1\beta 1$ -Integrin wurde schon in früheren Arbeiten als Laminin/Kollagen-Rezeptor in PC12-Zellen charakterisiert [Tomaselli et al., 1987] [Tomaselli & Reichardt, 1988] [Hall et al., 1990]. Die RLF-Zellen exprimieren auch  $\alpha 1\beta 1$ -Integrin [Voigt et al., 1995] [Caniggia et al., 1996] und werden für weitergehende Experimente als Positivkontrollen eingesetzt.

Als zweites Integrin kann das  $\alpha 3\beta 1$ -Integrin in PC12-Zellen detektiert werden. Auch dieses Integrin konnte schon in früheren Studien in PC12-Zellen als Laminin-Rezeptor identifiziert werden [Tomaselli et al., 1990] [DeFreitas et al., 1995]. Einige Untersuchungen von anderen Arbeitsgruppen belegten, dass das  $\alpha 3\beta 1$ -Integrin schwach an Fibronectin, aber mit höherer Affinität an einige Laminin-Isoformen, Kollagen I und Kollagen IV bindet [Takada et al., 1989] [Takada & Hemler, 1989] [Carter et al., 1990]. Auch RLF-Zellen exprimieren die  $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit [Caniggia et al., 1995]. Hingegen exprimieren die Endothelzellen des Rattenhirns (RBE) weder  $\alpha 3\beta 1$ -, noch  $\alpha 1\beta 1$ -Integrine, und werden somit als Negativkontrollen herangezogen.

Der Fibronectin-Rezeptor  $\alpha v\beta 1$ -Integrin kann in den untersuchten PC12-Zellen nicht nachgewiesen werden. Es ist jedoch beschrieben, dass die Stimulierung von PC12-Zellen mittels  $Mn^{2+}$  die Expression dieses Fibronectin-Rezeptors hervorrufen kann [Lein et al., 2000].

In der indirekten Immunofluoreszenz können die Integrin-Untereinheiten hauptsächlich auf der Zelloberfläche und in den sogenannten Punkt-Kontakten nachgewiesen werden. Es handelt sich hierbei um punktförmige Strukturen entlang der Neuriten von neuronalen Zellen, die den fokalen Adhäsionen anderer Zellen wie Fibroblasten sehr ähnlich sind [Arregui et al., 1994] [Gomez et al., 1996] [Renaudin et al., 1999].

$\alpha 3\beta 1$ -Integrin wird in anderen Zelllinien (Epithelzellen) meistens zusammen mit  $\alpha 6\beta 1$ -Integrin exprimiert. Sie weisen eine ähnliche Ligandenspezifität für Laminin-5 und Laminin-1 auf [Sonnenberg et al., 1988], wobei das  $\alpha 3\beta 1$ -Integrin dort eine regulatorische Funktion einnimmt, während das  $\alpha 6\beta 1$ -Integrin für die stabile Adhäsion in Hemidesmosomen von Epithelzellen zuständig ist [Goldfinger et al., 1999].

Die  $\alpha 3$ - sowie die  $\alpha 6$ -Integrin-Untereinheiten besitzen unter nicht-reduzierenden Bedingungen ein identisches Molekulargewicht, jedoch besteht zwischen den beiden  $\alpha$ -Integrin-Untereinheiten keine ausgeprägte Sequenzhomologie. Die extrazellulären Domänen der  $\alpha 3$ - und  $\alpha 6$ -Integrin-Untereinheiten sind nur zu 23% homolog, während die cytoplasmatischen Domänen eine Homologie von ca. 40% aufweisen.

In der Literatur wird ein PC12-Klon beschrieben, der die  $\alpha 6$ -Integrin-Untereinheit exprimiert [Vogelezang et al., 2001]. Weiterhin wird darauf hingewiesen, dass  $\alpha 6\beta 1$ -Integrine in DRG-Zellen (Dorsal-Root-Ganglion-Cells), die sich ähnlich wie PC12-Zellen verhalten, exprimiert werden.

Basierend auf diesen Daten wird getestet, ob PC12-Zellen die  $\alpha 6$ -Integrin-Untereinheit exprimieren, indem die Spezifität des verwendeten  $\alpha 6$ -Integrin-Antikörpers in weiteren Ratten-Zellen getestet wird. Es werden Zelllysate von FLF-, RBE- NBT-II und ES-Zellen im Westernblot auf  $\alpha 6$ -Integrin getestet und mit PC12-Zelllysaten verglichen.

Das  $\alpha 6$ -Integrin wird in den untersuchten PC12-Zellen nicht exprimiert. Im Vergleich dazu ist die  $\alpha 6$ -Integrin-Untereinheit mit dem eingesetzten Ratten-spezifischen Antikörper in RBE-Zellen nachweisbar [Müller et al., 2004].

Während die mRNA für die  $\alpha 6$ -Integrin-Untereinheit in geringen Mengen in den PC12-Zellen nachweisbar ist, ist das Protein nicht detektierbar. Auch mit Hilfe eines  $\alpha 6$ -Integrin-spezifischen funktionsblockierenden Antikörpers kann man der  $\alpha 6$ -Integrin-Untereinheit keine Funktion zuweisen.

Aus diesen Experimenten kann man schließen, dass die PC12-Zellen kein funktionell relevantes  $\alpha 6\beta 1$ -Integrin exprimieren. Die Spezifität des eingesetzten anti- $\alpha 6$ -Integrins GoH3 ist immer noch in der Literatur umstritten. Dieser Antikörper wurde aus der Ratte gewonnen. Der GoH3 wird als Antikörper beschrieben, der die Bindung der Integrine an das E8-Fragment im Laminin-1 maskiert [Aumailley et al., 1990] und somit die Bindung von  $\alpha 6\beta 1$ -Integrin verhindert [Sonnenberg et al., 1988]. Publiziert ist eine Immunreaktivität mit der  $\alpha 6$ -Integrin-Untereinheit der Maus und des humanen Proteins [Serafini et al., 1991].

Allerdings führt die Gabe von GoH3 in RBE-Zellen zum Verlust der Adhäsionsaktivität auf Laminin-1, während die Zell-Adhäsion auf den übrigen Matrixproteinen unverändert bleibt. Somit zeigen die vorliegenden Daten ebenfalls, dass der GoH3 auch an das Ratten-Protein binden kann. Das konnte bislang nur in einer einzigen weiteren Studie gezeigt werden [Caniggia et al., 1996].

Das Ligandenspektrum, das vom  $\alpha 3\beta 1$ -Integrin erkannt wird, wird nach wie vor kontrovers in der Literatur diskutiert. Deshalb ist ein Ziel dieser Arbeit unter anderem, die Ligandenspezifität des  $\alpha 3\beta 1$ -Integrins in PC12-Zellen zu bestimmen.

Das  $\alpha 3\beta 1$ -Integrin ist ursprünglich als Fibronektin-Rezeptor [Wayner & Carter, 1987] [Tawil et al., 1996] und Kollagen-Rezeptor [Elices et al., 1991] identifiziert worden. Es soll jedoch auch andere Komponente der EZM wie verschiedene Laminin-Isoformen [Gehlsen et al., 1992] [Belkin & Stepp, 2000], Entactin [Dedhar et al., 1992] und Thrombospondin [DeFreitas et al., 1995] binden können. Da das  $\alpha 3\beta 1$ -Integrin hauptsächlich in den Epithelzellen exprimiert wird, wurde es in den letzten Jahren vor allem als Rezeptor für Laminin-5 beschrieben [Carter et al., 1991] [Tsuji et al., 2002]. Die Bindung an die anderen EZM-Komponenten wie Laminin-1 soll mit geringer Affinität erfolgen [Coppolino & Dedhar, 2000] [Teller & Beaulieu, 2001].

Studien, in denen synthetische Laminin-1-Peptide eingesetzt wurden, konnten aber zeigen, dass  $\alpha 3\beta 1$ -Integrin nicht nur mit hoher Affinität an Laminin-1-Peptide binden kann, sondern dass über diese Bindung auch das Neuritenwachstum vermittelt wird [Tashiro et al., 1999].

Die Variabilität bei der Ligandenbindung des  $\alpha 3\beta 1$ -Integrins kann durch die Existenz verschiedener Bindungsdomänen und das Vorliegen verschiedener  $\alpha 3$ -Isoformen erklärt werden [Tamura et al., 1991] [Gout et al., 2001]. Weiterhin wird postuliert, dass die Glykosylierungsvielfalt der extrazellulären Domänen des  $\alpha 3\beta 1$ -Integrins die Ligandenaffinität verändern kann [Nishiuchi et al., 2003].

Ein enzymatische Abspaltung der Sialinsäuren-Seitenketten verändert nicht nur die Bindung, sondern erhöht auch die Affinität von  $\alpha 3\beta 1$ -Integrin an Fibronektin und Kollagen IV [Pochee et al., 2003], die normalerweise keine hochaffinen Liganden des  $\alpha 3\beta 1$ -Integrins darstellen.

Vermutlich ist die Ligandenspezifität des  $\alpha 3\beta 1$ -Integrins auch zellspezifisch, während in Keratinozyten ausschließlich  $\alpha 6\beta 1$ -Integrin an Laminin-1 bindet, nicht aber das  $\alpha 3\beta 1$ -Integrin [Sonnenberg et al., 1991] [Delwel et al., 1994] [Delwel et al., 1995] [Rousselle & Aumailley, 1994], wird das  $\alpha 3\beta 1$ -Integrin in neuronalen Zellen als Laminin-1-Rezeptor beschrieben [Teller & Beaulieu, 2001] [Tashiro et al., 1999].

## **4.2. Untersuchungen zur biologischen Funktion der Integrine in PC12-Zellen**

### **4.2.1 Integrin-vermittelte Zell-Adhäsion**

Zur Untersuchung der Integrin-vermittelten Adhäsion werden funktionsblockierende Integrin-Antikörper eingesetzt. Mit diesem Ansatz soll die Ligandenspezifität der in PC12-Zellen exprimierten Integrine und deren Funktion bei Prozessen wie der Adhäsion und des Matrix-abhängigen Neuritenwachstum charakterisiert werden.

Generell spielen  $\beta 1$ -Integrine eine bedeutende Rolle bei der Regulation der Ligandenaffinität und der Aktivierung von Integrin-vermittelten Signalwegen [Liu et al., 2000]. Solch eine Rolle haben  $\beta 1$ -Integrine in PC12-Zellen [Tomaselli et al., 1990].

Die Blockierung des  $\beta 1$ -Integrins durch einen funktionsblockierenden Antikörper führt zu stark verminderter Adhäsion auf allen getesteten Matrixproteinen. Demzufolge führt der Einsatz des anti- $\beta 1$ -Integrin-Antikörpers Ha2/5 im Differenzierungsassay zur Inhibition der neuronalen Differenzierung, begründet durch den Verlust der Zell-Matrix-Interaktion. Daten aus der Literatur bestätigen diese Ergebnisse [Goldfinger et al., 1998] [Tashiro et al., 1999] [Frank & Carter, 2004] [Kunneken et al., 2004].

Die Hemmung des  $\alpha 1\beta 1$ -Integrins durch einen  $\alpha 1$ -Integrin-Antikörper 33.4 [Löster et al., 1994] inhibiert die Adhäsion auf den als  $\alpha 1\beta 1$ -Integrin-spezifischen Liganden Laminin-1 [Vossmeier et al., 2000] und Kollagen IV, aber nicht auf Laminin-5, da diese Matrix keinen spezifischen Liganden des  $\alpha 1\beta 1$ -Integrins beinhaltet.

Auf Laminin-1 und Kollagen IV wird in PC12-Zellen die Adhäsion über das  $\alpha 1\beta 1$ -Integrin vermittelt, was nicht der Fall in anderen Zell-Systemen ist. In hämatopoetischen K562-Zellen stellt das  $\alpha 1\beta 1$ -Integrin jedoch nur einen Kollagen IV-Rezeptor dar [Wong et al., 1996].

Die Blockierung der  $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit durch den  $\alpha 3$ -Integrin-Antikörper Ralph 3.2 zeigt auf den getesteten Matrixproteinen keinen Einfluss auf die Zell-Matrix-Wechselwirkung. Dies kann auch für andere Zellen beschrieben werden und führt zur Schlussfolgerung, dass das  $\alpha 3\beta 1$ -Integrin nicht an der anfänglichen Anheftung beteiligt ist [Carter et al., 1990] [Nguyen et al., 2000], sondern eher eine Rolle bei der späten Adhäsion spielt. Ferner konnte gezeigt werden, dass in Melanom-Zellen  $\alpha 3\beta 1$ -Integrin nicht an der Zell-Adhäsion auf Laminin-1, Kollagen IV und auf Fibronektin involviert ist. Hingegen ist  $\alpha 3\beta 1$ -Integrin an der Zell-Migration und an der Invasion dieser Zellen stark beteiligt [Melchiori et al., 1995]. In Keratinozyten, die  $\alpha 3\beta 1$ - und  $\alpha 6\beta 1$ -Integrine exprimieren, wird die Zell-Matrix-Adhäsion von  $\alpha 6\beta 1$ -Integrin vermittelt, während das  $\alpha 3\beta 1$ -Integrin an der Modulation von Signalwegen und an der Cytoskelett-Organisation beteiligt ist [Manohar et al., 2004]. Es wird somit als regulatorischer Rezeptor in den fokalen Adhäsionen beschrieben [Gu et al., 2001].

Der  $\alpha 6$ -Integrin-Antikörper GoH3 beeinflusst die Adhäsion auf den  $\alpha 6\beta 1$ -Integrin-spezifischen Liganden Laminin-5 und Laminin-1 nicht. Zusammen mit den Expressionsdaten untermauert das Ergebnis, dass  $\alpha 6\beta 1$ -Integrin nicht in den verwendeten PC12-Zellen exprimiert wird.

Aus diesen Daten entwickelt sich die Schlussfolgerung, dass die Zell-Matrix-Adhäsion in PC12-Zellen auf Laminin-1 und Kollagen IV über das  $\alpha 1\beta 1$ -Integrin vermittelt wird.  $\alpha 3\beta 1$ -Integrin vermittelt keine initiale Anheftung und spielt vermutlich eher eine Rolle bei der späteren Adhäsion, was durch andere Arbeitsgruppen belegt werden konnte [Pochech et al., 2003].

#### 4.2.2 Integrin-vermitteltes Neuritenwachstum

Auf den verschiedenen Matrixproteinen Laminin-1, Laminin-5 und Kollagen IV können PC12-Zellen adhären. Durch zusätzliche Gabe von NGF beginnen die Zellen, auf den oben genannten Matrixproteinen Neuriten zu bilden.

Die Integrine, die an diesem Prozess beteiligt sind, können im Neuriteninhibitionsassay mittels funktionsblockierender Antikörper bestimmt werden.

Die Hemmung der  $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit durch Ralph 3.2 [Hynes, 1992] [Clark & Brugge, 1995] führt zu einer starken Abnahme der Neuritenlänge auf einer Laminin-5-reichen Matrix. Etwas weniger stark ist die Neuriteninhibition auf Laminin-1 durch diesen Antikörper. Die Beteiligung des  $\alpha 3\beta 1$ -Integrins am Auswachsen von Neuriten kann auch für sympathische Neuronen beschrieben werden [DeFreitas et al., 1995]. Weiterhin trägt die Blockierung der  $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit sowohl auf Laminin-5-reicher Matrix als auch auf Thrombospondin-1 zu einer Minderung der Nervenfasern und der Neuritenverzweigungen bei [Hemler, 2001], während andere  $\alpha$ -Integrin-Untereinheiten an diesem Prozess nicht beteiligt zu sein scheinen [Banerjee et al., 1997].

Die Hemmung des  $\alpha 1\beta 1$ -Integrins führt nur auf Laminin-1 zu einer sehr starken Inhibition des Neuritenwachstums von PC12-Zellen, während der von  $\alpha 3$ -Integrin-Antikörper Ralph 3.2, wie schon erwähnt, das Neuritenwachstum auf Laminin-1 schwächer reduziert.

Andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die Hemmung der  $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit die Adhäsion sowie das Neuritenwachstum auf bestimmten Laminin-1-Fragmenten hemmt [Reichardt et al., 1990] [Tashiro et al., 1999], was diese Daten bestätigen und darauf hinweisen, dass auch Laminin-1 ein Ligand für das  $\alpha 3\beta 1$ -Integrin ist.

Die Blockierung der  $\alpha 6$ -Integrin-Untereinheit durch den GoH3 zeigt auf beiden Matrixproteinen keinen Effekt im Bezug auf das Neuritenwachstum der PC12-Zellen.

Dies bestätigt erneut, dass die Zellen unter den gegebenen Bedingungen kein funktionales  $\alpha 6 \beta 1$ -Integrin exprimieren.

Untersuchungen an peripheren Neuronen des Huhns zeigten, dass die Blockierung der  $\beta 1$ -Integrin-Untereinheit zu einer kompletten Inhibition des Neuritenwachstums auf Laminin-5 sowie auf Laminin-1 führen kann [Culley et al., 2001].

Damit zeigt sich, dass  $\alpha 3 \beta 1$ -Integrin ein Rezeptor für Laminin-5 und möglicherweise ein schwacher Rezeptor für Laminin-1 in PC12-Zellen ist. Diese Ligandenspezifität ist vermutlich zellspezifisch. Auch andere Arbeitsgruppen postulieren, dass  $\alpha 3 \beta 1$ -Integrin ein Rezeptor für Laminin-5 als auch für Laminin-1 ist [Teller & Beaulieu, 2001]. Allerdings soll  $\alpha 3 \beta 1$ -Integrin in Epithelzellen mit höherer Affinität an Laminin-5 als an Laminin-1 binden [Teller & Beaulieu, 2001]. Die Ligandenspezifität des  $\alpha 3 \beta 1$ -Integrins wird weiterhin in der Literatur kontrovers diskutiert. In Keratinozyten konnte das  $\alpha 3 \beta 1$ -Integrin ausschließlich als ein Rezeptor für Laminin-5 identifiziert werden [Carter et al., 1990] [Tsuji et al., 2002], während in PC12-Zellen gezeigt werden konnte, dass es ein Laminin-1-bindender Rezeptor ist [Tashiro et al., 1999].

Für die meisten Versuche wird Laminin-5-reiche Matrix eingesetzt, die sich aus verschiedenen Komponenten zusammensetzt. Die verwendete Laminin-5-reiche Matrix stammt von SCC25-Zellen, einer squamösen Karzinom-Zelllinie der Zunge, die Laminin-5 sowohl in den Zellkulturüberstand als auch als Matrix auf Kulturplatten deponiert [Rousselle & Aumailley, 1994]. Die in den Extrazellularraum gebrachte Laminin-5-reiche Matrix wird von Metalloproteinasen prozessiert [Aumailley et al., 2003] und anschließend von Integrinen in supramolekularen Strukturen reorganisiert [deHart et al., 2003]. Diese Matrix wurde auch schon für andere Studien als  $\alpha 3 \beta 1$ -Integrin-Ligand eingesetzt [Goldfinger et al., 1998] [Kunneken et al., 2004] [Frank & Carter, 2004].

Dass die Interaktion mit dem  $\alpha 3 \beta 1$ -Integrin über Laminin-5 aus der Matrix vermittelt wird, zeigen Versuche, bei denen die Laminin-5-reiche Matrix mittels eines anti-Laminin-5-Antikörpers BM165 [Rousselle et al., 1991] [Rousselle & Aumailley, 1994] blockiert wurde.

Zusätzlich sind im Westernblot die prozessierte und unprozessierte  $\gamma 2$ -Ketten des Laminin-5 aus der Matrix identifiziert worden.

Die prozessierte Form mit einem Molekulargewicht von ca. 150 kDa und die unprozessierte Form der  $\gamma 2$ -Kette mit einem Molekulargewicht von ca. 105 kDa. Bei der Prozessierung von Laminin-5, speziell der  $\gamma 2$ -Kette, handelt es sich um eine proteolytische Spaltung der  $\gamma 2$ -Kette durch Metallo-Proteinasen-1 oder 2 (MMP-1 oder MMP-2) [Aumailley et al., 2003]. Darüber hinaus konnte durch den Einsatz von monoklonalen Antikörpern gegen die  $\alpha 3$ -Kette des Laminin-5, die Laminin-5-Matrix blockieren, was zu einer Hemmung des Neuritenwachstums führt. Aus diesen Daten kann geschlossen werden, dass die Bindung der PC12-Zellen an die Matrix der SCC25-Zellen an Laminin-5 erfolgt.

### **4.3. Bestimmung der Funktion der cytoplasmatischen $\alpha 3$ -Sequenz bei $\alpha 3\beta 1$ -abhängigen Prozessen**

#### **4.3.1. Transiente Transfektion der PC12-Zellen mit IL2R- $\alpha 3$ und IL2R**

Viele Studien zur Untersuchung der Funktion des  $\alpha 3\beta 1$ -Integrins fokussierten sich auf die  $\beta 1$ -Untereinheit, insbesondere auf deren cytoplasmatische Domäne und deren Funktion. Durch Deletionsmutanten der  $\beta 1$ -Integrin-Untereinheit, die die Funktion der Integrine stören, konnten dieser Integrin-Untereinheit verschiedene Aufgaben zugeschrieben werden [Solowska et al., 1989] [Guan et al., 1991] [Hibbs et al., 1991a] [O'Toole et al. 1994].

Deletionsmutanten der  $\alpha 1$ -Integrin-Untereinheit stellten die Bedeutsamkeit der cytoplasmatischen Domäne der  $\alpha 1$ -Untereinheit bei der Zell-Adhäsion sowie in der Signaltransduktion dar [Vossmeyer et al., 2000].

Zur Untersuchung der Funktion der cytoplasmatischen Sequenz der  $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit werden chimäre Proteine in PC12-Zellen überexprimiert.

Die Chimäre besteht aus der extrazellulären und transmembranären Domäne des IL2-Rezeptors, an die der cytoplasmatische Teil der  $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit geknüpft ist.

Diese Chimäre wird in der vorliegenden Arbeit als IL2R- $\alpha$ 3 bezeichnet. Als Kontrolle wird der IL2-Rezeptor ohne die cytoplasmatische Sequenz transfiziert. Die Transfektion dieser Rezeptoren wird mittels Westernblot nachgewiesen. Die IL2R-Konstrukte zeigen Banden mit einem Molekulargewicht von ca. 55-60 kDa.

Weitere Banden sind mit einem niedrigeren Molekulargewicht detektiert worden, die vermutlich auf partiell glykosylierte IL2R-Konstrukte hinweisen.

Ähnliche Chimären wurden von DiPersio und Mitarbeitern [DiPersio et al., 2001] in Keratinozyten eingesetzt. Diese Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Expression dieser Chimären in den verwendeten MDCK-Zellen im Westernblot zwei Banden zeigte, die auf die partielle Glykosylierung dieser Chimären zurückzuführen war.

Die Chimären werden 24 h nach Transfektion in PC12-Zellen exprimiert, und die Expression hält bis zu 72 h an.

Nach NGF-Stimulation ist die Expression stärker ausgeprägt, da die NGF-Stimulation den Zell-Zyklus arretiert und die transfizierten Plasmide nicht so schnell ausgedünnt werden. Die Oberflächen-Expression von IL2R- $\alpha$ 3 und IL2R kann mittels FACS-Analysen bestimmt werden. Die Transfektionsrate beider Konstrukte liegt in NGF-behandelten Zellen bei ca. 60 %, während bei den unbehandelten Zellen die Transfektionsrate ca. 30 % beträgt.

Die Immunfluoreszenzen zeigen eine homogene Oberflächenverteilung der IL2R- $\alpha$ 3- und IL2R-Rezeptoren in PC12-Zellen auf Laminin-5, Laminin-1 und Kollagen IV. Somit wird das Ziel erreicht, eine autonom-exprimierte cytoplasmatische  $\alpha$ 3-Integrin-Sequenz an die Zell-Membran zu bringen, wo sie dominant negativ über die endogene  $\alpha$ 3-Sequenz wirken kann.

Dem  $\alpha$ 3 $\beta$ 1-Integrin wird eine Bindung an Laminin-10/11 zugeschrieben [Kikkawa et al., 1998] [Kikkawa et al., 2000]. Studien mit gereinigten  $\alpha$ 3 $\beta$ 1- und  $\alpha$ 6 $\beta$ 1-Integrinen zeigten, dass diese mit hoher Affinität an Laminin-5, hingegen und mit geringerer Affinität an Laminin-10/11 [Nishiuchi et al., 2003] und Laminin-1 binden [Tashiro et al., 1999].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression der autonomen IL2R- $\alpha$ 3-Chimäre in PC12-Zellen auf die Bindung an verschiedene Laminin-Isoformen (Laminin-5 Laminin-1 und Laminin-10/11) wirkt, was nahelegt, dass es sich beim  $\alpha$ 3 $\beta$ 1-Integrin um einen Rezeptor für die genannten Laminin-Isoformen handelt.

#### **4.3.2. Untersuchungen zur Auswirkung der IL2R- $\alpha$ 3-Chimäre auf die biologische Funktion des $\alpha$ 3-Integrins**

##### Die Zell-Adhäsion

Die Transfektion der IL2R- $\alpha$ 3-Konstrukte in PC12-Zellen zeigt keine Auswirkung auf die Zell-Adhäsion der transfizierten Zellen, die auf den getesteten Matrixproteinen adhären.

Somit ist das  $\alpha$ 3 $\beta$ 1-Integrin für die Zell-Matrix-Adhäsion von PC12-Zellen nicht essentiell, es beeinflusst weder die Adhäsion auf dem  $\alpha$ 3 $\beta$ 1-spezifischen Liganden Laminin-5, noch wirkt es auf andere Integrine und deren Liganden. Diese Daten korrelieren mit den erhaltenen Ergebnissen der Untersuchungen mit dem funktionsblockierenden  $\alpha$ 3-Integrin-Antikörper Ralph 3.2, der keine Inhibition der Adhäsion auf Laminin-5 und auf anderen Matrixproteinen auslösen kann.

##### Die Zell-Proliferation

Im Vergleich zur Zell-Matrix-Adhäsion wird die Zell-Proliferation durch die IL2R- $\alpha$ 3-Chimäre beeinflusst. Die IL2R- $\alpha$ 3-transfizierten Zellen zeigen eine erhöhte Proliferationsrate gegenüber den Kontrollzellen sowohl auf Laminin-5, und Laminin-1, als auch auf Kollagen IV. Beide Zelltypen können nicht auf dem unspezifischen Liganden Poly-L-Lysin proliferieren und gehen vermutlich in die Apoptose, wie es auch für andere Zelltypen wie Fibroblasten beschrieben ist [Bakre et al., 2002] [Kim et al., 2002]. Die erhöhte Proliferationsrate der IL2R- $\alpha$ 3-Zellen lässt vermuten, dass die  $\alpha$ 3-Integrin-Untereinheit in PC12-Zellen normalerweise eine Proliferations-hemmende Funktion innehat.

Die erhöhte Expression und Aktivität der  $\alpha 3\beta 1$ -Integrine in NGF-stimulierten PC12-Zellen untermauert diese Vermutung [Danker et al., 2001].

Der Proliferations-hemmende Einfluss des  $\alpha 3\beta 1$ -Integrins in Zellen konnte auch von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden [Guo et al., 2000]. So wird die Proliferation von Lungenkarzinom-Zellen durch die Transfektion des  $\alpha 3\beta 1$ -Integrins inhibiert.

Bestätigt wurde dieser Effekt in Endothelzellen, die erhebliche Mengen von  $\alpha 3\beta 1$ -Integrin exprimieren, wodurch die Proliferation gehemmt wird [Chandrasekaran et al., 1999].

#### Einfluss der IL2R- $\alpha 3$ -Chimäre auf die Expression endogener Integrine

Die Menge endogener  $\alpha 1$ - und  $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheiten wird durch Transfektion von der IL2R- $\alpha 3$ -Chimäre nicht verändert. IL2- $\alpha 3$ - und IL2R-transfizierte Zellen exprimieren identische Mengen an endogenen Integrinen. Dies stimmt mit Daten anderer Arbeitsgruppen überein, die ebenfalls zeigen, dass die endogene Integrin-Expression durch Transfektion der Chimären IL2R- $\beta 1$  oder IL2R- $\alpha 5$  und IL2R- $\beta 4$  nicht beeinflusst wird.

Die endogenen Integrine sind auf der Zelloberfläche präsent, und auch die Rekrutierung der endogenen  $\beta 1$ -Integrine zu den fokalen Adhäsionen bleibt von der Transfektion der Chimären unbeeinträchtigt. Allerdings wird die Funktion der endogenen Integrine wie beabsichtigt durch die Transfektion dieser rekombinanten Proteine stark moduliert [LaFlamme et al., 1994] [Nievers et al., 1998].

#### Untersuchungen zum Einfluss von der IL2R- $\alpha 3$ -Chimäre auf das Neuritenwachstum

Die Transfektion der IL2R- $\alpha 3$ -Chimäre führt zu einer Abrundung der transfizierten Zellen auch nach NGF-Gabe auf den auf  $\alpha 3$ -Integrin-spezifischen Liganden (Laminin-5-reicher Matrix, Laminin-1 und Laminin-10/11). Auf Kollagen IV differenzieren die IL2R- $\alpha 3$ -transfizierten Zellen normal.

Die Auswertung der Neuritenlängen von Kristallviolett-gefärbten IL2R $\alpha$ -3 sowie IL2R-transferten Zellen zeigt, dass die Bindung des  $\alpha$ 3 $\beta$ 1-vermittelten Neuritenwachstums in den IL2R- $\alpha$ 3-transferten Zellen nicht vollständig blockiert wird, im Vergleich zu Immunfluoreszenz-Analysen in der IL2R- $\alpha$ 3-transferte Zellen rund bleiben.

Dies liegt daran, dass die Auswertung mit dieser Methode alle Zellen einbezieht (die transferten und nicht transferten Zellen), während in der Immunfluoreszenz ausschließlich transferte Zellen betrachtet werden.

Der inhibitorische Effekt der IL2R- $\alpha$ 3-Konstrukte auf das Neuritenwachstum lässt auf einen dominant negativen Einfluss dieser Chimäre auf das endogene  $\alpha$ 3 $\beta$ 1-Integrin schließen.

Eine Wirkung auf das endogene  $\alpha$ 1 $\beta$ 1-Integrin kann durch die fehlende Wirkung auf Kollagen IV ausgeschlossen werden. Ferner bestätigt die Hemmung des Neuritenwachstums auf Laminin-1 die Bindung des  $\alpha$ 3 $\beta$ 1-Integrin an dieses Protein.

Es wurde beschrieben, dass das  $\alpha$ 3 $\beta$ 1-Integrin als solches auf andere Integrine wie  $\alpha$ 2 $\beta$ 1- und  $\alpha$ 6 $\beta$ 1-Integrin, deren Ligandenaffinität und Funktion beeinflussen kann [Lichtner et al., 1998] [Gout et al., 2001]. Um auszuschließen, dass die cytoplasmatische Domäne des  $\alpha$ 3 $\beta$ 1-Integrins auf Laminin-1 keinen Einfluss auf das endogene  $\alpha$ 1 $\beta$ 1-Integrin ausübt, werden IL2R- $\alpha$ 1-Chimären transient in PC12-Zellen transfert.

Diese Chimäre wirkt nur auf den  $\alpha$ 3 $\beta$ 1-Integrin-spezifischen Liganden, auf dem die transferten Zellen rund bleiben, während diese auf Laminin-5, das kein Ligand für  $\alpha$ 1 $\beta$ 1-Integrin ist, neuronal differenzieren. Als weitere Kontrolle wurden CHO/ $\alpha$ 1-transferte Zellen, die stabil das  $\alpha$ 1 $\beta$ 1-Integrin [Vossmeier et al., 2000], aber kein  $\alpha$ 3 $\beta$ 1-Integrin exprimieren, eingesetzt.

Auch hier war nur ein Effekt auf das Cytoskelett der CHO/ $\alpha$ 1-Zellen durch die IL2R- $\alpha$ 1-Chimäre zu verzeichnen. Die cytoplasmatische  $\alpha$ 3-Sequenz wirkt auf das  $\alpha$ 1 $\beta$ 1-Integrin nicht. Somit beeinflusst die IL2R- $\alpha$ 3-Chimäre ausschließlich nur die endogene  $\alpha$ 3-Integrin-Untereinheit.

Analog dazu wirkt die IL2R- $\alpha$ 1-Chimäre inhibitorisch nur auf das endogene  $\alpha$ 1-Integrin, was die Spezifität der Chimäre belegt und weiterhin dafür spricht, dass  $\alpha$ 3 $\beta$ 1- und  $\alpha$ 1 $\beta$ 1-Integrine unabhängig voneinander ihre Funktion ausüben.

#### **4.3.3. Beteiligung der cytoplasmatischen Sequenz der $\alpha$ 3-Integrin-Untereinheit an den RhoA/ROK- und Rac1-Signalwegen**

Integrine sind an der Organisation des Cytoskletts beteiligt, indem sie kleine GTPasen wie Rac1 und RhoA regulieren. Aktinstrukturen, die durch Rac1 und Cdc42 induziert werden, sind mit den Integrinen in fokalen Komplexen assoziiert [Hall, 1998].

RhoA induziert in Fibroblasten die Bildung von Spannungsfasern und die Assemblierung der fokalen Adhäsionen [Ridley & Hall, 1992a] [Schwartz & Shattil, 2000].

Die Aktivierung von Rac1 und Cdc42 in Fibroblasten fördert die Bildung von Lamellipodien und Filopodien [Ridley & Hall, 1992a] [Nobes & Hall, 1995]. Rac1 und RhoA haben in neuronalen Zellen wechselseitige Wirkungen. Diese Wechselwirkung wird in der Literatur als Crosstalk zwischen den kleinen GTPasen Rac1 und RhoA bezeichnet [Cox et al., 2001].

Rac1 kontrolliert Zellprotrusionen durch Aktinpolymerisation, Bildung von Lamellipodien und „membrane-ruffles“ [Katoh, 2000], während die Aktivierung von RhoA zum Kollabieren der Neuriten bzw. zur Neuriten-Retraktion führt [Gebink et al., 1997] [Kozma et al., 1997] [Katoh et al., 1998] [Sarner et al., 2000].

Die Regulation von RhoA durch Integrine verläuft biphasisch. Zuerst induzieren Integrine, nach Bindung an den Liganden, eine transiente Inhibition von RhoA [Nusser et al., 2002].

Zu diesem Zeitpunkt befinden sich die Zellen in der initialen Phase des Spreitens. Zu einem späteren Zeitpunkt wird RhoA reaktiviert und induziert die Bildung von Spannungsfasern, und fokalen Adhäsionen. Das sind Prozesse, die nach dem Spreiten der Zellen eine feste Bindung zur Matrix herstellen [Berrier et al., 2002].

RhoA wird in verschiedenen Zellsystemen weiterhin durch Agonisten wie LPA, (Lysophosphatidsäure), Bombesin, Norepinephrin und ET-1 (Endothelin-1) aktiviert [Ridley & Hall, 1994] [Kuwahara et al., 1999]. Das aktivierte RhoA bindet an verschiedene Downstream-Effektoren, unter anderem an die RhoA-Kinase ROK $\alpha$  [Leung et al., 1995].

Die Blockierung der RhoA-bindenden Kinase ROK $\alpha$  durch pharmakologische Agentien wie Y27632 [Uehata et al., 1997] [Ishizaki et al., 2000] hat zur Folge, dass die Peptid- und die Proteinsynthese in den Y27632-behandelten Zellen stark erhöht ist. Die Größe der Zellen verändert sich und die myofibrilläre Organisation ist deutlich gesteigert [Kuwahara et al., 1999].

Ein physiologischer Inhibitor der ROK $\alpha$  ist NGF, der jedoch einen nicht so starken Effekt wie Y27632 ausübt. PC12-Zellen, die mit NGF behandelt worden sind, gehen in die Differenzierung.

Während der Initiationsphase der neuronalen Differenzierung wird die ROK $\alpha$  gehemmt, indem sie in das Zellinnere transloziert wird. In der Elongationsphase der Neuritenbildung wird die Kinase wieder in Membrannähe gebracht [Leung et al., 1995].

Die morphologischen Veränderungen, die durch den ROK $\alpha$ -Inhibitor Y27632 in PC12-Zellen beobachtet werden und die auf einer Veränderung des Cytoskeletts beruhen [Altun-Gultekin et al., 1998], können auch in dieser Arbeit bestätigt werden. Die mit Y27632 behandelten PC12-Zellen, die auf Laminin-5 oder auf Laminin-1 differenzieren, zeigen ein verstärktes Neuritenwachstum. Hierbei ist eine verstärkte Verzweigung der Neuriten im Vergleich zu Kontrollzellen zu beobachten.

Ähnliche Effekte wurden erzielt, nachdem die katalytische Bindungsdomäne p160 der ROK-Kinase oder das konstitutiv aktive RhoA in PC12-Zellen transfiziert wurde [Kato et al., 1997]. Da die Transfektion der IL2R- $\alpha$ 3-Chimären ebenfalls zum Abrunden der PC12-Zellen führte, lag die Vermutung nahe, dass die  $\alpha$ 3-cytoplasmatische Sequenz in diesen Signalweg eingreift. Die durch IL2R- $\alpha$ 3-Konstrukte induzierte Differenzierungshemmung kann durch Behandlung mit dem ROK $\alpha$ -Inhibitor Y27632 aufgehoben werden.

IL2R- $\alpha$ 3-transfizierte Zellen bilden nach Y27632-Gabe auf Laminin-5, Laminin-1 sowie auf Laminin-10/11 wieder Neuriten. Allerdings sind die Neuriten dünner als in normalen Zellen.

Um zu überprüfen, über welches Integrin nach Y2763-Gabe das Auswachsen der Neuriten verläuft, werden die IL2R- $\alpha$ 3- und IL2R-transfizierten Zellen zusätzlich mit Integrin-funktionsblockierenden Antikörpern behandelt.

Auf den  $\alpha$ 3 $\beta$ 1-Integrin-spezifischen Liganden wie Laminin-5, Laminin-1 und Laminin-10/11 kann die Hemmung des Neuritenwachstums durch einen  $\alpha$ 3-Integrin-Antikörper mittels Y27632 in IL2R-Kontrollzellen wieder aufgehoben werden, was dafür spricht, dass der ROK $\alpha$ -Inhibitor downstream der IL2R- $\alpha$ 3-Chimäre agiert und deren Hemmung aufhebt und im Weiteren zur Integrin-Aktivierung über die  $\beta$ 1-Untereinheit führt [Chen et al., 1994].

Die IL2R- $\alpha$ 1-Chimäre, die in dieser Arbeit als weitere Kontrolle verwendet ist, bestätigt die Spezifität der transfizierten Chimären, da auch IL2R- $\alpha$ 1-transfizierte PC12-Zellen eine runde Zellmorphologie auf Laminin-1, aber nicht auf Laminin-5 aufweisen. Die Differenzierung kann durch Gabe von ROK $\alpha$ -Inhibitor wieder erreicht werden.

Die zusätzliche Behandlung dieser Zellen mit dem  $\alpha$ 1-Antikörper 33.4 führt jedoch zur vollständigen Hemmung der endogenen  $\alpha$ 1-Integrin-Funktion im Hinblick auf das Neuritenwachstum. Diese Ergebnisse zeigen weiterhin, dass die cytoplasmatischen Domänen der  $\alpha$ -Untereinheiten am Downstream-Signalweg von Integrinen beteiligt sind, nicht aber an der Regulation der Integrin-Bindungsaktivität, da die Bindung der Integrine auch in Anwesenheit der Chimäre hergestellt werden kann. Jedoch scheinen die cytoplasmatischen Sequenzen sowohl der  $\alpha$ 3- als auch der  $\alpha$ 1-Integrin Untereinheiten eine Rolle bei der Inaktivierung des RhoA/ROK $\alpha$ -Signalweges zu spielen.

Durch diese Experimente wird gezeigt, dass die Inaktivierung des RhoA-Signalweges beim Integrin-abhängigen Neuritenwachstum von PC12-Zellen notwendig ist. Die Chimären greifen offensichtlich in die Regulation des RhoA-Signalweges ein. Eine solche Regulation der RhoA-GTPase durch Integrine wurde kürzlich von Liang und Mitarbeitern beschrieben [Liang et al., 2004].

Diese konnten zeigen, dass in Oligodendrocyten Integrine die Fyn-Kinase aktivieren. Dadurch wird die Phosphorylierung von p190Rho-GAP induziert, das wiederum zur Inaktivierung von RhoA führt [Liang et al., 2004].

Die kleine GTPase Rac1 wird durch Integrin-vermittelte Adhäsion aktiviert und reguliert Veränderungen am Cytoskelett als Antwort auf die NGF-Induktion [Clark et al., 1998] [Price et al., 1998]. Gleichzeitig inhibiert NGF die Rho-Aktivierung durch die Bindung an den Neutrophin-Rezeptor, der auf PC12-Zellen exprimiert wird [Bilderback et al., 1999] [Yamashita et al., 1999]. In PC12-Zellen gleicht die Inaktivierung von RhoA dem Effekt von Neutrophinen und führt zum verstärkten Neuritenauswachsen. Daten aus der Literatur weisen auf einem Crosstalk zwischen den beiden Rho-GTPasen RhoA und Rac1 hin. Es wird postuliert, dass NGF die Rac1-Aktivierung induziert und gleichzeitig RhoA inhibiert [Yamaguchi et al., 2001].

Zur Untersuchung der kleinen GTPase Rac1 werden konstitutiv aktives Rac (L61Rac), dominant negatives Rac (N17Rac) und Wildtyp-Rac (wtRac) in den IL2R- $\alpha$ 3- und IL2R-Konstrukten in PC12-Zellen kotransfiziert. Zellen, die mit dem konstitutiv aktiven Rac transfiziert werden, zeigen auf  $\alpha$ 3 $\beta$ 1-Integrin spezifische Liganden wie Laminin-5, Laminin-1 und Lmainin-10/11 und unabhängig von den transfizierten Chimären einen typischen Rac1-Phänotyp, der durch die Bildung zahlreicher kleiner filopodienartiger Ausläufer charakterisiert ist. Diese Zellen sind außerdem auf den  $\alpha$ 3 $\beta$ 1-Integrin-spezifischen Liganden abgeflacht und zeigen ein vergrößertes Soma. Auch Daniels und Mitarbeitern konnten den Rac-Phenotyp in PC12-Zellen zeigen [Daniels et al., 1998]. Allerdings veranlassten diese Rac-Mutanten auf Kollagen IV die Bildung von Filopodien, die kleinen Neuriten ähnlich waren [Altun-Gultekin et al., 1998]. Versuche von anderen Arbeitsgruppen, zeigten, dass konstitutiv aktives Rac1 in PC12-Zellen keine Neuriten sondern kleine „membran ruffels“ induzierte [Lamoureux et al., 1997] [Posern et al., 2000]. Neuritenwachstum von PC12-Zellen kann durch die Expression von dominant negativen Mutanten von Rac1 und Cdc42 inhibiert werden [Sebok et al., 1999] [Chen et al., 1999]. In Oligodendrocyten wurde ein ähnlicher Effekt beobachtet [Liang et al., 2004].

Dominant negatives Rac1 führt in IL2R- $\alpha$ 3- und IL2R-transfizierten Zellen auf den  $\alpha$ 3 $\beta$ 1-Integrin-spezifischen Liganden zur kompletten Inhibition des Neuritenwachstums.

Die hier gezeigten Ergebnisse bestätigen die von Kuhn und Mitarbeitern [Kuhn et al., 1998] durchgeführten Studien. Sie zeigen, dass das  $\beta$ 1-Integrin-vermittelte Neuritenwachstum auf Laminin-1 vom primären Motor- und Spinalneuronen des Huhns durch die Expression von dominant negativem Rac inhibiert wird und diese Zellen dadurch rund blieben. Das dominant negative Rac ruft dabei den Arrest der Elongationsphase der Neuriten hervor [Altun-Gultekin et al., 1998] [Lamoureux et al., 1997].

Auch auf Kollagen IV bilden die mit dominant negativem Rac-transfizierten in IL2R- und IL2R- $\alpha$ 3-exprimierenden Zellen entweder sehr kurze oder keine Neuriten im Vergleich zu PC12-Zellen, die mit Wt-Rac transfiziert sind, und auf Kollagen IV besonders lange Neuriten bilden.

Rac1 liegt somit downstream sowohl von  $\alpha$ 3 $\beta$ 1- als auch von  $\alpha$ 1 $\beta$ 1-Integrin. Ferner deutet der Defekt der Neuritenbildung in den mit negativ dominant Rac-transfizierten Zellen auf ein Defizit in der Funktion der Wachstumskegel hin [Lamoureux et al., 1997].

Die kontrollierte Aktivierung und Deaktivierung von Rac scheint wichtig bei der Reorganisation des Cytoskellets zu sein und die Überexpression von konstitutiv aktivem Rac scheint diesen dynamischen Prozess zu blockieren. In CHO/ $\alpha$ 1-Zellen, denen die cytoplasmatische Sequenz der  $\alpha$ 1-Integrin fehlt, besitzen einen erhöhten Pool an GTP-Rac. Entgegen den Erwartungen können diese Zellen nicht spreiten und sind nicht in der Lage, F-Aktin-Spannungsfasern auszubilden [Posern et al., 2000] [Smerling, Diplomarbeit, FU-berlin].

Der konstitutiv aktive Rac ausgelöste igelartige Phänotyp kann durch die zusätzliche Gabe des ROK $\alpha$ -Inhibitors Y27632 wieder verändert werden.

Derart behandelte IL2R- $\alpha$ 3- sowie IL2R-transfizierte Zellen können auf Laminin-5, Laminin-1, Laminin-10/11 und Kollagen IV neuronal differenzieren. Vermutlich werden die durch konstitutiv aktives Rac gebildeten Filopodien als Neuriten-Vorläufer betrachtet, die durch Y27632 dazu stimuliert werden, in die Elongationsphase der Neuritenbildung überzugehen.

Der dominant negative-Effekt von N17Rac kann IL2R-transfizierten Zellen auf Laminin-5 mittels ROK $\alpha$ -Inhibitor-Behandlung wieder aufheben, jedoch nicht IL2R- $\alpha$ 3-transfizierten Zellen. Diese bleiben trotz ROK $\alpha$ -Inhibierung rund, während auf Laminin-1 die IL2R- $\alpha$ 3-transfizierten Zellen ein gestrecktes Soma und verzögerte Neuriten im Vergleich zu den IL2R-exprimierenden Zellen zeigen, die durch Gabe von ROK $\alpha$ -Inhibitor ein neuronales Netzwerk bilden. Diese Daten weisen darauf hin, dass Rac1 und RhoA die  $\alpha$ 3 $\beta$ 1-vermittelten Neuritenbildung in PC12-Zellen regulieren, und dass die  $\alpha$ 3-cytoplasmatische Sequenz in diesem Prozess eine wesentliche Rolle spielt. Allerdings muss die  $\beta$ 1-Integrin-Untereinheit in diese Betrachtungen mit einbezogen werden, da gezeigt wird, dass diese Untereinheit notwendig und ausreichend ist, um Rac1 zu aktivieren [Berrier et al., 2002].

Mutationen in der  $\beta$ 1-cytoplasmatischen-Sequenz blockiert die Aktivierung des Rac1-JNK-Signalweges [Hirsch et al., 2002]. Kürzlich wurde für Keratinozyten gezeigt, dass das  $\alpha$ 3 $\beta$ 1-Integrin Rac1 aktiviert und somit Einfluss auf die Zell-Migration einnehmen kann [Choma et al., 2004].

Auf Kollagen IV kann der dominant negative Effekt von N17Rac durch Gabe von Y27632 aufgehoben werden. Dies lässt sich dadurch erklären, dass das Neuritenwachstum auf Kollagen IV durch das  $\alpha$ 1 $\beta$ 1-Integrin und nicht durch das  $\alpha$ 3 $\beta$ 1-Integrin vermittelt wird, die autonom exprimierte cytoplasmatische  $\alpha$ 3-Sequenz soll hier dementsprechend keine Rolle spielen. Die erhaltenen Daten sprechen dafür, dass Rac1 und RhoA im  $\alpha$ 3 $\beta$ 1-Integrin-vermittelten Neuritenwachstum involviert sind. So konnte auch die gegenseitige Wechselwirkung von Rac1 und RhoA in PC12-Zellen bewiesen werden. Rac1 muss in seiner aktiven, aber regulierenden Form, vorliegen, um das Neuritenwachstum fördern zu können, während der RhoA-Signalweg inaktiviert werden muss.

#### **4.3.4. Einfluss der IL2R- $\alpha$ 3-Chimäre auf die MAPK-Signalkaskade**

Integrin-abhängige Adhäsionsprozesse werden durch ERKs, Mitglieder der MAPK-Familie, reguliert [Frisch & Francis, 1994]. Nach Aktivierung der Integrin-vermittelten Signale werden ERKs in den Zellkern transloziert und aktivieren dort Gene, die für das Überleben und der Proliferation der Zellen wichtig sind [Schulze et al., 2001].

Kürzlich wurde für humane Keratinozyten beschrieben, dass das  $\alpha 3\beta 1$ -Integrin das Überleben dieser Zellen fördert, indem es einerseits die proteolytische Spaltung der Caspase 3 inhibiert und andererseits ERK1/2 aktiviert [Manohar et al., 2004].

Für die  $\beta 1$ -Integrin-Untereinheit ist gezeigt worden, dass es an Signalwegen beteiligt ist, die FAK, PI3K umfassen, da Mutationen in der  $\beta 1$ -Integrin-cytoplasmatischen Sequenz diesen Signalweg inhibieren [Hirsch et al., 2002]. Basierend auf diese Daten sollte untersucht werden, ob die Aktivierung der ERK1/2 in NGF-stimulierten PC12-Zellen möglicherweise in Abhängigkeit von der cytoplasmatischen  $\alpha 3$ -Sequenz verläuft. In IL2R- $\alpha 3$ -Zellen ist die ERK1/2-Aktivierung beschleunigt, nimmt auch viel schneller wieder ab als in IL2R-exprimierenden Zellen, in denen das Signal nach 60 min gut nachweisbar ist. Diese Daten deuten darauf hin, dass die  $\alpha 3$ -cytoplasmatische Domäne ebenfalls an der Aktivierung der ERKs beteiligt ist. Für die  $\alpha 2$ -cytoplasmatische Sequenz des  $\alpha 2\beta 1$ -Integrins ist nachgewiesen worden, dass sie die Aktivierung der p38-Kinase, einer anderen MAP-Kinase, moduliert [Ivaska et al., 1999].

Verschiedene Studien zeigen, dass die  $\beta 1$ -Integrin-Untereinheit in diesem Prozess eventuell auch eine Rolle spielt. Die  $\beta 1$ -cytoplasmatische Domäne aktiviert die ERKs über Rac1/PI3K/MEK und vermittelt deren Translokation in den Zellkern [Barberis et al., 2000].

Weiterhin führt die Blockierung der  $\beta 1$ -Integrin-Untereinheit durch den Einsatz von Antikörpern in neuronalen Zellen zu einer gestörten MAPK-Aktivierung [Anderson & Ferreira, 2004], und leitet die Zellen in die Apoptose [Farrelly et al., 1999].

Die  $\beta 1$ -Integrin-Untereinheit kann aber auch einen zweiten Signalweg aktivieren, an dem Rac1 und andere Mitglieder der MAPK-Familie wie die p38-Kinase beteiligt sind [Mainiero et al., 2000], während RhoA von der  $\beta 1$ -Integrin-Untereinheit über FAK suprimiert wird [Khyrul et al., 2004] [Ren et al., 2000].

Der Signalweg, der durch die cytoplasmatische Sequenz des  $\alpha 3\beta 1$ -Integrins moduliert wird und zur Veränderung der MAP-Kinase-Aktivität führt, muss in weiteren Experimenten genauer untersucht werden.

#### **4.3.5. Modell zur Beteiligung der cytoplasmatischen Sequenz der $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit am $\alpha 3\beta 1$ -Integrin-vermittelten Neuritenwachstum**

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die  $\alpha 3$ -cytoplasmische Domäne des  $\alpha 3\beta 1$ -Integrins am Downstream-Signalweg dieses Integrins beteiligt ist, indem es vermutlich in den Crosstalk zwischen Rac1 und RhoA eingreift.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die autonome Expression der cytoplasmatischen  $\alpha 3$ -Sequenz eine fehlende Inaktivierung des RhoA/ROK $\alpha$ -Signalweges zur Folge hat, die jedoch für das Auswachsen von Neuriten essentiell ist. Durch die Hemmung der ROK $\alpha$  durch den pharmakologischen Inhibitor Y27632 kann das NGF-induzierte Auswachsen von Neuriten wieder erfolgen. Auch eine Beeinflussung von Rac1, die ebenfalls für diesen Prozess wichtig ist, durch die  $\alpha 3$ -cytoplasmatische Sequenz ist denkbar. Jedoch kann der Phänotyp von differenzierten Wildtyp-Zellen nur nach Transfektion von konstitutiv aktivem Rac und zusätzlicher Gabe von ROK $\alpha$ -Inhibitor wieder hergestellt werden.

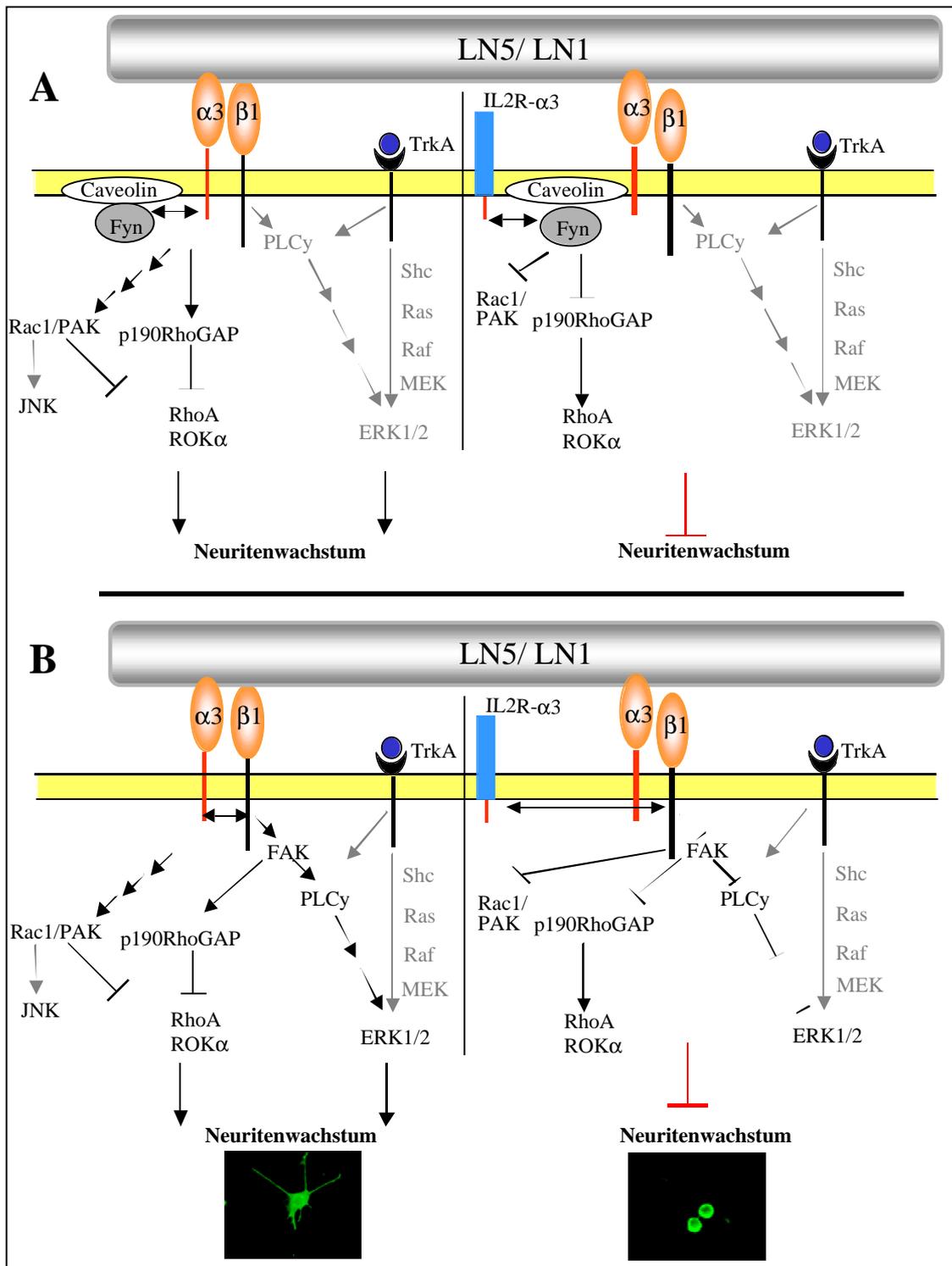
Bei der Frage, welche Moleküle direkt durch die Chimäre  $\alpha 3$ -Untereinheit angesprochen werden und in dem Crosstalk der kleinen GTPasen eingreifen können, gibt es verschiedene Möglichkeiten. Ein Kandidat wäre die fokale Adhäsionskinase pp125FAK. Diese cytosolische Tyrosinkinase, die mit der  $\beta 1$ -Integrin-Untereinheit interagiert [Danker et al., 1998], kann den RhoA/ROK $\alpha$ -Signalweg inhibieren, indem sie p190Rho-GAP (GTPase-aktivierendes Protein) phosphoryliert, was die Inaktivierung von RhoA zur Folge hat [Liang et al., 2004] (Abb. 38).

Dieser Weg wird durch die cytoplasmatische Sequenz der  $\beta 1$ -Integrin-Untereinheit vermittelt, die auch allein notwendig und ausreichend ist, um Rac zu aktivieren. Hier wäre eine regulatorische Wirkung der cytoplasmatischen  $\alpha 3$ -Sequenz auf die  $\beta 1$ -Integrin-Sequenz denkbar.

Diese regulatorische Wirkung wurde auch schon für andere cytoplasmatische  $\alpha$ -Sequenzen postuliert [Williams et al., 1994], [Smerling, Diplomarbeit, FU-Berlin]. Auch vorgelegte Strukturdaten zu diesen Integrinsequenzen lassen dies denkbar erscheinen.

Eine andere Möglichkeit wäre das direkte Eingreifen der cytoplasmatischen  $\alpha 3$ -Sequenz in das  $\alpha 3\beta 1$ -vermittelte Signaling. Die cytoplasmatischen  $\alpha$ -Sequenzen können über das Protein Caveolin-1 die Src-Kinase Fyn in den fokalen Adhäsionen rekrutieren [Wary et al., 1996], eine Tyrosinkinase, die nach Adhäsion auf dem  $\alpha 3\beta 1$ -spezifischen Liganden Laminin-5 in einigen Zellen phosphoryliert und aktiviert wird [Sato et al., 1999] (Abb. 38). Wie pp125FAK kann auch Fyn p190Rho-GAP phosphorylieren und aktivieren [Liang et al., 2004] und nachgeschaltet RhoA inaktivieren. Die Beteiligung von Integrinen an diesem Signalweg wurde, ohne Zuweisung funktioneller Sequenzen, bei der Differenzierung von Oligodendrocyten gezeigt [Liang et al., 2004], ist aber auch für das Auswachsen von Neuriten in neuronalen Zellen denkbar.

$\alpha 3$ -Integrin-cytoplasmatische Sequenz stört nicht den Crosstalk zwischen den Integrinen und dem NGF-Rezeptor im Bezug auf die MAP-Kinasen-Aktivierung, der NGF-Signalweg scheint somit unbeeinflusst von der  $\alpha 3$ -cytoplasmatischen Sequenz zu sein (Abb. 38).



**Abb. 38 : Modell für die Rolle der  $\alpha 3$ -cytoplasmatischen Sequenz des  $\alpha 3\beta 1$ -Integrins in der neuronalen Differenzierung von PC12-Zellen.**

**A:**  $\alpha 3\beta 1$ -Integrin-vermittelte neuronale Differenzierung. Zum einen rekrutiert und aktiviert die  $\alpha 3$ -cytoplasmatische Sequenz die Fyn-Kinase, die wiederum die p190Rho-GAP phosphoryliert und somit RhoA inaktiviert, während Rac1 aktiviert wird, was die Poliarisation der Zelle fördert und folglich die neuroanle Differenzierung stimuliert. Zum anderen aktiviert die  $\beta 1$ -Untereinheit die FAK, die auch die p190Rho-GAP aktiviert und RhoA in seiner inaktiven GDP-gebundenen Form überführt.

**B:** Hemmung der neuronalen Differenzierung durch die IL2R- $\alpha 3$ -Chimären. Blockierung des Fyn- oder auch des FAK- Signalweges durch die Chimäre, was zur Aktivierung der RhoA/ROK $\alpha$  führen kann, während die Inhibition von Rac1 zum Verlust der Zellpolarität führt und unterdrückt somit das Neuritenwachstum. Jedoch bleibt der Crosstalk zwischen  $\alpha 3\beta 1$ -Integrin und TrkA unbeeinflusst.