

Institut für Biochemie und Molekularbiologie  
Charité – Universitätsmedizin Berlin – Campus Benjamin Franklin  
Arbeitsgruppe Prof. Dr. Werner Reutter

**Identifizierung von Bindungspartnern des cytosolischen  
Teils der  $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit und die Aufklärung ihrer  
Rolle bei der Funktion des  $\alpha 3\beta 1$ -Integrins**

Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von Diana Mutz aus Böblingen  
Berlin Juni 2004

1. Gutachter: Prof. Dr. W. Reutter

2. Gutachter: Prof. Dr. F. Hucho

Tag der Disputation: 13. Juli 2004

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>7</b>
1.1 Komponenten und Funktionen der extrazellulären Matrix .....	7
1.2 Adhäsion und die wichtigsten Zelladhäsionsmoleküle .....	9
1.3 Integrine .....	11
1.3.1 Evolution der Integrine .....	14
1.3.2 Struktur / Konformation der Integrine .....	14
1.3.3 Regulation der Ligandenbindung / Aktivierungsmechanismen .....	18
der Integrine .....	18
1.3.4 Physiologische Funktionen der Integrine .....	19
1.3.5 Funktionen der Integrine bei pathologischen Prozessen .....	21
1.3.6 Signaltransduktion der Integrine .....	22
1.3.7 Modulation der Integrine durch Phosphorylierung .....	25
1.4 Das $\alpha 3\beta 1$ -Integrin .....	26
1.4.1 Interaktionspartner des $\alpha 3\beta 1$ -Integrins .....	28
<b>2 Zielsetzung</b> .....	<b>32</b>
<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>33</b>
3.1 Identifizierung $\alpha 3$ -Integrin-bindender Proteine mittels .....	33
Affinitätschromatographie .....	33
3.2 Generierung von peptidspezifischem Antikörper gegen Lanp und .....	38
Untersuchung von Lanp .....	38
3.2.1 Auswahl immunogener Bereiche .....	38
3.2.2 Test und Reinigung der Kaninchenserum .....	39
3.2.3 Nachweis von Lanp im Immunoblot .....	40
3.2.4 Anreicherung von Lanp durch Immunpräzipitation .....	41
3.2.5 Nachweis von Lanp in der Immunfluoreszenz .....	42
3.3 Überprüfung der Lanp/ $\alpha 3$ -Integrin-Interaktion durch Copräzipitation ...	44
3.4 Überprüfung der Lanp/ $\alpha 3$ -Integrin-Interaktion durch das .....	45
<i>yeast two-hybrid system</i> .....	45
3.5 <i>Pull down</i> mit GST-Fusionsproteinen .....	47

3.6	Untersuchungen zur Komplexbildung von Lanp, PP1, PP2A und der $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit durch Gelfiltrations- und Quervernetzungsexperimente	49
3.6.1	Gelfiltration	49
3.6.2	Quervernetzung	50
3.7	Bestimmung der Bindungsstellen in den cytosolischen $\alpha$ -Integrin-Anteilen mittels Peptidbindungsstudien	52
3.8	In vitro-Phosphatase-Assays	54
3.9	Lokalisation der Interaktionspartner Lanp, PP1, PP2A und der $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit	56
3.10	Überexpression von Lanp	63
3.11	<i>Knock down</i> von Lanp mit Antisense-Oligonucleotiden	68
3.12	Hemmung des Kernexports von Lanp mit Crm1-Inhibitoren	70
4	Diskussion	73
4.1	Identifizierung cytosolischer Bindungspartner der $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit	73
4.1.1	Die Interaktionspartner PP1, PP2A und Lanp	74
4.1.2	Die Lanp-Familie	75
4.2	Die Interaktionen zwischen Integrin, Lanp, PP1 und PP2A	78
4.2.1	Proteinchemische Charakterisierung der Interaktionen zwischen Integrin, Lanp, PP1 und PP2A	78
	<i>Pull down</i> des Integrin-Lanp-Phosphatasen Proteinkomplexes	78
	Eingrenzung der Bindungsstellen der Integrin-Untereinheit	79
	Nachweis der Interaktionen im intakten Zellsystem	81
	Spezifität des polyklonalen anti-Lanp-Antikörpers	82
4.2.2	Zellbiologische Untersuchungen zur Interaktion zwischen Integrin, Lanp, PP1 und PP2A	84
	Untersuchung der Dephosphorylierung der $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit	84
	Lokalisation der Interaktionspartner	85
	Auswirkungen der Überexpression von Lanp	87
	<i>Knock down</i> von Lanp	88
	Hemmung des Kernexports	90
4.3	Arbeitshypothese und Ausblick	91

<b>5 Zusammenfassung .....</b>	<b>94</b>
<b>Summary .....</b>	<b>96</b>
<b>6 Materialien und Methoden.....</b>	<b>98</b>
<b>6.1 Materialien .....</b>	<b>98</b>
<b>6.1.1 Chemikalien und Zellkultur-Materialien .....</b>	<b>98</b>
<b>6.1.2 Oligonucleotide und Peptide .....</b>	<b>98</b>
6.1.2.1 Oligonucleotide .....	98
6.1.2.2 Peptide .....	99
<b>6.1.3 Antikörper.....</b>	<b>100</b>
<b>6.1.4 Enzyme / Proteine, Marker und Kits.....</b>	<b>102</b>
6.1.4.1 Enzyme / Proteine .....	102
6.1.4.2 Marker .....	102
6.1.4.3 Kits.....	103
<b>6.1.5 Vektoren .....</b>	<b>103</b>
<b>6.1.6 Versuchstiere .....</b>	<b>108</b>
<b>6.1.7 Eukaryontenzellen .....</b>	<b>108</b>
6.1.7.1 Säugerzellen.....	108
6.1.7.2 Hefen .....	108
<b>6.1.8 Prokaryontenzellen.....</b>	<b>108</b>
<b>6.1.9 Geräte .....</b>	<b>109</b>
<b>6.1.10 Sonstige Materialien .....</b>	<b>110</b>
<b>6.2 Methoden .....</b>	<b>111</b>
<b>6.2.1 Zellbiologische Methoden für Säugerzellen .....</b>	<b>111</b>
6.2.1.1 Allgemeine zellbiologische Methoden für Säugerzellen.....	111
6.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Säugerzellen .....	113
6.2.1.3 Generierung Laminin-5-reicher Matrix .....	113
6.2.1.4 Gewinnung von Primärzellen aus Kleinhirngewebe.....	114
6.2.1.5 NGF-induzierte Differenzierung von PC12-Zellen.....	116
6.2.1.6 Quantifizierung der Neuritenlängen differenzierter PC12-Zellen ..	116
6.2.1.7 <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA).....	117
6.2.1.8 Indirekte Immunfluoreszenz.....	117
6.2.1.9 Durchflußzytometrie/FACS ( <i>fluorescence-activated cell</i> .....	
<i>scanning</i> ).....	119
6.2.1.10 Adhäsionsassay.....	120

6.2.1.11	Proliferationsassay .....	121
6.2.1.12	Transfektion von Säugerzellen mit Plasmid-DNA bzw. mit DNA .....	
	Oligonucleotiden .....	122
<b>6.2.2</b>	<b>Zellbiologische Methoden für Hefezellen .....</b>	<b>124</b>
6.2.2.1	Allgemeine zellbiologische Methoden für die Kultivierung von .....	
	Hefezellen.....	124
6.2.2.2	Einfrieren und Auftauen von Hefezellen .....	126
6.2.2.3	Transformation von Hefen mit Plasmid-DNA .....	126
<b>6.2.3</b>	<b>Mikrobiologische Methoden für Bakterienzellen.....</b>	<b>128</b>
6.2.3.1	Allgemeine mikrobiologische Methoden für die Kultivierung von .....	
	<i>E.coli</i> .....	128
6.2.3.2	Einfrieren und Auftauen von Bakterien .....	129
6.2.3.3	Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA.....	129
6.2.3.4	Expression rekombinanter Fusionsproteine in <i>E.coli</i> .....	129
<b>6.2.4</b>	<b>Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>131</b>
6.2.4.1	Konzentrationsbestimmung von DNA.....	131
6.2.4.2	Elektrophoretische Auftrennung von DNA .....	131
6.2.4.3	Elution aus dem Gel .....	132
6.2.4.4	Plasmid-Schnell-Präparation .....	132
6.2.4.5	Plasmid-Präparation im Midi- bzw. Maxi-Maßstab und Reinigung.....	
	durch Anionen-Austauscher-Säulen .....	134
6.2.4.6	Fällung von DNA.....	135
6.2.4.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	135
6.2.4.8	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonucleasen.....	137
6.2.4.9	Ligation von DNA-Fragmenten .....	137
6.2.4.10	Dephosphorylierung von DNA .....	138
6.2.4.11	Sequenzierung von DNA .....	138
<b>6.2.5</b>	<b>Proteinchemische Methoden .....</b>	<b>139</b>
6.2.5.1	Solubilisierung von Säugerzellen.....	139
6.2.5.2	Cytosolpräparation von Säugerzellen .....	139
6.2.5.3	Solubilisierung von Hefezellen.....	140
6.2.5.4	Proteinbestimmung.....	141
6.2.5.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	142
6.2.5.6	Tricin-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	143

6.2.5.7	Färbung von Gelen .....	144
6.2.5.8	Western-Blotting .....	145
6.2.5.9	Immunchemischer Nachweis von Proteinen auf Blotmembranen.	146
6.2.5.10	Reinigung und Anreicherung von Antikörpern .....	147
6.2.5.11	Inhibition von Antikörper-Antigen-Bindung durch immunogene Peptide .....	148
6.2.5.12	Aufschluß von Bakterienzellen nach Expression von .....	
	poly-His-Tag-markierten Fusionsproteinen .....	149
6.2.5.13	Reinigung überexprimierter poly-Histidin-markierter Fusionsproteine .....	149
6.2.5.14	Aufschluß von Bakterienzellen nach Expression von .....	
	Fusionsproteinen mit GST-Anteil .....	151
6.2.5.15	Reinigung überexprimierter Proteine mit GST-Anteil .....	152
6.2.5.16	Proteinaffinitätschromatographie .....	152
6.2.5.17	Protein-Identifizierung .....	154
6.2.5.18	GST <i>pull-down assay</i> .....	156
6.2.5.19	Immunpräzipitation .....	157
6.2.5.20	Kopplung von Peptiden an aktivierte Thiolsepharose .....	158
6.2.5.21	Kopplung von Peptiden an CNBr-aktivierte Sepharose .....	159
6.2.5.22	Peptidbindungsstudien .....	160
6.2.5.23	Gelfiltration .....	160
6.2.5.24	Quervernetzung .....	161
6.2.5.25	In-vitro Phosphatase-Assay .....	162
6.2.5.26	Galactosidase-Assay aus Flüssigkultur .....	163
<b>7</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>165</b>
	<b>Anhang</b> .....	<b>194</b>
	<b>DNA- und Proteinsequenzen</b> .....	<b>194</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>199</b>
	<b>Veröffentlichungen</b> .....	<b>202</b>
	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>204</b>
	<b>Danksagung</b> .....	<b>205</b>
	<b>Förderung</b> .....	<b>206</b>

