

## 5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt Studien zur Funktion des  $\alpha 3\beta 1$ -Integrins. Das Augenmerk liegt auf der Beteiligung der  $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit, welche die Spezifität des Integrins bestimmt. Das  $\alpha 3\beta 1$ -Integrin spielt eine wichtige Rolle bei der neuronalen Entwicklung und ist in PC12-Zellen an der NGF-induzierten Ausbildung von Neuriten beteiligt.

Mittels Ligandenaffinitätschromatographie konnten acht intrazelluläre Bindungspartner des cytoplasmatischen Anteils der  $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit aus Cytosol von PC12-Zellen identifiziert werden. Unter diesen Proteinen befinden sich Lanp und Pal31 (Mitglieder der Lanp-Familie), Set- $\alpha$  (ein entfernter Verwandter der Lanp-Familie) und die beiden Serin-/Threonin-Phosphatasen PP1 und PP2A, die von Lanp und Set- $\alpha$  reguliert werden. Die Ergebnisse der Affinitätschromatographie sind reproduzierbar und durch eine Positivkontrolle (DRAL/FHL2) für die Bindung an die  $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit bestätigt.

Die Interaktion von Lanp, PP1 und PP2A mit der  $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit konnte durch *pull-down assays* reproduzierbar bestätigt werden. Diese und die nach Gelfiltration und Quervernetzung gewonnenen Ergebnisse deuten darauf hin, daß an der  $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit ein multimerer Komplex besteht, der Lanp, PP1, PP2A und möglicherweise weitere Proteine beinhaltet.

Der Bereich der cytoplasmatischen Sequenz der  $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit, der für die Interaktion der Phosphatasen PP1 und PP2A nötig ist, konnte auf die konservierte membran-proximale KXGFFKR-Sequenz eingegrenzt werden. Lanp hingegen bindet an die gesamte cytoplasmatische Sequenz der  $\alpha 1$ -Integrin-Untereinheit und an die membran-proximale cytoplasmatische  $\alpha 3$ -Sequenz, jedoch nicht an die KXGFFKR-Sequenz alleine.

Immunfluoreszenz-Studien zeigen, daß Lanp, PP1 und PP2A im Cytosol von PC12-Zellen lokalisiert sind. Die Interaktion mit dem intrazellulären Anteil der  $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit ist demnach möglich.

Die Phosphatasen PP1 und PP2A sind in der Lage, in vitro Phosphat aus Threoninphosphorylierten Peptiden freizusetzen, welche die potentiellen Phosphorylierungsstellen des cytoplasmatischen Anteils der  $\alpha$ 3-Integrin-Untereinheit abbilden. Die PP1 ist außerdem in der Lage, präzipitiertes, phosphoryliertes  $\alpha$ 3 $\beta$ 1-Integrin in vitro zu dephosphorylieren.

Die Überexpression von Lanp in verschiedenen Zelltypen führt zur massiven Anreicherung von Lanp im Zellkern. Das Neuritenwachstum von PC12-Zellen auf Laminin-5-reicher Matrix ist nach Lanp-Überexpression um die Hälfte reduziert.

## Summary

This thesis describes studies on the function of integrin  $\alpha3\beta1$ . Its focus is on the contribution of the  $\alpha3$  subunit, which defines integrin specificity. Integrin  $\alpha3\beta1$  plays an important role during neuronal development and is involved in the NGF-induced outgrowth of neurites in PC12 cells.

Using a ligand-affinity-chromatography approach, eight intracellular proteins from PC12 cytosol were identified that bind to the cytoplasmic tail of the  $\alpha3$ -integrin subunit. Among these are lanp and pal31 (two members of the lanp family), set- $\alpha$  (a distantly related protein thereof) and the two serine/threonine phosphatases PP1 and PP2A, which are subject to regulation by lanp and set- $\alpha$ . The results of affinity chromatography are reproducible and confirmed using DRAL/FHL2 as a positive control for binding to the  $\alpha3$ -integrin subunit.

The interactions of lanp, PP1 and PP2A with the  $\alpha3$ -integrin subunit were confirmed in several pull-down experiments. This finding, combined with the results of gel-filtration and cross-linking experiments, suggests the existence of a multimeric protein complex at the  $\alpha3$ -integrin subunit that comprises lanp, PP1 and PP2A and possibly additional proteins.

The portion of the cytoplasmic sequence of the  $\alpha3$ -integrin subunit that is necessary for the interaction with the phosphatases PP1 and PP2A could be narrowed down to the conserved membrane-proximal KXGFFKR sequence. In contrast, lanp needs the complete cytoplasmic sequence of the  $\alpha1$ -integrin subunit or the membrane-proximal cytoplasmic sequence of  $\alpha3$ -integrin subunit for binding, but does not bind to the KXGFFKR motif alone.

Immunofluorescence studies show that lanp, PP1 and PP2A are localized in the cytosol of PC12 cells. Hence, direct interaction with the intracellular part of the  $\alpha3$ -integrin subunit is possible.

PP1 and PP2A are able to release phosphate in vitro from threonine-phosphorylated peptides that cover the potential phosphorylation sites within the cytoplasmic tail of the  $\alpha 3$ -integrin subunit. PP1 is also able to dephosphorylate precipitated phosphorylated integrin  $\alpha 3\beta 1$  in vitro.

Over-expression of lanp in different cell types leads to a massive enrichment of lanp in the nucleus. In PC12 cells grown on laminin-5-rich matrix, neurite outgrowth is reduced to half of the normal values.