

**Die cytoplasmatische Sequenz der $\alpha 1$ -Integrinuntereinheit:
Analyse der Lipidbindung, der Struktur und des
Signalkomplexes mit Phospholipase C γ 1 im Rahmen der
 $\alpha 1\beta 1$ -Integrin-vermittelten Signaltransduktion**

Dissertation

**zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr.rer.nat.)**

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Diplom-Biochemikerin

Kerstin Tang

aus Demmin

Berlin, März 2010

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Frau Priv.-Doz. Dr. Kerstin Danker von Januar 2006 bis April 2008 am Institut für Biochemie und Molekularbiologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, und ab Mai 2008 am Institut für Biochemie der Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Mitte, angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Petra Knaus

2. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. Kerstin Danker

Datum der Disputation: 03.11.2010

*La lutte elle-même vers les sommets suffit à remplir un
cœur d'homme. Il faut imaginer Sisyphe heureux.*

(Albert Camus)

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Zelluläre Membranen	1
1.2	Integrine	1
1.2.1	Klassifizierung und Funktion	1
1.2.2	Aufbau und Struktur	3
1.2.3	Konformationszustände von Integrinen	4
1.2.4	Aktivierung von Integrinen	5
1.2.4.1	<i>Inside-out</i> -Aktivierung	6
1.2.4.2	<i>Outside-in</i> -Aktivierung	7
1.2.5	Integrinvermittelte Signaltransduktion	7
1.2.5.1	Phospholipase C γ 1 (PLC γ 1)	9
1.2.6	Die cytoplasmatischen Integrindomänen	10
1.2.7	Regulierung von Integrinen	12
1.2.8	Das α 1 β 1-Integrin	13
1.2.8.1	Die α 1-Integrinuntereinheit und ihre cytoplasmatische Sequenz	14
1.3	Phosphoinositide	15
1.3.1	Physikalische Eigenschaften und Signalfunktionen von Membranlipiden	15
1.3.2	Vorkommen und Bedeutung der Phosphoinositide	16
1.3.3	Vorkommen und Funktion von PI(4,5)P $_2$ und PI(3,4,5)P $_3$	17
1.3.4	Die Rolle von PIPs in der integrinvermittelten Zelladhäsion und Zellmigration	18
1.3.5	PIP-metabolisierende Enzyme	19
1.3.5.1	Inositollipidkinasen	19
1.3.5.2	Inositollipidphosphatasen	20
1.3.5.3	Phospholipasen	20
1.3.6	Interaktionen zwischen Proteinen und PIP-haltigen Membranen	21
1.3.6.1	Bedeutung von Protein-PIP-Interaktionen	21
1.3.6.2	PIP-bindende Proteindomänen	21
1.3.6.3	Die Pleckstrin-Homologie (PH)-Domäne	23
1.3.6.4	Unstrukturierte, basische Aminosäuresequenzen	24
1.4	Zielsetzung der Arbeit	24
2	MATERIAL UND METHODEN	27

2.1	Material.....	27
2.1.1	Geräte.....	27
2.1.2	Allgemeines Labormaterial.....	28
2.1.3	Chemikalien und Lösungen.....	29
2.1.4	Reagentien und Inhibitoren.....	29
2.1.5	Antibiotika.....	29
2.1.6	Größenstandards und Marker.....	30
2.1.7	Nukleotide und Oligonukleotide.....	30
2.1.8	Vektoren.....	31
2.1.8.1	Der eukaryonte Expressionsvektor pRc/CMV.....	31
2.1.8.2	Der eukaryonte Expressionsvektor pEGFP.....	31
2.1.8.3	Der bakterielle Expressionsvektor pGEX.....	32
2.1.9	Peptide, Matrixproteine und Antikörper.....	32
2.1.10	Enzyme.....	33
2.1.11	Phospholipide.....	34
2.1.12	Zellen.....	34
2.1.12.1	Bakterienstämme.....	34
2.1.12.2	Säugerzelllinien.....	34
2.1.13	Material für molekularbiologische Methoden.....	35
2.1.14	Material für lipidchemische und biophysikalische Methoden.....	35
2.1.15	Material für protein- und biochemische Methoden.....	36
2.1.16	Material für zellbiologische Methoden.....	36
2.1.17	Software und Datenbanken.....	37
2.2	Methoden.....	38
2.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	38
2.2.1.1	Kultivierung von Bakterien.....	38
2.2.1.2	Bestimmung der optischen Dichte und Lagerung von Bakterienkulturen.....	38
2.2.1.3	Herstellen chemisch-kompetenter Zellen.....	39
2.2.1.4	Transformation von Bakterien mittels Hitzeschock.....	39
2.2.1.5	Transformation von Bakterien mittels Elektroporation.....	39
2.2.1.6	Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (Minipräparation).....	39
2.2.1.7	Isolierung von Plasmid-DNA im großen Maßstab (Maxipräparation).....	40
2.2.1.8	Präzipitation von Plasmid-DNA.....	40

2.2.1.9	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	40
2.2.1.10	Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen.....	41
2.2.1.11	Aufreinigung von löslichen PCR-Produkten oder von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	41
2.2.1.12	Ligation von DNA-Fragmenten	42
2.2.1.13	Klonierung der für die C-SH2- und die N+C-SH2-Domäne der PLC γ 1 kodierenden DNA-Sequenzen in den pEGFP-C1-Expressionsvektor.....	42
2.2.1.14	Sequenzierung von Plasmid-DNA	43
2.2.2	Lipidchemische Methoden	43
2.2.2.1	Herstellen von Lipidlösungen.....	43
2.2.2.2	Langmuir-Filmwaagenmessungen	43
2.2.2.3	Präparation von Liposomen	45
2.2.2.4	Präparation von multilamellaren Vesikeln (MLVs) und großen, unilamellaren Vesikeln (LUVs)	45
2.2.2.5	Präparation von multilamellaren Vesikeln (MLVs) und kleinen, unilamellaren Vesikeln (SUVs)	47
2.2.2.6	Liposomen-Co-Sedimentationstest	48
2.2.2.7	Liposomenvermittelter Protein-Protein-Interaktionstest	48
2.2.2.8	PIP- <i>Strip</i> -Inkubationstest.....	48
2.2.3	Biophysikalische Methoden	49
2.2.3.1	Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie	49
2.2.3.2	Kernmagnetische Resonanz (NMR)-Spektroskopie	50
2.2.4	Computerbasierte Methoden	50
2.2.4.1	Moleküldynamik (MD)-Computersimulation	50
2.2.5	Proteinchemische und biochemische Methoden	51
2.2.5.1	Expression von GST-Fusionsproteinen	51
2.2.5.2	GST-Affinitätschromatographie.....	53
2.2.5.3	Thrombinspaltung von Fusionsproteinen	53
2.2.5.4	Größenausschlusschromatographie (Gelfiltration)	53
2.2.5.5	Kationenaustauschchromatographie	54
2.2.5.6	Aufkonzentrieren und Lyophilisieren von Proteinlösungen.....	54
2.2.5.7	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels UV-Absorption	55
2.2.5.8	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bicinchoninsäure (BCA)-Test.....	55
2.2.5.9	Lagerung von Peptiden und Proteinen	55

2.2.5.10	Gewinnung von Zellysat.....	55
2.2.5.11	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	56
2.2.5.12	Tricin-SDS-PAGE.....	56
2.2.5.13	NuPAGE Gradienten-Gelelektrophorese.....	57
2.2.5.14	Native Gelelektrophorese	57
2.2.5.15	Coomassie-Brillant-Blau (CBB)-Färbung von Polyacrylamidgelen	58
2.2.5.16	Western Blot	58
2.2.5.17	GST- <i>Pulldown</i> -Analyse.....	59
2.2.5.18	Co-Immunopräzipitation (Co-IP).....	60
2.2.6	Zellbiologische Methoden.....	61
2.2.6.1	Herstellen von Nukleotidlösungen als Mediumszusatz	61
2.2.6.2	Beschichtung von Zellkulturmaterial mit Matrixproteinen	61
2.2.6.3	Kultivierung eukaryonter Zelllinien.....	61
2.2.6.4	Kryokonservierung eukaryonter Zellen	62
2.2.6.5	Zellzahlbestimmung mittels Trypanblau und Hämacytometer	62
2.2.6.6	Kollagen IV-Selektion von Zellen	63
2.2.6.7	Transiente Transfektion von Zellen mittels Lipofektion	63
2.2.6.8	Haptotaktischer Migrationstest.....	64
2.2.6.9	Fluoreszenzmikroskopie	65
3	ERGEBNISSE	67
3.1	Untersuchungen zur Struktur der α1-cytoplasmatischen Sequenz.....	67
3.1.1	NMR-Spektroskopie der α 1-cytoplasmatischen Sequenz	67
3.1.1.1	Aufreinigung von ^{15}N -markiertem α 1-cyto-Peptid.....	67
3.1.1.2	^1H - ^{15}N -HSQC-NMR-Spektroskopie	68
3.1.2	CD-Spektroskopie der α 1-cytoplasmatischen Sequenz in Lösung	69
3.1.3	MD-Simulation der α 1-cytoplasmatischen Sequenz in Lösung	71
3.1.3.1	MD-Simulation in Wasser	71
3.1.3.2	MD-Simulation in 100 mM NaCl-Lösung.....	73
3.2	Analyse der Lipidbindung der α1-cytoplasmatischen Sequenz.....	74
3.2.1	PIP- <i>Strip</i> -Inkubationstest	74
3.2.2	Lipid-Co-Sedimentationsversuch.....	76
3.2.3	Langmuir-Filmwaagenmessungen.....	78
3.2.3.1	Interaktion von Integrinpeptiden mit Langmuir-Filmen.....	79

3.2.3.2	Abhängigkeit der Membraninteraktion von der Konzentration von PI(4,5)P ₂ und PI(3,4,5)P ₃	80
3.2.3.3	Einfluss von zweiwertigen Kationen und von Phosphat auf die Membranassoziation der Integrinpeptide.....	81
3.2.4	CD-spektroskopische Messungen der α 1-cytoplasmatischen Sequenz in Gegenwart von Liposomen	86
3.3	Charakterisierung der Interaktion zwischen α1β1-Integrin und PLCγ1	88
3.3.1	Identifizierung der Integrinbindungsmodule im PLC γ 1-Molekül.....	88
3.3.2	Analyse der Interaktion zwischen einzelnen PLC γ 1-Domänen mit Integrinpeptiden in Lösung	91
3.3.2.1	Expression und Aufreinigung von Domänen der PLC γ 1 als GST-markierte Fusionsproteine	91
3.3.2.2	¹ H- ¹⁵ N-HSQC-NMR-Spektroskopie	91
3.3.3	Einfluss von Lipiden auf die Interaktion zwischen α 1 β 1-Integrin und PLC γ 1	96
3.3.3.1	Einfluss von Lipiden auf die Interaktion der α 1-cytoplasmatischen Sequenz mit der PH-Domäne der PLC γ 1	97
3.3.4	Funktion der PLC γ 1 und einzelner PLC γ 1-Domänen in der α 1 β 1-Integrin-abhängigen Signaltransduktion	99
3.3.4.1	Einfluss von PLC γ 1-Domänen auf die α 1 β 1-Integrin-vermittelte Zellmorphologie	99
3.3.4.2	Rolle der PLC γ 1 in der α 1 β 1-Integrin-vermittelten Zellmigration	111
3.3.4.3	Rolle der PH-Domäne der PLC γ 1 in der α 1 β 1-Integrin-abhängigen Zellmigration	111
4	DISKUSSION.....	115
4.1	Untersuchungen zur Struktur der α1-cytoplasmatischen Sequenz.....	115
	In Lösung bildet die α 1-cytoplasmatische Sequenz keine Sekundärstrukturen aus, faltet jedoch auf sich zurück.....	115
4.2	Untersuchung der Interaktion der α1-cytoplasmatischen Sequenz mit Phospholipiden.....	118
	Die cytoplasmatische Sequenz der α 1-Integrinkette assoziiert kopfgruppenabhängig mit PIPs	118
	Das α 1-cyto-Peptid inseriert in Langmuir-Filme in Abhängigkeit von der Konzentration von PI(4,5)P ₂ und PI(3,4,5)P ₃	120
	Die Insertion des α 1-cyto-Peptids in Langmuir-Filme wird maßgeblich durch elektrostatische Interaktionen bestimmt	121
	Die Membraninsertion des α 1-cyto-Peptids wird durch die Verteilung von polaren und unpolaren Resten in dessen Aminosäuresequenz bestimmt	123
	Das N-terminale KIGFFKR-Motiv und die C-terminale PLKKKMEK-Sequenz weisen ein distinktes Membraninsertionsverhalten auf.....	124
	Zelluläre Bedeutung der Integrin-Lipid-Interaktion	126

Die Assoziation mit Phospholipiden führt zu Konformationsänderungen der α 1-Integrinpeptide	129
4.3 Charakterisierung der Interaktion zwischen α1β1-Integrin und PLCγ1	134
Identifizierung der PH- und der C-SH2-Domäne der PLC γ 1 als Bindungsmodule für das α 1 β 1-Integrin.....	134
Einfluss von PIPs auf die Interaktion zwischen α 1 β 1-Integrin und PLC γ 1.....	137
PLC γ 1 reguliert die α 1 β 1-Integrin-abhängige Zellmorphologie und Zellmigration in Abhängigkeit von den cytoplasmatischen Integrinsequenzen	138
4.4 Arbeitsmodell.....	143
5 ZUSAMMENFASSUNG	147
6 SUMMARY	149
7 LITERATUR	151
8 ANHANG.....	179
8.1 Proteinsequenzen	179
8.1.1 α 1-Integrinuntereinheit aus <i>Rattus norvegicus</i>	179
8.1.2 β 1-Integrinuntereinheit (Isoform 1A) aus <i>Homo sapiens</i>	179
8.1.3 Phospholipase C γ 1 aus <i>Rattus norvegicus</i>	180
8.2 Vektorkarten.....	181
8.3 ^1H-^{15}N-HSQC-NMR-Spektren	182
Abkürzungsverzeichnis	189
Publikationen.....	197
Originalarbeiten	197
Vorträge	197
Posterbeiträge.....	197
Stipendien	198
Lebenslauf.....	199
Danksagung	200
Eidesstattliche Erklärung	202

1 EINLEITUNG

1.1 Zelluläre Membranen

Zellen sind von einer Plasmamembran umgeben, die sie von der Umgebung abgrenzt und ihnen Schutz gewährt. Ein intrazelluläres Membransystem bewirkt daneben die subzelluläre räumliche und funktionelle Kompartimentierung. Zusätzlich gewährleisten Zellmembranen essentielle energetische, strukturelle und regulatorische Zellfunktionen.

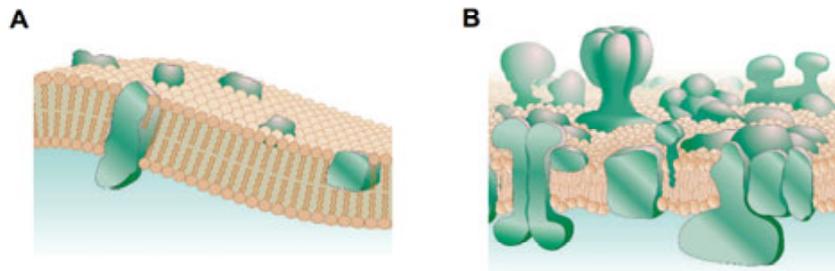


Abb. 1.1: Membranstrukturmodelle. Gezeigt sind das von Singer und Nicholson 1972 vorgeschlagene *Fluid Mosaic*-Modell (A) und das gegenwärtige Membrankonzept (B) [Engelman 2005].

Die Struktur von Zellmembranen wurde erstmals 1972 von Singer und Nicholson mithilfe des *Fluid Mosaic*-Modells beschrieben (Abb. 1.1 A). In einer ca. 6 nm dicken Doppelschicht aus amphipathischen Phospholipiden sind demnach Proteine vereinzelt eingebettet oder angelagert. Gemäß des aktualisierten Modells (Abb. 1.1 B) liegen Membranlipide und -proteine in gleichem Massenverhältnis vor, sind innerhalb von Membranen ungleichmäßig verteilt und stehen in komplexen Beziehungen miteinander. Zellmembranen gelten als strukturell und funktionell äußerst heterogen [Gennis 1989, Engelman 2005]. Den Hauptanteil (75-80%) der Membranlipide machen Glycerophospholipide aus, gefolgt von Glykosphingolipiden (20-25%) und Sterolen [Eyster 2007, van Meer *et al.* 2008]. Einerseits beherbergen und modulieren Membranlipide die assoziierten Proteine; andererseits bestimmen sie Fluidität, Krümmung und Dicke der Membran [Dowhan & Bogdanov 2002, Marsh 2007] (1.3.1). Die mit Membranen assoziierten Proteine umfassen nahezu alle bekannten Klassen, von Rezeptoren (1.2) und Transportern hin zu Enzymen sowie Signal- und Strukturproteinen [Eyster 2007].

1.2 Integrine

1.2.1 Klassifizierung und Funktion

Integrine gehören neben den Selektinen, Cadherinen und Adhäsionsmolekülen der Ig-Superfamilie (*cell adhesion molecules*, CAMs) zu den Zelladhäsionsrezeptoren. Integrine vermit-

tehn Zell-Zell- und Zell-Pathogen-Interaktionen und gelten als wichtigste Rezeptoren für Proteine der Extrazellulären Matrix (EZM) [Hynes 2002, Takada *et al.* 2007]. Integrine werden in Metazoen exprimiert und sind hoch konservierte, glykosylierte Transmembranproteine vom Typ I. Die beiden Untereinheiten α und β werden nicht-kovalent im ER zusammengeführt und als Heterodimer an die Zelloberfläche transportiert. Gegenwärtig sind im Säuger 18 α - und 8 β -Ketten bekannt, die zu 24 distinkten Integrinrezeptoren kombiniert werden (Abb. 1.2). Die Paarungsspezifität wird hierbei durch Sequenzen beider Ketten in der N-terminalen Kopfdomäne bestimmt (1.2.2) [Humphries 2000, Barczyk *et al.* 2009].

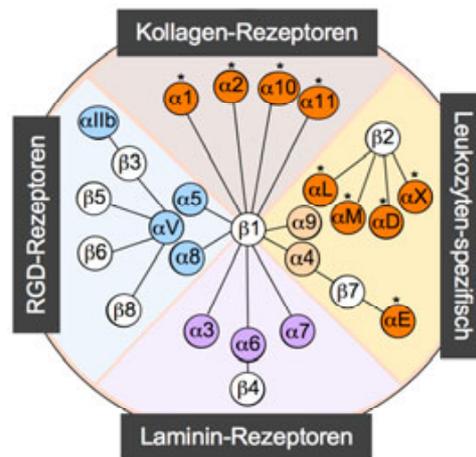


Abb. 1.2: Integrinrezeptoren im Säuger. Integrine sind nicht-kovalente Heterodimere aus einer der 18 α - und einer der 8 β -Untereinheiten, die gemäß ihrer Expression oder Ligandenbindung klassifiziert werden¹. Integrine, deren α -Untereinheit eine I-Domäne enthält, sind markiert (*). Die Abbildung wurde verändert nach [Barczyk *et al.* 2009].

Jedes $\alpha\beta$ -Integrin weist ein individuelles Expressionsmuster und ein spezifisches Ligandenrepertoire auf. Dementsprechend erfolgt die Einteilung von Integrinen in vier Gruppen (Abb. 1.2). Zu den Liganden gehören Strukturproteine der EZM wie Kollagen, Laminin oder Fibronectin, als auch Plasmaproteine wie der von Willebrand-Faktor und lösliches Fibrinogen. Ebenso dienen auf der Oberfläche anderer Zellen exprimierte Cadherine oder CAMs als Integrinliganden. Die $\beta 2$ - und die $\beta 7$ -Integrine werden aufgrund ihrer Expression als Leukozyten-Integrine bezeichnet [Hynes 2002, Takada *et al.* 2007].

Ihre Bezeichnung verdanken die Integrine ihrer Funktion, das intrazelluläre Aktincytoskelett und den Extrazellularraum miteinander zu verbinden² [Hynes *et al.* 1987]. Integrine vermit-

¹ Ein häufig vorkommendes Bindemotiv für Integrine in EZM-Proteinen wie Fibronectin und Vitronectin ist das Tripeptid Arginin-Glycin-Aspartat (RGD).

² Englisch: *to integrate*

teln diverse zelluläre Prozesse, die eine Organisation des Cytoskeletts beinhalten, wie Zelladhäsion, -spreiten und -migration und die Extravasation von Leukozyten ins Gewebe. Desweiteren werden durch Integrine Vorgänge wie Genexpression, Zellproliferation und -differenzierung als auch Apoptose beeinflusst (1.2.5) [van der Flier & Sonnenberg 2001].

Integrine sind für viele physiologische Prozesse von großer Bedeutung. Sie sind an Embryonalentwicklung, Wundheilung, Regulierung der Immunantwort, Blutgerinnung, Hämostase, Angiogenese und der Aufrechterhaltung der Gewebsintegrität beteiligt. Die funktionelle Relevanz von Integrinen wird an Funktionsstörungen und Krankheiten ersichtlich, die aus der veränderten Expression oder Fehlregulation dieser Proteine resultieren. Hierzu zählen verschiedene entzündliche und kardiovaskuläre Erkrankungen, Psoriasis, Thrombose, Blutgerinnungs- und Wundheilungsstörungen, Immundefizienz und Muskeldystrophien. Auch in der Tumorentstehung und -progression sowie der Metastasierung sind Integrine involviert [Etzioni 1996, Huvneers *et al.* 2007, Kinashi 2007].

1.2.2 Aufbau und Struktur

Beide Integrinketten besitzen eine große extrazelluläre Domäne, eine Transmembranhelix (TMH) und eine kurze cytoplasmatische Sequenz, die mit Ausnahme der $\beta 4$ -Untereinheit (UE) 15-77 Aminosäuren umfasst. Das Molekulargewicht der α -Kette beträgt 120-180 kDa, das der β -Kette 110-130 kDa. Die Sequenzhomologie der α -Untereinheiten beträgt 30% und die der β -Ketten 45% [Takada *et al.* 2007]. Zwischen der α - und der β -UE selbst besteht keine Ähnlichkeit.

Bislang wurde keine Kristallstruktur eines kompletten Integrinrezeptors erstellt. Als erste Struktur einer Integrinextradomäne wurde die des $\alpha V \beta 3$ -Integrins im freien und im ligandenbesetzten Zustand präsentiert [Xiong *et al.* 2001, Xiong *et al.* 2002]. Abb. 1.3 zeigt die extrazelluläre Basisstruktur der Integrine als einen ligandenbindenden Kopf, der auf zwei Beinen von 16 Å Länge ruht. Der siebenblättrige β -Propeller in der Kopfregion der α -Kette beherbergt in den Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 10$, $\alpha 11$, αM , αD , αE , αX und αL eine I-Domäne [Heino 2000], die an der ionenabhängigen Ligandenbindung beteiligt ist [Lee *et al.* 1995, Arnaout *et al.* 2007]. Der Kopfbereich der β -UE enthält neben dem PSI (Plexin-Semaphorin-Integrin)-Modul eine Hybrid-Domäne, in die eine I-ähnliche Domäne inseriert ist. Die β -I-Domäne bildet zusammen mit dem β -Propeller bzw. der I-Domäne der α -UE eine Kontaktfläche, mit der die Ligandenbindung erfolgt [Hynes 2002, Takada *et al.* 2007].

Die Beinregion der α -Kette wird in einen „Schenkel“ und zwei „Waden“ unterteilt. In der β -UE sind hier vier EGF-ähnliche Sequenzen und eine membranproximale β -tail-Domäne lokalisiert [Takagi *et al.* 2001, White *et al.* 2004, Arnaout *et al.* 2007, Takada *et al.* 2007].

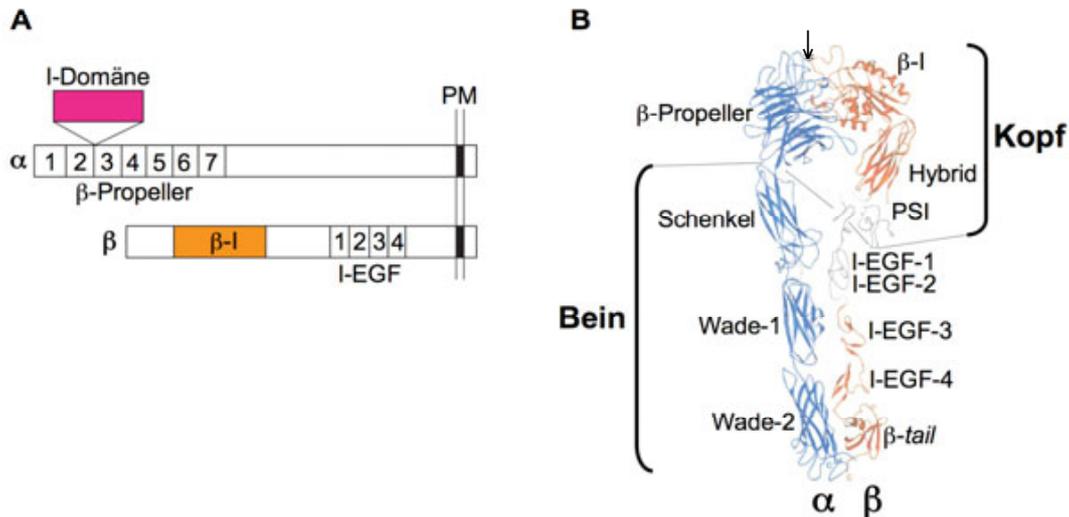


Abb. 1.3: Aufbau von Integrinen. (A) Schema der beiden Integrinuntereinheiten [Takada *et al.* 2007]. (B) Struktur der Ektodomäne des α V β 3-Integrins [Xiong *et al.* 2001]. Der Pfeil markiert die Position der I-Domäne in anderen α -Ketten. Die Abbildung wurde verändert nach [Hynes 2002].

Informationen über die Struktur der Transmembrandomäne (TMD) wurden bislang nur für die α IIb- und die β 3-Integrinuntereinheit erhalten. Diese lagert sich hierbei schräg (β 3) bzw. senkrecht (α IIb) in die Plasmamembran ein [Lau *et al.* 2008a, Lau *et al.* 2008b]. Auf die cytoplasmatischen Integrinsequenzen wird näher in Abschnitt 1.2.6 eingegangen.

1.2.3 Konformationszustände von Integrinen

Integrine liegen in distinkten Konformationszuständen vor, die mit verschiedenen Stadien physiologischer Aktivität korrelieren [Beglova *et al.* 2002, Takagi *et al.* 2002, Takagi & Springer 2002, Kim *et al.* 2004, Ma *et al.* 2007]. Abb. 1.4 A zeigt den inaktiven Zustand, in dem weder Ligandenbindung noch intrazelluläres *Signalling* erfolgen. Die zugehörige Konformation wird als „geschlossen“ oder „gebeugt“ bezeichnet, da beide Ketten vollständig und eng miteinander assoziiert sind und die Kopffregion weit in Richtung Membran abgeknickt ist. Dem gegenüber steht die „offene“, „ausgestreckte“ Konformation (Abb. 1.4 C), in der das Integrin eine erhöhte Ligandenaffinität aufweist. Die Ligandenbindestelle in der Kopffregion ist hier zugänglich, und die α - und die β -Kette sind in dem Beinbereich voneinander dissoziiert.

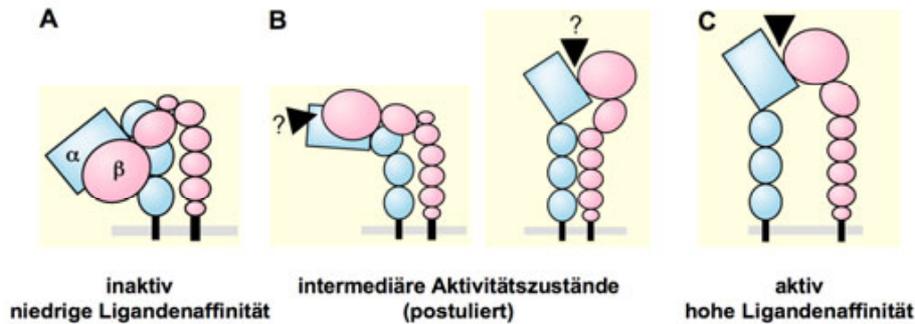


Abb. 1.4: Konformationszustände von Integrinen. Integrine liegen in einer inaktiven, geschlossenen (A) oder einer aktiven, offenen (C) Konformation vor. Verschiedene Intermediärzustände werden postuliert (B). Der extrazelluläre Ligand wird durch ein Dreieck symbolisiert [Mould & Humphries 2004].

Da Ligandenbindung auch im gebeugten Zustand nachgewiesen wurde [Adair *et al.* 2005], werden intermediäre Affinitätszustände postuliert, in denen das Integrinmolekül präaktiviert ist (Abb. 1.4 B) [Sarantos *et al.* 2005]. Es wird vermutet, dass die verschiedenen Integrinkonformationen in einem dynamischen Gleichgewicht vorliegen. Welche Konformation stabilisiert wird, hängt von der Aktivität intrazellulärer Faktoren und der Konzentration extrazellulärer Liganden ab [Takagi *et al.* 2002, Takagi & Springer 2002, Humphries *et al.* 2003, Mould & Humphries 2004, Springer & Wang 2004, Luo & Springer 2006].

Die inaktive Integrinkonformation wird zum einen durch intramolekulare Interaktionen zwischen Kopf- und Beinbereich in der β -UE stabilisiert [Arnaout *et al.* 2007]. Daneben existieren Kontaktflächen zwischen α - und β -Kette im extrazellulären, membrannahen Bereich [Kashiwagi *et al.* 1999, Ruiz *et al.* 2001, Takagi *et al.* 2001, Vomund *et al.* 2008]. Essentiell für die Stabilisierung des inaktiven Zustands sind die sogenannten Klammern im TM- und im intrazellulären Bereich (1.2.6). So wurden mittels *in vitro*- und *in silico*-Studien heterodimere Interaktionen im Bereich der TMD identifiziert, die auf van der Waals-Interaktionen und Wasserstoffbrückenbindungen beruhen [Adair & Yeager 2002, Gottschalk *et al.* 2002, Li *et al.* 2002, Schneider & Engelman 2004, Luo *et al.* 2005, Partridge *et al.* 2005].

1.2.4 Aktivierung von Integrinen

Integrinaktivierung, d.h. die Erhöhung der Ligandenaffinität, ist mit dem Übergang von geschlossener zu offener Konformation verbunden [Takagi & Springer 2002] und bedarf der Dissoziation beider Untereinheiten [Springer & Wang 2004]. Daneben betreffen die strukturellen Umlagerungen die Kopfreion einschließlich der Ligandenbindestelle, die Haltung des Integrinrezeptors und die Positionierung der beiden Untereinheiten zur Plasmamembran [Hynes 2002, Luo & Springer 2006, Arnaout *et al.* 2007].

Große Bedeutung wird dem Aufbrechen der Klammern in den cytoplasmatischen Sequenzen, in dem TM-Bereich und der Ektodomäne zugeschrieben [Ginsberg *et al.* 2001, Takagi & Springer 2002, Kim *et al.* 2003, Luo *et al.* 2004b]. So setzt sich das initiale Aufbrechen der intrazellulären Klammer über die TM-Region des Integrinmoleküls in seine Ektodomäne fort. Dadurch nimmt das Integrin den ausgestreckten Zustand an, die Kopfdomäne schnell klappmesserartig nach oben, und die Ligandenbindestelle wird zugänglich [Beglova *et al.* 2002, Luo *et al.* 2007]. Bezüglich der Konformationsänderungen in den Transmembrandomänen und den cytoplasmatischen Sequenzen werden gegenwärtig das Scheren- und das Separationsmodell favorisiert (Abb. 1.5). Die im inaktiven Zustand assoziierten Membranhelices klappen hierbei wie die Blätter einer Schere an einem Fixpunkt auseinander oder trennen sich vollständig voneinander [Wegener & Campbell 2008].

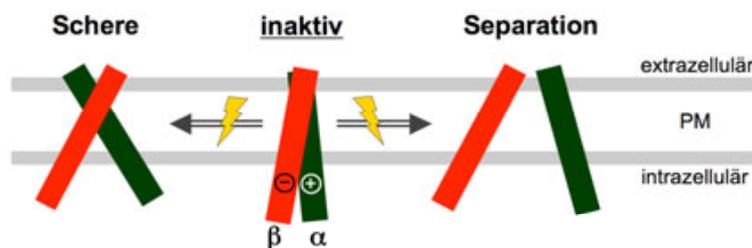


Abb. 1.5: Modelle der Konformationsänderungen der Transmembran- und der cytoplasmatischen Domänen während der Aktivierung von Integrinen. Die α - β -intermolekulare Salzbrücke, die als Teil der cytoplasmatischen Klammer den inaktiven Zustand fixiert, ist mithilfe von Plus- und Minuszeichen verdeutlicht. Die Integrinaktivierung wird durch einen Blitz symbolisiert. Die Abbildung wurde verändert nach [Imai *et al.* 2008, Wegener & Campbell 2008]. PM: Plasmamembran

1.2.4.1 *Inside-out*-Aktivierung

Die *Inside-out*-Aktivierung ist insbesondere für Leukozyten- und Thrombozyten-Integrine erforscht. In diesem Prozess erhöhen intrazelluläre Signale die Affinität der Integrine für ihren extrazellulären Liganden, indem sie die Bindung des Adaptermoleküls Talin mit dessen FERM³-Domäne an die cytoplasmatische Sequenz der β -UE stimulieren [Patil *et al.* 1999, Calderwood *et al.* 2002, Vinogradova *et al.* 2002, Tadokoro *et al.* 2003, Li *et al.* 2007, Bouaouina *et al.* 2008]. Dadurch wird die Interaktion zwischen den intrazellulären Domänen der Integrinketten unterbrochen, die daraufhin um mehr als 100 Å auseinander weichen [Kim *et al.* 2003]. Die stimulierenden Signale werden zuvor durch die Aktivierung von G-Protein- oder Tyrosinkinase-gekoppelten Rezeptoren oder des T-Zell-Rezeptor-Komplex' generiert und zu Talin weitergeleitet [Springer & Wang 2004].

³ FERM = Bande 4.1-Protein, Ezrin, Radixin, Moesin

Kürzlich wurde mit Kindlin ein zweites Protein identifiziert, das über seine FERM-Domäne die Integrinaktivierung stimuliert. Da Kindline allein Integrine nicht in den hochaffinen Zustand versetzen können, wird ihre synergistische Kooperation mit Talin vermutet [Banno & Ginsberg 2008, Ma *et al.* 2008, Moser *et al.* 2009].

1.2.4.2 *Outside-in*-Aktivierung

Die *Outside-in*-Integrinaktivierung kann durch die Bindung von extrazellulären Liganden, divalenten Kationen oder aktivierenden Antikörpern induziert werden [Takagi *et al.* 2003]. Voraussetzung ist, dass das Integrin in einem intermediären Affinitätszustand mit zugänglicher Ligandenbindestelle vorliegt [Takagi 2007]. Es wird kontrovers diskutiert, ob die *Outside-in*-Aktivierung ebenfalls mit einer Dissoziation von α - und β -Kette einhergeht. Die Art des extrazellulären Stimulus' scheint dies zu beeinflussen [Hantgan *et al.* 1999, Takagi *et al.* 2002, Kim *et al.* 2003, Luo *et al.* 2004a, Partridge *et al.* 2005].

1.2.5 Integrinvermittelte Signaltransduktion

Integrine verfügen über keine enzymatische Aktivität. Im ligandengebundenen Zustand initiieren sie intrazelluläre Signalwege, indem ihre cytoplasmatischen Domänen Interaktionen mit Signalproteinen und cytoskelettassoziierten Proteinen eingehen.

Zunächst bewirkt die Bindung an den extrazellulären, multivalenten Liganden das laterale Anhäufen mehrerer hundert Integrinmoleküle in der Plasmamembran, das sogenannte *Clustering*, das die Avidität der Integrine gegenüber ihren Liganden erhöht [Cluzel *et al.* 2005]. An die cytosolischen Integrinsequenzen wird daraufhin eine Vielzahl von intrazellulären Proteinen über direkte oder indirekte Interaktionen rekrutiert. So entstehen an den Kontaktpunkten zwischen den Integrinen und der EZM dynamische Proteinkomplexe, die im frühen Zustand fokale Kontakte oder fokale Komplexe und nach Stabilisierung fokale Adhäsionen genannt werden. Diese verankern das Aktincytoskelett und sind Startpunkte intrazellulärer Signalwege [Ginsberg *et al.* 2005](Abb. 1.6).

In fokalen Adhäsionen sind bis zu 150 verschiedene Proteine zu finden [Zaidel-Bar *et al.* 2007, Geiger *et al.* 2009]. Dazu zählen Strukturproteine, Tyrosinkinasen, lipidmodifizierende Enzyme, Serin/Threonin-Kinasen, Phosphatasen, Proteasen, Adapterproteine und Modulatoren der kleinen Rho- und Arf-GTPasen [Price *et al.* 1998, Schlaepfer & Hunter 1998, Miranti 2002, McCall-Culbreath & Zutter 2008]. Die sequentielle Rekrutierung der Proteine in die

fokalen Adhäsionen wird präzise reguliert, und die Identität der Proteine und deren posttranslationale Modifizierungen bestimmen, welche Signalwege angeschaltet werden [Lo 2006].

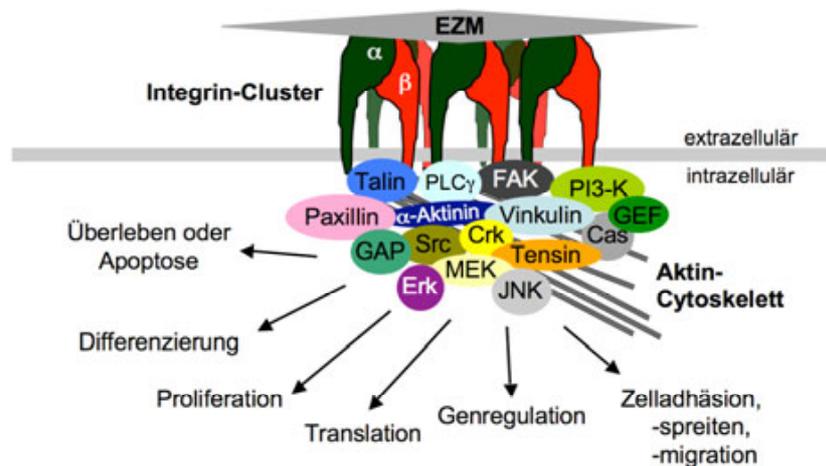


Abb. 1.6: Aufbau und Funktion von fokalen Adhäsionen. Im ligandengebundenen Zustand rekrutieren Integrine eine Vielzahl von Signalproteinen und cytoskelettassoziierten Proteinen an ihre cytoplasmatischen Domänen und initiieren so verschiedene zelluläre Signalwege. Die Abbildung macht keine Aussagen über spezifische Protein-Protein-Interaktionen. Abkürzungen sind im Abkürzungsverzeichnis erläutert. Die Abbildung wurde modifiziert nach [van der Flier & Sonnenberg 2001, Berrier & Yamada 2007].

Das Protein Talin besitzt neben seiner Rolle in der Aktivierung von Integrinen (1.2.4.1) die Funktion, deren Verbindung zum Aktincyto skelett herzustellen bzw. weitere Signalproteine und cytoskelettassoziierte Proteine wie Paxillin oder Vinkulin in die fokalen Komplexe zu rekrutieren. Ein anderes Protein, das früh in die fokalen Kontakte gelangt, ist die fokale Adhäsionskinase (FAK), die eine zentrale Rolle bei der integrinvermittelten Signaltransduktion einnimmt [Mitra *et al.* 2005]. Durch Bindung an die cytoplasmatische Domäne der β -Integrinkette wird die Autoinhibition der FAK aufgehoben und letztere aktiviert. Auto-phosphorylierte FAK ist dann für weitere Komplexbildung mit und Phosphorylierung durch Src zugänglich [Lietha *et al.* 2007]. Beide Kinasen aktivieren eine Vielzahl weiterer Proteine und stimulieren so integrinvermittelte Funktionen wie Cytoskelettorganisation und Genregulation [Hervy *et al.* 2006].

Integrine können nach Ligandenbindung phosphoryliert werden [McCall-Culbreath & Zutter 2008]. Ein markantes Ereignis integrinabhängiger Zelladhäsion und Voraussetzung für deren Signaltransduktion ist zudem die Tyrosinphosphorylierung von fokalen Adhäsionsproteinen [Kornberg *et al.* 1991] durch FAK oder Mitglieder der Familie der Src-Kinasen (SFKs) [Schlaepfer & Hunter 1998, Arias-Salgado *et al.* 2003, Cluzel *et al.* 2005]. Über die fokalen Adhäsionen werden integrinabhängig auch mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAPK) und Enzyme aktiviert, die den Stoffwechsel von Phosphoinositiden oder calcium-

abhängige Signalwege beeinflussen [Aplin & Juliano 1999, van der Flier & Sonnenberg 2001].

Integrininduzierte Signalwege kooperieren häufig mit denen anderer Oberflächenrezeptoren. So wird adhäsionsabhängiges Zellwachstum beispielsweise in Zusammenarbeit mit Wachstumsfaktorrezeptoren vermittelt [Brunton *et al.* 2004].

1.2.5.1 Phospholipase C γ 1 (PLC γ 1)

Eines der in integrinvermittelter Signaltransduktion eingebetteten Proteine ist Phospholipase C γ (PLC γ). PLC γ hydrolysiert die Phosphodiesterbindung am C3-Atom von Phosphatidylinositol(4,5)bisphosphat (PI(4,5)P₂, 1.3.3) und generiert so die zwei *Second messenger*-Moleküle Inositol(1,4,5)trisphosphat (I(1,4,5)P₃) und Diacylglycerol (DAG). Zwei Isoformen der PLC γ existieren, von denen PLC γ 1 ubiquitär und PLC γ 2 in hämatopoetischen Zellen exprimiert wird.



Abb. 1.7: Domänenstruktur der humanen PLC γ 1. N': N-terminal, PH: Pleckstrin-Homologie, PLC α,γ : die zwei Hälften des katalytisch aktiven Zentrums, s: *split* (gespalten), SH: Src-Homologie, C2: zu der calciumbindenden Domäne 2 der PKC homolog, C': C-terminal. Die Abbildung wurde modifiziert nach [Golemis & Adams 2005].

PLC γ 1 ist ein monomeres Protein mit einem Molekulargewicht von 148 kDa (Abb. 1.7). Am N-Terminus beherbergt es eine PH-Domäne, und zentral sind zwei SH2-Domänen sowie eine SH3-Domäne lokalisiert. Das katalytische Zentrum der PLC γ 1 setzt sich aus zwei separaten Anteilen zusammen, die bei der Molekülaktivierung in räumliche Nähe zueinander gelangen. Ebenfalls getrennt liegen die zwei gespaltenen (*split*) Hälften einer zentralen PH-Domäne vor. Im C-terminalen Bereich ist eine C2-ähnliche Domäne lokalisiert. Mit den Resten S1248, Y472, Y771, Y775, Y783 und Y1254 wurden eine Serin- und fünf Tyrosinphosphorylierungsstellen identifiziert. Für die Lipaseaktivität der PLC γ 1 gilt die Phosphorylierung von Y783 als essentiell [Kim *et al.* 1990, Wahl *et al.* 1990, Park *et al.* 1991, Wang *et al.* 2006].

PLC γ 1 wird durch Membranrekrutierung und Tyrosinphosphorylierung aktiviert [Sekiya *et al.* 1999b]. Letztere kommt entweder direkt durch die Bindung der SH2-Domänen der PLC γ 1 an Wachstumsfaktorrezeptoren mit Tyrosinkinaseaktivität oder an lösliche Tyrosinkinasen zustande, die durch Oberflächenrezeptoren aktiviert werden [Zhang *et al.* 1999, Tvorogov *et*

al. 2005]. Die Membranassoziation der PLC γ 1 wird durch die Bindung der PH-Domäne an PI(3,4,5)P₃ vermittelt und ist wichtige Voraussetzung für die Funktion der PLC γ 1 [Falasca *et al.* 1998, Kavran *et al.* 1998].

Durch die Generierung der Botenstoffe I(1,4,5)P₃ und DAG stimuliert PLC γ 1 den Calciumausstrom aus dem ER und aktiviert so die PKC. PLC γ 1 ist zudem in wachstumsfaktorabhängiger Zellmotilität, Chemotaxis, Neuritenwachstum, Angiogenese, Genregulation, Proliferation und Apoptose sowie in T-Zell-Aktivierung und -*Signalling* involviert [Carpenter & Ji 1999, Liu & Ye 2005]. Daneben übt PLC γ 1 als Adaptermolekül oder als Guaninnukleotid-austauschfaktor lipaseunabhängige Funktionen aus, die durch Protein-Protein-Interaktionen einzelner PLC γ 1-Domänen vermittelt werden. Da sowohl die PLC γ 1 als auch die Phosphoinositid-3'-Kinase (PI3-Kinase, 1.3.5.1)) PI(4,5)P₂ als Substrat verwenden, greifen PLC γ 1- und PI3-Kinase-vermittelte Funktionen ineinander.

PLC γ 1 wird ebenfalls integrinabhängig aktiviert, wie für β 1- und β 2-Integrine gezeigt wurde [Cybulsky *et al.* 1993, Kanner *et al.* 1993, Wrenn *et al.* 1996, Langholz *et al.* 1997, Tvorogov *et al.* 2005]. PLC γ 1 wurde zudem in fokalen Adhäsionen lokalisiert [Wang *et al.* 2005] und ist an integrinvermittelter Zelladhäsion und -migration beteiligt [Kundra *et al.* 1994, Shepard *et al.* 2007, Wang *et al.* 2007]. Insbesondere wurde die Rolle der PLC γ 1 in der Zelladhäsion, -spreitung und -migration nach Aktivierung des α 5 β 1-Integrins beschrieben [Jones *et al.* 2005, Tvorogov *et al.* 2005, Choi *et al.* 2007]. Neben der Vermittlung integrinabhängiger Signalwege wurde auch die Rolle der PLC γ 1 in der *Inside-out*-Aktivierung und in der Aviditätsmodulierung von Integrinen demonstriert, in deren Folge Thrombozytenaggregation, T-Zell-Adhäsion und -Aktivierung sowie Monozytenarretierung stimuliert werden [Driessens *et al.* 1997, Langholz *et al.* 1997, Nagel *et al.* 1998, Vossmeier *et al.* 2002, Wells *et al.* 2003, Hyduk *et al.* 2007].

1.2.6 Die cytoplasmatischen Integrindomänen

Mit Ausnahme der β 4-Kette umfassen die intrazellulären Integrindomänen 15-77 Aminosäuren. Die β 4-cytoplasmatische Sequenz besitzt hingegen rund 1000 Aminosäuren und assoziiert mit Intermediärfilamenten anstelle des Aktincytoskeletts [de Pereda *et al.* 1999].

Die cytoplasmatischen Integrindomänen erfüllen mehrere Funktionen. Zum einen vermitteln sie die für die Oberflächenexpression notwendige Heterodimerisierung. Daneben fixieren sie durch die Ausbildung einer membranproximalen Klammer, die auf hydrophoben und elek-

trostatischen Interaktionen beruht, den inaktiven Zustand [O'Toole *et al.* 1994, Hughes *et al.* 1995, Hughes *et al.* 1996, Vinogradova *et al.* 2002] und spielen eine bedeutende Rolle bei der *Inside-out*-Aktivierung von Integrinen [Lu *et al.* 2001] (1.2.3 und 1.2.4.1). Zwischen den membranproximalen Resten Arginin der α -Kette und Aspartat der β -Kette besteht dabei eine Salzbrücke, die als universell postuliert [O'Toole *et al.* 1994, Hughes *et al.* 1996, Li *et al.* 2003, Partridge *et al.* 2005] und für die Integrine α IIB β 3, α L β 2, α 4 β 1 und α 4 β 7 bestätigt wurde [Vinogradova *et al.* 2002, Semmrich *et al.* 2005, Ghevaert *et al.* 2008, Imai *et al.* 2008]. Im aktivierten Zustand initiieren die cytoplasmatischen Integrinsequenzen zudem diverse zelluläre Signalwege (1.2.5).

Gemäß der *Positive-inside-rule* beginnt die intrazelluläre Sequenz eines integralen Membranproteins mit der ersten geladenen Aminosäure im Anschluss an die hydrophobe TMD [von Heijne 1992]. Bei dieser Aminosäure handelt es sich in beiden Integrinketten nahezu immer um einen Lysinrest. Diesem folgen vier bis sieben unpolare Aminosäuren, denen sich zwei bis drei geladene Reste anschließen [Williams *et al.* 1994, Calderwood 2004]. Dieses membranproximale Motiv ist in beiden Ketten hochkonserviert und lautet KxGFFKR für die α - und KLLxxxHDR(R/K)E für die β -UE [Moser *et al.* 2009], wobei x häufig eine unpolare Aminosäure darstellt. Die GFFKR-Sequenz ist essentiell für die Heterodimerisierung des Rezeptors im ER, den Transport zur Zelloberfläche [De Melker *et al.* 1997, Peyruchaud *et al.* 1998] und die Fixierung der inaktiven Konformation [Ma *et al.* 2007]. Die Bedeutung der membranproximalen Bereiche beider Untereinheiten an der Aufrechterhaltung des inaktiven Integrinzustandes und an der Integrinaktivierung wird durch diverse Substitutions- und Deletionsmutanten dieser Regionen in der α IIB-, α L- oder β 3-Kette verdeutlicht, die konstitutiv-aktive Integrine hervorrufen [O'Toole *et al.* 1994, Hughes *et al.* 1995, Hughes *et al.* 1996, Lu & Springer 1997, Semmrich *et al.* 2005, Ghevaert *et al.* 2008]. Während die cytoplasmatische Sequenz der β -Ketten äußerst homolog ist, folgt dem GFFKR-Motiv in der α -Kette eine jeweils individuelle Sequenz.

Die β -cytoplasmatische Domäne besitzt ein bis zwei NxxY/NPxY-Internalisierungsmotive, die von Proteinen mit PTB- oder SH2-Domänen gebunden werden [Calderwood *et al.* 1999, Pellinen *et al.* 2006, Ma *et al.* 2008, Montanez *et al.* 2008, Moser *et al.* 2008]. Zu den zahlreichen Bindungspartnern der β -Kette gehören cytoskelettassoziierte Proteine (α -Aktinin, Talin, Filamin, Myosin, Skelemin), Adapter- und Signalproteine (Kindlin, ICAP1, RACK1, Cytohesin, Shc, Grb2) und Kinasen (ILK, FAK, SFKs) [Liu *et al.* 2000, Harburger & Calderwood 2009]. Für die α -Kette hingegen sind nur wenige Interaktionspartner bekannt

[Ginsberg *et al.* 2005]. An das konservierte GFFKR-Motiv binden die kleine GTPase Rab21 [Pellinen *et al.* 2006] und das ER-assoziierte Protein Calreticulin, die das Integrinrecycling bzw. das integrinvermittelte Calcium-*Signalling* beeinflussen [Coppolino *et al.* 1997]. Andere intrazelluläre Proteine binden spezifisch an einzelne α -Ketten und spezifizieren so die Signaltransduktion des Integrinrezeptors [Harburger & Calderwood 2009]. Hierzu zählen die Interaktionen $\alpha4/\alpha9$ -Paxillin [Liu *et al.* 1999], $\alpha5$ -Nischarin [Alahari & Nasrallah 2004], αIIb -CIB [Naik *et al.* 1997], αIIb -Talin [Knezevic *et al.* 1996], $\alpha3/\alpha7$ -FHL2 [Wixler *et al.* 2000] und αL -RAPL [Katagiri *et al.* 2003].

Gemeinhin werden die intrazellulären Integrinsequenzen als unstrukturiert betrachtet [Wegener & Campbell 2008]. Die Struktur der einzelnen cytoplasmatischen Integrindomänen als auch ihrer heterodimeren Interaktionsfläche wurde insbesondere für das $\alpha\text{IIb}\beta3$ -Integrin untersucht [Haas & Plow 1996, 1997, Vallar *et al.* 1999, Vinogradova *et al.* 2000, Li *et al.* 2001, Ulmer *et al.* 2001, Vinogradova *et al.* 2002, Weljie *et al.* 2002, Vinogradova *et al.* 2004, Bhunia *et al.* 2009]. Die resultierenden Ergebnisse waren dabei aufgrund unterschiedlicher experimenteller Bedingungen widersprüchlich und reichten von ungefalteter Konformation hin zu lokal variabel ausgebildeten Strukturen, die eine α -Helix oder eine *Turn*-Struktur umfassten. Die heterodimere Assoziation zwischen den intrazellulären Integrindomänen gilt aufgrund mikromolarer Dissoziationskonstanten in jedem Fall als schwach [Vallar *et al.* 1999, Bhunia *et al.* 2009].

1.2.7 Regulierung von Integrinen

Für einen korrekten und spezifischen Ablauf integrinabhängiger Signalprozesse ist eine zeitlich-räumliche Regulierung der Integrine essentiell. So müssen beispielsweise bei der Zellmigration fokale Adhäsionen dynamisch auf- und abgebaut und das Cytoskelett reorganisiert werden, um eine effektive Fortbewegung der Zelle zu ermöglichen [Horwitz & Hunter 1996, Sanchez-Madrid & del Pozo 1999].

Neben der Erhöhung der Ligandenaffinität im Zuge der *Inside-out*-Aktivierung verstärken *Clustering*-bedingte Aviditätseffekte die Ligandenbindung der Integrine (1.2.4.1 und 1.2.5) [Li *et al.* 2001, Carman & Springer 2003, Kim *et al.* 2004]. Um adhäsionsvermittelte Signaltransduktion zu beenden, müssen Integrine von ihrem extrazellulären Liganden dissoziieren. Zudem müssen die intrazellulären Multiproteinkomplexe aufgelöst oder umgebaut werden [Rid *et al.* 2005, Lock *et al.* 2008]. Durch Phosphorylierung, Dephosphorylierung und calpainvermittelte Proteolyse, sowohl der Integrinsequenzen als auch der mit ihnen asso-

zierten Moleküle, werden Protein-Protein-Interaktionen moduliert. Intrazelluläre Zugkräfte können ebenfalls zu einem Auflösen der fokalen Adhäsionen beitragen [Harburger & Calderwood 2009]. In fokalen Adhäsionen sind die Proteinkinasen PKC und PKA sowie die Phosphatasen PP2A und PTP-1 lokalisiert [Blystone *et al.* 1997, Valmu *et al.* 1999]. Die Phosphorylierung des NPxY-Motivs durch Src beendet dessen Interaktion mit Talin und stimuliert die Bindung konkurrierender Proteine [Kiema *et al.* 2006, Oxley *et al.* 2008, Takala *et al.* 2008]. Neben der Beeinflussung der Signaleigenschaften moduliert die Phosphorylierung der intrazellulären Integrindomänen auch die Konformation und die Aktivierungsempfänglichkeit des Integrinrezeptors [Fagerholm *et al.* 2004, Harburger & Calderwood 2009]. Im Zuge der Zellmigration werden Integrine zudem gezielt endocytisiert und durch intrazelluläre Transportvorgänge an der Zellfront wieder exponiert [Schmidt *et al.* 1995, Puklin-Faucher & Sheetz 2009].

Darüber hinaus ermöglichen laterale Interaktionen der Integrine mit anderen Membranproteinen die gegenseitige Modulierung ihrer Zelloberflächenexpression, Aktivierung und Funktion und können so ein synergistisches *Signalling* bewirken. Zu den lateralen Integrinbindungspartnern zählen Caveolin, Tetraspanine, Mitglieder der Ig-Superfamilie und Ionenkanäle sowie Wachstumsfaktorrezeptoren und GPI-verankerte Proteine [van der Flier & Sonnenberg 2001]. Daneben können verschiedene Integrine einander auf dominant-negative Weise beeinflussen [Arnaout *et al.* 2007].

1.2.8 Das $\alpha 1\beta 1$ -Integrin

$\alpha 1\beta 1$ -Integrin ist ein Zelladhäsionsrezeptor für die extrazellulären Matrixproteine Kollagen I, IV und VI sowie Laminin-1 [Kern *et al.* 1993, Loster *et al.* 1994, Gardner *et al.* 1996, Heino 2000, Tulla *et al.* 2001] und wird auf Mesenchymalzellen exprimiert [White *et al.* 2004, McCall-Culbreath & Zutter 2008]. Die Expression der $\alpha 1$ -Kette wird durch Wachstumsfaktoren reguliert [Rossino *et al.* 1990, Defilippi *et al.* 1991, Janat *et al.* 1992, Serra *et al.* 1994] und ist inflammationsinduziert in Immunzellen verstärkt [McCall-Culbreath & Zutter 2008]. Aufgrund der Expression ab sechs Tagen nach der Aktivierung von T-Zellen wird $\alpha 1\beta 1$ -Integrin auch als VLA (*very late antigen*)-1 bezeichnet. Zudem werden gemäß der CD-Nomenklatur die $\alpha 1$ -Kette CD49a und die $\beta 1$ -UE CD29 genannt [Hemler *et al.* 1985, McCall-Culbreath & Zutter 2008].

Neben der Regulierung T-Zell-spezifischer Funktionen vermittelt $\alpha 1\beta 1$ -Integrin neuronale Differenzierung und Gewebeintegrität sowie Zellspreitung, -adhäsion und -migration [White

et al. 2004, McCall-Culbreath & Zutter 2008]. Zudem werden durch $\alpha 1\beta 1$ -Integrin die Kollagensynthese und die VEGF-induzierte Angiogenese reguliert [Senger *et al.* 1997, Gardner *et al.* 1999]. Gleichwohl sind auch pathologische Ereignisse mit der Expression und Funktion dieses Integrins verbunden. Hierzu zählen chronisch entzündliche (Autoimmun-) Erkrankungen wie Multiple Sklerose, Osteoarthritis, Rheumatoide Arthritis, Darmentzündungen und Psoriasis [Hemler & Jacobson 1987, Loeser *et al.* 1995, Bank *et al.* 2002, Conrad *et al.* 2007, McCall-Culbreath & Zutter 2008]. Das $\alpha 1\beta 1$ -Integrin vermittelt die Angiogenese maligner Tumore [Pozzi *et al.* 2000] und ist bei einigen Krebsarten in Funktion oder Expression verändert [Liebert *et al.* 1992, Sterry *et al.* 1992, Su *et al.* 2001].

Das $\alpha 1\beta 1$ -Integrin ist das einzige kollagenbindende Integrin, das über das Adapterprotein Shc den Ras-abhängigen Erk-MAPK-Weg aktiviert [Wary *et al.* 1996, Pozzi *et al.* 1998] und so Proliferation induziert [Heino 2000]. Dies erfolgt über die Interaktion der $\alpha 1$ -Kette mit Caveolin [Pozzi *et al.* 1998]. In T-Zellen beeinflusst $\alpha 1\beta 1$ -Integrin darüber hinaus die Cytokinsekretion [Rao *et al.* 2000, McCall-Culbreath & Zutter 2008]. Eine neuere Veröffentlichung beschreibt zudem den negativ regulierenden Einfluss von $\alpha 1\beta 1$ -Integrin auf den EGF-Rezeptor, vermittelt über die Bindung der Tyrosinphosphatase TCPTP an die cytoplasmatische Sequenz der $\alpha 1$ -Integrinuntereinheit [Mattila *et al.* 2005].

Ein Ausschalten (*knock-out*, KO) des $\beta 1$ -Gens in Mäusen verursacht embryonale Letalität während der Phase der Implantation [Stephens *et al.* 1995]. Mithilfe von gewebsspezifischen Deletionen konnte jedoch die Rolle der $\beta 1$ -UE in der Myo- und der Chondrogenese ermittelt werden [Aszodi *et al.* 2003, Schwander *et al.* 2003]. $\alpha 1$ -KO-Mäuse hingegen sind lebensfähig, fertil und durchlaufen eine normale Entwicklung. In diesen Mäusen ist zwar die Heilung von Knochenfrakturen beeinträchtigt, doch ist auch die Tumorangiogenese verringert [Pozzi *et al.* 1998, Ekholm *et al.* 2002]. $\alpha 1$ -defiziente Fibroblasten zeigen auf Kollagen und Laminin milde Spreitungs-, Migrations- und Proliferationsdefekte [Gardner *et al.* 1996, Pozzi *et al.* 1998].

1.2.8.1 Die $\alpha 1$ -Integrinuntereinheit und ihre cytoplasmatische Sequenz

Die $\alpha 1$ -Integrinuntereinheit ist mit einem Gehalt von 1152 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 180 kDa die Größte aller Integrinketten [Ignatius *et al.* 1990, Tulla *et al.* 2001]. Die $\alpha 1$ -UE besitzt in ihrer Ektodomäne eine I-Domäne und heterodimerisiert allein mit der $\beta 1$ -Kette (130 kDa) [Kern *et al.* 1994]. Unter den Integrinen verfügt die $\alpha 1$ -UE über

die kürzeste cytoplasmatische Sequenz, die mit +6 zugleich die höchste positive Nettoladung besitzt. Die Aminosäuresequenzen der cytoplasmatischen Domäne der α 1- und der β 1-Kette sind in Abb. 1.8 wiedergegeben.

α 1: K₁₁₆₆IGFFKRPLKKKMEK-C'

β 1: K₇₅₂LLMIHDRREFAKFEKEKMNAKWDTGENPIYKSAVTTVVNPKYEGK-C'

Abb. 1.8: Die cytoplasmatischen Aminosäuresequenzen der α 1- und der β 1-Integrinuntereinheit, beginnend ab dem K₁₁₆₆- bzw. dem K₇₅₂-Rest. Die konservierten membranproximalen Bereiche sind grau hinterlegt, das GFFKR-Motiv und die NPXY-Internalisierungssequenzen sind unterstrichen. Der Einbuchstabencode der Aminosäuren ist im Abkürzungsverzeichnis erläutert. C': C-Terminus

Trotz ihrer Kürze ist die α 1-cytoplasmatische Sequenz für die ligandenabhängige Ausbildung von fokalen Adhäsionen essentiell und ist Bestandteil des α 1 β 1-Integrin-Proteinkomplexes mit Paxillin, Talin, α -Aktinin und FAK [Loster *et al.* 2001]. Die Deletion der α 1-cytoplasmatischen Sequenz nach dem Lysin₁₁₆₆-Rest verhindert die α 1 β 1-Integrin-abhängige Zell-spreitung, die Reorganisation des Cytoskeletts und die Zellmigration. Bei α 1-Mutanten, deren intrazelluläre Sequenz nach dem GFFKR-Motiv trunziert ist, erfolgen diese Prozesse im Vergleich zum Wildtypprotein verzögert, womit die funktionelle Bedeutung sowohl der membranproximalen als auch der -distalen Region in der Cytoskelettorganisation demonstriert wurde [Vossmeier *et al.* 2000]. Kürzlich konnte die Rolle der α 1-cytoplasmatischen Sequenz bei der Aktivierung der kleinen GTPase Rac1, über die Vermittlung der Membranrekrutierung des Regulatorproteins RhoGDI, identifiziert werden. Darüber hinaus wurde die Bedeutung der C-terminalen PLKKKMEK-Sequenz für die Translokation der PI3-Kinase in fokale Adhäsionen beschrieben [Del Pozo *et al.* 2002, Smerling *et al.* 2007].

1.3 Phosphoinositide

1.3.1 Physikalische Eigenschaften und Signalfunktionen von Membranlipiden

Lipide zeigen spezifisches Phasenverhalten, d.h. in Abhängigkeit ihrer chemischen Natur nehmen sie distinkte fluide und feste Phasenzustände ein. Aus diesem Grund können Lipide innerhalb von Membranen lateral segregieren und distinkte Mikrodomänen bilden. Daneben sind Membranlipide (1.1) und ihre Bausteine durch ihre signalinduzierte Bildung, Hydrolyse oder Translokation als *Second messenger*-Moleküle an zellulären Signalprozessen wie Proliferation, Adhäsion und Migration oder auch Immunprozessen und Angiogenese beteiligt. Membranlipide entfalten ihre Signalfunktion, indem lösliche Lipidspezies an Oberflächen-

rezeptoren oder membranständige Lipide an cytoplasmatische Proteine binden. Desweiteren fungieren Membranlipide als Vorläufer der Prostaglandine, Eicosanoide und Leukotriene [Eyster 2007, Meyer zu Heringsdorf & Jakobs 2007, Hannun & Obeid 2008]. Phospholipide, deren Struktur eine Membrankrümmung verursacht, sind darüber hinaus an der Vesikelfusion oder -abschnürung beteiligt [Huijbregts *et al.* 2000].

1.3.2 Vorkommen und Bedeutung der Phosphoinositide

Der Begriff „Phosphoinositide“ (PIs) bezeichnet das Glycerophospholipid Phosphatidyl-D-myo-Inositol (PtdIns) und seine sieben phosphorylierten Derivate (Phosphatidylinositolphosphate, PIPs) (Abb. 1.9). PIs werden hochdynamisch ineinander konvertiert und regulieren über diverse *Feedback*- und *Feedforward*-Mechanismen die sie metabolisierenden Enzyme.

PIs kommen auf der cytoplasmatischen Seite von Zellmembranen vor, wo sie in ruhenden Zellen 1% der Membranlipide ausmachen. Auf einen extrazellulären Stimulus hin kann die lokale Konzentration v.a. der PIPs jedoch transient bis auf das 30-fache ansteigen [Stephens *et al.* 1993, Stephens *et al.* 2000, Michell 2008]. Im Nukleus regulieren PIPs die Aktivität nukleärer Proteine und sind so an Spleißprozessen und der Chromatinorganisation beteiligt [Odom *et al.* 2000, Hammond *et al.* 2004].

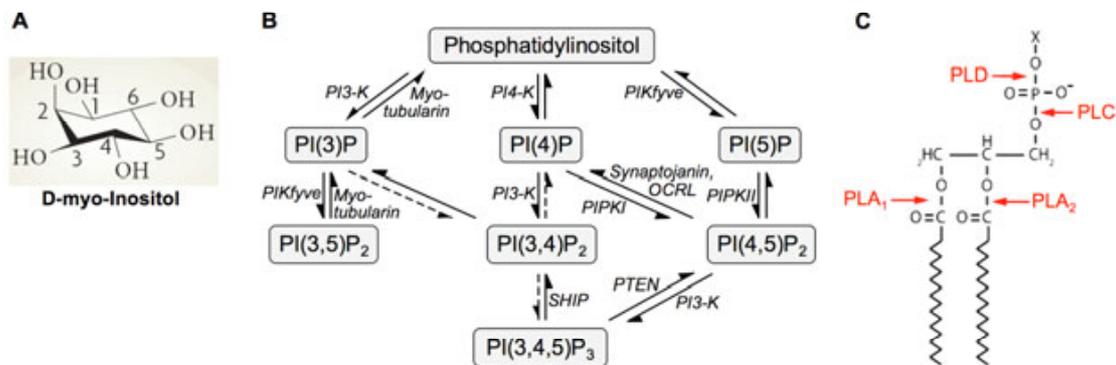


Abb. 1.9: Die Gruppe der Phosphoinositide (PI). (A) Struktur der Kopfgruppe D-myo-Inositol [Michell 2008]. (B) Mono-, bis- und trisphosphorylierte PI-Derivate (PIPs) und metabolische Enzyme im Säuger. Reaktionen mit unterbrochenem Pfeil konnten *in vitro* gezeigt werden [Di Paolo & De Camilli 2006]. (C) Hydrolytische Spaltung des Phospholipidmoleküls durch verschiedene Phospholipasen. Die Abbildung wurde verändert nach [Vanhaesebroeck *et al.* 2001, Lemmon 2008, Michell 2008]. Einzelheiten sind im Text erläutert.

Generell sind PIPs an allen Prozessen beteiligt, die mit einer Änderung der Membranstruktur oder der -krümmung einhergehen, wie Vesikelknospung und -abschnürung, Membranfusion, Endo- und Exocytose und intrazellulärer Membranfluss. Durch Modulierung von Guanin-nukleotidaustauschfaktoren (GEFs) und GTPase-aktivierenden Proteinen (GAPs) nehmen sie

Einfluss auf die zahlreichen, von kleinen GTPasen gesteuerten Signalwege. Über andere Effektorproteine vermitteln sie Zellproliferation und die Umorganisation des Aktin- und des Mikrotubulicytoskeletts [Di Paolo & De Camilli 2006, Michell 2008].

Die einzelnen PIPs zeigen ein organellenspezifisches Verteilungsmuster. So kommt PI(3)P in der Membran des frühen Endosomens vor, wo es für den Membranfluss in sekretorischen und endocytotischen Signalwegen wichtig ist [Gillooly *et al.* 2000, Odorizzi *et al.* 2000]. PI(4)P hingegen ist in der Plasmamembran lokalisiert, wo es als Vorläufer für PI(4,5)P₂ fungiert und bei der clathrinvermittelten Endocytose mitwirkt. Das in der Membran des Golgi-Apparats enthaltene PI(4)P ist essentiell für dessen Struktur und Funktion. Die Bedeutung des im Nukleus' detektierten PI(5)P-Moleküls ist noch unklar [Gozani *et al.* 2005]. Die drei PIP₂-Spezies spielen ebenfalls eine Rolle bei endocytotischen Prozessen, durch ihre Lokalisation in der Plasmamembran (PI(3,4)P₂ und PI(4,5)P₂) oder in Endosomen (PI(3,5)P₂) [Gillooly *et al.* 2000].

1.3.3 Vorkommen und Funktion von PI(4,5)P₂ und PI(3,4,5)P₃

PI(4,5)P₂ ist das meist vorkommende Phosphoinositidmolekül [Stephens *et al.* 2000]. Es wurde in der Plasmamembran und im Nukleus detektiert [Tran *et al.* 1993, Lemmon 2008] und wird im Golgi-Apparat vermutet [Attree *et al.* 1992, Majerus *et al.* 1999, De Matteis *et al.* 2005]. Zahlreiche Studien belegen, dass PI(4,5)P₂ für die Vesikelknospung, Endo-, Exo- und Phagocytose [Bai *et al.* 2004] sowie das Zellwachstum [Di Paolo & De Camilli 2006] und die T-Zell-Aktivierung [Penninger & Crabtree 1999, Villalba *et al.* 2001] erforderlich ist. Die Bedeutung von PI(4,5)P₂ resultiert zum einen aus seiner Vorläuferfunktion für die *Second messenger*-Moleküle PI(3,4,5)P₃, DAG und IP₃ [Majerus *et al.* 1986]. Zum anderen reguliert PI(4,5)P₂ selbst die Lokalisation und Aktivität vieler Proteine, zu denen Ionenkanäle und -pumpen [Hilgemann *et al.* 2001, Suh & Hille 2005] sowie Clathrinadapterproteine und aktincytoskelettassoziierte und -modulierende Proteine gehören [Wenk & De Camilli 2004].

PI(4,5)P₂-abhängige Prozesse werden generell über die Menge und die lokale Konzentration von PI(4,5)P₂ und dessen Zugänglichkeit für Bindeproteine reguliert [Kwik *et al.* 2003]. Für die Plasmamembran werden zudem räumlich und funktionell distinkte PI(4,5)P₂-Pools postuliert [Pike & Miller 1998, Golebiewska *et al.* 2008]. Die Anreicherung von PI(4,5)P₂ in Mikrodomänen verstärkt beispielsweise die N-WASP-abhängige Aktinpolymerisation [Golub & Caroni 2005] und erhöht die Bildung von PI(3,4,5)P₃ und IP₃ [Laux *et al.* 2000, Johnson *et al.* 2008].

PI(3,4,5)P₃ wird durch die Aktivierung von Oberflächenrezeptoren transient in der Plasmamembran durch PI3-Kinase aus PI(4,5)P₂ gebildet [Cantley 2002] und erreicht bis zu 10% der lokalen PI(4,5)P₂-Menge [Vanhaesebroeck & Waterfield 1999]. Die Bedeutung eines agonistsensitiven PI(3,4,5)P₃-Pools im Nukleus ist noch unklar [Lindsay *et al.* 2006]. Die durch PI(3,4,5)P₃ regulierten Vorgänge beinhalten Exo- und Phagocytose [Botelho *et al.* 2004, Lindmo & Stenmark 2006], Aktinpolymerisation und GTPase-abhängige Signalprozesse [Logan & Mandato 2006]. Daneben ist PI(3,4,5)P₃ für zelluläre Ereignisse wie Proliferation, Wachstum, Überleben, Differenzierung und Migration von Bedeutung [Vanhaesebroeck *et al.* 2001, Cantley 2002]. Analog zu PI(4,5)P₂ rekrutiert PI(3,4,5)P₃ die in diesen Prozessen involvierten Moleküle, darunter Proteinkinasen, Regulatorproteine kleiner GTPasen und Adapterproteine, an die Plasmamembran und moduliert deren Aktivität.

1.3.4 Die Rolle von PIPs in der integrinvermittelten Zelladhäsion und Zellmigration

Durch integrinvermittelte Adhäsion werden PI(4,5)P₂ und PI(3,4,5)P₃ vermehrt gebildet [Chong *et al.* 1994, Oude Weernink *et al.* 2000]. Während der chemotaktischen Migration von Neutrophilen und von *Dictyostelium discoideum* bildet sich PI3-Kinase-abhängig ein intrazellulärer PI(3,4,5)P₃-Gradient aus, der die Migrationsrichtung definiert [Parent *et al.* 1998, Hannigan *et al.* 2002]. Die wachstumsfaktorabhängige Bildung von promigratorischen gekräuselten Membranstrukturen, den *Ruffles*, wird ebenfalls durch PI(3,4,5)P₃ verursacht [Czech 2003, Oikawa *et al.* 2004].

Im Zuge integrinvermittelter Zellspreitung, -adhäsion und -migration wird die Organisation des Aktincytoskeletts zeitlich und räumlich präzise reguliert. Diverse aktinassoziierte Proteine und Adapterproteine kontrollieren die Verfügbarkeit monomeren G-Aktins, die Initiation und Elongation der Aktinpolymerisation, die Aktinverzweigung und die Aktindepolymerisation. Die aktinregulierenden Proteine werden ihrerseits durch PI(3,4,5)P₃ und vor allem PI(4,5)P₂ moduliert. So stimuliert eine erhöhte lokale PI(4,5)P₂-Konzentration z.B. N-WASP⁴, das die Arp2/3-vermittelte Aktinpolymerisation fördert, und inaktiviert gleichzeitig die aktindegredierenden und -kappenbildenden Proteine Gelsolin, Kofilin und Profilin [Lassing & Lindberg 1985, Janmey & Stossel 1987, Pollard & Borisy 2003, Yin & Janmey 2003, Papayannopoulos *et al.* 2005] (1.3.6.1). Analog werden durch PI(4,5)P₂ auch

⁴ PI(3,4,5)P₃ rekrutiert WASP-verwandtes WAVE [Oikawa *et al.* 2004].

ERM-Proteine moduliert, welche das Anheften des Aktincytoskeletts an die Plasmamembran bewirken [Hirao *et al.* 1996, Heiska *et al.* 1998, Edwards & Keep 2001, Fievet *et al.* 2004]. Für die Ausbildung spezifischer Aktinstrukturen sind die Mitglieder der Rho-Familie kleiner GTPasen (Rho, Rac, Cdc42) verantwortlich. Die Rho-GTPasen werden indirekt durch PI(4,5)P₂ und PI(3,4,5)P₃ reguliert, indem die Aktivität ihrer GEF- und GAP-Regulatorproteine durch diese PIP-Moleküle moduliert wird [Jaffe & Hall 2005].

Ferner ist der Einfluss von PI(4,5)P₂ und PI(3,4,5)P₃ auf die fokalen Adhäsionsproteine Vinkulin und α -Aktinin beschrieben. Durch Interaktion mit PI(4,5)P₂ wird die Aktinassoziaton von Vinkulin aufgehoben und die von α -Aktinin induziert, was die Zellmigration stimuliert [Steimle *et al.* 1999, Greenwood *et al.* 2000, Ziegler *et al.* 2006]. α -Aktinin bindet daneben an PI3-Kinase und assoziiert PDGF-abhängig mit PI(3,4,5)P₃ [Shibasaki *et al.* 1994]. Anders als PI(4,5)P₂ vermag PI(3,4,5)P₃ spezifisch α -Aktinin, nicht aber Vinkulin und Talin, aus den fokalen Komplexen zu lösen [Greenwood *et al.* 2000, Kelly & Taylor 2005]. Auch das Protein Talin, das eine wichtige Rolle bei der *Inside-out*-Aktivierung von Integrinen spielt [Nayal *et al.* 2004] (1.2.4), bindet an PI(4,5)P₂, wodurch seine Affinität zu Integrinen erhöht wird [Martel *et al.* 2001]. Darüber hinaus bewirkt Talin die PI(4,5)P₂-Generierung in Integrinnähe, indem es PIPK I γ (1.3.5.1) bindet und in die fokalen Adhäsionen rekrutiert [Di Paolo *et al.* 2002, Ling *et al.* 2003]. Die Lokalisierung der PI(3,4,5)P₃-erzeugenden PI3-Kinase in fokale Adhäsionen erfolgt durch deren direkte Bindung an Ezrin [Gautreau *et al.* 1999], FAK [Chen & Guan 1994] oder α -Aktinin [Young & Gautel 2000, Stossel *et al.* 2001].

1.3.5 PIP-metabolisierende Enzyme

Für die Initiation und Beendigung der durch PIPs regulierten Prozesse und für die Gewährleistung der durch sie vermittelten Organellenidentität werden einzelne PIPs zeit- und ortspezifisch generiert, hydrolysiert oder innerhalb von Membranen transloziert.

1.3.5.1 Inositollipidkinasen

Der myo-Inositol-Ring in der Phospholipidkopfgruppe kann an der 3'-, 4'- und 5'-Position reversibel phosphoryliert werden (Abb. 1.9 A und B). Die Unterklassen I-III der Phosphoinositid-3'-Kinase (PI3-Kinase, PI3-K) unterscheiden sich hinsichtlich ihres Expressionsmusters, der Substratpräferenz und der sie aktivierenden Oberflächenrezeptoren. Bei der in den fokalen Adhäsionen aktiven Form handelt es sich um PI3-K IA, welche PI(4,5)P₂ zu

PI(3,4,5)P₃ phosphoryliert [Cantley 2002]. Die 4'-Hydroxylgruppe von PtdIns wird durch PI4-K und die von PI(5)P durch PIPK II phosphoryliert [Wang *et al.* 2004, Halstead *et al.* 2005]. Die Phosphorylierung der 5'-Hydroxylgruppe erfolgt durch die Kinasen PIKfyve/ PIPK III und PIPK I⁵. PIKfyve besitzt für die Bindung seiner Substrate PtdIns und PI(3)P eine betitelnde FYVE-Domäne (1.3.6.2, Tabelle 1.1) [Sbrissa *et al.* 1999, 2002].

1.3.5.2 Inositollipidphosphatasen

PIPs werden durch verschiedene Lipidphosphatasen hydrolysiert. Die 3'-Phosphatase PTEN (*phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten*) degradiert PI(3,4,5)P₃ [Maehama & Dixon 1998, Leslie *et al.* 2001, Wishart *et al.* 2001] und wirkt als Gegenspieler der anti-apoptotischen PKB/Akt sowie als Tumorsuppressor [Simpson *et al.* 2001]. Die 3'-Phosphatgruppe von PI(3)P und PI(3,5)P₂ wird durch die Klasse der Myotubularine entfernt [Wishart *et al.* 2001]. Die 5'-Phosphatgruppe von PI(3,4,5)P₃ und PI(4,5)P₂ hingegen wird durch SHIP (*SH2-containing inositol 5-phosphatase*) abgespalten [McPherson *et al.* 1996, Cremona *et al.* 1999, Sly *et al.* 2003]. Im Golgi-Apparat ist die PI(4,5)P₂-spezifische Inositol-5'-Phosphatase OCRL (*oculocerebrorenal syndrome of Lowe*) lokalisiert [Attree *et al.* 1992, Majerus *et al.* 1999, De Matteis *et al.* 2005]. Die Polyphosphatase Synaptojanin degradiert PI(4,5)P₂ und andere PIPs zu PI(4)P [Halstead *et al.* 2005]. Eine Inositol-4'-Phosphatase ist bislang nur für Hefe beschrieben, wo sie mit dem ER und dem Golgi-Apparat assoziiert ist [Guo *et al.* 1999].

1.3.5.3 Phospholipasen

Phospholipasen (PLs) hydrolysieren Esterbindungen des Phospholipidmoleküls. Je nach Angriffspunkt (Abb. 1.9 C) werden eine freie Fettsäure und ein Lysophospholipid (durch PLA), eine freie Kopfgruppe und Phosphatidat (durch PLD) oder eine phosphorylierte Kopfgruppe und DAG (durch PLC) generiert. Die drei Phospholipaseklassen unterscheiden sich deutlich hinsichtlich der Anzahl der Subtypen, der Proteinstruktur und der Regulierung [Eyster 2007, van Meer *et al.* 2008]. Der Aufbau der phosphoinositidspezifischen PLC und ihre Beteiligung an integrinvermittelten Signalprozessen ist in Abschnitt 1.2.5.1 beschrieben.

⁵ PIK: Phosphoinositidkinase, PIPK: Phosphoinositidphosphatkinase. Die Nomenklatur wird in der Literatur nicht immer einheitlich verwendet.

1.3.6 Interaktionen zwischen Proteinen und PIP-haltigen Membranen

1.3.6.1 Bedeutung von Protein-PIP-Interaktionen

Die Bindung eines Proteins an PIP-haltige Membranen verändert das Phasen- und das Packungsverhalten der lokalen Membranlipide und schränkt deren Beweglichkeit ein [Bucki *et al.* 2000, Tuominen *et al.* 2002, Forstner *et al.* 2006]. Durch spezielle sequestrierende Proteine können PIPs auch lokal akkumulieren [Haleva *et al.* 2004]. Die Proteine ihrerseits werden durch die Assoziation mit PIPs an definierte Membranbereiche rekrutiert und in ihrer Konformation und Aktivität verändert. So können in dem PIP-bindenden Protein Bindemotive für weitere PIPs oder Proteine frei gelegt werden [Di Paolo & De Camilli 2006], oder die PIP-Assoziation bewirkt das Aufbrechen autoinhibitorischer Interaktionen im Proteinkomplex, wie für cytoskelettregulierende Proteine gezeigt wurde [Yin & Janmey 2003, Janmey & Lindberg 2004] (1.3.4).

Die Bedeutung von PIPs und PIP-Protein-Interaktionen offenbart sich in multiplen Erkrankungen, die durch Gendefekte der PIP-metabolisierenden Enzyme oder durch Mutationen in den PIP-Bindedomänen der Proteinbindungspartner zustande kommen. Dazu gehören Tumorentstehung [Bader *et al.* 2005], myotubuläre Myopathie [Laporte *et al.* 1996], bipolare Störungen [Halstead *et al.* 2005] und Defekte in der B-Zellreifung [Lindvall *et al.* 2005].

1.3.6.2 PIP-bindende Proteindomänen

Proteine binden an PIP-reiche Membranen sowohl mithilfe von strukturell definierten Modulen als auch über unstrukturierte, basische Aminosäuresequenzen (1.3.6.4). Tabelle 1.1 listet eine Reihe prototypischer PIP-Bindedomänen auf. Die Module unterscheiden sich hinsichtlich der Substratspezifität und -affinität und des PIP-Bindungsmechanismus. Die Interaktionen dieser Domänen mit den geladenen PIP-Kopfgruppen schließen Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatische Wechselwirkungen ein [Lemmon 2003, Balla 2005]. Je nach Bindungsmotiv kann über hydrophobe Aminosäuren auch eine partielle Membraninsertion erfolgen, wie es der Fall bei den FYVE-, PX-, ENTH- und BAR-Domänen ist. Die BAR- und ENTH/ANTH-Domänen binden zudem PI(4,5)P₂-reiche Membranen, die einen definierten Krümmungsradius aufweisen [Itoh & De Camilli 2006]. Die in endocytotischen Effektorproteinen enthaltene, PI(3)P-erkennende FYVE-Domäne gilt als ein spezifisch bindendes Modul, wohingegen nur 10% der PH-Domänen selektiv mit PIPs assoziieren. Die übrigen aufgeführten Module binden PIPs ebenfalls unspezifisch und mit hoher Promiskuität [Lemmon 2003, Di Paolo & De Camilli 2006].

Angesichts der hohen Promiskuität und niedrigen Affinität, mit der viele der genannten Domänen an PIPs binden, stellt sich die Frage, wie Proteine selektiv und gezielt zu PIP-enthaltenden Membranen geleitet werden. Dies erfolgt durch die sogenannte Koinzidenzdetektion, welche die Kooperation multipler synchroner Interaktionen beinhaltet. Dadurch wird die Affinität einer Protein-PIP-Assoziation erhöht und diese spezifiziert [Carlton & Cullen 2005, Lemmon 2008, Michell 2008]. Im Rahmen der Koinzidenzdetektion bindet ein Protein gleichzeitig an ein PIP-Molekül und eine andere PIP- oder Phospholipidspezies. Alternativ kann eine Homo- oder Heterooligomerisierung des Proteins stattfinden. Einige Proteindomänen binden darüber hinaus PIPs nur im Kontext einer spezifischen Membrankrümmung.

Tabelle 1.1: PIP-bindende Proteindomänen, verändert nach [Balla 2005, Lemmon 2008, Michell 2008]. Abkürzungen der Beispielproteine sind im Abkürzungsverzeichnis erläutert.

Domäne (Name)	Assoziation mit	Beispiele	Referenzen	Membraninsertion
PH (Pleckstrin-Homologie)	PA, PI, PI(3)P, PI(4)P, PI(3,4)P ₂ , PI(4,5)P ₂ , PI(3,4,5)P ₃	Akt/PKB, Btk, Dynamin, Sos, GRP-1, PDK1, PLCδ, PLCγ, FAPP1/2	Harlan <i>et al.</i> 1994, Rebecchi & Scarlata 1998, Balla 2005, Di Paolo & De Camilli 2006, Lemmon 2008	nein
PX (Phox-Homologie)	PI(3)P, PI(5)P, PI(3,4)P ₂ , PI(3,5)P ₂ , PI(4,5)P ₂ , PI(3,4,5)P ₃	CISK, p47 ^{phox} , PI3-K II, Vamp7, SNX 2,3,5,7,13	Ponting 1996, Sato <i>et al.</i> 2001, Ellson <i>et al.</i> 2002, Karathanassis <i>et al.</i> 2002, Seet & Hong 2006	ja
FYVE (Fab1, YOTB, Vac1, EEA1)	PI(3)P	EEA1, Hrs, PIKfyve, SARA	Stenmark <i>et al.</i> 1996, Gaullier <i>et al.</i> 1998, Dumas <i>et al.</i> 2001, Kutateladze 2006	ja
ENTH/ANTH (Epsin/AP180-N-Terminus-Homologie)	PI(4)P, PI(3,5)P ₂ , PI(4,5)P ₂	Epsin, AP180, CALM, Ent3p, Ent5p	Ford <i>et al.</i> 2001, Itoh <i>et al.</i> 2001, Legendre-Guillemin <i>et al.</i> 2004, Itoh & De Camilli 2006	ja (ENTH) nein (ANTH)
GRAM (Glukosyltransferase, Rab-ähnlicher GTPase-Aktivatoren, Myotubularine)	PI(3,5)P ₂	Myotubularine, MTMR3	Doerks <i>et al.</i> 2000, Lorenzo <i>et al.</i> 2005	nein
PROPPIN (Phosphoinositidbindender β-Propeller)	PI(3)P, PI(3,5)P ₂	Atg21, WIPI49	Jeffries <i>et al.</i> 2004, Stromhaug <i>et al.</i> 2004, Michell <i>et al.</i> 2006	nicht bekannt
FERM (Bande 4.1-Protein, Ezrin, Radixin, Moesin)	PI(4,5)P ₂	Ezrin, Moesin, Radixin, Talin	Mangeat <i>et al.</i> 1999, Hamada <i>et al.</i> 2003, Garcia-Alvarez <i>et al.</i> 2003	nein
BAR (Bin, Amphiphysin, Rvs-Familie)	saure Phospholipide	Amphiphysin, Endophilin	Takei <i>et al.</i> 1999, Itoh & De Camilli 2006	ja

1.3.6.3 Die Pleckstrin-Homologie (PH)-Domäne

PH-Domänen, erstmals in dem Thrombozytenprotein Pleckstrin entdeckt, umfassen rund 120 Aminosäuren [Haslam *et al.* 1993, Mayer *et al.* 1993, Harlan *et al.* 1994]. Aktuell sind mehr als 200 PH-Domänen in eukaryonten Proteinen bekannt, die in Signalprozessen, Cytoskelettorganisation, intrazellulärem Membranfluss und Phospholipidmetabolismus involviert sind [Musacchio *et al.* 1993, Gibson *et al.* 1994, Shaw 1996]. Die Struktur einer Vielzahl von PH-Domänen wurde bereits mittels NMR-Spektroskopie oder Kristallstrukturanalyse aufgeklärt [Ferguson *et al.* 1995, Baraldi *et al.* 1999, Ferguson *et al.* 2000, Lietzke *et al.* 2000, Milburn *et al.* 2003, Komander *et al.* 2004]. PH-Domänen weisen nur geringe Homologie in ihrer Primärsequenz auf, doch ist ihre räumliche Struktur hoch konserviert (Abb. 1.10). Zentral befinden sich sieben β -Stränge, die zwei senkrecht aufeinander stehende β -Faltblätter bilden. Diese Kernstruktur wird durch eine seitwärts angelagerte, C-terminale α -Helix mit amphipathischem Charakter stabilisiert.

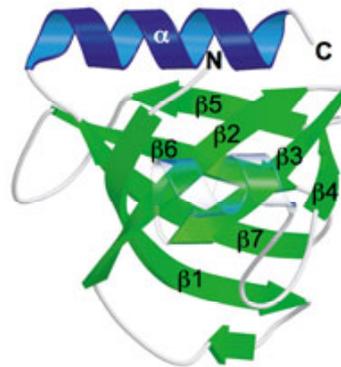


Abb. 1.10: Struktur der PH-Domäne von β -Spektrin, verändert nach [Lemmon *et al.* 2002]. Die sieben β -Stränge und die C-terminale α -Helix sind gekennzeichnet. N: N-Terminus, C: C-Terminus

Das kanonische PIP-Bindemotiv wird vor allem durch die basische Sequenz $Kx_n(K/R)xR$, wobei x eine beliebige Aminosäure darstellt, in der $\beta 1$ - $\beta 2$ -Schleife gebildet [Isakoff *et al.* 1998]. Aber auch die variablen $\beta 3$ - $\beta 4$ und $\beta 6$ - $\beta 7$ -Schleifen sind positiv geladen und können die PIP-Bindung vermitteln [He *et al.* 2008, Lemmon 2008]. Nur wenige PH-Domänen assoziieren hochspezifisch mit einer PIP-Spezie. Hierzu zählen die $PI(3,4,5)P_3$ -bindenden PH-Domänen von GRP-1, Btk und PKB/Akt [Fukuda *et al.* 1996] sowie die PH-Domäne von PLC $\delta 1$, die IP_3 und $PI(4,5)P_2$ erkennt [Lemmon *et al.* 1995, Varnai *et al.* 2002].

Einige PH-Domänen binden nicht nur an PIPs, sondern assoziieren auch mit anderen Proteinen. So interagieren die PH-Domänen von PLC $\gamma 1$, Btk und PKB/Akt mit heterotrimeren G-Proteinen, Myosin II bzw. der PKC [Tsukada *et al.* 1994, Yao *et al.* 1997, Tanaka *et al.*

1999]. An der Proteinbindung von PH-Domänen sind die C-terminale α -Helix und die Schleifen β 4- β 5 und β 6- β 7 beteiligt [Lodowski *et al.* 2003].

1.3.6.4 Unstrukturierte, basische Aminosäuresequenzen

Proteine können an PIPs auch über kurze, polybasische Sequenzen (PBSN) binden, von denen einige in Tabelle 1.2 aufgeführt sind. Diese Sequenzen besitzen durch die Anzahl von mehr als fünf Resten Lysin und/oder Arginin eine hohe positive Nettoladung und binden PIPs in Abhängigkeit von elektrostatischen Wechselwirkungen überwiegend unspezifisch [McLaughlin *et al.* 2002]. Die PBSN sind oft in unstrukturierten Proteinregionen lokalisiert, erfahren jedoch nach Bindung an PIP-enthaltende Membranen eine Konformationsänderung, die mit einer lokalen Entfaltung [Yin & Janmey 2003] oder mit der Adaption einer, häufig α -helikalen, Sekundärstruktur [Lemmon 2003, Balla 2005] verbunden ist. Bislang wurde insbesondere die Bindung von PBSN an $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ analysiert.

Tabelle 1.2: Beispiele eukaryotischer Proteine, die über basische, unstrukturierte Bereiche an PIPs binden. Dazu gehören das myristoylierte, alaninreiche PKC-Substrat (MARCKS), das neuronale Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein (N-WASP), die NR1-Untereinheit des N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptors (NMDA) und die kleine GTPase Rit. Basische Aminosäurereste sind unterstrichen.

Protein	Reste #	Sequenz	Literatur	Nettoladung
MARCKS	151-175	<u>KKKKKR</u> <u>FSF</u> <u>KK</u> <u>SF</u> <u>KL</u> <u>SG</u> <u>FS</u> <u>F</u> <u>KK</u> <u>N</u> <u>KK</u>	McLaughlin & Aderem 1995	+13
Src	1-15	myr-G <u>SS</u> <u>SK</u> <u>SK</u> <u>PK</u> <u>DPS</u> <u>Q</u> <u>RRR</u>	Sigal <i>et al.</i> 1994, Buser <i>et al.</i> 1994	+5
N-WASP	183-197	<u>KE</u> <u>KK</u> <u>KG</u> <u>K</u> <u>AK</u> <u>KK</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>K</u>	Rohatgi <i>et al.</i> 1999, Higgs & Pollard 2000, Prehoda <i>et al.</i> 2000	+9
Talin	385-406	GEQIAQLIAGYIDIIL <u>KK</u> <u>KK</u> <u>SK</u>	Seelig <i>et al.</i> 2000	+3
Gelsolin	150-169	<u>K</u> <u>H</u> <u>V</u> <u>V</u> <u>P</u> <u>N</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>V</u> <u>V</u> <u>Q</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>Q</u> <u>V</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>R</u> <u>R</u>	Liepina <i>et al.</i> 2003	+4
Syndecan-4	188-194	<u>KK</u> <u>P</u> <u>I</u> <u>Y</u> <u>KK</u>	Horowitz <i>et al.</i> 1999	+4
NMDA-NR1	875-898	<u>KK</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>F</u> <u>R</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>F</u> <u>K</u> <u>R</u> <u>R</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>K</u>	Ehlers <i>et al.</i> 1996, Tingley <i>et al.</i> 1997	+9
Rit	194-219	<u>KK</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>P</u> <u>K</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>W</u> <u>K</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>F</u> <u>R</u> <u>K</u> <u>K</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>T</u>	Heo <i>et al.</i> 2006	+10

1.4 Zielsetzung der Arbeit

α 1 β 1-Integrin ist ein Zelloberflächenrezeptor, der nach Bindung an seinen extrazellulären Liganden Kollagen IV oder Laminin-1 zelluläre Adhäsion, Migration, neuronale Differenzierung und die Regulierung von T-Zellen vermittelt. Die α 1 β 1-Integrin-abhängige Signaltransduktion hängt dabei von dem Vorhandensein und der Integrität der cytoplasmatischen Sequenz der α 1-Integrinuntereinheit ab. Diese umfasst lediglich die fünfzehn Aminosäuren KIGFFKRPLKKKMEK. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten die Struktur und die

Lipidbindung der $\alpha 1$ -cytoplasmatischen Sequenz als zugrunde liegende Eigenschaften ihrer intrazellulären Signalfunktion untersucht werden.

Die cytoplasmatischen Integrindomänen gelten gemeinhin als ungefaltet. Strukturelle Untersuchungen der intrazellulären Sequenz der α -Integrinkette haben sich bislang vor allem auf die α I**b**-Integrinkette konzentriert und dabei divergente Ergebnisse erbracht. Keine Daten lagen diesbezüglich über die cytoplasmatische Sequenz der $\alpha 1$ -UE vor, die sich von der α I**b**-Kette durch die membrandistale Region unterscheidet. Aus diesem Grund sollte die Struktur der $\alpha 1$ -cytoplasmatischen Sequenz in wässriger Lösung ermittelt werden.

Bedingt durch den hohen Anteil basischer Aminosäuren besitzt die $\alpha 1$ -cytoplasmatische Domäne eine Nettoladung von +6. Daher sollte zum einen untersucht werden, ob diese Sequenz an negativ-geladene Phospholipide bindet. Die Lipidassoziation eines von der $\alpha 1$ -cytoplasmatischen Sequenz abgeleiteten Peptids sollte dabei auf Affinität und Spezifität hin analysiert werden. Mithilfe von Teilpeptiden des membranproximalen bzw. -distalen Bereichs sollte das Lipidbindungsmotiv innerhalb der $\alpha 1$ -cytoplasmatischen Domäne lokalisiert werden. Weiterhin sollte der Frage nachgegangen werden, ob die Lipidassoziation einen Konformationswechsel in der $\alpha 1$ -cytoplasmatischen Sequenz hervorruft.

In einem dritten Projekt sollte die Natur und die Bedeutung der Assoziation des $\alpha 1\beta 1$ -Integrins mit einem Enzym des Lipidmetabolismus', der PLC $\gamma 1$, analysiert werden. In früheren Studien der Arbeitsgruppe wurde die Bindung der PLC $\gamma 1$ an das $\alpha 1\beta 1$ -Integrin bereits gezeigt [Vossmeyer *et al.* 2002]; unklar war jedoch, welche die jeweiligen Bindungsmotive innerhalb des PLC $\gamma 1$ -Moleküls und des $\alpha 1\beta 1$ -Integrins sind. Ein weiteres Ziel der Arbeit war aus diesem Grund, die Interaktion zwischen beiden Molekülen mittels NMR-Spektroskopie näher zu charakterisieren und dabei Bindungsepitope in dem PLC $\gamma 1$ -Molekül für die $\alpha 1$ - und die $\beta 1$ -Integrinkette zu identifizieren. Desweiteren sollte der Einfluss von Phospholipiden auf die Interaktion zwischen $\alpha 1\beta 1$ -Integrin und PLC $\gamma 1$ untersucht werden. Mithilfe von funktionellen zellbiologischen Studien sollten schließlich Informationen über die funktionelle Rolle der PLC $\gamma 1$ und ihrer Domänen in der $\alpha 1\beta 1$ -Integrin-abhängigen Zellmigration und -morphologie, in Anhängigkeit der $\alpha 1$ -cytoplasmatischen Sequenz, erhalten werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 *Material*

2.1.1 Geräte

Agarose-Gelelektrophorese Modell B2	Owl Separation Systems, USA
Autoklav, Dampfsterilisator	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Bakterienbrutschrank	Binder GmbH, Tuttlingen
CD-Spektrometer, J-715	Jasco Corp., GB
Elektrophoresesysteme für PAGE und Western Blot	Bio-Rad, München
Elektroporationsgerät, <i>Gene Pulser X cell</i>	Bio-Rad, München
Plattenlesegerät, <i>Sunrise</i>	Tecan, Crailsheim
FPLC-Anlage	GE Healthcare, Freiburg
Gefriertrocknungsanlage, Christ alpha2-4	Martin Christ GmbH, Osterode
Geldokumentationssystem, Gel iX	Intas Instruments, Göttingen
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
HPLC-Anlage, Äkta	GE Healthcare, Freiburg
Imager, LAS-1000	Fujifilm, Düsseldorf
Imager, Odyssey	LICOR-Biosciences, USA
Kühlschrank (4°C, -20°C)	Bosch, München
Kühlschrank (-80°C)	GFL, Burgwedel
Langmuir-Filmwaage, Modell 601A	Nima Technology Ltd., GB
Magnetrührer, Typ RH B2	IKA Werke, Staufen
Mikroskope:	
Lichtmikroskop, Diavert	Leica, Bensheim
Fluoreszenzmikroskop, Axiovert 200	Zeiss, Jena
NMR-Spektrometer, 600 MHz, 750 MHz	Bruker BioSpin, Karlsruhe
PC <i>RiCycler</i>	Bio-Rad, München
pH-Meter 646, digital	Knick, Berlin
Photometer, BioPhotometer UV	Eppendorf, Hamburg
Profinia-Proteinaufreinigungssystem	Bio-Rad, München

Schwenkrad, <i>Rotator</i>	Neolab, Heidelberg
Schüttelinkubator IH50	Incutec GmbH, Mössingen
Schwenkinkubator, Stuart Orbital S150	Rhys International Ltd., GB
Schwenkapparat 3013	GFL, Burgwedel
Spannungsgerät, <i>Power PAC 200</i>	Bio-Rad, München
Sterilbank für die Molekularbiologie	Biochrom KG, Berlin
Sterilbank für die Zellkultur	BDK GmbH, Sonnenbühl-Genkingen
Stickstofftank	VWR, Darmstadt
Ultraschallstab, <i>Brandson Sonifier W-250D</i>	G. Heinemann Labortechnik, Schwäbisch-Gmünd
Ultraschallwasserbad	Th. Karow GmbH, Berlin
UV-Transilluminator	MWG Biotech, München
Vakuumpumpe	Vacuubrand GmbH, Wertheim
Vortex-Genie 2	Bender & Hobein AG, Schweiz
Feinwaage (d = 0,0001 g), <i>Adventurer</i>	Ohaus Corp., USA
Waage (d = 0,01 g), CP622	Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zellkulturbrutschrank, Heraeus 6000	Kendro Laboratory Products, Langenselbold
Zentrifugen:	
PCR-Zentrifuge	Roth, Karlsruhe
Heraeus-Megafuge 1.0R	Thermo Scientific, Bonn
Heraeus-Biofuge pico	Kendro Laboratory Products, Langenselbold
Avanti-Zentrifuge, J-25	Beckman Coulter, USA

2.1.2 Allgemeines Labormaterial

Mikroreaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Pipetten und Multikanalpipetten	Eppendorf, Hamburg
Hamilton-Glaspipetten, 10-50 µl	Hamilton Bonaduz, Schweiz
Whatman-Rotrandsterilfilter, 0,2 µm	Whatman GmbH, Dassel
TPP-Filtrationssysteme (250 ml, 500 ml), 0,22 µm	Costar, Corning Inc., USA

Parafilm	Roth, Karlsruhe
Sterican-Kanülen	B. Braun, Melsungen
Discardit II-Spritzen (2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml)	Becton Dickinson, Spanien
Omnifix-F-Spritzen (1 ml)	B. Braun, Melsungen
Falcon-Polypropylenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Becton Dickinson, USA

2.1.3 Chemikalien und Lösungen

Chemikalien und Substanzen wurden in analytischer Reinheit von den Firmen Roth, Sigma-Aldrich und Merck bezogen. Sämtliche Lösungen und Puffer wurden mit bidestilliertem Wasser hergestellt und für 20 Min bei 121°C und 1 bar autoklaviert oder steril filtriert (0,22 µm).

2.1.4 Reagentien und Inhibitoren

Biotin	Roth, Karlsruhe
Glutathion (GSH)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropylthiogalaktosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Proteaseninhibitorcocktail (PIC)-Lösung	Sigma, München
Proteaseninhibitorcocktail (PIC)-Tabletten	Roche, Penzberg
Thiamin	Roth, Karlsruhe
Transfectin-Lipidreagenz	Bio-Rad, München
dNTP-Mix (10 mM)	Fermentas, St. Leon-Rot
MgCl ₂ (25 mM)	Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.5 Antibiotika

Ampicillin, Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
Geniticinsulfat, G418	Biochrom AG, Berlin
Kanamycinsulfat	Roth, Karlsruhe
Pen/Strep (100 x):	PAN Biotech GmbH,
Penicillin (10000 U/ml)	Aidenbach
Streptomycin (10 mg/ml)	

2.1.6 Größenstandards und Marker

DNA-Größenmarker <i>Gene Ruler</i> 1 kb, <i>Gene Ruler</i> 100 bp und <i>Low Range</i>	Fermentas, St. Leon-Rot
Protein-Größenstandard, <i>Precision Plus Dual</i>	Bio-Rad, München
Protein-Größenstandard, Mark12	Invitrogen, GB
Protein-Größenstandard, <i>SeeBlue Plus2</i>	Invitrogen, GB

2.1.7 Nukleotide und Oligonukleotide

Die Ribonukleotide Adenosin, Cytidin, Guanosin, Thymin, Uridin und die 2' Desoxyribonukleotide Desoxyadenosin, -guanosin und -cytidin wurden von Sigma-Aldrich bezogen.

Tabelle 2.1: Liste der verwendeten Oligonukleotide, mit Angabe der Nukleotidsequenz in 5'-3'-Richtung und der Schmelztemperatur (T_m). s: Strangrichtung (*sense*), as: Gegenstrangrichtung (*antisense*)

Sequenzierprimer		
Name	Nukleotidsequenz 5'-3'	T_m
pRc/CMV 764s IRD-700	ATTGACGCAAATGGGCGGTAGG	68°C
pRc/CMV 1113 as IRD-800	TTCCAGGGTCAAGGAAGGCACG	69°C
a1 vor Eco91I s IRD-700	CAGGACAGTGGTGCAGCATTCA	67°C
pGEX 5' IRD-700	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG	74°C
pGEX 3' IRD-800	CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG	72°C
eGFP C1 s IRD-700	CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG	68°C
eGFP C1 as IRD-800	GTGGTATGGCTGATTATGATCAGTTATCTAG	66°C
Primer zur Detektion einer DNA-Zielsequenz		
Name	Nukleotidsequenz 5'-3'	T_m
α 1 up s	GTAGTACGTGTGGAGTTGC	61°C
α 1 do f.l. as	ATAGGATCCCGGCACGATCATTCTCCAT	71°C
α 1 do GFFKR as	ACATCACCTTTTGAAGAATCCAATCTTC	62°C
α 1 do K	ACATCACTTCCACAGAGCCAATATAAG	65°C
SP6 as	CGATTTAGGTGACACTATAG	56°C
α 1 TM K as	CTTCCACAGAGCCAATATAAGGA	63°C
Eco91I s	GGTTACCGGTTACCTTCAAATAATATCCAG	66°C
Oligo dT	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	27°C
GAPDH L s	ACCACCTGTTGCTGTAGC	66°C
GAPDH R as	CATCACCATCTTCCAGGAGC	63°C
GAPDH human s	GGTGAAGGTCGGAGTCAACGG	67°C
GAPDH human as	GGTCATGAGTCCCTCCACGAT	64°C
PH PLC γ 1 s	GAAGCGGAGGTGCTGC	64°C
PH ins RGADK s	CCGCGGTGCGGACAAA	64°C
PH3/4 KDDEE in s	GAGCAAGGATGACGAGGAG	63°C
PH+PH3/4 YGMEF as	GCGGAATTCCATTCCATA	64°C
PH6/7 FNTEQ as	GCGCTGCTCGGTGTTGAA	64°C
NSH2 PLC γ 1 s	TGGTCCACGGGAAGCTC	65°C
NSH2 PLC γ 1 as	CAGGCTCTGAAAGGCGCATC	66°C
CSH2 PLC γ 1 s	TGGTACCACGCAAGCCTG	65°C
CSH2 PLC γ 1 as	GGGGTAGCGAGTTTCATTTTGC	65°C

Oligonukleotide wurden von MWG Biotech bezogen und laut Herstellerangaben rekonstruiert. Auskunft über ihre Sequenz, Schmelztemperatur und Anwendung gibt Tabelle 2.1.

2.1.8 Vektoren

Alle Plasmid-DNA-Moleküle wurden vor ihrer Verwendung mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung kontrolliert. Die Plasmidkarten der in diesem Abschnitt vorgestellten Vektoren sind im Anhang aufgeführt.

2.1.8.1 Der eukaryote Expressionsvektor pRc/CMV

Vossmeier und Kollegen klonierten die cDNA der Ratten- $\alpha 1$ -Integrinuntereinheit über die Schnittstellen *Xba*I- und *Hind*III in die multiple Klonierungsstelle (MKS) des Expressionsvektors pRc/CMV (Invitrogen) und erzeugten ausgehend von „ $\alpha 1$ in pRc/CMV“ *in vitro* die Trunktationsmutanten $\alpha 1$ /GFFKR und $\alpha 1$ /K der $\alpha 1$ -Integrinuntereinheit [Vossmeier *et al.* 2000]. Mit diesen wurden daraufhin stabile Zelllinien generiert (2.1.12.2).

2.1.8.2 Der eukaryote Expressionsvektor pEGFP

Der pEGFP-Vektor dient der Klonierung und Expression von GFP-Fusionsproteinen. Das aus der Qualle *Aequoria victoria* stammende, grünfluoreszierende Protein (GFP) besitzt ein Molekulargewicht von 28 kDa und emittiert nach Absorption von blauem oder UV-Licht grüne Fluoreszenz der Wellenlänge 507 nm. Aufgrund seiner starken Expression wird GFP als Markierung für Proteine eingesetzt, um deren Funktion oder Lokalisierung *in vivo* im Rahmen der Fluoreszenzmikroskopie zu erforschen. Der GFP-Anteil ermöglicht zudem den immunologischen Nachweis des Fusionsproteins im Western Blot mittels eines gegen GFP gerichteten Antikörpers [Prasher *et al.* 1992].

Um N-terminal markierte GFP-Fusionsproteine einzelner Domänen der Ratten-PLC $\gamma 1$ zu exprimieren, wurden pEGFP-C1-Plasmide benutzt (Clontech, zur Verfügung gestellt von M. Falasca, London). Die Klonierung der PH-Domäne der PLC $\gamma 1$ mit den mutierten Konstrukten PH 3/4 und PH 6/7⁶ in die MKS von pEGFP-C1 war über die *Bgl*II- und *Bam*HI-, die der PH-Domäne von PLC $\beta 1$ über *Bse*AI- und *Eco*RI- und die der PH-Domäne der PLC $\delta 1$ sowie die der N-SH2-Domäne der PLC $\gamma 1$ über *Bgl*II- und *Eco*RI-Schnittstellen erfolgt [Falasca *et al.* 1998, Razzini *et al.* 2000, Piccolo *et al.* 2002].

⁶ Ersatz der $\beta 3$ - $\beta 4$ bzw. $\beta 6$ - $\beta 7$ Schleife der PH-Domäne der PLC $\gamma 1$ durch die der PH-Domäne der GTPase Dynamin.

2.1.8.3 Der bakterielle Expressionsvektor pGEX

Der pGEX-Vektor mit seinen Unterklassen (Amersham) dient der Klonierung und Aufreinigung von rekombinanten, N-terminal markierten GST (Glutathion-S-Transferase)-Fusionsproteinen in *E.coli*. Die PLC γ 1-Domänen bzw. -Konstrukte PH, PH 3/4, PH 6/7, N-SH2, C-SH2, SH3 und N+C-SH2 lagen kloniert in pGEX-2TK vor (zur Verfügung gestellt von M. Falasca, London). Die Klonierung der PH-, PH 3/4- und PH 6/7-Konstrukte war über *Bam*HI- und die der N-SH2-Sequenz über *Bam*HI- und *Eco*RI-Schnittstellen erfolgt [Falasca *et al.* 1998, Piccolo *et al.* 2002]. Über die anderen Domänen liegt diesbezüglich keine Information vor. Um das N-terminale Fusionsprotein „GST- α 1-cyto“ zu generieren, war die kodierende Basensequenz der fünfzehn intrazellulären Aminosäuren der α 1-Integrinuntereinheit der Ratte mittels *Sma*I- und *Eco*RI-Verdau in die MKS von pGEX-2TK inseriert worden (Dr. Pamela Weinmann, AG Danker).

2.1.9 Peptide, Matrixproteine und Antikörper

Die in Tabelle 2.2 aufgeführten Peptide mit der Aminosäuresequenz der intrazellulären Sequenzen der α 1- und der β 1-Integrinkette wurden von der Arbeitsgruppe Henklein, Institut für Biochemie, Charité-Universitätsmedizin, Campus Mitte, synthetisiert und in einer Konzentration von 50 mM oder 100 mM als Stammlösung rekonstituiert.

Tabelle 2.2: Übersicht über die verwendeten α 1- und β 1-Integrinpeptide. MG: Molekulargewicht, PM: Plasmamembran, P: Phosphatrest

α 1-Integrinpeptide			
Name	Aminosäuresequenz N'-C'	MG [g/mol]	Lokalisierung innerhalb der α 1-cytoplasmatischen Domäne
α 1-cyto	KIGFFKRPLKKKMEK	1879	
α 1-scrambled	KMGIKFRPKLEKFKK	1879	-
KIGFFKR	KIGFFKR	895	
PLKKKMEK	PLKKKMEK	1001	
β 1-Integrinpeptide			
Name	Aminosäuresequenz N'-C'	MG [g/mol]	Lokalisierung innerhalb der β 1-cytoplasmatischen Domäne
β 1-1	KLLMI IHDRREFA	1642	
β 1-2	KWDTGENPIYKSA	1509	
β 1-3	FAKFEKEKMNAKW	1657	
β 1-4	AVTTVVNPKYEGK	1406	
pY β 1-2	KWDTGENPI (p) YKSA	1604	

Die Matrixproteine Fibronectin (FN) aus humanem Plasma und Kollagen IV (KIV) aus humaner Plazenta wurden von Sigma-Aldrich bezogen.

Die eingesetzten Antikörper und Detektionsmoleküle sind in Tabelle 2.3 aufgelistet.

Tabelle 2.3: Übersicht der verwendeten Antikörper und Detektionsproteine bzw. -peptide.
 IF: Immunfluoreszenz, IP: Immunpräzipitation, WB: Western Blot, POD: Peroxidase

Primärantikörper				
Name	Natur	aus	Vertrieb durch	Anwendung
anti-β-Aktin	monoklonal	Maus	Sigma-Aldrich	WB 1:5000
anti-FAK	polyklonal	Kaninchen	Calbiochem	WB 1:1000
anti-GFP	polyklonal	Kaninchen	Cell Signalling	WB 1:1000
anti-GST ^{POD}	polyklonal	Kaninchen	Sigma-Aldrich	WB 1:1000
anti-α1-Integrin, As2K5	polyklonal	Kaninchen	AG Danker	WB 1:2000
anti-α1-Integrin, 33.4	monoklonal	Maus	AG Danker	IP 8µg
anti-β1-Integrin, As7K4	polyklonal	Kaninchen	AG Danker	WB 1:1000
anti-PLCγ1	monoklonal	Maus	Transduction Laboratories	WB 1:1000
anti-α-Tubulin	monoklonal	Maus	Abcam	WB 1:5000
Sekundärantikörper				
Name	aus	Vertrieb durch		Anwendung
anti-Kaninchen-IgG, GaR ^{POD}	Ziege	Jackson ImmunoResearch		WB 1:5000
anti-Maus-IgG, RaM ^{POD}	Kaninchen	Jackson ImmunoResearch		WB 1:5000
Sonstige bindungsspezifische Proteine				
Name	Vertrieb durch		Anwendung	
anti-F-Aktin, Phalloidin ^{CPITC}	Sigma-Aldrich		IF 1:100	

2.1.10 Enzyme

T4 DNA-Ligase (5 WeissU/µl) mit Puffer (10 x)	Bioline, Luckenwalde
Alkalische Phosphatase aus dem Kälberdarm (CIAP, 10 U/µl) mit Puffer (10 x)	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (2,5 U/µl) mit Puffer (10 x)	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/µl) mit Puffer (10 x)	Fermentas, St. Leon-Rot
Thrombin (1 U/µl)	Calbiochem, Darmstadt
RNase A (100 mg/ml)	Qiagen, Hilden

Die Restriktionsenzyme *Acc65I*, *AvaII*, *BamHI*, *Eco72I*, *Eco91I*, *EcoRI*, *HindIII*, *NcoI*, *NotI*, *PstI*, *SmaI*, *XbaI* und *XhoI* wurden mit ihren zugehörigen Puffern von der Firma Fermentas bezogen und gemäß Herstellerangaben verwendet.

2.1.11 Phospholipide

Phospholipide wurden von Avanti Polar Lipids, USA, bezogen (Tabelle 2.4).

Tabelle 2.4: Liste der verwendeten Phospholipide. SUVs: kleine, unilamellare Vesikel (*small unilamellar vesicles*), LUVs: große, unilamellare Vesikel (*large unilamellar vesicles*), Langmuir: Langmuir-Filmwaage

Phospholipid	Abkürzung	Fettsäurekomponenten	MG [g/mol]	Lösung [mg/ml]	Anwendung
Phosphatidylserin	PS	C18:1	810	10	SUVs
		C16:0, C18:1	784	20	LUVs
		C14:0	701,9	0,5	Langmuir
Phosphatidylcholin	PC	C18:1	786,2	10	SUVs
		C16:0, C18:1	760,1	20	LUVs
		C14:0	677,9	0,5	Langmuir
Phosphatidylinositol-(4,5)bisphosphat	PI(4,5)P ₂	C18:1	1074,2	0,5	SUVs
				0,1	LUVs
				0,5	Langmuir
Phosphatidylinositol-(3,4,5)trisphosphat	PI(3,4,5)P ₃	C18:1	1171,2	0,5	SUVs
				0,1	LUVs
				0,5	Langmuir

2.1.12 Zellen

2.1.12.1 Bakterienstämme

Chemisch kompetente *One Shot* Top10-Bakterien für die Klonierung von cDNA-Fragmenten und für die Propagierung von Plasmid-DNA wurden von Invitrogen bezogen. Der Genotyp lautet: F⁻ mcrA Δ(mrr hsdRMS mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL mcrBC) (Str^R) endA1 nupG.

Für die heterologe Expression und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen wurden *E.coli*-Bakterien des Typs BL21 (DE3) (Novagen) verwendet. Der Genotyp dieses Bakterienstamms ist: B, F⁻, dcm, ompT, hsdS (r_B⁻ m_B⁻), gal λ (DE3).

2.1.12.2 Säugerezelllinien

CHO-Zellen wurden von ATCC bezogen. Diese wurden ausgehend von Ovarialzellen des chinesischen Hamsters generiert und exprimieren endogen die Integrine α5β1 und αvβ3. Verwendet wurden die mit den α1-Integrinvarianten stabil transfizierten CHO-Zelllinien α1/f.l., α1/GFFKR und α1/K [Vossmeier *et al.* 2000]. „f.l.“ steht für *full length*, da die intrazelluläre Aminosäuresequenz der α1-Integrinuntereinheit, bezeichnet ab dem Lysin₁₁₆₆-Rest im Einbuchstabencode mit K₁I₂G₃F₄F₅K₆R₇P₈L₉K₁₀K₁₁K₁₂M₁₃E₁₄K₁₅, hier

vollständig vorliegt, wohingegen sie in den „KIGFFKR“- und „K“-Zellen bis auf den Rest R₇ bzw. K₁ verkürzt ist.

2.1.13 Material für molekularbiologische Methoden

Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt	Applichem, Darmstadt
DNA-Ladepuffer (6 x)	Fermentas, St. Leon-Rot
Ethidiumbromid, 1% (w/v)	Roth, Karlsruhe
UV-Küvetten	Eppendorf, Hamburg
Thermodruckerpapier	Epson, Japan
PLASTIBRAND-Einmalküvetten	Brand GmbH, Wertheim
<i>HiSpeed Plasmid Maxi-Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>QIAquick Gel Extraction-Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>Thermo Sequenase Cycle Sequencing-Kit</i>	GE Healthcare, Freiburg
dNTP-Mix (10 mM)	Fermentas, St. Leon-Rot
MgCl ₂ (25 mM)	Fermentas, St. Leon-Rot
Impfösen	Roth, Karlsruhe
Petrischalen, Ø 10 cm	VWR, Darmstadt
PCR-Bio-Mix (2 x)	Bioline, Luckenwalde

2.1.14 Material für lipidchemische und biophysikalische Methoden

Miniextruder	Avanti Polar Lipids, USA
Supelco-Glasmikrogefäße	Sigma-Aldrich, Steinheim
Transferpettor-Kolbenhubpipette	Brand GmbH, Wertheim
Ultrazentrifugationsmikroreaktionsgefäße	Beckman, USA
<i>PIP-Strip-Membranen</i>	Echelon, USA
<i>KimtechScience-Präzisionswischtücher</i>	Kimberly-Clark, GB
NuPAGE Novex Bis-Tris-Gele, 4-12%	Invitrogen, Karlsruhe
CD-Küvette Quarz Suprasil, 0,1 mm	Hellma Optik, Jena
NMR-Röhrchen, Norell 502, 1 ml	Deutero GmbH, Kastellaun
Deuteriumoxid, 99,9%	Deutero GmbH, Kastellaun

2.1.15 Material für protein- und biochemische Methoden

Coomassie-Brillant-Blau (CBB) R/G-250	Serva, Heidelberg
<i>BCA Protein Assay Detection-Kit</i>	Pierce, USA
Glutathion-Sepharose 4B <i>Fast Flow</i> und <i>GSTrap</i> 4B <i>Fast Flow</i> -Säule, 5 ml	GE Healthcare, Freiburg
MonoS HR 5/5-Kationenaustauschersäule, 1 ml	GE Healthcare, Freiburg
<i>HiLoad</i> 16/60 Superdex 75, 3-70 kDa	GE Healthcare, Freiburg
¹⁵ N-Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Campro Scientific, Berlin
Acrylamid/N ^o , N ^o Methylenbisacrylamid-Mix (30%/0,8%)	Serva, Heidelberg
Amicon-Ultrafiltrationseinheiten	Millipore, USA
Whatman-Filterpapier	Whatman International, GB
Protran-Nitrocellulosemembran	Schleicher und Schüll, Dassel
Magermilchpulver	Humana Milchunion, Herford
Protein-G-Sepharose 4 <i>Fast Flow</i>	GE Healthcare, Freiburg
<i>Super Signal West Pico</i> -Chemilumineszenzsubstrat	Pierce, USA
Ponceau S	Serva, Heidelberg
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe

2.1.16 Material für zellbiologische Methoden

Sämtliches Plastik-Zellkulturmaterial, in Form von Schalen mit einem Durchmesser von 15 cm, 10 cm und 6 cm, 6-, 24- und 96-Loch-Platten sowie Flaschen mit einer Fläche von 25 cm², 75 cm² und 150 cm², wurde von Costar, Corning Inc., USA bezogen.

BioWhittaker α - <i>Minimal Essential</i> -Medium (MEM)	Lonza, Schweiz
HyClone Fötale Kälberserum (FKS)	Perbio, Thermo Fisher Scientific, Bonn
PBS (pH 7,4; 300 mosmol): 8 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , 140 mM NaCl, 3 mM KCl	PAA Laboratories, Österreich
PBS/EDTA	0,5 g/l Na ₂ EDTA in PBS
<i>Transwell</i> -Migrationseinheiten (8,0 μ m Porengröße, 6,5 mm Durchmesser)	Costar, Corning Inc., USA

<i>Lab-Tek Permax-8-Kammer-Objektträger</i>	Nunc Inc., USA
Deckgläschen für die Immunfluoreszenz, (24 x 50) mm	Paul Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen
Immersionsöl	Zeiss, Jena
Neubauer-Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen
Deckgläschen für die Zählkammer, (20 x 26) mm	Menzel-Gläser, Braunschweig
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
Saponin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAA Laboratories, Österreich
<i>GelMount</i> -Eindeckelmedium	Sigma-Aldrich, Steinheim
Handzählgerät	Roth, Karlsruhe
Zählokular	Nikon, Japan
OPTI-MEM	Gibco, Invitrogen, USA
Accutase-Enzymmix	PAA Laboratories, Österreich
Trypanblau (0,4% w/v)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Frierbehälter <i>Mr Freeze</i> (<i>Cryo 1°C</i>)	Nalgene, Nunc Inc., USA
Plastikzellschaber	Costar, Corning Inc., USA
Pasteurpipetten (mit und ohne Watte), 150 mm	Roth, Karlsruhe
Kryomikrogefäße (2 ml, System 100)	Nalgene, Nunc Inc., USA
Kristallviolett (Hexamethylpararosanilin- Methylviolett 10B)	Merck, Darmstadt

2.1.17 Software und Datenbanken

ACDP v2.6	www.structuralchemistry.org
Axiovision	Zeiss, Jena
EXPASY	www.expasy.org
MacMolly 3.7	Softgene GmbH, Berlin
LICOR	LICOR-Biosciences, USA
PUBMED	www.ncbi.nlm.nih.gov
Origin 6.0	Origin Lab, MicroCal, USA

Sparky 3	T.D. Goddard & D.G. Kneller, USA
Xwin-NMR	Bruker Biospin, Karlsruhe

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Kultivierung von Bakterien

Um Plasmid-DNA aus Top10-Bakterien zu isolieren, wurden jeweils 4 ml LB-Medium mit einer von einer Agarplatte gepickten Bakterienkolonie angeimpft und üN bei 37°C und 300 rpm geschüttelt. Antibiotika wurden dem LB-Flüssigmedium bzw. der LB-Agarplatte in einer Endkonzentration von 50 µg/ml Kanamycin oder 200 µg/ml Ampicillin zugesetzt.

BL21 (DE3)-Bakterien wurden mittels Elektroporation mit pGEX-Plasmid-DNA transformiert (2.2.1.5), auf ampicillinhaltigen (100 µg/ml) LB-Agarplatten ausgestrichen und üN bei 37°C inkubiert. 100 ml Minimalmedium wurden mit drei Kolonien inokuliert und üN bei 190 rpm und 37°C geschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde für 10 Min bei 1900 × g und RT zentrifugiert, und das erhaltene Bakterienpellet wurde in 1 l frischem Minimalmedium resuspendiert. Mit dieser Sekundärkultur wurde gemäß 2.2.5.1 weiter verfahren.

Lösungen für die Bakterienkultivierung

LB-Flüssigmedium: 1% (w/v) Trypton, 1% (w/v) NaCl, 0,5% (w/v) Hefeextrakt

LB-Festmedium: LB-Flüssigmedium, 1,5% (w/v) Agar-Agar

Minimalmedium: 5% (v/v) LB-Medium, 10% (v/v) 10 x M9-Salzlösung, 1% (v/v) Spurenelementelösung, 100 mg/l Ampicillin, 1 mM MgSO₄, 0,3 mM CaCl₂, 0,4% (w/v) Glukose, 1 mg/l Thiamin, 1,5 mg/l Biotin, 0,5 mg/l ¹⁵N-NH₄Cl bzw. 1,5 mg/ NH₄Cl

Spurenelementelösung (pH 7,6): 5 g/l Na₂EDTA, 0,5 g/l FeSO₄, 50 mg/l ZnCl₂, 10 mg/l CuSO₄

M9-Salzlösung (10 x): 500 mM Na₂HPO₄, 150 mM KH₂PO₄, 100 mM NaCl

2.2.1.2 Bestimmung der optischen Dichte und Lagerung von Bakterienkulturen

Die Wachstumsphasen von Bakterienkulturen wurden anhand der optischen Dichte (OD) identifiziert. Hierfür wurde 1 ml Flüssigbakterienkultur in einer Plastikkuvette gegen eine Medienkontrolle bei einer Wellenlänge von 600 nm photometrisch vermessen.

Um Bakterienkulturen längerfristig zu lagern, wurden 800 µl einer 3 ml-üN-Kultur mit 200 µl Glycerin gründlich gemischt und bei -80°C eingefroren.

2.2.1.3 Herstellen chemisch-kompetenter Zellen

3 ml antibiotikafreies LB-Medium (2.2.1.1) wurde mit 50 µl chemisch-kompetenten Top10-Zellen inokuliert und üN bei 37°C geschüttelt. 250 µl Bakteriensuspension wurde anschließend in 100 ml LB-Medium überführt und bei 37°C und 190 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert (2.2.1.2). Die Bakterien wurden durch Zentrifugation bei 2890 × g und 4°C für 15 Min sedimentiert und in 25 ml eiskalter CaCl₂-Lösung resuspendiert. Der Vorgang wurde 2 x wiederholt. Das zuletzt erhaltene Bakterienpellet wurde in 2,5 ml CaCl₂-Lösung resuspendiert und in 50 µl-Aliquots portioniert. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert [Mülhardt 2006].

Lösungen zum Herstellen chemisch-kompetenter Zellen

Calciumchlorid-Lösung: 10 mM PIPES pH 7, 60 mM CaCl₂, 15% (v/v) Glycerin

2.2.1.4 Transformation von Bakterien mittels Hitzeschock

Ein 50 µl-Aliquot chemisch-kompetenter Top10-Bakterien wurde im Eisbad aufgetaut und mit maximal 1 µg Plasmid-DNA oder mit 5-10 µl Ligationsansatz vermischt. Der Ansatz wurde für 30 Min auf Eis, dann für 45 s bei 43°C und schließlich für 2 Min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden in 250 µl handwarmem SOC-Medium (Invitrogen) aufgenommen und für 1 h bei 37°C geschüttelt. Verschiedene Volumina der Bakteriensuspension wurden auf antibiotikahaltigen LB-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert.

2.2.1.5 Transformation von Bakterien mittels Elektroporation

25 µl elektrokompentente BL21 (DE3)-Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und in einer gekühlten Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 2 mm) mit 0,2 µl pGEX-Plasmid-DNA vermischt. Nach dem gesetzten Elektropuls (1,8 kV, 200 Ohm, 25 µF) wurden die Zellen in 1 ml warmem LB-Medium (2.2.1.1) aufgenommen und schüttelnd für 1 h bei 37°C inkubiert. 50 µl der Bakteriensuspension wurden auf LB-Amp-Platten ausgestrichen und üN bei 37°C kultiviert.

2.2.1.6 Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (Minipräparation)

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse. 2 ml einer üN-Kultur (2.2.1.1) wurden für 5 Min bei 3200 × g und RT zentrifugiert. Das erhaltene Bakterienpellet wurde in 200 µl Puffer P1 resuspendiert und für 5 Min auf Eis gekühlt. 200 µl Puffer P2 wurden zugegeben. Der Ansatz wurde mehrmals geschwenkt und für 5 Min auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 250 µl Puffer P3 wurde der Ansatz erneut

mehrmals geschwenkt und für 15 Min eisgekühlt. Das Gemisch wurde für 15 Min bei 4°C und 16000 × g zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut analog zentrifugiert. Der dann erhaltene Überstand wurde mit 500 µl Isopropanol für 5 Min bei RT inkubiert. Die präzipitierte Plasmid-DNA wurde durch 20-minütige Zentrifugation bei 16000 × g und 4°C sedimentiert und mit 750 µl 70% Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde bis zur Durchsichtigkeit bei RT getrocknet, in 45 µl sterilem Wasser resuspendiert und über UV-Absorption quantifiziert.

Plasmid-DNA-Isolierungslösungen

Resuspensionspuffer P1: 50 mM Tris/HCl pH 8, 10 mM Na₂EDTA, 100 µg/ml RNase A

Lysepuffer P2: 200 mM NaOH, 1% (w/v) SDS

Neutralisierungspuffer P3: 3 M KCH₃COO/CH₃COOH pH 5,5

2.2.1.7 Isolierung von Plasmid-DNA im großen Maßstab (Maxipräparation)

Mit 50 µl einer dichten 4 ml üN-Kultur wurde eine Sekundärkultur in 250 ml antibiotikahaltigem LB-Medium angeimpft und üN bei 37°C geschüttelt. Die Bakterien wurden für 15 Min bei 2890 × g und 4°C zentrifugiert, und das erhaltene Pellet wurde mit dem *HiSpeed*-Plasmid-DNA-Isolierungskit (Qiagen) nach Herstellerprotokoll aufgearbeitet.

2.2.1.8 Präzipitation von Plasmid-DNA

Bei einem OD₂₆₀/OD₂₈₀-Quotient einer Plasmid-DNA-Lösung kleiner als 1,7, wurde die Lösung mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetatlösung (pH 4,8) und 2,5-fachem Volumen kalten Ethanol p.A. gut gemischt und für 2 h bei -80°C inkubiert. Die Lösung wurde für 20 Min bei 11000 × g und 4°C zentrifugiert, und das resultierende Plasmid-DNA-Pellet wurde 2 x mit 750 µl 70% Ethanol gewaschen und zentrifugiert. Die Plasmid-DNA wurde bei RT getrocknet und anschließend in sterilem Wasser resuspendiert und quantifiziert.

2.2.1.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) [Saiki *et al.* 1985]

Für analytische PCR-Reaktionen wurde die *Taq*-Polymerase und für Klonierungen die *Pfu*-Polymerase verwendet, die über eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität verfügt. Die Ansätze wurden auf Eis in PCR-Reaktionsgefäßen gemäß Tabelle 2.5 pipettiert.

Tabelle 2.5: Alternative PCR-Ansätze. Verwendet wurden entweder der PCR-Bio-Mix (Bioline) oder das *Taq*- bzw. *Pfu*-Polymerasensystem (Fermentas).

Bio-Mix	<i>Taq</i> -Polymerase	<i>Pfu</i> -Polymerase
50 ng Plasmid-DNA oder 3,5 µg cDNA		
0,25 µl 10 µM Primer <i>sense</i>		
0,25 µl 10 µM Primer <i>antisense</i>		
6,25 µl 10 x PCR-Bio-Mix	1,25 µl 10 x <i>Taq</i> -Puffer mit (NH ₄) ₂ SO ₄	1,25 µl 10 x <i>Pfu</i> -Puffer mit MgSO ₄
	0,25 µl 25 mM MgCl ₂	-
	0,625 µl 10 mM dNTPs	
	0,125 µl <i>Taq</i>	0,125 µl <i>Pfu</i>
add 12,5 µl H ₂ O		

Folgendes Programm wurde anschließend in dem PCR-Gerät der Firma Bio-Rad gefahren:

Initiale Denaturierung:	94°C	1 Min	} 30 x
Denaturierung:	94°C	20 s	
Primer-Anlagerung:	An-T ⁷	1 Min	
Primer-Extension:	72°C	1-3 ⁸ Min	
Finale Elongation:	72°C	10 Min	
Halten:	4°C	∞	

2.2.1.10 Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Für die Restriktionseinzelanalyse wurden 5 µg Plasmid-DNA mit sterilem Wasser, 0,25 U/µl Enzym und 2 µl zugehörigem Enzympuffer in einem Volumen von 20 µl gemischt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Für einen Doppelverdau wurden je Enzym 0,5 U/µl und der Puffer Y⁺ in 2-facher Endkonzentration eingesetzt. Für präparative Zwecke wurden 10 µg Vektor-DNA oder 50 µl aufgereinigtes PCR-Produkt in einem Volumen von 60 µl in einem Restriktionsdoppelverdau für 2 h bei 37°C inkubiert.

2.2.1.11 Aufreinigung von löslichen PCR-Produkten oder von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach der Agarosegelelektrophorese eines Restriktionsansatzes wurden die gewünschten DNA-Agarose-Banden unter der UV-Lampe ausgeschnitten. Sowohl die in Agarosestücken

⁷ Die Hybridisierungstemperatur (*Annealing temperature*, An-T) wurde primer- und polymerasenspezifisch ermittelt. Für Informationen über Sequenz und Schmelztemperatur der Oligonukleotide siehe Tabelle 2.1.

⁸ Die Elongationszeit betrug abhängig von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts und der eingesetzten Polymerase 1 Min/kb DNA (*Taq*) oder 2 Min/kb DNA (*Pfu*).

enthaltene DNA als auch lösliche PCR-Produkte wurden mit dem *QIAquick*-Gel-Extraktionskit (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

2.2.1.12 Ligation von DNA-Fragmenten

In einer Ligrationsreaktion wurden 20 ng linearisierte, dephosphorylierte Vektor-DNA (siehe unten) mit 20- bzw. 35-fachem molarem Überschuss der analog restriktionsverdauten Insert-DNA eingesetzt. In dem Gesamtvolumen von 20 µl wurden 2 µl 10 x T4 DNA-Ligasepuffer und 1 µl T4 DNA-Ligase zugefügt. Die Ligation erfolgte in bei 4°C.

Der linearisierte Zielvektor wurde vor der Ligation mit alkalischer Phosphatase (CIAP) am 5'-Ende dephosphoryliert. Hierfür wurde 50 µl aufgereinigter, linearisierter Vektor mit 6 µl CIAP-Puffer, 1 µl CIAP und 3 µl sterilem Wasser für 1h bei 37°C inkubiert. Die CIAP wurde anschließend für 15 Min bei 80°C inaktiviert.

2.2.1.13 Klonierung der für die C-SH2- und die N+C-SH2-Domäne der PLCγ1 kodierenden DNA-Sequenzen in den pEGFP-C1-Expressionsvektor

Um die C-SH2- und die Tandem-N+C-SH2-Domäne der PLCγ1 als GFP-Fusionsproteine zu erhalten, wurden ihre kodierenden DNA-Sequenzen über *Bam*HI- und *Xba*I-Schnittstellen aus dem pGEX-Vektor entfernt und in den pEGFP-C1-Vektor inseriert, wie in Abb. 2.1 dargestellt ist. Die zugehörigen Vektorkarten sind im Anhang aufgeführt.

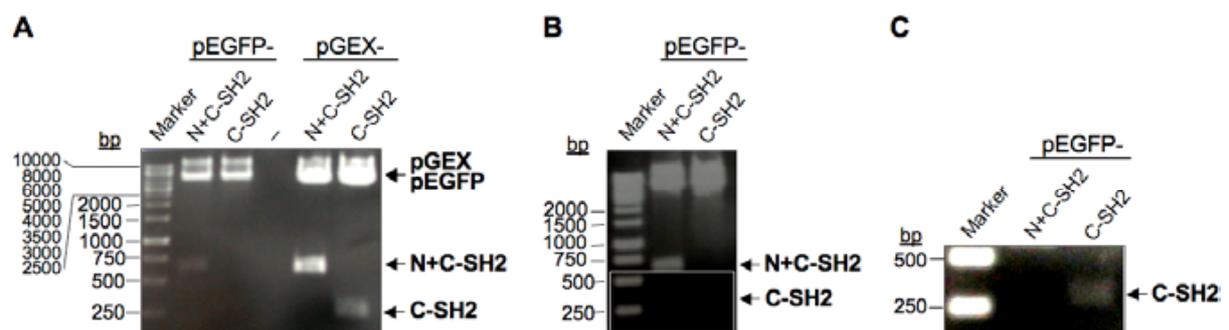


Abb. 2.1: *Bam*HI/*Xba*I-Kontrollverdau des pEGFP-C1-Plasmids mit inserierter cDNA der C-SH2- oder der N+C-SH2-Domäne der PLCγ1. Gezeigt sind drei Darstellungen eines ethidiumbromidgefärbten Agarosegels (1,5%). Die für die C-SH2- oder die N+C-SH2-Domäne kodierenden DNA-Sequenzen wurden mittels *Bam*HI- und *Xba*I-Spaltung aus dem pGEX-Vektor ausgeschnitten, aufgereinigt und in den analog verdauten, dephosphorylierten pEGFP-C1-Vektor inseriert. In der jeweiligen Ligrationsreaktion wurde das C-SH2-Fragment mit 35-fachem und das N+C-SH2-Fragment mit 20-fachem molarem Überschuss zum Vektor eingesetzt. Chemisch-kompetente Top10 Bakterien wurden mit den Ligrationsansätzen transformiert. Die Plasmid-DNA kanamycinresistenter Klone wurde isoliert und mit *Bam*HI und *Xba*I endonukleolytisch kontrollverdaut (A). Unter stärkerer Belichtung wurden in dem Agarosegel auch das 627 bp-Fragment der N+C-SH2-Domäne (B) und das 270 bp-Fragment der C-SH2-Domäne (C) im pEGFP-C1-Vektor detektiert. Die im Agarosegel positiv getesteten Plasmid-DNA-Proben wurden anschließend sequenziert.

2.2.1.14 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Für die Sequenzierung von Plasmid-DNA nach dem Kettenabbruchverfahren wurden der *Cycle Sequencing*-Kit (GE Healthcare) und fluorophormarkierte Oligonukleotide (Tabelle 2.1) eingesetzt [Sanger *et al.* 1977, Sears *et al.* 1992]. 5 µg Plasmid-DNA wurden mit je 1 µl IRD700-konjugiertem Strang- bzw. IRD800-konjugiertem Gegenstrang-Primer (je 2 µM) und sterilem Wasser auf ein Volumen von 13 µl aufgefüllt. Je 3 µl des Gemischs wurden auf vier PCR-Reaktionsgefäße verteilt und jeweils mit 3 µl einer der Nukleotidlösungen A, C, G oder T gut gemischt. Eine PCR mit folgendem Programm wurde in dem PCR-Cycler der Firma Bio-Rad gefahren:

Initiale Denaturierung:	94°C	2 Min	
Denaturierung:	94°C	20 s	} 24 x
Primer-Anlagerung:	61,5°C	20 s	
Primer-Extension:	72°C	20 s	
Halten:	4°C	∞	

Die PCR-Reaktionen wurden durch Zugabe von 5 µl Stopplösung (im Kit enthalten) und Erhitzen auf 72°C für 3 Min beendet. Die anschließende Gelelektrophorese und Rohdatengewinnung wurden von Frau Katrin Büttner, Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, vorgenommen. Die generierten Daten wurden mithilfe des Alignment-Programms der MacMolly Software 3.7 mit der Ziel-DNA-Sequenz abgeglichen.

2.2.2 Lipidchemische Methoden

2.2.2.1 Herstellen von Lipidlösungen

Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylserin (PS) wurden in einer Konzentration von 10-25 mg/ml in Chloroform; Phosphatidylinositol(4,5)bisphosphat (PI(4,5)P₂) und Phosphatidylinositol(3,4,5)trisphosphat (PI(3,4,5)P₃) hingegen in einem Gemisch aus Chloroform: Methanol: Wasser (20:9:1 Volumen%) gelöst.

2.2.2.2 Langmuir-Filmwaagenmessungen

Filmwaagenmessungen erfolgen an Einschichtmembranen (*monolayer*), die durch Spreitung einer Phospholipidmischung auf einer wässrigen Lösung entstehen. Die so gebildeten Lipidfilme ermöglichen modellhaft die Untersuchung von Vorgängen an Phasengrenzen, wie z.B.

zwischen Plasmamembran und Cytosol. Dabei können einzelne Parameter wie die Zusammensetzung der Lipidmischung oder des Puffers gezielt variiert und untersucht werden.

Tabelle 2.6: Alternative Puffer für die Langmuir-Filmwaagenmessungen.

Bestandteil	Standardpuffer	Ionenpuffer	Phosphatpuffer
HEPES/NaOH pH 7,2 (16°C)	50 mM	50 mM	50 mM
NaCl	100 mM	100 mM	50 mM
MgCl ₂	-	5 mM	-
CaCl ₂	-	5 mM	-
NaH ₂ PO ₄	-	-	50 mM

Die Filmwaagenmessungen wurden mit dem Filmwaagenmodell 601 (Nima) bei 20°C in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Andreas Hofmann am Eskitis-Institut der Griffith-Universität in Brisbane, Australien, durchgeführt [Hu *et al.* 2008]. Die verwendete Filmwaage verfügt über eine bewegliche Barriere, die computergesteuert innerhalb einer Fläche von 99 cm² und 20 cm² bewegt und fixiert wurde. Vor der Benutzung wurden Filmwaage und Zubehör (Trog, Barriere, Minimagnetstab, Absaugspitze) mit einem chloroform-, dann mit einem ethanolgetränkten Zellstofftuch und schließlich mit einem trockenen Präzisionswischtuch gesäubert. Nach dem Zusammenbau der Apparatur wurden 100 ml Puffer in den Trog gegossen (Tabelle 2.6) und dieser mithilfe eines Minimagnetstabs kontinuierlich auf niedrigster Stufe gerührt. Als Drucksensor diente eine Wilhelmy-Platte, ein Stück Whatman-Papier der Maße 2,4 cm x 1 cm. Diese wurde hängend in den Puffer eingetaucht, ohne den Boden des Trogs zu berühren (Abb. 2.2).

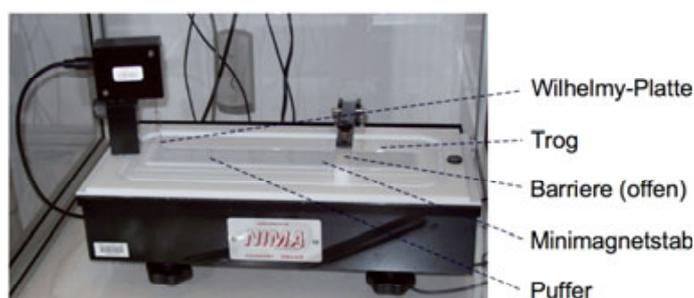


Abb. 2.2: Aufbau der gebrauchsfertigen Langmuir-Filmwaage.

Die Barriere wurde im Rahmen einer „Isothermen“-Messung bis zu einer Fläche von 20 cm² geschlossen, und Verunreinigungen der Pufferoberfläche wurden abgesaugt. Die Barriere wurde voll geöffnet, die Lipidmischung (Tabelle 2.7) wurde tröpfchenweise auf der Pufferoberfläche verteilt und für 10 Min zu einem Einschichtfilm gespreitet. Zunächst wurde für jedes Lipidgemisch das Volumen ermittelt, bei dem die Druck-Fläche (π -A)-Isotherme einen

Phasenübergang von flüssig-kondensiert zu flüssig-expandiert bei $\pi = 15,5$ mN/m besaß. Mit dem ermittelten Volumen der jeweiligen Lipidmischung wurde ein neuer Film gespreitet. Im Rahmen einer 20-minütigen „Druckkontroll“-Messung wurde dann die Fläche eingestellt, die dem initialen Spreitungsdruck $\pi_i = 15,5$ mN/m entsprach. Im anschließenden, 40-minütigen „Flächenkontroll“-Experiment wurde die Fläche konstant gehalten, und der Spreitungsdruck π wurde aufgezeichnet. Nach den ersten 5 Min wurden dabei 250 nmol Peptid α 1-cyto, KIGFFKR, PLKKKMEK, α 1-scrambled oder β 1-4 bzw. Wasser in die wässrige Phase injiziert, und die Spreitungsdruckmessung wurde nach weiteren 35 Min beendet. Die Messdaten wurden mithilfe des Microsoft Excel-Programms prozessiert und die Änderungen des Spreitungsdrucks ($\Delta\pi = \pi - \pi_i$) wurden berechnet.

Tabelle 2.7: Zusammensetzungen einzelner Lipidmischungen zur Generierung von Langmuir-Einschichtfilmen. MG: Molekulargewicht, DM: Dimyristoyl-, PC: Phosphatidylcholin, PS: Phosphatidylserin, PI(4,5)P₂: Dioleoylphosphatidylinositol(4,5)bisphosphat, PI(3,4,5)P₃: Dioleoylphosphatidylinositol(3,4,5)trisphosphat

Lipidmischung (0,5 g/l in 100 μ l)	Zusammensetzung [mol%]	mittleres MG [g/mol]	Volumina einzelner Lipidbestandteile			
			DMPC [0,5 g/l]	DMPS [0,5 g/l]	PI(4,5)P ₂ [0,5 g/l]	PI(3,4,5)P ₃ [0,5 g/l]
PC:PS	50:50	689,9	49,1 μ l	50,9 μ l	-	-
PC:PS	85:15	681,5	84,6 μ l	15,5 μ l	-	-
PC:PS:PI(4,5)P ₂	54:44:2	696,4	52,5 μ l	44,4 μ l	3,1 μ l	-
PC:PS:PI(4,5)P ₂	60:35:5	716,6	57,5 μ l	34,9 μ l	7,7 μ l	-
PC:PS:PI(3,4,5)P ₃	56:42:2	704,6	54,3 μ l	42,3 μ l	-	3,4 μ l
PC:PS:PI(3,4,5)P ₃	65:30:5	725,9	62 μ l	29,8 μ l	-	8,3 μ l

2.2.2.3 Präparation von Liposomen

Liposomen bzw. Vesikel bestehen aus einer Lipiddoppelschicht, die ein wässriges Kompartiment umschließt. Multilamellare Vesikel (MLVs) sind zwiebelschalenähnlich aus mehreren dieser Doppelschichten aufgebaut. In der Anzahl der einzelnen Schichten und somit ihres Durchmessers sind MLVs äußerst heterogen (200-2000 nm). Unilamellare Vesikel sind hingegen von einer Lipiddoppelschicht umgeben und lassen sich in große (100-200 nm, LUVs, 2.2.2.4) oder kleine, unilamellare Vesikel (20-50 nm, SUVs, 2.2.2.5) einteilen.

2.2.2.4 Präparation von multilamellaren Vesikeln (MLVs) und großen, unilamellaren Vesikeln (LUVs)

Die Präparation von großen, unilamellaren Vesikeln (LUVs, *large unilamellar vesicles*) aus multilamellaren Vesikeln (MLVs) erfolgte in dem Labor von Herrn Priv.-Doz. Dr. Christian Freund am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie, Berlin-Buch. Generiert wurden

600 µl Vesikelsuspension mit einer Konzentration von 4 mM, deren Zusammensetzung Tabelle 2.8 entnommen werden kann.

Für jede MLV-Sorte wurde ein Reagenzglas verwendet und dieses je 2 x mit Methanol und Chloroform ausgespült. In das Reagenzglas wurden 200 µl Chloroform und die Phospholipide pipettiert. Die Lipidmischung wurde für 1 h am Rotationsverdampfer und anschließend 10^{-4} mbar im Hochvakuum vollständig evaporiert. Der Lipidfilm wurde mit Liposomenpuffer für 30 Min bei RT inkubiert und gründlich resuspendiert. Die erzeugte trübe MLV-Suspension wurde in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und fünf Gefriertaucyclen unterworfen (1 Min flüssiger Stickstoff - 5 Min RT-Wasserbad). Die MLVs wurden bis zu ihrer Weiterverarbeitung in LUVs bei -20°C gelagert.

Tabelle 2.8: Präparation von MLVs und SUVs. PO: Palmitoyl-oleoyl-, PC: Phosphatidylcholin, PS: Phosphatidylserin, PI(4,5)P₂: Dioleoylphosphatidylinositol(4,5)bisphosphat, PI(3,4,5)P₃: Dioleoylphosphatidylinositol(3,4,5)trisphosphat

MLVs/LUVs (4 mM in 600 µl)	Zusammensetzung [mol%]	Volumina einzelner Lipidbestandteile			
		POPC [20 g/l]	POPS [20 g/l]	PI(4,5)P ₂ [0,1 g/l]	PI(3,4,5)P ₃ [0,1 g/l]
PC:PS	50:50	45,6 µl	47 µl	-	-
PC:PS	85:15	77,5 µl	14,1 µl	-	-
PC:PS:PI(4,5)P ₂	54:44:2	49,3 µl	41,4 µl	516,6 µl	-
PC:PS:PI(3,4,5)P ₃	56:42:2	51,1 µl	39,5 µl	-	656,2 µl

LUVs wurden mittels Extrusion der MLV-Suspension durch eine Polycarbonatmembran mit 100 nm Porengröße hergestellt. Hierfür wurde ein Miniextruder (Avanti Polar Lipids) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Extrudiert wurde in siebzehn Schüben, wobei der Übergang von der trüben MLV-Suspension zu einer klaren LUV-Lösung zu beobachten war. Diese wurde in ein Zentrifugenmikroreaktionsgefäß überführt, mit LUV-Puffer auf 1,4 ml aufgefüllt und für 1 h bei 8°C und 90000 × g zentrifugiert. Das Liposomenpellet wurde entsprechend der Endkonzentration von 4 mM in LUV-Puffer resuspendiert. LUVs wurden bei 6°C gelagert und innerhalb eines Tages für den Co-Sedimentationstest (2.2.2.6) und innerhalb von einer Woche für die Co-Immunopräzipitation (2.2.5.18) verwendet.

Puffer für die Präparation von MLVs und LUVs

Liposomenpuffer: 10 mM MOPS pH 7,2, 176 mM Sucrose

LUV-Puffer: 10 mM MOPS pH 7,2, 100 mM NaCl

2.2.2.5 Präparation von multilamellaren Vesikeln (MLVs) und kleinen, unilamellaren Vesikeln (SUVs)

Die Herstellung von kleinen, unilamellaren Vesikeln (SUVs, *small unilamellar vesicles*) für die CD-Spektroskopie (2.2.3.1) erfolgte in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Andreas Hofmann am Eskitis-Institut der Griffith-Universität Brisbane, Australien [Hu *et al.* 2008].

Die erforderlichen Lipidvolumina für die Präparation von je 1 μmol SUVs (Tabelle 2.9) wurden in einem Reagenzglas mit 2 ml Chloroform-Methanol-Gemisch (2:1) überschichtet und anschließend unter einem konstanten Stickstoffstrom abgedampft. Zu dem Lipidfilm wurden 3 ml Diethylether gegeben und die Lipide erneut bis zur Trockne evaporiert. Der Lipidfilm wurde mit 1 ml CD-Puffer für 30 Min bei RT inkubiert und resuspendiert. Die entstandene MLV-Suspension wurde für 10 Min bei 10°C und 11000 \times g zentrifugiert. Das Liposomenpellet wurde in dem entsprechenden Volumen CD-Puffer resuspendiert (Spalte 4 in der unteren Hälfte von Tabelle 2.9) und bei RT sonifiziert, bis eine klare SUV-Lösung entstand. Durch Eiszugabe wurde die Temperatur des Ultraschallwasserbads hierbei unter 20°C gehalten. SUVs wurden frisch für CD-spektroskopische Messungen verwendet (2.2.3.1), wo sie durch ihre geringe Größe weniger Streuung als LUVs oder MLVs erzeugten.

Tabelle 2.9: Präparation von 1 μmol SUVs. DO: Dioleoyl-, PC: Phosphatidylcholin, PS: Phosphatidylserin, PI(4,5)P₂: Dioleoylphosphatidylinositol(4,5)bisphosphat, PI(3,4,5)P₃: Dioleoylphosphatidylinositol(3,4,5)trisphosphat

		Volumina einzelner Lipidbestandteile			
1 μmol SUVs	Zusammensetzung [mol%]	DOPC [10 g/l]	DOPS [10 g/l]	PI(4,5)P ₂ [0,5 g/l]	PI(3,4,5)P ₃ [0,5 g/l]
PC:PS	50:50	39,4 μl	40,3 μl	-	-
PC:PS:PI(4,5)P ₂	54:44:2	42,5 μl	35,5 μl	43 μl	-
PC:PS:PI(3,4,5)P ₃	56:42:2	44,1 μl	33,9 μl	-	46,9 μl
		Eigenschaften			
1 μmol SUVs	Zusammensetzung [mol%]	Gesamtlipid [μg]	Volumen [μl]	Konzentration [mg/ml] [mM]	
PC:PS	50:50	796,9	79,7	10	12,55
PC:PS:PI(4,5)P ₂	54:44:2	801,5	80,2		12,47
PC:PS:PI(3,4,5)P ₃	56:42:2	803	80,3		12,45

Lösungen für die Präparation von SUVs

CD-Puffer: 10 mM Na₂HPO₄ pH 7,5, 20 mM NaCl

2.2.2.6 Liposomen-Co-Sedimentationstest

Der Liposomen-Co-Sedimentationstest zur Analyse von Lipid-Protein-Interaktionen wurde in der Arbeitsgruppe von Herrn Priv.-Doz. Christian Freund am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie in Berlin-Buch durchgeführt [Heuer *et al.* 2006].

In einem Gesamtvolumen von 200 μl wurden in einem Ultrazentrifugenmikroreaktionsgefäß LUVs (2.2.2.4) in der Endkonzentration von 0, 100, 300, 600, 900 oder 1600 μM mit 30 μM $\alpha\text{1-cyto}$ -Peptid und LUV-Puffer (2.2.2.4) gemischt. Nach 30-minütiger Inkubation bei RT wurde der Ansatz für 1 h bei $90000 \times g$ und 10°C zentrifugiert. 190 μl des Überstands wurden abgenommen, und das verbleibene LUV-Pellet wurde in 30 μl 1,3 x SDS-Probenpuffer für 5 Min auf 95°C erhitzt. Die Gelelektrophorese der Proben und die nachfolgende CBB-Färbung des Gels erfolgten wie unter 2.2.5.13 und 2.2.5.15 beschrieben. Die gefärbten Gele wurden eingescannt, und co-sedimentiertes Peptid wurde densitometrisch mithilfe der Odyssey-Software quantifiziert. Für die Kurvenanpassung der hyperbolen Kurven wurde das Origin-Programm verwendet.

2.2.2.7 Liposomenvermittelter Protein-Protein-Interaktionstest

Um den Einfluss von LUVs auf die Interaktion der PH-Domäne der PLC γ1 mit der cytoplasmatischen Sequenz der α1 -Integrinuntereinheit zu untersuchen, wurden 600 μM LUVs, 5 μM aufgereinigtes PH-Protein und 30 μM $\alpha\text{1-cyto}$ -Peptid gemischt und mit LUV-Puffer (2.2.2.4) auf 20 μl aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 1 h bei RT inkubiert und einer nativen Gelelektrophorese unterzogen (2.2.5.14).

2.2.2.8 PIP-Strip-Inkubationstest [Kavran *et al.* 1998]

PIP-Strips von Echelon sind hydrophobe Membranen, auf deren Oberfläche je 100 pmol verschiedene Phospholipide transferiert wurden. Die Membranen wurden lichtgeschützt mit TBS inkl. 3% BSA für 1 h bei RT blockiert und mit GST- $\alpha\text{1-cyto}$ (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in TBS) üN bei 4°C im Dunkeln geschwenkt. Nach 3-maligem Waschen mit TBS wurde die Membran mit einem peroxidasegekoppelten anti-GST-Antikörper (1:1000 in TBS) für 2 h bei RT inkubiert und anschließend 4 x mit TBS gewaschen. Gebundenes Protein wurde mittels Chemilumineszenz (2.2.5.16) detektiert.

Lösungen für den PIP-Strip-Inkubationstest

TBS: 50 mM Tris/HCl pH 8, 50 mM NaCl

2.2.3 Biophysikalische Methoden

2.2.3.1 Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie

Dem Phänomen des Circulardichroismus' (CD) liegt die Eigenschaft chiraler Moleküle zugrunde, links und rechts zirkulär-polarisiertes Licht unterschiedlich stark zu absorbieren. Nach dem Durchgang durch eine chirale Lösung besitzen die links und rechts zirkulär-polarisierten Lichtstrahlen deshalb unterschiedliche Amplituden, so dass der kombinierte austretende Lichtstrahl statt ursprünglich planar nun elliptisch polarisiert ist. Die erzeugte Elliptizität ϑ_{obs} des Lichtstrahls wird in Grad gemessen und ist durch Gl. 1 definiert.

$$\vartheta_{\text{obs}} = \tan^{-1}\left(\frac{b}{a}\right), \quad \text{Gl. 1}$$

wobei b/a das Verhältnis der größeren zu der kleineren Achse des elliptisch polarisierten Lichtstrahls darstellt.

Unter Einbeziehung der Weglänge d des Lichts und der Konzentration c der Probenlösung ergibt sich die molare Elliptizität ϑ_{m} mit der Einheit [Grad · cm²/dmol].

$$\vartheta_{\text{m}} = \vartheta_{\text{obs}} \times 10 \times c^{-1} \times d^{-1} = 3300 \times \Delta\epsilon, \quad \text{Gl. 2}$$

wobei $\Delta\epsilon$ die Differenz der molaren Extinktionskoeffizienten der links und rechts zirkulär-polarisierten Lichtstrahlen ist [Fallert-Müller 1999/2000].

In CD-Spektren ist ϑ_{m} graphisch gegen die eingestrahlte Wellenlänge aufgetragen. Aufgrund der Lichtabsorption der Peptidbindung liefern die CD-Kurven im Bereich zwischen 190 nm und 250 nm Informationen über die Sekundärstruktur von Proteinen.

Die CD-Messungen wurden an einem Jasco-Spektropolarimeter mit einem Peltierheizelement bei 20°C in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Hofmann an der Griffith-Universität in Brisbane, Australien, durchgeführt. Proben wurden in einem Volumen von 300 µl in einer Quatzküvette von 0,1 cm Dicke vermessen. In jeder Messung wurden drei Scans à 10 nm/Min zwischen den Wellenlängen 190-260 nm aufgenommen und addiert, und die Messwerte von zwei unabhängigen Messungen wurden gemittelt. Als Probe diente Puffer, dem 0,1-0,239 mg/ml Peptid und/oder 3 mM SUVs zugegeben wurden. Die Messdaten wurden mithilfe der ACDP-Software um den Hintergrund korrigiert, prozessiert und geglättet [Hofmann 2009].

Lösungen für die CD-Spektroskopie

CD-Puffer: 10 mM Na₂HPO₄ pH 7,5, 20 mM NaCl

2.2.3.2 Kernmagnetische Resonanz (NMR)-Spektroskopie

Die NMR (*nuclear magnetic resonance*)-Spektroskopie dient der Strukturuntersuchung von Molekülen. Anwendung finden hierbei die Isotope ¹H, ¹³C und ¹⁵N, deren Atomkern einen Eigenspin besitzt. Mit diesem Eigenspin ist eine Zirkulation elektrischer Ladung verbunden, die wiederum ein magnetisches Feld induziert [Fallert-Müller 1999/2000]. Befindet sich das betreffende Atom in einem statischen äußeren Magnetfeld, so treten Wechselwirkungen der zugehörigen magnetischen Momente auf, was zu einer Aufspaltung der Energieniveaus des Atomkernspins führt. Im Rahmen der NMR-Spektroskopie werden diese Übergänge induziert, um Informationen über energetische Aspekte und sie bedingende strukturelle Gegebenheiten zu erhalten.

NMR-spektroskopische Messungen wurden unter Anleitung an einem 600 MHz-Spektrometer (Bruker DRX600) bei 303 K am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie, Berlin-Buch, vorgenommen. 500 µl aufgereinigtes Protein oder α1-cyto-Peptid wurden in einem NMR-Röhrchen mit 55 µl Deuteriumoxid gemischt. Mithilfe von eindimensionalen ¹H-NMR-Spektren wurden Informationen über den Faltungszustand der Proteine bzw. des Peptids (un- bzw. ¹⁵N-markiert) erhalten. Für die Aufnahme von zweidimensionalen ¹H-¹⁵N-HSQC (*heteronuclear single quantum coherence*)-Spektren wurde ¹⁵N-markiertes Protein verwendet, das zunächst pur und dann in Gegenwart eines Peptids (1-3 mM) vermessen wurde. Mithilfe der Programme Xwin-NMR bzw. Sparky 3 wurden Phasenkorrektur und Prozessierung der Spektren vorgenommen.

2.2.4 Computerbasierte Methoden

2.2.4.1 Moleküldynamik (MD)-Computersimulation

Die Struktur von Molekülen kann neben der NMR-Spektroskopie auch mithilfe von computergestützten Rechnungen auf atomarer Ebene untersucht werden. Hierbei wird kein statisches Bild der Molekülkonformation geliefert, sondern mithilfe von Moleküldynamik (MD)-Simulationen sind Informationen sowohl über die intramolekulare Dynamik des Moleküls als auch über seine intermolekularen Kontakte zugänglich [van Gunsteren & Berendsen 1990, DKFZ 2009]. Heutzutage können Zeitspannen von bis zu 1 ms des Molekülverhaltens simuliert werden; die Rechenzeit hingegen kann selbst bei Hochleistungsrechnern bis zu

mehreren Monaten betragen. Als Ergebnis einer MD-Simulation werden Trajektorien erhalten, welche die zeitliche Abfolge der räumlichen Koordinaten und Geschwindigkeiten eines jeden Atoms bezeichnen.

Die Faltung des α 1-cyto-Peptids wurde in Wasser oder 100 mM NaCl für eine Dauer von 250 ns oder 200 ns von Prof. Andreas Hofmann simuliert. Die Rechnungen wurden mithilfe des Programmpakets GROMACS [van der Spoel *et al.* 2005] und eines Protokolls von Kerrigan [Kerrigan 2003] durchgeführt. Dabei wurden das gmx-Kraftfeld und die explizite Solvatisierung mittels des spc-Wassermodells verwendet. Zunächst wurde das α 1-cyto-Peptid manuell mit dem Programm O konstruiert und die Geometrie des Peptids optimiert [Jones *et al.* 1991]. Um die Ladungsneutralität in der Simulationszelle zu gewährleisten, wurden sechs Wassermoleküle durch Chloridionen ausgetauscht. Für die Simulation in 100 mM NaCl wurden sechzehn Wassermoleküle durch elf Chlorid- und fünf Natriumionen ersetzt. Für die Rechnungen wurden in drei Dimensionen periodische Grenzbedingungen definiert. Elektrostatische Fernwechselwirkungen wurden mithilfe der PME (*particle mesh ewald*)-Methode modelliert. Für die initiale Äquilibration des Systems in der Simulationszelle wurde zunächst eine peptidfixierte Simulation für 20 ps durchgeführt und die Zelle dabei kontinuierlich auf 300 K erwärmt (*position-restrained dynamics simulation*). Visualisierung und Analyse der erhaltenen Trajektorien erfolgten mithilfe der Programme GROMACS bzw. VMD [Humphrey *et al.* 1996]. Dabei wurden ausgewählte Atomabstände und der Gyrationradius des α 1-cyto-Peptids als strukturelle Parameter bestimmt.

2.2.5 Proteinchemische und biochemische Methoden

2.2.5.1 Expression von GST-Fusionsproteinen

Die PLC γ 1-Domänen PH, N-SH2, C-SH2 und N+C-SH2 als auch die α 1-cytoplasmatische Sequenz wurden als GST-Fusionsprotein heterolog in *E.coli* exprimiert und aufgereinigt. Physikalische Informationen zu einzelnen Proteinen sind in Tabelle 2.10 zusammengestellt. Die rekombinanten Proteine umfassten mehr Aminosäuren, als der eigentlichen Domäne entsprechen, da zum einen einige die Domäne umgebende Aminosäurereste ebenfalls kloniert wurden. Zum anderen kodiert der pGEX-Abschnitt zwischen dem Leseraster von GST und dem der Proteindomänensequenz für einige zusätzliche Aminosäuren, welche u.a. die Thrombinschnittstelle darstellen. Die Plasmidkarte des pGEX-Vektors und die Aminosäuresequenz der PLC γ 1 sind im Anhang aufgeführt.

Tabelle 2.10: Mithilfe des ProtParam-Algorithmus des EXPASY-Programms gewonnene physikalische Daten der GST-Fusionsproteine. Angegeben sind die Anzahl der Aminosäurereste, das Molekulargewicht (MG), der isoelektrische Punkt (pI) und der molare Extinktionskoeffizient ϵ bei 280 nm.

rekombinantes Protein	Anzahl der Aminosäurereste	MG [kDa]	pI	$\epsilon_{280\text{ nm}}$ [$M^{-1} \cdot cm^{-1}$]
GST	223	26	6,1	43110
GST- α 1-cyto	249	29	8,8	43110
PH	149	17,1	7,9	21095
PH 3/4	149	17,1	5,51	21095
PH 6/7	149	17,1	7,9	19605
N-SH2	116	13,2	6,6	11585
C-SH2	109	12,6	10,3	14440
N+C-SH2	227	26,2	9,2	31650
α 1-cyto	26	3	11,8	-

Die Expressions- und Aufreinigungsbedingungen der Fusionsproteine GST-PH, -N-SH2, -C-SH2, -N+C-SH2 und - α 1-cyto sind in Tabelle 2.11 aufgelistet. Bakterien des Stamms BL21 (DE3) wurden mit den pGEX-Plasmid-DNA-Konstrukten transformiert (2.2.1.5), und die primären \bar{u} N-Kulturen wurden wie unter 2.2.1.1 beschrieben kultiviert. Die bakterielle Expression der GST-Fusionsproteine wurde mit IPTG induziert, wobei auch frisches Ampicillin (100 μ g/ml) zugegeben wurde. Die Proteinexpression erfolgte schüttelnd bei 190 rpm für den in Tabelle 2.11 angegebenen Zeitraum. Die Expressionskultur wurde gekühlt bei 18000 \times g für 15 Min zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in Lysepuffer (20 ml/l Bakterienkultur) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mit fünf Ultraschallstößen à 30 s auf Eis, unterbrochen von gleichlangen Pausen. Die Suspension wurde mit Triton X-100 (Endkonzentration 1% (v/v)) versetzt und für 20 Min bei 53000 \times g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde für die GST-Affinitätschromatographie (2.2.5.2) verwendet.

Tabelle 2.11: Bedingungen für die bakterielle Expression und die Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen.

GST-		PH	N-SH2	C-SH2	N+C-SH2	α 1-cyto
Induktion	OD ₆₀₀	0,7	0,4			0,2
	IPTG [mM]	0,05	0,05		0,01	0,5
Expression	Dauer	4 h	4 h	üN		6 h
	Temperatur	30°C	37°C		30°C	1 h 37°C, 5 h 30°C
Aufreinigung des GST-Fusionsproteins		HiTrap GST-Affinitätschromatographie (Profinia)				
		Gelfiltration (FPLC)				
Aufreinigung des Zielproteins nach der Thrombinspaltung		Gelfiltration (FPLC)		Kationenaustauschchromatographie	Gelfiltration (HPLC), Lyophilisierung	

Lösungen für die Expression rekombinanter Proteine

Lysepuffer: 50 mM Tris/HCl pH 8, 200 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 5 mM DTT (frisch), 1 PIC-Tablette/15 ml (frisch)

2.2.5.2 GST-Affinitätschromatographie

Zur Aufreinigung der GST-Fusionsproteine wurden eine 5 ml-Säule (*GSTrap 4B Fast Flow*, GE Healthcare) und das Proteinreinigungssystem Profinia (Bio-Rad) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Pro 20 ml Bakterienlysats wurde ein Aufreinigungslauf gefahren. Das GST-Fusionsprotein wurde in 15 ml glutathionhaltigem Elutionspuffer (Bio-Rad) eluiert und währenddessen quantifiziert.

2.2.5.3 Thrombinspaltung von Fusionsproteinen

In dem pGEX-Vektor befindet sich zwischen dem für GST kodierenden Leseraster und der MKS eine DNA-Sequenz, die für eine Thrombinschnittstelle kodiert. Um die GST-Markierung von den rekombinanten PLC γ 1-Domänen mit Thrombin abzuspalten, wurde das jeweilige Eluat der GST-Affinitätschromatographie (2.2.5.2) mit 1 U Thrombin pro mg Protein in üN bei 4°C leicht schwenkend inkubiert. Das GST- α 1-cyto-Eluat wurde vor der Inkubation mit Thrombin zunächst mithilfe eines Amicon-Filters mit 10 kDa Ausschlussvolumen (MWCO) auf ein Volumen von 2 ml eingengt (2.2.5.6).

2.2.5.4 Größenausschlusschromatographie (Gelfiltration)

Um GST und das Zielprotein nach dem Thrombinverdau voneinander zu trennen oder um GST-Fusionsproteine nach der GST-Affinitätschromatographie zu reinigen, wurde eine Gelfiltration mittels FPLC-Anlage (GE Healthcare) durchgeführt. Verwendet wurde eine *HiLoad 16/60 Superdex 75*-Gelfiltrationssäule (50 ml, GE Healthcare). Die Proteinproben wurden zunächst auf ein Volumen von 10 ml eingengt und bei 16000 \times g für 5 Min zentrifugiert. Der Überstand wurde mithilfe einer Beladungsapparatur (*Superloop*) auf die mit 2,5-fachem Säulenvolumen PBS äquilibrierte Säule geladen. Als Laufpuffer diente PBS, die Fließgeschwindigkeit betrug 1 ml/Min. Es wurden 2 ml-Fraktionen gesammelt, deren Absorption bei 280 nm photometrisch aufgezeichnet wurde.

Rekombinantes α 1-cyto-Peptid wurde mithilfe der HPLC-Anlage Äkta (GE Healthcare) aufgereinigt, da diese im Gegensatz zur FPLC-Anlage auch über einen Detektor der Wellenlänge 220 nm verfügte. Verwendet wurde eine Superdex 75-50 ml-Säule (GE Healthcare), die mit 2,5-fachem Säulenvolumen Phosphatpuffer gewaschen wurde, bevor sie mit 2 ml

thrombinbehandelter Probe beladen wurde. Die Gelfiltration erfolgte in Phosphatpuffer mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/Min. Es wurden 1,3 ml-Fraktionen gesammelt.

Lösungen für die FPLC und HPLC

PBS (pH 7,3): 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl

Phosphatpuffer (pH 7,3): 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄

2.2.5.5 Kationenaustauschchromatographie

Aufgrund des gemeinsamen Molekulargewichts von 26 kDa konnten die rekombinanten Proteine GST und N+C-SH2 nach Thrombinspaltung nicht über Größenausschlußchromatographie voneinander getrennt werden. Aufgrund ihres unterschiedlichen isoelektrischen Punktes (Tabelle 2.10), wurde deshalb eine Kationenaustauschchromatographie mit der MonoS-Kationenaustauschersäule (1 ml, GE Healthcare) durchgeführt. Die MonoS-Säule wurde mit einer Geschwindigkeit von 2 ml/Min nacheinander mit 5 ml Phosphatpuffer, 10 ml Hochsalz-PBS und 5 ml Phosphatpuffer gespült. Die Säule wurde mit 5 ml der thrombinverdauten Probe beladen (1 ml/Min). Die an die Säule gebundene N+C-SH2-Domäne wurde mit 10 ml Phosphatpuffer gewaschen und anschließend mithilfe eines Gradienten von 0-1 M NaCl eluiert.

Lösungen für die Kationenaustauschchromatographie

Hochsalz-PBS (pH 7,3): 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 1 M NaCl, 2,7 mM KCl

Phosphatpuffer (pH 7,3): 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄

2.2.5.6 Aufkonzentrieren und Lyophilisieren von Proteinlösungen

Um die Konzentration einer Proteinlösung zu erhöhen bzw. deren Volumen zu verkleinern, wurde die Proteinlösung in einen Zentrifugalfilter überführt und bei 3220 × g und 10°C zentrifugiert, bis das gewünschte Volumen erreicht war. Anwendung fanden 15 ml- und 50 ml-Einheiten mit dem MWCO von 3 kDa, 5 kDa, 10 kDa und 30 kDa.

Für die Lyophilisierung wurden α1-cyto-Peptid-enthaltende FPLC-Fraktionen vereint und in ein 50 ml Polypropylenröhrchen mit durchlöchertem Deckel überführt. Das Röhrchen wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und mithilfe einer Vakuum-Ölpumpe $\bar{u}N$ gefriergetrocknet. Das resultierende Pulver wurde in Phosphatpuffer rekonstituiert.

2.2.5.7 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels UV-Absorption

100 µl aufgereinigtes Protein wurden in einer 1:5- oder 1:10-Verdünnung in PBS in einer Quartzküvette bei 280 nm photometrisch vermessen, und die Proteinkonzentration wurde mithilfe des Gesetzes von Lambert-Beer berechnet.

$$E_{280} = \varepsilon \times c \times d \quad \text{Gl. 3}$$

Hierbei ist E_{280} die Extinktion bei 280 nm, ε der molare Extinktionskoeffizient bei 280 nm [$M^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$] (Tabelle 2.10), c die Konzentration der Proteinlösung [M] und d die Schichtdicke der Küvette (1 cm).

2.2.5.8 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bicinchoninsäure (BCA)-Test

Bei dem kolorimetrischen Bicinchoninsäure (BCA)-Test werden zweiwertige Kupferionen im basischen Milieu durch vorhandene Aminosäureseitenketten reduziert. Die entstandenen Cu^+ -Ionen bilden mit dem BCA-Reagenz einen quantifizierbaren Farbumschlag [Smith *et al.* 1985].

Drei Volumina (2 µl, 5 µl und 8 µl) Zelllysate und eine doppelt angesetzte Eichreihe (0-16 µl) einer BSA-Lösung (2 mg/ml) wurden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert und mit Solubilisierungspuffer (2.2.5.10) auf 20 µl aufgefüllt. Durchführung und Auswertung des BCA-Tests erfolgten daraufhin gemäß Herstellerangaben.

2.2.5.9 Lagerung von Peptiden und Proteinen

Lyophilisierte Peptide wurden bei 4°C und Peptidlösungen bei -20°C aufbewahrt. Proteinlösungen wurden mit 50% (v/v) Glycerin versetzt, in Stickstoff eingefroren und bei -20°C oder -80°C gelagert.

2.2.5.10 Gewinnung von Zelllysate

Um eukaryote Zellen aufzuschließen, wurden entweder Zellpellets in Solubilisierungspuffer aufgenommen oder adhärenente Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers in selbigem abgeschabt. Die Proben wurden bei 4°C für 1 h rotiert und für 15 Min bei 4°C und 16000 × g zentrifugiert. Der Überstand, das Solubilisat, wurde für den BCA-Test (2.2.5.8) verwendet.

Lösungen für die Zellsolubilisierung

Solubilisierungspuffer: 20 mM HEPES/NaOH pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 , 1% (v/v) Triton X-100, 1 mM PMSF (frisch), 0,1% (v/v) PIC (frisch)

2.2.5.11 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um Proteine elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen, wurde eine diskontinuierliche Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) mit Tris-Glycin-Puffern nach Laemmli durchgeführt [Laemmli 1970]. Tabelle 2.12 zeigt ein Pipettierschema für zwei Gele mit 7,5%, 10% und 15% Polyacrylamidkonzentration im Trenngel.

Tabelle 2.12: Pipettierschema für zwei SDS-Gele (7,5%, 10% und 15%). Trenn- und Sammelgel wurden gleichzeitig angesetzt und direkt nacheinander gegossen.

Komponente	Trenngel			Sammelgel
	7,5%	10%	15%	4%
Lösung A	2,25 ml	3 ml	4,5 ml	0,4 ml
Lösung B	2,25 ml			-
Lösung C	-			0,75 ml
H ₂ O dest	3,6 ml	2,85 ml	1,35 ml	1,85 ml
Glycerin	0,9 ml			-
APS (10% w/v)	45 µl			12 µl
TEMED	4,5 µl			3 µl

Als Proben dienten Zellsolubilisate bzw. immunpräzipitierte Ansätze, die vor dem Gelauftrag mit 5 x bzw. 2 x reduzierendem Probenpuffer für 5 Min bei 95°C gekocht wurden. Die Gelelektrophorese erfolgte in SDS-Laufpuffer, zunächst für 5 Min bei 80 V und anschließend bei 180 V, bis die Bromphenolblaubande das Ende der Laufstrecke erreicht hatte. Die Gele wurden gefärbt oder für den Western Blot eingesetzt.

Lösungen für die SDS-PAGE

Lösung A: 30% (w/v) Acrylamid, 0,8% (w/v) N', N' Methylenbisacrylamid

Lösung B: 1,5 M Tris/HCl pH 8,8, 0,4% (w/v) SDS

Lösung C: 0,5 M Tris/HCl pH 6,8, 0,4% (w/v) SDS

SDS-Laufpuffer (10 x): 250 mM Tris/HCl pH 7,3, 1,92 M Glycin, 0,1% (w/v) SDS

Nicht-reduzierender Probenpuffer (nr. PP, 5 x): 300 mM Tris/HCl pH 6,8, 15% (w/v) SDS, 50% (v/v) Glycerin, 0,015% (w/v) Bromphenolblau

Reduzierender Probenpuffer (red. PP, 5 x): nr. PP zzgl. 5 mM DTT

2.2.5.12 Tricin-SDS-PAGE

Um Proteine mit einem Molekulargewicht kleiner 15 kDa gelelektrophoretisch aufzutrennen, wurde die Tricin-SDS-PAGE angewendet [Schagger & von Jagow 1987]. Die Zusammensetzung für zwei entsprechende Gele ist Tabelle 2.13 zu entnehmen.

Tabelle 2.13: Mengenangaben für zwei Tricin-SDS-Gele (15% oder 20%). Sammel- und Trenngel wurden gleichzeitig angesetzt und unmittelbar aufeinander geschichtet.

Komponente	Trenngel		Sammelgel
	15%	20%	4%
Lösung A	4,5 ml	6 ml	0,4 ml
Tricingelpuffer	3 ml		0,75 ml
H₂O dest	1,1 ml	-	1,85 ml
Glycerin	0,4 ml		-
APS (10% w/v)	50 µl		25 µl
TEMED	5 µl		2,5 µl

Der Probenauftrag auf das auspolymerisierte Gel erfolgte wie unter 2.2.5.11 beschrieben. Im Gegensatz zum SDS-PAGE-Laufpuffer fanden hier mit Kathodenpuffer und Anodenpuffer (im Innen- bzw. Außenraum der Gelhalterung) zwei getrennte Puffersysteme Anwendung. Nach dem Einlaufen der Proben bei 50 V erfolgte die restliche Gelelektrophorese bei 110 V.

Lösungen für die Tricin-SDS-PAGE

Lösung A: 30% (w/v) Acrylamid, 0,8% (w/v) N', N' Methylenebisacrylamid

Tricingelpuffer: 3 M Tris/HCl pH 8,45, 0,3% (w/v) SDS

Kathodenpuffer (10 x): 1 M Tris/HCl pH 8,25, 1 M Tricin, 1% (w/v) SDS

Anodenpuffer (10 x): 2 M Tris/HCl pH 8,9, 0,3% (w/v) SDS

2.2.5.13 NuPAGE Gradienten-Gelelektrophorese

Die in Probenpuffer aufgenommenen Liposomenpellets des Lipid-Co-Sedimentationstests (2.2.2.6) wurden auf NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris-Gradientengele (Invitrogen) aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte eisgekühlt für 30 Min bei 200 V in MES-Puffer.

Lösungen für die Bis-Tris-Gradienten-PAGE

MES-Puffer (pH 7,3): 50 mM Tris, 50 mM MES, 0,1% (w/v) SDS, 1 mM Na₂EDTA

2.2.5.14 Native Gelelektrophorese

Werden Proteine unter SDS-freien, nativen Bedingungen gelelektrophoretisch aufgetrennt, so wird ihre Bewegung innerhalb des Gels lediglich durch ihre Molekülgröße und -form sowie ihre Eigenladung bestimmt. Somit können oligomere Zustände und Proteinkomplexe nachgewiesen werden. Das *Blue Native*-Bis-Tris-PAGE-System (Invitrogen) beruht zudem auf einem Anodenpuffer, der den Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau (CBB) G-250 enthält. Durch Bindung an die Proteine vermittelt CBB diesen eine negative Ladung, denaturiert sie jedoch nicht [Schagger & von Jagow 1991].

Die Liposomen-Protein-Ansätze (2.2.2.7) wurden in 4 x nativem Probenpuffer (Invitrogen) aufgenommen und gemäß den Herstellerangaben auf das Gel geladen. Die Komponenten für den gebrauchsfertigen Kathoden- bzw. Anodenpuffer waren ebenfalls im Lieferumfang enthalten. Das Gel wurde nach beendeter Gelelektrophorese (150 V, RT, 70 Min) nach Herstellerprotokoll CBB-gefärbt und entfärbt.

2.2.5.15 Coomassie-Brillant-Blau (CBB)-Färbung von Polyacrylamidgelen

Nach ihrer gelelektrophoretischen Auftrennung können im Gel befindliche Proteine durch den Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau (CBB) angefärbt werden, der an basische und unpolare Aminosäureseitenketten bindet. Durch die in der Färbelösung befindliche Essigsäure werden die Proteine zusätzlich im Gel fixiert.

Proteingele wurden bei RT für 1 h schwenkend in CBB-Färbelösung und anschließend für mindestens 1 h in Entfärbelösung inkubiert. Nach der Auftrennung von Liposomenpellets des Lipid-Co-Sedimentationsversuchs (2.2.2.6) wurden die NuPAGE-Gradientengele gemäß der Formaldehyd (FA)-Methode behandelt, um das kleine, basische α 1-cyto-Peptid zu fixieren und anzufärben. Diese Gele wurden für 1 h bei RT in FA-Färbelösung 1 und anschließend für 1-3 h in FA-Färbelösung 2 geschüttelt, bevor sie mit FA-Entfärbelösung inkubiert wurden [Steck *et al.* 1980].

Lösungen für die CBB-Färbung von Proteingelen

CBB-Färbelösung: 50% (v/v) Ethanol, 12% (v/v) CH₃COOH, 0,1% (w/v) CBB R-250

CBB-Entfärbelösung: 5% (v/v) Ethanol, 7,5% (v/v) CH₃COOH

FA-Färbelösung 1: 25% (v/v) Ethanol, 5% (v/v) Formaldehyd, 0,12% (w/v) CBB R-250

FA-Färbelösung 2: 25% (v/v) Ethanol, 3,7% (v/v) Formaldehyd, 0,12% (w/v) CBB R-250

FA-Entfärbelösung: 25% (v/v) Ethanol, 3,7% (v/v) Formaldehyd

2.2.5.16 Western Blot

Die Western Blot-Analyse umfasste 1. eine PAGE, in der Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt wurden, 2. den stromabhängigen Transfer der Proteine aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran und 3. die immunologische Detektion der dort immobilisierten Proteine [Towbin *et al.* 1979]. CBB-gefärbte SDS-Gele wurden nach einer 4-stündigen Inkubation in Harnstoffpuffer ebenfalls für die Schritte 2 und 3 eingesetzt [Perides *et al.* 1986].

Verwendet wurde das Tank-Blotsystem der Firma Bio-Rad. Ein Sandwich aus Schwamm – Filterpapier – SDS-Gel – Membran – Filterpapier – Schwamm wurde in einer mit Blotpuffer gefüllten Schale luftblasenfrei zusammengelegt und in einer Blotklammer fixiert. Die Klammer wurde in der Blotkammer positioniert und diese mit einem Eisreservoir und Blotpuffer gefüllt. Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Nitrocellulosemembran erfolgte gekühlt für 1 h mit 250 mA. Um den Proteintransfer auf die Membran zu dokumentieren, wurde die reversible Ponceau-Färbung durchgeführt [Salinovich & Montelaro 1986]. Hierfür wurde die Membran für 1 Min in Ponceau-Färbelösung geschwenkt und dann mit 0,1% Essigsäure gewaschen. Das sichtbare Proteinmuster wurde zwecks Dokumentation fotokopiert. Die Membran wurde schwenkend in PBS-T oder TBS-T entfärbt und durch Inkubation mit 10% Magermilch- oder 3% BSA-Lösung (in PBS-T oder TBS-T) für 1 h bei RT blockiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (Tabelle 2.3) erfolgte μ N in PBS-T oder TBS-T bei 4°C. Die Membran wurde 3 x für 5 Min mit PBS-T oder TBS-T gewaschen, ehe die Inkubation mit dem peroxidasegekoppelten Zweitantikörper für 2 h bei RT erfolgte. Die Membran wurde 4 x für 5 Min mit PBS-T oder TBS-T gründlich gewaschen. Der Nachweis der Proteine erfolgte mittels Chemilumineszenz unter Verwendung des *Super Signal West Pico*-Proteindetektionssystems der Firma Pierce.

Lösungen für den Western Blot

Harnstoffpuffer: 25 mM Tris/HCl pH 7,3, 192 mM Glycin, 0,01% (w/v) SDS, 6 M Urea

Blotpuffer (10 x): 1 M Tris/HCl pH 8,3, 1,92 M Glycin, 10% (v/v) Ethanol

Ponceau-Färbelösung (5 x): 2% (w/v) Ponceau S, 30% (v/v) Trichloressigsäure, 30% (v/v) Sulfosalicylsäure

PBS (pH 7,6): 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl

PBS-Tween (PBS-T): 0,1% (v/v) Tween-20 in PBS

TBS: 50 mM Tris/HCl pH 7,6, 150 mM NaCl

TBS-Tween (TBS-T): 0,1% (v/v) Tween-20 in TBS

2.2.5.17 GST-Pulldown-Analyse

3 ml einer BL21- μ N-Kultur (2.2.1.1) wurden in 30 ml LB-Amp-Medium überführt und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 geschüttelt. Die Expression der GST-Fusionsproteine wurde durch Zugabe von 0,1 mM IPTG induziert und erfolgte für 3 h bei 30°C. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation bei 3220 × g sedimentiert und in 2 ml Lysepuffer resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte in fünf Gefriertaucyclen (30 s flüssiger Stickstoff - 1 Min 37°C).

Klares Lysat wurde nach Zugabe von 100 µl Sepharose 4B durch Zentrifugation bei 11000 × g und 4°C für 30 Min erhalten.

150 µl Glutathion-Sepharose (50% Suspension) wurde rotierend in 100 µl Lysepuffer für 45 Min bei 4°C äquilibriert und für 3 Min bei 300 × g und RT zentrifugiert. Der Lysepuffer wurde abgenommen und die Sepharose mit 600 µl BL21-Lysat für 1 h bei 4°C geschwenkt. Der Überstand wurde verworfen. Die Sepharose wurde 5 x mit 150 µl Waschpuffer 1 gewaschen und anschließend mit 100 µl Solubilisationspuffer für 45 Min bei 4°C äquilibriert. Die sedimentierte Sepharose wurde mit 200 µl CHO-Solubilisat (ca. 450 µg Protein) gemischt. Der Ansatz wurde für 1 h bei 4°C geschwenkt. Das Sepharosepellet wurde 5 x mit Waschpuffer 2 gewaschen und anschließend in 50 µl 1,5 x red. PP (2.2.5.11) für 10 Min bei 95°C gekocht.

Lösungen für den GST-Pulldown

Lysepuffer: 10 mM Na₂HPO₄ pH 7,5, 140 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0,1% Triton X-100

Solubilisierungspuffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,6, 50 mM NaCl, 1 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, 1% (v/v) Triton X-100, 0,1% (v/v) β-Mercaptoethanol, 1 mM PMSF (frisch), 0,1% (v/v) PIC (frisch)

Waschpuffer 1: 50 mM Tris/HCl pH 8, 50 mM NaCl

Waschpuffer 2: wie Solubilisierungspuffer, 0,1% statt 1% (v/v) Triton X-100

2.2.5.18 Co-Immunopräzipitation (Co-IP)

Im Rahmen der Co-IP wurde mithilfe des monoklonalen, an Protein-G-Sepharose (PGS) gekoppelten 33.4-Antikörpers die α1-Integrinuntereinheit aus CHO-α1/f.l. Zellen präzipitiert und auf Vorhandensein der PLCγ1 hin untersucht. Nach Inkubationen und Äquilibrierungen sowie Waschschritten, die in 200 µl bzw. 500 µl erfolgten, wurde die PGS für 3 Min bei 300 × g und RT zentrifugiert.

80 µl PGS (50% Suspension) wurde 1 x mit IP-Puffer gewaschen und in frischem IP-Puffer für 20 Min bei 4°C rotierend äquilibriert. 10 µg 33.4-Antikörper wurde schwenkend für 2 h bei 4°C an die PGS gekoppelt. Der Überstand wurde abgenommen, und die PGS wurde 3 x mit Waschpuffer gewaschen.

1 × 10⁷ serumdepletierte Zellen wurden in serumfreiem Medium auf acht KIV-beschichteten 10 cm-Schalen für 30-45 Min ausgesät. Die adhärenen Zellen wurden 1 x mit PBS gewaschen und in IP-Puffer auf Eis abgeschabt. Das Zellsolubilisat (2.2.5.10) wurde mit der

33.4-PGS für 1 h schwenkend und für 15 Min ruhend bei 4°C inkubiert. Die 33.4-PGS wurde 3 x mit Waschpuffer gewaschen, in 40 µl 2 x red. PP aufgeköcht und ein Western Blot durchgeführt (2.2.5.11 und 2.2.5.16). Vor der Zugabe zu der 33.4-PGS wurde das Zellsolubilisat gegebenenfalls mit 400 µM LUVs (2.2.2.4) für 30 Min bei RT präinkubiert.

Lösungen für die Co-IP

IP-Puffer: 50 mM HEPES/NaOH pH 7,5, 50 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 1% (v/v) Triton X-100, 1 mM PMSF (frisch), 0,1% (v/v) PIC (frisch), 1 mM NaVO₄ (frisch), 5 mM NaF (frisch)

Waschpuffer: wie IP-Puffer, jedoch zzgl. 0,1% (v/v) Triton X-100

Solubilisierungspuffer: wie IP-Puffer, jedoch zzgl. 150 mM NaCl und 2% (v/v) Triton X-100

2.2.6 Zellbiologische Methoden

2.2.6.1 Herstellen von Nukleotidlösungen als Mediumszusatz

Dem von Lonza bezogenen CHO-Medium α-MEM wurden vor Verwendung Nukleotide beigemischt. Hierfür wurden 125 mg Adenosin, 125 mg Guanosin und 62,5 mg Desoxyguanosin zusammen in 3 ml 1 M NaOH gelöst. Je 125 mg Cytidin, Desoxycytidin, Thymidin und Uridin wurden gemeinsam in 10 ml sterilem Wasser aufgenommen. 125 mg Desoxyadenosin wurde in 2,6 ml 1 M HCl gelöst. Die drei Lösungen wurden vereint und mit α-MEM auf 125 ml aufgefüllt. 5 ml dieser Nukleotidlösung wurden zu jeder 500 ml-Mediumsflasche pipettiert.

2.2.6.2 Beschichtung von Zellkulturmaterial mit Matrixproteinen

Die lyophilisierten Matrixproteine KIV und FN wurden in 0,1% Essigsäure bzw. PBS üN bei 4°C schwenkend rekonstituiert, um die jeweilige Stammlösung (1 mg/ml) zu erzeugen. Zellkulturmaterial wurde mit einer verdünnten Matrixproteinlösung (20 µg/ml in PBS) bedeckt, mit Parafilm versiegelt und üN bei 4°C geschwenkt. Für die Beschichtung eines 8-Kammer-Objektträgers wurden pro Kammer 200 µl und für die einer 10 cm-Schale 2,5 ml der verdünnten Matrixproteinlösung eingesetzt. Vor ihrer Benutzung wurden die beschichteten Oberflächen einmal mit PBS gewaschen.

2.2.6.3 Kultivierung eukaryonter Zelllinien

Die CHO-Zelllinien wurden bei 37°C unter 5% CO₂-Atmosphäre in Kompletmedium kultiviert und alle 2-3 Tage passagiert. Für die Passage wurden die adhärennten Zellen einer 10 cm-Schale mit 2,5 ml PBS/EDTA-Lösung abgelöst und durch Zentrifugation bei 146 × g

für 3 Min sedimentiert. Das Zellpellet wurde in frischem Kompletmedium resuspendiert und in einer 1:4-Verdünnung in 5 ml Medium auf neue 10 cm-Schalen ausgesät.

Um integrinabhängige Signalprozesse zu untersuchen, wurde den Zellen das wachstumsfaktorenenthaltende fötale Kälberserum (FKS) entzogen. Die adhärenen CHO-Zellen wurden hierfür 1 x mit PBS gewaschen, mit Depletionsmedium bedeckt und für 30-45 Min im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS/EDTA inklusive 10% Accutase abgelöst und für 3 Min bei $180 \times g$ zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Depletionsmedium resuspendiert und die Zellkonzentration bestimmt (2.2.6.5).

Lösungen für die Zellkultivierung

FKS wurde zunächst für 30 Min bei 56°C inaktiviert (i.a.).

Kompletmedium: α -MEM zzgl. 10% (v/v) FKS i.a., 0,5 g/l G418, 3 mM Glutamin, 1% (v/v) Pen/Strep

Depletionsmedium: α -MEM zzgl. 0,5 g/l G418, 3 mM Glutamin, 1% (v/v) Pen/Strep

2.2.6.4 Kryokonservierung eukaryonter Zellen

Konfluente CHO-Zellen einer 10 cm-Schale wurden mit PBS/EDTA abgelöst, zentrifugiert und in 900 μl FKS i.a. resuspendiert. Nach Zugabe von 100 μl DMSO wurde die Zellsuspension in ein Kryomikrogefäß überführt. Dieses wurde in den mit Isopropanol gefüllten Kryobehälter plziert und für mindestens 2 Tage bei -80°C aufbewahrt. Von dort aus wurden die Zellen in Stickstoff eingefroren und im Stickstofftank langfristig gelagert.

Um Zellen aufzutauen, wurde das tiefgefrorene Kryomikrogefäß in der Hand angewärmt. Durch Zugabe von 37°C -warmem Kompletmedium wurden die Zellen zügig aufgetaut und, wie unter 2.2.6.3 beschrieben, kultiviert.

2.2.6.5 Zellzahlbestimmung mittels Trypanblau und Hämacytometer

Die Lebendzellzahl einer Lösung kann durch eine kombinierte Anwendung von Trypanblauschlussstest und Neubauer-Zählkammer (Hämacytometer) ermittelt werden [Schimpf 2002]. Nach Zugabe zu einer Zellsuspension diffundiert der Farbstoff Trypanblau in das Cytoplasma apoptotischer und toter Zellen, da deren Zellmembran nicht mehr intakt ist. Vitale Zellen hingegen werden nicht angefärbt und können mit der Zählkammer gezählt werden.

10 μl einer gut vereinzelt CHO-Zellsuspension wurden mit 40 μl 0,1% Trypanblaulösung versetzt. 10 μl der Mischung wurden in die Neubauer-Zählkammer pipettiert, und die leben-

den Zellen innerhalb der vier Großquadranten wurden gezählt. Die Zellkonzentration der Suspension ergab sich wie folgt:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Mittelwert der Zellen der vier Großquadranten} \times \text{Verdünnung} \times 10^4 \quad \text{Gl. 4}$$

2.2.6.6 Kollagen IV-Selektion von Zellen

Die Kollagen IV (KIV)-Selektion diente dem Zweck, speziell Zellen einer Zellsuspension anzureichern, die $\alpha 1\beta 1$ -Integrin als funktionellen Kollagenrezeptor exprimierten. Sie wurde mit den CHO-Zelllinien $\alpha 1/f.l.$, $\alpha 1/GFFKR$ und $\alpha 1/K$ regelmäßig durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen einer konfluent bewachsenen 10 cm-Schale für 45 Min serumdepletiert und mit PBS/EDTA inkl. 10% Accutase abgelöst (2.2.6.3). Die Zellen wurden durch 3-minütige Zentrifugation bei $180 \times g$ sedimentiert und in 1 ml serumfreiem Medium aufgenommen. Je 500 μl Zellsuspension wurden auf zwei KIV-beschichteten 10 cm-Schalen (2.2.6.2) in 5 ml serumfreiem Medium ausgesät. Die KIV-beschichteten Schalen wurden zuvor 1 x mit PBS gewaschen, für 30 Min bei 37°C mit 1% (w/v) BSA-Lösung (in PBS) inkubiert und erneut mit PBS gewaschen. Nach der Zellaussaat wurden die Platten für 30 Min in den Brutschrank gestellt. Adhärenente Zellen wurden gründlich mit PBS gewaschen und mit PBS/EDTA inkl. 10% Accutase abgelöst und zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden mit Komplettmedium aufgenommen und, wie unter 2.2.6.3 beschrieben, kultiviert.

2.2.6.7 Transiente Transfektion von Zellen mittels Lipofektion

Bei der Lipofektion kommen Liposomen aus kationischen und ungeladenen Phospholipiden, wie N[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-Trimethylammoniumchlorid bzw. L-Dioleoylphosphatidylethanolamin zum Einsatz [Felgner *et al.* 1987, Rose *et al.* 1991]. Im Lipofektionsreagenz zusätzlich enthaltene DNA-kompaktierende Substanzen sollen die Lipid-DNA-Komplexe stabilisieren, deren Aufnahme durch die Zelle dann vermutlich über Endocytose erfolgt [Schrumpf 2002].

$7,5 \times 10^5$ CHO-Zellen wurden in Komplettmedium auf einer 10 cm-Schale ausgesät und kultiviert, bis nach 2 Tagen eine Konfluenz von 80% erreicht war (2.2.6.3). Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und mit 4 ml Transfektionsmedium bedeckt. Je 500 μl OPTI-MEM (Gibco) wurden mit 10 μg Plasmid-DNA oder mit 10 μl Transfectin-Reagenz (Bio-Rad) gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Beide Lösungen wurden vermengt und

für 20 min bei RT inkubiert. Das Gemisch aus Transfectin, DNA und OPTI-MEM wurde auf den adhärenen Zellen verteilt und diese für mindestens 6 h im Brutschrank kultiviert.

Lösungen für die Lipofektion

Transfektionsmedium: α -MEM zzgl. 10% (v/v) FKS i.a., 3 mM Glutamin

2.2.6.8 Haptotaktischer Migrationstest

Um die integrinvermittelte Migration von CHO-Zellen entlang eines Matrixgradienten zu untersuchen, wurde das *Transwell*-Migrationssystem von Corning verwendet. Dieses umfasste neben einer 24-Loch-Platte auch 12 Filter mit einer Polycarbonatmembran. Durch die Membranporen von 8 μ m Durchmesser mussten sich die Zellen aktiv bewegen, um auf die matrixbeschichtete Filterunterseite zu gelangen. Diese Arbeiten wurden von Frau Christiane Smerling durchgeführt.

Die Unterseite eines Filter wurde mit 50 μ l KIV-Lösung (20 μ g/ml, 2.2.6.2) für 30 Min bei RT beschichtet und 1 x mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die Filterunterseite mit 50 μ l BSA-Lösung blockiert und erneut gewaschen. 600 μ l Depletionsmedium (2.2.6.3) wurde in eine Vertiefung der 24-Loch-Platte pipettiert, in die dann der Filter gehängt wurde. In das leere Filterinnere wurde 100 μ l Zellsuspension mit 5×10^4 serumdepletierten Zellen (2.2.6.3) pipettiert. Die Migration der Zellen durch die Filtermembran erfolgte für 5 h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂-Begasung. Die Filter wurden 1 x mit PBS gewaschen, und im Filterinneren verbliebene Zellen wurden mit einem Wattestäbchen entfernt. Migrierte Zellen auf der Filterunterseite wurden für 25 Min bei RT mit Paraformaldehyd (PFA)/Saponin permeabilisiert und anschließend 3 x mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit Kristallviolett für 20 Min bei RT gefärbt und solange mit sterilem Wasser gewaschen, bis die Waschlösung klar blieb. Um die Anzahl migrierter Zellen zu ermitteln, wurden die Filter üN kopfüber getrocknet, und pro Filter wurden zehn Felder mithilfe eines Zählokulars bei 125-facher Vergrößerung am Lichtmikroskop ausgezählt. Mittelwert und Standardabweichung wurden mithilfe des Excel-Programms berechnet.

Lösungen für den Migrationstest

Blockierlösung: 1% (w/v) BSA in PBS

Permeabilisierungslösung: 4% (w/v) PFA, 0,025% (w/v) Saponin in PBS (lösen bei 65°C)

Färbelösung: 0,1% (w/v) Kristallviolett

2.2.6.9 Fluoreszenzmikroskopie

Bei der Fluoreszenzmikroskopie werden Fluorophore eingesetzt, die Licht definierter Wellenlänge absorbieren und emittieren, um zelluläre Kompartimente und Proteine zu visualisieren. In dieser Arbeit wurde zum einen die Eigenfluoreszenz von GFP (2.1.8.2) genutzt. Zum anderen wurde gegen F-Aktin gerichtetes, fluorophorkonjugiertes Phalloidin verwendet (Tabelle 2.3).

Zunächst wurde ein 8-Kammer-Objektträger (Nunc) mit KIV und FN beschichtet (2.2.6.2). Jede Kammer wurde 1 x mit 600 µl PBS gewaschen und für 30 Min bei 37°C mit 200 µl BSA-Lösung blockiert. Die Kammern wurden 3 x gewaschen, und 100 µl Depletionsmedium wurde pro Kammer vorgelegt. 100 µl Zellsuspension mit 3×10^4 serumdepletierten CHO- α 1/f.1. oder - α 1/K Zellen wurde pro Kammer ausgesät und für 2 h im Brutschrank inkubiert (2.2.6.3). Die adhärenen Zellen wurden 3 x vorsichtig mit 200 µl PBS gewaschen und für 15 Min bei RT mit 200 µl Permeabilisierungslösung inkubiert. Der Objektträger wurde anschließend 3 x mit 600 µl PBS gewaschen und mit 200 µl BSA-Lösung für 25 Min bei RT blockiert. Die Zellen wurden 3 x für 5 Min mit 600 µl PBS gewaschen und mit 200 µl CPITC-Phalloidin-Lösung in PBS lichtgeschützt bei RT für 2 h geschwenkt. Je zwei Waschstschritte à 10 Min in 600 µl PBS-T und PBS (2.2.5.16) schlossen sich an. Der Objektträger wurde getrocknet, mit *GelMount* (Sigma) gemäß den Herstellerangaben versiegelt und für 1 h bei RT und danach üN bei 4°C im Dunkeln ausgehärtet. Ausschnitte des Objektträgers wurden am Mikroskop Axiovert 200 (Zeiss) mit dem 40 x Objektiv und dem 1,6 x Optovar der Kamera und unter Verwendung der Axiovision-Software fotografiert.

Lösungen für die Fluoreszenzmikroskopie

Blockierlösung: 1% (w/v) BSA in PBS

Permeabilisierungslösung: 4% (w/v) PFA, 0,025% (w/v) Saponin in PBS (lösen bei 65°C)

3 ERGEBNISSE

3.1 Untersuchungen zur Struktur der α 1-cytoplasmatischen Sequenz

3.1.1 NMR-Spektroskopie der α 1-cytoplasmatischen Sequenz

Ein Ziel der Arbeit war es, die Struktur der α 1-cytoplasmatischen Sequenz in Lösung mit dreidimensionaler ^1H - ^{13}C - ^{15}N -NMR-Spektroskopie unter Verwendung eines rekombinanten α 1-cyto-Peptids aufzuklären. Die Aufreinigung von isotopenmarkiertem α 1-cyto-Peptid sollte zunächst für die ^{15}N -Markierung etabliert werden, um so Informationen über dessen Stabilität und Ausbeute zu erhalten, sowie um mögliche Sekundärstrukturen des Peptids mithilfe von zweidimensionalen ^1H - ^{15}N -NMR-spektroskopischen Messungen zu untersuchen.

3.1.1.1 Aufreinigung von ^{15}N -markiertem α 1-cyto-Peptid

Das GST- α 1-cyto-Fusionsprotein wurde in *E.coli*-BL21-Bakterien exprimiert, die in ^{15}N - NH_4Cl -haltigem M9-Minimalmedium kultiviert wurden (2.2.5.1). Nach der Thrombinspaltung des isotopenmarkierten Fusionsproteins wurden GST und das α 1-cyto-Peptid mittels HPLC-Gelfiltration voneinander getrennt (Abb. 3.1 A). Das in den späten HPLC-Fractionen auftretende schwache und flächige Signal im Bereich von 6 kDa-2,5 kDa war hierbei dem rekombinanten α 1-cyto-Peptid zuzuordnen. Dieses besaß am N-Terminus elf zusätzliche Aminosäuren, die aus der MKS des pGEX-Vektors stammten⁹. Aufgrund des geringen Molekulargewichts von 3 kDa konnte das ^{15}N - α 1-cyto-Peptid im Rahmen der Tricin-SDS-PAGE nicht distinkt aufgetrennt werden. Da der Zweck der Peptiddetektion jedoch erfüllt war, wurde auf den Einsatz von höher auftrennenden Gradientengelen verzichtet. HPLC-Fractionen, die das rekombinante α 1-cyto-Peptid rein enthielten, wurden vereint, lyophilisiert und in sterilem Wasser rekonstituiert. Verschiedene Volumina der Lösung des ^{15}N - α 1-cyto-Peptids wurden zusammen mit bekannten Mengen des synthetischen α 1-cyto-Peptids gelelektrophoretisch aufgetrennt und angefärbt, um anhand der Bandenintensitäten beider Peptide die Menge des rekombinanten α 1-cyto-Peptids abzuschätzen (Abb. 3.1 B). Somit betrug die Konzentration der ^{15}N - α 1-cyto-Peptidlösung 200-250 μM , erhalten in einem Volumen von 400 μl . Dies entsprach einer Ausbeute von 120 μg rekombinantes α 1-cyto-Peptid pro Liter Bakterienexpressionskultur.

⁹ Die Plasmidkarte und die MKS des pGEX-Vektors sind im Anhang aufgeführt.

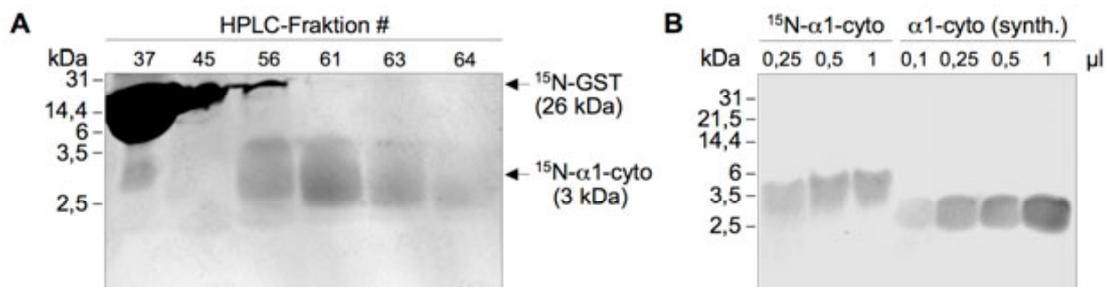


Abb. 3.1: Aufreinigung des rekombinanten, ^{15}N -markierten $\alpha 1$ -cyto-Peptids. Gereinigtes, isoto-
penmarkiertes GST- $\alpha 1$ -cyto-Protein wurde mit Thrombin proteolytisch gespalten. Beide Fragmente
wurden in einer HPLC-Gelfiltration in salzfreiem Phosphatpuffer voneinander getrennt, und Aliquots
einzeler Fraktionen wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt (A). Fraktionen mit ^{15}N - $\alpha 1$ -cyto-
Peptid wurden vereint, lyophilisiert und in Wasser rekonstituiert. Die Konzentration der Lösung des
 ^{15}N -markierten $\alpha 1$ -cyto-Peptids wurde mithilfe bekannter Mengen synthetischen $\alpha 1$ -cyto-
Peptids (1,9 kDa, 1 mM) abgeschätzt (B). Dargestellt sind die CBB-Färbungen von 20% Tricin-SDS-Gelen
nach der Gelelektrophorese.

3.1.1.2 ^1H - ^{15}N -HSQC-NMR-Spektroskopie

Das ^{15}N -markierte $\alpha 1$ -cyto-Peptid wurde μN bei 303 K in einem zweidimensionalen ^1H - ^{15}N -
HSQC-Experiment vermessen, nachdem die Aufnahme des eindimensionalen ^1H -Spektrums
auf ein nativ aufgereinigtes Peptid schließen lies (nicht gezeigt). Das HSQC-Spektrum ver-
knüpft die Frequenz eines Stickstoffatoms (ω_1) mit der des in einer Amid- oder Aminbindung
gebundenen Protons (ω_2). Da sich das Stickstoffatom in der Aminosäure Prolin in einem
Pyrrolidiniumring befindet und hier kein Amidproton existiert, erzeugt Prolin keine
 ^1H - ^{15}N -Signale. Abb. 3.2 zeigt das NMR-Spektrum des rekombinanten $\alpha 1$ -cyto-Peptids, in
dem etwa 25 Peaks zu erkennen sind. Deren wenig distinkte Auflösung und der starke
Hintergrund weisen auf einsetzende Denaturierung des Peptids während der NMR-Messung
hin. Der Vergleich mit tabellierten Werten der chemischen Verschiebungen der ^1H - und
 ^{15}N -Resonanzen für die Zufallsknäuelkonformation [Wüthrich 1976, 1986, Glushka *et al.*
1989, 1990, Braun *et al.* 1994, Wishart & Sykes 1994] ergab die Übereinstimmung einiger
Verschiebungen. Die Hälfte der Signale wiederum konnte der Zufallsknäuelkonformation
nicht zugeordnet werden.

Obleich ein Protokoll für die Aufreinigung von rekombinantem, ^{15}N -markiertem $\alpha 1$ -cyto-
Peptid etabliert werden konnte, war es nicht möglich, dieses in ausreichender Menge und
Stabilität für NMR-Messungen mit kürzerer Messzeit als 17 h zu erzeugen. Aus diesem
Grund wurden CD-spektroskopische Analysen (3.1.2) und MD-Simulationen (3.1.3) durch-
geführt, um Zugang zu der Struktur der $\alpha 1$ -cytoplasmatischen Domäne zu erlangen.

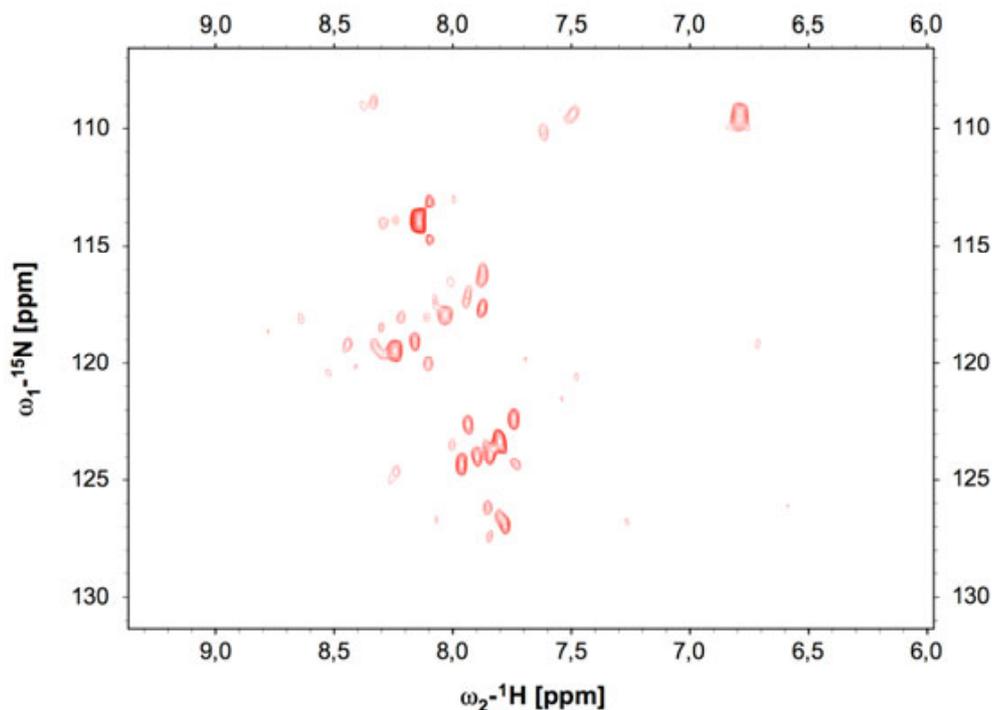


Abb. 3.2: ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum des rekombinanten, ^{15}N -markierten $\alpha 1$ -cyto-Peptids. In dem zweidimensionalen Spektrum sind die Stickstofffrequenz (ω_1) und die Frequenz des in einer Amid- oder Aminobindung verknüpften Protons (ω_2) miteinander verknüpft. Die erhaltenen Rohdaten wurden mit dem Programmen XwinNMR und Sparky 3 prozessiert und graphisch dargestellt.

3.1.2 CD-Spektroskopie der $\alpha 1$ -cytoplasmatischen Sequenz in Lösung

Um die Sekundärstruktur der $\alpha 1$ -cytoplasmatischen Sequenz in wässriger Umgebung zu untersuchen, wurden die Peptide $\alpha 1$ -cyto, KIGFFKR und PLKKKMEK sowie das Kontrollpeptid $\alpha 1$ -scrambled¹⁰ (Tabelle 2.2) CD-spektroskopisch im fernen UV-Bereich von 190 nm bis 260 nm vermessen (2.2.3.1). Die CD-Spektren der Peptide $\alpha 1$ -cyto, $\alpha 1$ -scrambled und PLKKKMEK besaßen ein negatives Minimum im Bereich 195 nm-200 nm sowie schwache positive oder negative Banden zwischen 215 nm und 260 nm (Abb. 3.3 A, B, D) und ähnelten damit stark dem CD-Spektrum unstrukturierter Zufallsknäuelkonformation (ZK, Abb. 3.3 E) [Venyaminov & Vassilenko 1994]. Das Spektrum des KIGFFKR-Peptids (Abb. 3.3 C) wies im Vergleich dazu kein niederwelliges Minimum, statt dessen jedoch ein positives Maximum um 220 nm auf und stimmte somit weder mit dem Spektrum der Zufallsknäuelkonformation noch mit dem von β -Turn-Strukturen (Abb. 3.3 E, F) vollständig überein.

¹⁰ Deutsch: zusammengewürfelt

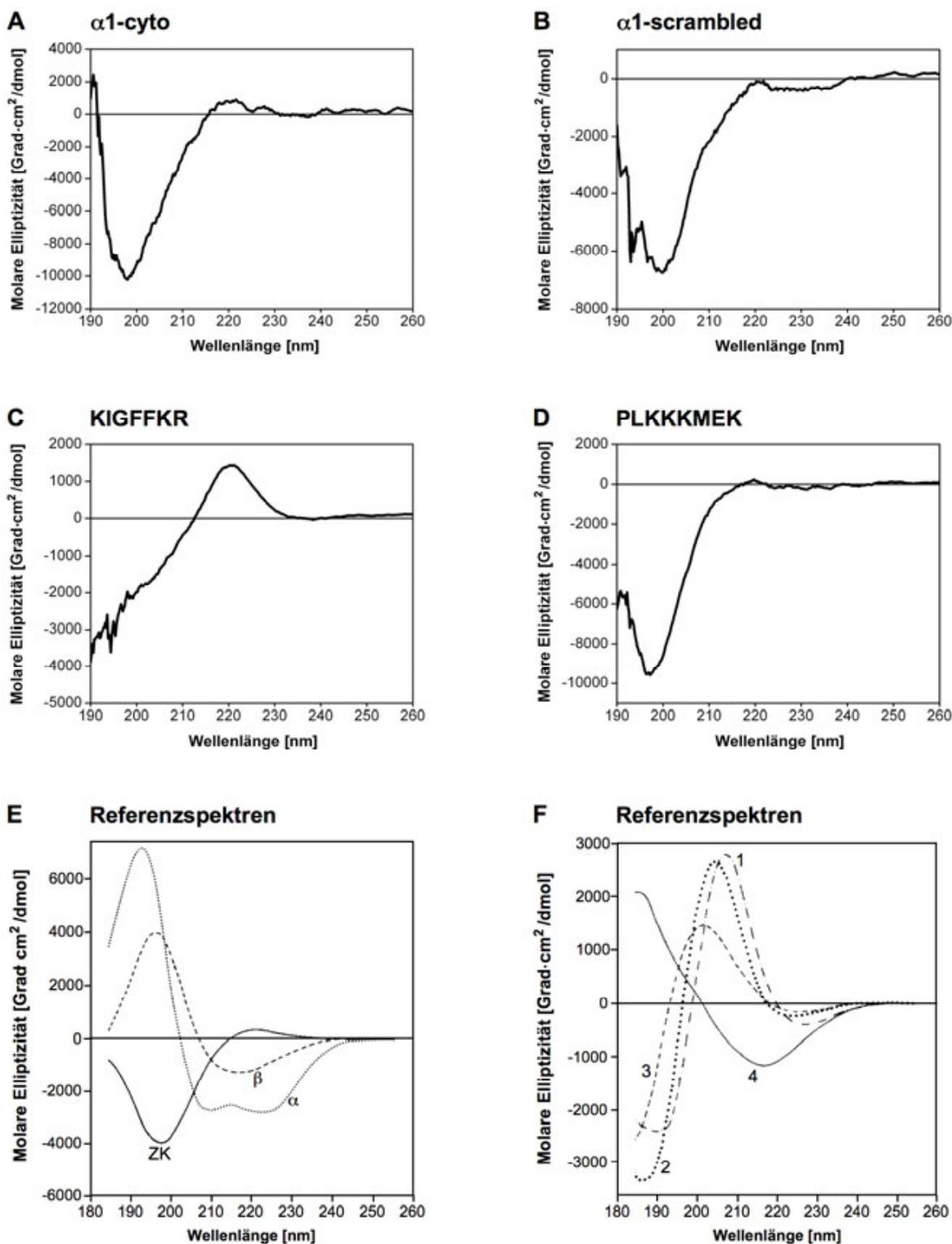


Abb. 3.3: CD-Spektren der Integrinpeptide $\alpha 1$ -cyto (A), $\alpha 1$ -scrambled (B), KIGFFKR (C) und PLKKKMEK (D). 0,1 mg/ml Peptid wurde in Phosphatpuffer mit 10 mM NaCl zwischen 190 nm und 260 nm vermessen. Die erhaltenen CD-Signale wurden prozessiert, in die molare Elliptizität ϑ_m konvertiert und die Spektren geglättet. (E): Referenzspektren der Sekundärstrukturen α -Helix (α), β -Faltblatt (β) und unstrukturierter Zufallsknäuelkonformation (ZK). (F): Referenzspektren von vier verschiedenen β -Turn-Strukturen. (E) und (F) wurden verändert nach [Brahms & Brahms 1980].

3.1.3 MD-Simulation der α 1-cytoplasmatischen Sequenz in Lösung

Um Zugang zu der Struktur des α 1-cyto-Peptids auf atomarer Ebene zu erhalten, wurde dessen Faltungsverhalten computerbasiert simuliert (2.2.4.1). Anhand der erhaltenen Trajektorien¹¹ wurde die zeitliche Entwicklung von strukturellen Parametern des α 1-cyto-Peptids in Form des Gyrationradius¹² und in Form von intramolekularen Entfernungen der C $_{\alpha}$ -Atome der Aminosäurereste F₄-R₇, I₂-K₁₀, L₉-K₁₅ und K₁₀-M₁₃ analysiert (Abb. 3.4).

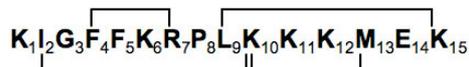


Abb. 3.4: Die mittels der MD-Simulation analysierten intramolekularen Abstandsparameter in der α 1-cytoplasmatischen Sequenz. Die Aminosäuren der α 1-cytoplasmatischen Sequenz wurden ab dem Lysin₁₁₆₆-Rest im Einbuchstabencode als K₁-I₂-G₃-F₄-F₅-K₆-R₇-P₈-L₉-K₁₀-K₁₁-K₁₂-M₁₃-E₁₄-K₁₅ beziffert. Verbindungslinien kennzeichnen die quantifizierten intramolekularen C $_{\alpha}$ -C $_{\alpha}$ -Atomabstände einzelner Aminosäurereste.

3.1.3.1 MD-Simulation in Wasser

In Analogie zu den CD-Messungen (3.1.2) wurde zunächst eine MD-Simulation in Wasser durchgeführt, und die erhaltenen Trajektorien wurden wie oben beschrieben analysiert (Abb. 3.5). Von den untersuchten Distanzen waren F₄-R₇ und K₁₀-M₁₃ über den gesamten Simulationszeitraum der Simulation am stabilsten ausgeprägt und wiesen mit Werten von 0,6 nm und 0,75 nm die kleinsten Abstände auf (Abb. 3.5 A, C). Im Gegensatz dazu schwankten die Distanzen L₉-K₁₅ und insbesondere I₂-K₁₀ stark. So lag die Entfernung L₉-K₁₅ (Abb. 3.5 D) entweder zwischen 0,4 nm und 0,8 nm oder bei 1,2 nm. Die Werte des I₂-K₁₀-Abstands (Abb. 3.5 B) betragen über einige Zeit 0,6 nm oder 1,4 nm, wurden jedoch auch von Ausschlägen von bis zu 1,25 nm und 2 nm unterbrochen. Trotz dieser teilweise stark variierenden intramolekularen Atomabstände betrug der Gyrationradius des α 1-cyto-Peptids überwiegend 0,7 nm bis 0,8 nm (Abb. 3.5 E).

Die für die Strukturparameter erhaltenen Daten gingen mit einem Faltungsverhalten des α 1-cyto-Peptids einher, in dem zwei Konformationsarten vorherrschten, die als Momentaufnahmen bei 80 ns und 200 ns Simulationszeit in Abb. 3.5 F und G dargestellt sind. Hierbei existierte das Peptid einerseits durch Rückfaltung auf sich selbst in einer haken- bzw. U-

¹¹ „Trajektorie“ bezeichnet die zeitabhängige, dreidimensionale Position und Geschwindigkeit eines Atoms.

¹² Der Gyrationradius ist eine Rechengröße, die den mittleren Atomabstand des Peptids darstellt und ein Maß für dessen Ausdehnung im Raum ist.

förmigen Konformation, mit dem K₆-Rest als exponierte Spitze (Abb. 3.5 F), andererseits besaß es eine aufgelockerte, globuläre Struktur (Abb. 3.5 G). Beide Konformationen nahmen dabei ein ähnliches Volumen ein.

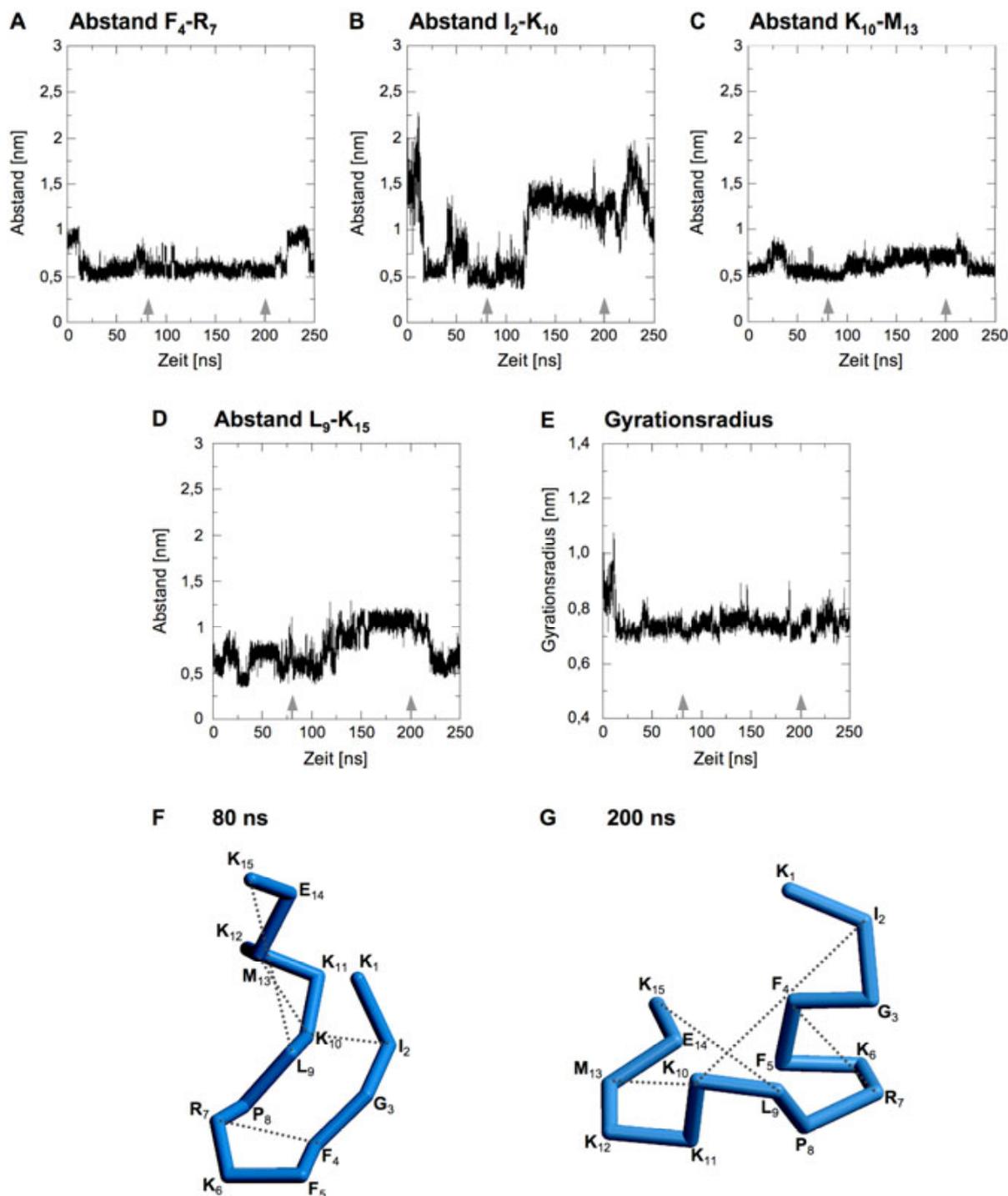


Abb. 3.5: MD-Simulation der α 1-cytoplasmatischen Sequenz in Wasser. Dargestellt ist die zeitliche Entwicklung des Abstandes der C _{α} -Atome der Aminosäurereste F₄-R₇ (A), I₂-K₁₀ (B), K₁₀-M₁₃ (C) und L₉-K₁₅ (D) sowie des Gyrationradius' (E). Die Pfeile markieren die Zeitpunkte, deren zugehörige Molekülkonformation als Momentaufnahme in (F) bzw. (G) dargestellt ist. Die Abbildungen wurden mit MOLSCRIPT und Raster3D erstellt. nm: Nanometer, ns: Nanosekunde

3.1.3.2 MD-Simulation in 100 mM NaCl-Lösung

Anschließend erfolgte eine MD-Simulation des Peptids bei einer physiologischen Salzkonzentration von 100 mM NaCl (2.2.4.1). Hierbei wurde die Rechenzeit aufgrund von Computerproblemen auf 200 ns verkürzt. Die Daten für die zeitliche Entwicklung der strukturellen Parameter sind in Abb. 3.6 zusammengefasst.

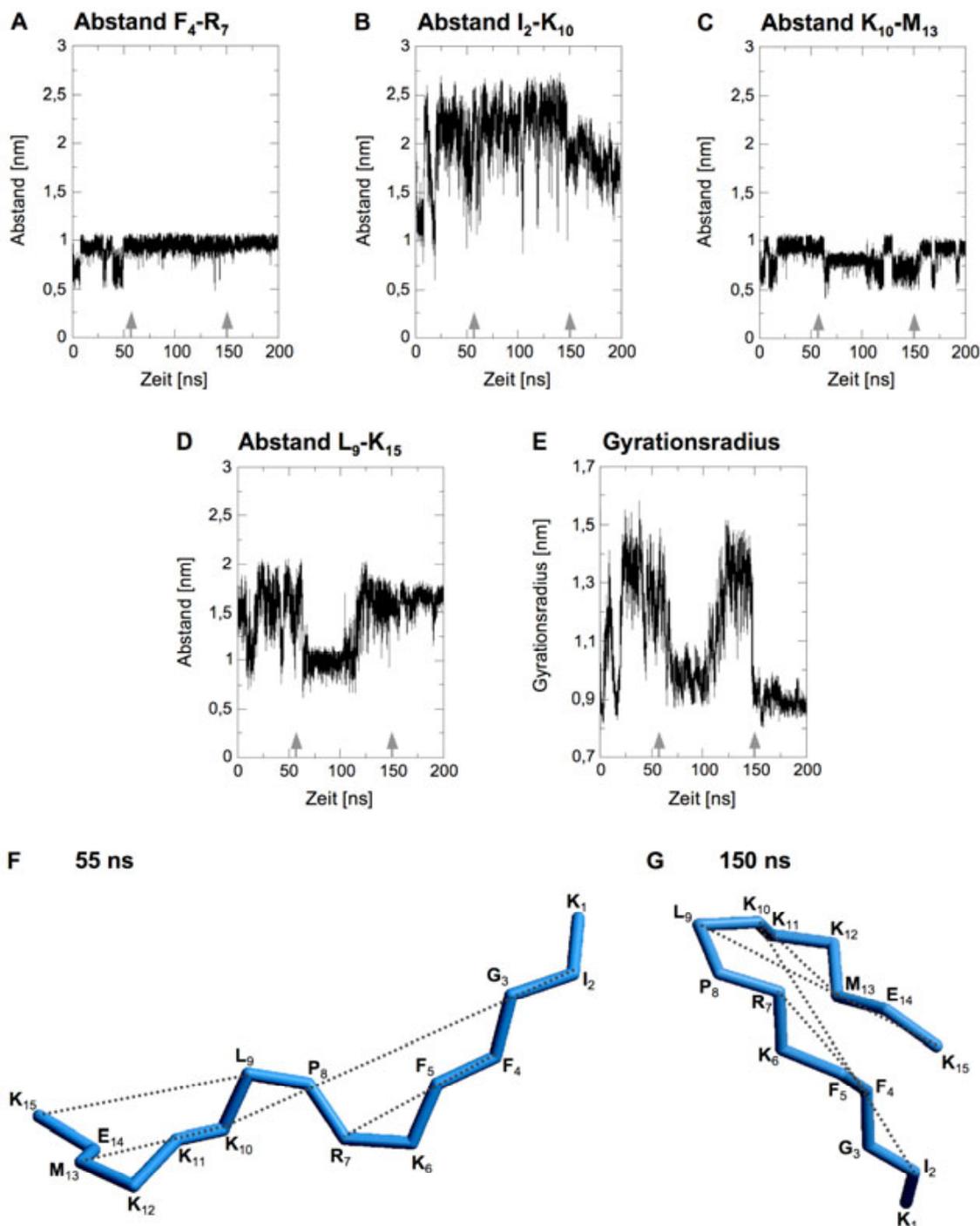


Abb. 3.6: MD-Simulation der $\alpha 1$ -cytoplasmatischen Sequenz in 100 mM NaCl. Dargestellt ist die zeitliche Entwicklung von Abständen der α -C-Atome definierter Aminosäurereste (A-D) und die des Gyrationradius' des $\alpha 1$ -cyto-Peptids (E). Die Pfeile markieren die Zeitpunkte, deren zugehörige Molekülkonformation als Momentaufnahme in (F) bzw. (G) dargestellt ist. Die Abbildungen wurden mit MOLSCRIPT und Raster3D erstellt. nm: Nanometer, ns: Nanosekunde

Verglichen mit der wässrigen Umgebung (3.1.3.1) besaßen die unter 100 mM NaCl-Bedingungen quantifizierte intramolekulare Abstände, insbesondere die von I₂-K₁₀ und L₉-K₁₅, einen anderen Verlauf und waren gemeinhin vergrößert. Die Abstände F₄-R₇ und K₁₀-M₁₃ (Abb. 3.6 A, C) waren mit Werten von maximal 1 nm erneut am kleinsten; die Entfernung F₄-R₇ variierte zudem sehr wenig. Abb. 3.6 D zeigt, dass die Reste L₉-K₁₅ entweder in einem engen Abstand von 1 nm oder in weiterer Entfernung von 1,6 nm bis 2 nm vorlagen. Die Distanz I₂-K₁₀ war erneut von allen untersuchten Abständen die größte (Abb. 3.6 B); sie verlief jedoch bei erhöhter NaCl-Konzentration konstanter. Die Gegenwart von 100 mM NaCl veränderte zudem den zeitlichen Verlauf und die Größe des Gyrationradius' (Abb. 3.6 E). Minimale Werte von 0,9 nm-1 nm lagen ähnlich häufig vor wie größere Ausdehnungen von bis zu 1,5 nm. Die zwei markanten Konformationen des α 1-cyto-Peptids sind für die Simulationszeitpunkte 55 ns und 150 ns in Abb. 3.6 F und G dargestellt. Erneut lag das α 1-cyto-Peptid in einer hakenförmigen Konformation vor, in der jedoch der L₉-Rest die exponierte Spitze bildete (Abb. 3.6 F). Die alternative Konformation (Abb. 3.6 G) war unter 100 mM NaCl-Bedingungen stark ausgestreckt. Wohingegen bei der MD-Simulation in Wasser keine Konformation eindeutig dominierte, überwog bei der Simulation mit erhöhter NaCl-Konzentration die ausgestreckte Konformation.

3.2 Analyse der Lipidbindung der α 1-cytoplasmatischen Sequenz

3.2.1 PIP-Strip-Inkubationstest

Um einen ersten Eindruck über die Fähigkeit der α 1-cytoplasmatischen Sequenz an Phospholipide zu binden, zu gewinnen, wurde ein PIP-Strip-Inkubationstest mit dem Fusionsprotein GST- α 1-cyto durchgeführt. PIP-Strips sind hydrophobe Membranen, auf deren Oberfläche verschiedene Phospholipide einschließlich der Phosphatidylinositolphosphate (PIPs), aufgetragen sind (Abb. 3.8 A). Das GST- α 1-cyto-Fusionsprotein wurde zuvor IPTG-induziert in *E.coli* exprimiert und mittels GST-Affinitätschromatographie und Gelfiltration aufgereinigt (2.2.5, Abb. 3.7). Während der Aufreinigung fand eine leichte Degradation des Fusionsproteins statt, so dass die finale Lösung gereinigtes GST- α 1-cyto-Protein und in geringem Anteil GST in einer Gesamtproteinkonzentration von 1,8 mM enthielt (Abb. 3.7 B). Die IPTG-induzierte Expression und die Aufreinigung des GST-Kontrollproteins erfolgten analog (nicht gezeigt) und erbrachten eine Lösung reinen GST-Proteins, mit einer Konzentration von 1,2 mM.

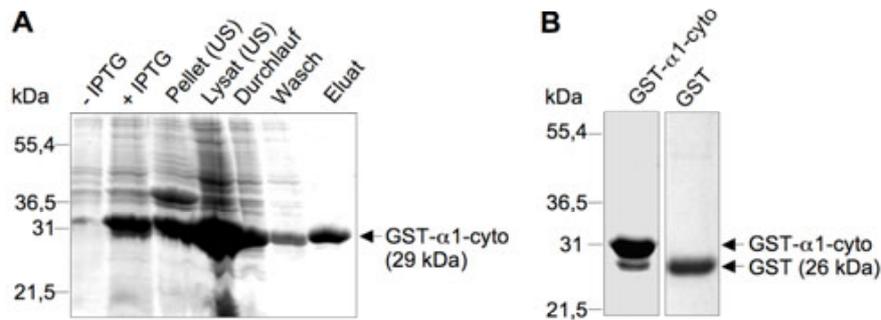


Abb. 3.7: IPTG-induzierte heterologe Expression und Aufreinigung des rekombinanten Proteins GST- α 1-cyto in *E. coli* BL21-Zellen. Die Bakterien der Expressionskultur wurden mittels Ultraschall (US) aufgeschlossen. Im Lysat befindliches lösliches GST- α 1-cyto-Protein wurde affinitätschromatographisch angereichert und mit glutathionhaltigem Puffer eluiert (A). Proteinenthaltende Fraktionen der nachfolgenden Gelfiltration wurden vereint und konzentriert, um gebrauchsfertige Lösungen rekombinanten Proteins zu erhalten (B). Gezeigt ist die CBB-Färbung von Tricin-SDS-Gelen (15%) nach der PAGE.

Aufgereinigtes GST- α 1-cyto-Protein wurde mit einem PIP-Strip inkubiert, und gebundenes Protein wurde immunologisch detektiert (2.2.5.16) [Kavran *et al.* 1998].

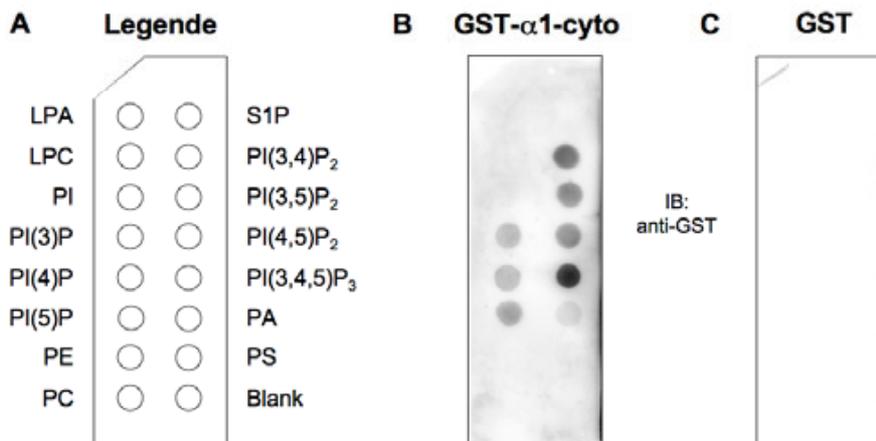


Abb. 3.8: PIP-Strip-Inkubationstest. PIP-Strip-Membranen (A) wurden mit GST- α 1-cyto (B) oder GST (C) inkubiert, gewaschen und mit einem peroxidasegekoppelten anti-GST-Antikörper inkubiert (IB: Immunoblot). Gebundenes Protein wurde mittels Chemilumineszenz detektiert. Die in (A) aufgetragenen Lipide sind: LPA: Lysophosphatidat, LPC: Lysophosphatidylcholin, PA: Phosphatidat, PC: Phosphatidylcholin, PE: Phosphatidylethanolamin, PI: Phosphatidylinositol, PI(X)P: Phosphatidyl(X)phosphat, PI(X,Y) P_2 : Phosphatidylinositol(X,Y)bisphosphat, PI(3,4,5) P_3 : Phosphatidylinositol-(3,4,5)trisphosphat, PS: Phosphatidylserin, S1P: Sphingosin(1)phosphat.

Abb. 3.8 B zeigt, dass eine Bindung von GST- α 1-cyto an alle PIPs erfolgte, dabei mit höchster Intensität an PI(3,4,5) P_3 . Phosphatidylinositol und Phosphatidat hingegen wurden nicht bzw. schwach gebunden. Die Glycerophospholipide mit Cholin-, Serin- oder Ethanolamin-kopfgruppe blieben von der GST- α 1-cyto-Bindung ausgeschlossen, ebenso wie lösliches Sphingosin(1)phosphat und die Lysophospholipide Lysophosphatidylcholin und Lysophosphatidat. Inwiefern die Fettsäurekomponenten der PIPs eine Rolle bei der Proteinbindung spielten, konnte nicht untersucht werden, da keine membranimmobilisierten PIP-Lysoformen

verfügbar waren. Das unfusionierte GST-Kontrollprotein zeigte keine Bindung an die PIP-*Strip*-Membran, wie in Abb. 3.8 C ersichtlich ist.

3.2.2 Lipid-Co-Sedimentationsversuch

Da der PIP-*Strip*-Inkubationstest nur qualitative Aussagen über die Bindung eines Proteins an Lipide erlaubt [Kavran *et al.* 1998], wurden Liposomen-Co-Sedimentationsexperimente durchgeführt (2.2.2.6), um die Bindung der α 1-cytoplasmatischen Sequenz, in Form des α 1-cyto-Peptids, an PIPs zu untersuchen [Buser & McLaughlin 1997]. Hierbei beschränkten sich die Studien auf die Derivate PI(4,5)P₂ und PI(3,4,5)P₃, die in dem inneren Blatt der Plasmamembran lokalisiert sind und wichtige zelluläre Signalfunktionen ausüben (1.3.3).

Zunächst wurden LUVs präpariert, die Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylserin (PS) in der molaren Zusammensetzung (50:50) enthielten (PC:PS (50:50), 2.2.2.4). Diesen wurde PI(4,5)P₂ oder PI(3,4,5)P₃ in einer molaren Endkonzentration von 2% zugesetzt [Heuer *et al.* 2006]. Um eine konstante negative Oberflächenladung der Liposomen zu gewährleisten, wurde der Anteil von monovalentem PS gemäß der Ladung von PI(4,5)P₂ oder PI(3,4,5)P₃ verringert. Hierfür wurde berücksichtigt, dass PI(4,5)P₂ unter physiologischen Bedingungen drei der fünf möglichen negativen Ladungen besitzt [Toner *et al.* 1988]. Da sich bezüglich des Ionisierungszustandes von PI(3,4,5)P₃ keine Daten finden ließen, wurden analog zu PI(4,5)P₂ vier der sieben möglichen negativen Ladungen angenommen. Die molaren Zusammensetzungen der LUVs betragen somit PC:PS:PI(4,5)P₂ (54:44:2) und PC:PS:PI(3,4,5)P₃ (56:42:2), bezeichnet als 2% PI(4,5)P₂ bzw. 2% PI(3,4,5)P₃. Als Kontrolle für eine elektrostatisch bedingte Lipid-Protein-Interaktion wurden zudem Liposomen mit einem molaren PS-Anteil von 15% eingesetzt (PC:PS (85:15)).

Steigende Konzentrationen der Liposomen wurden mit dem α 1-cyto-Peptid (Tabelle 2.2) inkubiert und mittels Ultrazentrifugation sedimentiert. Die Liposomenpellets wurden gelelektrophoretisch in einem NuPAGE Novex 4-12% Gradientengel aufgetrennt. Co-sedimentiertes Peptid wurde durch CBB-Färbung detektiert und densitometrisch quantifiziert (Abb. 3.9 A). Hierbei zeigte sich, dass das α 1-cyto-Peptid stark mit den negativ-geladenen Liposomen der Sorte PC:PS (50:50), 2% PI(4,5)P₂ oder PI(3,4,5)P₃ co-sedimentierte, nicht jedoch mit den schwach negativ-geladenen PC:PS (85:15)-Vesikeln. Der Anteil sedimentierten Peptids wurde graphisch gegen die eingesetzte Lipidkonzentration aufgetragen und mithilfe der Origin-Software nicht-linearen Kurvenverläufen angepasst (Abb. 3.9 B). Die Bindungskurve an PC:PS (85:15)-haltige LUVs zeigte einen nahezu linearen Verlauf, was für eine unspezifische

sche Lipidbindung sprach. Das Bindungsverhalten des Peptids an die drei weiteren Liposomentypen ergab hingegen mit steigender Lipidkonzentration einen hyperbolen Kurvenverlauf.

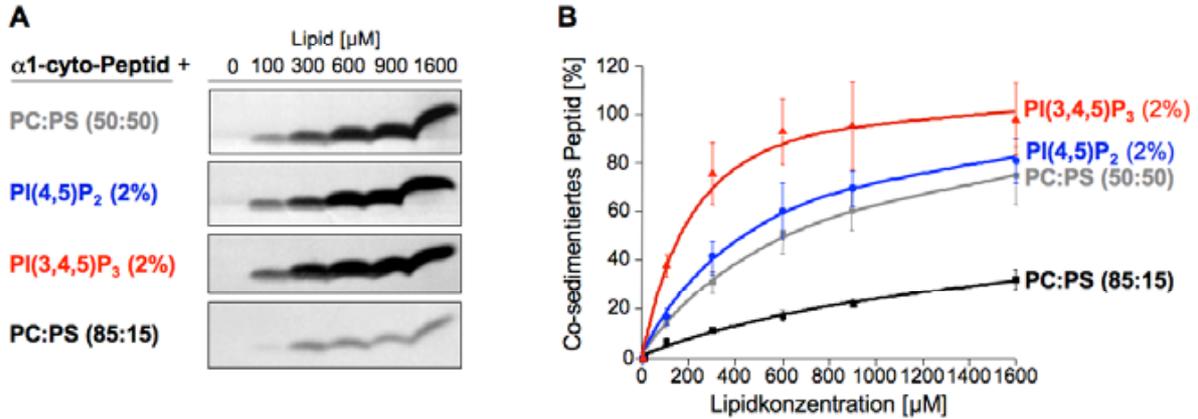


Abb. 3.9: Lipid-Co-Sedimentationstest. Die Liposomen PC:PS (50:50), 2% PI(4,5)P₂, 2% PI(3,4,5)P₃ und PC:PS (85:15) wurden mit dem $\alpha 1$ -cyto-Peptid inkubiert und ultrazentrifugiert. Co-sedimentiertes Peptid wurde mittels SDS-PAGE und CBB-Färbung detektiert (**A**) und densitometrisch quantifiziert. Durch den Auftrag von co-sedimentiertem Peptid gegen die eingesetzte Lipidkonzentration wurden die apparenten Dissoziationskonstanten bestimmt (**B**).

Der Mechanismus und die Stöchiometrie der Bindung von Proteinen an Lipidflächen sind in der Regel nicht bekannt. Aus diesem Grund wird eine sogenannte apparente Dissoziationskonstante K_D^{app} bestimmt, um die Bindung von Proteinen an Liposomen zu beschreiben [Peitzsch & McLaughlin 1993]. Die Berechnung der K_D^{app} -Werte erfolgte für die drei hyperbolen Bindungskurven PC:PS (50:50), 2% PI(4,5)P₂ und 2% PI(3,4,5)P₃ mithilfe des Programms Origin und der durch die AG Freund, Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie, Berlin-Buch, vom Massenwirkungsgesetz abgeleiteten Formel:

$$\frac{[P]_L}{[P]_0} = 100 \left(1 - \left(\frac{a}{2[P]_0} \left(-K_D^{app} + [P]_0 - \frac{[L]}{2} \right) + \sqrt{\left(K_D^{app} - [P]_0 + \frac{[L]}{2} \right)^2 + 4K_D^{app}[P]_0} \right) - \frac{b}{[P]_0} \right) \% \quad \text{Gl. 5}$$

Hierbei bezeichnet $[P]_L$ das lipidgebundene Peptid, $[P]_0$ die Gesamtpeptidkonzentration, $[L]$ die Gesamtlipidkonzentration und K_D^{app} die apparente Dissoziationskonstante. Die Parameter a und b sind lineare Korrekturfaktoren, die während der nicht-linearen Kurvenanpassung automatisch optimiert werden.

Die ermittelten K_D^{app} -Werte betragen $319,4 \pm 21,5 \mu\text{M}$ für PC:PS (50:50), $208,5 \pm 16,3 \mu\text{M}$ für 2% PI(4,5)P₂ und $61,5 \pm 13,0 \mu\text{M}$ für 2% PI(3,4,5)P₃. Demnach erfolgte die stärkste Bindung des $\alpha 1$ -cyto-Peptids an PI(3,4,5)P₃-haltige LUVs, gefolgt von PI(4,5)P₂- und PC:PS (50:50)-enthaltenden Liposomen.

Die kürzeren α 1-Teilpeptide, KIGFFKR und PLKKKMEK (Tabelle 2.2) wurden ebenfalls in dem Co-Sedimentationsversuch eingesetzt. Bedingt durch die Kürze dieser Peptide wurden jedoch nach der gelelektrophoretischen Auftrennung des Liposomenpellets mit anschließender CBB-Färbung keine quantifizierbaren Peptidbanden erhalten.

3.2.3 Langmuir-Filmwaagenmessungen

Um die mittels PIP-*Strip*- und Co-Sedimentationsanalysen gewonnenen Informationen über die Lipidbindung der α 1-cytoplasmatischen Sequenz durch ein unabhängiges Experiment zu bestätigen, erfolgten Spreitungsdruckmessungen an Lipidfilmen mithilfe der Langmuir-Filmwaage. Zudem sollte mit diesen Experimenten die Interaktion des α 1-cyto-Peptids mit PI(4,5)P₂- oder PI(3,4,5)P₃-haltigen Lipidoberflächen hinsichtlich der zugrunde liegenden energetischen Aspekte und des physischen Mechanismus' charakterisiert werden. So sollte geklärt werden, ob es sich bei der Interaktion zwischen α 1-cyto-Peptid und der jeweiligen Lipidoberfläche um Adsorption oder Insertion handelte. Mithilfe von Langmuir-Filmen wird vor allem Membranpenetration detektiert, da reine Anlagerungsprozesse nur geringe Änderungen des Spreitungsdrucks π eines Langmuir-Films verursachen [Maget-Dana 1999]. Im Rahmen der Langmuir-Filmwaagenstudien konnten im Vergleich zu den vorangegangenen Experimenten auch die kürzeren α 1-Peptide KIGFFKR und PLKKKMEK eingesetzt werden.

Ein Langmuir-Film wurde erzeugt, indem eine Phospholipidmischung (Tabelle 2.7) auf einer Pufferoberfläche zu einem Einschichtfilm (*monolayer*) gespreitet und dieser auf den physiologischen Membranspreitungsdruck von 15,5 mN/m (π_i) komprimiert wurde [Mukhopadhyay & Cho 1996, Rosengarth *et al.* 1998]. Integrinpeptide wurden in einer Endkonzentration von 2,5 μ M in die darunter liegende Pufferphase („Subphase“) injiziert, und Veränderungen des Spreitungsdrucks ($\Delta\pi$) des Langmuir-Films wurden über 30 Min verfolgt. Für Kontrollmessungen wurde Wasser injiziert (2.2.2.2). Für die Experimente wurde neben dem Peptid α 1-cyto auch das α 1-scrambled-Peptid verwendet, das die Aminosäuren der α 1-cytoplasmatischen Sequenz in zufällig durchmischter Anordnung enthielt. Desweiteren wurden die Teilpeptide KIGFFKR und PLKKKMEK eingesetzt, welche den membranproximalen bzw. -distalen Abschnitt der α 1-cytoplasmatischen Sequenz präsentierten. Das Kontrollpeptid β 1-4 wurde aus dem membrandistalen Bereich der cytoplasmatischen Domäne der β 1-Integrinuntereinheit abgeleitet (Tabelle 2.2).

3.2.3.1 Interaktion von Integrinpeptiden mit Langmuir-Filmen

Zunächst wurde die Interaktion der Integrinpeptide $\alpha 1$ -cyto, $\alpha 1$ -scrambled, KIGFFKR, PLKKKMEK und $\beta 1$ -4 mit Langmuir-Filmen untersucht, welche die Zusammensetzung der Liposomen des Co-Sedimentationsversuchs (3.2.2) besaßen: PC:PS (50:50), 2% PI(4,5)P₂, 2% PI(3,4,5)P₃ und PC:PS (85:15). Die Ergebnisse sind als $\Delta\pi$ -t-Graphen in Abb. 3.10 zusammengefasst. Das $\alpha 1$ -cyto-Peptid (Abb. 3.10 A) assoziierte mit den Langmuir-Filmen mit ähnlicher Präferenz wie mit den Liposomen im Co-Sedimentationstest. So inserierte das $\alpha 1$ -cyto-Peptid bevorzugt in PI(3,4,5)P₃-haltige Einschichtmembranen ($\Delta\pi \approx 6$ mN/m), wohingegen die Membranpenetration in PC:PS (50:50)- und in PI(4,5)P₂-haltige Filme mit $\Delta\pi \approx 2,1$ mN/m deutlich schwächer erfolgte. Ebenso war keine Assoziation dieses Peptids mit Filmen aus PC:PS (85:15) nachweisbar. Demnach bedurfte das $\alpha 1$ -cyto-Peptid negativer Oberflächenladung, vorzugsweise vermittelt durch die PI(3,4,5)P₃-Kopfgruppe, um mit Lipiden zu assoziieren.

Abb. 3.10 B zeigt, dass das $\alpha 1$ -scrambled-Peptid mit ähnlicher Präferenz wie das $\alpha 1$ -cyto-Peptid in die vier angebotenen Langmuir-Filme inserierte. Die dabei erreichten $\Delta\pi$ -Werte waren jedoch stets um etwa 1 mN/m gegenüber denen des $\alpha 1$ -cyto-Peptids erhöht. Auch das KIGFFKR-Peptid inserierte am stärksten in den PI(3,4,5)P₃- und am schwächsten in den PC:PS (85:15)-haltigen Film (Abb. 3.10 C). Die maximalen $\Delta\pi$ -Werte für die Insertion des KIGFFKR-Peptids in PC:PS (50:50)- und in PI(4,5)P₂-haltige Filme waren erneut bedeutend schwächer als für PI(3,4,5)P₃ und ähnelten denen des $\alpha 1$ -cyto-Peptids. Im Vergleich zum $\alpha 1$ -cyto-Peptid war der maximale $\Delta\pi$ -Wert des KIGFFKR-Peptids für Filme aus PC:PS (85:15) jedoch leicht erhöht ($\Delta\pi \approx 0,9$ mN/m) und für jene mit PI(3,4,5)P₃ verringert ($\Delta\pi \approx 4,9$ mN/m). Auffällig war die verminderte Stabilität der Insertion des KIGFFKR-Peptids in die PI(4,5)P₂- oder PI(3,4,5)P₃-enthaltenden Langmuir-Filme, da die $\Delta\pi$ -Werte nach dem Erreichen eines Maximums bei 10 oder 15 Min im weiteren Messverlauf abnahmen. Im Gegensatz zu den anderen Peptiden wies das PLKKKMEK-Peptid nur geringe Membraninsertion mit $\Delta\pi$ -Werten zwischen 0 und 1 mN/m auf (Abb. 3.10 D), was auch für das Kontrollpeptid $\beta 1$ -4 beobachtet wurde (Abb. 3.10 E). Die $\Delta\pi$ -Werte der Wasserkontrollmessung lagen stets zwischen 0 und 0,5 mN/m (Abb. 3.10 F).

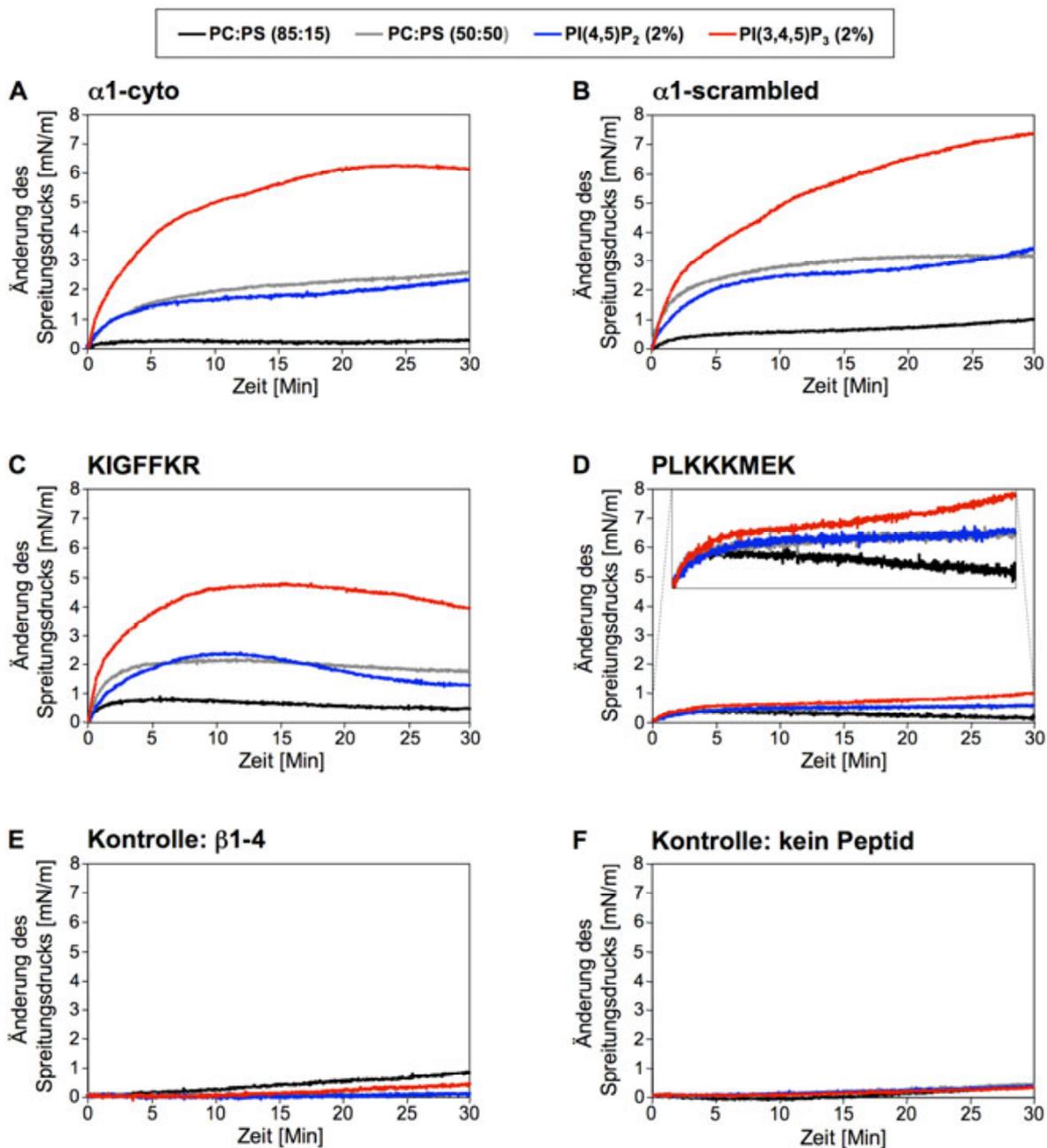


Abb. 3.10: Interaktion von Integrinpeptiden mit den Langmuir-Filmen PC:PS (50:50), 2% PI(4,5)P₂, 2% PI(3,4,5)P₃ und PC:PS (85:15). Einzelheiten sind im Text beschrieben.

3.2.3.2 Abhängigkeit der Membraninteraktion von der Konzentration von PI(4,5)P₂ und PI(3,4,5)P₃

Bei den Co-Sedimentationsstudien (3.2.2) wurde die Gesamtmenge von Liposomen und damit die angebotene Bindungsfläche variiert, um die Lipidbindung des $\alpha 1$ -cyto-Peptids zu analysieren. Um den Einfluss einer erhöhten PIP-Konzentration und somit PIP-Dichte auf die Interaktion der Integrinpeptide mit den Langmuir-Filmen zu untersuchen, wurde die molare Endkonzentration von PI(4,5)P₂ bzw. PI(3,4,5)P₃ von 2% auf 5% erhöht. Unter Berücksichtigung des Ladungsausgleichs mit monovalentem PS betrug die Zusammensetzung der gene-

rierten Lipidmischungen PC:PS:PI(4,5)P₂ (60:35:5) bzw. PC:PS:PI(3,4,5)P₃ (65:30:5). Die an den Langmuir-Filmen gemessenen Insertionskinetiken sind in Abb. 3.11 zusammengefasst. Mit der Steigerung der PI(4,5)P₂-Konzentration von 2% auf 5% verdoppelte sich die Membraninsertion des α 1-cyto-Peptids ($\Delta\pi \approx 4$ mN/m, Abb. 3.11 A). Die Erhöhung der negativen Oberflächenladung des Langmuir-Films durch PS steigerte die Membraninsertion des Peptids jedoch nicht, was für einen PI(4,5)P₂-spezifischen Effekt sprach. Im Gegensatz zu PI(4,5)P₂ führte die erhöhte PI(3,4,5)P₃-Konzentration zu einer Reduktion der Membraninsertion des α 1-cyto-Peptids um 50%. Damit ähnelte der erreichte maximale $\Delta\pi$ -Wert für 5% PI(3,4,5)P₃ dem für 5% PI(4,5)P₂. Die Insertion des α 1-cyto-Peptids in Langmuir-Filme war demzufolge abhängig von der PI(4,5)P₂- bzw. der PI(3,4,5)P₃-Konzentration, jedoch auf unterschiedliche Weise.

Das Phänomen, dass die Membranpenetration bei erhöhter PI(4,5)P₂-Konzentration zunahm, bei gesteigerter PI(3,4,5)P₃-Konzentration hingegen sank, war ebenfalls für die Peptide α 1-scrambled und KIGFFKR zu beobachten. Wie für das α 1-cyto-Peptid beschrieben, führte die Erhöhung der PI(4,5)P₂-Konzentration ebenfalls zu einer Verdopplung der $\Delta\pi$ -Werte des α 1-scrambled-Peptids (Abb. 3.11 B), wohingegen dessen Insertion in Filme aus PC:PS (45:55) nicht gesteigert wurde. Ebenfalls in Analogie zu dem α 1-cyto-Peptid bewirkte die Zunahme der PI(3,4,5)P₃-Konzentration von 2% auf 5% die Halbierung der Membraninsertion des α 1-scrambled-Peptids. Die finale Membraninsertion des KIGFFKR-Peptids (Abb. 3.11 C) wurde ebenfalls durch die Erhöhung der PI(4,5)P₂-Konzentration von 2% auf 5% verdoppelt und durch entsprechende Erhöhung der PI(3,4,5)P₃-Konzentration halbiert. Darüber hinaus stabilisierte die gesteigerte PI(4,5)P₂- oder PI(3,4,5)P₃-Konzentration die Membraninsertion des KIGFFKR-Peptids. Abb. 3.11 D zeigt, dass die Membraninsertion des PLKKKMEK-Peptids durch die Erhöhung weder der PI(4,5)P₂- noch der PI(3,4,5)P₃-Konzentration wesentlich gesteigert werden konnte. Die Kontrollspreitungsdruckmessungen besaßen weiterhin $\Delta\pi$ -Werte zwischen 0 und 1 mN/m (Abb. 3.11 E und F).

3.2.3.3 Einfluss von zweiwertigen Kationen und von Phosphat auf die Membranassoziation der Integrinpeptide

Die bisherigen Langmuir-Filmwaagenmessungen deuteten darauf hin, dass an der Insertion der Integrinpeptide α 1-cyto, α 1-scrambled und KIGFFKR in die PI(4,5)P₂- und PI(3,4,5)P₃-haltigen Filme elektrostatische Interaktionen beteiligt waren. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden dem Subphasenpuffer MgCl₂ und CaCl₂ zugesetzt und Spreitungsdruckmessungen mit den 2% und 5% PI(4,5)P₂- oder PI(3,4,5)P₃-enthaltenden Filmen durch-

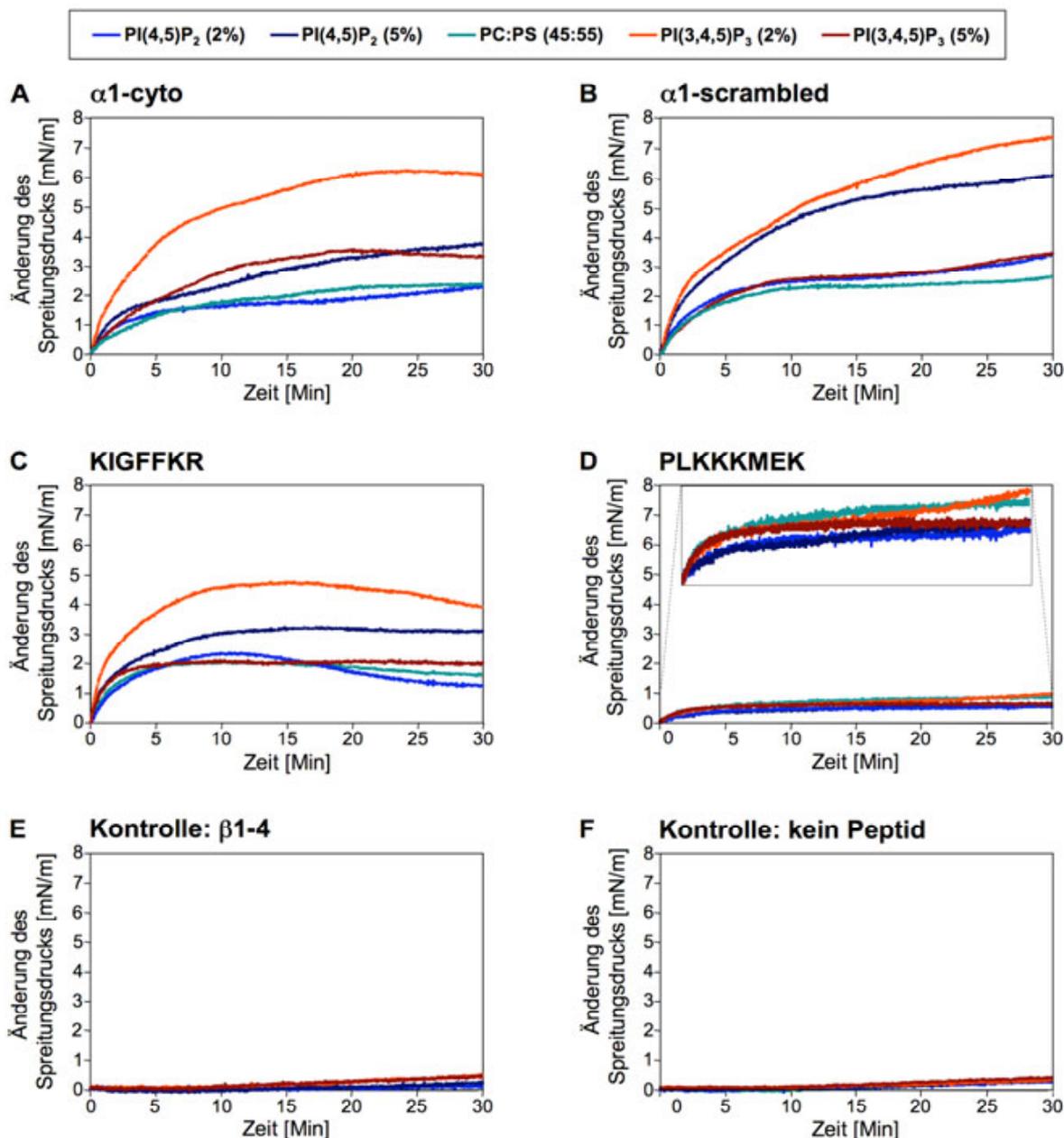


Abb. 3.11: Abhängigkeit der Interaktion von Integrinpeptiden mit Langmuir-Filmen von deren PIP-Konzentration. Untersucht wurde die Interaktion mit Langmuir-Filmen, die 2% oder 5% PI(4,5)P₂ bzw. PI(3,4,5)P₃ oder PC:PS (45:55) enthielten.

geführt. Zweiwertige Kationen wie Mg²⁺ und Ca²⁺ schirmen die Phosphatgruppen von Phospholipidkopfgruppen ab und unterbrechen deren elektrostatische Interaktionen [Gennis 1989]. Die gewählte Salzkonzentration von 2,5 mM lag oberhalb den physiologischen Bedingungen; sie diente ausschließlich dem Zweck, elektrostatische Wechselwirkungen effektiv zu unterbrechen. Die zugehörigen $\Delta\pi$ -t-Graphen sind in Abb. 3.12 in der linken Spalte für 2% und 5% PI(4,5)P₂ und in der rechten Spalte für 2% und 5% PI(3,4,5)P₃ dargestellt. Generell führte der Zusatz von MgCl₂ und CaCl₂ im Puffer stets zu einer Erniedrigung des maximalen $\Delta\pi$ -Wertes. Einzig das Ausmaß der Inhibition der Membraninsertion variierte. Innerhalb einer PIP-Sorte bewirkten MgCl₂ und CaCl₂ dort die höchste Abnahme von $\Delta\pi_{\max}$, wo zuvor

die stärkere Bindung stattgefunden hatte, d.h. bei 5% PI(4,5)P₂ mehr als bei 2% PI(4,5)P₂ und bei 2% PI(3,4,5)P₃ mehr als bei 5% PI(3,4,5)P₃. Dies deutet auf die größtenteils elektrostatische Natur der Membraninsertion der α 1-Integrinpeptide in Filme, die 5% PI(4,5)P₂ oder 2% PI(3,4,5)P₃ enthalten, hin.

Der Zusatz von MgCl₂ und CaCl₂ reduzierte unabhängig von der PIP-Spezies die Membraninsertion des α 1-cyto-Peptids auf den maximalen $\Delta\pi$ -Wert \approx 1 mN/m (Abb. 3.12 A und E). Die Inhibition der Membranpenetration auf einen Grundwert von $\Delta\pi$ -Wert \approx 1,8 mN/m war für das α 1-scrambled-Peptid ebenfalls unabhängig von der PI(3,4,5)P₃-Konzentration zu beobachten (Abb. 3.12 F). Die Penetration dieses Peptids in 2% oder 5% PI(4,5)P₂-haltige Filme (Abb. 3.12 B) wurde jedoch durch MgCl₂ und CaCl₂ auf etwa 33% des jeweiligen salzfreien Wertes gesenkt. Im Vergleich zu dem α 1-cyto-Peptid war die relative salzinduzierte Inhibition der Membraninsertion des α 1-scrambled-Peptids in Filme mit 5% PI(4,5)P₂ oder 2% PI(3,4,5)P₃ nach 30 Min geringer ausgeprägt.

Die Gegenwart von MgCl₂ und CaCl₂ schwächte ebenfalls die Insertion des Peptids KIGFFKR in die PI(4,5)P₂- oder PI(3,4,5)P₃-enthaltenden Langmuir-Filme (Abb. 3.12 C und G). So wurde die Membranpenetration in 5% PI(4,5)P₂-haltige Filme um 74% und die in 2% PI(3,4,5)P₃-haltige Filme um 65% reduziert. Im Fall der Konzentration von 2% PI(4,5)P₂ wurde zwar der maximale $\Delta\pi$ -Wert durch MgCl₂ und CaCl₂ auf ca. 75% abgesenkt, doch lagen in den letzten 10 Min der Messung gleiche $\Delta\pi$ -Werte wie in der salzfreien Messung vor (Abb. 3.12 C). Auch die Spreitungsdruckkurve für den 5% PI(3,4,5)P₃-haltigen Film war trotz verringerter $\Delta\pi$ -Werte nach 30 Min Messung weiterhin ansteigend (Abb. 3.12 G), so dass die Membraninsertion in 2% PI(4,5)P₂- oder 5% PI(3,4,5)P₃-haltige Filme durch MgCl₂ und CaCl₂ eher verzögert als vollständig gehemmt war.

Die in den Abschnitten 3.2.1-3.2.3.2 dargestellten Daten gaben Anlass zu der Vermutung, dass die Phosphatgruppen von PI(4,5)P₂ und PI(3,4,5)P₃ maßgeblich an deren Interaktion mit den Integrinpeptiden α 1-cyto, α 1-scrambled und KIGFFKR beteiligt waren. Aus diesem Grund wurde die Membraninsertion dieser Peptide in deren bevorzugte Filme, 2% PI(3,4,5)P₃ und 5% PI(4,5)P₂, in Gegenwart von 50 mM Natriumdihydrogenphosphat (NaH₂PO₄) untersucht (Tabelle 2.6, Abb. 3.13).

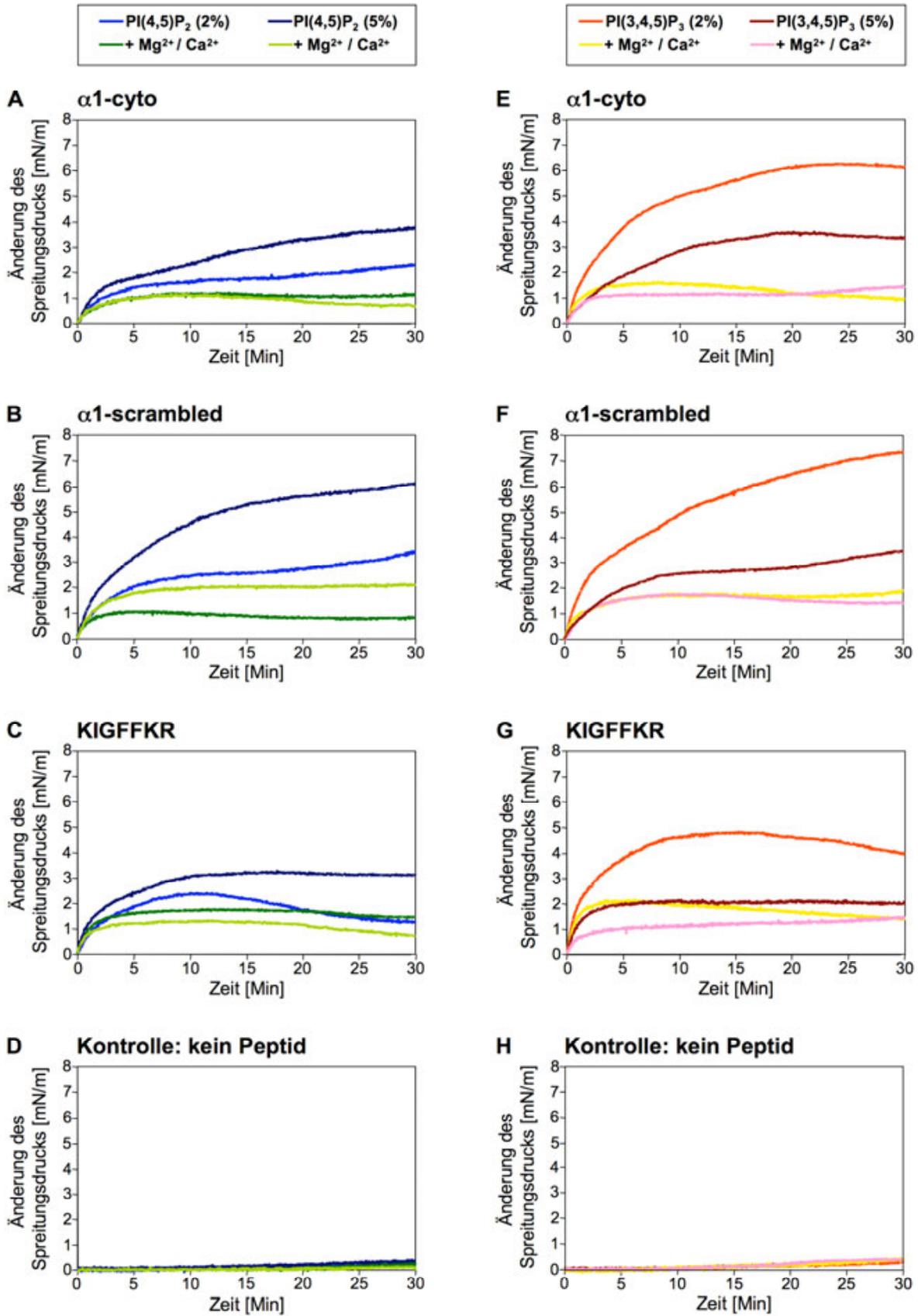


Abb. 3.12: Einfluss von MgCl₂ und CaCl₂ auf die Insertion der Integrinpeptide in PI(4,5)P₂- oder PI(3,4,5)P₃-enthaltende Langmuir-Filme.

Die Membraninsertion aller drei Peptide in 2% PI(3,4,5)P₃-enthaltende Langmuir-Filme wurde durch NaH₂PO₄ weniger als zuvor durch MgCl₂ und CaCl₂ reduziert: auf 66% (KIGFFKR-Peptid), 50% (α1-scrambled-Peptid) oder 33% (α1-cyto-Peptid). Der inhibierende Einfluss von NaH₂PO₄ war auf die Insertion der Peptide in 5% PI(4,5)P₂-haltige Filme ebenfalls schwächer als der von MgCl₂ und CaCl₂. Da die Δπ-Werte des KIGFFKR-Peptids erst nach 8 Min Messzeit begannen, auf ca. 60% der NaH₂PO₄-freien Messung abzufallen, war die Wirkung von NaH₂PO₄ hier verzögert (Abb. 3.13 C). Die entsprechende Spreitungsdruckkurve des α1-cyto-Peptids stagnierte nach 10 Min und erreichte dabei 75% des maximalen Δπ-Wertes der NaH₂PO₄-freien Messung (Abb. 3.13 A). Bei der Membraninsertion des α1-scrambled-Peptids (Abb. 3.13 B) führte NaH₂PO₄ zunächst zu einem steileren Anstieg der Δπ-Kurve, die das Maximum von 5,2 mN/m anstelle von 6,2 mN/m nach 10 Min erlangte. Anschließend fiel die Kurve kontinuierlich ab, bis sie nach 30 Min 66% des Δπ-Wertes der NaH₂PO₄-freien Messung erreichte.

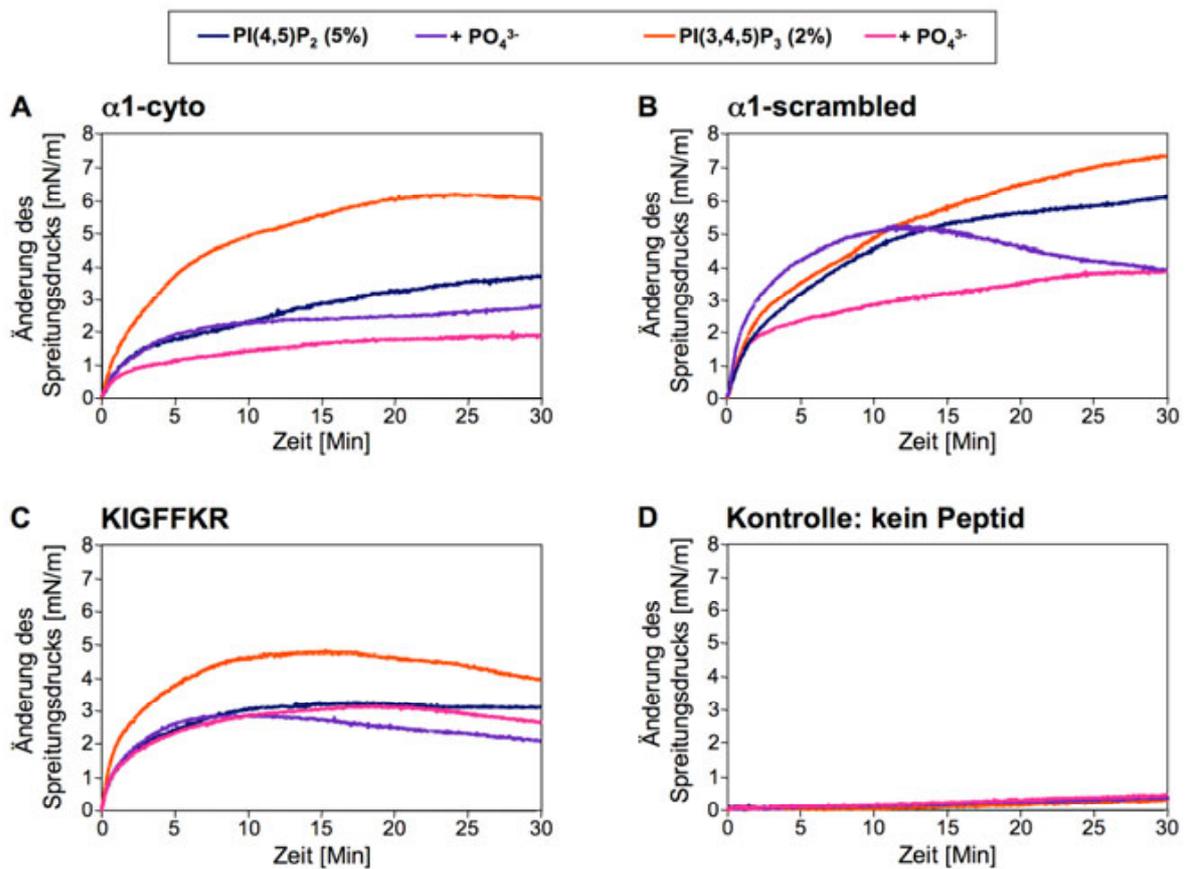


Abb. 3.13: Einfluss von Natriumdihydrogenphosphat auf die Interaktion von Integrinpeptiden mit 2% PI(3,4,5)P₃- und 5% PI(4,5)P₂-haltigen Langmuir-Filmen.

3.2.4 CD-spektroskopische Messungen der α 1-cytoplasmatischen Sequenz in Gegenwart von Liposomen

Anschließend wurde der Frage nachgegangen, ob die Lipid-Interaktion der Integrinpeptide mit deren Konformationswechsel einherging, wie es für zahlreiche lipidbindende Proteine und Peptide beschrieben ist (4.2). Für diesen Zweck wurden die Peptide α 1-cyto, α 1-scrambled, KIGFFKR und PLKKKMEK CD-spektroskopisch in Gegenwart von SUVs der Sorte PC:PS (50:50), 2% PI(4,5)P₂ oder 2% PI(3,4,5)P₃ (Tabelle 2.9) vermessen. Das Auftreten von lipidbedingten Störeffekten war trotz des kleinen SUV-Durchmessers bei Wellenlängen < 200 nm unvermeidbar und äußerte sich in einem erhöhten Rauschen der CD-Signale (Abb. 3.14) [Backlund *et al.* 1994, Magzoub *et al.* 2002]. Um den Einfluss der verschiedenen SUVs auf die Konformation eines Peptids vergleichend zu untersuchen, wurden jeweils 0,1 mg/ml Peptid mit 3 mM SUVs vermessen. Somit betrug das Lipid-Peptid-Verhältnis 57:1 für die Peptide α 1-cyto und α 1-scrambled, 30:1 für das PLKKKMEK-Peptid und 27:1 für das KIGFFKR-Peptid.

Die Gegenwart von Liposomen bewirkte die Abflachung der CD-Kurven des α 1-cyto-Peptids und die Verschiebung des negativen Minimums in Bereiche größerer Wellenlänge und höherer Elliptizität (Abb. 3.14 A). Am stärksten war dieser Effekt bei Anwesenheit der SUVs mit PI(4,5)P₂ oder PI(3,4,5)P₃ ausgeprägt, wo das Minimum bei 208 nm lag. Zusätzlich befand sich bei 232 nm in allen SUV-bedingten Peptidspektren eine schwache Schulter. Die stärksten Veränderungen der spektralen Eigenschaften des α 1-cyto-Peptids riefen insgesamt die PI(3,4,5)P₃-haltigen SUVs hervor. Die in Anwesenheit der drei Sorten von SUVs veränderten CD-Spektren des Peptids deckten sich jedoch mit keinem der Referenzspektren der kanonischen Sekundärstrukturen α -Helix oder β -Faltblatt (Abb. 3.3 E) vollständig.

Verglichen mit dem CD-Spektrum des reinen α 1-scrambled-Peptids in Puffer verursachten insbesondere die PI(4,5)P₂- oder PI(3,4,5)P₃-enthaltenden SUVs starke spektrale Veränderungen des Peptids (Abb. 3.14 B). So besaßen diese Spektren ein breites negatives Minimum zwischen 208/209 nm und 220 nm und wiesen eine Vorzeichenumkehr bei 206/207 nm auf. Zudem verschob sich das negative Minimum von zuvor 200 nm erneut in Bereiche höherer Wellenlänge und größerer Elliptizitäten. Das PI(3,4,5)P₃-induzierte Peptidspektrum besaß desweiteren ein positives Maximum bei 200 nm. Damit lässt sich vor allem die durch PI(3,4,5)P₃-haltige SUVs hervorgerufene Konformationsänderung des α 1-scrambled-Peptids mit einigen Kennzeichen von β -Faltblattstruktur in Einklang bringen (Abb. 3.3 E).

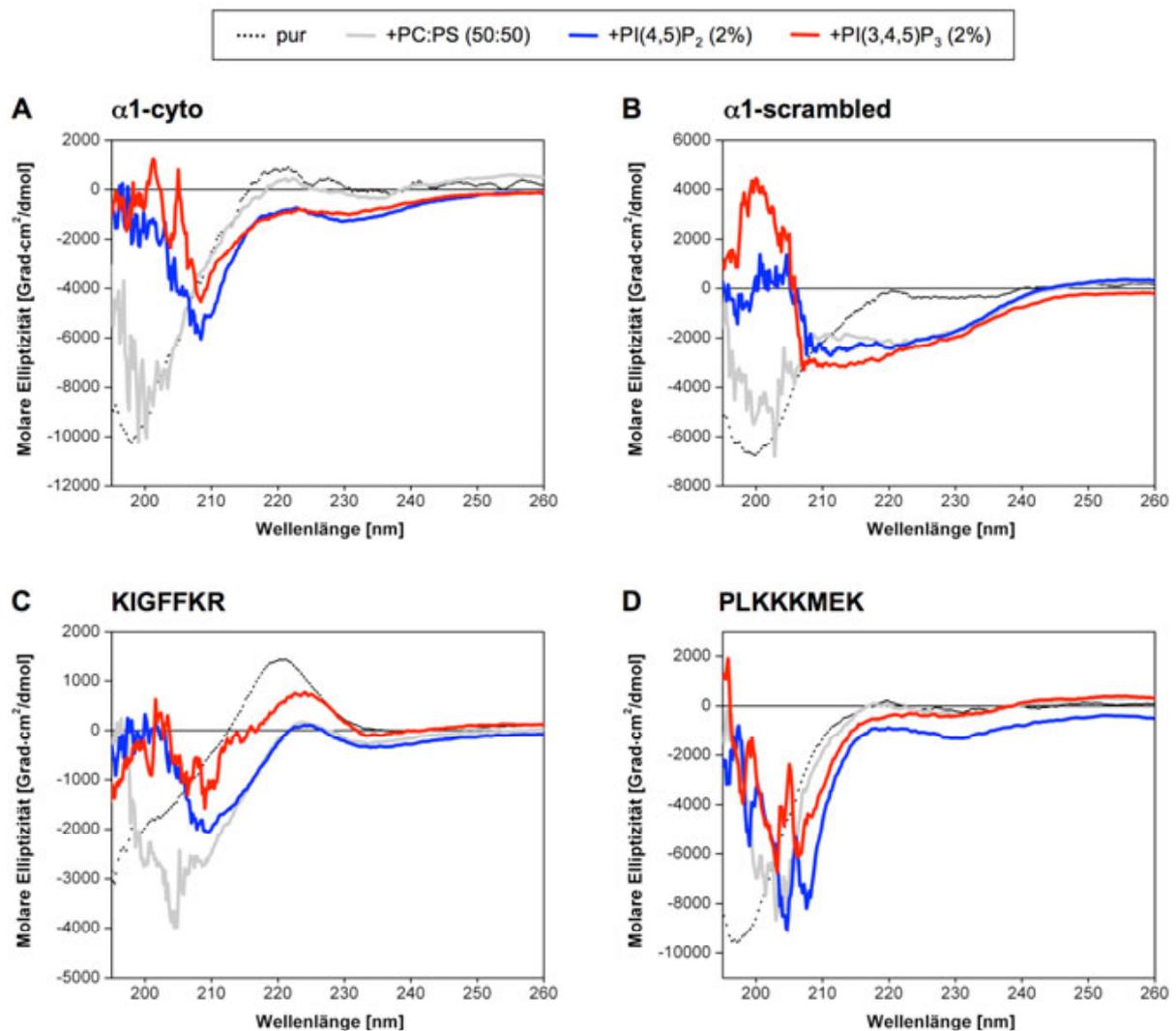


Abb. 3.14: CD-Spektroskopie der Integrinpeptide $\alpha 1$ -cyto (A), $\alpha 1$ -scrambled (B), KIGFFKR (C) und PLKKKMEK (D) in wässriger Lösung („pur“) und in Anwesenheit von 3 mM SUVs PC:PS (50:50), 2% PI(4,5)P₂ oder 2% PI(3,4,5)P₃. Die primären CD-Signale wurden mithilfe des ACDP-Programms um den Hintergrund reduziert und prozessiert. Als Hintergrund dienten Messungen von Puffer- bzw. 3 mM SUV-Lösung ohne Peptid. Referenzspektren sind in Abb. 3.3 E und F aufgeführt.

Das deutlich positive CD-Maximum des KIGFFKR-Peptids in Puffer verschob sich bei der Zugabe von Liposomen zum einen von 220 nm zu 224 nm und verlor zum anderen an Intensität (Abb. 3.14 C). Mit dem durch PC:PS-haltige SUVs hervorgerufenen Minimum bei 204 nm ähnelte dieses Spektrum der Zufallsknäuelkonformation (Abb. 3.3 E). Liposomen, die PI(3,4,5)P₃ oder PI(4,5)P₂ enthielten, induzierten ein schwaches bzw. starkes negatives Minimum um 208 nm. PI(4,5)P₂-haltige SUVs erzeugten darüber hinaus ein CD-Spektrum, das eine Vorzeichenumkehr bei 205 nm und ein positives Maximum bei 202 nm aufwies. Damit waren in dem PI(4,5)P₂-induzierten Spektrum des KIGFFKR-Peptids einige Kennzeichen von α -Helix- als auch von β -Faltblattstruktur zu beobachten.

Verglichen mit den anderen Peptiden bewirkte die Anwesenheit von Liposomen in dem PLKKKMEK-Peptid die geringsten spektralen Veränderungen (Abb. 3.14 D). Die Spektren des Peptids in Anwesenheit von SUVs mit PC:PS oder PI(3,4,5)P₃ ähnelten einander und besaßen beide ein gegenüber dem Spektrum der reinen Peptidlösung um 10 nm verschobenes Minimum. Zwar lag dieses in dem PI(4,5)P₂-induzierten Spektrum bei 208 nm, doch rief keine der drei SUV-Sorten eine definierte Sekundärstruktur hervor (Abb. 3.3 E).

Aufgrund des hohen Fehlers bei der rechnerischen Bestimmung der Sekundärstruktur anhand eines SUV-induzierten CD-Spektrums konnten keine sicheren Werte für die jeweilige Peptidkonformation ermittelt werden (4.1 und 4.2).

Somit wurden durch die Assoziation der Integrinpeptide mit phospholipidhaltigen Liposomen v.a. die CD-Spektren der Peptide α 1-cyto, α 1-scrambled und KIGFFKR verändert. Insbesondere verursachten PI(3,4,5)P₃- bzw. PI(4,5)P₂-haltige Liposomen Konformationsänderungen in dem α 1-scrambled- und dem KIGFFKR-Peptid. Diese können jedoch nicht eindeutig als Einnahme einer β -Faltblatt- oder einer α -Helixstruktur beschrieben werden.

3.3 Charakterisierung der Interaktion zwischen α 1 β 1-Integrin und PLC γ 1

3.3.1 Identifizierung der Integrinbindungsmodule im PLC γ 1-Molekül

Um die Integrinbindungsstellen innerhalb des PLC γ 1-Moleküls zu lokalisieren, wurde ein GST-Pulldown-Versuch durchgeführt, bei dem die rekombinanten, GST-fusionierten PLC γ 1-Domänen PH, SH3¹³, N-SH2, C-SH2 oder N+C-SH2 mit Lysat aus CHO- α 1/f.l. Zellen inkubiert wurden. Die PH-Domäne der PLC γ 1 wurde hierbei sowohl von der α 1- als auch von der β 1-Integrinuntereinheit gebunden (Abb. 3.15 B). Die C-SH2-Domäne wurde einzeln und als Teil der N+C-SH2-Tandemdomäne nur von der β 1-Kette erkannt. Keine Bindung des α 1 β 1-Integrins erfolgte an die SH3- und die N-SH2-Domäne sowie an unfusioniertes GST. Weiterhin wurde untersucht, ob ebenfalls die fokale Adhäsionskinase (FAK) an die GST-Fusionsproteine band, da FAK sowohl mit der β 1-Integrinuntereinheit als auch mit PLC γ 1 assoziieren kann [Zhang *et al.* 1999, Chen *et al.* 2000]. Die Pulldown-Experimente zeigten, dass FAK stark mit GST-N+C-SH2 und GST-C-SH2, hingegen schwach mit GST-PH interagierte.

¹³ Die für die SH3-Domäne der PLC γ 1 kodierende Sequenz lag in dreifacher Ausführung (3x) in dem pGEX-Vektor vor.

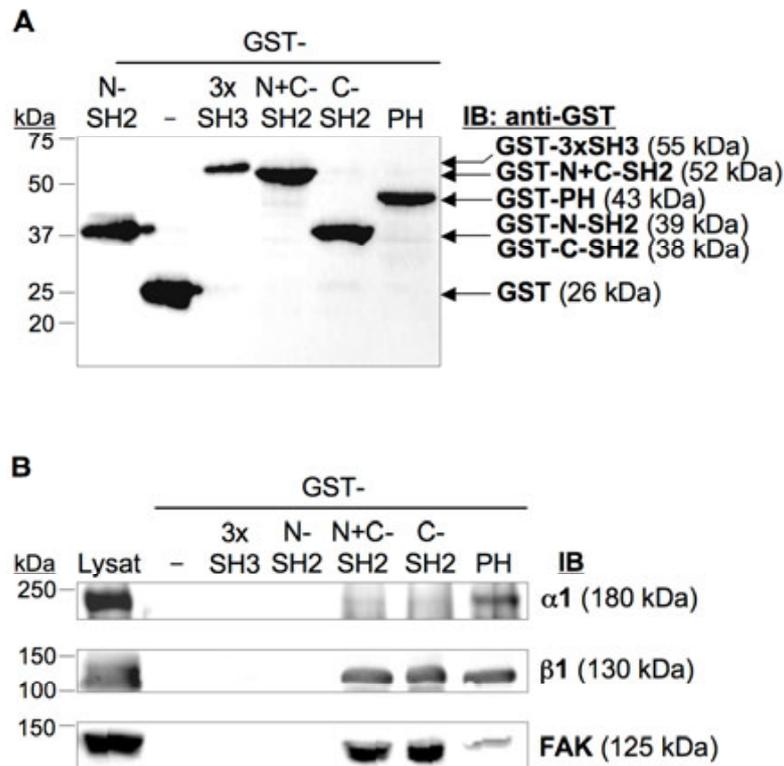


Abb. 3.15: GST-Pulldown zur Identifizierung der Integrinbindungsmotive innerhalb der PLC γ 1. (A) Expressionskontrolle der GST-Fusionsproteine in den verwendeten Bakterienlysaten mithilfe des peroxidasegekoppelten anti-GST-Antikörpers im Immunoblot (IB). (B) Die heterolog in *E.coli* exprimierten Fusionsproteine GST, GST-SH3 (3x SH3), GST-N-SH2, GST-N+C-SH2, GST-C-SH2 und GST-PH wurden nicht-kovalent an Glutathion-Sepharose gebunden und in Puffer inkl. 50 mM NaCl mit Lysat von CHO- α 1/f.l. Zellen inkubiert. Der Nachweis der α 1- und der β 1-Integrinkette sowie der fokalen Adhäsionskinase (FAK) erfolgte immunologisch mittels Western Blot (IB: Immunoblot). Die verwendeten Antikörper waren anti- α 1 As2K5, anti- β 1 As4K4 und anti-FAK.

Um Informationen über die Rolle von ionischen Wechselwirkungen in der Interaktion zwischen GST-PH, -C-SH2 bzw. -N+C-SH2 und dem α 1 β 1-Integrin zu erlangen, wurde die Ionenstärke des Solubilisierungspuffers in Form der NaCl-Konzentration erhöht (Abb. 3.16). Die Assoziation zwischen GST-PH und der β 1-Kette fand bei allen Konzentrationen von NaCl statt, am stärksten jedoch bei der von 150 mM (Abb. 3.16 A). Die β 1-UE band bei 50 mM und 150 mM NaCl stark und bei 250 mM NaCl schwach an GST-C-SH2. Die Assoziation der β 1-Kette mit der Tandem-N+C-SH2-Domäne hingegen erfolgte nur bei 50 mM und 150 mM NaCl. Im Gegensatz zu der β 1-UE wurde die Interaktion der α 1-Kette mit GST-PH stärker durch eine erhöhte Ionenstärke beeinflusst, da deren Bindung mit steigender NaCl-Konzentration von 50 mM bis 250 mM sukzessive abnahm (Abb. 3.16 B). Die Assoziation der α 1-UE mit GST-PH und die der β 1-Kette mit GST-PH, -C-SH2 und -N+C-SH2 erfolgten zudem bei den NaCl-Konzentrationen von 150 mM und 250 mM unabhängig von FAK, da FAK hier nicht mit den besagten PLC γ 1-Domänen assoziierte.

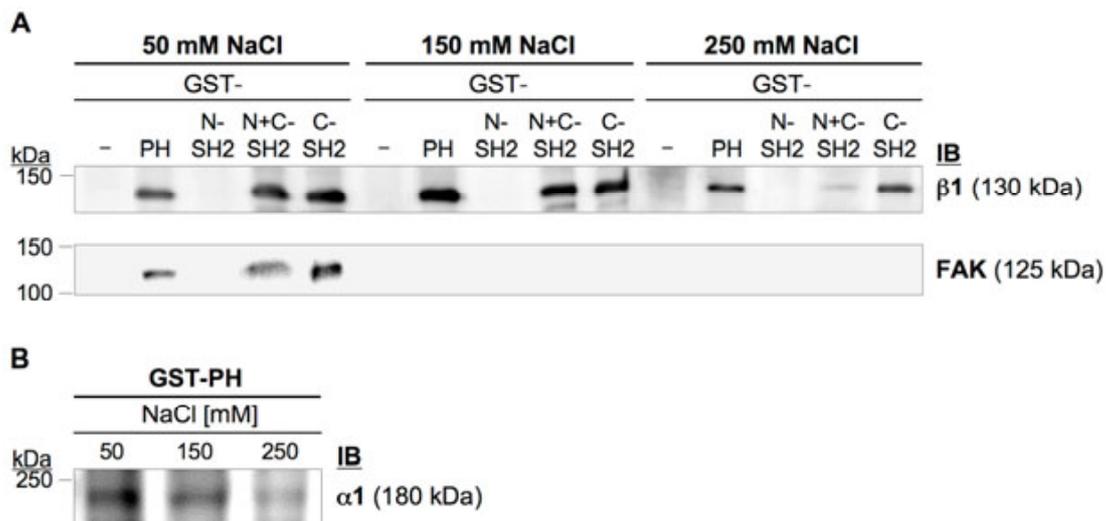


Abb. 3.16: Abhängigkeit des GST-Pulldown-Experiments von der Ionenstärke. Die heterolog in *E.coli* exprimierte Fusionsproteine GST, GST-PH, GST-N-SH2, GST-N+C-SH2 und GST-C-SH2 wurden nicht-kovalent an Glutathion-Sepharose gebunden und mit CHO- $\alpha 1/f.1.$ Zellysat in Gegenwart von Puffer inkl. 50 mM, 150 mM oder 250 mM NaCl inkubiert. Der Nachweis der $\beta 1$ -Integrinkette und der fokalen Adhäsionskinase (FAK) (**A**) sowie der $\alpha 1$ -Integrinuntereinheit (**B**) erfolgte immunologisch mittels Western Blot (IB: Immunoblot). Verwendet wurden die Antikörper anti- $\alpha 1$ As2K5, anti- $\beta 1$ As4K4 und anti-FAK.

PH-Domänen existieren in rund 200 verschiedenen zellulären Proteinen [Balla 2005]. Um zu untersuchen, ob das $\alpha 1\beta 1$ -Integrin selektiv die PH-Domäne der PLC $\gamma 1$ erkannte, wurden zusätzlich die GST-fusionierten PH-Domänen der Proteinkinase Akt und der PLC-Isoformen $\beta 1$ und $\delta 1$ für einen GST-Pulldown-Test eingesetzt (Abb. 3.17).

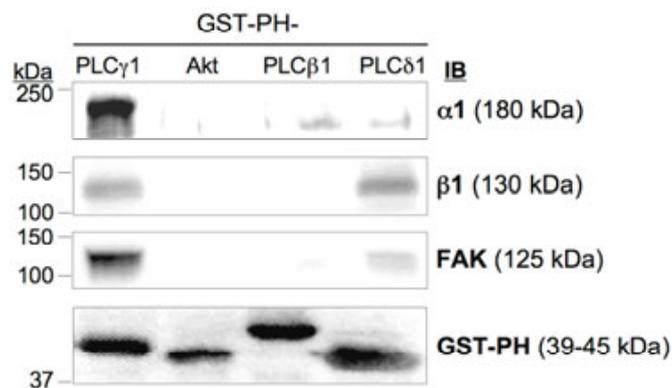


Abb. 3.17: Abhängigkeit des GST-Pulldown-Experiments von der Art der PH-Domäne. Die heterolog in *E.coli* exprimierte GST-Fusionsproteine der PH-Domänen von PLC $\gamma 1$, Akt, PLC $\beta 1$ und PLC $\delta 1$ wurden an Glutathion-Sepharose gekoppelt und in Puffer inkl. 50 mM NaCl mit CHO- $\alpha 1/f.1.$ Zellysat inkubiert. Der Nachweis der $\alpha 1$ - und der $\beta 1$ -Integrinkette sowie der fokalen Adhäsionskinase (FAK) erfolgte immunologisch mittels Western Blot (IB: Immunoblot). Verwendet wurden die Antikörper As2K5 anti- $\alpha 1$, As4K4 anti- $\beta 1$ und anti-FAK.

Von den angebotenen PH-Domänen band die $\alpha 1$ -Kette einzig an die der PLC $\gamma 1$. Die $\beta 1$ -UE und FAK hingegen assoziierten mit den GST-PH-Domänen von PLC $\gamma 1$ und PLC $\delta 1$.

3.3.2 Analyse der Interaktion zwischen einzelnen PLC γ 1-Domänen mit Integrinpeptiden in Lösung

3.3.2.1 Expression und Aufreinigung von Domänen der PLC γ 1 als GST-markierte Fusionsproteine

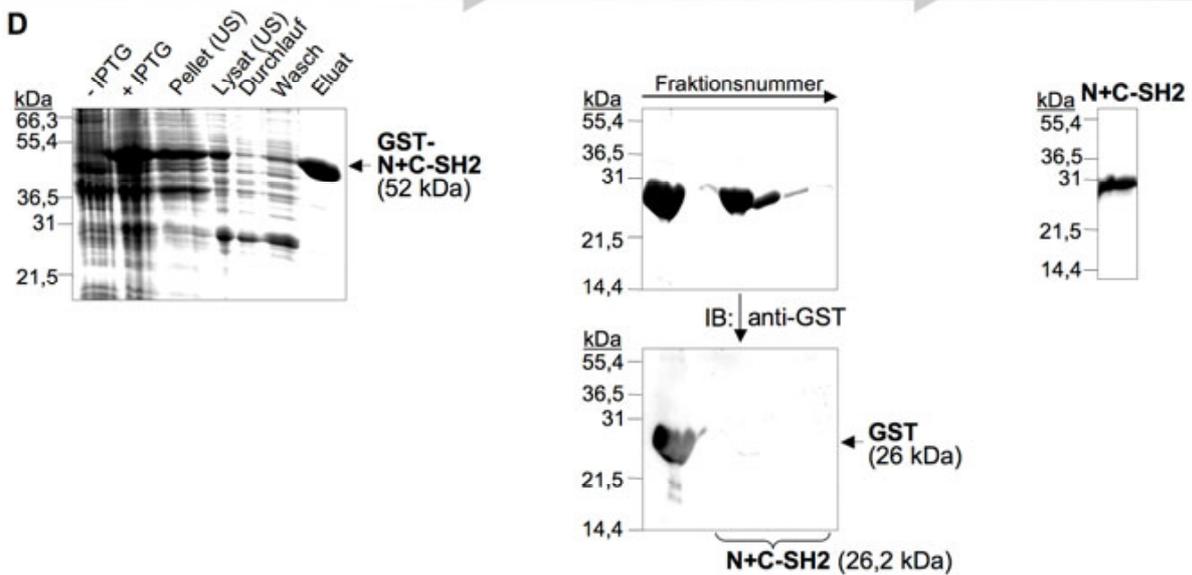
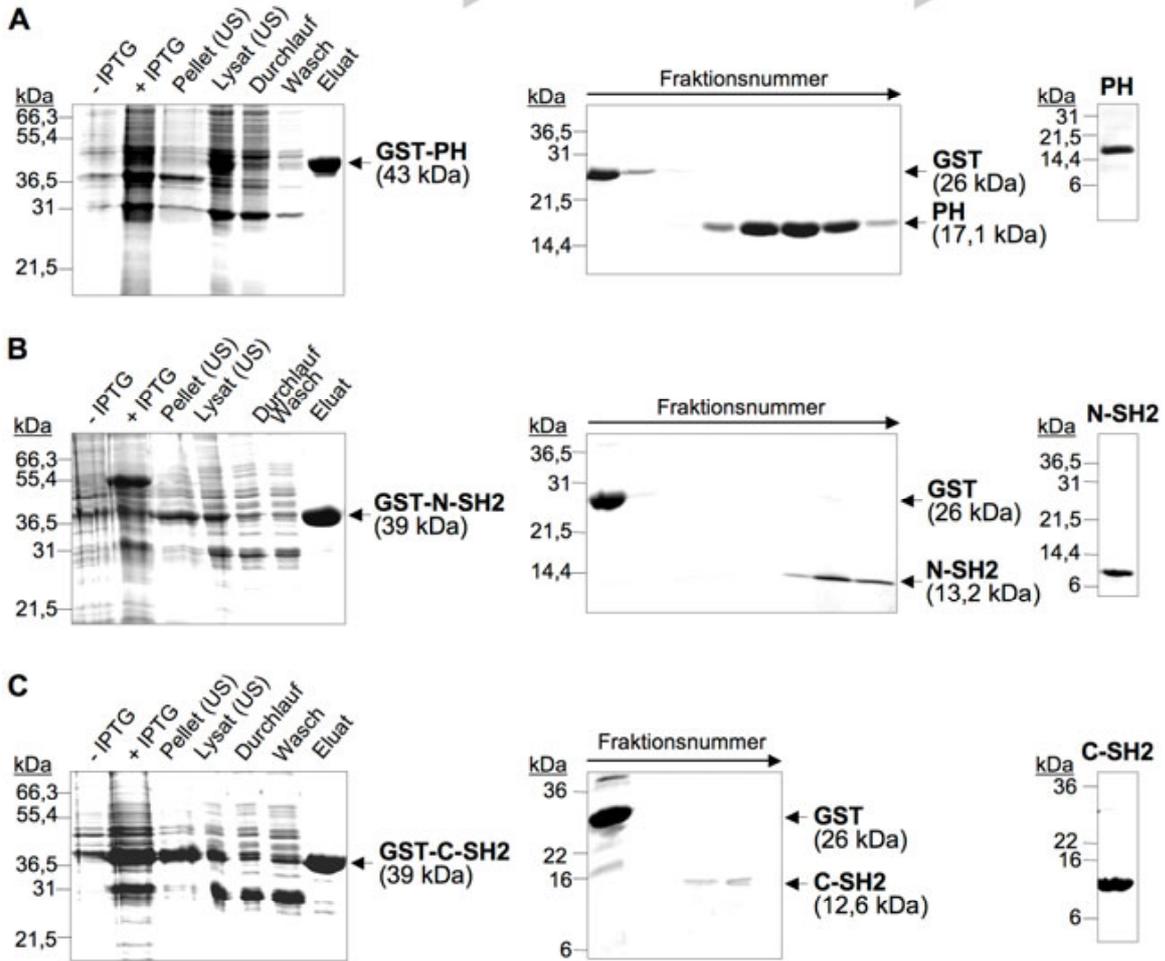
Um die Interaktion zwischen den cytoplasmatischen Sequenzen des α 1 β 1-Integrins mit der PH- und der C-SH2-Domäne der PLC γ 1 zu bestätigen, wurden ^1H - ^{15}N -NMR-spektroskopische Messungen durchgeführt. Hierfür wurden zunächst die Domänen PH, C-SH2, N+C-SH2 und N-SH2 als ^{15}N -markierte GST-Fusionsproteine gemäß 2.2.5.1 in *E.coli* rekombinant exprimiert und aufgereinigt (Abb. 3.18). Alle Proteine wurden in reiner Lösung, jedoch mit unterschiedlicher Ausbeute und Stabilität erhalten. Bezogen auf einen Liter Bakterienexpressionskultur wurden durchschnittlich 1,1 mg PH-, 2,6 mg N-SH2-, 0,7 mg C-SH2- und 2,4 mg N+C-SH2-Protein erhalten. Das PH- und das C-SH2-Protein erwiesen sich als äußerst instabil, insbesondere im Verlauf der NMR-Messungen, die bei 303 K durchgeführt wurden.

3.3.2.2 ^1H - ^{15}N -HSQC-NMR-Spektroskopie

Von den zuvor aufgereinigten ^{15}N -markierten PLC γ 1-Domänen wurden vor und nach Zugabe von 1-3 mM Integrinpeptid α 1-cyto, KIGFFKR, PLKKKMEK, β 1-2, β 1-3 oder β 1-4 ^1H - ^{15}N -HSQC-NMR-Spektren aufgenommen (2.2.3.2 und 3.1.1). Die Spektren einer Domäne der PLC γ 1 ohne und mit Peptid wurden prozessiert, übereinander gelegt und auf Resonanzverschiebungen hin untersucht. Diese waren in dem ^1H - ^{15}N -HSQC-Überlagerungsspektrum der PH-Domäne ohne und mit α 1-cyto-Peptid nicht zu erkennen (Abb. 3.19). Ebenso wurden keine Veränderungen der Resonanzen der PH-Domäne detektiert, wenn diese mit dem Peptid KIGFFKR oder PLKKKMEK oder mit der Kombination aus α 1-cyto- und β 1-4-Peptid vermessen wurde (nicht gezeigt¹⁴).

Als Negativkontrolle wurden die N-SH2- und die Tandem-N+C-SH2-Domäne der PLC γ 1 gleichfalls auf die Interaktion mit dem α 1-cyto-Peptid hin untersucht. In den zugehörigen Überlagerungsspektren traten erwartungsgemäß keine Verschiebungen von Peaks auf (nicht gezeigt).

¹⁴ Die in diesem Abschnitt nicht gezeigten NMR-Spektren sind im Anhang aufgeführt.



◀ **Abb. 3.18: Heterologe Expression und Aufreinigung der ^{15}N -markierten Domänen PH (A), N-SH2 (B), C-SH2 (C) und N+C-SH2 (D) der PLC γ 1.** Die Proteinexpression wurde durch IPTG induziert und erfolgte wie unter 2.2.5.1 beschrieben. Die sedimentierten Bakterien wurden in Lyse-puffer resuspendiert und mittels Ultraschall (US) aufgeschlossen. Lösliches Fusionsprotein wurde mithilfe der GSTrap-Säule und des Profinia-Proteinreinigungssystems (Bio-Rad) affinitätschromatographisch immobilisiert, gewaschen und eluiert. Die GST-Markierung wurde mit Thrombin abgespalten und durch Größenausschlusschromatographie von der PH-, N-SH2- oder C-SH2-Domäne entfernt (A-C). GST und die N+C-SH2-Domäne wurden mittels Kationenaustauschchromatographie voneinander getrennt. Das N+C-SH2-Protein band hierbei an die MonoS-Säule und wurde nach dem Waschschrift mithilfe eines Gradienten von 0-1 M NaCl eluiert (D). Gezeigt ist, wenn nicht anders angegeben, die CBB-Färbung von (Tricin-)SDS-Gelen. IB: Immunoblot

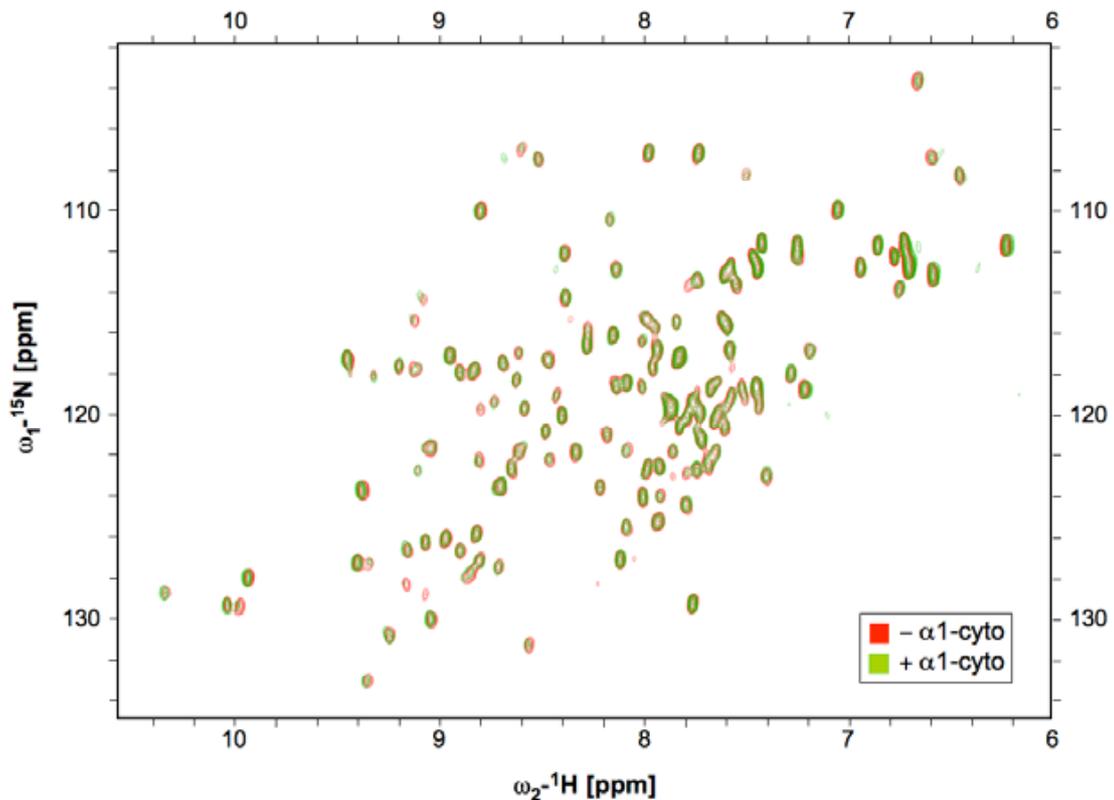


Abb. 3.19: ^1H - ^{15}N -HSQC-Überlagerungsspektrum der PH-Domäne der PLC γ 1 ohne und mit 1 mM α 1-cyto-Peptid.

Die ^{15}N -markierte PH-Domäne wurde ebenfalls in Gegenwart der Peptide β 1-3, β 1-2 und β 1-4 (Tabelle 2.2) NMR-spektroskopisch vermessen. Das dem membranproximalen Teil der β 1-Kette entsprechende β 1-1-Peptid konnte für die NMR-Experimente nicht eingesetzt werden, da es nur mithilfe organischer Lösemittel gelöst werden konnte, die nach Zugabe zu den Proteinlösungen diese jedoch denaturierten. Die Überlagerung der ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren der PH-Domäne ohne und mit β 1-3-Peptid ergab keine Veränderungen der Resonanzen (nicht gezeigt). Um die Frage zu klären, ob für eine Assoziation mit der PH-Domäne neben dem β 1-2- auch das β 1-3-Peptid benötigt wurde, wurde die PH-Domäne in Gegenwart dieser

zwei Peptide erneut vermessen. Erneut traten keine wesentlichen Verschiebungen der Peaks auf (nicht gezeigt). Auch die Vermessung der PH-Domäne in zusätzlicher Anwesenheit des β 1-4-Peptids zeigte keine Interaktionen zwischen beiden Molekülen (nicht gezeigt). Um zu testen, ob Bereiche der cytoplasmatischen Sequenz sowohl der α 1- als auch der β 1-UE gleichzeitig für eine Assoziation mit der PH-Domäne vorliegen mussten, wurden in einer Art *Screen* die Peptide α 1-cyto, β 1-4, β 1-2 und β 1-3 sukzessiv zu der Lösung des PH-Proteins gegeben und diese nach jeder Peptidzugabe ^1H - ^{15}N -spektroskopisch vermessen. Dabei wurden jedoch keine wesentlichen Resonanzveränderungen detektiert (nicht gezeigt).

Von der als Bindungsmodul für die β 1-Kette identifizierten C-SH2-Domäne der PLC γ 1 (3.3.1), wurden ebenfalls ^1H - ^{15}N -HSQC-NMR-Spektren mit zugesetztem β 1-3-Peptid aufgenommen. Die Überlagerung dieses Spektrums mit dem der reinen C-SH2-Proteinlösung erbrachte ebenfalls keine Abweichungen der Resonanzen und somit keinen Nachweis einer Assoziation (nicht gezeigt). Aufgrund der geringen Ausbeute und Stabilität der aufgereinigten C-SH2-Domäne (3.3.2.1) konnten keine weiteren Messungen durchgeführt werden. Da die N+C-SH2-Domäne in höherer Ausbeute und Stabilität aufgereinigt werden konnte, wurde diese für die NMR-Messungen mit β -Integrinpeptiden eingesetzt. Zuvor wurden die ^1H - ^{15}N -HSQC-NMR-Spektren von reiner N-SH2-, C-SH2- und N+C-SH2-Domäne miteinander abgeglichen (Abb. 3.20). Dabei traten deutliche Abweichungen der Resonanzen der Tandem-SH2-Domäne zu denen der N- und der C-SH2-Domäne auf, was die individuelle Faltung der N+C-Tandem-Domäne zeigt.

Die Überlagerung des Spektrums der N+C-SH2-Proteinlösung im reinen Zustand mit dem, das nach Zugabe des β 1-2-Peptids gemessen wurde, erbrachte keine veränderten Resonanzen (nicht gezeigt). Gleiches galt für den Einsatz des tyrosinphosphorylierten pY β 1-2-Peptids (Tabelle 2.2, Spektrum nicht gezeigt). Nach der Zugabe von β 1-3-Peptid zu der N+C-SH2-Lösung, die bereits β 1-2-Peptid enthielt, traten hingegen leichte Änderungen der NMR-Signale des Proteins auf (Abb. 3.21), was auf eine Interaktion zwischen der N+C-SH2-Domäne und dem zentralen Abschnitt innerhalb der β 1-cytoplasmatischen Sequenz (Tabelle 2.2) hinweist.

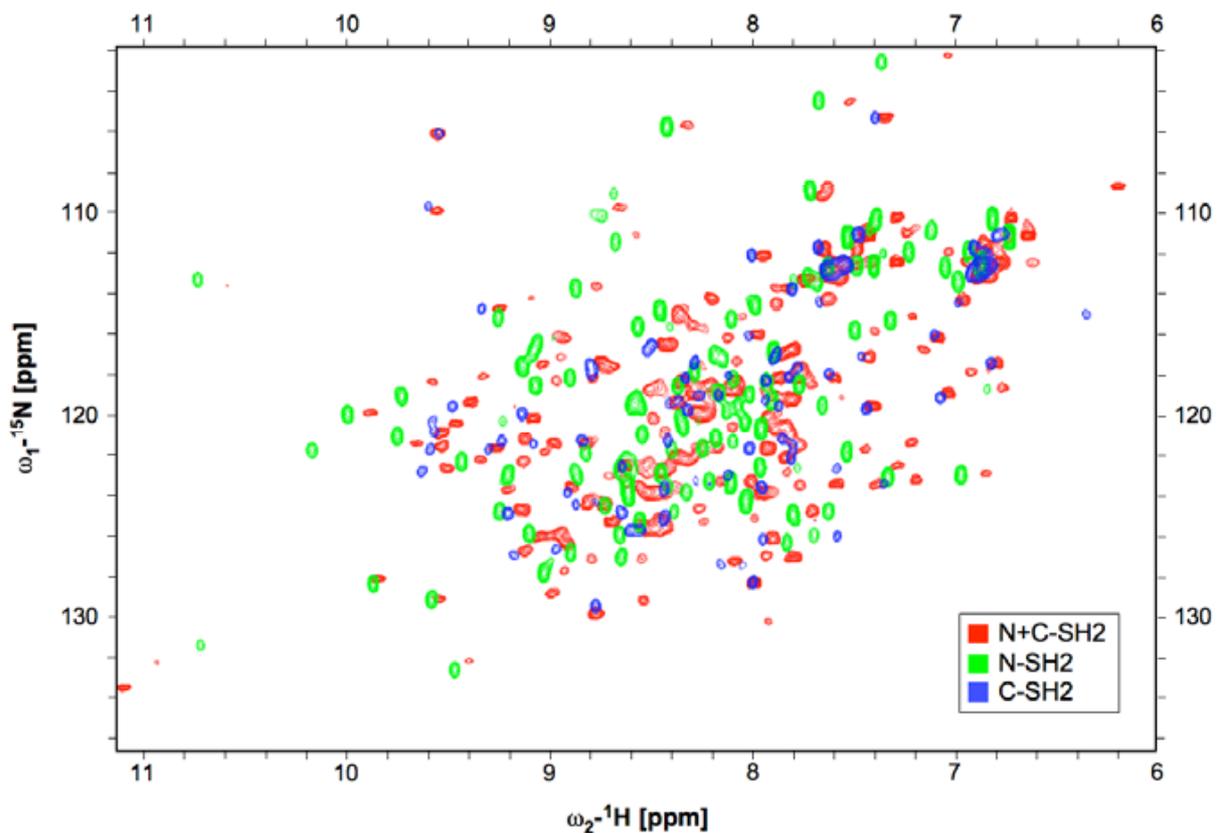


Abb. 3.20: Überlagerung des ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrums der N+C-SH2-Domäne der PLC γ 1 mit dem der N- und dem der C-SH2-Domäne.

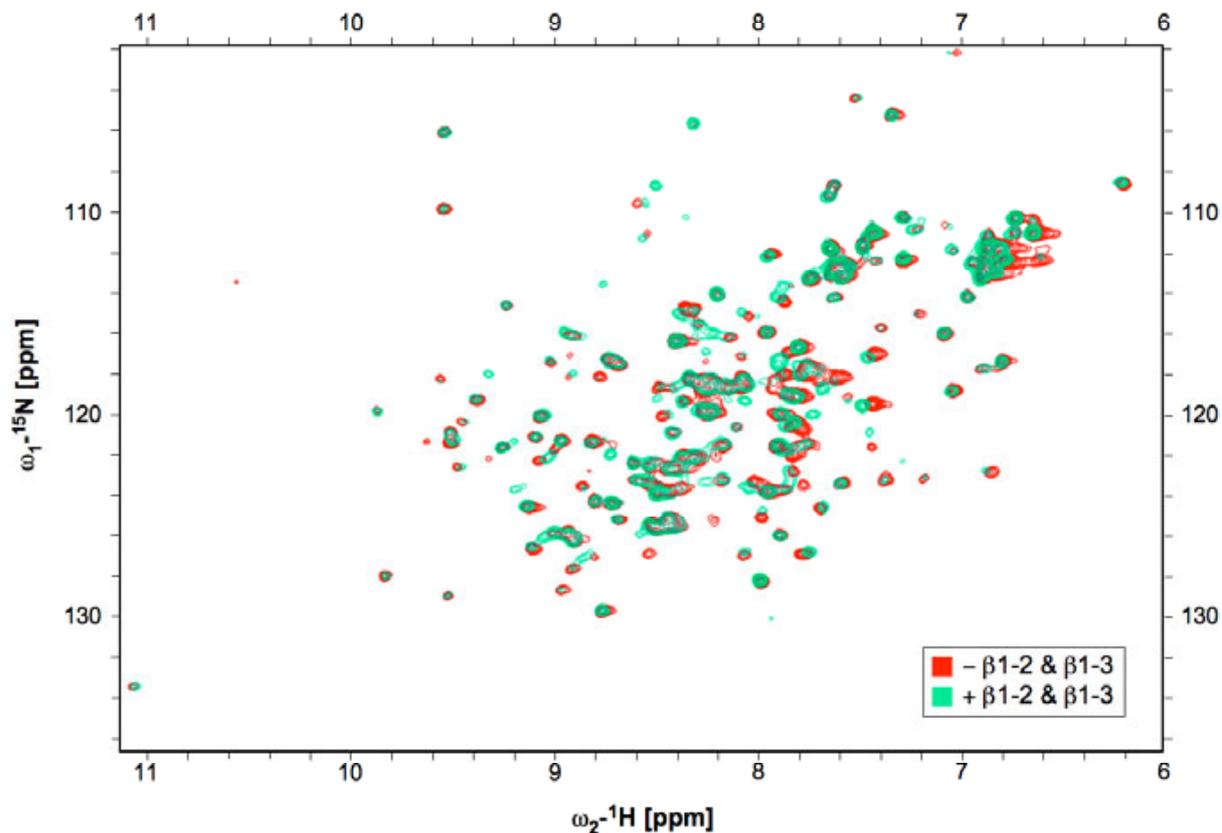


Abb. 3.21: Überlagerung des ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrums der reinen N+C-SH2-Domäne der PLC γ 1 mit dem nach Zugabe der Peptide β 1-2 und β 1-3 (je 1 mM).

Die Ergebnisse der durchgeführten NMR-Messungen sind zur Übersicht in Tabelle 3.1 zusammengefasst. Da mithilfe der NMR-Studien die durch die *Pulldown*-Experimente gefundenen Interaktionen zwischen der PH-Domäne der PLC γ 1 und dem α 1 β 1-Integrin in wässriger Lösung nicht wie erhofft bestätigt werden konnten, wurde im Folgenden der Frage nachgegangen, ob für die Assoziation zwischen PLC γ 1 und dem α 1 β 1-Integrin eine Lipidumgebung benötigt wurde.

Tabelle 3.1: Übersicht über die erfolgten ^1H - ^{15}N -HSQC-NMR-Messungen und die erhaltenen Verschiebungen der Resonanzen.

PLC γ 1-Domäne	Integrinpeptide/e	veränderte Resonanzen?
PH	α 1-cyto	nein
	KIGFFKR	nein
	PLKKKMEK	nein
	β 1-3	nein
	β 1-3 + β 1-2	nein
	β 1-4 + β 1-2 + β 1-3	nein
	α 1-cyto + β 1-4	nein
	α 1-cyto + β 1-4 + β 1-2 + β 1-3	nein
N-SH2	α 1-cyto	nein
	α 1-cyto + β 1-4	nein
	α 1-cyto + β 1-4 + β 1-2	nein
	α 1-cyto + β 1-4 + β 1-2 + β 1-3	nein
C-SH2	β 1-3	nein
N+C-SH2	α 1-cyto	nein
	β 1-2	nein
	pY β 1-2	nein
	α 1-cyto + β 1-4	nein
	β 1-2 + β 1-3	ja

3.3.3 Einfluss von Lipiden auf die Interaktion zwischen α 1 β 1-Integrin und PLC γ 1

Bei der PLC γ 1 handelt es sich um ein lipidbindendes und -modifizierendes Enzym, das darüber hinaus auch lipidvermittelte Protein-Protein-Interaktionen eingeht (4.3). Da zudem die α 1-cytoplasmatische Sequenz an PI(4,5)P $_2$ und PI(3,4,5)P $_3$ bindet (3.2), sollte mittels Co-Immunopräzipitation (Co-IP, 2.2.5.18) der α 1-Integrinkette untersucht werden, ob Liposomen aus negativ-geladenen Phospholipiden (2.2.2.4) einen Einfluss auf die Interaktion zwischen PLC γ 1 und α 1 β 1-Integrin ausübten (Abb. 3.22). Liposomen, die PC:PS (50:50), 2% PI(4,5)P $_2$ oder 2% PI(3,4,5)P $_3$ enthielten, verstärkten die Assoziation zwischen PLC γ 1 und α 1 β 1-Integrin, im Gegensatz zu den schwach negativ-geladenen Liposomen aus PC:PS (85:15).

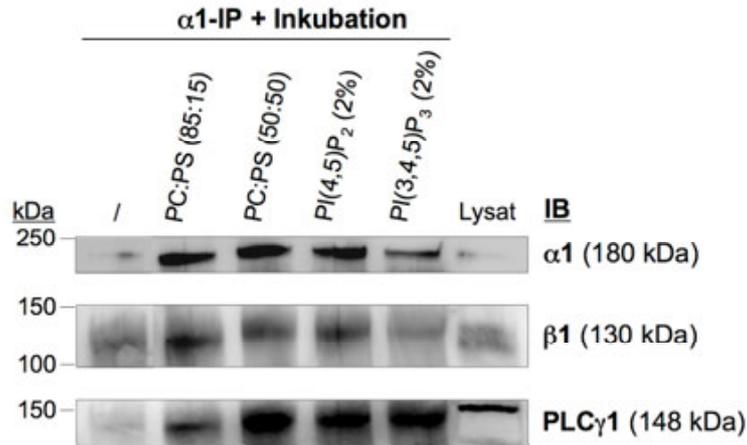


Abb. 3.22: Einfluss von LUVs auf die Interaktion zwischen PLC γ 1 und α 1 β 1-Integrin. Serumdepletierte CHO- α 1/f.l. Zellen wurden nach 45-minütiger Adhäsion auf KIV-beschichteten Platten in Solubilisierungspuffer inkl. 2% Triton X-100 und 50 mM NaCl abgeschabt. Das Solubilisat wurde mit 400 μ M LUVs PC:PS (50:50), PC:PS (85:15), 2% PI(4,5)P₂ oder 2% PI(3,4,5)P₃ für 30 Min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die α 1-Integrinkette aus dem Solubilisat mithilfe des monoklonalen, an Protein G-Sepharose gekoppelten 33.4-Antikörpers präzipitiert. Das Präzipitat wurde immunologisch mittels Western Blot auf die α 1-Kette, die β 1-Kette und PLC γ 1 hin untersucht. Verwendet wurden die Antikörper AS2K5 anti- α 1, AS4K4 anti- β 1 und anti-PLC γ 1. IP: Immunopräzipitation, IB: Immunoblot

3.3.3.1 Einfluss von Lipiden auf die Interaktion der α 1-cytoplasmatischen Sequenz mit der PH-Domäne der PLC γ 1

Sowohl die PLC γ 1-PH-Domäne als auch die α 1-cytoplasmatische Sequenz binden an PI(3,4,5)P₃ (1.2.5.1 und 3.2). Um die Bedeutung der Lipidassoziation der PH-Domäne der PLC γ 1 für deren Interaktion mit α 1 β 1-Integrin zu ermitteln, wurden neben der Wildtyp-PH-Domäne auch die zwei PH-Mutanten PH 3/4 und PH 6/7 in einem GST-Pulldown-Experiment eingesetzt. In diesen PH-Konstrukten ist die Schleife zwischen den β -Strängen 3 und 4 bzw. 6 und 7 durch die jeweils entsprechende Sequenz aus der PH-Domäne der GTPase Dynamin ersetzt, was im Fall der PH 3/4-Mutante die Membranbindung verhindert [Falasca *et al.* 1998]. Verglichen mit der Wildtyp-PH-Domäne assoziierte die α 1-UE schwächer mit dem PH 6/7-Konstrukt und am schwächsten mit der PH 3/4-Mutante (Abb. 3.23). Die Bindung der β 1-Kette an die drei PH-Konstrukte war mit der gleichen Tendenz ausgebildet. FAK band ebenfalls schwach an die PH 3/4-Mutante; die Assoziation mit dem PH 6/7-Konstrukt war jedoch gegenüber der Wildtyp-PH-Domäne unverändert. Dies zeigt, dass die β 3- β 4-Schleife der PH-Domäne der PLC γ 1 und damit deren Lipidassoziation für die Interaktion der PLC γ 1 mit α 1 β 1-Integrin und FAK benötigt wurde. Die β 6- β 7-Schleife der PH-Domäne der PLC γ 1 hingegen spielte nur für die Assoziation der PLC γ 1 mit α 1 β 1-Integrin eine Rolle.

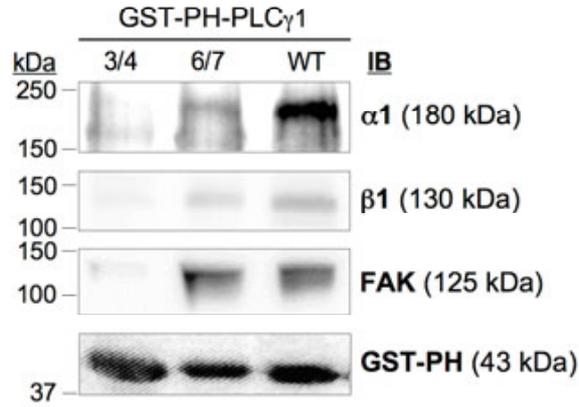


Abb. 3.23: Einfluss der Lipidbindung der PH-Domäne von PLC γ 1 auf deren Assoziation mit α 1 β 1-Integrin im GST-Pulldown-Experiment. Das in *E.coli* exprimierte GST-Fusionsprotein der Wildtyp-PH-Domäne (WT) oder das des mutierten PH 3/4- oder PH 6/7-Konstrukts wurde an Glutathion-Sepharose gebunden und in Puffer inkl. 50 mM NaCl mit CHO- α 1/f.l. Zellysats inkubiert. Der Nachweis der Integrinuntereinheiten sowie der fokalen Adhäsionskinase (FAK) erfolgte immunologisch mittels Western Blot (IB). Die verwendeten Antikörper waren As2K5 anti- α 1, As4K4 anti- β 1 und anti-FAK.

Um den Einfluss von PI(3,4,5)P₃ auf die Interaktion der PH-Domäne mit der α 1-Integrinkette zu untersuchen, wurden aufgereinigtes PH-Protein, α 1-cyto-Peptid und Liposomen im Rahmen eines liposomenvermittelten Protein-Protein-Interaktionstests (2.2.2.7) inkubiert und einer nativen Gelelektrophorese unterzogen (2.2.5.14). Verwendet wurden PC:PS (50:50)- oder 2% PI(3,4,5)P₃-haltige LUVs (2.2.2.4).

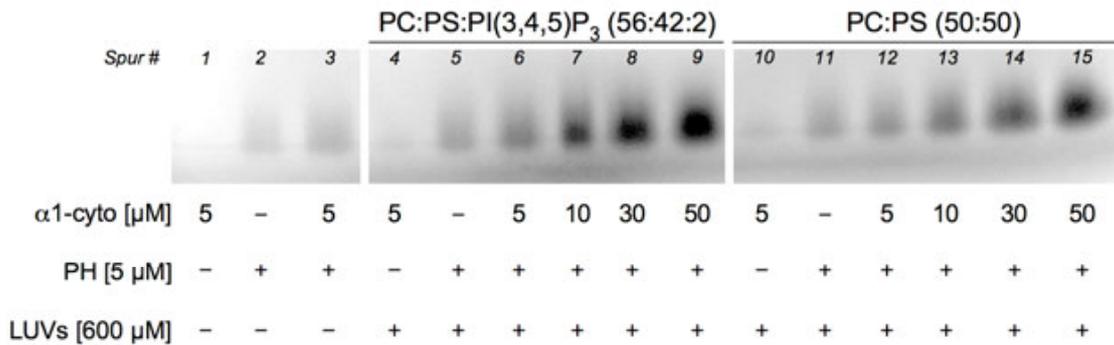


Abb. 3.24: Native Gelelektrophorese zur Untersuchung des Einfluss' von PI(3,4,5)P₃ auf die Assoziation der PH-Domäne der PLC γ 1 mit der α 1-cytoplasmatischen Sequenz. 5 μ M aufgereinigtes PH-Protein, 5-30 μ M α 1-cyto-Peptid und 600 μ M Liposomen (LUVs) aus PC:PS (50:50) oder 2% PI(3,4,5)P₃ wurden mit LUV-Puffer für 1 h bei RT inkubiert, einer *Blue Native*-Gelelektrophorese unterzogen und anschließend CBB-gefärbt.

Wie in Abb. 3.24 dargestellt ist, assoziierten die PH-Domäne und das α 1-cyto-Peptid in Lösung in geringem Ausmaß miteinander (vgl. Spur 3 und Spur 2). Die PH- α 1-cyto-Interaktion wurde durch PI(3,4,5)P₃-haltige Liposomen stimuliert. Durch die Erhöhung der Konzentration des α 1-cyto-Peptids von 5 μ M auf 10 μ M, 30 μ M und 50 μ M wurde bei konstanter Konzentration von PH-Domäne und LUVs der ternäre Komplex weiter verstärkt (Spur 7-

9). Die Anwesenheit der Liposomen aus PC:PS (50:50) anstelle der 2% PI(3,4,5)P₃-haltigen LUVs übte ebenfalls einen, obgleich schwächeren, Einfluss auf die Assoziation von α 1-cyto-Peptid und PH-Domäne aus (vgl. Spur 3, 6 und 12). Bei der Erhöhung der Konzentration des α 1-cyto-Peptids zeigten die Banden hier zudem geringere Intensität, als für PI(3,4,5)P₃-enthaltende Liposomen beschrieben wurde (vgl. Spur 6-9 mit Spur 12-15). Demzufolge übten Liposomen, die aus PC:PS (50:50) bestanden, generell einen fördernden Einfluss auf die Assoziation von PH-Domäne und α 1-cyto-Peptid aus. Enthielten die Liposomen zusätzlich 2% PI(3,4,5)P₃, war die Tendenz zur Assoziation gar noch höher.

3.3.4 Funktion der PLC γ 1 und einzelner PLC γ 1-Domänen in der α 1 β 1-Integrin-abhängigen Signaltransduktion

In früheren Studien war bereits die Rolle der PLC γ 1 in der α 1 β 1-abhängigen Zelladhäsion demonstriert worden [Vossmeyer *et al.* 2002]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob PLC γ 1 ebenfalls für die α 1 β 1-Integrin-vermittelte Zellmigration und Zellmorphologie von Bedeutung ist.

3.3.4.1 Einfluss von PLC γ 1-Domänen auf die α 1 β 1-Integrin-vermittelte Zellmorphologie

Um den Einfluss der verschiedenen GFP-markierten Domänen der PLC γ 1 auf die α 1 β 1-Integrin-abhängige Zellmorphologie zu untersuchen, wurden CHO-Zellen mit der entsprechenden Plasmid-DNA transient transfiziert (2.2.6.7) und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert (2.2.6.9). Die C-SH2- und die N+C-SH2-Domäne mussten hierfür zunächst in den pEGFP-Vektor kloniert werden (2.2.1.13). Die Expressionskontrolle der transient exprimierten GFP-Proteine ist in Abb. 3.25 dargestellt.

Während CHO- α 1/f.l. Zellen, die mit Vektor-DNA transfiziert wurden, gleichmäßig gespreitet waren sowie kortikales Aktin und Spannungsfasern aufwiesen (Abb. 3.26 A), führte die Expression der PH- oder der C-SH2-Domäne der PLC γ 1 zu einem Phänotyp mit deutlich verändertem F-Aktincytoskelett, dem die ausgeprägten Spannungsfasern, die in Kontrollzellen zu beobachten waren, fehlten (Abb. 3.26 B bzw. C). Stattdessen führten beide Konstrukte zu einer verstärkten Aktivität an der Plasmamembran, die sich bei Expression der PH-Domäne in Form von breiten Lamellipodien und einer erhöhten Anzahl von Zellausläufern äußerte (Abb. 3.26 B). Letztere waren mitunter weiter verzweigt (nicht gezeigt).

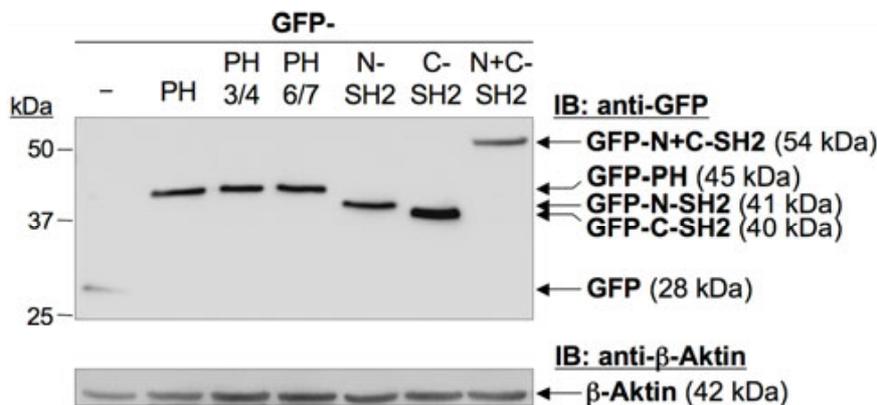


Abb. 3.25: Ektopische Expression der Fusionsproteine GFP-PH, -PH 3/4, -PH 6/7, -N-SH2, -C-SH2 und -N+C-SH2 am Beispiel der CHO- α 1/f.1. Zellen. Die Zellen wurden mittels Lipofektion für 6 h mit der entsprechenden Plasmid-DNA transfiziert und anschließend lysiert. Zellsolubilisat mit 40 μ g Protein wurde pro Spur eines 12% Tricin-SDS-Gels aufgetragen, und ein Western Blot wurde durchgeführt. Die GFP-Fusionsproteine wurden mit dem anti-GFP-Antikörper und mittels Chemilumineszenz detektiert. Als Ladungskontrolle diente β -Aktin. IB: Immunoblot

CHO- α 1/f.1. Zellen, die mit C-SH2-kodierender Plasmid-DNA transfiziert worden waren, bildeten vermehrt spitze Filopodien und kleine Membranauswölbungen aus. Diese Zellen waren kleiner und rundlicher als die vektortransfizierten Kontrollzellen (Abb. 3.26 C). Die gleichzeitige Expression der PH- und der C-SH2-Domäne hob hingegen die für die einzelnen Domänen beschriebenen Effekte auf und verursachte ein vektorähnliches Erscheinungsbild (Abb. 3.26 D). Jedoch waren in diesen Zellen die Spannungsfasern weniger deutlich ausgebildet, und in der Zellperipherie war eine schwache Grünfärbung im Bereich des kortikalen Aktins zu erkennen (gekennzeichnet durch Pfeilspitzen). Die ektopische Expression der Tandem-SH2-Domäne (GFP-N+C-SH2) erbrachte kompakte, gespreitete CHO- α 1/f.1. Zellen, in denen keine erhöhte Ausbildung von Lamelli- oder Filopodien zu beobachten war (Abb. 3.26 E). Jedoch war in diesen Zellen das kortikale Aktincytoskelett verstärkt, und an den Enden der zugehörigen Aktinstränge waren deutliche GFP-Signale auszumachen (mit Pfeilspitzen gekennzeichnet). Dieser Effekt war auf die Tandem-SH2-Domäne beschränkt, da er bei Expression der N-SH2- oder der C-SH2-Domäne nicht auftrat (Abb. 3.26 F und C). CHO- α 1/f.1. Zellen, die mit für die N-SH2-Domäne kodierender DNA transfiziert worden waren, ähnelten in ihrem Erscheinungsbild vektortransfizierten Zellen.

Um die Rolle der Lipidbindung der PH-Domäne der PLC γ 1 bei den oben beschriebenen morphologischen Effekten zu untersuchen, wurden CHO- α 1/f.1. Zellen mit Plasmid-DNA, kodierend für die mutierten Konstrukte GFP-PH 3/4 und GFP-PH 6/7 transfiziert und mittels Fluoreszenzmikroskopie visualisiert. Die Expression dieser beiden Konstrukte führte zu einem zellulären Phänotyp mit einer gegenüber den Vektorzellen erhöhten Aktivität an der Plasma-

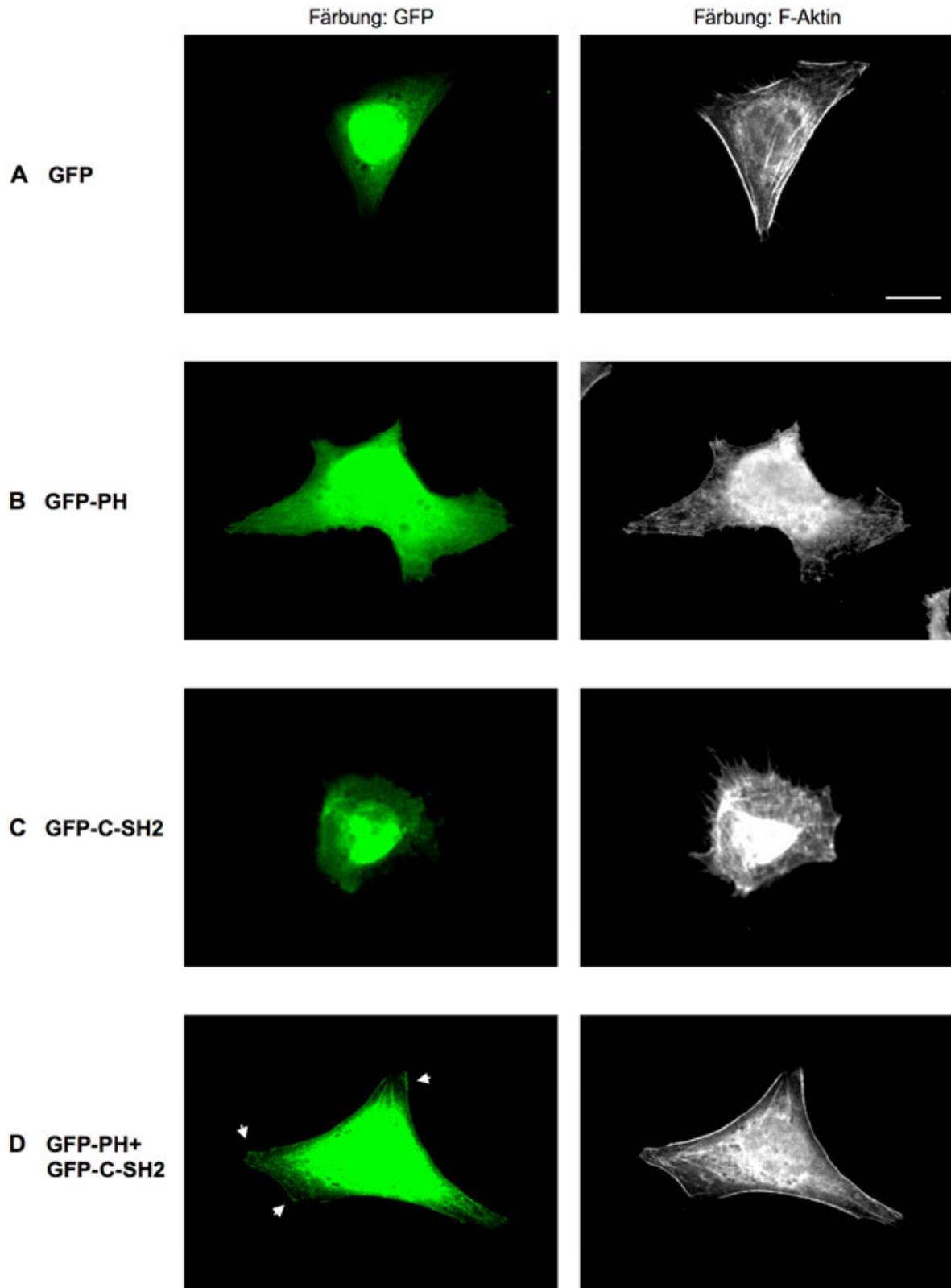
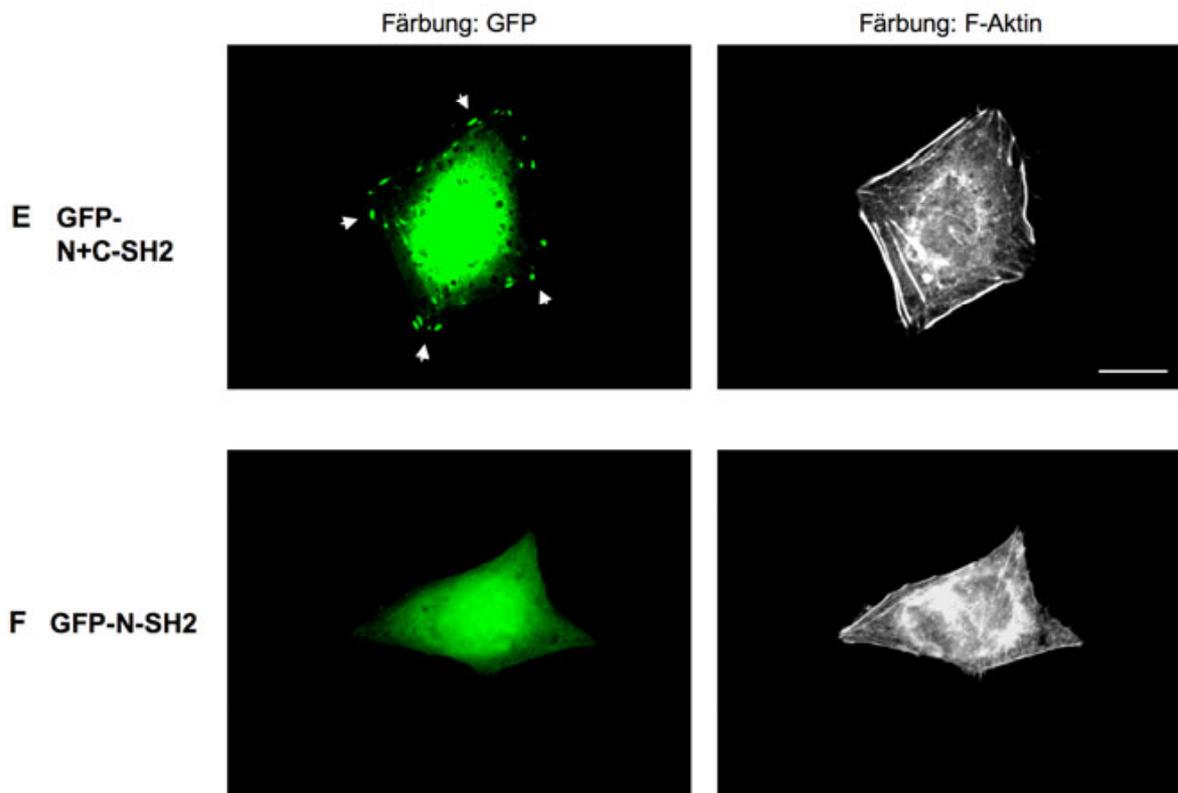


Abb. 3.26: Einfluss der GFP-Konstrukte GFP (A), GFP-PH (B), GFP-C-SH2 (C), GFP-PH und GFP-C-SH2 (D), GFP-N+C-SH2 (E)* und GFP-N-SH2 (F)* auf die KIV-abhängige Zellmorphologie von CHO- $\alpha 1/f.i.$ Zellen. Die Zellen wurden für 6 h mit der jeweiligen Plasmid-DNA transfiziert und anschließend für 1 h serumdepletiert. 3×10^4 Zellen wurden pro Kammer eines KIV-beschichteten (20 $\mu\text{g/ml}$) 8-Kammer-Objektträgers ausgesät. Nach 2-stündiger Adhäsion bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen gewaschen, fixiert, blockiert und mit CPITC-Phalloidin (1:100) für 2 h bei RT inkubiert. Der Objektträger wurde gewaschen, getrocknet und mit *GelMount* versiegelt. Die Aufnahmen der GFP- bzw. der CPITC-vermittelten Fluoreszenz erfolgten mit 64-facher Vergrößerung am Fluoreszenzmikroskop. Der Maßstabsbalken entspricht 50 μm . *: siehe folgende Seite

Fortsetzung Abb. 3.26



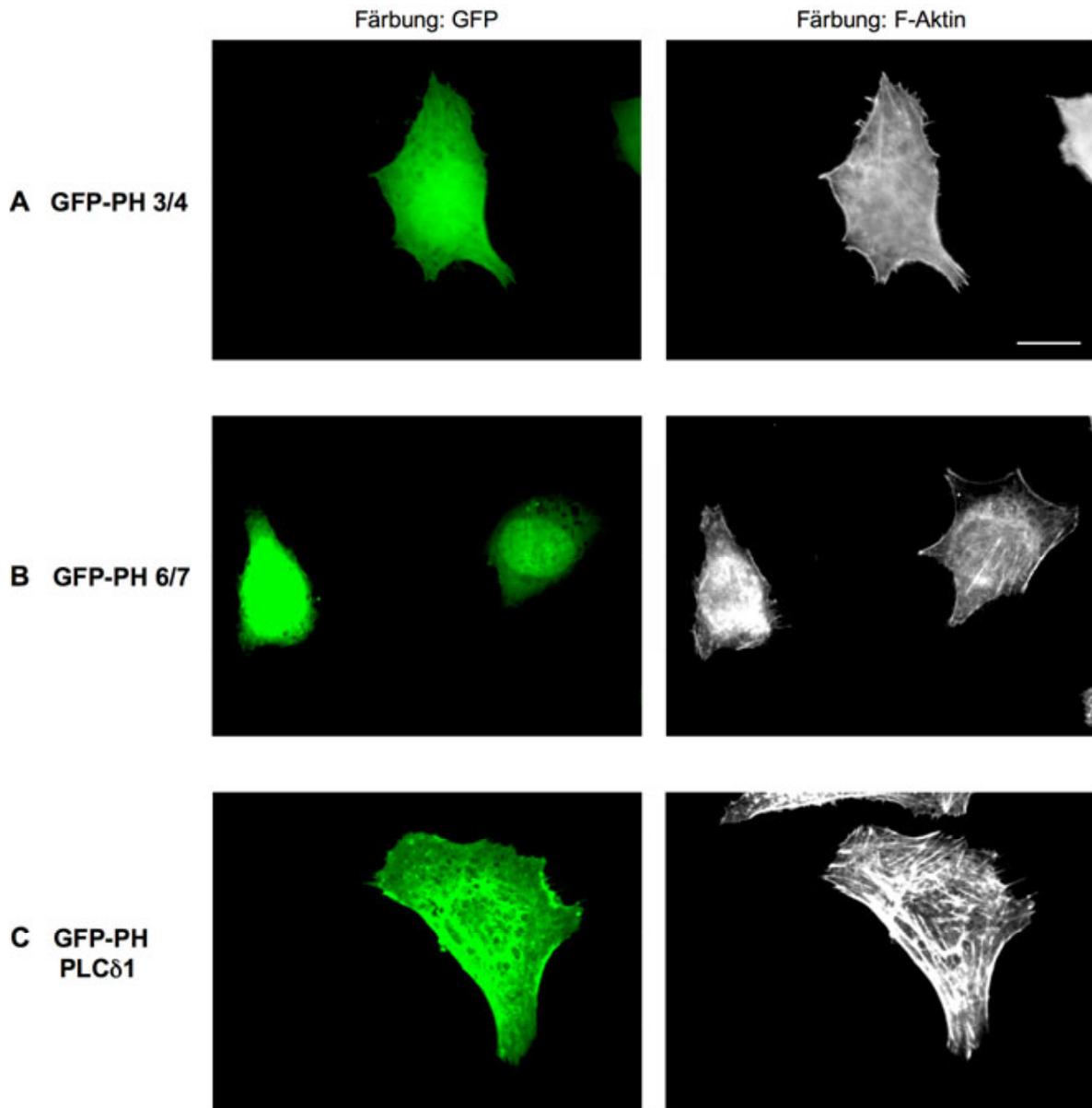


Abb. 3.27: Einfluss der mutierten Konstrukte GFP-PH 3/4 (A) und GFP-PH 6/7 (B) der PH-Domäne der PLC γ 1 und von GFP-PH der PLC δ 1 (C) auf die KIV-abhängige Zellmorphologie von CHO- α 1/f.I. Zellen. Die Transfektion der Zellen und die Durchführung des Experiments erfolgten wie in der Beschriftung von Abb. 3.26 erläutert. Der Maßstabsbalken entspricht 50 μ m.

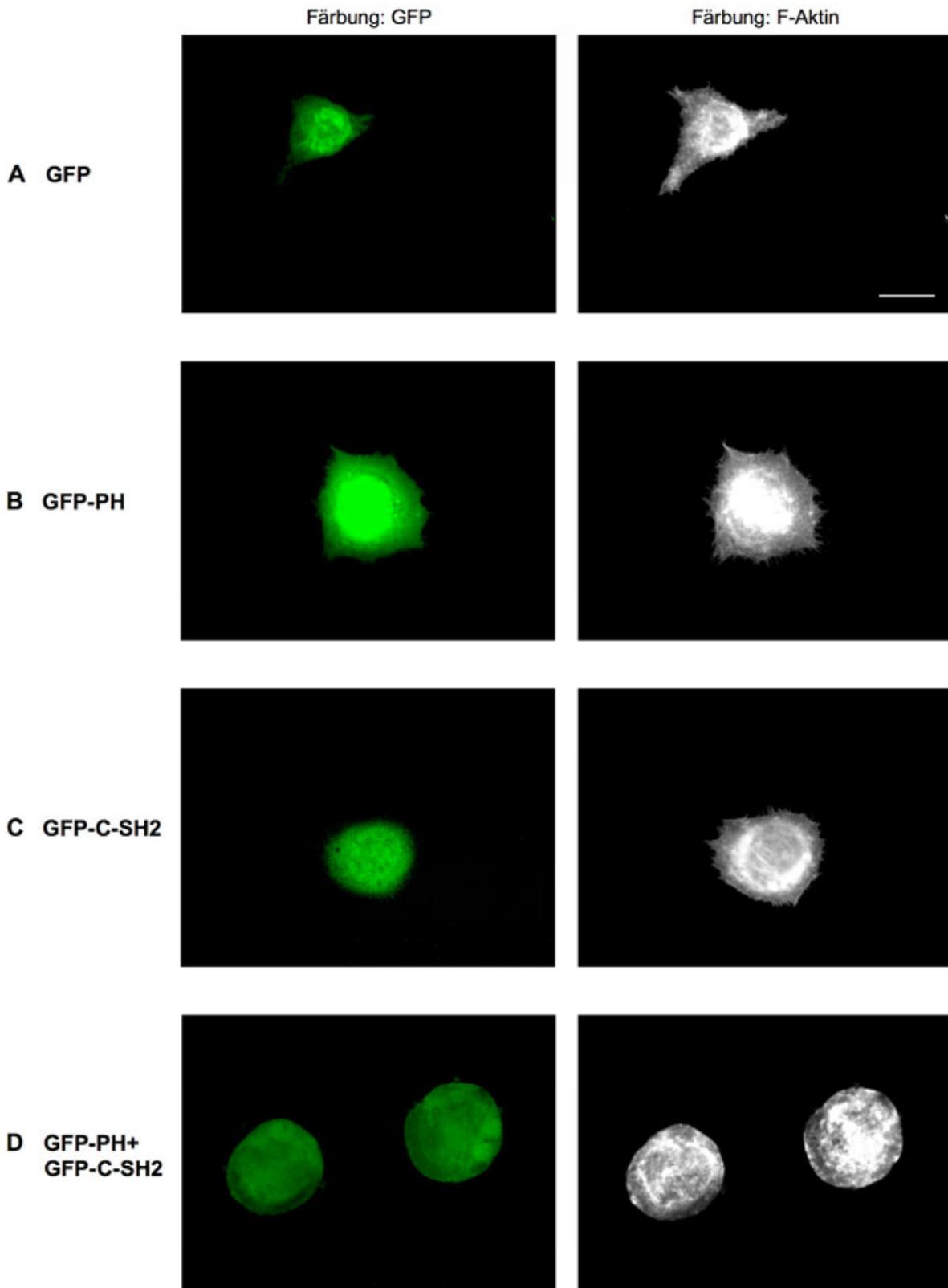
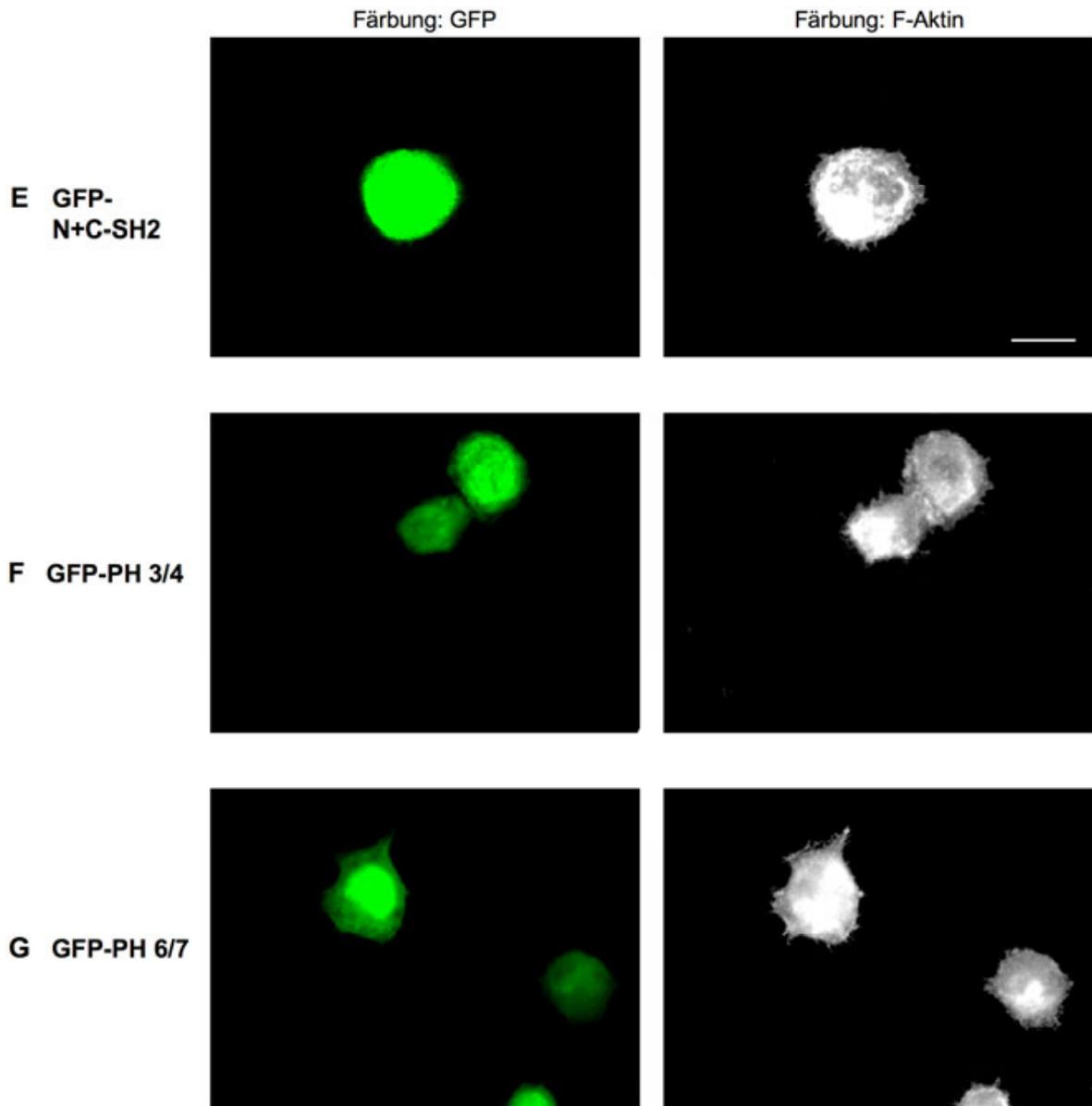


Abb. 3.28: Einfluss der Konstrukte GFP (A), GFP-PH (B), GFP-C-SH2 (C), GFP-PH und GFP-C-SH2 (D), GFP-N+C-SH2 (E)*, GFP-PH 3/4 (F)* und GFP-PH 6/7 (G)* auf die KIV-abhängige Zellmorphologie von CHO- α 1/K Zellen. Die Transfektion der Zellen und die Durchführung des Experiments erfolgten analog wie für die CHO- α 1/f.i. Zellen in Abb. 3.26 beschrieben. Der Maßstabsbalken entspricht 50 μ m. *: siehe folgende Seite

Fortsetzung Abb. 3.28



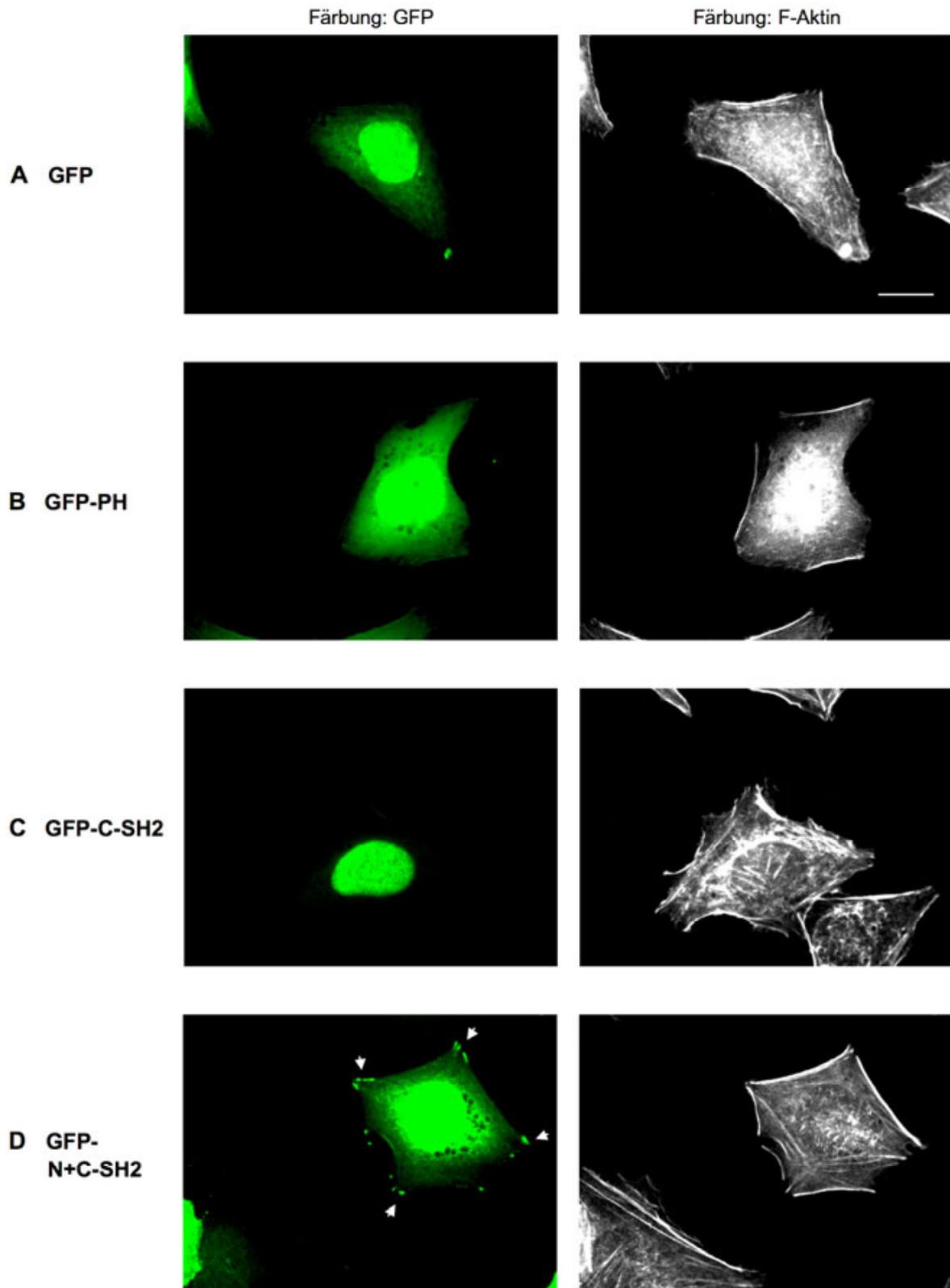


Abb. 3.29: Einfluss der GFP-Konstrukte GFP (A), GFP-PH (B), GFP-C-SH2 (C) und GFP-N+C-SH2 (D) auf die FN-abhängige Zellmorphologie von CHO- α 1/f.i. Zellen. Die Transfektion der Zellen und die Durchführung des Experiments erfolgten wie in Abb. 3.26 erläutert. Der Maßstabsbalken entspricht 50 μ m.

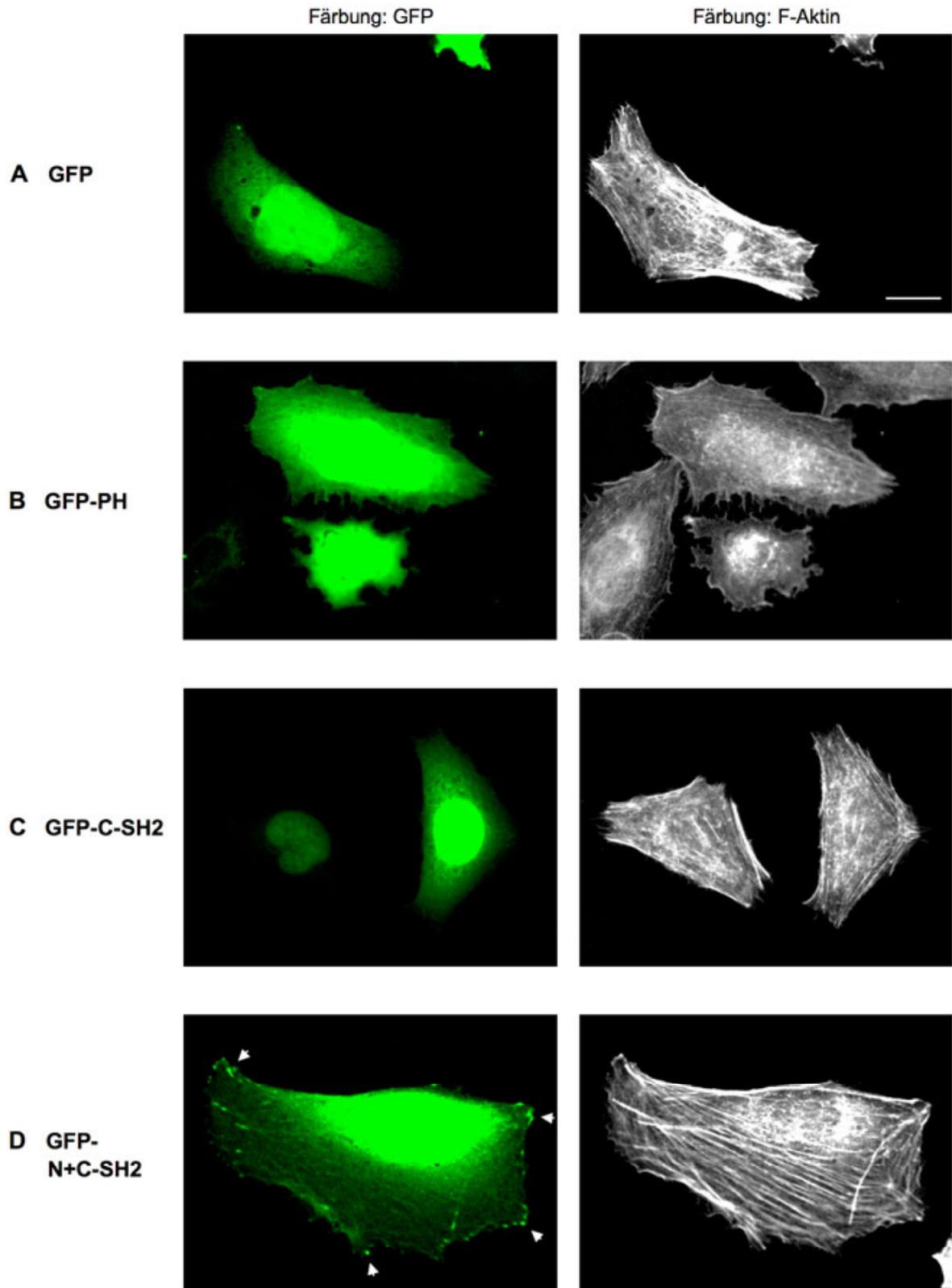


Abb. 3.30: Einfluss der GFP-Konstrukte GFP (A), GFP-PH (B), GFP-C-SH2 (C) und GFP-N+C-SH2 (D) auf die FN-abhängige Zellmorphologie von CHO- α 1/K Zellen. Die Transfektion der Zellen und die Durchführung des Experiments erfolgten wie in Abb. 3.26 beschrieben. Der Maßstabsbalken entspricht 50 μ m.

membran. Die für die Wildtyp-PH-Domäne beschriebenen flächigen Lamellipodien und vermehrten Zellausläufer waren bei Expression der Mutantenproteine jedoch nicht zu beobachten (Abb. 3.27 A und B). Stattdessen besaßen diese Zellen spitze, stechapfelähnliche Ausläufer, die mit kortikalem Aktin verstärkt waren. Verglichen mit der PH 3/4-Mutante ging die Expression des PH 6/7-Konstrukts mit einer stärkeren Ausbildung von Aktinspannungsfasern einher. Diese Zellen besaßen daneben einen zusätzlichen zweiten Phänotyp mit polarisierter, tropfenähnlicher Zellform, die mit einer unregelmäßigen Membranoberfläche „grober“ erschien.

Um Aufschluss über die Spezifität der für die PH-Domäne der PLC γ 1 beschriebenen Effekte auf die α 1 β 1-Integrin-abhängige Zellmorphologie zu erhalten, wurde die Auswirkung der Expression der PH-Domäne der PLC δ 1 auf die CHO- α 1/f.l. Zellen ebenfalls untersucht (Abb. 3.27 C). Diese Zellen zeigten ein polarisiertes Erscheinungsbild mit einem großen Lamellipod und starker Aktivität an der Plasmamembran. Die GFP-fusionierte PH-Domäne der PLC δ 1 war hierbei stellenweise an der Zellperipherie zu finden, und das F-Aktincytoskelett war verstärkt ausgebildet. Somit verursachte die Expression der PH-Domänen der PLC-Isomere γ 1 und δ 1 unterschiedliche Effekte auf die α 1 β 1-Integrin-abhängige Zellmorphologie.

Als Bindungsepitope für die cytoplasmatische Sequenz der α 1- und der β 1-Integrinkette waren die PH- und die C-SH2-Domäne der PLC γ 1 identifiziert worden. Im Folgenden wurde der Frage nachgegangen, welche Effekte die ektopische Expression dieser Domänen auf CHO- α 1/K Zellen, die eine α 1-Kette ohne intrazelluläre Sequenz exprimieren, hervorrufen. Zwar waren vektortransfizierte CHO- α 1/K Zellen nach 2-stündiger Adhäsion auf KIV leicht gespreitet, doch hatten sie noch kein deutliches Aktincytoskelett ausgebildet (Abb. 3.28 A) [Vossmeier *et al.* 2000]. Die Expression von GFP-PH bzw. GFP-C-SH2 rief in diesen Zellen einen Phänotyp hervor, der durch eine rundliche Form mit vielen kleinen Zellausläufern gekennzeichnet war (Abb. 3.28 B und C) und der, von der fehlenden Zellspreitung abgesehen, nicht stark von den vektortransfizierten Zellen abwich. Somit unterschieden sich die CHO- α 1/f.l. und die CHO- α 1/K Zellen vor allem in dem durch Überexpression der PH-Domäne verursachten Phänotyp. Desweiteren führte die Co-Expression der PH- und der C-SH2-Domäne in den CHO- α 1/K Zellen, anders in den CHO- α 1/f.l. Zellen, zu keinem vektorähnlichen Phänotyp, sondern erzeugte runde Zellen (Abb. 3.28 D). CHO- α 1/K Zellen, die mit Plasmid-DNA der N+C-SH2-Domäne transfiziert worden waren, blieben rund, spreiteten nicht und besaßen schwache Zellausläufer. Die kortikalen Aktinstränge und deren für

die CHO- α 1/f.l. Zellen beschriebene Co-Lokalisation mit GFP-N+C-SH2 waren im Fall der CHO- α 1/K Zellen nicht zu erkennen (Abb. 3.28 E). Die Expression der mutierten PH-Konstrukte PH 3/4 und PH 6/7 schließlich erzeugte in den CHO- α 1/K Zellen einen Phänotyp, wie er für die Wildtyp-PH-Domäne beschrieben wurde (Abb. 3.28 B, F und G).

Die Fluoreszenzanalysen der CHO- α 1/K Zellen verdeutlichen somit die Bedeutung der α 1-cytoplasmatischen Domäne für die durch die PLC γ 1-Domänen hervorgerufenen Effekte auf die Morphologie der CHO- α 1/f.l. Zellen. Um zu erfahren, ob die für die PH- und die C-SH2-Domäne beschriebenen Beobachtungen spezifisch für die α 1 β 1-Integrin-vermittelte Signaltransduktion waren, wurden CHO- α 1/f.l. und - α 1/K Zellen mit den DNA-Konstrukten für GFP-PH, -C-SH2 und -N+C-SH2 transfiziert und nach 2-stündiger Adhäsion auf dem α 5 β 1-Integrin-Liganden Fibronectin (FN) mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert (Abb. 3.29). Im Gegensatz zu den Studien auf KIV verursachte die ektopische Expression von GFP-PH in FN-adhärenenten CHO- α 1/f.l. Zellen weniger drastische Effekte. Diese Zellen besaßen zwar ebenfalls Lamellipodien. Jedoch war zum einen die Anzahl von Zellausläufern nicht stark erhöht, und es waren keine Spannungsfasern zu beobachten; zum anderen war das kortikale Aktincytoskelett ausgebildet (Abb. 3.29 B). Zellen, die mit GFP-C-SH2 transfiziert wurden, wiesen eine erhöhte Aktivität an der Plasmamembran auf und waren besser gespreitet als die entsprechenden, KIV-adhärenenten Zellen (Abb. 3.29 C). Die Spannungsfasern waren hier jedoch unorganisiert. Der in den CHO- α 1/f.l. Zellen durch GFP-N+C-SH2 hervorgerufene Phänotyp ähnelte jedoch dem für KIV beschriebenen (Abb. 3.29 D). So waren diese Zellen ebenfalls gut gespreitet und besaßen Spannungsfasern sowie ein kortikales Aktincytoskelett, das mit GFP-N+C-SH2 co-lokalisierte (mit Pfeilspitzen gekennzeichnet).

Der Phänotyp FN-adhärenenter CHO- α 1/K Zellen, die mit GFP-PH oder GFP-C-SH2 transfiziert wurden, wich von dem jeweiligen, für CHO- α 1/f.l. Zellen beschriebenen ab. Im Fall von GFP-PH waren hierfür die erhöhte Aktivität an der Membran, die mit vielen Zellausläufern einherging, und die ausgebildeten, unorganisierten Spannungsfasern verantwortlich (Abb. 3.30 B). Die Expression der GFP-C-SH2-Domäne in CHO- α 1/K Zellen rief auf FN einen vektorähnlichen Phänotyp von gut gespreiteten Zellen mit Spannungsfasern hervor (Abb. 3.30 C). Nach Transfektion mit dem GFP-N+C-SH2-Konstrukt war bei den FN-adhärenenten CHO- α 1/K Zellen Aktivität an der Plasmamembran in Form von kleinen Ausläufern zu beobachten, wie es zuvor nicht der Fall war. Jedoch war auch hier die Zellform kompakt und war GFP-N+C-SH2 mit dem kortikalen Cytoskelett assoziiert, wie die Pfeilspitzen kenn-

zeichnen (Abb. 3.30 D). Diese Co-Lokalisation war demnach unabhängig von der $\alpha 1$ -, jedoch abhängig von der $\beta 1$ -Integrinuntereinheit.

3.3.4.2 Rolle der PLC γ 1 in der $\alpha 1\beta 1$ -Integrin-vermittelten Zellmigration

Neben der zellulären Adhäsion und Morphologie vermittelt $\alpha 1\beta 1$ -Integrin auch die Motilität von Zellen auf KIV. Um Aufschluss über die Rolle der PLC γ 1 darin zu erhalten, wurde die Migration von CHO- $\alpha 1$ /f.l., - $\alpha 1$ /GFFKR und - $\alpha 1$ /K Zellen in Anwesenheit des PLC γ -Inhibitors U73122 in einem haptotaktischen Migrationsversuch analysiert. Als Referenz dienten CHO- $\alpha 1$ /f.l.-Zellen, denen anstelle des Inhibitors das Vehikel DMSO zugesetzt wurde. Die Bedeutung der $\alpha 1$ -cytoplasmatischen Sequenz für die KIV-abhängige Zellmigration wurde bereits beschrieben [Vossmeier *et al.* 2002] und erklärt die im Vergleich zu den CHO- $\alpha 1$ /f.l. Zellen verminderte Zahl migrierter CHO- $\alpha 1$ /GFFKR und - $\alpha 1$ /K Zellen (Abb. 3.31). In Gegenwart des PLC γ -Inhibitors war die Migration in CHO- $\alpha 1$ /f.l. und - $\alpha 1$ /GFFKR Zellen stark erniedrigt, was die funktionelle Beteiligung der PLC γ 1 an der $\alpha 1\beta 1$ -Integrin-abhängigen Zellmigration zeigt.

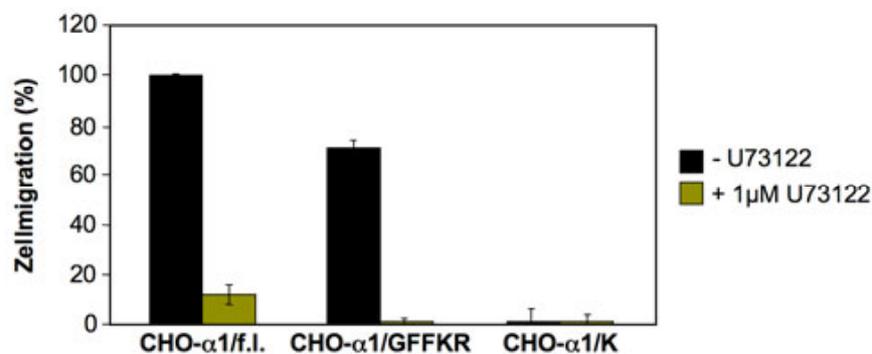


Abb. 3.31: Einfluss des PLC γ -Inhibitors U73122 auf die $\alpha 1\beta 1$ -Integrin-abhängige Zellmigration im Transwell-Migrationssystem. 5×10^4 serumdepletierte CHO- $\alpha 1$ /f.l., - $\alpha 1$ /GFFKR und - $\alpha 1$ /K Zellen wanderten für 5 h bei 37°C in Richtung eines KIV-Gradienten. Migrierte Zellen wurden permeabilisiert und mit Kristallviolettlösung gefärbt. Mithilfe eines Zähllokulars wurden bei 125-facher Vergrößerung fünf Felder pro Filter ausgezählt, und Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten wurden bestimmt.

3.3.4.3 Rolle der PH-Domäne der PLC γ 1 in der $\alpha 1\beta 1$ -Integrin-abhängigen Zellmigration

Nachdem die PH-Domäne der PLC γ 1 als Bindungspartner der cytoplasmatischen Sequenz der $\alpha 1$ - und der $\beta 1$ -Integrinuntereinheit identifiziert worden (3.3.1) und die Bedeutung der PLC γ 1 an der $\alpha 1\beta 1$ -Integrin-vermittelten Zellmigration gezeigt war (3.3.4.2), wurde der Einfluss von ektopisch exprimierter GFP-PH-Domäne auf die KIV-abhängige Zellmigration von

$\alpha 1$ -exprimierenden CHO-Zellen untersucht. Wie in Abb. 3.32 dargestellt, reduzierte die Überexpression der PLC $\gamma 1$ -PH-Domäne die Migration von CHO- $\alpha 1$ /f.l., - $\alpha 1$ /GFFKR und - $\alpha 1$ /K Zellen im Vergleich zu den jeweils vektortransfizierten Kontrollzellen um die Hälfte. Damit war der migrationsinhibierende Effekt der überexprimierten PH-Domäne der PLC $\gamma 1$, verglichen mit dem der PLC $\gamma 1$ -Inhibitors U73122 (Abb. 3.31), bei CHO- $\alpha 1$ /f.l. und - $\alpha 1$ /GFFKR Zellen bedeutend schwächer ausgeprägt. Um über die Bedeutung der PI(3,4,5)P $_3$ -Interaktion der PH-Domäne Auskunft zu erhalten, wurde die Migration der CHO-Zellen nach Expression der PH-Mutanten PH 3/4 und PH 6/7 ebenfalls untersucht (Abb. 3.32). Im Vergleich zu der PH-Wildtyp-Domäne senkte die PH 3/4-Mutante, die keine Membranbindung ausübt, die Migration der CHO- $\alpha 1$ /f.l. und der - $\alpha 1$ /GFFKR Zellen weniger stark, auf 82% bzw. 93% des Kontrollwertes. Im Gegensatz hierzu war die Migration in den CHO- $\alpha 1$ /K Zellen bei Expression von GFP-PH 3/4 fast vollständig inhibiert. Die Expression der PH-Mutante 6/7, deren Membranbindung intakt ist, reduzierte die Migration in allen drei Zelllinien ebenfalls deutlich, in den CHO- $\alpha 1$ /GFFKR Zellen dabei auf das durch die PH-Wildtyp-Domäne induzierte Niveau. In den CHO- $\alpha 1$ /f.l. und - $\alpha 1$ /K Zellen wurde die Zellmigration durch Expression von GFP-PH 6/7 gar noch stärker als durch die PH-Wildtyp-Domäne inhibiert. In Anhängigkeit von der Art des $\alpha 1$ -Integrinkonstruktes übten die überexprimierten PH-Konstrukte bei gleicher Expressionsstärke (Abb. 3.25) demnach einen unterschiedlichen Effekt auf die Migration der CHO-Zellen aus.

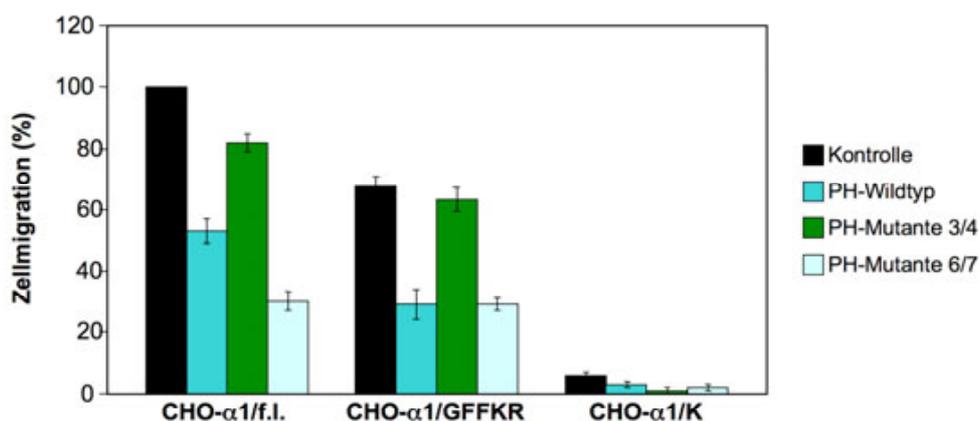


Abb. 3.32: Einfluss der ektopisch exprimierten PH-Domäne der PLC $\gamma 1$ auf die $\alpha 1\beta 1$ -Integrin-abhängige Zellmigration im Transwell-System. CHO- $\alpha 1$ /f.l., - $\alpha 1$ /GFFKR und - $\alpha 1$ /K Zellen wurden mit Plasmid-DNA, kodierend für GFP-PH, -PH 3/4 oder -PH 6/7 bzw. GFP mittels Lipofektion ün transfiziert und für 1 h serumdepletiert. 5×10^4 Zellen wurden auf KIV-beschichteten Filtern ausgesät und für 5 h im Brutschrank inkubiert. Migrierte Zellen wurden mit PFA/Saponin permeabilisiert, mit Kristallviolett gefärbt und am Lichtmikroskop bei 125-facher Vergrößerung ausgezählt. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt.

Um die Spezifität des migrationsinhibierenden Effekt der PLC γ 1-PH-Domäne zu untersuchen, wurde auch der Einfluss der ektopisch exprimierten PH-Domänen von PLC β 1 und PLC δ 1 auf die Migration von CHO- α 1-Zellen untersucht (Abb. 3.33). Dabei zeigte sich, dass die Expression der PLC β 1- oder der PLC δ 1-PH-Domäne keinen bzw. einen schwachen Einfluss auf die Motilität der CHO- α 1/f.l. bzw. der - α 1/K Zellen ausübte. Die Migration der CHO- α 1/GFFKR Zellen wurde nur durch die Expression der PLC δ 1-PH-Domäne beeinflusst; sie wurde um ein Viertel gesenkt.

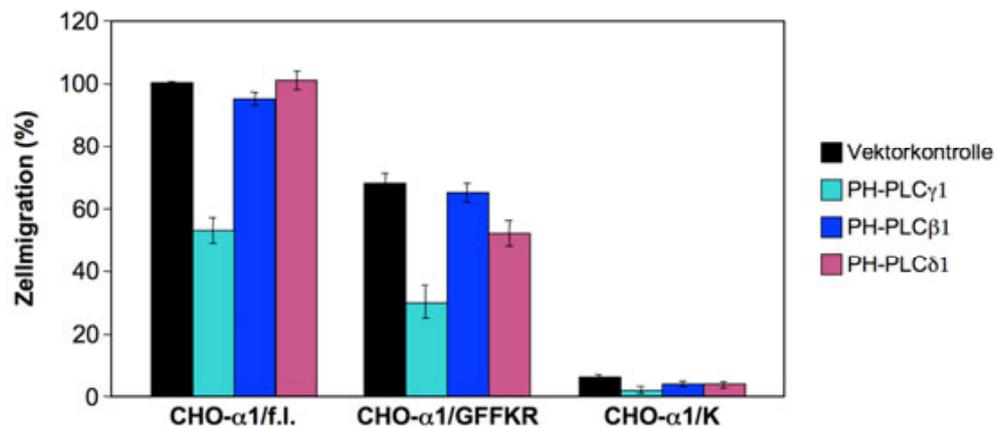


Abb. 3.33: Einfluss der PH-PLC-Isoform auf die α 1 β 1-Integrin-vermittelte Zellmigration im Transwell-System. CHO- α 1/f.l., - α 1/GFFKR und - α 1/K Zellen wurden mit GFP-Plasmid-DNA der PH-Domäne von PLC β 1, PLC δ 1 oder PLC γ 1 mittels Lipofektion üN transfiziert. Kontrollzellen wurden mit Leervektor transfiziert. 5×10^4 Zellen serumdepletierte Zellen wurden auf KIV-beschichteten Filtern ausgesät und für 5 h im Brutschrank inkubiert. Migrierte Zellen wurden mit PFA/Saponin permeabilisiert, mit Kristallviolett gefärbt und am Lichtmikroskop mit 125-facher Vergrößerung ausgezählt. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt.

4 DISKUSSION

4.1 Untersuchungen zur Struktur der α 1-cytoplasmatischen Sequenz

In Lösung bildet die α 1-cytoplasmatische Sequenz keine Sekundärstrukturen aus, faltet jedoch auf sich zurück

Mithilfe der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten NMR- und CD-spektroskopischen Messungen sowie der MD-Simulationen konnte in dem von der α 1-cytoplasmatischen Sequenz abgeleiteten α 1-cyto-Peptid keine definierte Sekundärstruktur detektiert werden. Das α 1-cyto-Peptid wurde zunächst ^{15}N -markiert rekombinant in *E.coli* aufgereinigt und für ^1H - ^{15}N -HSQC-NMR-Messungen eingesetzt (3.1.1), wie bereits für Peptide der cytoplasmatischen Domäne der α I**b**- und der β 3-Integrinkette berichtet [Vinogradova *et al.* 2000, Ulmer *et al.* 2001, Vinogradova *et al.* 2002, Weljie *et al.* 2002, Vinogradova *et al.* 2004, Lau *et al.* 2008a, Lau *et al.* 2008b, Bhunia *et al.* 2009]. Die für das α 1-cyto-Peptid erhaltenen HSQC-Signale konnten mit einigen der für die Zufallsknäuelkonformation tabellierten Verschiebungen der ^1H - und ^{15}N -Resonanzen abgeglichen werden [Bundi & Wüthrich 1979, Wüthrich 1986, Glushka *et al.* 1989, 1990, Braun *et al.* 1994]. Die Resonanzsignale waren jedoch nicht distinkt aufgelöst, was durch die während des langen Messzeitraums von 17 h eingesetzte Denaturierung des Peptids erklärt werden kann.

Die CD-Spektren der Integrinpeptide α 1-cyto, α 1-scrambled und PLKKKMEK entsprachen dem unstrukturierter Zufallsknäuelkonformation (3.1.2) und ähnelten damit denen der von den intrazellulären Domänen der Integrinketten α I**b**¹⁵ und β 3¹⁶ abgeleiteten Peptide [Haas & Plow 1997]. Die fehlende Faltung des α 1-cyto- und des PLKKKMEK-Peptids stimmte dabei nicht mit der Struktur einer α -Helix überein, die durch das PSIPRED-Programm [Jones 1999] für die PLKKKMEK-Sequenz vorhergesagt wurde (nicht gezeigt, 4.2). Die PSIPRED-Strukturvorhersage umfasste jedoch neben der cytoplasmatischen Sequenz auch die Transmembrandomäne (TMD) der α 1-Kette. Dies -zusammen mit der Tatsache, dass das Spektrum des KIGFFKR-Peptids einige Kennzeichen von β -Turn-Strukturen aufwies- deutet darauf hin, dass das KIGFFKR- und das PLKKKMEK-Motiv ihre Struktur innerhalb der

¹⁵ die cytoplasmatische Aminosäuresequenz der α I**b**-UE lautet: K₉₈₉VGFFKRNRPPLLEDDEGE₁₀₀₈

¹⁶ die cytoplasmatische Aminosäuresequenz der β 3-UE lautet: K₇₁₆LLITIHDRKEFAKFEEERARAKWDTAN-NPLYKEATSTFTNITYRGT₇₆₂.

α 1-Kette nicht unabhängig voneinander einnehmen. Eine derartige gegenseitige Einflussnahme von membranproximalem und -distalem Bereich wurde bereits für die α I**Ib**-cytoplasmatische Sequenz beschrieben [Haas & Plow 1997].

Der Befund einer fehlenden definierten α -Helix- oder β -Faltblattstruktur in der α 1-cytoplasmatischen Sequenz wurde durch MD-Simulationen bestätigt (3.1.3). und deckt sich mit publizierten Daten aus CD- und NMR-Messungen von Peptiden der intrazellulären Domäne der α I**Ib**-, α 5-, α V- bzw. β 3-UE [Muir *et al.* 1994, Haas & Plow 1996, Hwang & Vogel 2000, Ulmer *et al.* 2001, Weljie *et al.* 2002, Vinogradova *et al.* 2004]. Der Einfluss einer Lipidumgebung auf die Faltung der intrazellulären Integrinsequenzen wurde ebenfalls untersucht und wird in Abschnitt 4.2 diskutiert.

Die aus den CD-Spektren der α -Integrinpeptide abgeleitete Zufallsknäuelkonformation ist jedoch aus mehreren Gründen auch mit Unsicherheit behaftet. Zum einen erschweren vorhandene aromatische Aminosäuren die sichere Herleitung der vorliegenden Peptidkonformation aus CD-Spektren [Woody 1978]. Zum anderen sind Fälle bekannt, in denen das CD-Spektrum eines Peptids oder Proteins trotz dessen bekannter β -Sekundärstruktur der Zufallsknäuelkonformation ähnelt. Dies ist auf β -Stränge zurückzuführen, die transient ausgebildet werden bzw. verzerrt, irregulär oder sehr kurz sind [Manavalan & Johnson 1983, Blanco *et al.* 1994a, Blanco *et al.* 1994b]. Dergleichen wurde für den Sojabohmentrypsin-inhibitor, α -Chymotrypsin, Elastase, Rubredoxin und Weizenkeimagglutinin gezeigt [Sweet *et al.* 1974, Brahm & Brahm 1980, Hennessey & Johnson 1981, Mori & Jirgensons 1981, Richardson 1981, Manavalan & Johnson 1983]. Die rechnerische Bestimmung der Sekundärstruktur der Integrinpeptide aus deren CD-Spektren mithilfe des ACDP-Programms ergab einen β -Faltblattanteil von 40% für das α 1-cyto-Peptid und von 59% für das KIGFFKR-Peptid. Die Berechnung war jedoch mit Fehlern behaftet und wurde deshalb nicht aufgeführt (siehe auch 4.2). β -Strukturbereiche über kurze Aminosäuresequenzen stellen keine Seltenheit dar [Chou & Fasman 1974]. Weitere Argumente sprechen dafür, dass das Vorhandensein eines Strukturmotivs in der α 1-cytoplasmatischen Sequenz nicht ausgeschlossen werden kann. Erstens ist das CD-Spektrum des α 1-cyto-Peptids deckungsgleich mit dem eines Peptids aus der B1-Domäne des Proteins G, das nachweislich eine β -Hairpin-Struktur ausbildet und einen β -Strukturanteil von 42% besitzt. Demnach liegen in der Lösung des besagten B1-Peptids sowohl eine ungefaltete Konformation als auch die eines β -Hairpins vor, die miteinander im Gleichgewicht stehen [Blanco *et al.* 1994a, Blanco *et al.* 1994b]. Die

MD-Simulation des $\alpha 1$ -cyto-Peptids zeigte ebenfalls zwei vorherrschende Konformationen, eine aufgelockerte bzw. ausgestreckte und eine rückgefaltete, hakenförmige. Letztere befand sich im N-terminalen Abschnitt des Peptids und könnte eine *Turn*- oder *Hairpin*-Struktur darstellen. Zweitens konnten mithilfe von NOE-NMR-Messungen von cytoplasmatischen Integrinpeptiden auch *Turn*-Strukturen in der Pro₉₉₈-Pro₉₉₉-Sequenz der α I**b**- und der α V-UE bzw. in dem membrandistalen N₇₄₄PLY₇₄₇-Motiv der $\beta 3$ -Kette identifiziert werden [Filardo & Cheresh 1994, O'Toole *et al.* 1995, Haas & Plow 1996, Vinogradova *et al.* 2000, Ulmer *et al.* 2001]. Ulmer und Kollegen beschrieben zudem die Neigung zur Ausprägung einer α -Helix zwischen den Resten Arg₇₂₄ und Ala₇₃₅ der $\beta 3$ -Untereinheit [Ulmer *et al.* 2001].

MD-Simulationen der Faltung des $\alpha 1$ -cyto-Peptids in Wasser bzw. in NaCl-Lösung zeigten für beide Bedingungen zwei vorherrschende Peptidkonformationen, eine geschlossene, hakenförmige Rückfaltungsstruktur und einen aufgelockerten bzw. ausgestreckten Zustand. Besonders die Identifizierung der hakenförmigen Konformation ist von Bedeutung, da das $\alpha 1$ -cyto-Peptid initial als ungefaltet und ausgestreckt definiert wurde, demnach also eine intrinsische Neigung zur Rückfaltung besitzt. Das Konzept, dass sich der C-terminale Abschnitt einer intrazellulären Integrindomäne zurückfaltet, um eine geschlossene Struktur zu bilden, wurde bereits für die α I**b**- und die $\beta 3$ -Integrinkette mithilfe von Computermodellierungen in Wasser und NMR-Messungen in DPC-Mizellen hergeleitet [Haas & Plow 1996, 1997, Vinogradova *et al.* 2000, Weljie *et al.* 2002]. Die Rückfaltung wurde hierbei durch die entsprechenden *Turn*-Strukturen in der α I**b**- bzw. der $\beta 3$ -UE ermöglicht (siehe oben). Die Strukturaufklärung der 58 Aminosäuren umfassenden α L-cytoplasmatischen Domäne mittels NMR-Spektroskopie in Wasser ergab ein kompaktes Bündel aus drei α -Helices, wobei sich die C-terminale zwischen die N-terminale und die mittlere Helix schob [Bhunia *et al.* 2009]. Dies deutet auf eine intrinsische Rückfaltungsneigung in den cytoplasmatischen Sequenzen aller α -Integrinuntereinheiten hin, deren molekulare Struktur von der Natur und der Länge der spezifischen Aminosäuresequenz abhängt. Bislang wird vermutet, dass die Rückfaltung von cytoplasmatischen Integrindomänen für die Struktur oder die *Inside-out*-Aktivierung von Integrinen von Bedeutung sein könnte [Haas & Plow 1997]. Einem distinkten Integrinaktivitätszustand konnte die geschlossene cytoplasmatische Konformation jedoch nicht zugeordnet werden [Vinogradova *et al.* 2000, Weljie *et al.* 2002].

Die Daten der MD-Simulation des $\alpha 1$ -cyto-Peptids weisen darauf hin, dass die Konformation der $\alpha 1$ -cytoplasmatischen Sequenz hoch dynamisch ist. Damit wäre auch deren unterschiedliche Zugänglichkeit für Proteinbindungspartner verbunden [Chou 2000, Rotondi & Gierasch

2005, Giddu *et al.* 2009]. Da die ausgestreckte Konformation zudem durch eine erhöhte Ionenstärke gefördert wird, entsteht ein Bild der Struktur der $\alpha 1$ -cytoplasmatischen Sequenz, die in Abhängigkeit von der lokalen, submembranären Ionenkonzentration äußerst dynamisch ist und eventuell mit einer distinkten Feinregulierung der Funktion oder Konformation des $\alpha 1\beta 1$ -Integrinrezeptors verbunden ist.

4.2 *Untersuchung der Interaktion der $\alpha 1$ -cytoplasmatischen Sequenz mit Phospholipiden*

Die cytoplasmatische Sequenz der $\alpha 1$ -Integrinuntereinheit assoziiert kopfgruppenabhängig mit PIPs

Die cytoplasmatische Sequenz KIGFFKRPLKKKMEK der $\alpha 1$ -Integrinuntereinheit weist eine Nettoladung von +6 auf und beherbergt zwei aromatische Reste. Damit sind die Voraussetzungen für eine Membranassoziation und -insertion erfüllt [McLaughlin & Murray 2005, Bentham *et al.* 2006, Rosenhouse-Dantsker & Logothetis 2007]. Mithilfe von drei unabhängigen Methoden wurde im Rahmen dieser Arbeit die Interaktion der $\alpha 1$ -cytoplasmatischen Sequenz mit den negativ-geladenen Phospholipiden PS, PI(4,5)P₂ und PI(3,4,5)P₃ analysiert. Zunächst konnte die Bindung des GST- $\alpha 1$ -cyto-Fusionsproteins an alle Sorten von PIPs auf einer phospholipidexponierenden Membran detektiert werden (3.2.1). Aufgrund des rein qualitativen Charakters dieses PIP-Strip-Inkubationstests konnten hieraus jedoch keine quantitativen Aussagen hinsichtlich PIP-Präferenz und -Affinität erfolgen [Kavran *et al.* 1998]. Um die Assoziation der $\alpha 1$ -cytoplasmatischen Sequenz an PI(4,5)P₂ und PI(3,4,5)P₃ im Vergleich zu dem monovalenten, sauren Lipid PS mit Hilfe von apparenten Dissoziationskonstanten K_D^{app} zu quantifizieren, wurden Liposomen-Co-Sedimentationsexperimente mit dem $\alpha 1$ -cyto-Peptid durchgeführt. Dabei wurde die Bindung dieses Peptids in Abhängigkeit von der angebotenen Lipidoberfläche untersucht, einer bereits vielfach angewandten Methode [Kavran *et al.* 1998, Macia *et al.* 2000, Ford *et al.* 2001, Wang *et al.* 2002, Papayannopoulos *et al.* 2005, Golebiewska *et al.* 2006, Heuer *et al.* 2006, Sigalov *et al.* 2006]. In der vorliegenden Arbeit wurden folgende apparente Dissoziationskonstanten ermittelt: $319,4 \pm 21,5 \mu\text{M}$ für PC:PS (50:50), $208,5 \pm 16,3 \mu\text{M}$ für 2% PI(4,5)P₂ und $61,5 \pm 13 \mu\text{M}$ für 2% PI(3,4,5)P₃. Die Präferenz für PI(3,4,5)P₃ spricht für eine kopfgruppenspezifische Liposomenbindung. Für die Assoziation des $\alpha 1$ -cyto-Peptids mit Liposomen aus PC:PS (85:15) konnte aufgrund ihres schwachen und unspezifischen Charakters keine Affinitätskonstante bestimmt werden. Demnach bedurfte die Membranbindung der $\alpha 1$ -cytoplasma-

tischen Sequenz einer gewissen negativen Oberflächenladung, die von PS und/oder PI(4,5)P₂ bzw. PI(3,4,5)P₃ bereitgestellt wurde.

Bislang wurden Dissoziationskonstanten von PI(4,5)P₂- und PI(3,4,5)P₃-bindenden PH-Domänen vorwiegend für deren Bindung an die löslichen Inositolphosphate IP₃ und IP₄ ermittelt. Jene der als spezifisch geltenden PH-Domänen von GRP-1, Btk, PLCδ1 und Spektrin lagen im nano- und vereinzelt im mikromolarem Bereich [Ferguson *et al.* 1995, Kojima *et al.* 1997, Kavran *et al.* 1998, Rebecchi & Scarlata 1998, Lemmon & Ferguson 2001]. Daneben wurden jedoch auch die Affinitäten einiger PH-Domänen für deren Bindung an PIP-enthaltende Lipidschichten mittels Oberflächenplasmonresonanz (SPR)-Spektroskopie ermittelt. Hier betragen die K_D-Werte für die Bindung an PI(4,5)P₂: 400 ± 30 nM (PH FAPP1) [Stahelin *et al.* 2007]¹⁷ und für die Assoziation mit PI(3,4,5)P₃: 80 ± 10 nM (PH Btk), 170 ± 41 nM (PH GRP-1), 590 ± 80 nM (PH Akt) sowie 1,7 ± 0,41 μM (PH ARNO) [Manna *et al.* 2007]¹⁸. Diese niedrigen Affinitätskonstanten kommen durch die Ausbildung einer definierten räumlichen Bindungstasche zustande [Balla 2005, Lemmon 2008], deren Vorhandensein in der kurzen α1-cytoplasmatischen Sequenz unwahrscheinlich ist. Unter den gleichen Bedingungen des Lipid-Co-Sedimentationstests, mit denen die Dissoziationskonstanten für das α1-cyto-Peptid ermittelt wurden, erfolgte auch die Bestimmung der Bindungsaffinität der N-terminalen hSH3-Domäne des Immunzelladapterproteins ADAP mit einem K_D-Wert von 156 ± 25 μM für 2% PI(4,5)P₂ [Heuer *et al.* 2006]¹⁹, der im Bereich der in dieser Arbeit ermittelten Affinitätskonstanten liegt. Ebenfalls mittels Liposomen-Co-Sedimentation haben Papayannopoulos und Kollegen die Bindung eines Peptids der polybasischen Region von N-WASP (Tabelle 1.2) mit folgenden apparenten K_D-Werten quantifiziert: > 100 μM für PC:PS (70:30), 1,2 μM für 10% PI(4,5)P₂, 10 μM für 2% PI(4,5)P₂ und 2,4 μM für 10% PI(3,4,5)P₃ [Papayannopoulos *et al.* 2005]²⁰. Zwar verfügen die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Lipidmischungen über eine andere Zusammensetzung und einen anderen PIP-Anteil, doch liegen die für das α1-cyto-Peptid ermittelten apparenten K_D-Werte ebenfalls im mikromolaren, und damit vergleichbaren Bereich.

Die molare Zusammensetzung der verwendeten Lipidschichten betrug: ¹⁷PC:PE:PI(4,5)P₂ (77:20:3), ¹⁸PC:PE:PI(3,4,5)P₃ (77:20:3), ¹⁹PC:PS:PI(4,5)P₂ (50:48:2), ²⁰PC:PS:PI(4,5)P₂ (70:20:10), PC:PS:PI(4,5)P₂ (70:28:2), PC:PS:PI(3,4,5)P₃ (70:20:10).

Langmuir-Filmwaagemessungen konnten das Präferenzmuster des α 1-cyto-Peptids für die Phospholipide aus dem Co-Sedimentationstest bestätigen: $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ (2%) > $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ (2%) \geq $\text{PC}:\text{PS}$ (50:50) > $\text{PC}:\text{PS}$ (85:15). Demnach ist nicht nur die Membranbindung, sondern auch die Membraninsertion des α 1-cyto-Peptids kopfgruppen- und ladungsabhängig. Während die für 2% $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ und $\text{PC}:\text{PS}$ (50:50) ermittelten K_D^{app} -Werte geringfügig voneinander abwichen, war bezüglich der Insertion in entsprechende Langmuir-Filme kein Unterschied festzustellen. Auch war die Präferenz für $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ bei den Spreitungsdruckmessungen anscheinend stärker ausgeprägt als bei den Co-Sedimentationsstudien. Diese Befunde können durch die Unterschiede beider Experimente bezüglich Lipidoberflächenkrümmung, Versuchsdurchführung und Detektionsprinzip bedingt sein. Während der Co-Sedimentationstest keine Aussage über die Art der Interaktion zwischen Peptid und Lipidoberfläche erlaubt, dienen Langmuir-Filmwaagemessungen primär der Detektion von Membranpenetration [Newman *et al.* 1989, Maget-Dana 1999].

Das α 1-cyto-Peptid inseriert in Langmuir-Filme in Abhängigkeit von der Konzentration von $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ und $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$

Die unter 3.2.3.2 beschriebenen Ergebnisse demonstrieren, dass die Insertion des α 1-cyto-Peptids in Langmuir-Filme auch in Abhängigkeit von der Konzentration und damit der Dichte der eingesetzten PIPs erfolgte. So nahm bei der Erhöhung der $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ -Konzentration von 2% auf 5% die Membraninsertion des α 1-cyto-Peptids deutlich zu. Ein ähnliches $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ -Bindungsverhalten ist bereits für N-WASP [Papayannopoulos *et al.* 2005] und MARCKS [Wang *et al.* 2001] beschrieben, wobei für N-WASP zudem ein kooperativer $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ -Bindungsmechanismus gezeigt werden konnte. Ob ein solches Bindungsverhalten auch für das α 1-cyto-Peptid vorliegt, müsste in weiteren Lipid-Co-Sedimentationsstudien mit zusätzlichen $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ -Konzentrationen untersucht werden. Die durch eine erhöhte $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ -Konzentration bewirkte Verstärkung der Membraninsertion des α 1-cyto-Peptids konnte zudem als $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ -spezifisch betrachtet werden, da eine PS-bedingte Erhöhung der negativen Filmoberflächenladung keine Änderung der Membraninsertion zur Folge hatte. Dieser Befund stimmt mit Berichten überein, dass die von den polybasischen Sequenzen von MARCKS und ErbB1 abgeleiteten Peptide sowie das Lys-13-Peptid spezifisch multivalentes $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$, nicht jedoch monovalentes PS sequestrieren [Golebiewska *et al.* 2006].

Anders als erwartet hatte die Erhöhung der $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ -Konzentration von 2% auf 5% einen gegenteiligen Effekt. So wurde die Membraninsertion des α 1-cyto-Peptids hier um die Hälfte reduziert. Ein solcher Effekt wurde bislang noch nicht beschrieben und kann verschiedene

Ursachen haben. Erstens könnten -eventuell unterstützt durch das $\alpha 1$ -cyto-Peptid- einzelne PI(3,4,5) P_3 -Moleküle in Lösung gehen. Zweitens müssen sterische Effekte der voluminösen Kopfgruppe von PI(3,4,5) P_3 in Betracht gezogen werden, welche die Membranpenetration des $\alpha 1$ -cyto-Peptids erschweren, dessen Membranbindung jedoch nicht unbedingt beeinflussen [Bradshaw *et al.* 1996]. Drittens könnten sich die PI(3,4,5) P_3 -Moleküle innerhalb der Plasmamembran zu größeren Aggregaten zusammenlagern, was die zugängliche Grenzfläche für die Proteinbindungspartner verkleinert [Forstner *et al.* 2006]. Viertens kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine erhöhte PI(3,4,5) P_3 -Konzentration den Bindungsmechanismus des $\alpha 1$ -cyto-Peptids einschließlich der Bindungsstöchiometrie verändert. Mögliche Konsequenzen der konzentrationsabhängigen Membraninsertion des $\alpha 1$ -cyto-Peptids für das $\alpha 1\beta 1$ -Integrin werden ab Seite 126 diskutiert.

Die Insertion des $\alpha 1$ -cyto-Peptids in Langmuir-Filme wird maßgeblich durch elektrostatische Interaktionen bestimmt

Der saure Charakter der PI(4,5) P_2 - bzw. der PI(3,4,5) P_3 -Kopfgruppe einerseits und die positive Nettoladung des $\alpha 1$ -cyto-Peptids andererseits implizieren einen ionischen Charakter dieser Lipid-Peptid-Interaktion, unter Beteiligung der Phosphatgruppen von PI(4,5) P_2 oder PI(3,4,5) P_3 . Darauf weisen die Ergebnisse des PIP-Strip-Inkubationstests als auch die der Liposomen-Co-Sedimentation und der Langmuir-Messungen hin. Für eine elektrostatische PIP-Peptid-Interaktion spricht zudem, dass die Insertion des $\alpha 1$ -cyto-Peptids in PI(4,5) P_2 - oder PI(3,4,5) P_3 -enthaltende Langmuir-Filme durch Magnesium- und Calciumchlorid stark reduziert wurde, in Analogie zu anderen polybasischen Peptiden [Ben-Tal *et al.* 1996, Levental *et al.* 2008a, Levental *et al.* 2008b]. Zweiwertige Kationen schirmen die Phosphatgruppen an Phospholipidkopfgruppen elektrostatisch ab [Gennis 1989, López Cascales *et al.* 1996, Pandit & Berkowitz 2002]; Calciumionen können zudem die Phosphatgruppen dehydratisieren [Shah & Schulman 1965, Flanagan *et al.* 1997]. Demnach können durch Zugabe der besagten Salze sowohl elektrostatische Wechselwirkungen als auch Wasserstoffbrückenbindungen unterbrochen worden sein, die für die Membraninsertion des $\alpha 1$ -cyto-Peptids benötigt wurden. In bereits publizierten Bindungsexperimenten mit anderen amphipathischen Peptiden, die ebenfalls aus einem hydrophoben und einem basischen Anteil bestanden, wurde gezeigt, dass deren Assoziation mit negativ-geladenen Membranen hauptsächlich durch unspezifische elektrostatische Interaktionen angetrieben wurde [Montich *et al.* 1993, Ben-Tal *et al.* 1996, Wang *et al.* 2001, Rusu *et al.* 2004, McLaughlin *et al.* 2005a]. Der Beitrag von Wasserstoffbrückenbindungen wurde bei den genannten Veröffentlichungen

hingegen nicht untersucht. Die Anzahl ausgebildeter Wasserstoffbrückenbindungen und die der daran beteiligten Aminosäurereste bestimmen jedoch die Bindungsspezifität einer Interaktion [Rosenhouse-Dantsker & Logothetis 2007], wie für die IP₃-Bindung der PH-Domäne von PLC δ 1 ($K_D = 120$ nM) und von Spektrin ($K_D = 40$ μ M) aufgezeigt werden konnte [Ferguson *et al.* 1995]. Dass Wasserstoffbrückenbindungen zudem eine Rolle bei der Interaktion von Proteinen mit membranständigen PIPs spielen, wurde für das Lys-13-Peptid gezeigt. Dessen computersimulierte Bindung an PI(4,5)P₂ wurde durch elektrostatische Interaktionen angetrieben und durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert. PS hingegen konnte in dem besagten System keine langlebigen Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden [Lorenz *et al.* 2008]. Somit spricht vieles dafür, dass die Assoziation der α 1-cytoplasmatischen Sequenz mit PI(4,5)P₂ und PI(3,4,5)P₃ größtenteils durch ladungsbedingte Wechselwirkungen zustande kommt, dass vermutlich aber auch Wasserstoffbrückenbindungen einen Beitrag zu dieser Interaktion leisten und diese möglicherweise spezifizieren.

Für die Involvierung der Phosphatgruppen von PI(4,5)P₂ und PI(3,4,5)P₃ in deren Assoziation mit dem α 1-cyto-Peptid spricht, dass dessen Penetration in die zugehörigen Langmuir-Filme ebenfalls durch Natriumhydrogenphosphat reduziert wurde. Bei der Inkubation des GST- α 1-cyto-Fusionsproteins mit der PIP-Strip-Membran wurden PS, LPA und S(1)P nicht gebunden, was zum einen darauf hinweist, dass nur die am Inositolring befindlichen, monoveresterten Phosphatgruppen erkannt wurden. Dies wird durch die mittels MD-Simulation erhaltenen Daten gestützt, dass bevorzugt Phosphomonoester von Lysin- und Argininresten in Proteinen gebunden werden [Kooijman *et al.* 2007]. Da GST- α 1-cyto im PIP-Strip-Versuch schwach an PA, nicht aber an LPA band, könnte auch den unpolaren Fettsäurekomponenten der Lipidmoleküle eine Funktion bei der Bindung an die α 1-cytoplasmatische Sequenz zukommen, da sie an hydrophoben und van der Waals-Wechselwirkungen beteiligt sind. Für einen Beitrag hydrophober Wechselwirkungen an der Assoziation der α 1-cytoplasmatischen Sequenz mit PIPs spricht zudem, dass die Insertion des α 1-cyto-Peptids in Langmuir-Filme durch Zugabe von Salzen oder Phosphat nie vollständig gehemmt wurde. Der verbliebene $\Delta\pi$ -Wert von 1 mN/m könnte den durch hydrophobe Interaktionen zustande kommenden Anteil der Bindungsenergie repräsentieren, wie für die Membraninsertion anderer amphipathischer Peptide bereits gezeigt werden konnte [Victor *et al.* 1999, Ellena *et al.* 2003, Zhang *et al.* 2003, Gambhir *et al.* 2004]. Die Helixrad-Projektion²¹ des

²¹ Die Helixrad (*Helical wheel*)-Projektion ist eine zweidimensionale Darstellung von Aminosäuresequenzen zur Beurteilung ihres amphipathischen Charakters [Schiffer & Edmundson 1967].

α 1-cyto-Peptids (Abb. 4.1) zeigt, dass dieses eine zur Membraninsertion fähige amphipatische Helix ausbilden kann. Mit der hydrophoben Oberfläche aus vier Seitengruppen wäre einerseits die Assoziation mit dem unpolaren Anteil der Phospholipidmoleküle möglich, während die geladenen Lysinseitenketten andererseits mit den Phospholipidkopfgruppen interagierten [Seelig *et al.* 2000]. Das α 1-cyto-Peptid weist desweiteren ein Verhältnis von polaren zu unpolaren Aminosäuren (VPUA) von 1,14 auf. Ein ähnlicher VPUA-Wert ist auch bei einigen, bezüglich Sequenz und Ladung ähnlichen antimikrobiellen Peptiden zu finden, wo er mit deren Membraninsertion und Porenbildung einhergeht [Maget-Dana 1999].

Die Membraninsertion des α 1-cyto-Peptids wird durch die Verteilung von polaren und unpolaren Resten in dessen Aminosäuresequenz bestimmt

Die mithilfe der Langmuir-Filmwaage erhaltenen Daten erlauben den weiteren Rückschluss, dass das α 1-cyto-Peptid eine Membranassoziation ausübt, die durch seine Aminosäuresequenz und die daraus resultierende Verteilung von geladenen und hydrophoben Resten bestimmt wird. Anlass zu dieser Schlussfolgerung liefert das Membraninsertionsverhalten des Kontrollpeptids α 1-scrambled, das die α 1-cytoplasmatische Aminosäuresequenz in durchmischter Reihenfolge enthält. Das α 1-scrambled-Peptid inserierte in die Langmuir-Filme stärker als das α 1-cyto-Peptid; zudem wurde dessen Membranpenetration im Vergleich zu dem α 1-cyto-Peptid durch Salze oder Phosphat in der Regel weniger beeinträchtigt. Da die Peptide α 1-cyto und α 1-scrambled hinsichtlich ihrer physikochemischen Eigenschaften identisch sind, können die beschriebenen Effekte darauf zurückzuführen sein, dass das α 1-scrambled-Peptid ein gegenüber dem α 1-cyto-Peptid stärkeren amphipathischen Charakter besitzt. Dieser wird durch die Helixrad-Projektion des α 1-scrambled-Peptids veranschaulicht (Abb. 4.1 A und B). So ist der geladene und insbesondere der hydrophobe, aromatische Bereich des α 1-scrambled-Peptids gegenüber dem α 1-cyto-Peptid jeweils vergrößert, was einen energetisch günstigeren Mechanismus der Membraninteraktion und -insertion bewirken sollte. An der Helixrad-Projektion des Kontrollpeptids β 1-4 wird die Korrelation zwischen dessen schwach amphipathischem Charakter und der fehlenden Membraninsertion ersichtlich (Abb. 4.1 C).

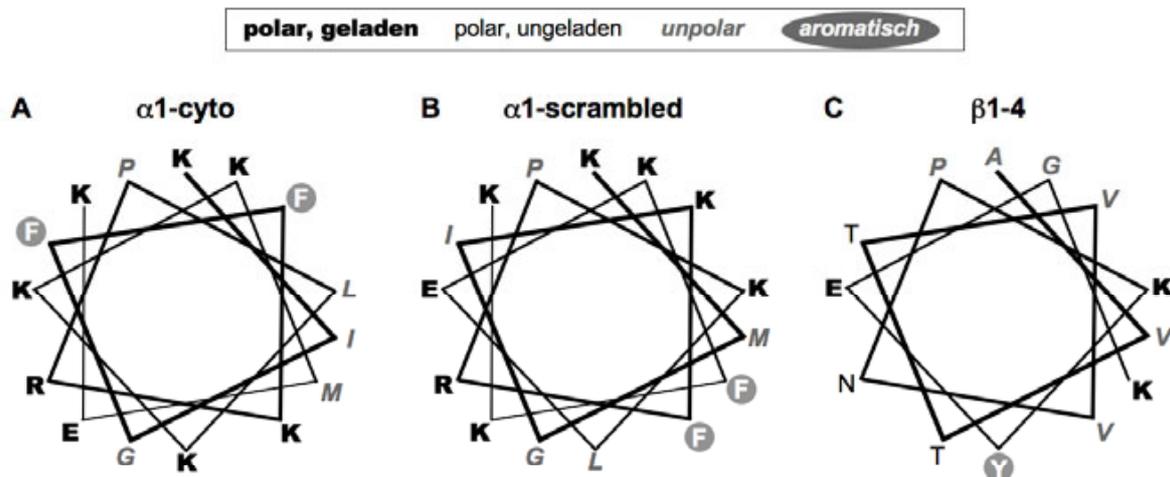


Abb. 4.1: Helixrad-Projektion der $\alpha 1$ -Integrinpeptide $\alpha 1$ -cyto (A), $\alpha 1$ -scrambled (B) und des Kontrollpeptids $\beta 1$ -4 (C), erstellt gemäß [Schiffer & Edmundson 1967]. Der erste Aminosäurerest ist in 12 Uhr-Stellung und die folgenden Aminosäuren sind als Speichen mit 3,6 Aminosäuren pro Windung im Uhrzeigersinn aufgetragen.

Die Beobachtung, dass die genaue Aminosäuresequenz das Insertionsverhalten des $\alpha 1$ -cyto-Peptids definiert, steht im Gegensatz zu dem Befund, dass vom Protein MARCKS abgeleitete Peptide mit identischer Ladung aber unterschiedlicher Aminosäureanordnung mit gleicher Affinität an $PI(4,5)P_2$ binden [Wang *et al.* 2002]. Analog detektierten Bucki und Kollegen übereinstimmende membranpermeante Eigenschaften für ein von Gelsolin abgeleitetes Peptid, dessen scrambled-Variante und dessen D-Enantiomer [Bucki *et al.* 2004]. Für das antimikrobielle Peptid PBP10 konnte hingegen -in Übereinstimmung mit den hier erhobenen Daten- eine veränderte PIP-Bindung nach der Permutation der Aminosäuresequenz des Peptids gezeigt werden [Cunningham *et al.* 2001].

Das N-terminale KIGFFKR-Motiv und die C-terminale PLKKKMEK-Sequenz weisen ein distinktes Membraninsertionsverhalten auf

Um die Membraninsertionsaktivität innerhalb der $\alpha 1$ -cytoplasmatischen Domäne zu lokalisieren, wurden die kurzen Integrinpeptide KIGFFKR und PLKKKMEK ebenfalls für die Langmuir-Studien eingesetzt. Diese präsentieren den N- bzw. C-terminalen Anteil der $\alpha 1$ -cytoplasmatischen Sequenz. Das KIGFFKR-Peptid inserierte wie das $\alpha 1$ -cyto-Peptid in die Langmuir-Filme, womit frühere Studien bestätigt werden, welche die Interaktion des Phe₉₉₂-Phe₉₉₃-Duetts innerhalb des KxGFFKR-Motivs der cytoplasmatischen Domäne der $\alpha 1$ -Integrinkette mit den unpolaren Fettsäurekomponenten der Phospholipide beschrieben [Wimley & White 1996, Vinogradova *et al.* 2004, Lau *et al.* 2008b, Zhu *et al.* 2009]. Die Membraninsertion des KIGFFKR-Peptids erfolgte ebenfalls kopfgruppenabhängig, jedoch

gegenüber dem $\alpha 1$ -cyto-Peptid vermehrt in die schwach geladenen PC:PS (85:15)- und geringer in die stärker negativ-geladenen 2% PI(3,4,5)P₃-, 5% PI(3,4,5)P₃- und 5% PI(4,5)P₂-haltigen Einschichtmembranen. Die maximalen $\Delta\pi$ -Werte für die Insertion des KIGFFKR-Peptids in PC:PS (50:50)- oder 2% PI(4,5)P₂-enthaltende Filme waren verglichen mit denen des $\alpha 1$ -cyto-Peptids zwar identisch, jedoch fiel insbesondere die 2% PI(4,5)P₂-Kurve nach dem erreichten Maximum ab. Die Insertion des KIGFFKR-Peptids in Langmuir-Filme wurde außerdem in der Regel weniger als die des $\alpha 1$ -cyto-Peptids durch Salze und Phosphat gehemmt. Diese Beobachtungen erlauben den Schluss, dass das KIGFFKR-Peptid mehr hydrophobe und weniger ionische Interaktionen mit den Langmuir-Filmen einging als das $\alpha 1$ -cyto-Peptid. In Anbetracht der in den Langmuir-Filmen verwendeten Lipide Dimyristoyl-PC und -PS wäre das Rückgrat des KIGFFKR-Peptids ausreichend lang, um sich senkrecht in die Einschichtmembran einzulagern. Somit könnten die zentralen hydrophoben Reste mit den Fettsäuren der Phospholipide wechselwirken, während die positiv-geladenen Lysin- bzw. Argininreste einerseits in die Luftphase ragen und andererseits mit den Kopfgruppen interagieren könnten. Diese Annahme einer senkrechten Einlagerung des KIGFFKR-Peptids in die Langmuir-Filme geht konform mit aktuellen Veröffentlichungen [Stefansson *et al.* 2004, Wegener & Campbell 2008], die eine Ausweitung der Transmembranhelix der α -Integrinketten bis hinein zu deren GFF-Sequenz postulieren.

Das gegenüber dem KIGFFKR-Peptid veränderte Insertionsverhalten des $\alpha 1$ -cyto-Peptids impliziert zudem eine Rolle der im $\alpha 1$ -cyto-Peptid vorhandenen, C-terminalen PLKKKMEK-Sequenz. Für das PLKKKMEK-Peptid hingegen wurde trotz dessen hoher positiver Ladung keine Membraninsertion detektiert. Dies spricht für einen peripheren Anlagerungsprozess des PLKKKMEK-Peptids, da die für die Membraninsertion nötigen aromatischen oder unpolaren Aminosäurereste nicht in ausreichender Zahl vorhanden waren [Montich *et al.* 1993, Ben-Tal *et al.* 1996, Maget-Dana *et al.* 1999, Rusu *et al.* 2004, Rosenhouse-Dantsker & Logothetis 2007]. Somit inserierte das PLKKKMEK-Motiv zwar nicht eigenständig in die Einschichtmembran. Durch seine Präsenz wurde die KIGFFKR-vermittelte Insertion des $\alpha 1$ -cyto-Peptids in geladene PI(4,5)P₂- oder PI(3,4,5)P₃-Filme jedoch verstärkt und stabilisiert, als auch jene in PC:PS (85:15)-haltige Filme verhindert. Daraus folgt, dass das konservierte KxGFFKR-Motiv in allen α -Integrinketten deren Eintauchen in die Plasmamembran stimulieren könnte (siehe oben). Da sich diesem Motiv jedoch nur in der $\alpha 1$ -UE ein positiv-geladener Abschnitt in Form der PLKKKMEK-Sequenz anschließt, ist die in dieser Arbeit charakterisierte Membranassoziation als spezi-

fisch für die $\alpha 1$ -cytoplasmatische Sequenz zu betrachten. Diese ist mit einer Nettoladung von +6 einzigartig; andere intrazelluläre Domänen der α -Integrinketten sind un- oder negativ-geladen oder besitzen eine positive Nettoladung von maximal +4. Zu den letztgenannten zählen die $\alpha 3$ -, die $\alpha 11$ - und die αE -Kette [Gahmberg *et al.* 2009]. Aus diesem Grund wäre von keiner anderen α -intrazellulären Domäne eine der $\alpha 1$ -UE vergleichbare Membraninsertion in die verwendeten PI(4,5)P₂- und PI(3,4,5)P₃-haltigen Filme zu erwarten.

Zelluläre Bedeutung der Integrin-Lipid-Interaktion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bindung eines von der $\alpha 1$ -cytoplasmatischen Sequenz abgeleiteten Peptids an PI(4,5)P₂ und PI(3,4,5)P₃ mithilfe von *in vitro*-Experimenten beschrieben. Die erhaltenen Ergebnisse besitzen jedoch auch eine Relevanz *in vivo*. Zum einen besitzt die cytoplasmatische Seite der Plasmamembran ein negatives elektrostatisches Potential von etwa -30 mV [McLaughlin 1977, 1989], zum anderen werden PI(4,5)P₂ und PI(3,4,5)P₃ durch die PIPK I γ bzw. PI3-K in räumlicher Nähe von Integrinen [Cantley 2002, Ling *et al.* 2002] oder gar integrinabhängig generiert [Chellaiah 2006]. Bislang lagen jedoch noch keine Studien vor, die sich mit der direkten Bindung von Integrinen an PIPs beschäftigen haben. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen nun, dass die $\alpha 1$ -cytoplasmatische Sequenz in Abhängigkeit von der Kopfgruppe und der Konzentration von PI(4,5)P₂ bzw. PI(3,4,5)P₃ sowie der Ionenstärke in Membranen inserieren kann. Dadurch kann die Zugänglichkeit von PI(4,5)P₂ und PI(3,4,5)P₃ für andere Proteinbindungspartner, insbesondere in den fokalen Adhäsionen, eingeschränkt werden [McLaughlin & Murray 2005]. Eine variable Membraninsertion der $\alpha 1$ -cytoplasmatischen Sequenz reguliert jedoch auch deren eigene Verfügbarkeit für cytosolische und laterale Protein-Protein-Interaktionen. Demzufolge könnten durch die PIP-Bindung der $\alpha 1$ -cytoplasmatischen Sequenz auch das Recycling, die Aktivierung und das *Signalling* des $\alpha 1\beta 1$ -Integrinrezeptors direkt oder indirekt beeinflusst werden (siehe unten), was es in zukünftigen Studien zu untersuchen gilt. Der Aspekt der Modulierung der Konformation der $\alpha 1$ -cytoplasmatischen Sequenz durch deren Lipidbindung wird in dem darauf folgenden Abschnitt diskutiert.

Das Phänomen, dass integrale Membranproteine durch die Bindung an PIPs in ihrer Struktur und Funktion reguliert werden, wurde bereits für Ionenkanäle [Huang *et al.* 1998, Zhang, H. *et al.* 1999, Soom *et al.* 2001, Lopes *et al.* 2002, Rohacs *et al.* 2003, Michailidis *et al.* 2007, Rosenhouse-Dantsker & Logothetis 2007], NMDA- und Acetylcholinrezeptoren [Gambhir *et al.* 2004, Fernandez-Carvajal *et al.* 2006], den Immunzellrezeptorkomplex MIRR [Sigalov *et*

al. 2006] und den ErbB1/EGF-Rezeptor [McLaughlin *et al.* 2005b] demonstriert. Neben der Modulation der Proteinaktivität steuert PI(4,5)P₂ auch das Recycling von Oberflächenrezeptoren [Itoh *et al.* 2001, Huang *et al.* 2004, Kim, S. *et al.* 2006]. Darüber hinaus steuert in Mikrodomänen befindliches PI(4,5)P₂ die gezielte Membranlokalisierung von Cadherinen während der epithelialen Morphogenese [Schill & Anderson 2009].

Auch in der Aktivierung des $\alpha 1\beta 1$ -Integrins könnten die distinkten, PIP-spezifischen membranpermeanten Eigenschaften der $\alpha 1$ -cytoplasmatischen Sequenz eine Rolle spielen. In den bislang vorgeschlagenen Modellen zur Integrinaktivierung (1.2.4) wird eine räumliche Umorientierung der Transmembran- und der cytoplasmatischen Domänen und deren veränderte Membranassoziation postuliert [Wegener & Campbell 2008]. Diese Vorgänge könnten durch eine spezifische PIP-Umgebung des $\alpha 1\beta 1$ -Integrins beeinflusst werden. Bei der *Inside-out*-Aktivierung von Integrinen kommt darüber hinaus dem Protein Talin eine große Bedeutung zu, indem es mit der FERM-Domäne seiner Kopfreion mit der tyrosinphosphorylierten, cytoplasmatischen Domäne der β -Integrinkette interagiert und so deren Assoziation mit der α -UE unterbricht [Gottschalk 2005, Wegener *et al.* 2007]. Die Bindung an die β -Kette wird durch die PI(4,5)P₂-induzierte Konformationsveränderung von Talin verstärkt [Martel *et al.* 2001]. In Anbetracht der Größe der Talinkopfdomäne von 50 kDa [Critchley & Gingras 2008] und der beschriebenen Interaktion der $\alpha 1$ -cytoplasmatischen Domäne mit Talin [Loster *et al.* 2001], könnte deren Fähigkeit, an PI(4,5)P₂ und PI(3,4,5)P₃ zu binden, einen zusätzlichen, bislang unbekanntem Aspekt in der Talin-vermittelten *Inside-out*-Aktivierung von Integrinen darstellen.

Nur wenige Studien haben bisher die Bedeutung von PIP-Molekülen bei der integrinvermittelten Signaltransduktion untersucht. Beispielsweise berichteten Powner und Kollegen, dass PA und PI(4,5)P₂ die $\beta 1$ - und $\beta 2$ -Integrin-vermittelte Adhäsion regulieren [Powner *et al.* 2005]. Die Rolle von PIPs in der bidirektionalen integrinabhängigen Signalweitergabe wurde insbesondere indirekt über die Bedeutung von PIP-metabolisierenden Enzymen gezeigt. So ist die negative Regulation integrinvermittelter Zellspreitung, -migration und -invasion sowie die Errichtung von fokalen Adhäsionen durch die 3'-Phosphatase PTEN durch deren Phosphataseaktivität gegenüber dem Lipid PI(3,4,5)P₃ und gegenüber Proteinen wie FAK, Shc und Fyn vielfach beschrieben [Gu *et al.* 1998, Maehama & Dixon 1998, Stambolic *et al.* 1998, Tamura *et al.* 1998, Tamura *et al.* 1999, Dey *et al.* 2008]. Der 5'-Inositol- und Proteinphosphatase SHIP konnte ebenfalls eine Rolle bei der integrinabhängigen Zelladhäsion von Leukozyten und Thrombozyten zugeordnet werden [Rey-Ladino *et al.* 1999,

Maxwell *et al.* 2004]. Die Tyrosinphosphorylierung und die Translokation von SHIP ihrerseits erfolgen in thrombinstimulierten Thrombozyten wiederum integrinvermittelt [Giuriato *et al.* 1997]. Desweiteren wurde ein positiv modulierender Einfluss der PI3-Kinase auf die Ligandenaffinität der Integrine α IIB β 3, α v β 3, α 5 β 1 und α 4 β 1 sowie der β 2-Integrine gezeigt [Franke *et al.* 1997, Gratacap *et al.* 1998, Pasquet *et al.* 1999, Constantin *et al.* 2000, Barazi *et al.* 2002, Piccio *et al.* 2002, Woulfe *et al.* 2002, Feigelson *et al.* 2003, Glodek *et al.* 2003, Paul *et al.* 2003, Watanabe *et al.* 2003, Jackson *et al.* 2004]. Die Signaltransduktion erfolgt dabei in Abhängigkeit der Lipidkinaseaktivität der PI3-Kinase über Rap1 und Akt oder aber Akt-unabhängig [Schoenwaelder *et al.* 2007]. Neben der Modulierung der Ligandenaffinität konnte die Beteiligung der PI3-Kinase an dem integrinvermittelten *Signalling* ebenfalls demonstriert werden [Mazzucato *et al.* 2002, Nesbitt *et al.* 2002, Yap *et al.* 2002]. Diese ambivalenten Effekte der PI3-Kinase können durch spezifische und einander ergänzende Funktionen verschiedener PI3-Kinase-Isoformen erklärt werden [Sujobert *et al.* 2005, Zhao *et al.* 2006, Ferguson *et al.* 2007, Schoenwaelder *et al.* 2007].

Es bleibt zu untersuchen, welche funktionelle Bedeutung die Membranassoziation der α 1-cytoplasmatischen Sequenz für die α 1 β 1-Integrin-vermittelte Signaltransduktion hat und in welchem Zusammenhang deren Lipidbindung mit den für die Deletionsmutanten der α 1-Kette beschriebenen, zellulären Effekten steht. So adhäreren, spreiten und migrieren CHO- α 1/GFFKR Zellen auf Kollagen verzögert [Vossmeier *et al.* 2000]. Die ektopische Expression konstitutiv-aktiver PI3-Kinase hat hierauf keinen Einfluss, im Gegensatz zu α 1/f.1.-exprimierenden CHO-Zellen, deren kollagenvermittelte Migration durch konstitutiv-aktive PI3-Kinase drastisch erhöht wird. Zudem wurde gezeigt, dass die C-terminale PLKKKMEK-Sequenz der α 1-cytoplasmatischen Domäne für die kollagenabhängige Rekrutierung der PI3-Kinase in die fokalen Adhäsionen und für die nachgeschalteten α 1 β 1-Integrin-induzierten Signalwege, die z.B. zu Zellmigration führen, benötigt wird [Smerling *et al.* 2007]. Während der Zellmigration und der Chemotaxis wird PI3-Kinase-abhängig ein PI(3,4,5)P₃-Gradient erzeugt, der vom vorderen zum hinteren Zellende (*leading* bzw. *rear edge*) abnimmt [Stephens *et al.* 2002, Dormann & Weijer 2003, Van Haastert & Devreotes 2004]. Die konzentrationsabhängige Insertion der α 1-cytoplasmatischen Sequenz in PI(4,5)P₂- und PI(3,4,5)P₃-haltige Langmuir-Filme weist darauf hin, dass diese Lipidinteraktionen einen konkreten Einfluss auf die α 1 β 1-Integrin-vermittelte Zellmigration ausüben könnten.

Die variable Membranassoziation der α 1-cytoplasmatischen Sequenz könnte die lateralen und cytoplasmatischen Proteininteraktionen der α 1-Kette dynamisch modulieren. So konnte

der assoziationsfördernde Effekt von PI(4,5)P₂ und PI(3,4,5)P₃ auf die Interaktion von α 1 β 1-Integrin mit PLC γ 1 in dieser Arbeit ebenfalls demonstriert werden (3.3 und 4.3). Neben der Förderung von Proteininteraktionen durch die Lipidbindung der α 1-Integrinkette muss zudem berücksichtigt werden, dass viele fokale Signalmoleküle und cytoskelettassoziierte Proteine, die mit Integrinen direkt assoziieren, selbst durch Bindung an PI(4,5)P₂ oder PI(3,4,5)P₃ reguliert werden. Dazu zählen die Proteine Vinkulin, Talin, α -Aktinin und Paxillin. α -Aktinin ist eines der Proteine, die eine Verbindung zwischen Aktinfilamenten und Integrinen herstellen [Blanchard *et al.* 1989, Otey *et al.* 1990, Pavalko & Burridge 1991]. α -Aktinin assoziiert, wie die α 1-cytoplasmatische Sequenz, mit PI(4,5)P₂ und PI(3,4,5)P₃, doch nur PI(3,4,5)P₃ unterbricht die Integrinbindung von α -Aktinin [Greenwood *et al.* 2000, Fraley *et al.* 2003, Corgan *et al.* 2004, Fraley *et al.* 2005, Kelly & Taylor 2005, Full *et al.* 2007]. Nähere Untersuchungen müssen klären, ob die Interaktion der α 1-cytoplasmatischen Domäne mit PI(3,4,5)P₃ in diese Vorgänge involviert ist und ob deren Assoziation mit PI(4,5)P₂ oder PI(3,4,5)P₃ möglicherweise kompetitiv in bestehende Protein-Lipid-Interaktionen eingreift.

Die Assoziation mit Phospholipiden führt zu Konformationsänderungen der α 1-Integrinpeptide

Die CD-Spektren der Integrinpeptide α 1-cyto, α 1-scrambled, KIGFFKR und PLKKKMEK wichen in Gegenwart von 3 mM SUVs aus PC:PS (50:50), 2% PI(4,5)P₂ oder 2% PI(3,4,5)P₃ von denen der reinen Peptidlösungen ab, was auf lipidinduzierte Konformationsänderungen in den Peptiden hinweist. Diese waren besonders deutlich in den Peptiden α 1-scrambled und KIGFFKR ausgeprägt, erfüllten jedoch nicht vollständig die Kriterien für die Sekundärstrukturelemente β -Faltblatt bzw. α -Helix. Die Quantifizierung der Sekundärstruktur mithilfe des ACDP-Programms erbrachte für alle Peptide, v.a. aber für das PI(3,4,5)P₃- bzw. das PI(4,5)P₂-induzierte Spektrum des α 1-scrambled- bzw. des KIGFFKR-Peptids, einen Zuwachs an β -Faltblattstruktur (nicht gezeigt). Jedoch waren die mit der Sekundärstrukturbestimmung assoziierten Fehler, die durch Abgleichung mit internen Referenzspektren entstehen, zu groß, um diese Berechnungen zu berücksichtigen; obgleich bereitet es allgemein Schwierigkeiten, mithilfe der verwendeten ACDP-Version die vorgeschlagenen RMS-Fehler zu erreichen. Dies ist auf die Probenbeschaffenheit, Pufferzusammensetzung und insbesondere die ungenaue Konzentrationsangabe der verwendeten Peptidlösung zurückzuführen [Greenfield 1996, A. Hofmann, persönliche Kommunikation]. Somit können die in Abschnitt 3.2.4 beschriebenen Ergebnisse nur als ein Hinweis auf eine PIP-bedingte Konformations-

änderung der Integrinpeptide gewertet werden. Mehrere Ursachen, die aus den angewandten experimentellen Bedingungen resultieren, sind für das Ausbleiben des Nachweises eines eindeutigen Konformationswechsels denkbar. So belegen mehrere Studien amphipathischer Peptide oder Proteine die Bedeutung sowohl der Oberflächenladung der Liposomen oder Lipidfilme als auch des eingesetzten Lipid-Peptid-Verhältnis' für einen lipidinduzierten Konformationswechsel ursprünglich ungefalteter Peptide. Hierzu gehören das antimikrobielle Peptid Penetratin, das Neuropeptid Substanz P, das Apolipoprotein A-I_m, bakterielle Toxine, das synthetische, kanalbildende Peptid (LARL)₃(LRAL)₃ und das mit Morbus Alzheimer assoziierte Amyloid Aβ(1-40)-Peptid [Lee *et al.* 1993, Seelig *et al.* 1996, Terzi *et al.* 1997, Bellet-Amalric *et al.* 2000, Suurkuusk & Singh 2000, Thoren *et al.* 2000, Drin *et al.* 2001, Magzoub *et al.* 2002, Tiewesiri *et al.* 2009]. Aus diesem Grund sollten zukünftige CD-Messungen der Integrinpeptide in Anwesenheit von SUVs durchgeführt werden, die höhere Konzentrationen an PI(4,5)P₂ oder PI(3,4,5)P₃, z.B. 5% oder 10% enthalten, da diese stärkere Konformationsänderungen hervorrufen könnten. Das in den CD-Messungen eingesetzte Lipid-Peptid-Verhältnis sollte ebenfalls variiert werden. Ferner könnten CD-Spektren der Integrinpeptide in einer Lösung, die Trifluorethanol (TFE) enthält, aufgenommen werden, da TFE als Membranmimetikum gilt und Sekundärstrukturen induziert [Buck *et al.* 1993, Sticht *et al.* 1994, Yang *et al.* 1994, Haas & Plow 1997]. Darüber hinaus muss auch der Beitrag der Transmembrandomäne an der Struktur der cytoplasmatischen Sequenz der α1-Kette in Betracht gezogen werden (siehe unten).

Die für die Integrinpeptide aufgenommenen CD-Spektren ermöglichen jedoch qualitative Aussagen. Zum einen waren die durch die SUVs hervorgerufenen spektralen Änderungen des α1-scrambled-Peptids größer als jene des α1-cyto-Peptids. Das α1-scrambled-Peptid übte desweiteren eine stärkere Membraninsertion aus (3.2.3). Zwischen diesen zwei Beobachtungen könnte ein Zusammenhang bestehen, wird doch die Einnahme einer definierten Sekundärstruktur als bestimmender Faktor für die Interaktion von Peptiden oder Proteinen mit Membranen postuliert [Maget-Dana & Lelievre 2001]. Desweiteren wurde das Spektrum eines Integrinpeptids durch SUVs, die PI(4,5)P₂ oder PI(3,4,5)P₃ enthielten, oft unterschiedlich verändert. Ein solcher PIP-spezifischer Einfluss auf die Proteinstruktur wurde für die CH2-Domäne von α-Aktinin bereits demonstriert. Obgleich die Bindungsstellen für PI(4,5)P₂ und PI(3,4,5)P₃ in der CH2-Domäne identisch sind, wird diese durch beide Moleküle strukturell und funktionell distinkt reguliert [Qin & Cafiso 1996, Greenwood *et al.* 2000, Fraley *et al.* 2003, Corgan *et al.* 2004, Full *et al.* 2007].

In der Literatur sind verschiedene Effekte der Lipidbindung auf die Struktur von Peptiden oder Proteinen beschrieben. So ist ein von der basischen Region des Proteins MARCKS abgeleitetes Peptid in Lösung unstrukturiert und bleibt es bei der Bindung an PS- oder PI(4,5)P₂-enthaltende Membranen [Qin & Cafiso 1996, Victor *et al.* 1999, Wang *et al.* 2001, Rauch *et al.* 2002, Ellena *et al.* 2003, Zhang *et al.* 2003]. Ebenso konnte in den cytoplasmatischen, basischen MIRR-Sequenzen während ihrer Bindung an negativ-geladene Lipidoberflächen keine Sekundärstruktur identifiziert werden [Sigalov *et al.* 2006]. Gleichwohl gibt es zahlreiche Veröffentlichungen, welche die Induktion einer α -Helix in amphipathischen oder basischen lipidbindenden Peptiden oder Proteinen berichten. Hierzu gehören einige antimikrobielle und cytotoxische Peptide [Cornut *et al.* 1993, Maget-Dana *et al.* 1999, Nittoli *et al.* 1999, Kweon *et al.* 2003] sowie Teilpeptide der Proteine Annexin A1 [Hu *et al.* 2008], Talin [Seelig *et al.* 2000] und Gelsolin [Liepina *et al.* 2003]. Zudem können Peptide mit alternierenden hydrophoben und hydrophilen Resten, wie es auch der Fall im α 1-scrambled-Peptid ist, in Lösung oder in Gegenwart von Membranen β -Faltblattstrukturen ausbilden, mit denen sie Membraninsertion ausüben [Bazzi *et al.* 1987, Maget-Dana & Ptak 1997, Maget-Dana & Lelievre 2001, Rotondi & Gierasch 2005, Bai *et al.* 2009]. Die Insertion von insbesondere antimikrobiellen Peptiden in Membranoberflächen kann auch über die Ausbildung einer β -Hairpin- oder einer β -Turn-Struktur erfolgen [Gross & Morell 1971, Buchman *et al.* 1988, Eisenhauer *et al.* 1992, Ehret-Sabatier *et al.* 1996]. Interessanterweise tritt die für die Integrinpeptide beobachtete, SUV-induzierte Verschiebung des kurzwelligen, negativen Minimums in Bereiche größerer Wellenlänge und Elliptizität auch in dem CD-Spektrum eines Peptids der B1-Domäne des Proteins G in Anwesenheit von 30% TFE auf. In Wasser ähnelte das Peptidspektrum unstrukturierter Zufallsknäuelkonformation. Die Autoren erklärten die TFE-induzierte Peptidkonformation als eine Stabilisierung der β -Hairpin-Struktur des Peptids [Blanco *et al.* 1994a]. Zukünftige CD-Messungen müssen nun ergründen, ob eine vergleichbare Situation bei den α 1-Integrinpeptiden ebenfalls vorliegen könnte.

Strukturuntersuchungen von TM- und cytoplasmatischen Integrindomänen in Lipidumgebung wurden bislang vorwiegend mit denen des α Ib β 3-Integrins sowie vereinzelt mit denen des α 5 β 1- bzw. α V β 3-Integrins durchgeführt und erbrachten konträre Strukturinformationen. Die Studien belegen jedoch den Einfluss, den die Lipid- bzw. Membranumgebung auf die Struktur und Lokalisation der TM- und der cytoplasmatischen Integrindomänen ausübt. Um die Umgebung der Plasmamembran zu simulieren, wurden CD- und NMR-spektroskopische Messungen in Lösungen durchgeführt, die TFE, DPC-Mizellen oder Phospholipid-

bizellen enthielten [Haas & Plow 1996, 1997, Vinogradova *et al.* 2000, Li *et al.* 2002, Vinogradova *et al.* 2002, Weljie *et al.* 2002, Vinogradova *et al.* 2004, Lau *et al.* 2008a, Lau *et al.* 2008b, Lau *et al.* 2009, Zhu *et al.* 2009].

Zum Vergleich mit der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchung der lipid-induzierten Konformationsänderung der α 1-cytoplasmatischen Sequenz sind insbesondere die Studien von Vinogradova *et al.* geeignet, da die Autoren für die strukturelle Analyse der cytoplasmatischen Sequenz der α I**b**-Integrinkette ein von dieser abgeleitetes Peptid, ebenfalls ohne TM-Bereich und ohne β -Partner, in DPC-Mizellen verwendeten [Vinogradova *et al.* 2000, Vinogradova *et al.* 2004]. Mithilfe von CD- und NMR-Spektroskopie wurde gezeigt, dass das α I**b**-cyto-Peptid eine kurze N-terminale α -Helix besaß und mit der KxGFF-Sequenz in die DPC-Mizellen eintauchte, was die für das separate KIGFFKR-Peptid der α 1-cytoplasmatischen Sequenz gefundene Membraninsertion stützt (3.1.3). Ein N-terminal myristoyliertes α I**b**-cyto-Peptid nahm in DPC-Mizellen hingegen durch Rückfaltung eine geschlossene Peptidkonformation ein, ermöglicht durch eine *Turn*-Struktur im Pro₉₉₈-Pro₉₉₉-Motiv²² [Vinogradova *et al.* 2000]. Analog penetrierte auch die membranproximale Region des β 3-cyto-Peptids in DPC-Mizellen. Diese induzierten in dem membran-distalen Bereich der β 3-cytoplasmatischen Sequenz zudem eine α -Helix [Vinogradova *et al.* 2004], womit eine frühere Studie [Li *et al.* 2002] bestätigt wurde.

Die Verwendung von Peptiden der reinen cytoplasmatischen Integrinsequenzen wirft die Frage auf, wie physiologisch dieser Versuchsansatz ist. Welchen Einfluss die Transmembranhelix (TMH) auf die Faltung und Organisation der cytoplasmatischen Integrindomänen ausübt, wird hierbei kontrovers diskutiert [Muir *et al.* 1994, Haas & Plow 1996, Weljie *et al.* 2002, Lau *et al.* 2009, Zhu *et al.* 2009]. Jüngste Strukturdaten und Computersimulationen, die für den kompletten α I**b** β 3-Integrinrezeptor und dessen vollständige TM-cyto-Region in Bizellen durchgeführt wurden, stützen zum einen das Konzept einer von der TMH unabhängigen Struktur der cytoplasmatischen Integrinsequenzen. Demnach endet die α I**b**-TMH bei dem als erste cytoplasmatische Aminosäure geltenden Lysinrest K₉₈₉. Dann folgt eine Umkehrung des Peptidrückgrats, durch die das benachbarte Phe₉₉₂-Phe₉₉₃-Motiv in Kontakt zur TMH gelangt [Wimley & White 1996, Lau *et al.* 2008a, Lau *et al.* 2008b, Lau *et al.* 2009, Zhu *et al.* 2009]. Laut Zhu *et al.* befindet sich der Glycinrest des GFFKR-Motivs in einem *Turn*, so dass dieses Motiv die Kontaktfläche zur β 3-cytoplasmati-

²² In der α 1-cytoplasmatischen Sequenz befindet sich nur ein Prolinrest.

schen Sequenz ausgebildet und dabei teilweise in die Membran eingebettet ist [Zhu *et al.* 2009]. Zum anderen demonstrieren frühere Studien die Bedeutung der Transmembrandomäne (TMD) für die Konformation der intrazellulären Integrindomänen. Beispielsweise wurden, je nachdem, wie viele der Aminosäurereste der TMD in den Peptiden der α I**b**-cytoplasmatischen Sequenz enthalten waren, für deren KxGFFKR-Motiv eine β -Faltblatt- oder eine α -Helix ermittelt [Haas & Plow 1997, Hwang & Vogel 2000]. Um dem eventuellen Einfluss der TMH der α 1-Integrinkette auf die Struktur deren cytoplasmatischen Sequenz Rechnung zu tragen, wurde eine PSIPRED-Strukturvorhersage für einen Ausschnitt der α 1-UE durchgeführt, der die cytoplasmatische und die TM-Region als auch vier extrazelluläre Reste umfasste (nicht gezeigt). Das PSIPRED-Programm [Jones 1999] schlug eine 28 Aminosäuren umfassende TMH vor, die bis zum zweiten Phenylalaninrest im konservierten GFFKR-Motiv reichte. Dies geht konform mit Berichten von Glykosylierungsstudien, in denen die Autoren zudem postulierten, dass die betreffenden Aminosäuren im Zuge der Integrinaktivierung bzw. durch die Bindung intrazellulärer Interaktionspartner ins Cytosol gezogen würden [Armulik *et al.* 1999, Stefansson *et al.* 2004, Luo *et al.* 2004b, Partridge *et al.* 2005]. Laut dem PSIPRED-Strukturmodell der α 1-cytoplasmatischen Sequenz würde das PLKKKM-Motiv zudem eine separate α -Helix einnehmen. Frühere Strukturvorhersagen für die α 1-cytoplasmatische Domäne schlugen je nach Algorithmus eine α -Helix bzw. eine β -Faltblatt-Struktur in der membranproximalen Region vor [Haas & Plow 1997]. Die Autoren schlossen jedoch nur elf Aminosäuren der TMD der α 1-Integrinkette in die Berechnungen mit ein und verwendeten andere Vorhersageprogramme. In jedem Fall muss in zukünftigen Strukturstudien auch der TM-Bereich der α 1-Kette einbezogen werden, um dessen Einfluss auf die α 1-cytoplasmatische Sequenz ermitteln zu können.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimente konzentrierten sich auf die α 1-cytoplasmatische Sequenz, ohne die β 1-cytoplasmatische Sequenz zu berücksichtigen. In Hinblick auf die Entklammerungshypothese der Integrinaktivierung (1.2.4) korrespondieren diese Versuchsbedingungen mit der Situation der getrennten cytoplasmatischen Integrindomänen im aktivierten Integrinzustand. Für das α I**b** β 3-Integrin gibt es Hinweise darauf, dass die Membraneinbettung der α I**b**- und deren Interaktion mit der β 3-cytoplasmatischen Sequenz sich gegenseitig ausschließen, da an beiden das GFFKR-Motiv der α I**b**-UE beteiligt ist [Wimley & White 1996, Vinogradova *et al.* 2002, Vinogradova *et al.* 2004, Lau *et al.* 2008a, Lau *et al.* 2008b, Lau *et al.* 2009, Zhu *et al.* 2009]. Zusätzlich wurde berichtet, dass Peptide der TM- und der cytoplasmatischen Domäne der α I**b**-Kette in einer Lösung mit

Peptiden der $\beta 3$ -cytoplasmatischen Sequenz als auch allein in simulierter Lipidumgebung dieselbe Struktur einnehmen, die mit einer Erhöhung des Sekundärstrukturanteils verbunden ist [Haas & Plow 1996, 1997, Hwang & Vogel 2000, Vinogradova *et al.* 2000, Vinogradova *et al.* 2002, Weljie *et al.* 2002, Vinogradova *et al.* 2004]. Aus diesem Grund sollte in Zukunft die Struktur der $\alpha 1$ - auch in Gegenwart von $\beta 1$ -Integrinpeptiden untersucht werden.

4.3 *Charakterisierung der Interaktion zwischen $\alpha 1\beta 1$ -Integrin und PLC $\gamma 1$*

Identifizierung der PH- und der C-SH2-Domäne der PLC $\gamma 1$ als Bindungsmodule für das $\alpha 1\beta 1$ -Integrin

In der vorliegenden Arbeit wurden im Rahmen von GST-*Pulldown*-Experimenten erstmals die PH- und die C-SH2-Domäne der PLC $\gamma 1$ als Bindungsepitope für $\alpha 1\beta 1$ -Integrin identifiziert (3.3.1). Damit wurde an frühere Studien angeknüpft, in denen die matrixabhängige Interaktion der PLC $\gamma 1$ mit dem $\alpha 1\beta 1$ - bzw. dem $\alpha 5\beta 1$ -Integrin demonstriert wurde [Vossmeyer *et al.* 2002, Choi *et al.* 2007].

Während die $\alpha 1$ -Kette ausschließlich mit der PH-Domäne der PLC $\gamma 1$ assoziierte, band die $\beta 1$ -Integrinuntereinheit sowohl an die PH- als auch an die C-SH2-Domäne. Die $\beta 1$ -Kette ergänzt damit die zahlreichen Proteinbindungspartner der C-SH2-Domäne. Zu diesen zählen insbesondere tyrosinphosphorylierte Wachstumsfaktorrezeptoren [Katan *et al.* 2003], aber auch die lösliche Tyrosinkinase FAK [Zhang, X. *et al.* 1999], das epitheliale, aktindegredierende Protein Villin [Tomar *et al.* 2006] sowie die Proteine AP180 und p115 [Han *et al.* 2002, Han *et al.* 2003], die in clathrinvermittelter Endocytose bzw. Vesikelfusion involviert sind. Die Identifizierung der PH-Domäne als Bindungspartner des $\alpha 1\beta 1$ -Integrins ist insofern besonders, da PH-Domänen primär Lipidbindung vermitteln. Nur wenige Protein-Interaktionen sind bislang für PH-Domänen generell [Maffucci & Falasca 2001, Balla 2005], als auch für die PH-Domäne der PLC $\gamma 1$ speziell, bekannt. Letztere umfassen die leichte Neurofilamentkette [Kim, S. K. *et al.* 2006] und β -Tubulin [Chang *et al.* 2005].

Die in dieser Arbeit gefundene Assoziation der $\beta 1$ -Integrinuntereinheit mit der PH- und der C-SH2-Domäne wurde weniger als jene der $\alpha 1$ -Kette mit der PH-Domäne durch eine steigende Ionenstärke beeinflusst, wie Untersuchungen mit verschiedenen NaCl-Konzentrationen ergaben. Die beiden Integrinketten unterschieden sich darüber hinaus in ihrem Bindungsverhalten gegenüber den PH-Domänen von Akt, PLC $\beta 1$ und PLC $\delta 1$. In PH-Domänen gilt die

räumliche, nicht aber die primäre Struktur als konserviert [Balla 2005]. Da die $\alpha 1$ -UE an keine der weiteren genannten PH-Domänen band, deutet dies darauf hin, dass für ihre Interaktion mit der PH-Domäne der PLC $\gamma 1$ deren spezifische Aminosäuresequenz benötigt wurde. Die $\beta 1$ -Kette hingegen assoziierte mit den PH-Domänen der PLC-Isoformen $\gamma 1$ und $\delta 1$, so dass hier ein anderes Bindungsprinzip als bei der $\alpha 1$ -UE vorliegen könnte.

Neben der Identität der PH-Domäne wurde auch die Bedeutung der Lipidbindung von PLC $\gamma 1$ -PH für die Bindung an $\alpha 1\beta 1$ -Integrin untersucht. Hierfür wurden die mutierten PH-Konstrukte PH 3/4 und PH 6/7 eingesetzt, deren PI(3,4,5)P $_3$ -Bindung um 85% bzw. 18% herabgesetzt ist [Falasca *et al.* 1998]. Die Bindung beider Integrinketten an das mutierte PH-Konstrukt 6/7 war hierbei deutlich gegenüber der PH-Wildtyp-Domäne reduziert, die der PH 3/4-Variante war sogar vollständig inhibiert (3.3.3.1). Demnach wurden die beiden Schleifen $\beta 3$ - $\beta 4$ sowie $\beta 6$ - $\beta 7$ der PLC $\gamma 1$ -PH-Domäne bzw. deren Lipidinteraktion für die Interaktion mit $\alpha 1\beta 1$ -Integrin benötigt. Anders als bei dem $\alpha 1\beta 1$ -Integrin war die Bindung von FAK an die PH 6/7-Mutante gegenüber der Wildtyp-Domäne unverändert. Somit stellte die reduzierte Bindung von $\alpha 1\beta 1$ -Integrin an die PH-Domäne nach Substitution von deren $\beta 6$ - $\beta 7$ -Schleife ein integrinspezifisches Ereignis dar und weist darauf hin, dass diese Schleife an der Interaktion mit dem Integrin beteiligt ist. Zwar sind Proteininteraktionen von PH-Domänen bislang v.a. für deren C-terminale α -Helix bekannt [Balla 2005], es wurden jedoch ebenfalls bereits die $\beta 4$ - $\beta 5$ - und die $\beta 6$ - $\beta 7$ -Schleife als Bindungsloci beschrieben [Lodowski *et al.* 2003]. Im Gegensatz zu dem hier für das $\alpha 1\beta 1$ -Integrin dargestellten Befund ist die Assoziation des EGFR mit der PLC $\gamma 1$ von Mutationen in deren PH-Domäne unbeeinträchtigt, weil sie über die SH2-Domänen der PLC $\gamma 1$ erfolgt [Matsuda *et al.* 2001].

Mithilfe von aufgereinigten, ^{15}N -markierten Domänen der PLC $\gamma 1$ und von Peptiden der cytoplasmatischen Sequenzen der $\alpha 1$ - und der $\beta 1$ -Integrinuntereinheit wurden im weiteren NMR-spektroskopische Messungen in Lösung durchgeführt, um anhand von Änderungen der chemischen Verschiebungen der Domänen die gefundenen Interaktionen zu bestätigen und bindungsrelevante Reste zu identifizieren (3.3.2) [Bonvin *et al.* 2005]. Hierbei konnten bis auf eine Ausnahme keine Signalverschiebungen und damit Interaktionen der Peptide der cytoplasmatischen Integrindomänen mit den PLC $\gamma 1$ -Domänen nachgewiesen werden (Tabelle 3.1). Einzig bei der Vermessung der N+C-SH2-Domäne mit einer Kombination aus dem $\beta 1$ -2- und dem $\beta 1$ -3-Peptid traten leichte Verschiebungen auf. In zukünftigen Unter-

suchungen muss nun eine eventuelle, peptidbedingte pH-Wertänderung²³ ausgeschlossen und diese Interaktion bestätigt werden. Die Tatsache, dass keine die β 1-cytoplasmatische Sequenz betreffenden Interaktionen mit der PH- und der C-SH2-Domäne detektiert werden konnten, kann zum einen in der willkürlichen Wahl der zu kurzen β 1-Peptide begründet sein, die ein mögliches Bindungsepitop ausschließen. Zum anderen konnte mit dem β 1-1-Peptid aufgrund dessen Hydrophobizität der potentielle Bindungslocus der PLC γ 1 [Vossmeier *et al.* 2002] nicht für die NMR-Messungen eingesetzt werden. Vorstellbar wäre unter Einbeziehung der dem β 1-1-Peptid entsprechenden Sequenz ein Mechanismus, in dem der membranproximale Bereich der β 1-Kette sowohl an die PH- und die C-SH2-Domäne bindet, als auch die Interaktion der PH-Domäne mit der α 1-cytoplasmatischen Sequenz vermittelt. Möglich ist zudem, dass die bei den Peptiden fehlenden Ekto- und TM-Sequenzen der Integrinketten eine Bedeutung für die PLC γ 1-Bindung haben. Hierfür spricht auch, dass die intrazelluläre Interaktion des α 1 β 1-Integrins mit PLC γ 1 nach dessen Aktivierung durch extrazelluläre KIV-Bindung erfolgte [Vossmeier *et al.* 2002]. Der Befund, dass *in vitro* keine direkte Bindung zwischen Integrinpeptiden und PLC γ 1-Domänen detektiert werden konnte, könnte daneben auch durch den indirekten Charakter ihrer Interaktion zustande kommen. Dagegen spricht jedoch, dass die Assoziation von α 1 β 1-Integrin und PLC γ 1 auch unabhängig von FAK, einem bekannten Integrin- und PLC γ 1-Bindungspartner, detektiert wurde (3.3.1). Desweiteren wurden bereits fokale Adhäsionsproteine wie Talin, Paxillin, Pyk2, α -Aktinin und FAK als Vermittler der Interaktion zwischen α 1 β 1-Integrin und PLC γ 1 ausgeschlossen [Vossmeier *et al.* 2002]. Zwar besteht die Möglichkeit der Existenz bisher unbekannter Mittlerproteine, doch zeigten Choi und Kollegen die Interaktion von PLC γ 1 und der β 1-cytoplasmatischen Sequenz ebenfalls anhand von gereinigten Proteinen [Choi *et al.* 2007]. Daneben ist zu berücksichtigen, dass die Interaktion zwischen α 1 β 1-Integrin und PLC γ 1 intrazellulär an der Grenzfläche zwischen Plasmamembran und Cytosol stattfindet, so dass sie durch Membranlipide beeinflusst werden könnte. So wurde die GST-Pulldown-Analyse mit Zelllysat durchgeführt, in dem die Integrine vermutlich partiell in Lipidumgebung erhalten blieben, wodurch ihre Interaktion mit PLC γ 1 gefördert werden konnte. PIPs wurden bislang in NMR-Messungen aufgrund des zu erwartenden Störsignals nicht einbezogen.

²³ Die Peptidlösungen besaßen bedingt durch ihre Synthese einen stark sauren pH-Wert.

Einfluss von PIPs auf die Interaktion zwischen $\alpha 1\beta 1$ -Integrin und PLC $\gamma 1$

GST-Pull-down-Experimente unter Verwendung der PH-Mutante 3/4 demonstrierten die Bedeutung der Lipidbindung der PH-Domäne der PLC $\gamma 1$ für deren Bindung an beide Unter-einheiten des $\alpha 1\beta 1$ -Integrins (3.3.3). Mithilfe der Co-IP konnte zudem gezeigt werden, dass Liposomen, welche die negativ-geladenen Phospholipide PS, PI(4,5)P₂ und/oder PI(3,4,5)P₃ enthielten, die Assoziation zwischen $\alpha 1\beta 1$ -Integrin und PLC $\gamma 1$ stärkten. Dies geht zum einen konform mit dem Vorschlag, dass die $\alpha 1$ -cytoplasmatische Sequenz eine Rolle in der Signalweiterleitung hin zu PLC $\gamma 1$ und PI3-Kinase ausübt und dass die PI3-Kinase als vorgeschalteter Aktivator der PLC $\gamma 1$ wirkt [Vossmeier *et al.* 2002]. Zum anderen decken sich die Befunde einer lipidvermittelten Interaktion zwischen $\alpha 1\beta 1$ -Integrin und PLC $\gamma 1$ mit den in dieser Arbeit für die $\alpha 1$ -cytoplasmatische Domäne identifizierten Lipidinteraktionen (3.2), die von der negativen Lipidoberflächenladung abhängen. Lipidvermittelte Interaktionen der PLC $\gamma 1$ mit dem nukleären Phosphoprotein AHNAK [Sekiya *et al.* 1999a, Lee *et al.* 2004] und dem mikrotubuliassoziierten, neuronalen Protein Tau sind bereits bekannt [Hwang *et al.* 1996]. In beiden Fällen binden und aktivieren AHNAK bzw. Tau konzentriert mit Arachidonsäure an PLC $\gamma 1$, unabhängig von deren Tyrosinphosphorylierung. Darüber hinaus wurden Lipidinteraktionen für einige Domänen der PLC $\gamma 1$, ebenfalls unabhängig von der Tyrosinphosphorylierung letzterer, ermittelt. So binden die PH- und die C-SH2-Domäne an PI(3,4,5)P₃ [Bae *et al.* 1998, Falasca *et al.* 1998, Rameh *et al.* 1998], die N-sPH-Domäne assoziiert mit PI(4)P und PI(4,5)P₂ [Chang *et al.* 2002], und die C2-Domäne vermittelt die calciumabhängige Interaktion mit Phospholipiden [Davletov & Sudhof 1993]. Den für die PLC $\gamma 1$ beschriebenen Lipidinteraktionen wird eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der PLC $\gamma 1$ bei geringer oder fehlender Tyrosinphosphorylierung zugesprochen [Carpenter & Ji 1999, Sekiya *et al.* 1999b].

Um den Einfluss von PI(3,4,5)P₃, dem bevorzugten Lipidbindungspartner von gleichermaßen PH-Domäne der PLC $\gamma 1$ und $\alpha 1$ -cytoplasmatischer Sequenz, auf die Interaktion dieser beiden Moleküle zu untersuchen, wurde eine native PAGE mit Liposomen durchgeführt [Suurkuusk & Singh 2000]. Hierbei zeigte sich, dass die Interaktion zwischen gereinigter PH-Domäne und $\alpha 1$ -cyto-Peptid in Lösung sehr schwach war, dass sie durch die Gegenwart negativ-geladener PC:PS-haltiger Liposomen jedoch stimuliert und noch weiter verstärkt wurde, wenn diese 2% PI(3,4,5)P₃ enthielten. Demnach könnte PI(3,4,5)P₃ bewirken, dass die beiden Bindungsepitope auf einen zellulären Stimulus hin, der die PI3-Kinase aktiviert, in räumliche Nähe zueinander gelangen, wie es auch der Fall für PDK1 und Akt bzw. PKC der Fall ist

[Newton 2003, Scheid & Woodgett 2003]. Eine PI(4,5)P₂-geförderte Assoziation sowohl der PH-Domäne der PLC γ 1 mit der leichten Neurofilamentkette, als auch ihrer sPH-Domäne mit dem Elongationsfaktor EF1 α , wurde bereits beschrieben [Chang *et al.* 2002, Kim, S. K. *et al.* 2006]. EF1 α bindet hierbei PI(4,5)P₂ selbst nicht [Chang *et al.* 2002].

Wie der trimolekulare Komplex aus PH-Domäne, α 1-cytoplasmatischer Sequenz und PI(3,4,5)P₃ gebildet wird und aufgebaut ist, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen. Für die PH-Domäne von β -ARK ist bereits bekannt, dass sie mit dem G _{$\beta\gamma$} -Komplex und mit PI(4,5)P₂ gleichzeitig interagieren kann [Harlan *et al.* 1994, Touhara *et al.* 1994]. Dies ist Voraussetzung für die effektive Membranassoziation und die Aktivierung von β -ARK [Pitcher *et al.* 1995]. Ein ähnlicher kooperativer Mechanismus aus PIP- und Proteinbindung wurde für die PH-Domänen von PLC β 1 [Wang *et al.* 1999, Razzini *et al.* 2000] und Dbl [Russo *et al.* 2001] beschrieben und könnte auch für die Komplexbildung der PH-Domäne der PLC γ 1 mit PI(3,4,5)P₃ und der α 1-cytoplasmatischen Sequenz vorliegen. Weil die PI(3,4,5)P₃-Bindung der PH-Domäne der PLC γ 1 alleine als zu unspezifisch für die Membranrekrutierung gilt, werden gemeinhin PIP-Protein-Kooperationsmechanismen postuliert. Demnach muss die Lipidbindung der PH-Domäne durch zusätzliche Protein-Protein-Interaktionen des Moleküls bzw. der Domäne selbst, beispielsweise mit Rezeptortyrosinkinasen, verstärkt werden, um eine spezifische und stabile Membranlokalisation des beherbergenden Enzyms zu bewirken [Maffucci & Falasca 2001]. Hierfür könnten die cytoplasmatischen Sequenzen der Integrine ebenfalls eine wichtige Rolle spielen.

PLC γ 1 reguliert die α 1 β 1-Integrin-abhängige Zellmorphologie und Zellmigration in Abhängigkeit von den cytoplasmatischen Integrinsequenzen

Mithilfe von Migrationsversuchen und Immunfluoreszenzstudien wurde die funktionelle Bedeutung der Interaktionen zwischen den cytoplasmatischen Integrinsequenzen mit der PH- und der C-SH2-Domäne der PLC γ 1 bei dem α 1 β 1-Integrin-abhängigen *Signalling* untersucht (3.3.4). Die gegenüber den CHO- α 1/f.1. Zellen in den CHO- α 1/K Zellen beobachtete verzögerte Zellspreitung und -migration auf einer Kollagenmatrix stimmt mit früheren Studien überein [Vossmeyer *et al.* 2000]. Bislang war die Rolle der PLC γ 1 in der α 1 β 1-Integrin-vermittelten Zelladhäsion bekannt [Vossmeyer *et al.* 2002]. Mithilfe des PLC γ 1-Inhibitors U73122 wurde in dieser Arbeit die Bedeutung der PLC γ 1 für die α 1 β 1-Integrin-abhängige Zellmotilität ebenfalls gezeigt. Die Wirkung von U73122 war hierbei vergleichbar mit der auf die EGF-stimulierte Zellmigration [Chen *et al.* 1994]. Die Bedeutung der PLC γ 1 für die

$\alpha 5\beta 1$ - bzw. $\beta 1$ -Integrin-abhängige Zellspreitung und -migration von Endothelzellen auf FN oder Basallamina wurde bereits demonstriert [Jones *et al.* 2005, Tvorogov *et al.* 2005, Choi *et al.* 2007].

Die $\alpha 1\beta 1$ -Integrin-abhängige Migration in CHO- $\alpha 1$ -Zellen wurde ebenfalls durch die ektopische Expression der PH-Domäne von PLC $\gamma 1$ reduziert. Dies kann durch die unregulierte und unkoordinierte Ausstülpung von Lamellipodien sowie die unzureichende Ausbildung des Aktincytoskeletts zustande kommen, was eine gerichtete und effektive Zellmigration verhindert. Das lipidbindungsdefiziente PH 3/4-Konstrukt, dessen Bindung an das $\alpha 1\beta 1$ -Integrin im GST-Pull-down ausblieb, inhibierte die Zellmigration auf KIV nur gering. Dies spiegelt die Bedeutung der Bindung der transfizierten Wildtyp-PH-Domäne an PI(3,4,5) P_3 und an das $\alpha 1\beta 1$ -Integrin für deren dominant-negativen Einfluss auf die $\alpha 1\beta 1$ -Integrin-abhängige Motilität wider. Die mit GFP-PH 3/4 transfizierten Zellen besaßen jedoch kein vektorähnliches Erscheinungsbild, was auf zusätzliche Protein-Protein-Interaktionen dieses PH-Konstrukts hinweist, die zwar die Zellmorphologie, nicht aber die Zellmigration beeinflussen. Die KIV-abhängige Migration von CHO- $\alpha 1$ /f.l. Zellen wurde durch Expression der PH 6/7-Mutante, die PI(3,4,5) P_3 weiterhin binden kann, stärker inhibiert als durch die Wildtyp-PH-Domäne, was nicht mit den Bindungsdaten übereinstimmt. Demnach scheinen jedoch beide Stränge der PH-Domäne der PLC $\gamma 1$, $\beta 3$ - $\beta 4$ und $\beta 6$ - $\beta 7$, für die Vermittlung von $\alpha 1\beta 1$ -Integrin-abhängiger Zellmigration benötigt zu werden. Die Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen liefern keine Erklärung für den migrationsinhibierenden Effekt des PH 6/7-Konstrukts. Da diese Mutante die Migration in den CHO- $\alpha 1$ /GFFKR Zellen in gleichem Maß wie die Wildtyp-PH-Domäne senkte, scheint die membrandistale PLKKKMEK-Sequenz der $\alpha 1$ -Kette für den migrationsinhibierenden Einfluss des PH 6/7-Konstrukts auf die CHO- $\alpha 1$ /f.l. Zellen von Bedeutung zu sein.

Die Hemmung der Zellmigration durch überexprimierte PLC $\gamma 1$ -PH-Domäne ist in Einklang mit Studien von Piccolo und Kollegen, nach denen deren stabile Expression die Zelladhäsion fördert und die EGF-induzierte Zellmotilität hemmt [Piccolo *et al.* 2002]. Für den transdominanten Effekt der ektopisch exprimierten PH-Domäne auf das $\alpha 1\beta 1$ -Integrin-vermittelte *Signalling* sind verschiedene Wirkungspunkte denkbar. Zum einen kann diese durch Bindung an das für die Zellmigration essentielle PI(3,4,5) P_3 dessen Zugänglichkeit für cytoskeletale oder Signalproteine verhindern. Zweitens können intrazelluläre Protein-Protein-Interaktionen, an denen die PH-Domäne der PLC $\gamma 1$ beteiligt ist, inhibiert werden. Der Befund, dass die PH-Domänen von PLC $\beta 1$ und PLC $\delta 1$ die Migration von CHO- $\alpha 1$ /f.l. Zellen nicht reduzier-

ten, spricht für einen durch die PH-Domäne der PLC γ 1 spezifisch ausgeübten Effekt. Für PLC δ 1-PH war dies so nicht zu erwarten, da diese Domäne als hochspezifisch für PI(4,5)P₂ und dieses wiederum als essentiell für die Zellmigration gilt [Gabev *et al.* 1989, Wang *et al.* 2005]. Dies und die Tatsache, dass die zuvor beschriebene deutliche Membranlokalisierung von GFP-PH PLC δ 1 [Matsuda *et al.* 2001, Wang *et al.* 2005] in dieser Arbeit nicht so deutlich beobachtet werden konnte, könnten dem Einsatz des Selektionsantibiotikums Neomycin zugeschrieben werden, dass ebenfalls an PI(4,5)P₂ bindet [Gabev *et al.* 1989].

Der für die PH-transfizierten CHO- α 1/f.1. Zellen beschriebene Phänotyp war zum einen abhängig von der α 1-cytoplasmatischen Sequenz, da die GFP-PH-Expression in KIV-adhären-ten CHO- α 1/K Zellen lediglich gekräuselte Membranstrukturen hervorrief. Zum anderen war der besagte Phänotyp von den Schleifen β 3- β 4 und β 6- β 7 der PH-Domäne abhängig, da er bei Expression der Mutanten PH 3/4 und PH 6/7 nicht beobachtet werden konnte. Diese Abhängigkeit beruhte wiederum ebenfalls auf der α 1-cytoplasmatischen Sequenz, da CHO- α 1/K Zellen nach Transfektion jedweden PH-Konstrukts, ob Wildtyp oder Mutante, gleich aussahen. Die in CHO- α 1/f.1. Zellen durch GFP-PH verursachten Effekte einer erhöhten Anzahl von Lamellipodien und einem schwach ausgebildeten Aktincytoskelett waren zudem spezifisch für α 1 β 1-Integrin, da Lamellipodien bei α 5 β 1-Integrin-vermittelter Adhäsion auf FN schwächer, kortikale Aktinstränge hingegen stärker ausgebildet waren.

PH-Domänen vermitteln die Membranbindung von Proteinen, jedoch mit unterschiedlicher Spezifität (1.3.6.3). GFP-PH zeigte in CHO- α 1/f.1. Zellen keine vorherrschende Plasmamembranlokalisierung, was auf zusätzliche Protein-Protein-Interaktionen der PH-Domäne neben ihrer schwachen Lipidbindung hindeutet. Ein ähnliches Verhalten wurde bereits für die PH-Domänen von Akt, ARNO, Btk und GRP-1 beobachtet [Varnai *et al.* 2005]. Auf einen Wachstumsfaktorstimulus hin wird GFP-PH aus dem Cytoplasma zu der Plasmamembran am vorderen Ende der migrierenden Zelle rekrutiert [Falasca *et al.* 1998, Piccolo *et al.* 2002]. Der durch integrinvermittelte Adhäsion hervorgerufene Stimulus mag damit verglichen nicht stark genug zu sein, um eine solche Translokalisierung zu bewirken. Zudem binden PH-Domänen mit ähnlicher Affinität wie für die membrangebundenen PIPs auch an lösliche Inositolphosphate, was ihre Membranassoziation reduziert [Poccia & Larijani 2009].

Der inhibierende Effekt der transfizierten PH-Domäne der PLC γ 1 auf die Migration der CHO- α 1-Zellen war weniger stark als der des PLC-Inhibitors U73122 ausgeprägt. Dies kann zum einen sowohl durch eine geringe Transfektionseffizienz als auch durch promiskuitive

Lipid- oder Proteininteraktionen der PH-Domäne bedingt sein. Zum anderen kann dies auf die Bedeutung zusätzlicher PLC γ 1-Domänen in der α 1 β 1-Integrin-vermittelten Zellmigration hinweisen. Hierfür sprechen auch Fluoreszenzmikroskopiestudien von CHO- α 1-Zellen, die mit anderen PLC γ 1-Domänen transfiziert wurden. Die als Bindungslocus der β 1-Kette identifizierte C-SH2-Domäne veränderte ebenfalls die KIV-abhängige Zellmorphologie von CHO- α 1/f.l. und - α 1/K Zellen. Der dabei hervorgerufene ähnliche Phänotyp beider Zelllinien und die Beobachtung, dass CHO- α 1/K Zellen bei der Expression von GFP-PH oder -C-SH2 das gleiche Erscheinungsbild besaßen, erlauben den Schluss, dass die C-SH2-Domäne primär die β 1-cytoplasmatische Sequenz anspricht, in Übereinstimmung mit den erhaltenen Bindungsergebnissen. Der Befund jedoch, dass beide CHO-Zelllinien nach Transfektion mit GFP-C-SH2 bei Adhäsion auf FN einen anderen Phänotyp als jeweils auf KIV aufwiesen, impliziert die involvierte, eventuell spezifizierende, Rolle der α -Integrinkette. Die für GFP-C-SH2 beschriebenen Effekte auf die Zellmorphologie konnten bei der Expression von GFP-N-SH2 und GFP-N+C-SH2 nicht beobachtet werden. Eine derart funktionelle Diskrepanz dieser beiden SH2-Domänen wurde bereits im Rahmen der PDGF- oder der TCR-induzierten Aktivierung der PLC γ 1 gezeigt [Stoica *et al.* 1998, Ji *et al.* 1999, Poulin *et al.* 2000].

Die gleichzeitige Transfektion von CHO- α 1/f.l. Zellen mit GFP-PH und -C-SH2 rief einen vektorähnlichen Phänotyp hervor. Dieser kann zum einen durch eine Komplexbildung der beiden Konstrukte mit deren anschließender Inaktivierung zustande gekommen sein. Die intramolekulare Assoziation der C-SH2- mit der N-sPH-Domäne der PLC γ 1 wurde bereits beschrieben [DeBell *et al.* 2007]. Andererseits könnten die PH- und die C-SH2-Domäne funktionell gegenteilige Effekte auf die α 1 β 1-Integrin-vermittelte Signaltransduktion ausüben, um diese zeitlich-räumlich zu regulieren oder zu spezifizieren. Eine leichte grüne Fluoreszenz an der Zellperipherie deutete zudem darauf hin, dass PH- und C-SH2-Domäne gleichzeitig vorhanden sein mussten, um integrinabhängig an die Plasmamembran rekrutiert zu werden. Dies stimmt mit den *Pulldown*-Analysen überein, nach denen beide Domänen durch die cytosolischen Sequenzen des α 1 β 1-Integrins gebunden werden. Von der wachstumsfaktorinduzierten Kooperation der PH- und der C-SH2-Domäne, um die PLC γ 1 an die Plasmamembran zu rekrutieren, berichteten bereits Maffucci und Falasca [Maffucci & Falasca 2001]. In den CHO- α 1/K Zellen führte die Co-Expression von GFP-PH und C-SH2 zu einer Abrundung der Zellen, was ebenfalls für eine Verknüpfung der durch GFP-PH- und -C-SH2 hervorgerufenen zellulären Effekte spricht. Zusätzlich jedoch demonstriert dies die

Rolle der Interaktion zwischen PH-Domäne und $\alpha 1$ -cytoplasmatischer Sequenz in der KIV-abhängigen Regulierung von Membranstrukturen.

CHO- $\alpha 1$ /f.1. Zellen, die mit der GFP-fusionierten N+C-SH2-Domäne transfiziert wurden, besaßen auf KIV und FN ein verstärktes kortikales Aktincytoskelett, mit dessen Enden GFP-N+C-SH2 co-lokalisierte. Dies war für die Einzeldomänen GFP-N-SH2 und -C-SH2 nicht zu beobachten und mag in der individuellen Faltung der Tandem-SH2-Domäne gegenüber den Einzeldomänen begründet sein, welche die Integrinbindung jedoch nicht sehr beeinflusst (3.3). Die besagte Co-Lokalisierung trat ebenfalls in FN-adhärenenten CHO- $\alpha 1$ /K Zellen auf und war demzufolge von der $\beta 1$ -Integrinuntereinheit abhängig. Auf KIV waren die entsprechend transfizierten CHO- $\alpha 1$ /K Zellen nicht vergleichbar gespreitet, um die Lokalisation von GFP-N+C-SH2 und damit die Rolle der $\alpha 1$ -Kette hierbei beurteilen zu können.

Offen bleibt, wie die $\beta 1$ -Integrin-abhängige, physische Verbindung von GFP-N+C-SH2 zum Aktincytoskelett erfolgt. Eine Assoziation der PLC $\gamma 1$ mit Aktinfilamenten wurde früh beschrieben [McBride *et al.* 1991], jedoch an der SH3-Domäne festgemacht, während das N+C-SH2-Protein diffus in der Zelle verteilt war [Bar-Sagi *et al.* 1993]. Daneben wurde in Thrombozyten ein Komplex aus PLC $\gamma 1$ mit Aktin und dem aktinkappenbildenden Protein Gelsolin beschrieben, der nach Thrombinaktivierung aufgehoben wird [Baldassare *et al.* 1997]. In Epithelzellen interagiert die C-SH2-Domäne der PLC $\gamma 1$ zudem mit dem aktinabbauenden Protein Villin [Tomar *et al.* 2006]. Desweiteren wurde das fokale Adapterprotein Grb2 als Bindungspartner von pY783 [Choi *et al.* 2005], N-SH2- und C2-Domäne der PLC $\gamma 1$ identifiziert [Stoica *et al.* 1998, Browaeys-Poly *et al.* 2007]. Ob es sich bei den in den CHO-Zellen angefärbten Loci um fokale Adhäsionen handelt, müssen Studien mit spezifischen Antikörpern gegen Phosphotyrosin oder fokale Adhäsionsproteine klären. Die integrinabhängige Lokalisation von PLC $\gamma 1$ in fokalen Adhäsionen als auch die Rolle der SH2-Domänen der PLC $\gamma 1$ in der Zelladhäsion wurden in jedem Fall bereits berichtet [Tvorogov *et al.* 2005, Wang *et al.* 2005].

Die beschriebenen Fluoreszenzanalysen weisen auf die Rolle der PH-, der C-SH2 und der N+C-SH2-Domäne der PLC $\gamma 1$ in der $\alpha 1\beta 1$ -Integrin-vermittelten Zellmorphologie und -migration hin. Es ist bekannt, dass PLC $\gamma 1$ an der Reorganisation des Cytoskeletts und seiner Komponenten beteiligt ist [Wells 2000, Kassis *et al.* 2001, Piccolo *et al.* 2002] und über die Stimulierung von Kofilin die EGF-abhängige Ausbildung von Zellausläufern am vorderen Ende migrierender Karzinomzellen fördert [Mouneimne *et al.* 2004]. Da die frühe Signal-

weiterleitung integrinvermittelter Adhäsion mit Signalwegen assoziiert ist, die zur Aktivierung der kleinen GTPasen Rho, Rac und Cdc42 und so zur Aktinpolymerisation führen [Price *et al.* 1998], ist eine Einflussnahme der PLC γ 1 auf diese Proteine denkbar. Eine direkte Assoziation zwischen PLC γ 1 und RhoA findet z.B. in leukotrienstimulierten Intestinalzellen statt, wo sie für die PLC γ 1-vermittelte Calciummobilisierung essentiell ist [Thodeti *et al.* 2002]. Eine direkte Interaktion mit Rac konnte bislang nur für die sPH-Domäne von PLC γ 2 gezeigt werden [Walliser *et al.* 2008]. Vielfach beschrieben ist jedoch die Einflussnahme von PLC γ 1, gegebenenfalls mit Beteiligung von Src, auf die besagten GTPasen über deren GEFs wie β -Pix [Bae *et al.* 2005] und Tiam [Fleming *et al.* 1998, Filippi *et al.* 2008]. Darüber hinaus wurde die Funktion der PLC γ 1 in der integrinabhängigen Zellspreitung und -elongation durch ihre Assoziation mit dem Komplex aus β -Pix und dem Adaptermolekül GIT1 erklärt [Jones & Katan 2007]. Alternativ kann PLC γ 1 die integrininduzierte Zellspreitung und -migration durch die Aktivierung von Pyk2 und Paxillin regulieren [Choi *et al.* 2007]. Ob dies auch der Mechanismus der α 1 β 1-Integrin-induzierten und PLC γ 1-vermittelten Zellmigration ist, muss in zukünftigen Untersuchungen näher beleuchtet werden.

Einige Befunde der Zellmorphologiestudien sprechen desweiteren für einen Einfluss der α 1-Kette bzw. des α 1 β 1-Integrins *in trans* auf die α 5-Kette bzw. das α 5 β 1-Integrin. Sowohl CHO- α 1/f.1. als auch - α 1/K Zellen exprimieren α 5 β 1-Integrin als funktionellen FN-Rezeptor. Jedoch rief die Expression von GFP-PH, GFP-C-SH2 oder GFP-N+C-SH2 für beide Zelllinien einen unterschiedlichen Phänotyp auf FN hervor, was bei einem unabhängigen Wirken der beiden Integrinrezeptoren so nicht erfolgen sollte.

4.4 *Arbeitsmodell*

Aus den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen zur Lipidbindung der α 1-cytoplasmatischen Sequenz lässt sich ein Arbeitsmodell herleiten (Abb. 4.2). Das α 1 β 1-Integrin wird durch die Bindung an seinen extrazellulären Liganden KIV aktiviert, was mit einem Konformationswechsel des gesamten Rezeptors und einem Auseinanderweichen beider Untereinheiten einhergeht (Abb. 4.2 A). In der Folge werden intrazelluläre Signalwege angeschaltet. α 1 β 1-Integrin-spezifisch wird hierbei der Erk-MAPK-Weg, über die direkte Interaktion der α 1-Kette mit dem Membranprotein Caveolin, aktiviert, der zu veränderter Genexpression und Zellproliferation führt [Wary *et al.* 1996, Pozzi *et al.* 1998]. An die cytoplasmatischen Sequenzen beider Integrinuntereinheiten wird eine Vielzahl von Signalproteinen und aktin-cytoskelettassoziierten Proteinen rekrutiert, und fokale Adhäsionen entstehen. Nach seiner

Aktivierung reguliert das $\alpha 1\beta 1$ -Integrin unter anderem die Membranlokalisation von RhoGDI und stimuliert so die kleine GTPase Rac [Del Pozo *et al.* 2002, Smerling *et al.* 2007]. Im Zuge der Integrinaktivierung werden ebenfalls die Phosphoinositidkinasen PIPK I und PI3-K in die fokalen Adhäsionen rekrutiert. Dadurch wird in diesen Membranbereichen die Konzentration der *Second messenger*-Moleküle PI(4,5)P₂ bzw. PI(3,4,5)P₃ lokal erhöht. Diese wiederum assoziieren mit und modulieren die Aktivität von aktinassozierten Proteinen sowie von den GAP- und GEF-Regulatorproteinen der Rho-Familie der kleinen GTPasen. Deren Mitglieder (Rho, Rac, Cdc42) vermitteln die Ausbildung von Spannungsfasern und promigratorischen *Ruffles* sowie von Lamelli- und Filopodien. Das spezifische Zusammenspiel der genannten Proteine und Lipide steuert die $\alpha 1\beta 1$ -Integrin-abhängige Reorganisation des Aktincytoskeletts und ermöglicht die Adhäsion von Zellen, die Zellspreitung oder die Zellmigration (Abb. 4.2 A). Unter Einbeziehung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit (Abb. 4.2 B-D) assoziiert die $\alpha 1$ -cytoplasmatische Sequenz mit den Phosphoinositiden PI(4,5)P₂ (Abb. 4.2 B) bzw. PI(3,4,5)P₃ (Abb. 4.2 C). Dabei inseriert die $\alpha 1$ -cytoplasmatische Sequenz stark bei einer erhöhten Konzentration von PI(4,5)P₂ (Abb. 4.2 B rechts), bzw. einer geringen Konzentration von PI(3,4,5)P₃ (Abb. 4.2 C links) in die Plasmamembran. Die Assoziation der $\alpha 1$ -cytoplasmatischen Sequenz mit PI(3,4,5)P₃ vermittelt daraufhin die Assoziation des $\alpha 1\beta 1$ -Integrinrezeptors mit PLC γ 1 (Abb. 4.2 D). Hierbei interagieren beide cytoplasmatische Integrindomänen mit der PH-Domäne der PLC γ 1, und die $\beta 1$ -intrazelluläre Sequenz bindet zusätzlich an die C-SH2-Domäne der PLC γ 1. Diese kooperativen Protein-Protein- und Protein-Lipid-Interaktionen zwischen dem $\alpha 1\beta 1$ -Integrin, der PLC γ 1, PI(4,5)P₂ bzw. PI(3,4,5)P₃ erfolgen in Analogie zu der wachstumsfaktorabhängigen Aktivierung der PLC γ 1 und steuern nun die $\alpha 1\beta 1$ -Integrin-abhängige Ausbildung von Lamelli- und Filopodien sowie die Organisation des Aktincytoskeletts. Damit werden die Voraussetzungen für eine gerichtete und effektive Zellmigration erfüllt. Welche funktionelle Bedeutung der Lipidassoziation der $\alpha 1$ -cytoplasmatischen Sequenz darüber hinaus zukommt, bleibt Gegenstand zukünftiger Forschung.

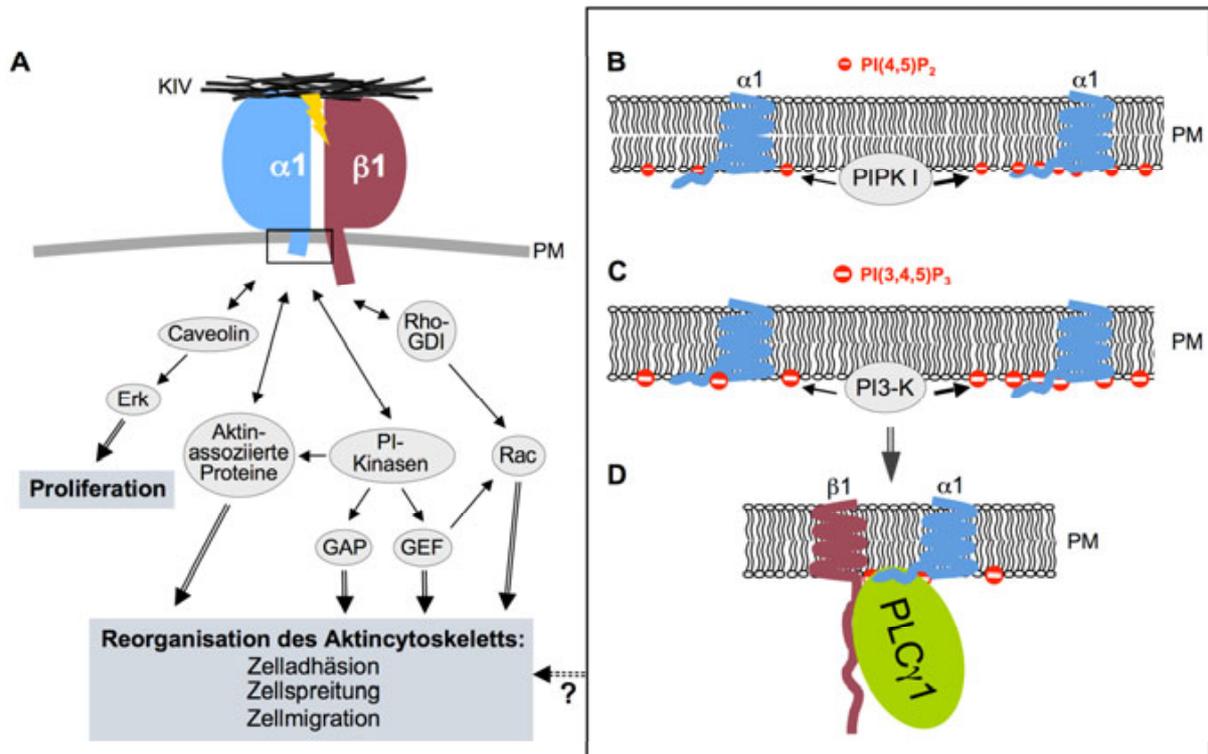


Abb. 4.2: Arbeitsmodell. Das gegenwärtige Konzept $\alpha 1\beta 1$ -Integrin-vermittelter Signaltransduktion, insbesondere die Beeinflussung des Aktincytoskeletts (**A**) kann durch die in der vorliegenden Arbeit charakterisierte Interaktion der $\alpha 1$ -cytoplasmatischen Sequenz mit PI(4,5)P₂ (**B**) und PI(3,4,5)P₃ (**C**) und der des $\alpha 1\beta 1$ -Integrins mit PLC γ 1 (**D**) ergänzt werden. Einzelheiten sind im Text beschrieben. Die Pfeile in (**A**) stehen für direkte oder indirekte Interaktionen (Doppelpfeil), für die Regulierung der Aktivität (einfacher Pfeil) bzw. die Hinführung zu zellulären Ereignissen (zweifacher Pfeil). Die einfachen Pfeile in (**B**) und (**C**) bezeichnen die jeweilige Menge von gebildetem PI(4,5)P₂ bzw. PI(3,4,5)P₃.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das $\alpha 1\beta 1$ -Integrin ist ein die Plasmamembran durchspannender Adhäsionsrezeptor, der nach Bindung an den extrazellulären Liganden Kollagen intrazelluläre Signalwege auslöst, die zu Zelladhäsion, -spreitung, -migration und -proliferation führen. Gemeinhin wird die Hauptrolle in der $\alpha 1\beta 1$ -Integrin-vermittelten intrazellulären Signaltransduktion der cytoplasmatischen Domäne der $\beta 1$ -Integrinuntereinheit zugesprochen. Zunehmend demonstrieren Studien jedoch auch die signalgebende Bedeutung der kurzen $\alpha 1$ -cytoplasmatischen Sequenz ($\alpha 1$ -CS), welche die Aminosäuren KIGFFKRPLKKKMEK umfasst. Auf welchem Weg der $\alpha 1$ -cytoplasmatische Teil seine Signalfunktion entfaltet, ist allerdings nur wenig erforscht. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb sowohl die Struktur als auch die Lipidbindung als mögliche funktionsdeterminierende Eigenschaften dieser kurzen, basischen Sequenz untersucht. Das von der $\alpha 1$ -CS abgeleitete Peptid besaß in Lösung keine definierte Sekundärstruktur, wie CD-Messungen und MD-Simulationen zeigten. Die erstmals für ein Integrin durchgeführten Lipidbindungsstudien demonstrierten jedoch, dass die $\alpha 1$ -CS mit den *Second messenger*-Molekülen $PI(4,5)P_2$ und insbesondere $PI(3,4,5)P_3$ assoziierte. Für diese Interaktionen konnten mikromolare Dissoziationskonstanten ermittelt werden, die für eine geringe Bindungsaffinität sprechen. Das Peptid der $\alpha 1$ -CS inserierte zudem in Abhängigkeit von der PIP-Art und der PIP-Konzentration und vermittelt über ionische Wechselwirkungen in $PI(4,5)P_2$ - und $PI(3,4,5)P_3$ -enthaltende Langmuir-Filme. Studien mit verkürzten Peptiden ergaben, dass die Membraninsertion der $\alpha 1$ -CS durch das membranproximale, konservierte KIGFFKR-Motiv angetrieben, durch die membrandistale, $\alpha 1$ -spezifische PLKKKMEK-Sequenz jedoch stabilisiert und verstärkt wurde. Die Assoziation mit Liposomen, die $PI(4,5)P_2$ oder $PI(3,4,5)P_3$ enthielten, induzierte keine eindeutige Sekundärstruktur in den $\alpha 1$ -Integrinpeptiden, jedoch liefert die vorliegende Arbeit Hinweise darauf, dass die Interaktion zwischen $\alpha 1\beta 1$ -Integrin und dem phospholipidmodifizierenden Enzym $PLC\gamma 1$ durch $PI(4,5)P_2$ bzw. $PI(3,4,5)P_3$ verstärkt wird. Dabei wurden die PH- und die C-SH2-Domäne der $PLC\gamma 1$ als Bindungsloci für die cytoplasmatischen Domänen von $\alpha 1$ - und $\beta 1$ -Integrinuntereinheit identifiziert. Die Assoziation beider Integrinketten mit der PH-Domäne war hierbei von deren Lipidbindung und der Ionenstärke abhängig. In funktionellen Studien wurde weiterhin die Bedeutung sowohl der $PLC\gamma 1$ als auch ihrer PH-Domäne für die $\alpha 1\beta 1$ -Integrin-vermittelte Zellmigration gezeigt. Immuncytochemische Studien demonstrieren die Rolle der PH- bzw. der C-SH2-Domäne in der $\alpha 1\beta 1$ -Integrin-vermittelten, regulierten Ausbildung von Membranausläufern und der Organisation des Aktincytoskeletts. In

Abhängigkeit von der β 1-cytoplasmatischen Domäne co-lokalisierte die N+C-SH2-Domäne der PLC γ 1 zudem mit den Enden kortikaler Aktinstränge. Diese Befunde weisen auf die Bedeutung kooperativer Protein-Protein- und Protein-Lipid-Interaktionen zwischen α 1 β 1-Integrin, Phosphoinositiden und der PLC γ 1 für die α 1 β 1-Integrin-abhängige, PLC γ 1-vermittelte Zellmigration hin. Die zur Lipidbindung der α 1-CS vorgestellten Daten eröffnen zudem einen neuartigen Regulierungsmechanismus der α 1 β 1-Integrin-vermittelten Signaltransduktion, der generell für Integrine gelten könnte.

6 SUMMARY

$\alpha 1\beta 1$ Integrin is a membrane-spanning cell adhesion receptor. Upon binding to its extracellular ligand collagen, $\alpha 1\beta 1$ integrin initiates intracellular signalling pathways, which enable cell adhesion, spreading, migration and proliferation. The cytoplasmic domain of the $\beta 1$ integrin subunit is commonly considered to play the major role in $\alpha 1\beta 1$ integrin-mediated intracellular signal transduction. Yet, there is growing evidence on the signalling properties of the short $\alpha 1$ cytoplasmic sequence ($\alpha 1$ -CS), which comprises the 15 amino acids KIGFFKRPLKKKMEK. Little is known about the signalling mechanisms of the $\alpha 1$ cytoplasmic tail. Therefore, within the scope of this thesis, the structure as well as the lipid binding of this short, positively charged sequence have been investigated as potential function-underlying features of the $\alpha 1$ -CS. CD spectroscopy and MD simulations revealed that the peptide derived from the $\alpha 1$ -CS did not adopt any secondary structure in solution. However, lipid binding studies, which have been performed for integrins for the first time, demonstrated that the $\alpha 1$ -CS bound to the second messenger molecules PI(4,5)P₂ and particularly PI(3,4,5)P₃. Micromolar dissociation constants were determined for this lipid-peptide interaction, arguing for its low binding affinity. Moreover, the peptide of the $\alpha 1$ -CS inserted into Langmuir films which contained PI(4,5)P₂- or PI(3,4,5)P₃. Membrane insertion of the peptide was realised by ionic interactions and was dependent on the species and the concentration of the applied phosphoinositide. Studies with truncated peptides revealed that membrane insertion of the $\alpha 1$ -CS was driven by its membrane-proximal, conserved KIGFFKR-motif, however stabilised and accomplished by the membrane-distal, $\alpha 1$ -specific PLKKKMEK-sequence. Thus, for the first time ever, binding of an integrin to PI(4,5)P₂ and PI(3,4,5)P₃ has been shown in this work. Association with liposomes containing PI(4,5)P₂ or PI(3,4,5)P₃ did not evoke any clear conformational change of the integrin peptides. Yet, this work provides evidence, that the interaction between $\alpha 1\beta 1$ integrin and the phospholipid-modifying enzyme PLC γ 1 is stimulated by PI(4,5)P₂ or PI(3,4,5)P₃. Beyond, both the PH and the C-SH2 domain of PLC γ 1 were mapped as binding sites for the $\alpha 1$ and $\beta 1$ cytoplasmatic sequences. Thereby, the association of the integrin with the PH domain was dependent on both the lipid binding of the latter and the ionic strength. By means of functional assays, it was shown that PLC γ 1 as well as its PH domain is involved in $\alpha 1\beta 1$ integrin-mediated cell migration. Furthermore, immunofluorescence studies demonstrated the role of the PH and the C-SH2 domain in the regulated formation of

membrane protrusions as well as in the assembly of the actin cytoskeleton, upon collagen ligation of $\alpha 1\beta 1$ integrin. Additionally, dependent on the $\beta 1$ cytoplasmic sequence, the N+C-SH2 domain of PLC $\gamma 1$ was localised at the ends of cortical actin strands. These results point at the important role that cooperative protein-protein and protein-lipid interactions between $\alpha 1\beta 1$ integrin, phosphoinositides and PLC $\gamma 1$ might play in $\alpha 1\beta 1$ integrin-dependent and PLC $\gamma 1$ -mediated cell migration. Eventually, the provided data on the lipid binding features of the $\alpha 1$ -CS reveal a novel mode of regulation for the $\alpha 1\beta 1$ integrin-mediated signal transduction, which might be universally valid for all integrins.

7 LITERATUR

- Adair, B. D. & Yeager, M. (2002). Three-dimensional model of the human platelet integrin α IIb β 3 based on electron cryomicroscopy and x-ray crystallography. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(22): 14059.
- Adair, B. D., Xiong, J. P., Maddock, C. *et al.* (2005). Three-dimensional EM structure of the ectodomain of integrin α V β 3 in a complex with fibronectin. *J Cell Biol* **168**(7): 1109.
- Alahari, S. K. & Nasrallah, H. (2004). A membrane proximal region of the integrin α 5 subunit is important for its interaction with nischarin. *Biochem J* **377**(Pt 2): 449.
- Aplin, A. E. & Juliano, R. L. (1999). Integrin and cytoskeletal regulation of growth factor signaling to the MAP kinase pathway. *J Cell Sci* **112** (Pt 5): 695.
- Arias-Salgado, E. G., Lizano, S., Sarkar, S. *et al.* (2003). Src kinase activation by direct interaction with the integrin beta cytoplasmic domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(23): 13298.
- Armulik, A., Nilsson, I., von Heijne, G. *et al.* (1999). Determination of the border between the transmembrane and cytoplasmic domains of human integrin subunits. *J Biol Chem* **274**(52): 37030.
- Arnaut, M. A., Goodman, S. L., Xiong, J. P. (2007). Structure and mechanics of integrin-based cell adhesion. *Curr Opin Cell Biol* **19**(5): 495.
- Aszodi, A., Hunziker, E. B., Brakebusch, C. *et al.* (2003). Beta1 integrins regulate chondrocyte rotation, G1 progression, and cytokinesis. *Genes Dev* **17**(19): 2465.
- Attree, O., Olivos, I. M., Okabe, I. *et al.* (1992). The Lowe's oculocerebrorenal syndrome gene encodes a protein highly homologous to inositol polyphosphate-5-phosphatase. *Nature* **358**(6383): 239.
- Backlund, B. M., Wikander, G., Peeters, T. L. *et al.* (1994). Induction of secondary structure in the peptide hormone motilin by interaction with phospholipid vesicles. *Biochim Biophys Acta* **1190**(2): 337.
- Bader, A. G., Kang, S., Zhao, L. *et al.* (2005). Oncogenic PI3K de Bae, S. S., Lee, Y. H., Chang, J. S. *et al.* (1998). Src homology domains of phospholipase C gamma1 inhibit nerve growth factor-induced differentiation of PC12 cells. *J Neurochem* **71**(1): 178.
- Bae, Y. S., Cantley, L. G., Chen, C. S. *et al.* (1998). Activation of phospholipase C-gamma by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* **273**(8): 4465.
- Bae, J. Y., Ahn, S. J., Lee, J. E. *et al.* (2005). BetaPix-a enhances the activity of phospholipase Cgamma1 by binding SH3 domain in breast cancer. *J Cell Biochem* **94**(5): 1010.
- Bai, J., Tucker, W. C., Chapman, E. R. (2004). PIP2 increases the speed of response of synaptotagmin and steers its membrane-penetration activity toward the plasma membrane. *Nat Struct Mol Biol* **11**(1): 36.
- Bai, Y., Liu, S., Jiang, P. *et al.* (2009). Structure-dependent charge density as a determinant of antimicrobial activity of peptide analogues of defensin. *Biochemistry* **48**(30): 7229.
- Baldassare, J. J., Henderson, P. A., Tarver, A. *et al.* (1997). Thrombin activation of human platelets dissociates a complex containing gelsolin and actin from phosphatidylinositide-specific phospholipase Cgamma1. *Biochem J* **324** (Pt 1): 283.
- Balla, T. (2005). Inositol-lipid binding motifs: signal integrators through protein-lipid and protein-protein interactions. *J Cell Sci* **118**(Pt 10): 2093.
- Bank, I., Koltakov, A., Goldstein, I. *et al.* (2002). Lymphocytes expressing alpha1beta1 integrin (very late antigen-1) in peripheral blood of patients with arthritis are a subset of CD45RO(+) T-cells primed for rapid adhesion to collagen IV. *Clin Immunol* **105**(3): 247.
- Banno, A. & Ginsberg, M. H. (2008). Integrin activation. *Biochem Soc Trans* **36**(Pt 2): 229.
- Baraldi, E., Djinić Carugo, K., Hyvonen, M. *et al.* (1999). Structure of the PH domain from Bruton's tyrosine kinase in complex with inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate. *Structure* **7**(4): 449.
- Barazi, H. O., Li, Z., Cashel, J. A. *et al.* (2002). Regulation of integrin function by CD47 ligands. Differential effects on alpha vbeta 3 and alpha 4beta1 integrin-mediated adhesion. *J Biol Chem* **277**(45): 42859.

- Barczyk, M., Carracedo, S., Gullberg, D. (2009). Integrins. *Cell Tissue Res* **339**(1): 269.
- Bar-Sagi, D., Rotin, D., Batzer, A. *et al.* (1993). SH3 domains direct cellular localization of signaling molecules. *Cell* **74**(1): 83.
- Bazzi, M. D., Woody, R. W., Brack, A. (1987). Interaction of amphipathic polypeptides with phospholipids: characterization of conformations and the CD of oriented beta-sheets. *Biopolymers* **26**(7): 1115.
- Beglova, N., Blacklow, S. C., Takagi, J. *et al.* (2002). Cysteine-rich module structure reveals a fulcrum for integrin rearrangement upon activation. *Nat Struct Biol* **9**(4): 282.
- Bellet-Amalric, E., Blaudez, D., Desbat, B. *et al.* (2000). Interaction of the third helix of Antennapedia homeodomain and a phospholipid monolayer, studied by ellipsometry and PM-IRRAS at the air-water interface. *Biochim Biophys Acta* **1467**: 131.
- Ben-Tal, N., Honig, B., Peitzsch, R. M. *et al.* (1996). Binding of small basic peptides to membranes containing acidic lipids: theoretical models and experimental results. *Biophys J* **71**(2): 561.
- Bentham, M., Mazaleyra, S., Harris, M. (2006). Role of myristoylation and N-terminal basic residues in membrane association of the human immunodeficiency virus type 1 Nef protein. *J Gen Virol* **87**(Pt 3): 563.
- Berrier, A. L. & Yamada, K. M. (2007). Cell-matrix adhesion. *J Cell Physiol* **213**(3): 565.
- Bhunia, A., Tang, X. Y., Mohanram, H. *et al.* (2009). NMR solution conformations and interactions of integrin alphaLbeta2 cytoplasmic tails. *J Biol Chem* **284**(6): 3873.
- Blanchard, A., Ohanian, V., Critchley, D. (1989). The structure and function of alpha-actinin. *J Muscle Res Cell Motil* **10**(4): 280.
- Blanco, F. J., Jimenez, M. A., Pineda, A. *et al.* (1994a). NMR solution structure of the isolated N-terminal fragment of protein-G B1 domain. Evidence of trifluoroethanol induced native-like beta-hairpin formation. *Biochemistry* **33**(19): 6004.
- Blanco, F. J., Rivas, G., Serrano, L. (1994b). A short linear peptide that folds into a native stable beta-hairpin in aqueous solution. *Nat Struct Biol* **1**(9): 584.
- Blystone, S. D., Williams, M. P., Slater, S. E. *et al.* (1997). Requirement of integrin beta3 tyrosine 747 for beta3 tyrosine phosphorylation and regulation of alphavbeta3 avidity. *J Biol Chem* **272**(45): 28757.
- Bonvin, A. M. J. J., Boelens, R., Kaptein, R. (2005). NMR analysis of protein interactions. *Curr Opin Chem Biol* **9**: 1.
- Botelho, R. J., Scott, C. C., Grinstein, S. (2004). Phosphoinositide involvement in phagocytosis and phagosome maturation. *Curr Top Microbiol Immunol* **282**: 1.
- Bouaouina, M., Lad, Y., Calderwood, D. A. (2008). The N-terminal domains of talin cooperate with the phosphotyrosine binding-like domain to activate beta1 and beta3 integrins. *J Biol Chem* **283**(10): 6118.
- Bradshaw, J. P., Bushby, R. J., Giles, C. C. D. *et al.* (1996). Neutron diffraction reveals the orientation of the headgroup of inositol lipids in model membranes. *Nat Struct Biol* **3**(2): 125.
- Brahms, S. & Brahms, J. (1980). Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism. *J Mol Biol* **138**(2): 149.
- Braun, D., Wider, G., Wüthrich, K. (1994). Sequence-corrected 15-N "random coil" chemical shifts. *J Am Chem Soc* **116**: 8466.
- Browaeys-Poly, E., Broutin, I., Antoine, A. F. *et al.* (2007). A non-canonical Grb2-PLC-gamma1-Sos cascade triggered by lipovitellin 1, an apolipoprotein B homologue. *Cell Signal* **19**(12): 2540.
- Brunton, V. G., MacPherson, I. R., Frame, M. C. (2004). Cell adhesion receptors, tyrosine kinases and actin modulators: a complex three-way circuitry. *Biochim Biophys Acta* **1692**(2-3): 121.
- Buchman, G. W., Banerjee, S., Hansen, J. N. (1988). Structure, expression, and evolution of a gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic. *J Biol Chem* **263**(31): 16260.

- Buck, M., Radford, S. E., Dobson, C. M. (1993). A partially folded state of hen egg white lysozyme in trifluoroethanol: structural characterization and implications for protein folding. *Biochemistry* **32**(2): 669.
- Bucki, R., Giraud, F., Sulpice, J. C. (2000). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate domain inducers promote phospholipid transverse redistribution in biological membranes. *Biochemistry* **39**(19): 5838.
- Bucki, R., Pastore, J. J., Randhawa, P. *et al.* (2004). Antibacterial activities of rhodamine B-conjugated gelsolin-derived peptides compared to those of the antimicrobial peptides cathelicidin LL37, magainin II, and melittin. *Antimicrob Agents Chemother* **48**(5): 1526.
- Bundi, A. & Wüthrich, K. (1979). Use of amide 1-H-NMR titration shifts for studies of polypeptide conformation. *Biopolymers* **18**(2): 299.
- Buser, C. A., Sigal, C. T., Resh, M. D. *et al.* (1994). Membrane binding of myristylated peptides corresponding to the NH₂ terminus of Src. *Biochemistry* **33**(44): 13093.
- Buser, C. A. & McLaughlin, S. (1997). Ultracentrifugation technique for measuring the binding of peptides and proteins to sucrose-loaded phospholipid vesicles. *Methods Mol Biol* **84**: 267.
- Calderwood, D. A., Zent, R., Grant, R. *et al.* (1999). The Talin head domain binds to integrin beta subunit cytoplasmic tails and regulates integrin activation. *J Biol Chem* **274**(40): 28071.
- Calderwood, D. A., Yan, B., de Pereda, J. M. *et al.* (2002). The phosphotyrosine binding-like domain of talin activates integrins. *J Biol Chem* **277**(24): 21749.
- Calderwood, D. A. (2004). Integrin activation. *J Cell Sci* **117**(Pt 5): 657.
- Cantley, L. C. (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* **296**(5573): 1655.
- Carman, C. V. & Springer, T. A. (2003). Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized? *Curr Opin Cell Biol* **15**(5): 547.
- Carlton, J. G. & Cullen, P. J. (2005). Coincidence detection in phosphoinositide signaling. *Trends Cell Biol* **15**(10): 540.
- Carpenter, G. & Ji, Q. (1999). Phospholipase C-gamma as a signal-transducing element. *Exp Cell Res* **253**(1): 15.
- Chang, J. S., Seok, H., Kwon, T. K. *et al.* (2002). Interaction of elongation factor-1alpha and pleckstrin homology domain of phospholipase C-gamma 1 with activating its activity. *J Biol Chem* **277**(22): 19697.
- Chang, J. S., Kim, S. K., Kwon, T. K. *et al.* (2005). Pleckstrin homology domains of phospholipase C-gamma1 directly interact with beta-tubulin for activation of phospholipase C-gamma1 and reciprocal modulation of beta-tubulin function in microtubule assembly. *J Biol Chem* **280**(8): 6897.
- Chellaiah, M. A. (2006). Regulation of podosomes by integrin alphavbeta3 and Rho GTPase-facilitated phosphoinositide signaling. *Eur J Cell Biol* **85**(3-4): 311.
- Chen, H. C. & Guan, J. L. (1994). Association of focal adhesion kinase with its potential substrate phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(21): 10148.
- Chen, L. M., Bailey, D., Fernandez-Valle, C. (2000). Association of beta 1 integrin with focal adhesion kinase and paxillin in differentiating Schwann cells. *J Neurosci* **20**(10): 3776.
- Choi, J. H., Hong, W. P., Yun, S. *et al.* (2005). Grb2 negatively regulates epidermal growth factor-induced phospholipase C-gamma1 activity through the direct interaction with tyrosine-phosphorylated phospholipase C-gamma1. *Cell Signal* **17**(10): 1289.
- Choi, J. H., Yang, Y. R., Lee, S. K. *et al.* (2007). Phospholipase C-gamma1 potentiates integrin-dependent cell spreading and migration through Pyk2/paxillin activation. *Cell Signal* **19**(8): 1784.
- Chong, L. D., Traynor-Kaplan, A., Bokoch, G. M. *et al.* (1994). The small GTP-binding protein Rho regulates a phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in mammalian cells. *Cell* **79**(3): 507.
- Chou, P. Y. & Fasman, G. D. (1974). Prediction of protein conformation. *Biochemistry* **13**(2): 222.
- Chou, K. C. (2000). Prediction of tight turns and their types in proteins. *Anal Biochem* **286**(1): 1.

- Cluzel, C., Saltel, F., Lussi, J. *et al.* (2005). The mechanisms and dynamics of (alpha)v(beta)3 integrin clustering in living cells. *J Cell Biol* **171**(2): 383.
- Conrad, C., Boyman, O., Tonel, G. *et al.* (2007). Alpha1beta1 integrin is crucial for accumulation of epidermal T cells and the development of psoriasis. *Nat Med* **13**(7): 836.
- Constantin, G., Majeed, M., Giagulli, C. *et al.* (2000). Chemokines trigger immediate beta2 integrin affinity and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow. *Immunity* **13**(6): 759.
- Coppolino, M. G., Woodside, M. J., Demaurex, N. *et al.* (1997). Calreticulin is essential for integrin-mediated calcium signalling and cell adhesion. *Nature* **386**(6627): 843.
- Corgan, A. M., Singleton, C., Santoso, C. B. *et al.* (2004). Phosphoinositides differentially regulate alpha-actinin flexibility and function. *Biochem J* **378**(Pt 3): 1067.
- Cornut, I., Thiaudière, E., Dufourcq, J. (1993). *in: The amphipathic helix*. Epand, R. M. (ed.), Boca Raton, USA, CRC Press: 173.
- Cremona, O., Di Paolo, G., Wenk, M. R. *et al.* (1999). Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling. *Cell* **99**(2): 179.
- Critchley, D. R. & Gingras, A. R. (2008). Talin at a glance. *J Cell Sci* **121**(Pt 9): 1345.
- Cunningham, C. C., Vegners, R., Bucki, R. *et al.* (2001). Cell permeant polyphosphoinositide-binding peptides that block cell motility and actin assembly. *J Biol Chem* **276**(46): 43390.
- Cybulsky, A. V., Carbonetto, S., Cyr, M. D. *et al.* (1993). Extracellular matrix-stimulated phospholipase activation is mediated by beta 1-integrin. *Am J Physiol* **264**(2 Pt 1): C323.
- Czech, M. P. (2003). Dynamics of phosphoinositides in membrane retrieval and insertion. *Annu Rev Physiol* **65**: 791.
- Davletov, B. A. & Sudhof, T. C. (1993). A single C2 domain from synaptotagmin I is sufficient for high affinity Ca²⁺/phospholipid binding. *J Biol Chem* **268**(35): 26386.
- DeBell, K., Graham, L., Reischl, I. *et al.* (2007). Intramolecular regulation of phospholipase C-gamma1 by its C-terminal Src homology 2 domain. *Mol Cell Biol* **27**(3): 854.
- Defilippi, P., van Hinsbergh, V., Bertolotto, A. *et al.* (1991). Differential distribution and modulation of expression of alpha 1/beta 1 integrin on human endothelial cells. *J Cell Biol* **114**(4): 855.
- Del Pozo, M. A., Kiosses, W. B., Alderson, N. B. *et al.* (2002). Integrins regulate GTP-Rac localized effector interactions through dissociation of Rho-GDI. *Nat Cell Biol* **4**(3): 232.
- De Matteis, M. A., Di Campli, A., Godi, A. (2005). The role of the phosphoinositides at the Golgi complex. *Biochim Biophys Acta* **1744**(3): 396.
- De Melker, A. A., Kramer, D., Kuikman, I. *et al.* (1997). The two phenylalanines in the GFFKR motif of the integrin alpha6A subunit are essential for heterodimerization. *Biochem J* **328** (Pt 2): 529.
- de Pereda, J. M., Wiche, G., Liddington, R. C. (1999). Crystal structure of a tandem pair of fibronectin type III domains from the cytoplasmic tail of integrin alpha6beta4. *Embo J* **18**(15): 4087.
- Dey, N., Crosswell, H. E., De, P. *et al.* (2008). The protein phosphatase activity of PTEN regulates SRC family kinases and controls glioma migration. *Cancer Res* **68**(6): 1862.
- Di Paolo, G., Pellegrini, L., Letinic, K. *et al.* (2002). Recruitment and regulation of phosphatidylinositol phosphate kinase type 1 gamma by the FERM domain of talin. *Nature* **420**(6911): 85.
- Di Paolo, G. & De Camilli, P. (2006). Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* **443**(7112): 651.
- DKFZ (2009). www.md-simulations.de. Stand: 11.07.2009
- Doerks, T., Strauss, M., Brendel, M. *et al.* (2000). GRAM, a novel domain in glucosyltransferases, myotubularins and other putative membrane-associated proteins. *Trends Biochem Sci* **25**(10): 483.

- Dormann, D. & Weijer, C. J. (2003). Chemotactic cell movement during development. *Curr Opin Genet Dev* **13**(4): 358.
- Dowhan, W. & Bogdanov, M. (2002). *in: Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*. Vance, D. E. and Vance, J. E. (eds.), Amsterdam, Elsevier: 36.
- Driessens, M. H., van Hulten, P. E., van Rijthoven, E. A. *et al.* (1997). Activation of G-proteins with AIF-4 induces LFA-1-mediated adhesion of T-cell hybridoma cells to ICAM-1 by signal pathways that differ from phorbol ester- and manganese-induced adhesion. *Exp Cell Res* **231**(2): 242.
- Drin, G., Mazel, M., Clair, P. *et al.* (2001). Physico-chemical requirements for cellular uptake of pAntp peptide. Role of lipid-binding affinity. *Eur J Biochem* **268**(5): 1304.
- Dumas, J. J., Merithew, E., Sudharshan, E. *et al.* (2001). Multivalent endosome targeting by homodimeric EEA1. *Mol Cell* **8**(5): 947.
- Edwards, S. D. & Keep, N. H. (2001). The 2.7 Å crystal structure of the activated FERM domain of moesin: an analysis of structural changes on activation. *Biochemistry* **40**(24): 7061.
- Ehlers, M. D., Zhang, S., Bernhardt, J. P. *et al.* (1996). Inactivation of NMDA receptors by direct interaction of calmodulin with the NR1 subunit. *Cell* **84**(5): 745.
- Ehret-Sabatier, L., Loew, D., Goyffon, M. *et al.* (1996). Characterization of novel cysteine-rich antimicrobial peptides from scorpion blood. *J Biol Chem* **271**(47): 29537.
- Eisenhauer, P. B., Harwig, S. S., Lehrer, R. I. (1992). Cryptdins: antimicrobial defensins of the murine small intestine. *Infect Immun* **60**(9): 3556.
- Ekholm, E., Hankenson, K. D., Uusitalo, H. *et al.* (2002). Diminished callus size and cartilage synthesis in alpha 1 beta 1 integrin-deficient mice during bone fracture healing. *Am J Pathol* **160**(5): 1779.
- Ellena, J. F., Burnitz, M. C., Cafiso, D. S. (2003). Location of the myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS) effector domain in negatively charged phospholipid bicelles. *Biophys J* **85**(4): 2442.
- Ellson, C. D., Andrews, S., Stephens, L. R. *et al.* (2002). The PX domain: a new phosphoinositide-binding module. *J Cell Sci* **115**(Pt 6): 1099.
- Engelman, D. M. (2005). Membranes are more mosaic than fluid. *Nature* **438**(7068): 578.
- Etzioni, A. (1996). Adhesion molecules--their role in health and disease. *Pediatr Res* **39**(2): 191.
- Eyster, K. M. (2007). The membrane and lipids as integral participants in signal transduction: lipid signal transduction for the non-lipid biochemist. *Adv Physiol Educ* **31**(1): 5.
- Fagerholm, S. C., Hilden, T. J., Gahmberg, C. G. (2004). P marks the spot: site-specific integrin phosphorylation regulates molecular interactions. *Trends Biochem Sci* **29**(9): 504.
- Falasca, M., Logan, S. K., Lehto, V. P. *et al.* (1998). Activation of phospholipase C gamma by PI 3-kinase-induced PH domain-mediated membrane targeting. *Embo J* **17**(2): 414.
- Fallert-Müller, A. R. (1999/2000). *Lexikon der Biochemie in zwei Teilen*. 1. Auflage, Heidelberg, Berlin, Spektrum Akademischer Verlag, Elsevier GmbH.
- Feigelson, S. W., Grabovsky, V., Shamri, R. *et al.* (2003). The CD81 tetraspanin facilitates instantaneous leukocyte VLA-4 adhesion strengthening to vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) under shear flow. *J Biol Chem* **278**(51): 51203.
- Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M. *et al.* (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(21): 7413.
- Ferguson, K. M., Lemmon, M. A., Schlessinger, J. *et al.* (1995). Structure of the high affinity complex of inositol trisphosphate with a phospholipase C pleckstrin homology domain. *Cell* **83**(6): 1037.
- Ferguson, K. M., Kavran, J. M., Sankaran, V. G. *et al.* (2000). Structural basis for discrimination of 3-phosphoinositides by pleckstrin homology domains. *Mol Cell* **6**(2): 373.
- Ferguson, G. J., Milne, L., Kulkarni, S. *et al.* (2007). PI(3)Kgamma has an important context-dependent role in neutrophil chemokinesis. *Nat Cell Biol* **9**(1): 86.

- Fernandez-Carvajal, A. M., Encinar, J. A., Poveda, J. A. *et al.* (2006). Structural and functional changes induced in the nicotinic acetylcholine receptor by membrane phospholipids. *J Mol Neurosci* **30**(1-2): 121.
- Fievet, B. T., Gautreau, A., Roy, C. *et al.* (2004). Phosphoinositide binding and phosphorylation act sequentially in the activation mechanism of ezrin. *J Cell Biol* **164**(5): 653.
- Filardo, E. J. & Cheresch, D. A. (1994). A beta turn in the cytoplasmic tail of the integrin alpha v subunit influences conformation and ligand binding of alpha v beta 3. *J Biol Chem* **269**(6): 4641.
- Filippi, B. M., Mariggio, S., Pulvirenti, T. *et al.* (2008). SRC-dependent signalling regulates actin ruffle formation induced by glycerophosphoinositol 4-phosphate. *Biochim Biophys Acta* **1783**(12): 2311.
- Flanagan, L. A., Cunningham, C. C., Chen, J. *et al.* (1997). The structure of divalent cation-induced aggregates of PIP2 and their alteration by gelsolin and tau. *Biophys J* **73**(3): 1440.
- Fleming, I. N., Elliott, C. M., Exton, J. H. (1998). Phospholipase C-gamma, protein kinase C and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II are involved in platelet-derived growth factor-induced phosphorylation of Tiam1. *FEBS Lett* **429**(3): 229.
- Ford, M. G., Pearse, B. M., Higgins, M. K. *et al.* (2001). Simultaneous binding of PtdIns(4,5)P2 and clathrin by AP180 in the nucleation of clathrin lattices on membranes. *Science* **291**(5506): 1051.
- Forstner, M. B., Yee, C. K., Parikh, A. N. *et al.* (2006). Lipid lateral mobility and membrane phase structure modulation by protein binding. *J Am Chem Soc* **128**(47): 15221.
- Fraley, T. S., Tran, T. C., Corgan, A. M. *et al.* (2003). Phosphoinositide binding inhibits alpha-actinin bundling activity. *J Biol Chem* **278**(26): 24039.
- Fraley, T. S., Pereira, C. B., Tran, T. C. *et al.* (2005). Phosphoinositide binding regulates alpha-actinin dynamics: mechanism for modulating cytoskeletal remodeling. *J Biol Chem* **280**(15): 15479.
- Franke, T. F., Kaplan, D. R., Cantley, L. C. *et al.* (1997). Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science* **275**(5300): 665.
- Fukuda, M., Kojima, T., Kabayama, H. *et al.* (1996). Mutation of the pleckstrin homology domain of Bruton's tyrosine kinase in immunodeficiency impaired inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate binding capacity. *J Biol Chem* **271**(48): 30303.
- Full, S. J., Deinzer, M. L., Ho, P. S. *et al.* (2007). Phosphoinositide binding regulates alpha-actinin CH2 domain structure: analysis by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Protein Sci* **16**(12): 2597.
- Gabev, E., Kasianowicz, J., Abbott, T. *et al.* (1989). Binding of neomycin to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2). *Biochim Biophys Acta* **979**(1): 105.
- Gahmberg, C. G., Fagerholm, S. C., Nurmi, S. M. *et al.* (2009). Regulation of integrin activity and signalling. *Biochim Biophys Acta* **1790**(6): 431.
- Gambhir, A., Hangyas-Mihalyne, G., Zaitseva, I. *et al.* (2004). Electrostatic sequestration of PIP2 on phospholipid membranes by basic/aromatic regions of proteins. *Biophys J* **86**(4): 2188.
- Garcia-Alvarez, B., de Pereda, J. M., Calderwood, D. A. *et al.* (2003). Structural determinants of integrin recognition by talin. *Mol Cell* **11**(1): 49.
- Gardner, H., Kreidberg, J., Kotliansky, V. *et al.* (1996). Deletion of integrin alpha 1 by homologous recombination permits normal murine development but gives rise to a specific deficit in cell adhesion. *Dev Biol* **175**(2): 301.
- Gardner, H., Broberg, A., Pozzi, A. *et al.* (1999). Absence of integrin alpha1beta1 in the mouse causes loss of feedback regulation of collagen synthesis in normal and wounded dermis. *J Cell Sci* **112** (Pt 3): 263.
- Gaullier, J. M., Simonsen, A., D'Arrigo, A. *et al.* (1998). FYVE fingers bind PtdIns(3)P. *Nature* **394**(6692): 432.
- Gautreau, A., Poulet, P., Louvard, D. *et al.* (1999). Ezrin, a plasma membrane-microfilament linker, signals cell survival through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(13): 7300.

- Geiger, B., Spatz, J. P., Bershadsky, A. D. (2009). Environmental sensing through focal adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(1): 21.
- Gennis, R. B. (1989). *Biomembranes: molecular structure and function*. 1. Auflage, New York, Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag New York Inc.
- Ghevaert, C., Salsmann, A., Watkins, N. A. *et al.* (2008). A nonsynonymous SNP in the ITGB3 gene disrupts the conserved membrane-proximal cytoplasmic salt bridge in the alphaIIb beta3 integrin and cosegregates dominantly with abnormal proplatelet formation and macrothrombocytopenia. *Blood* **111**(7): 3407.
- Gibson, T. J., Hyvonen, M., Musacchio, A. *et al.* (1994). PH domain: the first anniversary. *Trends Biochem Sci* **19**(9): 349.
- Giddu, S., Subramanian, V., Yoon, H. S. *et al.* (2009). Design of beta-hairpin peptides for modulation of cell adhesion by beta-turn constraint. *J Med Chem* **52**(3): 726.
- Gillooly, D. J., Morrow, I. C., Lindsay, M. *et al.* (2000). Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells. *Embo J* **19**(17): 4577.
- Ginsberg, M. H., Yaspan, B., Forsyth, J. *et al.* (2001). A membrane-distal segment of the integrin alpha IIb cytoplasmic domain regulates integrin activation. *J Biol Chem* **276**(25): 22514.
- Ginsberg, M. H., Partridge, A., Shattil, S. J. (2005). Integrin regulation. *Curr Opin Cell Biol* **17**(5): 509.
- Giuriato, S., Payrastra, B., Drayer, A. L. *et al.* (1997). Tyrosine phosphorylation and relocation of SHIP are integrin-mediated in thrombin-stimulated human blood platelets. *J Biol Chem* **272**(43): 26857.
- Glodek, A. M., Honczarenko, M., Le, Y. *et al.* (2003). Sustained activation of cell adhesion is a differentially regulated process in B lymphopoiesis. *J Exp Med* **197**(4): 461.
- Glushka, J., Lee, M., Coffin, S. *et al.* (1989). Nitrogen-15 chemical shifts of backbone amides in bovine pancreatic trypsin inhibitor and apamin. *J Am Chem Soc* **111**: 7716.
- Glushka, J., Lee, M., Coffin, S. *et al.* (1990). Nitrogen-15 chemical shifts of backbone amides in bovine pancreatic trypsin inhibitor and apamin [Erratum]. *J Am Chem Soc* **112**(2843).
- Goksoy, E., Ma, Y. Q., Wang, X. *et al.* (2008). Structural basis for the autoinhibition of talin in regulating integrin activation. *Mol Cell* **31**(1): 124.
- Golebiewska, U., Gambhir, A., Hangyas-Mihalyne, G. *et al.* (2006). Membrane-bound basic peptides sequester multivalent (PIP2), but not monovalent (PS), acidic lipids. *Biophys J* **91**(2): 588.
- Golebiewska, U., Nyako, M., Woturski, W. *et al.* (2008). Diffusion coefficient of fluorescent phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in the plasma membrane of cells. *Mol Biol Cell* **19**(4): 1663.
- Golemis, E. A. & Adams, P. D. (eds.) (2005). *Protein-protein interactions. A molecular cloning manual*. 2nd edition, Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Golub, T. & Caroni, P. (2005). PI(4,5)P2-dependent microdomain assemblies capture microtubules to promote and control leading edge motility. *J Cell Biol* **169**(1): 151.
- Gottschalk, K. E., Adams, P. D., Brunger, A. T. *et al.* (2002). Transmembrane signal transduction of the alpha(IIb)beta(3) integrin. *Protein Sci* **11**(7): 1800.
- Gottschalk, K. E. (2005). A coiled-coil structure of the alphaIIb beta3 integrin transmembrane and cytoplasmic domains in its resting state. *Structure* **13**(5): 703.
- Gozani, O., Field, S. J., Ferguson, C. G. *et al.* (2005). Modification of protein sub-nuclear localization by synthetic phosphoinositides: evidence for nuclear phosphoinositide signaling mechanisms. *Adv Enzyme Regul* **45**: 171.
- Gratacap, M. P., Payrastra, B., Viala, C. *et al.* (1998). Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent stimulation of phospholipase C-gamma2 is an early key event in Fc gamma RIIA-mediated activation of human platelets. *J Biol Chem* **273**(38): 24314.
- Greenfield, N. J. (1996). Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data. *Anal Biochem* **235**(1): 1.

- Greenwood, J. A., Theibert, A. B., Prestwich, G. D. *et al.* (2000). Restructuring of focal adhesion plaques by PI 3-kinase. Regulation by PtdIns (3,4,5)-p(3) binding to alpha-actinin. *J Cell Biol* **150**(3): 627.
- Gross, E. & Morell, J. L. (1971). The structure of nisin. *J Am Chem Soc* **93**(18): 4634.
- Gu, J., Tamura, M., Yamada, K. M. (1998). Tumor suppressor PTEN inhibits integrin- and growth factor-mediated mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling pathways. *J Cell Biol* **143**(5): 1375.
- Guo, S., Stolz, L. E., Lemrow, S. M. *et al.* (1999). SAC1-like domains of yeast SAC1, INP52, and INP53 and of human synaptojanin encode polyphosphoinositide phosphatases. *J Biol Chem* **274**(19): 12990.
- Guttman, R. P., Sokol, S., Baker, D. L. *et al.* (2002). Proteolysis of the N-methyl-D-aspartate receptor by calpain in situ. *J Pharmacol Exp Ther* **302**(3): 1023.
- Haas, T. A. & Plow, E. F. (1996). The cytoplasmic domain of alphaIIb beta3. A ternary complex of the integrin alpha and beta subunits and a divalent cation. *J Biol Chem* **271**(11): 6017.
- Haas, T. A. & Plow, E. F. (1997). Development of a structural model for the cytoplasmic domain of an integrin. *Protein Eng* **10**(12): 1395.
- Haleva, E., Ben-Tal, N., Diamant, H. (2004). Increased concentration of polyvalent phospholipids in the adsorption domain of a charged protein. *Biophys J* **86**(4): 2165.
- Halstead, J. R., Jalink, K., Divecha, N. (2005). An emerging role for PtdIns(4,5)P2-mediated signalling in human disease. *Trends Pharmacol Sci* **26**(12): 654.
- Hamada, K., Shimizu, T., Yonemura, S. *et al.* (2003). Structural basis of adhesion-molecule recognition by ERM proteins revealed by the crystal structure of the radixin-ICAM-2 complex. *Embo J* **22**(3): 502.
- Hammond, G., Thomas, C. L., Schiavo, G. (2004). Nuclear phosphoinositides and their functions. *Curr Top Microbiol Immunol* **282**: 177.
- Han, S. J., Lee, J. H., Hong, S. H. *et al.* (2002). AP180 binds to the C-terminal SH2 domain of phospholipase C-gamma and inhibits its enzymatic activity. *Biochem Biophys Res Commun* **290**(1): 35.
- Han, S. J., Lee, J. H., Kim, C. G. *et al.* (2003). Identification of p115 as a PLCgamma1-binding protein and the role of Src homology domains of PLCgamma1 in the vesicular transport. *Biochem Biophys Res Commun* **300**(3): 649.
- Hannigan, M., Zhan, L., Li, Z. *et al.* (2002). Neutrophils lacking phosphoinositide 3-kinase gamma show loss of directionality during N-formyl-Met-Leu-Phe-induced chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(6): 3603.
- Hannun, Y. A. & Obeid, L. M. (2008). Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(2): 139.
- Hantgan, R. R., Paumi, C., Rocco, M. *et al.* (1999). Effects of ligand-mimetic peptides Arg-Gly-Asp-X (X = Phe, Trp, Ser) on alphaIIb beta3 integrin conformation and oligomerization. *Biochemistry* **38**(44): 14461.
- Harburger, D. S. & Calderwood, D. A. (2009). Integrin signalling at a glance. *J Cell Sci* **122**(Pt 2): 159.
- Harlan, J. E., Hajduk, P. J., Yoon, H. S. *et al.* (1994). Pleckstrin homology domains bind to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature* **371**(6493): 168.
- Haslam, R. J., Koide, H. B., Hemmings, B. A. (1993). Pleckstrin domain homology. *Nature* **363**(6427): 309.
- He, J., Haney, R. M., Vora, M. *et al.* (2008). Molecular mechanism of membrane targeting by the GRP1 PH domain. *J Lipid Res* **49**(8): 1807.
- Heino, J. (2000). The collagen receptor integrins have distinct ligand recognition and signaling functions. *Matrix Biol* **19**(4): 319.
- Heiska, L., Alfthan, K., Gronholm, M. *et al.* (1998). Association of ezrin with intercellular adhesion molecule-1 and -2 (ICAM-1 and ICAM-2). Regulation by phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J Biol Chem* **273**(34): 21893.
- Hemler, M. E., Jacobson, J. G., Brenner, M. B. *et al.* (1985). VLA-1: a T cell surface antigen which defines a novel late stage of human T cell activation. *Eur J Immunol* **15**(5): 502.

- Hemler, M. E. & Jacobson, J. G. (1987). Cell matrix adhesion-related proteins VLA-1 and VLA-2: regulation of expression on T cells. *J Immunol* **138**(9): 2941.
- Hennessey, J. P., Jr. & Johnson, W. C., Jr. (1981). Information content in the circular dichroism of proteins. *Biochemistry* **20**(5): 1085.
- Heo, W. D., Inoue, T., Park, W. S. *et al.* (2006). PI(3,4,5)P3 and PI(4,5)P2 lipids target proteins with polybasic clusters to the plasma membrane. *Science* **314**(5804): 1458.
- Hervy, M., Hoffman, L., Beckerle, M. C. (2006). From the membrane to the nucleus and back again: bifunctional focal adhesion proteins. *Curr Opin Cell Biol* **18**(5): 524.
- Heuer, K., Sylvester, M., Kliche, S. *et al.* (2006). Lipid-binding hSH3 domains in immune cell adapter proteins. *J Mol Biol* **361**(1): 94. Higgs, H. N. & Pollard, T. D. (2000). Activation by Cdc42 and PIP(2) of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) stimulates actin nucleation by Arp2/3 complex. *J Cell Biol* **150**(6): 1311.
- Higgs, H. N. & Pollard, T. D. (2000). Activation by Cdc42 and PIP(2) of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) stimulates actin nucleation by Arp2/3 complex. *J Cell Biol* **150**(6): 1311.
- Hilgemann, D. W., Feng, S., Nasuhoglu, C. (2001). The complex and intriguing lives of PIP2 with ion channels and transporters. *Sci STKE* **2001**(111): re19.
- Hirao, M., Sato, N., Kondo, T. *et al.* (1996). Regulation mechanism of ERM (ezrin/radixin/moesin) protein/plasma membrane association: possible involvement of phosphatidylinositol turnover and Rho-dependent signaling pathway. *J Cell Biol* **135**(1): 37.
- Hofmann, A. (2009). ACDP - a Java application for data processing and analysis of protein dichroism spectra. *J Appl Cryst* **42**: 137.
- Horowitz, A., Murakami, M., Gao, Y. *et al.* (1999). Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate mediates the interaction of syndecan-4 with protein kinase C. *Biochemistry* **38**(48): 15871.
- Horwitz, A. F. & Hunter, T. (1996). Cell adhesion: integrating circuitry. *Trends Cell Biol* **6**(12): 460.
- Hu, N. J., Bradshaw, J., Lauter, H. *et al.* (2008). Membrane-induced folding and structure of membrane-bound annexin A1 N-terminal peptides: implications for annexin-induced membrane aggregation. *Biophys J* **94**(5): 1773.
- Huang, C. L., Feng, S., Hilgemann, D. W. (1998). Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP2 and its stabilization by Gbetagamma. *Nature* **391**(6669): 803.
- Huang, S., Lifshitz, L., Patki-Kamath, V. *et al.* (2004). Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-rich plasma membrane patches organize active zones of endocytosis and ruffling in cultured adipocytes. *Mol Cell Biol* **24**(20): 9102.
- Hughes, P. E., O'Toole, T. E., Ylanne, J. *et al.* (1995). The conserved membrane-proximal region of an integrin cytoplasmic domain specifies ligand binding affinity. *J Biol Chem* **270**(21): 12411.
- Hughes, P. E., Diaz-Gonzalez, F., Leong, L. *et al.* (1996). Breaking the integrin hinge. A defined structural constraint regulates integrin signaling. *J Biol Chem* **271**(12): 6571.
- Huijbregts, R. P., Topalof, L., Bankaitis, V. A. (2000). Lipid metabolism and regulation of membrane trafficking. *Traffic* **1**(3): 195.
- Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K. (1996). VMD - visual molecular dynamics. *J Molec Graphics* **14**: 33.
- Humphries, J. D., Askari, J. A., Zhang, X. P. *et al.* (2000). Molecular basis of ligand recognition by integrin alpha5beta 1. II. Specificity of arg-gly-Asp binding is determined by Trp157 OF THE alpha subunit. *J Biol Chem* **275**(27): 20337.
- Humphries, M. J. (2000). Integrin structure. *Biochem Soc Trans* **28**(4): 311.
- Humphries, M. J., McEwan, P. A., Barton, S. J. *et al.* (2003). Integrin structure: heady advances in ligand binding, but activation still makes the knees wobble. *Trends Biochem Sci* **28**(6): 313.

- Huveneers, S., Truong, H., Danen, H. J. (2007). Integrins: signaling, disease, and therapy. *Int J Radiat Biol* **83**(11-12): 743.
- Hwang, S. C., Jhon, D. Y., Bae, Y. S. *et al.* (1996). Activation of phospholipase C-gamma by the concerted action of tau proteins and arachidonic acid. *J Biol Chem* **271**(31): 18342.
- Hwang, P. M. & Vogel, H. J. (2000). Structures of the platelet calcium- and integrin-binding protein and the alphaIIb-integrin cytoplasmic domain suggest a mechanism for calcium-regulated recognition; homology modelling and NMR studies. *J Mol Recognit* **13**(2): 83.
- Hyduk, S. J., Chan, J. R., Duffy, S. T. *et al.* (2007). Phospholipase C, calcium, and calmodulin are critical for alpha4beta1 integrin affinity up-regulation and monocyte arrest triggered by chemoattractants. *Blood* **109**(1): 176.
- Hynes, R. O., Schwarzbauer, J. E., Tamkun, J. W. (1987). Isolation and analysis of cDNA and genomic clones of fibronectin and its receptor. *Methods Enzymol* **144**: 447.
- Hynes, R. O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**(6): 673.
- Ignatius, M. J., Large, T. H., Houde, M. *et al.* (1990). Molecular cloning of the rat integrin alpha 1-subunit: a receptor for laminin and collagen. *J Cell Biol* **111**(2): 709.
- Imai, Y., Park, E. J., Peer, D. *et al.* (2008). Genetic perturbation of the putative cytoplasmic membrane-proximal salt bridge aberrantly activates alpha(4) integrins. *Blood* **112**(13): 5007.
- Isakoff, S. J., Cardozo, T., Andreev, J. *et al.* (1998). Identification and analysis of PH domain-containing targets of phosphatidylinositol 3-kinase using a novel in vivo assay in yeast. *Embo J* **17**(18): 5374.
- Itoh, T., Koshiba, S., Kigawa, T. *et al.* (2001). Role of the ENTH domain in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate binding and endocytosis. *Science* **291**(5506): 1047.
- Itoh, T. & De Camilli, P. (2006). BAR, F-BAR (EFC) and ENTH/ANTH domains in the regulation of membrane-cytosol interfaces and membrane curvature. *Biochim Biophys Acta* **1761**(8): 897.
- Jackson, S. P., Yap, C. L., Anderson, K. E. (2004). Phosphoinositide 3-kinases and the regulation of platelet function. *Biochem Soc Trans* **32**(Pt 2): 387.
- Jaffe, A. B. & Hall, A. (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 247.
- Janat, M. F., Argraves, W. S., Liao, G. (1992). Regulation of vascular smooth muscle cell integrin expression by transforming growth factor beta1 and by platelet-derived growth factor-BB. *J Cell Physiol* **151**(3): 588.
- Janmey, P. A. & Stossel, T. P. (1987). Modulation of gelsolin function by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Nature* **325**(6102): 362.
- Janmey, P. A. & Lindberg, U. (2004). Cytoskeletal regulation: rich in lipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(8): 658.
- Jeffries, T. R., Dove, S. K., Michell, R. H. *et al.* (2004). PtdIns-specific MPR pathway association of a novel WD40 repeat protein, WIPI49. *Mol Biol Cell* **15**(6): 2652.
- Ji, Q. S., Chattopadhyay, A., Vecchi, M. *et al.* (1999). Physiological requirement for both SH2 domains for phospholipase C-gamma1 function and interaction with platelet-derived growth factor receptors. *Mol Cell Biol* **19**(7): 4961.
- Johnson, C. M., Chichili, G. R., Rodgers, W. (2008). Compartmentalization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate signaling evidenced using targeted phosphatases. *J Biol Chem* **283**(44): 29920.
- Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. *et al.* (1991). Improved methods for building protein models in electron density maps and location of errors in these models. *Acta Crystallogr. A Found. Cryst* **47**: 110.
- Jones, D. T. (1999). Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J Mol Biol* **292**(2): 195.
- Jones, N. P., Peak, J., Brader, S. *et al.* (2005). PLCgamma1 is essential for early events in integrin signalling required for cell motility. *J Cell Sci* **118**(Pt 12): 2695.

- Jones, N. P. & Katan, M. (2007). Role of phospholipase Cgamma1 in cell spreading requires association with a beta-Pix/GIT1-containing complex, leading to activation of Cdc42 and Rac1. *Mol Cell Biol* **27**(16): 5790.
- Kanner, S. B., Grosmaire, L. S., Ledbetter, J. A. *et al.* (1993). Beta 2-integrin LFA-1 signaling through phospholipase C-gamma 1 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(15): 7099.
- Karathanassis, D., Stahelin, R. V., Bravo, J. *et al.* (2002). Binding of the PX domain of p47(phox) to phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate and phosphatidic acid is masked by an intramolecular interaction. *Embo J* **21**(19): 5057.
- Kashiwagi, H., Tomiyama, Y., Tadokoro, S. *et al.* (1999). A mutation in the extracellular cysteine-rich repeat region of the beta3 subunit activates integrins alphaIIb beta3 and alphaV beta3. *Blood* **93**(8): 2559.
- Kassis, J., Lauffenburger, D. A., Turner, T. *et al.* (2001). Tumor invasion as dysregulated cell motility. *Semin Cancer Biol* **11**(2): 105.
- Katagiri, K., Maeda, A., Shimonaka, M. *et al.* (2003). RAPL, a Rap1-binding molecule that mediates Rap1-induced adhesion through spatial regulation of LFA-1. *Nat Immunol* **4**(8): 741.
- Katan, M., Rodriguez, R., Matsuda, M. *et al.* (2003). Structural and mechanistic aspects of phospholipase Cgamma regulation. *Adv Enzyme Regul* **43**: 77.
- Kavran, J. M., Klein, D. E., Lee, A. *et al.* (1998). Specificity and promiscuity in phosphoinositide binding by pleckstrin homology domains. *J Biol Chem* **273**(46): 30497.
- Kelly, D. F. & Taylor, K. A. (2005). Identification of the beta1-integrin binding site on alpha-actinin by cryoelectron microscopy. *J Struct Biol* **149**(3): 290.
- Kern, A., Eble, J., Golbik, R. *et al.* (1993). Interaction of type IV collagen with the isolated integrins alpha 1 beta 1 and alpha 2 beta 1. *Eur J Biochem* **215**(1): 151.
- Kern, F., Docke, W. D., Reinke, P. *et al.* (1994). Discordant expression of LFA-1, VLA-4alpha, VLA-beta 1, CD45RO and CD28 on T-cell subsets: evidence for multiple subsets of 'memory' T cells. *Int Arch Allergy Immunol* **104**(1): 17.
- Kerrigan, J. (2003). <http://www2.umdj.edu/~kerrigje>.
- Kiema, T., Lad, Y., Jiang, P. *et al.* (2006). The molecular basis of filamin binding to integrins and competition with talin. *Mol Cell* **21**(3): 337.
- Kim, J. W., Sim, S. S., Kim, U. H. *et al.* (1990). Tyrosine residues in bovine phospholipase C-gamma phosphorylated by the epidermal growth factor receptor in vitro. *J Biol Chem* **265**(7): 3940.
- Kim, M., Carman, C. V., Springer, T. A. (2003). Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins. *Science* **301**(5640): 1720.
- Kim, M., Carman, C. V., Yang, W. *et al.* (2004). The primacy of affinity over clustering in regulation of adhesiveness of the integrin {alpha}L{beta}2. *J Cell Biol* **167**(6): 1241.
- Kim, S., Kim, H., Chang, B. *et al.* (2006). Regulation of transferrin recycling kinetics by PtdIns[4,5]P2 availability. *Faseb J* **20**(13): 2399.
- Kim, S. K., Choi, J. H., Suh, P. G. *et al.* (2006). Pleckstrin homology domain of phospholipase C-gamma1 directly binds to 68-kDa neurofilament light chain. *Exp Mol Med* **38**(3): 265.
- Kinashi, T. (2007). Integrin regulation of lymphocyte trafficking: lessons from structural and signaling studies. *Adv Immunol* **93**: 185.
- Knezevic, I., Leisner, T. M., Lam, S. C. (1996). Direct binding of the platelet integrin alphaIIb beta3 (GPIIb-IIIa) to talin. Evidence that interaction is mediated through the cytoplasmic domains of both alphaIIb and beta3. *J Biol Chem* **271**(27): 16416.
- Kojima, T., Fukuda, M., Watanabe, Y. *et al.* (1997). Characterization of the pleckstrin homology domain of Btk as an inositol polyphosphate and phosphoinositide binding domain. *Biochem Biophys Res Commun* **236**(2): 333.

- Komander, D., Deak, M., Morrice, N. *et al.* (2004). Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction of a proteolytic fragment of PDK1 containing the pleckstrin homology domain. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**(Pt 2): 314.
- Kooijman, E. E., Tieleman, D. P., Testerink, C. *et al.* (2007). An electrostatic/hydrogen bond switch as the basis for the specific interaction of phosphatidic acid with proteins. *J Biol Chem* **282**(15): 11356.
- Kornberg, L. J., Earp, H. S., Turner, C. E. *et al.* (1991). Signal transduction by integrins: increased protein tyrosine phosphorylation caused by clustering of beta 1 integrins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(19): 8392.
- Kundra, V., Escobedo, J. A., Kazlauskas, A. *et al.* (1994). Regulation of chemotaxis by the platelet-derived growth factor receptor-beta. *Nature* **367**(6462): 474.
- Kutateladze, T. G. (2006). Phosphatidylinositol 3-phosphate recognition and membrane docking by the FYVE domain. *Biochim Biophys Acta* **1761**(8): 868.
- Kweon, D. H., Kim, C. S., Shin, Y. K. (2003). Insertion of the membrane-proximal region of the neuronal SNARE coiled coil into the membrane. *J Biol Chem* **278**(14): 12367.
- Kwik, J., Boyle, S., Fooksman, D. *et al.* (2003). Membrane cholesterol, lateral mobility, and the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent organization of cell actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(24): 13964.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259): 680.
- Langholz, O., Roeckel, D., Petersohn, D. *et al.* (1997). Cell-matrix interactions induce tyrosine phosphorylation of MAP kinases ERK1 and ERK2 and PLCgamma-1 in two-dimensional and three-dimensional cultures of human fibroblasts. *Exp Cell Res* **235**(1): 22.
- Laporte, J., Hu, L. J., Kretz, C. *et al.* (1996). A gene mutated in X-linked myotubular myopathy defines a new putative tyrosine phosphatase family conserved in yeast. *Nat Genet* **13**(2): 175.
- Lassing, I. & Lindberg, U. (1985). Specific interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and profilactin. *Nature* **314**(6010): 472.
- Lau, T. L., Partridge, A. W., Ginsberg, M. H. *et al.* (2008a). Structure of the integrin beta3 transmembrane segment in phospholipid bicelles and detergent micelles. *Biochemistry* **47**(13): 4008.
- Lau, T. L., Dua, V., Ulmer, T. S. (2008b). Structure of the integrin alphaIIb transmembrane segment. *J Biol Chem* **283**(23): 16162.
- Lau, T. L., Kim, C., Ginsberg, M. H. *et al.* (2009). The structure of the integrin alphaIIbbeta3 transmembrane complex explains integrin transmembrane signalling. *Embo J* **28**(9): 1351.
- Laux, T., Fukami, K., Thelen, M. *et al.* (2000). GAP43, MARCKS, and CAP23 modulate PI(4,5)P(2) at plasmalemmal rafts, and regulate cell cortex actin dynamics through a common mechanism. *J Cell Biol* **149**(7): 1455.
- Lee, S., Iwata, T., Oyagi, H. *et al.* (1993). Effect of salts on conformational change of basic amphipathic peptides from beta-structure to alpha-helix in the presence of phospholipid liposomes and their channel-forming ability. *Biochim Biophys Acta* **1151**(1): 76.
- Lee, J. O., Rieu, P., Arnaout, M. A. *et al.* (1995). Crystal structure of the A domain from the alpha subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18). *Cell* **80**(4): 631.
- Lee, I. H., You, J. O., Ha, K. S. *et al.* (2004). AHNAK-mediated activation of phospholipase C-gamma1 through protein kinase C. *J Biol Chem* **279**(25): 26645.
- Lee, S. B., Varnai, P., Balla, A. *et al.* (2004). The pleckstrin homology domain of phosphoinositide-specific phospholipase Cdelta4 is not a critical determinant of the membrane localization of the enzyme. *J Biol Chem* **279**(23): 24362.
- Legendre-Guillemain, V., Wasiak, S., Hussain, N. K. *et al.* (2004). ENTH/ANTH proteins and clathrin-mediated membrane budding. *J Cell Sci* **117**(Pt 1): 9.

- Lemmon, M. A., Ferguson, K. M., O'Brien, R. *et al.* (1995). Specific and high-affinity binding of inositol phosphates to an isolated pleckstrin homology domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(23): 10472.
- Lemmon, M. A. & Ferguson, K. M. (2001). Molecular determinants in pleckstrin homology domains that allow specific recognition of phosphoinositides. *Biochem Soc Trans* **29**(Pt 4): 377.
- Lemmon, M. A., Ferguson, K. M., Abrams, C. S. (2002). Pleckstrin homology domains and the cytoskeleton. *FEBS Lett* **513**(1): 71.
- Lemmon, M. A. (2003). Phosphoinositide recognition domains. *Traffic* **4**(4): 201.
- Lemmon, M. A. (2008). Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(2): 99.
- Leslie, N. R., Biondi, R. M., Alessi, D. R. (2001). Phosphoinositide-regulated kinases and phosphoinositide phosphatases. *Chem Rev* **101**(8): 2365.
- Levental, I., Cebers, A., Janmey, P. A. (2008a). Combined electrostatics and hydrogen bonding determine intermolecular interactions between polyphosphoinositides. *J Am Chem Soc* **130**(28): 9025.
- Levental, I., Janmey, P. A., Cebers, A. (2008b). Electrostatic contribution to the surface pressure of charged monolayers containing polyphosphoinositides. *Biophys J* **95**(3): 1199.
- Li, R., Babu, C. R., Lear, J. D. *et al.* (2001). Oligomerization of the integrin alphaIIb beta3: roles of the transmembrane and cytoplasmic domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(22): 12462.
- Li, R., Babu, C. R., Valentine, K. *et al.* (2002). Characterization of the monomeric form of the transmembrane and cytoplasmic domains of the integrin beta 3 subunit by NMR spectroscopy. *Biochemistry* **41**(52): 15618.
- Li, R., Mitra, N., Gratkowski, H. *et al.* (2003). Activation of integrin alphaIIb beta3 by modulation of transmembrane helix associations. *Science* **300**(5620): 795.
- Li, W., Metcalf, D. G., Gorelik, R. *et al.* (2005). A push-pull mechanism for regulating integrin function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(5): 1424.
- Li, Y. F., Tang, R. H., Puan, K. J. *et al.* (2007). The cytosolic protein talin induces an intermediate affinity integrin alphaL beta2. *J Biol Chem* **282**(33): 24310.
- Liebert, W., Szymas, J., Majewski, T. (1992). [Clinical analysis of 27 cases of primary lymphoma of the central nervous system]. *Neurol Neurochir Pol Suppl* **1**: 144.
- Liepina, I., Czaplewski, C., Janmey, P. *et al.* (2003). Molecular dynamics study of a gelsolin-derived peptide binding to a lipid bilayer containing phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Biopolymers* **71**(1): 49.
- Lietha, D., Cai, X., Ceccarelli, D. F. *et al.* (2007). Structural basis for the autoinhibition of focal adhesion kinase. *Cell* **129**(6): 1177.
- Lietzke, S. E., Bose, S., Cronin, T. *et al.* (2000). Structural basis of 3-phosphoinositide recognition by pleckstrin homology domains. *Mol Cell* **6**(2): 385.
- Lim, J., Wiedemann, A., Tzircotis, G. *et al.* (2007). An essential role for talin during alpha(M)beta(2)-mediated phagocytosis. *Mol Biol Cell* **18**(3): 976.
- Lim, C. J., Kain, K. H., Tkachenko, E. *et al.* (2008). Integrin-mediated protein kinase A activation at the leading edge of migrating cells. *Mol Biol Cell* **19**(11): 4930.
- Lindmo, K. & Stenmark, H. (2006). Regulation of membrane traffic by phosphoinositide 3-kinases. *J Cell Sci* **119**(Pt 4): 605.
- Lindsay, Y., McCoull, D., Davidson, L. *et al.* (2006). Localization of agonist-sensitive PtdIns(3,4,5)P3 reveals a nuclear pool that is insensitive to PTEN expression. *J Cell Sci* **119**(Pt 24): 5160.
- Lindvall, J. M., Blomberg, K. E., Wennborg, A. *et al.* (2005). Differential expression and molecular characterisation of Lmo7, Myo1e, Sash1, and Mcoln2 genes in Btk-defective B-cells. *Cell Immunol* **235**(1): 46.

- Ling, K., Doughman, R. L., Firestone, A. J. *et al.* (2002). Type I gamma phosphatidylinositol phosphate kinase targets and regulates focal adhesions. *Nature* **420**(6911): 89.
- Ling, K., Doughman, R. L., Iyer, V. V. *et al.* (2003). Tyrosine phosphorylation of type I gamma phosphatidylinositol phosphate kinase by Src regulates an integrin-talin switch. *J Cell Biol* **163**(6): 1339.
- Liu, S., Thomas, S. M., Woodside, D. G. *et al.* (1999). Binding of paxillin to alpha4 integrins modifies integrin-dependent biological responses. *Nature* **402**(6762): 676.
- Liu, S., Calderwood, D. A., Ginsberg, M. H. (2000). Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *J Cell Sci* **113** (Pt 20): 3563.
- Liu, X. & Ye, K. (2005). Src homology domains in phospholipase C-gamma1 mediate its anti-apoptotic action through regulating the enzymatic activity. *J Neurochem* **93**(4): 892.
- Lo, S. H. (2006). Focal adhesions: what's new inside. *Dev Biol* **294**(2): 280.
- Lock, J. G., Wehrle-Haller, B., Stromblad, S. (2008). Cell-matrix adhesion complexes: master control machinery of cell migration. *Semin Cancer Biol* **18**(1): 65.
- Lodowski, D. T., Barnhill, J. F., Pitcher, J. A. *et al.* (2003). Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of a complex between G protein-coupled receptor kinase 2 and Gbeta1gamma2. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **59**(Pt 5): 936.
- Loeser, R. F., Carlson, C. S., McGee, M. P. (1995). Expression of beta 1 integrins by cultured articular chondrocytes and in osteoarthritic cartilage. *Exp Cell Res* **217**(2): 248.
- Logan, M. R. & Mandato, C. A. (2006). Regulation of the actin cytoskeleton by PIP2 in cytokinesis. *Biol Cell* **98**(6): 377.
- Lopes, C. M., Zhang, H., Rohacs, T. *et al.* (2002). Alterations in conserved Kir channel-PIP2 interactions underlie channelopathies. *Neuron* **34**(6): 933.
- López Cascales, J. J., de la Torre, J. G., Marrink, S. J. *et al.* (1996). Molecular dynamics simulation of a charged biological membrane. *J Chem Phys* **104**: 2713.
- Lorenz, C. D., Faraudo, J., Travasset, A. (2008). Hydrogen bonding and binding of polybasic residues with negatively charged mixed lipid monolayers. *Langmuir* **24**(5): 1654.
- Lorenzo, O., Urbe, S., Clague, M. J. (2005). Analysis of phosphoinositide binding domain properties within the myotubularin-related protein MTMR3. *J Cell Sci* **118**(Pt 9): 2005.
- Loster, K., Voigt, S., Heidrich, C. *et al.* (1994). Cell-collagen adhesion is inhibited by monoclonal antibody 33.4 against the rat alpha 1-integrin subunit. *Exp Cell Res* **212**(1): 155.
- Loster, K., Vossmeier, D., Hofmann, W. *et al.* (2001). alpha1 Integrin cytoplasmic domain is involved in focal adhesion formation via association with intracellular proteins. *Biochem J* **356**(Pt 1): 233.
- Lu, C. F. & Springer, T. A. (1997). The alpha subunit cytoplasmic domain regulates the assembly and adhesiveness of integrin lymphocyte function-associated antigen-1. *J Immunol* **159**(1): 268.
- Lu, C., Takagi, J., Springer, T. A. (2001). Association of the membrane proximal regions of the alpha and beta subunit cytoplasmic domains constrains an integrin in the inactive state. *J Biol Chem* **276**(18): 14642.
- Luo, B. H., Springer, T. A., Takagi, J. (2004a). Locking the beta3 integrin I-like domain into high and low affinity conformations with disulfides. *J Biol Chem* **279**(11): 10215.
- Luo, B. H., Takagi, J., Springer, T. A. (2004b). A specific interface between integrin transmembrane helices and affinity for ligand. *PLoS Biol* **2**: e153.
- Luo, B. H., Carman, C. V., Takagi, J. *et al.* (2005). Disrupting integrin transmembrane domain heterodimerization increases ligand binding affinity, not valency or clustering. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(10): 3679.
- Luo, B. H. & Springer, T. A. (2006). Integrin structures and conformational signaling. *Curr Opin Cell Biol* **18**(5): 579.

- Luo, B. H., Carman, C. V., Springer, T. A. (2007). Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol* **25**: 619.
- Ma, Y. Q., Qin, J., Plow, E. F. (2007). Platelet integrin alpha(IIb)beta(3): activation mechanisms. *J Thromb Haemost* **5**(7): 1345.
- Ma, Y. Q., Qin, J., Wu, C. *et al.* (2008). Kindlin-2 (Mig-2): a co-activator of beta3 integrins. *J Cell Biol* **181**(3): 439.
- Macia, E., Paris, S., Chabre, M. (2000). Binding of the PH and polybasic C-terminal domains of ARNO to phosphoinositides and to acidic lipids. *Biochemistry* **39**(19): 5893.
- Maehama, T. & Dixon, J. E. (1998). The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* **273**(22): 13375.
- Maffucci, T. & Falasca, M. (2001). Specificity in pleckstrin homology (PH) domain membrane targeting: a role for a phosphoinositide-protein co-operative mechanism. *FEBS Lett* **506**(3): 173.
- Maget-Dana, R. & Ptak, M. (1997). Penetration of the insect defensin A into phospholipid monolayers and formation of defensin A-lipid complexes. *Biophys J* **73**(5): 2527.
- Maget-Dana, R. (1999). The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. *Biochim Biophys Acta* **1462**(1-2): 109.
- Maget-Dana, R., Lelievre, D., Brack, A. (1999). Surface active properties of amphiphilic sequential isopeptides: Comparison between alpha-helical and beta-sheet conformations. *Biopolymers* **49**(5): 415.
- Maget-Dana, R. & Lelievre, D. (2001). Comparative interaction of alpha-helical and beta-sheet amphiphilic isopeptides with phospholipid monolayers. *Biopolymers* **59**(1): 1.
- Magzoub, M., Eriksson, L. E., Graslund, A. (2002). Conformational states of the cell-penetrating peptide penetratin when interacting with phospholipid vesicles: effects of surface charge and peptide concentration. *Biochim Biophys Acta* **1563**(1-2): 53.
- Majerus, P. W., Connolly, T. M., Ross, T. S. *et al.* (1986). The role of phosphoinositides in cell physiology. *Symp Fundam Cancer Res* **39**: 157.
- Majerus, P. W., Kisseleva, M. V., Norris, F. A. (1999). The role of phosphatases in inositol signaling reactions. *J Biol Chem* **274**(16): 10669.
- Manavalan, P. & Johnson, W. C. J. (1983). Sensitivity of circular dichroism to protein tertiary structure class. *Nature* **305**: 831.
- Mangeat, P., Roy, C., Martin, M. (1999). ERM proteins in cell adhesion and membrane dynamics. *Trends Cell Biol* **9**(5): 187.
- Manna, D., Albanese, A., Park, W. S. *et al.* (2007). Mechanistic basis of differential cellular responses of phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate- and phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-binding pleckstrin homology domains. *J Biol Chem* **282**(44): 32093.
- Marsh, D. (2007). Lateral pressure profile, spontaneous curvature frustration, and the incorporation and conformation of proteins in membranes. *Biophys J* **93**: 3884.
- Martel, V., Racaud-Sultan, C., Dupe, S. *et al.* (2001). Conformation, localization, and integrin binding of talin depend on its interaction with phosphoinositides. *J Biol Chem* **276**(24): 21217.
- Matsuda, M., Paterson, H. F., Rodriguez, R. *et al.* (2001). Real time fluorescence imaging of PLC gamma translocation and its interaction with the epidermal growth factor receptor. *J Cell Biol* **153**(3): 599.
- Mattila, E., Pellinen, T., Nevo, J. *et al.* (2005). Negative regulation of EGFR signalling through integrin-alpha1beta1-mediated activation of protein tyrosine phosphatase TCPTP. *Nat Cell Biol* **7**(1): 78.
- Maxwell, M. J., Yuan, Y., Anderson, K. E. *et al.* (2004). SHIP1 and Lyn Kinase Negatively Regulate Integrin alpha IIb beta 3 signaling in platelets. *J Biol Chem* **279**(31): 32196.

- Mayer, B. J., Ren, R., Clark, K. L. *et al.* (1993). A putative modular domain present in diverse signaling proteins. *Cell* **73**(4): 629.
- Mazzucato, M., Pradella, P., Cozzi, M. R. *et al.* (2002). Sequential cytoplasmic calcium signals in a 2-stage platelet activation process induced by the glycoprotein Ibalph mechanoreceptor. *Blood* **100**(8): 2793.
- McBride, K., Rhee, S. G., Jaken, S. (1991). Immunocytochemical localization of phospholipase C-gamma in rat embryo fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(16): 7111.
- McCall-Culbreath, K. D. & Zutter, M. M. (2008). Collagen receptor integrins: rising to the challenge. *Curr Drug Targets* **9**(2): 139.
- McLaughlin, S. (1977). Electrostatic potentials at membrane-solution interfaces. *Curr Top Membr Trans* **9**: 71.
- McLaughlin, S. (1989). The electrostatic properties of membranes. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* **18**: 113.
- McLaughlin, S. & Aderem, A. (1995). The myristoyl-electrostatic switch: a modulator of reversible protein-membrane interactions. *Trends Biochem Sci* **20**(7): 272.
- McLaughlin, S., Wang, J., Gambhir, A. *et al.* (2002). PIP(2) and proteins: interactions, organization, and information flow. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **31**: 151.
- McLaughlin, S., Hangyas-Mihalyne, G., Zaitseva, I. *et al.* (2005a). Reversible - through calmodulin - electrostatic interactions between basic residues on proteins and acidic lipids in the plasma membrane. *Biochem Soc Symp*(72): 189.
- McLaughlin, S., Smith, S. O., Hayman, M. J. *et al.* (2005b). An electrostatic engine model for autoinhibition and activation of the epidermal growth factor receptor (EGFR/ErbB) family. *J Gen Physiol* **126**(1): 41.
- McLaughlin, S. & Murray, D. (2005). Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics. *Nature* **438**(7068): 605.
- McPherson, P. S., Garcia, E. P., Slepnev, V. I. *et al.* (1996). A presynaptic inositol-5-phosphatase. *Nature* **379**(6563): 353.
- Meyer zu Heringsdorf, D. & Jakobs, K. H. (2007). Lysophospholipid receptors: signalling, pharmacology and regulation by lysophospholipid metabolism. *Biochem Biophys Acta* **1768**: 923.
- Michailidis, I. E., Helton, T. D., Petrou, V. I. *et al.* (2007). Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate regulates NMDA receptor activity through alpha-actinin. *J Neurosci* **27**(20): 5523.
- Michell, R. H., Heath, V. L., Lemmon, M. A. *et al.* (2006). Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate: metabolism and cellular functions. *Trends Biochem Sci* **31**(1): 52.
- Michell, R. H. (2008). Inositol derivatives: evolution and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(2): 151.
- Milburn, C. C., Deak, M., Kelly, S. M. *et al.* (2003). Binding of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate to the pleckstrin homology domain of protein kinase B induces a conformational change. *Biochem J* **375**(Pt 3): 531.
- Miranti, C. K. (2002). Application of cell adhesion to study signaling networks. *Methods Cell Biol* **69**: 359.
- Mitra, S. K., Hanson, D. A., Schlaepfer, D. D. (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(1): 56.
- Montanez, E., Ussar, S., Schifferer, M. *et al.* (2008). Kindlin-2 controls bidirectional signaling of integrins. *Genes Dev* **22**(10): 1325.
- Montich, G., Scarlata, S., McLaughlin, S. *et al.* (1993). Thermodynamic characterization of the association of small basic peptides with membranes containing acidic lipids. *Biochim Biophys Acta* **1146**(1): 17.
- Mori, E. & Jirgensons, B. (1981). Effect of long-chain alkyl sulfate binding on circular dichroism and conformation of soybean trypsin inhibitor. *Biochemistry* **20**(6): 1630.
- Moser, M., Nieswandt, B., Ussar, S. *et al.* (2008). Kindlin-3 is essential for integrin activation and platelet aggregation. *Nat Med* **14**(3): 325.

- Moser, M., Legate, K. R., Zent, R. *et al.* (2009). The tail of integrins, talin, and kindlins. *Science* **324**(5929): 895.
- Mould, A. P. & Humphries, M. J. (2004). Regulation of integrin function through conformational complexity: not simply a knee-jerk reaction? *Curr Opin Cell Biol* **16**(5): 544.
- Mouneimne, G., Soon, L., DesMarais, V. *et al.* (2004). Phospholipase C and cofilin are required for carcinoma cell directionality in response to EGF stimulation. *J Cell Biol* **166**(5): 697.
- Muir, T. W., Williams, M. J., Ginsberg, M. H. *et al.* (1994). Design and chemical synthesis of a neoprotein structural model for the cytoplasmic domain of a multisubunit cell-surface receptor: integrin alpha IIb beta 3 (platelet GPIIb-IIIa). *Biochemistry* **33**(24): 7701.
- Mukhopadhyay, S. & Cho, W. (1996). Interactions of annexin V with phospholipid monolayers. *Biochem Biophys Acta* **1279**: 58.
- Mülhardt, C. (2006). *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. 5. Auflage, München, Spektrum Akademischer Verlag, Elsevier GmbH.
- Musacchio, A., Gibson, T., Rice, P. *et al.* (1993). The PH domain: a common piece in the structural patchwork of signalling proteins. *Trends Biochem Sci* **18**(9): 343.
- Nagel, W., Zeitlmann, L., Schilcher, P. *et al.* (1998). Phosphoinositide 3-OH kinase activates the beta2 integrin adhesion pathway and induces membrane recruitment of cytohesin-1. *J Biol Chem* **273**(24): 14853.
- Naik, U. P., Patel, P. M., Parise, L. V. (1997). Identification of a novel calcium-binding protein that interacts with the integrin alphaIIb cytoplasmic domain. *J Biol Chem* **272**(8): 4651.
- Nayal, A., Webb, D. J., Horwitz, A. F. (2004). Talin: an emerging focal point of adhesion dynamics. *Curr Opin Cell Biol* **16**(1): 94.
- Nesbitt, W. S., Kulkarni, S., Giuliano, S. *et al.* (2002). Distinct glycoprotein Ib/V/IX and integrin alpha IIb beta 3-dependent calcium signals cooperatively regulate platelet adhesion under flow. *J Biol Chem* **277**(4): 2965.
- Newman, R. H., Tucker, A., Ferguson, C. G. *et al.* (1989). Crystallisation of p68 on lipid monolayers and as three-dimensional single crystals. *J Mol Biol* **206**: 213.
- Newton, A. C. & Koshland, D. E., Jr. (1989). High cooperativity, specificity, and multiplicity in the protein kinase C-lipid interaction. *J Biol Chem* **264**(25): 14909.
- Newton, A. C. (2003). Measuring the interaction of protein kinase C with membranes: an introduction. *Methods Mol Biol* **233**: 89.
- Nittoli, T., Coast, G. M., Sieburth, S. M. (1999). Evidence for helicity in insect diuretic peptide hormones: computational analysis, spectroscopic studies, and biological assays. *J Pept Res* **53**(2): 99.
- Odom, A. R., Stahlberg, A., Wente, S. R. *et al.* (2000). A role for nuclear inositol 1,4,5-trisphosphate kinase in transcriptional control. *Science* **287**(5460): 2026.
- Odorizzi, G., Babst, M., Emr, S. D. (2000). Phosphoinositide signaling and the regulation of membrane trafficking in yeast. *Trends Biochem Sci* **25**(5): 229.
- Oikawa, T., Yamaguchi, H., Itoh, T. *et al.* (2004). PtdIns(3,4,5)P3 binding is necessary for WAVE2-induced formation of lamellipodia. *Nat Cell Biol* **6**(5): 420.
- Osawa, S., Funamoto, S., Nobuhara, M. *et al.* (2008). Phosphoinositides suppress gamma-secretase in both the detergent-soluble and -insoluble states. *J Biol Chem* **283**(28): 19283.
- Otey, C. A., Pavalko, F. M., Burridge, K. (1990). An interaction between alpha-actinin and the beta 1 integrin subunit in vitro. *J Cell Biol* **111**(2): 721.
- O'Toole, T. E., Katagiri, Y., Faull, R. J. *et al.* (1994). Integrin cytoplasmic domains mediate inside-out signal transduction. *J Cell Biol* **124**(6): 1047.
- O'Toole, T. E., Ylanne, J., Culley, B. M. (1995). Regulation of integrin affinity states through an NPXY motif in the beta subunit cytoplasmic domain. *J Biol Chem* **270**(15): 8553.

- Oxley, C. L., Anthis, N. J., Lowe, E. D. *et al.* (2008). An integrin phosphorylation switch: the effect of beta3 integrin tail phosphorylation on Dok1 and talin binding. *J Biol Chem* **283**(9): 5420.
- Oude Weernink, P. A., Schulte, P., Guo, Y. *et al.* (2000). Stimulation of phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase by Rho-kinase. *J Biol Chem* **275**(14): 10168.
- Pandit, S. A. & Berkowitz, M. L. (2002). Molecular dynamics simulation of dipalmitoylphosphatidylserine bilayer with Na⁺ counterions. *Biophys J* **82**(4): 1818.
- Papayannopoulos, V., Co, C., Prehoda, K. E. *et al.* (2005). A polybasic motif allows N-WASP to act as a sensor of PIP(2) density. *Mol Cell* **17**(2): 181.
- Parent, C. A., Blacklock, B. J., Froehlich, W. M. *et al.* (1998). G protein signaling events are activated at the leading edge of chemotactic cells. *Cell* **95**(1): 81.
- Park, D. J., Min, H. K., Rhee, S. G. (1991). IgE-induced tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 1 in rat basophilic leukemia cells. *J Biol Chem* **266**(36): 24237.
- Partridge, A. W., Liu, S., Kim, S. *et al.* (2005). Transmembrane domain helix packing stabilizes integrin alphaIIb beta3 in the low affinity state. *J Biol Chem* **280**(8): 7294.
- Pasquet, J. M., Bobe, R., Gross, B. *et al.* (1999). A collagen-related peptide regulates phospholipase Cgamma2 via phosphatidylinositol 3-kinase in human platelets. *Biochem J* **342** (Pt 1): 171.
- Paul, B. Z., Vilaire, G., Kunapuli, S. P. *et al.* (2003). Concurrent signaling from Galphaq- and Galpha12-coupled pathways is essential for agonist-induced alpha v beta3 activation on human platelets. *J Thromb Haemost* **1**(4): 814.
- Patil, S., Jedsadayamata, A., Wencel-Drake, J. D. *et al.* (1999). Identification of a talin-binding site in the integrin beta(3) subunit distinct from the NPLY regulatory motif of post-ligand binding functions. The talin n-terminal head domain interacts with the membrane-proximal region of the beta(3) cytoplasmic tail. *J Biol Chem* **274**(40): 28575.
- Pavalko, F. M. & Burridge, K. (1991). Disruption of the actin cytoskeleton after microinjection of proteolytic fragments of alpha-actinin. *J Cell Biol* **114**(3): 481.
- Peitzsch, R. M. & McLaughlin, S. (1993). Binding of acylated peptides and fatty acids to phospholipid vesicles: pertinence to myristoylated proteins. *Biochemistry* **32**(39): 10436.
- Pellinen, T., Arjonen, A., Vuoriluoto, K. *et al.* (2006). Small GTPase Rab21 regulates cell adhesion and controls endosomal traffic of beta1-integrins. *J Cell Biol* **173**(5): 767.
- Penninger, J. M. & Crabtree, G. R. (1999). The actin cytoskeleton and lymphocyte activation. *Cell* **96**(1): 9.
- Perides, G., Plagens, U., Traub, P. (1986). Protein transfer from fixed, stained, and dried polyacrylamide gels and immunoblot with protein A-gold. *Anal Biochem* **152**(1): 94.
- Peyruchaud, O., Nurden, A. T., Milet, S. *et al.* (1998). R to Q amino acid substitution in the GFFKR sequence of the cytoplasmic domain of the integrin IIb subunit in a patient with a Glanzmann's thrombasthenia-like syndrome. *Blood* **92**(11): 4178.
- Piccio, L., Rossi, B., Scarpini, E. *et al.* (2002). Molecular mechanisms involved in lymphocyte recruitment in inflamed brain microvessels: critical roles for P-selectin glycoprotein ligand-1 and heterotrimeric G(i)-linked receptors. *J Immunol* **168**(4): 1940.
- Piccolo, E., Innominato, P. F., Mariggio, M. A. *et al.* (2002). The mechanism involved in the regulation of phospholipase Cgamma1 activity in cell migration. *Oncogene* **21**(42): 6520.
- Pike, L. J. & Miller, J. M. (1998). Cholesterol depletion delocalizes phosphatidylinositol bisphosphate and inhibits hormone-stimulated phosphatidylinositol turnover. *J Biol Chem* **273**(35): 22298.
- Pitcher, J. A., Touhara, K., Payne, E. S. *et al.* (1995). Pleckstrin homology domain-mediated membrane association and activation of the beta-adrenergic receptor kinase requires coordinate interaction with G beta gamma subunits and lipid. *J Biol Chem* **270**(20): 11707.
- Poccia, D. & Larijani, B. (2009). Phosphatidylinositol metabolism and membrane fusion. *Biochem J* **418**(2): 233.

- Pollard, T. D. & Borisy, G. G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* **112**(4): 453.
- Ponting, C. P. (1996). Novel domains in NADPH oxidase subunits, sorting nexins, and PtdIns 3-kinases: binding partners of SH3 domains? *Protein Sci* **5**(11): 2353.
- Poulin, B., Sekiya, F., Rhee, S. G. (2000). Differential roles of the Src homology 2 domains of phospholipase C-gamma1 (PLC-gamma1) in platelet-derived growth factor-induced activation of PLC-gamma1 in intact cells. *J Biol Chem* **275**(9): 6411.
- Powner, D. J., Payne, R. M., Pettitt, T. R. *et al.* (2005). Phospholipase D2 stimulates integrin-mediated adhesion via phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase Igamma b. *J Cell Sci* **118**(Pt 13): 2975.
- Pozzi, A., Wary, K. K., Giancotti, F. G. *et al.* (1998). Integrin alpha1beta1 mediates a unique collagen-dependent proliferation pathway in vivo. *J Cell Biol* **142**(2): 587.
- Pozzi, A., Moberg, P. E., Miles, L. A. *et al.* (2000). Elevated matrix metalloprotease and angiostatin levels in integrin alpha 1 knockout mice cause reduced tumor vascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(5): 2202.
- Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W. *et al.* (1992). Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein. *Gene* **111**(2): 229.
- Prehoda, K. E., Scott, J. A., Mullins, R. D. *et al.* (2000). Integration of multiple signals through cooperative regulation of the N-WASP-Arp2/3 complex. *Science* **290**(5492): 801.
- Price, L. S., Leng, J., Schwartz, M. A. *et al.* (1998). Activation of Rac and Cdc42 by integrins mediates cell spreading. *Mol Biol Cell* **9**(7): 1863.
- Puklin-Faucher, E. & Sheetz, M. P. (2009). The mechanical integrin cycle. *J Cell Sci* **122**(Pt 2): 179.
- Qin, Z. & Cafiso, D. S. (1996). Membrane structure of protein kinase C and calmodulin binding domain of myristoylated alanine rich C kinase substrate determined by site-directed spin labeling. *Biochemistry* **35**(9): 2917.
- Rameh, L. E., Rhee, S. G., Spokes, K. *et al.* (1998). Phosphoinositide 3-kinase regulates phospholipase Cgamma-mediated calcium signaling. *J Biol Chem* **273**(37): 23750.
- Rameh, L. E. & Cantley, L. C. (1999). The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *J Biol Chem* **274**(13): 8347.
- Rao, W. H., Hales, J. M., Camp, R. D. (2000). Potent costimulation of effector T lymphocytes by human collagen type I. *J Immunol* **165**(9): 4935.
- Rauch, M. E., Ferguson, C. G., Prestwich, G. D. *et al.* (2002). Myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) sequesters spin-labeled phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in lipid bilayers. *J Biol Chem* **277**(16): 14068.
- Razzini, G., Brancaccio, A., Lemmon, M. A. *et al.* (2000). The role of the pleckstrin homology domain in membrane targeting and activation of phospholipase Cbeta(1). *J Biol Chem* **275**(20): 14873.
- Rebecchi, M. J. & Scarlata, S. (1998). Pleckstrin homology domains: a common fold with diverse functions. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **27**: 503.
- Rey-Ladino, J. A., Huber, M., Liu, L. *et al.* (1999). The SH2-containing inositol-5'-phosphatase enhances LFA-1-mediated cell adhesion and defines two signaling pathways for LFA-1 activation. *J Immunol* **162**(10): 5792.
- Richardson, J. S. (1981). The anatomy and taxonomy of protein structure. *Adv Protein Chem* **34**: 167.
- Rid, R., Schiefermeier, N., Grigoriev, I. *et al.* (2005). The last but not the least: the origin and significance of trailing adhesions in fibroblastic cells. *Cell Motil Cytoskeleton* **61**(3): 161.
- Rohacs, T., Lopes, C. M., Jin, T. *et al.* (2003). Specificity of activation by phosphoinositides determines lipid regulation of Kir channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(2): 745.

- Rohatgi, R., Ma, L., Miki, H. *et al.* (1999). The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell* **97**(2): 221.
- Rose, J. K., Buonocore, L., Whitt, M. A. (1991). A new cationic liposome reagent mediating nearly quantitative transfection of animal cells. *Biotechniques* **10**(4): 520.
- Rosengarth, A., Wintergalen, A., Galla, H. J. *et al.* (1998). Ca²⁺-independent interaction of annexin I with phospholipid monolayers. *FEBS Lett* **438**(3): 279.
- Rosenhouse-Dantsker, A. & Logothetis, D. E. (2007). Molecular characteristics of phosphoinositide binding. *Pflugers Arch* **455**(1): 45.
- Rossino, P., Gavazzi, I., Timpl, R. *et al.* (1990). Nerve growth factor induces increased expression of a laminin-binding integrin in rat pheochromocytoma PC12 cells. *Exp Cell Res* **189**(1): 100.
- Rotondi, K. S. & Gierasch, L. M. (2005). A well-defined amphipathic conformation for the calcium-free cyclic lipopeptide antibiotic, daptomycin, in aqueous solution. *Biopolymers* **80**(2-3): 374.
- Ruiz, C., Liu, C. Y., Sun, Q. H. *et al.* (2001). A point mutation in the cysteine-rich domain of glycoprotein (GP) IIIa results in the expression of a GPIIb-IIIa (alphaIIb beta3) integrin receptor locked in a high-affinity state and a Glanzmann thrombasthenia-like phenotype. *Blood* **98**(8): 2432.
- Russo, C., Gao, Y., Mancini, P. *et al.* (2001). Modulation of oncogenic DBL activity by phosphoinositol phosphate binding to pleckstrin homology domain. *J Biol Chem* **276**(22): 19524.
- Rusu, L., Gambhir, A., McLaughlin, S. *et al.* (2004). Fluorescence correlation spectroscopy studies of Peptide and protein binding to phospholipid vesicles. *Biophys J* **87**(2): 1044.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F. *et al.* (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**(4732): 1350.
- Salinovich, O. & Montelaro, R. C. (1986). Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* **156**(2): 341.
- Sanchez-Madrid, F. & del Pozo, M. A. (1999). Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *Embo J* **18**(3): 501.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12): 5463.
- Sarantos, M. R., Raychaudhuri, S., Lum, A. F. *et al.* (2005). Leukocyte function-associated antigen 1-mediated adhesion stability is dynamically regulated through affinity and valency during bond formation with intercellular adhesion molecule-1. *J Biol Chem* **280**(31): 28290.
- Sato, T. K., Overduin, M., Emr, S. D. (2001). Location, location, location: membrane targeting directed by PX domains. *Science* **294**(5548): 1881.
- Sbrissa, D., Ikonomov, O. C., Shisheva, A. (1999). PIKfyve, a mammalian ortholog of yeast Fab1p lipid kinase, synthesizes 5-phosphoinositides. Effect of insulin. *J Biol Chem* **274**(31): 21589.
- Sbrissa, D., Ikonomov, O. C., Shisheva, A. (2002). Phosphatidylinositol 3-phosphate-interacting domains in PIKfyve. Binding specificity and role in PIKfyve. Endomembrane localization. *J Biol Chem* **277**(8): 6073.
- Schagger, H. & von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**(2): 368.
- Schagger, H. & von Jagow, G. (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* **199**(2): 223.
- Scheid, M. P. & Woodgett, J. R. (2003). Unravelling the activation mechanisms of protein kinase B/Akt. *FEBS Lett* **546**(1): 108.
- Schiffer, M. & Edmundson, A. B. (1967). Use of helical wheels to represent the structures of proteins and to identify segments with helical potential. *Biophys J* **7**(2): 121.

- Schill, N. J. & Anderson, R. A. (2009). Out, in and back again: PtdIns(4,5)P(2) regulates cadherin trafficking in epithelial morphogenesis. *Biochem J* **418**(2): 247.
- Schmidt, C. E., Dai, J., Lauffenburger, D. A. *et al.* (1995). Integrin-cytoskeletal interactions in neuronal growth cones. *J Neurosci* **15**(5 Pt 1): 3400.
- Schlaepfer, D. D. & Hunter, T. (1998). Integrin signalling and tyrosine phosphorylation: just the FAKs? *Trends Cell Biol* **8**(4): 151.
- Schneider, D. & Engelman, D. M. (2004). Involvement of transmembrane domain interactions in signal transduction by alpha/beta integrins. *J Biol Chem* **279**(11): 9840.
- Schoenwaelder, S. M., Ono, A., Sturgeon, S. *et al.* (2007). Identification of a unique co-operative phosphoinositide 3-kinase signaling mechanism regulating integrin alpha IIb beta 3 adhesive function in platelets. *J Biol Chem* **282**(39): 28648.
- Schrimpf, G. H. (2002). *Gentechnische Methoden*. 3. Auflage, Heidelberg, Berlin, Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- Schwander, M., Leu, M., Stumm, M. *et al.* (2003). Beta1 integrins regulate myoblast fusion and sarcomere assembly. *Dev Cell* **4**(5): 673.
- Sears, L. E., Moran, L. S., Kissinger, C. *et al.* (1992). CircumVent thermal cycle sequencing and alternative manual and automated DNA sequencing protocols using the highly thermostable VentR (exo-) DNA polymerase. *Biotechniques* **13**(4): 626.
- Seelig, A., Alt, T., Lotz, S. *et al.* (1996). Binding of substance P agonists to lipid membranes and to the neurokinin-1 receptor. *Biochemistry* **35**(14): 4365.
- Seelig, A., Blatter, X. L., Frentzel, A. *et al.* (2000). Phospholipid binding of synthetic talin peptides provides evidence for an intrinsic membrane anchor of talin. *J Biol Chem* **275**(24): 17954.
- Seet, L. F. & Hong, W. (2006). The Phox (PX) domain proteins and membrane traffic. *Biochim Biophys Acta* **1761**(8): 878.
- Sekiya, F., Bae, Y. S., Jhon, D. Y. *et al.* (1999a). AHNAK, a protein that binds and activates phospholipase C-gamma1 in the presence of arachidonic acid. *J Biol Chem* **274**(20): 13900.
- Sekiya, F., Bae, Y. S., Rhee, S. G. (1999b). Regulation of phospholipase C isozymes: activation of phospholipase C-gamma in the absence of tyrosine-phosphorylation. *Chem Phys Lipids* **98**(1-2): 3.
- Semmrich, M., Smith, A., Feterowski, C. *et al.* (2005). Importance of integrin LFA-1 deactivation for the generation of immune responses. *J Exp Med* **201**(12): 1987.
- Senger, D. R., Claffey, K. P., Benes, J. E. *et al.* (1997). Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor: regulation through alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(25): 13612.
- Serra, R., Carbonetto, S., Lord, M. *et al.* (1994). Transforming growth factor beta 1 suppresses transformation in hepatocytes by regulating alpha 1 beta 1 integrin expression. *Cell Growth Differ* **5**(5): 509.
- Shah, D. O. & Schulman, J. H. (1965). Binding of Metal Ions to Monolayers of Lecithins, Plasmalogen, Cardiolipin, and Dicetyl Phosphate. *J Lipid Res* **6**: 341.
- Shaw, G. (1996). The pleckstrin homology domain: an intriguing multifunctional protein module. *Bioessays* **18**(1): 35.
- Shepard, C. R., Kassiss, J., Whaley, D. L. *et al.* (2007). PLC gamma contributes to metastasis of in situ-occurring mammary and prostate tumors. *Oncogene* **26**(21): 3020.
- Shibasaki, F., Fukami, K., Fukui, Y. *et al.* (1994). Phosphatidylinositol 3-kinase binds to alpha-actinin through the p85 subunit. *Biochem J* **302** (Pt 2): 551.
- Sigal, C. T., Zhou, W., Buser, C. A. *et al.* (1994). Amino-terminal basic residues of Src mediate membrane binding through electrostatic interaction with acidic phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(25): 12253.

- Sigalov, A. B., Aivazian, D. A., Uversky, V. N. *et al.* (2006). Lipid-binding activity of intrinsically unstructured cytoplasmic domains of multichain immune recognition receptor signaling subunits. *Biochemistry* **45**(51): 15731.
- Simpson, L., Li, J., Liaw, D. *et al.* (2001). PTEN expression causes feedback upregulation of insulin receptor substrate 2. *Mol Cell Biol* **21**(12): 3947.
- Sly, L. M., Rauh, M. J., Kalesnikoff, J. *et al.* (2003). SHIP, SHIP2, and PTEN activities are regulated in vivo by modulation of their protein levels: SHIP is up-regulated in macrophages and mast cells by lipopolysaccharide. *Exp Hematol* **31**(12): 1170.
- Smerling, C., Tang, K., Hofmann, W. *et al.* (2007). Role of the alpha(1) integrin cytoplasmic tail in the formation of focal complexes, actin organization, and in the control of cell migration. *Exp Cell Res* **313**(14): 3153.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T. *et al.* (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**(1): 76.
- Soom, M., Schonherr, R., Kubo, Y. *et al.* (2001). Multiple PIP2 binding sites in Kir2.1 inwardly rectifying potassium channels. *FEBS Lett* **490**(1-2): 49.
- Springer, T. A. & Wang, J. H. (2004). The three-dimensional structure of integrins and their ligands, and conformational regulation of cell adhesion. *Adv Protein Chem* **68**: 29.
- Stahelin, R. V., Karathanassis, D., Murray, D. *et al.* (2007). Structural and membrane binding analysis of the Phox homology domain of Bem1p: basis of phosphatidylinositol 4-phosphate specificity. *J Biol Chem* **282**(35): 25737.
- Stambolic, V., Suzuki, A., de la Pompa, J. L. *et al.* (1998). Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* **95**(1): 29.
- Steck, G., Leuthard, P., Burk, R. R. (1980). Detection of basic proteins and low molecular weight peptides in polyacrylamide gels by formaldehyde fixation. *Anal Biochem* **107**(1): 21.
- Stefansson, A., Armulik, A., Nilsson, I. *et al.* (2004). Determination of N- and C-terminal borders of the transmembrane domain of integrin subunits. *J Biol Chem* **279**(20): 21200.
- Steimle, P. A., Hoffert, J. D., Adey, N. B. *et al.* (1999). Polyphosphoinositides inhibit the interaction of vinculin with actin filaments. *J Biol Chem* **274**(18): 414.
- Stenmark, H., Aasland, R., Toh, B. H. *et al.* (1996). Endosomal localization of the autoantigen EEA1 is mediated by a zinc-binding FYVE finger. *J Biol Chem* **271**(39): 24048.
- Stephens, L., Jackson, T., Hawkins, P. T. (1993). Synthesis of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in permeabilized neutrophils regulated by receptors and G-proteins. *J Biol Chem* **268**(23): 17162.
- Stephens, L. E., Sutherland, A. E., Klimanskaya, I. V. *et al.* (1995). Deletion of beta 1 integrins in mice results in inner cell mass failure and peri-implantation lethality. *Genes Dev* **9**(15): 1883.
- Stephens, L., McGregor, A., Hawkins, P. (2000). *in: Biology of phosphoinositides*. Oxford, Oxford University Press.
- Stephens, L., Ellson, C., Hawkins, P. (2002). Roles of PI3Ks in leukocyte chemotaxis and phagocytosis. *Curr Opin Cell Biol* **14**(2): 203.
- Sterry, W., Mielke, V., Konter, U. *et al.* (1992). Role of beta 1-integrins in epidermotropism of malignant T cells. *Am J Pathol* **141**(4): 855.
- Sticht, H., Willbold, D., Ejchart, A. *et al.* (1994). Trifluoroethanol stabilizes a helix-turn-helix motif in equine infectious-anemia-virus trans-activator protein. *Eur J Biochem* **225**(3): 855.
- Stoica, B., DeBell, K. E., Graham, L. *et al.* (1998). The amino-terminal Src homology 2 domain of phospholipase C gamma 1 is essential for TCR-induced tyrosine phosphorylation of phospholipase C gamma 1. *J Immunol* **160**(3): 1059.
- Stossel, T. P., Condeelis, J., Cooley, L. *et al.* (2001). Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(2): 138.

- Stromhaug, P. E., Reggiori, F., Guan, J. *et al.* (2004). Atg21 is a phosphoinositide binding protein required for efficient lipidation and localization of Atg8 during uptake of aminopeptidase I by selective autophagy. *Mol Biol Cell* **15**(8): 3553.
- Su, R. J., Li, K., Yang, M. *et al.* (2001). Platelet-derived growth factor enhances ex vivo expansion of megakaryocytic progenitors from human cord blood. *Bone Marrow Transplant* **27**(10): 1075.
- Suh, B. C. & Hille, B. (2005). Regulation of ion channels by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Curr Opin Neurobiol* **15**(3): 370.
- Sujobert, P., Bardet, V., Cornillet-Lefebvre, P. *et al.* (2005). Essential role for the p110delta isoform in phosphoinositide 3-kinase activation and cell proliferation in acute myeloid leukemia. *Blood* **106**(3): 1063.
- Suurkuusk, M. & Singh, S. K. (2000). Formation of HDL-like complexes from apolipoprotein A-I(M) and DMPC. *Int J Pharm* **194**(1): 21.
- Sweet, R. M., Wright, H. T., Janin, J. *et al.* (1974). Crystal structure of the complex of porcine trypsin with soybean trypsin inhibitor (Kunitz) at 2.6-Å resolution. *Biochemistry* **13**(20): 4212.
- Tadokoro, S., Shattil, S. J., Eto, K. *et al.* (2003). Talin binding to integrin beta tails: A final common step in integrin activation. *Science* **302**: 103.
- Takada, Y., Ye, X., Simon, S. (2007). The integrins. *Genome Biol* **8**(5): 215.
- Takagi, J., Erickson, H. P., Springer, T. A. (2001). C-terminal opening mimics 'inside-out' activation of integrin alpha5beta1. *Nat Struct Biol* **8**(5): 412.
- Takagi, J., Petre, B. M., Walz, T. *et al.* (2002). Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell* **110**(5): 599.
- Takagi, J. & Springer, T. A. (2002). Integrin activation and structural rearrangement. *Immunol Rev* **186**: 141.
- Takagi, J., Strokovich, K., Springer, T. A. *et al.* (2003). Structure of integrin alpha5beta1 in complex with fibronectin. *Embo J* **22**(18): 4607.
- Takagi, J. (2007). Structural basis for ligand recognition by integrins. *Curr Opin Cell Biol* **19**(5): 557.
- Takala, H., Nurminen, E., Nurmi, S. M. *et al.* (2008). Beta2 integrin phosphorylation on Thr758 acts as a molecular switch to regulate 14-3-3 and filamin binding. *Blood* **112**(5): 1853.
- Takei, K., Slepnev, V. I., Haucke, V. *et al.* (1999). Functional partnership between amphiphysin and dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Nat Cell Biol* **1**(1): 33.
- Tamura, M., Gu, J., Matsumoto, K. *et al.* (1998). Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science* **280**(5369): 1614.
- Tamura, M., Gu, J., Takino, T. *et al.* (1999). Tumor suppressor PTEN inhibition of cell invasion, migration, and growth: differential involvement of focal adhesion kinase and p130Cas. *Cancer Res* **59**(2): 442.
- Tanaka, M., Konishi, H., Touhara, K. *et al.* (1999). Identification of myosin II as a binding protein to the PH domain of protein kinase B. *Biochem Biophys Res Commun* **255**(1): 169.
- Terzi, E., Holzemann, G., Seelig, J. (1997). Interaction of Alzheimer beta-amyloid peptide(1-40) with lipid membranes. *Biochemistry* **36**(48): 14845.
- Thodeti, C. K., Massoumi, R., Bindslev, L. *et al.* (2002). Leukotriene D4 induces association of active RhoA with phospholipase C-gamma1 in intestinal epithelial cells. *Biochem J* **365**(Pt 1): 157.
- Thoren, P. E., Persson, D., Karlsson, M. *et al.* (2000). The antennapedia peptide penetratin translocates across lipid bilayers - the first direct observation. *FEBS Lett* **482**(3): 265.
- Tiewsiiri, K., Fischer, W. B., Angsuthanasombat, C. (2009). Lipid-induced conformation of helix 7 from the pore-forming domain of the Bacillus thuringiensis Cry4Ba toxin: implications for toxicity mechanism. *Arch Biochem Biophys* **482**(1-2): 17.

- Tingley, W. G., Ehlers, M. D., Kameyama, K. *et al.* (1997). Characterization of protein kinase A and protein kinase C phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit using phosphorylation site-specific antibodies. *J Biol Chem* **272**(8): 5157.
- Tomar, A., George, S., Kansal, P. *et al.* (2006). Interaction of phospholipase C-gamma1 with villin regulates epithelial cell migration. *J Biol Chem* **281**(42): 31972.
- Toner, M., Vaio, G., McLaughlin, A. *et al.* (1988). Adsorption of cations to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Biochemistry* **27**(19): 7435.
- Touhara, K., Inglese, J., Pitcher, J. A. *et al.* (1994). Binding of G protein beta gamma-subunits to pleckstrin homology domains. *J Biol Chem* **269**(14): 10217.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(9): 4350.
- Tran, D., Gascard, P., Berthon, B. *et al.* (1993). Cellular distribution of polyphosphoinositides in rat hepatocytes. *Cell Signal* **5**(5): 565.
- Tsukada, S., Simon, M. I., Witte, O. N. *et al.* (1994). Binding of beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins to the PH domain of Bruton tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(23): 11256.
- Tulla, M., Pentikainen, O. T., Viitasalo, T. *et al.* (2001). Selective binding of collagen subtypes by integrin alpha 1I, alpha 2I, and alpha 10I domains. *J Biol Chem* **276**(51): 48206.
- Tuominen, E. K., Wallace, C. J., Kinnunen, P. K. (2002). Phospholipid-cytochrome c interaction: evidence for the extended lipid anchorage. *J Biol Chem* **277**(11): 8822.
- Tvorogov, D., Wang, X. J., Zent, R. *et al.* (2005). Integrin-dependent PLC-gamma1 phosphorylation mediates fibronectin-dependent adhesion. *J Cell Sci* **118**(Pt 3): 601.
- Ulmer, T. S., Yaspan, B., Ginsberg, M. H. *et al.* (2001). NMR analysis of structure and dynamics of the cytosolic tails of integrin alpha 1Ib beta 3 in aqueous solution. *Biochemistry* **40**(25): 7498.
- Vallar, L., Melchior, C., Plancon, S. *et al.* (1999). Divalent cations differentially regulate integrin alpha 1Ib cytoplasmic tail binding to beta 3 and to calcium- and integrin-binding protein. *J Biol Chem* **274**(24): 17257.
- Valmu, L., Hilden, T. J., van Willigen, G. *et al.* (1999). Characterization of beta 2 (CD18) integrin phosphorylation in phorbol ester-activated T lymphocytes. *Biochem J* **339** (Pt 1): 119.
- van der Flier, A. & Sonnenberg, A. (2001). Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res* **305**(3): 285.
- van der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B. *et al.* (2005). GROMACS: Fast, flexible and free. *J Comp Chem* **26**: 1701.
- van Gunsteren, W. F. & Berendsen, H. J. C. (1990). Moleküldynamik-Computersimulationen; Methodik, Anwendungen und Perspektiven in der Chemie. *Angew Chem Int Ed Engl* **102**: 1020.
- Van Haastert, P. J. & Devreotes, P. N. (2004). Chemotaxis: signalling the way forward. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(8): 626.
- Vanhaesebroeck, B. & Waterfield, M. D. (1999). Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp Cell Res* **253**(1): 239.
- Vanhaesebroeck, B., Leever, S. J., Ahmadi, K. *et al.* (2001). Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem* **70**: 535.
- van Meer, G., Voelker, D. R., Feigenson, G. W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(2): 112.
- Varnai, P., Lin, X., Lee, S. B. *et al.* (2002). Inositol lipid binding and membrane localization of isolated pleckstrin homology (PH) domains. Studies on the PH domains of phospholipase C delta 1 and p130. *J Biol Chem* **277**(30): 27412.

- Varnai, P., Bondeva, T., Tamas, P. *et al.* (2005). Selective cellular effects of overexpressed pleckstrin-homology domains that recognize PtdIns(3,4,5)P₃ suggest their interaction with protein binding partners. *J Cell Sci* **118**(Pt 20): 4879.
- Venyaminov, S. & Vassilenko, K. S. (1994). Determination of protein tertiary structure class from circular dichroism spectra. *Anal Biochem* **222**(1): 176.
- Victor, K., Jacob, J., Cafiso, D. S. (1999). Interactions controlling the membrane binding of basic protein domains: Phenylalanine and the attachment of the myristoylated alanine-rich C-kinase substrate protein to interfaces. *Biochemistry* **38**: 12527.
- Villalba, M., Bi, K., Rodriguez, F. *et al.* (2001). Vav1/Rac-dependent actin cytoskeleton reorganization is required for lipid raft clustering in T cells. *J Cell Biol* **155**(3): 331.
- Vinogradova, O., Haas, T., Plow, E. F. *et al.* (2000). A structural basis for integrin activation by the cytoplasmic tail of the alpha IIb-subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(4): 1450.
- Vinogradova, O., Velyvis, A., Velyviene, A. *et al.* (2002). A structural mechanism of integrin alpha(IIb)beta(3) "inside-out" activation as regulated by its cytoplasmic face. *Cell* **110**(5): 587.
- Vinogradova, O., Vaynberg, J., Kong, X. *et al.* (2004). Membrane-mediated structural transitions at the cytoplasmic face during integrin activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(12): 4094.
- Vomund, A. N., Stuhlsatz-Krouper, S., Dimitry, J. *et al.* (2008). A naturally occurring extracellular alpha-beta clasp contributes to stabilization of beta3 integrins in a bent, resting conformation. *Biochemistry* **47**(44): 11616.
- von Heijne, G. (1992). Membrane protein structure prediction: Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J Mol Biol* **225**: 487.
- Vossmeier, D., Kaufmann, C., Loster, K. *et al.* (2000). The cytoplasmic domain of the alpha1 integrin subunit influences stress fiber formation via the conserved GFFKR motif. *Exp Cell Res* **256**(1): 321.
- Vossmeier, D., Hofmann, W., Loster, K. *et al.* (2002). Phospholipase Cgamma binds alpha1beta1 integrin and modulates alpha1beta1 integrin-specific adhesion. *J Biol Chem* **277**(7): 4636.
- Wahl, M. I., Nishibe, S., Kim, J. W. *et al.* (1990). Identification of two epidermal growth factor-sensitive tyrosine phosphorylation sites of phospholipase C-gamma in intact HSC-1 cells. *J Biol Chem* **265**(7): 3944.
- Walliser, C., Retlich, M., Harris, R. *et al.* (2008). Rac regulates its effector phospholipase Cgamma2 through interaction with a split pleckstrin homology domain. *J Biol Chem* **283**(44): 30351.
- Wang, T., Pentylala, S., Rebecchi, M. J. *et al.* (1999). Differential association of the pleckstrin homology domains of phospholipases C-beta 1, C-beta 2, and C-delta 1 with lipid bilayers and the beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins. *Biochemistry* **38**(5): 1517.
- Wang, J., Arbuzova, A., Hangyas-Mihalyne, G. *et al.* (2001). The effector domain of myristoylated alanine-rich C kinase substrate binds strongly to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Biol Chem* **276**(7): 5012.
- Wang, J., Gambhir, A., Hangyas-Mihalyne, G. *et al.* (2002). Lateral sequestration of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate by the basic effector domain of myristoylated alanine-rich C kinase substrate is due to nonspecific electrostatic interactions. *J Biol Chem* **277**(37): 34401.
- Wang, Y. J., Li, W. H., Wang, J. *et al.* (2004). Critical role of PIP5KI{gamma}87 in InsP₃-mediated Ca(2+) signaling. *J Cell Biol* **167**(6): 1005.
- Wang, C., Du, X. N., Jia, Q. Z. *et al.* (2005). Binding of PLCdelta1PH-GFP to PtdIns(4,5)P₂ prevents inhibition of phospholipase C-mediated hydrolysis of PtdIns(4,5)P₂ by neomycin. *Acta Pharmacol Sin* **26**(12): 1485.
- Wang, Q., Downey, G. P., Herrera-Abreu, M. T. *et al.* (2005). SHP-2 modulates interleukin-1-induced Ca²⁺ flux and ERK activation via phosphorylation of phospholipase Cgamma1. *J Biol Chem* **280**(9): 8397.
- Wang, Y., Wu, J., Wang, Z. (2006). Akt binds to and phosphorylates phospholipase C-gamma1 in response to epidermal growth factor. *Mol Biol Cell* **17**(5): 2267.

- Wang, J., Mayernik, L., Armant, D. R. (2007). Trophoblast adhesion of the peri-implantation mouse blastocyst is regulated by integrin signaling that targets phospholipase C. *Dev Biol* **302**(1): 143.
- Wary, K. K., Mainiero, F., Isakoff, S. J. *et al.* (1996). The adaptor protein Shc couples a class of integrins to the control of cell cycle progression. *Cell* **87**(4): 733.
- Wary, K. K., Mariotti, A., Zurzolo, C. *et al.* (1998). A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth. *Cell* **94**(5): 625.
- Watanabe, Y., Tamura, M., Osajima, A. *et al.* (2003). Integrins induce expression of monocyte chemoattractant protein-1 via focal adhesion kinase in mesangial cells. *Kidney Int* **64**(2): 431.
- Wegener, K. L., Partridge, A. W., Han, J. *et al.* (2007). Structural basis of integrin activation by talin. *Cell* **128**(1): 171.
- Wegener, K. L. & Campbell, I. D. (2008). Transmembrane and cytoplasmic domains in integrin activation and protein-protein interactions (review). *Mol Membr Biol* **25**(5): 376.
- Weljie, A. M., Hwang, P. M., Vogel, H. J. (2002). Solution structures of the cytoplasmic tail complex from platelet integrin alpha IIb- and beta 3-subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(9): 5878.
- Wenk, M. R. & De Camilli, P. (2004). Protein-lipid interactions and phosphoinositide metabolism in membrane traffic: insights from vesicle recycling in nerve terminals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(22): 8262.
- Wells, A. (2000). Tumor invasion: role of growth factor-induced cell motility. *Adv Cancer Res* **78**: 31.
- Wells, A. D., Liu, Q. H., Hondowicz, B. *et al.* (2003). Regulation of T cell activation and tolerance by phospholipase C gamma-1-dependent integrin avidity modulation. *J Immunol* **170**(8): 4127.
- White, D. J., Puranen, S., Johnson, M. S. *et al.* (2004). The collagen receptor subfamily of the integrins. *Int J Biochem Cell Biol* **36**(8): 1405.
- Williams, M. J., Hughes, P. E., O'Toole, T. E. *et al.* (1994). The inner world of cell adhesion: integrin cytoplasmic domains. *Trends Cell Biol* **4**: 109.
- Wimley, W. C. & White, S. H. (1996). Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces. *Nat Struct Biol* **3**(10): 842.
- Wishart, D. S. & Sykes, B. D. (1994). Chemical shifts as a tool for structure determination. *Methods in Enzymology*. James, T. L. and Oppenheimer, N. L. Orlando, Academic Press. **239**: 363-92.
- Wishart, M. J., Taylor, G. S., Slama, J. T. *et al.* (2001). PTEN and myotubularin phosphoinositide phosphatases: bringing bioinformatics to the lab bench. *Curr Opin Cell Biol* **13**(2): 172.
- Wixler, V., Geerts, D., Laplantine, E. *et al.* (2000). The LIM-only protein DRAL/FHL2 binds to the cytoplasmic domain of several alpha and beta integrin chains and is recruited to adhesion complexes. *J Biol Chem* **275**(43): 33669.
- Woody, R. W. (1978). Aromatic side-chain contributions to the far ultraviolet circular dichroism of peptides and proteins. *Biopolymers* **17**(6): 1451.
- Woulfe, D., Jiang, H., Mortensen, R. *et al.* (2002). Activation of Rap1B by G(i) family members in platelets. *J Biol Chem* **277**(26): 23382.
- Wrenn, R. W., Creazzo, T. L., Herman, L. E. (1996). Beta 1 integrin ligation stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C gamma 1 and elevates intracellular Ca²⁺ in pancreatic acinar cells. *Biochem Biophys Res Commun* **226**(3): 876.
- Wüthrich, K. (1976). NMR in biological research: peptides and proteins. Amsterdam, North Holland, American Elsevier Pub.Co.
- Wüthrich, K. (1986). *NMR of proteins and nucleic acids*. New York, John Wiley & Sons Inc.
- Yan, B., Calderwood, D. A., Yaspan, B. *et al.* (2001). Calpain cleavage promotes talin binding to the beta 3 integrin cytoplasmic domain. *J Biol Chem* **276**(30): 28164.
- Yang, J. J., Pikeathly, M., Radford, S. E. (1994). Far-UV circular dichroism reveals a conformational switch in a peptide fragment from the beta-sheet of hen lysozyme. *Biochemistry* **33**(23): 7345.

- Yao, L., Suzuki, H., Ozawa, K. *et al.* (1997). Interactions between protein kinase C and pleckstrin homology domains. Inhibition by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and phorbol 12-myristate 13-acetate. *J Biol Chem* **272**(20): 13033.
- Yap, C. L., Anderson, K. E., Hughan, S. C. *et al.* (2002). Essential role for phosphoinositide 3-kinase in shear-dependent signaling between platelet glycoprotein Ib/V/IX and integrin alpha(IIb)beta(3). *Blood* **99**(1): 151.
- Yin, H. L. & Janmey, P. A. (2003). Phosphoinositide regulation of the actin cytoskeleton. *Annu Rev Physiol* **65**: 761.
- Xiong, J. P., Stehle, T., Diefenbach, B. *et al.* (2001). Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3. *Science* **294**(5541): 339.
- Xiong, J. P., Stehle, T., Zhang, R. *et al.* (2002). Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science* **296**(5565): 151.
- Young, P. & Gautel, M. (2000). The interaction of titin and alpha-actinin is controlled by a phospholipid-regulated intramolecular pseudoligand mechanism. *Embo J* **19**(23): 6331.
- Zaidel-Bar, R., Itzkovitz, S., Ma'ayan, A. *et al.* (2007). Functional atlas of the integrin adhesome. *Nat Cell Biol* **9**(8): 858.
- Zhang, H., He, C., Yan, X. *et al.* (1999). Activation of inwardly rectifying K⁺ channels by distinct PtdIns(4,5)P₂ interactions. *Nat Cell Biol* **1**(3): 183.
- Zhang, X., Chattopadhyay, A., Ji, Q. S. *et al.* (1999). Focal adhesion kinase promotes phospholipase C-gamma1 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(16): 9021.
- Zhang, W., Crocker, E., McLaughlin, S. *et al.* (2003). Binding of peptides with basic and aromatic residues to bilayer membranes: phenylalanine in the myristoylated alanine-rich C kinase substrate effector domain penetrates into the hydrophobic core of the bilayer. *J Biol Chem* **278**(24): 21459.
- Zhao, J. J., Cheng, H., Jia, S. *et al.* (2006). The p110alpha isoform of PI3K is essential for proper growth factor signaling and oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(44): 16296.
- Zhu, J., Luo, B. H., Barth, P. *et al.* (2009). The structure of a receptor with two associating transmembrane domains on the cell surface: integrin alphaIIb beta3. *Mol Cell* **34**(2): 234.
- Ziegler, W. H., Liddington, R. C., Critchley, D. R. (2006). The structure and regulation of vinculin. *Trends Cell Biol* **16**(9): 453.

8 ANHANG

8.1 Proteinsequenzen

8.1.1 α 1-Integrinuntereinheit aus *Rattus norvegicus* (Pubmed: NP_112256)

Die cytoplasmatische Sequenz ist markiert.

```

1  MVPRRPASLE VTVACIWLLT VILGFCVSFN VDVKNSMSFS GPVEDMFGYT VQOYENEEGK
61  WVLIQSPLVG QPKARTGDVY KCPVGRERAM PCVKLDLPVN TSIPNVTEIK ENMTFGSTLV
121 TNPNGGFLAC GPLYAYRCGH LHYTTGICSD VSPTFQVVNS FAPVQECSTQ LDIVIVLDGS
181 NSIYPWESVI AFLNDLLKRM DIGPKQTQVG IVQYGENVTH EFNLNKYSST EEVLVAANKI
241 GRQGGLOQMT ALGIDTARKE AFTEARGARR GVKKVMVIVT DGESHNYRL KQVIQDCED
301 NIQRFSIAIL GHYNRGNLST EKFEVEEIKSI ASEPTKHHF NVSDELALVT IVKALGERIF
361 ALEATADQSA ASFEMEMSQT GFSAHYSQDW VMLGAVGAYD WNGTVVMQKA NQMVIPHNTT
421 FQTEPAKMNE PLASYLGYTV NSATIPGDVL YIAGQPRYNH TGQVVIYKME DGNINILQTL
481 GGEQIGSYFG SVLTTIDIDK DSYTDLLLVG APMYMGTEKE EQGKVYVYAV NQTRFEYQMS
541 LEPIRQTCCS SLKDNSCTKE NKNPECGARF GTAIAAVKDL NVDGFNDVVI GAPLEDDHAG
601 AVYIYHGSGK TIREAYAQRI PSGGDGKTLK FFGQSIHGEM DLNGDGLTDV TIGGLGGAAL
661 FORWARDVAVK VTMNFEPNKV NIQKKNCRVE GKETVCINAT MCFHVKLKSK EDSIYEADLQ
721 YRVTLDSLRLQ ISRSFFSGTQ ERKIQRNITV RESECIRHSF YMLDKHDFQD SVRVTLDFNL
781 TDPENGPVLD DALPNSVHEH IPFAKDCGNK ERCISDLTLN VSTTEKSLLI VKSQHDKFNV
841 SLTVKNKGDS AYNTRTVVQH SPNLIFSGIE EIQKDSCESN QNITCRVGYP FLRAGETVTF
901 KIIFQFNTSH LSENAIHLS ATSDSEEPLE SLNDNEVNIS IPVKYEVGLQ FYSSASEHHI
961 SVAANETIPE FINSTEDIGN EINVFYTIK RGHFPMPELQ LSISFPNLTA DGYPVLYPIG
1021 WSSSDNVNCR PRSLEDPMGI NSGKKMTISK SEVLKRGTIQ DCSSTCGVAT ITCSLLPSDL
1081 SQVNVSLLLW KPTFIRAHFS SLNLTLRGEL KSENSSLTSL SSNRKRELAI QISKDGLPGR
1141 VPLWVILLSA FAGLLLLMLL ILALWKIGFF KRPLKKKMEK

```

8.1.2 β 1-Integrinuntereinheit (Isoform 1A) aus *Homo sapiens* (Pubmed: NP_002202)

Die cytoplasmatische Sequenz ist markiert.

```

1  MNLQPIFWIG LISSVCCVFA QTDENRCLKA NAKSCGECIQ AGPNCGWCTN STFLQEGMPT
61  SARCDLEAL KKKGCPPDDI ENPRGSKDIK KNKNVTNRSK GTAELKLPED ITQIQPQQLV
121 LRLRSGEPT FTLKFKRAED YPIDLYYLM DLSYSMKDDLE NVKSLGTDLM NEMRRITSDF
181 RIGFGSFVEK TVMPYISTTP AKLRNPCTSE QNCTSPFSYK NVLSLTKNGE VFNELVGKQR
241 ISGNLDSPEG GFDAIMQVAV CGSLIGWRNV TRLLVFSTDA GFHFAGDGKL GGIVLPNDGQ
301 CHLENNMYTM SHYYDYPSIA HLVQKLSENN IQTIFAVTEE FQPVYKELKN LIPKSAVGTL
361 SANSNVIQL IIDAYNSLSS EVILENGKLS EGVITISYKSY CKNGVNGTGE NGRKCSNISI
421 GDEVQFEISI TSNKCPKDS DSKIRPLGF TEEVEVILQY ICECECQSEG IPESPKCHEG
481 NGTFECGACR CNEGRVGRHC ECSTDEVNSE DMDAYCRKEN SSEICSNNGE CVCGQCVCRK
541 RDNTNEIYSG KFCECDNFNC DRNGLICGG NGVCKCRVCE CNPNYTGSA DCSLDTSTCE
601 ASNGQICNGR GICECGVCKC TDPKFQGTQ EMCQTCLGVC AEHKECVQCR AFNKGEKKDT
661 CTQECSYFNI TKVESRDKLP QPVQDPVSH CKEKDVEDDCW FYFTYSVNGN NEVMVHVVEN

```

721 PECPTGPDII PIVAGVVAGI VLIGLALLLI WKLLMIHDR REFAKFEKEK MNAKWDGTGEN
781 PIYKSAVTTV VNPKYEGK

8.1.3 Phospholipase C γ 1 aus *Rattus norvegicus* (Pubmed: NP_037319)

Die einzelnen Domänen sind gekennzeichnet. Folgende Aminosäuren wurden ausgetauscht, um die PH-Mutanten 3/4 und 6/7 zu erzeugen:

PH 3/4: R₆₄GADK₆₈ → KDDEE

PH 6/7: Y₁₁₁GMEF₁₁₅ → FNTEQ

```

1  MAGVGTPCAN  GCGPSAPSEA  EVLHLCRSLE  VGTVMTLFYS  KKSQRPERKT  FQVKLETRQI
-----PH-----
61  TWSRGADKIE  GSIDIREIKE  IRPGKTSRDF  DRYQEDPAFR  PDQSHCFVIL  YGMEFRLKTL
-----
121  SLOATSEDEV  NMWIKGLTWL  MEDTLQAATP  LQIERWLRKQ  FYSVDRNRED  RISAKDLKNM
-----
181  LSQVNYRVPN  MRFLRERLTD  FEQRSGDITY  GQFAQLYRSL  MYSAQKTMDL  PFLETNTLRT
-----
241  GERPELCQVS  LSEFQQFLE  YQELWAVDR  LQVQEFMLSF  LRDPLREIEE  PYFFLDELVT
-----
301  FLFSKENS VW  NSQLDAVCPE  TMNPLSHYW  ISSHNTYLT  GDQFSSESSL  EAYARCLRMG
-----PLC x-----
361  CRCIELDCWD  GPDGMPVIYH  GHTLTTKIKF  SDVLHTIKEH  AFVASEYPVI  LSIEDHCSIA
-----
421  QQRNMAQHFR  KVLGDTLLTK  PVDIAADGLP  SPNQLKRKIL  IKHKKLAEGS  AYEEVPTSVM
-----N-sPH-----
481  YSENDISNSI  KNGILYLEDP  VNHEWYPHYF  VLTSSKIYYS  EETSSDQNE  DEEEPKEASG
-----
541  STELHSSEKW  FHGKLGAGR  GRHIAERLLT  EYCIETGAPD  GSFLVRESET  FVGDYTLSEW
-----N-SH2-----
601  RNGKVQHCRI  HSRQDAGTPK  FFLTDNLVFD  SLYDLITHYQ  QVPLRCNEFE  MRLSEVPQT
-----C-SH2-----
661  NAHESKEWYH  ASLTRAQAEH  MLMRVPRDGA  FLVRKRNEPN  SYAISFRAEG  KIKHCRVQQE
-----
721  GQTVMLGNSE  FDSLVDLISY  YEKHPLYRKM  KLRYPINEEA  LEKIGTAEPD  YGALYEGRNP
-----SH3-----
781  GFYVEANPMP  TFKCAVKALF  DYKAQREDEL  TFTKSIIQN  VEKQDGGWWR  GDYGGKKQLW
-----C-sPH-----
841  FPSNYVEEMI  NPAILEPERE  HLDENSPLGD  LLRGVLDVPA  CQIAIRPEGK  NNRLFVFSIS
-----
901  MPSVAQWSLD  VAADSQEELQ  DWVKKIREVA  QTADARLTEG  KMMERRKIA  LELSELVVYC
-----PLC y-----
961  RVPVFDEEKI  GTERACYRDM  SSFPETKAEK  YVNKAKGKKF  LOYNRLQLSR  IYPKGQRLLS
-----
1021  SNYDPLPMWI  CGSQLVALNF  QTPDKPMQMN  QALFMAGGHC  GYVLQPSTMR  DEAFDPFDKS
-----
1081  SLRGLEPCVI  CIEVLGARHL  PKNGRGIVCP  FVEIEVAGAE  YDSTKQKTEF  VVDNGLNPVW
-----C2-----
1141  PAKPFHFQIS  NPEFAFLRFV  VYEEDMFSDQ  NFLAQATFPV  KGLKTGYRAV  PLKNNYSEDL
-----
1201  ELASLLIKID  IFFAKENGDL  SPFSGTSLRE  RASDASSQLF  HVRAREGSFE  ARYQQPFEDF
-----
1261  RISQEHLADH  FDSRERRAPR  RTRVNGDNRL

```

8.2 Vektorkarten

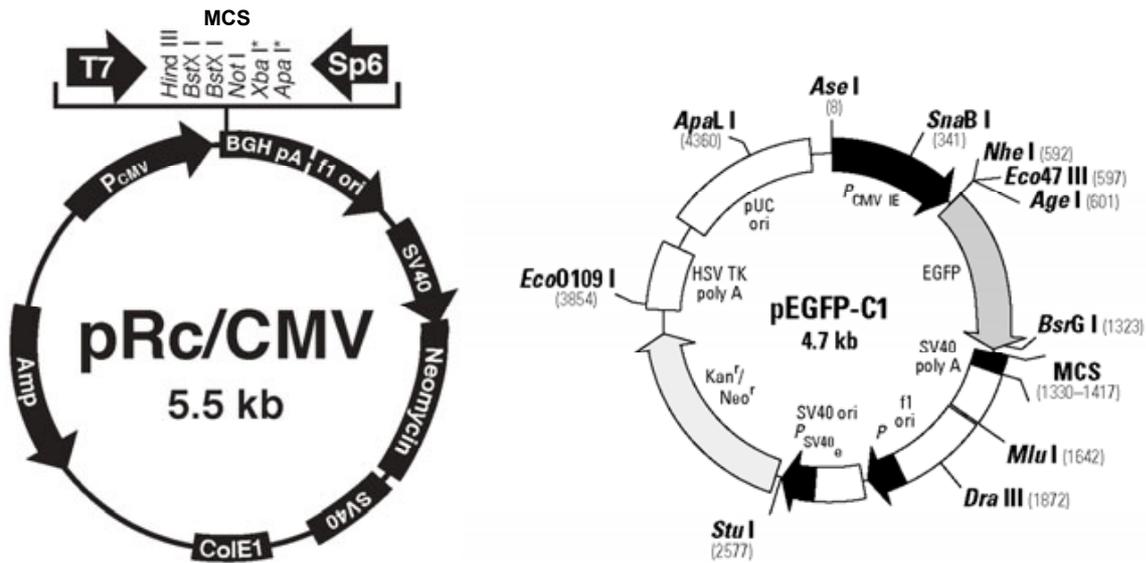


Abb. 8.1: Plasmidkarten der eukaryonten Expressionsvektoren pRc/CMV (Invitrogen) und pEGFP-C1 (Clontech) mit Angabe von multipler Klonierungsstelle (MKS, englisch: MCS) und Restriktionsschnittstellen.

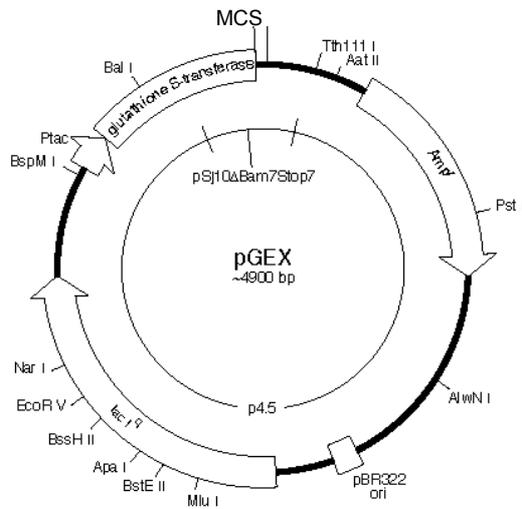


Abb. 8.2: Plasmidkarte des prokaryonten Expressionsvektors pGEX (GE Healthcare) mit Angabe von Restriktionsschnittstellen.

8.3 ^1H - ^{15}N -HSQC-NMR-Spektren

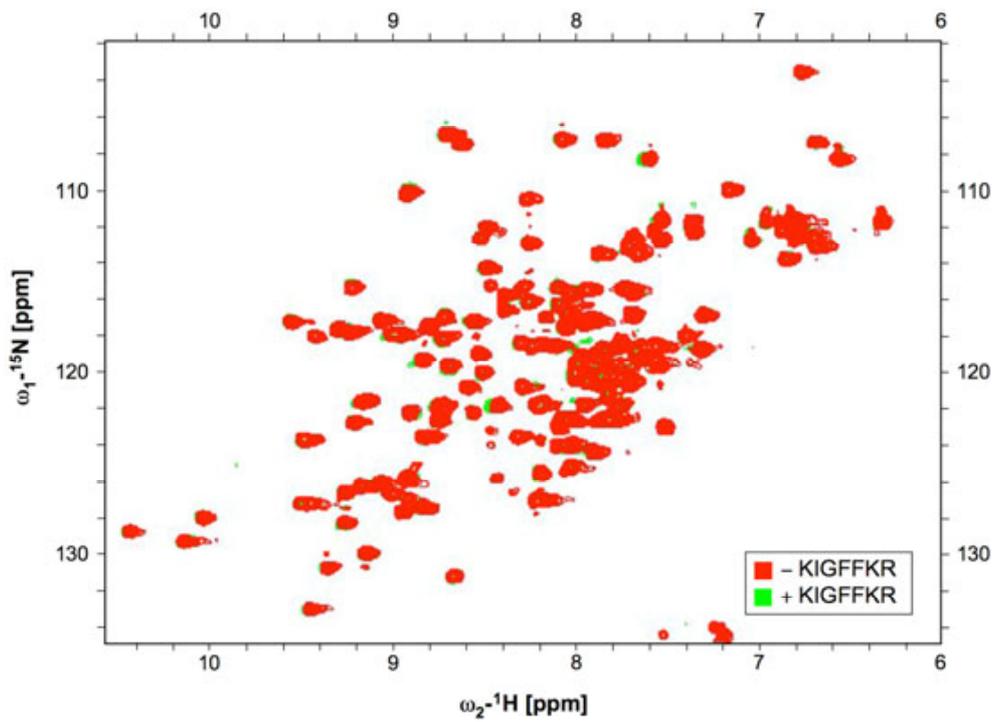


Abb. 8.3: ^1H - ^{15}N -HSQC-Überlagerungsspektrum der PH-Domäne der PLC γ 1 mit und ohne KIGFFKR-Peptid (1 mM).

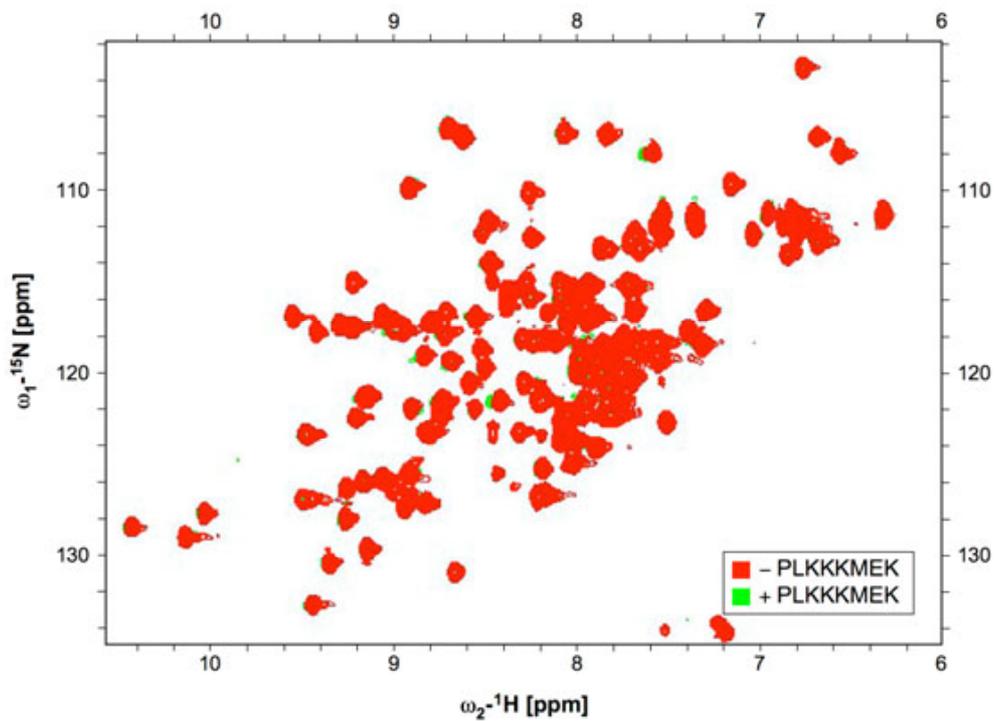


Abb. 8.4: ^1H - ^{15}N -HSQC-Überlagerungsspektrum der PH-Domäne der PLC γ 1 mit und ohne PLKKKMEK-Peptid (1 mM).

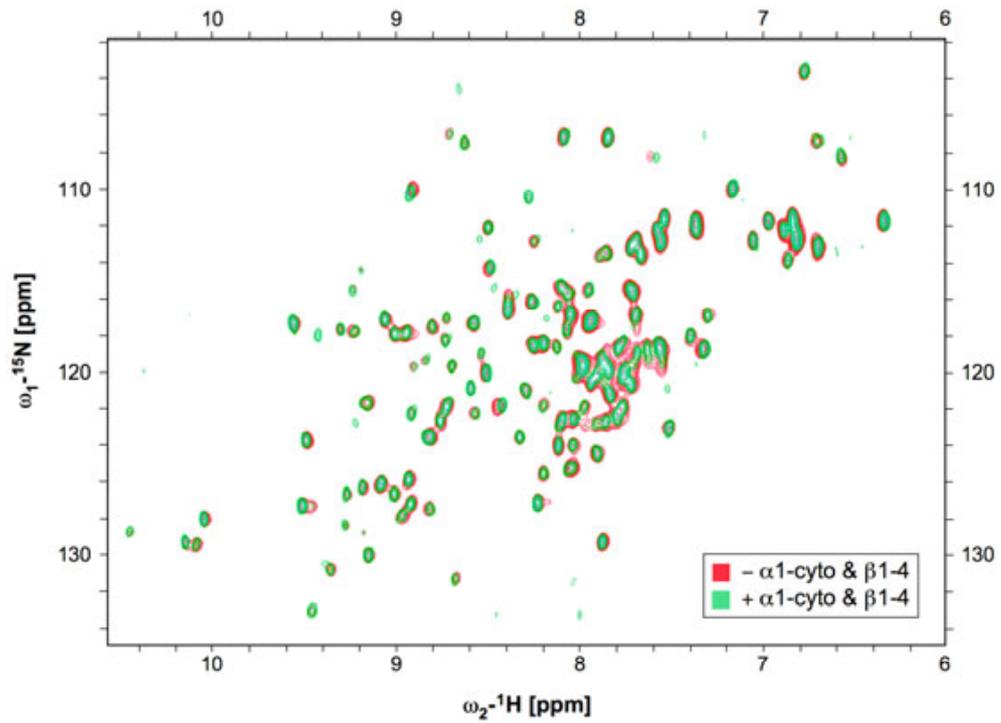


Abb. 8.5: ^1H - ^{15}N -HSQC-Überlagerungsspektrum der PH-Domäne der PLC γ 1 mit und ohne die Peptide α 1-cyto und β 1-4 (je 1 mM).

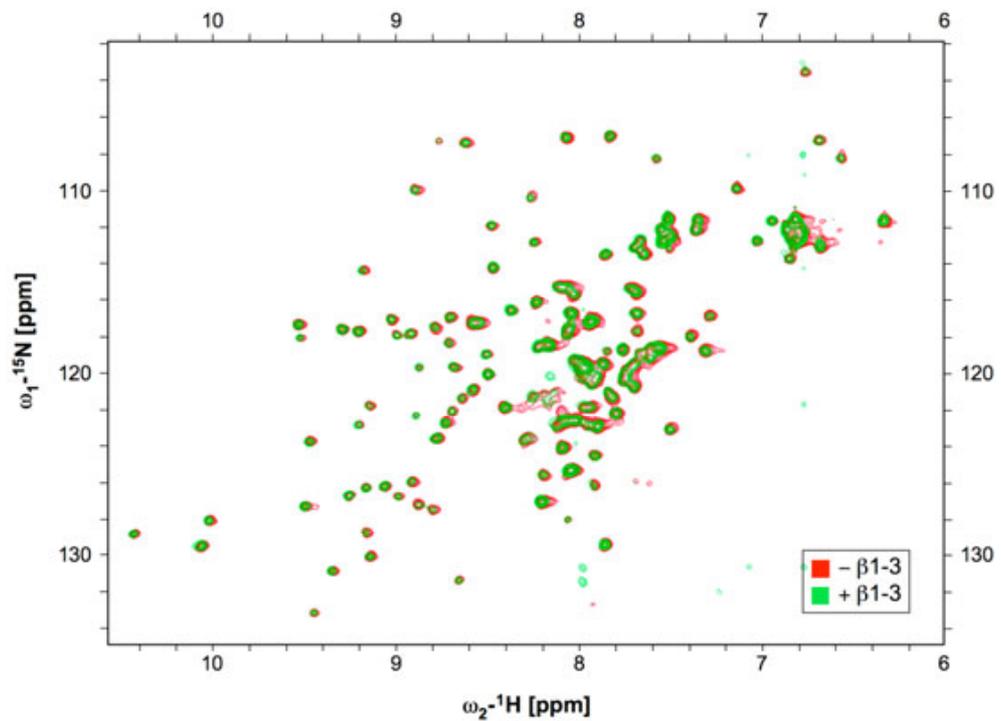


Abb. 8.6: ^1H - ^{15}N -HSQC-Überlagerungsspektrum der PH-Domäne der PLC γ 1 mit und ohne β 1-3-Peptid (1 mM).

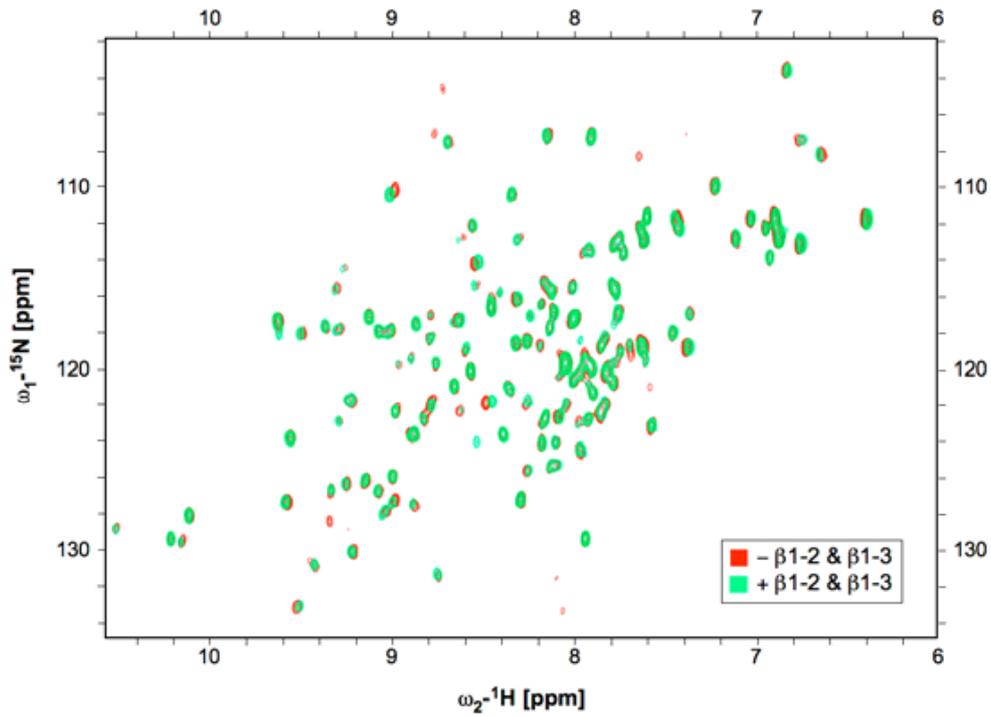


Abb. 8.7: ^1H - ^{15}N -HSQC-Überlagerungsspektrum der PH-Domäne der PLC γ 1 mit und ohne die Peptide β 1-3 und β 1-2 (je 1 mM).

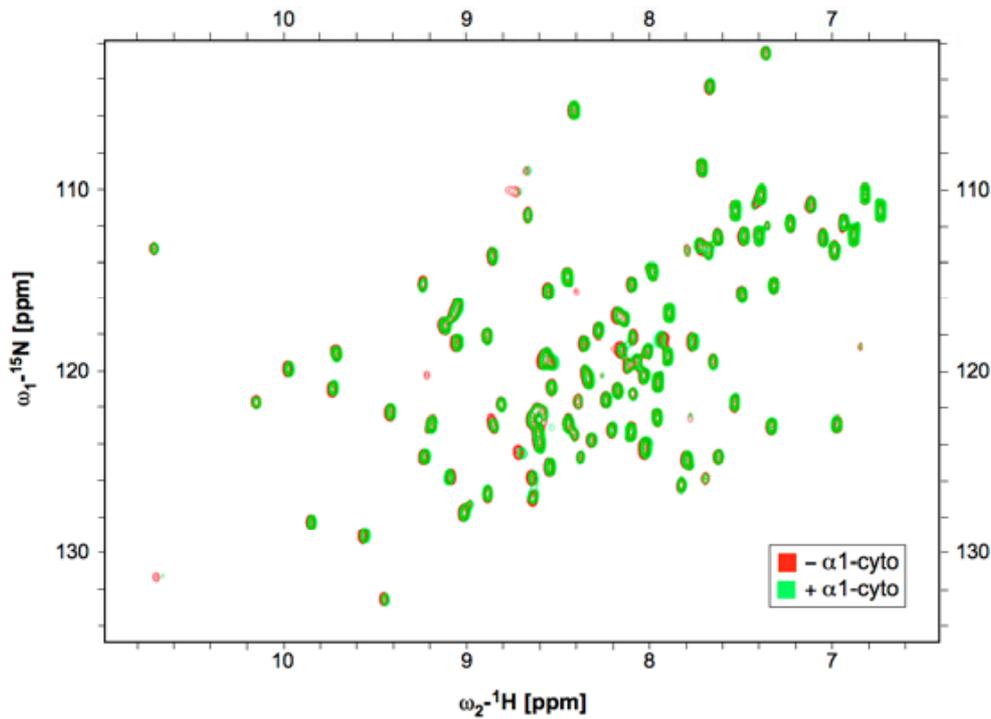


Abb. 8.8: ^1H - ^{15}N -HSQC-Überlagerungsspektrum der N-SH2-Domäne der PLC γ 1 mit und ohne α 1-cyto-Peptid (1 mM).

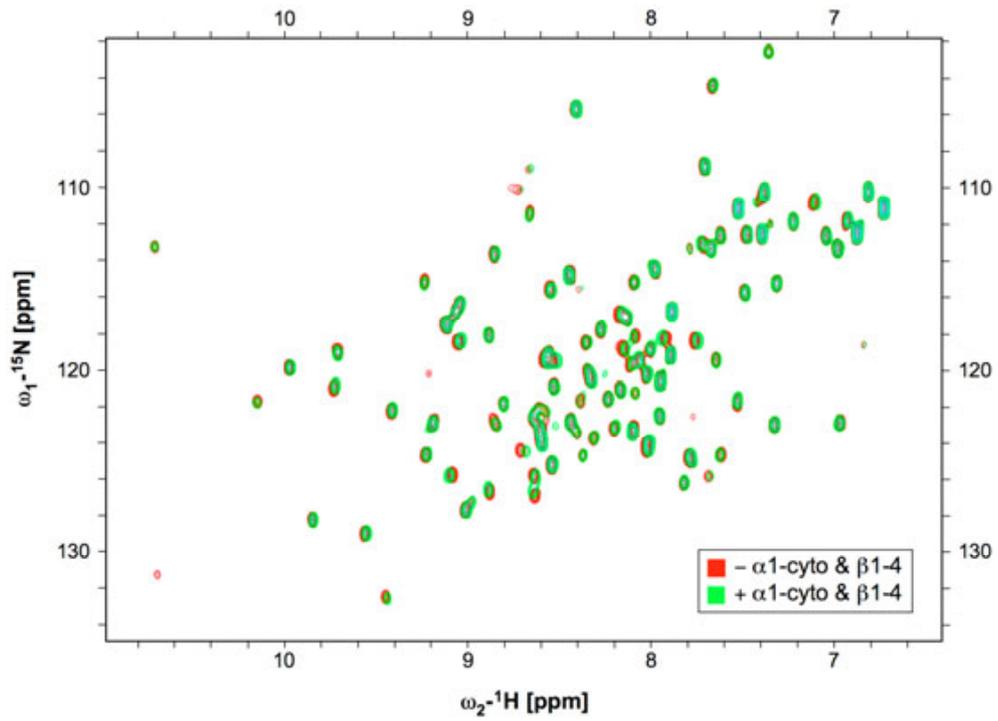


Abb. 8.9: ^1H - ^{15}N -HSQC-Überlagerungsspektrum der N-SH2-Domäne der PLC γ 1 mit und ohne die Peptide α 1-cyto und β 1-4 (je 1 mM).

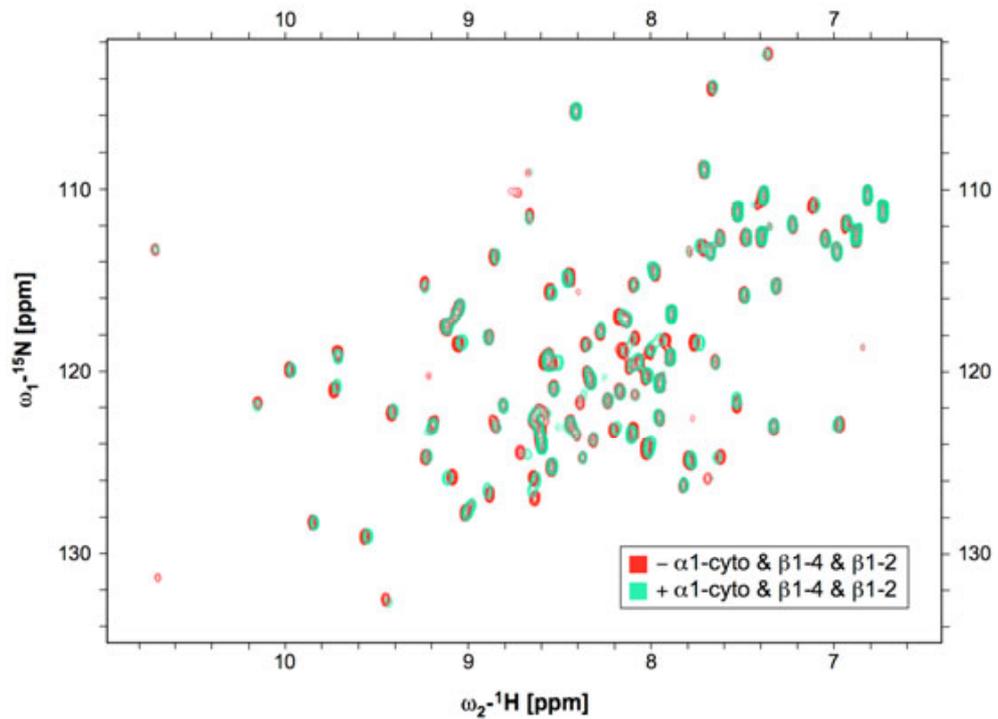


Abb. 8.10: ^1H - ^{15}N -HSQC-Überlagerungsspektrum der N-SH2-Domäne der PLC γ 1 mit und ohne die Peptide α 1-cyto, β 1-4 und β 1-2 (je 1 mM).

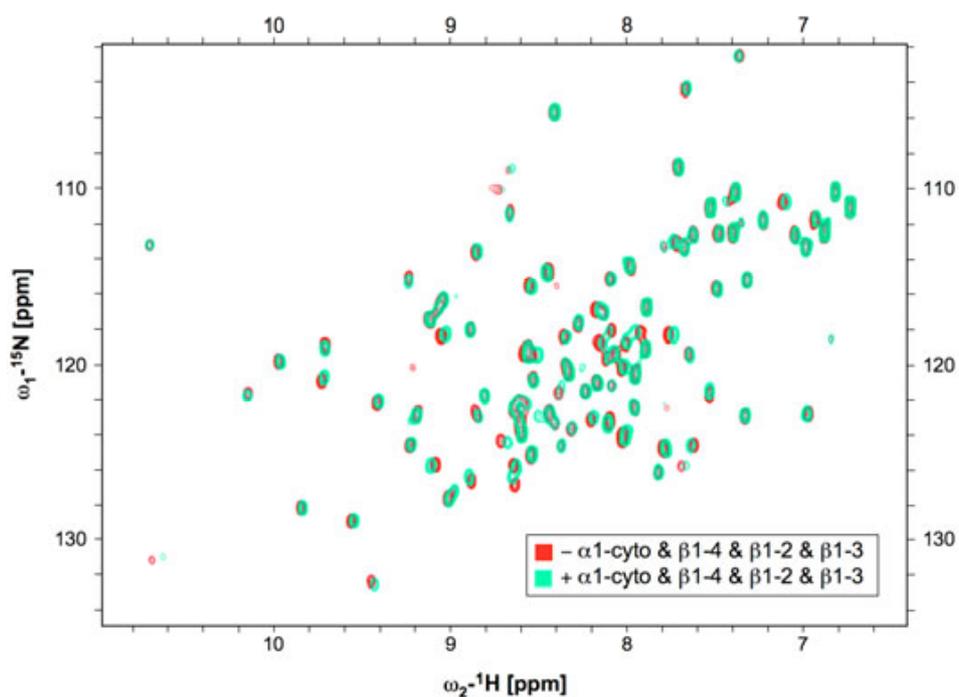


Abb. 8.11: ^1H - ^{15}N -HSQC-Überlagerungsspektrum der N-SH2-Domäne der PLC γ 1 mit und ohne die Peptide α 1-cyto, β 1-4, β 1-2 und β 1-3 (je 1 mM).

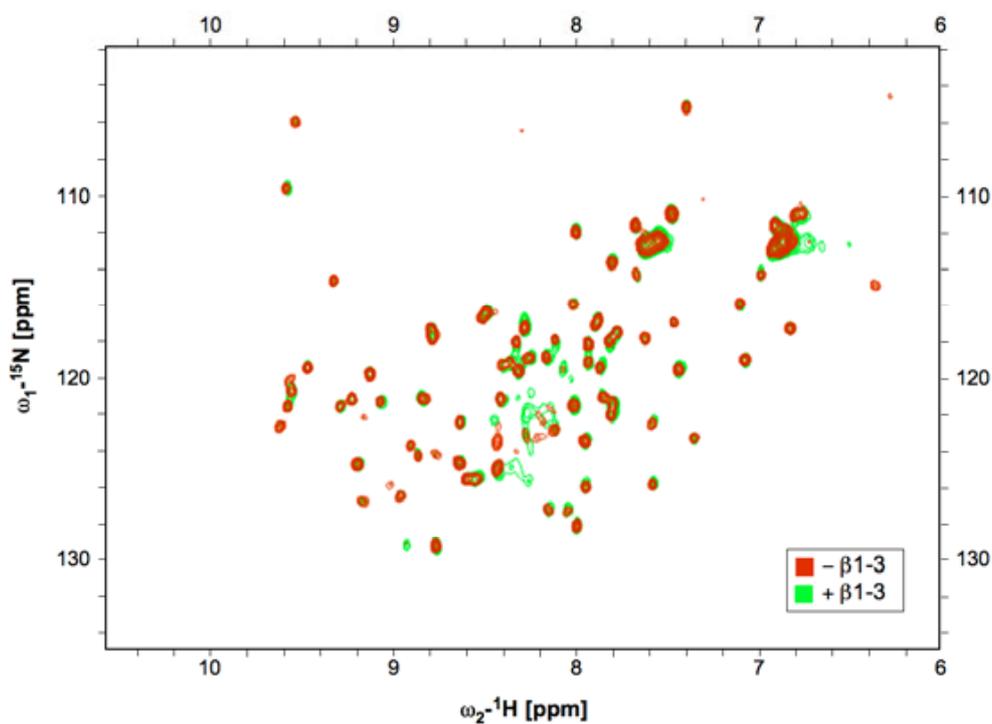


Abb. 8.12: ^1H - ^{15}N -HSQC-Überlagerungsspektrum der C-SH2-Domäne der PLC γ 1 mit und ohne β 1-3-Peptid (1 mM).

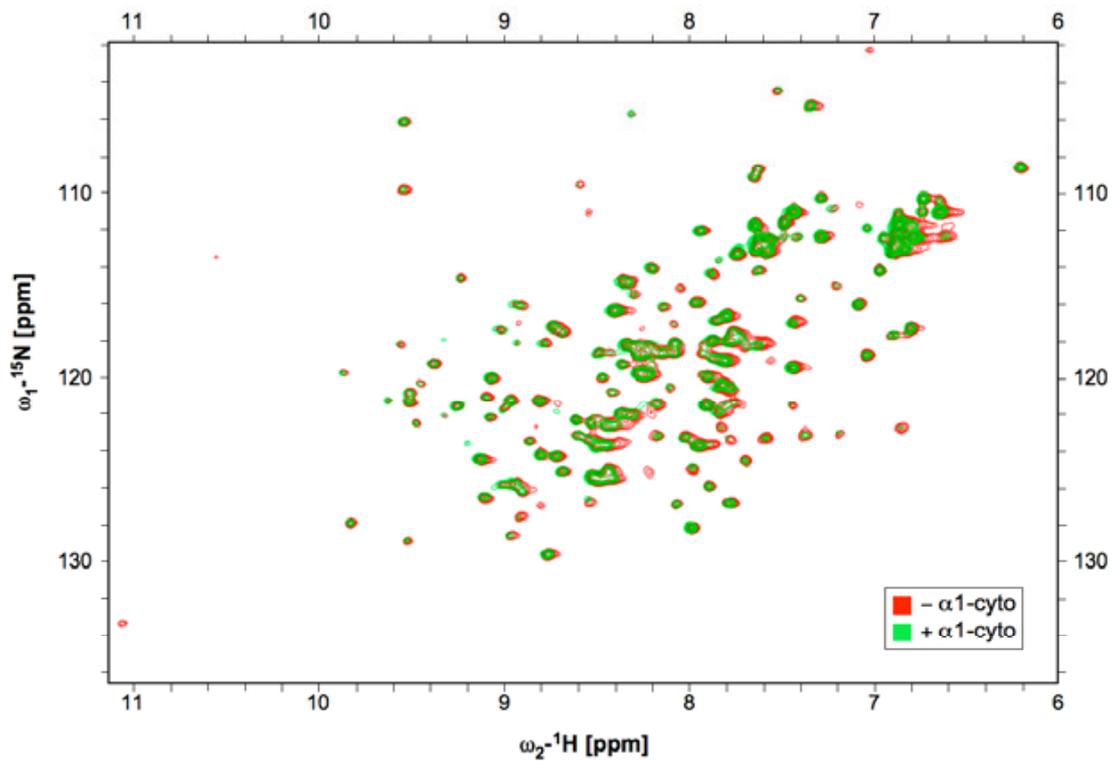


Abb. 8.13: ^1H - ^{15}N -HSQC-Überlagerungsspektrum der N+C-SH2-Domäne der PLC $\gamma 1$ mit und ohne $\alpha 1$ -cyto-Peptid (1 mM).

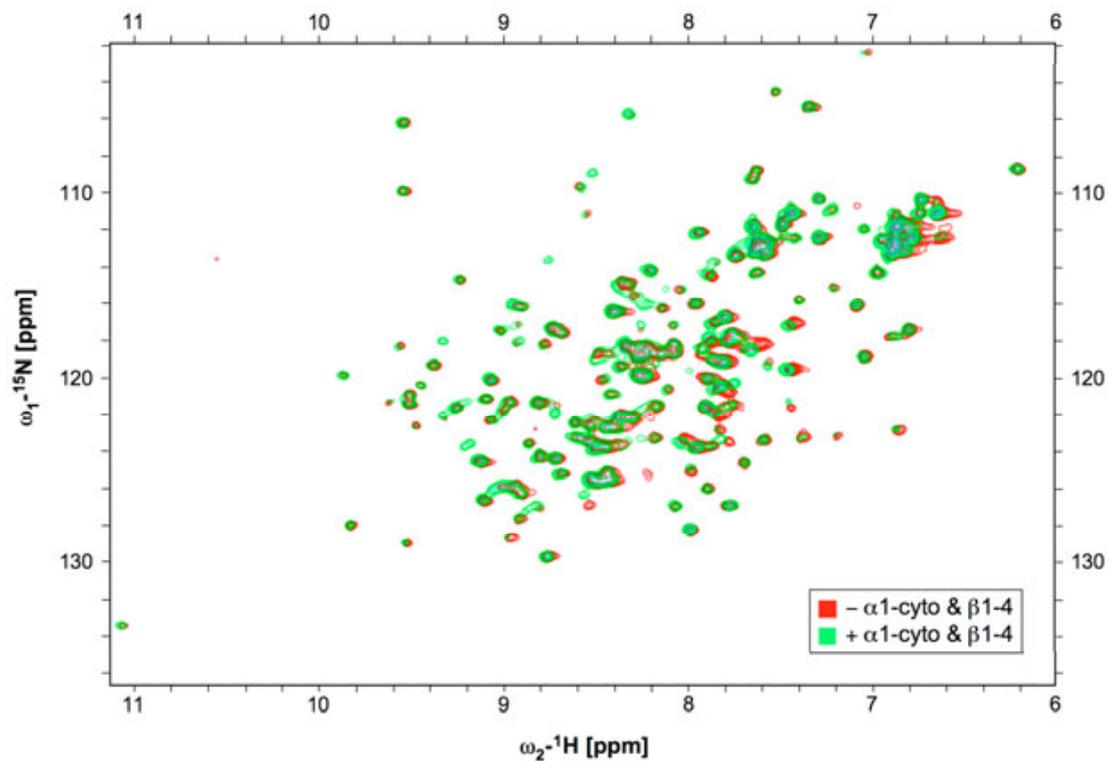


Abb. 8.14: ^1H - ^{15}N -HSQC-Überlagerungsspektrum der N+C-SH2-Domäne der PLC $\gamma 1$ mit und ohne die Peptide $\alpha 1$ -cyto und $\beta 1-4$ (je 1 mM).

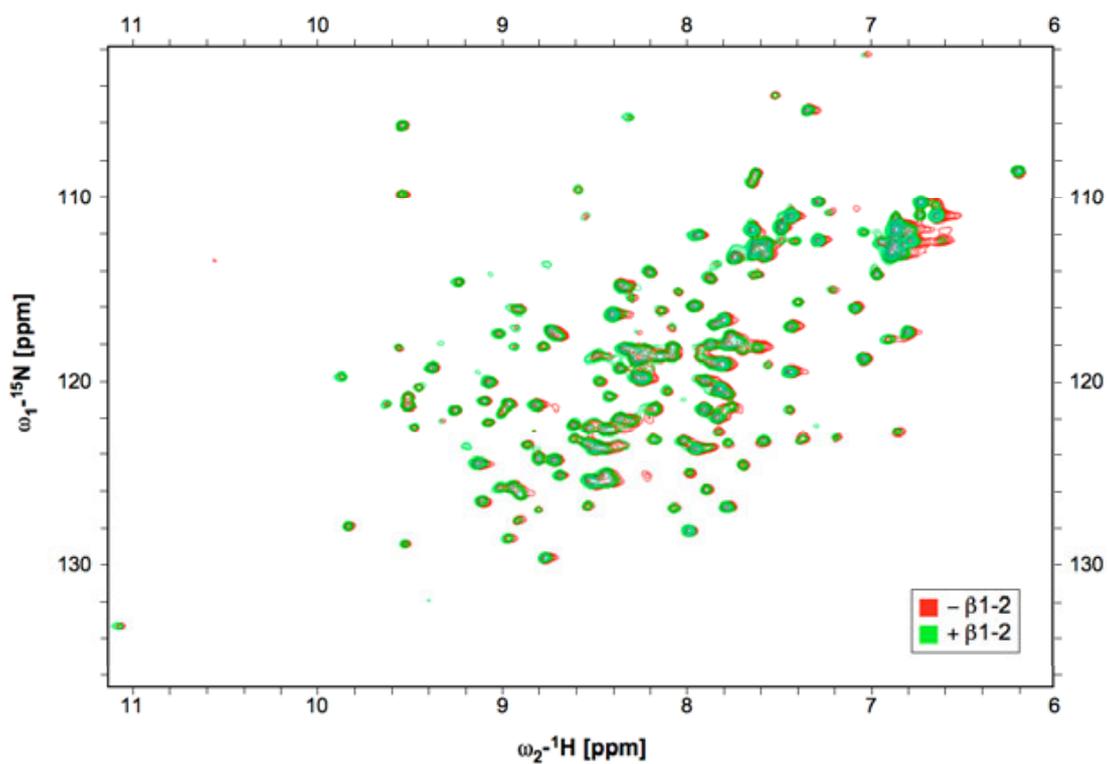


Abb. 8.15: ^1H - ^{15}N -HSQC-Überlagerungsspektrum der N+C-SH2-Domäne der PLC γ 1 mit und ohne $\beta 1-2$ -Peptid (1 mM).

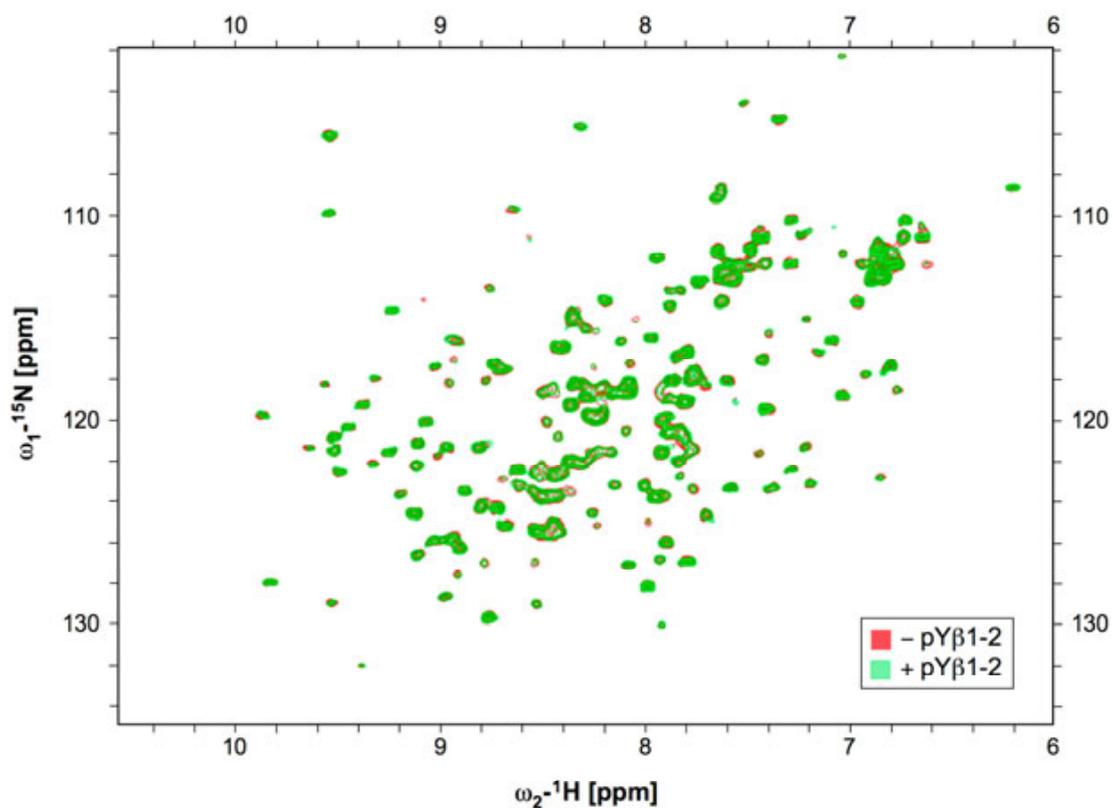


Abb. 8.16: ^1H - ^{15}N -HSQC-Überlagerungsspektrum der N+C-SH2-Domäne der PLC γ 1 mit und ohne Peptid pY $\beta 1-2$ (1 mM).

Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström; 1 Å = 0,1 nm
A	Ampère; Alanin
Abb.	Abbildung
ADAP	<i>adhesion and degranulation promoting adapter protein</i>
ADMIDAS	<i>adjacent to MIDAS</i> , in Nähe der MIDAS
AHNAK	hebräisch: riesig
Amp	Ampicillin
An-T	<i>annealing temperature</i> , Hybridisierungstemperatur
ANTH	AP180-N-Terminus-Homologie
AK	Antikörper
AP180	Adapterprotein 180
APS	Ammoniumpersulfat
ARK	adrenerge Rezeptor kinase
ARNO	<i>Arf nucleotide-binding site opener</i> -Protein
Arp	<i>actin-related protein</i> , aktinverwandtes Protein
as	<i>antisense</i> , Gegenstrang
Atg21	<i>autophagy-related WD40 domain 21</i> -Protein
ATP	Adenosintrisphosphat
BAR	Bin, Amphiphysin, Rvs-Familie
BCA	Bicinchoninsäure
Bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
Btk	Bruton-Agammaglobulinämie-Tyrosinkinase
C-Terminus	Carboxyterminus
CALM	<i>clathrin assembly lymphoid myeloid</i> -Motiv
CAM	Zelladhäsionsmolekül
Cas	p130Cas
CBB	Coomassie-Brillant-Blau
CD	<i>cluster differentiation</i> , Clusterdifferenzierung; Circulärdichroismus
Cdc42	<i>cell division cycle homologue 42</i> -Protein
cDNA	zur mRNA komplementäre DNA
CH2	Calponin-Homologie 2
CHO	<i>chinese hamster ovary</i> , Ovarien des chinesischen Hamsters

CIAP	<i>calf intestine alkaline phosphatase</i> , alkalische Phosphatase aus dem Kälberdarm
CIB	Calcium- und Integrinbindung
CISK	<i>cytokine-independent survival kinase</i> , zytokinunabhängige Überlebenskinase
CMV	Cytomegalievirus
Co-IP	Co-Immunopräzipitation
Crk	<i>v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homologue</i> -Protein
CS	<i>cytoplasmic sequence</i> , cytoplasmatische Sequenz
Csk	C-terminale Src-Kinase
D	Aspartat
Da	Dalton, 1 D = 1 g/mol
DAG	Diacylglycerol
Dbp	<i>dichaete beadex lethal</i> -Protein
DM	Dimyristoyl-
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid
DOCK180	<i>dedicator of cytokinesis</i> -Protein
DPC	Dodecylphosphocholin
DTT	Dithiothreitol
ϵ	molarer Extinktionskoeffizient
E	Extinktion; Glutamat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEA1	<i>early endosome antigen 1</i> -Protein
EF	Elongationsfaktor
EGF	<i>epidermal growth factor</i> , epidermaler Wachstumsfaktor
EGFP	<i>enhanced GFP</i> , verstärktes GFP
EGFR	EGF-Rezeptor
ENTH	Epsin-N-Terminus-Homologie
Ent	<i>endosome transport</i> -Protein
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ErbB1	<i>erythroblastic leukemia viral oncogene homologue</i> -Protein
Erk	extrazellulär-regulierte Kinase
ERM	Ezrin, Radixin, Moesin

<i>et al.</i>	<i>et alii</i> , und andere
EZM	Extrazelluläre Matrix
F	Phenylalanin
FA	Formaldehyd
FAK	fokale Adhäsionskinase
FAPP1	Phosphatidylinositol(4)phosphat-Adapterprotein 1
FERM	Bande 4.1-Protein, Ezrin, Radixin, Moesin
FHL2	<i>four and a half LIM domains 2</i> -Protein
FKS	fötales Kälberserum
f.l.	<i>full length</i> , Volllänge
FN	Fibronektin
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i> , schnelle Proteinflüssigkeitschromatographie
FYVE	Fab1, YOTB, Vac1, EEA1
g	Erdbeschleunigung
G	Glycin
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GAPDH	Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase
GDI	Guaninnukleotiddissoziationsinhibitor
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i> , Guaninnukleotidaustauschfaktor
GFP	grünfluoreszierendes Protein
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i> , G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GRAM	Glukosyltransferase, Rab-ähnlicher GTPase-Aktivator, Myotubularine
GROMACS	<i>Groningen machine for chemical simulations</i> , Groningener Maschine für chemische Simulationen
Grb	<i>growth factor receptor-bound</i> -Protein
GRP-1	<i>general receptor for phosphoinositides-1</i> -Protein
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintrisphosphat
h	Stunde
H	Histidin
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> , Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Hrs	Hepatozytenwachstumsfaktor-reguliertes Tyrosinkinasesubstrat

hSH3	<i>N-terminal helix packed against conserved SH3 scaffold</i>
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i> , heteronukleäre Einzelquantenkohärenz
Hz	Hertz
I	Isoleucin
i.a.	inaktiviert
IB	Immunoblot
ICAP1	<i>integrin cytoplasmic domain-associated protein 1</i>
I-Domäne	insetzte Domäne
I-EGF	integrinähnliche EGF-Domäne
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunoglobulin
ILK	<i>integrin-linked kinase</i> , integrinverknüpfte Kinase
ILKAP	<i>integrin-linked kinase-associated serine/threonine phosphatase</i> , mit der ILK assoziierte Serin/Threoninphosphatase
IP	Immunopräzipitation
IP ₃	Inositoltrisphosphat
IP ₄	Inosiltetraphosphat
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
IRD	<i>infrared dye</i> , Infrarotfarbstoff
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
K	Kelvin; Lysin
Kan	Kanamycin
Kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
K _D ^{app}	apparente Dissoziationskonstante
KIV	Kollagen IV
λ	Wellenlänge
l	Liter
L	Leucin
LB	Luria Broth
LIMBS	ligandeninduzierte Metallionenbindungsstelle
LPA	Lysophosphatidat
LUV	<i>large unilamellar vesicle</i> , großer unilamellarer Vesikel
Lys-13	ein aus 13 Lysinresten bestehendes Peptid
M	Methionin
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase

MARCKS	myristoyliertes, alaninreiches PKC-Substrat
MD	Moleküldynamik
MEK	MAPK/Erk-Kinase
MEM	minimalessenzielles Medium
MES	Morpholinoethansulfonsäure
MG	Molekulargewicht
Mg	Magnesium
MIDAS	<i>metal-ion-dependent adhesion site</i> , metallionenabhängige Adhäsionsstelle
Min	Minute
MIRR	<i>multichain immune recognition receptor</i> , vielkettiger Immunerkennungsrezeptor
MKS	multiple Klonierungsstelle
MLV	<i>multilamellar vesicle</i> , multilamellarer Vesikel
Mn	Mangan
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
MTMR3	<i>myotubularin related protein 3</i>
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i> , Molekulargewichtsausschlussgrenze
myr	Myristoyl-
N	Newton; Asparagin
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> , kernmagnetische Resonanz
NOE	nukleärer Overhauser-Effekt
nr. PP	nicht-reduzierender Probenpuffer
N-Terminus	Aminoterminus
NTP	Nukleosidtriphosphat
N-WASP	neuronales Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein
OCRL	okulozerebrorenales Syndrom nach Löwe(-Protein)
OD	optische Dichte
π	Spreitungsdruck (mN/m)
P	Prolin
PA	Phosphatidat
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
Pak	p21-Protein (Cdc42/Rac)-aktivierte Kinase
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PBSN	polybasische Sequenzen
PBS-T	PBS-Tween

PC	Phosphatidylcholin
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i> , Blutplättchenaktivierungsfaktor
PDK	<i>phosphoinositide-dependent kinase</i> , phosphoinositidabhängige Kinase
Pen/Strep	Penicillin, Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PGS	Protein-G-Sepharose
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PH	Pleckstrin-Homologie
Phox	Phagozyten-NADPH-Oxidasekomplex
pI	isoelektrischer Punkt
PI	Phosphatidylinositol; Phosphoinositid
PIC	Proteinaseninhibitorcocktail
PI3-K, PI3-Kinase	Phosphoinositid-3'-Kinase
PI(3,4,5)P ₃	Phosphatidylinositol(3,4,5)trisphosphat
PI(4,5)P ₂	Phosphatidylinositol(4,5)bisphosphat
PIPs	Phosphatidylinositolphosphate
PIPES	Piperazinbisetansulfonsäure
PIPK	Phosphoinositolphosphatkinase
PIX	Pak-interagierender Austauschfaktor
PK	Proteinkinase
PL	Phospholipase
PLC	Phospholipase C
PM	Plasmamembran
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PO	Palmitoyl-oleoyl-
POD	Meerrettichperoxidase
PP1	Proteinphosphatase 1
PP	Probenpuffer
Priv.-Doz.	Privatdozent
PROPPIN	phosphoinositidbindender β -Propeller
PS	Phosphatidylserin
PSI	Plexin, Semaphorin, Integrin
PSIPRED	<i>protein structure prediction</i> ; Proteinstrukturvorhersage
PtdIns	Phosphatidylinositol

PTB	Proteintyrosinbindung
PTP-1	Proteintyrosinphosphatase-1
PTEN	Phosphatase- und Tensin-Homolog deletiert auf Chromosom 10
Pyk2	Proteintyrosinkinase 2
PX	Phox-Homologie
pY	Phosphotyrosin
Q	Glutamin
R	Arginin
RACK	Rezeptor für aktivierte PKC
RAPL	<i>regulator for cell adhesion and polarization enriched in lymphoid tissues</i> -Protein
red. PP	reduzierender Probenpuffer
RGD	Arginin, Glycin, Aspartat
RIAM	Rap-interagierendes Adaptermolekül
RMSD	<i>root mean square deviation</i> , Abweichung der mittleren Fehlerquadrate
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SARA	<i>smad anchor for receptor activation</i> -Protein
s	Sekunde; <i>sense</i> (Strang)
S	Serin
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SFK	<i>Src family kinases</i> , Familie der Src-Kinasen
SH	Src-Homologie
Shc	SH2-Domänenprotein C1
SHIP	SH2-Domänen-enthaltende Inositolphosphatase
S(1)P	Sphingosin(1)phosphat
SNX	<i>sorting nexin</i> , sortierendes Nexin
Sos	<i>son of sevenless</i> -Protein
SPR	<i>surface plasmon resonance</i> , Oberflächenplasmonresonanz
SUV	<i>small unilamellar vesicle</i> , kleiner unilamellarer Vesikel
T	Threonin
ϑ_m	molare Elliptizität
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>

TBS	<i>tris-buffered saline</i> , Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	TBS-Tween
TCPTP	<i>T-cell proteine-tyrosine phosphatase</i> , T-Zell-Proteintyrosinphosphatase
TCR	<i>T-cell receptor</i> , T-Zellrezeptor
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFE	Trifluorethanol
T _m	<i>melting temperature</i> , Schmelztemperatur
TM	Transmembran-
TMD	Transmembrandomäne
TMH	Transmembranhelix
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	<i>unit</i> , enzymatische Aktivitätseinheit
u.a.	unter anderem
UE	Untereinheit
üN	über Nacht
UV	ultraviolett
V	Volt; Valin
Vamp7	vesikelassoziiertes Membranprotein 7
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> , vaskularendothelialer Wachstumsfaktor
vgl.	vergleiche
VLA	<i>very late antigen</i> , sehr spätes Antigen
VMD	<i>visual molecular dynamics</i> -Programm
VPUA	Verhältnis polarer zu unpolaren Resten
W	Tryptophan
WAVE	WASP-Familie, Verprolin-homologes Protein
WB	Western Blot
WIPI 49	WD-Wiederholungsdomäne, phosphoinositidinteragierendes Protein 49
WT	Wildtyp
x	beliebige Aminosäure
Y	Tyrosin
z.B.	zum Beispiel
ZK	Zufallsknäuelkonformation
zzgl.	zuzüglich

Publikationen

Originalarbeiten

Tang, K., Hofmann, A., Freund, C., Danker, K. The cytoplasmic tail of the alpha1 integrin subunit associates with phosphoinositides. *eingereicht*

Tang, K., Smerling, C., Falasca, M., Hofmann, W., Henklein, P., Hildmann, A., Freund, C., Danker, K. The N-terminal PH domain of PLCgamma1 interacts with the alpha1 and the beta1 subunit to regulate alpha1beta1 integrin-mediated migration and signalling. *in Vorbereitung*

Smerling, C., Tang, K. , Hofmann, W., Danker, K. (2007) Role of the alpha1 integrin cytoplasmic tail in the formation of focal complexes, actin organization, and in the control of cell migration. *Exp Cell Res* **313**(14): 3153-65.

Vorträge

“Studies on α 1 integrin cytosolic peptides”, Seminar Series, Eskitis Institute for Cell and Molecular Therapies, Griffith University Brisbane, Australien, 03.12.2008

“The cytoplasmic tail of the α 1 integrin subunit binds to PI(4,5)P₂ and PI(3,4,5)P₃”, 13th Signaltransduction Meeting (STS), Weimar, 28.10.2009

Posterbeiträge

Kerstin Tang, Werner Hofmann, Kerstin Danker: “*Induction of MMP secretion by α 1 β 1 integrin is constitutive*”, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie, Braunschweig, 29.03.-01.04.2006

Kerstin Tang, Werner Hofmann, Kerstin Danker: “*Truncation of the α 1 integrin cytoplasmic tail leads to increased MMP-9 secretion that is not dependent on integrin activation*”, 10th Signaltransduction Meeting, Weimar, 02.-04.11.2006; FEBS-Meeting “Molecular mechanisms of signal transduction and cancer”, Spetses, Griechenland, 15.-24.08.2007; International Conference “Cell invasion and metastasis”, Berlin-Buch, 26.-29.03.2008

Kerstin Tang, Christiane Smerling, Werner Hofmann, Kerstin Danker: “*Exploring the interaction between integrin α 1 β 1 and phospholipase C γ 1*”, 11th Signaltransduction

Meeting, Weimar, 31.10.-03.11.2007; Biochemical Society Annual Symposium “Structure and function in cell adhesion”, Manchester, Großbritannien, 03.-05.12.2007

Kerstin Tang, Werner Hofmann, Christian Freund, Kerstin Danker: “*The cytoplasmic tail of the $\alpha 1$ integrin subunit binds to phosphoinositides*”, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie, Marburg, 12.-15.03.2008

Stipendien

01/2006-12/2007	Promotionsstipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes
11/2006	STS-Reisestipendium für die Teilnahme am 10th Signaltransduction Meeting in Weimar
08/2007	FEBS-Reisestipendium für die Teilnahme am FEBS-Meeting auf Spetses, Griechenland
10-12/2008	Reisestipendium der Boehringer Ingelheim Fonds für den Forschungsaufenthalt in Brisbane, Australien

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Danksagung

Mein besonders herzlicher Dank gilt Frau Priv.-Doz. Dr. Kerstin Danker für die motivierende Betreuung während der letzten Jahre, für das damit verbundene Interesse an meiner Arbeit und die ansteckende Begeisterung für die Integrine.

Frau Prof. Petra Knaus danke ich ganz herzlich für die Bereitschaft, diese Arbeit zu begutachten und für die Organisation der begleitenden Doktorandensymposien.

Diese Arbeit wäre ohne die Unterstützung der Studienstiftung des deutschen Volkes nicht möglich gewesen. Dieser danke ich vielmals für das in meine Arbeit und meine Person gesetzte Vertrauen sowie für die interessanten und weiterbildenden Unternehmungen, Treffen und Veranstaltungen. In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei Prof. Reutter und Frau Kern bedanken, die mich bei den Bewerbungen für Doktorandenstipendien tatkräftig unterstützt haben. Daneben gilt mein Dank dem Boehringer Ingelheim Fonds für die Vergabe eines Reiestipendiums, das mir einen unvergesslichen Aufenthalt in Brisbane, Australien, ermöglicht hat.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Priv.-Doz. Dr. Christian Freund vom Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie in Berlin-Buch und Herrn Prof. Andreas Hofmann vom Eskitis Institute for Cell and Molecular Therapies in Brisbane für die erfolgreichen Kooperationen bedanken. Mein besonderer Dank geht dabei an Prof. Hofmann für seine engagierte Betreuung während meines Aufenthalts, den wissenschaftlichen Austausch und die Durchführung der MD-Simulationen.

Herrn Werner Hofmann und Frau Gudrun Mrawietz danke ich für ihre zuverlässige, gewissenhafte Ausführung von zellbiologischen und proteinchemischen Arbeiten. Daneben gilt mein Dank Frau Dr. Annette Hildmann für ihre Unterstützung und ihre hilfreichen Ratschläge. Frau Katrin Büttner vom Institut für Biochemie und Molekularbiologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin danke ich für die schnell und zuverlässig durchgeführten DNA-Sequenzierungen.

Allen ehemaligen und gegenwärtigen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe möchte ich von Herzen für die angenehme, stimulierende Arbeitsatmosphäre danken. Besonderer Dank geht an Kaya, Annette, Geo, Josi, Gudrun und Werner für den wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Austausch und für die gemeinsam verlebten Aktivitäten außerhalb des Labors.

Sehr zum Dank verpflichtet bin ich ebenso den Mitgliedern der Arbeitsgruppen Freund und Hofmann, die mich so freundlich und herzlich in ihre Mitte aufgenommen haben und mir stets hilfsbereit mit Rat und Tat zur Seite standen. Besonderer Dank geht hierbei an Dani, Katharina und Kyrill für die Einführung in die Proteinaufreinigung und für die Einweihung in andere hilfreiche Tricks und Tipps für die Laborarbeit. Marc danke ich vielmals für die Einführung in die Liposomen-Co-Sedimentationsversuche. Andreas sei herzlichst gedankt für die Einführung in die NMR-Spektroskopie und die geduldige Unterstützung bei der Aufnahme und Prozessierung der NMR-Spektren. Anja danke ich für die Einweisung in die Langmuir-Filmwaagenmethodik, und herzlicher Dank geht an Blessy für ihren Humor und die Entdeckung des Garden Centers in Brisbane.

Anschließend gilt mein herzlichster Dank den Menschen, die mir besonders in den letzten Monaten mit Geduld und Hilfsbereitschaft zur Seite standen. Ich danke allen voran Dr. Niko für sein Interesse und seine Diskussionsbereitschaft sowie Annette, Kaya, Diana und Jana für ihre Unterstützung und für gemeinsame Stunden in der Bibliothek. Simon und Claudi möchte ich insbesondere für ihr Verständnis, die technische Hilfe und die moralische Unterstützung danken.

Bei meinen Eltern bedanke ich mich dafür, dass sie mir mein Studium ermöglicht haben, und meiner ganzen Familie möchte ich herzlich für ihre Unterstützung danken. Besonderer Dank geht an meine Mutter, für ihr Vertrauen in mich und ihre stete Zuversicht und Ermutigung.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.