

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

**Untersuchungen zur biologischen Funktion der  $\alpha 3$ -cytoplasmatischen  
Domäne des  $\alpha 3\beta 1$ -Integrins und deren Einfluss auf die Aktivierung der  
kleinen GTPasen Rac1 und RhoA in PC12-Zellen**

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

Vorgelegt von Nadja Mechai aus Paris  
Berlin, 2004

1. Gutachter: Prof. Dr. W. Reutter
2. Gutachter: Prof. Dr. F. Hucho

Tag der Disputation: 05. Januar 2005



## Inhaltsverzeichnis

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| <b>1.</b> | <b>Einleitung</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1.      | Die Zell-Matrix-Adhäsion und die extrazelluläre Matrix                              | 1         |
| 1.2.      | Zelladhäsionsmoleküle   | 5         |
| 1.2.1.    | Integrine   | 7         |
| 1.2.2.    | Die Struktur der Integrine  | 8         |
| 1.2.3.    | Aktivierung der Integrine   | 11        |
| 1.2.4.    | Integrin-vermittelte Signaltransduktion   | 13        |
| 1.2.5.    | Bedeutung kleiner GTPasen bei Integrin-abhängigen Cytoskelett-Organisation          | 17        |
| 1.2.5.1.  | Integrin-abhängige Regulation von Rac   | 19        |
| 1.2.5.2.  | Integrin-abhängige Regulation von RhoA  | 21        |
| 1.2.6.    | Bedeutung der Integrine bei physiologischen Prozessen                               | 21        |
| 1.2.7.    | Rolle der cytoplasmatischen Domänen der Integrine bei Integrin-abhängigen Prozessen | 25        |
| 1.2.8.    | Das $\alpha\beta 1$ -Integrin   | 27        |
| 1.3.      | Zielsetzung der Arbeit  | 30        |
| <b>2.</b> | <b>Material und Methoden</b>  | <b>31</b> |
| 2.1.      | Materialien   | 31        |
| 2.1.1.    | Chemikalien   | 31        |
| 2.1.2.    | Geräte  | 31        |
| 2.1.3.    | Nährmedien für Bakterien  | 31        |
| 2.1.4.    | Puffer und Lösungen   | 32        |
| 2.1.4.1.  | Lösungen für Plasmidpräparation: Minilysat  | 32        |
| 2.1.4.2.  | Lösungen für Plasmidpräparation: Qiagensäulen                                       | 32        |
| 2.1.4.3.  | Lösungen für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese                                 | 33        |
| 2.1.4.4.  | Lösungen für die Tricin-Gele  | 34        |
| 2.1.4.5.  | Lösungen für den Immunoblot   | 34        |
| 2.1.4.6.  | Lösungen für Silbergele   | 35        |
| 2.1.5.    | Antikörper  | 36        |
| 2.1.6.    | Primer- und PCR-Reagenzien  | 37        |
| 2.1.7.    | Bakterien und Plasmidvektoren   | 38        |
| 2.1.8.    | Zelllinien und Zellkulturmaterialien  | 40        |
| 2.1.9.    | Enzyme, Kits und Marker   | 42        |
| 2.1.10.   | Sonstige Materialien  | 43        |
| 2.2.      | Methoden  | 43        |
| 2.2.1.    | Zellbiologische Methoden  | 43        |
| 2.2.1.1.  | Passagieren von Zellen  | 44        |
| 2.2.1.2.  | Auftauen und Einfrieren von Zellen  | 44        |
| 2.2.1.3.  | Herstellung der Laminin-5-reichen Matrix  | 44        |
| 2.2.1.4.  | Differenzierungsassay von PC12-Zellen   | 44        |
| 2.2.1.5.  | Behandlung der PC12-Zellen mit dem ROK $\alpha$ -Inhibitor Y27632                   | 45        |
| 2.2.1.6.  | Etablierung der transienten Transfektion von PC12-Zellen mittels Lipofectamine      | 45        |
| 2.2.1.7.  | Adhäsionsassay zur Untersuchung von Zell-Matrix-Wechselwirkungen                    | 46        |
| 2.2.1.8.  | Proliferationsassay   | 47        |
| 2.2.1.9.  | Durchflusscytometrie/FACScan (Fluorescence-Activated-Cell-Scanning)                 | 47        |

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| 2.2.2.    | Biochemische Methoden   | 48        |
| 2.2.2.1.  | Solubilisation von Zellen   | 48        |
| 2.2.2.2.  | Bestimmung der Proteinkonzentration nach der BCA-Methode  | 48        |
| 2.2.2.3.  | SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen  | 49        |
| 2.2.2.4.  | Nachweis von Proteinen mittels Westernblot-Analyse  | 49        |
| 2.2.2.5.  | Entwicklung des Immunoblots mit Luminol   | 50        |
| 2.2.2.6.  | Färben der Gele   | 50        |
| 2.2.2.7.  | Nachweis der Laminin-5-reichen Matrix   | 50        |
| 2.2.3.    | Molekularbiologische Methoden   | 51        |
| 2.2.3.1.  | Chromatographische Isolierung von Plasmid-DNA<br>(Maxi-Plasmid-Präparation)   | 51        |
| 2.2.3.2.  | Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen  | 51        |
| 2.2.3.3.  | Analytische Agarose-Gelelektrophorese   | 52        |
| 2.2.3.4.  | Reinigung von DNA durch Phenolextraktion  | 52        |
| 2.2.3.5.  | Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA  | 52        |
| 2.2.3.6.  | RNA-Präparation aus eukaryontischen Zellen  | 53        |
| 2.2.3.7.  | Reverse Transkription   | 53        |
| 2.2.3.8.  | Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)  | 53        |
| 2.2.4.    | Histologische Methoden  | 54        |
| 2.2.4.1.  | Indirekte und direkte Immunfluoreszenz  | 54        |
| 2.2.4.2.  | Elvanolherstellung  | 55        |
| <b>3.</b> | <b>Ergebnisse</b>   | <b>56</b> |
| 3.1.      | Expression von Adhäsionsmolekülen in PC12-Zellen  | 56        |
| 3.1.1.    | Expression von Integrinen in PC12-Zellen  | 56        |
| 3.1.1.1.  | Nachweis der Integrine mittels Western Blot   | 56        |
| 3.1.1.2.  | Bestimmung der Integrine-Oberflächenexpression mittels<br>Durchflusscytometrie  | 57        |
| 3.1.1.3.  | Untersuchungen zur $\alpha 6$ -Integrin-Untereinheit in PC12-Zellen<br>mittels RT-PCR                                 | 58        |
| 3.1.1.4.  | Nachweis der $\alpha 6$ -Integrin-Untereinheit in weiteren Zelllinien<br>mittels Westernblot und Durchflusscytometrie | 59        |
| 3.1.1.5.  | Nachweis von Integrinen in PC12-Zellen mittels indirekter<br>Immunofluoreszenz  | 62        |
| 3.1.2.    | Expression von neuronalen Adhäsionsmolekülen in PC12-Zellen   | 63        |
| 3.1.3.    | Charakterisierung der Integrin-Funktion in PC12-Zellen  | 63        |
| 3.1.3.1.  | Einfluss der Integrine auf die Zell-Matrix-Adhäsion   | 63        |
| 3.1.4.    | Matrix-abhängige Differenzierung von PC12-Zellen  | 66        |
| 3.1.4.1.  | Identifizierung von Integrinen, die an der Regulation der neuronalen<br>Differenzierung in PC12-Zellen beteiligt sind | 67        |
| 3.1.4.2.  | Einfluss des ROK $\alpha$ -Inhibitors Y27632 auf das Neuritenwachstum<br>von PC12-Zellen                              | 71        |
| 3.2.      | Bestimmung der Funktion der cytoplasmatischen $\alpha 3$ -Sequenz<br>bei $\alpha 3\beta 1$ -abhängigen Prozessen      | 73        |
| 3.2.1.    | Etablierung der transienten Transfektion von PC12-Zellen mittels<br>Lipofectamin                                      | 73        |
| 3.2.2.    | Untersuchungen zur biologischen Funktion der $\alpha 3$ -Integrin-<br>cytoplasmatischen Domäne                        | 77        |
| 3.2.2.1.  | Einfluss der IL2R- $\alpha 3$ -Chimären auf die Adhäsion der transfizierten<br>PC12-Zellen                            | 77        |

|           |   |            |
|-----------|---|------------|
| 3.2.2.2.  | Untersuchung zur Beeinflussung der Proliferation durch die Expression der cytoplasmatischen $\alpha 3$ -Sequenz   | 78         |
| 3.2.2.3.  | Einfluss der IL2R- $\alpha 3$ -Chimäre auf die Expression der endogenen Integrine in PC12-Zellen  | 79         |
| 3.2.2.4.  | Wirkung der IL2R- $\alpha 3$ -Konstrukte auf die Differenzierung der transfizierten PC12-Zellen   | 80         |
| 3.2.2.5.  | Charakterisierung des Einflusses der $\alpha 3$ -cytoplasmatischen Domäne auf die $\alpha 3\beta 1$ -Integrin-abhängige Sinaltransduktion               | 84         |
| 3.2.2.6.  | Nachweis der ERK1/2-Phosphorylierung in IL2- $\alpha 3$ -Zellen   | 94         |
| <b>4.</b> | <b>Diskussion</b>   | <b>96</b>  |
| 4.1.      | Expression und Funktion der $\beta 1$ -Integrin-Klasse in PC12-Zellen   | 96         |
| 4.2.      | Untersuchungen zur biologischen Funktion der Integrine in PC12-Zellen   | 100        |
| 4.2.1.    | Integrin-vermittelte Zelladhäsion   | 100        |
| 4.2.2.    | Integrin-vermitteltes Neuritenwachstum  | 102        |
| 4.3.      | Bestimmung der Funktion der cytoplasmatischen $\alpha 3$ -Sequenz bei $\alpha 3\beta 1$ -abhängigen Prozessen   | 104        |
| 4.3.1.    | Transiente Transfektion der PC12-Zellen mit IL2R- $\alpha 3$ und IL2R   | 104        |
| 4.3.2.    | Untersuchungen zur Auswirkung der IL2R- $\alpha 3$ -Chimäre auf die biologische Funktion des $\alpha 3$ -Integrins                                      | 106        |
| 4.3.3.    | Beteiligung der cytoplasmatischen Sequenz der $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit an der RhoA/ROK- und Rac1-Siganlwege                                    | 109        |
| 4.3.4.    | Einfluss der IL2R- $\alpha 3$ -Chimären auf die MAPK-Signalkaskade  | 115        |
| 4.3.5.    | Modell zur Beteiligung der cytoplasmatischen Sequenz der $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit am $\alpha 3\beta 1$ -Integrin-vermittelten Neuritenwachstum | 116        |
| <b>5.</b> | <b>Zusammenfassung</b>  | <b>119</b> |
|           | Summary   | 121        |
| <b>6.</b> | <b>Literatur</b>  | <b>123</b> |
|           | <b>Anhang</b>   | <b>168</b> |
|           | Veröffentlichungen  | 168        |
|           | Lebenslauf  | 170        |
|           | Danksagung  | 171        |
|           | Förderung   | 172        |

### Abkürzungen

|            |   |
|------------|---|
| APS        | Ammoniumpersulfat   |
| Abl2       | Tyrosine-Protein-Kinase Abl2  |
| Arp2/3     | Aktin-Related-Protein-Complex 2/3   |
| BSA        | Rinderserum-Albumin   |
| CAM        | Cell Adhesion Molecule  |
| Cas        | Crk-Associated-Substrate  |
| CD         | Cluster of differentiation  |
| CEA-CAM    | Carcinoembryonic-Antigen-Related-Cell-Adhesion-Molecule                           |
| Cdc42      | homologes Protein zum Gen 42 bei der Hefezellteilung (Cell-Division-Cycle-Gen 42) |
| CHO-Zellen | Chinese-Hamster-Ovary-Cells   |
| CNBr       | Cyanbromid  |
| Da         | Dalton  |
| DAG        | Diacylglycerol  |
| DDT        | Dithiothreitol  |
| DMSO       | Dimethylsulfoxid  |
| DOCK 180   | 180 kDa Protein Downstream von Crk  |
| DRAL/FHL2  | Down-Regulated in Rhabdomyosarcoma LIM Protein/Four and a Half LIM Protein 2      |
| EDTA       | Ethylendiamin-Tetraessigsäure   |
| ELMO       | Engulfment and Cell Motility  |
| ERK        | Extracellular-Signal-Regulated-Kinase   |
| ES         | Embryonale Stammzellen (Embryonic-Stem-Cells)                                     |
| EZM        | Extrazelluläre Matrix   |
| FAK        | Focal-Adhesion-Kinase   |
| FCS        | Fetales Kälber-Serum  |
| FITC       | Fluorescein-Isothiocyanat   |
| FN         | Fibronektin   |
| GAM        | Goat-anti-Mouse   |
| GAR        | Goat-anti-Rabbit  |
| GAP        | GTPase-Aktivating-Protein   |
| GDP        | Guanindiphosphat  |
| GEF        | Guanine-Nucleotide-Exchange-Factor  |
| GDFs       | Nukleotid-Dissoziations-Faktor  |
| GPI        | Glycosylphosphatidyl-Inositol   |

## Abkürzungen

---

|                  |  |
|------------------|--|
| Grb2             | Growth-Factor-Receptor-Bound-Protein 2       |
| ICAM             | Intercellular-Adhesion-Molecule              |
| IgCAM            | Immunglobulinartige Zelladhäsionsmoleküle    |
| IgSF             | Immunglobulin-Superfamilie                   |
| ILK              | Integrin-Linked-Kinase                       |
| IP3              | Inositoltrisphosphat                         |
| JNK              | JUN-N-Terminal-Kinase                        |
| KIV              | Kollagen IV                                  |
| MAPK             | Mitogen-Activated-Protein-Kinase             |
| MAPKK            | Mitogen-Activated-Protein-Kinase-Kinase      |
| mDia             | Mammalian-Homolog of Diaphanous              |
| MLC              | Myosin-Light-Chain                           |
| MSK              | Mitogen- und Stress-Activated-Protein-Kinase |
| NCAM             | neurales Zelladhäsionsmolekül                |
| Nap              | Nck-associated Protein-1                     |
| NBT-II           | Rat-Bladder-Carcinoma-Cells                  |
| NGF              | Nerve-Growth-Factor                          |
| LIMK             | LIM-Kinase                                   |
| PAGE             | Polyacrylamid-Gelelektrophorese              |
| PBS              | Phosphat-Buffered-Saline                     |
| PC12-Zellen      | Pheochromocytom-Zellen                       |
| PDK1             | Phosphoinositide-Dependent-Protein-Kinase 1  |
| PFA              | Paraformaldehyd                              |
| PI3-Kinase       | Phosphatidylinositol-3-Kinase                |
| PIP <sub>2</sub> | Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat         |
| PIP <sub>3</sub> | Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat      |
| PIR121           | p53-Inducible-Protein                        |
| PIX              | PAK-Interacting-Exchange-Factor              |
| PINCH            | Particular-Interesting New-Cys-His-Protein   |
| PKC              | Proteinkinase C                              |
| PKL              | Protein-Kinase C-Like-1                      |
| PLC              | Phospholipase C                              |
| PLL              | Poly-L-Lysin                                 |

## Abkürzungen

---

|              |   |
|--------------|---|
| PMSF         | Phenylmethylsulfonylfluorid                           |
| PP1          | Proteinphosphatase 1                                  |
| PP2          | Proteinphosphatase 2                                  |
| PTEN         | Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat 3-Phosphatase |
| PTP1B        | Protein-Tyrosine-Phosphatase-1 B                      |
| Pyk2         | Prolin-Rich-Tyrosine-Kinase                           |
| Rac          | Mitglied der Ras-Familie                              |
| Raf          | Mitglied der Rho-GTPasen                              |
| RAM          | Rabbit-anti-Mouse                                     |
| RBE          | Rat-Brain-Endothelial-Cells                           |
| ROK $\alpha$ | RhoA-Binding-Kinase $\alpha$                          |
| RLF          | Rat-Lung-Fibroblasts                                  |
| RTK          | Rezeptor-Tyrosinkinase                                |
| RT-PCR       | Reverse-Transkriptions-PCR                            |
| SCC25        | Squamöses Zellkarzinoma der Zunge                     |
| SDS          | Natriumdodecylsulfate (Sodium dodecyl sulfate)        |
| SOS          | Son-of-sevenless                                      |
| STAT         | Signal- transducer- and Activator- of Transcription   |
| TBS          | Tris buffered salt buffer                             |
| TBST         | Tris buffered salt buffer tween                       |
| TEMED        | Tetramethylethylendiamin                              |
| TrkA         | Tropomyosin-Rezeptor-Kinase A                         |
| TRITC        | Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat                    |
| Tris         | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan                       |
| WT           | Wildtyp   |
| WASP         | Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein                       |