

## 1. Einleitung

### 1.1. Die Zell-Matrix-Adhäsion und die extrazelluläre Matrix

Alle mehrzelligen Organismen sind in Zellverbänden - den Geweben - organisiert, die sich zu größeren Funktionseinheiten, den Organen, verbinden. In den Geweben stehen die Zellen in engem Kontakt mit komplexen extrazellulären Makromolekülen, die als extrazelluläre Matrix (EZM) bekannt sind. Die Zellen interagieren mit speziellen Oberflächen-Rezeptoren, den Integrinen [Adams & Watt, 1993]. Zu der heterogenen Population von Proteinen der extrazellulären Matrix zählen zahlreiche Proteoglycane, die bis jetzt identifizierten neunzehn verschiedenen Kollagene [van der Rest & Garrone, 1991] [Brown & Timpl, 1995], elf Laminin-Isoformen [Timpl & Brown, 1996], Nidogen, Elastin, Fibronectin und eine große Zahl weiterer Komponenten. Sie sind für die supramolekulare Organisation der extrazellulären Matrix von Bedeutung, die auf weiteren molekularen Interaktionen beruht.

Die extrazelluläre Matrix ist für die strukturelle und funktionelle Organisation von Zellen und für die mechanische Stabilität von Geweben verantwortlich. Eine spezialisierte Form der EZM ist die Basalmembran. Sie ist meist aus zwei morphologisch unterscheidbaren Schichten aufgebaut. 1- Basallamina (*Lamina basalis*), bestehend aus der *Lamina lucida* (*Lamina rara*), die unmittelbar an der zellulären Plasmamembran anliegt und aus der darüber liegenden *Lamina densa*, zu deren Hauptbestandteilen Laminin, Kollagen IV, Nidogen und das Proteoglykan Perlecan gehören [Timpl, 1989] [Yurchenco & Schittny, 1990] [Paulsson, 1992]. 2- Die *Lamina densa* ist über Verankerungsplaque mit der *Lamina fibroreticulaies* vom darunterliegenden Bindegewebe abgegrenzt. Diese Verankerungsfibrillen sind aus Kollagen VII aufgebaut [van der Rest & Garrone, 1991]. Die wesentlichen Bestandteile der extrazellulären Matrix von Bindegeweben sind:

1. faserige Bestandteile wie Kollagen Typ I und III, Ankerfibrillen wie Kollagen Typ VII Verankerungsmoleküle, wie Kollagen Typ IV, und Mikrofibrillen.
2. nichtfaserige Grundsubstanzen sowie Proteoglykane, Glykosaminoglykane, z.B. Decorin, Perlecan und Syndecan.

3. Glykoproteine, dazu gehören das Gewebefibronectin, Thrombospondin, der Laminin-Nidogen-Komplex und das K-Laminin (kurze Anker-Filamente).

Die Komponenten der Basalmembran werden hauptsächlich von Zellen synthetisiert, die auf ihr ruhen. In einigen Fällen ist jedoch eine Kooperation zwischen epithelialen und mesenchymalen Zellen zur Ausbildung einer intakten Basalmembran notwendig [Dziadek, 1995]. Am Aufbau der Basalmembran ist eine Vielzahl extrazellulärer Proteine beteiligt. Nach deren Translation und posttranslationalen Modifikationen werden sie in den extrazellulären Raum sezerniert und über verschiedene Mechanismen zu stabilen, supramolekularen Strukturen polymerisiert. Die Zusammensetzung der Basalmembran ist häufig gewebespezifisch [Miner et al., 1997] [Sanes & Yamagata, 1999].

### Kollagen

Kollagene sind die Hauptproteine der extrazellulären Matrix. Es sind bislang 16 verschiedene Typen identifiziert worden; Typ I, II und III bilden lange Fibrillen, Typ IV bildet Netzstrukturen. Kollagene sind eine Familie sehr charakteristischer Faserproteine, auch als Ankerfibrillen bekannt, die bei allen vielzelligen Organismen vorkommen als Hauptbestandteile von Knochen, Haut, Sehnen und Knorpeln. Ein sehr charakteristisches Merkmal der Kollagene ist ihre dreisträngige helikale Struktur. Drei Polypeptidketten ( $\alpha$ -Ketten) winden sich unter Bildung einer Superhelix (Tripelhelix) umeinander. Die Bildung der Fibrillen aus der Tripelhelix ist ein extrazellulärer Prozess, dem die Protokollagen-Peptide durch spezifische Protokollagen-Metalloproteinasen abgeschnitten werden [Bosman & Stamenkovic, 2003].

### Fibronectin

Fibronectin ist ein großes Glycoprotein, welches als Dimer aus zwei nahezu identischen Untereinheiten besteht, die durch zwei Disulfidbrücken verbunden sind. Fibronectin spielt eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion, Migration und Differenzierung [Mostafavi-Pour et al., 2003] [Rosso et al., 2004]. Es sind verschiedene Fibronectin-Isoformen bekannt, die durch alternatives Splicing gebildet werden.

Fibronektin enthält verschiedene Aminosäure-Motive wie RGD, RGDS, LDV und REDV, die für die Zellbindung wichtig sind. Diese Motive werden von verschiedenen Integrinen erkannt und gebunden [Kao, 1999].

### Laminin

Laminine stellen eine der Hauptkomponenten der Basalmembran dar. Sie sind Heterodimere, bestehend aus drei verschiedenen Ketten ( $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ ), die zwar Ähnlichkeiten aufweisen, aber alle von unterschiedlichen Genen kodiert werden. Sie sind in kreuzförmigen Strukturen organisiert [Timpl, 1996]. Sie besitzen globuläre Endstrukturen und verfügen über EGF-ähnliche Wiederholungen, in denen sich eine Bindungsstelle für das Protein Nidogen befindet. Nidogen verbindet Laminin mit Kollagen IV. Die  $\alpha$ -Kette des Laminins besitzt eine große C-Terminal-Domäne (G1-G5), die die Bindungsstelle (G1-G3) einiger Integrine ( $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$ , und  $\alpha 7\beta 1$ ) darstellen [Hynes & Lander, 1992] [Belkin & Stepp, 2000] (Abb. 1).

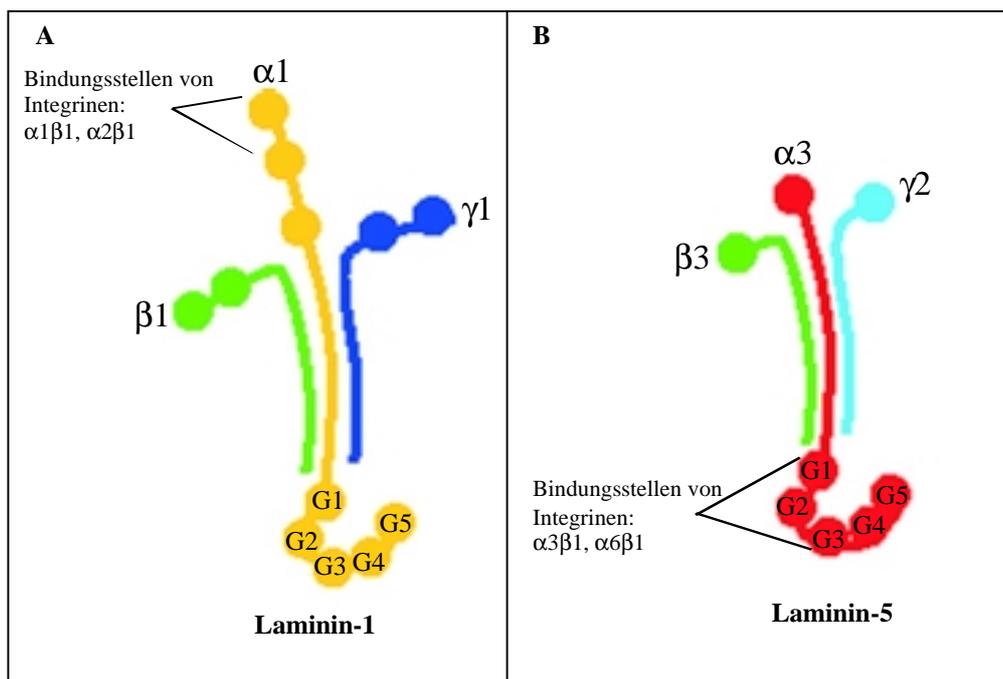
In Lamininen sind nicht nur RGD-Sequenzen als Bindungssequenzen anzutreffen, sondern auch andere Erkennungs-Motive wie PDSGR, YIGSR, IKVAV, mit denen sie Zelloberflächen-

rezeptoren erkennen und binden können [Timpl et al., 2000]. Es gibt 12 verschiedene Laminin-Isoformen, die in verschiedenen Zellen gewebespezifisch synthetisiert werden und die verschiedene Bindungsaffinitäten zu Zellen aufweisen. Fast alle epithelialen Zellen sezernieren Laminine, z.B. Herz- Muskel-, Nerven,- Endothelzellen und Zellen der Neuroretina. Laminine üben verschiedene Effekte auf Zellen aus, es kann die Zelladhäsion, Migration und die Differenzierung beeinträchtigen. Das als erstes aus dem Engelbrecht-Holm-Swarm (EHS)-Tumor der Maus isolierte Laminin-1 ( $\alpha 1\beta 1\gamma 1$ ) (Abb. 1 A) ist die am besten charakterisierte Isoform [Timpl et al., 1979] [Timpl et al., 1983]. Laminin-1 ist dafür bekannt, die Zelldifferenzierung zu fördern [Aumailley & Smyth, 1998].

Laminin-2 ( $\alpha 2\beta 1\gamma 1$ ), auch als Merosin bekannt, leitet das Neuritenwachstum ein [Colognato et al., 1997]. Laminin-5, das kleinste Laminin, ist in seiner Kettenkombination einmalig ( $\alpha 3\beta 3\gamma 2$ ) (Abb. 1 B). Nach der Synthese der Laminin-Ketten kommt es zuerst zur intrazellulären Bildung von  $\gamma/\beta$ -Dimere. Die endgültige Assoziation mit einer  $\alpha$ -Kette ist dann die Voraussetzung für die Sekretion von Lamininen in den extrazellulären Raum.

Sobald Laminin-5 in den extrazellulären Raum gelangt, wird zusätzlich durch Disulfidbrücken eine Verbindung zu Laminin-6 oder Laminin-7 hergestellt, welche die Verankerungsfilamente im Schichtenepithel formen [Champlaud et al., 1996].

Laminin-5 ist an der Zelladhäsion und der Migration von normalen [Carter et al., 1991] [Xia et al., 1996] [Giancotti, 1997], aber auch an Tumorzellen, [Xia et al., 1996] [Fukushima et al., 1998] beteiligt, wobei dessen Funktion stark von seiner proteolytischen Prozessierung abhängt. Das Prozessieren von Laminin-5 findet extrazellulär statt und wird durch Plasmin [Marinkovich et al., 1992] [Matsui et al., 1995a] [Matsui et al., 1995b] oder Matrix-Metalloproteinasen induziert [Giannelli et al., 1997] [Gagnoux-Palacios et al., 2001]. Die posttranslationale Prozessierung der  $\alpha 3$ -Kette des Laminin-5 moduliert dessen Funktion und beschränkt das Bindungsrepertoire mit den Integrinen ( $\alpha 3\beta 1$ -,  $\alpha 6\beta 1$ -Integrine) [Aumailley et al., 2003]. Laminin-5 und Laminin-10/11 ( $\alpha 5\beta 1\gamma 1$ ) treten häufig zusammen in der vaskulären Basalmembran auf und vermitteln dort die Adhäsion von Plättchen, Leukozyten und Endothelzellen [Pakkala et al., 2002].



**Abb. 1: Laminin-Strukturen, Isoformen (Laminin-5 und Laminin-1) und Integrin-Bindungsstellen** [Teller & Beaulieu, 2001]. **A:** Laminin-1 besteht aus  $\alpha 1$ -,  $\beta 1$ - und  $\gamma 1$ -Kette. Die Bindungsdomänen für  $\alpha 1\beta 1$ - und  $\alpha 2\beta 1$ -Integrin befinden sich im N-terminalen Bereich der  $\alpha 1$ -Kette. **B:** Laminin-5 besteht aus  $\alpha 3$ -,  $\beta 3$ - und  $\gamma 2$ -Ketten. Dargestellt sind die Bindungsdomänen von  $\alpha 3\beta 1$ - und  $\alpha 6\beta 1$ -Integrin, die sich in der Region G1-G2 der  $\alpha 3$ -Kette befinden. G1-G5 steht für die C-terminalen globulären Domänen der  $\alpha$ -Ketten des Laminins.

Defekte in den verschiedenen Komponenten des Laminins führen zu vielfältigen Erkrankungen [Libby & Lee, 2000]. Eine Mutation in der  $\alpha 2$ -Kette führt zu Muskel-Dystrophie und zur Demyelinisierung im zentralen Nervensystem [Arahata et al., 1995].

Defekte in allen Laminin-5-Ketten induzieren eine degenerative Desorganisation der Haut wie bei Junctional-Epidermolysis-Bullosa [Timpl, 1996] und einer Muskel-Dystrophie (Walker-Warburg-Syndrom). Bei dieser Krankheit wurde eine Reduktion der Expression der  $\beta 2$ -Kette festgestellt [Wewer et al., 1995].

Defekte in der  $\gamma 2$ -Kette führen zu Störungen der neuronalen Entwicklung des zentralen Nervensystems und zur Entzündung der Netzhaut (Retinitis pigmentosa 21) [Koch et al., 1999].

## 1.2. Zelladhäsionsmoleküle

Die Zelladhäsion ist ein Mechanismus, mit deren Hilfe Zellen an angrenzende Zellen (Zell-Zell-Adhäsion) und an die umgebende extrazelluläre Matrix (Zell-Matrix-Adhäsion) binden. Zelladhäsion ist die Voraussetzung für die Ausbildung und Entwicklung multizellulärer Organismen. Vorgänge der Zelladhäsion sind für die Zellmorphogenese und die Entstehung von Geweben von Bedeutung. Somit spielt die Zelladhäsion eine wichtige Rolle bei der Proliferation, Migration und Differenzierung. Es handelt sich um zellbiologische Prozesse wie Wundheilung, Homöostase, Tumorwachstum und Metastasierung [Hynes & Lander, 1992]. Durch Adhäsion werden intrazelluläre Prozesse in Gang gesetzt, die zur Umstrukturierung des Cytoskeletts und zur Induktion von Signalkaskaden führen können. Diese intrazellulären Vorgänge können ihrerseits Affinität, Expressionsmuster und Spezifität der Oberflächen-Rezeptoren beeinflussen [Aplin et al., 1998]. Die Zelladhäsion wird durch spezielle Zelloberflächen-Rezeptoren vermittelt.

Diese Rezeptoren wirken nicht nur als einfache Ankerpunkte, sondern übertragen durch die Interaktion mit anderen Molekülen Signale in das Zellinnere.

Über die Zellmembran hindurch treten Zelladhäsionsmoleküle mit anderen zellulären Komponenten wie dem Cytoskelett oder aber mit Signal- oder Botenmolekülen in Wechselwirkung.

Aufgrund struktureller Merkmale lassen sich Zelladhäsionsmoleküle in vier Untergruppen unterteilen: Cadherine, Moleküle der Immunglobulinsuperfamilie, Selektine und Integrine.

**Cadherine** gehören zu den Adhäsionsmolekülen, die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig homophile Wechselwirkungen zwischen den Zellen hervorrufen.

Für die Verankerung mit Aktinfilamenten des Cytoskeletts ist der intrazelluläre C-Terminus verantwortlich. Über eine als Catenine bezeichnete Familie von Proteinen erfolgt die Bindung an Aktin [Cowin & Burke, 1996].

Es sind 15 verschiedene Mitglieder der klassischen Cadherin-Familie bekannt, die jeweils in bestimmten Geweben vorkommen.

Die bekanntesten Vertreter sind E-Cadherin- (auf epithelialen Zellen, speziell in der *Zonula adherens* und in Desmosomen), N- (auf Nerven- und Muskelzellen) und P- (in der Plazenta und der Epidermis) Cadherine, R- und B- Cadherine (hauptsächlich in Glia-Zellen) [Takeichi, 1990]. Auch Cadherine können Signale ins Zellinnere weiterleiten. Hierbei sind Sie an einen Signalweg gekoppelt, der als Wnt/Wingless-Signalweg bekannt ist [Orsulic & Peifer, 1996] [Arias et al., 1999].

**Moleküle der Immunglobulinsuperfamilie (Ig-CAMs)** besitzen eine oder mehrere Immunglobulin-Domänen und vermitteln homophile, aber auch heterophile Bindungen zwischen den Zellen. Mit über 100 Mitgliedern stellen die Ig-CAMs die größte Familie der Adhäsionsmoleküle dar [Brummendorf & Rathjen, 1995]. Der bekannteste Vertreter ist das neuronale Adhäsionsmolekül N-CAM, das hauptsächlich in neuronalen Zellen vorkommt und bei der Differenzierung und der neuronalen Entwicklung eine wichtige Rolle spielt [Edelman & Crossin, 1991].

**Selektine** sind eine kleine Gruppe von Zelladhäsionsmolekülen. Selektine sind lektinartige Rezeptoren. Diese Gruppe besteht aus L- (auf Leukozyten), P- (auf Blutplättchen) und E- (auf Endothelzellen) Selektin.

Selektine vermitteln durch Bindung an sialylierte Glykane heterotypische Zell-Zell-Adhäsion und spielen dabei eine wichtige Rolle bei entzündlichen Prozessen, wo sie die Interaktionen zwischen Leukozyten und Endothelzellen vermitteln [Tedder et al., 1995].

### 1.2.1. Integrine

Bei Integrinen handelt es sich um eine Familie von Zelloberflächen-Glykoproteinen, die man früher als VLA-(Very-Late-Antigen) Proteine bezeichnete [Hemler et al., 1987] [Hynes, 1987]. Integrine sind nicht-kovalent gebundene Heterodimere. Sie bestehen aus zwei Untereinheiten: einer  $\alpha$ -Untereinheit und einer  $\beta$ -Untereinheit [Ruoslahti & Giancotti, 1989] [Albelda & Buck, 1990] (Abb. 2). Letztendlich konnten durch die Sequenzierung des Humangenoms 18  $\alpha$ - und 8  $\beta$ -Integrin-Untereinheiten identifiziert werden.

Die verschiedenen Kombinationen von  $\alpha$ - mit  $\beta$ -Untereinheiten ergeben 24 funktionelle Integrine [van der Flier & Sonnenberg, 2001] [Hynes, 2002a]. Man klassifiziert Integrin-Unterfamilien, die auf der Anwesenheit der  $\beta$ 1-,  $\beta$ 2- oder der  $\alpha$ v-Integrin-Untereinheit beruhen [Jin & Varner, 2004] (Abb. 2).

Die Ligandenspezifität ergibt sich aus der jeweiligen  $\alpha/\beta$ -Kombination, z.B. die  $\alpha$ v-Untereinheit kann mit der  $\beta$ 3- oder mit der  $\beta$ 5-Integrin-Untereinheit interagieren und einen Vitronectin-Rezeptor bilden [Pytela et al., 1985] [Smith et al., 1990]. Komplexiert die  $\alpha$ v-Integrin-Untereinheit mit der  $\beta$ 1-Untereinheit, dann agiert das Heterodimer als ein Fibronectin-Rezeptor [Vogel et al., 1990]. Ein weiteres Beispiel stellt die  $\alpha$ 6-Untereinheit dar, wenn die  $\alpha$ 6-Integrin-Untereinheit mit der  $\beta$ 1-Untereinheit interagiert, wird ein Laminin-Rezeptor gebildet [Sonnenberg et al., 1988]. Auch die Kombination von  $\alpha$ 6-Integrin-Untereinheit und  $\beta$ 4-Untereinheit führt zur Bildung eines Laminin-Rezeptors [Kajiji et al., 1989] (Abb. 2), der jedoch ausschließlich in den Hemidesmosomen lokalisiert ist [Cress et al., 1995].  $\alpha$ 3-Integrin-Untereinheit komplexiert ausschließlich mit  $\beta$ 1-Integrin-Untereinheit und bildet dadurch einen Laminin-5 Rezeptor [Kreidberg, 1996] [Kikkawa et al., 1998].

Die  $\beta$ 1-Subfamilie ist die größte Integrin-Subfamilie. Die  $\beta$ 1-Mitglieder binden ausschließlich Proteine der extrazellulären Matrix und interagieren intrazellulär mit Proteinen des Cytoskeletts [Buck & Horwitz, 1987].

Die  $\beta$ 2-Subfamilie wird nur auf Leukozyten exprimiert. Es gibt vier verschiedene  $\beta$ 2-Integrine: das  $\alpha_L\beta$ 2-Integrin (Mac-1), das die ICAM-Rezeptoren bindet [Gadek et al., 2002], das Heterodimer  $\alpha_M\beta$ 2 (LFA-1), das einen Komplement-Rezeptor bildet, aber auch an ICAM-1 und zusätz-

lich Fibrinogen bindet [Rosner et al., 2001], das  $\alpha_x\beta_2$ , welches auch als Komplement-Rezeptor fungiert [Hogg et al., 1999], sowie das  $\alpha_D\beta_2$ , es vermittelt die Interaktion mit ICAM-3 und VCAM-1 [Berman et al., 2003] (Abb. 2).

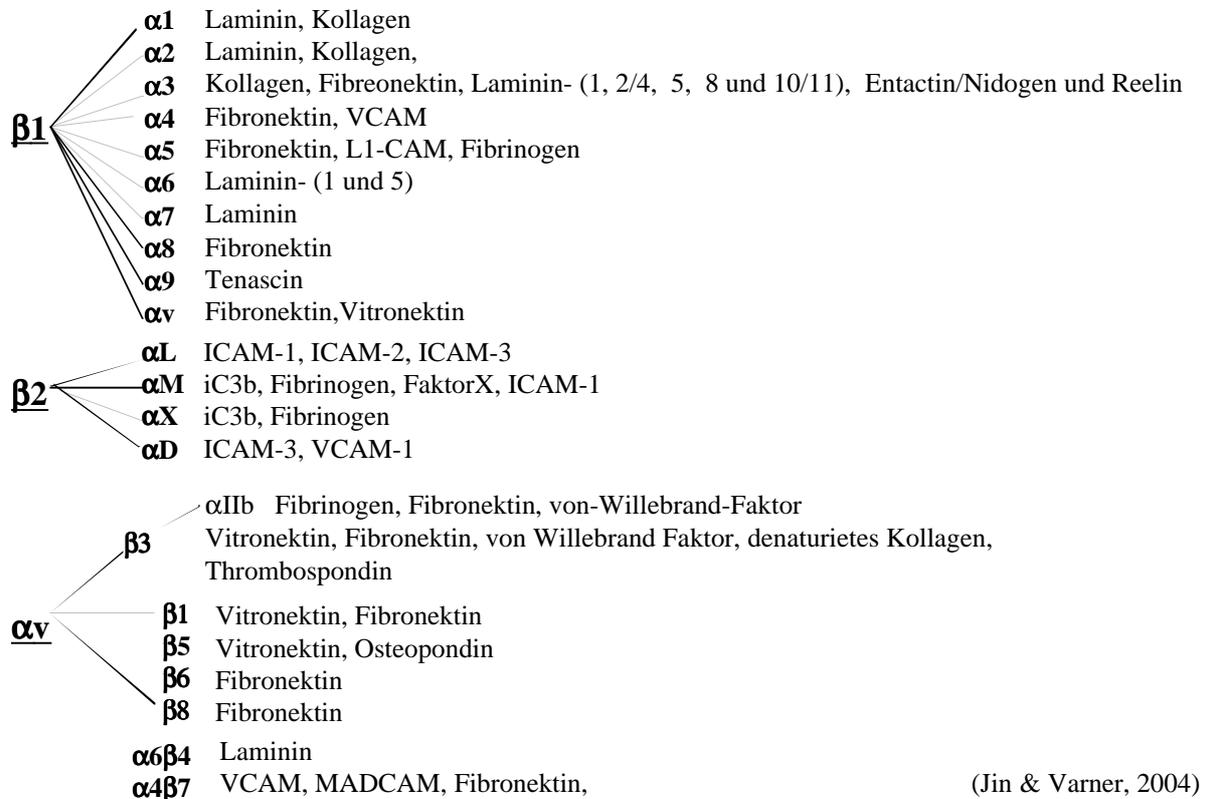


Abb. 2: Die drei Integrin-Subfamilien (**β1**, **β2** und **αv**), die verschiedenen Kombinationen und deren Liganden (verändert nach [Jin & Varner, 2004]).

### 1.2.2. Die Struktur der Integrine

Integrine bestehen aus transmembranären  $\alpha/\beta$ -Heterodimeren. Die Untereinheiten besitzen jeweils eine große extrazelluläre Domäne (bis zu 1114 Aminosäuren für die  $\alpha$ -Integrin-Untereinheiten und bis zu 678 Aminosäuren für die  $\beta$ -Untereinheiten). Jede Untereinheit durchspannt die Membran nur einmal.

Integrine besitzen einen kurzen transmembranären Bereich und eine kleine cytoplasmatische Domäne ohne Enzymaktivität (von 15-77 Aminosäuren für die  $\alpha$ -Integrin-Untereinheiten bzw. von 46-60 Aminosäuren für die  $\beta$ -Integrin-Untereinheiten) [Humphries et al., 2003].

Die  **$\alpha$ -Integrin-Untereinheit** besitzt im extrazellulären Teil, dem N-Terminus, drei bis vier Domänen, bestehend aus jeweils 12-15 Aminosäuren, die divalente Kationen wie  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$

und  $Mn^{2+}$  binden. Durch das Auslösen von Konformationsänderungen modulieren die zweitwertigen Kationen indirekt die Affinität und die Spezifität des Integrins.

Die  $\alpha$ -Untereinheiten weisen im N-terminalen Bereich der extrazellulären Domäne sieben repetitive Sequenzeinheiten (Domäne I-VII) (Abb.3) auf, die jeweils 60-70 Aminosäuren beinhalten [Corbi et al., 1987] [Stewart et al., 1996]. Die Domänen IV-VII besitzen, abhängig von der  $\alpha$ -Untereinheit, Konsensussequenzen für drei bis vier mögliche Bindungsstellen divalenter Kationen. Diese Domänen werden als EF-Hand-Motiv bezeichnet [Tuckwell et al., 1992] [Mould, 1996] [Takada et al., 1997]. Bei einigen  $\alpha$ -Untereinheiten ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_{10}$ ,  $\alpha_D$ ,  $\alpha_E$ ,  $\alpha_L$ ,  $\alpha_M$ ) ist zwischen den Domänen II und III eine sogenannte I-Domäne von ca. 200 Aminosäuren inseriert [Hogg et al., 1994] [Takada et al., 1997] [Leitinger & Hogg, 2000]. Die I-Domäne enthält eine konservierte  $Mg^{2+}/Mn^{2+}$ -Bindungsstelle, die auch als Metallionen-abhängige Adhäsionsstelle „MIDAS“ (Metal-Ion-Dependent-Adhesion-Site) bezeichnet wird [Lee et al., 1995] (Abb. 3). Die I-Domäne ist auch in Proteinen der extrazellulären Matrix wie im Kollagen IV vorhanden. Diese Domäne ist generell an Protein-Protein-Wechselwirkungen beteiligt. Bei den Integrinen ist die I-Domäne für die Ligandenbindung von Bedeutung [Ignatius et al., 1990] [Humphries & Newham, 1998] [Mould et al., 2000]. Einige  $\alpha$ -Integrin-Untereinheiten ( $\alpha_3$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_6$ ,  $\alpha_7$ ,  $\alpha_8$ ,  $\alpha_v$  und  $\alpha_{IIb}$ ) besitzen keine I-Domäne. Diese wird vermutlich durch enzymatische Spaltung entfernt.

Die verbliebenden Peptid-Fragmente werden durch Disulfidbrücken miteinander verknüpft.

Die cytoplasmatischen Domänen der  $\alpha$ -Untereinheiten sind einander wenig homolog, besitzen aber eine hochkonservierte membranproximale KXGFFFKR-Sequenz. Durch die Deletion dieser Sequenz kommt es zur konstitutiven Aktivierung der Integrine [O'Toole et al., 1994] [Paddison et al., 2002]. Verschiedene Splice-Varianten der  $\alpha$ -Untereinheit erhöhen die Heterogenität der cytoplasmatischen Domäne [van der Flier & Sonnenberg, 2001].

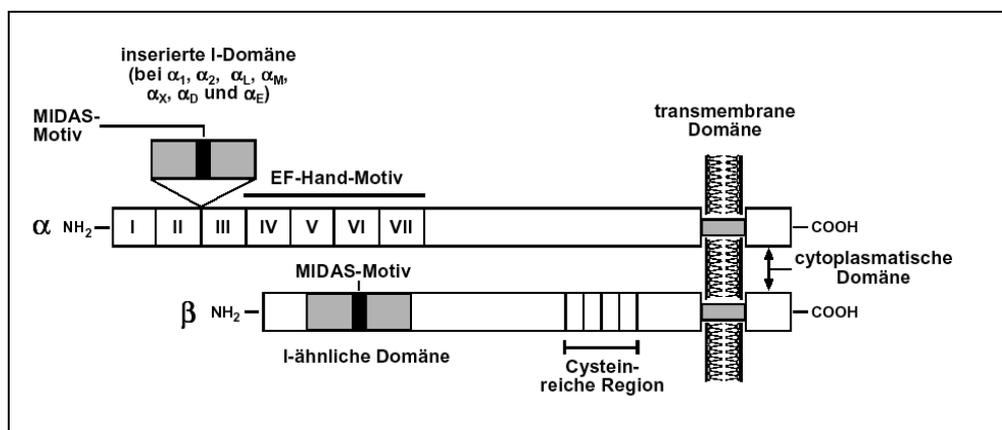
Diese Sequenz spielt eine wesentliche Rolle bei der Fähigkeit zur Ligandenbindung und Signalweiterleitung [Kassner et al., 1995] [Löster et al., 2001].

**Die  $\beta$ -Integrin-Untereinheit:** Die Größe der  $\beta$ -Untereinheiten variiert zwischen 95 kDa und 117 kDa. Die primäre Struktur der  $\beta$ -Untereinheiten ist weniger variabel als die der  $\alpha$ -Untereinheiten. Jede  $\beta$ -Untereinheit besitzt im N-Terminus, dem extrazellulären Teil, einen

großen „Loop“, eine konservierte Domäne von etwa 250 Aminosäuren. Diese weist Struktur-Homologie zur I-Domäne der  $\alpha$ -Integrin-Untereinheiten auf. Aus diesem Grund wird dieser Bereich als I-ähnliche Domäne bezeichnet. In Analogie zu den I-Domänen besitzt auch die I-ähnliche Domäne ein MIDAS-Motiv [Loftus et al., 1994] [Lee et al., 1995]. In der Nähe der transmembranären Region trägt die  $\beta$ -Integrin-Untereinheit vier cysteinreiche Domänen, die jeweils etwa 40 Aminosäuren lang sind und Homologie zum EGF-Modul aufweisen [Mould, 1996] (Abb. 3).

Die cytoplasmatischen Domänen der  $\beta$ -Untereinheiten bestehen aus 15-65 Aminosäuren. Im Gegensatz zur  $\alpha$ -Integrin-Untereinheit sind die cytoplasmatischen Domänen der  $\beta$ -Integrin-Untereinheiten sehr homolog [Sastry & Horwitz, 1993]. Für die  $\beta$ 1-,  $\beta$ 3- und  $\beta$ 4-Integrin-Untereinheiten sind ebenfalls Splicevarianten beschrieben worden [Languino & Ruoslahti, 1992] [de Melker & Sonnenberg, 1999]. [van der Flier & Sonnenberg, 2001].

Alle  $\beta$ -Integrin-Untereinheiten besitzen ein hochkonserviertes Motiv, die HDRR-Sequenz im membranproximalen Bereich [Williams et al., 1994] [O'Toole, 1997]. Diese Sequenz interagiert mit dem hochkonservierten GFFKR-Motiv der  $\alpha$ -Integrin-Untereinheit [Briesewitz et al., 1995] [van der Flier & Sonnenberg, 2001].



**Abb. 3: Schematische Darstellung der Integrin-Struktur** (verändert nach [Mould, 1996]). Domäne I-VII: repetitive Sequenzeinheiten, die jeweils 60-70 Aminosäuren beinhalten. Domänen IV-VII der  $\alpha$ -Untereinheit besitzen Bindungsstellen divalenter Kationen, die als EF-Hand-Motiv bezeichnet werden. Die I-Domäne enthält eine konservierte  $Mg^{2+}/Mn^{2+}$ -Bindungsstelle, die auch als metallionenabhängige Adhäsionsstelle „MIDAS“ (Metal-Ion-Dependent-Adhesion-Site) bezeichnet wird.

### 1.2.3. Aktivierung der Integrine

Der Aktivierungszustand von Integrinen kann im Wesentlichen durch zwei Ereignisse reguliert werden:

1. durch die Affinitätsänderung, die durch eine Konformationsänderung hervorgerufen wird.
2. durch Aviditätsänderung, die durch veränderte Aggregation der Integrin-Moleküle auf der Zelloberfläche ausgelöst wird.

Das Auftreten einer Affinitätsänderung konnte durch monoklonale Antikörper belegt werden, die spezifische Aktivierungsepitope auf Integrinen erkennen oder die in der Lage sind, eine aktive Konformation des Integrins zu induzieren [Mould, 1996]. Auch divalente Kationen wie  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  können über Konformationsänderungen den aktiven Zustand des Integrins induzieren [Mould, 1996].

In den letzten Jahren sind Konformationsänderungen der cytoplasmatischen Domäne der Integrine beschrieben worden [Liddington & Ginsberg, 2002]. Aviditätsänderungen können ebenfalls durch monoklonale Antikörper detektiert werden. So erkennt beispielsweise der monoklonale Antikörper NKI-L61 ein  $Ca^{2+}$ -abhängiges Aktivierungsepitop auf LFA-1 (Lymphocyte-Function-Associated-Antigen-1), das ausschließlich bei der Multimerisierung von Integrinen auf Zelloberflächen entsteht [van Kooyk et al., 1991] [van Kooyk et al., 1994].

Aviditätsänderungen sind vermutlich die Folge einer erhöhten lateralen Integrin-Mobilität, die durch eine temporäre Entkopplung des Integrins vom Aktin-Cytoskelett erleichtert wird [Dustin & Springer, 1991] [Stewart & Hogg, 1996] [van Kooyk & Figdor, 2000].

Die Funktion der Integrine unterliegt einem raschen Wechsel zwischen dem inaktiven und dem aktiven Zustand der Moleküle.

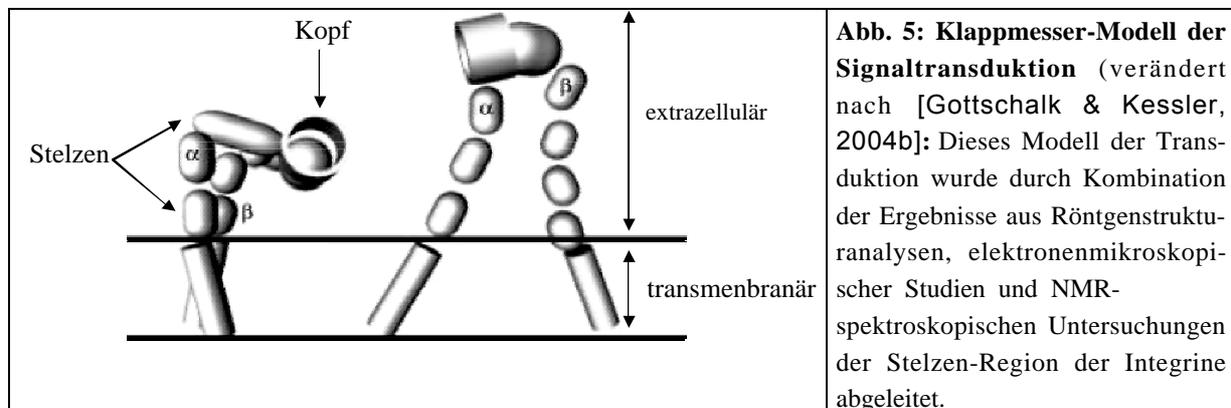
Verschiedene Modelle wurden aufgestellt, um die Aktivierung bzw. die Inaktivierung von Integrinen zu beschreiben und damit die Vermittlung des bidirektionalen Informationsstransfers (Inside-out- und Outside-in Signaling) aufzuklären.

Für die  $\alpha II\beta 3$ -Integrine konnte gezeigt werden, dass die beiden transmembranären Domänen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Integrin-Untereinheiten miteinander interagieren und dass diese Interaktion ein

wichtiges Ereignis für die Weiterleitung von Signalen ist [Gottschalk & Kessler, 2004b] [Gottschalk & Kessler, 2004a].

Diese Daten wurden aus elektronenmikroskopischen Bildern gewonnen, woraus sich schließen lässt, dass den bei der Ligandenbindung im Kristall auftretenden Strukturänderungen weitere konformative Umlagerungen folgen. In zahlreichen Untersuchungen konnten größere strukturelle Änderungen im Anschluss an die Ligandenbindung nachgewiesen werden [Hantgan et al., 1999] [Humphries et al., 2003]. Für die Aktivierung wurden ausgehend von verschiedenen experimentellen Ansätzen zwei Modelle vorgeschlagen. Beide Modelle stimmen darin überein, dass eine scherenförmige Bewegung erfolgt; sie unterscheiden sich aber in der Lage des Gelenks der „Schere“. Dem ersten Modell zufolge liegt das Gelenk in der Membran-Region und die Kopfgruppen dissoziieren nach der Ligandenbindung. Das zweite Modell, das Klappmesser-Modell, postuliert, dass das Scherengelenk nahe der Integrin-Kopfgruppen lokalisiert ist (Abb. 5). Dadurch bleiben die Kopfgruppen assoziiert [Gottschalk & Kessler, 2004b]. Kürzlich wurde das zweite Modell verfeinert, indem die Röntgenstruktur und zusätzliche NMR-Studien der Stelzen-Region einbezogen wurden.

Bei den Stelzen-Regionen handelt es sich um zwei lineare Regionen, auch als „Stalk“-Regionen bekannt, die sich in den extrazellulären Bereichen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Integrin-Untereinheiten befinden [Weisel et al., 1992] [Xiong et al., 2001]. Jetzt wird eine Kombination aus einer scherenähnlichen Bewegung und dem Öffnen der geknickten Integrin-Struktur vorgeschlagen. Dabei richten sich beide Integrin-Untereinheiten auf, um mit der extrazellulären Matrix in Kontakt zu treten [Beglova et al., 2002] (Abb. 5).



### Aufbau und Funktion der fokalen Adhäsionen:

Die Ausbildung der fokalen Adhäsionen ist hauptsächlich durch Integrine bedingt. Integrine können sich dabei jedoch auch mit anderen transmembranären Proteinen verbinden und so ein unterschiedliches Verhalten der Zelle auslösen. So ist der Komplex  $\alpha3\beta1$ -Integrin-CD151 zum Beispiel für die Regulierung der Beweglichkeit zuständig.

Zu den fokalen Proteinen gehören Protein-Kinasen wie FAK und ILK (Integrin-linked-Kinase) und Signalmoleküle wie Src, p130cas [Fishman et al., 1998] [Geiger et al., 2001].

Fokale Adhäsionen stabilisieren die Aktin-Mikrofilamente und sind an morphogenetischen Zelländerungen wie Spreiten, Bildung von Filopodien und Lamellipodien beteiligt [Liu et al., 2000] [Schoenwaelder & Burridge, 1999a] [Schoenwaelder & Burridge, 1999b]. Eine weitere Rolle der fokalen Adhäsionen besteht darin, die Boten, welche die Signale weiterleiten, zu konzentrieren und in den Zellkern zu leiten [van der Flier & Sonnenberg, 2001] [Giancotti, 1997] [Boudreau & Jones, 1999].

In neuronalen Zellen ist eine weitere Form der fokalen Adhäsionen charakterisiert worden, die Punkt-Kontakte (Point-Contacts) [Arregui et al., 1994]. Es handelt sich hierbei um kleine Integrin-abhängige Zell-Matrix-Kontakte, die sich in Form und Zelloberflächenverteilung von den klassischen fokalen Adhäsionen unterscheiden [Tawil et al., 1994], während die Punkt-Kontakte auf hoch-motilen Zellen präsent und für eine kurze Zell-Matrix-Bindung verantwortlich sind [Renaudin et al., 1999], vermitteln fokale Adhäsionen starke Zell-Matrix-Anheftungen. Somit reduzieren sie die Zell-Migration [Luna & Hitt, 1992].

#### **1.2.4 Integrin-vermittelte Signaltransduktion**

Integrine können zusätzlich zu ihrer adhäsiven Funktion intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden aktivieren. So wird Integrin-abhängig die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration erhöht, Tyrosin- und Serin/Threonin-Phosphorylierungen induziert, der Inositollipid-Metabolismus beeinflusst und die Aktivität der Familie der kleinen GTPasen moduliert [Giancotti & Ruoslahti, 1999] [Danen & Yamada, 2001] [Schwartz, 2001] [Arthur et al., 2002].

Integrin-abhängige-Signalwege können durch unterschiedliche Mechanismen induziert werden. Zum einen können durch einen Rezeptor-Crosstalk zwischen Wachstumsfaktoren und Integrinen parallele Wege geleitet werden, die in die Phosphorylierung von Downstream-Signalproteinen münden.

Integrine und Wachstumsfaktoren können unabhängig voneinander zu einer transienten, leichten Aktivierung von ERK führen. Die Kombination beider Wege führt zu einer Verstärkung des Signals [Chen et al., 1996] [Renshaw et al., 1997] und verstärkt die Raf-, ein Mitglied der MAPKKK, Kinase-Kinase- oder die MEK- Aktivierung. Nach der Aktivierung dieser Signalkaskade leitet ERK2 das Signal über die MAPK weiter.

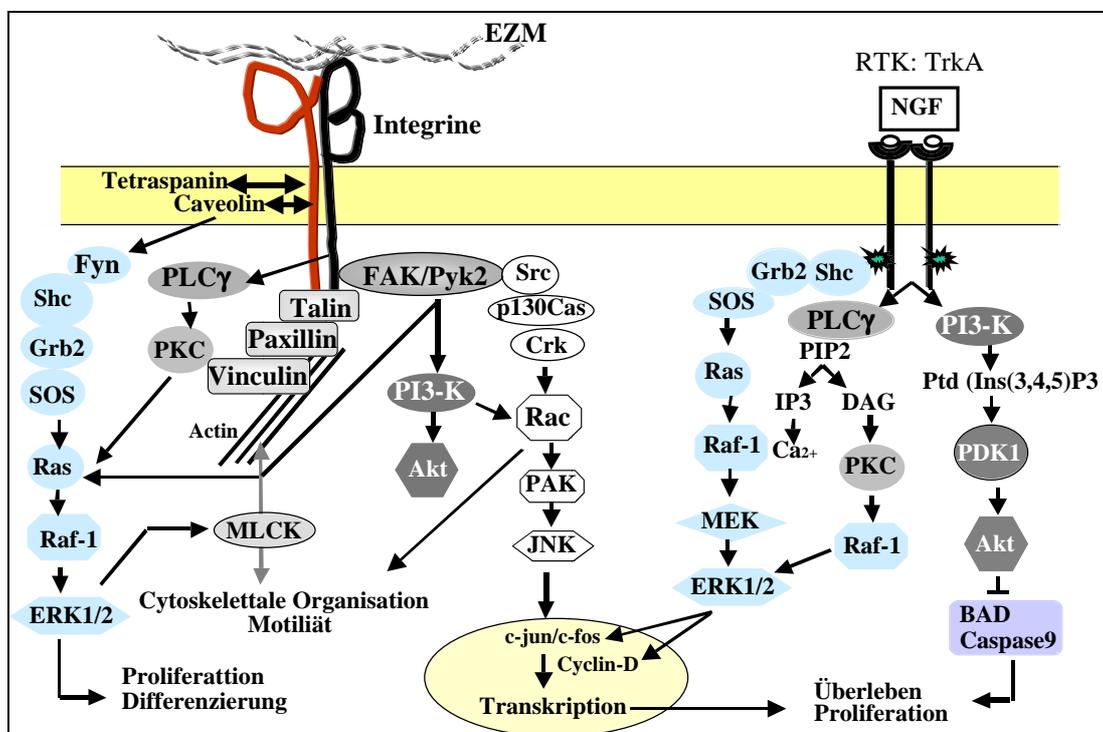
Aktivierte ERKs phosphorylieren in der Zelle entweder verschiedene cytoplasmatische Substrate oder werden in den Zellkern transloziert, wo sie Transkriptionsfaktoren phosphorylieren (Abb. 6).

In PC12-Zellen (Pheochromocytom-Zellen der Ratte) ist ein solcher Crosstalk zwischen dem NGF- (Nerven-Wachstumsfaktor) Rezeptor und den Integrinen beschrieben [Danker et al., 2001]. NGF, das zur Familie der Neutrophine gehört, bindet spezifisch an den auf PC12-Zellen exprimierten TrkA-Rezeptor (Tropomyosin-Rezeptor-Kinase A) und fördert das Neuritenwachstum in diesen Zellen. Die Bindung von NGF an TrkA führt zur Dimerisierung des Rezeptors und zu dessen Autophosphorylierung der cytoplasmatischen Domäne [Jing et al., 1992] [Kaplan et al., 1991a] [Kaplan et al., 1991b]. Anschließend werden cytosolische Proteine wie Shc, PLC $\gamma$  (Phospholipase  $\gamma$ ) und PI3-Kinase (Phosphoinositol 3-Kinase) zum TrkA-Rezeptor rekrutiert [Dikic et al., 1995] [Obermeier et al., 1993] [Obermeier et al., 1994]. Die Rekrutierung von SOS führt zur Aktivierung des ERK/MAPK-Signalwegs, einer Serin-Threonin-Kinase-Kaskade [Schlaepfer et al., 1994]. Die Src-Homologie-Domäne 2 (SH2) des Shc-Proteins dient als Adapter-Protein, welches zuerst an TrkA-Rezeptor bindet und dann an das Adapter-Protein Grb2, an SOS sowie an Ras-GEF (Abb. 6). Dieser Signalweg wird von TrkA und von Integrinen vermittelt. Bei den Integrinen koppelt die FAK über SOS an den ERK/MAPK-Signalweg. Die erste gemeinsame Komponente in der Signaltransduktion von Integrinen und TrkA ist PLC $\gamma$ .

PLC  $\gamma$  bindet an TrkA über die SH2-Domäne und katalysiert die Bildung von DAG (Diacylglycerol) und IP3 (Inositoltrisphosphate). IP3 vermittelt einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem endoplasmatischen Retikulum, während DAG die PKC (Protein-Kinase C) aktiviert (Abb. 6).

Zum anderen stellt die zweite kollektive Komponente die PI3-Kinase dar. PI3-Kinase wird vom TrkA selbst aktiviert oder durch Integrine über FAK/Pyk2-Kinasen. Dies führt zur PKB/Akt-Stimulierung, was das Überleben der Zellen fördert [Giancotti & Ruoslahti, 1999] (Abb. 6). Der zweite Mechanismus zur Aktivierung Integrin-abhängige Signale erfolgt durch Clustern der Integrine, was wiederum zur Reorganisation des Cytoskeletts und zum Aufbau der fokalen Adhäsionen zur Folge hat. Der Mechanismus der Integrin-abhängigen Signaltransduktion kann FAK-abhängig sowie FAK-unabhängig verlaufen. Der Integrin-stimulierte FAK-abhängige Signalweg beginnt mit der Oligomerisierung der Integrine, was zur Rekrutierung und Dimerisierung der assoziierten FAK führt [Chen et al., 1994]. Die Aktivierung von FAK führt zu deren Autophosphorylierung an Tyr<sup>397</sup> und bildet somit eine Bindungsstelle für Familie der Src-Kinasen und phosphorylieren FAK an weiteren Tyrosinresten. Dadurch entstehen Bindungsstellen für SH2-Domänen-tragende Proteine wie das Adapter-Protein Grb2. Dieses koppelt FAK über SOS, ein Ras-GEF, an den ERK/MAPK-Signalweg. Der FAK-Src-p130cas-Komplex phosphoryliert und stellt über die Adaptern Crk und Nrk [Richardson & Parsons, 1996] [Schlaepfer et al., 1997] eine Verbindung zum JNK/MAPK-Weg her [Dolfi et al., 1998]. Die aktivierte JNK transloziert in den Zellkern und phosphoryliert dort Transkriptionsfaktoren wie c-Jun, was mit c-Fos interagiert und den AP-1-Transkriptionsfaktor-Komplex bildet, der die Gene, die für die Zellproliferation von Bedeutung sind, reguliert [Treisman et al., 1998]. Die FAK-induzierten Migrationsprozesse können durch Phosphatasen wie PTEN (Phosphaditylinositol-3,4,5-trisphosphat-3-Phosphatase) oder PTP1B (Protein-Tyrosin-Phosphatase-1 B) reguliert werden [Liu et al., 1998] [Tamura et al., 1998], potentielle Substrate für den FAK/Src-Komplex sind Tensin und Paxillin, die ebenfalls Integrin-abhängig phosphoryliert werden und dadurch eine Cytoskelett-Reorganisation bewirken können [Hildebrand et al., 1996] (Abb. 9).

Einen FAK-unabhängigen Mechanismus der MAPK-Aktivierung verläuft über die Assoziation des transmembranären Teils der  $\alpha$ -Untereinheiten einiger Integrine wie  $\alpha6\beta4$ ,  $\alpha1\beta1$ ,  $\alpha5\beta1$  und  $\alpha v\beta3$  mit dem kleinen Membran-Protein Caveolin. Dadurch werden Fyn und Shc zu den fokalen Adhäsionen rekrutiert und letzteres phosphoryliert [Wary et al., 1996] [Wary et al., 1998]. Obwohl Caveolin auch mit anderen  $\alpha$ -Integrin-Untereinheiten ( $\alpha2$ ,  $\alpha3$ ) assoziiert, können diese Shc nicht rekrutieren. Die Assoziation mit Shc aktiviert den Ras/ERK-Signalweg, die Transkription des Fos-Serum-Response-Element (SRE) und induziert den Eintritt der Zellen in die G1-Phase des Zellzyklus in Anwesenheit von Wachstumsfaktoren. Integrine, die nicht an Shc gekoppelt sind, aktivieren die SRE-abhängige Transkription nicht und führen trotz mitogener Stimuli zur Zellzyklus-Arretierung [Wary et al., 1996].



**Abb. 6: Integrin-vermittelte Signaltransduktion und Crosstalk mit Wachstumsfaktor-Rezeptoren (RTKs)** (verändert nach [Giancotti & Ruoslahti, 1999] [Klesse & Parada, 1999]). Der Integrin-abhängige Signalweg moduliert die Aktivität von FAK und Shc und reguliert somit Zellzyklus und Proliferation. Weiterhin kontrollieren Integrine die Zelladhäsion und Proliferation über die Aktivierung von Caveolin, Fyn, Shc und Grb2, was zur Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade führt. Der RTK-abhängige Signalweg: Die Phosphorylierung der RTK wie TrkA durch die Bindung an NGF moduliert. Zum einen die Aktivierung der PI3-Kinase und Akt, das zum Überleben und zur Zellproliferation führt, zum Anderen wird der Shc/Grb2/SOS-Signalweg aktiviert, der in Ras-GTP und Raf die MAP-Kinase-Kaskade übergeht und zur Zelldifferenzierung beiträgt. Gemeinsame Signalwege zwischen den Integrinen und RTKs stellen die PI3-Kinase und die PLC $\gamma$  dar. Aktivierte PI3-Kinase stimuliert Akt durch Inhibition der proapoptotischen Proteine; BAD und Caspase9, was das Überleben der Zellen fördert. Verwendete Abkürzungen: Raf (Mitglied der Rho-GTPasen). ERK (Extracellular-Signal-Regulated-Kinase) SOS (Son-of-Sevenless), Grb2 (Growth-Factor-Receptor-Bound-Protein 2) JNK (JUN-N-Terminal-Kinase), IP3 (Inositoltrisphosphat), MAPK (Mitogen-Activated-Protein-Kinase), PLC $\gamma$  (Phospholipase C $\gamma$ ) und DAG (Diacylglycerol).

### 1.2.5. Bedeutung kleiner GTPasen bei Integrin-abhängigen cytoskelettalen Organisation

Die Organisation des Aktin-Cytoskeletts wird ebenfalls durch Integrine reguliert, die die Aktivität der Familie der Rho-GTPasen moduliert. Nachdem die Zellen Kontakt mit der extrazellulären Matrix aufgenommen haben, bilden sie Filopodien.

Die Integrine sind dann in den Spitzen der Filopodien konzentriert, wo sie feste Bindungen mit der extrazellulären Matrix eingehen und fokale Adhäsionen bilden. Integrine und Rezeptoren für lösliche Mitogene wie LPA (Lysophosphatidsäure) oder Wachstumsfaktoren regulieren das Spreiten und die Migration durch Aktivierung der Proteine der Rho-Familie [Keely et al., 1997] [Shaw et al., 1997] [Clark et al., 1998] [Price et al., 1998].

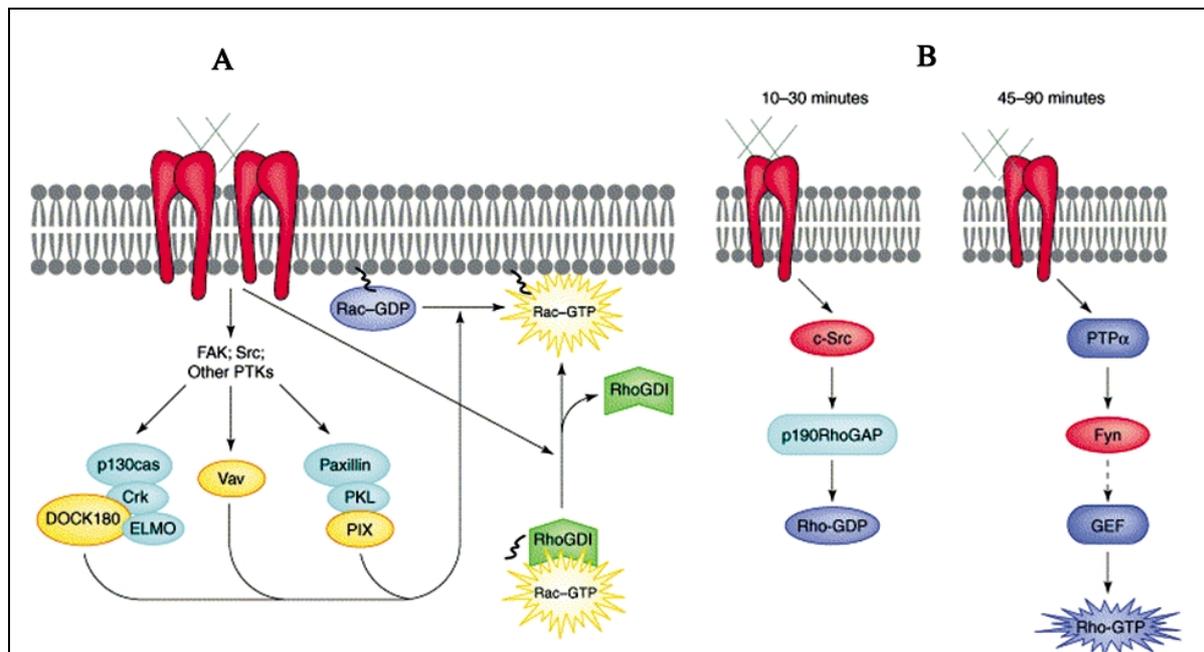
Diese kleinen GTP-bindenden Proteine sind in GDP-gebundener Form inaktiv und werden durch GDP/GTP-Austausch aktiviert. Reguliert werden die GTPasen der Rho-Familie durch zwei Gruppen interagierender Proteine, die als Nukleotid-Austausch-Faktoren, (GEFs) oder Nukleotid-Dissoziations-Faktoren (GDFs) bezeichnet werden. Diese beschleunigen die Freisetzung von GDP und erleichtern die Bindung von GTP.

Die Superfamilie der kleinen GTPasen kann in vier Subfamilien unterteilt werden: Ras, Rho, Rab und Arf. Alle sind sich in ihrer Funktion ähnlich [Ridley & Hall, 1992c]. Die Ras-Proteine sind wichtige Komponenten der Rezeptor-vermittelten Signaltransduktion und stimulieren die Proliferation und die Differenzierung [Hall et al., 1990] [Downward, 1990], während Mitglieder der Rab- und Raf-Superfamilie den Transport von Vesikeln zwischen den intrazellulären Kompartimenten regulieren [Balch, 1990] [Serafini et al., 1991].

Die Rho-Superfamilie beinhaltet drei hoch verwandte Proteine: RhoA, RhoB und RhoC, außerdem zwei Rac Proteine (Rac1 und Rac2) und Cdc42 [Hall et al., 1990] [Shinjo et al., 1990]. Die Aktivierung von RhoA führt in Fibroblasten zum Aufbau der Spannungsfasern und der fokalen Adhäsionen [Ridley & Hall, 1992]. Die Blockierung des RhoA-Proteins durch die Exoenzyme C3-Transferase (*Clostridium Botulinum*), die zur ADP-Ribosylierung von RhoA und dessen Inaktivierung führt, hat den Verlust der Aktin-Spannungsfasern zur Folge [Chardin et al., 1989].

Die funktionelle Bedeutung der anderen Mitglieder der Rho-Familie bei der Cytoskelett-Regulation ist gut untersucht. So ist Rac1 an der Bildung von Lamellipodien von sogenannten „membrane ruffles“ [Ridley & Hall, 1992c] [Ridley & Hall, 1992b] [Ridley & Hall, 1992a] und am Aufbau von kleinen fokalen Komplexen beteiligt [Nobes & Hall, 1995] [Ren et al., 1996] (Abb. 7 A). Cdc42, das dritte Mitglied der Rho-GTPasen reguliert die Bildung von Filopodien [Nobes & Hall, 1995].

Die Integrin-vermittelte Regulation der Rho-GTPasen durchläuft zwei Phasen: Während der initialen Adhäsionsphase werden Rac1 und Cdc42 aktiviert, dies führt zur Bildung von Filopodien und zur Aktin-Polymerisierung. Hingegen werden in der späteren Adhäsionsphase durch die Aktivierung von RhoA Spannungsfasern in der Zelle aufgebaut, was wiederum die Kontraktilität und die innere Spannung erhöht. Diese Wege verlaufen generell antagonistisch und biphasisch (Abb. 7 B). Rac1 und RhoA stehen in neuronalen Zellen in gegenseitigen Wechselwirkungen. Rac1 ist typisch für die Kontrolle der Filopodien, Bildung von Lamellipodien, „membrane-ruffles“ [Katoh et al., 1998] und für die Neuritenbildung [Altun-Gultekin et al., 1998]. Die Aktivierung von RhoA führt in neuronalen Zellen zum Neuriten-Kollaps bzw. zur Neuriten-Retraktion [Gebbink et al., 1997] [Katoh et al., 1998] [Kozma et al., 1997] [Sarnier et al., 2000].



**Abb. 7 A: Integrin-vermittelte Aktivierung von Rac1 und Rho** (verändert nach [DeMali et al., 2003]). Aktivierung der Integrine führt zur Aktivierung der Tyrosin-Kinasen FAK, Src und zum Aktivieren von Rac1. FAK, Src aktivieren auch Vav (was zur Familie der Rho-GEFs gehört), und Adapter-Proteine wie Paxillin, PKL (Protein-Kinase C-Like-1) und PIX (PAK-InterAktung-Exchange-Factor), oder p130Cas, Crk und ELMO (Enguflment and Cell motility), die an GEFs (Guanine-Nukleotide-Exchange-Factors) binden, PIX oder DOCK 180 (180 kDa Protein Downstream von Crk) überführen Rac1-GDP in Rac1-GTP, die aktive Form von Rac1. Integrine vermitteln die Translokation von Rac1-GTP zur Plasmamembran.

**B: Rolle der Src-Familie in der Inhibition und Reaktivierung von Rho:** Während der initialen Integrin-vermittelten Adhäsion (in den ersten 10-30 min) ist die Aktivität von Rho kurzzeitig unterdrückt. Die c-Src-abhängige Phosphorylierung führt zur Aktivierung von p190Rho-GAP, was zur Hydrolyse von GTP-Rho zu GDP-Rho führt. Hingegen wird Rho in der späteren Adhäsionsphase (45-90 min) wieder reaktiviert als Folge der Aktivierung von Fyn durch PTPα (Protein-Tyrosine-Phosphatase α).

### 1.2.5.1. Integrin-abhängige Regulation von Rac1

Die Integrin-abhängige Rac1-Aktivierung fördert die Bildung des Proteinkomplexes p130Cas/Paxillin/FAK. Die Tyrosin-Phosphorylierung von p130cas führt zur Bildung des Komplexes Crk, ELMO und DOCK180 [Vuori et al., 1996] [Cary et al., 1998]. Ein weiterer Proteinkomplex assoziiert mit Paxillin [Turner, 2000], PKL (Protein-Kinase C-Like-1) und PAX (PAK-Interacting-Exchange-Factor, auch als Rac1-GEF bekannt) (Abb. 7 A).

Aktives Rac1 bindet Downstream-Effektoren wie PAK (p21-Activated-Protein-Kinase). PAK hemmt die Bildung der Spannungsfasern und der fokalen Adhäsionen durch Phosphorylierung und Inaktivierung der MLCK (Myosin-Light-Chain-Kinase) und der MHC (Myosin-Heavy-Chain) [van Leeuwen et al., 1999].

Hingegen führt die Aktivierung der LIMK (LIM-Kinase) durch PAK zur Phosphorylierung somit zur Inaktivierung von Cofilin, einem Aktin-bindenden Protein, das die Aktin-Depolymerisierung und den Aktin-Turnover kontrolliert (Abb. 8). Filamin ist ebenfalls ein Aktin-bindendes Protein und stellt ein weiteres Substrat der PAK dar, bindet an Rac1, RhoA und Cdc42 und ist in den „membran-ruffles“ angereichert, wo es den Aufbau der Lamellipodien moduliert. Ferner kolokalisiert PAK mit F-Aktin und stabilisiert das Aktin-Netzwerk [Vadlamudi et al., 2002]. Ein weiterer Signalweg, bei dem Integrine in die Aktin-Polymerisierung eingreifen, ist die Bildung des Arp2/3- (Aktin-Related-Protein-Complex 2/3) WASP- (Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein) Komplexes [Higgs & Pollard, 1999]. WASP wird nach Bindung an Cdc42 oder an das Adapter-Protein Nck aktiviert. Die Bindung von Nck an Integrine wird durch PINCH und ILK vermittelt, was schließlich zur Bildung der Lamellipodien führt. [Burridge & Wennerberg, 2004] (Abb. 8).

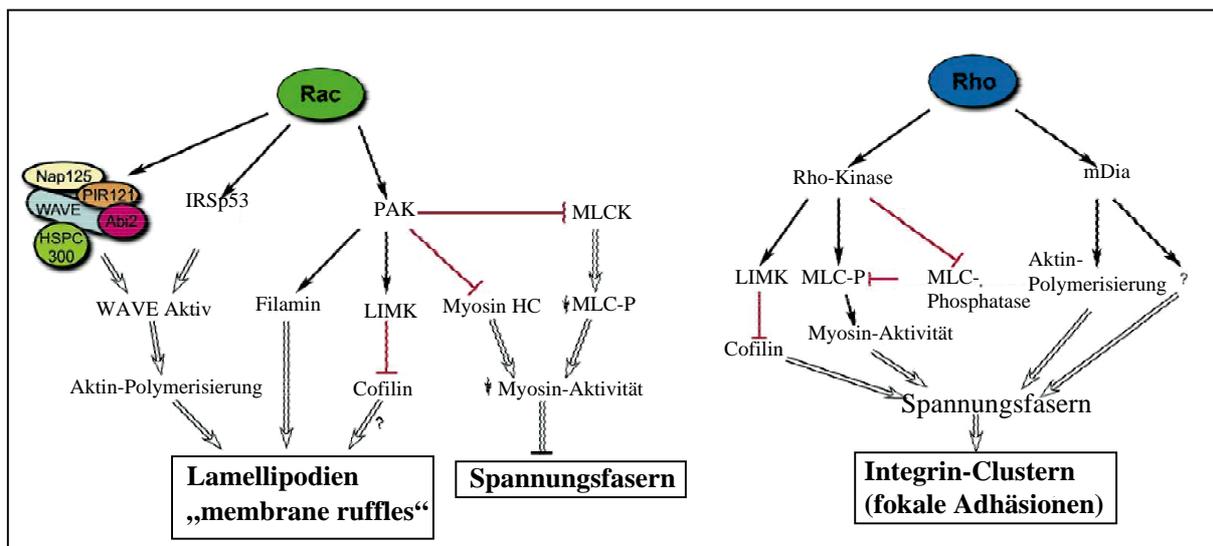


Abb. 8 : Rac1- und Rho-vermittelte Signalwege (verändert nach [Burridge & Wennerberg, 2004]).

**Der Rac1-Signalweg** leitet die Bildung von Lamellipodien und „membran-ruffles“ durch: 1- Wechselwirkung von Rac1 mit PAK (p21-Activated-Protein-Kinase), das entweder die LIMK aktiviert und inaktiviert somit bindende Cofilin 2- durch Bindung an Filaminin 3- durch den Aufbau von Proteinkomplexen wie WAVE/ HSPC300/PIR121/Abl2. Der inhibitorische Signalweg, der zum Verlust der Spannungsfasern und der fokalen Adhäsionen führt, verläuft durch die Phosphorylierung und Inaktivierung der MLCK (Myosin-Light-Chain-Kinase) und MHC (Myosin-Havy-Chain).

**Der RhoA-Signalweg** wird durch die Bindung von Rho an Downstream-Effektoren reguliert. Einerseits bindet RhoA an mDia (Mammalian Homolog of Diaphanous), das in der Aktin-Polymerisierung involviert ist, andererseits interagiert es mit ROK $\alpha$  (RhoA-Binding-Kinase), die die LIMK (LIM-Kinase) aktiviert und Cofilin inaktiviert. ROK $\alpha$  stimuliert in einem weiteren Weg MLC-P, so dass es zur Inaktivierung der MLC-Phosphatase kommt, was die Myosin-Aktivität erhöht.

Verwendete Abkürzungen: PIR121 (p53 Inducible-Protein), Abl2 (Tyrosine-Protein-Kinase Abl2), Nap (Nck-associated Protein-1) und PINCH (Particular-Interesting-New-Cys-His-Protein).

### 1.2.5.2. Integrin-abhängige Regulation von RhoA

Im Gegensatz zu Rac1 führt die Aktivierung von RhoA zum Aufbau der Spannungsfasern und der fokalen Adhäsionen durch die Stimulierung der Kontraktilität des Myosins. Rho induziert die Phosphorylierung der MLC durch Inaktivierung der MLC-Phosphatase über die Aktivierung einer seiner Downstream-Effektoren ROK $\alpha$  [Chrzanowska-Wodnicka & Burridge, 1996]. Ein weiterer Rho-Effektor ist mDia [Watanabe et al., 1999].

Die Wechselwirkung zwischen mDia und Rho fördert die Bildung dünner Spannungsfasern, die weniger gebündelt sind als die Spannungsfasern, die durch überexprimiertes RhoA oder konstitutiv aktive ROK $\alpha$  gebildet werden [Watanabe et al., 1999].

ROK $\alpha$  aktiviert die LIMK, die das Aktin-bindende Protein Cofilin phosphoryliert und inaktiviert. Dieser Prozess stabilisiert die Aktin-Filamente [Burridge & Wennerberg, 2004] (Abb. 8). Aktivierung von PIP2 (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat) erhöht die intrazelluläre Pi4,5-P2-Konzentration, was die Dissoziation Aktin-assoziierten Proteine Profilin und Gelsolin und führt somit zum Aufbau der Spannungsfasern (Abb. 8).

### 1.2.6. Bedeutung der Integrine bei physiologischen Prozessen

Integrine sind als multifunktionelle Adhäsionsrezeptoren noch bei der Regulierung anderer Vorgänge, wie Zelladhäsion, Spreiten, Migration, Differenzierung, Überleben/Apoptose und Zellzyklus-Progression im Spiel [Hynes, 2002b] [Howe & Juliano, 1998]. Obwohl sie hauptsächlich die Anbindung an die EZM vermitteln, können einige Integrine auch eine Zell/Zell-Bindung eingehen. Integrine können weiterhin die extrazelluläre Matrix organisieren und kontrollieren die Fibrillogenese einiger extrazellulärer Matrixproteine wie Fibronectin [Geiger et al., 2001] [Geiger & Bershadsky, 2002]. Untersuchungen an Integrin-knockout-Mäusen haben gezeigt, dass Integrine für den Aufbau und die Aufrechterhaltung zahlreiche Gewebe, wie der Haut, der Niere und des Gehirns, eine bedeutende Rolle spielen.

Laminin-Rezeptoren, wie  $\alpha3\beta1$ - und  $\alpha6\beta1$ -Integrine, sind jeweils wichtig für die Bildung des cerebralen Cortex.

In  $\alpha 6$ -Integrin-knock-out-Mäusen ist die kortikale Basalmembran zerstört [Georges-Labouesse et al., 1998]. Die Phenotypen einiger Integrin-knock-out-Mäuse sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Integrin-Untereinheiten	Phänotyp	Referenzen
$\alpha 1$	Defekte in der Entwicklung und reduzierte Tumor-Vaskularisation	[Gardner et al., 1996] [Pozzi et al., 2000]
$\alpha 3$	Perinatal letal, Defekte in der Nieren-, Lungen- und Hautentwicklung, Defekte in der Lamination des Neokortex	[Kreidberg, 1996] [DiPersio et al., 1997] [Miosge et al., 1999]
$\alpha 4$	Embryonal letal, Defekte in der Plazenta- und Herzentwicklung	[Dowling et al., 1996] [van der Neut et al., 1996]
$\alpha 5$	Embryonal letal, Defekte in der Mesoderm-Bildung	[Yang et al., 1993] [Goh et al., 1997] [Taverna et al., 1998]
$\alpha 6$	Perinatal letal, Hautablösung	[Georges-Labouesse et al., 1996]
$\alpha 7$	Lebensfähig, Entwicklung von Muskeldystrophien	[Mayer et al., 1997] [Saher & Hildt, 1999]
$\alpha 8$	Perinatal letal, Missbildung der Niere	[Muller et al., 1997] [Littlewood Evans & Muller, 2000]
$\alpha v$	Perinatal letal, Rupturen der Gefäße	[Bader et al., 1998] [McCarty et al., 2002]
$\beta 1$	Perinatal letal	[Fassler & Meyer, 1995] [Stephens et al., 1995] [Brakebusch et al., 1997]
konditioneller $\beta 1$ -knockout	Dysmyelierung der Schwann-Zellen, gestörte axonale Interaktionen und Segregation der Axone	[Feltri et al., 2002]

**Tab. 1: Effekte von Mutationen in Integrin-Genen auf die Mausentwicklung** (verändert nach [Hynes, 2002a])

Integrin-abhängige Adhäsion fördert die Genexpression. So können einerseits einige Immediate-Early Gene wie c-myc und c-fos nach Kontakt mit der extrazellulären Matrix exprimiert werden, andererseits wird die Cyclin-D1-Expression durch Integrin-abhängige Signalwege reguliert [Albanese et al., 1995] [Zhu et al., 1996] (Abb.-9). Zwei Hypothesen existieren betreffend den Mechanismus der Integrin-induzierten Genexpression. Der ersten zufolge verändert eine durch Integrinbesetzung ausgelöste Umstrukturierung des Cytoskeletts die Zellmorphologie und innere Spannung stark. Dies könnte sich im Kern auf Histone und Chromatinstruktur auswirken, so dass die Bindung von Transkriptionsfaktoren erleichtert wird.

Die zweite misst die eigentlichen Signalkaskaden, die durch Integrine initiiert werden, eine größere Bedeutung bei, da auch eine Integrin-abhängige Genexpression ohne Spreiten induziert werden kann [Boudreau & Jones, 1999] [Danen et al., 1998].

In Fibroblasten, die auf dem extrazellulären Protein Tenascin adhäreren, wird die MAPK-Aktivität induziert und die Proliferation der Zellen eingeleitet.

Dieser Vorgang wird nur durch  $\alpha\beta3$ -Integrin und  $\alpha9\beta1$ -Integrin vermittelt, während die Aktivierung des  $\alpha\beta6$ -Integrins nicht zur Proliferierung führt [Ilic et al., 1997]. Weiterhin ist die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix entscheidend für die Kontrolle der Proliferation.

So proliferieren Myoblasten auf Fibronectin und beenden das Zellwachstum, um in die Differenzierungsphase zu gehen, wenn sie auf Laminin ausplattiert werden, bilden sie Myofibrillen aus [Adams & Watt, 1993].

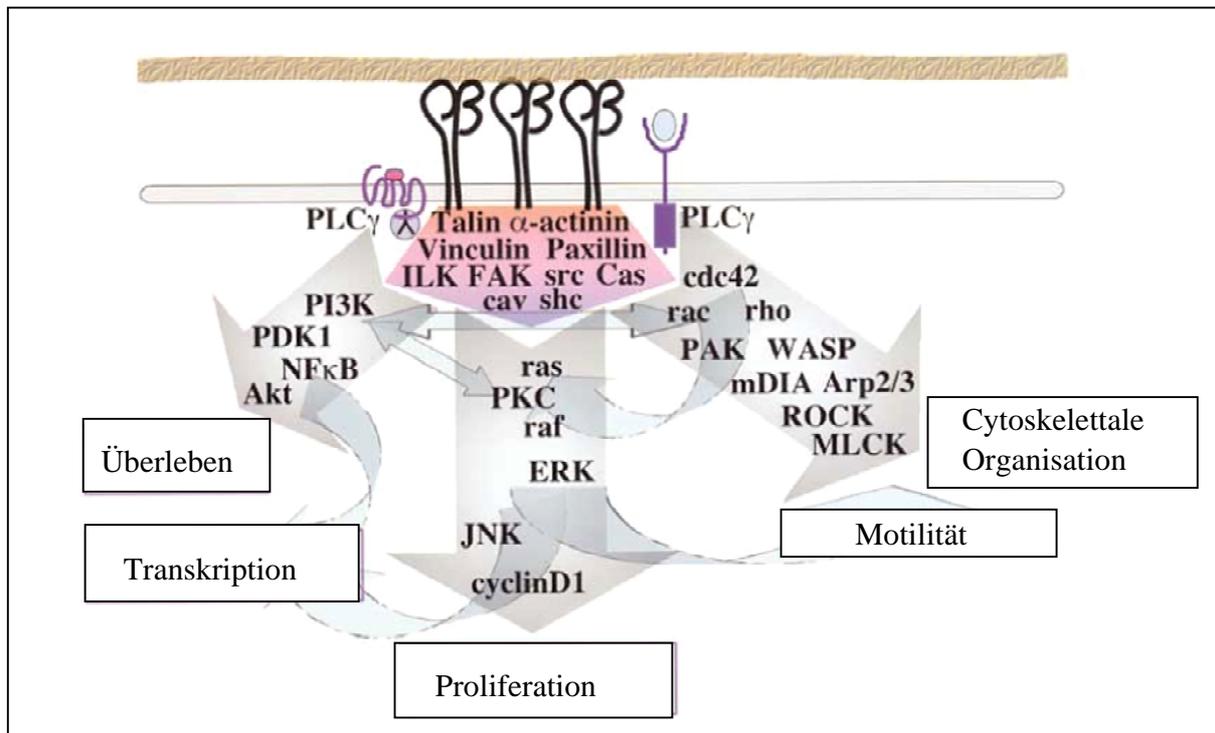
Integrin-vermittelte Zelladhäsion reguliert auch die Genexpression, die zur Differenzierung führt. In vitro-Untersuchungen an Keratinozyten haben gezeigt, dass in Suspension-gehaltene Keratinozyten die  $\beta1$ -Integrin-mRNA herunterregulieren und der  $\beta1$ -Rezeptor nicht auf der Zelloberfläche nachweisbar ist [Hotchin et al., 1995].

Daraus lässt sich schließen, dass die  $\beta1$ -Integrin-Untereinheit die Differenzierung der Keratinozyten inhibiert.

Integrine erhöhen die Überlebensfähigkeit der Zellen in Stress-Situationen, indem sie die Expression und die Aktivität verschiedener Mitglieder der anti-apoptotischen Bcl2-Proteine regulieren und nehmen somit Einfluss auf Menge, Funktion und Lokalisation der anti-apoptotischen Proteine.

Die Integrin-vermittelte Aktivierung der PI3-Kinase führt zur Phosphorylierung von Akt, die wiederum die Transkription der Bcl2-Proteinen induziert [Gauthier et al., 2001] [Leverrier et al., 1999] (Abb. 9). Die Phosphorylierung von Bcl2-Proteinen durch MAP-Kinasen wie ERK1/2 oder JNK schützt die Bcl2-Proteine vor der Ubiquitylierung. Dadurch reichern sich die anti-apoptotischen Bcl2-Homodimeren im Cytosol an, während die Bildung der pro-apoptotischen Heterodimerere Bcl2/Bax unterdrückt wird [Klesse & Parada, 1999], was zum Überleben der Zellen beiträgt [Breitschopf et al., 2000].

In Endothelzellen aktivieren  $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin-Antagonisten die PKA (Proteinkinase-A), die durch das Zerstören der Bildung der Aktin-Spannungsfasern die Zellmigration inhibiert [Kim et al., 2000].



**Abb. 9: Übersichtsschema zur Funktion der Integrine** (verändert nach [Hynes, 2002a]).

Das Clustern von Integrinen führt zur Rekrutierung von Proteinen der fokalen Adhäsionen wie Talin,  $\alpha$ -Aktinin, Vinculin, Paxillin, ILK (Integrin-Linked-Kinase), FAK (Fokal-Adhesion-Kinase), Adapter-Proteine wie src, Cas und Shc. Die Aktivierung der PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase) führt zur Aktivierung von PDK1 (Phosphoinositide-Dependent-Protein-Kinase 1) und Akt und so zum Überleben der Zellen. Die Regulation der MAP-Kinasen ERK1/ERK2- und JNK- (JUN-N-Terminal-Kinase) Aktivitäten durch die PKC (Proteinkinase C) stimuliert die Zellproliferation. Die Aktivierung der kleinen GTPasen wie Rac1, Cdc42 und Rho durch ROK $\alpha$  (RhoA-Binding-Kinase $\alpha$ ) und MLCK (Myosin-Light-Chain-Kinase) kontrolliert die Organisation des Cytoskeletts und die Zellmotilität.

Integrine unterstützen weiterhin durch Adhäsion und Proliferation die neuronale Entwicklung [Paulus & Jellinger, 1993] [Paulus et al., 1993]. Im zentralen Nervensystem (ZNS) werden Integrine der  $\beta 1$ - und der  $\alpha v$ -Integrin-Klasse auf Neuronen, Gliazellen und Endothelzellen exprimiert [Jones, 1996] [Pinkstaff et al., 1999].

Besonders die  $\beta 1$ -Integrine spielen eine wesentliche Rolle bei der neuronalen Adhäsion und Migration [Graus-Porta et al., 2001]. Integrine nehmen an der Synaptogenese und an der Aufrechterhaltung der synaptischen Strukturen während der Entwicklung des zentralen Nervensystems teil [Benson et al., 2000]. Sie sind auch wichtig für die synaptischen Wechselwirkungen im adulten zentralen Nervensystem [Bahr et al., 1997].

In hippocampalen Schnitten führt die Hemmung der Integrin-vermittelten Adhäsion mit antagonistischen RGD-Peptiden zu einer allmählichen Abnahme der synaptischen Festigkeit [Staubli et al., 1998]. Die Interaktion mit Reelin, einem spezifischen Liganden des  $\alpha3\beta1$ -Integrins und Bestandteil der extrazellulären Matrix des Vorderhirns [Forster et al., 2002], bestimmt die korrekte Positionierung der Neuronen und ist während der Entwicklung des Vorderhirns von Bedeutung.

Interaktion mit den Signalleitungsmolekülen Netrin und Semaphorin kontrollieren Integrin-vermittelte Zelladhäsion und Migration und konvergieren dadurch mit den Signalwegen der axonalen Lenkungsmoleküle [Nakamoto et al., 2004]. Semaphorine sind Signalmoleküle, welche die Ausbildung neuronaler Schaltkreise im Rückenmark von Mäusen während der embryonalen Entwicklung steuern. Semaphorine leiten die periphere sensorische Innervation, beeinflussen die Richtung des axonalen Wachstums durch Attraktion oder Repulsion weiterhin steuern sie die Ausbildung und Entwicklung geordneter kortikaler Projektionen.

### **1.2.7. Rolle der cytoplasmatischen Domänen von Integrinen bei Integrin-abhängigen Prozessen**

Die cytoplasmatischen Domänen der Integrine spielen eine essentielle Rolle bei der bidirektionalen Signaltransduktion. Einerseits sind sie für die Organisation des Cytoskeletts und die Aktivierung von Signalkaskaden notwendig (Outside-in), andererseits modulieren sie die Rezeptoraffinität und damit die Adhäsion und Migration (Inside-out) [Ginsberg et al., 1992] [Hemler et al., 1992]. Mutationen an bestimmten Resten der cytoplasmatischen Domänen von  $\beta3$ -Integrin [O'Toole et al., 1994] oder von  $\beta2$ -Integrin [Hibbs et al., 1991a] führen zum Verlust der adhäsiven Aktivität von CHO-Zellen, während partielle Deletionen des cytoplasmatischen Teils des  $\beta2$ -Integrins [Hibbs et al., 1991b] [Rabb et al., 1993] oder des  $\beta1$ -Integrins [Hayashi et al., 1990] zum kompletten Verlust der Zelladhäsion führt. In primären Mausfibroblasten, die mutierte cytoplasmatische  $\beta1$ -Integrine exprimieren, ist die Proliferation und das Überleben dieser Zellen stark beeinträchtigt [Hirsch et al., 2002]. Die cytoplasmatischen Domänen der Integrine sind notwendig für die Bildung der fokalen Adhäsionen. Die  $\beta1$ -Integrin-Untereinheit bindet fokale Adhäsions-Proteine wie Talin, [Knezevic et al., 1996] [Pfaff et al., 1998]  $\alpha$ -Aktinin [Lewis &

Schwartz, 1995] [Retta et al., 1998] und kortikales Filamin [Pavalko et al., 1998]. Enzyme wie FAK binden direkt an der membranproximalen Seite der  $\beta$ 1-,  $\beta$ 2- und  $\beta$ 3-Integrin-Untereinheiten. Mutationen in diesem Bereich blockieren die Bindung von FAK an den cytoplasmatischen Teil der  $\beta$ 1-Integrin-Untereinheit [Schaller et al., 1995]. Dadurch findet keine Rekrutierung der FAK in den fokalen Adhäsionen statt. Die cytoplasmatischen Domänen von  $\beta$ 1-,  $\beta$ 3-Integrinen sind ausreichend, um kleine GTPasen wie Rac1 zu aktivieren und damit einen Beitrag zur Reorganisation des Cytoskeletts zu leisten [Allison et al., 2002].

Die cytoplasmatischen Domänen der  $\alpha$ -Untereinheiten spielen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Bestimmung der adhäsiven Aktivität. Deletionsmutanten der  $\alpha$ 1-Untereinheit inhibieren die Bindung der cytosolischen Proteine, die für die Bildung der fokalen Adhäsionen und der Tyrosin-Phosphorylierung von Bedeutung sind [Löster et al., 2001].

Die Deletion nach dem konservierten GFFKR-Motif der cytoplasmatischen Domänen von  $\alpha$ 2- [Kawaguchi & Hemler, 1993] [Kassner et al., 1994],  $\alpha$ 4- [Kassner & Hemler, 1993] [Kassner et al., 1994],  $\alpha$ v- [Filardo & Cheresh, 1994] oder  $\alpha$ 6- [Shaw & Mercurio, 1993] Integrinen führt zum Ausfall der Zelladhäsion.

Verschiedene cytosolische Proteine, die an die cytoplasmatische Sequenz von  $\alpha$ -Untereinheiten binden, konnten identifiziert werden. Das F-Aktin interagiert mit der  $\alpha$ 2-Integrin-Untereinheit. Diese Wechselwirkung ist für die Lokalisation in den fokalen Adhäsionen wichtig [Kieffer et al., 1995] und erhöht die Bindung an Kollagen [Chan, 1992 #500].

Calreticulin stellt einen weiteren Interaktionspartner dar und bindet an die membranproximale Sequenz der  $\alpha$ -Integrin-Untereinheiten. Diese Interaktion moduliert die Zelladhäsion und die Signaltransduktion [Leung-Hagesteijn et al., 1994] [Coppolino et al., 1995].

Calreticulin-defiziente-Zellen zeigen eine defekte Integrin-abhängige Zelladhäsion [Coppolino et al., 1997]. Paxillin, ein Adapter-Protein, bindet direkt an den cytoplasmatischen Teil der  $\alpha$ 4-Integrin-Untereinheit [Turner, 2000].

Diese Bindung erhöht die FAK-Phosphorylierung, was zur Regulation der Zellmigration, der cytoskelettalen Organisation und Genexpression beiträgt [Turner et al., 1989]. Ferner wurde das DRAL/FHL2 (Down-Regulated in Rhabdomyosarcoma LIM Protein/Four and a Half LIM Protein 2) identifiziert, das an spezifische Membran-distale Sequenzen der  $\alpha$ 3A-,  $\alpha$ 3B- und

$\alpha7A$ -Integrin-Untereinheiten bindet. Es kann jedoch auch mit verschiedenen  $\beta$ -Integrin-Untereinheiten interagieren. DRAL/FHL2 kolokalisiert mit Integrinen in den fokalen Adhäsionen und leistet einen wichtigen Beitrag zur Integrin-vermittelten Signaltransduktion [Wixler et al., 2000]. Kürzlich wurde gezeigt, dass der  $\alpha3$ - cytoplasmatische Teil notwendig ist für die Rac1-vermittelte Lamellipodien-Bildung von migrierenden Epithelzellen [Choma et al., 2004]. Für die  $\alpha1$ -Integrin-Untereinheit ist eine Interaktion mit der PLC $\gamma$  bekannt [Vossmeier et al., 2002].

Caveolin-1, das ein transmembranäres Adapter-Protein darstellt, bindet ebenfalls an verschiedene  $\alpha$ -Integrin-Untereinheiten, unter anderem auch an die  $\alpha1$ -Untereinheit. Diese Interaktion erleichtert die Lenkung von Integrinen zu Tyrosin-Kinasen wie Fyn oder Yes [Wary et al., 1998].

### 1.2.8. Das $\alpha3\beta1$ -Integrin

$\alpha3\beta1$ -Integrin wurde ursprünglich als Rezeptor für Kollagen-I, und -IV, Laminin, Fibronectin und Entaktin/Nidogen identifiziert [Tomaselli et al., 1988] [Elices et al., 1991] [Dedhar et al., 1992] [Weitzman et al., 1993] [Wu et al., 1995].

In den letzten Jahren wurden auch Laminin-2/4 [Delwel et al., 1994], Laminin-5 [Carter et al., 1991] [Kikkawa et al., 1998], Laminin-8 [Fujiwara et al., 2001], Laminin 10/11 [Kikkawa et al., 1998] Reelin [Dulabon et al., 2000] EntAktin/Nidogen [Dedhar et al., 1992] und Thrombospondin-1 [DeFreitas et al., 1995] als Liganden für das  $\alpha3\beta1$ -Integrin charakterisiert.

$\alpha3\beta1$ -Integrin ist an der Bildung verschiedener Organe beteiligt. Es wird reichlich in der Haut exprimiert, besonders in den Keratinozyten der Epidermis, wo es eine bedeutende Rolle im Aufbau und der Aufrechterhaltung der Basalmembran spielt [Hertle et al., 1991] [DiPersio et al., 1997].

$\alpha3\beta1$ -Integrin-abhängige Prozesse sind für die Aufrechterhaltung der Struktur und Funktion der Haut und der Wundheilung wichtig [Hodivala-Dilke et al., 1998] [Gonzalez-Amaro & Sanchez-Madrid, 1999] [Goldfinger et al., 1999]. Mäuse, die Doppelmutationen in  $\alpha3$ - und  $\alpha6$ - oder  $\beta1$ -Integrin-Untereinheiten aufweisen, sind nicht in der Lage,  $\alpha3\beta1$ - und  $\alpha6\beta4$ -Integrine zu exprimieren und zeigen blasenartige Strukturen in der embryonalen Haut [DiPersio et al., 2000].

Ferner weisen die  $\alpha3$ -Integrin-knockout-Mäuse auf Defekte in der Assemblierung der Basalmembran und eine Reduktion des Spreitens von Keratinozyten auf Laminin-5 hin [DiPersio et al., 1997] [Hodivala-Dilke et al., 1998].

Es werden erhebliche Mengen an  $\alpha3\beta1$ -Integrin in der Niere gefunden. Es ist das prominenteste Integrin der Podocyten der Glomeruli und wird dort mit  $\alpha2\beta1$ - und  $\alpha6\beta1$ -Integrinen koexprimiert [Korhonen et al., 1990]. Weiterhin wird  $\alpha3\beta1$ -Integrin im Gehirn exprimiert [Ivins et al., 1998] [Anton et al., 1999]. Anton et al. konnten zeigen, dass die Organisation der kortikalen Neuronen von  $\alpha3\beta1$ -Integrin-knockout-Mäusen gestört ist.

Es ist auch in den aktiven Zonen der Motoneuronen lokalisiert und kommt in den Nervenenden, besonders in der Nähe der synaptischen Vesikel sehr konzentriert vor.

Es vermittelt die Adhäsion von Wachstumskegeln und Axonen an die basale, synaptische Lamina und wirkt somit an die Bildung und Aufrechterhaltung der aktiven Zonen der Motoneuronen [Cohen et al., 2000].

$\alpha3\beta1$ -Integrin ist außerdem wichtig für die Neuroglia-Erkennung während der neuronalen Migration und spielt damit eine entscheidende Rolle bei der Kortikogenese [DeFreitas et al., 1995] [Anton et al., 1999].  $\alpha3\beta1$ -Integrin spielt eine wichtige Rolle in Zelladhäsion, Migration und der Lamellipodien-Bildung, Strukturen, die bei der Migration von Epithelzellen von Bedeutung sind [Choma et al., 2004].

Unter Verwendung von  $\alpha3\beta1$ -Integrin-defizienter Keratinozyten konnte gezeigt werden, dass die mutierten Zellen in der Lage sind, an die extrazelluläre Matrix zu binden, bevorzugen dabei Liganden anderer Integrine wie Kollagen-I ( $\alpha2\beta1$ ), Laminin-1 ( $\alpha1\beta1$ ) oder Fibronectin ( $\alpha v\beta1$ ), die in diesen Zellen hochreguliert vorliegen [Hodivala-Dilke et al., 1998].

Daraus lässt sich schließen, dass  $\alpha 3\beta 1$ -Integrin auch die Funktion anderer Integrine modulieren kann [Gonzalez-Amaro & Sanchez-Madrid, 1999].  $\alpha 3\beta 1$ -Integrin fungiert als ein dominanter Inhibitor auf Kollagen IV-Rezeptoren ( $\alpha 2\beta 1$ ) in humanen Brust-Karzinom-Zellen, auf Fibronektin- ( $\alpha v\beta 5$ ) Rezeptoren in migrierenden Maus-Keratinocyten [Lichtner et al., 1998] [Ivankovic-Dikic et al., 2000] und auf Laminin- ( $\alpha 6\beta 1$ -Integrin) Rezeptoren in Maus-Keratinocyten [Laplantine et al., 2000].

$\alpha 3\beta 1$ -Integrin besitzt die Eigenschaft, innerhalb der Membran laterale Bindungen einzugehen. Es kann mit der Superfamilie der Tetraspanine (TM4SF) direkt interagieren und deren Funktion modulieren [Berditchevski et al., 1996] [Berditchevski et al., 1997] [Hemler, 1998].

Bei den Tetraspaninen handelt es sich um CD9 [Nakamura et al., 1995] [Hadjiargyrou et al., 1996] [Berditchevski et al., 1996], CD63 [Berditchevski et al., 1996] [Berditchevski et al., 1995] und CD81 [Nakamura et al., 1995] [Berditchevski et al., 1996] [Domanico et al., 1997].

Zusätzlich bildet  $\alpha 3\beta 1$ -Integrin mit CD151 einen Komplex [Yanez-Mo et al., 1998] [Stipp & Hemler, 2000] [Odintsova et al., 2003]. Daraufhin wird die PI4-Kinase aktiviert, was zur Regulation der Zellmigration führt [Yauch et al., 1998].

Anhand von funktionsblockierenden Antikörpern gegen  $\alpha 3\beta 1$ -Integrin oder CD151 konnte gezeigt werden, dass die Migration der Neutrophilen auf Fibronektin reduziert ist.

In neuronalen Zellen führt die Blockierung von CD151 oder CD9 zur Inhibition des Neuritenwachstums auf Laminin-5, aber nicht auf Laminin-1 [Stipp & Hemler, 2000].

$\alpha 3\beta 1$ -Integrin assoziiert in der Membran auch mit uPAR (CD87) (Urokinase-Plaminogen-Activated-Receptor) einem GPI- (Glycosylphosphatidyl-Inositol) gebundenen Oberflächen-Protein [Wei et al., 1999]. uPAR initiiert die proteolytische Spaltung von Integrinen und modifiziert somit deren Funktion [Blasi & Carmeliet, 2002].

Dem  $\alpha 3\beta 1$ -Integrin sind außerdem homophile Bindungen zugeschrieben worden [Sriramarao et al., 1993]. Es ist in den Zell-Zell-Kontakten beobachtet worden, wie es für einige Integrine wie  $\alpha 2\beta 1$ - und  $\alpha 6\beta 1$ -Integrin bekannt ist [Carter et al., 1990] [Kaufmann et al., 1989] [Hynes, 1987] [Symington & Carter, 1995].

### 1.3. Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte die biologische Funktion des  $\alpha3\beta1$ -Integrins insbesondere die Rolle der cytoplasmatischen Domäne der  $\alpha3$ -Untereinheit bei der Zell-Matrix-Adhäsion, der Zell-Proliferation, der neuronalen Differenzierung sowie deren Einfluss auf die Zellmorphologie untersucht werden. Die Untersuchungen zu biologischen Funktionen der cytoplasmatischen Domäne der  $\alpha3$ -Integrin-Untereinheit sollten in einem etablierten Zellsystem stattfinden. Aus diesem Grund wurden PC12-Zellen, die aus einem Nebennierentumor der Ratte gewonnen worden sind und für Untersuchungen zur neuronalen Differenzierung geeignet sind, gewählt.

Zur Klärung der Funktion der cytoplasmatischen  $\alpha3$ -Integrin-Sequenz des  $\alpha3\beta1$ -Integrins sollten chimäre Rezeptoren (IL2R- $\alpha3$ , IL2R) eingesetzt werden. Diese Chimären sollten in PC12-Zellen transient exprimiert werden und dadurch sie einen negativen Einfluss auf das endogene  $\alpha3\beta1$ -Integrin ausüben, indem sie potentielle intrazelluläre Bindungspartner, die normalerweise an das endogene  $\alpha3\beta1$ -Integrin binden, wegfangen und somit die  $\alpha3\beta1$ -Integrin-vermittelten Prozesse stören.

Der Einfluss der Chimären auf die biologische Aktivität des endogenen  $\alpha3\beta1$ -Integrins sollte mit Hilfe von Adhäsions-, Proliferations- und Differenzierungs-Assays untersucht werden. Der Einfluss der Chimären auf das Cytoskelett sollte in der Immunofluoreszenz beobachtet werden. In weiteren Experimenten sollte die Rolle der kleinen GTPasen (Rac1 und RhoA) untersucht werden, indem sowohl dominant negative als auch konstitutiv aktive Rac-cDNA-Konstrukte in PC12-Zellen transfiziert werden sollten.

Ferner sollte die Beteiligung der  $\alpha3$ -cytoplasmatischen Domäne des  $\alpha3\beta1$ -Integrins in der nachgeschalteten Aktivierung der MAP-Kinasen bzw. der ERK1/2 aufgeklärt werden.