

3. Ergebnisse

3.1. Expression von Integrinen und neuronalen Adhäsionsmolekülen in PC12-Zellen

3.1.1. Expression von Integrinen in PC12-Zellen

3.1.1.1. Nachweis der Integrine mittels Westernblot

PC12-Zellen exprimieren β 1-Integrine, hauptsächlich das α 1 β 1-Integrin, aber auch α 3 β 1-Integrin. Die Expression der α 1-, α 3- und β 1-Untereinheiten wurde im Gesamtlisat mittels Westernblot ermittelt. Zum Nachweis der Integrine wurden drei Rattenzelllinien verwendet PC12 (Pheochromocytoma-Zellen), RLF (Rattenlungen-Fibroblasten) und RBE (Rattenhirn-Endothelzellen).

Die β 1-Integrin-Untereinheit von ca. 130 kDa wurde mittels eines anti- β 1-Serums [Loster et al., 1994] in allen drei Zelllinien nachgewiesen (Abb. 1). Die α 1-Integrin-Untereinheit von ca. 190 kDa konnte mittels eines anti- α 1-Integrin-Serums [Löster, 1995 #188] ermittelt werden und war sehr stark in NGF-stimulierten PC12- und in RLF-Zellen exprimiert (Abb. 1). Die α 3-Integrin-Untereinheit von ca. 135 kDa konnte in PC12- sowie in RLF-Zellen mit einem Ratten-spezifischen-Antikörper, der das extrazelluläre Epitop der α 3-Untereinheit erkennt, nachgewiesen werden, hingegen exprimierten RBE-Zellen äußerst schwach α 1- und α 3-Integrin-Untereinheiten (Abb. 1). Die α 6-Integrin-Untereinheit war in PC12- sowie in RLF-Zellen mit einem Ratten-spezifischen-Antikörper, der die cytoplasmatische Domäne von α 6A-Integrin erkennt nicht detektierbar. Der Ratten-spezifische-Antikörper erkennt jedoch die α 6-Integrin-Untereinheiten in RBE-Zellen. (Abb. 1). Alle untersuchten Zelllinien exprimierten keine α v-Integrin-Untereinheit, einen Fibronectin-Rezeptor (150 kD) (Abb. 1).

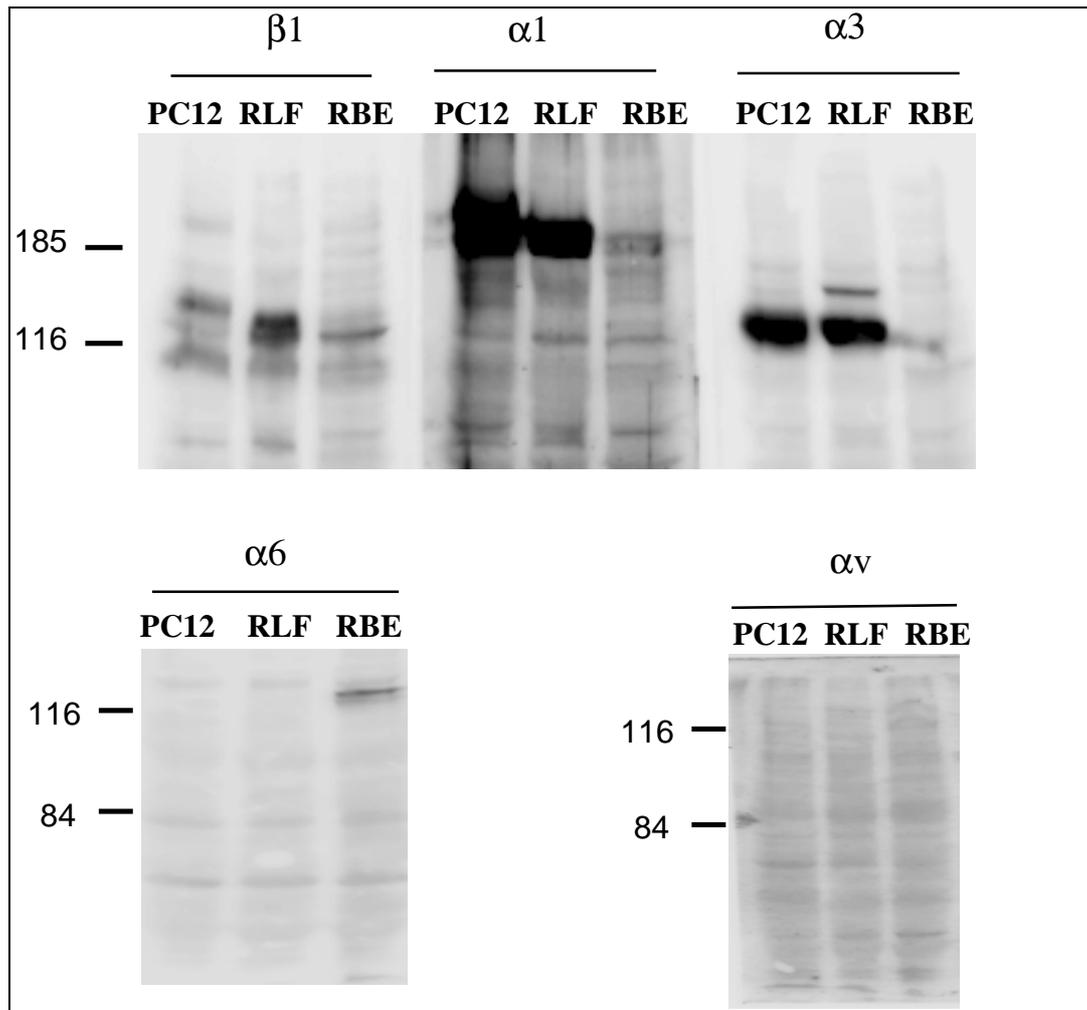


Abb. 1: Nachweis der $\alpha 1$ -, $\alpha 3$ -, $\alpha 6$ -, αv - und $\beta 1$ - in PC12-, RLF- und RBE-Zellen mittels Westernblot. Die Zellen wurden auf Laminin-5-reicher Matrix ausplattiert, ($\varnothing 10$ cm) und mit 100 ng/ml NGF stimuliert und nach 72 h bei $4C^\circ$ lysiert. Es wurden 50 μ g des Gesamtproteins pro Spur auf ein 7%iges SDS-Gel aufgetragen. Die Proteine wurden auf Nitrozellulose geblottet und mit einem anti- $\alpha 1$ -Integrin-Antiserum (As2K5), dem anti- $\beta 1$ -Integrin-Antiserum (As7K4), einem anti- $\alpha 3$ -Integrin-Antikörper (Klon 42) inkubiert. Anti-CD49f ein Rattenspezifischer mAk, wurde für die Detektion von $\alpha 6$ -Integrin verwendet. Gegen die αv -Untereinheit wurde ein mAk anti- αv -Integrin, verwendet.

3.1.1.2. Bestimmung der Integrin-Oberflächen-Expression mittels Durchflusscytometrie

Die Oberflächen-Expression endogener α -Integrin-Untereinheiten ($\alpha 1$ und $\alpha 3$) konnte mittels FACS-Analytik nachgewiesen werden. PC12-Zellen wurden auf Laminin-5-reicher Matrix oder auf Laminin-1-beschichteten Schalen ausgesät und mit 100 ng/ml NGF stimuliert.

Nach 72 h wurden die Zellen von der Platte abgelöst, fixiert und anschließend mit einem geeigneten primären Antikörper gefärbt.

86% der Zellen exprimierten $\alpha 3$ -Integrin auf der Zelloberfläche. 90% der PC12-Zellen exprimierten auf Laminin-5-reicher Matrix und 97% der Zellen auf Laminin-1 das $\alpha 1\beta 1$ -Integrin auf ihrer Zelloberfläche.

Die FACS-Analysen zeigten des weiteren, dass die $\alpha 6$ -Integrin-Untereinheit nur in geringen Mengen auf PC12-Zellen exprimiert wurde (Abb. 2).

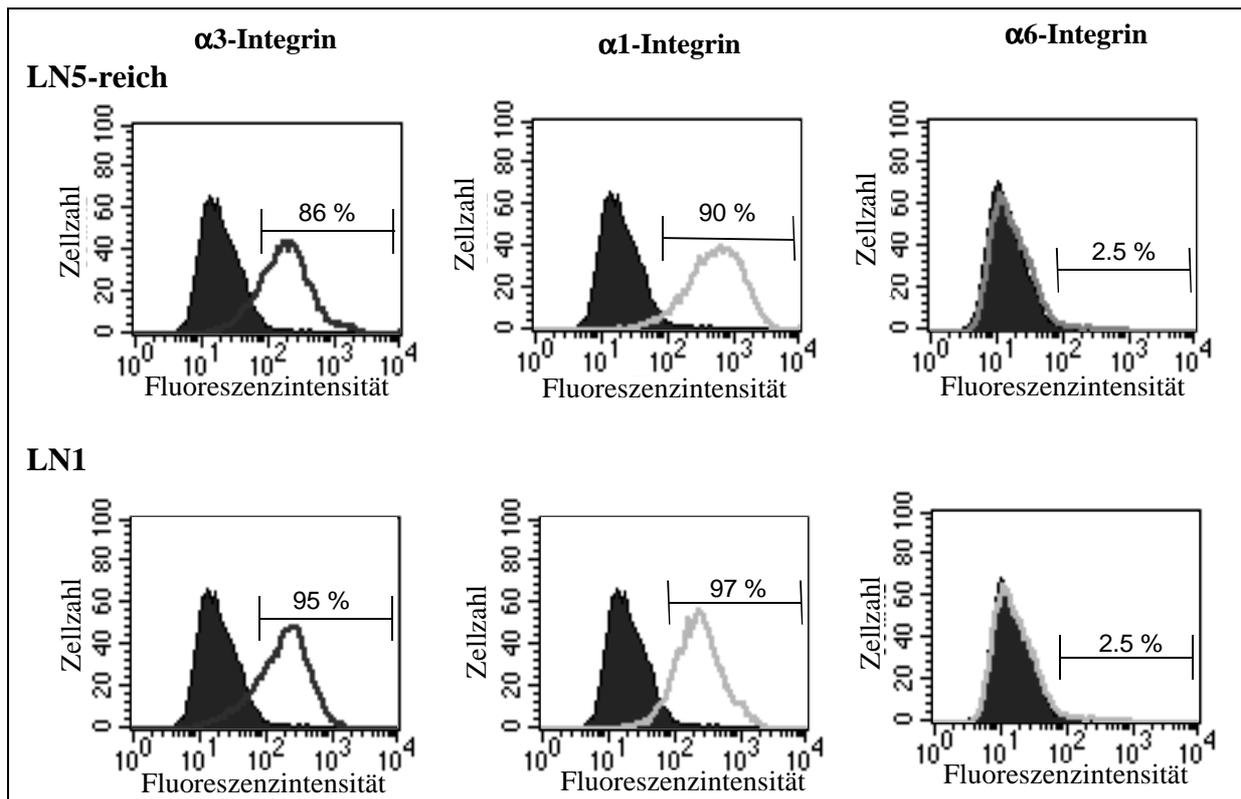


Abb. 2: FACS-Analyse der Oberflächen-Expression der endogenen $\alpha 1$ -, $\alpha 3$ - und $\alpha 6$ -Integrin-Untereinheiten in PC12-Zellen. Die Zellen wurden vor der Messung auf Laminin-1 sowie auf Laminin-5-reicher Matrix ausplattiert und mit NGF stimuliert. Die Zellen wurden nach 72 h fixiert und gefärbt. Für den $\alpha 3$ -Integrin-Nachweis wurde der mAk PIB5, für den $\alpha 1$ -Integrin-Nachweis der mAk 33.4 und für den Nachweis von $\alpha 6$ -Integrin der mAk GoH3 (Sonneberg et al., 1986) eingesetzt. Als Negativkontrolle dienten die PC12-Zellen, die mit dem sekundären Antikörper GAM/TFITC und GAR/FITC inkubiert wurden.

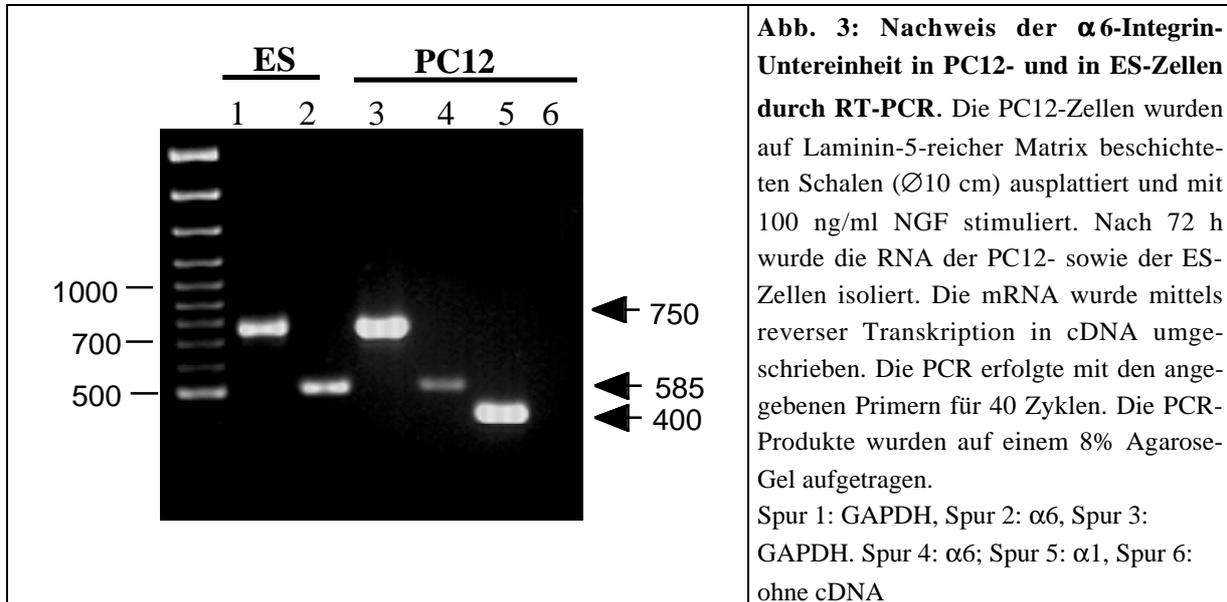
■: Negativkontrolle, ■: Nachweis von $\alpha 1$ -Integrin-Untereinheiten, ■: Nachweis von $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheiten und ■: Nachweis von 6-Integrin-Untereinheiten

3.1.1.3. Untersuchungen zur $\alpha 6$ -Integrin-Untereinheit in PC12-Zellen mittels RT-PCR

Anders als in der Literatur beschrieben [Vogelezang et al., 2001], exprimierten die in dieser Arbeit verwendeten PC12-Zellen, keine funktionelle $\alpha 6$ -Integrin-Untereinheit, die Expression der $\alpha 6$ -Untereinheit wurde aber auf RNA-Ebene mittels RT-PCR untersucht.

PC12-Zellen wurden auf Laminin-5-reicher Matrix ausplattiert und mit NGF stimuliert. Nach drei Tagen wurde die RNA aus PC12-Zellen mittels des RNeasy™-Kit isoliert. Als Positivkontrolle wurden ES-Zellen (embryonale Stammzellen), die $\alpha 6$ -Integrin exprimieren [Thorsteinsdottir et al., 1999], verwendet. Als Ladekontrolle diente das Hauskeeping-Gen GAPDH. Als eine weitere Kontrolle wurde mittels PCR die $\alpha 1$ -Integrin-Untereinheit vervielfältigt, da die Expression der $\alpha 1$ -Integrin-Untereinheit in PC12-Zellen gut charakterisiert ist [Tomaselli et al., 1987]. Dafür wurden Ratten-spezifische-Primer ausgewählt, die eine Bande von ca. 400 bp ergeben sollten. Die RNA wurde in cDNA umgeschrieben, anschließend wurde die RT-PCR mit den spezifischen Primern für $\alpha 6$ -, $\alpha 1$ -Integrine und GAPDH durchgeführt.

Mit Primern, die an die $\alpha 6$ -Integrin-Untereinheit der Ratten-Sequenz binden, konnte ein Fragment innerhalb der $\alpha 6$ -Integrin-Sequenz in ES-Zellen amplifiziert werden. Dieses Fragment ist ca. 585 bp groß. Die ES-Zellen wiesen ein viel stärkeres Signal auf als die PC12-Zellen (Abb. 3).



3.1.1.4. Nachweis der $\alpha 1$ -, $\alpha 3$ -, und $\alpha 6$ -Integrin-Untereinheiten in weiteren Zelllinien mittels Westernblot und Durchflusscytometrie

Die Expression der $\alpha 1$ -, $\alpha 3$ -, und $\alpha 6$ -Integrin-Untereinheiten wurde in weiteren Zelllinien untersucht.

Dazu gehören RBE-Zellen, eine Zelllinie, die aus Endothelien des Rattenhirns isoliert wurde (B.Öbrink, Stockholm Schweden), und embryonale Stammzellen der Maus (ES), die als Positivkontrollen bezüglich der $\alpha 6$ -Integrin-Expression dienten [Thorsteinsdottir et al., 1999]. Weiterhin wurden noch NBT-II-Zellen (Blasenkarzinom der Ratte) herangezogen, die kein $\alpha 6$ -Integrin exprimieren. 50 μg des Gesamtlysats der PC12-, NBT-II-, RBE- und ES-Zellen wurden auf einem SDS-PAGE aufgetragen und die Expression der verschiedenen Integrin-Untereinheiten getestet. NBT-II-, RBE- und ES-Zellen exprimierten die $\alpha 1$ -Integrin-Untereinheit nicht im Vergleich zu NGF-stimulierten PC12-Zellen (Abb. 4 A). Die $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit wurde in PC12- stark, allerdings weniger stark in NBT-II- und in ES-Zellen, exprimiert (Abb. 4 B), während in RBE-Zellen diese Untereinheit nicht nachweisbar war (Abb. 4 B). Der Ratten-spezifische-Antikörper gegen die $\alpha 6$ -Untereinheit erkannte ausschließlich die $\alpha 6$ -Integrin-Untereinheit in RBE-Zellen, nicht aber in PC12- und in NBT-II-Zellen, die ebenfalls aus der Ratte stammen. Die $\alpha 6$ -Untereinheit der Maus in ES-Zellen wurde von diesem Antikörper nicht erkannt (Abb. 4 C).

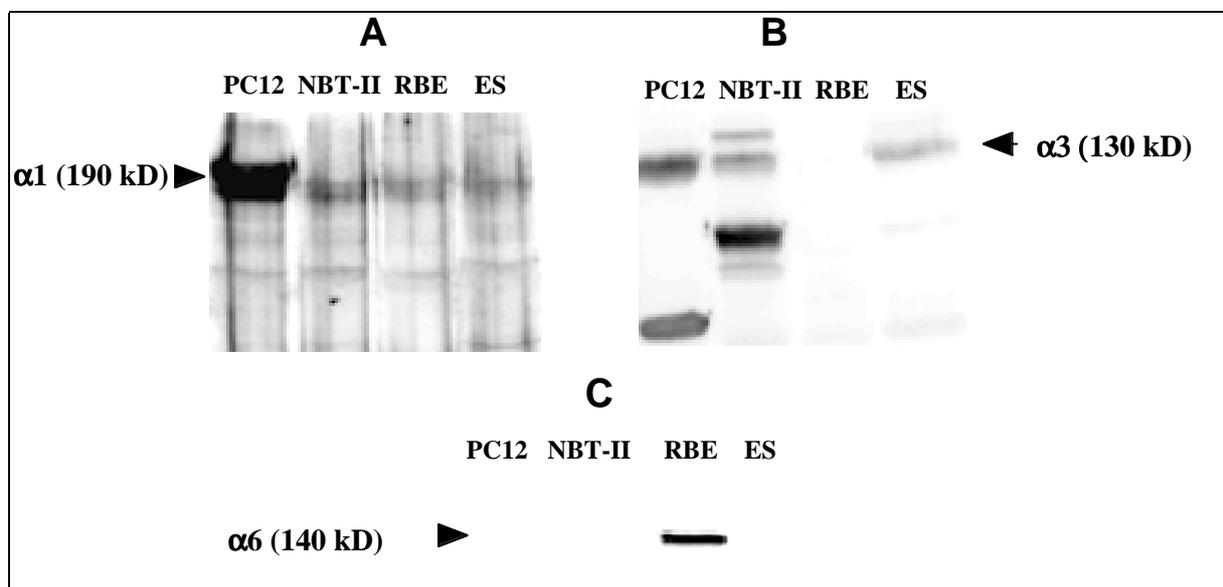


Abb. 4: Nachweis der $\alpha 6$ -, $\alpha 1$ - und $\alpha 3$ -Integrin-Expression in PC12-, NBT-II-, RBE- und ES-Zellen mittels Immunoblot. Zellsolubilisate von NGF-stimulierten PC12 -, NBT-II-, RBE- und ES-Zellen wurden auf einem 7%igen Gel aufgetrennt, mit einem anti- $\alpha 1$ -Integrin-Serum (As2K5) (A) oder mit einem anti- $\alpha 3$ -Integrin-Antikörper (Klon 42) (B) inkubiert. Weiterhin wurde ein Ratten-spezifischer-Antikörper anti-CD49f, der die cytoplasmatische Domäne der $\alpha 6$ A-Integrine bindet, verwendet (C).

Mit allen vier Zelllinien wurden FACS-Analysen durchgeführt. Die Zellen wurden mit dem anti- $\alpha 6$ -Integrin-Antikörper GoH3 durchgeführt. Die RBE- und die ES-Zellen exprimierten in großen Mengen $\alpha 6$ -Integrin auf ihrer Oberfläche (über 99% der Zellen), während die NBT-II- und die PC12-Zellen, wie auch der Westernblot vermuten ließ, negativ bezüglich der $\alpha 6$ -Integrin-Oberflächen-Expression waren (Abb. 5).

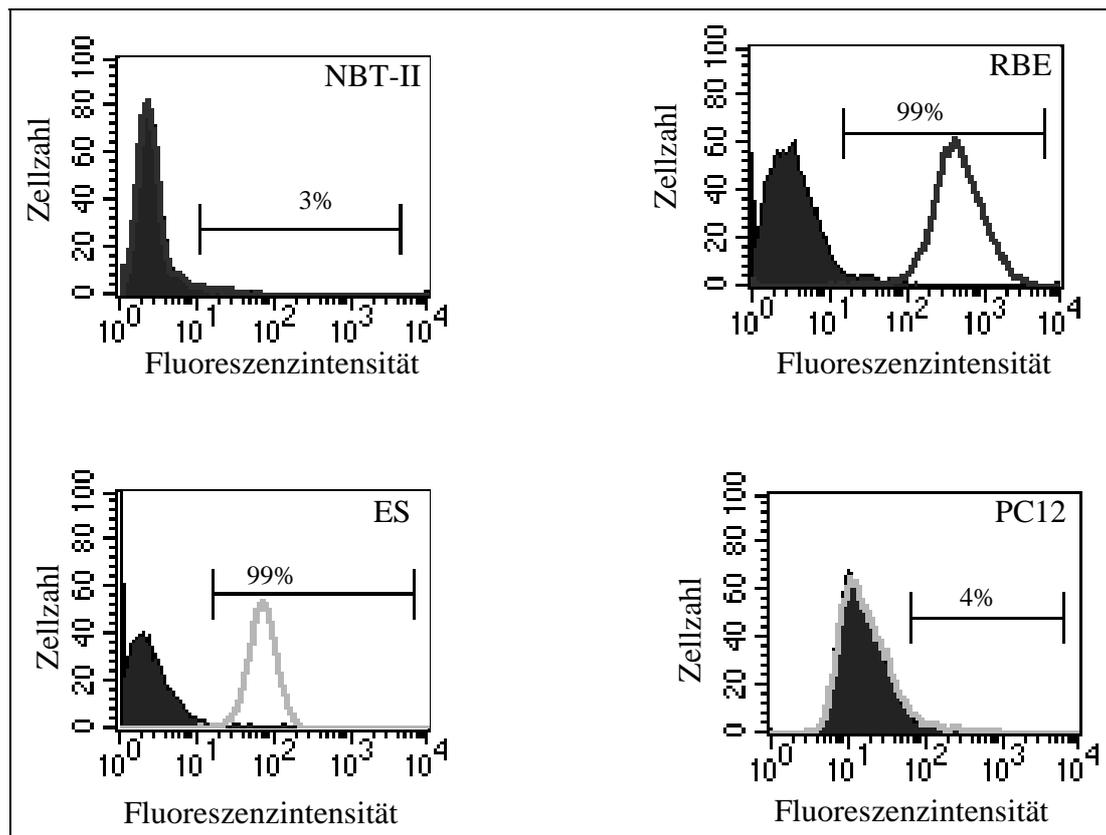


Abb. 5: FACS-Analyse der Oberflächen-Expression von $\alpha 6$ -Integrin in PC12-, NBT-II-, RBE- und ES-Zellen. NGF-stimulierte PC12-Zellen adhärten auf Laminin-5-reicher Matrix. Nach 72 h wurden die Zellen mit PBS/EDTA von der Matrix abgelöst. Die Zellen wurden 3 x mit PBS gewaschen und mit 4%igem Paraformaldehyd fixiert. NBT-II-Zellen wurden mit Viralex in PBS/EDTA von der Platte abgelöst, RBE- und ES-Zellen wurden mit Accutase in PBS/EDTA abgelöst. Anschließend wurden alle Zellen mit dem mAk GoH3, welcher die extrazelluläre Domäne der $\alpha 6$ -Integrin-Untereinheit erkennt, für 45 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit einem sekundären FITC-gekoppelten Antikörper für eine weitere Stunde inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen in 500 μ l PBS aufgenommen und im FACS-Scan analysiert. Als Negativkontrolle dienten die PC12-Zellen, die mit dem sekundären Antikörper GAR/FITC inkubiert wurden. ■: Negativkontrolle, ■■ und — : Nachweis von $\alpha 6$ -Integrin-Untereinheit.

3.1.1.5. Nachweis von Integrinen in PC12-Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz

Im Westernblot konnte gezeigt werden, dass β 1-Integrine wie α 1 β 1 und α 3 β 1 in PC12-Zellen exprimiert wurden. Mittels FACS-Analyse konnte nachgewiesen werden, dass diese Integrine auf der Zelloberfläche zu finden waren. Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz sollte die Lokalisation der Integrine, deren Expression in PC12-Zellen mittels Westernblot- und FACS-Analysen gezeigt werden konnte, bestimmt werden. NGF-stimulierte PC12-Zellen wurden auf Laminin-5-reicher Matrix ausgesät und anschließend mit Integrin-spezifischen Antikörpern inkubiert. Die Expression von α 1-, α 3-, und β 1-Integrin-Untereinheiten beschränkten sich nicht nur auf den Zellkörper, sondern sie waren auch auf den Neuriten lokalisiert (Abb. 6).

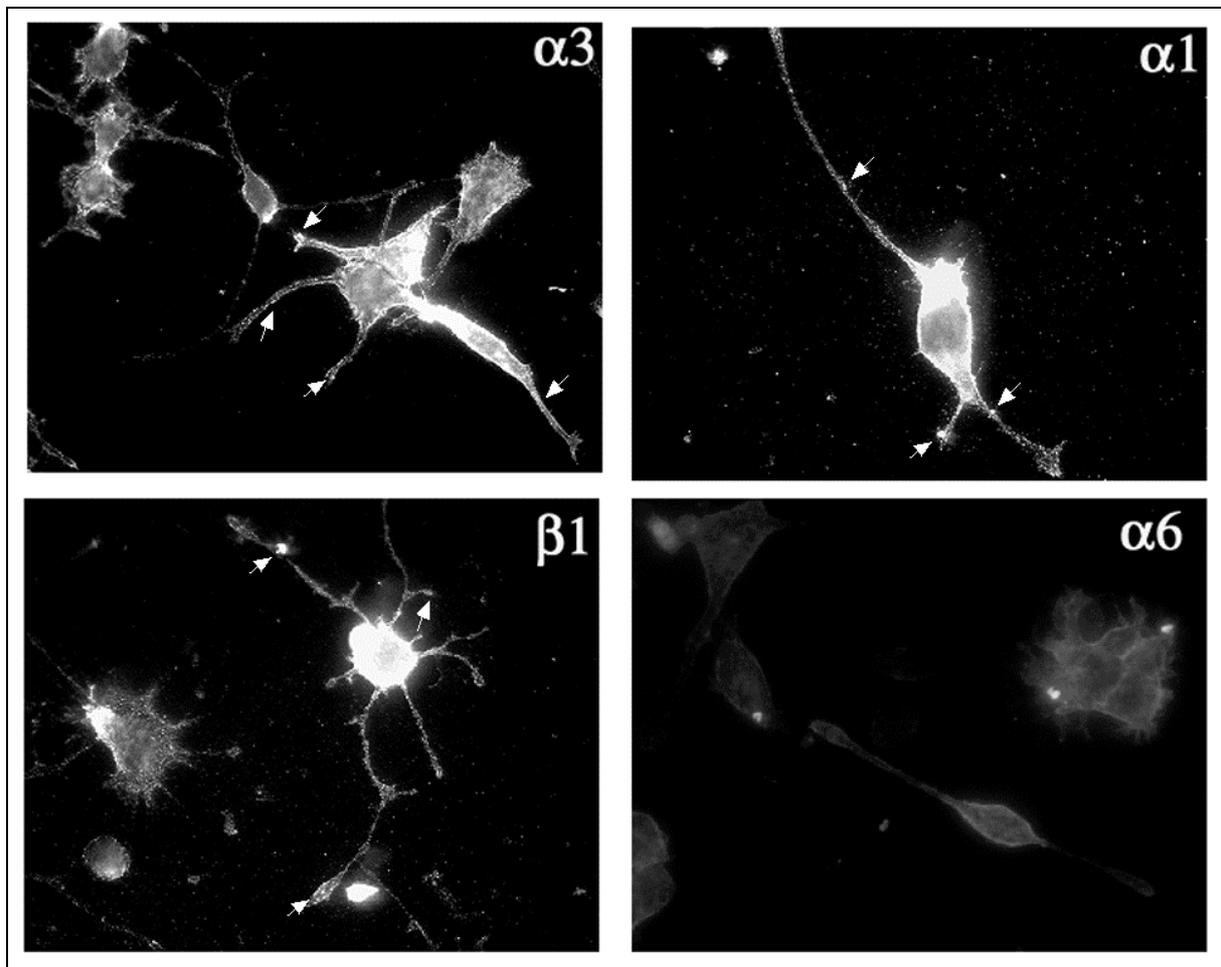


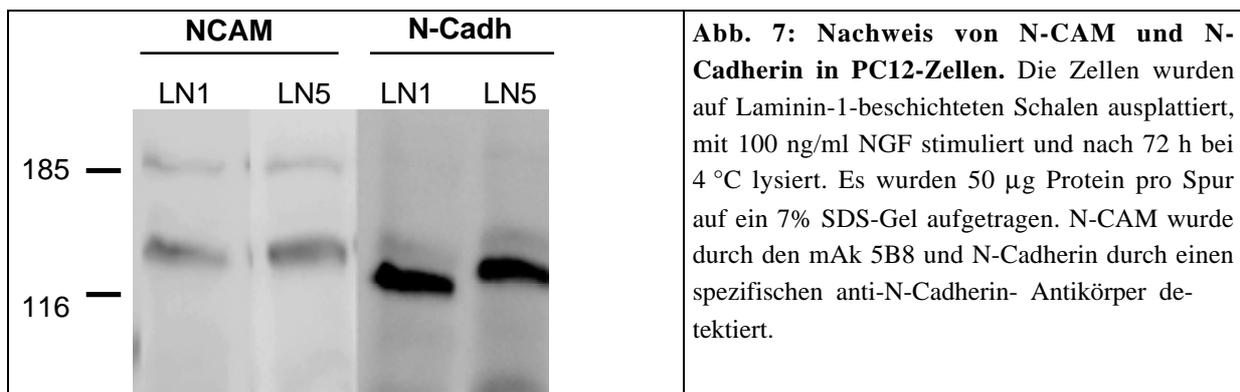
Abb. 6: Immunohistologischer Nachweis von β 1-Integrin-Untereinheiten in PC12-Zellen. PC12-Zellen wurden auf Laminin-5-reicher Matrix ausplattiert und in Anwesenheit von 100 ng/ml NGF für 3 Tage differenziert. Die Zellen wurden mit 4% PFA fixiert, mit 1% BSA/PBS blockiert und anschließend mit dem jeweiligen primären Antikörper (33.4: mAk anti- α 1, Ralph 3.2: mAk anti- α 3, Ha2/5: mAk anti- β 1, GoH3: mAk anti- α 6) inkubiert. Die Zellen wurden mit einem Zeiss-Axiovert-200-Mikroskop und mit einem 63 x Objektiv analysiert. Die Pfeile weisen auf die Point-Kontakte hin.

Die untersuchten Integrin-Untereinheiten befanden sich hauptsächlich in den sogenannten Point-Kontakten, punktförmige Strukturen entlang der Neuriten (in Abbildung 6 durch Pfeile gekennzeichnet), die den fokalen Adhäsionen anderer Zelltypen sehr ähnlich sind. Auch mittels indirekter Immunofluoreszenz war in PC12-Zellen das $\alpha 6 \beta 1$ -Integrin nicht nachweisbar (Abb. 6).

3.1.2. Expression von neuronalen Adhäsionsmolekülen in PC12-Zellen

PC12-Zellen exprimieren nicht nur Integrine auf ihrer Zelloberfläche, sondern sie exprimieren auch andere neuronale Adhäsionsmoleküle wie N-CAM, und N-Cadherin. N-CAM ist dafür bekannt, die neuronale Differenzierung von PC12-Zellen zu stimulieren jedoch auch zu hemmen [Buttner et al., 2004]. Mittels Westernblot konnten mit Hilfe des N-CAM-spezifischen monoklonalen Antikörpers 5B8 beide transmembranären N-CAM-Isoformen (140 kDa und 180 kDa) in PC12-Zellen nachgewiesen werden. N-Cadherin mit einem apparenten Molekulargewicht von 130 kDa wurde ebenfalls in PC12-Zellen exprimiert.

Die Expression beider Zelladhäsionsmoleküle war unabhängig von der Matrix, auf der die PC12-Zellen kultiviert wurden (Abb. 7).



3.1.3. Charakterisierung der Integrin-Funktion in PC12-Zellen

3.1.3.1. Einfluss der Integrine auf die Zell-Matrix-Adhäsion

Die Adhäsion der PC12-Zellen auf den verwendeten Matrixproteinen wird hauptsächlich über $\beta 1$ -Integrine vermittelt.

Die Gabe eines anti- β 1-Integrin-Antikörpers führte zur Aggregation der Zellen und zum Ablösen der Zellen von der Matrix (Abb. 8).

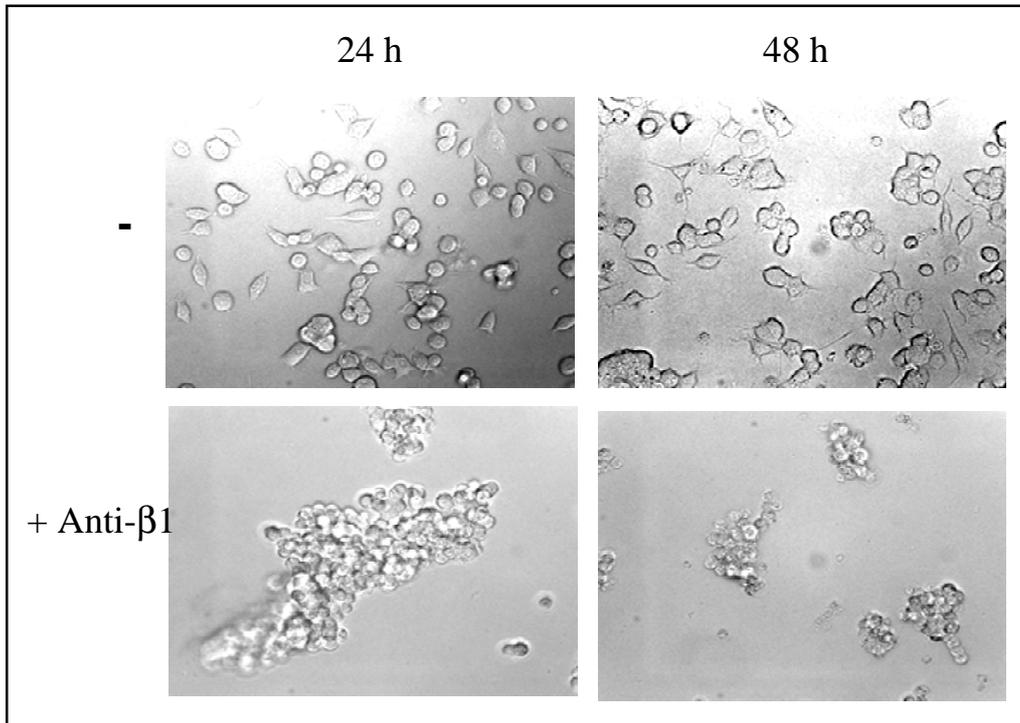


Abb. 8: Funktionsblockierender anti- β 1-Integrin verhindert die Zelladhäsion und die Differenzierung auf Matrix. PC12-Zellen wurden mit 10 μ g/ml anti- β 1-Integrin-Antikörper (Ha2/5) für 10 min preinkubiert und anschließend auf Laminin-5-reicher Matrix ausplattiert. Nach 24 h bzw. 48 h wurden die mit einem Zeiss-Axiovert-200-Mikroskop und mit einem 40 x Objektiv fotografiert.

Im Adhäsionsassay sollte geprüft werden, über welche Integrine PC12-Zellen an Matrixproteine binden. PC12-Zellen wurden auf Laminin 5-reicher Matrix ausplattiert, mit NGF (100 ng/ml) für 72 h stimuliert. Nach Ablösen mit PBS/EDTA und Waschen mit PBS wurden die Zellen mit funktionsblockierenden Antikörpern, die gegen verschiedene Integrin-Untereinheiten gerichtet sind, für 10 min präinkubiert, auf einer mit Matrixproteinen beschichteten 96-Well-Platte replattiert und anschließend für 2 h bei 37°C inkubiert. Auf Laminin 5-reicher Matrix erfolgte weder eine Hemmung der Adhäsion durch α 1-, α 3,- noch durch α 6-spezifische funktionsblockierende Antikörper. Dagegen führte die Blockierung der β 1-Integrin-Untereinheit zu einer 50%igen Hemmung der Adhäsion auf Laminin 5-reicher Matrix.

Auf Laminin-1 sowie auf Kollagen IV wurde die Adhäsion durch den anti- α 1-Integrin-Antikörper sowie den anti- β 1-Integrin stark gehemmt. Die Zellen bildeten nach Gabe dieser Antikörper klumpenartige Aggregate.

Auf dem Matrix-Protein Fibronectin adhärten die PC12-Zellen kaum, da sie offenbar keinen Fibronectin-Rezeptor auf ihrer Zelloberfläche exprimierten (Abb. 1).

Ferner hatte die Blockierung der α 6-Integrin-Untereinheit keinen Effekt auf die adhäsive Aktivität der PC12-Zellen auf allen untersuchten Matrixproteinen. Auf der Poly-L-Lysin-Matrix, auf der Zellen aufgrund negativ geladener Oberflächenmoleküle unspezifisch adhärten, wurde die Adhäsion durch die blockierenden Antikörper nicht beeinträchtigt. (Abb. 9).

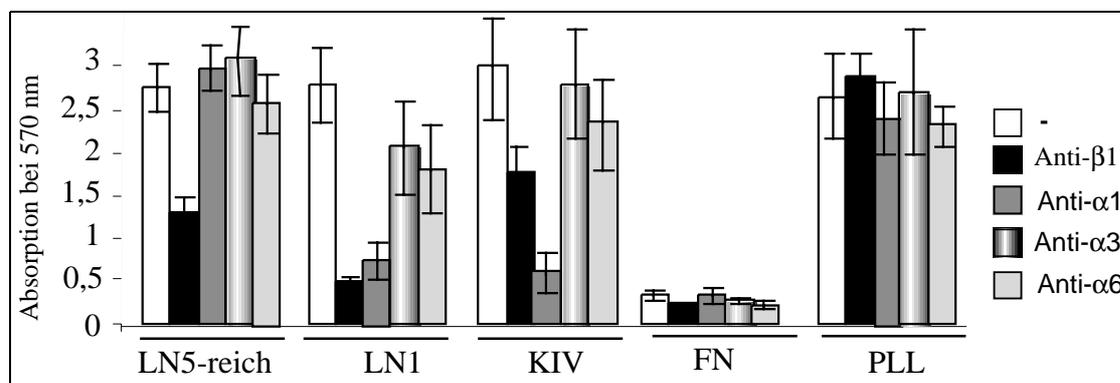


Abb. 9: Adhäsion von PC12-Zellen auf verschiedenen Matrixproteinen. NGF-stimulierte Zellen (1×10^6 Zellen/ml) wurden auf einer beschichteten 96-Well-Platte, die mit Matrixproteinen über Nacht bei 4°C beschichtet wurden, ausplattiert. Die Laminin-5-reiche Matrix wurde vor dem Versuch auf der 96-Well-Platte deponiert und zellenfrei bei 4°C aufbewahrt. Die Zellen wurden mit $10 \mu\text{g/ml}$ funktionsblockierenden Antikörpern (Ralph 3.2: anti- α 3, 33.4: anti- α 1, GoH3: anti- α 6 und Ha2/5: anti- β 1) für 10 min bei RT vorinkubiert. Die Adhäsion der Zellen erfolgte bei 37°C für 90 min. Die Zellzahl der adhären Zellen wurde nach der Färbung der fixierten Zellen photometrisch im ELISA-Reader bestimmt. Die Absorption wurde bei 570 nm gemessen.

Anders stellte sich die Situation in RBE-Zellen dar. Die Blockierung der α 1-Integrin-Untereinheit in diesen Zellen führte nicht zur Hemmung der Adhäsion auf den untersuchten Matrixproteinen, da diese Zellen die α 1-Untereinheit nur schwach exprimierten.

Die Blockierung der α 3-Integrin-Untereinheit zeigte ebenfalls keinen Effekt auf die adhäsive Aktivität dieser Zellen. Hingegen führte die Blockierung der α 6-Untereinheit in RBE-Zellen zu einer Minderung von ca. 33% der Adhäsion auf Laminin-1. Auch die Kombination von anti- α 6-Integrin- und anti- α 3-Integrin-Antikörpern ergab eine Blockierung der Zelladhäsion

der RBE-Zellen auf Laminin-1 (Abb. 10). Dieser Effekt war auf den anti- α 6-Integrin-Antikörper GoH3 zurückzuführen, da die RBE-Zellen die α 6-Integrin-Untereinheit, aber nicht die α 3-Integrin-Untereinheit, exprimierten. RBE-Zellen exprimieren nicht nur wie im FACS gezeigt wurde Integrine, sondern sie exprimieren auch Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle z.B. CEA-CAM. Da CEA-CAM nur an der Zell-Zell-Adhäsion, jedoch nicht an der Zell-Matrix-Adhäsion, beteiligt ist, wurde ein anti-CEA-CAM-Antikörper als Negativkontrolle im Adhäsionsassay eingesetzt.

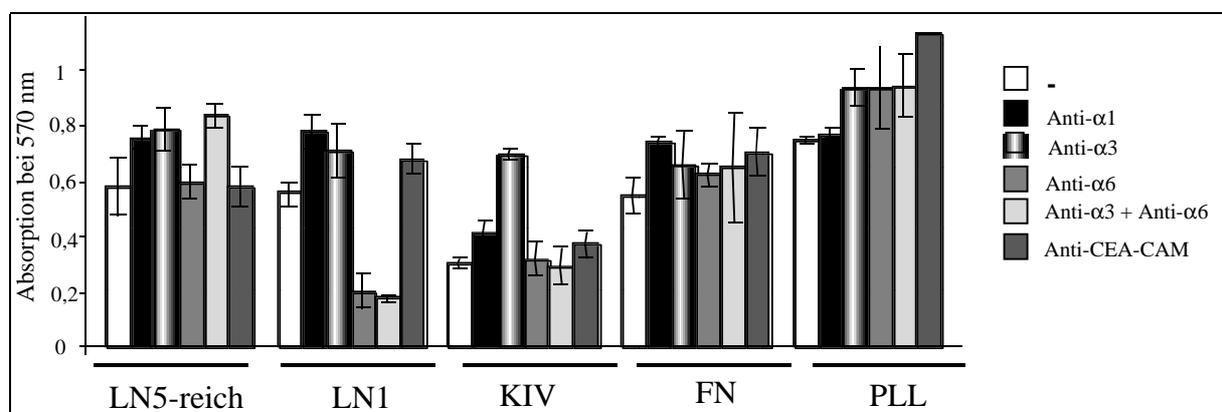
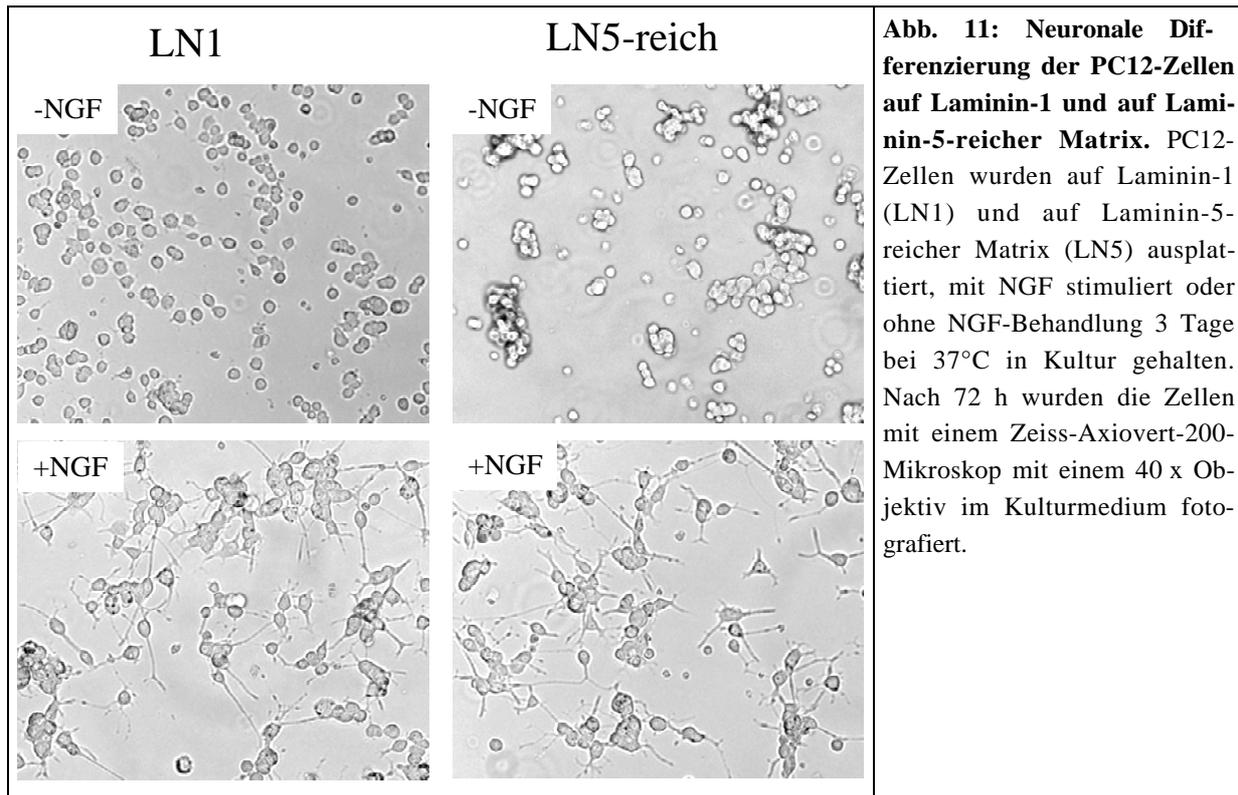


Abb. 10: Adhäsionsverhalten von RBE-Zellen in Anwesenheit von funktionsblockierenden Antikörpern. RBE-Zellen (4×10^5 Zellen/ml) wurden mit $10 \mu\text{g/ml}$ Integrin-funktionsblockierenden Antikörpern (Ralph 3.2: anti- α 3, 33.4: anti- α 1, GoH3: anti- α 6 und Ha2/5: anti- β 1, als Negativkontrolle wurde der mAk anti-CEA-CAM 9.2 herangezogen), für 10 min präinkubiert, die Zellen wurden anschliessend in eine 96-Well-Platte, die mit Matrixproteinen über Nacht bei 4°C beschichtet wurde, ausplattiert. Die Laminin-5-reiche Matrix wurde vor dem Versuch auf der 96-Well-Platte deponiert und zellenfrei bei 4°C aufbewahrt. Die Zelladhäsion erfolgte bei 37°C für 90 min. Die Zellzahl der adhärenen Zellen wurde nach der Färbung der fixierten Zellen photometrisch im ELISA-Reader bestimmt und die Absorption bei 570 nm gemessen.

3.1.4. Matrix-abhängige Differenzierung von PC12-Zellen

Die neuronale Differenzierung von PC12-Zellen ist einerseits abhängig von Wachstumsfaktoren wie NGF und andererseits von der Interaktion ihrer Integrine mit der angebotenen Matrix. PC12-Zellen können auf Laminin-1 sowie auf Laminin-5-reicher Matrix nach NGF-Stimulierung neuronal differenzieren. Adhärenente PC12-Zellen, die nicht mit NGF inkubiert wurden, adhärten auf der Matrix, blieben aber abgerundet und bildeten keine Neuriten (Abb. 11).



3.1.4.1. Identifizierung von Integrinen, die an der Regulation der neuronalen Differenzierung in PC12-Zellen beteiligt sind

Im Differenzierungsassay sollte getestet werden, inwieweit die Integrine $\alpha 1\beta 1$ und $\alpha 3\beta 1$ am Neuritenwachstum von PC12-Zellen beteiligt sind. Dabei wurde die Funktion dieser Integrin-Untereinheiten mittels funktionsblockierender Antikörper, die gegen die jeweilige α -Untereinheit gerichtet sind, inhibiert. PC12-Zellen wurden mit 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ funktionsblockierenden Antikörpern für 10 min vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf Laminin-5-reicher Matrix und auf Laminin-1 ausgesät, für 72 h mit NGF stimuliert. Daraufhin wurden die Zellen fixiert, mit Kristallviolett gefärbt und fotografiert. Die Neuritenlänge pro Zelle wurde mithilfe des Computer-Programms Photoshop ermittelt und in Balken-Diagramm dargestellt.

Auf Laminin 5-reicher Matrix zeigte die Blockierung der $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit durch den anti- $\alpha 3$ -Integrin-Antikörper Ralph 3.2, dass das Neuritenwachstum Matrix um 46% reduziert war im Vergleich zu vollst differenzierten PC12-Zellen (100%). Hingegen hatten die anderen eingesetzten funktionsblockierenden Antikörper auf Laminin-5-reicher Matrix keinen Einfluss auf das Neuritenwachstum der PC12-Zellen (Abb. 12 A und C). Auf Laminin-1 wies die

Hemmung der $\alpha 1$ -Integrin-Untereinheit, durch den anti- $\alpha 1$ -Integrin-Antikörper 33.4 eine signifikante Inhibition des Neuritenwachstums von ca. 70% auf. In der Gegenwart von anti- $\alpha 3$ -Integrin-Antikörper Ralph 3.2 wurde das Neuritenwachstum der auf Laminin-1-wachsenden PC12-Zellen ebenfalls um 52% reduziert (Abb. 12 B und D). Die auf Laminin-5-reicher Matrix oder Laminin-1 kultivierten PC12-Zellen zeigten in der Gegenwart von dem anti- $\alpha 6$ -Integrin-Antikörper GoH3 keine Neuriteninhibition. Diese war auf Laminin-5-reicher Matrix nur um 6% und auf Laminin-1 um 21% reduziert (Abb. 12 C und D).

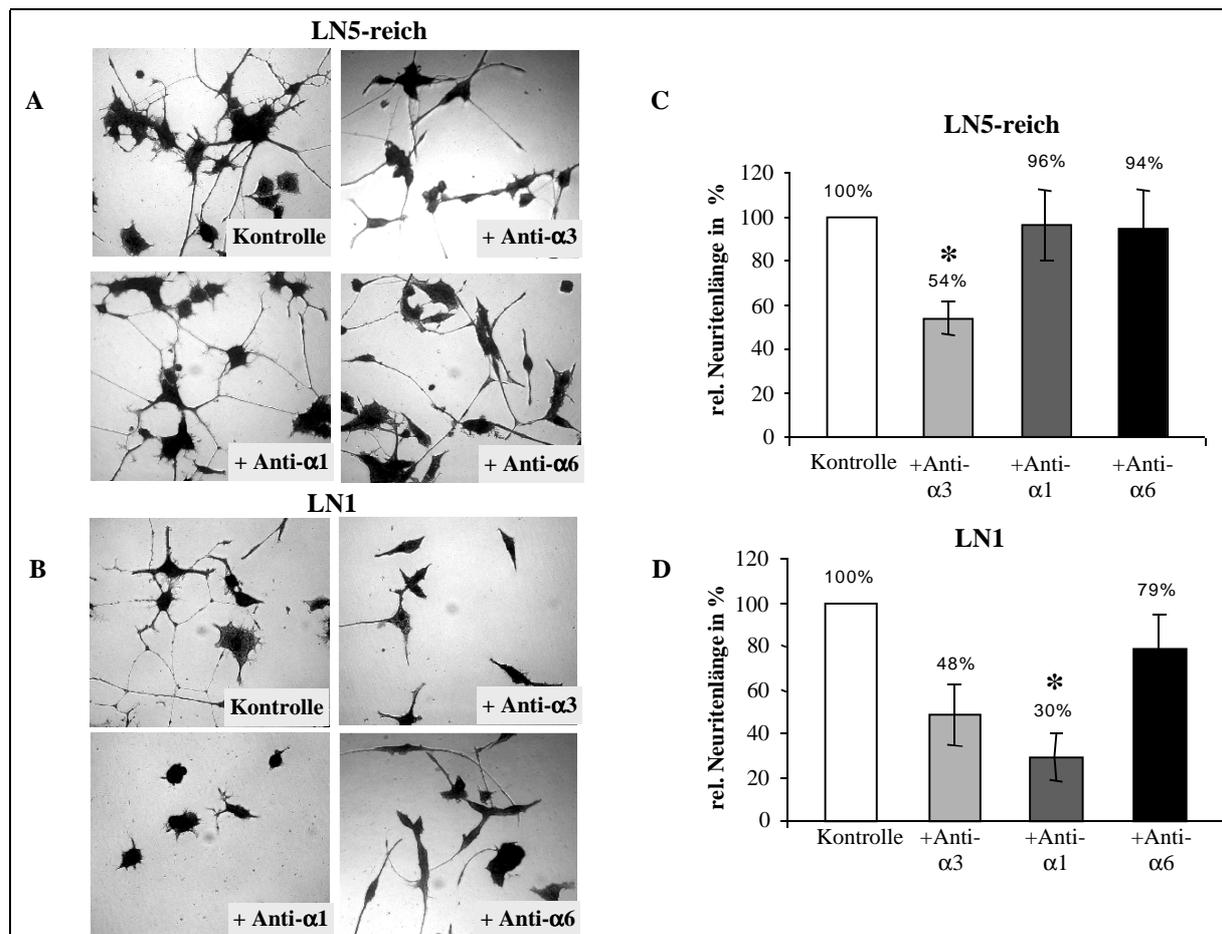


Abb. 12: Quantifizierung der Neuritenlängen differenzierter PC12-Zellen nach Gabe funktionsblockierender Antikörper. PC12-Zellen wurden mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Integrin-funktionsblockierenden Antikörpern (Ralph 3.2: anti- $\alpha 3$, 33.4: anti- $\alpha 1$, und GoH3: anti- $\alpha 6$) für 10 min vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf Laminin-5-reicher Matrix (LN5-reich) (A) und auf Laminin-1 (LN1) (B) ausgesät. Nach 3-tägiger Differenzierung wurden die Zellen mit 4% PFA fixiert, mit 0,1% Kristallviolett gefärbt und mit einem Zeiss-Axiovert-200-Mikroskop mit einem 40 x Objektiv fotografiert. C und D stellen die Auswertung der Neuritenlänge/Zelle in Balken-Diagramm dar. Auf den aufgenommenen mikroskopischen Bildern wurden die Neuriten nachgezeichnet und im Photoshop in Pixel umgerechnet. Die Pixelzahl wurde in cm/Zelle umgerechnet. Die statistische Auswertung der Neuritenlängen/Zellen ist mit dem SPSS-Programm berechnet. * Signifikant ($p < 0,05$)

Um zu überprüfen, ob die gehemmte Interaktion durch den $\alpha 3$ -Integrin-Antikörper auf der Laminin-5-reichen Matrix wirklich auf die Hemmung der Bindung an Laminin-5 basierte, wurde in einem weiteren Experiment die Ligandenbindung des $\alpha 3\beta 1$ -Integrins mittels eines anti-Laminin-5-Antikörpers, der die $\alpha 3$ -Kette des Laminin-5 erkennt und das Integrin-Bindungssepitop blockiert. PC12-Zellen wurden mit NGF stimuliert und für 72 h inkubiert. Die Zellen zeigten eine Konzentrations-abhängige Reduktion des Neuritenwachstums. 1 $\mu\text{g/ml}$ anti-Laminin-5-Antikörper reduzierte die Neuritenlänge um 30% im Vergleich zu Kontrollzellen. 5 $\mu\text{g/ml}$ Antikörper reduzierten das Neuritenwachstum um 50% im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Abb.13 B). Außerdem war ein Zellverlust nach Gabe des Antikörpers festzustellen (Abb. 13 A). Somit konnte gezeigt werden, dass die eingesetzte Laminin-5-reiche Matrix das Protein Laminin-5 enthält.

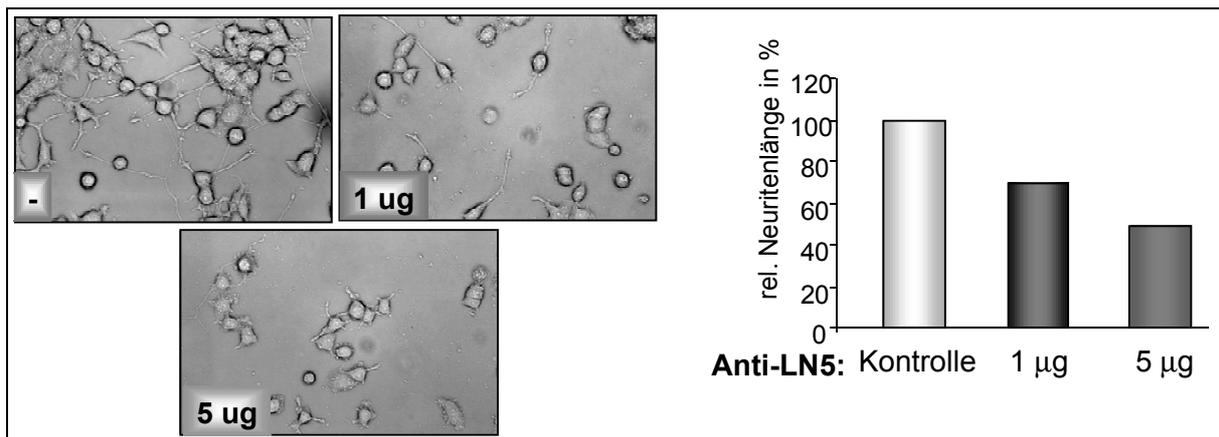


Abb. 13: Quantifizierung der Neuritenlänge differenzierter PC12-Zellen nach in Anwesenheit eines anti-Laminin-5. PC12-Zellen wurden auf Laminin-5-reiche-Matrix ausgesät und in Gegenwart von NGF (100 ng/ml) und anti-Laminin-5-Antikörper (B165) (jeweils 1 $\mu\text{g/ml}$ und 5 $\mu\text{g/ml}$) für 72 h in Kultur gehalten. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zeiss-Axiovert-200-Mikroskop und mit einem 40 x Objektiv fotografiert. Die Neuritenlänge/Zelle wurde wie in Abb. 12 ermittelt. **A:** Repräsentative Bilder von PC12-Zellen, die auf Laminin-5-reicher Matrix in Anwesenheit von anti-Laminin-5-Antikörper kultiviert wurden **B:** Quantifizierung der Neuritenlänge differenzierter PC12-Zellen.

Die Laminin-5-reiche Matrix wurde aus SCC25-Zellen gewonnen, die auf Kulturschalen für 10 Tage in Kultur gehalten wurden, um die Matrix zu produzieren.

Die deponierte Matrix konnte im Silbergel sowie im Westernblot nachgewiesen werden.

Im Silbergel waren unter reduzierenden Bedingungen die drei Laminin-5 Ketten $\alpha 3$ (160 kDa), $\beta 3$ (135 kDa) und $\gamma 2$ (150 kDa und 105 kDa) sichtbar. Die 105 kDa-Bande stellte die prozessierte Form der $\gamma 2$ -Kette dar. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen war nur eine Bande von über 600 kDa, die das Molekulargewicht des gesamten Laminin-5 darstellte, nachweisbar (Abb. 14 A).

Im Westernblot konnten die prozessierte (105 kDa) und unprozessierte (150 kDa) $\gamma 2$ -Kette des Laminin-5 aus der Matrix und im SCC25-Zellkultur-Überstand nachgewiesen werden. Das gereinigte Laminin-5 (erhalten von Monique Aumailley) diente als Positiv-Kontrolle (Abb. 13 B).

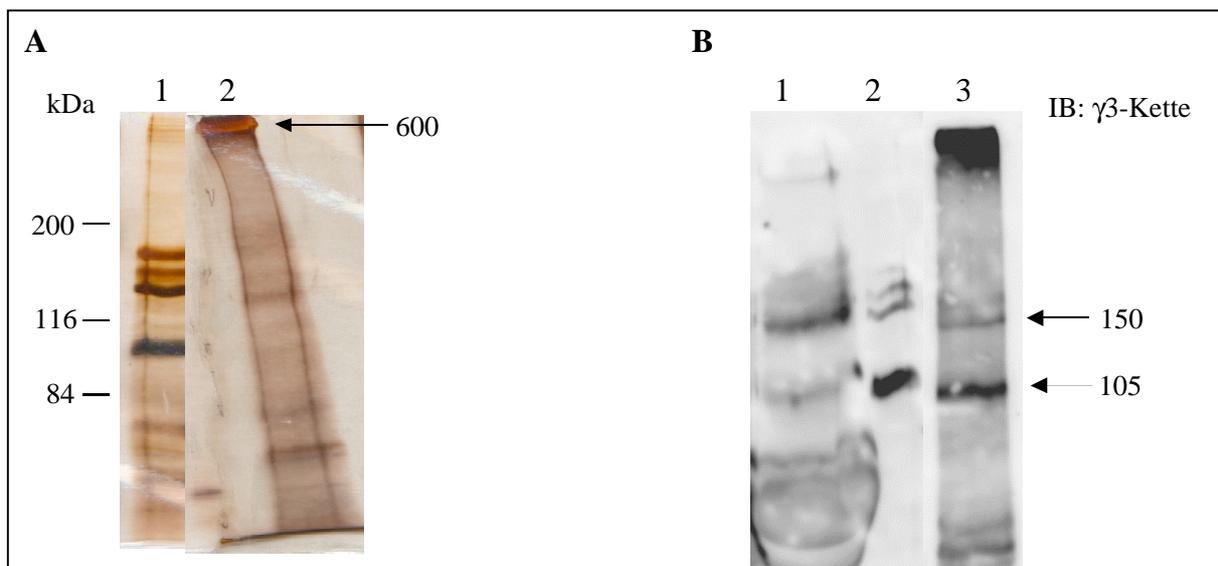


Abb. 13: Nachweis von Laminin-5-reicher Matrix im Zellkulturüberstand und in der deponierten Matrix. Der Zellkultur-Überstand stammte von den SCC25-Zellen, die 10 Tage unter standardisierten Zellkultur-Bedingungen gehalten wurden. Die deponierte Matrix wurde von den Platten abgelöst und auf einem 6,5% Gel aufgetragen. **A:** Silbergel: Spur 1: SCC25-Zellkultur-Überstand (10 μ l/Spur) unter reduzierenden Bedingungen. Spur 2: SCC25-Zellkultur-Überstand (10 μ l/Spur) unter nicht reduzierenden Bedingungen. **B:** Westernblot: Das Laminin-5 wurde durch einen mAk, der die prozessierte und nicht prozessierte $\gamma 2$ -Kette erkennt, detektiert. Spur 1: SCC25-Zellkultur-Überstand, Spur 2: gereinigtes Laminin-5 (Kontrolle) (2 μ g/Spur) Spur 3: deponierte Laminin-5-reiche Matrix (2 μ l/Spur).

3.1.5. Einfluss des ROK α -Inhibitors Y27632 auf das Neuritenwachstum von PC12-Zellen

NGF hemmt die kleine GTPase RhoA und die nachgeschaltete ROK α -Kinase. RhoA wird in der Initiationsphase der Neuritenbildung von der membranproximalen Seite in das Zellinnere transloziert und während der Elongationsphase der Neuritenbildung wieder zur Membran gebracht [Leung et al., 1995] [Leung et al., 1996]. RhoA wird jedoch von ROK α aktiviert, obwohl es sich bei ROK α um einen downstream-Effektor handelt [Leung et al., 1995].

Die RhoA-bindende-Kinase ROK α lässt in neuronalen Zellen die Wachstumskegel kollabieren und führt zum Zurückziehen der Neuriten und Abrunden der Zellen [Kozma et al., 1997]. Eine Möglichkeit, Rho-abhängige Prozesse zu blockieren, besteht in der Inaktivierung von RhoA mittels des ROK α -Inhibitors Y27632 [Uehata et al., 1997] [Ishizaki et al., 2000].

Native und NGF-stimulierte PC12-Zellen wurden mit Inhibitorkonzentrationen zwischen 10 μ M und 100 μ M inkubiert. Dies führte zu einer konzentrationsabhängigen Verstärkung der neuronalen Differenzierung in PC12-Zellen (Abb. 15).

Bei einer Inhibitorkonzentration von 50 μ M war eine beträchtliche Neuritenverlängerung der NGF-behandelten PC12-Zellen zu erkennen, so dass alle weiteren Untersuchungen zur ROK α -Inhibitor Y27632 mit dieser Inhibitorkonzentration durchgeführt wurden.

Die Zunahme der Neuritenzahl und der Verzweigungen der Neuriten pro Zelle war nach Gabe verschiedener Konzentrationen des ROK α -Inhibitors Y27632 sehr deutlich zu erkennen. Die Neuritenlänge pro Zelle stieg mit zunehmender Konzentration vom ROK α -Inhibitor Y27632 (Abb. 15 A und B).

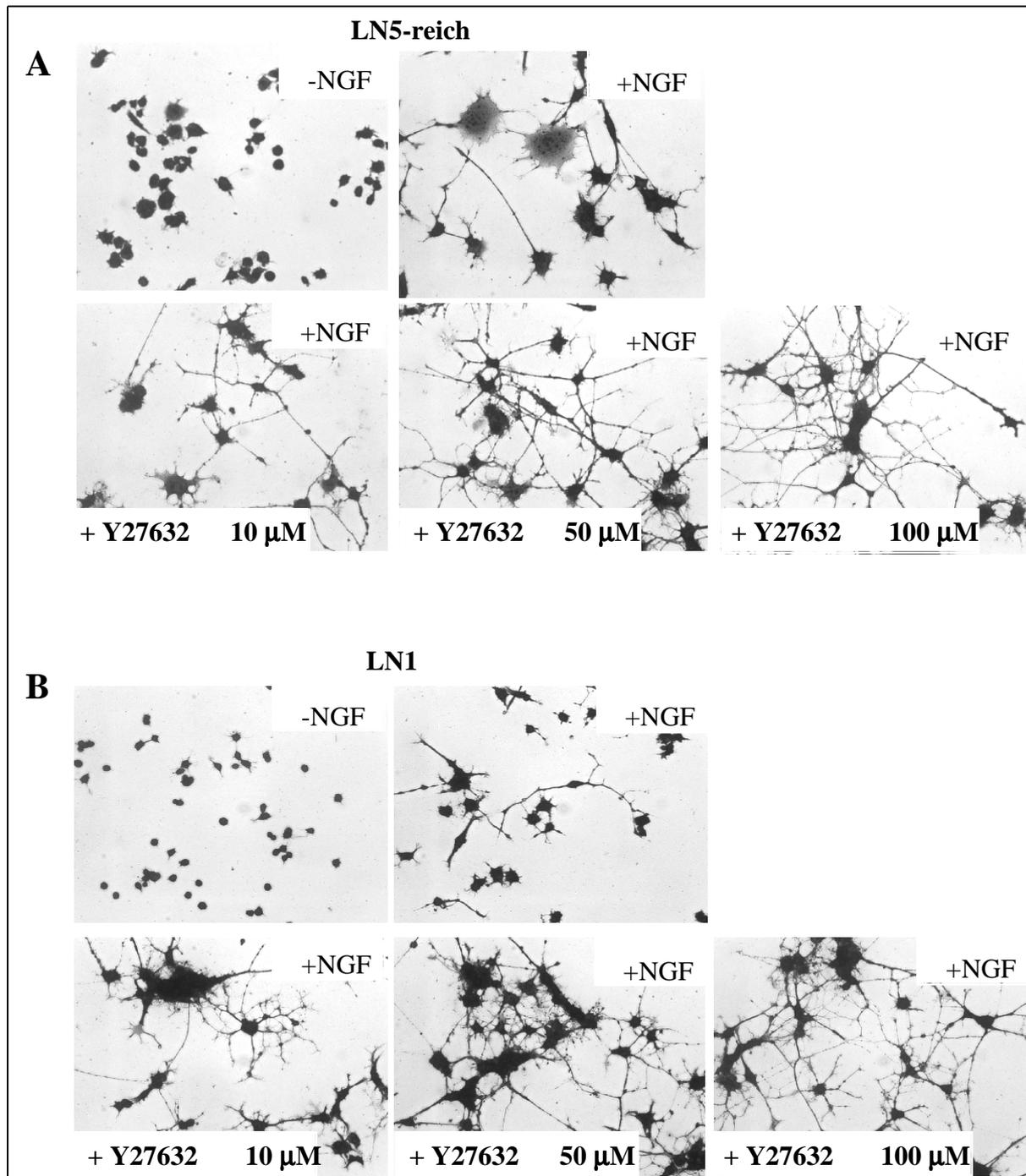


Abb. 15: Verstärkung des Neuritenwachstums von PC12-Zellen durch Gabe des ROK α -Inhibitors Y27632. PC12-Zellen wurden auf Laminin-5-reicher Matrix (LN5-reich) (A) und auf Laminin-1 (LN1) (B) ausplattiert, mit NGF (100 ng/ml) stimuliert und mit steigenden Konzentrationen von Y27632 inkubiert. Nach 72 h wurden die Zellen mit 4% PFA fixiert, mit Kristallviolett gefärbt und mit einem Zeiss-Axiovert-200-Mikroskop und mit einem 40 x Objektiv fotografiert.

3.2. Bestimmung der Funktion der cytoplasmatischen $\alpha 3$ -Sequenz bei $\alpha 3\beta 1$ -abhängigen Prozessen

3.2.1. Etablierung der transienten Transfektion von PC12-Zellen mittels Lipofectamin

Zur Untersuchung der biologischen Funktion der cytoplasmatischen Sequenz des $\alpha 3$ -Integrins während der neuronalen Differenzierung, der Zelladhäsion und der Zellproliferation wurden chimäre Proteine hergestellt. Diese Chimären bestehen aus der extrazellulären und transmembranären Domäne der α -Untereinheit des IL2-Rezeptors (Tac, CD25) und dem cytoplasmatischen Teil des $\alpha 3$ -Integrins (IL2R- $\alpha 3$). Als Kontrolle wurde die gesamte α -Untereinheit des IL2-Rezeptors (IL2R) eingesetzt, mit dessen cytoplasmatischer Domäne, die nur 4 Aminosäuren umfasst. Um sicherzustellen, dass mögliche Effekte wirklich durch die Inhibition der $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit und nicht durch die Beeinflussung des $\alpha 1\beta 1$ -Integrins hervorgerufen wird, wurde als weitere Kontrolle eine Chimäre, die die cytoplasmatische Sequenz der $\alpha 1$ -Integrin-Untereinheit enthält (IL2R- $\alpha 1$) eingesetzt (Abb. 16).

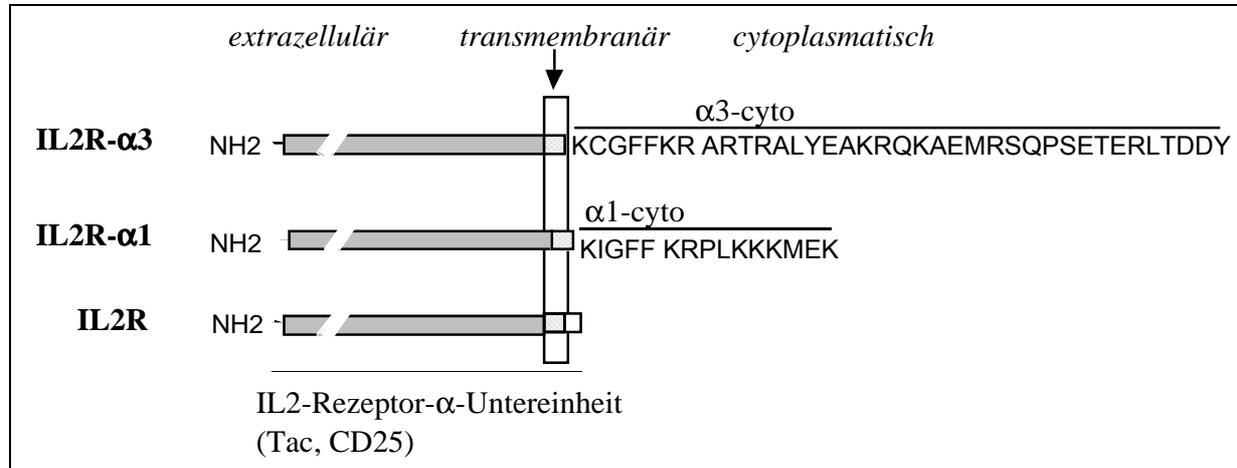


Abb. 16: Schematische Darstellung der Chimären-Rezeptoren IL2R- $\alpha 3$, IL2R- $\alpha 1$ und IL2R

Die Idee war, dass die IL2R- $\alpha 3$ -Chimäre um mögliche potentielle Bindungspartner mit der endogenen cytoplasmatischen $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit konkurriert und einen negativ-dominanten Effekt auf das $\alpha 3\beta 1$ -Integrin ausüben könnte.

Alle cDNAs (IL2R- $\alpha 3$, IL2R, und IL2R- $\alpha 1$) lagen als pCMV-Konstrukte in E-coli vor (AG Reutter).

Die cDNAs wurden mittels Maxi-Präparation nach dem "Quiagen-Maxi-Protokoll" gewonnen und enzymatisch verdaut. Zur Überprüfung der Fragmentgrößen wurde die cDNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen inkubiert und verdaut.

Nachdem das Molekulargewicht der Plasmide auf ihre Richtigkeit geprüft worden ist, wurde die Plasmid-DNA der Chimären (IL2R- α 3, IL2R- α 1) und der Kontrolle (IL2R) in PC12-Zellen mittels Lipofectamin transfiziert. Die Expression der Konstrukte wurde zeitlich (5 h, 24 h, 48 h, und 72 h) erfasst und mittels Westernblot und FACS analysiert.

Im Immunoblot wurde die Expression der IL2R- α 3-Chimären und des IL2R-Proteins in den transfizierten PC12-Zellen nachgewiesen. Die PC12-Zellen exprimieren endogen keine IL2-Rezeptoren. Aus diesem Grund können die Lysate der nicht-transfizierten Zellen als Negativkontrollen eingesetzt werden. PC12-Zellen wurden 24 h nach der Transfektion auf Laminin-5-reicher Matrix replattiert und für weitere 48 h in Kultur gehalten. Im Westernblot ließen sich Banden mit einem Molekulargewicht von ca. 55-60 kDa in den transfizierten Zellen nachweisen. Die Expression dieser Moleküle begann 24 h nach der Transfektion und blieb bis 72 h bestehen (Abb. 17 und 18). Transfizierte Zellen wiesen zusätzlich Banden mit einem niedrigeren Molekulargewicht auf, vermutlich handelte es sich um partiell glykosylierte Proteine [DiPersio et al., 2001]. NGF-Zugabe verstärkte scheinbar die Proteinexpression. Das beruhte vermutlich auf der verminderten Zellproliferation durch NGF. Somit wurde die Weitergabe der cDNA auf die Tochterzellen vermindert und die transfizierten Zellen exprimierten stärker die Chimären (Abb. 17). Die FACS-Analyse zeigte die Zelloberflächen-Expression der Chimären in den transfizierten Zellen. IL2R- α 3, IL2R- α 1 und IL2R waren 5 h und 24 h nach der Transfektion noch nicht auf der Zelloberfläche nachweisbar, jedoch nach 48 h. Wie der Westernblot vermuten ließ, wurden die IL2R-Konstrukte durch NGF auf der Zelloberfläche verstärkt exprimiert. Zellen, die mit NGF behandelt wurden, zeigten nach 72 h die maximale Expression (Abb. 19).

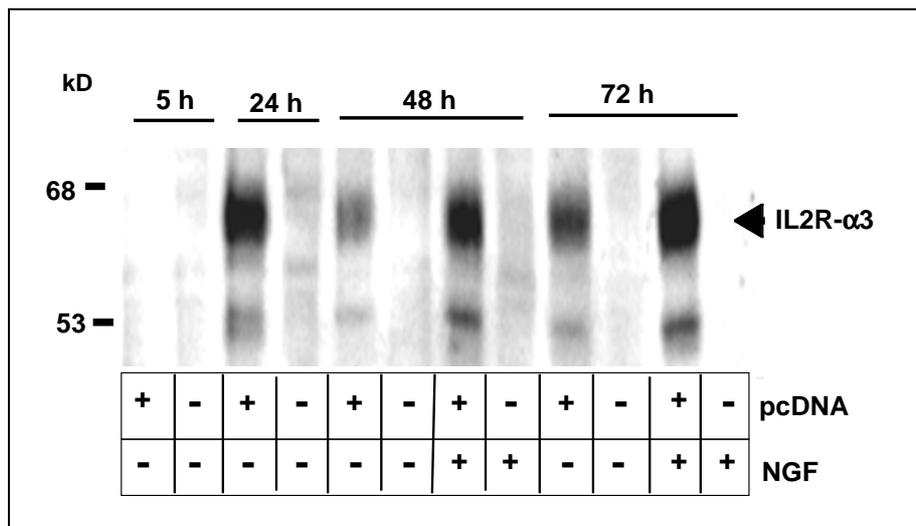


Abb. 17: Nachweis der Chimäre IL2R- α 3 im Immunoblot. Die Zellen wurden auf Laminin 1- beschichteten Schalen ausplattiert und 5 h, 24 h, 48 h und 72 h nach Transfektion bei 4°C lysiert. Es wurden 50 μ g Gesamtprotein auf einem 7% SDS-Gel aufgetragen. Das IL2R- α 3-Protein wurde durch einen Antikörper, der die cytoplasmatische Sequenz der α 3-Integrin-Untereinheit erkennt, detektiert. pcDNA: Plasmid cDNA

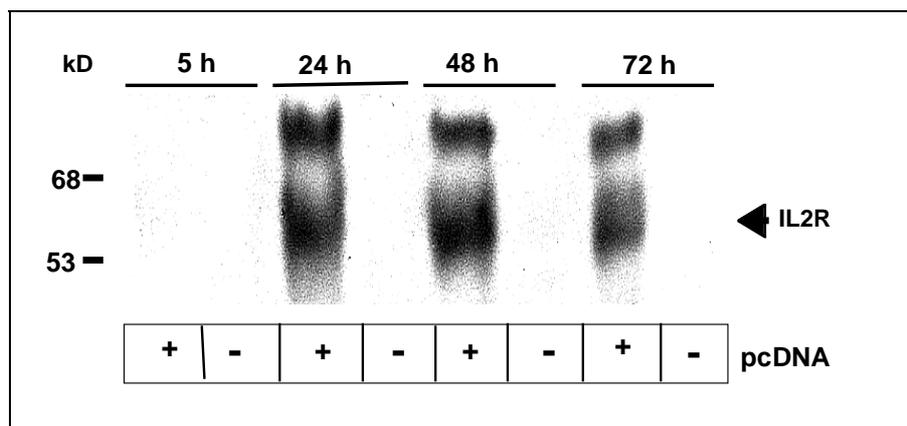


Abb. 18 : Nachweis des IL2R-Proteins im Immunoblot: Die IL2-Rezeptor-Kontrolle wurde mittels eines polyklonalen anti-IL2-Rezeptor-Antikörpers, der den extrazellulären Teil des IL2-Rezeptors erkennt, detektiert.

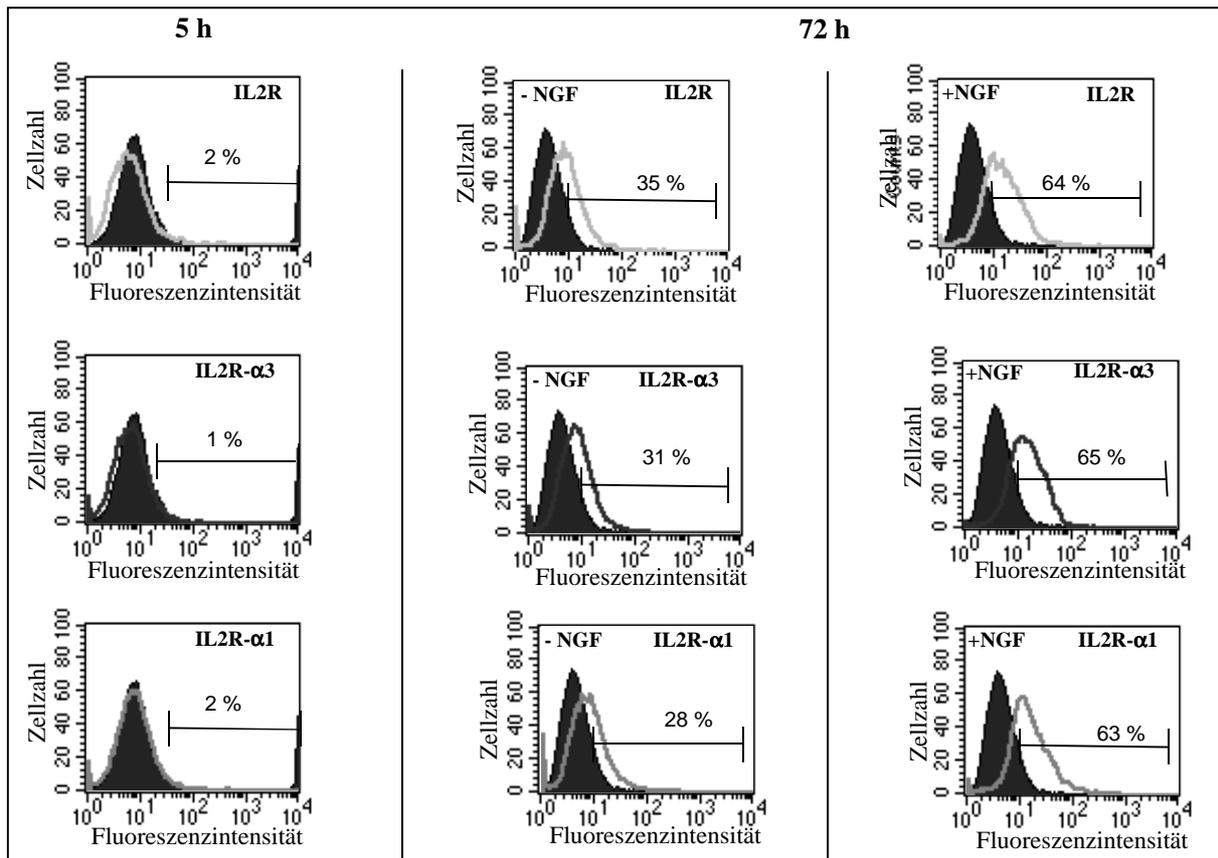


Abb. 19: Oberflächen-Expression von IL2R- α 3, IL2R und IL2R- α 1 in PC12-Zellen, bestimmt durch FACS-Analyse. Die Zellen wurden mit PBS/EDTA von der Matrix (LN1) abgelöst, 3 mal mit PBS gewaschen und mit 4% PFA fixiert und anschließend mit einem FITC-gekoppelten anti-IL2-Rezeptor-Antikörper für 45 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 500 μ l PBS aufgenommen und im FACS-Scan analysiert. Als Negativkontrolle dienen die IL2R-Zellen, die mit einem GAR/FITC inkubiert wurden.

■ Negativkontrolle, — und — — Nachweis der jeweiligen IL2R-Konstrukte.

Ein weiterer Nachweis der Chimären in den transfizierten Zellen erfolgte durch direkte Immunofluoreszenz. 24 h nach der Transfektion wurden die IL2R- α 3 und IL2R-Zellen auf Laminin-1-, Laminin-5-reicher Matrix, Laminin-10/11 und Kollagen IV replattiert und in Anwesenheit von NGF für weitere 48 h kultiviert. Der Nachweis der Chimären IL2R- α 3 und der Kontrolle IL2R erfolgte durch einen anti-IL2R/FITC-gekoppelten Antikörper. Ferner war zu beobachten, dass die IL2R- α 3-transfizierten Zellen eine runde Zellmorphologie auf Laminin-1, Laminin-5-reicher Matrix sowie auf Laminin-10/11 aufwiesen im Vergleich zu IL2R-transfizierten Zellen, die auf allen Matrixproteinen normal differenzierten (Abb. 20). Die IL2R- α 1-transfizierten Zellen differenzierten auf Laminin-1, nicht jedoch auf Laminin-5-reicher Matrix (Abb. 20).

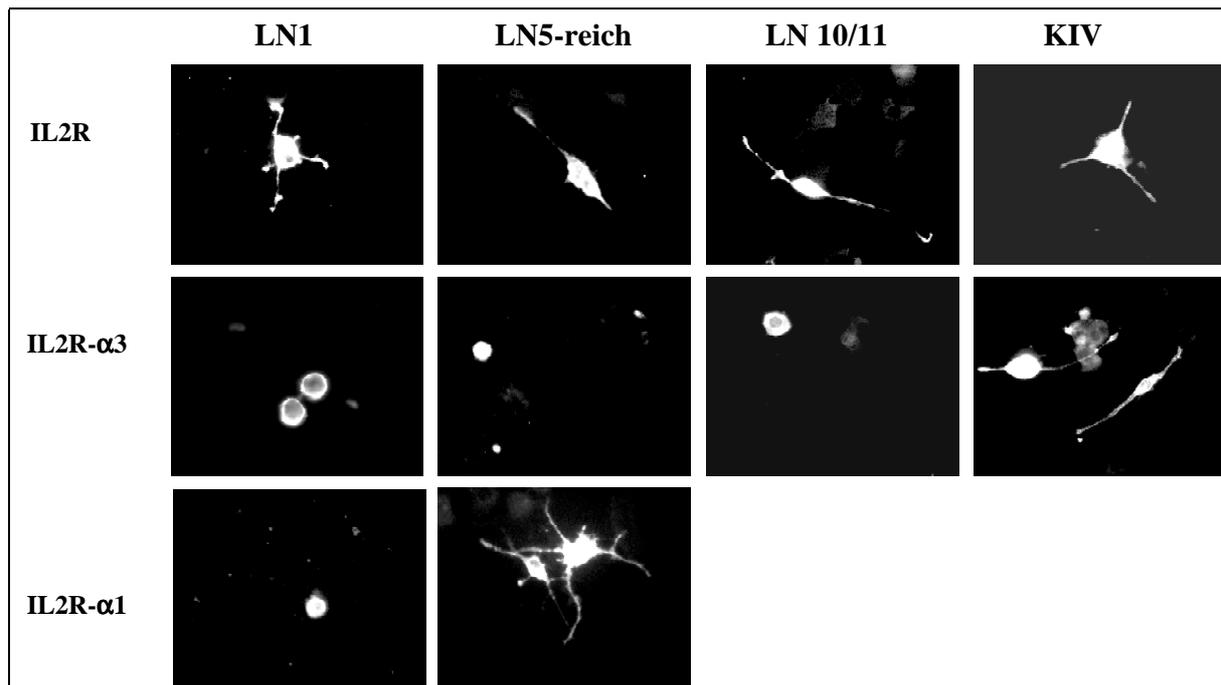


Abb. 20: Nachweis der rekombinanten IL2R-Proteine mittels direkter Immunofluoreszenz. PC12-Zellen wurden 24 h nach Transfektion auf Laminin-1 (LN1), Laminin-5-reicher Matrix (LN5-reich), Laminin-10/11 (LN10/11) und Kollagen IV (KIV) ausgesät, mit 100 ng/ml NGF stimuliert und für weitere 48 h differenziert. Anschließend wurden die Zellen unter nicht permeabilisierenden Bedingungen mit 4% PFA fixiert, mit 1% BSA/PBS blockiert und mit einem anti-IL2R/FITC-gekoppelten Antikörper gefärbt. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem Zeiss-Axiovert-200-Mikroskop und mit einem 63 x Objektiv aufgenommen.

3.2.2. Untersuchungen zur biologischen Funktion der $\alpha 3$ -Integrin-cytoplasmatischen Domäne

3.2.2.1. Einfluss der IL2R- $\alpha 3$ -Chimären auf die Adhäsion der transfizierten PC12-Zellen

Die Anheftung von PC12-Zellen an die extrazelluläre Matrix erfolgt durch die Integrine. Im Adhäsionsassay sollte getestet werden, inwieweit die cytoplasmatische Sequenz der $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit die Zelladhäsion beeinflussen kann. 72 h nach der Transfektion mit den IL2R-Konstrukten wurden Adhäsionsassays durchgeführt. Die Adhäsion war nach Transfektion und Expression der IL2R- $\alpha 3$ -Chimäre und des IL2R-Proteins auf den Matrixproteinen Laminin-5-reich, Laminin-1, Kollagen IV und Poly-L-Lysin nahezu gleich.

Auf Fibronectin adhärirten die Zellen nicht, da PC12-Zellen keine Fibronectin-Rezeptoren exprimieren (Abb. 21).

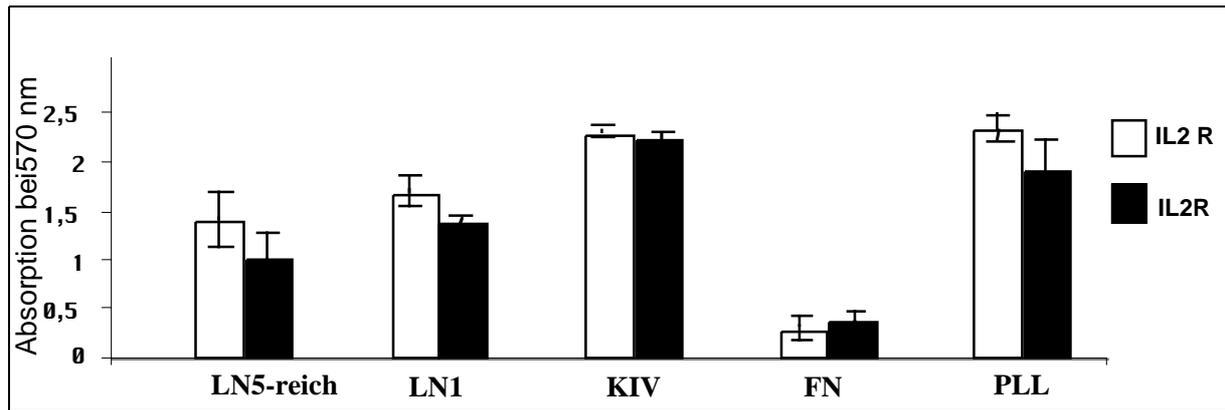


Abb. 21 : Adhäsion von IL2R- α 3- und IL2R-transfizierten Zellen auf verschiedenen Matrixproteinen. Die Zellen (1×10^6 Zellen/ml) wurden auf einer 96-Well-Platte, die mit den Matrixproteinen Laminin-1 (LN1), Kollagen IV (KIV), Fibronectin (FN) und Poly-L-Lysin (PLL) über Nacht bei 4°C beschichtet wurde, ausplattiert. Die Laminin-5-reiche Matrix wurde vor dem Versuch auf der 96-Well-Platte deponiert und zellenfrei bei 4°C aufbewahrt. Die Adhäsion der transfizierten Zellen erfolgt bei 37°C für 90 min. Die Zellzahl der adhären Zellen wird nach der Färbung der fixierten Zellen photometrisch im ELISA-Reader durch die Absorption bei 570 nm bestimmt.

3.2.2.2. Untersuchung zur Beeinflussung der Proliferation durch die Expression der cytoplasmatischen α 3-Sequenz

Integrine können Prozesse wie Zell-Adhäsion, -Migration und auch die -Proliferation regulieren. Um die Beteiligung der α 3-cytoplasmatischen Domäne an der Zellproliferation näher zu untersuchen, wurden die Proliferation der transfizierten Zellen 72 h nach Transfektion bestimmt. Die Bestimmung der Zell-Proliferation basierte auf dem Einbau des Basen-Analogons BrdU und dem anschließenden immunologischen Nachweis des Analogons, der an eine Farbreaktion gekoppelt war.

Wie in Abbildung 22 zu sehen ist, war die Zellproliferation durch die Transfektion mit der IL2R- α 3-Chimäre auf Laminin-5-reicher Matrix, auf Laminin-1 und auch auf Kollagen IV erhöht im Vergleich zu IL2R-transfizierten Kontroll-Zellen. Auf dem unphysiologischen Substrat Poly-L-Lysin und auf Fibronectin blieb die Proliferation durch die Transfektion unbeeinflusst (Abb. 22).

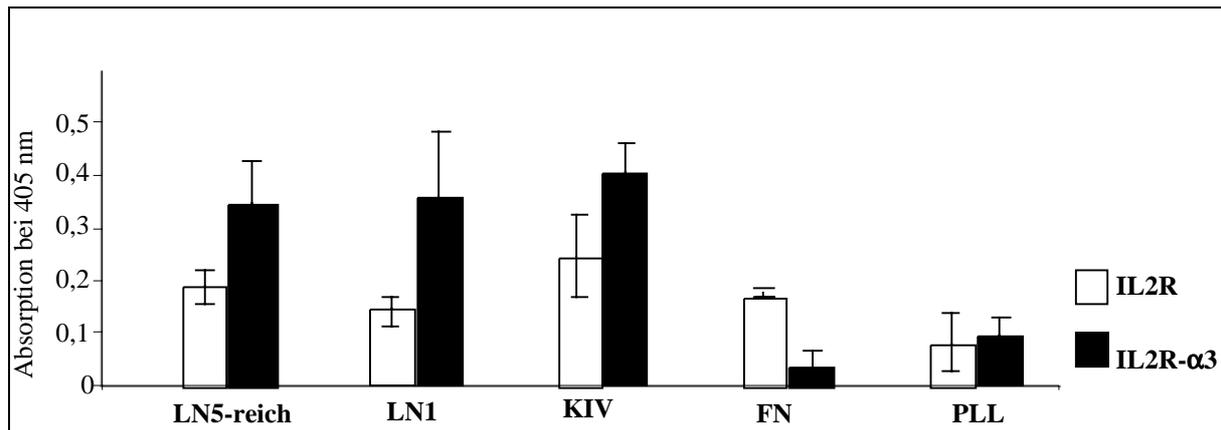


Abb. 22: Proliferationsverhalten der IL2R- α 3-transfizierten Zellen auf verschiedenen Matrixproteinen. Bei diesem Assay beruhte die Quantifizierung der Zellproliferation auf der Messung des Einbaus des Basenanalogs BrdU (5-Bromo-2'-desoxyuridin). 72 h nach der Transfektion wurde das Medium entfernt und die Zellen fixiert und denaturiert. Für 90 min wurde ein gegen das in die DNA eingebaute BrdU gerichteter, Peroxidasegekoppelter Antikörper dazugegeben. Durch die Zugabe des Substrates Tetramethylbenzidin kam es zu einer Blaufärbung in Abhängigkeit von Einbau des BrdU. Bei einer Wellenlänge von 405 nm wurde die Proliferationsrate im ELISA-Reader bestimmt.

3.2.2.3. Einfluss der IL2R- α 3-Chimäre auf die Expression der endogenen Integrine in PC12-Zellen

Weiterhin wurde untersucht, ob die Expression der β 1-Integrine durch die Transfektion der IL2R- α 3-Chimären beeinflusst wurde. IL2R- α 3- und IL2R-transfizierte Zellen wurden auf den oben genannten Matrixproteinen 24 h nach Transfektion ausplattiert. Nach einer weiteren Inkubation von 48 h wurden die Zellen von der Matrix abgelöst und lysiert. Es wurden 50 μ g Gesamtprotein auf ein 7% SDS-Gel aufgetragen.

Die endogenen α 1- (Abb. 23 A), α 3-Integrin-Untereinheiten (Abb. 23 B) wurden in allen Zellen unbeeinträchtigt von der Transfektion der Chimären und unabhängig von der angebotenen Matrix exprimiert. Die Expression der chimären Proteine war ebenfalls unabhängig von der angebotenen Matrix (Abb. 23 C).

Durch FACS-Analysen konnten die Ergebnisse des Westernblots bestätigt werden. Die Oberflächen-Expression der endogenen α 1- und α 3-Integrin-Untereinheiten in IL2R- α 3- und IL2R-transfizierten Zellen auf Laminin-1 sowie auf Laminin-5-reicher Matrix war nahezu unverändert (Abb. 24).

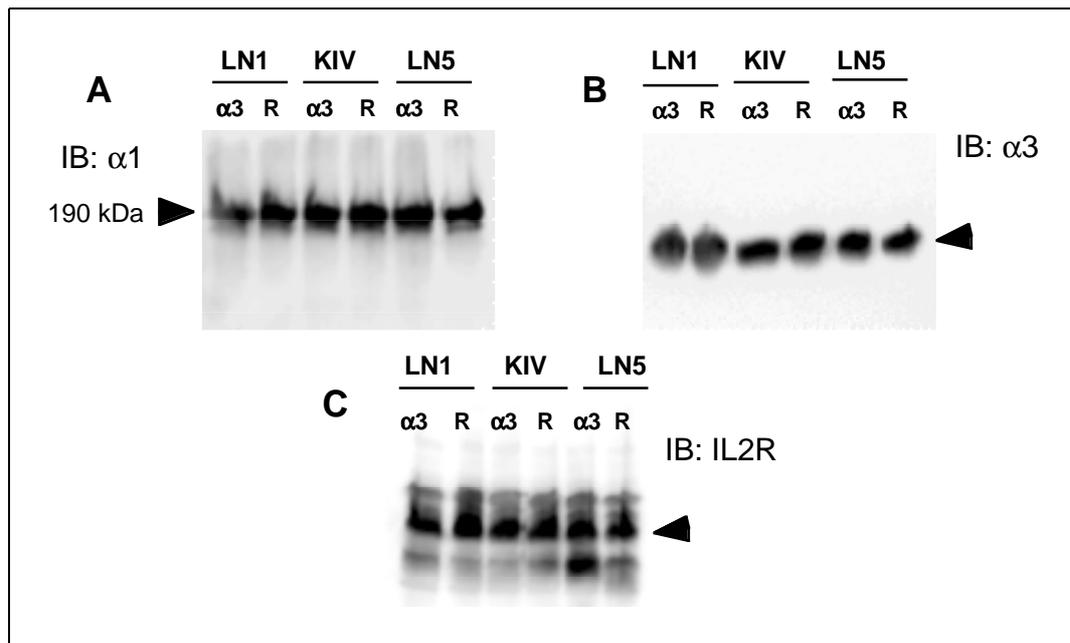


Abb. 23: Untersuchungen zur Expression der endogenen Integrine in den IL2R-Transfektanten im Westernblot. PC12-Zellen wurden 24 h nach Transfektion auf Laminin-1 (LN1), Laminin-5-reicher Matrix (LN5-reich) und Kollagen (KIV) mit 100 ng/ml NGF stimuliert und für weitere 48 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und auf einem 7% SDS-Gel aufgetrennt. In den IL2R- $\alpha 3$ ($\alpha 3$) und IL2R (R) transfizierten Zellen wurde das endogene $\alpha 1$ -Integrin mit dem anti- $\alpha 1$ -Antikörper (As2K5) (A) und das endogene $\alpha 3$ -Integrin mit dem anti- $\alpha 3$ -Antikörper (Klon 42) detektiert (B). IL2R- $\alpha 3$ und die IL2R (Kontrolle) wurden mittels eines anti-IL2-Rezeptor-Antikörpers, der die cytoplasmatische Sequenz der α -Untereinheit des IL2-Rezeptors erkennt, detektiert (C).

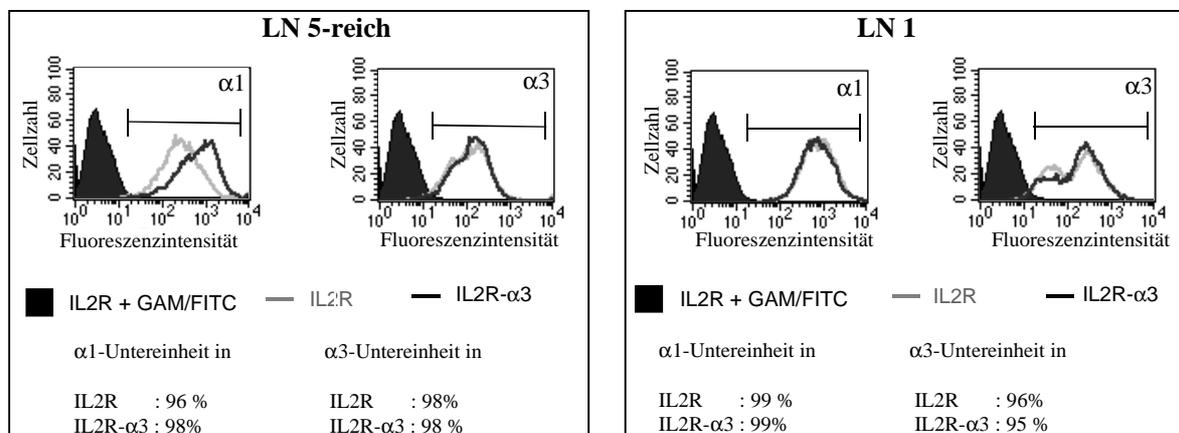


Abb. 24: Oberflächen-Expression der endogenen Integrine in den transfizierten PC12-Zellen mittels FACS-Analysen. PC12-Zellen wurden 24 h nach Transfektion auf Laminin-1 (LN1), Laminin-5-reicher Matrix (LN5-reich) mit 100 ng/ml NGF stimuliert und für weitere 48 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen von der Matrix abgelöst mit 4% PFA fixiert. Das endogene $\alpha 3$ -Integrin wurde mit dem anti- $\alpha 3$ (P1B5) detektiert und das endogene $\alpha 1$ -Integrin wurde mit dem anti- $\alpha 1$ (33.4) nachgewiesen. Als sekundärer Antikörper wurde ein FITC konjugierter Antikörper verwendet. Die Zellen wurden im FACS analysiert.

3.2.2.4. Wirkung der IL2R- $\alpha 3$ -Konstrukte auf die Differenzierung der transfizierten PC12-Zellen

In der Immunfluoreszenz wurde der Einfluss der transfizierten Chimären auf das Differenzierungsverhalten PC12-Zellen überprüft.

Zellen, die mit IL2R- α 3 transfiziert und mit NGF behandelt wurden, blieben auf Laminin-1, Laminin-5-reicher Matrix rund und bildeten keine Neuriten, während IL2R-transfizierte Zellen auf diesen Matrixproteinen differenzierten wie auch nicht transfizierte Zellen normal (Abb. 25 A). Die Transfektion von IL2R- α 3 hatte keinen Einfluss auf das Neuritenwachstum der Zellen, die auf Kollagen IV kultiviert wurden. Diese Zellen differenzierten unabhängig von der cDNA, mit der sie transfiziert wurden. Die Neuritenlänge der mit Lipofectamin transfizierten Zellen wurde auf Laminin-5-reicher Matrix und auf Laminin-1 quantifiziert. Die Neuritenlänge pro Zelle wurde auf Laminin-5-reicher Matrix um 55% nach IL2R- α 3-Transfektion reduziert, während die Neuritenlänge auf Laminin-1 um 25% im Vergleich zu den IL2R-Zellen reduziert wurde (Abb. 25 B). Allerdings erfolgte die Quantifizierung der Neuriten aus Kristallviolett-gefärbten Zellen und somit wurden alle Zellen (transfizierte- und nicht transfizierte-Zellen) erfasst und in die Kalkulation der Neuritenlänge pro Zellen einbezogen.

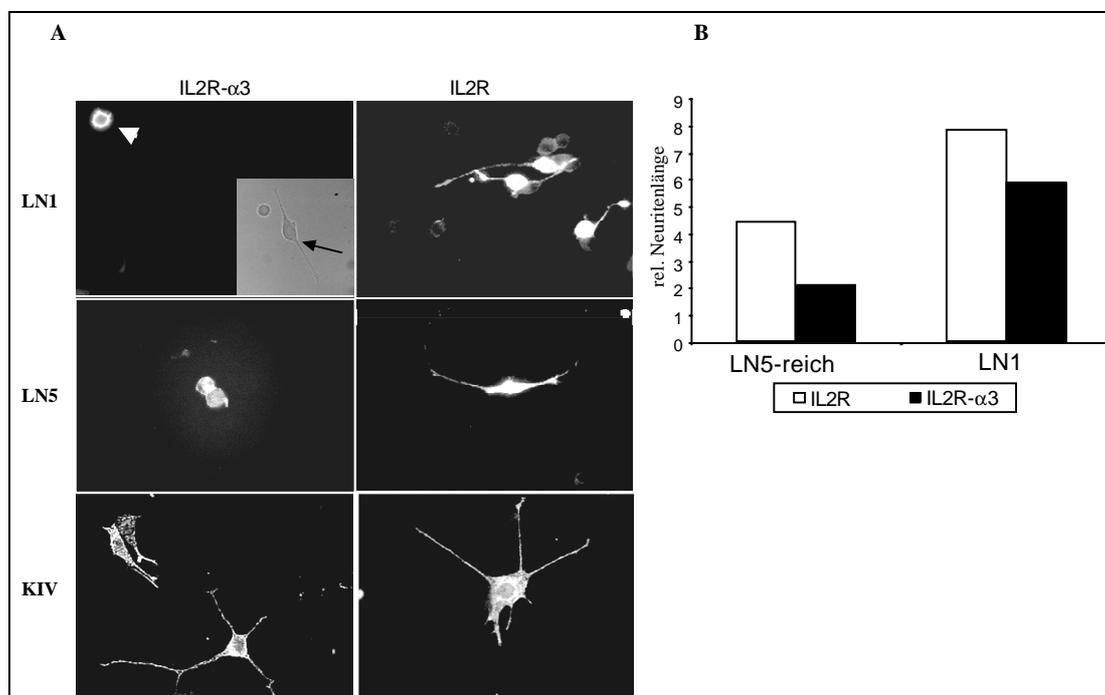


Abb. 25: A: Einfluss der IL2R- α 3-Chimären auf die Differenzierung von PC12-Zellen. Die Transfektanden wurden auf Laminin 1 (LN1), Laminin-5-reicher Matrix (LN5-reich), Laminin-10/11 (LN10/11) und Kollagen IV (KIV) ausgesät und für 48 h mit NGF stimuliert. Die IL2R- α 3- sowie die IL2R-Zellen wurden mittels eines anti-IL2R/FITC-Antikörpers detektiert. Die Bilder wurden mit einem Zeiss-Axiovert-200-Mikroskop und mit einem 63 x Objektiv aufgenommen. **B: Quantifizierung der Neuritenlänge pro Zelle.** Auf den aufgenommenen mikroskopischen Bildern wurden die Neuriten nachgezeichnet und mit Hilfe des Computer-Programms Photoshop die wiederum in Neuritenlänge pro Zelle umgerechnet wurden.

Um zu überprüfen, ob die Reduktion der Neuritenlänge auf der Laminin-5-reichen Matrix wirklich aufgrund der Interaktion an Laminin-5 beruht, wurden die Zellen auf gereinigtem Laminin-5 ausplattiert und mittels Nukleofektion, durch die eine höhere Transfektionsrate erzielt wurde, transfiziert.

72 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert, mit Kristallviolett gefärbt und quantifiziert (Abb. 26 A). Die Neuritenlänge IL2R- α 3-transfizierten Zellen war auf gereinigtem Laminin-5 um 80% reduziert im Vergleich zu den IL2R-transfizierten Zellen, die auf 100% gesetzt worden sind (Abb. 26 B).

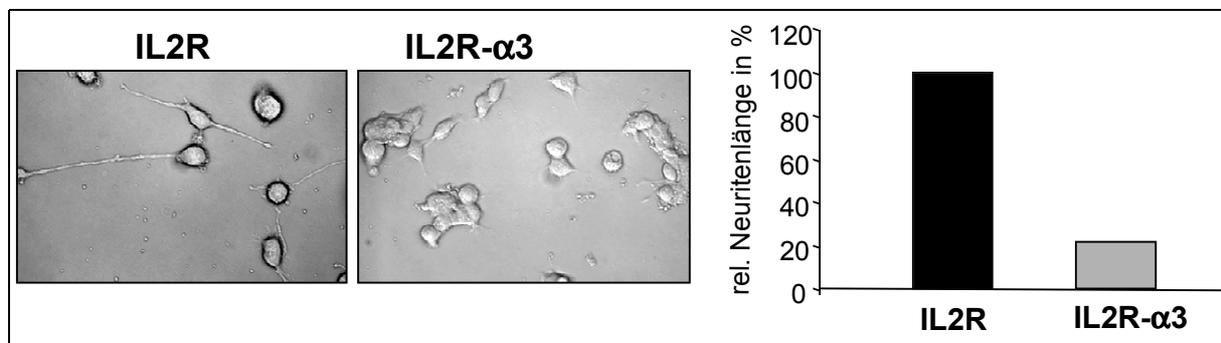


Abb. 26: Quantifizierung der Neuritenlänge IL2R- α 3-transfizierter PC12-Zellen auf gereinigtem Laminin-5. A: IL2R- α 3- und IL2R-Zellen wurden in Gegenwart von NGF 24 h nach Transfektion auf gereinigtem Laminin-5 (LN5-rein) ausplattiert und für weitere 48 h in Kultur gehalten. Anschließend wurden die Zellen mit 4% PFA fixiert, mit 0,1 % Kristallviolett gefärbt, mit einem Zeiss-Axiovert-200-Mikroskop und mit einem 40 x Objektiv fotografiert. B: Die Neuritenlänge pro Zelle wurde wie in Abb. 12 beschrieben ermittelt.

α 3 β 1-Integrin ist in der Lage, die Funktion anderer Integrine zu modulieren [Gonzalez-Amaro & Sanchez-Madrid, 1999] und fungiert z.B. in humanen Brust-Karzinom-Zellen als ein transdominanter Inhibitor des α 2 β 1-Integrins, einem Kollagen-Rezeptor in Maus-Keratinocyten [Lichtner et al., 1998]. α 3 β 1-Integrin kann ebenso das α 6 β 1-Integrin negativ regulieren [Laplantine et al., 2000]. Um auszuschließen, dass die IL2R- α 3-Chimäre einen dominant negativen Effekt auf das α 1 β 1-Integrin ausübt, wurden die Chimären in CHO/ α 1-Zellen transfiziert, die stabil die α 1 β 1-Integrin-Untereinheit exprimieren, [Vossmeyer et al., 2000], nicht aber das α 3 β 1-Integrin.

Diese Zellen wurden transient mit IL2R- α 3, IL2R- α 1 und IL2R (Kontrolle) transfiziert und anschließend auf Laminin-1 ausgesät. Die Oberflächen-Expression der Chimären wurde im FACS geprüft. Die Transfektionsrate des IL2R in den CHO/ α 1-Zellen beträgt schon 17 h nach der Transfektion 59%. Hingegen exprimieren nur 23% der CHO/ α 1-Zellen die IL2R- α 3-Chimären und 11% der Zellen weisen auf ihrer Zelloberfläche die IL2R- α 1-Konstrukte auf (Abb. 27).

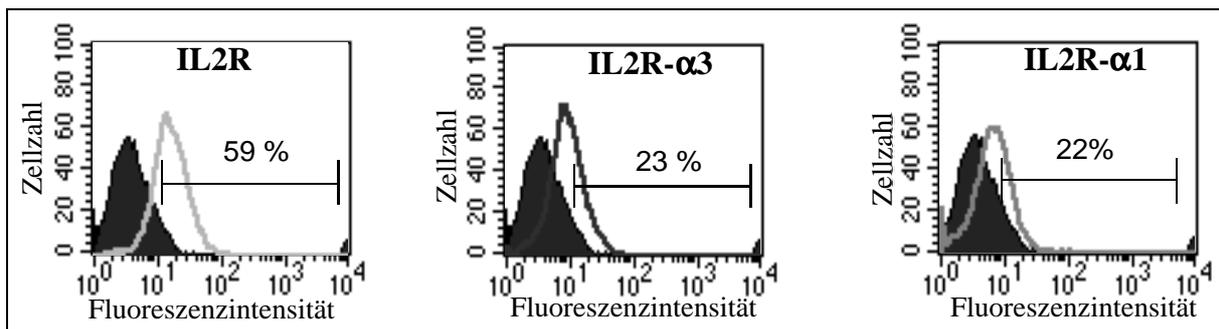


Abb. 27: Oberflächen-Expression von IL2R- α 1, IL2R- α 3 und IL2R in CHO/ α 1-Zellen mittels FACS-Analyse. Die CHO/ α 1-Zellen wurden wie die PC12-Zellen behandelt und nach 17 h mit dem FITC-gekoppelten anti-IL2-Rezeptor-Antikörper gefärbt. ■: Negativkontrolle, —: IL2R ■: IL2R- α 3 und —: IL2R- α 1

Die Zellmorphologie CHO/ α 1-IL2R- α 3-Zellen wurde mit direkter Immunofluoreszenz untersucht, diese Zellen verhalten sich wie die CHO/ α 1-IL2R-Kontroll-Zellen, die adhärten und spreiteten auf Laminin-1, wohingegen die Transfektion mit der IL2R- α 1-Chimäre zum Abrunden der Zellen auf Laminin-1 führt, das ein α 1 β 1-Integrin-spezifisches Substrat ist (Abb. 28).

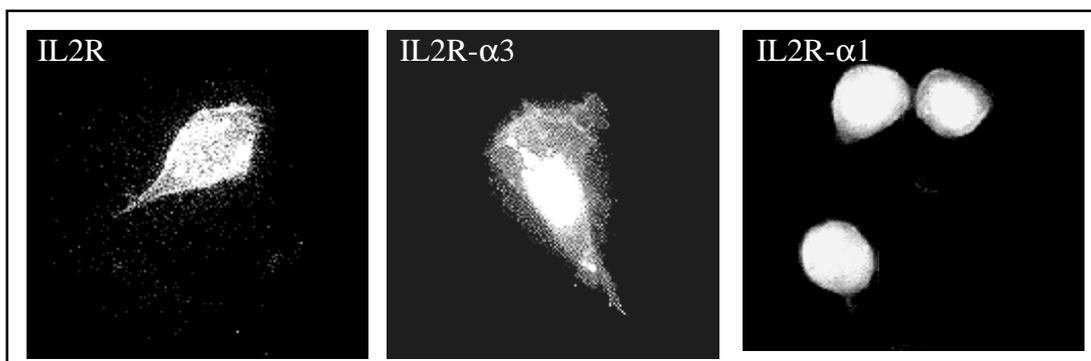


Abb. 28: Einfluss der IL2R- α 1-Chimären auf die Morphologie der CHO/ α 1-Zellen. Die CHO/ α 1-Zellen wurden 17 h nach der Transfektion mit IL2R- α 3, IL2R- α 1 und IL2R auf Laminin-1 ausplattiert und für weitere 2 h bei 37°C in Kultur gehalten. Die Zellen wurden mit 4% PFA fixiert. CHO/ α 1-IL2R- α 3-, CHO/ α 1-IL2R- α 1- und die CHO/ α 1-IL2R-Zellen wurden mittels eines anti-IL2R/FITC-Antikörpers detektiert.

3.2.2.5. Charakterisierung des Einflusses der $\alpha 3$ -cytoplasmatischen Domäne auf die $\alpha 3\beta 1$ -Integrin-abhängige Signaltransduktion

Die Organisation des Aktin-Cytoskeletts wird ebenfalls durch Integrin reguliert, die die Aktivität von der kleinen Rho-GTPasen wie Rac1 und Rho modulieren [Keely et al., 1997] [Shaw et al., 1997] [Clark et al., 1998] [Price et al., 1998].

Rac1 und RhoA stehen in neuronalen Zellen in gegenseitigen Wechselwirkungen. Rac1 kontrolliert die Bildung der Zellprotrusionen durch Aktinpolymerisation, Bildung von Lamellipodien und „membrane-ruffles“ [Katoh, 2000] und ist notwendig für die Neuritenbildung [Altun-Gultekin et al., 1998], während die Aktivierung von RhoA zur Neuriten-Retraktion führt [Gebbinck et al., 1997] [Katoh et al., 1998] [Kozma et al., 1997] [Sarner et al., 2000].

Die veränderte Zellmorphologie der IL2R- $\alpha 3$ -Zellen, die in der indirekten Immunfluoreszenz beobachtet wurde, ließ einen Einfluss durch die $\alpha 3$ -cytoplasmatische Sequenz auf die Reorganisation des Cytoskeletts vermuten, wodurch es zur Hemmung der neuronalen Differenzierung kommt. Deshalb sollte die Rolle des RhoA-Signaling bei der $\alpha 3\beta 1$ -Integrin-abhängigen Cytoskelett-Organisation untersucht werden, indem die RhoA-bindende Kinase ROK α durch Gabe des Inhibitors Y27632 gehemmt werden konnte. 50 μ M des Inhibitors wirken der Hemmung des Neuritenwachstum durch die IL2R- $\alpha 3$ -Chimäre auf Laminin-5-reicher Matrix, Laminin-1 und Laminin-10/11 entgegen (Abb. 29).

Wie vorher schon gezeigt, zeigten sich die Zellen, die auf Kollagen IV ausplattiert wurden, unbeeinflusst durch die Transfektion der Chimären, aber auch der Inhibitor hatte wenig Einfluss auf die Differenzierung auf diesem Matrixprotein. Die Neuriten sind nach Gabe von Y27632 besonders lang und sehr fein. Aus diesem Grund ist die Detektion derartiger Neuriten mittels Antikörper in der direkten Immunofluoreszenz sehr schwierig (Abb. 29).

Um zu überprüfen, über welches der Integrine die Neuriten nach Gabe des Inhibitors in den IL2R- $\alpha 3$ -transfizierten Zellen auswachsen, wurden die Integrin-Epitope mit Hilfe von funktionsblockierenden Antikörpern, die gegen die $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit (Abb. 30) oder gegen die $\alpha 1$ -Untereinheit (Abb. 31) gerichtet waren, eingesetzt und die Morphologie der Zellen nach NGF-Gabe beurteilt.

Der $\alpha3$ -Integrin-spezifische Antikörper Ralph3.2 konnte den aktivierenden Einfluss durch den Inhibitor Y27632 in den IL2R-transfizierten Zellen auf Laminin-5-reicher Matrix, Laminin-1 und Laminin-10/11 aufheben. Dieser Effekt war jedoch nicht in den IL2R- $\alpha3$ -transfizierten Zellen zu beobachten. Diese Zellen bleiben trotz Gabe von Y27632 undifferenziert bzw. rund (Abb. 32).

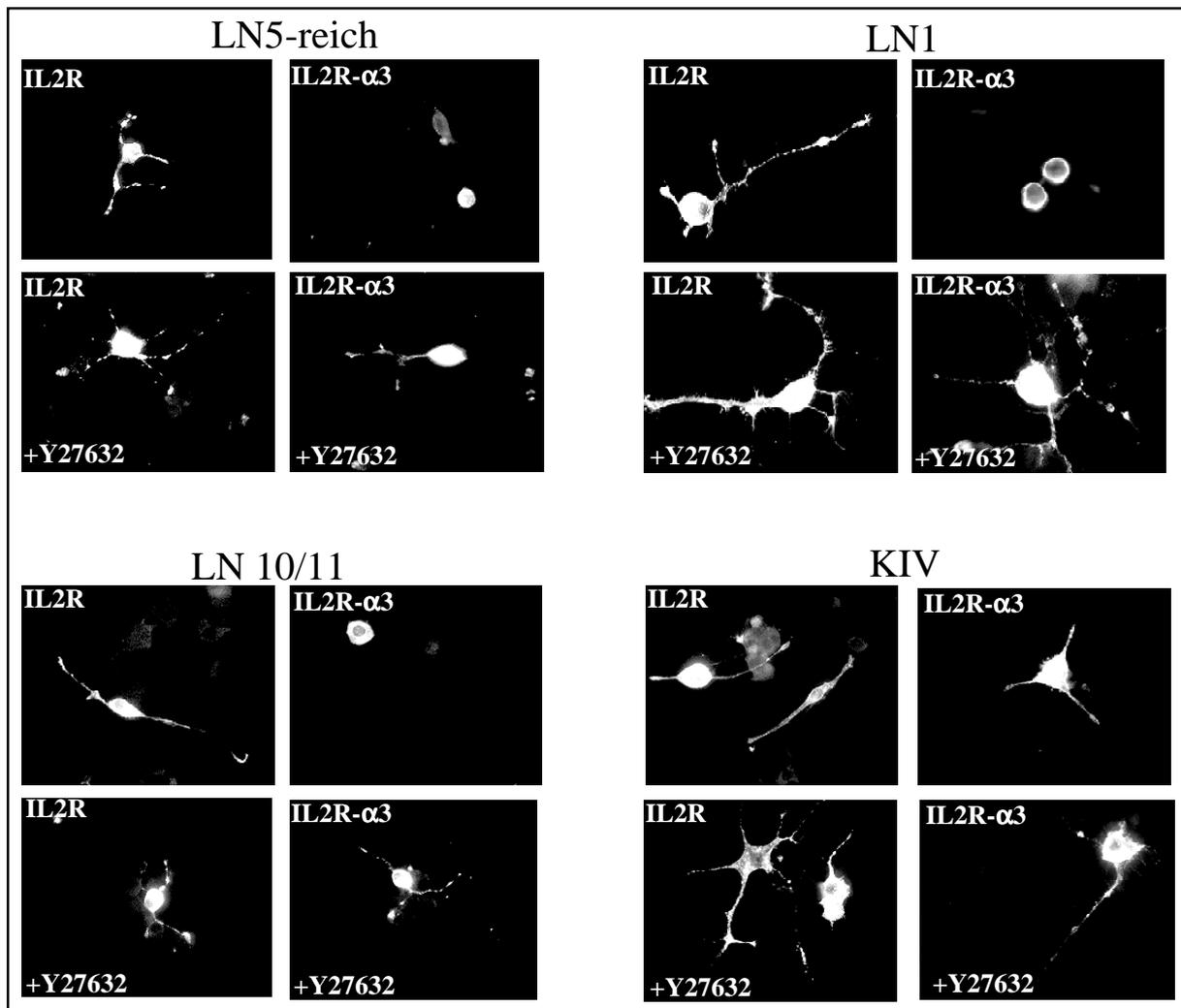


Abb. 29: Stimulierung des Neuritenwachstums der IL2R- $\alpha3$ -transfizierten Zellen durch Gabe von Y27632. PC12-Zellen wurden mit 50 μ M ROK α -Inhibitor Y2763 in Anwesenheit von NGF (100 ng/ml) für 48 h bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden auf Laminin-5-reicher Matrix (LN5-reich), Laminin-1 (LN1), Laminin-10/11 (LN10/11) und Kollagen IV (KIV) ausplattiert. 72 h nach Transfektion wurden die Zellen mit 4% PFA fixiert, mit dem anti-IL2R/FITC-Antikörper gefärbt, anschließend mit einem Zeiss-Axiovert-200-Mikroskop und mit einer 63 x Vergrößerung fotografiert.

Wie schon zuvor gezeigt, hatte dieser Antikörper auf Kollagen IV keinen Einfluss hinsichtlich des Neuritenwachstum von PC12-Zellen. Die Gabe des Antiköpers vermag den aktivierenden Einfluss des Inhibitors Y27632 in IL2R-transfizierten Zellen nicht zu unterdrücken (Abb. 32).

Im Vergleich dazu hemmte der anti- α 1-Integrin-Antikörper 33.4 den aktivierenden Einfluss des Inhibitors Y27632 ausschließlich auf Laminin-1, nicht aber auf Laminin-5-reicher Matrix (Abb. 33).

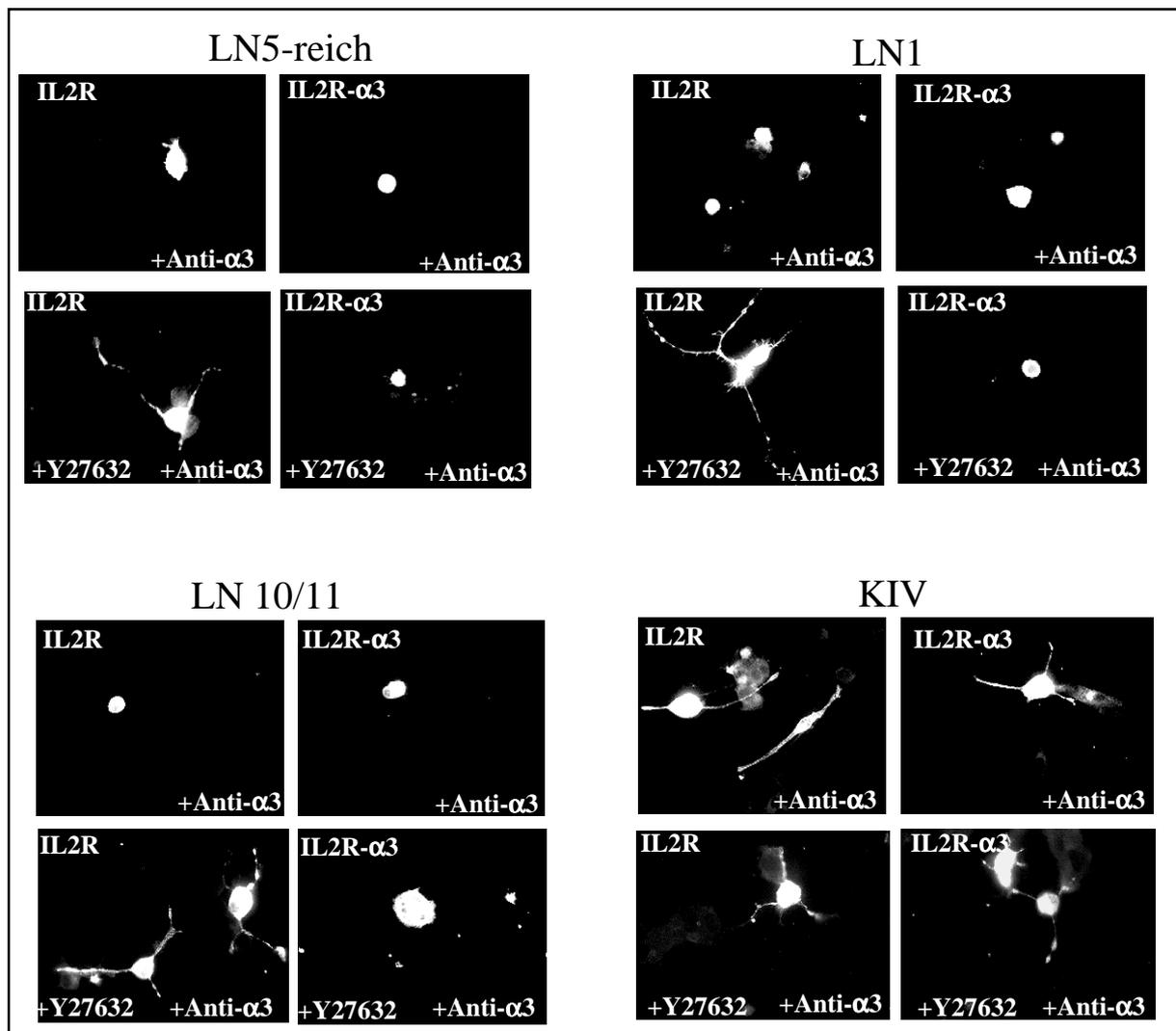


Abb. 30: Effekt des anti- α 3-Integrin-Antikörpers Ralph 3.2 und ROK α -Inhibitor Y27632 auf die Differenzierung von IL2R- α 3-transfizierten Zellen. Transfizierte PC12-Zellen wurden erst mit dem anti- α 3-Integrin-Antikörper (Ralph 3.2) (10 μ g/ml) 10 min vorinkubiert. Die Zellen wurden auf den jeweiligen Matrixproteinen (Laminin-5-reicher Matrix (LN5-reich), Laminin-1 (LN1), Laminin-10/11 (LN10/11) oder Kollagen IV) ausgesät, dann mit Y27632 (50 μ M) behandelt und mit 100 ng/ml NGF stimuliert. Nach 48 h wurden die Zellen mit 4% PFA fixiert, mit dem anti-IL2R/FITC-Antikörper gefärbt und am Zeiss-Mikroskop mit einem 63 x Objektiv fotografiert.

Zellen, die mit den IL2R- α 1-Chimären transfiziert wurden, zeigten ein ähnliches Verhalten im Hinblick auf das Neuritenwachstum. IL2R- α 1-Zellen blieben auf Laminin-1 rund, während sie auf Laminin-5-reicher Matrix unbeeinflusst differenzierten.

Der ROK α -Inhibitor Y27632 konnte auch hier den hemmenden Einfluss der IL2R- α 1-Chimäre aufheben. Die extrazelluläre Blockierung der α 1-Integrin-Untereinheit durch den anti- α 1-Integrin-Antikörper 33.4 hob den aktivierenden Einfluss des Inhibitors Y27632 auf Laminin-1 jedoch wieder auf.

Auf Laminin-5-reicher Matrix (kein α 1 β 1-spezifischer Ligand) hatte der Antikörper keinen Effekt, diese Zellen differenzierten zu einem neuronalen Phänotyp (Abb. 33).

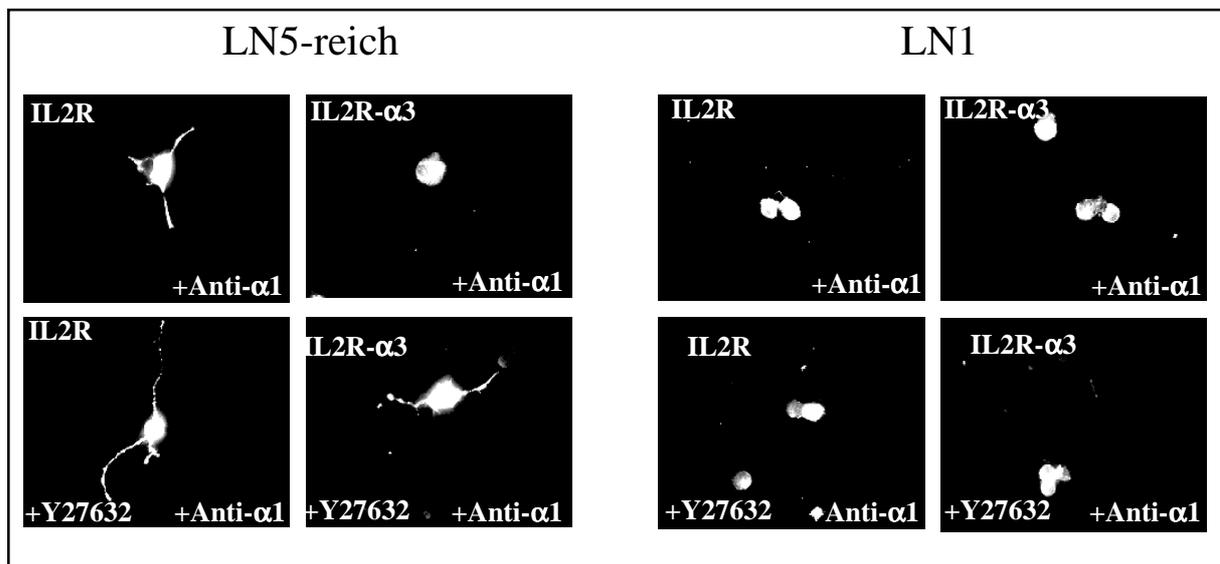


Abb. 31: Effekt des anti- α 1-Integrin-Antikörpers und des ROK α -Inhibitors Y27632 auf die Differenzierung von IL2R- α 3-transfizierten Zellen. Die Zellen wurden mit dem anti- α 1-Integrin-Antikörper (33.4) (10 μ g/ml) vorinkubiert und wie in Abb. 30 behandelt. Die Zellen wurden in diesem Experiment auf Laminin-5-reicher Matrix (LN5-reich) und auf Laminin-1 (LN1) ausplattiert. Nach 72 h wurden die Zellen mit 4% PFA fixiert, mit dem anti-IL2-R/FITC-Antikörper gefärbt am Zeiss-Axiovert-200-Mikroskop und mit einem 63 x Objektiv fotografiert.

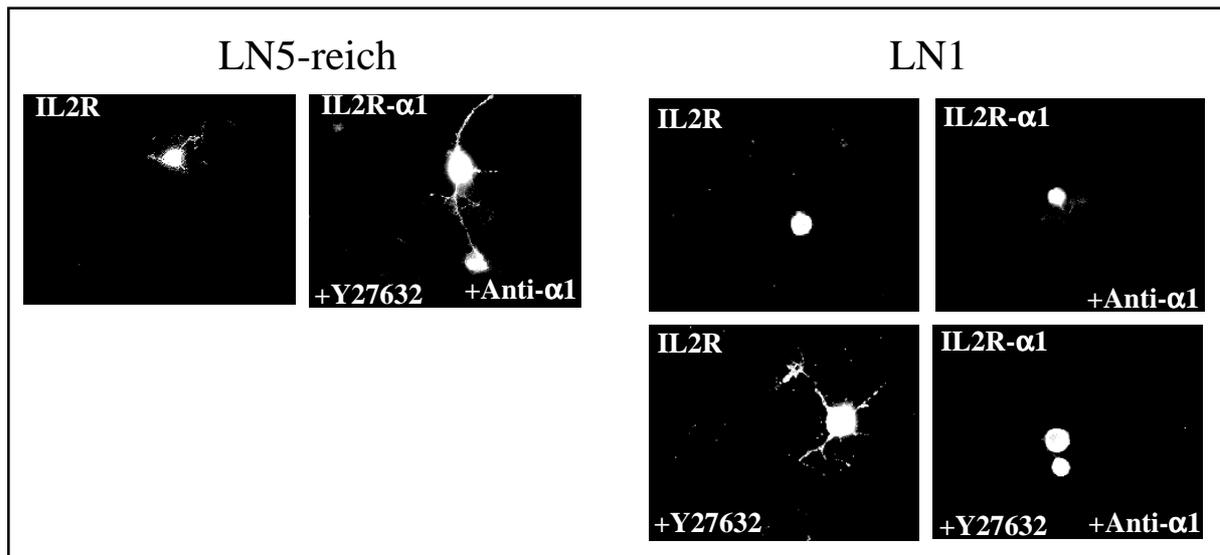


Abb. 32: Effekt des anti- α 1-Integrin-Antikörpers und des ROK α -Inhibitors Y27632 auf die Differenzierung von IL2R- α 1-transfizierten Zellen. IL2R- α 1- transfizierte Zellen wurden mit anti- α 1-Integrin-Antikörper (33.4) (10 μ g/ml präinkubiert, mit Y27632 (50 μ M) behandelt und auf Laminin-1 (LN1) oder Laminin 5-reicher Matrix (LN5-reich) ausgesät. Nach 72 h wurden die Zellen mit 4% PFA fixiert, mit einem anti-IL2R/FITC gefärbt, am Zeiss-Axiovert-200-Mikroskop und mit einer 63 x Vergrößerung fotografiert.

Das α 3 β 1-Integrin ist in Maus-Keratinocyten nicht nur für die Aktivierung der kleinen GTPase Rac1 notwendig, sondern moduliert auch die Bildung der Lamellipodien [Choma et al., 2004]. Zur Untersuchung der Rolle der kleinen GTPase Rac1 bei der Integrin-vermittelten Zelldifferenzierung in PC12-Zellen wurden die letzten transient doppelt-transfiziert.

Die auf Laminin-5-reicher Matrix adhären PC12-Zellen wurden gleichzeitig mit den chimeren Rezeptoren IL2R- α 3 bzw. IL2R und mit dominant negativem Rac (N17Rac), bzw. mit konstitutiv aktivem Rac (L61Rac) oder mit Leer-Vektor, der als Kontrolle diente, transient transfiziert. Zum Nachweis der Protein-Expression wurden die Solubilisate der transfizierten Zellen im SDS-PAGE aufgetragen und im Westernblot auf die Anwesenheit der transfizierten Konstrukte überprüft. Die Ermittlung der Rac-Konstrukte in den IL2R- und IL2R- α 3-Zellen erfolgte mittels eines monoklonalen Antikörpers, gegen die in diesem Protein enthaltenen Myc-Tags. Die IL2R-Konstrukte wurden mittels eines anti-IL2-Rezeptor-Antikörpers nachgewiesen (Abb. 33).

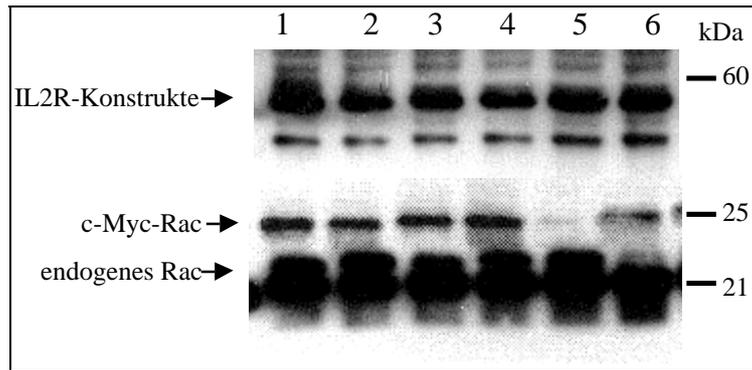


Abb. 33: Nachweis der überexprimierten Rac1-Konstrukte in IL2R- α 3- und IL2R-transfizierten Zellen.

PC12-Zellen wurden mit IL2R- und Rac1-Konstrukten mittels Lipofectamin transfiziert und auf Laminin-5-reicher Matrix für 48 h mit NGF (100 ng/ml) zum Differenzieren stimuliert. Die Zellen wurden lysiert und in einem Tricin-Gel aufgetrennt. Das endogene Rac wurde mittels eines anti-Rac-Antikörpers detektiert, die überexprimierten Rac-Konstrukte wurden mittels eines anti-c-Myc-Antikörpers und die IL2R-Konstrukte mit einem anti-IL2R-Antikörper nachgewiesen. Als Kontrollen wurden wt-Rac1 und ein Leer-Vektor verwendet.

1: IL2R- α 3 + L61Rac, 2: IL2R α 3 + N17Rac, 3: IL2R + L61Rac, 4: IL2R + N17Rac, 5: IL2R + Leer-Vektor und 6: IL2R + wt-Rac.

Für Immunfluoreszenz-Analysen wurden die Zellen 24 h nach Transfektion auf beschichtete Objektträger gebracht, mit NGF stimuliert und für weitere 48 h in Kultur gehalten. Anschließend wurden die IL2R-Chimären mit dem anti-IL2R/FITC-gekoppelten Antikörper nachgewiesen und die cMyc-Konstrukte wurden mit dem anti-cMyc-Cy3-konjugierten Antikörper, der die Rac-Konstrukte erkennt, detektiert. Es wurden Einzelbilder jeder Färbung aufgenommen.

Auf Laminin-5-reicher Matrix (Abb. 34 A) und auf Laminin-1 (Abb. 34 B) zeigen die IL2R- α 3- sowie die IL2R-Zellen nach Transfektion mit konstitutiv aktivem Rac (L61Rac) eine igelartige Morphologie, sogenannte Rosetten. Hingegen hinderte die Transfektion des dominant negativen Rac (N17Rac) die Neuritenbildung und die Zellen blieben rund.

IL2R-Zellen, die mit Leer-Vektor und mit Wildtyp-Rac transfiziert wurden und als Kontrollen dienten, differenzierten zu neuronalen Zellen (Abb. 34 C). Zu beobachten war, dass die Zellen eine starke Färbung aufwiesen, was auf eine Überexpression der Rac-Konstrukte zurückzuführen war.

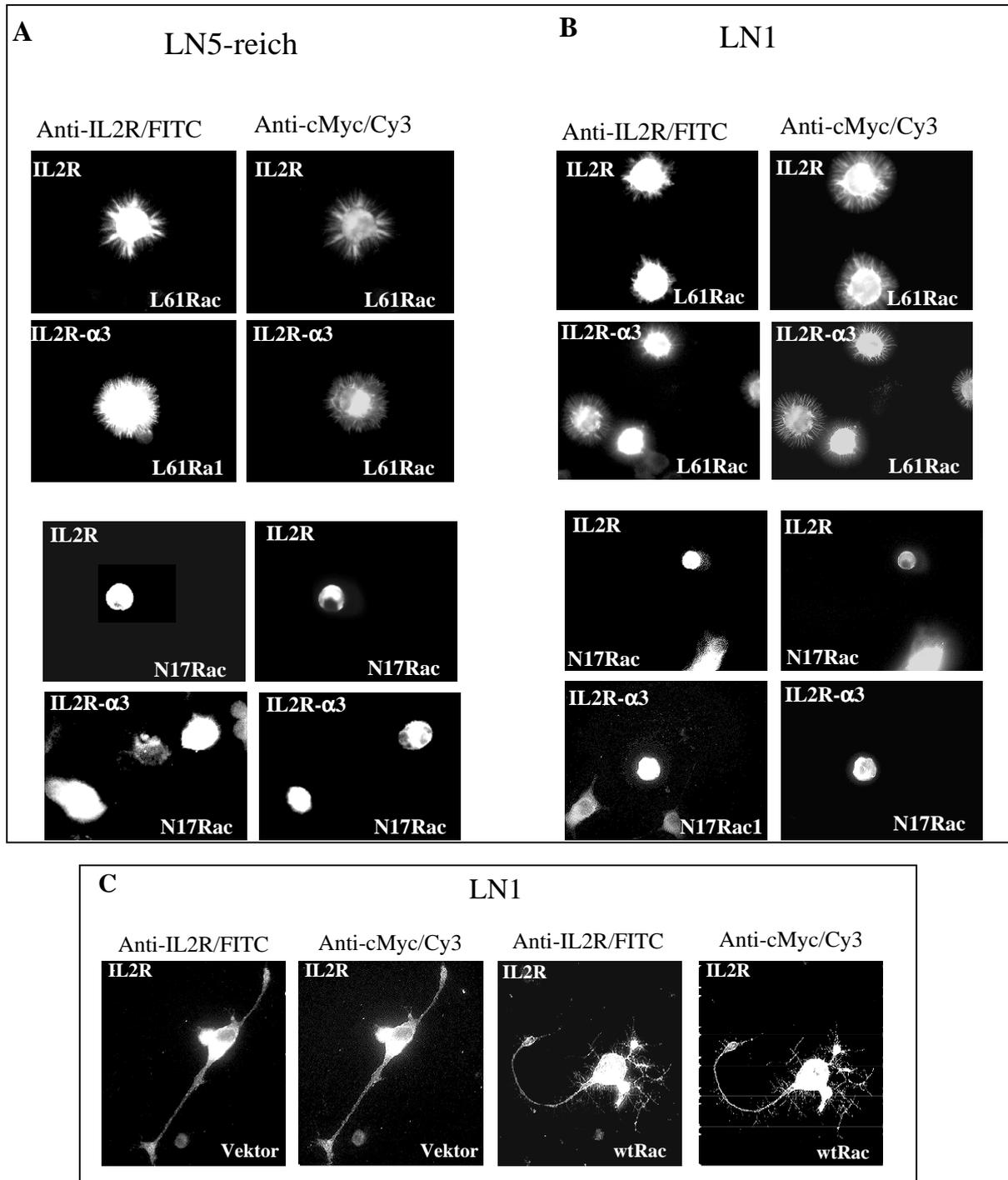


Abb. 34: Effekte von L61Rac und N17Rac auf die Differenzierung von IL2R- und IL2R- α 3-transfizierten Zellen. Die IL2R-Konstrukte (IL2R und IL2R- α 3) wurden mit den Rac-Konstrukten L61Rac und N17Rac **A** und **B**, Leer-Vektor und wtRac **C** mittels Lipofectamin transfiziert und auf Laminin-5-reicher Matrix (LN5-reich) **A** oder Laminin-1 (LN1) **B** und **C** ausplattiert und mit NGF stimuliert. Die Detektion der IL2R-Chimären wurde mittels des anti-IL2-R/FITC-gekoppelten Antikörpers ermittelt. Die Färbung der Rac-Konstrukte erfolgt mittels eines anti-c-Myc-Cy3-konjugierten Antikörpers. Die Analyse der Immunofluoreszenzen wurde am Zeiss-Axiovert-200 Mikroskop und mit einer 3 x Vergrößerung fotografiert.

Zur Untersuchung der Beteiligung der kleinen GTPase RhoA in diesen Prozessen wurden IL2R- α 3- bzw. IL2R-exprimierende Zellen, die mit konstitutiv aktivem Rac (L61Rac) oder dominant negativem Rac transfiziert wurden, zusätzlich mit ROK α -Inhibitor Y27632 zur Hemmung des Rho-Signalweges behandelt.

Auf Laminin-5-reicher Matrix induzierte die Gabe von Y27632 die neuronale Differenzierung von IL2R- α 3- und IL2R-exprimierenden Zellen, die mit L61Rac transfiziert wurden.

Der durch die Transfektion mit L61Rac induzierte, fillopodienartige Phenotyp, wurde durch Gabe von Y27632 supprimiert und die Zellen differenzierten unabhängig von der α 3-Sequenz zu einem neuronalen Phenotyp. Dadurch, dass der Zellkörper stark gefärbt war, waren die zahlreichen Fillopodien hingegen schwächer gefärbt. IL2R- bzw. IL2R- α 3-transfizierten Zellen, die N17Rac überexprimierten, differenzierten in keinem der untersuchten Fälle. Allerdings stimulierte die Gabe von Y27632 die IL2R-transfizierten Zellen zum Neuritenwachstum, wobei die IL2R- α 3-transfizierten Zellen vollkommen rund blieben (Abb. 35 A).

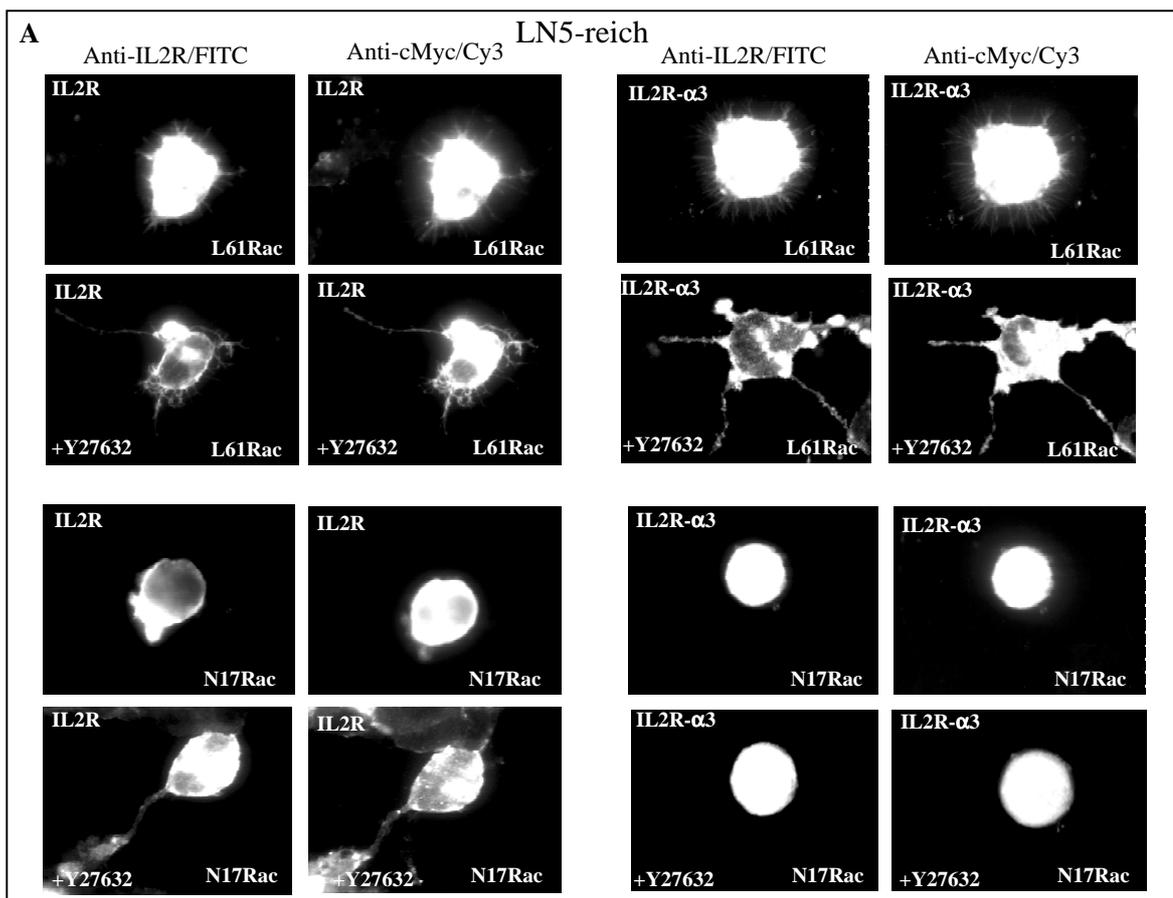
Auf Laminin-1 führte die Y27632-Behandlung der IL2R- und IL2R- α 3-exprimierenden Zellen, die zusätzlich mit L61Rac transfiziert wurden, zum Neuritenwachstum. Die Neuriten der IL2R- α 3-transfizierten Zellen waren jedoch weniger ausgeprägt, dennoch war der Zellkörper dieser Zellen ausgestreckt. Die Zellen, die mit N17Rac transfiziert wurden, blieben rund. Die Gabe von Y27632 führte zur Aufhebung des dominant negativen Effekts von N17Rac in IL2R-exprimierenden Zellen, wie schon auf Laminin-5 beobachtet wurde. Allerdings zeigten die IL2R- α 3-transfizierten Zellen durch Gabe von Y27632 einen ausgestreckten Zellkörper und blieben nicht vollständig rund, wie es auf Laminin-5 der Fall war (Abb. 35 B).

Auf Laminin-10/11 konnte gezeigt werden, dass die IL2R- und IL2R- α 3-transfizierten Zellen die L61Rac oder N17Rac überexprimierten, den gleichen Phenotyp aufwiesen wie schon auf Laminin-5-reicher Matrix und Laminin-1 gezeigt wurde. Diese sind in Abbildung 35 C deutlich zu erkennen.

Durch Gabe von ROK α -Inhibitor Y27632 wurden die IL2R- α 3 und die IL2R-exprimierenden Zellen unabhängig von der α 3-cytoplasmatischen Domäne zum Differenzieren stimuliert (Abb. 35 C und D).

Auf Kollagen IV unterscheidet sich der fillopodienartige Phenotyp, der durch die Transfektion von konstitutiv aktivem Rac induziert wurde, von dem, der auf Laminin-5-reicher Matrix oder auf Laminin-1 beobachtet wurde.

Die Zellen zeigten auf Kollagen IV längere Fillopodien, die als Neuritenvorläufer betrachtet werden können und die nach Gabe von Y27632 in Neuriten übergehen und bildeten ein ausgeprägtes neuronales Netzwerk (Abb. 35 D).



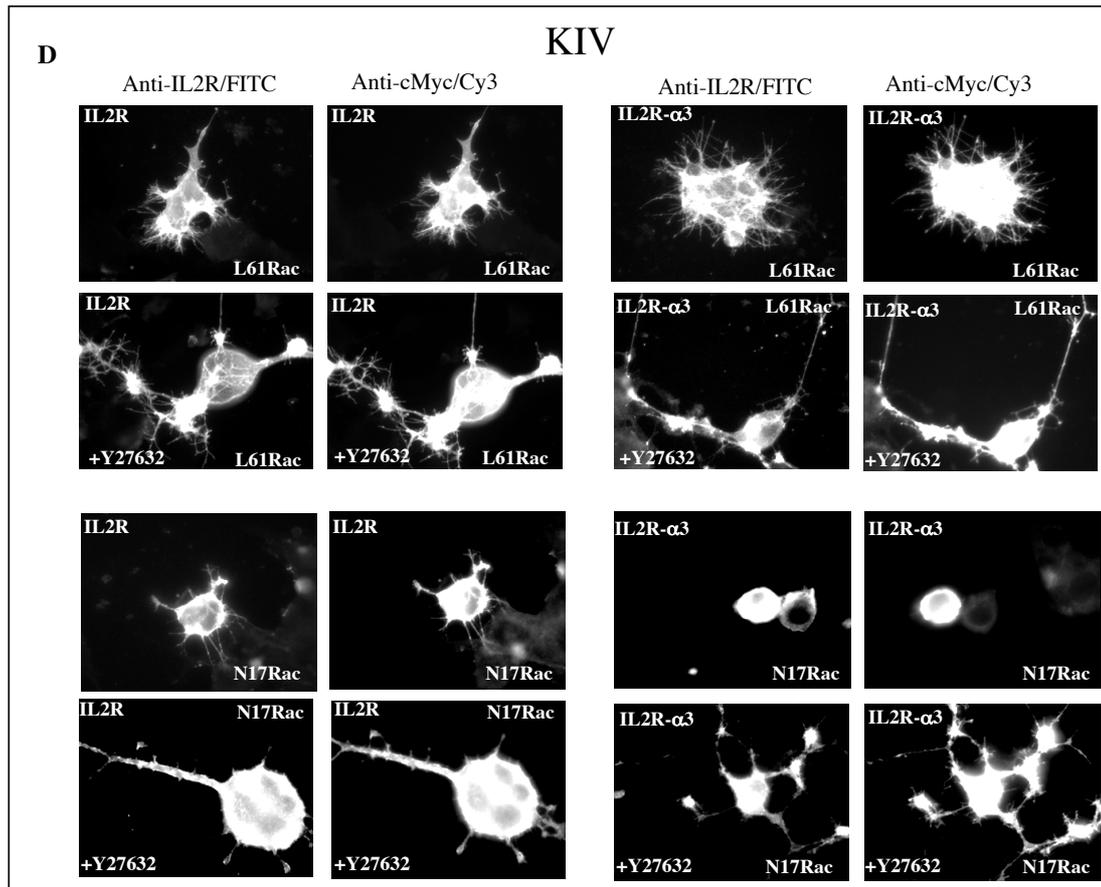


Abb. 35: Einfluss des ROK α -Inhibitors Y27632 auf die Morphologie der doppelt-transfizierten PC12-Zellen. PC12-Zellen wurden gleichzeitig mit den IL2R-Chimären (IL2R und IL2R- α 3) und mit konstitutiv aktivem Rac (L61Rac) oder mit dominant negativem Rac (N17Rac) mittels Nucleofektion transient transfiziert. Die Zellen wurden 24 h nach der Nucleofektion mit NGF (100 ng/ml) und mit oder ohne Gabe von ROK α -Inhibitor Y27632 (50 μ M) auf Matrix-Protein ausgesät. Die Detektion der transfizierten Konstrukte erfolgt wie in Abb. 34. Laminin-5-reicher Matrix (LN5-reich) **A**, Laminin-1 (LN1) **B**, Laminin-10/11 (LN10/11) **D** und **C**. Kollagen IV (KIV).

3.2.2.6. Nachweis der ERK1/2-Phosphorylierung in IL2- α 3-Zellen

Aktivierung der Integrine führt in vielen Zellsystemen zur Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden. Dabei werden verschiedene cytosolische Adapter- sowie Signal-Proteine in den fokalen Adhäsionen rekrutiert, die bei der Signalweiterleitung eine Rolle spielen. Sowohl Wachstumsfaktor-Rezeptoren als auch Integrine können die MAPK-Signalkaskade über ERKs aktivieren [Huang & Reichardt, 2003]. Aktivierte ERKs phosphorylieren in der Zelle entweder verschiedene cytoplasmatische Substrate, oder sie werden in den Zellkern transloziert, wo sie Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und die Transkription von Genen, die für Adhäsion, Proliferation und Überleben wichtig sind, regulieren.

Zur Untersuchung des Signalweges in IL2R- α 3- und IL2R-transfizierten Zellen wurden diese Zellen 72 h nach Transfektion auf Laminin-5-reicher Matrix für verschiedene Zeiten replattiert. Im Westernblot konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der ERK1/2 in IL2R- α 3-exprimierenden Zellen anders verläuft als in den IL2R-exprimierenden Kontrollzellen. In IL2R- α 3-transfizierten Zellen 20 min nach Adhäsion auf Laminin-5-reicher Matrix kommt es zu einer beschleunigten Aktivierung von ERK1/2. Das Signal klingt jedoch 60 min nach Adhäsion schneller ab als in IL2R-transfizierten Zellen. Die Aktivierung der ERK1/2 durch NGF verläuft jedoch unabhängig von der cytoplasmatischen α 3-Sequenz (Abb. 37).

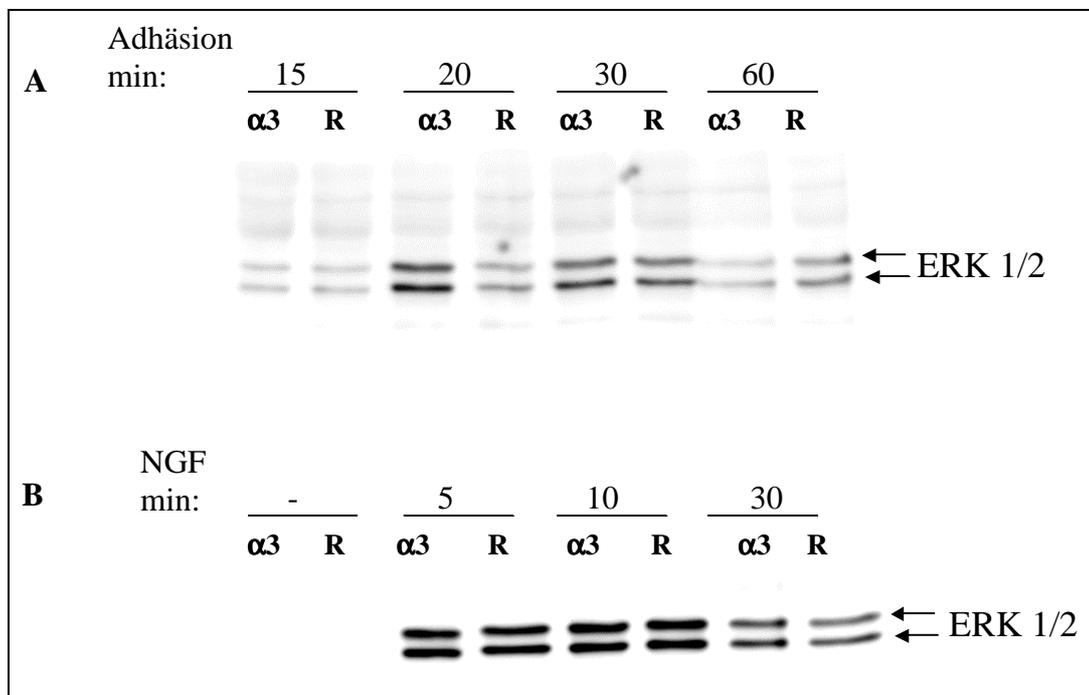


Abb. 37 : Integrin-abhängige Aktivierung der ERK1/2 in IL2R- α 3- und IL2R-exprimierenden Zellen. IL2R- α 3- und IL2R-transfizierten Zellen wurden 72 h nach Transfektion auf Laminin-5-reicher Matrix replattiert. Einerseits wurde die Adhäsionszeit variiert A, andererseits wurde die Zeit der NGF-Stimulation verändert B. 50 μ g/ml des Gesamtproteins wurden auf einem 10%igen SDS-Gel aufgetragen. ERK1/2 wurden mit einem anti-p-ERK1/2-Antikörper, der die phosphorylierten ERKs erkennt und detektiert.