

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Beteiligung des $\alpha 3\beta 1$ -Integrins an der Adhäsion, der Zell-Proliferation sowie beim Auswachsen von Neuriten in PC12-Zellen unter besonderer Berücksichtigung der $\alpha 3$ -cytoplasmatischen Sequenz des $\alpha 3\beta 1$ -Integrins untersucht.

PC12-Zellen exprimieren das $\alpha 3\beta 1$ - und das $\alpha 1\beta 1$ -Integrin, nicht aber das dem $\alpha 3\beta 1$ sehr ähnlichen $\alpha 6\beta 1$ -Integrin. Während das $\alpha 1\beta 1$ -Integrin Zell-Matrix-Adhäsion und das Auswachsen von Neuriten auf Kollagen IV und Laminin-1 unterstützt, spielt das $\alpha 3\beta 1$ -Integrin bei der Adhäsion auf seinen Liganden Laminin-5 und Laminin-1 nur eine untergeordnete Rolle, während es für das Auswachsen der Neuriten auf diesen Matrixproteinen essentiell ist.

In Untersuchungen zur Funktion der $\alpha 3$ -cytoplasmatischen Sequenz des $\alpha 3\beta 1$ -Integrins wurden chimäre Rezeptoren, die aus der extrazellulären Domäne des IL2-Rezeptors und der $\alpha 3$ -cytoplasmatischen Sequenz des $\alpha 3\beta 1$ -Integrins bestehen, in einem negativ-dominanten Ansatz verwendet.

Untersuchungen mit diesen chimären Proteinen ergaben, dass die cytoplasmatische $\alpha 3$ -Sequenz notwendig für die Integrin-abhängige Zell-Proliferation sowie für das Neuritenwachstum ist. IL2R- $\alpha 3$ -transfizierte Zellen wiesen eine gesteigerte Proliferationsrate auf und waren nicht in der Lage, nach NGF-Stimulation Neuriten auszubilden. Die endogene $\alpha 3$ -Sequenz wirkt somit offensichtlich Proliferations-hemmend und Differenzierungsfördernd.

Mit Hilfe von pharmakologischen Inhibitoren und geeigneten cDNA-Konstrukten konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der Differenzierung durch die IL2R- $\alpha 3$ -Chimäre möglicherweise auf einer Störung des Crosstalks zwischen den kleinen GTPasen RhoA und Rac1 beruht. Es ist beschrieben, dass Rac1 im Verlauf des Neuritenwachstums aktiviert wird, während der RhoA-Signalweg inaktiviert werden muss.

Die Kotransfektion von konstitutiv aktivem Rac in IL2R- α 3-transfizierten Zellen induzierte die Bildung von Filopodien, nicht aber die Bildung von Neuriten, während dominant negatives Rac1 komplett die Ausbildung von Zell-Ausläufern inhibiert.

Die Blockierung der RhoA-Kinase ROK α durch den pharmakologischen Inhibitor Y27632 konnten den durch IL2R- α 3 hervorgerufenen dominant negativen Effekt in PC12-Zellen auf Laminin-5 und Laminin-1 aufheben. Die sich bildenden Neuriten waren jedoch dünner als die in Wildtyp-Zellen. Erst die Gabe des ROK-Inhibitors bei gleichzeitiger Transfektion von konstitutiv aktivem Rac erzeugt einen Phänotyp, der den differenzierten Wildtyp-Zellen sehr ähnlich ist. Dies weist darauf hin, dass die cytoplasmatische Sequenz vor allem an der Inaktivierung des RhoA-Signalweges beteiligt ist.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die cytoplasmatische Sequenz der α 3-Integrin-Untereinheit einen Einfluss auf die Aktivierung der MAPK-Signalkaskade besitzt.

Summary

This thesis presents data on $\alpha3\beta1$ -integrin mediated cell adhesion, proliferation and neurite outgrowth of PC12-cells was investigated with respect to $\alpha3$ -cytoplasmic sequence.

PC12-cells express $\alpha3\beta1$ - and $\alpha1\beta1$ -, but not $\alpha6\beta1$ -integrin which is similar to $\alpha3\beta1$ -integrin. $\alpha1\beta1$ -integrin mediates cell adhesion and neurite outgrowth to collagen IV and laminin-1, while $\alpha3\beta1$ -integrin plays only a minor role in adhesion to its ligands laminin-5 and laminin-1. However it is essential for neurite outgrowth on both matrices.

In this study the function of the $\alpha3$ -cytoplasmic sequence of $\alpha3\beta1$ -integrin was analysed using as a dominant negative approach chimeric receptors consisting of the extracellular domain of the IL2-receptor and the intracellular sequence of the $\alpha3$ -integrin.

Investigations with these chimeric proteins revealed that the $\alpha3$ -cytoplasmic tail is necessary for integrin-dependent cell proliferation and neurite outgrowth. Cells transfected with this receptor showed an increase in proliferation and were able to form neurites after NGF-stimulation. Therefore the endogenous $\alpha3$ -sequence apparently inhibits proliferation and promotes differentiation.

Using pharmacological inhibitors and suitable cDNA constructs, it could be shown that the inhibition of the differentiation via the IL2R- $\alpha3$ chimera is possibly based on a disturbance of the crosstalk between the small GTPases RhoA and Rac1. It is described that Rac1 is activated during neurite outgrowth while RhoA-signal pathway has to be inactivated.

Cotransfection of constitutive active Rac1 in IL2R- $\alpha3$ transfected-cells induced the formation of filopodia, but not the formation of neurites, while dominant negative Rac1 completely inhibits formation of cell extensions.

Blocking of RhoA-kinase ROK α using the pharmacological inhibitor Y27632 eliminated the dominant negative effects of IL2R- $\alpha3$ constructs in PC12-cells on laminin-5 and laminin-1.

Nevertheless, these just formed neurites were thinner than the neurites of wildtype cells.

Only the combination of ROK α -inhibitor and simultaneous transfection with constitutive active Rac1 resulted in a phenotype that is comparable to the phenotype of differentiated wildtype cells.

This indicates that the cytoplasmic sequence is mainly engaged in inactivation of RhoA-signalling pathway.

It could be shown further that the cytoplasmic sequence of α 3-integrin subunit influences the activation of MAPK signalling cascades.