

### 3 Ergebnisse

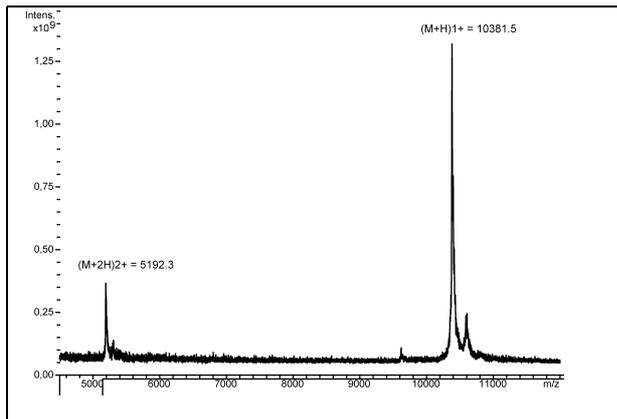
#### 3.1 Identifizierung $\alpha 3$ -Integrin-bindender Proteine mittels Affinitätschromatographie

Um den Beitrag des cytoplasmatischen Anteils der  $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit zur Funktion des  $\alpha 3\beta 1$ -Integrins zu klären, sollten potentielle cytosolische Bindungspartner der  $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit identifiziert werden. Dazu wurde der methodische Ansatz der Ligandenaffinitätschromatographie gewählt. Die für die Reinigung von Proteinen mit poly-Histidin-Markierung entwickelte  $\text{Ni}^{2+}$ -Nitrilotriessigsäure(NTA)-Agarose kann auch als Matrix für die Ligandenaffinitätschromatographie verwendet werden [Chataway und Barritt, 1995; Gu et al., 1994].

Der cytoplasmatische Bereich der  $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit besteht aus 37 Aminosäuren. Er wurde über den N-Terminus an einen Hexahistidinlinker kloniert (Vektor pRSET A) und als Fusionsprotein ( $\alpha 3$ /cyto) in *E.coli* (BL21 Zellen) exprimiert. Als Negativkontrollen wurde ein Kontrollprotein ähnlicher Größe (trunkierte UDP-N-Acetylglucosamin-2-Epimerase/N-Acetylmannosamin-Kinase in pRSET C) und ungekoppelte  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose verwendet. Die Fusionsproteine wurden mithilfe der  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose gereinigt. Die Reinigung von  $\alpha 3$ /cyto mußte unter denaturierenden Bedingungen erfolgen, da das Protein von den Bakterien in Einschlußkörper (*inclusion bodies*) verpackt wurde, die nur durch Guanidiniumhydrochlorid bzw. Harnstoff aufzubrechen waren. Nach Kopplung an die  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose wurde der Harnstoff nach und nach ausgewaschen, so daß eine Renaturierung des Proteins erfolgen konnte. Das Kontrollprotein konnte unter nativen Bedingungen aus den Bakterien gewonnen und gereinigt werden.

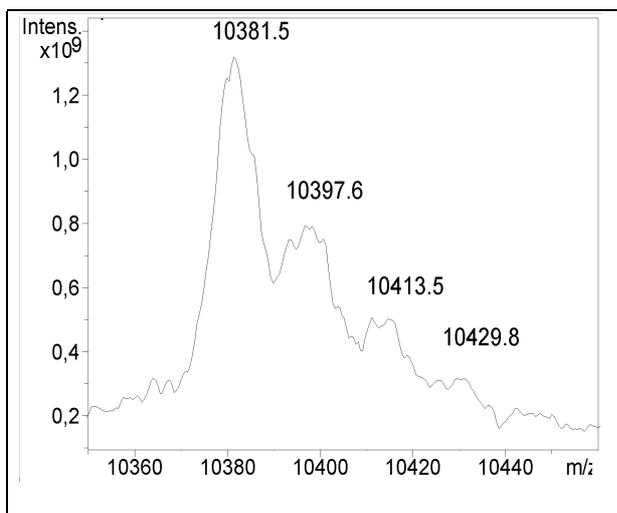
Das gereinigte Fusionsprotein  $\alpha 3$ /cyto wurde massenspektrometrisch untersucht (Kooperation mit Dr. Weise, Biochemie der FU-Berlin). Das Massenspektrum ergab den erwarteten Wert von  $10.381 \pm 10$  (Abb.9). Neben dem Hauptsignal waren weitere Signale mit einem Masseninkrement von jeweils 16 erkennbar, die wahrscheinlich auf oxidierten Methioninen beruhen (Abb.10). Das Protein enthält insgesamt 5 Methioninreste, von denen 4 außerhalb der Integrinsequenz liegen. Weitere stabile Modifikationen lagen nicht vor.

Für die Ligandenaffinitätschromatographie mit der  $\alpha 3$ /cyto-, der Kontrollprotein- und der Leersäule wurde Cytosol differenzierter PC12-Zellen (auf Kollagen-IV 72 h mit NGF kultiviert) eingesetzt.



**Abb.9 – Massenspektrum von gereinigtem Fusionsprotein  $\alpha 3$ /cyto**

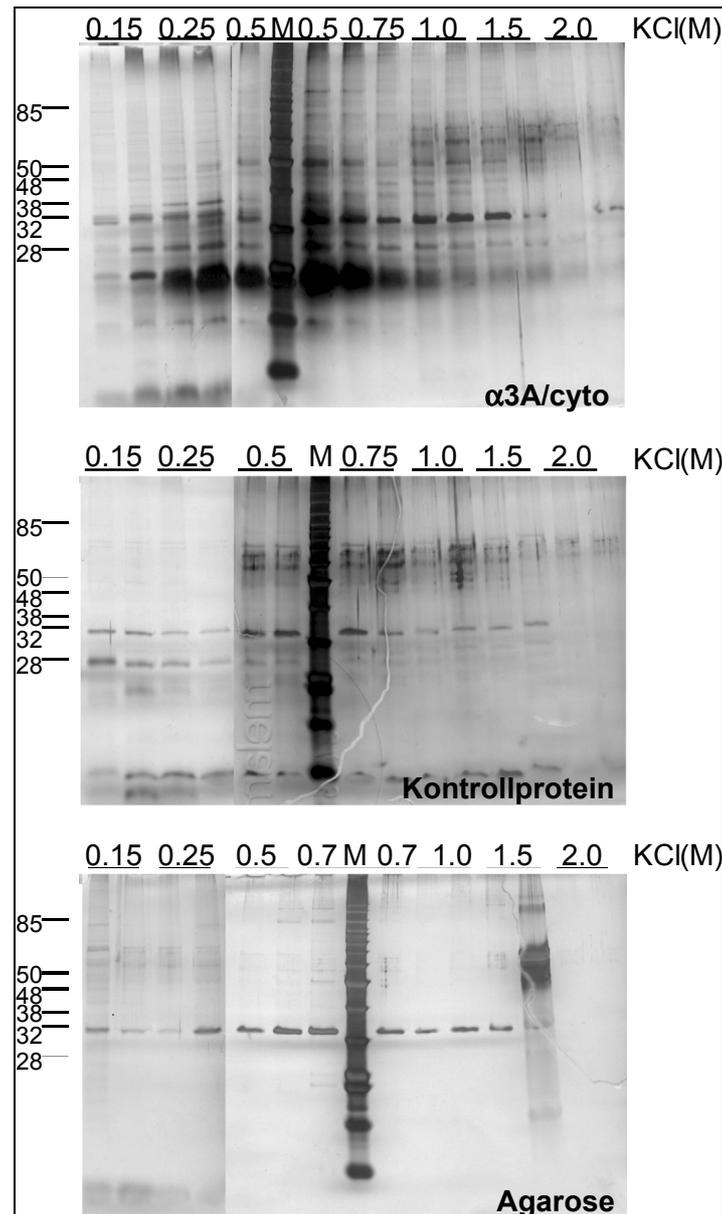
Die Messung wurde mit MALDI-TOF-MS mit Sinapinsäure als Matrix durchgeführt.



**Abb.10 – Detail des Massenspektrums von gereinigtem Fusionsprotein  $\alpha 3$ /cyto**

Während meiner Diplomarbeit wurde dieses Experiment bereits einmal durchgeführt. Dabei konnten drei von elf Proteinen nach tryptischem Verdau im Gel und massenspektrometrischer Analyse mittels Peptide-Mass-Fingerprinting identifiziert werden: Set- $\alpha$ , Lanp (*leucine-rich acidic nuclear protein*) und La/SS-B (*lupus antigen/Sjogren Syndrome B*).

Es wurden je 5 mg  $\alpha 3$ /cyto bzw. Kontrollprotein an 0,5 ml Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose gekoppelt und mit jeweils 10 mg Gesamtprotein aus dem Cytosol von differenzierten PC12-Zellen inkubiert. Abbildung 11 zeigt den Elutionsgradienten der verschiedenen Säulen nach gelelektrophoretischer Auftrennung in Silberfärbung.



**Abb.11 – Elutionsprofil der verschiedenen Säulen**

$\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose, die entweder mit dem Fusionsprotein des cytoplasmatischen Anteils der  $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit ( $\alpha 3/\text{cyto}$ ), einem Kontrollprotein oder mit keinem Protein gekoppelt wurde, wurde mit Cytosol von differenzierten PC12-Zellen inkubiert. Mit steigenden Salzkonzentrationen wurden die gebundenen Proteine eluiert, in einem 10%igen Tricin-SDS-Gel aufgetrennt und mit Silber gefärbt.

Bei der massenspektrometrischen Analyse nach tryptischem Verdau im Gel konnten sechs von zwölf Proteinen identifiziert werden. Unter diesen befanden sich die bereits in einem vorhergehenden Durchgang identifizierten Proteine Set- $\alpha$ , Lanp und La/SS-B (Diplomarbeit Diana Mutz), sowie Pal31 (*proliferation-related acidic nuclear protein*, MW 31 kDa) – ein Lanp-verwandtes Protein, DKFZp761C10121.1 – ein hypothetisches Protein mit Homologie zur Familie GTP1/OBG der GTP-bindenden Proteine und Nucleolin – ein multifunktionelles Protein, das hauptsächlich im Nucleolus der

Zelle, aber auch im Cytosol und an der Zelloberfläche zu finden ist. Die Ergebnisse der zweimal durchgeführten Ligandenaffinitätschromatographie sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

MW der Proteinbande (1./2. Experiment)	1. Durchführung Identifiziertes Protein, Sequenz-Abdeckung, MW	2. Durchführung Identifiziertes Protein, Sequenz-Abdeckung, MW
28/28	Set- $\alpha$ , 29%, 33,4	Set- $\alpha$ , 23%, 33,4
35/32	Lanp, 33%, 28,6	Lanp, 19%, 28,6
38/38	Nicht identifiziert	Pal31, 25%, 31
48/48	Nicht identifiziert	DKFZp761C10121.1, 16%, 28-45
50/50	La/SS-B, 46%, 48	La/SS-B, 29%, 48
80/85	Nicht identifiziert	Nucleolin 16%, 77

**Tab.2 – Zusammenstellung der Ergebnisse aus zwei unabhängigen Durchführungen der Ligandenaffinitätschromatographie**

Der Wert der „Sequenz-Abdeckung“ gibt an, welcher Anteil des Proteins in den über die Masse zugeordneten Peptiden wiedergefunden wird. Er wurde mit dem Programm Prospector/MS-Fit (<http://prospector.ucsf.edu/>) ermittelt. Bei einem Wert über 25% gilt die Identifikation als sicher [Schrotz-King et al., 1999].

Die Eluate der Affinitäts-Säulen wurden auf verschiedene Proteine, die im Zusammenhang mit Integrin-Signalwegen bekannt sind, im Immunoblot untersucht. Keines dieser Proteine konnte im Immunoblot nachgewiesen werden. Tabelle 3 faßt die Ergebnisse der verschiedenen Immunoblots zusammen. Entweder binden diese Proteine nicht an die  $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit oder in dem von uns gewählten Versuchsansatz findet keine bzw. keine nachweisbare Interaktion statt. Nucleolin konnte im Immunoblot nicht nachgewiesen werden, obwohl es massenspektrometrisch als Bindungspartner gefunden wurde (Tab.3), was auf die geringe Sensitivität des Antikörpers zurückgeführt werden kann. Lanp hingegen konnte mit einem polyklonalen Antikörper in den Eluaten der  $\alpha 3$ /cyto-Säule nachgewiesen werden, während die Eluate der Kontrollsäulen kein Lanp enthielten (Abb.12).

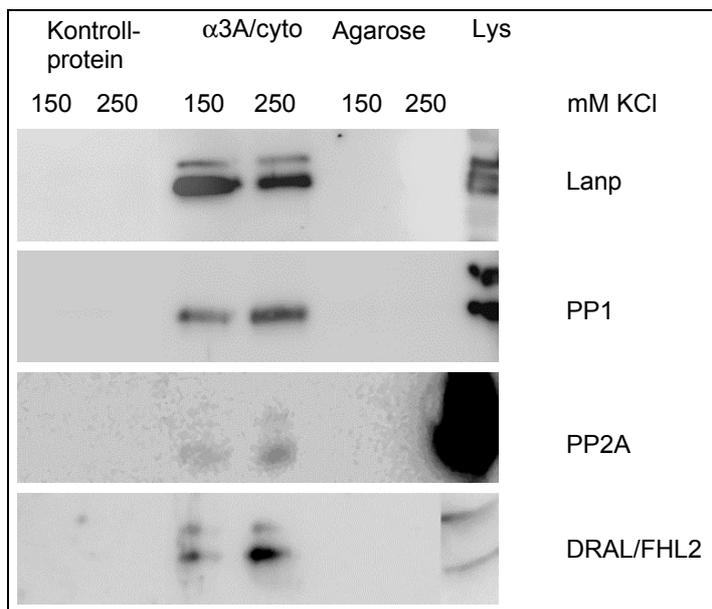
Da sowohl Set- $\alpha$  als auch Lanp als Inhibitoren der Serin-Threonin-Phosphatase PP2A beschrieben wurden [Li et al., 1995; Li et al., 1996], wurde auch nach den Phosphatasen PP1 und PP2A (Proteinphosphatase 1 und 2) gesucht. Die Phosphatase PP1 konnte

in den Eluaten der  $\alpha 3$ /cyto-Säule nachgewiesen werden, während beide Kontrollsäulen keine PP1 gebunden haben (Abb.12). Die PP2A konnte als ganz schwache Bande bei der  $\alpha 3$ /cyto-Säule identifiziert werden. Bei den Kontrollen ist keine Bande sichtbar (Abb.12).

Protein	Nachweis in Eluaten der $\alpha 3$ /cyto-Säule	Protein	Nachweis in Eluaten der $\alpha 3$ /cyto-Säule
PLC $\gamma$	NEIN	JAB1	NEIN
PI3K, p85 reg. Untereinheit	NEIN	$\beta$ -Tubulin	NEIN
Paxillin	NEIN	Nucleolin	NEIN
FAK	NEIN	Lanp	JA
Pyk	NEIN	PP1 kat. Untereinheit	JA
$\alpha 1$ -Integrin-Untereinheit	NEIN	PP2A kat Untereinheit	JA
$\beta 1$ -Integrin-Untereinheit	NEIN	DRAL/FHL2	JA
Calreticulin	NEIN		

**Tab.3 – Zusammenstellung der Immunoblots mit Eluaten der Ligandenaffinitätschromatographie**

Die Bestätigung zur Anwendbarkeit der Ligandenaffinitätschromatographie zur Identifizierung von  $\alpha 3$ -bindenden Proteinen lieferte die Inkubation der Eluate mit einem Antikörper gegen DRAL/FHL2, der von der Arbeitsgruppe Aumailley (Universität Köln) zur Verfügung gestellt wurde. DRAL/FHL2 ist ein Bindungspartner des cytoplasmatischen Bereichs der  $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit [Wixler et al., 2000], der ursprünglich durch einen *yeast two-hybrid screen* identifiziert worden ist. Dieses Protein wird nur vom Fusionsprotein  $\alpha 3$ /cyto zurückgehalten, die Kontrollen sind frei von DRAL/FHL2 (Abb.12).



**Abb.12 – Immunoblots mit Eluaten der Ligandenaffinitätschromatographie**

Verschiedene Elutionsfraktionen der Affinitätsäulen wurden mittels SDS-PAGE getrennt, geblottet und mit Antikörpern gegen Lanp, PP1, PP2A und DRAL/FHL2 inkubiert. Das Lysat von PC12-Zellen (Lys) diente als Positivkontrolle für die Antikörperentwicklung mit verstärkter Chemilumineszenz.

Somit konnten mit diesem experimentellen Ansatz Set, Lanp und La/SS-B als Bindungspartner der  $\alpha$ 3-Integrin-Untereinheit reproduzierbar nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte der massenspektrometrische Befund für Lanp durch den Nachweis mit Antikörpern im Immunoblot bestätigt werden. Die Identifikation von DRAL/FHL2, einem bereits bekannten Interaktionspartner des cytoplasmatischen Bereichs der  $\alpha$ 3-Integrin-Untereinheit, untermauert, daß die Affinitätschromatographie zur Identifizierung von Liganden prinzipiell anwendbar ist.

### **3.2 Generierung von peptidspezifischem Antikörper gegen Lanp und Untersuchung von Lanp**

Die weitere Arbeit konzentrierte sich auf die Integrin-Interaktion mit Lanp, da dieses Protein funktionell am Interessantesten erscheint: zum einen spielt es während der Entwicklung cerebraler Neuronen im Maushirn eine Rolle [Matsuoka et al., 1994] und zum anderen reguliert es die Serin-/Threoninphosphatasen PP1 und PP2A [Li et al., 1995; Li et al., 1996], die ebenfalls mit der  $\alpha$ 3-Integrin-Untereinheit wechselwirken. Da zum Zeitpunkt der Durchführung der Arbeiten kein Antikörper gegen Lanp kommerziell erhältlich war, wurden peptidspezifische polyklonale Antikörper in zwei Kaninchen gegen je zwei Peptide bei der Firma Eurogentech generiert.

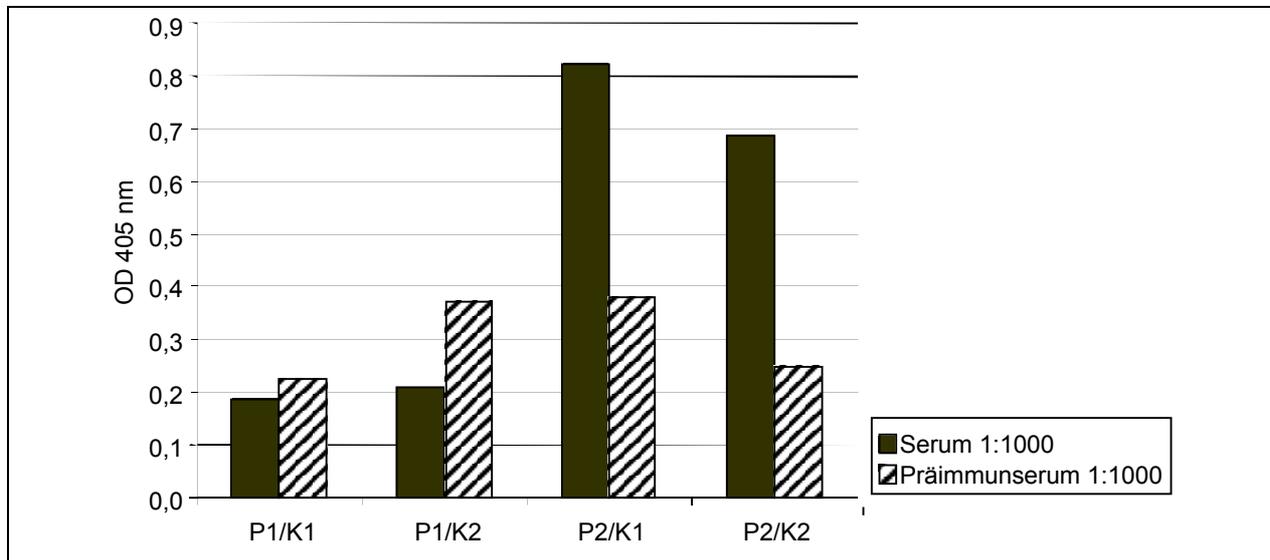
#### **3.2.1 Auswahl immunogener Bereiche**

Um möglichst immunogene Bereiche aus dem Gesamtprotein auszuwählen, wurde die Sequenz von Lanp aus der Ratte (Swiss Prot Eintrag P49911) auf Bereiche untersucht, die mit hoher Wahrscheinlichkeit an der Proteinoberfläche zu finden sind und daher für Antikörper leicht zugänglich sein sollten. Dazu wurde das Programm ProtScale (<http://www.expasy.org/tools/protscale.html>) verwendet. Unter Berücksichtigung der Hydrophilie nach Hopp & Woods [Hopp und Woods, 1981], der Hydrophobie nach Kyte & Doolittle [Kyte und Doolittle, 1982] sowie der Antigenizität nach Welling [Welling et al., 1985] wurden verschiedene Peptidbereiche in die engere Auswahl genommen. Mit diesen Peptiden wurde in der Protein-Datenbank Swiss-Prot (<http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml4.0/mspatter.html>) nach Proteinen mit ähnlichen Peptiden gesucht. Es wurden diejenigen Peptide ausgesucht, die außer in Lanp in keinem weiteren Protein vorkamen. Da Lanp einer Proteinfamilie mit diversen verwandten Proteinen angehört, die auf Protein-Ebene bis zu 70% identisch sind, ist eine Kreuzreaktivität insbesondere mit April/Pal31 (*a protein rich in leucines*) nicht

auszuschließen. Für die Immunisierung wurden letztlich die Peptide 1-15 (Peptid 1) und 147-161 (Peptid 2) eingesetzt. Die Peptide wurden mit einem zusätzlichen Cystein am C-Terminus synthetisiert, so daß sie mit dem Trägerprotein KLH (*keyhole limpet hemocyanin*) kovalent gekoppelt werden können.

### 3.2.2 Test und Reinigung der Kaninchenserum

Die Seren der beiden immunisierten Kaninchen wurden im *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) auf ihre Antikörper-Titer getestet. Beide Tiere hatten einen guten Titer gegen Peptid 2, während gegen Peptid 1 quasi keine Antikörper gebildet wurden (Abb.13). Als Kontrollen wurden die Präimmunseren beider Tiere eingesetzt.



**Abb.13 – ELISA der Lanp-Antikörper**

Die zur Immunisierung eingesetzten Peptide (P1, Peptid 1; P2, Peptid 2) wurden an einer Mikrotiterplatte immobilisiert und mit den Seren der Kaninchen (K1, Kaninchen 1; K2, Kaninchen 2) in 1:1000-facher Verdünnung inkubiert. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte über anti-Kaninchen-Antikörper, die mit Peroxidase gekoppelt waren. Die Peroxidase setzt ein Substrat zu einem Produkt anderer Farbe um, was photometrisch quantifiziert werden kann. Im Vergleich zum Serum der Tiere vor der Immunisierung (Präimmunserum) zeigen die Seren nur Antikörper gegen Peptid 2 an.

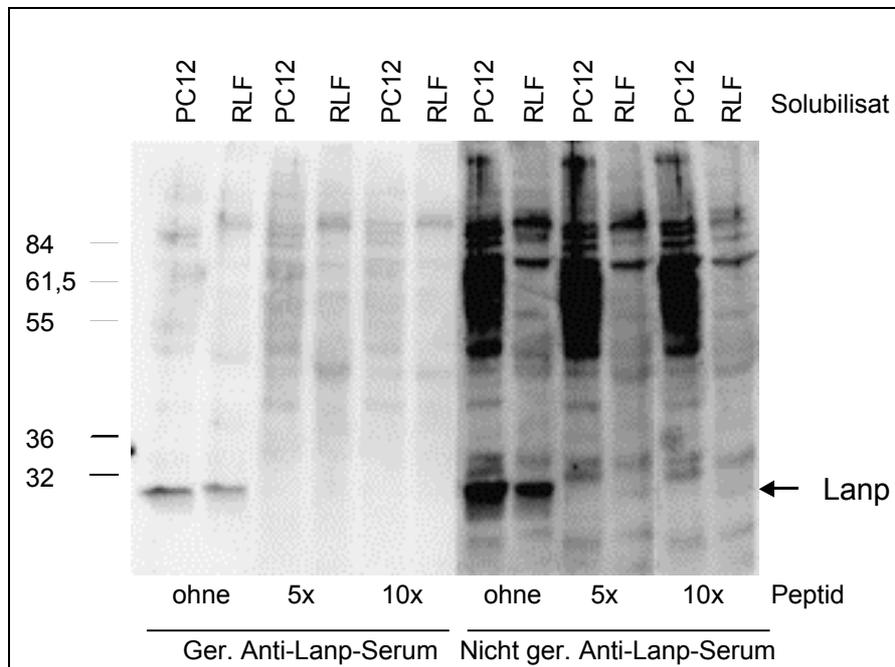
Die peptidspezifischen Antikörper aus dem Serum der Kaninchen wurden über eine Säule gereinigt, an der die Peptide 1 und 2 über das C-terminale Cystein gekoppelt wurden.

### 3.2.3 Nachweis von Lanp im Immunoblot

Zum Nachweis von Lanp im Immunoblot wurde das Lysat von PC12-Zellen und von Rattenlungenfibroblasten eingesetzt, da es sich bei beiden Zelllinien um Zellen der Ratte handelt, die  $\alpha 3\beta 1$ -Integrin in größeren Mengen exprimieren und die daher für weitere Analysen zur Interaktion des Integrins mit Lanp von Interesse sind.

Die ungereinigten Antikörper zeigten neben der Bande auf der erwarteten Höhe von 32 kDa noch weitere Banden im Bereich von 50 bis 90 kDa (Abb.14, rechte Seite).

Nach der Reinigung wurden die Antikörper in verschiedenen Konzentrationen im Immunoblot eingesetzt. Jedoch zeigte nur noch das gereinigte Serum von Kaninchen 2 die Bande bei 32 kDa. Der Antikörper kann in einer Verdünnung von 0,8  $\mu\text{g/ml}$  eingesetzt werden. Inkubiert man die gereinigten oder ungereinigten Antikörper mit einem fünffachen oder zehnfachen Überschuß an immunogenem Peptid, so verschwindet die Bande bei 32 kDa, während die weiteren Banden zwischen 50 und 90 kDa beim Nachweis mit nicht aufgereinigtem Antikörper weiterhin zu sehen sind (Abb.14). Daraus läßt sich schließen, daß es sich bei der Bande bei 32 kDa um Lanp handelt, das spezifisch vom gereinigten Antikörper erkannt wird.



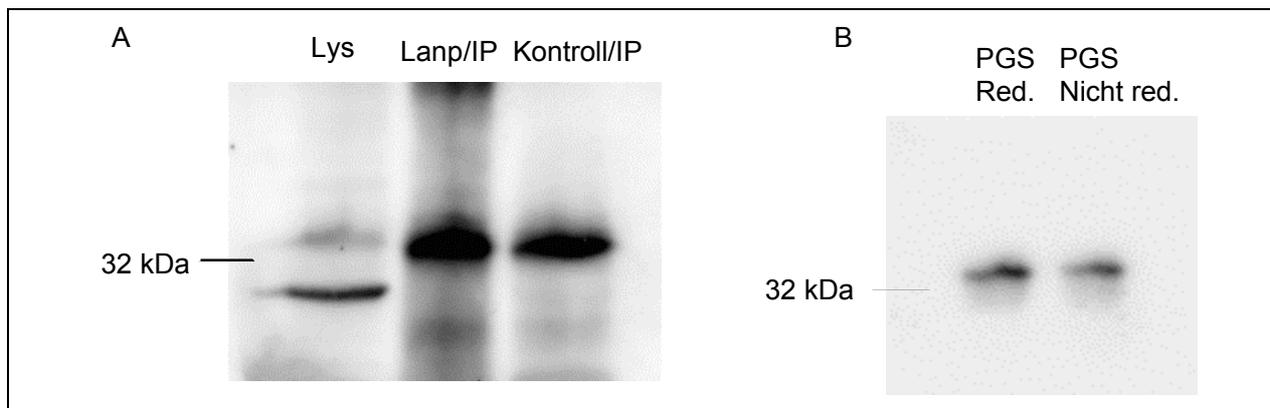
**Abb.14 – Immunoblot von Lanp**

Immunoblot mit gereinigtem bzw. nicht gereinigtem Antikörper von Kaninchen 2. Die Antikörper wurden auf 0,8  $\mu\text{g/ml}$  verdünnt und mit 5 bzw. 10x Überschuß an Peptid 1 und Peptid 2 2h lang vorinkubiert. Es wurde Solubilisat aus PC12-Zellen bzw. aus Rattenlungenfibroblasten (RLF) verwendet.

### 3.2.4 Anreicherung von Lanp durch Immunpräzipitation

Der gereinigte Antikörper gegen Lanp sollte auch für Immunpräzipitationen zur Anreicherung von Lanp aus Gesamt-Zellysat eingesetzt werden.

Dazu wurden zunächst die Antikörper an Protein-G- bzw. Protein-A-Sepharose nicht-kovalent gekoppelt und mit Zellysat inkubiert. Die angereicherten Proteine wurden in SDS-Probenpuffer (*sodium dodecyl sulfate*) direkt von der Sepharose abgekocht und mittels SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese) aufgetrennt. Der Nachweis erfolgte im Immunoblot ebenfalls mit dem aufgereinigten anti-Lanp-Antikörper. Trotz ausgiebigem Waschen tauchen sowohl bei der Präzipitation mit dem anti-Lanp Antikörper als auch mit der Antikörper-Kontrolle (Kaninchen-Anti-Ziege) Banden bei ca. 32 kDa auf, deren Spezifität somit fraglich ist (Abb.15A). Kocht man nur Protein-G-Sepharose alleine in Probenpuffer und trennt dieses Eluat im Gel auf, so zeigt die Entwicklung des Blots mit anti-Lanp-Antikörper ebenfalls Banden bei 32 kDa. Offenbar bindet der zweite Antikörper alleine (Peroxidase-gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper) an Bestandteile der Protein-G- (und Protein-A-) Sepharose (Abb.15B).



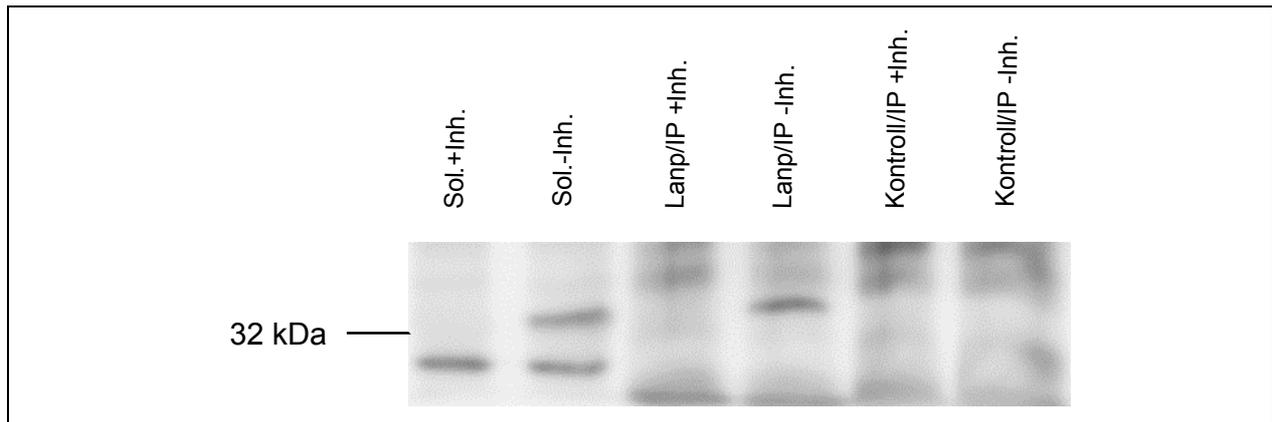
**Abb.15 –Immunpräzipitation von Lanp**

**A** Immunpräzipitation mit gereinigtem Lanp-Antikörper (Lanp/IP) und mit Kontroll-Antikörper (Kaninchen-anti-Ziege Kontroll/IP) aus PC12-Lysat (Lys). Der Blot wurde mit gereinigtem Lanp-Antikörper entwickelt.

**B** Protein-G-Sepharose (PGS) wurde in reduzierendem (Red.) bzw. in nicht reduzierendem (Nicht red.) Probenpuffer abgekocht, elektrophoretisch getrennt und geblottet. Der Blot wurde nur mit Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper inkubiert, der direkt an Peroxidase gekoppelt ist.

Daher wurden statt Protein-G oder Protein-A Antikörper verwendet, die gegen Kaninchen-Antikörper gerichtet und kovalent an Sepharose gekoppelt sind. Mit dieser Sepharose lässt sich spezifisch Lanp präzipitieren. Jedoch wird nur die Bande oberhalb von 32 kDa präzipitiert. Im Immunoblot erkennt das gereinigte Serum gelegentlich eine

Doppelbande bei 32 kDa. Einige Versuche deuten darauf hin, daß die Anwesenheit der Phosphatase-Inhibitoren Natriumorthovanadat und Natriumfluorid auf das Laufverhalten von Lanp einen Einfluß hat. So zeigt Abbildung 16, daß nur bei Abwesenheit von  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  und  $\text{NaF}$  beide Banden im Solubilisat detektiert werden können und die Präzipitation der oberen Bande mit dem anti-Lanp-Serum stattfindet, während in Anwesenheit der Inhibitoren nur die untere der beiden Banden erscheint und folglich auch keine Bande nach Präzipitation zu sehen ist (Abb.16).



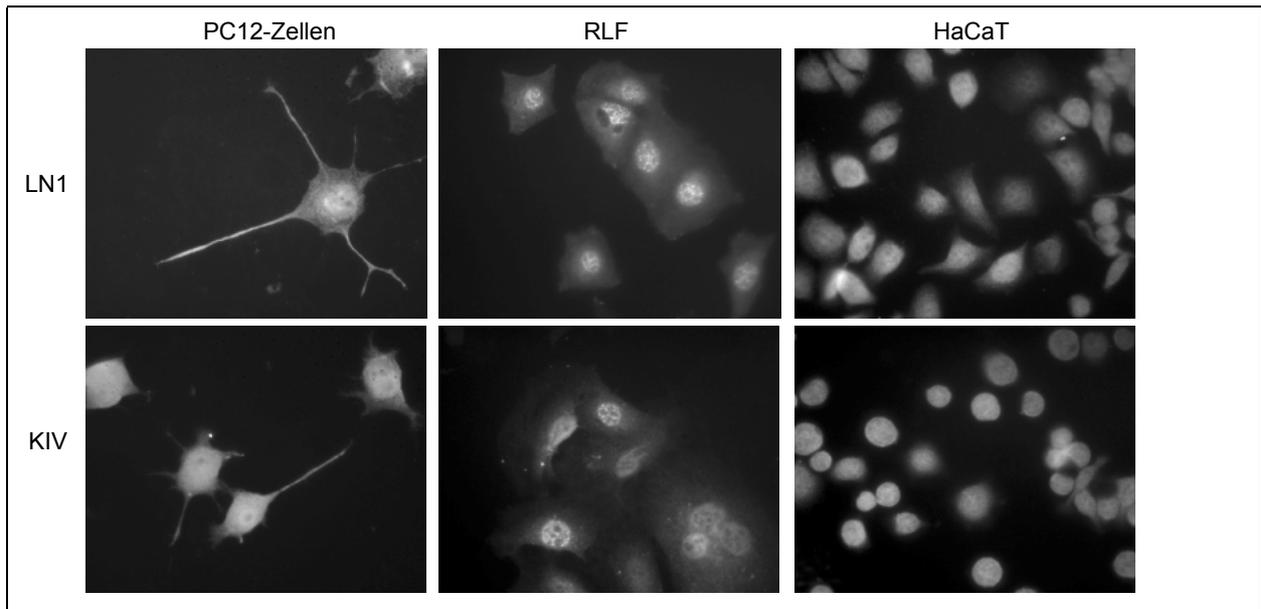
**Abb.16 – Charakterisierung der Lanp-Antiseren: Immunpräzipitation**

PC12-Zellen wurden mit oder ohne Zusatz von Phosphatase-Inhibitoren ( $\text{NaF}$  und  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) solubilisiert (Sol.+Inh. oder Sol.-Inh.) und mit Lanp-Antikörper (Lanp/IP) bzw. Kontroll-Antikörper (Kaninchen-anti-Ziege Kontroll/IP) inkubiert. Der Blot wurde mit gereinigtem Lanp-Serum entwickelt.

### 3.2.5 Nachweis von Lanp in der Immunfluoreszenz

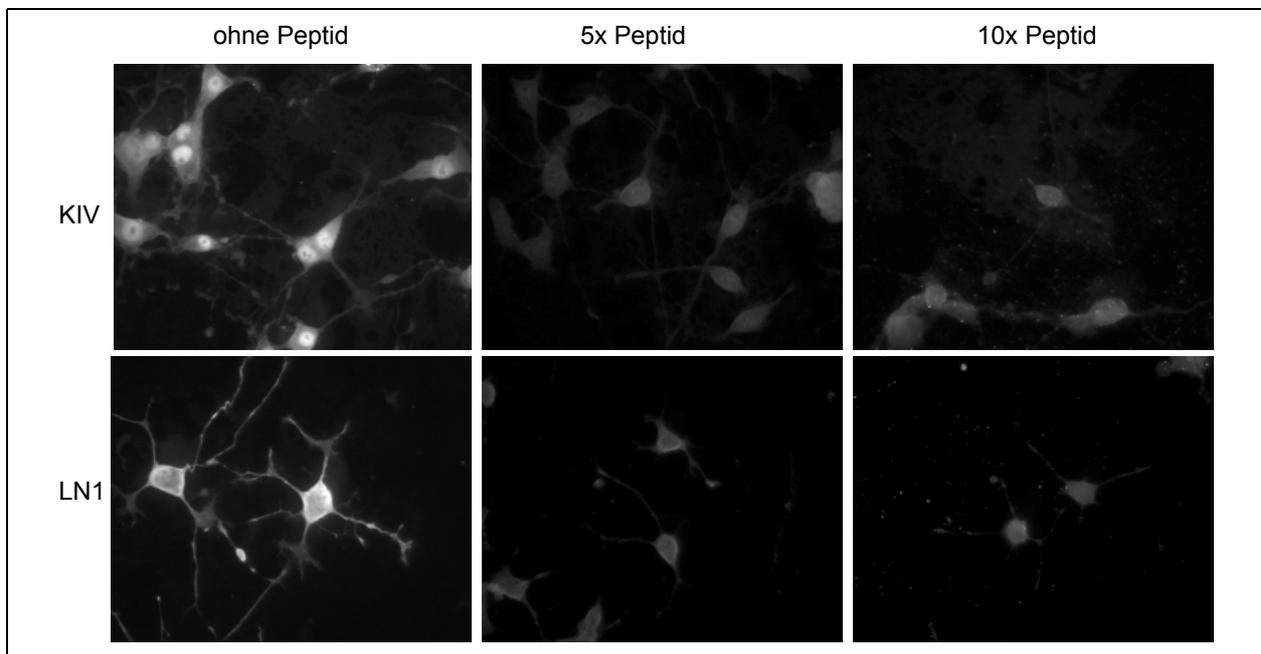
Die Antiseren gegen Lanp wurden auch für die Immunfluoreszenz eingesetzt. Es wurden sowohl PC12-Zellen als auch Fibroblasten (RLF, *rat lung fibroblasts*) und humane Keratinocyten (HaCaT, *human keratinocytes kept in high calcium at low temperature*) analysiert (Abb.17). HaCaT [Scharffetter-Kochanek et al., 1992] und RLF [Caniggia et al., 1995] exprimieren unter anderem  $\alpha 3\beta 1$ -Integrin und sind deshalb für weitere Untersuchungen von Interesse.

Die zur Immunisierung benutzten Peptide (P1 und P2) wurden zur Blockierung der Antikörper eingesetzt. Das Lanp-Signal in PC12-Zellen wird bereits bei fünffachem Überschuß an Peptid insgesamt schwächer und läßt sich durch zehnfachen Überschuß an Peptid nicht weiter reduzieren (Abb.18).



**Abb.17 – Immunfluoreszenz von Lanp**

Neuronal differenzierte PC12-Zellen aus der Ratte (PC12), Rattenlungenfibroblasten (RLF) und humane Keratinocyten (HaCaT) wurden auf Laminin-1 (LN1) bzw. Kollagen-IV (KIV) 72 mit NGF bzw. 1,5 h (für PC12-Zellen und RLF/HaCaT) kultiviert. Die Zellen wurden fixiert, permeabilisiert, mit Rinderserumalbumin blockiert und anschließend mit gereinigtem Antikörper gegen Lanp (8 µg/ml) sowie mit TRITC-konjugiertem Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper gefärbt. Die Epifluoreszenzbilder wurden an einem Zeiss Axiovert 200 Mikroskop mit 63-facher Vergrößerung aufgenommen.



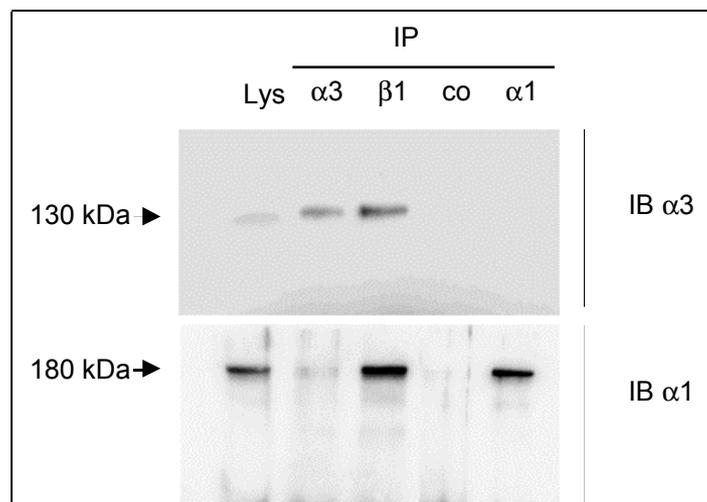
**Abb.18 – Peptidinhibition der Immunfluoreszenz von Lanp**

PC12-Zellen wurden 72 h auf Kollagen-IV (KIV) bzw. Laminin-1 (LN1) mit NGF kultiviert. Die Zellen wurden nach Fixieren, Permeabilisieren und Blockieren entweder mit gereinigtem Antikörper gegen Lanp direkt inkubiert (ohne Peptid) oder mit Antikörper, der zuvor mit 5- bzw. 10-fachem mengenmäßigem Überschuß an immunogenen Peptiden (5x Peptid bzw. 10x Peptid) 2 h inkubiert wurde. Die Aufnahmen wurden an einem Zeiss Axiovert 200 Mikroskop mit identischen Belichtungszeiten gemacht (63x Objektiv).

### 3.3 Überprüfung der Lanp/ $\alpha$ 3-Integrin-Interaktion durch Copräzipitation

Die Wechselwirkung der in der Affinitätschromatographie identifizierten Proteine mit dem cytoplasmatischen Teil der  $\alpha$ 3-Integrin-Untereinheit sollte mittels Copräzipitation überprüft werden. Dazu wird die  $\alpha$ 3-Integrin-Untereinheit bzw. der potentielle Interaktionspartner mit spezifischem Antikörper präzipitiert und das Präzipitat auf die Anwesenheit des Bindungspartners untersucht.

Die  $\alpha$ 3-Integrin-Untereinheit konnte sowohl mit Antikörpern, die gegen den extrazellulären Bereich des Moleküls gerichtet sind (Ralph3.2), als auch mit solchen Antikörpern, die ihr Epitop im cytoplasmatischen Teil des Moleküls finden (pAb  $\alpha$ 3/cyto), präzipitiert werden (Abb.19). Jedoch konnten in dem Präzipitat weder bereits publizierte Interaktionspartner wie DRAL/FHL2 [Wixler et al., 2000] oder Calreticulin [Coppolino et al., 1997] noch Lanp oder die Phosphatasen PP1, PP2A nachgewiesen werden. Auch nach Präzipitation der  $\alpha$ 1- und der  $\beta$ 1-Integrin-Untereinheiten (Abb.19) konnten die genannten Proteine nicht copräzipitiert werden. Die Präzipitation von Lanp (Abb.15) und der Phosphatase PP2A (keine Abb.) konnte erfolgreich durchgeführt werden, aber auch hier gelang der Nachweis copräzipitierender Proteine nicht. Die Präzipitation der  $\beta$ 1-Integrin-Untereinheit zeigt, daß die Copräzipitation prinzipiell funktioniert, da beide assoziierenden  $\alpha$ -Untereinheiten im Immunoblot nachweisbar sind (Abb.19).



**Abb.19 – Immunpräzipitation der Integrin-Untereinheiten**

PC12-Zellen wurden solubilisiert und mit spezifischen Antikörpern gegen die  $\alpha$ 3- ( $\alpha$ 3/cyto pAb),  $\alpha$ 1- (mAb 33.4) bzw.  $\beta$ 1- (pAb) Integrin-Untereinheit bzw. mit unspezifischen Antikörpern (Kaninchen-anti-Schaf) als Kontrolle (co) inkubiert. Die an die Antikörper gebundenen Antigene und assoziierten Interaktionspartner wurden mit Protein-G-Sepharose präzipitiert, gewaschen und in SDS-Probenpuffer gekocht sowie nach gelelektrophoretischer Auftrennung im Immunoblot (IB) untersucht. Das Zellysate (Lys) dient als Positivkontrolle für die Entwicklung des Immunoblots.

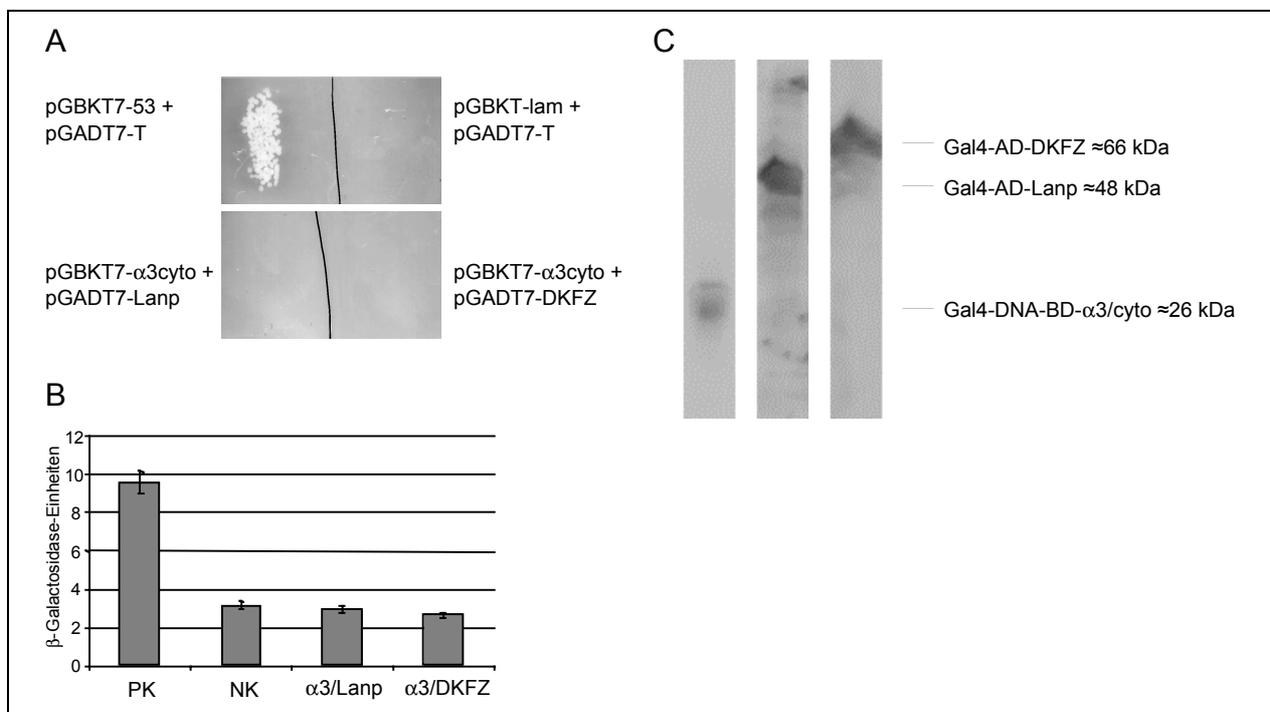
Es wurden diverse Variationen der Solubilisations- und Präzipitationsbedingungen durchgeführt (verändertes Detergenz (CHAPS, Brij 35, 58, 97, 98/99), geringere Mengen an Detergenz (0,5%), verringerte Salzkonzentrationen (50 mM) sowie Versuche unter Einsatz von Quervernetzern). Diese Versuchsabänderungen führten jedoch ebenfalls zu keinem Ergebnis, so daß letztlich auf die Bestätigung der Interaktion durch die Copräzipitation verzichtet werden mußte.

### **3.4 Überprüfung der Lanp/ $\alpha$ 3-Integrin-Interaktion durch das *yeast two-hybrid* system**

Um die Interaktion der potentiellen Bindungspartner mit dem cytoplasmatischen Teil der  $\alpha$ 3-Integrin-Untereinheit zu überprüfen, wurde das Prinzip des *yeast two-hybrid systems* gewählt [Chien et al., 1991]. Dabei macht man sich genetisch veränderte Hefestämme von *Saccharomyces cerevisiae* zunutze. Hier kam der Stamm AH109 zum Einsatz, der defizient für die Regulationselemente Gal4 und Gal80 ist, dem Gene für die Leucin- und Tryptophansynthese fehlen und dessen Gene für die Adenin- und Histidinsynthese sowie für die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Galactosidase unter der Kontrolle von Gal4 stehen. Man fusioniert an die DNA-Bindungsdomäne (*deoxyribonucleic acid*) von Gal4 Protein A (hier den cytoplasmatischen Anteil der  $\alpha$ 3-Integrin-Untereinheit) und an die Aktivierungsdomäne von Gal4 Protein B (hier Lanp und DKFZp761C10121.1), transfiziert die Hefe nacheinander mit beiden Vektoren, die als Selektionsmarker die Gene für die Leucin- bzw. die Tryptophansynthese tragen. Findet eine Interaktion zwischen Protein A und Protein B statt, so werden die unter der Kontrolle von Gal4 stehenden Gene für die Adenin- und Histidinsynthese und für die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Galactosidase transkribiert und die Hefen wachsen auch in Medium, dem Adenin und Histidin fehlt und sind in der Lage,  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -galactosidische Bindungen zu spalten und so z.B. Lactose in Galactose und Glucose zu spalten.

Die cytoplasmatische Sequenz der  $\alpha$ 3-Integrin-Untereinheit wurde so in den Vektor pGBKT7 kloniert, daß der Leserahmen zwischen der Gal4-DNA-Bindungsdomäne und  $\alpha$ 3/cyto erhalten blieb. In den pGADT7-Vektor wurde zum einen die Sequenz von Lanp und zum anderen die Sequenz des noch unbekanntes Proteins DKFZp761C10121.1 im vorgegebenen Leserahmen kloniert. Als Positivkontrolle wurden pGBKT7-53, der ein Fusionsprotein der Gal4-DNA-Bindungsdomäne (Gal4-DNA-BD) und p53 kodiert, und pGADT7-T, der das Fusionsprotein der Gal4-Aktivierungsdomäne (Gal4-AD) und des großen T-Antigens kodiert, eingesetzt. Als

Negativkontrolle dient pGBKT7-Lam, der das Fusionsprotein der Gal4-DNA-Bindungsdomäne mit Lamin C kodiert. Die Transfektionen wurden nacheinander durchgeführt und es wurde jeweils auf erfolgreiche Transfektion selektioniert, indem Hefemedium ohne Tryptophan bzw. Leucin eingesetzt wurde. Hefeklonen, die mit beiden Vektoren transfiziert waren, wurden auf Interaktion getestet, indem das Wachstum auf Platten, denen neben Tryptophan und Leucin auch noch Histidin und Adenin fehlen, überprüft wurde. Abbildung 20A zeigt das Wachstum der transfizierten Hefen auf oben erwähnten Selektionsplatten. Nur die als Positivkontrolle dienende Hefe, die mit pGBKT7-53 und pGADT7-T transfiziert wurde, wächst auf dem Mangelmedium, während die Negativkontrolle und auch die mit  $\alpha 3$ /cyto und Lanp bzw. mit  $\alpha 3$ /cyto und DKFZ transfizierten Hefen auf dem Selektionsmedium nicht wachsen können.



**Abb.20 – Überprüfung der Interaktion in Hefe**

**A** Doppelt transfizierte Hefen wurden auf Selektionsmedium (ohne Tryptophan, Leucin, Histidin und Adenin) ausgebracht und nach 4 Tagen Inkubation bei 30°C ausgewertet.

**B**  $\beta$ -Galactosidase-Assay aus Flüssighefekultur mit Chlorphenol-Rot- $\beta$ -D-Galactopyranoid (CPRG) als Substrat. PK = Positivkontrolle pGBKT7-53/pGADT7-T, NK = Negativkontrolle pGBKT7-Lam/pGADT7-T,  $\alpha 3$ /Lanp = pGBKT7- $\alpha 3$ cyto/pGADT7-Lanp,  $\alpha 3$ /DKFZ = pGBKT7- $\alpha 3$ cyto/pGADT7-DKFZ.

**C** Nachweis der Fusionsproteine im Hefelysate nach Aufschluß der Hefe mit Trichloressigsäure. Nachweis im Immunoblot mit anti-Myc-Antikörper für Gal4-DNA-BD- $\alpha 3$ /cyto und mit anti-HA-Antikörper für Gal4-AD-Lanp und Gal4-AD-DKFZ.

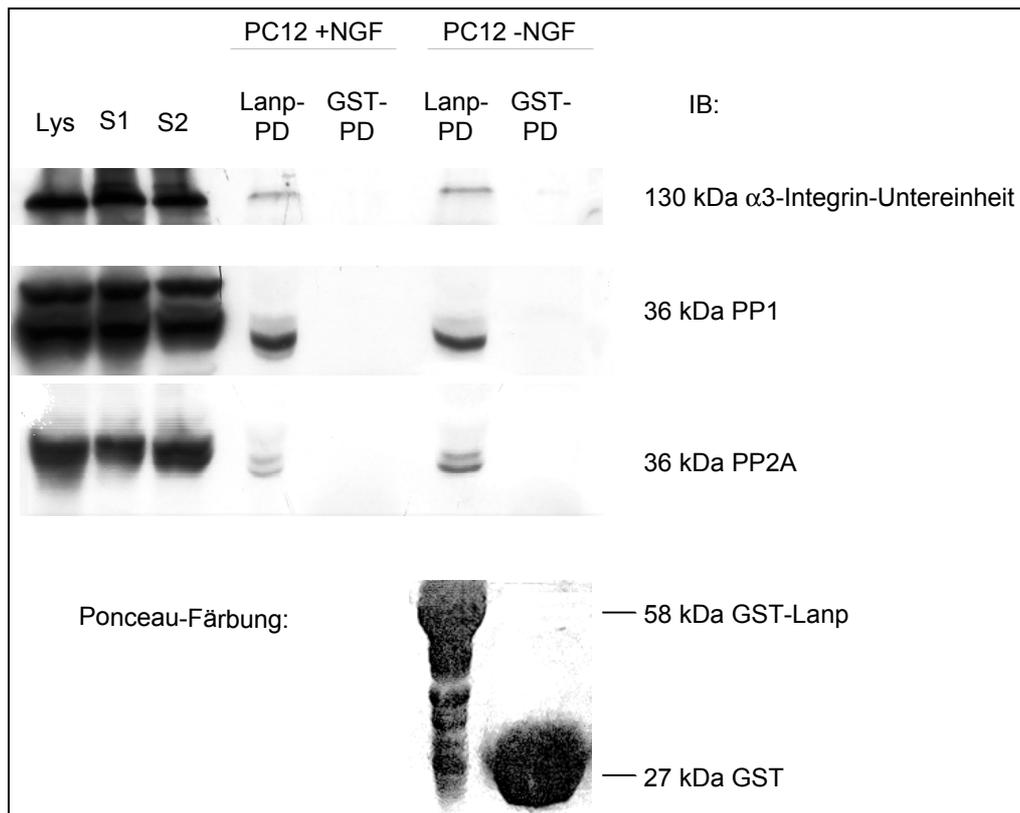
Eine weitere Möglichkeit, die Interaktion zwischen den Proteinen in der Hefe zu erfassen, ist der Test auf  $\alpha$ - und/oder  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität. Dazu macht man sich Substanzen zunutze, die nach der Reaktion Produkte anderer Farbe ergeben. Abbildung 20B zeigt die Ergebnisse des  $\beta$ -Galactosidase-Flüssigassays, bei dem Chlorphenol-Rot- $\beta$ -D-Galactopyranoid (CPRG) als Substrat eingesetzt wurde. Die mit pGBKT7- $\alpha$ 3/cyto und pGADT7-Lanp bzw. mit pGBKT7- $\alpha$ 3/cyto und pGADT7-DKFZ transfizierten Hefen liegen im Wertebereich der Negativkontrolle, während die Werte der Positivkontrolle um den Faktor 3 gegenüber der Negativkontrolle erhöht sind.

Um zu klären, ob die Proteine in der Hefe überhaupt synthetisiert werden, wurden die Hefen aufgebrochen und die Proteine extrahiert. Zum Aufbrechen der Hefen wurde die Trichloressigsäure-Methode eingesetzt. Abbildung 20C zeigt den Nachweis der Fusionsproteine in Hefelysat nach Trichloressigsäure-Extraktion. Sowohl Gal4-DNA-BD- $\alpha$ 3/cyto, Gal4-AD-Lanp als auch das Gal4-AD-DKFZ-Protein werden in der Hefe als Fusionsproteine in der erwarteten Größe exprimiert.

### 3.5 Pull down mit GST-Fusionsproteinen

Der sogenannte *pull down* eignet sich ebenfalls zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen. Dabei wird ein Protein als Fusionsprotein, z.B. mit Glutathion-S-Transferase (GST), rekombinant exprimiert [Smith und Johnson, 1988], mit Zellysat, das den Interaktionspartner enthält, inkubiert und über die Affinität des Fusionsproteins, z.B. zu Glutathion, präzipitiert.

Lanp wurde als Fusionsprotein mit GST (GST-Lanp), das von der Arbeitsgruppe Steitz (Universität Yale, USA) zur Verfügung gestellt wurde, in BL21-Bakterien exprimiert und an Glutathion-Sepharose angereichert. Das angereicherte Fusionsprotein wurde mit Lysat aus PC12-Zellen inkubiert und über die Glutathion-Sepharose präzipitiert. Die Sepharose wurde in Probenpuffer abgekocht und nach elektrophoretischer Auftrennung im Immunoblot analysiert. Als Negativkontrolle wurde GST eingesetzt. Mit GST-Lanp konnten sowohl aus undifferenzierten als auch aus neuronal differenzierten PC12-Zellen die  $\alpha$ 3-Untereinheit des  $\alpha$ 3 $\beta$ 1-Integrins sowie die Phosphatasen PP1 und PP2A präzipitiert werden. GST bindet die genannten Proteine nicht (Abb.21).



**Abb.21 – Pull down mit GST-Lanp und GST**

Differenzierte (PC12 +NGF) oder undifferenzierte (PC12 -NGF) PC12-Zellen wurden mit GST-Lanp oder mit GST inkubiert. Komplexe wurden mit Glutathion-Sepharose präzipitiert, mit SDS-Probenpuffer eluiert, gelelektrophoretisch getrennt und geblottet. Die Menge der eingesetzten Fusionsproteine kann in der Ponceau-Färbung abgeschätzt werden. Der Nachweis der interagierenden Proteine erfolgte mit spezifischen Antikörpern für PP1, PP2A und die  $\alpha$ 3-Integrin-Untereinheit. (Lys = Lysat, S1 = Lysat nach Inkubation mit GST-Lanp, S2 = Lysat nach Inkubation mit GST, Lanp-PD = *pull down* mit GST-Lanp, GST-PD = *pull down* mit GST, IB = Immunoblot)

Der für den Nachweis von PP1 eingesetzte Antikörper zeigt neben der Reaktion mit der katalytischen Untereinheit von PP1 noch eine weitere Reaktion mit Aktin (Bande bei 42 kDa). Mit GST-Lanp wird jedoch nur die katalytische Untereinheit von PP1 und nicht Aktin präzipitiert (Abb.21). Aktin kann somit als interne Negativkontrolle des Versuchs gewertet werden.

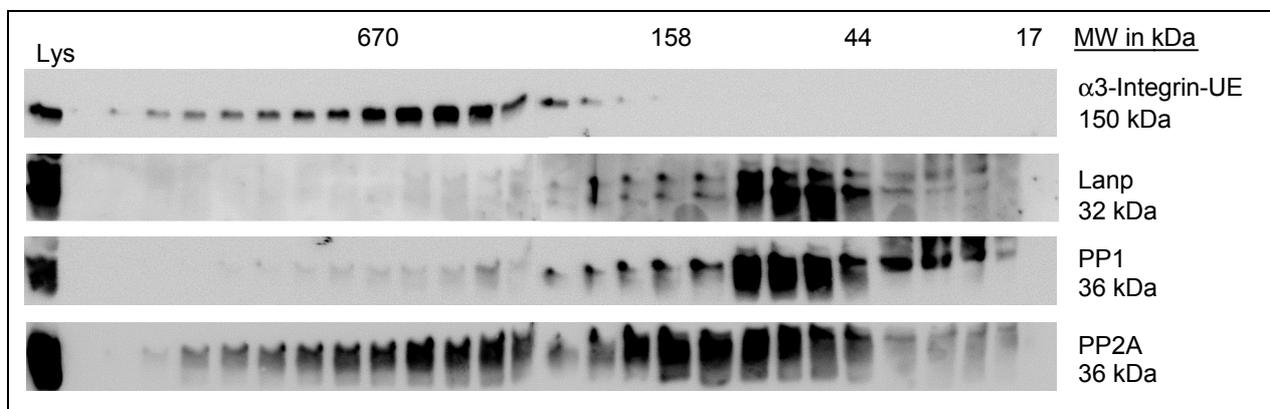
Mehrere voneinander unabhängige *pull-down assays* zeigten, daß Lanp unabhängig vom Differenzierungszustand der PC12-Zellen mit PP1, PP2A und dem  $\alpha$ 3 $\beta$ 1-Integrin einen Komplex ausbilden kann.

### 3.6 Untersuchungen zur Komplexbildung von Lanp, PP1, PP2A und der $\alpha$ 3-Integrin-Untereinheit durch Gelfiltrations- und Quervernetzungs-experimente

Die Ergebnisse aus den *pull-down assays* legen nahe, daß an Lanp ein Komplex, der aus mehreren Proteinen besteht, gebildet werden kann. Um diesem Befund weiter nachzugehen, wurden Gelfiltration und Quervernetzung als weitere Methoden zum Nachweis von Komplexen herangezogen.

#### 3.6.1 Gelfiltration

Das Triton X-100-Lysat von PC12-Zellen wurde im Größenausschlußverfahren an einer Superdex200-Säule entsprechend der Partikelgrößen aufgetrennt. Die Säule wurde mit einem Größenstandard kalibriert und die einzelnen Fraktionen wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung im Immunoblot auf die Anwesenheit der  $\alpha$ 3-Integrin-Untereinheit sowie von Lanp, PP1 und PP2A untersucht. Die Abbildung 22 zeigt die Verteilung der verschiedenen Moleküle innerhalb des Molekulargewichtsgradienten.



**Abb.22 – Gelfiltration von Triton X-100-Lysat von PC12-Zellen**

Die Fraktionen der Gelfiltration mit einer Superdex200-Säule wurden gelelektrophoretisch getrennt und im Immunoblot auf die Anwesenheit der verschiedenen Moleküle mit spezifischen Antikörpern getestet. Das Ausgangslysate (Lys) der PC12-Zellen dient als Positivkontrolle für die Blotentwicklung. Die Molekulargewichtsangaben (MW in kDa) für die einzelnen Fraktionen stammen von der Kalibrierung der Säule mit einem Molekulargewichtsstandard. Die Kalibrierung wurde mit CHAPS durchgeführt, da Triton X-100 die Absorption bei 280 nm überlagert.

Die  $\alpha$ 3-Integrin-Untereinheit ist stark in den Fraktionen mit hohem Molekulargewicht um 500 kDa angereichert, während die monomere Form der  $\alpha$ 3-Integrin-Untereinheit von ca. 150 kDa nur in Spuren auftritt. Die  $\alpha$ -Integrin-Untereinheiten sind in der Zelle

und auf der Zelloberfläche nur als Dimere in Kombination mit der  $\beta$ -Integrin-Untereinheit anzutreffen oder als Multimere aus mehreren Dimeren. Aber auch die bedeutend kleineren Moleküle Lanp und PP1 sowie vor allem PP2A kommen verstärkt in Aggregaten mit größerem Molekulargewicht vor, als dies von ihrem monomeren Molekulargewicht her zu erwarten wäre. Lanp und PP1 zeigen ein über weite Strecken ähnliches Elutionsprofil, dessen Hauptpeak im Bereich von 50-90 kDa liegt. Lanp und PP1 eluieren aber auch noch in Fraktionen bis 200/300 kDa. PP2A erstreckt sich noch deutlich in den Größenbereich bis zu 500 kDa und noch darüber hinaus.

Die Ergebnisse der Gelfiltration bestätigen somit grundsätzlich die Hinweise aus dem *pull down* und zeigen, daß alle untersuchten Komponenten in Komplexen höherer Molekulargewichte vorkommen.

### 3.6.2 Quervernetzung

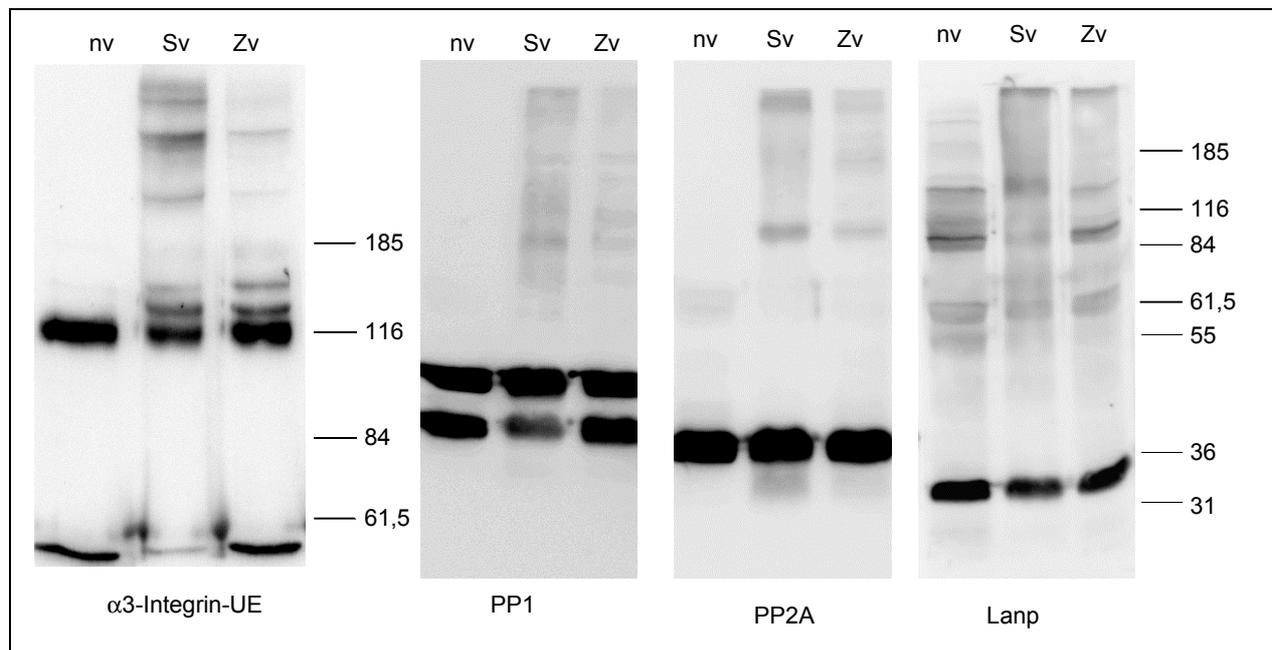
Zur Quervernetzung wurde der membrangängige bifunktionale Quervernetzer Disuccinimidylsuberat (DSS) eingesetzt, der mit Aminogruppen kovalent reagiert und Proteine bzw. Proteinbestandteile im Abstand von 11,4 Å miteinander verbindet. Die Quervernetzung wurde zum einen an intakten PC12-Zellen durchgeführt, die nach der Vernetzung solubiliert wurden und zum anderen mit PC12-Zellysat, das durch Behandlung mit Triton X-100-haltigem Puffer gewonnen wurde. Das Lysat aus vernetzten Zellen bzw. das vernetzte Zellysat wurde neben unbehandeltem Zellysat aufgetragen, gelelektrophoretisch getrennt und im Immunoblot analysiert (Abb.23). Die  $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit läuft in reduzierter Form bei ca. 120 kDa, da ein post-translational gespaltenes ca. 30 kDa großes Teilstück nur per Disulfidbrücke mit dem restlichen Molekül verbunden ist. Nach Quervernetzung sind deutlich Banden oberhalb der 120 kDa-Bande zu erkennen, die bei ca. 130, 150, 220 kDa und bei noch höheren Molekulargewichten liegen. Die prominenteste Bande über der bei ca. 220 kDa liegenden ist wahrscheinlich dem  $\alpha 3\beta 1$ -Integrin-Dimer zuzuordnen. Bei der Bande bei 150 kDa handelt es sich vermutlich um die vernetzte Form der kompletten  $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit, bei den anderen Banden kann es sich um Vernetzungen mit kleineren interagierenden Proteinen handeln.

Die katalytischen Untereinheiten der PP1 und der PP2A zeigen auch ganz deutlich, daß sie mit diversen anderen Molekülen in engen Kontakt treten und daher mit diesen vernetzt werden können, wenn auch die Signale nach Quervernetzung weitaus schwächer sind, als die Signale der unvernetzten Moleküle. Die PP1 zeigt nach Quer-

vernetzung Banden bei ca. 55, 65, 85, 100, 130, 160 kDa und noch darüber hinaus im Bereich höheren Molekulargewichts. Bei diesem Blot ist jedoch zu berücksichtigen, daß die Entwicklung mit dem Antikörper erfolgte, der neben der katalytischen Untereinheit der PP1 auch Aktin erkennt (die obere der beiden ausgeprägten Banden), daher ist die Interpretation des Immunoblots problematisch.

Die PP2A zeigt nach der Vernetzung auch Banden bei 90, 170 kDa und in Bereichen noch größeren Molekulargewichts.

Lanp zeigt bereits vor der Vernetzung verschiedene Banden im Immunoblot, die nach der Vernetzung zum Teil weniger stark ausgeprägt bzw. gar nicht mehr nachweisbar sind. Bei den vor und nach der Vernetzung sichtbaren Banden bei ca. 60, 90 und 130 kDa handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um die multimeren Formen dieses Proteins [Ulitzur et al., 1997b]. Obwohl es sich um ein denaturierendes Gel handelt, scheinen die multimeren Komplexe von Lanp teilweise nicht getrennt zu werden. Nach der Quervernetzung ist eine Fraktion zu erkennen, die gar nicht in das Gel einläuft und auf einen Komplex mit sehr großem Molekulargewicht schließen läßt.



**Abb.23 – Quervernetzung von PC12-Zellen und von PC12-Zellysat mit DSS**

PC12-Zellen wurden in adhärentem Zustand auf Kollagen-IV mit DSS vernetzt (Zv) und dann mit Triton X-100-haltigem Puffer solubilisiert oder PC12-Zellysat wurde mit DSS vernetzt (Sv). Beide Varianten wurden neben Lysat von nicht behandelten PC12-Zellen (nv) aufgetragen, gelelektrophoretisch getrennt und im Immunoblot mit spezifischen Antikörpern gegen die  $\alpha$ 3-Integrin-Untereinheit, die katalytischen Untereinheiten von PP1 und PP2A und gegen Lanp untersucht.

Somit unterstützen auch die Ergebnisse der Quervernetzung die Befunde des *pull down*, daß die  $\alpha$ 3-Integrin-Untereinheit und PP1, PP2A und Lanp in Multiprotein-Komplexen vorkommen können.

### **3.7 Bestimmung der Bindungsstellen in den cytosolischen $\alpha$ -Integrin-Anteilen mittels Peptidbindungsstudien**

Um die Bereiche der Integrin-Untereinheit einzugrenzen, die für die Interaktion mit den identifizierten Proteinen notwendig sind, wurden Peptide eingesetzt, die Teilbereiche der cytoplasmatischen Bereiche der Integrin-Untereinheiten abdecken (Abb.24A) [Otey et al., 1990; Schaller et al., 1995; Vossmeier et al., 2002]. Diese Peptide wurden über ein zusätzliches Cystein am N-Terminus kovalent an Thiolsepharose gekoppelt und mit Solubilisat von PC12-Zellen bzw. humanen Keratinocyten (HaCaT) inkubiert. Als Negativkontrolle wurde mit Cystein abgesättigte Thiolsepharose (Cys) eingesetzt. Gebundene Proteine wurden mit SDS-Probenpuffer abgekocht, gelelektrophoretisch getrennt und im Immunoblot analysiert.

Den katalytischen Untereinheiten der Phosphatasen PP1 und PP2A genügt die membran-proximale Sequenz der  $\alpha$ 1- bzw.  $\alpha$ 3-Integrin-Untereinheit, welche die unter den  $\alpha$ -Integrin-Untereinheiten konservierte KXGFFKR-Sequenz ( $\alpha$ -G) enthält. An die membran-distalen Bereiche ( $\alpha$ 3-2 und  $\alpha$ 1-3) binden beide Phosphatasen (Abb.24B). Lanp hingegen benötigt mehr als die KXGFFKR-Sequenz für die Bindung an die  $\alpha$ 1- und die  $\alpha$ 3-Integrin-Untereinheit, es erfolgt keine Bindung an  $\alpha$ -G, jedoch an die membran-proximale Sequenz von  $\alpha$ 3 ( $\alpha$ 3-1) und an die gesamte Sequenz von  $\alpha$ 1 ( $\alpha$ 1-1).

Der cytoplasmatische Teil der  $\alpha$ 3-Integrin-Untereinheit wurde weiter in kürzere Peptide unterteilt und die Bindung von Lanp untersucht. Als Positivkontrolle wurde das Protein DRAL/FHL2 eingesetzt, das in einem *yeast two-hybrid screen* als Interaktionspartner des cytoplasmatischen Anteils der  $\alpha$ 3-Integrin-Untereinheit entdeckt wurde [Wixler et al., 2000]. Da der Antikörper gegen DRAL/FHL2 bessere Ergebnisse im humanen System erzielt, wurden diese Bindungsstudien mit Lysat aus humanen Keratinocyten (HaCaT) durchgeführt.

Der bindende Anteil der cytoplasmatischen Sequenz der  $\alpha$ 3-Integrin-Untereinheit läßt sich sowohl für DRAL/FHL2 als auch für Lanp auf die membranproximalen Aminosäuren KCGFFKRARTRA eingrenzen (Abb.24C).

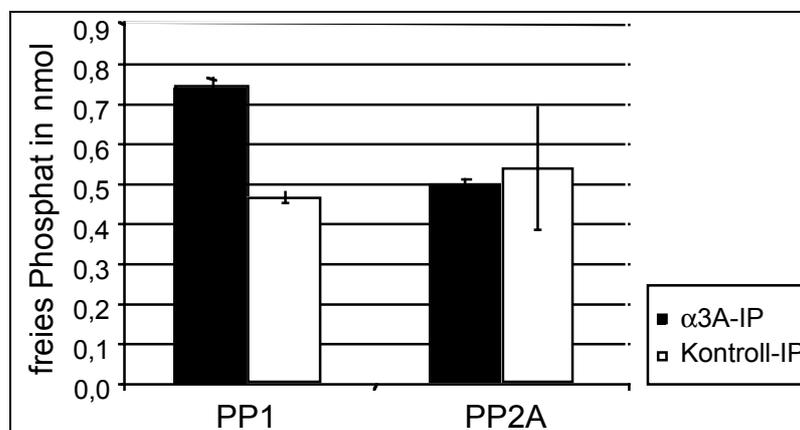


### 3.8 In vitro-Phosphatase-Assays

Um die Funktion der Interaktionen zwischen  $\alpha 3$ /cyto und den Phosphatasen näher zu untersuchen, wurden Phosphatase-Assays in vitro durchgeführt. Dazu wurde das Integrin  $\alpha 3\beta 1$  mit spezifischem Antikörper gegen die  $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit präzipitiert und mit rekombinant exprimierter PP1 bzw. mit gereinigter PP2A in optimiertem Reaktionspuffer inkubiert. Als Negativkontrolle wurde das Präzipitat eines unspezifischen Antikörpers (Maus-anti-Kaninchen IgG) eingesetzt.

Es ist bekannt, daß die  $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit Serin-/Threonin-Phosphorylierungsstellen besitzt und daß die Phosphorylierung durch die Aktivierung der PKC stimuliert werden kann [Hogervorst et al., 1993]. Deshalb wurden die PC12-Zellen, aus denen das Integrin präzipitiert werden sollte, vor der Solubilisation und Präzipitation mit dem Phorbolster PMA (Phorbol 12-myristat 13-acetat) inkubiert. Als Positivkontrolle für die Aktivität der eingesetzten Phosphatasen diente das Phosphopeptid KR(pT)IRR, welches ein Substrat der PP1 und der PP2A ist.

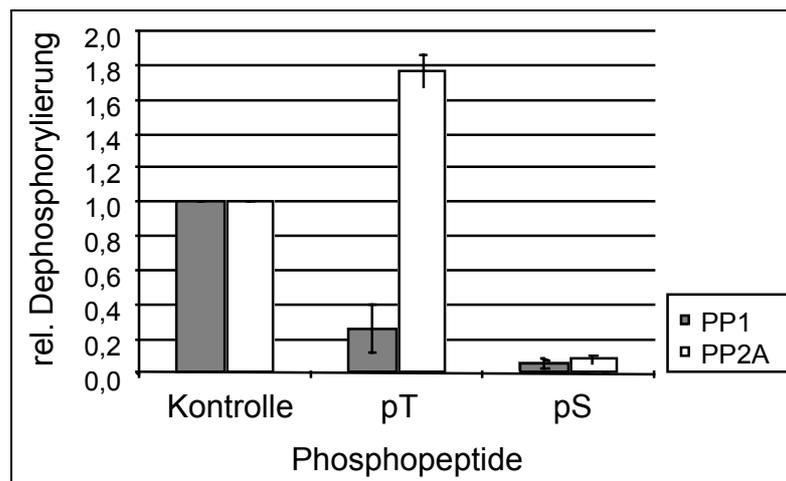
Abbildung 25 zeigt, daß nur PP1 in der Lage ist, aus präzipitiertem  $\alpha 3\beta 1$ -Integrin Phosphat freizusetzen, während PP2A im Vergleich zur Negativkontrolle zu keiner signifikanten Dephosphorylierung an  $\alpha 3\beta 1$ -Integrin führt.



**Abb.25 – In vitro-Phosphatase-Assay nach Immunpräzipitation**

Die  $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit wurde mit dem mAb Ralph3.2 aus PC12-Zellen präzipitiert, die 30 min mit 100 nM PMA stimuliert worden waren. Maus-anti-Kaninchen Antikörper wurde als Negativkontrolle eingesetzt. Die Präzipitate wurden mit der katalytischen Untereinheit der PP1 (rekombinant exprimierte katalytische Untereinheit der PP1 aus Skelettmuskel von Kaninchen) bzw. der PP2A (gereinigte PP2A aus humanen Erythrocyten) im entsprechenden Reaktionspuffer für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Freies Phosphat wurde mit dem Farbstoff Malachit-Grün nachgewiesen. Je ein repräsentatives Experiment ist abgebildet. Das Experiment wurde fünfmal für PP1 bzw. zweimal für PP2A durchgeführt.

Das Programm Prosite ([www.expasy.org/tools/scanprosite/](http://www.expasy.org/tools/scanprosite/)) [Sigrist et al., 2002] sagt für die  $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit eine potentielle Phosphorylierungsstelle für die Casein-Kinase-II an S1044 und eine weitere für die Protein Kinase C an T1046 voraus. Um herauszufinden, welche der beiden potentiell phosphorylierten Stellen von den Phosphatasen PP1 bzw. PP2A dephosphoryliert wird, wurden Phosphopeptide für einen Phosphatase-Assay in vitro eingesetzt, welche die Bereiche der Phosphorylierungsstellen abdecken (Aminosäuren 1041-1048). Als Positivkontrolle und als Maßstab für das Ausmaß der Dephosphorylierung diente das Threonin-Phosphopeptid KR(pT)IRR, ein Substrat der PP1 und der PP2A. Die PP1 ist in der Lage, aus dem Peptid, welches das phosphorylierte Threonin (T1046) trägt, Phosphat freizusetzen (Abb.26). Die PP2A ist noch potenter in der Freisetzung von Phosphat aus dem Phospho-Threonin-Peptid. Beide Phosphatasen sind jedoch nicht in der Lage, das phosphorylierte Serin zu dephosphorylieren (Abb.26).



**Abb.26 – In vitro Phosphatase-Assay mit Phosphopeptiden**

Phosphopeptide, welche die Aminosäuren 1041-1050 (Numerierung entsprechend der Maus-Sequenz) der  $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit abdecken, wurden mit phospho-Serin (pS) bzw. phospho-Threonin (pT) synthetisiert und für den Assay eingesetzt.

Freies Phosphat wurde mit dem Farbstoff Malachit-Grün nachgewiesen und quantifiziert. Die rekombinant exprimierte katalytische Untereinheit der PP1 aus Skelettmuskel von Kaninchen wurde für den PP1-Assay eingesetzt. Gereinigte PP2A aus humanen Erythrocyten wurde für den PP2A-Assay eingesetzt. Das Ausmaß der Dephosphorylierung wurde in Relation zur dem als Positivkontrolle eingesetzten Peptid KR(pT)IRR berechnet. Mittelwert und Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente sind dargestellt.

### **3.9 Lokalisation der Interaktionspartner Lanp, PP1, PP2A und der $\alpha$ 3-Integrin-Untereinheit**

Die Lokalisation der potentiellen Interaktionspartner in Relation zum  $\alpha$ 3 $\beta$ 1-Integrin wurde mithilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie in verschiedenen zellulären Systemen untersucht.

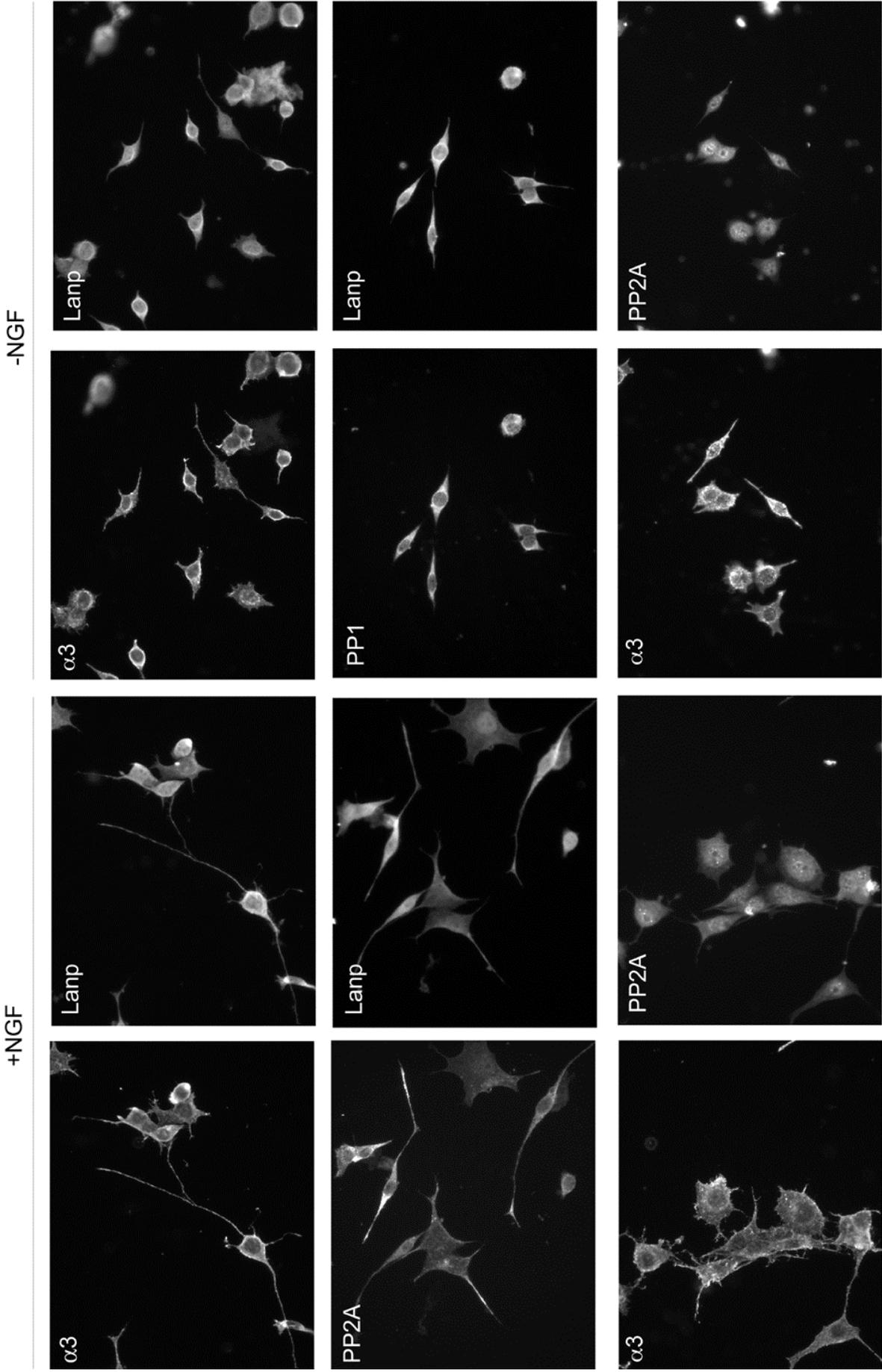
Vor allem für Lanp gibt es verschiedene Angaben zur Lokalisation innerhalb der Zelle, je nachdem in welchem funktionellen Zusammenhang es untersucht wurde. Einige Arbeiten im Zusammenhang mit der Funktion von Lanp belegen, daß Lanp während der Differenzierung von Neuronen des Cerebellums [Matsuoka et al., 1994], während der Entstehung der spinocerebralen Ataxie Typ 1 [Matilla et al., 1997], während des Transports bestimmter mRNA-Spezies [Brennan et al., 2000] und während der Regulation der Histonacetylierung [Seo et al., 2002; Seo et al., 2001] im Kern lokalisiert ist, während andere Arbeiten [Ulitzur et al., 1997b; Vaesen et al., 1994] Lanp hauptsächlich im Cytosol ansiedeln. Deshalb ist es besonders im Hinblick auf Lanp wichtig, in dem von uns verwendeten Zellsystem und funktionellen Zusammenhang die Lokalisation von Lanp aufzuklären.

Zunächst wurden mit spezifischen Antikörpern gegen die zu untersuchenden Moleküle Immunfluoreszenzfärbungen an PC12-Zellen im differenzierten und im undifferenzierten Stadium durchgeführt. Abbildung 27 zeigt verschiedene Doppel-Immunfluoreszenzfärbungen von PC12-Zellen, die auf Laminin-1 mit bzw. ohne NGF für 72 h kultiviert wurden.

#### **Folgende Seite:**

#### **Abb.27 – Immunfluoreszenzfärbung von PC12-Zellen (Doppelfärbungen) – Epifluoreszenz**

PC12-Zellen wurden für 72h auf Laminin-1 mit bzw. ohne 250 ng/ml NGF kultiviert, mit 4% PFA fixiert und mit 0,1% Triton X-100 permeabilisiert. Die Färbung erfolgte nach Blockierung mit 1% BSA mit mAb Ralph3.2 gegen die  $\alpha$ 3-Integrin-Untereinheit, pAb gegen Lanp, mAb E-9 gegen PP1 und pAb gegen PP2A. Die Fluoreszenzmarkierung wurde mit markierten Sekundärantikörpern (AlexaFluor<sup>®</sup>594-markierter Ziege-anti-Kaninchen- und Cy2-markierter Ziege-anti-Maus-Antikörper) durchgeführt. Die Aufnahmen wurden mit einem Zeiss Axiovert 200 Mikroskop mit 63x Vergrößerung gemacht.

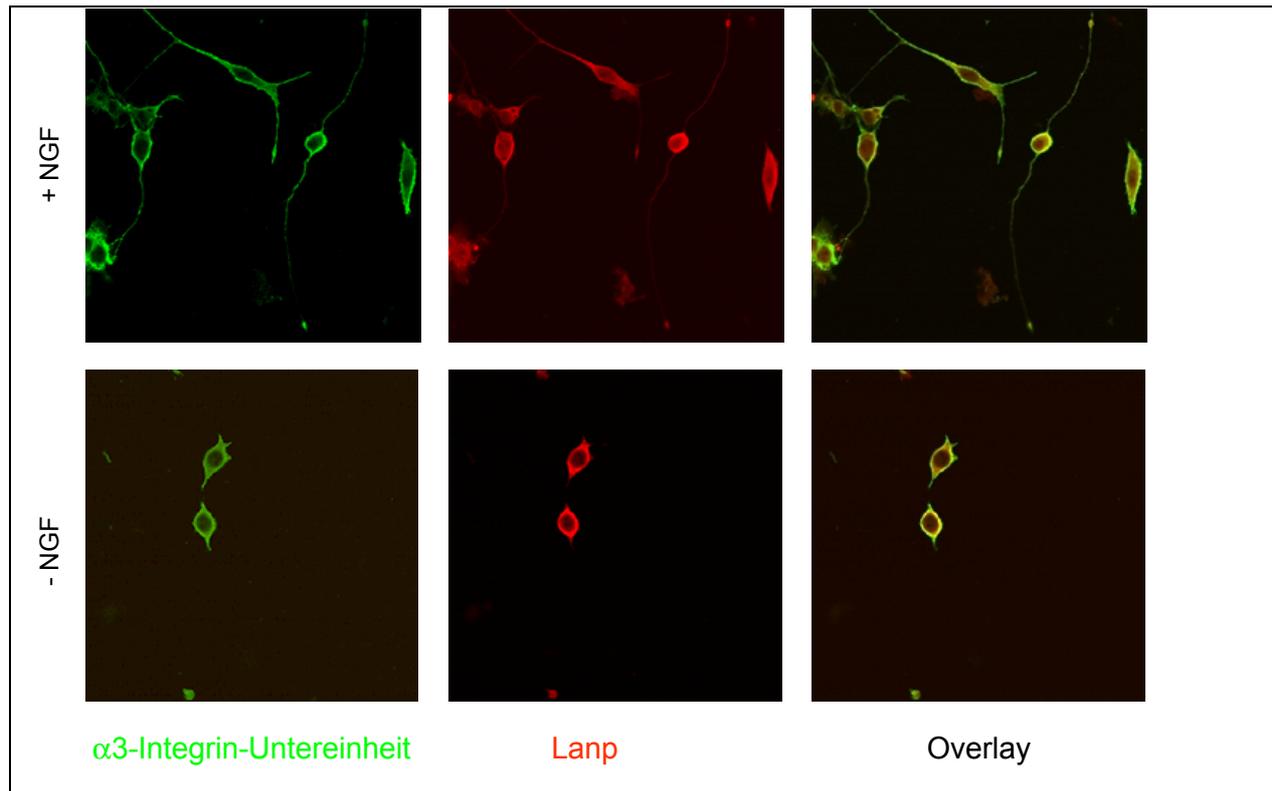


Die Färbung mit dem Antikörper gegen die  $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit zeigt, daß  $\alpha 3\beta 1$ -Integrin hauptsächlich an den Zellrändern und entlang der Neuriten lokalisiert ist. Lanp ist vornehmlich im Cytosol, innerhalb der dünnen Neuriten und zu einem geringen Anteil auch im Kern der Zellen zu finden. Die PP1 ist in den Neuriten der Zellen sowie ubiquitär im Cytosol lokalisiert. Die PP2A hingegen ist in den Neuriten kaum zu finden und eher gleichmäßig im Zellkörper verteilt.

Da Zellen nicht vollkommen eben, sondern vielmehr drei-dimensional sind, läßt die konventionelle Epifluoreszenzmikroskopie keine genauen Rückschlüsse auf die exakte räumliche Lokalisation innerhalb der Zelle zu. Daher wurde die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie zur Eingrenzung bestimmter Ebenen im untersuchten Objekt herangezogen, da sie in der Lage ist, optische Schnitte räumlicher Objekte zu generieren. Die Fluoreszenzanregung erfolgt mit einem fein steuerbaren bzw. ablenkbaren Laserstrahl, der das Objekt „scant“. Die Fluoreszenzemission wird durch die Einstellung der konfokalen Apertur (*pinhole*) auf die Strahlengröße reduziert, die der Fokusebene des anregenden Laserstrahls im Objekt entspricht. Somit werden die Emissionen der darüber- und darunterliegenden Ebenen ausgeblendet und es kommt nicht zu Überstrahlungseffekten, die zu falschen Schlußfolgerungen bezüglich der Lokalisation führen könnten.

Die PC12-Zellen wurden im Hinblick auf die Lokalisation von Lanp und der  $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop untersucht. Die konfokalen Aufnahmen zeigen deutlich die membranäre Lokalisation der Integrin-Untereinheit und die cytosolische Lokalisation von Lanp und nur schwache Färbung der Kerne (Abb.28).

Die cytosolische Färbung von Lanp zieht sich auch durch die dünnen Neuriten und in die erweiterten Endstrukturen der Neuriten. Somit ist in Kontaktbereichen zwischen Cytosol und Membran eine Interaktion von Lanp mit dem cytoplasmatischen Teil der  $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit möglich.



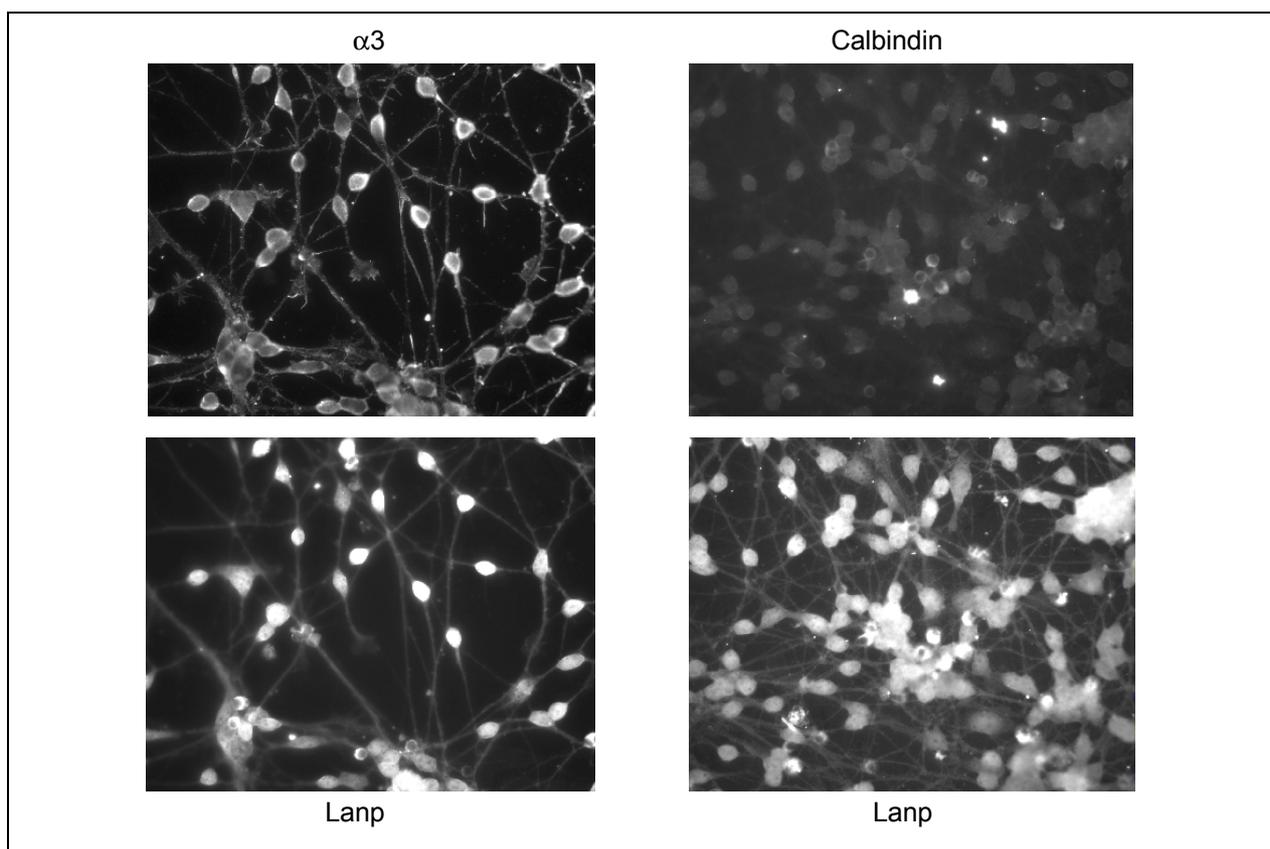
**Abb.28 – Immunfluoreszenzfärbung von PC12-Zellen (Doppelfärbungen) – konfokale Aufnahmen**

PC12-Zellen wurden für 48 h mit bzw. ohne 250 ng/ml NGF auf Laminin-1 kultiviert. Nach Fixierung und Permeabilisierung wurden die Zellen mit mAb Ralph3.2 gegen die  $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit und mit pAb gegen Lanp sowie mit sekundären Antikörpern (AlexaFluor<sup>®</sup>594-markierter Ziege-anti-Kaninchen- und Cy2-markierter Ziege-anti-Maus-Antikörper) gefärbt. Aufnahmen wurden mit dem Zeiss Axiovert 100 Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 410, pinhole 20) mit 63x Vergrößerung gemacht.

Lanp ist an der Differenzierung von Neuronen des Kleinhirns beteiligt und wird besonders stark in Purkinje-Zellen des Kleinhirns exprimiert [Matsuoka et al., 1994]. Das Kleinhirn erhält Inputs aus allen Ebenen des zentralen Nervensystems und aus der Peripherie. Die Efferenzen des Kleinhirns gehen zu tiefer gelegenen Kernen, den Vestibulariskernen im Hirnstamm, welche wiederum an die motorischen Regionen der Großhirnrinde und des Hirnstamms weiterleiten. Die Purkinje-Zellen leiten den ganzen Output der Kleinhirnrinde weiter. Über ihre Dendriten in der Molekularschicht erhalten die Purkinje-Zellen Inputs von Kletterfasern und von Körnerzellen. Die Axone leiten die Efferenzen der Purkinje-Zellen in die tiefer liegende weiße Substanz weiter.

Die Lokalisation des  $\alpha 3\beta 1$ -Integrins konnte auf Proteinebene bisher mittels Immunhistochemie noch nicht im Kleinhirn nachgewiesen werden [de Melker et al., 1997]. Untersuchungen der  $\alpha 3$ -mRNA-Expression ergaben jedoch positive Ergebnisse für Purkinje-Zellen und negative Ergebnisse für Körnerzellen des Kleinhirns [Pinkstaff et al., 1999].

Zur Analyse der Lanp/ $\alpha 3\beta 1$ -Integrin-Beziehung in primären Zellen, wurden aus dem Kleinhirn von neugeborenen Mäusen Zellen gewonnen, in Kultur genommen, unter verschiedenen Bedingungen kultiviert und in der Immunfluoreszenz analysiert. Als Markerprotein für Purkinje-Zellen eignet sich Calbindin [Legrand et al., 1983]. Calbindin ist ein 28 kDa großes Calcium-bindendes Protein, das im Kleinhirn ausschließlich in den Purkinje-Zellen zu finden ist. Abbildung 29 zeigt die Färbung einer Primärzellkultur aus 7 Tage alten Mäusen. Die Ausbildung der Neuriten ist auf Laminin sehr stark und deutlich zu sehen. Die Färbung mit einem Antikörper gegen die  $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit färbt die Zellränder der meisten vorhandenen Neuronen. Lanp ist in allen Zellen der Primärzellkultur stark im Cytosol exprimiert. Die Färbung mit Calbindin zeigt, daß es sich nur bei einem kleinen Teil der vorhandenen Neuronen um Purkinje-Zellen handelt. Der Großteil der Zellen sind die kleinen und sehr zahlreich im Kleinhirn vorkommenden Körnerzellen.



**Abb.29 – Immunfluoreszenz von Primärzellen (Doppelfärbungen) – Epifluoreszenz**

Primärzellen wurden aus den Kleinhirnen 7 Tage alter Mäuse gewonnen und 2 Tage lang auf Laminin-1 kultiviert. Nach Fixierung und Permeabilisierung wurden die Zellen mit mAb Ralph3.2 gegen die  $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit, mAb CB-955 gegen Calbindin, pAb gegen Lanp sowie mit sekundären Antikörpern (TRITC-markierter Ziege-anti-Kaninchen- und Cy2-markierter Ziege-anti-Maus-Antikörper) gefärbt. Die Aufnahmen wurden mit einem Zeiss Axiovert 200 Mikroskop mit 63x Vergrößerung gemacht.

Die Färbung der Primärzellen aus Mäusekleinhirn zeigt, daß die  $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit sehr wohl auf Neuronen des Kleinhirns nachweisbar ist und daß Lanp im Kleinhirn ubiquitär stark exprimiert wird. Wo sich  $\alpha 3\beta 1$ -Integrin und Lanp in Purkinje-Zellen aufhalten, ist anhand dieser Präparationsmethode nicht zu untersuchen, da zu wenige Purkinje-Zellen in der Gesamtpräparation zu finden sind.

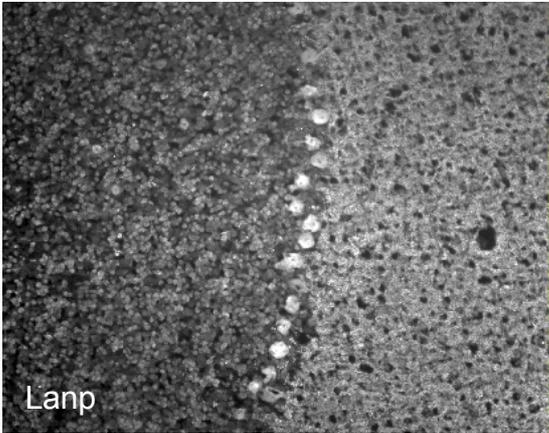
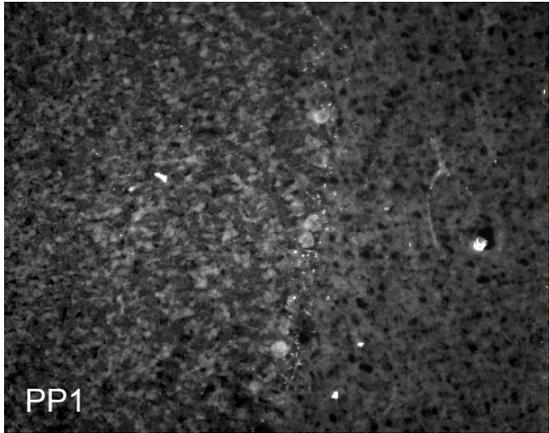
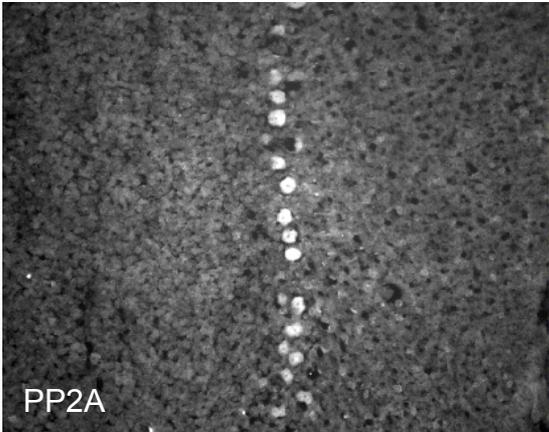
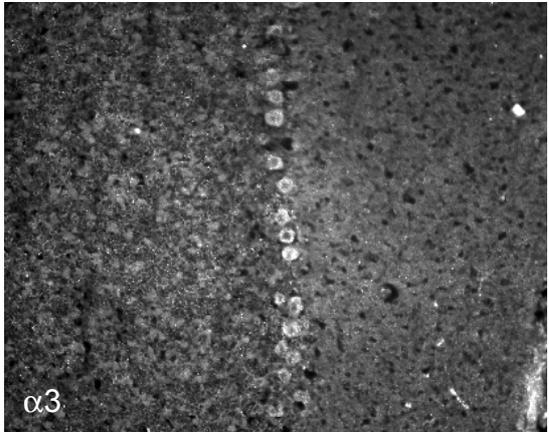
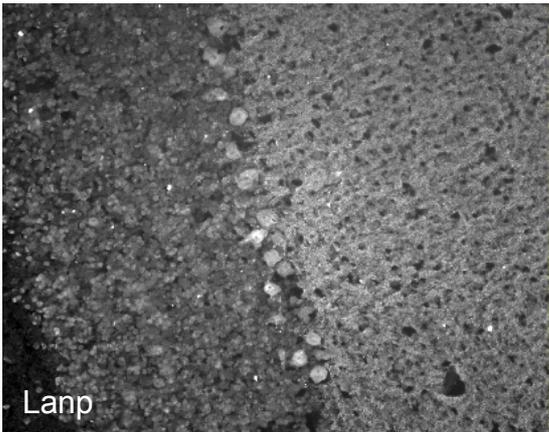
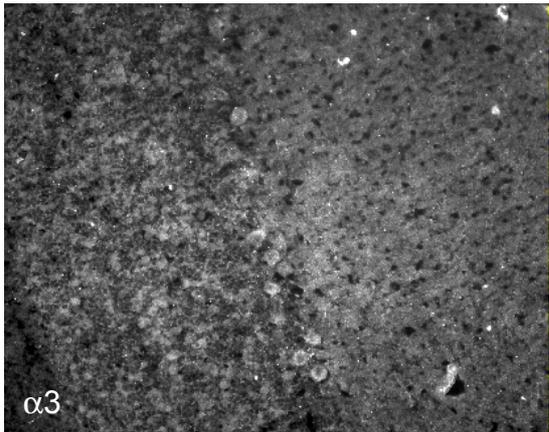
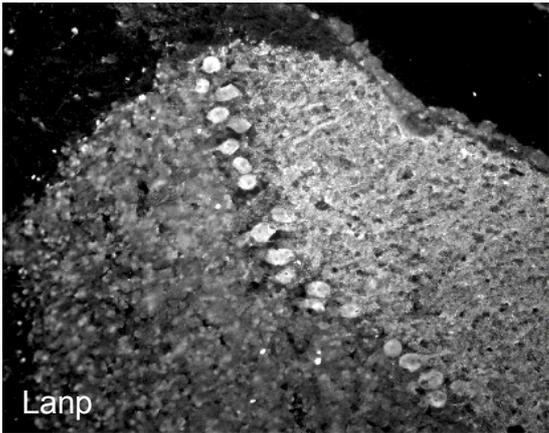
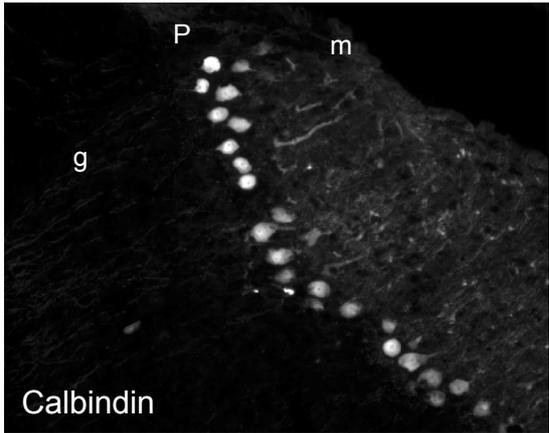
Da die aus Mäusekleinhirnen gewonnenen Zellen nicht im gewünschten Ausmaß zur Untersuchung von Purkinje-Zellen ausreichten, wurde auf Gewebeschnitte von Mäusehirnen zurückgegriffen (Kooperation mit Dr. Brüning, Anatomie der FU-Berlin). Die 16  $\mu\text{m}$  dicken Schnitte repräsentieren Querschnitte durch die hintere Hirnhälfte der Maus. Durch die Färbung gegen Calbindin lassen sich die Strukturen des Kleinhirns sehr gut erkennen, da die Purkinje-Zellen als einzellige Schicht (Stratum gangliosum) zwischen der an der Hirnoberfläche liegenden zellarmen Molekularschicht (Stratum moleculare) und der zellreichen Körnerschicht (Stratum granulosum) liegt. Außerdem sind die Purkinje-Zellen recht groß und oftmals sind ihre Dendriten, die sich in die Molekularschicht erstrecken, deutlich zu sehen (Abb.30).

Die Färbung der  $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit zeigt nur eine relativ schwache Färbung der Purkinje-Zellen und auch der umgebenden Körner- und Molekularschicht. Lanp läßt sich in Cytosol und Kernen der Purkinje- und der Körnerzellen anfärben. PP2A scheint in Purkinje-Zellen verstärkt exprimiert zu werden. Die Färbung mit dem PP1-Antikörper ist sehr schwach.

#### **Folgende Seite:**

#### **Abb.30 – Immunfluoreszenz von Maushirnschnitten (Doppelfärbungen) – Epifluoreszenz**

Maushirnschnitte von 16  $\mu\text{m}$  Schichtdicke wurden auf Glasobjekträgern fixiert, permeabilisiert und blockiert. Die Schnitte wurden mit mAb Ralph3.2 gegen die  $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit, mAb CB-955 gegen Calbindin, mAb E-9 gegen PP1, pAb gegen PP2A und pAb gegen Lanp sowie mit sekundären Antikörpern (AlexaFluor<sup>®</sup>594-markierter Ziege-anti-Kaninchen- und Cy2-markierter Ziege-anti-Maus-Antikörper) gefärbt. Die Aufnahmen wurden mit einem Zeiss Axiovert 200 Mikroskop mit 20x Vergrößerung gemacht. P=Purkinje-Zellen, m=Molekularschicht, g=Körnerschicht.



Die Färbung der Gewebeschnitte bestätigt die Ergebnisse der Färbung der Primärzellen aus Mäusekleinhirn für Lanp: es ist sowohl in Körner- als auch in Purkinje-Zellen stark exprimiert. Die Färbung für PP2A zeigt eine Anreicherung des Proteins in Purkinje-Zellen, während die Färbung für die PP1 negativ ist, was jedoch auch an der zu geringen Sensitivität des Antikörpers liegen kann. Die  $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit färbt bei den Gewebeschnitten im Gegensatz zu den Färbungen der Primärkultur keine Zellstrukturen eindeutig an. Dies ist eventuell auf die unzureichende Zugänglichkeit des Antigens zurückzuführen, das im Gewebeschnitt möglicherweise durch Interaktionen im Zellverbund maskiert vorliegt.

### 3.10 Überexpression von Lanp

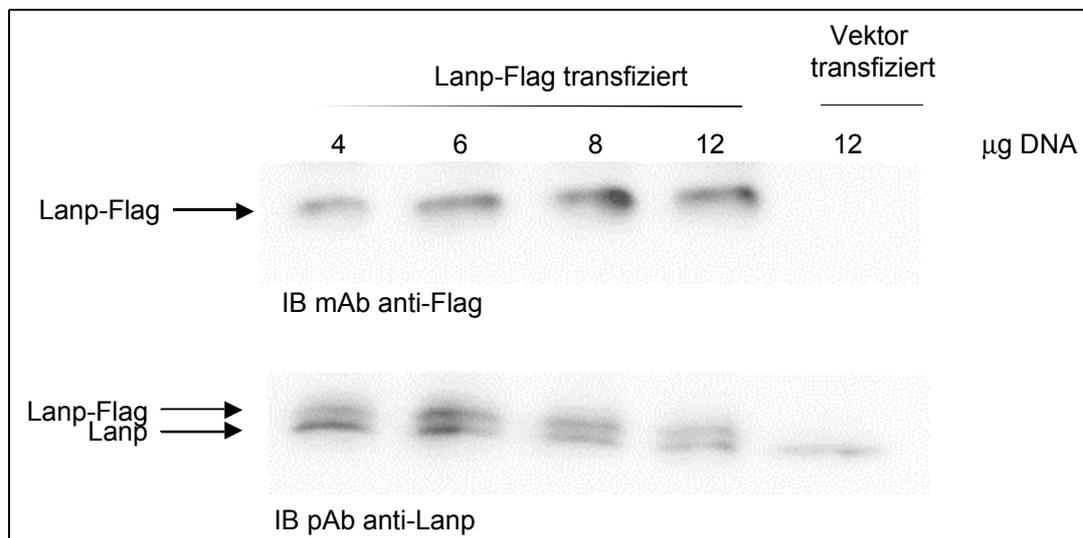
Um Einblicke in den funktionellen Zusammenhang zwischen dem  $\alpha 3\beta 1$ -Integrin und Lanp in der Zelle zu erhalten, wurde Lanp als Fusionsprotein zum einen mit einem 8 Aminosäuren langen Flag-Tag am C-Terminus von humanem Lanp (Arbeitsgruppe Prof. Steitz, Universität Yale, USA) und zum anderen mit dem 26,8 kDa großen *green-fluorescent protein* GFP aus der Qualle *Aequorea victoria* am N-Terminus von Lanp in Säugerzellen exprimiert. Lanp humanen Ursprungs lag als Klon bereits in der Klonsammlung des Deutschen Ressourcenzentrums für Genomforschung (RZPD) vor und wurde zur Klonierung in den pEGFP-C1 Vektor (BD Biosciences) verwendet.

Die Aminosäuresequenz von Lanp aus der Ratte und Lanp aus dem Menschen stimmt zu 87% überein. Daher wurde für die weiteren Versuche mit der humanen Lanp-Sequenz gearbeitet.

In überexprimierenden Zellen sollte der Effekt von überexprimiertem Lanp auf Adhäsions-, Proliferations- und Differenzierungsverhalten untersucht werden. Außerdem sollte über den Flag- bzw. den GFP-Anteil die Präzipitation von Lanp durchgeführt werden und nach copräzipitierenden Molekülen gesucht werden.

Die Transfektion von PC12-Zellen wurde nach dem Prinzip der Lipofektion mit Lipofektamin2000 (Invitrogen) durchgeführt. Die transiente Transfektion führt nach 48-72 h zu einem Expressionsmaximum. Nach Abschätzung im Immunoblot läßt sich durch dieses Transfektionssystem die Expressionsrate in der gesamten Zellpopulation nach transients Transfektion um den Faktor 2 steigern, Einsatz höherer DNA-Mengen führt zu keiner weiteren Steigerung (Abb.31). Die Untersuchung der Zellen mittels Immunfluoreszenz-Färbung zeigt, daß nur ca. 10-30% der Zellen sichtbar mit Lanp-Flag

transfiziert wurden. Die genauere Quantifizierung der Transfektionsrate nach Lipofektion mit Lanp-Flag mittels Durchflußzytometrie war leider nicht möglich, da die Färbung der Zellen mit dem gegen den Flag-Tag gerichteten Antikörper eine starke unspezifische Färbung auf der Zelloberfläche mit sich bringt, die das eigentliche Signal aus dem Zellinnern verdeckt.



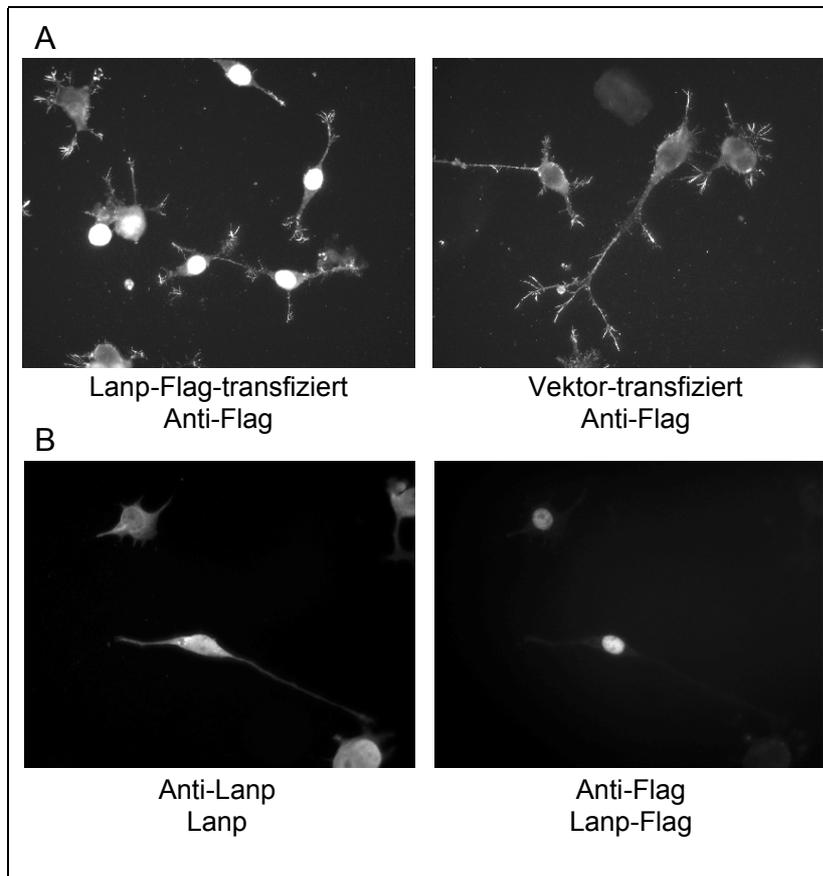
**Abb.31 – Überexpression von Lanp-Flag in PC12-Zellen: Immunoblot**

PC12-Zellen wurden mit verschiedenen Mengen an Lanp-Flag-Vektor bzw. mit Vektor transfiziert und im Immunoblot auf Expression des Lanp-Flag Fusionsproteins untersucht. Die Entwicklung mit dem Antikörper gegen den Flag-Tag zeigt eine Bande bei den Spuren, die Lysat von PC12-Zellen enthalten, die mit Lanp-Flag-Vektor transfiziert wurden. Die mit dem Vektor transfizierten Zellen zeigen kein Signal für Flag. Die Entwicklung des Blots mit Antikörper gegen Lanp zeigt neben der Bande des endogenen Lanps eine knapp darüber liegende Bande für das Fusionsprotein mit dem Flag-Tag. Diese Bande ist bei den Lysaten der mit dem Vektor transfizierten Zellen nicht detektierbar.

Das transfizierte Lanp-Flag ist hauptsächlich im Kern lokalisiert (Abb.32). Die starke Färbung der Zellränder mit dem anti-Flag-Antikörper muß als unspezifisch angesehen werden, da sie im gleichen Ausmaß auch bei den mit Vektor-transfizierten Zellen, die gar kein Flag-markiertes Protein exprimieren, zu sehen ist (Abb.32A). Die Färbung mit dem anti-Lanp-Antikörper zeigt die bekannte ubiquitäre Lokalisation von Lanp, während Lanp-Flag nur im Kern lokalisiert ist (Abb.32B).

Die Transfektion von PC12-Zellen nach dem Prinzip der Nucleofektion mit GFP-Lanp bzw. mit GFP bestätigt die Ergebnisse der Transfektion nach dem Prinzip der Lipofektion mit Lanp-Flag hinsichtlich der Lokalisation der Fusionsproteine im Kern. Während GFP ubiquitär in der Zelle verteilt ist, ist GFP-Lanp hingegen nur im Zellkern zu finden (ohne Abb.). Auch die leicht transfizierbaren Cos7-Zellen, die neben großen Mengen an  $\alpha3\beta1$ -Integrin auch Lanp exprimieren, zeigen die Kernlokalisation von

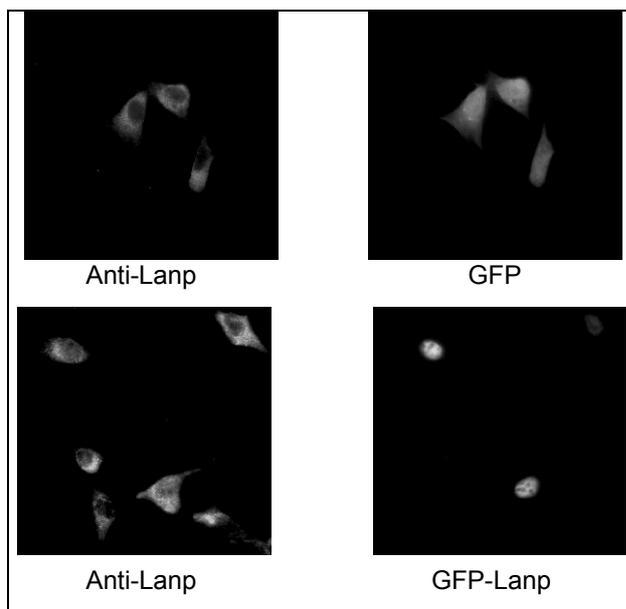
GFP-Lanp, während Lanp vom Antikörper hauptsächlich in cytosolischen Bereichen angefärbt wird (Abb.33).



**Abb.32 – Überexpression von Lanp-Flag in PC12-Zellen: Immunfluoreszenz**

**A** PC12-Zellen wurden mit Lanp-Flag-Vektor bzw. mit Vektor transfiziert und anschließend für 72 h auf Laminin-1 unter dem Einfluß von NGF kultiviert. Der Nachweis transfizierter Zellen erfolgte mit dem Antikörper (mAb M2) gegen den Flag-Tag.

**B** PC12-Zellen wurden mit Lanp-Flag-Vektor transfiziert und nach 72-stündiger Kultivierung mit NGF auf Laminin-1 sowohl mit dem anti-Lanp- als auch mit dem anti-Flag-Antikörper gefärbt.

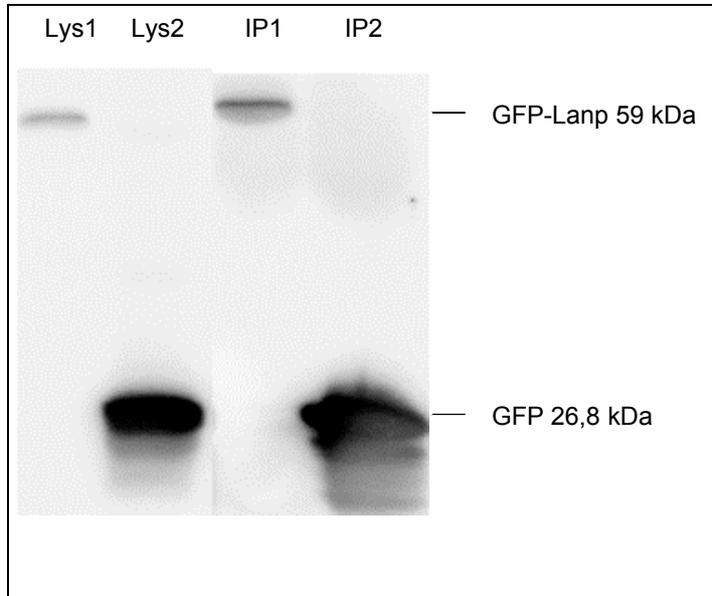


**Abb.33 – Überexpression von GFP-Lanp in Cos7-Zellen: Immunfluoreszenz**

Cos7-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für GFP-Lanp bzw. GFP transfiziert und 24 h lang kultiviert. Die Zellen wurden nach Fixierung und Permeabilisierung zusätzlich mit Antikörper gegen Lanp gefärbt.

Lanp-Flag läßt sich mit dem Antikörper gegen den Flag-Tag nicht eindeutig präzipitieren, auch die Vektor-transfizierten Zellen zeigen unspezifische Banden. GFP-Lanp und GFP konnten sowohl aus PC12- als auch aus Cos7-Zellen präzipitiert

werden, die nach dem Prinzip der Nucleofektion mit GFP-Lanp bzw. GFP transfiziert worden waren (Abb.34), aber der Nachweis copräzipitierender Proteine gelang nicht (nicht gezeigt).

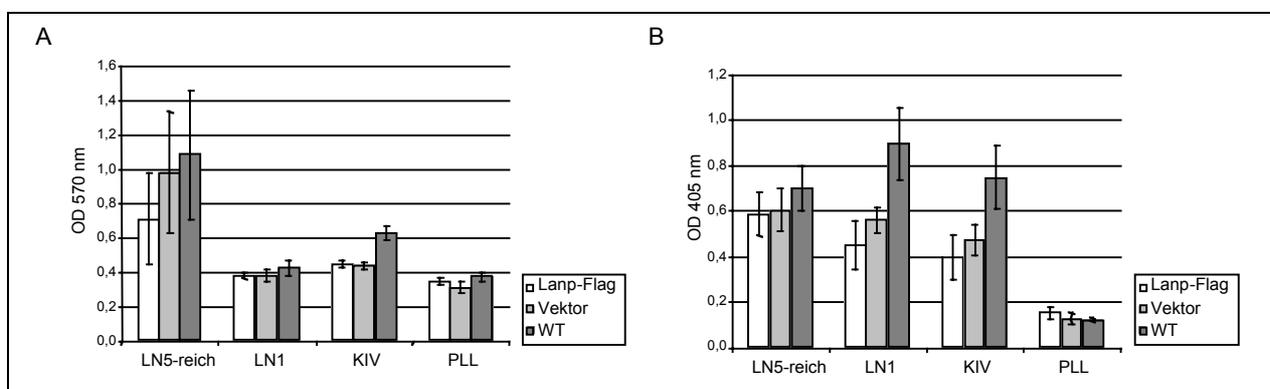


**Abb.34 – Immunpräzipitation von GFP-Fusionsproteinen**

Cos7-Zellen wurden mit GFP bzw. mit GFP-Lanp transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet, solubilisiert und mit anti-GFP-Antikörper (pAb) inkubiert. Die Entwicklung des Immunoblots erfolgte ebenfalls mit anti-GFP-Antikörper (JL-8 mAb). Lys1 = Lysat von GFP-Lanp-transfizierten Zellen, Lys2 = Lysat von GFP-transfizierten Zellen, IP1 = IP aus GFP-Lanp-transfizierten Zellen, Lys2 = IP aus GFP-transfizierten Zellen

Um herauszufinden, ob die Interaktion von Lanp mit der  $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit eine physiologische Bedeutung hat, wurde untersucht, welchen Einfluß die Überexpression von Lanp auf die von Integrinen vermittelte Adhäsion auf ihren extrazellulären Liganden hat. Neben der Adhäsion werden auch Zellproliferation und -differenzierung Integrin-abhängig reguliert und wurden deshalb ebenfalls untersucht.

Die Transfektion von Lanp-Flag in PC12-Zellen hat weder einen Einfluß auf die Adhäsion noch auf die Proliferation auf allen getesteten Matrixproteinen im Vergleich zu den Vektor-transfizierten bzw. untransfizierten Zellen (Abb.35). Die Transfektion an sich hat einen leichten proliferationshemmenden Effekt.



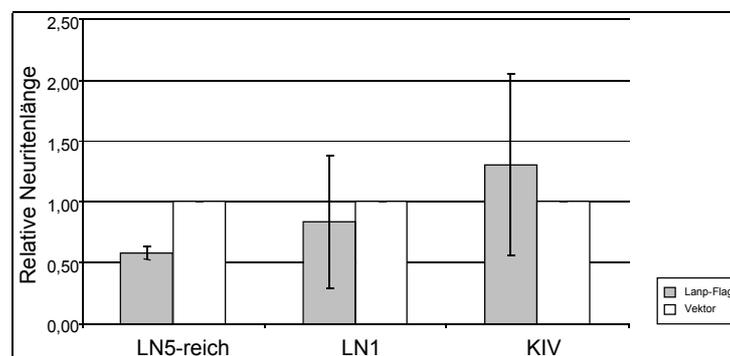
**Abb.35 – Überexpression von Lanp-Flag in PC12-Zellen: Adhäsion und Proliferation**

PC12-Zellen wurden mit Lanp-Flag-Vektor bzw. mit Vektor transfiziert. (Abkürzungen: LN5-reich = Laminin-5-reiche Matrix, LN1 = Laminin-1, KIV = Kollagen-KIV, PLL = Poly-L-lysin, WT = Wildtyp).

**A** Die Zellen wurden 16 h nach der Transfektion für 2 h auf verschiedenen Matrices zur Adhäsion gebracht. Die Adhäsionsfähigkeit der Zellen wurde nach Fixierung und Färbung der Zellen anhand der optischen Dichte bei 570 nm bestimmt. Die Werte auf der Laminin-5-reichen Matrix schwanken ziemlich stark, da es sich hierbei um eine von Zellen synthetisierte Matrix handelt, die natürlichen Schwankungen unterliegt.

**B** PC12-Zellen wurden 12 h nach der Transfektion für 24 h auf verschiedenen Matrices gehalten und auf ihr Proliferationsverhalten untersucht. Die Zellen erhalten markierte DNA-Bausteine, die sie während des Zellzyklus inkorporieren. Über den Nachweis der Menge der inkorporierten DNA-Bausteine läßt sich die Rate der Zellteilung bestimmen.

Der Einfluß der Überexpression von Lanp-Flag auf die Differenzierung von PC12-Zellen wurde nach transients Transfektion nach dem Prinzip der Nucleofektion untersucht. Die Nucleofektion steigert die Transfektionsrate von PC12-Zellen auf 30-50% im Vergleich zu den 10-30%, die durch Lipofektion erreicht werden. Die Zellen wurden auf verschiedenen Matrices für 72 h mit NGF inkubiert und anschließend mit dem gegen Flag gerichteten Antikörper markiert. Die transfizierten Zellen konnten so von den nicht transfizierten Zellen unterschieden werden.



**Abb.36 – Überexpression von Lanp-Flag in PC12-Zellen: Differenzierung**

PC12-Zellen wurden mit Lanp-Flag-Vektor bzw. mit Vektor transfiziert und 72 h mit NGF auf verschiedenen Matrices kultiviert. Die Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und mit Antikörper gegen Flag gefärbt. Zellen, deren Zellkern ein deutliches Signal ergab, wurden als Lanp-Flag-transfiziert betrachtet. Die Neuritenlänge der Zellen wurde erfaßt und ins Verhältnis zur Neuritenlänge der Zellen gesetzt, die nur mit Vektor transfiziert worden waren. (Abkürzungen: LN5-reich = Laminin-5-reiche Matrix, LN1 = Laminin-1, KIV = Kollagen-KIV).

Es wurden nur die transfizierten Zellen in der Auswertung berücksichtigt. Als Referenzwert dienten die mit dem Vektor ohne die Lanp-Flag-Sequenz transfizierten Zellen. Die Neuritenlängen der Zellen wurden gemessen und als Pixel/Zelle festgehalten. Der Versuch wurde viermal wiederholt und pro Versuch wurden 10-60

Zellen ausgewertet. Für die Differenzierung auf Laminin-5-reicher Matrix ergaben sich reduzierte Neuritenlängen nach Transfektion von Lanp-Flag. Die Neuriten sind um den Faktor  $0,58 \pm 0,05$  kürzer als bei den Vektor-transfizierten Zellen (Abb.36). Auf Kollagen-IV und Laminin-1 hingegen variierten die Werte der einzelnen Durchführungen stärker und es ergaben sich letztlich keine signifikanten Veränderungen der Neuritenlänge auf diesen Matrices nach Transfektion mit Lanp-Flag ( $1,31 \pm 0,75$  bzw.  $0,84 \pm 0,55$ ).

### 3.11 **Knock down von Lanp mit Antisense-Oligonucleotiden**

Wie die Überexpression von Proteinen kann auch die Deletion bzw. drastische Reduktion der Proteinexpression des zu untersuchenden Proteins Aufschluß über dessen Funktion geben.

Um Aufschluß über die Funktion von Lanp im Zusammenhang mit der Interaktion mit den Integrin-Untereinheiten zu erlangen, sollte daher die Expression von Lanp drastisch gesenkt werden und die Zellen sollten unter diesen Bedingungen auf Veränderungen im Adhäsions-, Migrations-, Proliferations- und Differenzierungsverhalten untersucht werden.

Ein weit verbreiteter Ansatz zur vorübergehenden spezifischen Senkung der Expression eines Zielgens ist die Antisense-Technologie (eingeführt von [Zamecnik und Stephenson, 1978]). Antisense-Oligonucleotide (ASO) sind DNA-Oligonucleotide, deren Sequenz komplementär zu der Sequenz der RNA (*ribonucleic acid*) ist, die vom Zielgen transkribiert wurde. Diese Moleküle blockieren die Genexpression, indem sie mit dem RNA-Transkript interagieren. Es wird angenommen, daß die entstehenden DNA-RNA-Hybride von der RNaseH erkannt und geschnitten werden, wodurch die Menge an Ziel-RNA reduziert wird.

Es wurden revers komplementäre (antisense) DNA-Oligonucleotide (6 verschiedene 17mere) mit durchgehendem Phosphothioat-Rückgrat (MWG Biotech) synthetisiert. Das Phosphothioat-Rückgrat soll die ASOs vor dem Abbau durch die allgegenwärtigen Nucleasen schützen.

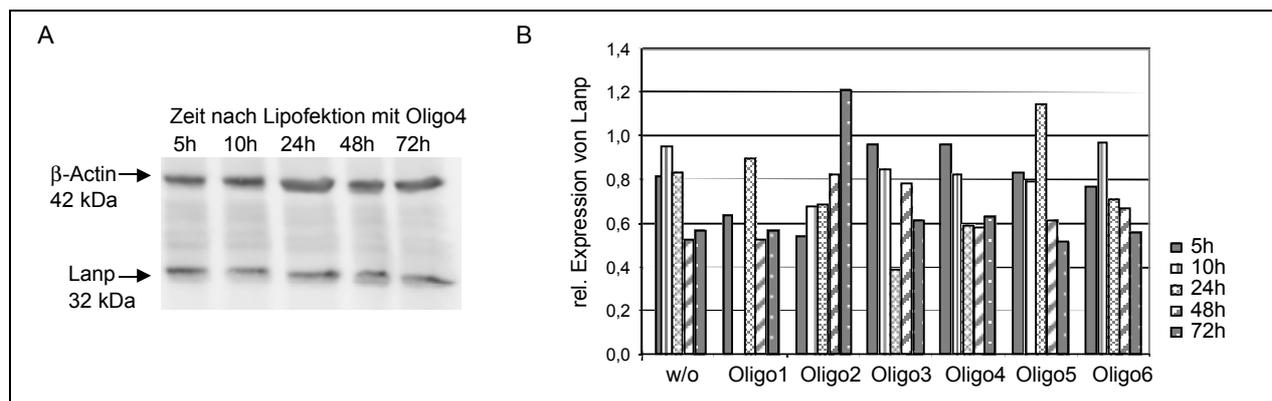
Die Auswahl der Oligos erfolgte nach folgenden Kriterien:

- Möglichst hoher GC-Gehalt, da dies die Schmelztemperatur der Doppelstränge bzw. die Affinität der Oligos zur mRNA erhöht
- Keine Tetra-G-Sequenz [Sen und Gilbert, 1992], keine internen Palindrome, um die Bildung von Haarnadeln oder anderer dreidimensionaler Strukturen zu vermeiden

- CpG Inseln vermeiden, da diese Immunantworten auslösen können [Krieg et al., 1995]
- Sequenzen auf möglichst geringe Ähnlichkeit mit anderen Genen in der DNA-Sequenzdatenbank überprüfen, um die Spezifität zu maximieren

Als Kontrollen sollten die entsprechenden Sense-Oligos bzw. Antisense-Oligos mit reverser Orientierung verwendet werden, wenn ein aktives Antisense-Oligonucleotid gefunden wurde.

Der Transfer der ASOs in die Zellen erfolgte mittels Oligofektamin (Invitrogen). Die Expression des Zielproteins Lanp wurde über einen Zeitraum von 72 h auf Proteinebene untersucht und per Immunoblot und  $\beta$ -Aktin als interner Kontrolle quantifiziert (Beispiel Oligo 4 Abb.37A).



**Abb.37 – Knock down von Lanp mit Antisense-DNA-Oligonucleotiden**

PC12-Zellen ( $10^6$  Zellen, die über Nacht auf Kollagen-IV auf Schalen mit 6 cm Durchmesser kultiviert worden waren) wurden mit je 0,4 nmol Oligonucleotid in optimiertem Medium Opti-MEM<sup>®</sup> mit je 6  $\mu$ l Oligofektamin behandelt.

**A** Immunoblot-Analyse der PC12-Zellen, die mit Oligonucleotid 4 verschieden lange behandelt wurden. Der Immunoblot wurde gleichzeitig mit Antikörpern gegen Lanp und gegen  $\beta$ -Aktin entwickelt.

**B** Quantifizierung der Immunoblot-Analysen der verschiedenen Oligonucleotide. Die densitometrischen Werte für Lanp wurden über die  $\beta$ -Aktin-Bande der jeweiligen Spur normiert und auf den Wert zum Zeitpunkt 0 vor der Lipofektion bezogen.

Die Lipofektion von PC12-Zellen mit DNA-Oligonucleotiden wurde sechsmal mit verschiedenen kleineren Modifikationen durchgeführt. Manchmal zeigten sich leichte *knock-down*-Effekte einzelner Oligos (z.B. Oligo 3 in Abb.37B), die aber nicht durchgängig reproduzierbar waren. Die Quantifizierung mittels Immunoblot ist sehr fehler-

anfällig und auch der Einsatz von  $\beta$ -Aktin als Ladungskontrolle räumt die Schwankungen innerhalb einer Entwicklung nicht völlig aus.

### 3.12 Hemmung des Kernexports von Lanp mit Crm1-Inhibitoren

Da der *knock down* von Lanp mit Antisense-Oligos nicht den gewünschten Effekt brachte, wurde versucht, die Lanp-Funktion mittels spezifischer Inhibitoren zu stören.

Lanp trägt ein basisches Kernlokalisierungssignal [Kalderon et al., 1984] und Leucinreiche Motive für die Bindung an Crm1/Exportin [Fornerod et al., 1997; Fukuda et al., 1997].

Von Brennan et al. wurde festgestellt, daß Lanp/pp32 mit dem Kernexportfaktor Crm1 (*chromosomal region maintenance protein 1*) interagiert und darüber auch aus dem Kern exportiert werden kann [Brennan et al., 2000]. Der Crm1-abhängige Kernexport läßt sich durch Leptomycin B, eine aus *Streptomyces* isolierte ungesättigte verzweigte Fettsäure inhibieren (Abb.38). Leptomycin B reagiert wahrscheinlich mit einem Cystein-Rest in Crm1 innerhalb der konservierten Kontrollregion, die für die Interaktion mit dem Kernexportsignal anderer Proteine verantwortlich ist [Kudo et al., 1999]. Eine weitere Substanz namens Ratjadon (Abb.38), die aus *Sorangium cellulosum* isoliert wurde, zeigt anti-proliferative Wirkung auf verschiedene Tumorzellen, arretiert diese in der G1-Phase des Zellzyklus und löst bei Konzentrationen bis zu 50 nM keine Apoptose aus [Burzlaff et al., 2003; Kalesse et al., 2001]. Daten weisen darauf hin, daß Ratjadon Crm1 inhibiert [Koster et al., 2003]. Ratjadon (50 nM) hat keinen Einfluß auf das Adhäsionsverhalten von PC12-Zellen auf verschiedenen Matrices (Abb.39A), die Proliferation wird jedoch auf allen getesteten Matrices drastisch gehemmt (Abb.39B).

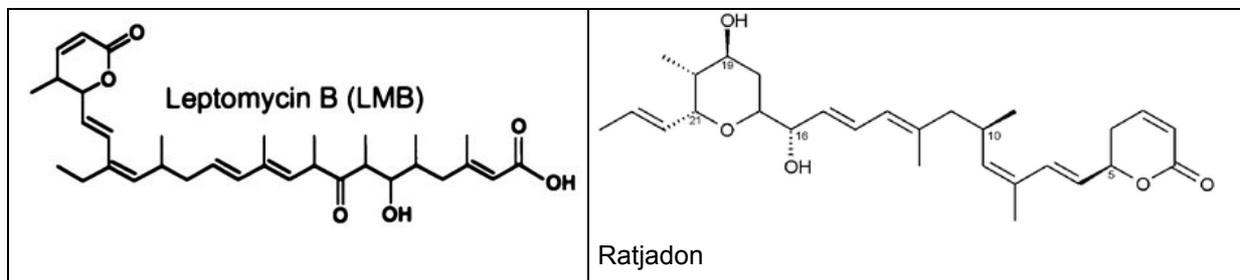
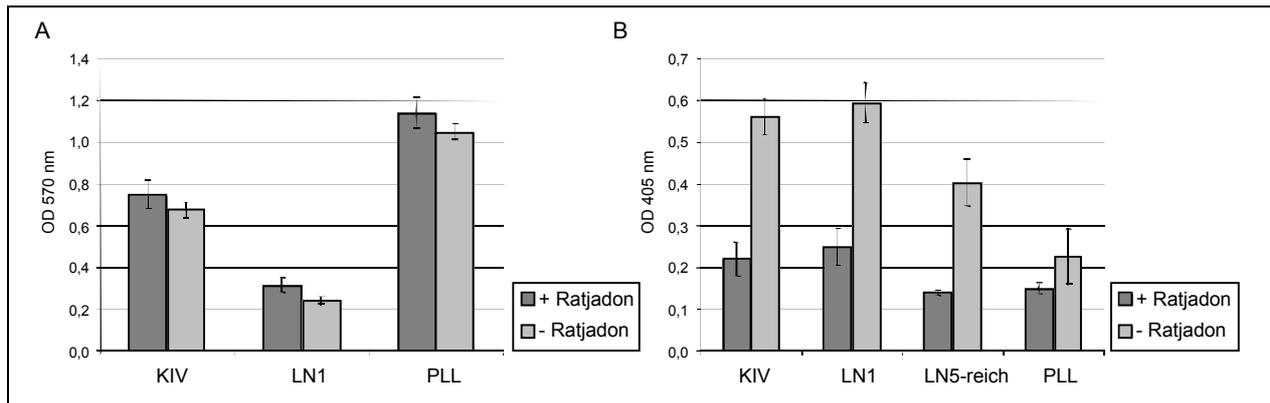


Abb.38 Strukturformeln von Leptomycin B und Ratjadon

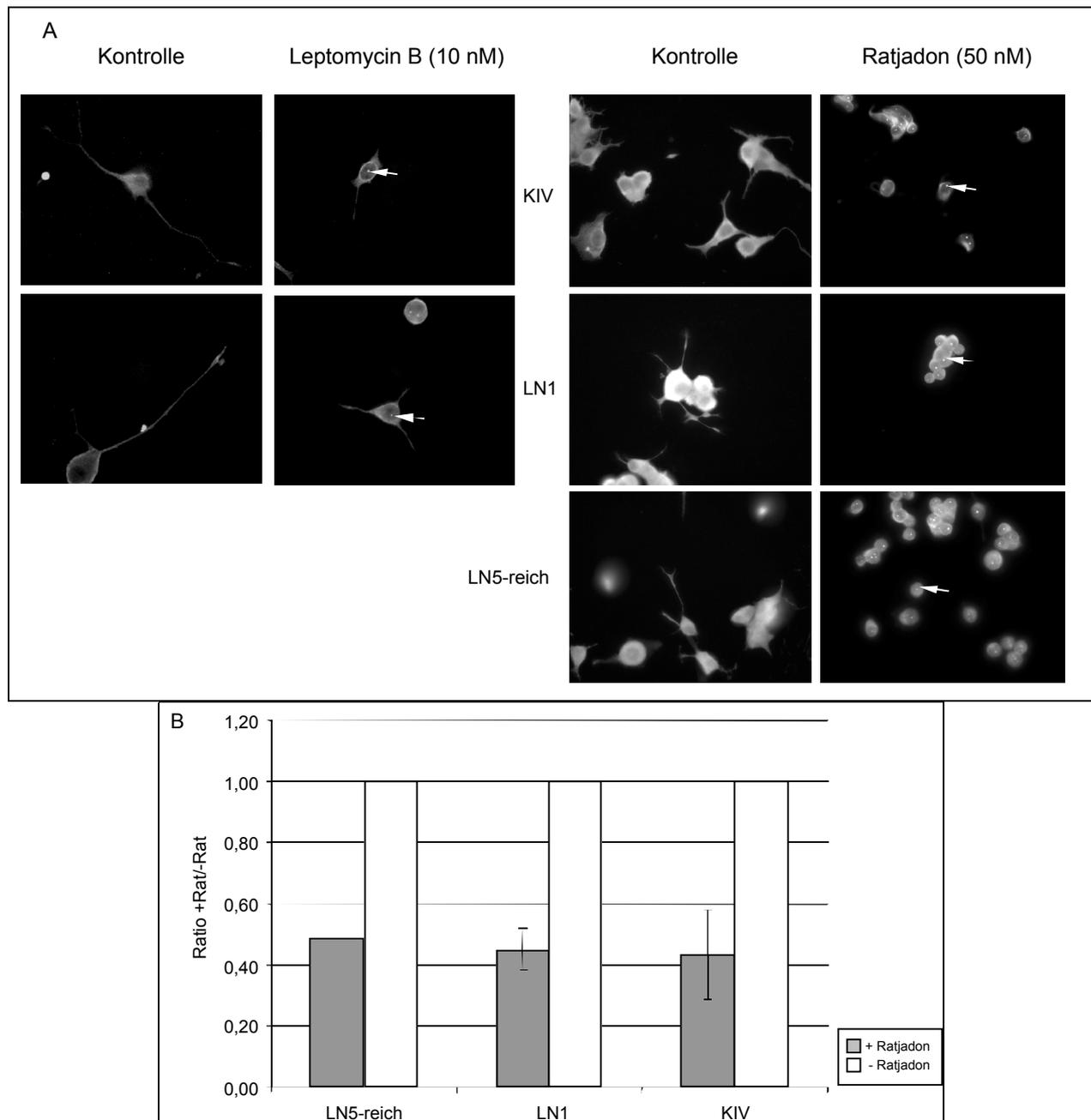


**Abb.39 – Adhäsion und Proliferation von PC12-Zellen nach Ratjadon-Behandlung**

PC12-Zellen wurden 48 h mit 50 nM Ratjadon inkubiert und anschließend **A** für 2h im Adhäsionsassay bzw. **B** für weitere 24 h im Proliferationsassay auf verschiedenen Matrices eingesetzt.

(Abkürzungen: KIV = Kollagen-KIV, LN1 = Laminin-1, LN5-reich = Laminin-5-reiche Matrix, PLL = Poly-L-lysin).

PC12-Zellen wurden während ihrer 72-stündigen Differenzierung auf verschiedenen Matrices mit Leptomycin B oder mit Ratjadon inkubiert. In Abbildung 40A ist zu sehen, daß behandelte Zellen im Vergleich zu Kontroll-Zellen, die nur mit den entsprechenden Mengen an Lösungsmittel inkubiert worden waren, deutlich kürzere Neuriten aufweisen. Für die Behandlung mit Ratjadon wurde die Verkürzung der Neuriten quantitativ erfaßt. Nach Ratjadon-Behandlung sind die Neuriten auf allen untersuchten Matrices im Mittel halb so lang wie bei unbehandelten Zellen (Abb.40B). Sowohl bei der Behandlung mit Leptomycin B als auch mit Ratjadon zeigt die Lanp-Färbung eine punktuelle Anreicherung des Proteins im Kern der Zellen (siehe Pfeile Abb.40A).



**Abb.40 – Hemmung des Crm1-abhängigen Kernexports in PC12-Zellen**

(Abkürzungen: LN5-reich = Laminin-5-reiche Matrix, LN1 = Laminin-1, KIV = Kollagen-KIV).

**A** PC12-Zellen wurden für 72 h auf verschiedenen Matrices mit NGF unter dem Einfluß von 10 nM Leptomycin B bzw. 50 nM Ratjadon kultiviert und mit Antikörper gegen Lanp gefärbt.

**B** PC12-Zellen wurden für 72 h auf verschiedenen Matrices mit NGF unter dem Einfluß von 50 nM Ratjadon kultiviert. Die Zellen wurden anschließend fixiert, permeabilisiert und mit Kristallviolett gefärbt, um die Neuritenlängen quantitativ zu erfassen. Die Neuritenlängen von Lösungsmittel-behandelten Zellen wurden als Referenzwert (=1) eingesetzt.

Auch nach Crm1-Inhibition ist Lanp weiterhin im Cytosol lokalisiert, d.h. daß nicht das gesamte Lanp im Kern gehalten wird.