

4 Diskussion

Das $\alpha 3\beta 1$ -Integrin spielt unter anderem eine wichtige Rolle bei der laminaren Organisation des Gehirns [Dulabon et al., 2000] und bei der Entwicklung des peripheren Nervensystems [DeFreitas et al., 1995].

Es ist vor allem an der Modulation der Signalwege beteiligt, die von anderen Rezeptoren initiiert wurden (Übersicht [Kreidberg, 2000]). Die genaue Funktionsweise dieses Integrins ist noch nicht geklärt. Es ist die α -Integrin-Untereinheit, welche die Spezifität des Integrins bestimmt. Die α -Integrin-Untereinheit legt durch seine Interaktionen mit bestimmten transmembranären und cytoplasmatischen Proteinen die Aktivierung spezifischer intrazellulärer Signalwege durch individuelle Integrine fest.

In der vorliegenden Arbeit wird die Identifizierung von Proteinen beschrieben, die an den cytoplasmatischen Anteil der $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit binden. Durch die Analyse dieser interagierenden Proteine sollten Erkenntnisse über die Funktion des $\alpha 3\beta 1$ -Integrins im zellulären Zusammenhang der neuronalen Differenzierung und der Signaltransduktion gewonnen werden.

4.1 Identifizierung cytosolischer Bindungspartner der $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit

Mithilfe der Ligandenaffinitätschromatographie wurden acht Proteine aus dem Cytosol von neuronal differenzierten PC12-Zellen identifiziert, die an den 37 Aminosäuren langen cytoplasmatischen Anteil der $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit gebunden wurden. Dabei wurden die Proteine Set α , Lanp und La/SS-B in zwei unabhängigen Experimenten massenspektrometrisch nachgewiesen; Lanp, PP1 und PP2A konnten mittels Immunoblot in zwei unabhängigen Experimenten identifiziert bzw. bestätigt werden.

Darüber hinaus konnte durch den Einsatz von Antikörpern gegen DRAL/FHL2, dessen Interaktion mit dem cytoplasmatischen Bereich der $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit in *yeast two-hybrid screens* nachgewiesen wurde [Wixler et al., 2000], die Anwendbarkeit der Ligandenaffinitätschromatographie zum Nachweis interagierender Proteine bekräftigt werden. Die Ligandenaffinitätschromatographie liefert folglich reproduzierbare und zuverlässige Ergebnisse.

Der Nachweis weiterer Proteine, die als Interaktionspartner der cytosolischen Bereiche von α -Integrin-Untereinheiten im allgemeinen beschrieben wurden, wie Calreticulin [Coppolino et al., 1997] und PLC γ [Vossmeyer et al., 2002] bzw. von weiteren Proteinen, die als Interaktionspartner anderer α - bzw. β -Integrin-Untereinheiten identifiziert worden sind, gelang hingegen nicht. Dies kann zum einen daran liegen, daß die

gewählten Versuchsbedingungen keine Interaktion zulassen. So ist z.B. für die Interaktion der KXGFFKR-Sequenz der α -Integrin-Untereinheit mit Calreticulin beschrieben, daß sie nur in Abwesenheit von Serin/Threonin-Phosphatase-Inhibitoren erfolgt [Coppolino und Dedhar, 1999]. Da die Affinitätschromatographie in Anwesenheit des Serin-/Threonin-Phosphatase-Inhibitors Na_3VO_4 durchgeführt wurde, kann dies den fehlenden Nachweis von Calreticulin in den Eluaten der $\alpha 3$ /cyto-Säule erklären. Des weiteren kann durch die begrenzte Sensitivität der eingesetzten Antikörper der Nachweis der Proteine, die nur in geringen Mengen von $\alpha 3$ /cyto gebunden wurden, fehlschlagen und so zu falsch-negativen Ergebnissen führen. Aus dem nicht erbrachten Nachweis eines Proteins bei der Immunoblot-Analyse der Eluate der Affinitätschromatographie-Säulen läßt sich somit noch keine endgültige Aussage über die Interaktion zwischen $\alpha 3$ /cyto und den untersuchten Proteinen ableiten.

Die Interaktionen der identifizierten Proteine mit der $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit könnten indirekter Natur sein und es kann sein, daß die Interaktionen durch bislang nicht identifizierte Protein vermittelt werden. Bindungen über Proteine, die lateral mit dem $\alpha 3\beta 1$ -Integrin assoziieren wie die Tetraspanine [Berditchevski et al., 1997a; Berditchevski et al., 1997b] und uPAR [Ghosh et al., 2000] können ausgeschlossen werden, da die Affinitätschromatographie mit einer cytosolischen Proteinfraction durchgeführt wurde. Daher können auch Interaktionen über die $\beta 1$ -Integrin-Untereinheit ausgeschlossen werden. Des weiteren scheinen die Bindungen unabhängig von der Phosphorylierung der $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit selbst zu sein, da das rekombinant exprimierte Fusionsprotein $\alpha 3$ /cyto nicht phosphoryliert war, wie massenspektrometrische Analysen ergaben (Abb.9+10).

4.1.1 Die Interaktionspartner PP1, PP2A und Lanp

Der cytoplasmatische Anteil der $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit trägt zwei putative Serin-/Threonin-Phosphorylierungsstellen. Es wurde gezeigt, daß die Serin-/Threonin-Phosphorylierung und -Dephosphorylierung für Integrin-abhängige Signalwege nötig ist [Gear et al., 1997; Ivaska et al., 2002; Pankov et al., 2003; Seminario et al., 1998; Zhang et al., 2001b]. Deshalb wurden die weiteren Studien auf das Protein Lanp fokussiert, ein Phosphoprotein, das unter anderem als hitzestabiler Inhibitor der Serin-/Threonin-Phosphatase PP2A [Li et al., 1995; Li et al., 1996] und als Regulator der PP1 agiert [Katayose et al., 2000]. Lanp ist auch bei der Entwicklung der Neuronen des Kleinhirns

beteiligt [Matsuoka et al., 1994] und bei der Modulation der Neuritogenese bei Neuro2a-Zellen, indem es mit dem Mikrotubuli-assoziierten Protein MAP1B interagiert [Opal et al., 2003].

Die Serin-/Threonin-Phosphatasen PP1 und PP2A, die durch Lanp reguliert werden, wurden ebenfalls von der α 3/cyto-Säule spezifisch zurückgehalten. Die beiden Phosphatasen sind in Eukaryonten die "Haupt"-Serin-/Threonin-Phosphatasen. PP1 spielt eine essentielle Rolle während des Zell-Zyklus [Berndt, 1999] und ist am Glycogen-Metabolismus, der Muskelkontraktion und der Proteinsynthese [Brady und Saltiel, 2001] beteiligt. Die PP2A ist bei der Regulation des Zell-Zyklus sowie bei der Zellentwicklung und der Ausbildung der Zellmorphologie involviert [Janssens und Goris, 2001].

Es erscheint unwahrscheinlich, daß alle interagierenden Proteine zur selben Zeit mit dem cytoplasmatischen Bereich der α 3-Integrin-Untereinheit Kontakte eingehen. Jedoch sind die alle Komponenten des Proteinkomplexes Integrin/Lanp/PP1/PP2A in der Lage, mit weiteren Proteinen, die an der Signaltransduktion der Integrine beteiligt sind, Bindungen einzugehen. So bindet PP1 z.B. auch FAK [Fresu et al., 2001], die PP2A interagiert mit Paxillin [Ito et al., 2000] und Lanp mit den Phosphatasen PP1 [Katayose et al., 2000] und PP2A [Li et al., 1996], und den Mikrotubuli-assoziierten Proteinen MAP2, MAP4 und Tau [Ulitzur et al., 1997a], sowie MAP1B [Opal et al., 2003]. Folglich ist die Bildung eines Signalkomplexes in vivo am Integrin vorstellbar. Die Kooperation der PP1 mit der PP2A spielt eine wichtige Rolle bei der Reorganisation des Cytoskeletts während der Sekretion von Mastzellen [Holst et al., 2002]. Die reziproke Regulation der PP1 und der PP2A durch dasselbe regulatorische Protein Lanp ist einzigartig [Katayose et al., 2000] und könnte zu den komplexen regulatorischen Erfordernissen der Integrin-Signalwege beitragen.

4.1.2 Die Lanp-Familie

Lanp (auch pp32 für Phosphoprotein MW 32 kDa) ist ein Mitglied der Familie der Leucin-reichen Proteine [Kobe und Deisenhofer, 1994; Kobe und Deisenhofer, 1995a; Kobe und Deisenhofer, 1995b]. Diese Proteine sind an einer Vielzahl von Funktionen wie z.B. Signalweiterleitung, Proteinabbau, Cytoskelett-Umbau und Morphogenese beteiligt, wobei wahrscheinlich ihre Leucin-reichen Wiederholungen als Adapter-Stellen für Protein-Protein-Interaktionen dienen.

Bei Lanp sind die Leucin-reichen Wiederholungen im N-terminalen Bereich lokalisiert, der wahrscheinlich eine amphipathische α -Helix ausbildet und Lanp eine globuläre Kopfdomäne gibt [Chen et al., 1996]. Der C-terminale Bereich ist sehr sauer, lang gestreckt und hydrophil und kann durch ionische Wechselwirkungen viele Interaktionen eingehen [Chen et al., 1996; Matsuoka et al., 1994].

Es existieren einige Proteine, die sowohl über die ausgedehnte saure Domäne als auch Leucin-reiche Wiederholungen verfügen und eine große Homologie mit Lanp aufweisen. Diese werden zu der Lanp-Familie gezählt und sind wahrscheinlich durch Genduplikationen entstanden [Opal et al., 2004]. Die Nomenklatur der Lanp-Familienmitglieder ist verwirrend, da vielen Mitgliedern je nach Zusammenhang der Entdeckung mehr als ein Name gegeben wurde. So sind April, Pal31 und SSP-29 (*silver-stainable protein* MW 29 kDa) identisch [Mencinger et al., 1998; Mutai et al., 2000; Zhu et al., 1997]. CPD1 (*cerebellar postnatal development protein 1*) und LANP-L (*lanp-like protein*) sind ebenfalls identisch [Matsubae et al., 2000; Radrizzani et al., 2001]. Zwei humane Homologe von Lanp/pp32 werden als pp32r1 und pp32r2 bezeichnet [Kadkol et al., 1999; Kadkol et al., 2001] und zeichnen sich beide durch hohe Sequenzähnlichkeit zu Lanp (ca. 93% auf DNA-Ebene) aus. Die Lanp-Familienmitglieder zeigen auch zu den TAF-Proteinen (*template-activating factor proteins*) TAF-1 α und TAF-1 β (eine gekürzte Variante von TAF-1 β entspricht dem Set α -Protein) eine allerdings vergleichsweise geringe Sequenzähnlichkeit (20% auf Proteinebene). Die TAF-1-Protein besitzen wie die Lanp-Familienmitglieder einen langen sauren C-terminalen Bereich, jedoch keine Leucin-reichen Wiederholungen in ihrer N-terminalen Sequenz [Adachi et al., 1994; Matsumoto et al., 1993; Nagata et al., 1995; von Lindern et al., 1992].

Mitglieder der Lanp- und der TAF-1-Familie wurden in verschiedenen Zusammenhängen gemeinsam isoliert, was überlappende Funktionen oder gemeinsame Funktionen als Teil eines Komplexes nahelegt. Die möglichen Funktionen und subzellulären Lokalisationen dieser Proteine sind verwirrend in ihrer Vielzahl. Deshalb soll im folgenden versucht werden, diese strukturiert aufzulisten bzw. zusammenzufassen. An der inneren Plasmamembran von Lymphozyten wurden Lanp und Set als HLA-assoziierte Proteine beschrieben (daher auch die Synonyme PHAP1 für Lanp und PHAP2 für Set) und mit der Signaltransduktion der HLA-Proteine (*human leukocyte antigen protein*) in Verbindung gebracht [Vaesen et al., 1994]. Aus dem Cytosol von Rindernierenzellen wurden Lanp und Set einzeln und als Bestandteile größerer Komplexe isoliert und als potente Inhibitoren der Serin-/Threoninphosphatase PP2A

identifiziert [Li et al., 1995; Li et al., 1996]. Set und Lanp assoziieren mit der PP1 und modifizieren deren Substratspezifität [Katayose et al., 2000]. Im Cytoplasma bindet Lanp an verschiedene Klassen der strukturellen Mikrotubuli-assoziierten Proteine (MAPs: MAP2, MAP4, Tau [Itin et al., 1999; Ulitzur et al., 1997a; Ulitzur et al., 1997b] und MAP1B [Opal et al., 2003]) und wurde in diesem Zusammenhang als Mapmodulin bezeichnet. Im Kern wird den Lanp- und TAF-Proteinen eine Rolle als Mitglieder der Transkriptions-Repressions-Maschinerie zugeschrieben. Lanp- und TAF-Proteine können als saure Proteine die basischen Histone maskieren, was zur Inhibition der Histon-Acetylierung und somit zur Verringerung der Transkriptionsaktivität der betreffenden Genabschnitte und deren Stilllegung führt [Seo et al., 2002; Seo et al., 2001; Shikama et al., 2000]. Im Kern von Purkinje-Zellen wurde auch die Interaktion von Lanp mit Ataxin-1, dem für die spinocerebelläre Ataxie Typ I verantwortlichen Genprodukt, in Abhängigkeit der Anzahl der Glutamin-Wiederholungen im Ataxin-1-Protein beobachtet [Matilla et al., 1997]. Für die sowohl im Kern als auch im Cytoplasma auftretenden Proteine der Lanp- und TAF-1-Familie wurde gezeigt, daß sie zwischen Kern und Cytosol wandern können. Lanp trägt ein basisches Kernlokalisations-Signal und Leucin-reiche Motive für die Bindung an Crm1/Exportin [Brennan et al., 2000; Fornerod et al., 1997; Fukuda et al., 1997]. Da die Lanp-Familienmitglieder außerdem zur Bindung des RNA-bindenden Proteins HuR in der Lage sind, wurde eine Rolle bei der RNA-Stabilisierung und dem RNA-Transport postuliert [Brennan et al., 2000; Gallouzi und Steitz, 2001]. Eine weitere Funktion hängt von der Doppellokalisierung in Kern und Cytosol bzw. am endoplasmatischen Retikulum ab: die Modulation der Apoptose auf der Ebene der Induktion von DNA-Strangbrüchen und der Caspase-Aktivierung [Beresford et al., 2001; Fan et al., 2003; Fan et al., 2002; Jiang et al., 2003].

Die Expression der Lanp-Mitglieder ist während der Differenzierung räumlich und zeitlich reguliert; Lanp wird vor allem bei der Entwicklung des Kleinhirns stark exprimiert [Matsuoka et al., 1994]. Die Lanp-Familienmitglieder werden in vielen Geweben auch bis ins Erwachsenenalter exprimiert, jedoch scheint die Expression von Lanp in Zellen mit hoher Proliferationsrate und in sich selbst erneuernden Zellen besonders hoch zu sein [Malek et al., 1990; Walensky et al., 1993]. In Tumorzellen spielen die Lanp-Familienmitglieder offenbar eine Rolle bei der Regulation der Proliferation [Bai et al., 2001; Brody et al., 2004; Chen et al., 1996; Kadkol et al., 1998; Kadkol et al., 1999; Kadkol et al., 2001].

4.2 Die Interaktionen zwischen Integrin, Lanp, PP1 und PP2A

Für Versuche, die mit rekombinant exprimierten Proteinen erzielt wurden, gilt generell, daß die Ergebnisse mit methodisch unabhängigen Experimenten bestätigt und weiter charakterisiert werden müssen. Die reichhaltige Literatur zum gemeinsamen Auftreten von Set und Lanp-Familienmitgliedern, unter anderem in affinitätschromatographischen Ansätzen, legt die Validierung der Ergebnisse in physiologischen Zusammenhängen nahe.

Deshalb sollten die mit der Ligandenaffinitätschromatographie erzielten Ergebnisse zunächst in verschiedenen anderen methodisch unabhängigen Versuchsansätzen bestätigt werden und dann auf ihren physiologischen Zusammenhang untersucht werden.

4.2.1 Proteinchemische Charakterisierung der Interaktionen zwischen Integrin, Lanp, PP1 und PP2A

***Pull down* des Integrin-Lanp-Phosphatasen-Proteinkomplexes**

Mit dem Einsatz von größeren Mengen des in *E.coli* rekombinant exprimierten Fusionsproteins GST-Lanp konnten die $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit und die Serin-/Threonin-Phosphatasen PP1 und PP2A präzipitiert werden, womit die Ergebnisse der Affinitätschromatographie bezüglich Lanp, PP1 und PP2A bestätigt wurden. Die Tatsache, daß für den *pull down* große Mengen an GST-Lanp eingesetzt werden mußten, wirft die Frage auf, wie groß die Affinität zwischen den Interaktionspartnern ist und läßt vermuten, daß sie eher gering ist. Es kann jedoch auch bei der Fusion mit GST wiederum zu Strukturveränderungen bei Lanp und auch zu Dimerbildung [Tudyka und Skerra, 1997] kommen, was die Bindungseigenschaften beeinträchtigen könnte. Außerdem könnten dem rekombinant in Bakterien exprimierten Fusionsprotein bestimmte Modifikationen wie z.B. Phosphorylierungen fehlen, die für die Interaktion möglicherweise von Bedeutung sind.

Die Interaktionen zwischen Lanp, PP1, PP2A und der $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit scheinen vom Differenzierungszustand der PC12-Zellen nicht abzuhängen, da die Proteinkomplexe im differenzierten wie im undifferenzierten Zustand gleichermaßen nachgewiesen werden können. Regulationsprozesse wie z.B. Phosphorylierung und Dephosphorylierung können sich jedoch auch innerhalb der in der biochemischen Analyse statisch erscheinenden Komplexe abspielen.

Eingrenzung der Bindungsstellen der Integrin-Untereinheit

Peptidbindungsstudien grenzten die Bereiche der cytosolischen Sequenzen der $\alpha 3$ - bzw. $\alpha 1$ -Integrin-Untereinheit weiter ein, die für die Interaktion mit Lanp, PP1 und PP2A nötig sind. Als Kontrolle wurde die bereits publizierte und auf die Aminosäuren 1024-1035 (ARTRALYEAKRQ) begrenzte Interaktion von DRAL/FHL2 mit der $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit genutzt [Wixler et al., 2000]. Es konnte gezeigt werden, daß die Serin-/Threonin-Phosphatasen PP1 und PP2A an den membran-proximalen Bereich der cytosolischen α -Integrin-Untereinheiten binden und daß offenbar die unter den α -Integrin-Untereinheiten konservierte KXGFFKR-Sequenz für die Bindung ausreichend ist. Diese konservierte Sequenz ist essentiell für die Integrin-Funktion [De Melker et al., 1997; Peter und Bode, 1996; Vossmeier et al., 2000] und sie ist ein Bindungsmotiv für weitere Interaktionspartner der Integrine [Rojiani et al., 1991; Vossmeier et al., 2002; Wixler et al., 1999]. Lanp hingegen bindet nicht an die konservierte Sequenz alleine, scheint also weitere Aminosäuren zur Interaktion zu benötigen, kann aber sowohl mit der kompletten cytosolischen $\alpha 1$ - als auch der membran-proximalen $\alpha 3$ -Sequenz Kontakte eingehen. Die Bindung von Lanp und DRAL/FHL2 an die cytosolische $\alpha 3$ -Sequenz konnte auf die Aminosäuren 1017-1028 (KCGFFKRARTRAL) eingegrenzt werden.

Existenz hochmolekularer Proteinkomplexe

Die Ergebnisse der *pull downs* deuteten an, daß die Interaktionen von Lanp, PP1, PP2A und möglicherweise noch weiterer Proteine mit der $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit in größeren Protein-Komplexen erfolgt. Dies wurde mit Gelfiltrations- und Quervernetzungsexperimenten weiter untersucht.

Die Gelfiltration und die Quervernetzung zeigen für alle untersuchten Proteine ($\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit, Lanp, PP1 und PP2A), daß sie in Komplexen mit höherem Molekulargewicht vorkommen. Für die $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit ist dieses Ergebnis nicht unerwartet, da es zum einen stets als Dimer mit der $\beta 1$ -Integrin-Untereinheit in der Zelle vorliegt und darüber hinaus in fokalen Kontakten – Stellen, an denen sich mehrere Integrin-Dimere und ihre assoziierten Proteine zusammenlagern und Kontaktpunkte zwischen der extrazellulären Matrix und intrazellulären Strukturen wie Aktin-Fasern ausbilden – vorkommt [DiPersio et al., 1995]. Bei der Quervernetzung treten jedoch neben den Banden bei 150 und 290 kDa, die der vernetzten $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit und dem $\alpha 3\beta 1$ -Integrin-Dimer zuzuordnen sind, weitere Banden z.B. bei

130, 220 kDa und darüber auf, die auf weitere Interaktionen mit anderen Proteinen schließen lassen. Die Integrine können neben den Interaktionen mit extrazellulären Liganden und intrazellulären Proteinen auch innerhalb der Plasmamembran laterale Assoziationen eingehen. Vor allem das Integrin $\alpha 3\beta 1$ ist für seine starken Interaktionen mit sogenannten Tetraspaninen wie z.B. CD151 [Yauch et al., 1998], CD9 und anderen [Berdichevski et al., 1997a] und uPAR [Ghosh et al., 2000] bekannt.

Auch die PP1 und die PP2A zeigen sowohl in der Gelfiltration als auch nach Quervernetzung Banden im hochmolekularen Bereich bis zu 160 bzw. 170 kDa und darüber, was Interaktionen mit z.B. der relativ großen $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit möglich erscheinen lässt. Die Phosphatasen treten in der Zelle kaum als Monomere auf, meist sind sie mit einer oder mehreren regulatorischen Untereinheiten assoziiert, die sie zu ihren Substraten führen und ihre Aktivität regulieren (Übersicht [Cohen, 2002; Janssens und Goris, 2001]).

Lanp taucht nach der Gelfiltration ebenfalls in Fraktionen mit Molekulargewichten von über 200 kDa auf. Eine Interaktion mit der $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit ist aufgrund dieses Befundes also vorstellbar.

Für Lanp sind auch ohne Quervernetzer Banden oberhalb von 32 kDa im Immunoblot zu sehen, obwohl die Proteine in einem denaturierenden Gel aufgetrennt wurden. Diese Banden sind nach Quervernetzen des Solubilisats mit DSS nicht mehr so deutlich zu sehen, jedoch genauso stark nach Vernetzung in intakten Zellen. Unter Umständen handelt es sich dabei um nicht vollständig denaturiertes multimeres Lanp. Neben diesen eventuell auf multimeres Lanp zurückzuführenden Banden sind Proteine mit sehr großem Molekulargewicht zu erkennen, die nicht in das Gel einlaufen. Auch für Lanp sind bereits Interaktionen mit anderen Proteinen beschrieben, die hier ebenfalls mit berücksichtigt werden müssen. So gibt es neben den Interaktionen mit der PP1 [Katayose et al., 2000] und PP2A [Li et al., 1995] weitere Interaktionen mit HLA-II [Vaesen et al., 1994], Ataxin-1 [Matilla et al., 1997], HuR [Brennan et al., 2000], Microtubuli-assoziierten Proteinen (MAP2, MAP4, Tau [Ulitzur et al., 1997b] und MAP1B [Opal et al., 2003]) sowie innerhalb des INHAT- (*inhibitor of acetyltransferases*) Komplexes [Seo et al., 2001], der Histonacetylierung und Transkription reguliert, und innerhalb eines Komplexes mit Granzym-A-Substraten [Fan et al., 2003]. Folglich bestehen diverse Erklärungsmöglichkeiten für auftretende Proteinkomplexe. Die genaue Zusammensetzung der sichtbaren Komplexe bedarf der weiteren Aufklärung.

Nachweis der Interaktionen im intakten Zellsystem

Copräzipitation

Die Copräzipitation zweier oder mehrerer interagierender Proteine aus einem Zellsystem ist ein sehr wertvoller Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen, da die Interaktion unter den endogenen Bedingungen und stöchiometrischen Verhältnissen innerhalb der Zelle stattfindet, während bei den meisten anderen Versuchen - und so auch bei der Ligandenaffinitätschromatographie - mit rekombinant exprimierten Proteinen *in vitro* in unphysiologischen Mengenverhältnissen gearbeitet wird.

Die $\alpha 3$ -, $\alpha 1$ - und $\beta 1$ -Integrin-Untereinheiten sowie PP2A und Lanp konnten immunpräzipitiert werden. Die Präzipitation von Lanp erfolgte jedoch nur in Abwesenheit von Serin/Threonin-Phosphatase-Inhibitoren und die Identität der präzipitierten Bande ist noch nicht vollständig geklärt (siehe Diskussion weiter unten "Spezifität des Antikörpers"). In den Präzipitaten ließ sich jedoch kein copräzipitierendes Protein im Immunoblot nachweisen. Eine grundsätzlich Schwierigkeit dieses Versuchsansatzes ist, daß für die Präzipitation bzw. Copräzipitation der membranständigen Integrine Detergenz zur Solubilisation der Zellen eingesetzt werden muß. Dieses Detergenz führt wahrscheinlich nicht nur zur Auflösung der Plasmamembran und der in ihr eingebetteten Membranproteine, sondern auch zur Dissoziation vielzähliger Protein-Protein-Interaktionen, insbesondere zwischen membranären und cytosolischen Proteinen. Des weiteren kommt der limitierende Faktor der Menge der präzipitierten bzw. copräzipitierten Proteine und der Affinität des Antikörpers als Erklärung für den fehlenden Nachweis von copräzipitierenden Proteinen ins Spiel. Außerdem muß berücksichtigt werden, daß die Affinität der untersuchten Bindungspartner zueinander unter Umständen sehr gering ist (siehe Ergebnisse des *pull down*) und dadurch copräzipitierende Proteine unterhalb der Detektionsgrenze vorliegen.

Aus dem fehlenden Nachweis copräzipitierender Proteine läßt sich folglich nicht unbedingt der Schluß ziehen, daß die Interaktionen in der Zelle nicht stattfinden.

Yeast two-hybrid system

Eine weitere Möglichkeit, um die Interaktion von Proteinen in intakten Zellen nachzuweisen, ist das *yeast two-hybrid system*. Die Proteine werden in der Hefe als Fusionsprotein exprimiert und die Hefen zeigen die Interaktion durch die Transkription bestimmter Reportergene an. Prinzipiell funktioniert das *yeast two-hybrid system* mit kurzen Proteinsequenzen wie der 37 Aminosäuren langen intrazellulären Sequenz der

$\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit, wie die Studien von Wixler et al. [Wixler et al., 2000] zeigen. In diesem Ansatz wurde die Interaktion zwischen Lanp und $\alpha 3$ /cyto sowie zwischen DKFZp761C10121.1 und $\alpha 3$ /cyto untersucht. Die Hefen zeigten keine Interaktion an, obwohl die Fusionsproteine in der Hefe offensichtlich in der erwarteten Größe produziert wurden. Gründe hierfür können darin liegen, daß die Expression der Fusionsproteine zu gering oder zu instabil war, um eine Interaktion zu erlauben bzw. nachweisbar zu machen. Auch könnte eines der beteiligten Interaktionsproteine in der Hefe im falschen Kompartiment exprimiert werden, was wiederum ein Zusammenreffen und die Interaktion der Protein verhindern würde. Die Expression der Proteine als Fusionsproteine mit der Gal4-DNA-Bindungsdomäne bzw. der Gal4-Aktivierungsdomäne kann unter Umständen die Struktur des Proteins verändern bzw. die Interaktionsstelle verdecken. Des Weiteren ist zu berücksichtigen, daß es sich bei Hefen um ein völlig anderes Zellsystem als dem ursprünglich eingesetzten Säugerzellsystem der PC12-Zellen handelt. Deshalb könnten posttranslationale Modifikationen, die für die Interaktion wichtig sind, fehlen. Außerdem ist gut möglich, daß die Interaktion im PC12-System nicht direkt erfolgt und notwendige "Adapterproteine" in den Hefezellen nicht vorhanden sind.

Spezifität des polyklonalen anti-Lanp Antikörpers

Gegen Lanp wurde peptidspezifischer polyklonaler Antikörper gewonnen, gereinigt und charakterisiert. Nur gegen Peptid 2 (Aminosäuren 147-161 der Ratten-Lanp-Sequenz) bildeten die Kaninchen Antikörper in nachweisbaren Mengen, obwohl beide Peptide aufgrund ihrer wahrscheinlichen Lokalisation an der Proteinoberfläche ausgewählt worden waren.

Der polyklonale Antikörper läßt sich im Immunoblot, in der Immunfluoreszenz und für die Immunpräzipitation einsetzen.

Verdrängungsexperimente mit den Peptiden zeigen, daß im Immunoblot die Bande knapp unter 32 kDa spezifisch vom Antikörper erkannt wird.

In der Immunfluoreszenz lassen die Antikörper-Signale nach Peptidinkubation stark nach, verschwinden jedoch nicht völlig, so daß bei Immunfluoreszenzfärbungen diese schwache Hintergrundfärbung berücksichtigt werden muß.

Bei der Immunpräzipitation ergaben sich Schwierigkeiten. Zum einen wird nach der Immunpräzipitation eine zusätzlich Bande oberhalb von 32 kDa unabhängig vom eingesetzten Antikörper sichtbar, die folglich nicht präzipitiertem Lanp zugeschrieben

werden muß und auf unspezifische Kreuzreaktion des Zweitantikörpers mit Bestandteilen der Protein-G-Sepharose zurückzuführen ist. Zum anderen ist in Zellsolubilisaten ebenfalls eine Bande oberhalb von 32 kDa zu sehen, die mit zunehmender Proteinmenge deutlicher sichtbar wird und offenbar nur vom anti-Lanp-Antikörper präzipitiert wird, wenn das Solubilisat ohne Phosphatase-Inhibitoren hergestellt wurde. Die Abhängigkeit der Detektion dieser Proteinbande oberhalb von 32 kDa von der Abwesenheit von Phosphatase-Inhibitor spricht dafür, daß es sich um ein Protein in dephosphoryliertem Zustand handelt. Lanp kann sowohl in phosphoryliertem als auch in dephosphoryliertem Zustand auftreten [Ulitzur et al., 1997b]. Lanp ist ein Substrat der Casein-Kinase-II [Malek et al., 1990]. Das Peptid 2, das sich als immunogen erwies, trägt eine potentielle Serin-Phosphorylierungsstelle (Ser158) für die Casein-Kinase-II. Offensichtlich erkennt der polyklonale Antikörper phosphoryliertes Lanp beim Einsatz im Immunoblot besser als unphosphoryliertes, während nur dephosphoryliertes Lanp von diesem Antikörper präzipitiert werden kann. Diese wahrscheinlich auf dephosphoryliertes Lanp zurückzuführende Bande über 32 kDa ist bei den Peptidinhibitions-Experimenten nicht zu sehen, da wahrscheinlich zu wenig Protein aufgetragen wurde, um diese schwache Bande zu detektieren.

Bekanntermaßen führt die Phosphorylierung von Proteinen in den meisten Fällen dazu, daß das Protein etwas langsamer als das unphosphorylierte Protein in der Gelelektrophorese läuft. Die Gründe hierfür sind nicht völlig geklärt, aber man nimmt an, daß die zusätzliche negative Ladung durch die Phosphatgruppe die Beladung des Proteins mit SDS stört und somit die Gesamtladung des Proteins verringert. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, daß in manchen Fällen die Phosphorylierung zu einem kleineren apparenten Molekulargewicht in der Gelelektrophorese führt.

Die Arbeitsgruppe um Ulitzur beschreibt jedoch für Lanp aus Cytosol von Hamsterzellen nach Dephosphorylierung das Auftreten einer Bande unterhalb der Bande von phosphoryliertem Lanp [Ulitzur et al., 1997b].

Eine andere Erklärungsmöglichkeit für das Phosphorylierungs-abhängige Auftreten der zusätzlichen Bande ist die Kreuzreaktion mit einem anderen dephosphorylierten Protein. Als Kandidaten kämen dafür der nahe Verwandte Pal31/April von Lanp in Frage. Die beiden Proteine sind auf Proteinebene zu 63,4% identisch. Im zur Immunisierung eingesetzten Peptid 2 sind 12 der 15 Aminosäuren identisch, davon maximal 8 in Folge. Dies könnte als Epitop für die Erkennung durch Antikörper genügen. Diese 8 Aminosäuren enthalten das potentiell phosphorylierte Ser158. Es

könnte also sein, daß der gegen Lanp gerichtete Antikörper mit dephosphoryliertem Pal31 schwach reagiert und dieses präzipitiert, während er Lanp überhaupt nicht präzipitiert. Um diese Frage endgültig zu klären, muß die Bande oberhalb von 32 kDa angereichert und identifiziert werden.

4.2.2 Zellbiologische Untersuchungen zur Interaktion zwischen Integrin, Lanp, PP1 und PP2A

Untersuchung der Dephosphorylierung der $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit

Zur Untersuchung der Dephosphorylierung von $\alpha 3\beta 1$ -Integrin durch PP1 und PP2A wurde ein in vitro-Assay durchgeführt. Hierfür wurde präzipitiertes $\alpha 3\beta 1$ -Integrin, dessen Phosphorylierung durch die Behandlung der Zellen mit dem Phorbolster PMA verstärkt wurde, mit PP1 bzw. PP2A in vitro inkubiert.

Nur die Phosphatase PP1 war in der Lage, aus dem Präzipitat Phosphat freizusetzen. Für diesen Assay wurden pro Versuchswert 2 mg Gesamtprotein eingesetzt. Wenn man als Hypothese davon ausgeht, daß davon 1% $\alpha 3\beta 1$ -Integrin ist, dann hätten 0,13 nmol $\alpha 3\beta 1$ -Integrin für die Präzipitation zur Verfügung gestanden. Geht man von einer vollständigen Präzipitation durch den spezifischen Antikörper aus, dann wäre diese Menge an $\alpha 3\beta 1$ -Integrin für den Assay eingesetzt worden, bei dem die PP1 ca. 0,3 nmol (bereinigt um den Hintergrundwert, der sich aus der Kontroll-Immünpräzipitation ergibt) freisetzen konnte. Daraus ließe sich folgern, daß die PP1 aus jedem Molekül $\alpha 3\beta 1$ -Integrin zwei Phosphate freisetzen kann.

Für diese und weitere Überlegungen muß berücksichtigt werden, daß sowohl die $\alpha 3$ - als auch die $\beta 1$ -Integrin-Untereinheit über mehrere potentielle Serin-/Threonin-Phosphorylierungsstellen verfügt. Für die $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit wurde die Phosphorylierung von S1044 nachgewiesen [Zhang et al., 2001b]. Außerdem trägt sie für T1046 eine weitere potentielle Phosphorylierungsstelle für die PKC (vorhergesagt durch Prosite). Die $\beta 1$ -Integrin-Untereinheit wird z.B. an S785 phosphoryliert, wodurch Adhäsion, Spreiten und Migrationsverhalten der Zelle reguliert werden [Mulrooney et al., 2001]. Weiterhin könnte es sein, daß das Präzipitat von $\alpha 3\beta 1$ -Integrin weitere assoziierte Proteine enthält, obwohl der Nachweis copräzipitierender Proteine nicht gelang (siehe oben). Es könnten prinzipiell alle Substrate von ILK (*integrin-linked kinase*), PKC und ROK als Substrate der PP1 und PP2A dienen. Die Integrin-assoziierten Proteine Paxillin und FAK können ebenfalls an Serin- und Threoninresten phosphoryliert und Substrate der Serin-/Threonin-Phosphatasen sein [Fresu et al.,

2001; Ito et al., 2000]. In HeLa-Zellen und in Fibroblasten wurde gezeigt, daß die PP1 δ mit der FAK in Abhängigkeit vom Zell-Zyklus assoziiert und die FAK dephosphoryliert [Fresu et al., 2001].

Um zu klären, welche der beiden potentiellen Phosphorylierungsstellen in der α 3-Integrin-Untereinheit als Substrat für die Serin-/Threonin-Phosphatasen dient, wurden Phosphopeptide eingesetzt, in denen entweder die eine oder die andere der in Frage kommenden Aminosäuren phosphoryliert ist. Aus dem Phosphopeptid, welches das pT1046 trägt, setzten sowohl die PP1 als auch die PP2A Phosphat frei, wobei die PP2A aktiver war als die PP1. Das pS1044-tragende Phosphopeptid wurde von beiden Phosphatasen nicht dephosphoryliert. Dieses Ergebnis ist erstaunlich, da für die isolierten katalytischen Untereinheiten der Phosphatasen nur eine sehr beschränkte Substratspezifität vorhergesagt wird. Für einige Substrate kann jedoch eine Aktivierung durch regulatorische Proteine nötig sein. Die Serin-/Threonin-Phosphatasen werden im allgemeinen sehr stark durch die Assoziation mit der regulatorischen Untereinheit in ihrer Aktivität kontrolliert und zu ihren Substraten rekrutiert (Übersicht [Cohen, 2002; Janssens und Goris, 2001]). Die PP2A war nicht in der Lage, aus dem präzipitierten, nativen α 3 β 1-Integrin-Komplex Phosphat freizusetzen, während sie sich bei dem Threonin-Phosphopeptid als sehr aktiv erwies. Es ist möglich, daß die PP2A das native Protein nicht als Substrat zu nutzen vermag bzw. dafür stimulatorische Untereinheiten benötigt.

Die Befunde der Dephosphorylierung des Phosphothreonins stehen zunächst der in der Literatur beschriebenen Phosphorylierung des Serinrestes der α 3-Integrin-Untereinheit entgegen [Zhang et al., 2001b]. Es ist aber möglich, daß die in dem in vitro-Assay gemessene Aktivität der Phosphatasen auch in vivo auftritt und dazu führt, daß phosphoryliertes Threonin innerhalb der α 3-Sequenz nur kurzzeitig oder in geringen Mengen vorkommt, so daß der Nachweis der Phosphorylierung dieses Threonin-Restes mit der derzeitigen Begrenzung der Analytik sehr schwierig oder gar unmöglich ist.

Lokalisation der Interaktionspartner

Die Färbung von PC12-Zellen mit spezifischen Antikörpern gegen PP1, PP2A, Lanp und die α 3-Integrin-Untereinheit zeigte für die Phosphatasen und Lanp cytosolische Verteilung, wobei Lanp und PP1 auch im Cytosol der Neuriten zu finden sind, während PP2A mehr auf den Zellkörper begrenzt zu sein scheint. Die α 3-Integrin-Untereinheit

ist erwartungsgemäß deutlich an der Membran lokalisiert. Die konfokalen Aufnahmen von PC12-Zellen, die nach Inkubation mit Antikörpern gegen Lanp als auch gegen die $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit gemacht wurden, verdeutlichen die mögliche Interaktion in membran-nahen Bereichen des Cytosols.

Primärzellen aus Mäusekleinhirn ließen sich mit Antikörpern gegen die $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit anfärben, Gewebeschnitte waren jedoch nur sehr schwach gefärbt. Dies kann zum einen daran liegen, daß die $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit im Kleinhirn nicht als Protein exprimiert wird, was die immunhistologischen Befunde von de Melker et al. [de Melker et al., 1997] bestätigen würde, jedoch die Frage aufwirft, wieso mRNA für die $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit zumindest in Purkinje-Zellen nachzuweisen ist [Pinkstaff et al., 1999], wenn dann daraus kein funktionsfähiges Protein entsteht. Zum anderen könnte es sein, daß der verwendete Antikörper (mAb Ralph3.2 [DeFreitas et al., 1995]) nicht für die Färbung von Geweben geeignet ist, da sein funktionelles Epitop extrazellulär liegt und dieses möglicherweise durch Interaktionen mit der EZM oder anderen Zellen nicht ausreichend zugänglich ist. De Melker et al. setzten für ihre Studien an Gewebeschnitten sowohl Antikörper ein, die den extrazellulären Teil der $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit (mAb J143 [Kantor et al., 1987]) zum Epitop haben, als auch Antikörper, die den cytoplasmatischen Anteil erkennen (mAb 29A3 [de Melker et al., 1997]). Dennoch können auch hier die Epitope durch Interaktionen im extrazellulären sowie im intrazellulären Bereich [DiPersio et al., 1995] verdeckt und durch die übliche Permeabilisierung mit 0,3 bzw. 0,5% Triton X-100 nur ungenügend zugänglich gemacht worden sein.

Die Färbung der Primärzellen aus dem Kleinhirn und der Gewebeschnitte mit dem Antikörper gegen Lanp zeigt, daß dieses Protein sowohl in Körnerzellen als auch in den Purkinje-Zellen des Kleinhirns exprimiert wird. Dies bestätigt die Befunde von Matsuoka et al. [Matsuoka et al., 1994]. Neben der Färbung des Zellkerns zeigt Lanp jedoch auch in den Primärzellen und im Gewebeschnitt ausgeprägte cytosolische Lokalisation, während Matsuoka et al. Lanp vor allem in den Kernen der Purkinje-Zellen ausmachen [Matsuoka et al., 1994].

Die Expression der Phosphatase PP2A in Rattenkleinhirn wurde bereits sowohl auf mRNA- [Abe et al., 1994] als auch auf Proteinebene [Hashikawa et al., 1995] in Körner- und Purkinje-Zellen beschrieben. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die Lokalisation der PP2A- α in Purkinje-Zellen des Mauskleinhirns.

Die PP1 wurde auf Proteinebene in Rattenkleinhirn in Purkinje-Zellen und anderen Neuronen lokalisiert [Hashikawa et al., 1995]. Die Färbung der Mauskleinhirnschnitte mit dem gegen verschiedene PP1-Isoformen gerichteten Antikörper zeigte bei uns keine positiven Ergebnisse, was sehr wohl an der zu geringen Affinität des Antikörpers liegen kann.

Auswirkungen der Überexpression von Lanp

Um die Effekte der Überexpression von Lanp zu studieren und um von dem polyklonalen Antikörper gegen Lanp unabhängig zu sein bzw. dessen Spezifität weiter zu überprüfen, wurden Zellen mit Lanp-Flag bzw. GFP-Lanp transfiziert.

Die Überexpression sowohl von Lanp-Flag als auch von GFP-Lanp fand nur in begrenztem Maße statt. Wie die Abbildung 23 zeigt, konnte nach Transfektion der PC12-Zellen mit Lanp-Flag mittels Lipofektion im besten Fall eine Verdopplung der Gesamtmenge an Lanp im Zellpool erreicht werden. Die Transfektion von PC12- bzw. Cos7-Zellen mit GFP-Lanp mittels Nucleofektion erbrachte im Vergleich zur Transfektion mit GFP alleine nur eine mäßige Expression (Abb.33). Dies mag zum einen daran liegen, daß die Zellen dieses Protein nur unzureichend exprimieren bzw. rasch wieder abbauen oder daran, daß die Zellen an der Expression des Proteins zugrunde gehen. Untersuchungen zur Cytotoxizität von Lanp-Flag (keine Abb.) und des Proliferationsverhaltens von PC12-Zellen, die mit Lanp-Flag transfiziert worden waren (Abb.35), zeigten jedoch keinen schädlichen Einfluß der Überexpression von Lanp auf die Zellen.

Färbt man die transfizierten Zellen mit Antikörper gegen Flag bzw. betrachtet man die Lokalisation des GFPs, so zeigt sich sowohl für Lanp-Flag (in PC12-Zellen) als auch für GFP-Lanp (in Cos7-Zellen), daß das überexprimierte Protein überwiegend im Kern zu finden ist. Bislang ist völlig unklar, wieso sich das überexprimierte Lanp im Kern und nur im Kern anreichert. Es ist denkbar, daß die Menge an cytosolischem Lanp streng reguliert wird und daß "überschüssiges" Protein in den Kern transportiert wird, um die cytosolischen Prozesse nicht zu stören.

Der polyklonale Antikörper gegen Lanp erkennt im Immunoblot Lanp-Flag (Abb.31) und auch GFP-Lanp (ohne Abb.). In der Immunfluoreszenz ergeben sich jedoch die bereits beschriebenen Diskrepanzen bezüglich der Lanp-Lokalisation. Somit bleibt weiterhin unklar, ob der Antikörper vor allem in der Immunfluoreszenz eventuell andere Proteine erkennt, die im Cytosol residieren.

Die Überexpression von Lanp-Flag in PC12-Zellen zeigt keinen meßbaren Einfluß auf deren Proliferations- und Adhäsionsverhalten auf Laminin-1, Kollagen-IV und Laminin-5-reicher Matrix (Abb.35). Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß es leichte Effekte gibt, die jedoch im Gesamzellpool untergehen, da nur ein geringer Anteil (10-30%) der Zellen, die für die Assays herangezogen wurden, transfiziert worden sind.

Durch die Färbung mit dem gegen Flag gerichteten Antikörper ist es möglich, nur die transfizierten Zellen auszuwerten und die Effekte auf die Differenzierung zu erfassen. Die mit Lanp-Flag transfizierten PC12-Zellen, die auf Laminin-5-reicher Matrix kultiviert wurden, zeigen deutlich reduzierte Neuritenlängen gegenüber den untransfizierten PC12-Zellen. Die Neuriten sind reproduzierbar nur ca. halb so lang wie die der untransfizierten Zellen. Die Differenzierung auf Laminin-1 und Kollagen-IV hingegen ist unbeeinflusst. Dieses Ergebnis spricht für eine spezifische Beteiligung von Lanp an der Funktion und dem Signalweg des $\alpha 3\beta 1$ -Integrins, da dieses Integrin in PC12-Zellen der Haupt-Rezeptor für Laminin-5 ist. Für Kollagen-IV und Laminin-1 hingegen ist in PC12-Zellen das $\alpha 1\beta 1$ -Integrin der Hauptrezeptor und dieses scheint von der Überexpression von Lanp in seiner Funktion bei der Differenzierung der PC12-Zellen nicht beeinträchtigt zu sein.

Das $\alpha 3\beta 1$ -Integrin ist auch in anderen Zellsystemen unter anderem ein Rezeptor für Laminin-5 [Carter et al., 1991; Delwel et al., 1994] und spielt im Nervensystem vor allem während der Entwicklung und dem korrekten Aufbau der laminaren Schichten des Großhirncortex [Anton et al., 1999] und der Kleinhirnrinde [Graus-Porta et al., 2001] eine wichtige Rolle. Laminin-5 scheint während der Embryonalentwicklung bei der Migration und Polarisation von Motorneuronen im sich entwickelnden Rückenmark eine Rolle zu spielen [Aberdam et al., 1994]. Außerdem fördert Laminin-5 das Auswachsen von Neuriten aus embryonalen Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems in vitro [Culley et al., 2001].

Die spezifischen Effekte auf die neuronale Differenzierung der Zellen auf dem $\alpha 3\beta 1$ -Liganden Laminin-5 durch die Überexpression des intrazellulären Interaktionspartners Lanp bzw. dessen forcierte Anreicherung im Kern weisen darauf hin, daß die Interaktion der $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit mit Lanp eine funktionelle Bedeutung hat.

Knock down von Lanp

Als weiterer Ansatz zur Aufklärung des funktionellen Zusammenhangs der Interaktion von Lanp mit der $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit wurde das vorübergehende "Ausschalten"

der Lanp-Expression durch ASOs verfolgt. Dazu wurden sechs verschiedene Oligonucleotide aus der Lanp-Sequenz ausgewählt und als ASOs zu PC12-Zellen gegeben. Die Expression von Lanp ließ sich trotz Mengen- und Zeitvariation nicht reproduzierbar senken. Es ist möglich, daß bereits die Aufnahme der Oligonucleotide in die Zelle nicht effizient genug erfolgte und daß somit zu wenige Zellen dem Einfluß der Antisense-Oligonucleotide unterworfen wurden. Die Aufnahme der ASOs kann durch den Einsatz Fluoreszenz-markierter Oligonucleotide verfolgt werden, was für weitere Versuche zur Optimierung der Methode empfehlenswert ist. Die Oligos selbst sollten durch ihr Phosphothioat-Rückgrat gegenüber enzymatischem Abbau stabil sein, jedoch ließe sich auch dies in der Zelle durch Fluoreszenz-Markierungen besser untersuchen.

Bai et al. berichten von der erfolgreichen Reduktion der Lanp-Expression in NIH-3T3-Fibroblasten mittels stabiler Transfektion von Vektoren, die das Antisense-Konstrukt kodieren und beobachten eine höhere Anfälligkeit der Zellen für onkogene Transformationen [Bai et al., 2001]. Jiang et al. hingegen berichten, daß ihre Bemühungen, Lanp mittels RNAi (RNA *interference*) in HeLa-Zellen herunterzuregulieren, erfolglos waren und vermuten, daß das Protein sehr langlebig ist oder in verschiedenen Formen auftritt [Jiang et al., 2003]. Brody et al. gelang durch die Transfektion eines gegen Lanp gerichteten RNAi-Oligonucleotids mit Oligofektamin und durch stabile Transfektion eines Antisense-Vektors mit Lipofektamin in die Karzinoma-Zelllinie TSU-Pr1 die Reduktion der Lanp-Expression, die zur Reduktion der Proliferation und Steigerung der Differenzierung führte [Brody et al., 2004].

Trotz der vielfältigen Funktionen, mit denen Lanp in Verbindung gebracht wird, zeigen die Lanp-Knockout-Mäuse keinen veränderten Phänotyp gegenüber ihren Wildtyp-Geschwistern [Opal et al., 2004]. Dieser Befund war äußerst unerwartet, da verschiedene Arbeitsgruppen Lanp als Regulator wichtiger Prozessen wie Proliferation [Chen et al., 1996], Differenzierung [Brody et al., 2004; Opal et al., 2003] und Apoptose [Jiang et al., 2003] beschreiben. Eine Erklärung für die ausbleibenden Effekte beim Lanp-Knockout ist die mögliche Kompensation durch die Verwandten von Lanp (April bzw. Pal31, CPD1 bzw. Lanp-L, pp32r1 und pp32r2). Zur Aufklärung der Funktion von Lanp bzw. der Lanp-Familie bedarf es weiterer Studien, die entweder gleichzeitig mehrere Familienmitglieder umfassen, sei es durch einen weiter gefaßten Knockout oder durch die Überexpression dominant-negativ wirkender Teilstrukturen des Lanp-Proteins wie z.B. des C-terminalen sauren Bereichs ohne die Leucin-reiche Domäne

oder sei es durch die Untersuchung von Lanp in einfacheren Organismen wie *Drosophila melanogaster*, die nur ein Protein der Lanp-Familie besitzen.

Hemmung des Kernexports

Durch die Hemmung des Crm1-abhängigen Kernexports mit den Substanzen Leptomycin B und Ratjadon wurde versucht, Erkenntnisse über die Funktion von cytosolischem Lanp im Zusammenhang mit der Funktion des $\alpha 3\beta 1$ -Integrins während Adhäsion, Proliferation und Differenzierung zu gewinnen. Die Behandlung von PC12-Zellen für 72 h mit Leptomycin B (10 nM) bzw. Ratjadon (50 nM) reduziert die Neuritenlänge um ca. die Hälfte im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Die Färbung mit Antikörper gegen Lanp zeigt, daß Lanp punktuell im Kern angereichert wird, daß jedoch auch weiterhin Lanp im Cytosol zu detektieren ist. Im Vergleich zu den Kernfärbungen nach Überexpression von Lanp ist die Anreicherung im Kern nach Crm1-Hemmung nur als sehr gering zu bezeichnen.

Die Adhäsion von PC12-Zellen ist durch die Behandlung mit Ratjadon nicht beeinträchtigt, während die Proliferation auf allen getesteten Matrixproteinen um ca. 50% reduziert ist.

Die Effekte der Crm1-Inhibitoren lassen keine direkten Rückschlüsse auf die Funktion von Lanp bei der Integrin-Signalweiterleitung zu, da neben Lanp noch viele andere Proteine (wie z.B. Aktin, c-Abl, Cyclin B1 und PKA) durch Crm1-abhängige Prozesse aus dem Kern geschleust werden und durch die Behandlung mit Leptomycin B bzw. Ratjadon beeinträchtigt sein dürften. Die gezielte Beeinträchtigung der Lanp-Funktion durch bisher nicht beschriebene spezifische Lanp-Inhibitoren bzw. die Expressionsstörung von Lanp ist deshalb für die Klärung der Funktion von Lanp im Zusammenhang mit den Integrin-Funktionen unerlässlich.

4.3 Arbeitshypothese und Ausblick

Aus den in dieser Arbeit gewonnenen Daten läßt sich ein Arbeitsmodell als Grundlage für weitergehende Arbeiten erstellen (Abb.41):

An den cytoplasmatischen Untereinheiten der Integrine existiert ein Komplex, der aus Lanp, den beiden Phosphatasen PP1 und PP2A und möglicherweise weiteren Proteinen besteht. Die einzelnen Proteine könnten entweder über verschiedene Sequenzbereiche gleichzeitig mit unterschiedlichen Proteinen interagieren oder über gleiche Sequenzen zu verschiedenen Zeiten mit unterschiedlichen Proteinen, wodurch der Komplex variabel und vielschichtig ist. Durch das Zusammenspiel dieser Proteine wird die Aktivität der Phosphatasen reguliert. Die Phosphatasen scheinen die Fähigkeit zu haben, Komponenten des Integrin-Komplexes zu dephosphorylieren. Nahe liegende Substrate sind die $\alpha3$ - und die $\beta1$ -Integrin-Untereinheiten [Kim et al., 2003b], Paxillin [Ito et al., 2000] und FAK [Fresu et al., 2001]. Der Phosphatasen-Protein-Komplex könnte folglich den Phosphorylierungszustand der Integrin-Untereinheiten und/oder weiterer assoziierter Proteine beeinflussen. Aus Veränderungen im Phosphorylierungsmuster können Änderungen von Protein-Protein-Interaktionen sowie die Modulation nachfolgender Signalkaskaden resultieren.

Die Verschiebung des Gleichgewichts von Lanp zwischen den verschiedenen Zellkompartimenten führt zu einer Anreicherung von Lanp im Kern. Dies führt zur Stilllegung von Genen, die u.a. für die Differenzierung der Zellen auf dem $\alpha3\beta1$ -Integrin-Liganden Laminin-5 nötig sind [Schneider et al., 2004; Seo et al., 2002; Seo et al., 2001; Shikama et al., 2000]. Es ist denkbar, daß die Interaktion von Lanp mit Integrinen an der Plasmamembran dazu führt, daß weniger Lanp im Kern zur Verfügung steht und daß gewisse für den Differenzierungsprozeß notwendige Gene transkribiert werden können.

Eine andere bzw. ergänzende Erklärung für die Reduktion der Neuritenlängen, die nach Anreicherung von Lanp im Kern zu beobachten ist, ist die Interaktion mit Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAP). Wenn Lanp sich hauptsächlich im Kern befindet, sind weniger MAPs an Lanp gebunden, folglich können sie verstärkt an Tubulin binden, was zur übermäßigen Stabilisierung der Mikrotubuli führt und die Neuritenbildung einschränkt [Opal et al., 2003]. Integrin-induzierte FAK- und Rho-Aktivierung scheinen jedoch für die zeitlich und räumlich koordinierte Stabilisierung von Mikrotubuli von Bedeutung zu sein [Palazzo et al., 2004]. Regulation der

Mikrotubuli-Stabilität durch die Interaktion von Integrinen mit Lanp ist ebenfalls vorstellbar: durch die Rekrutierung von Lanp an Integrine könnte weniger Lanp an MAPs binden, wodurch die Mikrotubuli stabilisiert werden.

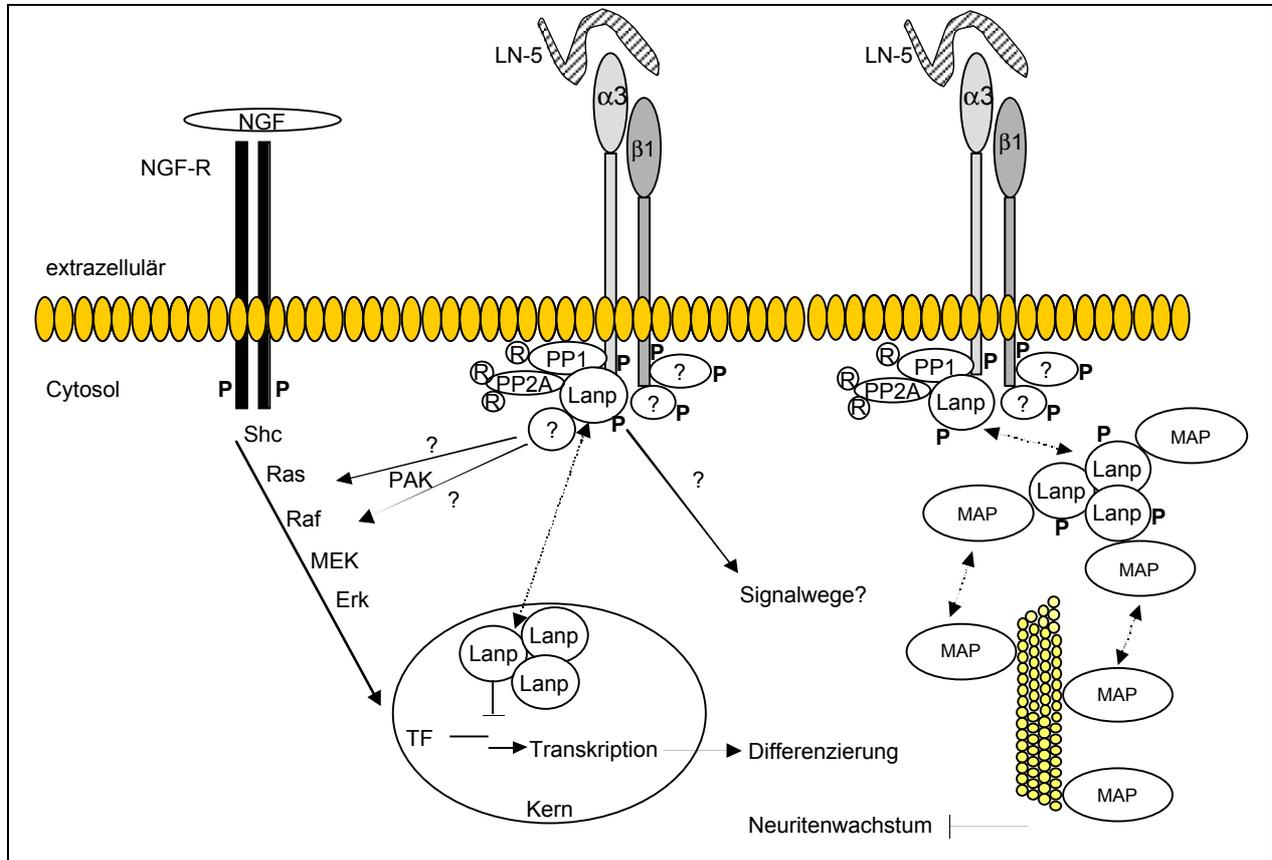


Abb.41 – Modell der Integrin/Lanp-Assoziation

Das Zusammenwirken der Signale von Integrinen, Wachstumsfaktorrezeptor (NGF-R = nerve growth factor receptor) und Mikrotubuli-stabilisierenden Proteinen ist schematisch dargestellt. Die fett gedruckten P's sollen Phosphorylierungen andeuten, der gestrichelte Doppelpfeil Translokation,. (Abkürzungen: MAP = Mikrotubuli-assoziiertes Protein, PAK = p21-aktivierte Kinase, R = regulatorische Untereinheit, TF = Transkriptionsfaktor).

In weiterführenden Arbeiten sollte untersucht werden, ob und wie sich der Phosphorylierungszustand des $\alpha3\beta1$ -Integrins während Adhäsions-, Proliferations- und Differenzierungsprozessen verändert. Über Mutationen der Konsensus-Sequenzen für die Phosphorylierung können zusätzlich Informationen über den Einfluß der Phosphorylierung auf nachfolgende Signalwege erhalten werden. So könnten zum einen Serin bzw. Threonin zu Alanin ausgetauscht werden, um den nicht-phosphorylierten Zustand widerzuspiegeln, und zum anderen Serin zu Aspartat bzw. Threonin zu Glutamat, wodurch der phosphorylierte Zustand simuliert wird, um die Funktionen der beiden Zustände zu untersuchen.

Außerdem sollte geklärt werden, ob die Interaktion von Lanp mit der Integrin-Untereinheit von Phosphorylierungen des Integrins oder von Lanp selbst abhängig ist. Die Eingrenzung der interagierenden und für die Integrin-Signalweiterleitung wichtigen Bereiche der Lanp-Sequenz verspricht weitere Auskünfte über den Mechanismus des Signalkomplexes,

Die Multimerisierung von Lanp scheint bei der Ausübung seiner vielfältigen Funktionen eine regulatorische Rolle zu spielen. Es sollte untersucht werden, wann und in welchen Zellkompartimenten Multimere von Lanp auftreten und welchen Einfluß die Störung der Multimer-Bildung auf die Lokalisation und Funktionen von Lanp in der Zelle hat. Die Mutation bzw. Deletion der für die Multimerisierung verantwortlichen Regionen der Lanp-Sequenz, sowie Mutationen des Kernlokalisations-Signals und der für die Interaktion mit der Integrin-Untereinheit benötigten Sequenz von Lanp versprechen, bei den weiteren Untersuchungen von großem Interesse und Wert zu sein.

Die Phosphatasen werden von weiteren regulatorischen Untereinheiten moduliert. In weiteren Studien sollte versucht werden, die Untereinheiten zu identifizieren, die an dem Komplex am Integrin beteiligt sind, um die weiteren Mitspieler der Regulation von Phosphorylierung/Dephosphorylierung zu kennen und den Komplex weiter aufzuklären.