

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Charakterisierung der funktionalen Rolle  
von Cytohesin-1 in der LFA-1-vermittelten  
T-Zell-Adhäsion**

**von  
Christiane Geiger**

**aus  
Deggendorf**

---

**München 2001**

## **Erklärung**

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 der Promotionsordnung vom 29.01.1998 von Prof. Dr. W. Kolanus betreut.

## **Ehrenwörtliche Versicherung**

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München, den 16.11.2000

.....  
(Christiane Geiger)

Dissertation eingereicht am: 16.11.2000

- 1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Kolanus
- 2. Berichterstatter: PD Dr. M. Meisterernst

Tag der mündlichen Prüfung: 01.02.2001

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 1996 bis November 2000 am Genzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München, im Labor von Prof. Dr. W. Kolanus angefertigt.

**Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:**

**Geiger, C., Nagel, W., Boehm, T., van Kooyk, Y., Figdor, C.G., Kremmer, E., Hogg, N., Zeitlmann, L., Dierks, H., Weber, K.S., Kolanus, W. (2000)**

Cytohesin-1 regulates beta-2 integrin-mediated adhesion through both ARF-GEF function and interaction with LFA-1. *EMBO J* **19**: 2525-36.

**Nagel, W., Zeitlmann, L., Schilcher, P., Geiger, C., Kolanus, J., Kolanus, W. (1998a)**

Phosphoinositide 3-OH kinase activates the beta2 integrin adhesion pathway and induces membrane recruitment of cytohesin-1. *J Biol Chem* **273**: 14853-61.

**No profit grows  
where is no pleasure ta`en.**

William Shakespeare,  
*The Taming of the Shrew*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Grundlagen des Vertebraten-Immunsystems</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Adhäsionsmoleküle des Immunsystems</b> .....	<b>2</b>
<b>1.3</b>	<b>Die Familie der Integrine</b> .....	<b>5</b>
1.3.1	Die Struktur der Integrine .....	5
1.3.2	Liganden der Integrine.....	7
<b>1.4</b>	<b>b<sub>2</sub>-Integrine</b> .....	<b>8</b>
1.4.1	LFA-1 (CD11a/CD18 oder $\alpha_L\beta_2$ ) .....	9
1.4.2	Mac-1 (CR3, CD11b/CD18 oder $\alpha_M\beta_2$ ) .....	10
1.4.3	p150,95 (CR4, CD11c/CD18 oder $\alpha_X\beta_2$ ) .....	10
1.4.4	$\alpha_D\beta_2$ (CD11d/CD18).....	10
1.4.5	Leukocyten-Adhäsionsdefizienz.....	10
<b>1.5</b>	<b>Regulierung der Integrin-Adhäsionsfunktion („inside-out-signaling“)</b> .....	<b>11</b>
1.5.1	Regulierung durch Affinitäts- bzw. Aviditätsänderungen .....	11
1.5.2	Mechanismen zur Integrin-Regulierung.....	12
<b>1.6</b>	<b>Signaltransduktion durch Integrine („outside-in-signaling“)</b> .....	<b>13</b>
<b>1.7</b>	<b>Die cytoplasmatischen Domänen der Integrine</b> .....	<b>14</b>
<b>1.8</b>	<b>Cytohesin-1</b> .....	<b>16</b>
1.8.1	Expression von Cytohesin-1 .....	16
1.8.2	Struktur und Funktion von Cytohesin-1 .....	17
1.8.3	Die Cytohesin-Protein-Familie.....	18
<b>2</b>	<b>Zielsetzung</b> .....	<b>20</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>21</b>
<b>3.1</b>	<b>Material</b> .....	<b>21</b>
3.1.1	Geräte.....	21
3.1.2	Chemikalien und Biochemikalien.....	22
3.1.3	Radiochemikalien .....	24
3.1.4	Enzyme .....	24
3.1.5	Kommerzielle Reaktionssysteme .....	24
3.1.6	Kulturmedien/Seren .....	24
3.1.7	Molekularbiologische Hilfsmittel.....	25
3.1.8	Lösungen und Puffer.....	25
3.1.9	Antikörper.....	25
3.1.9.1	Primäre Antikörper .....	25
3.1.9.2	Sekundäre Antikörper.....	26
3.1.10	Bakterienstämme .....	26
3.1.11	Hefestamm.....	27
3.1.12	Eukaryotische Zelllinien.....	27
3.1.13	Virusstamm.....	28
3.1.14	Phagenstamm.....	28
3.1.15	DNA- und Protein-Längenstandards .....	29
3.1.15.1	DNA-Längenstandard .....	29
3.1.15.2	Protein-Längenstandards .....	29

3.1.16	Plasmide .....	29
3.1.17	Proteinfusionsanteile .....	30
3.1.18	Oligodesoxyribonukleotide .....	30
<b>3.2</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>32</b>
3.2.1	Kultivierung und Stammhaltung der verwendeten Organismen.....	32
3.2.1.1	Methoden der prokaryotischen Zellkultur.....	32
3.2.1.2	Methoden der eukaryotischen Zellkultur.....	33
3.2.2	DNA-Arbeitstechniken.....	34
3.2.2.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> mittels CaCl <sub>2</sub> .....	34
3.2.2.2	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> .....	35
3.2.2.3	DNA-Isolierung aus plasmidhaltigen <i>E. coli</i> .....	35
3.2.2.4	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA .....	37
3.2.2.5	DNA-Restriktionsanalysen .....	38
3.2.2.6	Dephosphorylierung von DNA mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm .....	39
3.2.2.7	Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Molekülen .....	39
3.2.2.8	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	39
3.2.2.9	Ligation von DNA-Fragmenten .....	40
3.2.2.10	Amplifikation von DNA-Fragmenten mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	40
3.2.2.11	DNA-Mutagenisierungsverfahren nach Kunkel.....	42
3.2.2.12	DEAE-Dextran/Chloroquin-Transfektion von COS7-Zellen .....	45
3.2.2.13	Transfektion humaner Zellen durch Elektroporation .....	46
3.2.2.14	Stabile Expression von LFA-1 in HeLa-Zellen .....	47
3.2.3	Arbeiten mit dem Vaccinia-Virus-Expressionssystem.....	47
3.2.3.1	Herstellung rekombinanter Vaccinia-Viren .....	48
3.2.3.2	Selektion rekombinanter Vaccinia-Viren.....	48
3.2.3.3	Identifikation rekombinanter Vaccinia-Viren .....	49
3.2.3.4	Amplifikation rekombinanter Vaccinia-Viren .....	50
3.2.3.5	Infektion humaner Zellen mit rekombinanten Vaccinia-Viren.....	50
3.2.4	Protein-Arbeitstechniken.....	51
3.2.4.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	51
3.2.4.2	Coomassie-Blau-Färbung von Proteingelen .....	52
3.2.4.3	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford .....	52
3.2.4.4	Transfer von Protein-SDS-Komplexen auf Nitrozellulosemembran .....	53
3.2.4.5	Immunologische Detektion immobilisierter Proteine auf Nitrozellulosemembran .....	54
3.2.4.6	„Stripping“ von Nitrozellulosemembranen.....	55
3.2.4.7	Detektion von Proteinen mittels Durchflußzytometrie .....	55
3.2.4.8	Immunfluoreszenz-Mikroskopie .....	56
3.2.4.9	Proteinaufreinigung rekombinanter Proteine mit HIS-Fusionsanteil aus <i>E. coli</i> .....	58
3.2.4.10	Gesamtzellysat aus adhärennten COS7-Zellen.....	60
3.2.4.11	Gesamtzellysat aus Suspensionszellen .....	61
3.2.4.12	Direktpräzipitationen von Immunglobulin-Fusionsproteinen .....	61
3.2.4.13	<i>In vitro</i> -Präzipitationsstudien.....	62
3.2.4.14	Koimmunpräzipitation von Proteinen.....	64
3.2.5	Interaktionsanalysen in Hefe.....	65
3.2.5.1	Allgemeines Prinzip .....	65
3.2.5.2	Das „Two-Hybrid-System“ nach Gyuris <i>et al.</i> .....	66
3.2.5.3	Kultivierung des Hefe-Stammes EGY48/JK103 .....	68
3.2.5.4	<i>S. cerevisiae</i> -Glycerinkultur.....	69
3.2.5.5	Transformation von EGY48/JK103.....	69
3.2.5.6	Interaktionsanalyse zweier Proteine in <i>S. cerevisiae</i> .....	71
3.2.5.7	Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in Hefe-Flüssigkulturen .....	72
3.2.6	Funktionsanalysen.....	74
3.2.6.1	LFA-1-abhängige Zelladhäsion an ICAM-1-Fc .....	74
3.2.6.2	GDP/GTP-Austausch <i>in vitro</i> .....	75
3.2.7	Computerarbeiten .....	76

<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>77</b>
4.1	<b>Die Interaktion von Cytohesin-1 und CD18</b>	<b>77</b>
4.1.1	Koimmunpräzipitation von CD18 und Cytohesin-1	77
4.1.2	Kolokalisation von endogenem CD18 und Cytohesin-1 in LCL-721-Zellen	78
4.2	<b>Identifizierung der Cytohesin-1-Bindungsstelle auf CD18 mittels</b>	
	<b>Protein-Protein-Interaktionsanalysen in <i>S. cerevisiae</i></b>	<b>81</b>
4.2.1	Deletionsanalysen der cytoplasmatischen Domäne von CD18 in <i>S. cerevisiae</i>	81
4.2.2	Punktmutationsanalysen der cytoplasmatischen Domäne von CD18 in <i>S. cerevisiae</i>	85
4.2.3	Quantifizierung der CD18 <sub>cyt725</sub> /SEC7-Interaktionen in <i>S. cerevisiae</i>	87
4.3	<b>Biochemische und funktionale Charakterisierung von CD18A725G</b>	<b>89</b>
4.3.1	<i>In vitro</i> -Präzipitationsstudien mit cIg-CD18 <sub>cyt725</sub> -Fusionsproteinen und HIS-Cytohesin-1	89
4.3.2	Funktionale Charakterisierung des LFA-1-Integrins nach Einführung der CD18A725G-Mutation	91
4.3.3	<i>In vitro</i> -Präzipitationsstudien mit sIg-CD18 <sub>tm/cyt</sub> -Fusionsproteinen und HIS-Cytohesin-1	94
4.4	<b>Funktionale Charakterisierung der CD18(TRG)-Mutante</b>	<b>97</b>
4.4.1	Generierung rekombinanter Vaccinia-Viren zur Expression von funktionalem LFA-1	97
4.4.2	Funktionale Analyse von LFA-1(TRG) nach Expression in HeLa-Zellen	99
4.4.3	Funktionale Analyse von LFA-1(TRG) nach Expression in LFA-1-defizienten T-Zellen	101
4.4.4	Funktionale Analyse von LFA-1(TRG) nach stabiler Expression in HeLa-Zellen	105
4.5	<b>Cytohesin-1 induziert das Epitop 24 auf Jurkat E6-Zellen</b>	<b>108</b>
4.6	<b>Die funktionale Rolle der Guaninnukleotid-Austauschfunktion</b>	
	<b>von Cytohesin-1 in der T-Zell-Adhäsion</b>	<b>109</b>
4.6.1	<i>In vitro</i> -Präzipitationsstudien mit sIg-CD18 <sub>tm/cyt</sub> -Fusionsproteinen und HIS-Cytohesin-1(E157K)	110
4.6.2	Regulation der T-Zell-Adhäsion an ICAM-1-Fc durch Überexpression von Cytohesin-1 bzw. Cytohesin-1(E157K)	112
4.6.3	“Spreading“ von Jurkat E6-Zellen nach Überexpression von Cytohesin-1 bzw. Cytohesin-1(E157K)	113
4.7	<b>Einfluß von Brefeldin A auf die LFA-1-abhängige T-Zell-Adhäsion</b>	<b>115</b>
4.8	<b>Die Rolle der PI3-Kinase in der Regulation der LFA-1-abhängigen T-Zell-Adhäsion</b>	<b>116</b>
4.9	<b>Der Einfluß verschiedener CD18-Peptide auf die Guaninnukleotid-Austauschfunktion von Cytohesin-1</b>	<b>120</b>
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>123</b>
5.1	<b>Endogenes LFA-1 und Cytohesin-1 kolokalisieren in LCL-721-Zellen</b>	<b>123</b>
5.2	<b>Die Bindungsstelle für Cytohesin-1 ist in der membranproximalen Region der cytoplasmatischen Domäne von CD18 lokalisiert</b>	<b>125</b>
5.3	<b>Die Interaktion von CD18 und Cytohesin-1 ist wichtig für die Regulation der Zelladhäsion, vermittelt durch LFA-1</b>	<b>128</b>
5.4	<b>Mechanistische Modelle zur Affinitätskontrolle von LFA-1</b>	<b>131</b>
5.5	<b>Die Bedeutung der Affinitätsänderung von LFA-1 für die Ligandenbindung</b>	<b>133</b>
5.6	<b>Die GEF-Aktivität von Cytohesin-1 ist in die Regulation der T-Zell-Adhäsion involviert</b>	<b>134</b>

<b>5.7</b>	<b>ARF-Proteine und ihre Bedeutung für die Zelladhäsion.....</b>	<b>135</b>
<b>5.8</b>	<b>Die PI3-Kinase ist an der Aktivierung der LFA-1-abhängigen T-Zell-Adhäsion beteiligt.....</b>	<b>138</b>
<b>5.9</b>	<b>Die Adhäsion von T-Zellen an ICAM-1 wird durch einen dualen Wirkmechanismus von Cytohesin-1 reguliert .....</b>	<b>140</b>
<b>5.10</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>143</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>144</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>147</b>
<b>8</b>	<b>Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen.....</b>	<b>160</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>164</b>
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>165</b>



# 1 Einleitung

## 1.1 Grundlagen des Vertebraten-Immunsystems

Das Immunsystem der Vertebraten hat im Laufe der Evolution hocheffektive Mechanismen zur Bekämpfung von pathogenen Mikroorganismen entwickelt. Zwei Subsysteme zur Pathogenerkennung und -eliminierung können dabei voneinander unterschieden werden: das unspezifische (nichtadaptive) sowie das spezifische (adaptive) Immunsystem. Die Vermittlung der Immunabwehr erfolgt durch die weißen Blutzellen (Leukocyten), die kontinuierlich aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark generiert werden.

Phagocytierende Zellen, wie beispielsweise Makrophagen und Granulocyten, sowie natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind neben dem Komplementsystem (Plasmaproteine) für die nichtadaptive Immunität verantwortlich. Dieser angeborene Abwehrmechanismus gewährleistet eine schnelle Immunantwort, da Pathogene unspezifisch erkannt werden.

Die nichtadaptive Immunität ist jedoch nicht in der Lage, den Organismus vor allen Krankheitserregern zu schützen. Bestimmte Pathogene entziehen sich dem Angriff der unspezifischen Abwehr. Diese Mikroorganismen können durch das adaptive Immunsystem spezifisch erkannt und eliminiert werden. Zudem ist der adaptive Abwehrmechanismus in der Lage, eine langfristige Immunität gegen diese Stoffe aufzubauen.

Die adaptive Immunantwort wird durch Lymphocyten vermittelt. Aufgrund ihrer Funktion unterscheidet man dabei zwischen B- und T-Lymphocyten (B- und T-Zellen). Die Entwicklung der B-Lymphocyten erfolgt im Knochenmark. Naive B-Zellen differenzieren nach ihrer Aktivierung zu antikörperproduzierenden Plasmazellen und sind verantwortlich für die humorale Immunantwort.

T-Lymphocyten wandern zur Reifung in den Thymus. Dort findet ihre Differenzierung und Proliferation zu naiven T-Zellen statt, die nach ihrer Aktivierung weiter zu T-Effektorzellen ausdifferenzieren und die sogenannte zelluläre Immunantwort vermitteln.

Naiven B- und T-Lymphocyten gemein ist ihre Antigen-spezifität, d. h. jede Zelle exprimiert klonale Antigenrezeptoren, die jeweils ein spezifisches Antigen erkennen. Lymphocyten, die Rezeptoren gegen körpereigene Antigene exprimieren, werden daher bereits in einem frühen Entwicklungsstadium durch klonale Deletion beseitigt.

Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, auf ein spezifisches Antigen zu treffen, rezirkulieren

naive Lymphocyten kontinuierlich zwischen Blutstrom und den peripheren lymphatischen Organen. In diesen Organen erfolgt auch ihre Aktivierung. Trifft ein T-Lymphocyt auf ein spezifisches Antigen, so führt dies zu seiner Proliferation und Differenzierung in T-Effektorzellen. Hierbei unterscheidet man zwischen den CD8-positiven cytotoxischen T-Zellen, die in der Lage sind infizierte Zellen abzutöten, und den CD4-positiven T-Zellen, die wiederum in inflammatorische T-Zellen ( $T_H1$ ) und T-Helferzellen ( $T_H2$ ) differenzieren können. Die wichtigste Funktion der inflammatorischen T-Zellen ist die Aktivierung von Makrophagen, während T-Helferzellen in erster Linie B-Zellen zur Antikörperproduktion stimulieren.

Die Antigenpräsentation muß durch professionelle antigenpräsentierende Zellen (APCs), wie beispielsweise dendritische Zellen, Makrophagen oder B-Zellen erfolgen, die neben dem Antigen auch kostimulierende Signale vermitteln.

In jedem Fall erfolgt die Antigenpräsentation auf der Zelloberfläche durch MHC-Komplexe (Haupthistokompatibilitätskomplex oder major histocompatibility complex), wobei man zwischen MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Komplexen unterscheidet. MHC-Klasse-I-Moleküle werden auf allen Zelltypen exprimiert und präsentieren Peptide von Pathogenen die ins Cytosol gelangt sind. Sie werden von CD8-T-Zellen erkannt. CD4-T-Zellen dagegen erkennen MHC-Klasse-II-Moleküle, die hauptsächlich von Immunzellen exprimiert werden und die Peptidfragmente aus Proteinen binden, die in intrazellulären Vesikeln abgebaut wurden.

## 1.2 Adhäsionsmoleküle des Immunsystems

Für die Zirkulation naiver Lymphocyten durch Blutgefäße und Lymphsystem sowie für die Wanderung von Leukocyten in periphere infizierte Gewebe spielen Zell-Zell-Interaktionen und Wechselwirkungen der Immunzellen mit der extrazellulären Matrix eine entscheidende Rolle. Leukocyten müssen hierzu im Stande sein, rasch zwischen einem nicht adhärenen Zustand während der Zirkulation im Blutstrom und einem adhärenen Zustand, der für Extravasation und Migration notwendig ist, zu wechseln. Diese Fähigkeit wird durch Adhäsionsmoleküle vermittelt. Zu den wichtigsten Adhäsionsmolekülen zählen dabei die Selektine, die Integrine sowie die Immunglobulinsuperfamilie. All diese Adhäsionsrezeptoren sind transmembrane Oberflächenproteine, die sich durch Struktur und Funktion voneinander unterscheiden. Selektine besitzen eine lektinähnliche Domäne im extrazellulären Bereich und binden an spezifische Kohlenhydratgruppen. L-Selektine werden auf Leukocyten exprimiert und interagie-

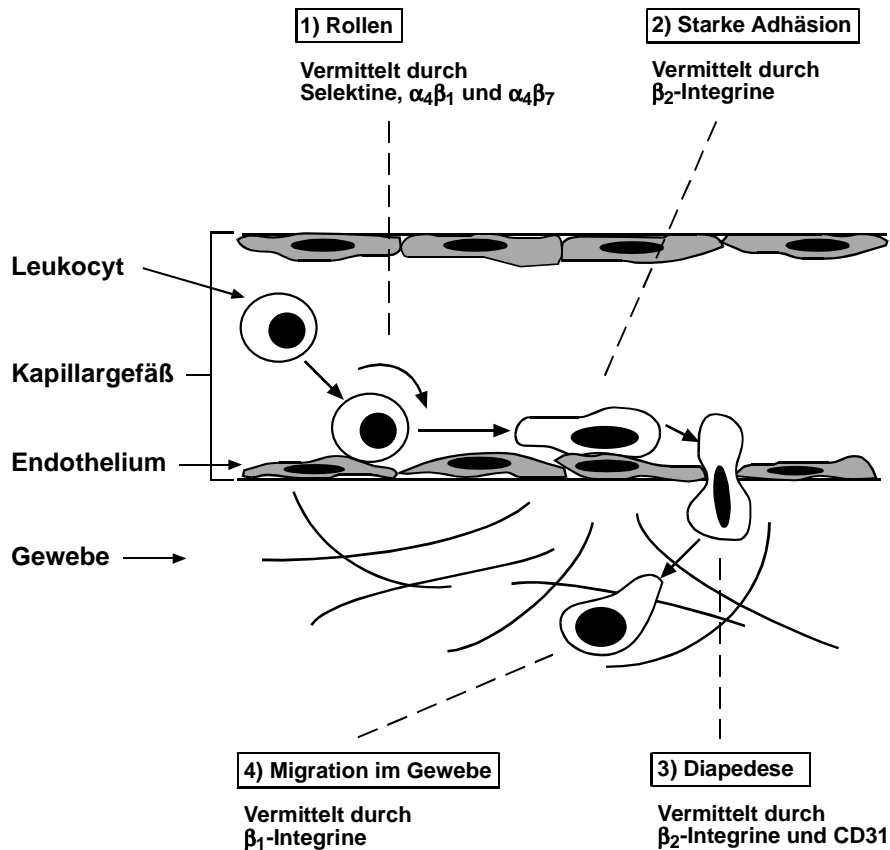
ren mit mucinähnlichen Molekülen, den vaskulären Adressinen (z. B. CD34, GlyCAM-1 oder MAdCAM-1), die auf dem vaskulären Endothel exprimiert werden. P- und E-Selektine dagegen werden auf Epithelzellen exprimiert und erkennen Sialyl-Lewis<sup>x</sup>- und Sialyl-Lewis<sup>a</sup>-Einheiten auf Leukocyten (Gonzalez-Amaro und Sanchez-Madrid, 1999).

Integrine stellen eine weit verbreitete Familie von Adhäsionsmolekülen dar. Sie sind  $\alpha/\beta$ -Heterodimere und werden aufgrund ihrer  $\beta$ -Untereinheiten in verschiedene Subfamilien unterteilt. Sie vermitteln sowohl Zell-Zell-Interaktionen als auch Interaktionen zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix.

Zu der dritten Gruppe von Adhäsionsmolekülen, der Immunglobulinsuperfamilie, zählen neben dem T- und B-Zell-Rezeptor auch die interzellulären Adhäsionsmoleküle ICAM-1, -2 und -3, die als Liganden für  $\beta_2$ -Integrine fungieren. ICAM-1 und -3 enthalten fünf Immunglobulin(Ig)-Domänen im extrazellulären Bereich, ICAM-2 trägt zwei Ig-Domänen. ICAM-1 und -2 werden sowohl auf Leukocyten als auch auf Endothel- und Epithelzellen exprimiert. Die Expression von ICAM-2 ist in der Regel konstitutiv, dagegen läßt sich die Expression von ICAM-1 beispielsweise auf Endothelzellen durch inflammatorische Stimuli wie TNF- $\alpha$  oder Interleukin-1 (IL-1) induzieren. ICAM-3 wird nur auf Leukocyten exprimiert (Gahmberg *et al.*, 1997).

Bereits Ende des 19. Jahrhunderts wurden die charakteristischen Schritte beschrieben, über die Leukocyten aus dem Blutstrom in Areale akuter Entzündung rekrutiert werden (Cohnheim, 1889). Die genauen molekularen Mechanismen, die der Adhäsion zirkulierender Immunzellen an die endotheliale Kapillarwand und der anschließenden Transmigration der Zellen zum Entzündungsherd zugrunde liegen, wurden allerdings erst seit Beginn der 80er Jahre des 20. Jahrhunderts aufgeklärt. Vor allem durch intravitale Mikroskopie und mit Hilfe von *in vitro*- bzw. *in vivo*-Studien mit blockierenden monoklonalen Antikörpern gelang es, die unterschiedlichen Adhäsionsmoleküle zu identifizieren und ihr Zusammenwirken bei Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen zu analysieren (Dustin und Springer, 1991; Springer, 1994; Ley, 1996).

Nach einem weithin akzeptierten Modell zur Regulation von Adhäsion, Diapedese und Transmigration wandernder Leukocyten, stellt man sich ein folgendes Szenario vor (Abb. 1):



**Abb. 1: Leukozyten-Extravasation.**

Die Rekrutierung zirkulierender Leukozyten an einen Entzündungsherd ist durch folgende Schritte charakterisiert: Entlangrollen der Zellen an der endothelialen Gefäßwand (1), stabile Adhäsion der Leukozyten (2), Diapedese (3) und Migration der Zellen im Gewebe (4).

Nach einer Infektion durch Mikroorganismen beginnen Makrophagen, Granulozyten und andere phagozytierende Zellen des Immunsystems die eingedrungenen Pathogene zu attackieren. Dabei sezernieren sie Faktoren, wie beispielsweise Cytokine und Chemokine, die ausgehend vom Sezernierungsort in die umliegenden Kapillargefäße diffundieren und dabei einen Konzentrationsgradienten ausbilden. Diese inflammatorischen Stimuli sind u.a. in der Lage, die Expression von E- und P-Selektin auf Endothelzellen zu induzieren. Dies ermöglicht das „Herausfangen“ zirkulierender Leukozyten aus dem Blutstrom. Selektine vermitteln nur eine schwache Zelladhäsion und bewirken somit ein Entlangrollen der Immunzellen an der Gefäßwand. Auch die Integrine  $\alpha_4\beta_7$  und  $\alpha_4\beta_1$  scheinen einen schwachen, reversiblen Kontakt zwischen Leukozyten und dem Endothel herstellen zu können (Berlin *et al.*, 1995).

In einem nächsten Schritt werden hauptsächlich  $\beta_2$ -Integrine aktiviert. Dies führt zu einer verstärkten Adhäsion der Zelle an die extrazelluläre Matrix über Bindung an die spezifischen Integrin-Rezeptoren. Zusätzlich induziert beispielsweise das Cytokin TNF- $\alpha$  eine erhöhte Ex-

pression von ICAM-1 auf Endothelzellen und fördert somit ebenfalls eine verstärkte Zelladhäsion vermittelt durch  $\beta_2$ -Integrine. Bei der nachfolgenden Diapedese der Leukocyten spielen ebenfalls  $\beta_2$ -Integrine, neben dem immunglobulinähnlichen Molekül CD31, eine wichtige Rolle. Im Anschluß an die Diapedese wandern die Immunzellen im Gewebe zum Entzündungsherd. Diese Migration, die aller Wahrscheinlichkeit nach von chemotaktischen Faktoren dirigiert wird, wird hauptsächlich durch Integrine der  $\beta_1$ -Subfamilie vermittelt (Gonzalez-Amaro und Sanchez-Madrid, 1999).

### 1.3 Die Familie der Integrine

Integrine stellen eine sehr wichtige Familie von Adhäsionsmolekülen dar und sind an einer Vielzahl von Adhäsionsereignissen beteiligt. So ermöglichen sie beispielsweise die Anlagerung von Lymphocyten an APCs oder von Blutplättchen an Fibrinogen und sind in wichtige Prozesse der inflammatorischen Antwort involviert. Ferner spielen sie eine entscheidende Rolle beim Gewebeaufbau und der Zellwanderung während der Embryonalentwicklung (Albelda und Buck, 1990; Edelmann und Crossin, 1991; Hynes, 1992; Horwitz, 1998; Darribere *et al.*, 2000).

Ein wesentliches Merkmal der Integrine ist ihre Fähigkeit Informationen bidirektional, also sowohl vom intrazellulären in den extrazellulären Raum („inside-out-signaling“) als auch vom extrazellulären Bereich in das Zellinnere („outside-in-signaling“) zu transduzieren.

#### 1.3.1 Die Struktur der Integrine

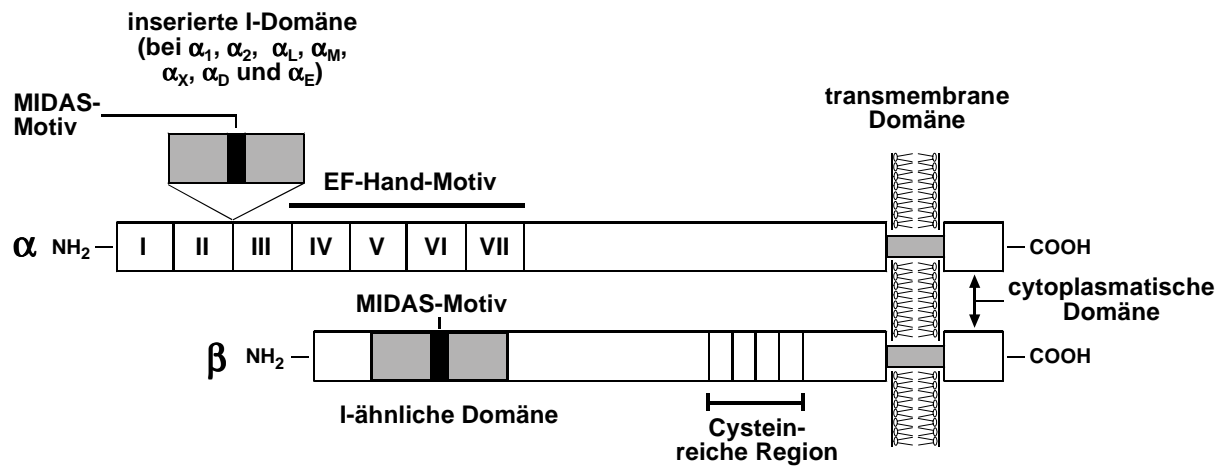
Die multiplen Funktionen der Integrine werden u. a. durch ihre Struktur bestimmt (Abb. 2). Integrine sind transmembrane  $\alpha/\beta$ -Heterodimere, deren Untereinheiten nichtkovalent miteinander verknüpft sind. Sie besitzen eine große extrazelluläre Domäne (bis zu 1114 Aminosäuren für die  $\alpha$ - und bis zu 678 Aminosäuren für die  $\beta$ -Kette) und einen kurzen transmembranen und cytoplasmatischen Bereich (von 15 - 77 Aminosäuren für die  $\alpha$ - bzw. von 46 - 60 Aminosäuren für die  $\beta$ -Untereinheit; eine Ausnahme stellt die cytoplasmatische Domäne von  $\beta_4$  mit mehr als 1000 Aminosäuren dar). Bisher sind 17  $\alpha$ - und acht  $\beta$ -Ketten bekannt, die in 22 verschiedenen Paarungen auftreten können (Stewart *et al.*, 1995; Kumar, 1998).

Die  $\alpha$ -Ketten weisen im Aminoterminus (N-Terminus) des extrazellulären Bereiches sieben repetitive Sequenzeinheiten auf (Domänen I - VII), die jeweils 60 - 70 Aminosäuren enthalten (Corbi *et al.*, 1987; Stewart und Hogg, 1996). Dabei besitzen die Domänen IV - VII, abhängig von der  $\alpha$ -Kette, Konsensussequenzen für drei bis vier mögliche Bindungsstellen divalenter Kationen, die als EF-Hand-Motiv bezeichnet werden und die in den Integrinen besonders gut konserviert sind (Takada *et al.*, 1997; Mould 1996; Tuckwell *et al.*, 1992). Bei einigen  $\alpha$ -Untereinheiten ( $\alpha_L$ ,  $\alpha_M$ ,  $\alpha_X$ ,  $\alpha_D$ ,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ , und  $\alpha_E$ ) ist zwischen die Domänen II und III eine sogenannte I-Domäne von ca. 200 Aminosäuren inseriert (Takada *et al.*, 1997; Hogg *et al.*, 1994; Leitinger und Hogg, 2000). I-Domänen enthalten eine konservierte  $Mg^{2+}/Mn^{2+}$ -Bindestelle, die auch als Metallionen-abhängige Adhäsionsstelle (MIDAS, metal ion-dependent adhesion site) bezeichnet wird (Lee *et al.*, 1995).

Die cytoplasmatischen Bereiche der  $\alpha$ -Ketten sind wenig homolog. Nur in der membranahnen Region befindet sich eine, in allen  $\alpha$ -Untereinheiten konservierte KXGFFKR-Sequenz, die u. a. ein Bindungsmotiv für Calreticulin darstellt (Williams *et al.*, 1994; O'Toole, 1997).

Die Integrin- $\beta$ -Ketten enthalten im extrazellulären Bereich eine konservierte Domäne von etwa 250 Aminosäuren, die Struktur-Homologie zur I-Domäne in  $\alpha$ -Untereinheiten aufweist und daher als I-ähnliche Domäne bezeichnet wird. Ähnlich der I-Domäne besitzt auch die I-ähnliche Domäne ein MIDAS-Motiv (Lee *et al.*, 1995; Loftus *et al.*, 1994). Der carboxyterminale (C-terminale) Bereich der extrazellulären Domäne trägt Cystein-reiche Sequenzabfolgen, die Homologie zum EGF-Modul aufweisen (Mould, 1996).

Den cytoplasmatischen Domänen der  $\beta$ -Ketten gemein ist die konservierte Sequenzabfolge LLV-ihDRRE im N-Terminus, sowie ein NPXY/F-Motiv, ca. 30 Aminosäuren von der transmembranen Domäne entfernt (Williams *et al.*, 1994; O'Toole, 1997).



**Abb. 2: Schematische Darstellung der Integrin-Struktur.**

Die  $\alpha$ -Kette trägt sieben aminotermine, repetitive Sequenzeinheiten (I-VII), von denen die Domänen IV-VII EF-Hand-ähnliche Strukturen mit je einer potentiellen Metallionen-Bindungsstelle enthalten. Einige  $\alpha$ -Untereinheiten besitzen zusätzlich eine I-Domäne mit MIDAS(metal ion-dependent adhesion site)-Motiv. Die  $\beta$ -Kette trägt ebenfalls eine I-ähnliche Domäne mit MIDAS-Motiv und zusätzlich eine Cystein-reiche Region im carboxyterminalen Bereich der extrazellulären Domäne.

### 1.3.2 Liganden der Integrine

Einige Integrine sind in der Lage mit unterschiedlichen Liganden zu interagieren und bestimmte Liganden wiederum können von unterschiedlichen Integrinen erkannt werden (Tabelle 1).

Integrin	zusätzliche Bezeichnungen	charakterisierte Liganden
$\alpha_1\beta_1$	VLA-1, CD49a/CD29	Kollagen I und IV, Laminin
$\alpha_2\beta_1$	VLA-2, CD49b/CD29	Kollagen I und IV, Laminin
$\alpha_3\beta_1$	VLA-3, CD49c/CD29	Kollagen I, Laminin, Fibronectin, Epiligrin
$\alpha_4\beta_1$	VLA-4, CD49d/CD29	VCAM-1, Fibronectin
$\alpha_5\beta_1$	VLA-5, CD49e/CD29	Fibronectin
$\alpha_6\beta_1$	VLA-6, CD49f/CD29	Laminin
$\alpha_L\beta_2$	LFA-1, CD11a/CD18	ICAM-1, -2, -3, -4, -5
$\alpha_M\beta_2$	Mac-1, CD11b/CD18	ICAM-1, iC3b, Fibrinogen, Faktor X
$\alpha_X\beta_2$	p150,95, CD11c/CD18	Fibrinogen, iC3b, CD23
$\alpha_D\beta_2$	CD11d/CD18	ICAM-3, VCAM-1

$\alpha_V\beta_3$	CD51/CD61	Vitronectin, Fibrinogen, Fibronectin, Kollagen
$\alpha_4\beta_7$	CD49d/ —	MAdCAM-1, Fibronectin, VCAM-1
$\alpha_E\beta_7$		E-Cadherin

**Tabelle 1: Übersicht der auf Leukocyten exprimierten Integrine.**

(Verwendete Abkürzungen: VLA, very late activation antigen; LFA-1, lymphocyte function-associated antigen 1; VCAM, vascular cell adhesion molecule; ICAM, intercellular adhesion molecule; iC3b, inaktivierte Form von C3b; MAdCAM, mucosal addressin cell adhesion molecule.)

Die Ligandenbindung scheint in erster Linie durch die N-terminalen Bereiche der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette der Integrine vermittelt zu werden. Sowohl die I-Domäne als auch die I-ähnliche Domäne werden dabei als entscheidende Ligandenbindungsmodule diskutiert (Mould, 1996; Loftus *et al.*, 1994; Bajt *et al.*, 1994). Bei Integrinen ohne I-Domäne stellen die potentiellen Kationenbindestrukturen höchstwahrscheinlich auch die Ligandenbindestellen dar (Takada *et al.*, 1997).

Einer Reihe von Integrinen dient die Tripeptid-Sequenz RGD als Liganden-Erkennungsmotiv. Aber auch Aminosäure-Sequenzfolgen wie GPRP, EILDV oder KQAGDV können von bestimmten Integrinen erkannt werden (Hynes, 1992).

Eine für die Funktion entscheidende Eigenschaft der Integrine besteht darin, daß sie normalerweise in einem inaktiven Zustand auf der Zelloberfläche exprimiert werden. Erst nach Aktivierung sind sie in der Lage mit ihrem spezifischen Liganden zu interagieren.

## 1.4 $\beta_2$ -Integrine

Leukocyten exprimieren  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ -,  $\beta_3$ - und  $\beta_7$ -Integrine (Tabelle 1), wobei  $\beta_2$ - und  $\beta_7$ -Integrine bisher ausschließlich auf Leukocyten identifiziert wurden.  $\beta_2$ -Integrine stellen dabei die dominierende Gruppe von Integrinen auf Leukocyten dar.

Bisher sind vier verschiedene  $\beta_2$ -Integrine beschrieben worden: LFA-1, Mac1 (auch CR3), p150,95 (Arnaout, 1990a; Larson und Springer, 1990) und  $\alpha_D\beta_2$  (Van der Vieren *et al.*, 1995; Danilenko *et al.*, 1995), die durch eine gemeinsame  $\beta$ -Untereinheit ( $\beta_2$  oder CD18), mit einem Molekulargewicht von 95 kDa, charakterisiert sind.



### 1.4.1 LFA-1 (CD11a/CD18 oder $\alpha_L\beta_2$ )

LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen 1) trägt eine  $\alpha$ -Kette von 180 kDa und wird auf allen Leukocyten exprimiert. Die Funktion von LFA-1 wurde hauptsächlich durch Studien mit monoklonalen Antikörpern, gerichtet gegen LFA-1, analysiert. Dabei zeigte sich, daß das Integrin sowohl in die Vermittlung der adaptiven wie auch der nichtadaptiven Immunantwort involviert ist. So spielt LFA-1 beispielsweise eine Rolle bei der Antigen-spezifischen T-Zell-Proliferation, bei der T-Zell-abhängigen Antikörper-Antwort, bei der Aktivität von NK-Zellen, bei dem durch cytotoxische T-Zellen vermittelten Zelltod sowie bei der Lokalisation, Diapedese und Migration von Leukocyten (Arnaout, 1990b; Springer, 1990). Erst kürzlich wurde publiziert, daß LFA-1 auch in das Rollen von Immunzellen auf dem Endothelium involviert sein könnte, durch die Vermittlung schwacher Interaktionen mit ICAM-1 (Sigal *et al.*, 2000).

Fünf Liganden für LFA-1 sind bekannt: ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, ICAM-4 und ICAM-5 (Larson und Springer, 1990; Gahmberg *et al.*, 1997; Tian *et al.*, 2000), wobei ICAM-1 den wichtigsten Liganden für LFA-1 darstellt.

Die Interaktion von LFA-1 und ICAM-1 wird über die beiden N-terminalen Ig-Domänen des Liganden und hauptsächlich über die I-Domäne der  $\alpha$ -Kette von LFA-1 vermittelt (McDowall *et al.*, 1998; Leitinger und Hogg, 2000; Knorr und Dustin, 1997). Sowohl das MIDAS-Motiv als auch eine als IDAS (I-Domänen allosterische Stelle) bezeichnete Region, die ebenfalls in der I-Domäne der CD11 $\alpha$ -Untereinheit lokalisiert ist, scheinen hierbei kritische Bereiche für die Ligandenbindung darzustellen (Kamata *et al.*, 1995; Edwards *et al.*, 1995; Huth *et al.*, 2000). Vermutlich ist aber auch der I-Domänen-ähnliche Bereich der  $\beta_2$ -Untereinheit in die LFA-1/ICAM-Interaktion involviert (Huang *et al.*, 2000).

Die divalenten Kationen  $Mg^{2+}$  und  $Mn^{2+}$  stellen potente Aktivatoren der LFA-1/ICAM-Bindung dar, während die Rolle von  $Ca^{2+}$  kontrovers ist. Einerseits scheint  $Ca^{2+}$  einen inhibitorischen Effekt auf die Rezeptor/Liganden-Interaktion auszuüben, andererseits jedoch korreliert die Bindung von  $Ca^{2+}$  an LFA-1 mit einer Aggregation des Integrins auf der Zelloberfläche, wodurch die Interaktion mit ICAM-1 gefördert wird (Dransfield *et al.*, 1992; van Kooyk *et al.*, 1994).

### 1.4.2 Mac-1 (CR3, CD11b/CD18 oder $\alpha_M\beta_2$ )

Mac-1 trägt eine  $\alpha$ -Kette von 170 kDa und wird primär auf Monocyten, Granulocyten und NK-Zellen exprimiert (Wright *et al.*, 1983). Das Integrin spielt eine wesentliche Rolle bei der Extravasation phagozytischer Zellen in entzündetes Gewebe und bei der Phagozytose opsonisierter Mikroorganismen (Arnaout *et al.*, 1983). Als Liganden für Mac-1 sind u. a. der Komplementfaktor iC3b, Fibrinogen, Koagulationsfaktor X, LPS (Lipopolysaccharide) und ICAM-1 bekannt (Rabb *et al.*, 1993). Mac-1 kann in intrazellulären Vesikeln gespeichert werden. Seine Freisetzung und rasche Mobilisierung an die Zelloberfläche wird durch inflammatorische Mediatoren induziert (Hughes *et al.*, 1992).

### 1.4.3 p150,95 (CR4, CD11c/CD18 oder $\alpha_X\beta_2$ )

P150,95 wird hauptsächlich auf Monocyten, Granulocyten und Makrophagen exprimiert. Ähnlich Mac-1 kann auch p150,95 in intrazellulären Vesikeln gespeichert werden, bis es durch inflammatorische Stimuli an die Zelloberfläche rekrutiert wird. Als Liganden für p150,95 sind iC3b, LPS und Fc $\epsilon$ -RezeptorII (CD23) bekannt (Arnaout, 1990a; Lecoanet-Henchoz *et al.*, 1995).

### 1.4.4 $\alpha_D\beta_2$ (CD11d/CD18)

$\alpha_D\beta_2$ , mit einer  $\alpha$ -Kette von 155 kDa, wurde erstmals 1995 beschrieben und stellt daher das am wenigsten charakterisierte Mitglied der  $\beta_2$ -Integrin-Subfamilie dar.  $\alpha_D\beta_2$  wird in erster Linie in der roten Pulpa der Milz auf Makrophagen und Granulocyten sowie auf einigen CD8-positiven-T-Zellen exprimiert. Als Ligand für  $\alpha_D\beta_2$  dient ICAM-3 (Van der Vieren *et al.*, 1995; Danilenko *et al.*, 1995). Auch die Expression des Integrins in humanen eosinophilen Zellen und seine Funktion als alternativer Ligand für VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) wurde beschrieben (Grayson *et al.*, 1998).

### 1.4.5 Leukocyten-Adhäsionsdefizienz

Die biologische Relevanz der  $\beta_2$ -Integrine wird durch eine erbliche Immunschwäche, die Leu-

kocyten-Adhäsionsdefizienz (LAD) belegt. Diese Erkrankung beruht auf einem Defekt der Synthese der  $\beta_2$ -Untereinheit und führt u. a. zu einer erheblichen Beeinträchtigung der Immunität gegen bakterielle Infektionen. Da  $\beta_2$ -Integrine eine entscheidende Rolle bei der Adhäsion von Neutrophilen und Makrophagen an die Endothelwand der Blutgefäße und bei der nachfolgenden Diapedese spielen, sind  $\beta_2$ -Integrin-defekte Phagozyten nicht mehr in der Lage an den Infektionsherd zu gelangen, um dort opsonisierte Mikroorganismen zu beseitigen.

Die molekulare Basis für die Ausprägung von LAD bilden verschiedene Mutationen im extrazellulären Bereich der  $\beta_2$ -Untereinheit, die hauptsächlich in der I-ähnlichen Domäne oder in der Cystein-reichen Region liegen. Als Folge dieser Mutationen werden entweder die mRNA-Synthese, die Translation oder die Heterodimerformierung und damit die Zelloberflächenexpression des Integrins vollständig bzw. stark inhibiert. Die  $\alpha$ -Untereinheit ist in LAD-Patienten normal exprimiert. Allerdings erfolgt die Heterodimerformierung der  $\beta_2$ -Integrine im Golgi-Komplex und hierbei wird sowohl eine intakte  $\alpha$ - als auch  $\beta$ -Kette benötigt (Arnaout, 1990b; Arnaout *et al.*, 1990; Sleigh *et al.*, 1992; Nelson *et al.*, 1992; Lopez Rodriguez *et al.*, 1993).

## 1.5 Regulierung der Integrin-Adhäsionsfunktion („inside-out-signaling“)

Die Funktion der Leukocytenintegrine unterliegt einer dynamischen Regulation, die einen raschen Wechsel zwischen einem inaktiven und einem aktiven Zustand der Moleküle erlaubt. Verschiedene Modelle wurden aufgestellt, um die Aktivierung bzw. Deaktivierung von Integrinen und damit die Vermittlung des bidirektionalen Informationstransfers zu beschreiben.

### 1.5.1 Regulierung durch Affinitäts- bzw. Aviditätsänderungen

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

- a) Durch eine Affinitätsänderung, also durch Konformationsänderungen des Integrins und
- b) durch eine Aviditätsänderung, womit die Modulation des Aggregationsgrades der Integrin-Moleküle auf der Zelloberfläche gemeint ist.

Das Auftreten von Affinitätsänderungen wird am plausibelsten durch monoklonale Antikörper (mAk) dokumentiert, die spezifische Aktivierungsepitope auf dem Integrin erkennen oder die in der Lage sind, eine aktive Konformation des Integrins zu induzieren. Zu solchen aktivierenden Antikörpern zählen beispielsweise die anti-CD18-Antikörper KIM185, KIM127 (Andrew *et al.*, 1993), CBR LFA-1/2 (Petruzzelli *et al.*, 1995) sowie der anti-CD11a-Antikörper MEM83 (Landis *et al.*, 1993). Die mAks 24 (Dransfield und Hogg, 1989), 15/7 Yednock *et al.*, 1995) und PAC-1 (Shattil *et al.*, 1985) dagegen detektieren Epitope, die nur auf aktiviertem LFA-1,  $\beta_1$ - bzw.  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin exprimiert werden.

Auch divalente Kationen wie  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  können durch die Induktion von Konformationsänderungen den Aktivierungszustand des Integrins regulieren (Mould, 1996).

Aviditätsänderungen können in bestimmten Fällen ebenfalls durch monoklonale Antikörper detektiert werden. So erkennt beispielsweise der mAk NKI-L16 ein  $Ca^{2+}$ -abhängiges Aktivierungsepitop auf LFA-1, dessen Expression mit der Multimerisierung von oberflächenexprimiertem Integrin assoziiert ist (van Kooyk *et al.*, 1991; van Kooyk *et al.*, 1994).

Aviditätsänderungen sind vermutlich die Folge einer erhöhten lateralen Integrin-Mobilität, die durch eine temporäre Entkopplung des Integrins vom Aktin-Cytoskelett erleichtert wird (Dustin und Springer, 1991; Stewart und Hogg, 1996; van Kooyk *et al.*, 1999; van Kooyk und Figdor, 2000).

### 1.5.2 Mechanismen zur Integrin-Regulierung

Verschiedene Ereignisse können zu einer Affinitäts- bzw. Aviditätsänderung und damit zu einer Integrin-Aktivierung führen. So läßt sich z. B. die durch  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Integrine vermittelte Zelladhäsion durch die antikörpervermittelte Quervernetzung des T-Zell-Rezeptor(TCR)/CD3-Komplexes (Dustin und Springer, 1989) oder der Korezeptoren CD2, CD7, CD28 und CD31 induzieren (van Kooyk *et al.*, 1989; Shimizu *et al.*, 1995; Chan *et al.*, 1997; Zell *et al.*, 1996; Shimizu und Hunt, 1996). Auch Chemokine, Cytokine sowie intrazellulär wirkende Phorbolster (z. B. Tetradecanoylphorbol-13-acetat, PMA) und Calcium-Ionophore führen zu einer transienten Aktivierung von Integrinen (Kolanus und Seed, 1997). In hämatopoetischen Zellen induziert die Quervernetzung von Oberflächenrezeptoren im wesentlichen zwei Signalkaskaden. Zunächst werden Tyrosinkinase aktiviert, die u. a. die Stimulierung von Phosphatidylinositol-Phospholipasen (B oder C) induzieren. Diese spalten das Phospholipid Phosphatidylinositol in Diacylglycerin und Inositoltrisphosphat ( $IP_3$ ). Während Diacylglycerin Pro-

teinkinase C stimuliert, bewirkt  $IP_3$  die Freisetzung von  $Ca^{2+}$  aus intrazellulären Speichern. Für beide Ereignisse wurde gezeigt, daß sie beispielsweise zur Aktivierung von LFA-1 führen können (Kolanus und Seed, 1997; Lub *et al.*, 1995). Phorbolster stellen Strukturanaloga von Diacylglycerin dar und können somit ebenfalls eine Stimulierung der Proteinkinase C bewirken.

Auch für andere intrazelluläre Faktoren, wie etwa die Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3-Kinase) (Shimizu und Hunt, 1996) oder kleine G-Proteine wie R-ras (Zhang *et al.*, 1996), wurde eine Rolle bei der Integrin-Aktivierung postuliert. Das GTP-bindende Protein H-ras dagegen scheint in die Integrin-Deaktivierung involviert zu sein (Hughes *et al.*, 1997).

Die beschriebenen Faktoren stellen indirekt wirkende, regulatorische Elemente dar. Allerdings kann die Integrin-Funktion auch durch Proteine, die direkt mit dem Rezeptor interagieren, moduliert werden.

So sind beispielsweise cytoplasmatische Proteine wie  $\beta_3$ -Endonexin, ILK (Integrin-linked-kinase) und Cytohesin-1 bekannt, die direkt an die cytoplasmatische Domäne von Integrinen binden können.  $\beta_3$ -Endonexin interagiert dabei spezifisch mit der cytoplasmatischen Domäne von  $\beta_3$  und spielt vermutlich eine Rolle bei der Affinitätsmodulation von  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (Egenthaler *et al.*, 1997; Kashiwagi *et al.*, 1997). Für ILK wurde eine Interaktion mit  $\beta_1$  gezeigt (Hannigan *et al.*, 1996) und Cytohesin-1 scheint in die Regulierung der durch LFA-1 vermittelten Zelladhäsion involviert zu sein (Kolanus *et al.*, 1996).

Ferner sind Integrin-Assoziationen mit Membranproteinen wie etwa Mitgliedern der Transmembran-4-Superfamilie (TM4SF) oder CD47 (Integrin-assoziiertes Protein), sowie für die Cytoskelett-assoziierten Proteine Talin,  $\alpha$ -Aktinin, Filamin, Paxillin und Aktin dokumentiert (Kolanus und Seed, 1997; Hemler, 1998; Porter und Hogg, 1998).

## 1.6 Signaltransduktion durch Integrine („outside-in-signaling“)

Wie bereits erwähnt, können Integrine Signale vom extrazellulären in den intrazellulären Raum transportieren. Solche Signale können entweder nach Ligandenbindung oder nach Assoziation mit anderen Rezeptoren, wie etwa TM4SF-Proteinen, Wachstumsfaktor-Rezeptoren oder dem Urokinase-Rezeptor transduziert werden.

Ein frühes Signal, das auf eine Integrin/Liganden-Interaktion folgt, ist in vielen Zelltypen die Tyrosinphosphorylierung und Aktivierung der Fokaladhäsionskinase (FAK). Diese Ereignisse

laufen in membrannahen Multiproteinkomplexen, den sogenannten Fokalkontakten ab, in denen sich neben Integrinen noch diverse andere Moleküle, wie etwa Komponenten des Cytoskeletts oder Signalproteine organisieren. Die Phosphorylierung der FAK kann zur Aktivierung des ERK-MAP(mitogen activated protein)-Kinase-Signalweges führen. An dieser Aktivierung sind auch noch weitere Faktoren, wie etwa das Adapterprotein GRB2 und der Guaninnukleotid-Austauschfaktor SOS beteiligt. Allerdings kann die Aktivierung der ERK-MAP-Kinase auch unabhängig von FAK erfolgen.

Mittlerweile ist eine Vielzahl von Faktoren bekannt, die in Signalkaskaden involviert sind, die durch Integrine induziert wurden (Schlaepfer und Hunter, 1998; Guan, 1997; Wary *et al.*, 1998; Aplin *et al.*, 1999; Berton und Lowell, 1999; O'Neill *et al.*, 2000).

Für  $\beta_2$ -Integrine wurde beispielsweise dokumentiert, daß sie nach ihrer Aktivierung durch Ligandenbindung Tyrosinkinase der Src-, Src- und FAK-Familie aktivieren können, was zu einer Tyrosinphosphorylierung verschiedener Proteine wie etwa Paxillin, dem Guaninnukleotid-Austauschfaktor Vav, ERK, dem GTPase-aktivierenden Protein p120RasGAP oder Phospholipase C $\gamma$  führt. Diese Phosphorylierungsereignisse können wiederum verschiedene Signalkaskaden induzieren, die beispielsweise in der Aktivierung der GTPasen Rho und Rac, der PI3-Kinase oder in einem Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration resultieren (Dib und Andersson, 2000).

## 1.7 Die cytoplasmatischen Domänen der Integrine

Die cytoplasmatischen Domänen der Integrine spielen eine zentrale Rolle bei der Vermittlung der Integrin-Funktionen. Obwohl sie relativ kurz sind und keine intrinsischen enzymatischen Aktivitäten besitzen, sind sie unentbehrlich für den bidirektionalen Informationstransfer.

Die funktionale Relevanz der cytoplasmatischen Domänen konnte vor allem durch Deletions- und Punktmutationsanalysen demonstriert werden. Deletierte man beispielsweise die cytoplasmatische Domäne der  $\beta$ -Kette von LFA-1 und exprimierte das resultierende Integrin stabil in der myeloiden Zelllinie K562, so führte dies zu einem konstitutiv aktiven Integrin und zusätzlich zu einer Multimerisierung von LFA-1 auf der Zelloberfläche (Lub *et al.*, 1997). Ähnliche Ergebnisse lieferten Studien mit einer B-lymphoblastoiden Zelllinie, die aus einem LAD-Patienten isoliert und deren LFA-1-Expression rekonstituiert worden war (Hibbs *et al.*, 1991a).

Als wichtige regulatorische Regionen der cytoplasmatischen Domäne von  $\beta$ -Untereinheiten werden hauptsächlich drei Bereiche diskutiert (Abb. 3): eine konservierte Region im membranproximalen Bereich, die aus sieben Aminosäuren besteht, das NPXY/F-Motiv und eine Region, die im C-Terminus lokalisiert ist und neun Aminosäurereste enthält. Dieser Bereich wird im Folgenden als TTT-Region bezeichnet. Die TTT-Region ist gut in  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - und  $\beta_7$ -Integrinen, weniger dagegen in  $\beta_3$ -Integrinen konserviert (LaFlamme *et al.*, 1997; Hughes *et al.*, 1995; Peter und O'Toole, 1995; Hibbs *et al.*, 1991b). Mutationen in diesen Bereichen können zu einer verminderten Zelladhäsion führen oder die Lokalisierung des Integrins in Fokalkontakte inhibieren, vermutlich u. a. aufgrund fehlender Cytoskelett-Assoziationen.

Die Bedeutung von Aminosäureresten der TTT-Region für die Regulierung der Zelladhäsion wurde erstmals für  $\beta_2$ -Integrine beschrieben. Hibbs *et al.* (1991b) exprimierten rekombinantes LFA-1 in COS7-Zellen. In diesen Zellen ist das Integrin konstitutiv aktiv und bindet ohne zusätzliche Stimulierung an ICAM-1. Mit Hilfe von Mutationsanalysen konnten Hibbs *et al.* zeigen, daß die drei aufeinanderfolgenden Threonine TTT758-760 sowie F766, in der cytoplasmatischen Domäne von  $\beta_2$ , für die Regulierung der Integrin/Liganden-Interaktion kritisch waren. Mutationen dieser Aminosäurereste führten praktisch zu einer vollständigen Inhibition der Zelladhäsion an ICAM-1.

Auch Phosphorylierungen der  $\beta$ -Untereinheit scheinen eine Rolle bei der Adhäsionsregulation zu spielen (LaFlamme *et al.*, 1997). In der cytoplasmatischen Domäne von  $\beta_2$  wurde dabei S756 als der Aminosäurerest identifiziert, der nach PMA-Stimulierung in erster Linie phosphoryliert wird (Hibbs *et al.*, 1991b).

	membranproximale Region	NPXY/F-Motiv	TTT-Region	
$\beta_2$	<sup>1</sup> K A L I H L S D	L R E Y R R F E K E K L K S Q W N N D .	N P L F	K S A . T T T V M N P K F A E S <sup>46</sup> —COOH
$\beta_1$	<sup>1</sup> K L L M I I H D	R R E F A K F E K E K M N A K W D T G E	N P I Y	K S A . V T T V V N P K Y E G K <sup>47</sup> —COOH
$\beta_3$	<sup>1</sup> K L L I T I H D	R K E F A K F E E E R A R A K W D T A N	N P L Y	K E A . T S T F T N I T Y R G T <sup>47</sup> —COOH
$\beta_7$	<sup>1</sup> R L S V E I Y D	R R E Y S R F E K E Q Q Q L N W K Q D S	N P L Y	K S A I T T T I . N P R F Q E A D S P T L <sup>52</sup> —COOH

**Abb. 3: Aminosäure-Sequenzvergleich der cytoplasmatischen Domänen von  $\beta_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_3$  und  $\beta_7$ .**

Der konservierte membranproximale Bereich sowie das NPXY/F-Motiv und die TTT-Region sind durch einen Kasten markiert.

Im Vergleich zu den  $\beta$ -Ketten unterscheiden sich die cytoplasmatischen Domänen der  $\alpha$ -Untereinheiten wesentlich stärker in ihrer funktionalen Relevanz. So werden diese beispiels-

weise nicht für die Zelladhäsion vermittelt durch  $\alpha_5\beta_1$  oder  $\alpha_L\beta_2$  benötigt, wohingegen die  $\alpha$ -Untereinheiten von  $\alpha_2\beta_1$  bzw.  $\alpha_4\beta_1$  unerlässlich für die Integrin/Liganden-Interaktion sind (LaFlamme *et al.*, 1997). Allerdings adhäreren K562-Zellen spontan an ICAM-1, wenn sie LFA-1 exprimieren, dessen KVGFFKR-Motiv der  $\alpha_L$ -Untereinheit deletiert wurde (van Kooyk *et al.*, 1999). Ähnliche Ergebnisse lieferten Studien mit  $\alpha_{IIb}\beta_3$  nach Deletion der GFFKR-Sequenzfolge. In den cytoplasmatischen Domänen der  $\alpha_2$ -,  $\alpha_4$ - und  $\alpha_6$ -Untereinheiten von  $\beta_1$ -Integrinen dagegen scheinen vielmehr die Sequenzen C-terminal von der KXGFFKR-Region wichtig für die Integrin-Aktivierung zu sein (Williams *et al.*, 1994).

Neuere Arbeiten von Weber *et al.* (1999) deuten darauf hin, daß die cytoplasmatischen Domänen der  $\alpha$ -Untereinheiten von  $\beta_2$ -Integrinen in die Chemokin-regulierte Integrin-Aktivität involviert sein könnten.

## 1.8 Cytohesin-1

Zur Aufklärung von Integrin-Regulationsmechanismen kann die Kenntnis von Faktoren beitragen, die spezifisch mit einem Integrin interagieren.

Von Kolanus *et al.* wurde 1996 das cytoplasmatische Protein Cytohesin-1 identifiziert, das vermutlich in die spezifische Regulierung der durch LFA-1 vermittelten Zelladhäsion involviert ist. Cytohesin-1, das ursprünglich als cDNA (B2-1) aus NK-Zellen und peripheren T-Lymphocyten kloniert worden war (Liu und Pohajdak, 1992), wurde mit Hilfe des „Yeast-Two-Hybrid“-Systems als spezifischer Interaktor der cytoplasmatischen Domäne von  $\beta_2$  (CD18) isoliert.

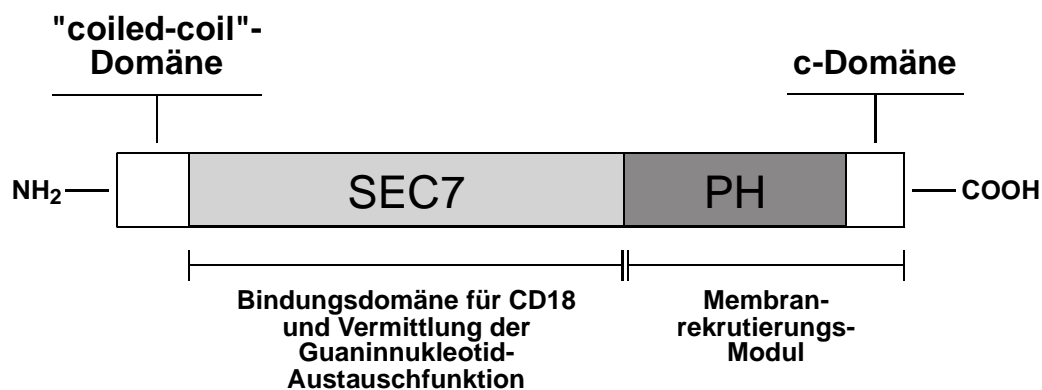
### 1.8.1 Expression von Cytohesin-1

Cytohesin-1 wird hauptsächlich in Zellen des hämatopoetischen Systems exprimiert, in hohen Mengen vor allem in NK-Zellen, in peripheren T-Lymphocyten und in lymphoblastoiden Zelllinien. Aber auch in einigen nichthämatopoetischen Zelllinien wie etwa HeLa, K562 oder CV-1 kann Cytohesin-1 in geringen Mengen detektiert werden (Liu und Pohajdak, 1992; Kolanus *et al.*, 1996; Geiger *et al.*, 2000).



## 1.8.2 Struktur und Funktion von Cytohesin-1

Cytohesin-1 weist ein Molekulargewicht von 47 kDa auf und setzt sich zusammen aus einer kurzen aminoterminalen „coiled-coil“-Domäne, einer etwa 200 Aminosäuren umfassenden zentralen SEC7-Domäne, einer PH-Domäne aus ca. 100 Aminosäuren und einer angrenzenden C-terminalen polybasischen Region (c-Domäne) (Kolanus *et al.*, 1996; Nagel *et al.*, 1998a; Nagel *et al.*, 1998b).



**Abb. 4: Schematische Darstellung der Cytohesin-1-Struktur.**

Das Protein enthält eine aminoterminalen „coiled-coil“-Domäne, gefolgt von einer zentralen SEC7- und einer PH-Domäne mit einer carboxyterminalen, polybasischen Region (c-Domäne).

Die Funktion der „coiled-coil“-Domäne ist noch nicht bekannt, sie könnte jedoch an Oligomerisierungsprozessen beteiligt sein.

Die SEC7-Domäne, die als Interaktionsbereich für die cytoplasmatische Domäne von CD18 identifiziert wurde (Kolanus *et al.*, 1996), weist Homologie zum SEC7-Protein von *S. cerevisiae* auf, das in den Proteintransport vom ER zum Golgi-Komplex involviert ist (Achstetter *et al.*, 1988). Zusätzlich katalysiert die SEC7-Domäne den Guaninnukleotid-Austausch an ADP-Ribosylierungsfaktoren (ARFs). Cytohesin-1 gehört damit zu den Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs, guanine nucleotide exchange factors) (Meacci *et al.*, 1997; Pacheco-Rodriguez *et al.*, 1998; Donaldson und Jackson, 2000). ARF-Proteine sind Guaninnukleotid-bindende Proteine mit einem Molekulargewicht von 20 kDa und Mitglieder der Ras GTPase-Superfamilie. ARF-Proteine können zwischen zwei Aktivierungszuständen alternieren: zwischen einer inaktiven, GDP-gebundenen und einer aktivierten, GTP-gebundenen Form. Der Austausch von GDP gegen GTP wird durch GEFs, die Hydrolyse des gebundenen GTP und die damit verbundene Rückkehr des ARF-Proteins in seine inaktive Form durch GAPs

(GTPase-Aktivierungsproteine) katalysiert (Donaldson und Jackson, 2000; Moss und Vaughan, 1998).

Die Struktur der SEC7-Domäne von Cytohesin-1 wurde vor kurzem durch NMR-Spektroskopie aufgeklärt (Betz *et al.*, 1998). Danach setzt sich diese Domäne aus zwei, fünf  $\alpha$ -helikalen Untereinheiten zusammen, die eine ausgedehnte Form aufweisen. Zusätzlich wurden anhand von Mutagenese- und Proteinbindungsstudien zwei Sequenzmotive in der C-terminalen Subdomäne von SEC7 analysiert, die sowohl für den Nukleotid-Austausch als auch für die ARF-Bindung essentiell sind.

Die Pleckstrin-Homologie(PH)-Domäne von Cytohesin-1 stellt ein Modul dar, das in einer Vielzahl von Proteinen auftritt. So etwa bei den Proteinkinasen  $\beta$ ARK, Akt und Btk, bei den Regulatoren kleiner G-Proteine Ras-GAP, SOS, Vav und Dbp sowie bei den Lipid-assoziierten Proteinen PLC $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  und PI3-Kinase. Allgemein können PH-Domänen die Membranrekrutierung von Proteinen über Bindung an Membranlipide vermitteln (Shaw, 1996; Pawson, 1995; Lemmon *et al.*, 1996). In Cytohesin-1 kommt der PH-Domäne eine ähnliche Aufgabe zu, wobei die polybasische c-Domäne aller Wahrscheinlichkeit nach zur Stabilisierung der PH-Domänen/Membran-Interaktion beiträgt (Nagel *et al.*, 1998a und b).

### 1.8.3 Die Cytohesin-Protein-Familie

Cytohesin-1 zählt zu einer Familie von Proteinen, die erst vor kurzer Zeit identifiziert wurde und von der zum jetzigen Zeitpunkt vier Mitglieder bekannt sind: Cytohesin-1, Cytohesin-2, Cytohesin-3 und Cytohesin-4.

Diese Proteine bestehen aus ca. 400 Aminosäuren und besitzen eine drei-Domänen-Struktur, mit einer „coiled-coil“-, einer SEC7- und einer PH-Domäne.

Cytohesin-2 (ARNO, für ARF nucleotide-binding site opener) weist eine 83%ige Homologie zu Cytohesin-1 auf, wird aber im Gegensatz zu diesem ubiquitär exprimiert (Chardin *et al.*, 1996). Cytohesin-2 wurde als GEF für ARF1 und ARF6 *in vitro* identifiziert (Chardin *et al.*, 1996; Paris *et al.*, 1997; Frank *et al.*, 1998a) und kann in Zellen, die mit Cytohesin-2 transfiziert wurden, sowohl im Cytoplasma als auch an der Plasmamembran detektiert werden (Frank *et al.*, 1998a). Nach neuesten Erkenntnissen scheint das Protein eine Rolle bei der Modulation des Aktin-Cytoskelettes zu spielen (Frank *et al.*, 1998b).

Von Cytohesin-3 (ARNO3) wurde zunächst das Maus-Analogon GRP1 (general receptor for phosphoinositides 1; 88% Homologie zu Cytohesin-1) als Interaktor für Phosphatidylinositol-

(3,4,5)-triphosphat (PIP<sub>3</sub>) identifiziert (Klarlund *et al.*, 1997). *In vitro*-Experimente zeigten kurz darauf, daß GRP1 ebenfalls GEF-Aktivität gegenüber ARF-Proteinen besitzt (Klarlund *et al.*, 1998). Für das humane Analogon von Cytohesin-3 (ARNO3) wurde ebenfalls eine Guannukleotid-Austauschfunktion an ARF1 *in vitro* dokumentiert (Franco *et al.*, 1998).

Erst kürzlich wurde das vierte Mitglied der Cytohesin-Familie, Cytohesin-4, identifiziert. Es unterscheidet sich mit einer 69%igen Homologie zu Cytohesin-1 am stärksten von allen anderen Cytohesin-Proteinen auf der Aminosäuresequenz-Basis. Cytohesin-4 wird hauptsächlich in peripheren Leukocyten exprimiert und zeigt GEF-Aktivität gegenüber ARF1 und ARF5 *in vitro* (Ogasawara *et al.*, 2000).

## 2 Zielsetzung

Verschiedene Modelle, die den Mechanismus zur Aktivierung des Integrins LFA-1 und die damit verbundene Induktion der Ligandenbindung erklären, sind aufgestellt worden. Es ist jedoch noch immer wenig darüber bekannt, welche intrazellulären Signale in die direkte Affinitäts- bzw. Aviditätsmodulation des Integrins involviert sind. Zur Klärung dieser Problematik spielt die Identifikation von Faktoren, die direkt mit der cytoplasmatischen Region des Integrins interagieren können, und die Analyse ihrer Funktion eine wichtige Rolle.

Mit Cytohesin-1 war von Kolanus *et al.* 1996 ein möglicher Interaktor für die cytoplasmatische Domäne der LFA-1- $\beta$ -Untereinheit identifiziert worden, der in die spezifische Regulierung der LFA-1-Funktion involviert zu sein schien. Wurde Cytohesin-1 in der LFA-1-positiven humanen T-Zelllinie Jurkat E6 überexprimiert, so führte dies zu einer deutlich gesteigerten Adhäsion der Zellen an ICAM-1. Die molekularen Mechanismen, die dabei zur Aktivierung des Integrins führten, waren unklar. Die Vermutung lag nahe, daß die direkte Interaktion von Cytohesin-1 und CD18 eine wichtige Rolle für die Integrin-Regulierung spielte.

Ein erstes Ziel dieser Arbeit war daher die Verifizierung der Cytohesin-1/CD18-Interaktion und die Analyse ihrer Spezifität durch Koimmunpräzipitationsanalysen.

Desweiteren sollte die Bedeutung dieser Interaktion für die Induktion der Zelladhäsion untersucht werden. Mit Hilfe von Mutationsanalysen sollte eine CD18-Untereinheit generiert werden, die nicht mit Cytohesin-1 interagierte. Anschließend sollte diese CD18-Kette in den LFA-1-Kontext überführt und die Funktion des Integrins mit Hilfe von Zelladhäsionsstudien charakterisiert werden. Ferner stellte sich die Frage, ob Cytohesin-1 primär in die Affinitäts- oder in die Aviditätsregulierung des Integrins involviert war.

Auch die Frage, ob die Guaninnukleotid-Austauschfunktion von Cytohesin-1 an der Regulierung der Integrin-Funktion beteiligt war, sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Zusätzlich zur Analyse, der von Cytohesin-1 vermittelten regulatorischen Funktionen, war auch die Regulierung des Faktors selbst von Interesse. Arbeiten von Kolanus *et al.* (1996) ergaben, daß die Überexpression der isolierten PH-Domäne von Cytohesin-1 in Jurkat E6-Zellen zu einer vollständigen Inhibition der Zelladhäsion an ICAM-1 führte. In diesem Zusammenhang konnte Dr. W. Nagel zeigen, daß die PH-Domäne als Modul diente, um Cytohesin-1 an die Plasmamembran zu rekrutieren (Nagel *et al.*, 1998a). Die intrazellulären Signale, die diese Membranrekrutierung induzierten, waren nicht bekannt und sollten ebenfalls in dieser Arbeit durch Zelladhäsionsstudien analysiert werden.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Geräte

Agarosegeldokumentation Agarosegelkammern	Eagle Eye II, Stratagene (Heidelberg) Harnischmacher (München) Werkstätten des Max-Planck-Instituts für Biochemie (Martinsried)
Autoklaven	MMM (München)
Bakterienschüttler	ISF-1-V, Adolf Kühner (Schweiz)
Bunsenbrenner	Roth (Karlsruhe)
Durchflußcytometer	Epics XL, Coulter (Miami, USA)
Elektroporationsapparatur	EasyJect Plus D2000, Eurogentec (Seraing, Belgien)
Entwicklermaschine	Hyperprocessor, Amersham (Braunschweig)
Fluoreszenz-Meßgerät	CytoFluorII, PerSeptive Biosystems (Framingham, USA)
Geltrockner	Vakuum Geltrockner Modell 583, BioRad (München)
Heizblöcke	Thermomixer 5436, Eppendorf (Hamburg)
Heizrührgerät	Ikamag RCT, Bachhofer (Reutlingen)
Inkubatoren	Heraeus (Osterode)
Konfokales Lasermikroskop	TCS-NT/Leitz DM IRB/E, Leica (Wetzlar)
Lichtmikroskop	Typ IM35, Zeiss (Jena)
Magnetrührer	Ikamag Reo, Bachhofer (Reutlingen)
PCR-Heizblock	FTS-I Thermal Sequencer, Corbett Research, Sidney (Australien)
pH-Meter	Modell 761, Knick (Berlin)
Photometer	Spektrophotometer DU 640, Beckmann (München)
Pipetten	P2, P20, P200, P1000, Gilson (Middleton, USA)
Pipettierhilfe	Hirschmann (Eberstadt)
Protein-Minigel-Apparaturen	BioRad (München)
Protein-Transfer-Apparaturen	BioRad (München)
Reinstwasseranlage	MilliRo 30plus, Millipore (Eschborn)
Schüttelgerät	Reax2000, Heidolph (Kelheim)
Sonifikator	Sonifier GM300, Bandelin (Berlin)
Spannungsgeräte	Modell 455, Consort (Turnhout, Belgien)
Sterilbank	BDK (Sonnenbühl)
Stickstofftank	XLC-230, MVE (New Prague, USA)
Tischschüttler	3020, GFL (Burgwedel)
Überkopfschüttler	Bachhofer (Reutlingen)
Ultraschallbad	Transsonic digital T480/H-2, Elma (Singen)

UV-Illuminatoren (254 nm und 365 nm)	Bachhofer (Reutlingen)
Waagen	AE163, Mettler-Toledo (Gießen); Typ 1412, Sartorius (Göttingen)
Wasserbäder	1086, GFL (Burgwedel)
Zentrifugen	Sorvall RC-5C plus, DuPont (Bad Homburg); J6-MC und L8-80M, Beckmann (München); 5417 und 5417R, Eppendorf (Hamburg)
Zentrifugenrotoren	Beckmann (München); DuPont (Bad Homburg)

### 3.1.2 Chemikalien und Biochemikalien

30% Acrylamid:Bisacrylamid (29:1)	Roth (Karlsruhe)
Agar für Hefe-Platten	Difco (Detroit, USA)
Agarose	Sigma (Taufkirchen)
Agarose (LMP-Agarose)	NuSieve®, Biozym (Oldendorf)
Aminosäuren	Sigma (Taufkirchen)
Ammoniumacetat	Merck (Darmstadt)
Ammoniumhydrogencarbonat	Merck (Darmstadt)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck (Darmstadt)
Ammoniumsulfat	Merck (Darmstadt)
Ampicillin	Roth (Karlsruhe)
Aprotinin	Sigma (Taufkirchen)
ATP	Roche (Mannheim)
Bacto-Hefe-Stickstoff-Base	Difco (Detroit, USA)
Bacto-Trypton	Gibco (Eggenstein)
Bisbenzimid H33342 Fluorochrom Trihydrochlorid	Calbiochem (Bad Soden)
Borsäure	Merck (Darmstadt)
Bradford-Reagenzlösung	BioRad (München)
5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (BCIP)	Biomol (Hamburg)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
n-Butanol	Roth (Karlsruhe)
Caesiumchlorid	Gibco (Eggenstein)
Calciumchlorid	Merck (Darmstadt)
Chloroquinphosphat	Sigma (Taufkirchen)
Coomassie-Blau R-250	Sigma (Taufkirchen)
DEAE-Dextran	Sigma (Taufkirchen)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth (Karlsruhe)
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Dithiothreitol (DTT)	Merck (Darmstadt)
dNTP's	Roche (Mannheim)
Essigsäure	Roth (Karlsruhe)
Ethanol (EtOH)	Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid (EtBr)	Sigma (Taufkirchen)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck (Darmstadt)
Formaldehyd	Merck (Darmstadt)
Galaktose	Merck (Darmstadt)
Gelatine	Merck (Darmstadt)

Gen32-Protein	Roche (Mannheim)
Gentamycinsulfat	Gibco (Eggenstein)
Glukose	Gibco (Eggenstein)
Glycerin	Roth (Karlsruhe)
Glycin	Roth (Karlsruhe)
Glykogen	Roche (Mannheim)
Hefe-Extrakt	Gibco (Eggenstein)
HEPES	Roth (Karlsruhe)
Hypoxanthin	Sigma (Taufkirchen)
Imidazol	Merck (Darmstadt)
Isopropanol	Roth (Karlsruhe)
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid (IPTG)	Roche (Mannheim)
Kaliumacetat	Merck (Darmstadt)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Kaliumphosphat	Merck (Darmstadt)
Lachsspermien DNA	Sigma (Taufkirchen)
LB-Agar	Gibco (Eggenstein)
LB-Base	Gibco (Eggenstein)
Leupeptin	Sigma (Taufkirchen)
Lithiumacetat	Merck (Darmstadt)
Lithiumchlorid	Sigma (Taufkirchen)
Magnesiumchlorid	Merck (Darmstadt)
Magnesiumsulfat	Merck (Darmstadt)
Manganchlorid	Merck (Darmstadt)
2-Mercaptoethanol	Merck (Darmstadt)
Methanol	Roth (Karlsruhe)
Mounting-Medium	Vector Laboratories (Burlingame, USA)
Mycophenolsäure (MPA)	Sigma (Taufkirchen)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydroxid	Roth (Karlsruhe)
Nickel-NTA-Agarose	Quiagen (Hilden)
Nitroblau Tetrazoliumchlorid (NBT)	Biomol (Hamburg)
12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (PMA)	Sigma (Taufkirchen)
Phenol (in TE äquilibriert)	Roth (Karlsruhe)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Serva (Heidelberg)
Phytohämagglutinin (PHA)	Sigma (Taufkirchen)
Polyethylenglykol 6000 (PEG 6000)	Roth (Karlsruhe)
Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat (Tween20)	Roth (Karlsruhe)
Protein-A-Sepharose <sup>TM</sup> 6MB	Amersham (Braunschweig)
Puromycin	Biomol (Hamburg)
Rinderserumalbumin (BSA)	Roth (Karlsruhe)
Saccharose	Merck (Darmstadt)
Salzsäure (37%)	Riedel-de-Haen (Seelze)
Scintillationsflüssigkeit Quicksafe A	Zinsser Analytic (Frankfurt)
Spermidin	Roche (Mannheim)
Surfact-Amps® 58 (Brij58)	Pierce (Illinois, USA)

N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma (Taufkirchen)
Tetracyclin	Roche (Mannheim)
Tris	Roth (Karlsruhe)
Triton-X-100	ICN (Aurora, USA)
Trypsin/EDTA-Lösung	Gibco (Eggenstein)
Xanthin	Sigma (Taufkirchen)

### 3.1.3 Radiochemikalien

[ $\gamma$ - <sup>35</sup> S]GTP 37 MBq/ml, 1 mCi/ml, >1000 Ci/mmol	Amersham (Braunschweig)
--	-------------------------

### 3.1.4 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Roche (Mannheim)
DNA-Polymerase I (Klenow Fragment)	Roche (Mannheim)
Lysozym	Sigma (Taufkirchen)
Restriktionsendonukleasen	NEB (Schwalbach); Fermentas (Vilnius, Litauen); Roche (Mannheim)
RNaseA	Sigma (Taufkirchen)
T4-DNA-Ligase	Fermentas (Vilnius, Litauen)
T4-DNA-Polymerase	NEB (Schwalbach)
T4-Polynukleotidkinase	NEB (Schwalbach)
Vent-DNA-Polymerase	NEB (Schwalbach)

### 3.1.5 Kommerzielle Reaktionssysteme

HRP-Detektionssystem	RPN 2106 ECL, Amersham (Braunschweig); Renaissance, NEN (Boston, USA)
----------------------	--

### 3.1.6 Kulturmedien/Seren

DMEM	Gibco (Eggenstein)
FCS	Gibco (Eggenstein)
HBSS	Gibco (Eggenstein)
Humanserum	C. Figdor (Nijmegen, Niederlande)
Iscove's Medium	Gibco (Eggenstein)
NuSerum	Gibco (Eggenstein)
RPMI 1640-Medium	Gibco (Eggenstein)



### 3.1.7 Molekularbiologische Hilfsmittel

Elektroporationsküvetten	Eurogentec (Seraing, Belgien)
Filterpapier (Whatman 3MM)	Schleicher&Schuell (Dassel)
Mikrotiterplatten (96-Well)	Nunc (Roskilde, Dänemark); Falcon (Heidelberg)
Nitrozellulosemembran (0,45 µm)	Schleicher&Schuell (Dassel)
Objektträger (Poly-L-Lysin beschichtet)	Sigma (Taufkirchen)
Pap-Pen	Immunotech (Marseille, Frankreich)
Röntgenfilme	X-OMAT-AR, Kodak (Rochester, USA)
Ultrazentrifugationsröhrchen	Beckmann (München)
Zellkultur-Einweg-Plastikmaterialien	Nunc (Roskilde, Dänemark); Falcon (Heidelberg)

### 3.1.8 Lösungen und Puffer

50x TAE:	242 g Tris 57 ml 100% Essigsäure 50 mM EDTA H <sub>2</sub> O (bidest.) ad 1 l	1x TE:	10 mM Tris/HCl (pH 7,6) 1 mM EDTA (pH 8,0)
10x PBS:	80 g NaCl 2 g KCl 14,4 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2,4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O (bidest.) ad 1 l pH 7,4	10x TBS:	121,1 g Tris 87,66 g NaCl H <sub>2</sub> O (bidest.) ad 1 l pH 7,5

### 3.1.9 Antikörper

#### 3.1.9.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Quelle
Maus-anti-CD18 (KIM185)	1 µg/ml (IF)	M. Robinson (Celltech, Berkshire, UK)
Maus-anti-CD18 (MEM48)	1:1000 (IF, WB)	V. Horejsi (Prag, Tschechien)
Maus-anti-CD11a (MHM24)	1:1000 (IF, WB)	DAKO (Hamburg)
Maus-anti-CD11a, b, c (mAk 24)	8 µg/ml (IF)	N. Hogg (London, UK)
Maus-anti-CD29-Biotin (4B7R)	10 µg/ml (IF)	Ancell (Bayport, USA)
Ratte-anti-Cytohesin-1 (7H2), als Hybridoma-Überstand	unverdünnt (IF), 1:10 (WB)	E. Kremmer (GSF, München)

Ratte-anti-Cytohesin (2D7), als Hybridoma-Überstand	unverdünnt (IF)	E. Kremmer (GSF, München)
polyklonaler Kanninchen-anti- Cytohesin-Antikörper	40 µg/ml	Eurogentec (Seraing, Belgien)
CAD9 (7H2-isotypenspezifischer Kontroll-Antikörper aus Ratte), als Hybridoma-Überstand	unverdünnt (IF)	E. Kremmer (GSF, München)
Maus-anti-TCR (OKT3)	2 µg/ml	E. Kremmer (GSF, München)
Ziege-anti-Human-IgG (Fcγ- spezifisch)	1:1000 (WB)	Dianova (Hamburg)

### 3.1.9.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Quelle
Ziege-anti-Kanninchen	50 µg/ml	Southern Biotechnology (Birmingham, USA)
HRP-Ziege-anti-Maus	1:3000 (WB)	Dianova (Hamburg)
HRP-Ziege-anti-Ratte	1:2000 (WB)	Sigma (Taufkirchen)
HRP-Esel-anti-Ziege	1:3000 (WB)	Dianova (Hamburg)
FITC-Schaf-anti-Maus	1:100 - 1:400 (IF)	Dianova (Hamburg)
FITC-Ziege-anti-Human	1:400 (IF)	Dianova (Hamburg)
FITC-Ziege-anti-Ratte-F(ab') <sub>2</sub> - Fragment	1:100 (IF)	Rockland (Gilbertsville, USA)
Texas-Red-Ziege-anti-Maus- F(ab') <sub>2</sub> -Fragment	1:100 (IF)	Dianova (Hamburg)

IF: Immunfluoreszenz; WB: Western-Blot

### 3.1.10 Bakterienstämme

<i>E.coli</i> - Stamm	Genotyp	Verwendung	Referenz
BL21	B F <sup>-</sup> ompT hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal dcm (DE3) (Cam <sup>r</sup> )	Expression von HIS- Fusionsproteinen	Studier und Moffat, 1986
BL21LysS	B F <sup>-</sup> ompT hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal dcm (DE3) pLysS (Cam <sup>r</sup> )	Expression von HIS- Fusionsproteinen	Studier und Moffat, 1986
CJ236 <sup>d</sup>	Dut-1, ung-1, thi-1, relA1, pCJ105 (Cam <sup>r</sup> , F <sup>-</sup> )	ortsspezifische Mutage- nese nach Kunkel	Sambrook <i>et al.</i> , 1989

MC1061	araD139, $\Delta(\text{ara-leu})7696$ , galE15, galK16, $\Delta(\text{lac})_{X74}$ , rpsL(Str <sup>r</sup> ), hsdR2(m <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>-</sup> ), mcrA, mcrB	Amplifikation von Plasmiden	Casadaban und Cohen, 1980
MC1061-P3	araD139, $\Delta(\text{ara-leu})7696$ , galE15, galK16, $\Delta(\text{lac})_{X74}$ , rpsL(Str <sup>r</sup> ), hsdR2(m <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>-</sup> ), mcrA, mcrB; zusätzlich mit Helferplasmid p3: kann, bla(amp)-am, tet-am	Amplifikation von CDM-Vektoren	Casadaban und Cohen, 1980
DH5 $\alpha$	endA1, hsdR17(r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ), supE44, thi1, recA1, gyrA, (Nal <sup>r</sup> ), relA1	Amplifikation von Plasmiden	Hanahan, 1983

### 3.1.11 Hefestamm

<i>S. cerevisiae</i> -Stamm	Genotyp	Verwendung	Referenz
EGY48/JK103	MATa, trp1, ura3, his3, LEU2;pLexA, op6-LEU2; zusätzlich mit Reporterplasmid JK103: amp, Ura	Interaktionsanalysen	Zervos <i>et al.</i> , 1993

### 3.1.12 Eukaryotische Zelllinien

Bezeichnung	Eigenschaften	Verwendung	Referenz
CV-1	fibroblastenähnliche Affen-nierenzellen („African green monkey“)	Amplifikation rekombinan-ter Vaccinia-Viren	Jensen <i>et al.</i> , 1964
COS7	fibroblastenähnliche CV-1-Zellen mit integriertem, replikationsdefektem SV40-Genom	transiente Expression von Proteinen durch DEAE-Dextran/Chloroquin-Transfektion bzw. durch Infektion mit rekombinan-ten Vaccinia-Viren	Gluzman, 1981
Jurkat E6	humane T-Zell-Linie aus Patienten mit akuter Leukämie	transiente Expression von Proteinen durch Infektion mit rekombinanten Vaccinia-Viren zum Einsatz in funktionalen Analysen	Weiss <i>et al.</i> , 1984
K562	humane erythromyeloide Zelllinie aus einem Patienten mit chronischer Leukämie	Zelladhäsionsanalysen	Andersson <i>et al.</i> , 1979

HeLa	humane Zelllinie mit epithelartiger Morphologie aus Patienten mit Cervix-Karzinom	transiente Expression von Proteinen durch Infektion mit rekombinanten Vaccinia-Viren und stabile Expression von Proteinen mit Hilfe des pIRES/Puro-Vektorsystems	Tyndall <i>et al.</i> , 1965
SK- $\beta_2.7$	LFA-1-defizienter humaner T-Zell-Klon, durch chem. Mutagenese aus der T-Lymphoma-Zelllinie SKW3 selektiert	Zelladhäsionsanalysen	Weber <i>et al.</i> , 1997
LAD19	LFA-1-defizienter humaner T-Zell-Klon aus einem Patienten mit Leukocyten-Adhäsionsdefizienz	Zelladhäsionsanalysen	Vennegoor <i>et al.</i> , 1992
LCL-721	humane lymphoblastoide B-Zell-Linie	Kolokalisationsstudien endogener Proteine	Reitnauer <i>et al.</i> , 1985

### 3.1.13 Virusstämme

Bezeichnung	Verwendung	Referenz
Vaccinia (WR-Stamm)	Insertion rekombinanter DNA in das Vaccinia-Genom und anschließende Proteinexpression in eukaryotischen Zellen	Mackett <i>et al.</i> , 1982

### 3.1.14 Phagenstämme

Bezeichnung	Verwendung	Referenz
M13K07	Herstellung von ssDNA zur ortsspezifischen Mutagenese nach Kunkel	Dotto und Zinder, 1984

### 3.1.15 DNA- und Protein-Längenstandards

#### 3.1.15.1 DNA-Längenstandard

Bezeichnung	Hersteller	Fragmentlängen (Bp)
Lambda-DNA (geschnitten mit EcoRI/HindIII)	Fermentas, Vilnius (Litauen)	21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 564, 125

#### 3.1.15.2 Protein-Längenstandards

In allen Fällen wurde ein vorgefärbter SDS-Protein-Längenstandard (Sigma, Taufkirchen) verwendet, der folgende Proteinzusammensetzung besaß:

Protein	Molekulargewicht (in kDa)
$\alpha_2$ -Makroglobulin aus humanem Plasma	180
$\beta$ -Galaktosidase aus <i>E. coli</i>	112
Fruktose-6-Phosphat-Kinase aus Kaninchenmuskel	84
Pyruvat-Kinase aus Hühnermuskel	64
Fumarase aus Schweineherz	52
Laktose-Dehydrogenase aus Kaninchenmuskel	35
Triosephosphat-Isomerase aus Kaninchenmuskel	32

### 3.1.16 Plasmide

Bezeichnung	Resistenz	Verwendung	Referenz
CDM7	supF (amp/tet)	Expression nativer Proteine	Seed, 1987
p5C7	amp	Expression nativer Proteine und von Proteinen mit cIg- bzw. sIg-Fusionsanteil	Kolanus, nicht publiziert
pT7Hxpflu	amp	Expression von Proteinen mit HIS-Fusionsanteil	Kolanus, nicht publiziert
pTKg	amp	Vektor zur homologen Rekombination mit Vaccinia-Genom	Romeo und Seed, 1991

pEG202	amp, His	Expression des „bait“-Proteins in <i>S. cerevisiae</i>	Ruden <i>et al.</i> , 1991
pJG4-5	Amp, Trp	Expression des „prey“-Proteins in <i>S. cerevisiae</i>	Gyuris <i>et al.</i> , 1993

### 3.1.17 Proteinfusionsanteile

Bezeichnung	Aufbau	Verwendung	Referenz
cIg	CH2- und CH3-Domänensegmente der humanen IgG1-cDNA	Expression zellulärer Proteine zur Präzipitation über den Fusionsanteil an Protein-A und zur Vereinfachten Proteindetektion über den Fusionsanteil	Kolanus <i>et al.</i> , 1996
sIg	Exportsignalsequenz von CD5; extrazellulär: CH2- und CH3-Domänensegmente der humanen IgG1-cDNA; transmembrane Domäne von CD7	Expression von Proteinen zur Präzipitation über den Fusionsanteil an Protein-A und zur Vereinfachten Proteindetektion über den Fusionsanteil	Zeitlmann <i>et al.</i> , 1998
HIS	6xHIS, Erkennungssequenz für Faktor Xa, Hämagglutinin-Epitop	Expression und vereinfachte Aufreinigung rekombinanter Proteine über den Fusionsanteil an Ni-Agarose	Kolanus <i>et al.</i> , 1996

### 3.1.18 Oligodesoxyribonukleotide

Die unten aufgeführten Oligodesoxyribonukleotide wurden im Labor von Herrn Dr. Arnold (im Hause) synthetisiert.

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
1.CD18for	5`- GCGGGGACGCGTCTCCGGGAG TACAGGCGCTTT - 3`	PCR
CD18Notrev	5`- GCGGGGGCGGCCGCTTAACT CTCAGC - 3`	PCR

CD18cytA725G	5`- GTACTCCCTGAGGTCGCTCAGG TGGATCAGACCCTTCCA - 3`	ortsspezifische Mutagenese nach Kunkel
CD18cytI727V	5`- GTACTCCCTGAGGTCGCTC GG TGGACCAGAGCCTT - 3`	ortsspezifische Mutagenese nach Kunkel
CD18cytH728R	5`- TACTCCCTGAGGTCGCTCAGGC GGATCAGAGCCTT - 3`	ortsspezifische Mutagenese nach Kunkel
CD18cytL729V	5`- CCTGTACTCCCTGAGGTCGCTC ACGTGGATCAGAGCCTT - 3`	ortsspezifische Mutagenese nach Kunkel
CD18cytS730G	5`- CCTGTACTCCCTGAGGTCGCC CAGGTGGATCAGAGCCTT - 3`	ortsspezifische Mutagenese nach Kunkel
CD18BamHIfor	5`- GCGGGGGGATCCAGCAGGCC CAACATCGCCGC -3`	PCR
CD18-2238rev	5`- GATGACCAGCAGGAGAATGCC GATCAGC - 3`	PCR
CD18TRGfor	5`- CTCCTGCTGGTCATCACGCGTG GTCTGATCCAC -3`	PCR
CD18-1781for	5`- GCGGGGGCTCAGCGTGCCAGT GCGAGAGGACCACTGAGG - 3`	PCR
CD18-1707for	5`- CGGCCAGGTCTGCGGCGGC CC - 3`	Sequenzierung

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Kultivierung und Stammhaltung der verwendeten Organismen

#### 3.2.1.1 Methoden der prokaryotischen Zellkultur

Die Arbeiten mit Bakterien wurden unter möglichst sterilen Bedingungen unmittelbar neben einer Bunsenbrennerflamme und mit sterilen Glas- bzw. Plastikwaren durchgeführt. Glasspatel zum Ausplattieren von Bakterien wurden mittels 100% EtOH über einer Bunsenbrennerflamme sterilisiert.

Die Anzucht von *E. coli*-Flüssigkulturen erfolgte in sterilen Reagenzgläsern bzw. Erlenmeyerkolben. Die Nährmedien wurden zur Sterilisation 1 h bei 120°C autoklaviert und anschließend mit den entsprechenden Antibiotika versetzt. In der Regel wurde die Bakterienkultur aus einer Einzelkolonie herangezogen, wobei sich das Volumen an Nährmedium, in dem angeimpft wurde, nach dem Verwendungszweck der Kultur richtete: Für Minipräparationen und Glycerin-Kulturen wurde von einer 5ml-Kultur, für Maxipräparationen von einer 1l-Kultur ausgegangen. Zur Vermehrung wurden die Bakterienkulturen über Nacht, unter guter Belüftung, bei 37°C in einem Bakterienschüttler bei 200 Upm inkubiert.

#### **Anzucht von *E. coli* MC1061, DH5 $\alpha$ und BL21 mit Ampicillin-resistenten Vektoren**

Die Anzucht dieser Bakterienstämme erfolgte in LB-Medium, dem zur Selektion auf Plasmid-transformierte Bakterien Ampicillin in einer Endkonzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$  zugesetzt war.

#### **Anzucht von *E. coli* MC1061p3 mit CDM7-Vektoren (Ampicillin/Tetracyclin-Resistenz)**

Die Anzucht dieser Bakterienstämme mit dem Zusatzplasmid p3 erfolgte in LB-Medium, dem zur Selektion auf Plasmid-transformierte Bakterien Ampicillin und Tetracyclin in einer Endkonzentration von 12,5  $\mu\text{g/ml}$  bzw. 7,5  $\mu\text{g/ml}$  zugesetzt waren.

#### **Anlegen von Glycerin-Kulturen**

Zur langfristigen Lagerung von Bakterienklonen wurden Glycerin-Dauerkulturen angelegt. Hierzu wurde 1 ml der stationär gewachsenen Bakteriensuspension mit 180  $\mu\text{l}$  sterilem 86%igem Glycerin in einem 1,5ml-Reaktionsgefäß vermischt und bei -80°C aufbewahrt.



### 3.2.1.2 *Methoden der eukaryotischen Zellkultur*

#### **Kultivierung von Suspensionszellen**

Eukaryotische Suspensionszellen wurden in sterilen Plastikzellkulturflaschen in RPMI 1640-Medium, supplementiert mit 10% hitzeinaktiviertem FCS und 13 µg/ml Gentamycinsulfat, in einem Begasungsbrutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 96% relative Luftfeuchtigkeit) kultiviert. Alle Arbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank und mit sterilen Materialien durchgeführt. Die Zellen wurden jeweils in einer Dichte von 0,2 bis max. 1,0 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml kultiviert und zur Verdünnung mit frischem Medium versetzt.

#### **Kultivierung von LAD19-T-Zellen**

LAD19-T-Zellen wurden von Rik Bleijs (aus der Arbeitsgruppe von C. Figdor, Niederlande) kultiviert und nach Restimulierung mit frisch isolierten PBMC- und EBV-transformierten JY-Zellen im tiefgefrorenen Zustand zur Verfügung gestellt. Jeweils 10 x 10<sup>6</sup> Zellen wurden aufgetaut und in 9,6 ml Iscove`s Medium, supplementiert mit 7,5% Humanserum (gemischt aus Blut von zehn verschiedenen gesunden Spendern), 100 U/ml IL-2 und 0,2 µg/ml PHA, kultiviert. Der Zusatz von IL-2 und PHA diente zur Wachstumsstimulierung der Zellen. Die Zellen wurden in 96-Well-Mikrotiterplatten mit Rundboden kultiviert, wobei jedes Well 100 µl Zellsuspension enthielt. Nach 2 – 3 Tagen der Kultivierung wurden die LAD19-Zellen für Analysen eingesetzt.

#### **Kultivierung adhärenter Zellen**

Adhärente eukaryotische Zellen wurden als Monolayer-Kulturen in sterilen, beschichteten 10cm-Zellkulturschalen in DMEM-Medium mit 10% hitzeinaktiviertem FCS und 13 µg/ml Gentamycinsulfat in einem Begasungsbrutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 96% relative Luftfeuchtigkeit) kultiviert. Zur Umsetzung wurden die Zellen zunächst mit 5 ml 1x PBS gewaschen und anschließend mit 2,5 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung (0,5 mg Trypsin/ml) inkubiert, um sie von der Schale zu lösen. Die Trypsinierung der Zellen wurde durch Zugabe von DMEM-Medium gestoppt und die Zellen anschließend in frisches DMEM-Medium überführt.

#### **Anlegen von Dauerkulturen**

Zur langfristigen Lagerung von eukaryotischen Zellen wurden Dauerkulturen angelegt. Die adhärennten Zellen einer dicht bewachsenen Zellkulturschale bzw. 5 x 10<sup>7</sup> Zellen einer Suspensionskultur wurden hierzu 5 min bei 900x g abzentrifugiert, die Zellen in 750 µl Medium/10%

FCS resuspendiert und in sterile 2ml-Gefriergefäße überführt. Anschließend wurde die Suspension mit 750 µl FCS/30% DMSO (v/v) vermischt und sofort bei -80°C eingefroren. Die längerfristige Lagerung der Dauerkulturen erfolgte in flüssigem Stickstoff.

### 3.2.2 DNA-Arbeitstechniken

#### 3.2.2.1 Herstellung kompetenter *E. coli* mittels $\text{CaCl}_2$

Das nachfolgend beschriebene Verfahren zur Herstellung kompetenter *E. coli* basiert auf dem Protokoll von Mike Scott (UCSF).

Die verschiedenen *E. coli*-Stämme wurden ihrer Resistenz entsprechend auf LB-Agarplatten vereinzelt und über Nacht bei 37°C inkubiert. 20 ml TYM (im 250ml-Erlenmeyerkolben) wurden mit einer Bakterienkolonie inokuliert und bei 37°C und 200 Upm im Bakterien-schüttler inkubiert. Bei einer  $\text{OD}_{600}$  von 0.5 - 0.8 wurde diese Vorkultur in einen 2l-Erlenmeyerkolben überführt und 100 ml TYM zugegeben. Bei einer  $\text{OD}_{600}$  von 0.5 - 0.9 wurden weitere 380 ml hinzugefügt. Wenn die Bakterienkultur eine  $\text{OD}_{600}$  von 0.6 auf, wurde der Kolben auf Eis unter Schwenken rasch auf 4°C gekühlt. Nach Überführen der Kultur in einen sterilen 500ml-Zentrifugenbecher, wurden die Zellen 10 min bei 3000x g abzentrifugiert. Die sedimentierten Bakterien wurden in 100 ml kaltem Tfb I vorsichtig resuspendiert und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Danach wurden die Zellen in 20 ml Tfb II aufgenommen, in 200µl-Aliquots in sterile 1,5ml-Reaktionsgefäße gegeben und in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Lagerung kompetenter *E. coli*-Stämme erfolgte bei -80°C.

TYM:            2% (w/v) Bacto-Trypton  
                  0,5% /w/v) Hefe-Extrakt  
                  0,1 M NaCl  
                  10 mM  $\text{MgSO}_4$

Sterilisation durch Autoklavieren

TfB I:           30 mM KOAc  
                  100 mM KCl  
                  10 mM CaCl<sub>2</sub>  
                  15% (v/v) Glycerin  
                          Sterilisation durch Autoklavieren  
                  50 mM MnCl<sub>2</sub> (separat autoklaviert)

TfB II:           10 mM HEPES (pH 7,0)  
                  75 mM CaCl<sub>2</sub>  
                  10 mM KCl  
                  15% (v/v) Glycerin  
                          Sterilisation durch Autoklavieren

### 3.2.2.2 *Transformation kompetenter E. coli*

100 µl einer kompetenten *E. coli*-Suspension wurden auf Eis aufgetaut und mit 7 µl eines 50 µl Ligationsansatzes (3.2.2.9) bzw. 5 ng einer Plasmid-DNA-Präparation vermischt. Die Bakterien wurden anschließend weitere 15 min auf Eis und danach 5 min bei 37°C inkubiert. Der Transformationsansatz wurde auf LB-Agarplatten mit den Antibiotika der Plasmidresistenz ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 3.2.2.3 *DNA-Isolierung aus plasmidhaltigen E. coli*

#### **Mini-Präparation**

Dieses Verfahren wurde zur raschen Isolierung von Plasmid-DNA und zur raschen Überprüfung der Transformanten auf das gewünschte DNA-Fragment angewendet und in Abwandlung der von Birnboim und Doly (1979) beschriebenen Methode durchgeführt.

5 ml LB-Medium, supplementiert mit dem entsprechenden Selektions-Antibiotikum, wurden mit einer Bakterienkolonie inokuliert und über Nacht bei 37°C im Bakterienschüttler inkubiert. Die Zellsuspension wurde in einem Eppendorfreaktionsgefäß 1 min bei 20800x g und RT zentrifugiert, das resultierende Zellpellet in 300 µl Puffer 1 resuspendiert und anschließend zur alkalischen Lyse der Zellen mit 300 µl Puffer 2 gut durchmischt und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl Puffer 3, wurde der Ansatz vorsichtig gemischt und 5 min

auf Eis inkubiert. Zur Abtrennung chromosomaler DNA, von RNA und Proteinen, wurde 15 min bei 20800x g und 4°C zentrifugiert. Aus dem 900 µl Überstand, der die Plasmid-DNA enthielt, wurden noch vorhandene Proteine mit dem gleichen Volumen Phenol extrahiert (Zentrifugation: 5 min bei 20800x g und RT) und die DNA anschließend durch Zugabe von 0,8 Vol. Isopropanol gefällt und abzentrifugiert (15 min, 20800x g, 4°C). Nachdem das Pellet mit 70%igem kaltem EtOH gewaschen worden war, wurde die DNA getrocknet und in der Regel in 50 µl TE-Puffer aufgenommen. Zur Hydrolyse noch vorhandener RNA inkubierte man die Lösung ca. 30 min bei RT mit 10 µg RNaseA.

Puffer 1: 10 mM EDTA (pH 8,0)

Puffer 2: 0,2 M NaOH  
1% (w/v) SDS

Puffer 3: 2,5 M KOAc  
2,5 M HOAc  
pH 4,7

### **Maxi-Präparation**

Zur Isolierung von Plasmid-DNA im mg-Maßstab wurde die Maxi-Präparation angewendet. Diese Methode entsprach im wesentlichen der Durchführung der Mini-Präparation und wurde ebenfalls in Anlehnung an die Protokolle von Birnboim und Doly (1979) und Ish-Horowicz und Burke (1981) durchgeführt.

1 l einer Bakteriensuspension wurde 20 min bei 5000x g zentrifugiert und die sedimentierten Bakterienzellen in 40 ml Puffer 1 resuspendiert. Die Zellyse erfolgte ähnlich der Mini-Präparation alkalisch, durch Zugabe von 80 ml Puffer 2. Nach Zugabe von 40 ml Puffer 3 und kräftigem Durchmischen, wurden Bakterienzellreste 10 min bei 5000x g abgetrennt. Der Überstand wurde durch mehrlagigen Verbandmull in einen 500ml-Zentrifugenbecher filtriert und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 250 ml Isopropanol ausgefällt und anschließend 10 min bei 5000x g und 4°C abzentrifugiert. Das Sediment, das u. a. noch RNA und Salze enthielt, wurde mit 70% EtOH gewaschen, getrocknet und in 4 ml Puffer 1 resuspendiert. Die weitere Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte über einen CsCl-Gradienten. Hierzu wurde

die Lösung in ein 15ml-Plastikröhrchen überführt, das 5,5 g CsCl enthielt, und mit 4,4 g EtBr versetzt. Ungelöste Substanzen wurden 5 min bei 12300x g abzentrifugiert und der Überstand in ein Ultrazentrifugationsröhrchen überführt. Nach einer vierstündigen Zentrifugation bei 50900x g in einem NVT90-Rotor war die EtBr-gefärbte Plasmid-DNA-Bande im CsCl-Gradienten sichtbar und konnte mittels einer Spritze abgezogen werden. Das EtBr wurde anschließend durch mehrmaliges Ausschütteln mit n-Butanol (gesättigt mit 1 M NaCl) entfernt. Zur DNA-Fällung wurde die Lösung mit dem äquivalenten Volumen einer 1 M Ammoniumacetat-Lösung und mit 2 Vol. absolutem EtOH versetzt und gut durchmischt. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 6700x g und 4°C wurde das Pellet mit 70% kaltem EtOH gewaschen, getrocknet und je nach Ausbeute in 1 - 1,5 ml H<sub>2</sub>O (bidest.) aufgenommen.

#### 3.2.2.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Zur Konzentrationsmessung von DNA wurde die DNA-Lösung 1:50 in 200 µl H<sub>2</sub>O verdünnt und die Konzentration bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD<sub>260</sub>) spektralphotometrisch bestimmt. DNA weist bei einer Wellenlänge von 260 nm ein Absorptionsmaximum auf. Bei doppelsträngiger DNA wird bei einer OD<sub>260</sub> = 1,0 eine DNA-Konzentration von 50 µg/ml zugrunde gelegt (Sambrook *et al.*, 1989). Längere, einzelsträngige DNA-Moleküle weisen bei einer OD<sub>260</sub> = 1,0 eine Konzentration von 33 µg/ml auf.

Formel: 
$$c = \frac{OD_{260} \times k}{\epsilon \times d}$$

c = Konzentration in mM/l

k = Verdünnungsfaktor

ε = Extinktionskoeffizient in mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>

d = Küvettenschichtdicke in cm

Wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm ein weiteres Absorptionsmaximum gemessen, deutete dies auf die Anwesenheit von Proteinen in der Lösung hin. Der Quotient der Absorptionskoeffizienten, die bei 260 nm und 280 nm gemessen wurden, gab Aufschluß über die Reinheit einer DNA-Präparation. Bei reinen DNA-Lösungen liegt der Quotient bei ungefähr 2. Niedri-

gere Werte sind ein Hinweis auf Verunreinigungen durch Proteine, höhere Werte hingegen können ein Anzeichen für die Anwesenheit von RNA sein oder zeigen an, daß die DNA denaturiert ist.

Die Konzentration von Oligodesoxyribonukleotiden wurde anhand der Basenzusammensetzung über ein spezielles Programm des Spektralphotometers bestimmt. Es liegen folgende Extinktionskoeffizienten der einzelnen Basen zugrunde (Wallace und Miyada, 1987):

Base	$\epsilon_{260\text{nm}}^{1\text{M}}$
Adenin	15,20
Cytosin	7,05
Guanosin	12,01
Thymin	8,40

Der Extinktionskoeffizient  $\epsilon_{\text{gesamt}}$  wird als Summe der Extinktionskoeffizienten der einzelnen Basen angenähert.

Um die Oligodesoxyribonukleotidmenge ausgehend von ihrer Konzentration zu berechnen, wird das Molekulargewicht der Oligodesoxyribonukleotide bestimmt. Hierzu wird die Anzahl der Basen mit dem durchschnittlichen Basen-Molekulargewicht von 330 g/mol multipliziert.

### 3.2.2.5 DNA-Restriktionsanalysen

Die enzymatische Spaltung wurde zur Charakterisierung und Klonierung von Plasmid-DNA durchgeführt.

Für die Restriktion wurden 2  $\mu\text{g}$  (bei analytischen Ansätzen) bzw. 5  $\mu\text{g}$  (bei präparativen Ansätzen) der Plasmid-DNA eingesetzt und mit der jeweils benötigten Restriktionsendonuklease unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen gespalten. Waren Restriktionen mit zwei Enzymen gleichzeitig nötig, so wurde ebenfalls nach Angaben des Herstellers verfahren und der jeweils für beide Restriktionsendonukleasen günstigste Reaktionspuffer gewählt.

In der Regel konnte eine quantitative Spaltung der DNA nach einer zwei- bis dreistündigen Inkubationszeit erreicht werden. In einigen Fällen (Restriktion von PCR-Produkten) war eine Reaktionszeit von 8 – 12 h nötig.

### 3.2.2.6 *Dephosphorylierung von DNA mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm*

Die alkalische Phosphatase aus Kälberdarm entfernt in einem linearen, doppelsträngigen DNA-Molekül endständige 5'-Phosphatgruppen. Das Entfernen von Phosphatresten wurde bei Klonierungen durchgeführt, um die unspezifische Selbstligation des Vektors zu unterbinden. Nach dem Restriktionsverdau der DNA-Probe wurde dem Ansatz 1 U alkalische Phosphatase zugesetzt und für 30 min bei RT inkubiert.

### 3.2.2.7 *Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Molekülen*

DNA-Fragmente wurden in horizontalen Agarosegelen in Flachgelapparaturen aufgetrennt. Dabei erlaubt die negative Ladung der DNA-Moleküle ihre Wanderung im elektrischen Feld. Die Gelkonzentration richtete sich nach der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente und lag zwischen 1% und 3% (w/v). Vor der Auftragung wurden die DNA-Proben mit 1/6 Vol. 6x Agarose-Auftragspuffer versetzt. Zusätzlich wurde auf dem Gel eine bekannte Referenz (DNA-Längenstandard) aufgetragen, um das Molekulargewicht der aufgetrennten DNA-Fragmente zu bestimmen. Die Elektrophorese erfolgte in 1x TAE/EtBr bei 5 V/cm. Das in die DNA interkalierte EtBr wurde anschließend, zur Visualisierung der DNA-Fragmente, unter UV-Licht zur Fluoreszenz gebracht.

1x TAE/EtBr: 20 µl EtBr (10 mg/ml in H<sub>2</sub>O) auf 1 l 1x TAE

6x Agarose-Auftragspuffer: 0,25% (w/v) Bromphenolblau  
 0,25% (w/v) Xylencyanol  
 30% (v/v) Glycerin  
 50 mM EDTA

### 3.2.2.8 *Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen*

Zur Klonierung von DNA-Fragmenten wurde 1/10 eines Restriktionsansatzes auf ein niedrig-schmelzendes Agarosegel (LMP-Agarose) aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Unter UV-Licht der Wellenlänge  $\lambda = 365$  nm wurden die entsprechenden DNA-Fragmente mit Hilfe eines Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Bei Erhitzen auf 65°C schmolz das

Gelstück und das erhaltene DNA-Fragment konnte in Ligationsansätze eingesetzt werden.

### 3.2.2.9 *Ligation von DNA-Fragmenten*

Die T4-DNA-Ligase katalysiert die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen endständigen 5`-Phosphat- und 3`-Hydroxylgruppen einer doppelsträngigen DNA.

Nach Schmelzen der LMP-Agaroseblöckchen (3.2.2.8) wurden Vektor-DNA und DNA-Fragment in einem molaren Mengenverhältnis von 1:3 in die Ligation eingesetzt. Nach Zugabe von 5 µl 10x Ligationspuffer und 2 U T4-DNA-Ligase wurde die Ligation in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt. Die Ligation GC-reicher Restriktionsschnittstellen (z. B. MluI und NotI) erfolgte dabei für 2 h bei RT. AT-reiche Restriktionsschnittstellen (z. B. HindIII und XbaI) wurden ÜN bei 16°C ligiert.

10x Ligationspuffer: 400 mM Tris/HCl  
100 mM MgCl<sub>2</sub>  
100 mM DTT  
5 mM ATP  
pH 7,8

### 3.2.2.10 *Amplifikation von DNA-Fragmenten mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)*

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) führt zu exponentieller Vermehrung eines DNA-Abschnittes zwischen zwei an den komplementären Strängen hybridisierenden Oligodesoxyribonukleotiden (Saiki *et al.*, 1985; Mullis und Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1988).

PCR-Reaktionen wurden für Mutagenese- und Klonierungsexperimente angewendet. In der Regel wurde dabei die Vent-DNA-Polymerase eingesetzt, da sie im Vergleich zu anderen Polymerasen eine höhere Kopiergenauigkeit besitzt.

Die typische Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes war wie folgt:

200 ng DNA  
0,5 µg Vorwärts-Oligodesoxyribonukleotid  
0,5 µg Rückwärts-Oligodesoxyribonukleotid



4 µl 10x Vent-Polymerase-Puffer  
4 µl 2,5 mM dNTP-Mischung  
1 µl Vent-Polymerase (1 U/µl)  
H<sub>2</sub>O (bidest.) ad 40 µl

Die PCR-Reaktion wurde in einer Kapillar-PCR-Maschine (Corbett Research), entsprechend der programmierten Temperaturen für Strangtrennung (Denaturierung), Oligonukleotid-Hybridisierung und Strangverlängerung (Elongation), durchgeführt. In der Regel wurden hierzu folgende Bedingungen gewählt:

Denaturierung:	94°C	30 sek
Hybridisierung:	55°C	60 sek
Elongation:	72°C	60 sek

(15 – 20 Zyklen)

Nach Beendigung der Reaktion analysierte man ein 5µl-Aliquot des Produktes zur Kontrolle auf einem Agarosegel.

10x Vent-Polymerase-Puffer:	100 mM KCl
	200 mM Tris/HCl (pH 8,8)
	100 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
	20 mM MgSO <sub>4</sub>
	1% (v/v) Triton-X-100

2,5 mM dNTP-Mix:	2,5 mM dGTP
	2,5 mM dATP
	2,5 mM dTTP
	2,5 mM dCTP

### **Fällung des PCR-Produktes**

Das Volumen des PCR-Ansatzes wurde mit H<sub>2</sub>O (bidest.) auf 200 µl ergänzt und die Proteine anschließend, nach Zugabe von 200 µl Phenol (in TE äquilibriert), in der organischen Phase gelöst. Die obere, wäßrige Phase überführte man in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß und fällte die enthaltene DNA unter Zusatz von 1 µl Glycogen und 800 µl EtOH aus. Die DNA wurde 5 min bei 20800x g abzentrifugiert, das Sediment mit 1 ml 70% EtOH gewaschen und in 25 µl H<sub>2</sub>O (bidest.) gelöst.

Die aufgereinigte DNA wurde zur Klonierung in Plasmidvektoren mit 3 U jedes Klonierungsrestriktionsenzym ÜN bei 37°C inkubiert.

#### **3.2.2.11 DNA-Mutagenisierungsverfahren nach Kunkel**

Grundlage des DNA-Mutagenisierungsverfahrens nach Kunkel (Kunkel, 1985; Kunkel *et al.*, 1987) ist die Transformation von Plasmid-DNA in den Uracil-N-Glycosylase- und dUTPase-negativen *E. coli*-Stamm CJ236 (Lindahl, 1974; Konrad und Lehman, 1975; Duncan *et al.*, 1978; Hochhauser und Weiss, 1978). Dies führt zu einem verstärkten Einbau von dUTP anstelle von dTTP in die replizierte DNA, das aufgrund der fehlenden Uracil-N-Glycosylase nicht mehr entfernt wird.

Die gebildete Uracil-haltige Plasmid-DNA kann durch den Helferphagen M13K07 als Einzelstrang-DNA (ssDNA) verpackt werden. Durch *in vitro*-Polymerisation der Einzelstrang-DNA mit einem Oligodesoxyribonukleotid, das die gewünschte Mutation beinhaltet, entsteht eine Thymin-haltige Kopie des Uracil-haltigen Stranges. Nach Transformation in *E. coli* MC1061 erfolgt der Abbau der Uracil-haltigen DNA und damit eine Selektion zugunsten der mutierten, Thymin-haltigen DNA-Sequenz.

### **Gewinnung von Einzelstrang-Phagen-DNA**

Die Präparation der Phagen-Einzelstrang-DNA erfolgte nach der Vorschrift von Sambrook *et al.* (1989).

5 ng Plasmid-DNA wurden in die Bakterienzelllinie CJ236 transformiert und auf LB-Agarplatten mit Ampicillin (50 µg/ml) und Chloramphenicol (30 µg/ml) ÜN bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 3 ml 2x YT-Medium (inkl. 50 µg/ml Ampicillin und 30 µg/ml Chloramphenicol) mit einer Bakterienkolonie inokuliert und 5 h bei 37°C und 200 Upm in einem Bakterienschüttler geschüttelt. Nach Zugabe des Helferphagen M13K07 in



**Phosphorylierung des Mutagenese-Oligodesoxyribonukleotids**

Voraussetzung für die Polymerisation des mutierten Stranges ist die Phosphorylierung des Mutagenese-Oligodesoxyribonukleotids. Hierzu wurde folgender Phosphorylierungsansatz pipettiert:

5 mg Mutagenese-Oligodesoxyribonukleotid  
3 µl 10x LA-Puffer  
3 µl 10x Restriktionspuffer 4 (NEB, Schwalbach)  
1 µl T4-Polynukleotidkinase (1 U/µl)  
H<sub>2</sub>O (bidest.) ad 30 µl

Die Phosphorylierung des Mutagenese-Oligodesoxyribonukleotids erfolgte ÜN bei 37°C. Zur Inaktivierung der T4-Polynukleotidkinase wurde der Ansatz 20 min bei 65°C inkubiert und anschließend mit 70 µl H<sub>2</sub>O (bidest.) versetzt.

**Synthese des mutierten DNA-Stranges**

Zur Synthese des mutierten DNA-Stranges wurden 200 ng Phagen-Einzelstrang-DNA, 3 pmol phosphoryliertes Oligodesoxyribonukleotid und 1 µl 10x Annealingpuffer in einem Endvolumen von 10 µl H<sub>2</sub>O (bidest.) vermischt. Die Einzelstrang-DNA wurde 5 min in einem Aluminiumblock bei 70°C im Wasserbad denaturiert und für 30 min langsam auf RT abgekühlt. Nach Überführen der Ansätze auf Eis wurden 1 µl 10x Synthesepuffer, 2,5 U T4-DNA-Ligase, 2,5 µg Gen32-Protein und 1 U T4-DNA-Polymerase zugegeben und 5 min auf Eis gekühlt. Die Proben wurde 5 min bei 25°C und nachfolgend 90 min bei 37°C inkubiert. Zur Beendigung der Synthesereaktion wurden 90 µl Stoppuffer zugegeben.

**Transformation der mutierten Plasmid-DNA in *E. coli* MC1061**

100 µl kompetente *E. coli* MC1061 wurden auf Eis aufgetaut, mit 10 µl des DNA-Syntheseansatzes vermischt und 5 min bei 4°C inkubiert. Nach einer weiteren fünfminütigen Inkubation bei 37°C wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten (inkl. 50 µg/ml Ampicillin) ausgestrichen.

---

10x LA-Puffer:	10 mM ATP 20 mM DTT 1 mg/ml BSA 10 mM Spermidin
10x Annealingpuffer:	20 mM Tris/HCl (pH 7,4) 2 mM MgCl <sub>2</sub> 50 mM NaCl
10x Synthesepuffer:	4 mM dGTP 4 mM dATP 4 mM dTTP 4 mM dCTP 7,5 mM ATP 175 mM Tris/HCl (pH 7,4) 37,5 mM MgCl <sub>2</sub> 5 mM DTT
Stoppuffer:	10 mM Tris/HCl (pH 8,0) 10 mM EDTA

### 3.2.2.12 DEAE-Dextran/Chloroquin-Transfektion von COS7-Zellen

Die Transfektion von COS7-Zellen erfolgte zur transienten Überexpression von Fusionsproteinen. Dieses Expressionssystem ermöglicht hohe Proteinausbeuten bei einfacher Handhabung der Zellen. Die Transfektionsprozedur orientiert sich an dem Protokoll von Lopata *et al.* (1984). Zur Steigerung der Transfektionseffizienz werden jedoch verschiedene Parameter modifiziert (Sussman und Milman, 1984).

Bei dieser Methode wird die Plasmid-DNA im Komplex mit DEAE-Dextran über einen bisher nicht vollständig geklärten Mechanismus aufgenommen. Chloroquin begünstigt diesen Prozess vermutlich dadurch, daß es eine zu starke Ansäuerung der DNA-enhaltenden Endosomen verhindert.

COS7-Zellen einer dicht bewachsenen 10cm-Schale wurden am Vorabend durch Trypsinie-

rung abgelöst und derart auf neue Schalen verteilt, daß die Zellen am nächsten Tag eine Konfluenz von etwa 80% aufwiesen. Vor der Transfektion wurde das Medium abgenommen und durch 5 ml DMEM/10% NuSerum ersetzt. Zugabe von 1 µg Plasmid-DNA pro ml Medium jedes zu transfizierenden Konstruktes und 200 µl einer 25-fach konzentrierten DEAE-Dextran/Chloroquin-Lösung startete die Transfektion. In der Regel begannen sich die Zellen auf der Platte nach ca. 2 h Inkubation bei 37°C/5% CO<sub>2</sub> abzurunden. Die Transfektion war abgeschlossen, wenn sich etwa 80% der Zellen abgerundet, aber noch nicht gelöst hatten. Dies war normalerweise nach einer vier- bis fünfstündigen Reaktionszeit der Fall. Das Medium wurde abgenommen und die Zellen für 2 min mit 5 ml PBS/10% (v/v) DMSO gewaschen. Die PBS/DMSO-Lösung wurde verworfen und die Zellen ÜN bei 37°C/5% CO<sub>2</sub> in 10 ml DMEM/10% FCS inkubiert. Am Tag nach der Transfektion wurden die Zellen nach Waschen mit 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung trypsiniert und 1:1 auf frische Platten überführt. Nach 24 - 48 h Inkubation bei 37°C/5% CO<sub>2</sub> konnten die Zellen für Analysen eingesetzt werden.

25x DEAE-Dextran/Chloroquin: 10 mg/ml (w/v) DEAE-Dextran  
2,5 mM Chloroquinphosphat  
in PBS

Sterilisation durch Filtration

Lagerung in 1ml-Aliquots bei -20°C

### **3.2.2.13 Transfektion humaner Zellen durch Elektroporation**

Die Transfektion humaner Zellen mittels Elektroporation erfolgte in dieser Arbeit zur stabilen Integration von DNA in das Genom von HeLa-Zellen (3.2.2.14).

Starke elektrische Felder permeabilisieren Membranen kurzfristig derart, daß große Moleküle, wie beispielsweise DNA, in die Zelle aufgenommen werden können. Ein kleiner Prozentsatz der eingeschleusten Plasmid-DNA wird dabei normalerweise stabil in das Genom der Zellen integriert.

Zur Elektroporation wurden  $1,5 \times 10^7$  HeLa-Zellen 5 min bei 900x g abzentrifugiert und in 400 µl RPMI/10% FCS resuspendiert. In 4mm-Elektroporationsküvetten wurden 12 µg jeder zu transfizierenden Plasmid-DNA vorgelegt. Nach Zugabe der Zellen und Mischen erfolgte die Elektroporation nach den zuvor ausgetesteten zellspezifischen Bedingungen. Für HeLa-Zellen wurden folgende Einstellungen gewählt:

Spannung: 220 V

Feldstärke: 900  $\mu$ Farad

Zur Expression wurden die Zellen in 10cm-Zellkulturschalen mit 10 ml RPMI/10% FCS überführt und ÜN bei 37°C/5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

#### **3.2.2.14 Stabile Expression von LFA-1 in HeLa-Zellen**

Für funktionale Analysen wurden HeLa-Zellen generiert, die stabil LFA-1 exprimierten. Zu diesem Zweck wurde die cDNA, codierend für die humane CD11a- bzw. CD18-Untereinheit, in den Expressionsvektor pEF-IRESpuro (Zeitlmann, unveröffentlicht) kloniert. Dieser Expressionsvektor besitzt eine bicistronische Expressionskassette unter der Kontrolle des humanen EF.1 $\alpha$ -Promotors. Ein zusätzliches IRES(internal ribosome entry site)-Element aus dem ECM-Virus ermöglicht zudem die gleichzeitige Translation sowohl des gewünschten Proteins als auch des Selektionsmarkers. Die Selektion erfolgte in diesem Fall auf die Resistenz gegen das Antibiotikum Puromycin.

Die beiden Plasmide, codierend für die  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Kette von LFA-1, wurden in HeLa-Zellen durch Elektroporation kotransfiziert (3.2.2.13). Zellen, die die transfizierte DNA stabil in das Genom integriert hatten, wurden durch Zusatz von Puromycin, in einer Endkonzentration von 2  $\mu$ g/ml selektiert. Die gewählte Antibiotika-Konzentration entsprach dabei der Menge, die für Wildtyp-HeLa-Zellen nach zwei bis drei Tagen toxisch wirkte. Nach einer zweiwöchigen Selektionsphase wurden die Zellen auf LFA-1-Expression mittels Durchflußzytometrie (3.2.4.7) analysiert. Für funktionale Analysen wurde auf eine Selektion einzelner Klone verzichtet und statt dessen eine Gesamtpopulation an Zellen eingesetzt.

### **3.2.3 Arbeiten mit dem Vaccinia-Virus-Expressionssystem**

Das Vaccinia-Virus, ein Mitglied der Poxvirus-Familie, ist ein „Vektorsystem“ für die transiente Expression von Genen in Säugerzellen (Panicali und Paoletti, 1982; Mackett *et al.*, 1982). Der Vorteil der Vaccinia-Infektion besteht im weiten Spektrum von Wirtszellen und einer hohen Expressionsrate.

### 3.2.3.1 Herstellung rekombinanter Vaccinia-Viren

Von einer 10cm-Schale konfluenten CV-1-Zellen wurde das Medium abgenommen und durch 2,5 ml DMEM (ohne Zusätze) ersetzt. Die Zellen wurden mit  $10^8$ - $10^9$  pfu des Wildtyp-Vaccinia-Virus pro ml Medium infiziert und 2 h bei  $37^\circ\text{C}/5\%$   $\text{CO}_2$  inkubiert. Anschließend wurde das Medium durch 5 ml DMEM/10% FCS ersetzt und das zu rekombinierende Plasmid auf folgende Weise vorbereitet und zugegeben:

Zu 500  $\mu\text{l}$  250 mM  $\text{CaCl}_2$  wurden 10  $\mu\text{g}$  pTKg-Plasmid-DNA gegeben. Unter Schütteln wurde diese Mischung in 500  $\mu\text{l}$  2x HEBS-Lösung getropft und der Ansatz unter Schwenken auf die CV-1-Zellen verteilt. Nach 12 h Inkubation bei  $37^\circ\text{C}/5\%$   $\text{CO}_2$ , wurde das Medium durch frisches DMEM/10% FCS ersetzt und die Zellen weitere 24 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Die so infizierten Zellen wurden geerntet und 5 min bei 900x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 500  $\mu\text{l}$  DMEM (ohne Zusätze) aufgenommen und die Zellen durch dreimaliges Einfrieren (in Trockeneis/Methanol) und Auftauen aufgebrochen. Zur vollständigen Lyse wurde die Zellsuspension anschließend mit 500  $\mu\text{l}$  Trypsin (2x umkristallisiert und sterilfiltriert) versetzt und 30 min bei  $37^\circ\text{C}$  im Wasserbad inkubiert. Die so präparierte Suspension enthielt sowohl Wildtyp- als auch rekombinanten Vaccinia-Virus. Auf rekombinanten Vaccinia-Virus mußte daher selektiert werden (3.2.3.2).

2x HEBS-Lösung: 270 mM NaCl  
12 mM  $\text{D}^+$ -Glucose  
100 mM KCl  
1,4 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
40 mM HEPES  
pH 7,1  
Sterilisation durch Filtration (0,22  $\mu\text{m}$  Porendurchmesser)  
Lagerung bei  $-20^\circ\text{C}$

### 3.2.3.2 Selektion rekombinanter Vaccinia-Viren

Zur Selektion rekombinanter Vaccinia-Viren wurde Mycophenolsäure (MPA) eingesetzt, die die Guanylat(GMP)-Synthese der Zelle und somit die Replikation von Wildtyp-Virus hemmt. Durch die Koexpression des *E. coli* gpt-Gens, das für die Guanin-Phosphoribosyltransferase



(XGPRT) codiert, kann die Inhibition der GMP-Biosynthese, bei gleichzeitiger Anwesenheit von Xanthin und Hypoxanthin, umgangen werden, da XGPRT diese beiden Substrate zur GMP-Synthese verwenden kann (Falkner und Moss, 1988). Der pTKg-Expressionsvektor trägt die DNA-Sequenz für das gpt-Gen.

Zur Selektion wurden konfluente CV-1-Zellen auf 6cm-Schalen ÜN mit 3 ml Selektionsmedium inkubiert. Am nächsten Morgen wurde das Medium abgenommen und durch 1,5 ml DMEM (ohne Zusätze) ersetzt. Die Zellen wurden anschließend mit der Suspension aus rekombinanten und Wildtyp-Virus (3.2.3.1) infiziert und 1 h bei 37°C/5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Das Medium wurde entfernt und durch 3 ml Selektionsmedium ersetzt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 36 – 48 h wurden durch rekombinanten Virus lysierte Zellbereiche als Viren-Plaques sichtbar. Die Viren-Plaques wurden unter sterilen Bedingungen von der Platte entfernt, in 200 µl 10 mM Tris (pH 9,5) überführt und für eine erneute Selektionsrunde eingesetzt. Nach drei bis vier Selektionsrunden lag der rekombinante Virus in aller Regel in reiner Form vor und konnte auf Proteinexpression getestet werden.

Selektionsmedium: 190 ml DMEM  
2,5% (v/v) FCS  
10 mg MPA  
100 mg Xanthin

### 3.2.3.3 *Identifikation rekombinanter Vaccinia-Viren*

Die Reinheit einer Suspension rekombinanter Vaccinia-Viren kann rasch durch Immunofärbung von Viren-Plaques getestet werden. Viren-Plaques, die nach Infektion in einem dichten Zellrasen entstehen, werden dazu mittels spezifischer Antikörper auf Proteinexpression getestet.

Konfluente CV-1-Zellen, auf einer 6cm-Schale, wurden mit dem zu testenden Vaccinia-Virus infiziert (3.2.3.5) und in DMEM/10% FCS Medium bei 37°C/5% CO<sub>2</sub> bis zum Auftreten gut sichtbarer Viren-Plaques im Zellrasen inkubiert. Das Medium wurde abgenommen und durch 1 ml PBS ersetzt.

Zur Anfärbung des überexprimierten Proteins wurde der spezifische Antikörper in einer entsprechenden Verdünnung zugegeben und 1 h bei RT auf einem Kippschüttler inkubiert. Die Zellen wurden anschließend dreimal mit PBS gewaschen und erneut mit 1 ml PBS über-

schichtet. Nach Zugabe von 2 µg eines sekundären Antikörpers, gekoppelt mit Alkalischer-Phosphatase, wurden die Zellen erneut 1 h bei RT auf einem Kippschüttler geschwenkt und anschließend viermal mit PBS gewaschen. Die Detektion des überexprimierten Proteins erfolgte durch Zugabe von 2,5 ml AP-Puffer, 8,25 µl BCIP (50 mg/ml) und 16,5 µl NBT (50 mg/ml). Infizierte Zellen, die das gewünschte Protein exprimierten, färbten sich dabei nach etwa 10 – 20 min violett.

AP-Puffer: 100 mM Tris/HCl (pH 9,5)  
100 mM NaCl  
5 mM MgCl<sub>2</sub>

#### **3.2.3.4 Amplifikation rekombinanter Vaccinia-Viren**

Konfluente CV-1-Zellen, auf einer 10cm-Zellkulturschale, wurden mit 20 µl einer Suspension rekombinanter Vaccinia-Viren in 2,5 ml DMEM (ohne Zusätze) infiziert und 1 h bei 37°C/5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und durch 10 ml DMEM/10% FCS ersetzt.

In der Regel waren nach 12 - 36 h praktisch alle Zellen gleichmäßig infiziert. In diesem Stadium wurden die Zellen 2x mit 5 ml PBS gewaschen und nach erneuter Zugabe von 5 ml PBS mit einem sterilen Plastikzellschaber von der Platte abgelöst. Nach 5 min Zentrifugation bei 900x g wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet mit 300 µl 10 mM Tris/HCl (pH 9,0) versetzt. Die Zellen wurden 30 min bei RT inkubiert und im Ultraschallbad (Transsonic Digital – Typ T480/H-2, Firma ELMA) bei maximaler Beschallungsstärke für 30 sek vereinzelt und anschließend bei –20°C gelagert.

#### **3.2.3.5 Infektion humaner Zellen mit rekombinanten Vaccinia-Viren**

Zur Expression von Proteinen, mit Hilfe des Vaccinia-Virus-Expressionssystems, wurden 3 x 10<sup>6</sup> Suspensionszellen 5 min bei 900x g zentrifugiert und in 100 µl RPMI (ohne Zusätze) resuspendiert.

Die Zellen wurden 1 h bei 37°C/5% CO<sub>2</sub> mit 10 MOI (multiplicity of infection, entspricht 10 Viren pro Zelle) rekombinantem Vaccinia-Virus infiziert, anschließend mit 5 ml RPMI/10% FCS versetzt und in 6cm-Zellkulturschalen überführt. Nach einer Expressionsdauer von sechs

Stunden bis ÜN (abhängig von der Zelllinie) bei 37°C/5% CO<sub>2</sub>, konnten die Zellen für Analysen eingesetzt werden.

### 3.2.4 Protein-Arbeitstechniken

#### 3.2.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte in der Regel unter denaturierenden Bedingungen durch die diskontinuierliche, eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970). Polyacrylamid als Trägermedium besitzt den Vorteil, daß es chemisch inert ist und zudem die Porengröße des Gels durch unterschiedliche Konzentrationen von Acrylamid und Bisacrylamid leicht variiert werden kann.

Durch Zusatz von SDS zum Proteingemisch werden praktisch alle nichtkovalenten Wechselwirkungen in den nativen Proteinen zerstört. Ferner wird ein SDS/Protein-Komplex gebildet, dessen stark negative Ladung dem Molekulargewicht des Proteins ungefähr proportional ist. Die Wanderungsgeschwindigkeit in SDS-haltigen Gelen ist somit alleine durch das Molekulargewicht eines unmodifizierten Proteins und durch den Vernetzungsgrad des Gels bestimmt. Zur Gelelektrophorese wurde die Polyacrylamid-Gellösung nach dem unten angegebenen Schema zwischen zwei Glasplatten in einer Mini-Gelapparatur (BioRad) in einer Höhe von ca. 4,5 cm gegossen und mit 1 ml H<sub>2</sub>O (bidest.) überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Wasser vollständig entfernt und das Trenngel mit Sammelgel (ca. 0,5 cm) überschichtet, um die Protein/SDS-Komplexe vor der eigentlichen Auftrennung zu fokussieren.

Das Gel wurde mit den vorbereiteten Protein-Proben beladen und der Gellauf in 1x SDS-Laufpuffer bei 150 V durchgeführt.

<b>Trenngel</b>	<b>8% (ml pro Gel)</b>	<b>10% (ml pro Gel)</b>	<b>12% (ml pro Gel)</b>
H <sub>2</sub> O	2,3	1,9	1,6
30% Acrylamid:Bisacrylamid (29:1)	1,3	1,7	2,0
1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)	1,3	1,3	1,3
10% SDS	0,05	0,05	0,05
10% APS	0,05	0,05	0,05
TEMED	0,003	0,003	0,003

Sammelgel	5% (ml pro Gel)
H <sub>2</sub> O	1,4
30% Acrylamid:Bisacrylamid (29:1)	0,33
1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)	0,25
10% SDS	0,02
10% APS	0,02
TEMED	0,003

10x SDS-Laufpuffer:        250 mM Tris  
                                   2,5 M Glycin  
                                   1% (w/v) SDS  
                                   pH 8,3

#### 3.2.4.2 *Coomassie-Blau-Färbung von Proteingelen*

Zur schnellen Anfärbung der durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine, wurde das Verfahren der Coomassie-Blau-Färbung angewendet. Das Polyacrylamidgel wurde hierzu etwa 60 min bei RT auf einem Tischschüttler bei 60 Upm in der Färbelösung geschwenkt und anschließend 3x 15 min in der Entfärbelösung inkubiert. Zum Trocknen wurde das Gel luftblasenfrei auf ein Filterpapier aufgebracht und für 1 h bei 80°C in einem Vakuum-Geltrockner getrocknet.

Färbelösung:                50% (v/v) Methanol  
                                   10% (v/v) Essigsäure  
                                   0,2% (w/v) Coomassie-Blau R-250

Entfärbelösung:        20% (v/v) Isopropanol  
                                   10% (v/v) Essigsäure

#### 3.2.4.3 *Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford*

Die Proteinkonzentration in Lösung wurde durch die Bradford-Methode bestimmt (Bradford, 1976). Die Messung basiert auf der Absorptionsänderung des gebundenen Farbstoffes Co-

massie-Brilliant-Blau bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 595$  nm im Vergleich zum freien Farbstoff, in Abhängigkeit zur Proteinkonzentration. Der Farbstoff bindet dabei an basische (Ausnahme Arginin) und aromatische Aminosäurereste.

Als Referenz der gemessenen Proteinkonzentration der Probe diente die Eichkurve eines Standardproteins, in aller Regel BSA, verschiedener bekannter Konzentrationen (1, 2, 5, 10, 20 und 30  $\mu\text{g}$ ).

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde eine im Handel erhältliche, konzentrierte Bradford-Reagenzlösung (BioRad) 1:5 mit Wasser verdünnt. Jeweils 1 ml dieser verdünnten Farbstofflösung wurde mit 20 ml der Proteinprobe unbekannter Konzentration vermischt und die optische Dichte bei der Wellenlänge  $\lambda = 595$  nm bestimmt. Der erhaltene Meßwert wurde anschließend mit den Daten der Eichkurve verglichen und somit die Proteinkonzentration ermittelt.

#### 3.2.4.4 *Transfer von Protein-SDS-Komplexen auf Nitrozellulosemembran*

Ein Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembran wurde zur Immobilisierung und späteren spezifischen immunologischen Detektion der Proteine durchgeführt. Es wurde stets nichtaktivierte Nitrozellulosemembran verwendet.

Der Proteintransfer erfolgte durch sog. ElektrobloTTing, im Tank-Verfahren, in einer vertikalen Protein-Transfer-Apparatur (BioRad). Das hierzu benötigte Polyacrylamidgel, die Nitrozellulosemembran, die Filterpapiere und die Schwämme wurden in Transferpuffer äquilibriert und entsprechend dem folgenden Schema, möglichst ohne Lufteinschlüsse, zwischen den Elektroden angeordnet:

#### **Anode**

poröser Schwamm  
 3 Filterpapiere (Whatman 3MM)  
 Nitrozellulosemembran  
 SDS-Polyacrylamidgel  
 3 Filterpapiere (Whatman 3MM)  
 poröser Schwamm

#### **Kathode**

Der Transfer der Proteine erfolgte unter Kühlung und permanenter Pufferbewegung wahlweise bei 70 V für 3 h oder bei 20 V ÜN.

Transferpuffer:        5,8 g Tris-Base  
                          2,9 g Glycin  
                          3,7 ml 10% (w/v) SDS  
                          200 ml Methanol  
                          mit H<sub>2</sub>O (dest.) ad 1 l

### **3.2.4.5     *Immunologische Detektion immobilisierter Proteine auf Nitrozellulosemembran***

Nach dem Transfer auf Nitrozellulosemembran wurden die Protein mit Hilfe spezifischer Antikörper und dem, auf dem HRP-System basierenden ECL-Verfahren detektiert.

Die Nitrozellulosemembran wurde dazu nach dem Elektroblothing (3.2.4.4) für 5 min auf einem Tischschüttler bei 60 Upm in 1x TBST gewaschen. Um noch freie Proteinbindungsstellen auf der Membran abzusättigen, wurde die Nitrozellulose anschließend 30 min in Blockierlösung geschwenkt. Nach 3x 5 min Waschen mit 1x TBST, inkubierte man die Membran mit dem spezifischen Antikörper, der in geeigneter Weise in 10 ml 1x TBST verdünnt worden war (3.1.9.1), 30 min bis 2 h bei RT unter leichtem Schwenken auf einem Tischschüttler. Nach der Inkubation wurde die Membran erneut 3x 5 min mit 1x TBST gewaschen und mit einem sekundären, Peroxidase-gekoppelten Antikörper (gerichtet gegen den ersten Antikörper) für 1 h bei RT und 60 Upm inkubiert. In der Regel wurde der sekundäre Antikörper dabei in einem Volumen von 10 ml und in einer Verdünnung von 1:3000 in 1x TBST eingesetzt (3.1.9.2). Zum Abschluß wurde die Membran abermals 3x 5 min mit 1x TBST gewaschen. Zur Detektion der spezifischen Proteine wurde anschließend ein ECL-Reagenz verwendet und nach den Angaben des Herstellers verfahren. Entsprechend der Intensität der Chemilumineszenz wurde ein Röntgenfilm (Kodak X-OMAT-AR) für 1 sek bis 10 min exponiert und anschließend entwickelt.

---

1x TBST:	10% 10x TBS 0,1% (v/v) Tween20 pH 7,5
Blockierlösung:	0,25% (w/v) Gelatine in 1x TBST

#### **3.2.4.6 „Stripping“ von Nitrozellulosemembranen**

Das „Stripping“-Verfahren ermöglicht das Entfernen spezifischer Antikörper von Nitrozellulosemembranen und dadurch die mehrfache Detektion mit Antikörpern verschiedener Spezifität auf einer Membran.

Membranen mit gebundenen Antikörpern wurden 5 min bei 70°C in „Stripping“-Puffer unter leichtem Schwenken inkubiert. Nach Entfernen des Puffers wurde die Membran 3x 5 min bei RT mit 50 ml 1x TBST gewaschen und konnte anschließend erneut zur spezifischen Proteindetektion (3.2.4.5) eingesetzt werden.

„Stripping“-Puffer: 100 mM 2-Mercaptoethanol  
2% SDS  
62,5 mM Tris/HCl (pH 6,7)

#### **3.2.4.7 Detektion von Proteinen mittels Durchflußzytometrie**

Als Alternative zur Detektion immobilisierter Proteine auf Nitrozellulosemembran (3.2.4.5) besteht die Möglichkeit der Expressionskontrolle durch fluoreszenzaktivierte Zelltrennung (FACS = fluorescence activated cell sorting). Mit dieser Methode können Proteine in intakten Zellen detektiert werden.

Ca.  $3 \times 10^6$  Zellen wurden 5 min bei 900x g in einem 15ml-Plastikröhrchen sedimentiert, mit 5 ml 1x PBS gewaschen und abermals 5 min bei 900x g zentrifugiert.

Zur Anfärbung von Zelloberflächen-Proteinen wurden die Zellen in 1 ml PBS aufgenommen und mit einem spezifischen Antikörper in einer geeigneten Verdünnung 1 h bei 4°C inkubiert (3.1.9). Die Zellen wurden mit 5 ml 1x PBS gewaschen und erneut in 1 ml 1x PBS mit einem sekundären Fluorescein-isothiocyanat(FITC)-konjugierten Antikörper (gerichtet gegen den primären Antikörper) abgedunkelt 1 h bei 4°C gefärbt. Nachdem die Zellen nochmals mit 5

ml 1x PBS gewaschen und in 1 ml 1x PBS resuspendiert worden waren, konnte der Prozentsatz an Zellen, die das markierte Protein exprimierten, mit Hilfe eines FACS-Meßgerätes (Epics XL, Coulter) bestimmt werden.

Die Anfärbung und Detektion intrazellulär exprimierter Proteine erfolgte auf ähnliche Weise, allerdings mußten die Zellen hierzu permeabilisiert werden, um den Antikörper-Eintritt in die Zelle zu gewährleisten. Dazu wurden die Zellen, nach einmaligem Waschen mit PBS, mit 1 ml 2% (v/v) Formaldehyd/PBS für 30 min bei RT fixiert, wie oben pelletiert und anschließend noch überschüssiges Formaldehyd mit 2 ml einer 2%igen (w/v) Glycin/PBS-Lösung zur Reaktion gebracht. Die Zellen wurden erneut bei 900x g zentrifugiert und zur spezifischen Protein-Detektion mit den entsprechenden Antikörpern in 1 ml 0,2% (v/v) Triton-X-100/PBS analog oben inkubiert.

Zur Detektion des Epitops 24 auf LFA-1 wurden Zellen mit dem monoklonalen Antikörper 24 (mAk 24) in einer Konzentration von 8µg/ml 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde ein sekundärer, FITC-konjugierter Schaf-anti-Maus-Antikörper im Überschuß zugegeben und die Zellen weitere 45 min bei RT inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde durch 1x Waschen mit PBS entfernt, die Zellen mit 2% (v/v) Formaldehyd/PBS fixiert und die Expression des Epitops 24 mit Hilfe eines FACS-Meßgerätes (Epics XL, Coulter) analysiert.

#### **3.2.4.8 Immunfluoreszenz-Mikroskopie**

Die Immunfluoreszenz-Mikroskopie ermöglicht die Analyse der Proteinexpression und die genaue Lokalisierung von Proteinen in einzelnen, intakten Zellen. Analog zur Durchflußzytometrie erfolgt die Protein-Markierung mit spezifischen Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpern.

In dieser Arbeit wurde die Immunfluoreszenz-Mikroskopie eingesetzt, um die Kolokalisation endogener transmembraner Integrine mit Cytohesin-1 in lymphoblastoiden LCL-721-Zellen zu analysieren.

Pro Färbeansatz wurden ca.  $1 \times 10^6$  LCL-721-Zellen für 5 min bei 900x g pelletiert und in 200 µl HBSS (Hank`s buffered salt solution) resuspendiert. Zur Markierung der Integrine wurden die entsprechenden spezifischen Antikörper nach folgenden Angaben verdünnt eingesetzt und die Zellen 10 – 15 min bei RT inkubiert.



Antikörper-Bezeichnung	Antigen	Verdünnung
KIM185 (aus Maus)	humanes CD18	1 µg/ml
4B7R (aus Maus)	humanes CD29	10 µg/ml

Nach Waschen mit 5 ml HBSS wurden die Zellen mit einem sekundären Texas-Red-konjugierten Ziege-anti-Maus-F(ab')<sub>2</sub> Fragment-Antikörper, in einer Verdünnung von 1:100, 10 min bei 37°C inkubiert, wodurch eine Quervernetzung des jeweiligen Integrins erfolgte. Die Zellen wurden erneut mit 5 ml HBSS gewaschen, in 200 µl HBSS resuspendiert und auf einen, mit Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger (Sigma) aufgetragen. Diese Poly-L-Lysin-Unterlage war zuvor, mittels eines Fettstiftes, in einzelne Felder unterteilt worden, was eine Auftragung mehrerer, unterschiedlicher Färbeansätze ermöglichte. Zur Adhäsion wurden die Zellen 30 min bei 37°C inkubiert. Nichtadhärente Zellen wurden vorsichtig mit HBSS abgespült. Zur Fixierung der adhärenen Zellen wurde der Objektträger in 2% (v/v) Formaldehyd/PBS für ca. 15 min bei RT inkubiert. Nach Absättigung des verbliebenen Formaldehyds mit 2% (w/v) Glycin/PBS für 10 min wurden die Zellen mit PBS gewaschen und intrazelluläres Cytohesin-1 markiert. Um den Antikörper-Eintritt zu ermöglichen, wurden die Zellen mit 0,2% (v/v) Triton-X-100/PBS für 15 min bei RT permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Hybridoma-Überstand des monoklonalen Antikörpers 7D2 2x 30 min bei RT inkubiert. Zusätzlich wurden Zellen mit dem 7D2-isotypenspezifischen Kontroll-Antikörper CAD9, der ebenfalls als Hybridoma-Überstand zur Verfügung stand, in ähnlicher Weise gefärbt.

Nach zweimaligem Waschen mit 0,2% (v/v) Triton-X-100/PBS wurden die Zellen mit einem sekundären FITC-konjugierten Ziege-anti-Ratte-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment-Antikörper, in einer Verdünnung von 1:100 in 0,2% (v/v) Triton-X-100/PBS 1 h bei RT und abgedunkelt inkubiert. Der sekundäre Antikörper zeigte nur minimale Kreuzreaktivität mit Proteinen aus Maus-Serum.

Überschüssiger Antikörper wurde durch 3x Waschen mit PBS entfernt und die Zellen anschließend mit „Mounting“-Medium (Vector Laboratories) überschichtet, um ein zu schnelles Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu verhindern. Die Zellen wurden mit einem Deckglas (Marienfeld) abgedeckt und die Ränder der beiden Glasplatten mit Nagellack abgedichtet. Die Zellen wurden unmittelbar nach der Färbeprozedur mit einem konfokalen Lasermikroskop (Leica TCS/NT) analysiert und die aufgenommenen Bilder anschließend mit dem Programm Photoshop (Adobe) verarbeitet.

### 3.2.4.9 *Proteinaufreinigung rekombinanter Proteine mit HIS-Fusionsanteil aus E. coli*

Die Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine mit HIS-Fusionsanteil aus *E. coli* ermöglicht eine hohe Proteinausbeute bei hoher Reinheit, da die Aufreinigung durch Immobilisierung des HIS-Fusionsanteils an Ni-Agarose erfolgt.

#### **Proteinexpression**

Zur Expression eines HIS-Fusionsproteins wurde der Vektor pT7Hxpflu verwendet. In diesem Expressionssystem werden Gene unter der Kontrolle des Bakteriophagen T7-Promotors exprimiert, ähnlich dem von Studier und Moffat (1986) und Tabor und Richardson (1985) entwickelten pET-Expressionssystem. Zusätzlich besitzt der Vektor einen lac-Operator und die Sequenz für den lac-Repressor. Unter Verwendung des *E. coli*-Stammes BL21(DE3), der das Gen für die Bakteriophage T7-Polymerase trägt, kann die Expression des gewünschten Proteins mittels IPTG induziert werden, da IPTG den lac-Repressor bindet und außerdem die T7-Polymerase ausschließlich den T7-Promotor erkennt.

Der Expressionsvektor, in den die cDNA für das aufzureinigende Protein kloniert war, wurde in CaCl<sub>2</sub>-kompetente *E. coli* BL21LysS transformiert (3.1.10; 3.2.2.2). Der Transformationsansatz wurde auf LB-Agarplatten (enthielten 50 µg/ml Ampicillin) ausplattiert und ÜN bei 37°C inkubiert. Eine Bakterienkolonie wurde in 5 ml LB-Medium (enthielt 50 µg/ml Ampicillin) in einer ÜN-Kultur angezogen und am nächsten Morgen in 1 l LB-Medium (enthielt 50 µg/ml Ampicillin) verdünnt und bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0,8 bei 37°C und 280 Upm in einem Bakterienrührer inkubiert. In dieser Phase des logarithmischen Wachstums erfolgte die Induktion mit IPTG in einer Endkonzentration von 2 mM. Die Bakterienkultur wurde anschließend noch 4 h bei RT und 200 Upm geschüttelt. Unmittelbar vor der Induktion mit IPTG und nach Beendigung der Proteinexpression wurde jeweils 1 ml der Bakterien suspension für eine qualitative Analyse der Proteinexpression mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung entnommen. Die Zellen wurden hierzu pelletiert und in je 60 µl 1x SDS-Probenpuffer resuspendiert.

#### **Präparation des exprimierten Fusionsproteins**

Die Bakterien suspension wurde in 1l-Zentrifugenbecher überführt und 20 min bei 5000x g zentrifugiert.

Alle weiteren Schritte zur Aufreinigung des HIS-Fusionsproteins wurden auf Eis oder im Kühlraum bei 4°C durchgeführt.

Das Zellpellet wurde in 10 ml Sonifikationspuffer resuspendiert und ÜN bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Nach dem Auftauen der Zellsuspension wurde der Puffer mit Lysozym und den Proteaseinhibitoren Aprotinin und Leupeptin komplettiert und die Bakterien zur vollständigen Lyse mit Ultraschall sonifiziert. Die Beschallung erfolgte dabei mit einem Ultraschallstab (Sonifier GM300), auf Eiswasser, zunächst 1 min bei einer konstanten mittleren Intensität und anschließend 4 min bei mittlerer Intensität und Pulsbetrieb. Nach dem Abkühlen der Suspension erfolgte eine weitere Sonifikation für 2 - 3 min ebenfalls bei mittlerer Intensität und Pulsbetrieb. Noch unlösliche Bakterienbestandteile wurden in einem SS34-Rotor bei  $30000\times g$  für 30 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  abzentrifugiert, der Überstand aufbewahrt, das erhaltene Pellet in 10 ml Sonifikationspuffer resuspendiert und nochmals wie oben sonifiziert. Unlösliche Bestandteile wurden analog oben abzentrifugiert und die erhaltenen Überstände in einem 50ml-Plastikröhrchen vereinigt.

Das klare Gesamtsonifikat wurde mit 1 ml Ni-NTA-Agarose, die zuvor in Sonifikationspuffer äquilibriert worden war, versetzt und 1 h bei  $4^{\circ}\text{C}$  auf einem Drehrad inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Matrix 4x mit 50 ml Waschpuffer von unspezifisch gebundenem Material befreit. Die Elution des gebundenen Fusionsproteins erfolgte in einem 15ml-Plastikröhrchen in zwei Schritten, mit je 5 ml Elutionspuffer, bei  $4^{\circ}\text{C}$  und einer fünfminütigen Inkubation am Drehrad.

Von den verschiedenen Aufreinigungsstufen wurden jeweils  $40\mu\text{l}$ -Aliquots entnommen, mit je  $20\mu\text{l}$  3x SDS-Probenpuffer versetzt und die Qualität der Protein-Überexpression bzw. -Aufreinigung anhand eines 10% SDS-Polyacrylamidgels mit anschließender Coomassie-Färbung analysiert.

Die Proteinkonzentration der einzelnen Fraktionen wurde ebenfalls mit Hilfe eines SDS-Polyacrylamidgels und einem bekannten Proteinstandard (in der Regel BSA) abgeschätzt, da das im Elutionspuffer enthaltene Imidazol bei einer Proteinbestimmung nach Bradford (3.2.4.3) störend wirkt. In der Regel konnte mit dieser Aufreinigungsmethode eine Proteinkonzentration von ca. 1 mg/ml erreicht werden.

Sonifikationspuffer:	50 mM Tris/HCl pH 8,0 0,3 M NaCl  100 µg/ml Lysozymbilösung (Stocklösung: 100 µg/µl (w/v)) 6 µg/ml Aprotinin 6 µg/ml Leupeptin
Waschpuffer:	50 mM Tris/HCl pH 6,0 0,3 M NaCl 10 % (v/v) Glycerin 10 mM Imidazol
Elutionspuffer:	50 mM Tris/HCl pH 6,0 0,3 M NaCl 10% (v/v) Glycerin 200 mM Imidazol

#### **3.2.4.10 Gesamtzellysat aus adhärennten COS7-Zellen**

Zur Lyse adhärennter COS7-Zellen wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 1x PBS gewaschen und mit 10 ml 1x PBS versetzt. Mit Hilfe eines Plastikzellschabers wurden die Zellen vom Plattenboden abgelöst und in ein 15ml-Plastikröhrchen überführt. Zur Pelletierung wurden die Zellen 5 min bei 900x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet, je nach Verwendung, entweder in 500 µl Triton-X-100- oder Brij58-Lysispuffer auf Eis resuspendiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis und mehrmaligem Durchmischen der Zellsuspension wurden unlösliche Zelltrümmer bei 20800x g 5 min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand, das Gesamtzellysat, wurde abgenommen und konnte entweder für eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (3.2.4.1) oder für Präzipitationsstudien (3.2.4.12; 3.2.4.13) eingesetzt werden. Wurden Gesamtzellysate über SDS-PAGE analysiert, wurde dem Lysat 1/3 Vol. 3x SDS-Probenpuffer zugesetzt und der Ansatz 5 min bei 95°C in einem Thermomixer aufgeköcht.

Triton-X-100-Lysispuffer:	100 mM Tris/HCl pH 8,0 150 mM NaCl 1% (v/v) Triton-X-100
Brij58-Lysispuffer:	20 mM Tris/HCl pH 8,2 140 mM NaCl 1% (v/v) Brij58 40 µg/ml PMSF 20 µg/ml Aprotinin 20 µg/ml Leupeptin
3x SDS-Probenpuffer (reduzierend):	150 mM Tris/HCl pH 6,8 300 mM DTT 6% (w/v) SDS 30% (v/v) Glycerin 0,3% (w/v) Bromphenolblau

Der Puffer wurde in Aliquots bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### **3.2.4.11 Gesamtzellysat aus Suspensionszellen**

Die Suspensionszellen wurden zur Lyse in Zentrifugenbecher überführt und 5 min bei 900x g und RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 5 ml 1x PBS gewaschen und anschließend, je nach Verwendungszweck, in 500 µl Triton-X-100- bzw. Brij58-Lysispuffer resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Das weitere Verfahren entsprach den Arbeitsschritten zur Herstellung eines Gesamtzellysates aus COS7-Zellen (3.2.4.10).

#### **3.2.4.12 Direktpräzipitationen von Immunglobulin-Fusionsproteinen**

Direktpräzipitationen von Immunglobulin(Ig)-Fusionsproteinen wurden zur Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen (3.2.4.13) oder zur Protein-Expressionskontrolle durchgeführt. Der Vorteil der Ig-Fusionsanteile liegt darin, daß sie praktisch quantitativ an Protein-A präzipitiert und gut über Western-Blot (3.2.4.4; 3.2.4.5) oder immunochemische Methoden

(3.2.4.7) detektiert werden können.

Zur Direktpräzipitation von Ig-Fusionsproteinen wurden Gesamtzellysate (3.2.4.10; 3.2.4.11) eingesetzt. In der Regel wurden 500 µl Gesamtzellysat mit 30 µl Matrix-gekoppeltem Protein-A (Pharmacia) versetzt und 1 ½ h bei 4°C unter ständiger Rotation des Gefäßes inkubiert. Die Bindekapazität des Matrix-gekoppelten Protein-A betrug laut Herstellerangaben 10 µg humanes Immunglobulin pro µl Matrix/Protein-A-Suspension, so daß Protein-A im Überschuß vorlag und eine quantitative Präzipitation der Fusionsproteine gewährleistet war.

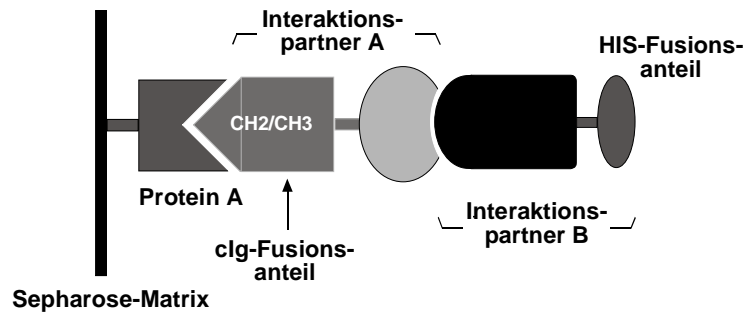
Nach beendeter Präzipitation wurde die Matrix 1 min bei 900x g und 4°C abzentrifugiert und 3 – 4 mal mit 500 µl entsprechendem Lysispuffer gewaschen. Wurden die präzipitierten Fusionsproteine anschließend über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (3.2.4.1) analysiert, so wurde die Matrix mit 30 µl 1x SDS-Probenpuffer versetzt und der Ansatz 5 min bei 95°C aufgeköcht.

### **3.2.4.13 *In vitro*-Präzipitationsstudien**

Mit *in vitro*-Präzipitationsstudien wurden in dieser Arbeit Interaktionen zwischen Fusionsproteinen analysiert. Ein Interaktionspartner wurde dabei als Immunglobulin-Fusionsprotein in COS7-Zellen überexprimiert (3.2.3.1), der zweite potentielle Interaktionspartner als HIS-Fusionsprotein, aufgereinigt aus *E. coli* (3.2.4.9), eingesetzt. Zwei verschiedene Methoden kamen dabei zur Anwendung:

#### **A) Präzipitationsstudien mit cIg-Fusionsproteinen (Abb. A):**

Das überexprimierte cIg-Fusionsprotein (Interaktionspartner A) wurde aus einem Triton-X-100-Gesamtzellysat an einer Protein-A-Sepharose-6MB-Matrix immobilisiert (3.2.4.12). Der Matrix/Protein-Komplex wurde in 500 µl Tween20-Puffer äquilibriert und in 500 µl dieses Puffers aufgenommen. Die Suspension wurde mit 10 µg des zu testenden Interaktionspartners B (eingesetzt als HIS-Fusionsprotein) 1 h bei RT, bei ständiger Rotation, inkubiert und die Protein-A-Matrix anschließend 4x mit 1 ml Tween20-Puffer gewaschen. Präzipitierte Proteine wurden mit 30 µl 1x SDS-Probenpuffer von der Matrix gelöst, bei 95°C 5 min im Thermomixer aufgeköcht und über SDS-PAGE (3.2.4.1) und Western-Blot (3.2.4.4; 3.2.4.5) analysiert.

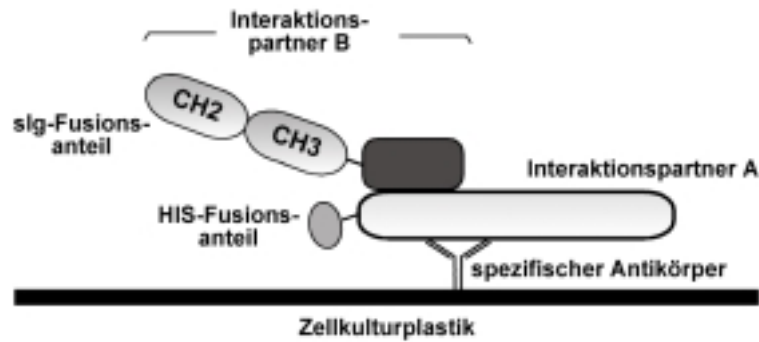


**Abb. A:** Schematische Darstellung des *in vitro*-Präzipitationsansatzes mit cIg-Fusionsproteinen.

### **B) Präzipitationsstudien mit sIg-Fusionsproteinen (Abb. B):**

Das aus *E. coli* aufgereinigte HIS-Fusionsprotein (Interaktionspartner A) wurde auf Zellkulturplastik immobilisiert und das sIg-Fusionsprotein (Interaktionspartner B) zur Interaktion aus einem Gesamtzellysat angeboten.

Eine 96-Well-Mikrotiterplatte (Falcon, Nr. 3911) wurde mit einem spezifischen, gegen das aufgereinigte Protein gerichteten Antikörper in einer geeigneten Verdünnung, in 50 mM Tris/HCl (pH 9,5), 1 h bei RT inkubiert. Pro Well wurden dabei 50 µl Antikörperlösung eingesetzt. Die Platte wurde 2x mit 50 mM Tris/HCl (pH 9,5) gewaschen und noch freie Stellen mit 1% (w/v) BSA/PBS 1 h bei RT abgesättigt. Das HIS-Fusionsprotein wurde in einer Konzentration von 10 ng/µl in Brij58-Lysispuffer (3.2.4.10) verdünnt und die Mikrotiterplatte, die zuvor 1x mit Brij58-Lysispuffer gewaschen wurde, mit jeweils 50 µl dieser Proteinlösung pro Well 3 h auf Eis inkubiert. Die Plastikmatrix wurde 2x mit Lysispuffer gewaschen und mit jeweils 100µl/Well eines vorbereiteten COS7-Gesamtzellysates, das die überexprimierten Immunglobulin-Fusionsproteine enthielt, 2 – 3 h ebenfalls auf Eis inkubiert. Nachdem ungebundene Proteine durch mehrmaliges Waschen mit Lysispuffer entfernt worden waren, wurden präzipitierte Proteine mit je 6 µl 1x SDS-Probenpuffer/Well von der Matrix abgelöst. Jeweils der Inhalt von vier Wells des gleichen Präzipitationsansatzes wurden vereinigt und über SDS-PAGE (3.2.4.1) und Western-Blot (3.2.4.4; 3.2.4.5) analysiert.



**Abb. B:** Schematische Darstellung des *in vitro*-Präzipitationsansatzes mit sIg-Fusionsproteinen.

Tween20-Puffer:     100 mM Tris/HCl (pH 7,5)  
                           1 mM MgCl<sub>2</sub>  
                           0,1 mM CaCl<sub>2</sub>  
                           50 mM NaCl  
                           0,2% (v/v) Tween20  
                           40 µg/ml PMSF  
                           20 µg/ml Aprotinin  
                           20 µg/ml Leupeptin

#### 3.2.4.14 Koimmunpräzipitation von Proteinen

Koimmunpräzipitationsanalysen wurden in dieser Arbeit durchgeführt, um die direkte Interaktion von Cytohesin-1 und CD18 zu dokumentieren. Das Präzipitationsprotokoll orientierte sich dabei an der von S. Godar entwickelten Methode (Kolanus *et al.*, 1996).

#### **Immobilisierung des präzipitierenden Antikörpers auf Zellkulturplastik**

Eine 96-Well-Mikrotiterplatte (Falcon, Nr. 3911) wurde mit 50 µg/ml eines Ziege-anti-Kaninchen-Antikörpers 1,5 h bei RT inkubiert (50 µl/Well). Die Verdünnung des Antikörpers erfolgte dabei in 50 mM Tris/HCl (pH 9,5). Die Mikrotiterplatte wurde 3x mit 50 mM Tris/HCl (pH 9,5) gewaschen und anschließend mit einem polyklonalen Kaninchen-anti-Cytohesin-1-Antikörper, in einer Verdünnung von 40 µg/ml in 50 mM Tris/HCl (pH 9,5), 2 – 3 h auf Eis inkubiert. Die Platte wurde wiederum 3x mit 50 mM Tris/HCl (pH 9,5; eiskalt) gewaschen und unspezifische Bereiche mit 1% (w/v) BSA/PBS 1 h auf Eis blockiert. Nach-



dem die Platte 1x mit dem zur Zellyse verwendeten Puffer gewaschen worden war, wurde sie unverzüglich zur Koimmunpräzipitation von Proteinen eingesetzt.

### **Koimmunpräzipitation**

Zellen, die Cytohesin-1 und CD18 exprimierten, wurden in Brij58-Lysispuffer (3.2.4.10), in einer Konzentration von  $2 \times 10^7$  Zellen/ml, lysiert. Die Mikrotiterplatte, auf der der präzipitierende Antikörper immobilisiert worden war, wurde mit dem erhaltenen Gesamtzellysat inkubiert (3 h auf Eis, jeweils 50  $\mu$ l Zellysat pro Well). Die Platte wurde 3x mit Lysispuffer gewaschen und die präzipitierten Proteine durch je 6  $\mu$ l 1x SDS-Probenpuffer/Well von der Matrix gelöst. Jeweils der Inhalt von vier Wells eines identischen Präzipitationsansatzes wurde vereinigt, die Proben 5 min bei 95°C inkubiert und die Proteine mittels SDS-PAGE (3.2.4.1) und Western-Blot (3.2.4.4; 3.2.4.5) analysiert.

## **3.2.5 Interaktionsanalysen in Hefe**

### **3.2.5.1 Allgemeines Prinzip**

Um neue Interaktionspartner einzelner Proteine aufzuspüren (Interaktionsklonierung) oder die Komplexformierung bereits bekannter Proteine genauer zu analysieren (Interaktionsanalyse), wird oftmals die als „Two-Hybrid-System“ (Fields *et al.*, 1989; Fields *et al.*, 1994) oder auch als „Interaction Trap“ (Gyuris *et al.*, 1993) bezeichnete Methode verwendet. Die Interaktionsstudien werden im Hefesystem durchgeführt, wobei die Interaktion zweier Proteine die transkriptionelle Aktivierung von Reportergenen vermittelt. Einer der beiden vermeintlichen Interaktionspartner, der gemeinhin auch als „bait“-Protein bezeichnet wird, wird dabei als Fusionsprotein mit einer spezifischen DNA-bindenden Domäne exprimiert. Der zweite potentielle Interaktionspartner, auch als „prey“-Protein bezeichnet, wird mit einem Transaktivierungs-Fusionsanteil exprimiert, der die Transkription von Genen aktivieren kann.

Als DNA-bindender Fusionsanteil kommen im Prinzip zwei Domänen zum Einsatz: Zum Einen das heterologe DNA-Bindungsprotein *lexA* (aus *E. coli*), das keine transkriptionelle Aktivität besitzt und in  $GAL4^+$ -Hefestämmen und zusammen mit einem Gal-induzierbaren Promotor eingesetzt werden kann. Zum anderen die  $GAL4$ -DNA-Bindungsdomäne, die jedoch in  $GAL4^-$ -Hefestämmen verwendet werden muß, die schwieriger zu transformieren sind als  $GAL4^+$ -Stämme, da *gal4* einen wichtigen Transkriptionsaktivator in Hefe darstellt. Jedoch

scheint die GAL4-DNA-Bindungsdomäne effizienter im Zellkern lokalisiert zu werden.

Als transaktivierender Fusionsanteil stehen die entsprechenden Domänen von GAL4 oder Herpes-simplex VP16 zur Verfügung. Diese Domänen gelten als starke bzw. sehr starke transkriptionelle Aktivatoren. Als mittelstarke Transaktivierungsdomäne gilt die aus *E. coli* selektierte B42-Domäne (Ruden *et al.*, 1991). Diesen Transaktivierungsdomänen gemein ist eine Folge mehrerer saurer Aminosäuren, die die transaktivierende Funktion vermitteln.

Als Reportergene dienen in der Regel lacZ oder LEU2.

In allen, in dieser Arbeit durchgeführten Interaktionsanalysen kam ausschließlich das *lexA/B42*-System nach Gyuris *et al.* (1993) zum Einsatz (siehe 3.2.5.2).

Interaktionsanalysen in Hefe setzen unter anderem voraus, daß das verwendete „bait“-Protein auch in den Zellkern transportiert wird. Proteine mit einer transmembranen Domäne beispielsweise eignen sich nicht für Interaktionsstudien in Hefe, da sie nicht in den Zellkern transloziert werden.

Zudem muß sichergestellt sein, daß das „bait“-Protein keine intrinsische Fähigkeit besitzt, die Transkription der Reportergene stark zu aktivieren. Ferner muß man sich bewußt sein, daß im „Two-Hybrid-System“ normalerweise die Interaktion einzelner Proteindomänen untersucht wird, die wiederum als Fusionsproteine exprimiert werden. Auftretende Interaktionen zwischen zwei Proteinen können daher nur ein erster Hinweis sein und müssen in jedem Fall durch zusätzliche Analysen in anderen Systemen bestätigt werden.

### 3.2.5.2 Das „Two-Hybrid-System“ nach Gyuris *et al.*

Das „Two-Hybrid-System“ nach Gyuris *et al.* (1993) verwendet als DNA-Bindungsdomäne das bakterielle *lexA*-Protein, als Transaktivierungsdomäne B42 und sowohl lacZ als auch LEU2 als Reportergene und selektierbare Marker.

#### **Hefe-Stamm und Reportergene**

Für die gesamten Interaktionsstudien wurde ausschließlich ein Derivat des *S. cerevisiae*-Stammes EGY48 (Gyuris *et al.*, 1993) verwendet, der zusätzlich das lacZ-Reporterplasmid JK103 (Finley *et al.*, unveröffentlicht) enthielt. Der Hefestamm EGY48 trägt Mutationen in den Genen *trp1*, *ura3*, *his3* und *leu2*, wodurch er nicht in der Lage ist, die entsprechenden Aminosäuren Tryptophan, Uracil, Histidin und Leucin de novo zu synthetisieren. Das chromosomale LEU2-Gen wurde dabei durch homologe Rekombination derart verändert, daß sei-

ne Transkription durch vier *lexA*-Operatoren kontrolliert wird. Somit kann LEU2 als Reporter gen fungieren, da der Hefe-Stamm nur dann auf Leucin-freiem Medium wachsen kann, wenn durch eine Interaktion der zu testenden Fusionsproteine die Transkription des LEU2-Gens aktiviert wird.

Ein weiteres Reporter gen trägt das *lacZ*-Reporterplasmid JK103. Dieses Plasmid codiert für  $\beta$ -Galaktosidase, ebenfalls unter der Kontrolle eines *lexA*-Operators. Eine Interaktion zweier zu testender Fusionsproteine und die damit verbundene Transkription der  $\beta$ -Galaktosidase kann über eine Farbreaktion sichtbar gemacht werden. Das chromogene Substrat X-Gal wird bei Anwesenheit von  $\beta$ -Galaktosidase und Sauerstoff zu einem blauen Indigofarbstoff umgesetzt.

Das *lacZ*-Reporterplasmid enthält zusätzlich ein URA3-Gen. Ein JK103-tragender EGY48-Stamm kann also auf Uracil-defizientem Medium selektiert werden. Weiterhin codiert das Plasmid für ein Ampicillin-Resistenzgen und trägt Replikationsursprünge für *E. coli* und *S. cerevisiae*.

### **Expressionsplasmide**

Für die Expression des „bait“-Proteins wurde der Vektor pEG202 (Gyuris *et al.*, 1993) verwendet. pEG202 ist ein Derivat von Lex202 + PL (Ruden *et al.*, 1991). Der Vektor enthält die Sequenz für die DNA-bindende Domäne des *lexA*-Proteins (Aminosäuren 1 - 202). Am C-terminalen Ende der *lex202*-Sequenz schließt sich eine multiple Klonierungsstelle an, in die die codierende Sequenz eines der potentiellen Interaktionspartner inseriert werden kann. Da als Promotor der starke ADH-Promotor aus *S. cerevisiae* verwendet wird, erhält man eine konstitutive Expression des DNA-bindenden Fusionsproteins. Dieses wird trotz fehlender Kernlokalisationssequenz in ausreichendem Maße in den Zellkern transportiert. Als Transkriptions-Terminator fungiert ebenfalls die Sequenz aus dem *S. cerevisiae* ADH-Gen.

Das pEG202-LexA-Fusionsplasmid codiert zudem für ein HIS3-Gen. Dadurch kann ein pEG202-tragender EGY48-Stamm auf Histidin-negativem Medium selektiert werden.

Für die Expression des „prey“-Proteins wurde der Vektor pJG4-5 (Gyuris *et al.*, 1993) eingesetzt. Unter der Kontrolle des GAL1-induzierbaren Promotors wird die transaktivierende Domäne B42 mit einer nukleären Lokalisationssequenz aus SV40 am N-terminalen Bereich und einem Hämagglutinin(HA)-Epitop am C-terminalen Ende fusioniert exprimiert. Über die Restriktionsschnittstellen EcoRI und XhoI am C-Terminus des HA-Epitops kann der potentielle

Interaktionspartner inseriert werden. Als Transkriptions-Terminator fungiert wiederum der ADH-Terminator. Als Selektionsmarker enthält das Plasmid das TRP1-Gen.

### 3.2.5.3 *Kultivierung des Hefe-Stammes EGY48/JK103*

Ausgehend von einer Glycerinkultur wurde, unter sterilen Bedingungen, ein Teil der noch gefrorenen Zellsuspension abgenommen und sofort in 20 ml U-Minimalmedium überführt. (Es ist darauf zu achten, daß die verbleibende Glycerinkultur nicht auftaut.) Die Zellen wurden anschließend in einem Hefeschüttler bei 30°C und 280 Upm inkubiert. Waren die Zellen bis zu einer  $OD_{600} = 1,0$  herangewachsen, wurden sie in frischem U-Minimalmedium verdünnt, so daß die Suspension wieder eine  $OD_{600}$  von 0,1 aufwies. Frisch aufgetaute Hefezellen wurden auf diese Weise einige Tage kultiviert, bevor sie für Interaktionsanalysen eingesetzt wurden.

U-Minimalmedium:

- 1,3 g Dropout-Mix (Aminosäuremischung, der mehrere Aminosäuren, auf die später selektiert werden soll, fehlen)
- 1,7 g Bacto-Hefe-Stickstoff-Base
- 5 g  $(NH_4)_2SO_4$ 
  - ad 900 ml mit  $H_2O$  (bidest.)
  - Sterilisation durch Autoklavieren (20 min, 1 bar, in einem Tischautoklaven)
- 100 ml 20% (w/v) Glukose
  - separat autoklaviert
- 8,3 ml 120x (w/v) Histidin-Stocklösung
- 8,3 ml 120x (w/v) Tryptophan-Stocklösung
- 16,6 ml 120x (w/v) Leucin-Stocklösung

Dropout-Mix:

Aminosäure	Menge in 67 g Dropout-Mix [g]	Endkonzentration im Medium [µg/ml]
Adenin	2,5	40
L-Arginin	1,2	20
L-Aspartat	6,0	100
L-Glutamat	6,0	100
L-Lysin	1,8	30
L-Methionin	1,2	20
L-Phenylalanin	3,0	50
L-Serin	22,5	375
L-Threonin	12,0	200
L-Tyrosin	1,8	30
L-Valin	9,0	150

Stammlösungen der Selektions-Aminosäuren:

Aminosäure	Konzentration der 120x Stammlösung [mg/100 ml]	Endkonzentration im Medium [µg/ml]
L-Histidin	240	20
L-Tryptophan	480	40
L-Leucin	720	120

Die Stammlösungen wurden durch Filtration (0,22 µm Porendurchmesser) sterilisiert.

### 3.2.5.4 *S. cerevisiae*-Glycerinkultur

Zur längerfristigen Lagerung von Hefestämmen wurden Glycerinkulturen angelegt. Hierzu wurden 10 ml einer Flüssigkultur, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase ( $OD_{600} = 0,5 - 0,8$ ) befand, abzentrifugiert und das Zellpellet in 1,5 ml 50% (v/v) Glycerin/TE resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.5.5 Transformation von EGY48/JK103

Die Transformation des *S. cerevisiae*-Stammes EGY48/JK103 für Interaktionsanalysen, erfolgte nach einer Methode von Ito *et al.* (1983) und Schiestl und Gietz (1989). Die Kompetenz

der Hefezellen zur Aufnahme von DNA wird dabei durch eine Behandlung mit Alkali-Ionen, PEG und hochmolekularer ssDNA induziert.

Für Interaktionsanalysen wurden stets beide Plasmide (zur Expression des „bait“- und „prey“-Proteins) kotransformiert.

Eine Glycerinkultur des zu transformierenden Stammes wurde in 20 ml flüssigem U<sup>-</sup> Minimalmedium 2 – 3 Tage kultiviert (3.2.5.3). Am Morgen der Transformation wurde die Hefekultur derart in U<sup>-</sup> Minimalmedium verdünnt, daß die Zellsuspension eine OD<sub>600</sub> von 0,1 aufwies. Anschließend inkubierte man die Kultur nochmals 5 – 6 h bei 30°C und 280 Upm in einem Hefe-Schüttler, bis eine OD<sub>600</sub> von etwa 0,5 erreicht war. Die Hefezellen wurden 5 min bei 900x g in einem Plastikröhrchen pelletiert und zweimal mit bidest. Wasser gewaschen. Das erhaltene Zellpellet wurde in 1/200 Vol. der Ausgangskultur 1x TE-Puffer/0,1 M LiOAc resuspendiert und jeweils 100 µl dieser Suspension mit einer Mischung aus je 1 µg Plasmid-DNA („bait“ und „prey“) und 50 µg einer hochmolekularen „Carrier“-DNA versetzt. Nach einer weiteren Zugabe von 350 µl 40% (w/v) PEG 4000/1x TE-Puffer wurde die Suspension vorsichtig durchmischt und 30 min bei 30°C auf einem Thermomixer unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach einem anschließenden zehnmütigen Hitzeschock bei 42°C auf dem Thermomixer wurden die Zellen sofort auf UHW<sup>-</sup> Minimalmedium-Agarplatten ausplattiert und bei 30°C inkubiert. Normalerweise waren Hefekolonien nach ca. 2 - 3 Tagen Inkubation auf der Platte zu erkennen.

1x TE-Puffer/0,1 M LiOAc: Die Lösung wurde bei jeder Transformation frisch aus einer 10x Stocklösung hergestellt.

„Carrier-DNA“: Hochmolekulare ssDNA aus Lachssperma (Sigma D1626) wurde nach einer Methode von Schiestl und Gietz (1989) hergestellt. Hierzu wurde die DNA in einer Konzentration von 10 mg/ml in 1x TE-Puffer über Nacht bei 4°C unter Rühren gelöst. 10ml-Aliquots der Lösung wurden bei mittlerer Intensität für eine Zeitdauer von 0 - 10 Sekunden mit einem Ultraschallstab (Sonifier GM300) sonifiziert, die Lösung anschließend mit 1 Vol. Phenol/Chloroform extrahiert und die DNA mit 1/10 Vol. 3 M NaOAc und 2,5 Vol. abs. EtOH ausgefällt. Die getrocknete

DNA wurde in 1x TE-Puffer in einer Konzentration von ca. 10 mg/ml resuspendiert und zur Denaturierung 20 min in einem Wasserbad aufgeköcht und sofort auf Eis abgeschreckt. DNA-Aliquots wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Die besten „Carrier“-Eigenschaften bietet sonifizierte DNA mit Fragmentlängen um ca. 7 kB. Die Fragmentlängen der einzelnen DNA-Proben wurden mit Hilfe eines 0,8% Agarosegels abgeschätzt, dabei zeigten DNA-Proben, die zwischen 5 und 10 sek sonifiziert worden waren, das beste Ergebnis. Diese Proben wurden als „Carrier“-DNA eingesetzt.

UHW<sup>-</sup>-Minimalmedium für Agarplatten:

- 1,3 g Dropout-Mix
- 1,7 g Bacto-Hefe-Stickstoff-Base
- 5 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 20 g Agar
- 1 Pellet NaOH

ad 900 ml mit  $\text{H}_2\text{O}$  (bidest.)

Sterilisation durch autoklavieren (20 min, 1 bar, in einem Tischaufoklaven)

100 ml 20% (w/v) Glukose

separat autoklaviert

16,6 ml 120x (w/v) Leucin-Stocklösung

### 3.2.5.6 *Interaktionsanalyse zweier Proteine in S. cerevisiae*

Die Interaktion zweier Proteine wurde über das lacZ-Reportergen (3.2.5.2) unter Induktion durch Galaktose getestet. Dazu wurden die erhaltenen Hefe-Transformanten von der Agarplatte abgeschabt und auf einer X-Gal/Galaktose-UHW<sup>-</sup>-Minimalagarplatte ausgestrichen. Je nach Stärke der Interaktion trat nach 1 - 3 Tagen eine Blaufärbung der Hefekolonien auf.

X-Gal/Galaktose-UHW <sup>-</sup> -Minimalagarplatte:	0,8 g Dropout-Mix
	1,7 g Bacto-Hefe-Stickstoff-Base
	5 g (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
	20 g Agar
	1 Pellet NaOH
	ad 800 ml mit H <sub>2</sub> O (bidest.)
	Sterilisation durch Autoklavieren
	(20 min, 1 bar, in einem Tischau-
	toklaven)
	100 ml 20% (w/v) Galaktose
	separat autoklaviert
	100 ml 0,7 M Kalium-Phosphat-Puffer
	pH 7,0
	Sterilfiltriert
	2 ml 20 mg/ml (w/v) X-Gal in 100%
	N,N-Dimethylformamid

### 3.2.5.7 Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in Hefe-Flüssigkulturen

Die Ermittlung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in Flüssigkultur wurde angewendet, um die Intensität von Protein-Protein-Interaktionen in Hefe quantitativ bestimmen zu können. Die Interaktion zweier zu testender Fusionsproteine in Hefe führt zur Transkription des lacZ-Reportergens und damit zur Produktion von  $\beta$ -Galaktosidase, bei gleichzeitiger Anwesenheit von Galaktose. Werden die  $\beta$ -Galaktosidase-produzierenden Hefezellen permeabilisiert oder aufgebrochen und das chromogene Substrat o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktosid (ONPG) im Überschuss zugegeben, so spaltet  $\beta$ -Galaktosidase ONPG in Galaktose und o-Nitrophenol. O-Nitrophenol ist eine gelbe Substanz mit einem Absorptionsmaximum bei 420 nm, was eine photometrische Bestimmung der Verbindung erlaubt. Da ONPG im Überschuss zugegeben wird, ist die Menge an o-Nitrophenol proportional zur Menge des anwesenden Enzyms  $\beta$ -Galaktosidase.



Zur Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurden Hefen mit den zu testenden Fusionskonstrukten transformiert und jeweils Einzelkolonien der erhaltenen Hefe-Transformanten 1 – 2 Tage im entsprechenden Selektions-Flüssigmedium (enthielt Glukose) kultiviert. Die Hefe-Kulturen wurden anschließend in Galaktose-haltiges Selektions-Flüssigmedium verdünnt und die Zellen bei 30°C kultiviert, bis sie eine  $OD_{600}$  von 0,5 bis 1,0 (Zellen befinden sich in der mittleren bis späten logarithmischen Phase) erreicht hatten.

Die Zellen wurden 5 min bei 2500 Upm (Eppendorf-Tischzentrifuge 5417R) pelletiert, in einem Ausgangsvolumen Z-Puffer resuspendiert und auf Eis aufbewahrt. Für jeden Ansatz wurde die  $OD_{600}$  neu bestimmt. Für genaue spätere Messungen sollte sie nicht über 0,7 liegen. In solchen Fällen wurde der Ansatz mit einem geeigneten Volumen Z-Puffer verdünnt.

Pro Ansatz wurde die  $\beta$ -Galaktosidase-Menge für zwei verschiedene Zell-Konzentrationen bestimmt, wobei das Ausgangsvolumen jeweils 1 ml betrug. Für eine Messung wurde die Zellsuspension unverdünnt, für eine zweite Messung 1:10 in Z-Puffer verdünnt eingesetzt.

Zur Permeabilisierung der Zellen wurden die Ansätze mit je 1 Tropfen 0,1% SDS und 2 Tropfen  $CHCl_3$  versetzt, 15 sek gut durchmischt und 15 min in einem 30°C Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden 0,2 ml einer 4 mg/ml (w/v) ONPG-Lösung zugegeben, kurz durchmischt und wiederum in einem 30°C Wasserbad inkubiert. Ab der erneuten Inkubation bei 30°C wurde mit der Zeitnahme begonnen. Die Zeit wurde gestoppt, wenn eine mittlere Gelbfärbung der Probe auftrat und die Reaktion daraufhin mit 0,5 ml 1 M  $Na_2CO_3$  gestoppt worden war.

Zelltrümmer wurden 5 min bei 2500 Upm (Eppendorf-Tischzentrifuge 5417R) abzentrifugiert und die  $OD_{420}$  bzw.  $OD_{550}$  des Überstandes gemessen. Eine Absorption bei  $OD_{550}$  deutete auf noch vorhandene Zelltrümmer hin.

Die Berechnung der Einheiten (U) an  $\beta$ -Galaktosidase erfolgte nach folgender Formel:

$$U = \frac{1000 \times [(OD_{420}) - (1,75 \times OD_{550})]}{(t) \times (v) \times (OD_{600})}$$

t = Reaktionszeit (min)

v = Volumen der eingesetzten Hefekultur (ml)

$OD_{600}$  = Zelldichte zu Beginn der Reaktion

$OD_{420}$  = Absorption durch o-Nitrophenol und Lichtstreuung durch noch vorhandene Zell-

trümmer

OD<sub>550</sub> = Lichtstreuung durch Zelltrümmer

Z-Puffer:      16,1 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O  
                  5,5 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O  
                  0,75 g KCl  
                  0,246 g MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O  
                  2,7 ml β-Mercaptoethanol  
                  H<sub>2</sub>O (bidest.) ad 1 l (pH 7,0)

### 3.2.6 Funktionsanalysen

#### 3.2.6.1 *LFA-1-abhängige Zelladhäsion an ICAM-1-Fc*

Die Adhäsion von Zellen an immobilisiertes ICAM-1 wurde zur funktionalen Charakterisierung des Integrins LFA-1 analysiert. Als LFA-1-Ligand diente hierbei ein lösliches Fusionsprotein von ICAM-1, ICAM-1-Fc, das sich aus der extrazellulären Domäne von ICAM-1 zusammensetzte, die über eine Hinge-Domäne N-terminal an die CH2- und CH3-Domäne von humanem IgG1 fusioniert war (Kolanus *et al.*, 1996). Die Adhäsion LFA-1-exprimierender Zellen an ICAM-1-Fc wurde fluorometrisch analysiert.

#### **Immobilisierung von ICAM-1-Fc an Zellkulturplastik**

Eine 96-Well-Mikrotiterplatte (Nunc, Maxisorp) wurde mit einem Ziege-anti-Human-IgG-Antikörper (Fcγ-spezifisch/Dianova) in einer 1:100 Verdünnung in 50 mM Tris/HCl (pH 9,5) 1,5 h bei RT inkubiert. Dabei wurden pro Well 50 µl Antikörperlösung eingesetzt. Nach zweimaligem Waschen der Platte mit 50 mM Tris/HCl (pH 9,5), wurden noch freie Bereiche des Plastiks mit 1% (w/v) BSA/PBS durch eine einstündige Inkubation bei RT abgesättigt. Die BSA-Lösung wurde entfernt und die Platte 1x mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte mit einer ICAM-1-Fc-Lösung 1 h bei RT inkubiert (je 80 µl ICAM-1-Fc/Well). Nicht gebundenes ICAM-1-Fc wurde durch 1x Waschen mit HBSS (37°C) entfernt. Die so präparierte Mikrotiterplatte wurde sofort für Adhäsionsanalysen eingesetzt.

Die Expression des ICAM-1-Fc erfolgte mit Hilfe des Vaccinia-Virus-Expressionssystems in

COS7-Zellen. Das von den infizierten Zellen sezernierte Protein wurde ohne weitere Aufreinigung zur Immobilisierung an Zellkulturplastik eingesetzt. Hochkonzentrierte ICAM-1-Fc-Lösungen wurden in geeigneter Weise in DMEM (ohne Zusätze) verdünnt.

### **Analyse der Zelladhäsion**

Die zu analysierenden Zellen wurden zur Fluoreszenzmarkierung mit dem Farbstoff Bisbenzimid H33342 Fluorochrom-trihydrochlorid (Calbiochem) in einer Endkonzentration von 12 µg/ml in Medium für 30 min bei 37°C gefärbt. Anschließend wurden die Zellen bei 900x g für 5 min sedimentiert und das Pellet in HBSS (37°C) resuspendiert, so daß eine Konzentration von ca. 150 000 Zellen/100 µl Puffer resultierte. Zur Integrinaktivierung wurden die Zellen mit verschiedenen Agenzien inkubiert. Dabei erfolgte eine Stimulierung mit einem entsprechend verdünnten Antikörper in aller Regel 30 min bei 37°C, eine Stimulierung mit PMA (in einer Endkonzentration von 40 ng/ml) 10 min bei 37°C. Die so vorbehandelten Zellen wurden auf die mit ICAM-1-Fc beschichtete Mikrotiterplatte aufgebracht, wobei pro Well ca. 150 000 Zellen eingesetzt wurden. Die Adhäsion erfolgte je nach Zelltyp 30 - 60 min bei 37°C (LCL-721, Jurkat E6, SK-β<sub>2</sub>.7: 30 min; LAD19, HeLa, K562: 60 min). Nicht adhärenente Zellen wurden durch Waschen mit HBSS (37°C) entfernt und der Prozentsatz adhärenente Zellen fluorometrisch mit einem Fluoreszenz-Meßgerät (CytoFluorII) bestimmt. Pro Versuchsansatz wurden in aller Regel vier Vergleichswerte gemessen. Als Referenzwert (100 %) der maximal möglichen Emissionsstrahlung galt dabei jeweils die Fluoreszenzstrahlung der ursprünglich eingesetzten Gesamtzellmenge (je 150 000 Zellen).

### **3.2.6.2 GDP/GTP-Austausch *in vitro***

Guaninnucleotid-bindende Proteine (G-Proteine) können in verschiedenen Aktivierungszuständen auftreten: in einem inaktiven, GDP-bindenden oder einem aktiven, GTP-bindenden Zustand. Der Austausch von gebundenem GDP gegen GTP wird durch sog. Guaninnucleotid-Austauschfaktoren (GEF's) katalysiert. Im Gegenzug katalysieren sog. GTPase-Aktivierungsproteine (GAP's) die Hydrolyse des gebundenen GTP, wodurch das G-Protein wieder in seinen inaktiven Zustand übergeht. Hydrolysebeständige Analoga des GTP, wie beispielsweise GTPγS, halten G-Proteine in einem permanent aktivierten Zustand und können daher eingesetzt werden, um die GEF-Aktivität von Proteinen zu bestimmen.

In dieser Arbeit wurde der GDP/GTP-Austausch an ARF1 *in vitro* bestimmt, um die GEF-

Aktivität von Cytohesin-1 zu analysieren. Das Versuchsprotokoll orientierte sich dabei an einer von Franco *et al.* (1995) beschriebenen und von Knorr *et al.* (2000) modifizierten Methode.

ARF1 wurde mit einem C-terminalen cIg-Fusionsanteil (Knorr *et al.*, 2000) in COS7-Zellen mit Hilfe des Vaccinia-Virus-Expressionssystems exprimiert (3.2.3.5) und anschließend von diesen Zellen ein Triton-X-100-Gesamtzellysat (3.2.4.10) hergestellt. Das cIg-Fusionsprotein wurde an Protein-A-Sepharose immobilisiert (3.2.4.12). Nachdem die Matrix in GDP/GTP-Austausch-Puffer äquilibriert worden war, wurde sie in 50 µl dieses Puffers aufgenommen. Dem Ansatz wurde, aus *E. coli* aufgereinigtes, rekombinantes HIS-Cytohesin-1 sowie PtdIns[3,4,5]P<sub>3</sub>-haltige Liposomen (zur Verfügung gestellt von T. Knorr) in einer Endkonzentration von 0,02 µg/µl zugesetzt. Nach Zugabe von [ $\gamma$ -<sup>35</sup>S]GTP in einer Endkonzentration von 0,02 µCi/µl wurde der Ansatz sofort bei 37°C auf einem Thermomixer bei maximaler Geschwindigkeit geschüttelt. Nach 5 bzw. 20 min wurde der Überstand von der Sepharose-Matrix vollständig abgezogen und die Reaktion durch Zugabe von 1 ml GDP/GTP-Waschpuffer gestoppt. Die Matrix wurde 3x mit GDP/GTP-Waschpuffer gewaschen und anschließend in 1 ml Scintillationsflüssigkeit aufgenommen. Die Menge an gebundener Radioaktivität wurde mit Hilfe eines Scintillationszählers ermittelt.

GDP/GTP-Austauschpuffer:        50 mM Hepes (pH 7,5)  
    1 mM MgCl<sub>2</sub>  
    1 mM DTT

GDP/GTP-Waschpuffer:        20 mM Hepes (pH 7,5)  
    100 mM NaCl  
    10 mM MgCl<sub>2</sub>

### 3.2.7 Computerarbeiten

Die vorliegende Arbeit wurde auf einem PC-Rechner mit dem Textverarbeitungsprogramm WinWord97 (Microsoft) durchgeführt. Abbildungen wurden mit dem Grafikprogramm Freehand 8.0 (Macromedia) bzw. Photoshop (Adobe) angefertigt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Die Interaktion von Cytohesin-1 und CD18

Kolanus *et al.* (1996) identifizierten Cytohesin-1 mit Hilfe des „Yeast-Two-Hybrid“-Systems als Interaktor der cytoplasmatischen Domäne von CD18, der  $\beta$ -Untereinheit des Integrins LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen 1). Mittels Protein-Protein-Interaktionsanalysen, ebenfalls durchgeführt in *S. cerevisiae*, konnten sie zudem nachweisen, daß die SEC7-Domäne von Cytohesin-1 als Vermittler der Bindung fungierte.

Es wurde vermutet, daß diese Bindung spezifisch war, da Cytohesin-1 im Hefesystem keine Interaktion mit den cytoplasmatischen Domänen anderer transmembraner Rezeptoren wie CD29 ( $\beta_1$ ), CD2, CD4 oder CD8 sowie mit den Proteintyrosinkinasen Syk, Lck, Fyn und ZAP-70, die eine Rolle bei der Lymphocytenaktivierung spielen, zeigte. Angeschlossene biochemische Analysen bestätigten die Interaktion von Cytohesin-1 und CD18 und zeigten zudem, daß Cytohesin-1 keine Bindungsaffinität für CD29 aufwies.

#### 4.1.1 Koimmunpräzipitation von CD18 und Cytohesin-1

S. Godar, am Institut für Immunologie in Wien, konnte die Assoziation von Cytohesin-1 und CD18 mittels Koimmunpräzipitation zeigen (Kolanus *et al.*, 1996). Der Bindungsnachweis mit Hilfe dieser Methode gelang allerdings nur schwer, was darauf hindeutete, daß die Interaktion der beiden Proteine nur schwach war.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst die Koimmunpräzipitation von Cytohesin-1 und CD18 im Labor stabil etabliert werden, um die direkte und spezifische Interaktion der beiden Partner zu verifizieren und um im weiteren Verlauf der Arbeit das Bindungsverhalten von CD18-Mutanten analysieren zu können.

Das Originalprotokoll beschrieb die Verwendung eines Lysispuffers, der mit Brij58 supplementiert war (3.2.4.14). Brij58, ein nicht-ionisches, mildes Detergens, wird eingesetzt, um eine vollständige Solubilisierung von Membrankomplexen während der Zellyse zu verhindern und um schwache Protein-Protein-Wechselwirkungen zu erhalten.

Die Präzipitation von Cytohesin-1 erfolgte aus dem Gesamtzellysat mit einem anti-Cytohesin-1-Antikörper, der an einer 96-Well-Mikrotiterplatte immobilisiert vorlag, der Nachweis des kopräzipitierten CD18 anschließend mittels Western-Blot-Analyse.

Die Koimmunpräzipitation von Cytohesin-1 und CD18 konnte jedoch unter Anwendung des Originalprotokolls nicht reproduziert werden. Auch die Entwicklung alternativer Protokolle, die die Verwendung unterschiedlicher Detergentien, verschiedener Zelllinien sowie den Versuch überexprimierte Proteine zu kopräzipitieren einschloß, führten im Laufe dieser Arbeit nicht zum Erfolg.

Diese Ergebnisse bestätigten die Annahme, daß Cytohesin-1 und CD18 vermutlich nur schwach miteinander wechselwirken, wodurch eine Koimmunpräzipitation erschwert wird.

#### **4.1.2 Kolokalisation von endogenem CD18 und Cytohesin-1 in LCL-721-Zellen**

Da die Interaktion von CD18 und Cytohesin-1 im Rahmen dieser Arbeit nicht über Koimmunpräzipitation nachgewiesen werden konnte, sollte die mögliche Assoziation der Proteine durch Kolokalisationsstudien mittels Immunfluoreszenz in intakten Zellen charakterisiert werden.

Für diese Analysen wurde die humane lymphoblastoide B-Zelllinie LCL-721 verwendet. LCL-721 exprimiert sowohl LFA-1 als auch Cytohesin-1 in ausreichenden Mengen, die eine immunologische Detektion der Proteine ermöglichen.

Als transmembraner Rezeptor wird LFA-1 auf der gesamten Zelloberfläche exprimiert, während Cytohesin-1 hauptsächlich im Cytoplasma lokalisiert ist. Um eine mögliche Kolokalisation der beiden Proteine detektieren zu können, wurde das Integrin mit Hilfe eines Antikörpers quervernetzt. Dies initiierte eine Aggregation und eine damit einhergehende Aktivierung des Rezeptors. Die Distribution von LFA-1 und Cytohesin-1 wurde anschließend mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie analysiert.

Die Färbung und Quervernetzung von LFA-1 erfolgte durch Inkubation der LCL-721-Zellen mit dem monoklonalen anti-CD18-Antikörper KIM185, gefolgt von einer Inkubation mit einem sekundären Texas-Red-konjugierten Antikörper bei 37°C. Die Zellen wurden auf einer Poly-L-Lysin beschichteten Unterlage fixiert und intrazelluläres Cytohesin-1 mit dem monoklonalen anti-Cytohesin-1-Antikörpers 7D2 und einem sekundären Fluorescein-isothiocyanat(FITC)-konjugierten Antikörper gefärbt (3.2.4.8).

Der monoklonale Antikörper (mAk) 7D2 erkennt neben Cytohesin-1 auch andere Mitglieder der Cytohesin-Familie, eignete sich aber am besten für eine intrazelluläre Anfärbungen des Proteins. Die Expression von Cytohesin-1 in LCL-721-Zellen war zuvor durch Arbeiten von Dr. W. Nagel mittels Western-Blot-Analyse und mit Hilfe des mAk 7H2, der spezifisch Cytohesin-1 erkennt, nachgewiesen worden (Geiger *et al.*, 2000).

Wurde Cytohesin-1 mit mAk 7D2 ohne zusätzliche LFA-1-Aggregation angefärbt, so konnte das Protein im Cytoplasma lokalisiert werden (Abb. 5, A2). Eine parallel durchgeführte Färbung, bei der anstelle des mAk 7D2 ein Kontroll-Antikörper für Cytohesin-1 eingesetzt wurde, zeigte erwartungsgemäß keine Proteindetektion (Abb. 5, A1).

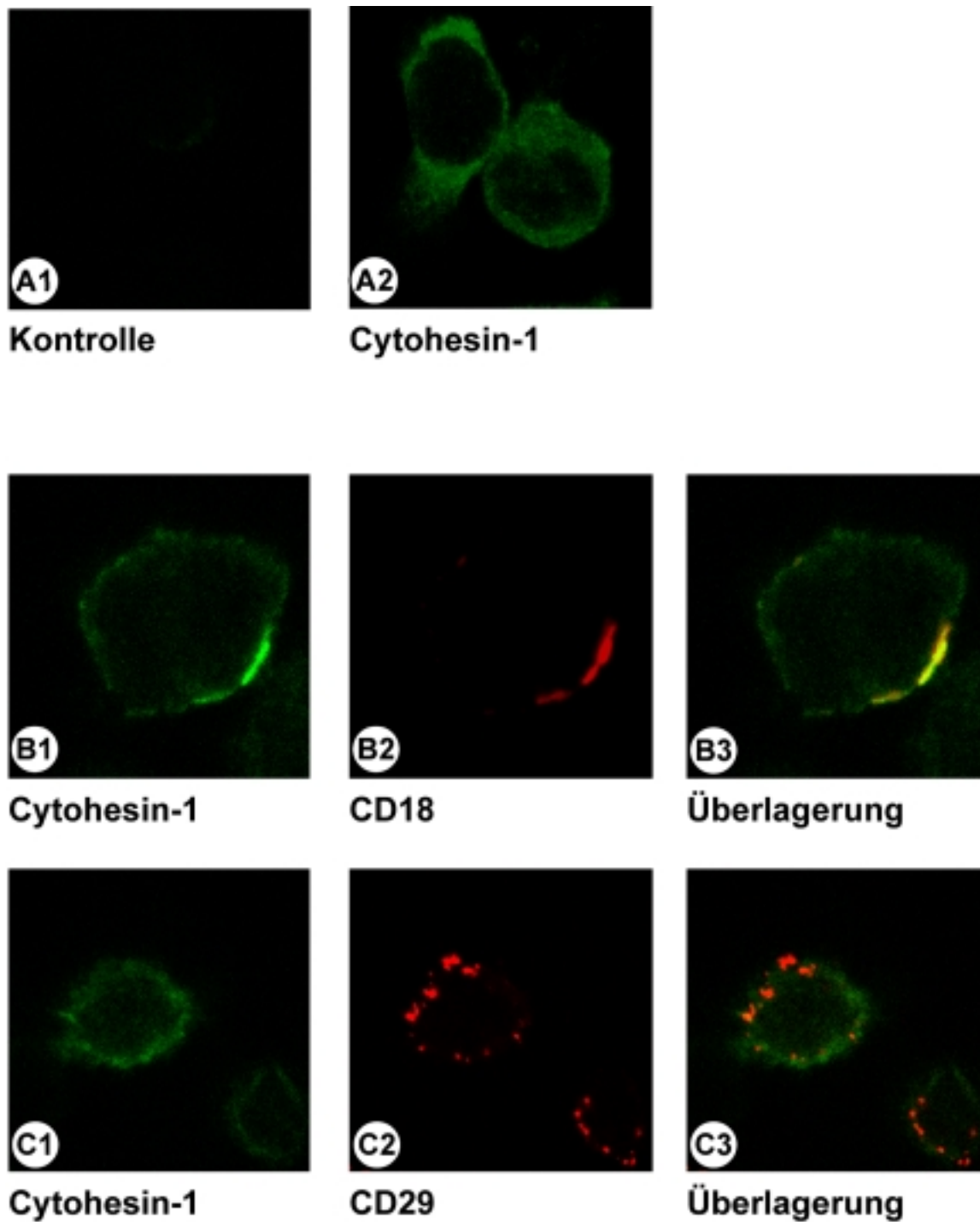
Wurde das  $\beta_2$ -Integrin zur Aggregation gebracht, so resultierte dies in einer Konzentration des Rezeptors in distinkten Bereichen der Plasmamembran. Die Analyse der Cytohesin-1-Distribution in diesen Zellen ergab eine sehr gute Kolokalisation der beiden Proteine. Cytohesin-1 war in die Bereiche des multimerisierten Integrins, an die Plasmamembran rekrutiert worden (Abb. 5, B1 - 3).

Um die Spezifität dieser Kolokalisation zu prüfen, wurde zusätzlich die Distribution von CD29, der  $\beta_1$ -Kette der VLA(very late antigen)-Integrine, und Cytohesin-1 analysiert.

$\beta_1$ -Integrine werden ebenfalls auf Leukocyten exprimiert, auf B-Zellen vor allem VLA-3 und VLA-4.

Bereits durch Interaktionsanalysen in Hefe sowie durch biochemische Präzipitationsstudien konnte keine Interaktion von Cytohesin-1 und CD29 demonstriert werden (Kolanus *et al.*, 1996; 4.1). Dieser Befund wurde durch die Kolokalisationsstudien bestätigt.

Das  $\beta_1$ -Integrin wurde in ähnlicher Weise wie LFA-1 mittels Antikörper quervernetzt. Zur spezifischen Markierung diente in diesem Fall der monoklonale anti-CD29-Antikörper 4B7R. Die Quervernetzung führte ebenfalls zu einer Multimerisierung des Integrins auf der Zelloberfläche, eine Koaggregation von CD29 mit Cytohesin-1 konnte allerdings nicht detektiert werden (Abb. 5, C1 - C3). Cytohesin-1 lag hauptsächlich im Cytoplasma vor und zeigte keine Kolokalisation mit CD29.



**Abb. 5: Kolokalisation von endogenem CD18 und Cytohesin-1 in der humanen lymphoblastoiden B-Zelllinie LCL-721.**

Zur Detektion von CD18 bzw. CD29 wurden LCL-721-Zellen mit dem monoklonalen anti-CD18-Antikörper KIM185 (B) bzw. mit dem monoklonalen anti-CD29-Antikörper 4B7R für 10 min gefärbt und anschließend zur Integrin-Quervernetzung mit einem sekundären Texas-Red-konjugierten Antikörper 10 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden auf eine mit Poly-L-Lysin beschichtete Unterlage aufgebracht und endogenes Cytohesin-1 mit Hilfe des monoklonalen anti-Cytohesin-1-Antikörpers 7D2 1 h bei RT gefärbt, gefolgt von einer einstündigen Inkubation mit einem sekundären FITC-konjugierten Antikörper (A2, B und C). Die spezifische Anfärbung von Cytohesin-1 durch mAk 7D2 wurde mit dem Kontroll-Antikörper CAD9 überprüft (A1). Die Analyse der zellulären Distribution der Proteine erfolgte anschließend mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie.



## 4.2 Identifizierung der Cytohesin-1-Bindungsstelle auf CD18 mittels Protein-Protein-Interaktionsanalysen in *S. cerevisiae*

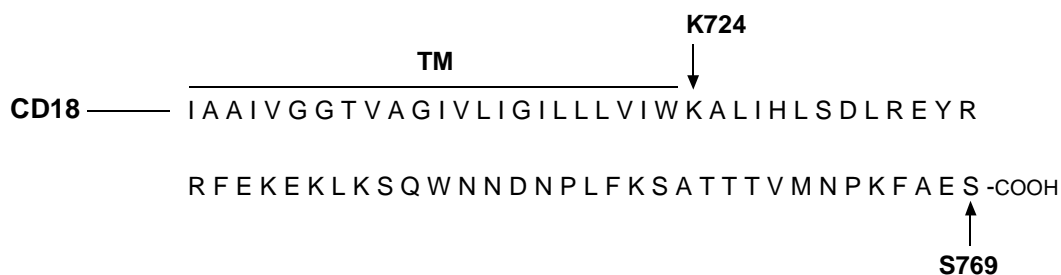
Die Immunfluoreszenz lieferte neben den bereits durchgeführten Interaktionsstudien von Kolanus *et al.* (1996) einen weiteren Hinweis auf die direkte und spezifische Interaktion von Cytohesin-1 und CD18.

Um die Relevanz dieser Interaktion für die Regulierung der LFA-1/ICAM-1-Bindung charakterisieren zu können, sollte eine CD18-Mutante generiert werden, die nicht mehr mit Cytohesin-1 interagiert. Diese  $\beta_2$ -Untereinheit sollte anschließend in das LFA-1-Molekül integriert und dessen Funktion analysiert werden.

Um das Bindungsverhalten verschiedener CD18-Mutanten möglichst rasch testen zu können, wurden Protein-Protein-Interaktionsanalysen in *S. cerevisiae* durchgeführt.

### 4.2.1 Deletionsanalysen der cytoplasmatischen Domäne von CD18 in *S. cerevisiae*

Der Aminoterminus (N-Terminus) der cytoplasmatischen Domänen der Integrin- $\beta$ -Untereinheiten wird durch die erste geladene Aminosäure (AS) gekennzeichnet, die nach einer kontinuierlichen Folge von 23 hydrophoben Resten auftritt (LaFlamme *et al.*, 1997). In CD18 wird diese Position durch das Stop-Transfer Lysin 724 markiert. Damit enthält die cytoplasmatische Domäne von CD18 46 Aminosäurereste (AS 724 – 769) (Abb. 6).



**Abb. 6: Aminosäuresequenz der transmembranen und cytoplasmatischen Domäne von CD18.**

Der N-Terminus der cytoplasmatischen Domäne von CD18 wird durch K724 markiert. Die cytoplasmatische Domäne setzt sich damit aus 46 AS zusammen. Die transmembrane Domäne (TM), die 23 AS enthält, ist mit einem Balken markiert.

Von Kolanus *et al.* (1996) wurde die SEC7-Domäne als diejenige Domäne von Cytohesin-1 identifiziert, die mit der cytoplasmatischen Region von CD18 in Wechselwirkung trat. Daher wurden Interaktionsanalysen in Hefe hauptsächlich mit der SEC7-Domäne und der cytoplasmatischen Domäne von CD18 durchgeführt.

Zur Eingrenzung des Interaktionsbereiches waren von Britta Schiller, im Labor von Dr. W. Kolanus, bereits verschiedene Deletionsmutanten der cytoplasmatischen Domäne von CD18 mittels PCR generiert und analysiert worden.

Als Ausgangskonstrukt für diese Deletionsmutanten diente eine cytoplasmatische Domäne von CD18, im weiteren Verlauf dieser Arbeit als CD18<sub>cyt725</sub> bezeichnet, deren Sequenz als erste aminoterminal Aminosäure nicht für das Lysin 724, sondern für das Alanin 725 kodierte (vgl. Abb. 6). Flankiert wurde das Konstrukt durch die Restriktionsschnittstellen für MluI und NotI. MluI/NotI diente als häufig verwendete Klonierungskassette im Labor. Zudem erwies sich die Sequenz der MluI-Restriktionsschnittstelle, die für die Aminosäurereste TR kodiert, als effektive Stop-Transfer-Sequenz.

CD18<sub>cyt725</sub> war, ausgehend vom 3`-Ende, sukzessive in vier Schritten deletiert und die Interaktion der resultierenden Proteine mit der SEC7-Domäne mittels Protein-Protein-Interaktionsanalysen in Hefe getestet worden (Abb. 7).

Hierzu wurde das „Two-Hybrid-System“ von Gyuris *et al.* (1993), unter Verwendung des Hefe-Stammes EGY48/JK103, eingesetzt. In diesem System vermittelt die Interaktion zweier Proteine die transkriptionelle Aktivierung von Reportergenen. Einer der beiden potentiellen Interaktionspartner, gemeinhin als „bait“-Protein bezeichnet, wird dabei als Fusionsprotein mit einer spezifischen DNA-Bindungs-Domäne, dem *lexA*-Protein (*lexA202*), exprimiert. Der zweite potentielle Interaktionspartner, das „prey“-Protein, trägt einen Transaktivierungs-Fusionsanteil, in diesem Fall die Transaktivierungsdomäne B42. Als Reportergen für die Interaktion der beiden Proteine dient u. a. *lacZ*. *LacZ* kodiert für  $\beta$ -Galaktosidase, ein Enzym, das das chromogene Substrat X-Gal unter Bildung eines blauen Farbstoffes umsetzen kann. Interagieren die beiden zu testenden Fusionsproteine im Hefesystem, so führt dies zur Transkription der  $\beta$ -Galaktosidase und damit zu einer Blaufärbung der Zellen (3.2.5).

In den hier beschriebenen Experimenten waren die unterschiedlichen Deletionsmutanten der cytoplasmatischen Domäne von CD18 als „bait“, die SEC7-Domäne als „prey“ eingesetzt worden. Als Expressionsvektoren dienten pEG202 zur Expression des „bait“- bzw. pJG4-5 zur Expression des „prey“-Proteins. Hefezellen waren mit den entsprechenden Plasmiden kotransformiert und die Transformationseffizienz mittels Selektionsmarker überprüft worden. pEG202 kodiert für ein *his3*-, pJG4-5 für ein *trp1*-Gen. Der Hefe-Stamm EGY48/JK103,

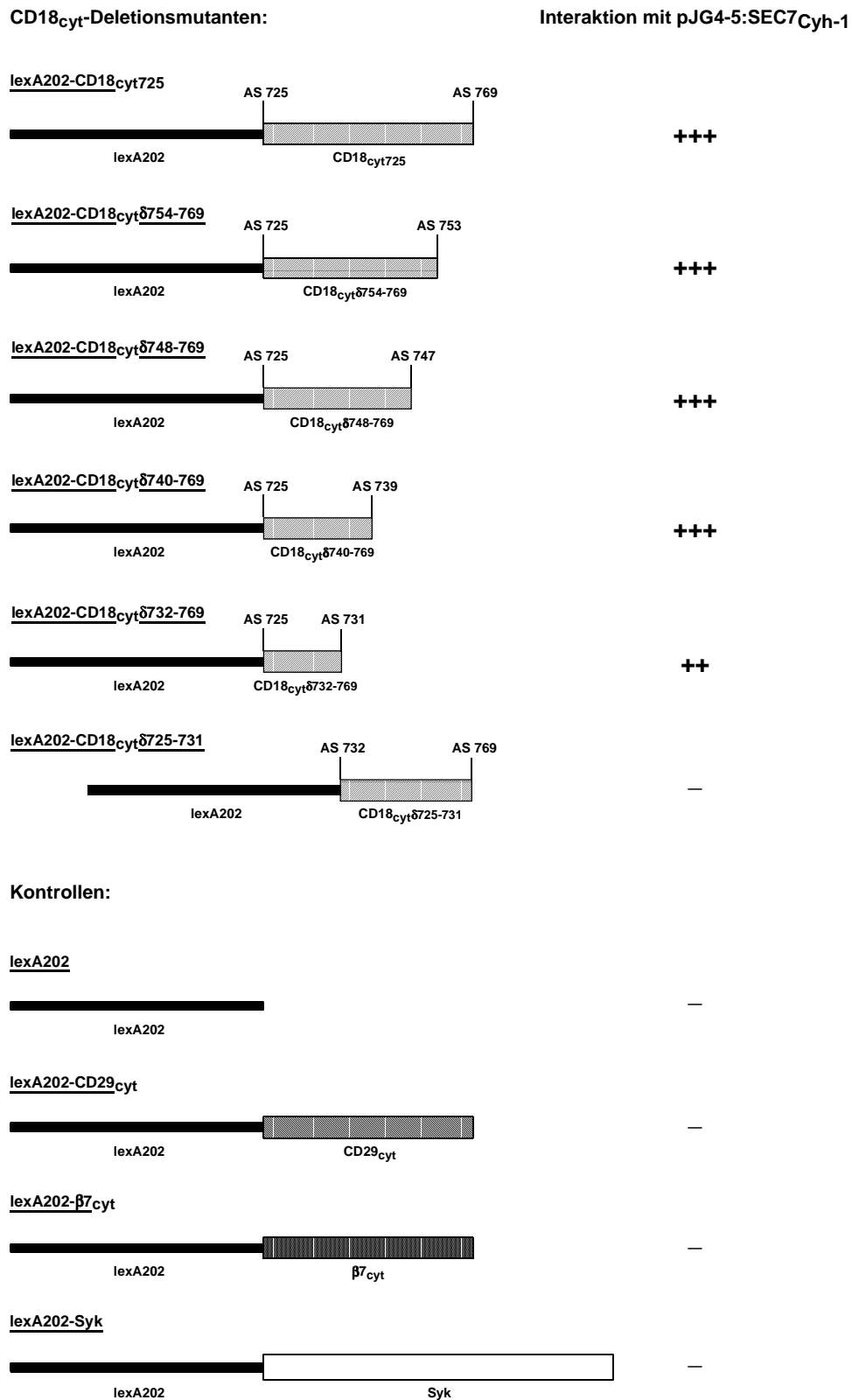
weist Defekte in diesen Genen auf und kann folglich nur dann auf HW-negativem Medium wachsen, wenn er zusätzlich Expressionsplasmide trägt, die für diese Gene kodieren.

Die relative Intensität der Protein-Protein-Interaktionen war über das lacZ-Reportergen analysiert worden. Als positive Kontrolle diente dabei in jedem Fall die Interaktion der SEC7-Domäne von Cytohesin-1 (SEC7<sub>Cyh-1</sub>) und CD18<sub>cyt725</sub>.

Wie Abbildung 7 zeigt, waren bereits die sieben N-terminalen Aminosäurereste von CD18<sub>cyt725</sub> ausreichend, um die Interaktion mit der SEC7-Domäne von Cytohesin-1 zu vermitteln.

Ausgehend von diesem Ergebnis wurde eine cytoplasmatische Domäne von CD18 generiert, die defizient in den entsprechenden sieben N-terminalen Aminosäuren war. Erwartungsgemäß zeigte diese Mutante keine Interaktion mit der SEC7-Domäne. Als negative Kontrollen wurden zusätzlich die cytoplasmatischen Domänen von CD29 und  $\beta_7$  sowie Syk und der Fusionsanteil lexA202 getestet. Diese Proteine zeigten ebenfalls keine Bindung an die SEC7-Domäne von Cytohesin-1.

Diese Analysen lieferten einen ersten Hinweis darauf, daß die Interaktionsstelle für Cytohesin-1 vermutlich im membranproximalen Bereich der cytoplasmatischen Domäne von CD18 lokalisiert war. Auch für andere Integrine war dieser Bereich bereits als wichtige Region zur Integrinregulierung beschrieben worden (Hughes *et al.*, 1995).



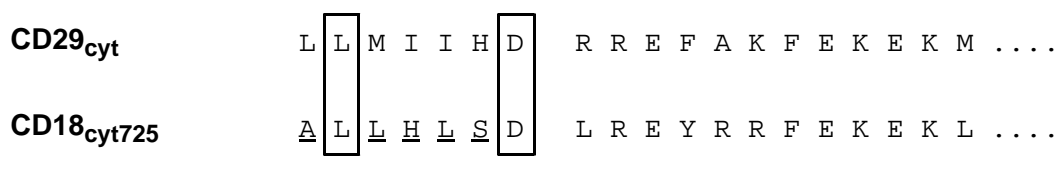
**Abb. 7: Protein-Protein-Interaktionsanalysen in *S. cerevisiae* mit Deletionsmutanten der cytoplasmatischen Domäne von CD18 und der SEC7-Domäne von Cytohesin-1.**

CD18-Mutanten bzw. Kontrollproteine wurden, fusioniert an lexA202, als „bait“ eingesetzt. Die SEC7-Domäne von Cytohesin-1, das „prey“-Protein, wurde als Fusionsprotein mit der transaktivierenden Domäne B42 exprimiert. Die Interaktionsanalysen wurden im Hefe-Stamm EGY48/JK103 durchgeführt. Die relative Intensität der Interaktionen wurde als Blaufärbung der Hefeklone auf UHW/X-Gal-Selektionsplatten analysiert und ist als +++ (starke Blaufärbung), ++ (mittelstarke Blaufärbung) oder – (keine Blaufärbung) dargestellt.

#### 4.2.2 Punktmutationsanalysen der cytoplasmatischen Domäne von CD18 in *S. cerevisiae*

Nachdem die membranproximale Region der cytoplasmatischen Domäne von CD18 als Interaktionsbereich für Cytohesin-1 identifiziert worden war, galt es, die Bindungsstelle noch weiter einzugrenzen.

Cytohesin-1 interagiert mit CD18, nicht aber mit CD29. Die Vermutung lag daher nahe, daß die Bindung durch Aminosäurereste vermittelt wurde, die spezifisch in der CD18-Sequenz auftraten. Zur genaueren Lokalisierung der Interaktionsstelle wurden im N-terminalen Bereich von CD18<sub>cyt725</sub> diejenigen Aminosäurereste punktmuiert, die keine Homologie zur entsprechenden CD29-Sequenz aufwiesen. In Abbildung 8 sind diese mutierten Aminosäurereste unterstrichen dargestellt.



**Abb. 8: Punktmutationen in der cytoplasmatischen Domäne von CD18.**

Aminosäure-Sequenzvergleich der cytoplasmatischen, membranproximalen Region von CD29 und CD18. Der vermutliche Interaktionsbereich für Cytohesin-1 ist mit einem Balken markiert. Homologe Aminosäuren in dieser Region sind in einem Kasten zusammengefaßt. Die in der CD18-Sequenz punktmuierten Aminosäurereste sind unterstrichen dargestellt.

Der membranproximale Bereich von CD18, der sieben Aminosäuren enthält, unterscheidet sich in fünf Aminosäureresten von der entsprechenden CD29-Sequenz. Diese Reste wurden möglichst konservativ mutiert, um Konformationsänderungen der cytoplasmatischen Kette weitgehend zu verhindern.

Folgende Punktmutanten der cytoplasmatischen Domäne von CD18 wurden generiert:

- |                                 |                                 |
|---------------------------------|---------------------------------|
| 1) CD18 <sub>cyt725</sub> A725G | 4) CD18 <sub>cyt725</sub> L729V |
| 2) CD18 <sub>cyt725</sub> I727V | 5) CD18 <sub>cyt725</sub> S730G |
| 3) CD18 <sub>cyt725</sub> H728R |                                 |

Die Mutagenese erfolgte nach dem DNA-Mutagenisierungsverfahren nach Kunkel (3.2.2.11). Als Ausgangskonstrukt zur Herstellung der hierfür benötigten Einzelstrang-Phagen-DNA diente die CD18<sub>cyt725</sub>-Sequenz, die über die Restriktionsschnittstellen MluI/NotI in den Expressionsvektor p5C7:cIg kloniert worden war. Dieses Plasmid stand bereits zur Verfügung.

Die Interaktion der SEC7-Domäne mit den generierten CD18-Punktmutanten wurde wiederum durch Protein-Protein-Interaktionsanalysen in Hefe getestet. Dabei wurde analog 4.2.1 das System von Gyuris *et al.* (1993) eingesetzt. Die Punktmutanten von CD18 dienten als „bait“- , die SEC7-Domäne als „prey“-Protein. Hefezellen wurden mit den entsprechenden Plasmiden kotransformiert und die Intensität der Protein-Protein-Interaktion anhand der Umsetzung des Substrates X-Gal analysiert.

Als positive Kontrolle diente in jedem Fall die Interaktion von CD18<sub>cyt725</sub> und SEC7, als negative Kontrolle wurden Hefezellen eingesetzt, die Syk und SEC7 exprimierten.

Die Mutanten CD18<sub>cyt725</sub>I727V, CD18<sub>cyt725</sub>L729V und CD18<sub>cyt725</sub>S730G zeigten keine Beeinträchtigung ihres Interaktionsvermögens mit SEC7. Hefen, die die entsprechenden Proteine koexprimierten, wiesen bereits nach einer 24-stündigen Inkubation auf den entsprechenden X-Gal-Selektionsplatten eine starke Blaufärbung auf. Diese Blaufärbung entsprach der positiven Kontrolle.

Die Mutante CD18<sub>cyt725</sub>H728R zeigte nach 24 h eine wesentlich schwächere Interaktion mit der SEC7-Domäne. Die Blaufärbung der Hefen intensivierte sich jedoch nach weiteren zwei bis drei Tagen Wachstum.

Keine Blaufärbung und damit keinerlei Wechselwirkung mit der SEC7-Domäne zeigte dagegen die Mutante CD18<sub>cyt725</sub>A725G. Auch eine mehrtägige Inkubation auf X-Gal-Selektionsplatten änderte dieses Ergebnis nicht. Eine Mutation des Alanin 725 nach Glycin schien somit die Interaktion von CD18 und der SEC7-Domäne zu inhibieren.

Zusätzlich wurde die Interaktion von CD18<sub>cyt725</sub> bzw. CD18<sub>cyt725</sub>A725G mit dem vollständigen Cytohesin-1-Protein analysiert. Diese Experimente stützten die bereits erhaltenen Ergebnisse. Verglichen mit der isolierten SEC7-Domäne, zeigte CD18<sub>cyt725</sub> allerdings eine etwas schwächere Interaktion mit Cytohesin-1.

In Tabelle 2 sind die Ergebnisse der Protein-Protein-Interaktionsanalysen in Hefe dargestellt:

„bait“-Protein fusioniert mit lexA202	„prey“-Protein fusioniert mit der B42-Domäne	relative Intensität der Blaufärbung auf UHW/X-Gal-Platten
CD18 <sub>cyt725</sub>	SEC7 <sub>Cyh-1</sub>	+++
CD29 <sub>cyt</sub>	SEC7 <sub>Cyh-1</sub>	-
Syk	SEC7 <sub>Cyh-1</sub>	-
CD18 <sub>cyt725A725G</sub>	SEC7 <sub>Cyh-1</sub>	-
CD18 <sub>cyt725I727V</sub>	SEC7 <sub>Cyh-1</sub>	+++
CD18 <sub>cyt725H728R</sub>	SEC7 <sub>Cyh-1</sub>	+
CD18 <sub>cyt725L729V</sub>	SEC7 <sub>Cyh-1</sub>	+++
CD18 <sub>cyt725S730G</sub>	SEC7 <sub>Cyh-1</sub>	+++
CD18 <sub>cyt725</sub>	Cytohesin-1	++
CD29 <sub>cyt</sub>	Cytohesin-1	-
Syk	Cytohesin-1	-
CD18 <sub>cyt725A725G</sub>	Cytohesin-1	-

**Tab. 2: Protein-Protein-Interaktionsanalysen in Hefe mit CD18<sub>cyt725</sub>-Punktmutanten und SEC7 bzw. Cytohesin-1.**

Die aufgeführten Mutanten der cytoplasmatischen Domäne von CD18 wurden im Bezug auf ihre Interaktion mit der SEC7-Domäne bzw. dem vollständigen Cytohesin-1-Protein in Hefe analysiert. Die rel. Intensität der Interaktion, die in Hefezellen auf UHW/X-Gal/Galaktose-Selektionsplatten auftrat, ist als +++ (starke Blaufärbung), ++ (mittelstarke Blaufärbung), + (schwache Blaufärbung) und – (keine Blaufärbung) dargestellt.

#### 4.2.3 Quantifizierung der CD18<sub>cyt725</sub>/SEC7-Interaktionen in *S. cerevisiae*

Um die Interaktionsintensität der einzelnen CD18<sub>cyt725</sub>-Punktmutanten mit der SEC7-Domäne in Hefe quantitativ zu bestimmen, wurden in einem Flüssigansatz die Einheiten an produzierter  $\beta$ -Galaktosidase ermittelt (3.2.5.7).

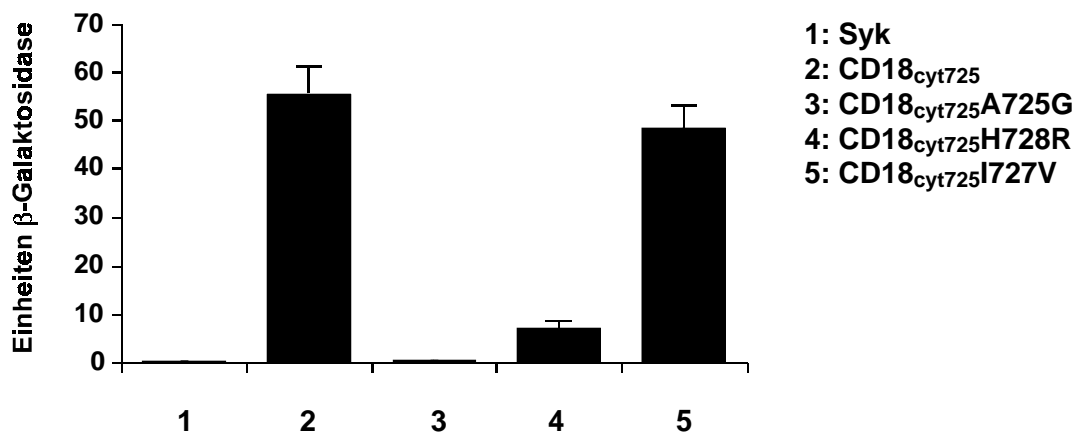
Eine Interaktion der beiden zu testenden Fusionsproteine führt zur Transkription des lacZ-Reportergens und damit zur Translation von  $\beta$ -Galaktosidase.  $\beta$ -Galaktosidase kann das chromogene Substrat o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galaktosid (ONPG) in Galaktose und o-Nitrophenol spalten. Die Konzentration von o-Nitrophenol ist proportional zur Menge an  $\beta$ -Galaktosidase und kann photometrisch bestimmt werden, da die Verbindung ein Absorptionsmaximum bei 420 nm aufweist.

Es wurde die  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität von Hefe-Einzelkolonien analysiert, die neben der SEC7-Domäne zusätzlich CD18<sub>cyt725</sub>, die Mutanten CD18<sub>cyt725A725G</sub>, CD18<sub>cyt725H728R</sub>,

CD18<sub>cyt725</sub>I727V oder als negative Kontrolle die Proteintyrosinkinase Syk exprimierten (Abb. 9).

Sowohl das CD18<sub>cyt725</sub>-Fusionsprotein als auch die Mutante CD18<sub>cyt725</sub>I727V, die bereits auf X-Gal-Selektionsplatten eine vergleichbare Interaktion mit SEC7 zeigten (vgl. 4.2.2), induzierten eine etwa gleich hohe Produktion an  $\beta$ -Galaktosidase (55 U bzw. 48 U) im Flüssigansatz. Die Expression der Mutante CD18<sub>cyt725</sub>H728R dagegen bewirkte eine fünf- bis sechsfache Reduktion der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität (8 U), verglichen mit CD18<sub>cyt725</sub>, während die Mutante CD18<sub>cyt725</sub>A725G (0,6 U) aufgrund der inhibierten Interaktion mit der SEC7-Domäne keine Synthese der  $\beta$ -Galaktosidase induzierte.

Diese Quantifizierung der Interaktion konnte somit den Befund der Protein-Protein-Interaktionsanalysen in Hefe bestätigen: die CD18<sub>cyt725</sub>A725G Mutante war nicht mehr in der Lage mit der SEC7-Domäne von Cytohesin-1 in Hefe zu interagieren.



**Abb. 9: Quantifizierung der Interaktion von CD18<sub>cyt725</sub>-Punktmutanten mit der SEC7-Domäne von Cytohesin-1 in Hefe mittels Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität.**

Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von doppeltransformierten Hefe-Einzelkolonien wurde in einem Flüssigansatz durch die photometrische Bestimmung der o-Nitrophenol-Menge ermittelt. Die Einheiten an  $\beta$ -Galaktosidase stellen Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen mit jeweils einer Doppelbestimmung dar.



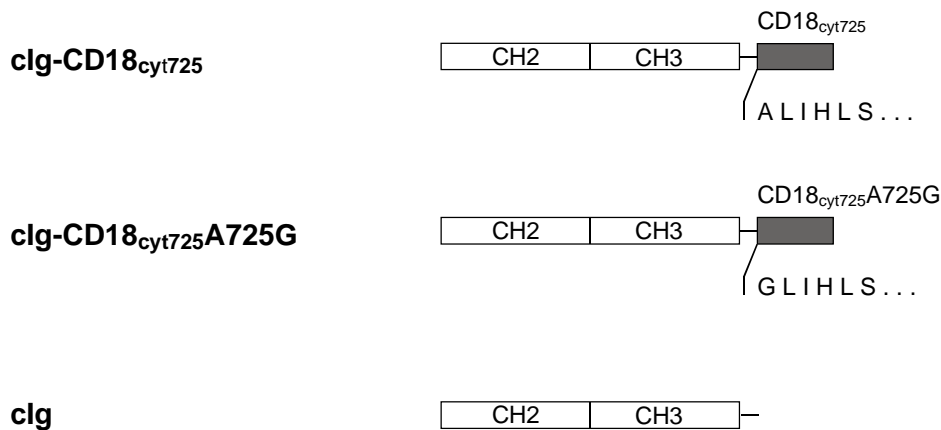
### 4.3 Biochemische und funktionale Charakterisierung von CD18A725G

Der Aminosäurerest A725 der CD18-Untereinheit erwies sich als kritisch für die CD18/Cytohesin-1-Interaktion. Durch biochemische und funktionale Studien sollte diese Beobachtung eingehender analysiert werden.

#### 4.3.1 *In vitro*-Präzipitationsstudien mit cIg-CD18<sub>cyt725</sub>-Fusionsproteinen und HIS-Cytohesin-1

Die Bindungsaffinität von CD18<sub>cyt725</sub>A725G für Cytohesin-1 wurde zunächst biochemisch, durch *in vitro*-Präzipitationsstudien charakterisiert. Da die Koimmunpräzipitation von Cytohesin-1 und CD18 nicht etabliert werden konnte (vgl. 4.1.1), sollte die Interaktionsanalyse mit Hilfe von Fusionsproteinen erfolgen.

Hierzu wurde die cytoplasmatische Domäne von CD18 carboxyterminal (C-terminal) an die CH2- und CH3-Domäne des humanen IgG1 (kurz: cIg für cytoplasmic immunoglobuline) fusioniert. Der cIg-Fusionsanteil gewährleistet eine praktisch vollständige Präzipitation des Fusionsproteins über Protein A, sowie eine sehr gute Immunodetektion. Zur Klonierung der cIg-Fusionskonstrukte wurden die bereits unter 4.2.2 (Interaktionsanalysen in Hefe) beschriebenen CD18<sub>cyt725</sub>-Konstrukte eingesetzt. Die entsprechende CD18-Sequenz, kodierend für CD18<sub>cyt725</sub> bzw. CD18<sub>cyt725</sub>A725G, wurde über die Restriktionsschnittstellen MluI und NotI in den p5C7:cIg-Vektor kloniert. Als negative Kontrolle diente das cIg-Konstrukt. Eine schematische Darstellung der resultierenden cIg-Fusionsproteine zeigt Abbildung 10.



**Abb. 10: Schematische Darstellung der cIg-CD18<sub>cyt725</sub>-Fusionsproteine.**

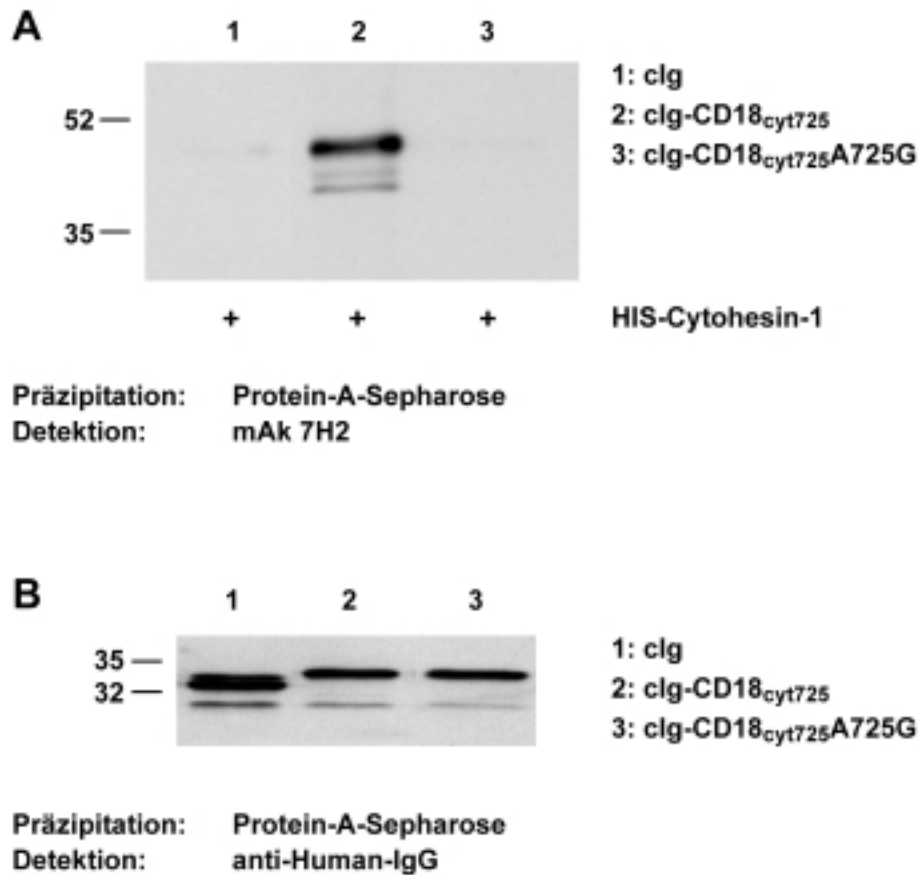
Die CH2- und CH3-Domäne des humanen IgG1 (cIg) wurden N-terminal an CD18<sub>cyt725</sub> bzw. CD18<sub>cyt725</sub>A725G fusioniert. Als negative Kontrolle diente der cIg-Fusionsanteil.

Cytohesin-1 wurde für die Interaktionsstudien in gereinigter Form eingesetzt. Das Protein wurde hierzu mit einem N-terminalen Polyhistidin-Fusionsanteil (HIS) in *E. coli* überexprimiert und über eine Ni-Säule aufgereinigt.

Die Fusionsproteine cIg-CD18<sub>cyt725</sub>, cIg-CD18<sub>cyt725</sub>A725G sowie cIg wurden in COS7-Zellen nach DEAE-Dextran/Chloroquin-Transfektion überexprimiert und aus Triton-X-100-Gesamtzelllysaten an Protein-A-Sepharose immobilisiert. Anschließend wurden die Präzipitationsansätze mit jeweils 10 µg rekombinatem HIS-Cytohesin-1 inkubiert und die gebundenen Proteine mittels Western-Blot analysiert (3.2.4.13A).

Wie Abbildung 11A zeigt, war cIg-CD18<sub>cyt725</sub> in der Lage, HIS-Cytohesin-1 an der Sepharose-Matrix zu immobilisieren (Abb. 11A, Spur 2). Eine Interaktion des Proteins sowohl mit CD18<sub>cyt725</sub>A725G als auch mit cIg konnte dagegen nicht detektiert werden (Abb. 11A, Spuren 3 und 1). Dieser Befund stützte die Ergebnisse der Protein-Protein-Interaktionsanalysen in Hefe.

Die Expression und vergleichbare quantitative Präzipitation der cIg-Fusionsproteine wurde parallel überprüft (Abb. 11B).



**Abb. 11: Biochemische Analyse der Interaktion von Cytohesin-1 und CD18<sub>cyt725</sub>A725G.**

A) Die Konstrukte cIg-CD18<sub>cyt725</sub>, cIg-CD18<sub>cyt725</sub>A725G und cIg wurden mit Hilfe von DEAE-Dextran/Chloroquin in COS7-Zellen transfiziert und die Fusionsproteine für 48 h überexprimiert. Aus einem anschließend hergestellten Triton-X-100-Gesamtzellsat wurden die Fusionsproteine an Protein-A-Sepharose präzipitiert und mit je 10 µg HIS-Cytohesin-1 für 1 h bei RT inkubiert. Gebundenes Protein wurde über SDS-PAGE und einen anti-Cytohesin-1-Western-Blot analysiert. Der Cytohesin-1-Nachweis erfolgte dabei mit dem monoklonalen Antikörper 7H2. B) Detektion der cIg-Fusionsproteine nach Präzipitation an Protein-A-Sepharose durch einen anti-Human-IgG-Western-Blot.

#### 4.3.2 Funktionale Charakterisierung des LFA-1-Integrins nach Einführung der CD18A725G-Mutation

Interessant war die Frage, ob die Mutation des A725 nach G in der CD18-Untereinheit (CD18A725G) die Funktion des intakten LFA-1-Moleküls beeinflusste.

Kolanus *et al.* (1996) konnten zeigen, daß eine Überexpression von Cytohesin-1 in Jurkat E6-Zellen einen Anstieg der Zelladhäsion an ICAM-1 zur Folge hatte. Diese gesteigerte Adhäsion wurde vermutlich durch die Interaktion von Cytohesin-1 und CD18 induziert. Zur Analyse der Integrin-Funktion wurde daher die Adhäsionsfähigkeit von Zellen an ICAM-1 ermittelt.

In der kooperierenden Arbeitsgruppe von C. Figdor, am University Medical Center in Nijmegen (Niederlande), wurden K562-Zellen generiert, die stabil LFA-1 mit einer CD18A725G-Untereinheit exprimierten (im Folgenden als KA725G bezeichnet). K562, eine erythromyeloide Zelllinie, exprimiert kein endogenes LFA-1 und eignet sich daher gut für Studien an  $\beta_2$ -Integrin-Mutanten. KA725G sowie K562-Zellen, die Wildtyp-LFA-1 stabil exprimierten (KLFA-1), wurden von C. Figdor für funktionale Analysen zur Verfügung gestellt.

Untersucht werden sollte die Adhäsion von K562-Zellen an ICAM-1 (3.2.6.1). Als ICAM-1-Ligand diente hierbei ein lösliches Fusionsprotein von ICAM-1, im Folgenden als ICAM-1-Fc bezeichnet, das sich aus der extrazellulären Domäne von ICAM-1 zusammensetzte, die über eine „Hinge“-Region aminoterminal an die CH2- und CH3-Domäne des humanen IgG1 fusioniert war (Kolanus *et al.*, 1996) und bereits zur Verfügung stand.

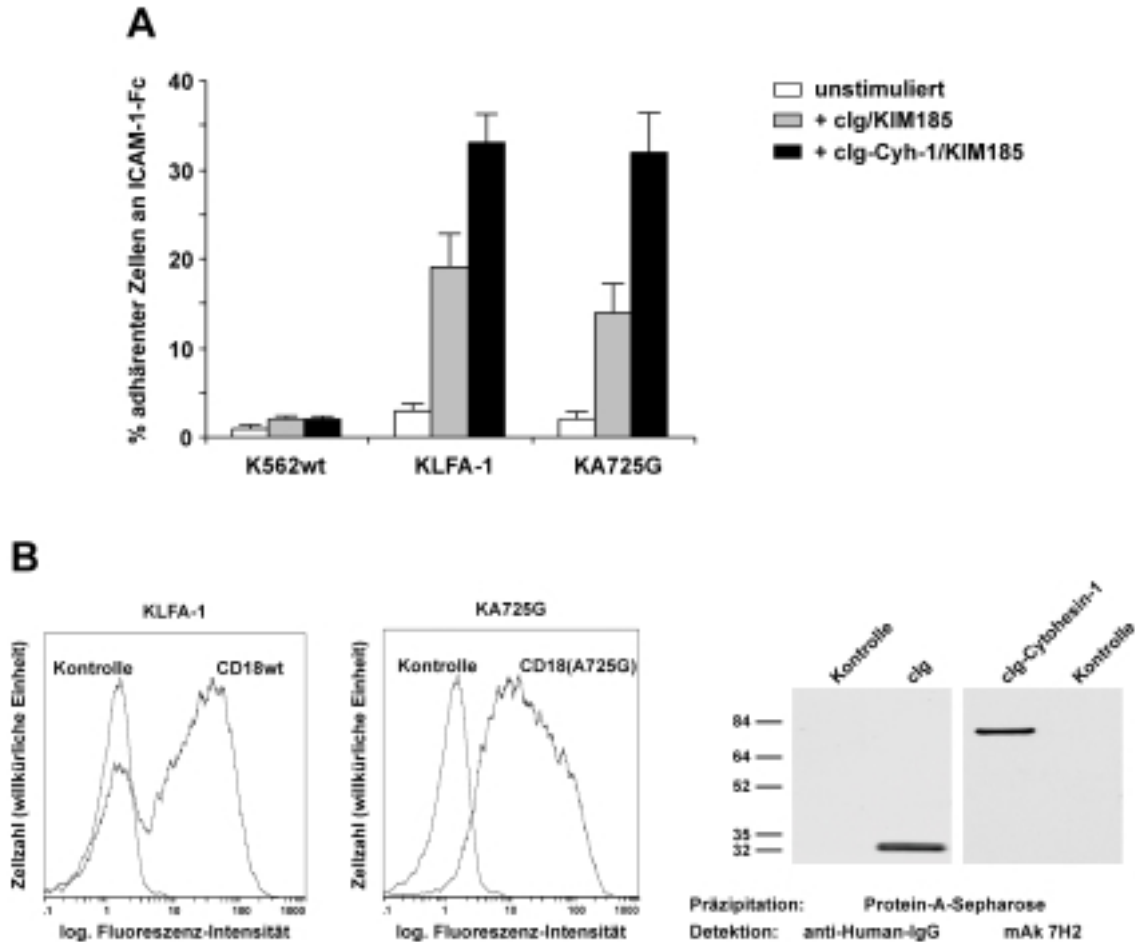
Für Zelladhäsionsstudien wurde ICAM-1-Fc an Zellkulturplastik immobilisiert und den zu analysierenden Zellen präsentiert. Zuvor wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid-H33342-Fluorochrom, der in die DNA interkaliert, markiert. Dies ermöglichte die anschließende fluorometrische Detektion adhärenter Zellen.

In der Regel wird LFA-1 in einer inaktiven Form auf der Zelloberfläche exprimiert und erst durch intrazelluläre Signalkaskaden zur Ligandenbindung aktiviert. Die Induktion solcher Signalkaskaden kann z. B. durch die Stimulierung von T-Zell-Oberflächenrezeptoren erfolgen. In experimentellen Ansätzen wird zur Aktivierung von LFA-1 häufig der Phorbolster PMA eingesetzt (Dustin und Springer, 1989; Ganpule *et al.*, 1997), der als Aktivator der Proteinkinase C gilt (Nishizuka, 1986). Es hatte sich allerdings gezeigt, daß K562-Zellen, die LFA-1 ektopisch exprimierten, nicht durch PMA zur Adhäsion an ICAM-1 stimuliert werden konnten (Ortlepp *et al.*, 1995; Lub *et al.*, 1997).

Alternativ zur indirekten Aktivierung durch PMA können Integrine auch direkt, durch extrazellulär wirkende Agenzien wie beispielsweise aktivierende Antikörper, zur Ligandenbindung stimuliert werden. Für Adhäsionsanalysen mit K562-Zellen wurde daher der monoklonale anti-CD18-Antikörper KIM185 eingesetzt (Andrew *et al.*, 1993), der LFA-1 spezifisch zur Bindung an ICAM-1 aktivieren kann (Ortlepp *et al.*, 1995). Zusätzlich wird vermutet, daß das Aktivierungspotential von KIM185 zumindest teilweise von intrazellulären Faktoren abhängig ist.

Zur Analyse der regulatorischen Rolle der CD18/Cytohesin-1-Interaktion wurde ein cIg-Fusionsprotein von Cytohesin-1 (cIg-Cytohesin-1 bzw. cIg-Cyh-1), das bereits zur Verfügung stand, mit Hilfe des Vaccinia-Virus-Expressionssystems in KLFA-1, KA725G bzw. Wildtyp-

K562-Zellen (K562wt) exprimiert und anschließend die Adhäsion der Zellen an ICAM-1-Fc nach Stimulierung mit KIM185 analysiert.



**Abb. 12: Funktionale Charakterisierung von LFA-1(A725G) nach stabiler Expression in K562-Zellen.**

A) cIg-Cytohesin-1 (schwarze Säulen) bzw. cIg (graue Säulen) wurde in Wildtyp-K562-, KLFA-1- bzw. KA725G-Zellen mittels rekombinanter Vaccinia-Viren für ca. 12 h exprimiert. Die einzelnen Zelllinien wurden anschließend nach Inkubation mit KIM185 (600 ng/1 Mio. Zellen; 30 min bei 37°C; graue und schwarze Säulen) für Zelladhäsionsanalysen eingesetzt. B) Die Detektion der Oberflächenexpression von LFA-1 auf KLFA-1 bzw. KA725G-Zellen erfolgte mittels Durchflußzytometrie durch Anfärbung der jeweiligen CD18-Untereinheit (linke Abbildung). Die Detektion der cIg- bzw. cIg-Cytohesin-1-Expression in K562-Zellen erfolgte nach Präzipitation der Fusionsproteine an Protein-A-Sepharose über einen anti-Human-IgG- (rechte Abbildung, linkes Autoradiogramm) bzw. einen anti-Cytohesin-1- (rechte Abbildung, rechtes Autoradiogramm) Western-Blot. Als Kontrolle dienten jeweils uninfizierte Zellen.

Die Adhäsionsstudien (graphisch dargestellt in Abb. 12A) ergaben jedoch, daß KA725G- und KLFA-1-Zellen sich nicht in ihrer Fähigkeit unterschieden an immobilisiertes ICAM-1-Fc zu binden. Beide Zelllinien zeigten nach Überexpression von cIg-Cytohesin-1 eine vergleichbare, deutlich gesteigerte Adhäsion (ca. 1,8-fach; Abb. 12A, schwarze Säulen), im Gegensatz zu Zellen, die zur Kontrolle den cIg-Fusionsanteil überexprimierten (Abb. 12A, graue Säulen).

K562wt sowie unstimulierte Zellen (Abb. 12A, weiße Säulen) zeigten in keinem Fall eine gesteigerte Adhäsion.

Die vergleichbare Expression des jeweiligen Integrins bzw. von cIg-Cytohesin-1 und cIg wurde mittels Durchflußzytometrie bzw. Western-Blot-Analyse überprüft (Abb. 12B).

### **4.3.3 *In vitro*-Präzipitationsstudien mit sIg-CD18<sub>tm/cyt</sub>-Fusionsproteinen und HIS-Cytohesin-1**

Die Beobachtung, daß die Einführung der CD18(A725G)-Untereinheit in LFA-1 keinen Einfluß auf die Bindung des Integrins an ICAM-1-Fc hatte, war überraschend, da für die Cytohesin-1/CD18-Interaktion eine regulatorische Funktion impliziert worden war.

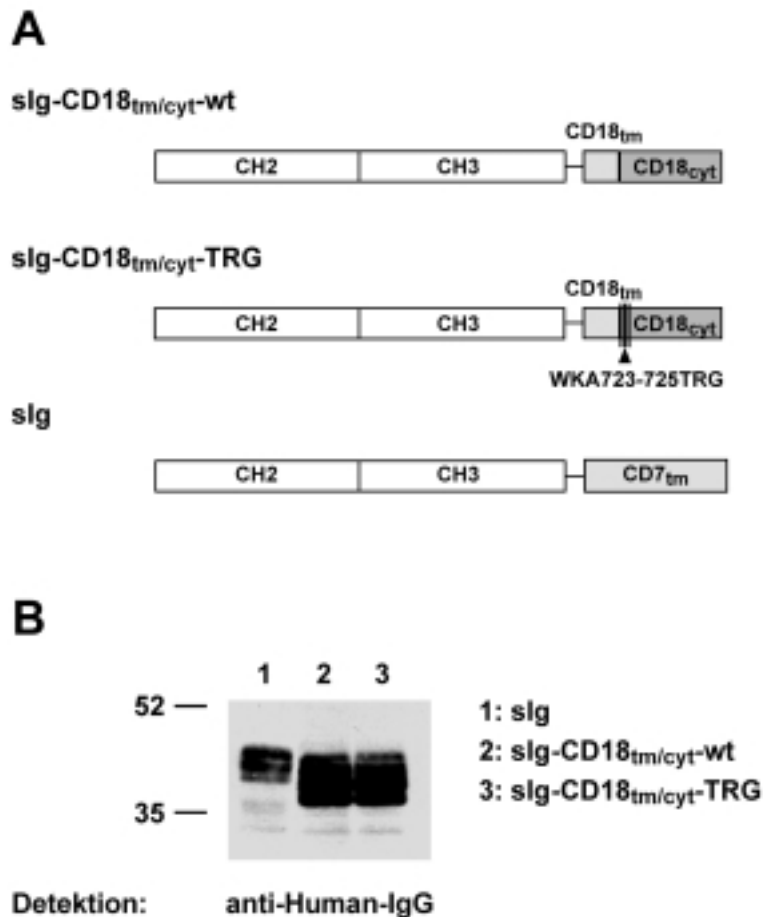
Daher lag die Vermutung nahe, daß nicht allein das Alanin 725 zur Vermittlung der Cytohesin-1/CD18-Interaktion kritisch war. Durch die Verwendung der MluI/NotI-Klonierungskassette zur Konstruktion der CD18<sub>cyt725</sub>-Fusionsproteine (vgl. 4.2.1) wurde eine cytoplasmatische Domäne von CD18 generiert, deren N-terminale Aminosäure A725 darstellte. Die N-terminale Aminosäure der vollständigen cytoplasmatischen Domäne der CD18-Untereinheit wird jedoch durch K724 markiert.

Es war daher möglich, daß durch die Einführung der MluI-Restriktionsschnittstelle, die für TR kodiert, am N-Terminus der cytoplasmatischen Domäne tatsächlich eine Doppel- bzw. Tripelmutante von CD18 generiert worden war und erst die Mutation mehrerer aufeinanderfolgender Aminosäurereste am Übergang der transmembranen zur cytoplasmatischen Domäne in einem Bindungsverlust mit Cytohesin-1 resultierte.

Zur Prüfung dieser Hypothese wurde das Bindungsverhalten einer CD18-Mutante analysiert, die die Mutation der drei aufeinanderfolgenden Aminosäurereste WKA723-725 nach TRG enthielt. Hierzu wurden CD18-Konstrukte generiert, die neben der cytoplasmatischen auch die transmembrane Domäne der  $\beta_2$ -Untereinheit trugen (CD18<sub>tm/cyt</sub>). Mittels PCR wurden Konstrukte amplifiziert, die entweder die Wildtyp-CD18-Sequenz (CD18<sub>tm/cyt</sub>-wt) oder die Mutation WKA(723-725) nach TRG (CD18<sub>tm/cyt</sub>-TRG) enthielten. Über die Restriktionsschnittstellen BamHI/NotI wurden diese Konstrukte in den pTKg:sIg-Vektor kloniert. Der pTKg:sIg-Vektor enthielt die Sequenz für einen extrazellulär orientierten sIg(surface Ig)-Fusionsanteil. Der sIg-Fusionsanteil (Zeitlmann *et al.*, 1998) setzte sich hierbei aus einer Exportsignalsequenz von CD5 sowie der CH2- und CH3-Domäne des humanen IgG1 zusammen. Die ursprünglich im sIg-Konstrukt enthaltene Sequenz für die transmembrane Domäne von CD7 wurde durch die transmembrane Domäne von CD18 ersetzt. Der aminoternale

sIg-Fusionsanteil gewährleistete die membranständige Expression und gute Immunodetektion der Proteine. Als negative Kontrolle diente der sIg-Fusionsanteil selbst, der in diesem Fall die transmembrane Domäne von CD7 enthielt (Abb. 13A).

Um eine effiziente und vergleichbare Expression der chimären Proteine zu gewährleisten, wurden rekombinante Vaccinia-Viren generiert (Abb. 13B).



**Abb. 13: sIg-CD18<sub>tm/cyt</sub>-Fusionskonstrukte für *in vitro*-Präzipitationsstudien.**

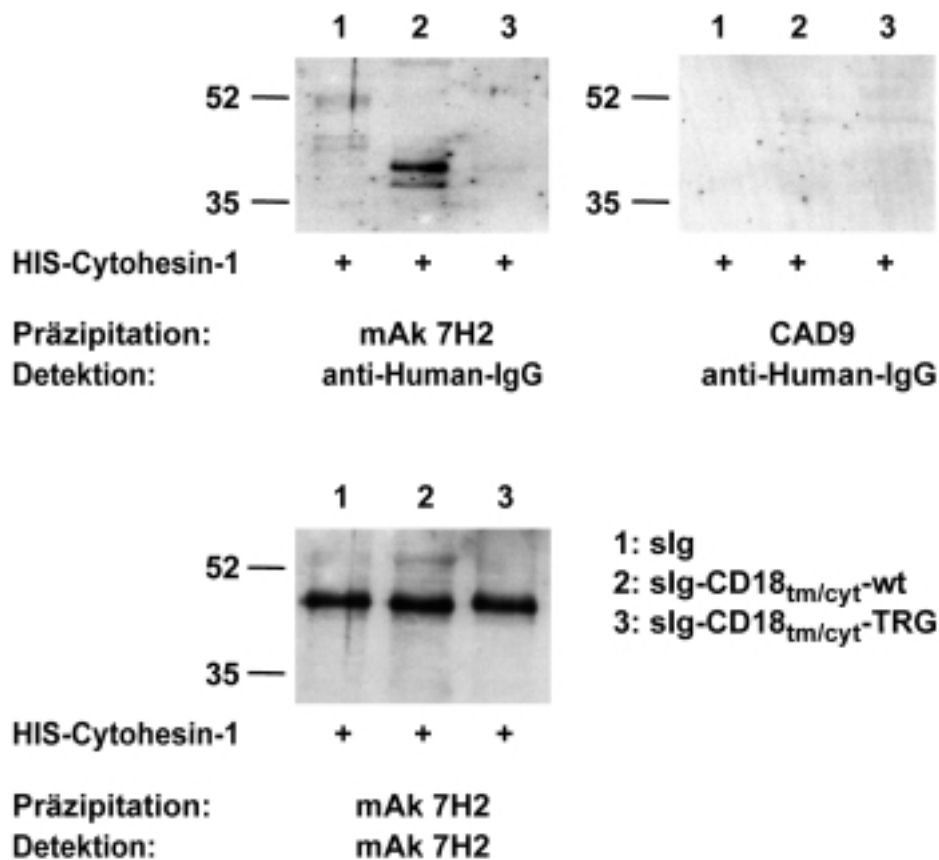
A) Schematische Darstellung der sIg-Fusionskonstrukte. B) Rekombinante Vaccinia-Viren zur Expression der sIg-Fusionsproteine wurden generiert und die Proteinexpression, nach Infektion von COS7-Zellen, über einen anti-Human-IgG-Western-Blot aus Gesamtzellysate detektiert.

Die sIg-Fusionsproteine wurden in COS7-Zellen exprimiert und ihre Bindung an HIS-Cytohesin-1 analysiert.

HIS-Cytohesin-1 wurde hierzu über den spezifischen mAk 7H2 an Zellkulturplastik immobilisiert. Die infizierten COS7-Zellen wurden mit einem Puffer, der mit Brij58 supplementiert war, lysiert und HIS-Cytohesin-1 mit dem resultierenden Gesamtzellysate inkubiert

(3.2.4.13B). Die Verwendung von Brij58 sollte den Erhalt schwacher Protein-Protein-Wechselwirkungen gewährleisten.

Abbildung 14 zeigt, daß nur sIg-CD18<sub>tm/cyt</sub>-wt in der Lage war an HIS-Cytohesin-1 zu binden (Abb. 14, oben links, Spur 2). sIg-CD18<sub>tm/cyt</sub>-TRG interagiert, ähnlich wie sIg, nicht mit HIS-Cytohesin-1 (Abb. 14, oben links, Spuren 3 und 1). Dabei war sicher gestellt, daß HIS-Cytohesin-1 in allen Ansätzen in vergleichbaren Mengen auf der Matrix immobilisiert vorlag (Abb. 14 unten, Spuren 1, 2 und 3).



**Abb. 14: *In vitro*-Präzipitationsstudien zur Analyse der sIg-CD18<sub>tm/cyt</sub>/HIS-Cytohesin-1-Interaktion.**

Die Fusionsproteine sIg (1), sIg-CD18<sub>tm/cyt</sub>-wt (2) bzw. sIg-CD18<sub>tm/cyt</sub>-TRG (3) wurden mittels rekombinanter Vaccinia-Viren in COS7-Zellen überexprimiert. Aus diesen Zellen hergestellte Brij58-Gesamtzelllysate wurden auf 96-Well-Mikrotiterplatten aufgebracht, die mit HIS-Cytohesin-1 beschichtet waren (obere und untere Abbildungen links, Spuren 1, 2 und 3). Die durch HIS-Cytohesin-1 präzipitierten sIg-Fusionsproteine wurden über SDS-PAGE und Western-Blot analysiert, wobei der Inhalt von jeweils vier Wells eines gleichen Ansatzes vereinigt wurde und einer Gelspur entspricht. Zur Präzipitationskontrolle wurde der 7H2-isotypenspezifische Antikörper CAD9 eingesetzt (obere Abbildung, rechts).



Zum Test der spezifischen Präzipitation von CD18 durch Cytohesin-1 wurde in einem parallelen Ansatz der 7H2-isotypenspezifische Kontroll-Antikörper CAD9 anstelle von mAk 7H2 eingesetzt. Dieser Antikörper wurde ebenfalls mit HIS-Cytohesin-1 und anschließend mit COS7-Gesamtzelllysaten, die die jeweiligen sIg-Fusionsproteine enthielten, inkubiert. Eine Analyse der möglichen gebundenen Proteine zeigte, daß mit dieser Versuchsanordnung kein sIg-Fusionsprotein präzipitiert werden konnte (Abb. 14, oben rechts).

Diese *in vitro*-Präzipitationsanalysen bestätigten die Vermutung, daß die Mutation der drei aufeinanderfolgenden Aminosäurereste WKA723-725 nach TRG zu einem Interaktionsverlust mit Cytohesin-1 führte.

#### **4.4 Funktionale Charakterisierung der CD18(TRG)-Mutante**

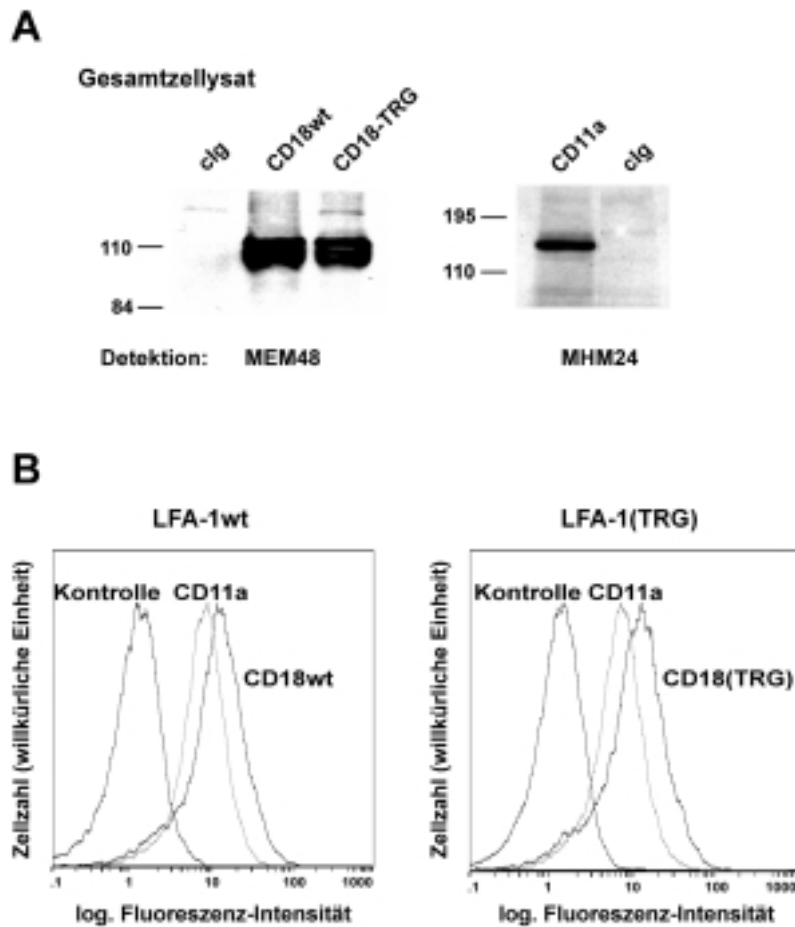
Die funktionale Relevanz der TRG-Mutation im LFA-1-Molekül sollte wiederum mittels Zelladhäsionsstudien analysiert werden.

##### **4.4.1 Generierung rekombinanter Vaccinia-Viren zur Expression von funktionalem LFA-1**

Zur raschen und effizienten Expression von Wildtyp-LFA-1 (LFA-1wt) bzw. von LFA-1, das die CD18(TRG)-Untereinheit trug (LFA-1(TRG)), wurden rekombinante Vaccinia-Viren eingesetzt. Hierzu wurden Viren für die Expression der Wildtyp-CD18(CD18wt)-, der CD18(TRG)- bzw. der CD11a-Kette generiert. Die entsprechenden Sequenzen der Integrin-Untereinheiten waren dazu über die Restriktionsschnittstellen HindIII/NotI in den pTKg-Expressionsvektor kloniert worden. Die cDNAs kodierend für das humane CD18wt bzw. CD11a standen bereits zur Verfügung, die cDNA kodierend für CD18(TRG) wurde mittels PCR-Mutagenese amplifiziert.

Zum Test der rekombinanten Vaccinia-Viren wurden die Einzelketten in HeLa-Zellen exprimiert und ihr Molekulargewicht über einen anti-CD18- bzw. anti-CD11a-Western-Blot analysiert (Abb. 15A). CD18 migrierte zwischen 100 und 120 kDa in mehreren Banden, die vermutlich durch ein unterschiedliches Glykosylierungsmuster zustande kamen. CD11a wies ein Molekulargewicht von etwa 180 kDa auf. Die Zelloberflächenexpression der LFA-1wt- bzw. LFA-1(TRG)-Moleküle wurde ebenfalls auf HeLa-Zellen nach Koexpression der  $\alpha$ - und  $\beta$ -

Untereinheit mittels Durchflußzytometrie überprüft (Abb. 15B).



**Abb. 15: Expression von CD18 und CD11a mittels rekombinanter Vaccinia-Viren.**

**A)** CD18wt, CD18(TRG) bzw. CD11a wurden mit Hilfe des Vaccinia-Virus-Expressionssystems in HeLa-Zellen exprimiert und aus dem Gesamtzelllysate über Western-Blot analysiert. Die CD18-Detektion erfolgte dabei mit dem monoklonalen anti-Human-CD18-Antikörper MEM48 unter nicht reduzierenden Bedingungen (linkes Autoradiogramm), die Detektion von CD11a mit dem monoklonalen anti-Human-CD11a-Antikörper MHM24 unter reduzierenden Bedingungen (rechtes Autoradiogramm). **B)** Detektion der Oberflächenexpression von LFA-1wt bzw. LFA-1(TRG) in HeLa-Zellen nach Expression durch rekombinante Vaccinia-Viren mittels Durchflußzytometrie. Die Anfärbung der Integrin-Untereinheiten erfolgte mit den Antikörpern MEM48 (CD18) bzw. MHM24 (CD11a) und einer anschließenden Inkubation mit einem sekundären FITC-konjugierten anti-Maus-Antikörper. Als Kontrolle dienten jeweils HeLa-Zellen, die den clg-Fusionsanteil exprimierten.

Die  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Untereinheit von LFA-1 wird normalerweise nicht als Einzelkette an der Zelloberfläche exprimiert. Die Heterodimer-Formierung der beiden Ketten ist Voraussetzung für die Translokation des Integrins an die Plasmamembran. Sie erfolgt im Golgi-Apparat und benötigt die korrekte Expression beider Untereinheiten (Arnaout, 1990; Sligh *et al.*, 1992).

Auch CD18 und CD11a, die mit Hilfe rekombinanter Vaccinia-Viren exprimiert wurden, konnten als Einzelketten nicht an die Zelloberfläche transportiert werden.

#### 4.4.2 Funktionale Analyse von LFA-1(TRG) nach Expression in HeLa-Zellen

Für erste funktionale Analysen der LFA-1(TRG)-Mutante wurden HeLa-Zellen verwendet, da die Expression von LFA-1 in K562-Zellen mit Hilfe des Vaccinia-Virus-Expressionssystems nicht zufriedenstellend war. Eine Infektion der K562-Zellen mit zwei verschiedenen rekombinanten Viren, zur Expression der  $\alpha$  bzw.  $\beta$ -Untereinheit, führte nicht zur ausreichenden Expression der beiden Ketten und damit zu keiner hinreichenden Oberflächenexpression des Integrins.

HeLa, eine Zelllinie, die aus einem humanen Cervix-Carcinom entwickelt wurde, exprimiert kein endogenes LFA-1. Die Zellen weisen jedoch detektierbare Mengen an Cytohesin-1 auf (Geiger *et al.*, 2000) und eignen sich somit ebenfalls zur funktionalen Charakterisierung von LFA-1-Mutanten. Die Koinfektion dieser Zellen mit rekombinanten Vaccinia-Viren zur Expression von CD11a und CD18 lieferte zudem eine sehr gute Oberflächenexpression des Integrins (vgl. Abb. 15B).

Zelladhäsionsstudien wurden in ähnlicher Weise, wie bereits unter 4.3.2 beschrieben, durchgeführt. LFA-1wt, LFA-1(TRG) bzw. cIg (zur Kontrolle) wurden in HeLa exprimiert und die Adhäsion der Zellen an ICAM-1-Fc im unstimulierten Zustand bzw. nach Inkubation mit PMA oder KIM185 analysiert.

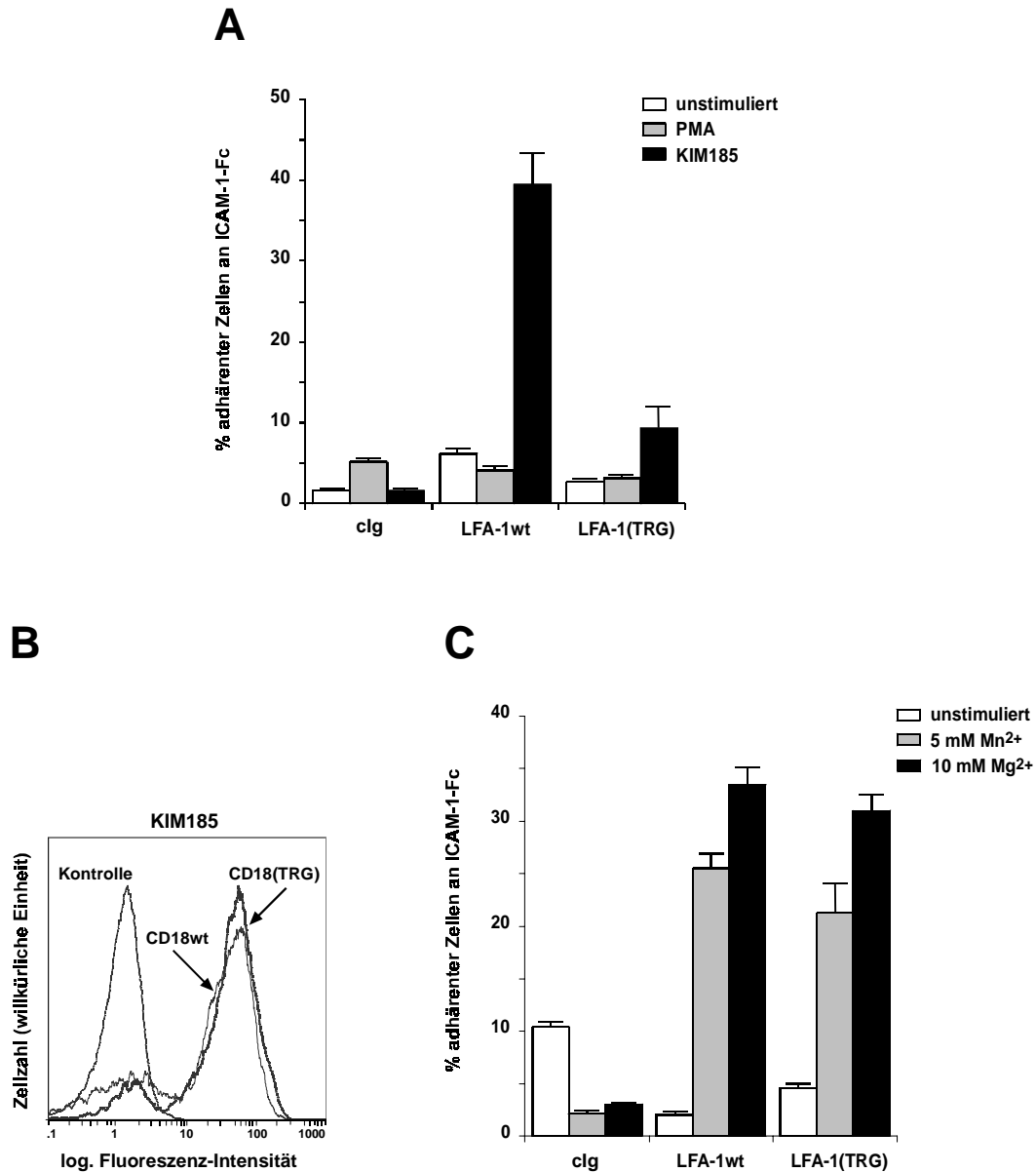
Unstimulierte Zellen zeigten in jedem Fall nur ein sehr geringes Bindungsvermögen für den immobilisierten LFA-1-Liganden (Abb. 16A, weiße Säulen). Allerdings führte auch eine Inkubation der Zellen mit PMA zu keiner wesentlichen Änderung dieser Adhäsionsfähigkeit (Abb. 16A, graue Säulen). Dieser Befund legte die Vermutung nahe, daß LFA-1, das ektopisch auf HeLa-Zellen exprimiert wurde, nicht durch PMA-induzierte Signalkaskaden aktiviert werden konnte. Ein vergleichbares Verhalten zeigte auch ektopisch auf K562-Zellen exprimiertes LFA-1 (vgl. 4.3.2).

Nach Inkubation mit KIM185 zeigten HeLa-Zellen, die LFA-1wt exprimierten, eine etwa um das neunfache gesteigerte Adhäsion an ICAM-1-Fc, im Vergleich zur Grundadhäsion. Die Grundadhäsion entsprach dabei dem Bindungsvermögen unstimulierter Zellen.

Im Gegensatz dazu waren entsprechend behandelte Zellen, die LFA-1(TRG) exprimierten, in ihrer Adhäsionsfähigkeit stark beeinträchtigt. Sie wiesen, verglichen mit unstimulierten Zellen, nur eine etwa 2,5-fach höhere Adhäsion auf (Abb. 16A, schwarze Säulen).

Mittels Durchflußzytometrie konnte dabei sicher gestellt werden, daß KIM185 beide Formen von LFA-1 in vergleichbarer Weise detektierte (Abb. 16B).

LFA-1(TRG), das Cytohesin-1 nicht mehr binden konnte, schien somit auch in seiner Funktion als Adhäsionsmolekül stark beeinträchtigt zu sein.



**Abb. 16: Adhäsionsanalysen mit HeLa-Zellen nach Überexpression von LFA-1wt bzw. LFA-1(TRG).**

LFA-1wt, LFA-1(TRG) bzw. cIg wurden mittels rekombinanter Vaccinia-Viren für 12-14 h in HeLa-Zellen überexprimiert. Anschließend wurde die Adhäsionsfähigkeit der Zellen an immobilisiertes ICAM-1-Fc analysiert. **A)** Die Zellen wurden vor der Adhäsion entweder ohne zusätzliche Stimuli (weiße Säulen) oder mit 40 ng/ml PMA für 10 min (graue Säulen) bzw. mit 600 ng/1 Mio. Zellen KIM185 für 30 min (schwarze Säulen) behandelt. **B)** Detektion der extrazellulären CD18-Kette von LFA-1wt bzw. LFA-1(TRG) mit Hilfe des anti-CD18-Antikörpers KIM185. Die Detektion erfolgte nach einer zusätzlichen Inkubation mit einem sekundären FITC-konjugierten anti-Maus-Antikörper mittels Durchflußzytometrie. **C)** Die Zellen wurden entweder 30 min mit 5 mM MnCl<sub>2</sub> (graue Säulen) oder 10 mM MgCl<sub>2</sub> (schwarze Säulen) inkubiert und anschließend für Adhäsionsstudien eingesetzt.

Es bestand jedoch die Möglichkeit, daß durch die Einführung der TRG-Mutation eine intramolekulare Konformationsänderung induziert wurde, die die Funktion des Integrins unabhängig von der Interaktion mit Cytohesin-1 beeinträchtigte.

Um die prinzipielle Funktionalität von LFA-1(TRG) zu prüfen, wurden HeLa-Zellen, die LFA-1wt bzw. LFA-1(TRG) exprimierten mit  $Mg^{2+}$  bzw.  $Mn^{2+}$  inkubiert. Diese divalenten Kationen aktivieren LFA-1 unabhängig von intrazellulären Faktoren und sollten daher eine vergleichbare Bindung beider Integrin-Formen an ICAM-1-Fc induzieren.

Wie die Adhäsionsanalysen zeigten (Abb. 16C), wiesen HeLa-Zellen, die LFA-1(TRG) bzw. LFA-1wt exprimierten, nach einer Inkubation mit  $Mn^{2+}$  bzw.  $Mg^{2+}$  ein vergleichbar gesteigertes Bindungsvermögen für ICAM-1-Fc auf (ca. achtfach gesteigert bei  $Mn^{2+}$ , Abb. 16C, graue Säulen; ca. neunfach gesteigert bei  $Mg^{2+}$ , Abb. 16C, schwarze Säulen).

Es schien also wahrscheinlich, daß die reduzierte Adhäsion von LFA-1(TRG)-positiven HeLa-Zellen auf den Verlust der Cytohesin-1/CD18-Interaktion zurückzuführen war.

#### **4.4.3 Funktionale Analyse von LFA-1(TRG) nach Expression in LFA-1-defizienten T-Zellen**

LFA-1 wird spezifisch auf Leukocyten exprimiert. HeLa-Zellen stellten somit ein unphysiologisches System zur Analyse der Integrin-Funktion dar. Als besseres Modellsystem konnten T-Zellen fungieren, deren endogene LFA-1-Expression aufgrund eines Gendefektes inhibiert war. Zudem sollte es mit diesem System möglich sein, LFA-1 indirekt durch PMA oder durch Stimulierung von Oberflächenrezeptoren zu aktivieren, um somit die Ligandenbindung ausschließlich durch intrazelluläre Signale zu induzieren.

Vor allem aus Studien mit LAD-T-Zell-Linien war bekannt, daß die LFA-1-Expression in  $\beta_2$ -Integrin-defizienten Zellen durch einen CD18-Gen-Transfer rekonstituiert werden konnte, da die endogene  $\alpha$ -Kette normalerweise korrekt translatiert war (Hibbs *et al.*, 1991a; Bauer *et al.*, 1998). In CD18-defizienten T-Zellen war es daher möglich, sowohl LFA-1wt als auch LFA-1(TRG) durch Einführung der entsprechenden CD18-Kette zu exprimieren.

Für Zelladhäsionsanalysen (3.2.6.1) wurden die T-Zell-Klone SK- $\beta_2.7$  und LAD19 verwendet.

SK- $\beta_2.7$  ist ein T-Zell-Klon, der durch chemische Mutagenese aus der T-Zell-Linie SKW3 selektiert wurde. SK- $\beta_2.7$  synthetisiert keine CD18-mRNA und weist somit kein endogenes LFA-1 auf (Weber *et al.*, 1997).

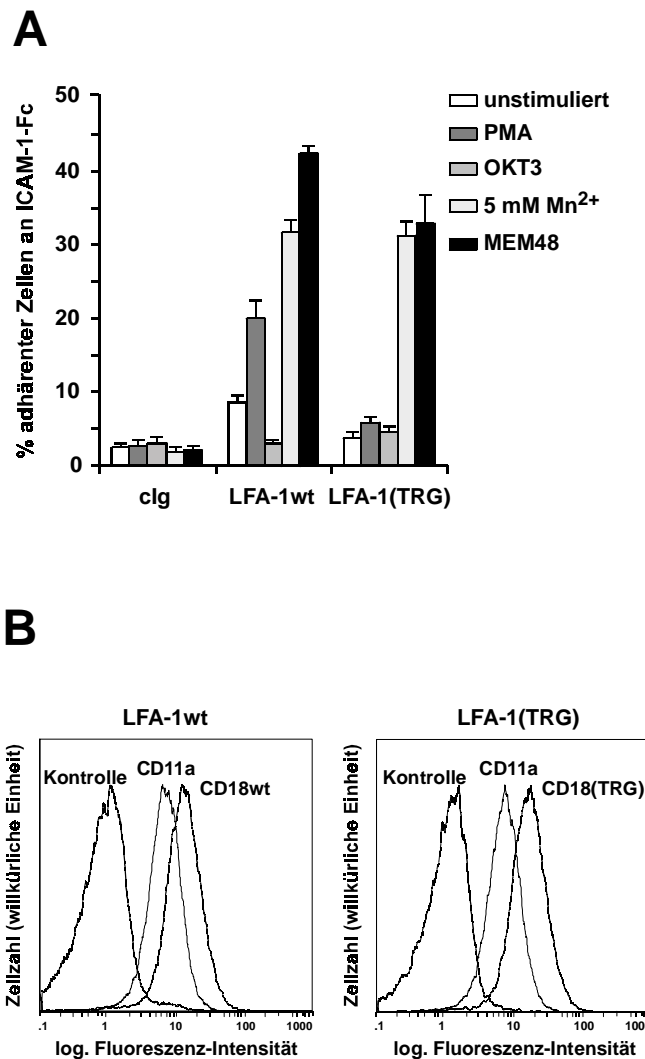
Durch die Expression der CD18wt- bzw. CD18(TRG)-Untereinheit mittels rekombinanter Vaccinia-Viren gelang es, das korrespondierende LFA-1-Integrin an der Zelloberfläche von SK- $\beta_2.7$ -Zellen zu exprimieren (Abb. 17B). Diese Zellen wurden für Adhäsionsanalysen eingesetzt und werden im Folgenden als SK- $\beta_2.7$ -LFA-1wt bzw. SK- $\beta_2.7$ -LFA-1(TRG) bezeichnet.

Im unstimulierten Zustand wiesen SK- $\beta_2.7$ -LFA-1wt eine leicht erhöhte Grundadhäsion an ICAM-1-Fc auf, verglichen mit SK- $\beta_2.7$ -LFA-1(TRG) oder mit Zellen, die zur Kontrolle cIg exprimierten (Abb. 17A, weiße Säulen). Eine Inkubation mit PMA resultierte nur bei SK- $\beta_2.7$ -LFA-1wt in einer deutlich gesteigerten Adhäsion an ICAM-1-Fc. Diese lag etwa 4,5-fach höher als die Adhäsion von SK- $\beta_2.7$ -LFA-1(TRG). LFA-1(TRG) konnte durch den intrazellulären Stimulus nicht zur Bindung an ICAM-1-Fc aktiviert werden (Abb. 17A, dunkelgraue Säulen).

Zusätzlich sollte die Zelladhäsion nach Stimulierung des T-Zell-Rezeptor(TCR)-Komplexes analysiert werden. Die Aktivierung des Oberflächenrezeptors sollte hierbei durch eine antikörpervermittelte Quervernetzung mit Hilfe des anti-TCR-Antikörpers OKT3 erfolgen.

Es zeigte sich jedoch, daß weder SK- $\beta_2.7$ -LFA-1wt noch SK- $\beta_2.7$ -LFA-1(TRG) durch Inkubation mit OKT3 zu einer verstärkten Adhäsion an ICAM-1-Fc stimuliert werden konnten (Abb. 17A, mittelgraue Säulen). Eine nähere Analyse ergab, daß OKT3 nicht in der Lage war, den TCR-Komplex auf SK- $\beta_2.7$ -Zellen zu detektieren. Daher lag die Vermutung nahe, daß die chemische Mutagenese zur Generierung der SK- $\beta_2.7$ -Zellen auch einen Defekt der TCR-Expression zur Folge hatte. Eine Charakterisierung der Zellen bzgl. der TCR-Expression war bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht erfolgt.

Die prinzipielle Funktionalität von LFA-1wt und LFA-1(TRG) auf SK- $\beta_2.7$ -Zellen wurde wiederum durch extrazelluläre Stimuli überprüft. Die Zellen wurden entweder mit  $Mn^{2+}$  (Abb. 17A, hellgraue Säulen) oder mit dem aktivierenden anti-CD18-Antikörper MEM48 (Abb. 17A, schwarze Säulen) inkubiert und ihre Bindung an ICAM-1-Fc analysiert. Sowohl SK- $\beta_2.7$ -LFA-1wt als auch SK- $\beta_2.7$ -LFA-1(TRG) zeigten dabei eine vergleichbar gesteigerte Adhäsion an ICAM-1-Fc. Diese lag etwa vierfach (im Falle von  $Mn^{2+}$ ) bzw. etwa fünffach (im Falle von MEM48) über der Grundadhäsion.



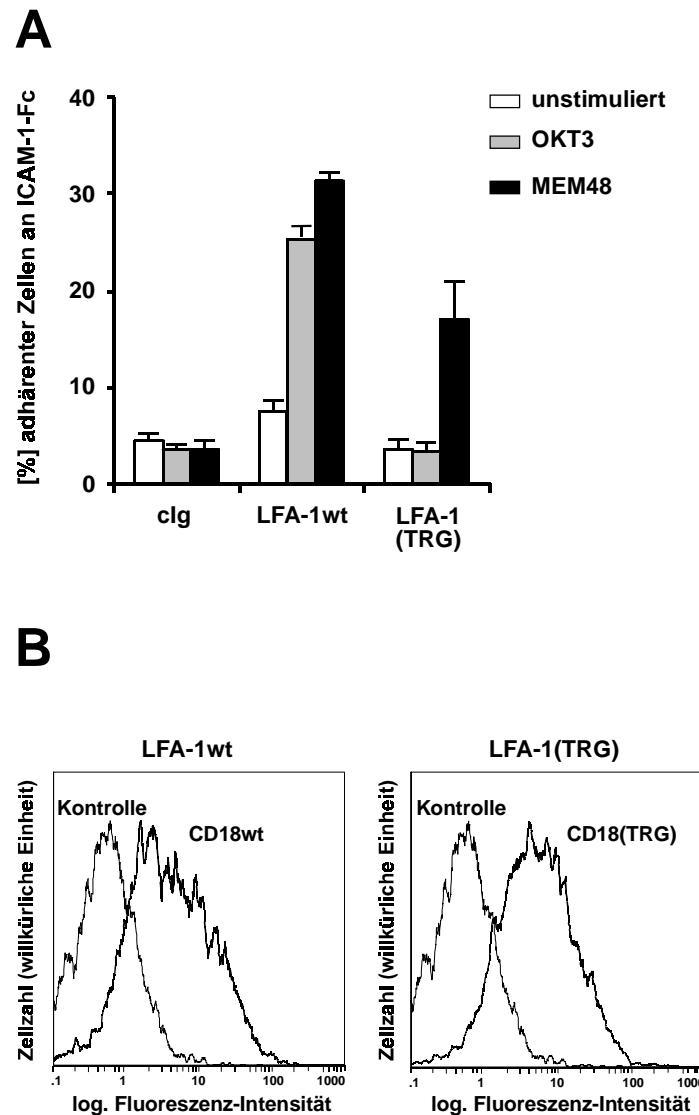
**Abb. 17: Adhäsionsanalysen mit SK- $\beta_2.7$ -Zellen nach Überexpression von LFA-1wt bzw. LFA-1(TRG).**

**A)** SK- $\beta_2.7$ -Zellen wurden mit rekombinantem Vaccinia-Virus zur Expression von CD18wt, CD18(TRG) bzw. clg infiziert. Nach einer sechsstündigen Expression wurden die Zellen mit verschiedenen Agenzien stimuliert (100 ng/ml PMA für 10 min (dunkelgraue Säulen), 2  $\mu$ g/ml OKT3 für 30 min (mittelgraue Säulen), 5 mM MnCl<sub>2</sub> für 30 min (hellgraue Säulen) oder 1  $\mu$ g/ml MEM48 für 30 min (schwarze Säulen)) und ihr Adhäsionsvermögen an immobilisiertes ICAM-1-Fc ermittelt. **B)** Analyse der Zelloberflächenexpression von LFA-1 auf SK- $\beta_2.7$ -Zellen nach Überexpression von CD18wt bzw. CD18(TRG) mittels Durchflußzytometrie. Die CD18-Detektion erfolgte durch den Antikörper MEM48, der CD11a-Nachweis durch den Antikörper MHM24.

In weiteren Experimenten wurde die Bindungsfähigkeit von LFA-1wt und LFA-1(TRG) an ICAM-1-Fc nach Expression im T-Zell-Klon LAD19 analysiert.

LAD19 war ursprünglich aus Blut eines LAD-Patienten isoliert worden und ebenfalls durch einen Defekt in der Synthese der CD18-mRNA charakterisiert (Vennegoor *et al.*, 1992).

Mit Hilfe rekombinanter Vaccinia-Viren konnte CD18wt bzw. CD18(TRG) und damit das korrespondierende  $\beta_2$ -Integrin auf LAD19-Zellen exprimiert werden (Abb. 18B).



**Abb. 18: Adhäsionsanalysen mit LAD19-Zellen nach Überexpression von LFA-1wt bzw. LFA-1(TRG).** A) LAD19-Zellen wurden mit rekombinanten Vaccinia-Virus zur Expression von CD18wt, CD18(TRG) bzw. cIg infiziert. Nach einer sechsstündigen Expression wurden die Zellen mit verschiedenen Agenzien stimuliert (2 µg/ml OKT3 für 30 min (graue Säulen) oder 1 µg/ml MEM48 für 30 min (schwarze Säulen)) und ihre Adhäsionsfähigkeit an immobilisiertes ICAM-1-Fc ermittelt. B) Analyse der Oberflächenexpression von LFA-1 auf LAD19-Zellen nach Überexpression von CD18wt bzw. CD18(TRG) mittels Durchflußzytometrie. Die CD18-Detektion erfolgte durch den Antikörper MEM48.

In erster Linie interessierte die Frage, inwieweit eine Stimulierung des TCR den Aktivierungszustand von LFA-1(TRG) modulieren konnte. Hierzu wurden LAD19-Zellen, die LFA-1wt, LFA-1(TRG) bzw. cIg (zur Kontrolle) exprimierten, mit OKT3 inkubiert und ihre Bindung an ICAM-1-Fc in Zelladhäsionsstudien ermittelt. Wie Abbildung 18 veranschaulicht, zeigten LAD19-Zellen nach Quervernetzung des TCR nur dann eine gesteigerte Adhäsion (3,5-fach gesteigert, gegenüber der Adhäsion unstimulierter Zellen), wenn sie LFA-1wt auf der Zelloberfläche trugen. Zellen die LFA-1(TRG) exprimierten, konnten nicht zur Bindung



an ICAM-1-Fc stimuliert werden (Abb. 18A, graue Säulen).

Eine Inkubation der Zellen mit dem aktivierenden Antikörper MEM48 konnte beide Integrin-Formen zur Bindung an ICAM-1-Fc aktivieren (Abb. 18A, schwarze Säulen). Allerdings wiesen hierbei Zellen, die LFA-1wt exprimierten, eine 1,5-fach höhere Adhäsion auf, im Vergleich zu Zellen, die LFA-1(TRG)-positiv waren. Ob das aktivierende Potential von MEM48 im LAD19-Modellsystem durch intrazelluläre Faktoren beeinflusst wurde oder ob dieser Befund einen Artefakt darstellte, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht eingehender analysiert.

Sowohl die Adhäsionsanalysen mit humanen T-Zell-Klonen als auch mit HeLa-Zellen zeigten, daß LFA-1, dessen CD18-Untereinheit die TRG-Mutation trug, stark in seiner Fähigkeit an ICAM-1-Fc zu binden beeinträchtigt war. Die membranproximale Region der cytoplasmatischen Domäne von CD18 schien also eine wichtige Rolle bei der Regulation der Integrin-Funktion zu spielen.

#### **4.4.4 Funktionale Analyse von LFA-1(TRG) nach stabiler Expression in HeLa-Zellen**

Die bisher dargestellten Adhäsionsstudien konnten die regulatorische Rolle von Cytohesin-1 in der Integrin-Aktivierung nur indirekt dokumentieren. Um den direkten Einfluß des cytoplasmatischen Faktors zu untersuchen, war es nötig, die Adhäsion von LFA-1(TRG)-positiven Zellen zu analysieren, die zusätzlich Cytohesin-1 überexprimierten.

Die Infektion von HeLa-Zellen mit drei verschiedenen Viren (zur Expression von CD18, CD11a und Cytohesin-1) erwies sich als äußerst schwierig und führte nicht zu einer ausreichenden Expression dieser drei Proteine. Auch die Koexpression von Cytohesin-1 und der  $\beta_2$ -Untereinheit in SK- $\beta_2.7$ -Zellen ermöglichte nur eine unzureichende Expression sowohl des Integrins als auch des cytoplasmatischen Faktors so daß keine eindeutige Analyse der Cytohesin-1-Funktion möglich war.

Aus diesem Grund wurden HeLa-Zellen generiert, die LFA-1wt bzw. LFA-1(TRG) stabil exprimierten (3.2.2.14). Diese Zelllinien werden im Folgenden als HeLFA-1wt bzw. HeTRG bezeichnet.

Abbildung 19B (obere Reihe) zeigt die Detektion von LFA-1 auf HeLFA-1wt bzw. HeTRG. Die Zelllinien wiesen eine sehr hohe Expressionsdichte des Integrins auf, diese konnte nicht erzielt werden, wenn LFA-1 mit Hilfe rekombinanter Vaccinia-Viren in humanen Zellen exprimiert wurde (vgl. Abb. 15B, 17B und 18B).

Die Adhäsionsfähigkeit von HeLFA-1wt und HeTRG an ICAM-1-Fc wurde wiederum anhand von Zelladhäsionsstudien (3.2.6.1) untersucht. Cytohesin-1 wurde als cIg-Fusionsprotein (cIg-Cytohesin-1 bzw. cIg-Cyh-1) mit Hilfe von rekombinantem Vaccinia-Virus exprimiert. HeLFA-1wt bzw. HeTRG, die zur Kontrolle den cIg-Fusionsanteil exprimierten, zeigten eine verhältnismäßig hohe Grundadhäsion. Diese resultierte vermutlich aus der hohen Integrindichte, die möglicherweise zu einer partiellen Multimerisierung und damit zu einer teilweisen Aktivierung von LFA-1 führte.

Trotz der erhöhten Grundadhäsion konnte die Bindung von HeLFA-1wt an ICAM-1-Fc durch die Überexpression von cIg-Cytohesin-1 weiter gesteigert werden. Die Adhäsion lag dabei etwa zweifach über der Grundadhäsion. Im Gegensatz dazu zeigten HeTRG nach Überexpression von cIg-Cytohesin-1 keine Änderung ihrer Adhäsionsfähigkeit (Abb. 19A, weiße Säulen).

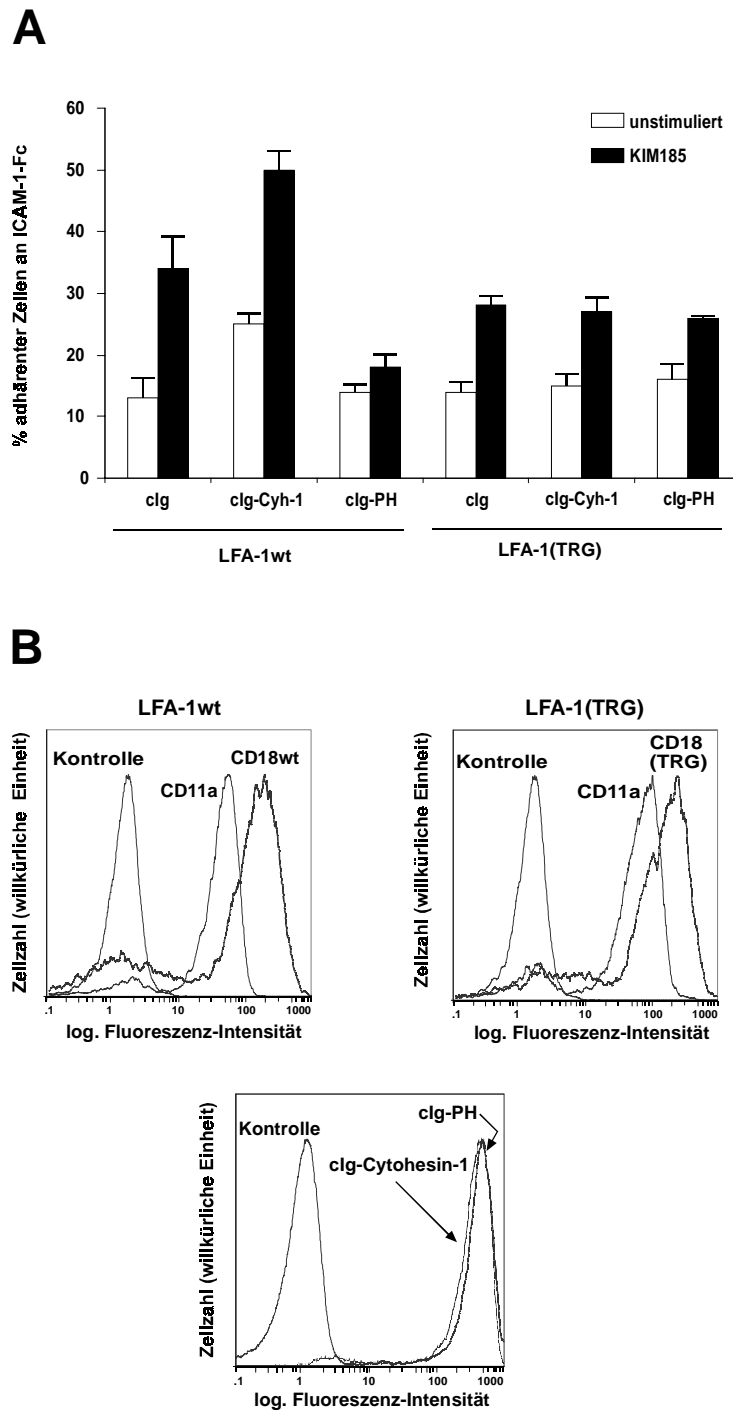
Wurde HeLFA-1wt bzw. HeTRG nach Überexpression von Cytohesin-1 zusätzlich mit KIM185 inkubiert, so konnte ebenfalls eine unterschiedliche Adhäsionsfähigkeit der einzelnen Zelllinien beobachtet werden. HeLFA-1wt adhärierte ca. zweifach besser an ICAM-1-Fc als HeTRG (Abb. 19A, schwarze Säulen).

Zusätzlich wurde der Einfluß der isolierten PH-Domäne von Cytohesin-1 auf die Zelladhäsion analysiert. Kolanus *et al.* (1996) dokumentierten, daß eine Überexpression der PH-Domäne in Jurkat E6-Zellen eine vollständige Inhibierung der Adhäsion an ICAM-1-Fc zur Folge hatte.

Wurde ein cIg-PH-Fusionsprotein mit Hilfe rekombinanter Vaccinia-Viren in HeLFA-1wt bzw. HeTRG überexprimiert, so führte dies zwar zu keiner vollständigen Inhibierung der Zelladhäsion, allerdings zeigten die Zellen auch in keinem Fall eine, über die Grundadhäsion hinaus gesteigerte Bindung an ICAM-1-Fc (Abb. 19A, weiße Säulen).

Eine zusätzliche Inkubation der Zellen mit KIM185 bewirkte jeweils nur eine geringfügig höhere Bindung von LFA-1wt bzw. LFA-1(TRG) an ICAM-1-Fc (Abb. 19A, schwarze Säulen).

Die Ergebnisse dieser Zelladhäsionsstudien stützten die Annahme, daß Cytohesin-1 die Aktivierung von LFA-1 durch Interaktion mit CD18 regulieren konnte.



**Abb. 19: Adhäsionsanalysen mit HeLa-Zellen nach stabiler Expression von LFA-1wt bzw. LFA-1(TRG) und Überexpression von clg-Cytohesisin-1.**

**A)** HeLa-Zellen, die stabil LFA-1wt bzw. LFA-1(TRG) exprimierten, wurden generiert. clg-Cytohesisin-1, clg-PH bzw. clg wurden mittels rekombinanter Vaccinia-Viren für 6 h überexprimiert und die Zellen anschließend entweder unstimuliert (weiße Säulen) oder nach Stimulation mit 600 ng/1 Mio. Zellen KIM185 für 30 min (schwarze Säulen) in Adhäsionsanalysen eingesetzt.

**B obere Reihe)** Analyse der Oberflächenexpression von LFA-1 auf HeLFA-1wt bzw. HeTRG mittels Durchflußzytometrie. Die Detektion erfolgte durch die Antikörper MEM48 (CD18) und MHM48 (CD11a).

**B untere Reihe)** Detektion der Expression von clg-Cytohesisin-1 bzw. clg-PH. Der Nachweis erfolgte über Durchflußzytometrie mit einem anti-Human-IgG-Antikörper.

## 4.5 Cytohesin-1 induziert das Epitop 24 auf Jurkat E6-Zellen

Welche molekularen Ereignisse führten nach Bindung von Cytohesin-1 an die cytoplasmatische Domäne von CD18 zur Aktivierung von LFA-1?

Denkbar war die Induktion einer Konformationsänderung und eine damit verbundene erhöhte Bindungsaffinität des Integrins für seinen Liganden.

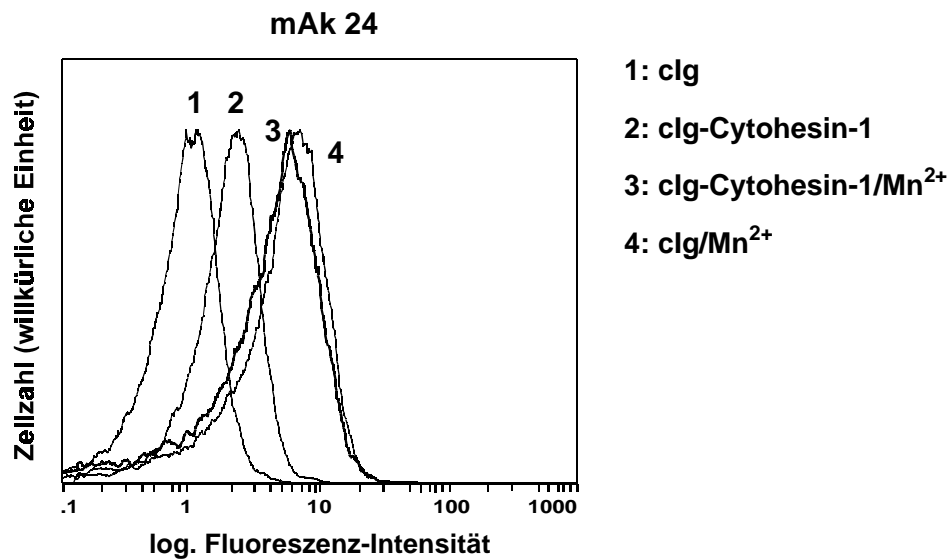
Die Literatur beschreibt eine Reihe von Antikörpern, die distinkte Aktivierungsepitope auf Integrinen detektieren und somit Rückschlüsse auf eventuelle Konformationsänderungen zulassen (Hynes, 1992; van Kooyk *et al.*, 1991). Um eine mögliche Modulation der LFA-1-Konformation durch Cytohesin-1 zu analysieren, wurde der monoklonale Antikörper 24 (mAk 24) verwendet. MAk 24 detektiert ein  $Mg^{2+}$ -abhängiges Epitop, das Epitop 24, das nur auf  $\beta_2$ -Integrinen, die sich in einem hochaffinen Zustand befinden, auftritt. Die Induktion dieses Epitops kann auch durch  $Mn^{2+}$  erfolgen (Dransfield und Hogg, 1989; Dransfield *et al.*, 1992).

Zur Prüfung, ob Cytohesin-1 in der Lage war das Epitop 24 auf LFA-1 zu induzieren, wurden Jurkat E6-Zellen verwendet. Diese Zellen exprimieren endogenes LFA-1. Nach Überexpression von cIg-Cytohesin-1 bzw. cIg (zur Kontrolle), wurden die Zellen mit mAk 24 bei RT gefärbt und die Bindung des Antikörpers an das Integrin mittels Durchflußzytometrie analysiert (3.2.4.7). Als positive Kontrolle dienten Zellen, die vor der Antikörperfärbung mit  $Mn^{2+}$  inkubiert worden waren.

Wie Abbildung 20 zeigt, konnte nach Stimulierung mit  $Mn^{2+}$  das Epitop 24 auf LFA-1 detektiert werden, unabhängig davon, ob Jurkat E6-Zellen cIg oder cIg-Cytohesin-1 überexprimierten (Abb. 20, Graphen 3 und 4).

Die Überexpression von cIg-Cytohesin-1 führte ebenfalls zu einer Bindung des mAk 24 an LFA-1, auch ohne zusätzliche Inkubation mit  $Mn^{2+}$  (Abb. 20, Graph 2). Die Fähigkeit von cIg-Cytohesin-1 zur Induktion des Epitops 24 entsprach dabei etwa 50% der Aktivierungsfähigkeit von  $Mn^{2+}$ .

Diese Ergebnisse legten die Vermutung nahe, daß Cytohesin-1 möglicherweise eine Konformationsänderung des Integrins induzieren konnte, die mit einer Affinitätsänderung korrelierte.



**Abb. 20: Detektion des Epitops 24 auf Jurkat E6-Zellen nach Überexpression von cIg-Cytohesin-1.**  
 In Jurkat E6-Zellen wurde mittels rekombinanter Vaccinia-Viren cIg bzw. cIg-Cytohesin-1 für ca. 6 h überexprimiert und die Zellen anschließend ohne oder mit 5 mM MnCl<sub>2</sub> für 30 min bei 37°C stimuliert. Nach Färbung mit mAk 24 und der anschließenden Inkubation mit einem sekundären FITC-konjugierten Antikörper bei RT, wurde das Auftreten des Epitops 24 mittels Durchflußzytometrie detektiert.

#### 4.6 Die funktionale Rolle der Guaninnukleotid-Austauschfunktion von Cytohesin-1 in der T-Zell-Adhäsion

Die direkte Interaktion von Cytohesin-1 und CD18 ist nur eine der bisher dokumentierten Funktionen von Cytohesin-1.

*In vitro*-Studien von Meacci *et al.* (1997) zeigten, daß die SEC7-Domäne von Cytohesin-1 den Guaninnukleotid-Austausch (GDP/GTP-Austausch) an gereinigtem ADP-Ribosylierungsfaktor 3 (ARF3) katalysieren konnte. Diese Beobachtung stand im Einklang mit Arbeiten anderer Forschungsgruppen, die dokumentierten, daß die SEC7-Domänen von Cytohesin-2 (ARNO) und Gea1, ein Protein aus *S. cerevisiae*, ebenfalls als Katalysatoren des GDP/GTP-Austausches an ARF-Proteinen fungierten (Chardin *et al.*, 1996; Peyroche *et al.*, 1996).

Im Jahr 1998 wurde Cytohesin-1 als Guaninnukleotid-Austauschfaktor (kurz GEF, für guanine nucleotide exchange factor) für unmyristoyliertes ARF1 beschrieben.

Die Rolle der GEF-Funktion von Cytohesin-1 in der T-Zell-Adhäsion war bis dahin noch nicht untersucht worden. Zur Analyse dieses Problems wurde eine Punktmutante von Cytohesin-1, Cytohesin-1(E157K), verwendet, die bereits zur Verfügung stand. T. Knorr konnte zei-

gen, daß die Punktmutation E157 nach K, die in der SEC7-Domäne lokalisiert war, in einem vollständigen Verlust der GEF-Funktion *in vitro* resultierte (Knorr *et al.*, 2000). Dieser Befund stützte die Annahme, daß Glutamat 157 kritisch für die katalytische Aktivität von Cytohesin-1 war (Betz *et al.*, 1998).

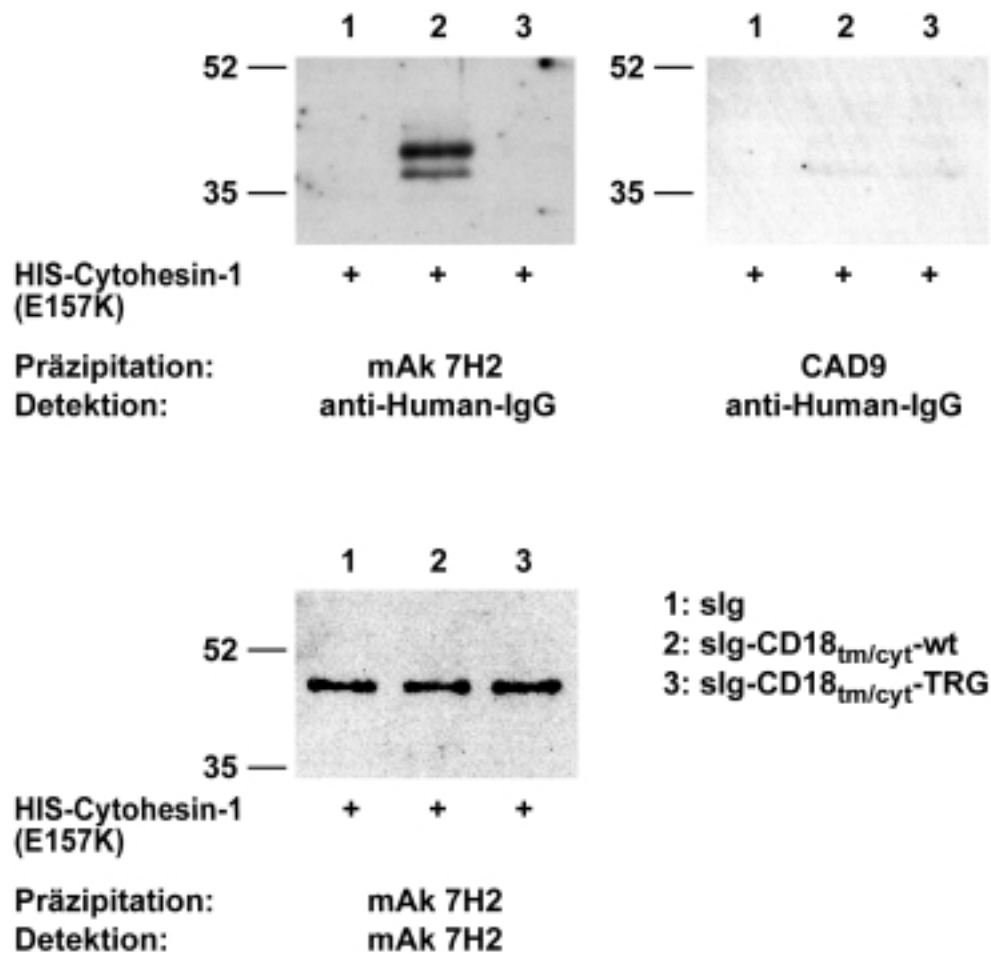
#### **4.6.1 *In vitro*-Präzipitationsstudien mit sIg-CD18<sub>tm/cyt</sub>-Fusionsproteinen und HIS-Cytohesin-1(E157K)**

Zunächst stellte sich die Frage, ob die Punktmutation E157K zu einer Beeinträchtigung der Cytohesin-1/CD18-Interaktion führte.

Zur Analyse wurden Präzipitationsstudien *in vitro* mit rekombinantem, gereinigtem HIS-Cytohesin-1(E157K) und sIg-CD18<sub>tm/cyt</sub>-Fusionsproteinen, wie bereits unter 4.3.3 beschrieben, durchgeführt. Sowohl die Interaktion von HIS-Cytohesin-1(E157K) und sIg-CD18<sub>tm/cyt</sub>-wt als auch sIg-CD18<sub>tm/cyt</sub>-TRG wurde hierbei charakterisiert.

Wie Abbildung 21 zeigt, war HIS-Cytohesin-1(E157K), ähnlich HIS-Cytohesin-1, in der Lage, sIg-CD18<sub>tm/cyt</sub>-wt aus einem COS7-Gesamtzelllysat zu immobilisieren (Abb. 21, oben links, Spur 2), während sIg-CD18<sub>tm/cyt</sub>-TRG und sIg keine Bindungsaffinität für die GEF-defekte Punktmutante zeigten (Abb. 21, oben links, Spuren 3 und 1).

In allen Ansätzen konnte dabei HIS-Cytohesin-1(E157K) in vergleichbaren Mengen mit Hilfe des monoklonalen anti-Cytohesin-1-Antikörpers 7H2 an der Matrix immobilisiert werden (Abb. 21, unten). Die Spezifität der Interaktion wurde mit dem 7H2-isotypenspezifischen Kontroll-Antikörper CAD9 analysiert. Erwartungsgemäß führte die Verwendung dieses Antikörpers zu keiner Präzipitation von sIg-CD18-Fusionsproteinen (Abb. 21, oben rechts).



**Abb. 21:** *In vitro*-Präzipitationsstudien zur Analyse der sIg-CD18<sub>tm/cyt</sub>/HIS-Cytohesin-1(E157K)-Interaktion.

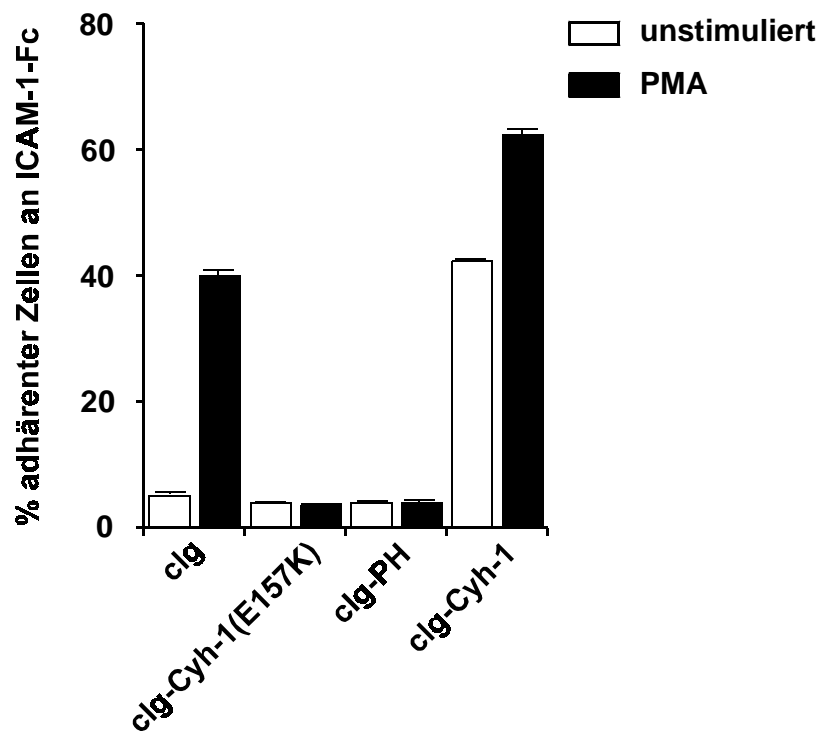
Die Fusionsproteine sIg-CD18<sub>tm/cyt</sub>-wt (2), sIg-CD18<sub>tm/cyt</sub>-TRG (3) sowie sIg (1) wurden mittels rekombinanter Vaccinia-Viren in COS7-Zellen überexprimiert. Gereinigtes HIS-Cytohesin-1(E157K) wurde über mAk 7H2 an 96-Well-Mikrotiterplatten immobilisiert (obere und untere Abbildungen links, Spuren 1, 2 und 3) und mit Brij58-Gesamtzelllysaten, hergestellt aus den infizierten COS7-Zellen, inkubiert. Präzipitierte Proteine wurden über SDS-PAGE und Western-Blot analysiert, wobei der Inhalt von jeweils vier Wells eines gleichen Ansatzes vereinigt wurde und einer Gelspur entsprach. Zur Kontrolle der spezifischen Präzipitation wurde der Antikörper CAD9 eingesetzt (obere Abbildung rechts).

Diese Präzipitationsstudien zeigten, daß die Mutation der für die GEF-Funktion von Cytohesin-1 kritischen Aminosäure keinen Einfluß auf die Cytohesin-1/CD18-Interaktion *in vitro* hatte. Desweiteren bestätigten sie die Beobachtung, daß die Einführung der TRG-Mutation in die cytoplasmatische Domäne von CD18 zu einem Bindungsverlust mit Cytohesin-1 führte.

#### 4.6.2 Regulation der T-Zell-Adhäsion an ICAM-1-Fc durch Überexpression von Cytohesin-1 bzw. Cytohesin-1(E157K)

Die Rolle der GEF-Funktion von Cytohesin-1 in der Regulation der LFA-1/ICAM-1-Bindung wurde mit Hilfe von Zelladhäsionsstudien (3.2.6.1) analysiert.

cIg-Cytohesin-1 bzw. cIg-Cytohesin-1(E157K) wurde in Jurkat E6-Zellen überexprimiert und die Adhäsionsfähigkeit der Zellen an immobilisiertes ICAM-1-Fc analysiert (Abb. 22).



**Abb. 22:** Adhäsionsanalysen mit Jurkat E6-Zellen nach Überexpression von cIg-Cytohesin-1 bzw. cIg-Cytohesin-1(E157K).

Die verschiedenen cIg-Fusionsproteine wurden mittels rekombinanter Vaccinia-Viren für 6 h in Jurkat E6-Zellen überexprimiert und ihre Adhäsion an immobilisiertes ICAM-1-Fc analysiert. Eine Stimulierung der Zellen erfolgte mit 40 ng/ml PMA (schwarze Säulen).

Die Überexpression von cIg-Cytohesin-1 führte bereits ohne zusätzliche Aktivierung von LFA-1 durch PMA zu einer signifikant erhöhten Zelladhäsion an ICAM-1-Fc. Diese war etwa achtfach gegenüber der Grundadhäsion gesteigert. Die Grundadhäsion wurde dabei durch die Bindungsfähigkeit von Zellen definiert, die nur den cIg-Fusionsanteil exprimierten. Eine zusätzliche Inkubation der Zellen mit PMA bewirkte eine weitere Steigerung der Adhäsionsfä-



higkeit. Jurkat E6 die dabei cIg-Cytohesin-1 überexprimierten, zeigten eine 1,5-fach höhere Bindung an ICAM-1-Fc als vergleichbar behandelte Zellen, die cIg exprimierten.

Diese Ergebnisse bestätigten die bereits von Kolanus *et al.* (1996) dokumentierten Befunde.

Überraschenderweise resultierte die Überexpression von cIg-Cytohesin-1(E157K) in Jurkat E6-Zellen in einer vollständigen Inhibierung der Zelladhäsion. Die Bindung der Zellen an ICAM-1-Fc konnte dabei auch durch eine Inkubation mit PMA nicht induziert werden.

Ein vergleichbarer Effekt trat auf, wenn Jurkat E6-Zellen die isolierte PH-Domäne von Cytohesin-1 überexprimierten.

Um eine stabile T-Zell-Adhäsion an ICAM-1 zu gewährleisten, schien folglich die Interaktion von Cytohesin-1 und CD18 nicht ausreichend zu sein. Auch die GEF-Funktion des cytoplasmatischen Regulators war hierfür entscheidend. Die molekularen Prozesse, die dabei durch die Katalyse des GDP/GTP-Austausches induziert wurden und schließlich zur Aktivierung des Integrins führten, waren jedoch unklar.

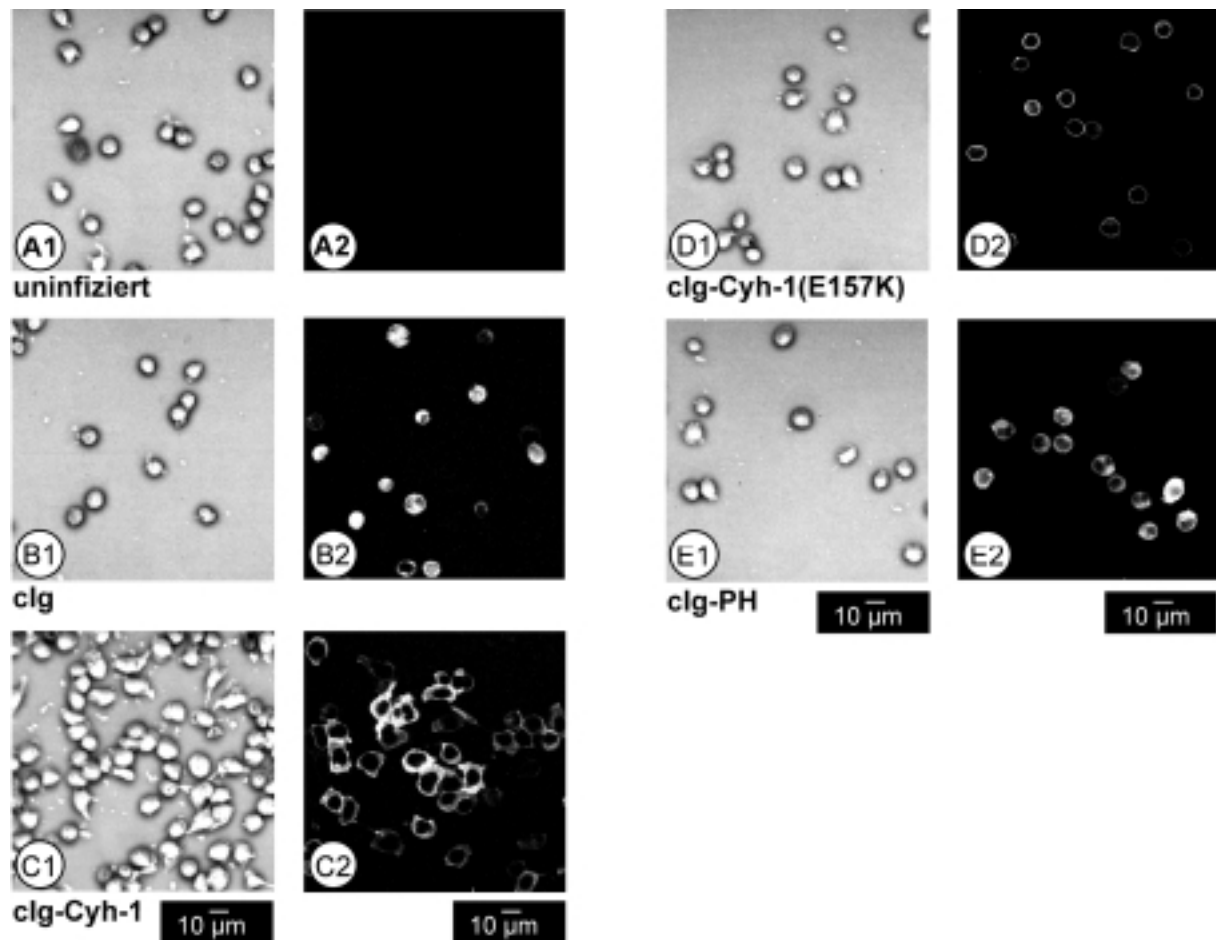
#### **4.6.3 “Spreading“ von Jurkat E6-Zellen nach Überexpression von Cytohesin-1 bzw. Cytohesin-1(E157K)**

Eine Zelle, die stabil über LFA-1 an ICAM-1 adhärert, weist in der Regel eine veränderte Morphologie auf. Die Zelle breitet sich auf ihrer Adhäsionsunterlage aus und verliert dadurch ihre ursprüngliche sphärische Form. Diese dynamische Strukturänderung der Zellmembran wird als „Spreading“ bezeichnet.

Dr. W. Nagel analysierte den Einfluß von Cytohesin-1 bzw. Cytohesin-1(E157K) auf das „Spreading“ von Jurkat E6-Zellen. Er exprimierte hierzu die entsprechenden cIg-Fusionsproteine, cIg-Cytohesin-1 bzw. cIg-Cytohesin-1(E157K), mittels rekombinanter Vaccinia-Viren in Jurkat E6, brachte die Zellen auf einer ICAM-1-Fc-Unterlage zur Adhäsion und untersuchte ihre Morphologie mit Hilfe der Phasenkontrastmikroskopie (Geiger *et al.*, 2000). Die Ergebnisse dieser Studien sind in Abbildung 23 dargestellt.

Die Überexpression von cIg-Cytohesin-1 induzierte ein starkes „Spreading“ der Zellen, einhergehend mit einer stabilen Adhäsion an ICAM-1-Fc (Abb. 23, C1). Im Gegensatz dazu führte die Überexpression von cIg-Cytohesin-1(E157K) zu keiner erkennbaren Veränderung der Zellmorphologie. Zudem wiesen die Zellen nur eine geringe Adhäsionsfähigkeit auf (Abb. 23, D1). Uninfizierte Jurkat E6 bzw. Jurkat E6, die zur Kontrolle cIg-PH oder cIg überexprimierten, zeigten ein vergleichbares Verhalten (Abb. 23, A1 bzw. E1 und B1).

Die Expression der jeweiligen cIg-Fusionsproteine wurde dabei mittels Immunfluoreszenz überprüft (Abb. 23, A2 - E2).



**Abb. 23:** „Spreading“ von adhärenenten Jurkat E6-Zellen nach Überexpression von cIg-Cytohesin-1 bzw. cIg-Cytohesin-1(E157K).

Jurkat E6-Zellen wurden zur Überexpression von cIg, cIg-Cytohesin-1, cIg-Cytohesin-1(E157K) bzw. cIg-PH für 6 h mit rekombinantem Vaccinia-Virus infiziert und anschließend auf einer mit ICAM-1-Fc-beschichteten Unterlage zur Adhäsion gebracht. Die Morphologie adhärenenten Zellen wurde mit Hilfe der Phasenkontrastmikroskopie analysiert (A1- E1). Die Kontrolle der Proteinexpression erfolgte mittels Immunfluoreszenz an einem konfokalen Lasermikroskop, nach Anfärbung des cIg-Fusionsanteils mit Hilfe eines FITC-konjugierten anti-Human-IgG-Antikörpers (A2 – E2). (Die hier dargestellten Experimente wurden von Dr. W. Nagel durchgeführt.)

Das „Spreading“ adhärenenten Zellen, das vermutlich durch Umlagerungen des Cytoskelettes begünstigt wird, scheint ein wichtiger Faktor zur Gewährleistung einer stabilen Zelladhäsion zu sein. Die Überexpression der GEF-defekten Mutante von Cytohesin-1 konnte das „Spreading“ von T-Zellen nicht induzieren. Womöglich spielt die GEF-Funktion eine Rolle bei der Cytoskelett-Modulation und ist auf diese Weise an der Aufrechterhaltung einer stabilen Zelladhäsion beteiligt.

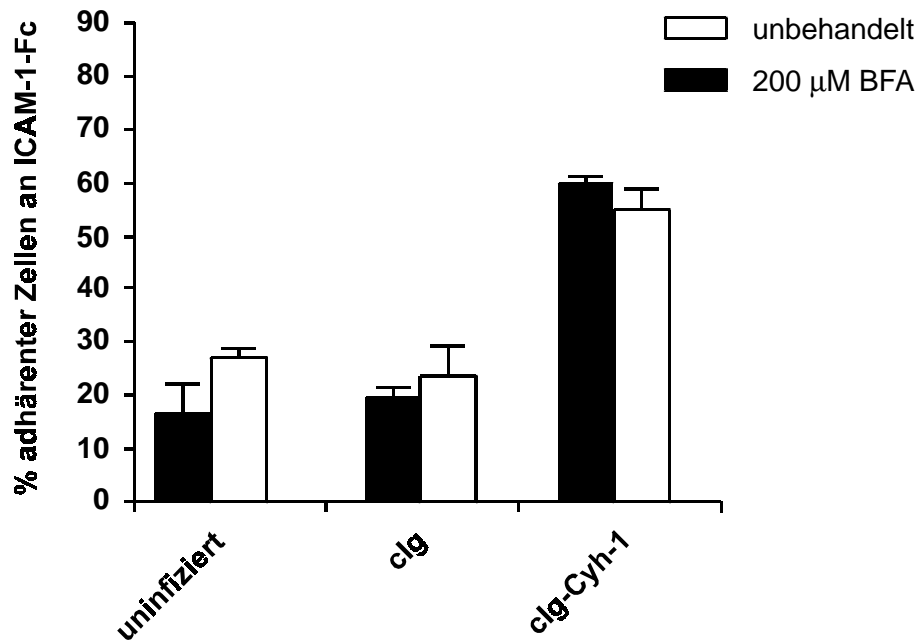
## 4.7 Einfluß von Brefeldin A auf die LFA-1-abhängige T-Zell-Adhäsion

Die GEF-Funktion von Cytohesin-1 könnte neben Umlagerungen des Cytoskelettes auch andere intrazelluläre Prozesse regulieren. *In vitro*-Analysen der Cytohesin-1-GEF-Funktion verschiedener Arbeitsgruppen deuteten darauf hin, daß ARF1 das primäre Substrat des GDP/GTP-Austauschfaktors sein konnte ((Meacci *et al.*, 1997; Pacheco-Rodriguez *et al.*, 1998). ARF1 und allgemein ARF-Proteine der Klasse I (hierzu zählen ARF1 - ARF3) spielen eine wichtige Rolle bei intrazellulären Transportprozessen vom ER zum Golgi und innerhalb des Golgi-Apparates (Moss und Vaughan, 1995). Zudem konnten Meacci *et al.* (1997) zeigen, daß Cytohesin-1 die Bindung von ARF1 an Golgi-Membranen *in vitro* induzierte.

Daher lag die Vermutung nahe, daß Cytohesin-1 durch die Aktivierung vesikulärer Transportprozesse die LFA-1-abhängige T-Zell-Adhäsion regulieren konnte. Hinweise für diese Hypothese sollten Experimente liefern, die den Einfluß von Brefeldin A (BFA) auf die T-Zell-Adhäsion analysierten. BFA ist ein Toxin, das vesikuläre Transportprozesse vom ER zum Golgi reversibel inhibiert und zur Auflösung der Golgi-Struktur führt (Lippincott-Schwartz *et al.*, 1991; Wood *et al.*, 1991).

Jurkat E6-Zellen, die durch eine Überexpression von cIg-Cytohesin-1 zu einer verstärkten Bindung an ICAM-1-Fc aktiviert wurden, zeigten allerdings nach einer einstündigen Inkubation mit BFA keine signifikante Änderung ihrer Adhäsionsfähigkeit (Abb. 24).

Diese Beobachtung ließ darauf schließen, daß intrazelluläre, BFA-sensitive Transportprozesse keine Rolle in der Regulation der Zelladhäsion an ICAM-1 spielten.



**Abb. 24: Adhäsionsanalyse mit Jurkat E6-Zellen nach Überexpression von cIg-Cytohesin-1 und Inkubation mit BFA.**

Jurkat E6-Zellen wurden für 6 h mit rekombinantem Vaccinia-Virus zur Expression von cIg-Cytohesin-1 bzw. cIg infiziert. Die Zellen wurden anschließend unbehandelt (weiße Säulen) oder nach Inkubation mit BFA (200 µM, 1 h bei 37°C; schwarze Säulen) für Zelladhäsionsanalysen eingesetzt.

#### 4.8 Die Rolle der PI3-Kinase in der Regulation der LFA-1-abhängigen T-Zell-Adhäsion

Eine Überexpression der isolierten PH-Domäne von Cytohesin-1 in Jurkat E6-Zellen führte zu einer vollständigen Inhibition der Zelladhäsion an ICAM-1-Fc (Kolanus *et al.*, 1996). Welcher molekulare Mechanismus dieser Inhibition zugrunde lag und welche Funktion der PH-Domäne bei der Regulierung der T-Zell-Adhäsion zukam, war zunächst unklar. PH-Domänen dienen einer Vielzahl von Proteinen als Membranrekrutierungsmodule (Pawson, 1995; Shaw, 1996), und Arbeiten von Nagel *et al.* (1998a) konnten zeigen, daß die PH-Domäne von Cytohesin-1 vermutlich ebenfalls für die Rekrutierung des Proteins an die Plasmamembran verantwortlich war. Die intrazellulären Signale, die diese Rekrutierung kontrollierten, waren nicht bekannt.

Die Arbeiten von Nagel *et al.* (1998a) ließen vermuten, daß die Assoziation der Cytohesin-1-PH-Domäne mit der Plasmamembran spezifisch über Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphat (PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>) erfolgte. Phosphatidylinositolphosphate gelten als Substrate bzw. Produkte

der Phosphatidylinositol-3'-Kinase (PI3-Kinase) (Shimizu und Hunt, 1996). Zusätzlich deuteten Analysen *in vitro* darauf hin, daß die Spezifität der GEF-Aktivität von Mitgliedern der Cytohesin-Familie durch Phosphatidylinositolphosphate reguliert sein könnte (Chardin *et al.*, 1996; Klarlund *et al.*, 1998).

Eine Rolle der PI3-Kinase in der Regulation der Zelladhäsion war bereits durch verschiedene Studien dokumentiert worden (Shimizu *et al.*, 1995; Zell *et al.*, 1996; Ward *et al.*, 1996).

Daher sollte der Einfluß der PI3-Kinase auch im Hinblick auf die Regulierung der LFA-1-abhängigen T-Zell-Adhäsion untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden Zelladhäsionsstudien (3.2.6.1) mit Jurkat E6-Zellen durchgeführt, die eine konstitutiv aktive Form der PI3-Kinase, im Folgenden als P110\* bezeichnet, überexprimierten (Abb. 25). P110\* ist ein chimäres Protein, bestehend aus der katalytischen Untereinheit p110 (von PI3-Kinase  $\alpha$  aus Maus), die an den C-Terminus der iSH2(inter-Src homology region 2)-Domäne der regulatorischen p85-Untereinheit fusioniert war und einen carboxyterminalen Myc-Fusionsanteil trug (Hu *et al.*, 1995; Nagel *et al.*, 1998a).

Der Einsatz einer konstitutiv aktiven Form der PI3-Kinase war nötig, da die direkte Aktivierung des endogenen Enzyms schwierig ist (Hu *et al.*, 1995). Ein rekombinanter Vaccinia-Virus zur Expression von P110\* stand bereits zur Verfügung.

Wie in Abbildung 25 graphisch dargestellt, wiesen Jurkat E6-Zellen, die P110\* überexprimierten, eine etwa dreifach höhere Adhäsion an immobilisiertes ICAM-1-Fc auf, als Zellen die zur Kontrolle den cIg-Fusionsanteil exprimierten. Eine vergleichbare Steigerung der Zelladhäsion konnte durch die Überexpression von cIg-Cytohesin-1 erzielt werden.

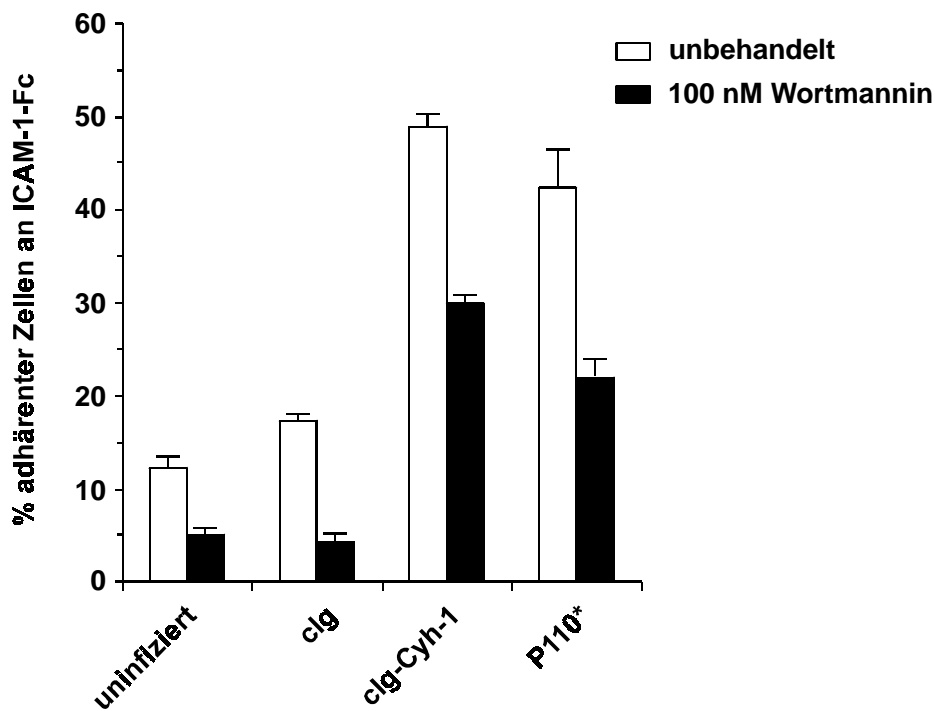
PI3-Kinase schien somit in der Lage zu sein, die Bindung von LFA-1 an ICAM-1-Fc zu induzieren.

Diese Vermutung wurde durch weitere Experimente gestützt, die die Analyse des Einflusses von Wortmannin auf die Zelladhäsion zum Gegenstand hatten. Wortmannin gilt als spezifischer Inhibitor der katalytischen Untereinheit p110 der PI3-Kinase. Sehr hohe Konzentrationen des Toxins (Konzentrationen  $>1 \mu\text{M}$ ) können allerdings auch zur Inhibierung anderer Enzyme führen (Ward *et al.*, 1996).

Jurkat E6, die cIg-Cytohesin-1 bzw. P110\* überexprimierten, zeigten nach einer Inkubation mit 100 nm Wortmannin ein signifikant reduziertes Vermögen an ICAM-1-Fc zu adhären (um ca. 50% im Falle von P110\*, um ca. 40% im Falle von cIg-Cytohesin-1 reduziert), verglichen mit Zellen, die ohne Behandlung mit Wortmannin für Zelladhäsionsanalysen eingesetzt wurden (Abb. 25).

Eine vollständige Inhibition der Zelladhäsion konnte durch Wortmannin jedoch nicht erreicht werden. Die eingesetzte Wortmannin-Konzentration war möglicherweise nicht ausreichend, um eine effektive Hemmung der P110\* zu gewährleisten, die nach Expression mit Hilfe rekombinanter Vaccinia-Viren in sehr hoher Konzentration in den Zellen vorlag. Ebenso wäre es aber auch denkbar, daß Wortmannin nicht in der Lage war, die verwendete Isoform der PI3-Kinase spezifisch zu inhibieren.

Die Aktivierung von LFA-1 durch cIg-Cytohesin-1 konnte mittels Wortmannin partiell inhibiert werden. Dies ließ den Schluß zu, daß eine direkt durch Cytohesin-1 induzierte stabile Zelladhäsion an ICAM-1 teilweise die Aktivität der PI3-Kinase benötigte.



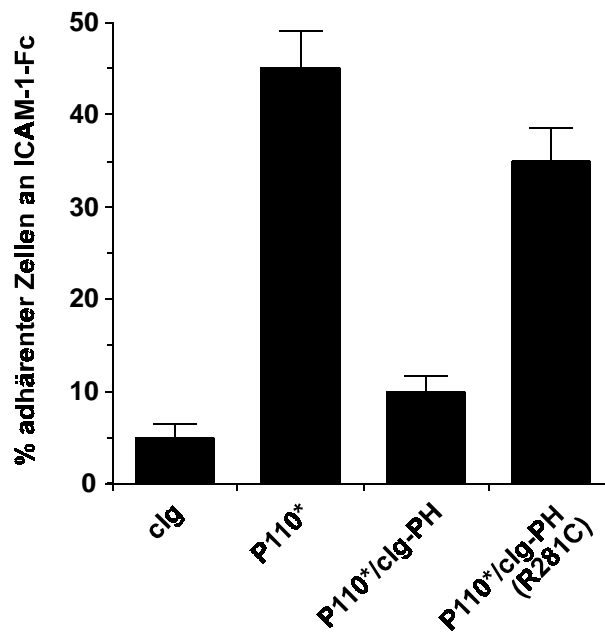
**Abb. 25: Adhäsionsanalysen mit Jurkat E6-Zellen nach Überexpression von P110\*.**

Jurkat E6-Zellen wurden für 6 h mit rekombinanten Vaccinia-Viren, zur Expression von cIg-Cytohesin-1, P110\* bzw. cIg, infiziert. Die Zellen wurden anschließend unbehandelt (weiße Säulen) oder nach Inkubation mit Wortmannin (100 nM, 30 min bei 37°C; schwarze Säulen) für Zelladhäsionsanalysen eingesetzt.

Gegenstand weiterer Analysen war die Frage, über welchen Mechanismus PI3-Kinase in den Cytohesin-1-Signalweg involviert war. Es schien plausibel, daß die Kinase durch Umsetzung von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> (Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat) zu PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> (Whitman *et al.*, 1988) die Rekrutierung von Cytohesin-1 an die Plasmamembran über die PH-Domäne regulierte (Nagel *et al.*, 1998a).

Zur Stützung dieser Hypothese wurden Experimente durchgeführt, die die P110\*-induzierte T-Zell-Adhäsion an ICAM-1-Fc in Abhängigkeit der isolierten PH-Domäne untersuchten. Hierzu wurden P110\* und ein cIg-Fusionsprotein der Cytohesin-1-PH-Domäne (cIg-PH) in Jurkat E6-Zellen koexprimiert und die Zelladhäsion an ICAM-1-Fc ermittelt. Parallel wurde anstelle der PH-Domäne cIg-PH(R281C) koexprimiert. PH(R281C) ist eine Punktmutante der PH-Domäne von Cytohesin-1, deren Bindung an Phosphatidylinositolphosphat inhibiert ist (Nagel *et al.*, 1998a).

Wie Abbildung 26 zeigt, waren Zellen die P110\* und cIg-PH exprimierten nicht mehr in der Lage, an ICAM-1-Fc zu adhären. Wurden dagegen P110\* und cIg-PH(R281C) in Jurkat E6-Zellen koexprimiert, so führte dies zu einer gesteigerten Zelladhäsion. Diese lag etwa vier- bis fünffach über der Grundadhäsion und entsprach in etwa den Werten, die durch Überexpression von nur P110\* in Jurkat E6-Zellen erzielt werden konnten.



**Abb. 26: Adhäsionsanalysen mit Jurkat E6-Zellen nach Koexpression von P110\* und cIg-PH.** P110\*, P110\*/cIg-PH, P110\*/cIg-PH(R281C) bzw. cIg wurde mittels rekombinanter Vaccinia-Viren in Jurkat E6-Zellen für 6 h überexprimiert und die Adhäsion der Zellen an immobilisiertes ICAM-1-Fc analysiert.

Diese Ergebnisse und von Dr. W. Nagel durchgeführte Studien (Nagel *et al.*, 1998a) deuteten darauf hin, daß PI3-Kinase in die Regulation der LFA-1-abhängigen T-Zell-Adhäsion durch Induktion einer verstärkten Rekrutierung von Cytohesin-1 an die Plasmamembran involviert sein könnte. Die Rekrutierung der isolierten PH-Domäne an die Membran würde folglich die Rekrutierung von Cytohesin-1 und damit die Interaktion mit LFA-1 inhibieren.

#### **4.9 Der Einfluß verschiedener CD18-Peptide auf die Guaninnukleotid-Austauschfunktion von Cytohesin-1**

Die SEC7-Domäne von Cytohesin-1 trägt die Bindungsstelle für CD18 und zugleich das katalytische Zentrum der Guaninnukleotid-Austauschfunktion. Dies warf die Frage auf, ob ein Cytohesin-1-Molekül in der Lage war, mit LFA-1 zu interagieren und gleichzeitig als Guaninnukleotid-Austauschfaktor zu fungieren.

Aufschluß hierüber sollten Studien *in vitro* liefern, die den von Cytohesin-1 katalysierten GDP/GTP-Austausch an ARF1 in Anwesenheit verschiedener CD18-Peptide analysierten und somit Hinweise auf die Formierung ternärer Komplexe, bestehend aus Cytohesin-1, CD18 und ARF1, geben konnten.

ARF1 stellte ein sehr gutes Substrat für Cytohesin-1 *in vitro* dar (Knorr *et al.*, 2000; vgl. 4.7). Zudem konnten Knorr *et al.* (2000) zeigen, daß der von Cytohesin-1 katalysierte GDP/GTP-Austausch an myristoyliertem ARF1 spezifisch durch die Anwesenheit von PtdIns[3,4,5]P<sub>3</sub>-haltigen Liposomen gesteigert werden konnte (vgl. auch 4.8).

Zur Analyse der GEF-Aktivität von Cytohesin-1 wurde daher eine Versuchsanordnung gewählt, die der von Knorr *et al.* (2000) beschriebenen Methode entsprach (3.2.6.2). Myristoyliertes ARF1, mit einem C-terminalen cIg-Fusionsanteil (ARF1-cIg), wurde mittels rekombinanter Vaccinia-Viren exprimiert und an Protein-A-Sepharose immobilisiert. Der Austausch von GDP gegen radioaktiv markiertes, hydrolysebeständiges [ $\gamma$ -<sup>35</sup>S]GTP an ARF1 erfolgte unter Anwesenheit von gereinigtem HIS-Cytohesin-1 und PtdIns[3,4,5]P<sub>3</sub>-haltigen Liposomen. Sowohl rekombinante Vaccinia-Viren zur Expression von ARF1-cIg als auch PtdIns[3,4,5]P<sub>3</sub>-haltige Liposomen standen bereits zur Verfügung. Zusätzlich wurden dem Reaktionsansatz verschiedene CD18-Peptide zugesetzt. Dazu waren Peptide folgender Aminosäuresequenz synthetisiert worden:



CD18 <sub>cyt</sub> -WKA16 (kurz: WKA):	H <sub>2</sub> N-WKALIHLSDLREYRRF-COOH
CD18 <sub>cyt</sub> -TRG16 (kurz: TRG):	H <sub>2</sub> N-TRGLIHLSDLREYRRF-COOH
CD18 <sub>cyt</sub> -C-Term23 (kurz: C-Term):	H <sub>2</sub> N-WNNDNPLFKSATSTVMNPKFAES-COOH

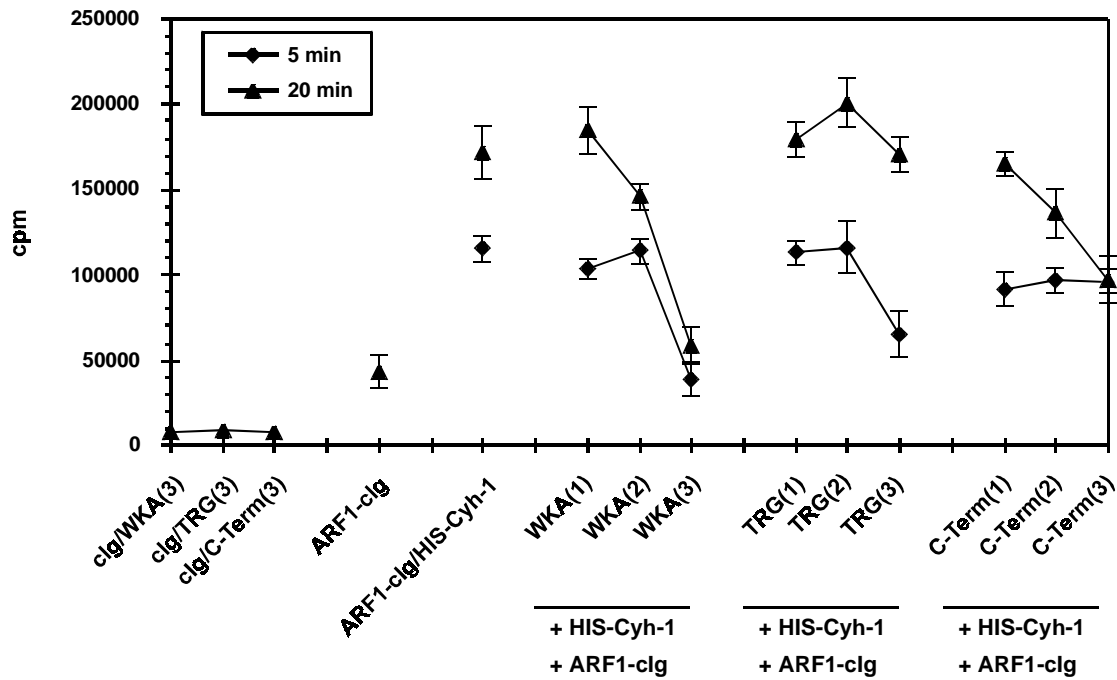
Das Peptid CD18<sub>cyt</sub>-WKA16, das sich aus den 15 N-terminalen Aminosäuren der cytoplasmatischen Domäne von CD18 und des W723 zusammensetzte, trug die Bindungsstelle für Cytohesin-1. Im Gegensatz dazu sollten die Peptide CD18<sub>cyt</sub>-TRG16 und CD18<sub>cyt</sub>-C-Term23 nicht mehr in der Lage sein, mit Cytohesin-1 zu interagieren. CD18<sub>cyt</sub>-TRG16 entsprach der CD18<sub>cyt</sub>-WKA16-Sequenz, enthielt jedoch die WKA(723-725)TRG-Mutation, CD18<sub>cyt</sub>-C-Term23 stellte den C-Terminus der cytoplasmatischen Domäne von CD18 dar.

Die Bindung von [ $\gamma$ -<sup>35</sup>S]GTP an ARF1-cIg wurde jeweils nach einer Zeit von fünf bzw. 20 Minuten gemessen, um eine Gleichgewichtseinstellung der Reaktion zu gewährleisten. Zusätzlich wurde der Einfluß unterschiedlicher Peptid-Konzentrationen (100 nM (1), 400 nM (2) bzw. 40  $\mu$ M (3)) untersucht.

Wie Abbildung 27 zeigt, war HIS-Cytohesin-1 in der Lage, den GDP/GTP-Austausch an ARF1-cIg effektiv zu katalysieren. Bei Anwesenheit von CD18<sub>cyt</sub>-WKA16 wurde die Austauschfunktion mit steigender Peptidkonzentration inhibiert. Eine Reduktion der katalytischen Aktivität von HIS-Cytohesin-1 konnte dabei nach einer 20-minütigen Reaktionszeit durch etwa äquimolare Mengen (400 nM (2)) von CD18<sub>cyt</sub>-WKA16 beobachtet werden und dieser Effekt wurde durch einen hohen Überschuß an Peptid (40  $\mu$ M; WKA(3)) noch weiter verstärkt.

Wurde dagegen das Peptid CD18<sub>cyt</sub>-TRG16 eingesetzt, dessen Bindung an Cytohesin-1 inhibiert sein sollte, so war nach einer 20-minütigen Reaktionszeit keine Reduktion der Cytohesin-1-GEF-Funktion zu beobachten. Dieser Befund war unabhängig von der Peptid-Konzentration.

CD18<sub>cyt</sub>-C-Term23 verhielt sich nach einer Reaktionszeit von 5 min inert, induzierte jedoch nach 20 Minuten eine konzentrationsabhängige Reduktion des Cytohesin-1-katalysierten GTP-Einbaus. Die Verminderung des GDP/GTP-Austausches war allerdings geringer, als die durch CD18<sub>cyt</sub>-WKA16 induzierte Reduktion. Ob der C-Terminus der cytoplasmatischen Domäne von CD18 in der Lage war, die GEF-Funktion von Cytohesin-1 an ARF1 spezifisch zu inhibieren, wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht näher analysiert.



**Abb. 27:** Der Einfluß verschiedener CD18-Peptide auf die GEF-Funktion von Cytohesin-1 gegenüber ARF1.

Der von Cytohesin-1-katalysierte GDP/GTP-Austausch an ARF1 wurde analysiert. ARF1-clg bzw. clg wurden in COS7-Zellen mittels rekombinanter Vaccinia-Viren überexprimiert und an Protein-A-Sepharose präzipitiert. Die verschiedenen CD18-Peptide wurden jeweils in Konzentrationen von 100 nM (1), 400 nM (2) bzw. 40  $\mu$ M (3), HIS-Cytohesin-1 und PtdIns[3,4,5] $P_3$ -haltige Liposomen jeweils in einer Endkonzentration von 0,02  $\mu$ g/ $\mu$ l, [ $\gamma$ - $^{35}$ S]GTP in einer Endkonzentration von 0,02  $\mu$ Ci/ $\mu$ l eingesetzt. Jeweils nach fünf und 20 min wurde die Reaktion abgestoppt und der Einbau an radioaktiv markiertem [ $\gamma$ - $^{35}$ S]GTP mit Hilfe eines Scintillationszählers gemessen. Die Meßwerte stellen Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen dar.

Ausgehend von diesen Daten schien eine Komplexformierung von ARF1, Cytohesin-1 und CD18 unwahrscheinlich. Das Peptid CD18cyt-WKA16 schien effektiv um die Interaktion mit Cytohesin-1 zu kompetitieren und damit die GEF-Funktion des Proteins zu inhibieren. Ferner stützte dieses Experiment die Annahme, daß die Einführung der TRG-Mutation im N-Terminus der cytoplasmatischen Domäne von CD18 die Interaktion mit Cytohesin-1 blockierte.

## 5 Diskussion

Das Integrin LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen 1; CD11a/CD18) stellt eines der wichtigsten Adhäsionsmoleküle der Leukocyten dar. LFA-1 vermittelt u. a. die stabile Adhäsion der Leukocyten an Fibroblasten, Endothel- und Epithelzellen und ist in die Regulation der B-Zell-Antwort sowie in den durch NK-Zellen vermittelten Zelltod involviert (Springer, 1990).

Die cytoplasmatische Domäne des Integrins spielt als Transmitter bidirektionaler Signale eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle dieser Funktionen. Die genauen molekularen Mechanismen zur Regulation von LFA-1 sind bisher jedoch nur wenig aufgeklärt.

Kolanus *et al.* (1996) identifizierten das cytoplasmatische Protein Cytohesin-1, das in die Regulation des „inside-out-signaling“ - die Transduktion intrazellulärer Signale in die extrazelluläre Domäne – von LFA-1 involviert zu sein schien. Cytohesin-1 wurde als spezifischer Interaktor der cytoplasmatischen Domäne von CD18 identifiziert, wobei die SEC7-Domäne von Cytohesin-1 als Vermittler dieser Interaktion fungierte.

Zwar konnten Kolanus *et al.* (1996) zeigen, daß Cytohesin-1 bei der Regulation der Zelladhäsion an den LFA-1-Liganden ICAM-1 eine Rolle spielen mußte, die Mechanismen, die dabei durch das cytoplasmatische Protein induziert wurden, waren jedoch nicht bekannt.

In dieser Arbeit wurden die Funktionen von Cytohesin-1 molekularbiologisch, zellbiologisch und biochemisch analysiert. Die direkte Interaktion des Proteins mit der cytoplasmatischen Domäne von CD18 sowie seine Guaninnukleotid-Austauschfunktion wurden auf ihre Relevanz für die Kontrolle der Zelladhäsion untersucht. Die Ergebnisse dieser Studien enthüllten einen dualen Wirkmechanismus von Cytohesin-1 in der Regulation der durch LFA-1-vermittelten T-Zell-Adhäsion.

### 5.1 Endogenes LFA-1 und Cytohesin-1 kolokalisieren in LCL-721-Zellen

Kolanus *et al.* (1996) konnten durch Protein-Protein-Interaktionsanalysen in Hefe und durch biochemische Bindungsstudien die Interaktion von Cytohesin-1 und der cytoplasmatischen Domäne von CD18 zeigen. Die Koimmunpräzipitation von endogenem LFA-1 und Cytohesin-1 aus der humanen T-Zell-Linie Jurkat E6, die von einer kooperierenden Arbeitsgruppe

durchgeführt worden war, schien jedoch schwierig zu sein, da sie nicht stabil reproduzierbar war.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Koimmunpräzipitation von LFA-1 und Cytohesin-1 im Labor etabliert werden. Dies gelang allerdings nicht. Es konnten keine Bedingungen gefunden werden, die die Interaktion der beiden Bindungspartner während der Zellyse aufrecht erhielten und damit die Kopräzipitation ermöglichten.

Diese Beobachtungen lassen vermuten, daß die Interaktion von LFA-1 und Cytohesin-1 durch eine hohe Dissoziationsrate charakterisiert ist oder einer raschen, dynamischen Regulation unterliegt. Es wäre auch denkbar, daß die Bindung von Cytohesin-1 an LFA-1 durch Faktoren begünstigt bzw. stabilisiert wird, die bisher noch nicht bekannt sind und die in den gewählten Systemen nicht vorhanden waren.

Um die Interaktion von endogenem LFA-1 und Cytohesin-1 zu dokumentieren, wurde daher nach alternativen Methoden gesucht. Der Nachweis der Kolokalisation der beiden Interaktionspartner in intakten Zellen mittels Immunfluoreszenz, unter Einsatz der konfokalen Lasermikroskopie, schien ein geeignetes Verfahren darzustellen.

Kolokalisieren zwei Proteine in einer Zelle, so liefert dies einen Hinweis auf ihre räumliche Nähe zueinander. Die Kolokalisation stellt zwar keinen Ersatz für eine Koimmunpräzipitation dar, da sie keinen direkten Beweis für eine Interaktion zweier Proteine liefern kann, allerdings erscheint eine Assoziation der Proteine sehr wahrscheinlich.

Für Kolokalisationsstudien wurde in dieser Arbeit die lymphoblastoide B-Zell-Linie LCL-721 verwendet. Nach einer Antikörper-vermittelten Quervernetzung von LFA-1 konnte eine sehr gute Kolokalisation von Cytohesin-1 und dem aggregierten Integrin in distinkten Bereichen der Plasmamembran nachgewiesen werden. Cytohesin-1 war aus dem Cytoplasma in die Bereiche des akkumulierten LFA-1 rekrutiert worden.

Durch Studien von Dr. W. Nagel, im Labor von Dr. W. Kolanus, konnte auch bei anderen Zelllinien, wie z. B. Jurkat E6 oder der cytotoxischen T-Zell-Linie 234, eine Kolokalisation von Cytohesin-1 und LFA-1 demonstriert werden.

Vergleichbare Ergebnisse, im Hinblick auf das Kolokalisationsmuster, konnten bereits Studien mit den CD18-Interaktoren Filamin und  $\alpha$ -Actinin (vgl. 5.2) in humanen Monocyten liefern (Sharma *et al.*, 1995).

Die Kolokalisation von Cytohesin-1 und LFA-1 deutete auf eine Assoziation der beiden Proteine in intakten Zellen hin. Diese Beobachtung stützte die bereits von Kolanus *et al.* (1996), durch biochemische Analysen, erzielten Ergebnisse.

Möglicherweise tritt die Assoziation von Cytohesin-1 und LFA-1 vor allem in spezialisierten Membran-Mikrodomänen, den sogenannten „rafts“ auf. In „rafts“ können neben wichtigen Komponenten biologischer Membranen, wie etwa Sphingolipiden oder Cholesterin, auch transmembrane Proteine angereichert sein (Varma und Mayor, 1998; Friedrichson und Kurzchalia, 1998). Vermutlich kann auch LFA-1 in „rafts“ organisiert werden und es wird spekuliert, daß die Formierung und Aggregation von „rafts“ eine Rolle bei der Integrin-Aktivierung spielen könnte (Krauss und Altevogt, 1999).

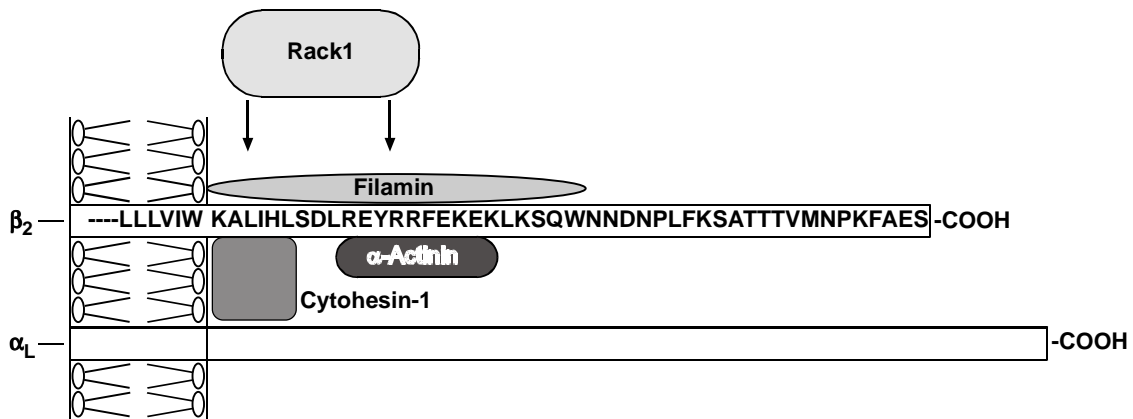
Durch Kolokalisationsstudien in LCL-721-Zellen konnte auch die Spezifität der Cytohesin-1/LFA-1-Assoziation demonstriert werden. Analysen, die die Distribution von Cytohesin-1 und  $\beta_1$ -Integrinen untersuchten, konnten zeigen, daß die Aggregation des Integrins zu keiner Kolokalisation von CD29, der  $\beta_1$ -Untereinheit, und Cytohesin-1 führte.

## **5.2 Die Bindungsstelle für Cytohesin-1 ist in der membranproximalen Region der cytoplasmatischen Domäne von CD18 lokalisiert**

Die Kolokalisationsstudien und die biochemischen Analysen von Kolanus *et al.* (1996) ließen darauf schließen, daß die Cytohesin-1/CD18-Interaktion spezifisch war.

Mit Hilfe von Protein-Protein-Interaktionsanalysen in Hefe, die mit der cytoplasmatischen Domäne von CD18 und der SEC7-Domäne von Cytohesin-1 durchgeführt wurden, konnte die membranproximale Region der cytoplasmatischen Domäne von CD18 (A725 - D731) als Interaktionsbereich für Cytohesin-1 bestimmt werden. Die aminoternale Region war bereits für zwei weitere CD18-Interaktoren als Bindungsstelle analysiert worden (Abb. 28). So konnten beispielsweise durch Bindungsstudien mit CD18-Peptiden die Interaktionsstellen von Filamin und  $\alpha$ -Actinin, beide Proteine stellen Komponenten des Cytoskelettes dar, auf die Region der Aminosäuren K724 – W747 (Filamin) bzw. der Aminosäuren R733 – K742 ( $\alpha$ -Actinin) lokalisiert werden (Sharma *et al.*, 1995; Pavalko *et al.*, 1993). Im Jahr 1998 wurde ein weiterer möglicher Interaktor der membranproximalen Region der cytoplasmatischen Domäne von CD18, das intrazelluläre Protein Rack1 (receptor for activated protein kinase C), publiziert (Lilienthal und Chang, 1998). Sowohl Rack1 als auch Filamin und  $\alpha$ -Actinin stellen jedoch keine spezifischen Interaktoren von CD18 dar, sondern können auch mit den cytoplasmatischen Domänen von  $\beta_1$  (Filamin,  $\alpha$ -Actinin, Rack1),  $\beta_7$  (Filamin) bzw.  $\beta_5$  (Rack1) wechselwirken (Otey *et al.*, 1990; Pfaff *et al.*, 1998; Lilienthal und Chang, 1998;

Hemler, 1998). Auch funktionale Studien mit  $\beta_1$ - und  $\beta_3$ -Integrinen führten zu der Schlußfolgerung, daß dem aminoterminalen Bereich der cytoplasmatischen Domäne der  $\beta$ -Ketten eine entscheidende Rolle in der Regulation der Integrin-Funktion zukam (Hughes *et al.*, 1995; Kashiwagi *et al.*, 1997).



**Abb. 28: Schematische Darstellung bekannter Interaktoren der aminoterminalen Region der cytoplasmatischen Domäne von CD18.**

Cytohesin-1, Filamin,  $\alpha$ -Actinin und Rack1 wurden bislang als Interaktoren der cytoplasmatischen Domäne von CD18 identifiziert, deren Bindungsstelle in der membran-nahen Region der Integrin- $\beta$ -Untereinheit lokalisiert ist. Als spezifischer Interaktor für  $\beta_2$  gilt nach bisherigen Kenntnissen jedoch nur Cytohesin-1.

Die weitere Eingrenzung der Bindungsstelle von Cytohesin-1 in der membranproximalen Region von CD18, erfolgte ebenfalls mittels Protein-Protein-Interaktionsanalysen in Hefe. Hierzu wurde die Interaktion der SEC7-Domäne mit verschiedenen Punktmutanten der cytoplasmatischen Domäne von CD18 charakterisiert.

Erste Ergebnisse dieser Analysen ließen vermuten, daß alleine A725 kritisch für die Bindung an Cytohesin-1 war. Studien, in denen die Funktion des vollständigen LFA-1-Integrins, mit einer Mutation des A725 nach G in der  $\beta$ -Untereinheit, untersucht wurde, konnten diesen Befund jedoch nicht bestätigen.

Vielmehr zeigte sich, daß aller Wahrscheinlichkeit nach die drei aufeinanderfolgenden Aminosäurereste WKA(723 – 725) die Bindung an Cytohesin-1 vermitteln. Eine Mutation von WKA(723 – 725) nach TRG in der cytoplasmatischen Domäne von CD18 resultierte in einem vollständigen Interaktionsverlust mit Cytohesin-1.

Die Aminosäurereste WKA(723 - 725) stellen die N-terminalen Aminosäuren der cytoplasmatischen Domäne von CD18 dar, wobei W723 vermutlich noch im transmembranen Bereich liegt (Fabbri *et al.*, 1999; LaFlamme *et al.*, 1997). Die Interaktionsstelle von Cytohesin-1 be-

fände sich folglich unmittelbar am N-Terminus der cytoplasmatischen Domäne von CD18. Einen ähnlichen Bindungsbereich fanden beispielsweise auch Liliental und Chang (1998) für den CD18-Interaktor Rack1. Sie stellten fest, daß das KALI-Motiv (Aminosäuren 724 – 727) in  $\beta_2$  kritisch für die Interaktion von Rack1 war.

Die Mutation von WKA(723 – 725) nach TRG inhibierte zwar die Interaktion von CD18 und Cytohesin-1, dennoch war nicht eindeutig geklärt, ob dieses Sequenzmotiv die eigentliche Bindungsstelle für Cytohesin-1 darstellte oder ob diese möglicherweise C-terminal von WKA lokalisiert war. Es war denkbar, daß auch die Aminosäure H728 der cytoplasmatischen Domäne von CD18 eine Rolle bei der Interaktionsvermittlung spielte. Eine entsprechend generierte Punktmutante (H728R) wies in Protein-Protein-Interaktionsanalysen in Hefe ein stark reduziertes Bindungsverhalten für Cytohesin-1 auf. Diese Mutante wurde im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht näher analysiert.

Die Mutation von WKA(723 – 725) nach TRG könnte Konformationsänderungen C-terminal von der WKA-Sequenz induziert und somit die eigentliche Bindungsstelle für Cytohesin-1 modifiziert haben.

Sekundärstruktur-Berechnungen von Marcantonio und David (1997), die für eine isolierte  $\beta$ -Untereinheit, bestehend aus der cytoplasmatischen und transmembranen Domäne, durchgeführt wurden, legten die Vermutung nahe, daß der N-terminale Bereich der  $\beta$ -cytoplasmatischen Domänen eine  $\alpha$ -helikale Struktur aufweist. Ausgehend von diesen Daten propagierten die Autoren ein Modell, wonach die Assoziation der beiden Integrin-Untereinheiten ( $\alpha$  und  $\beta$ ) die  $\beta$ -cytoplasmatische Domäne in einer Konformation geringer  $\alpha$ -Helizität und damit in einem inaktiven Zustand stabilisiert. Wird diese Assoziation aufgebrochen, so kann die  $\beta$ -Untereinheit in eine  $\alpha$ -helikale und damit aktivierte Konformation übergehen und mit regulatorischen Faktoren interagieren. Ferner kamen sie zu der Schlußfolgerung, daß Mutationen in der cytoplasmatischen Domäne, die diese  $\alpha$ -Helix stabilisieren, die  $\beta$ -Aktivität steigern, während Mutationen, die die Helix-Konformation destabilisieren, die Aktivität der  $\beta$ -Kette reduzieren sollten. Zwar bezieht sich das von Marcantonio und David entworfene Modell auf den Signaltransport vom extrazellulären in den intrazellulären Bereich der Zelle, es wäre jedoch durchaus denkbar, daß die TRG(723 – 725)-Mutation die CD18-Untereinheit in einer Konformation stabilisiert, die eine Interaktion von Cytohesin-1 mit der membranproximalen Region nicht mehr unterstützt.

Auch für Filamin wurde bereits gemutmaßt, daß eine  $\alpha$ -helikale Struktur seines Interaktionspartners die Bindungseigenschaften des Proteins beeinflussen könnte, da Filamin neben der

cytoplasmatischen Domäne von CD18 auch mit der cytoplasmatischen Domäne des Fcγ-Rezeptor I (CD64) interagieren kann (Sharma *et al.*, 1995; Ohta *et al.*, 1991). Die intrazelluläre Domäne von CD64 zeigt keine Sequenzhomologie zu CD18, jedoch wird für sie ebenfalls eine  $\alpha$ -helikale Struktur vorhergesagt (Sharma *et al.*, 1995).

Die biochemischen Bindungsstudien, die mit sIg-Fusionsproteinen der cytoplasmatischen Domäne von  $\beta_2$  durchgeführt wurden und die Analysen der Guaninnukleotid-Austauschfunktion von Cytohesin-1 unter Anwesenheit verschiedener CD18-Peptide, legten allerdings die Vermutung nahe, daß die Sequenzfolge WKA(723 – 725) tatsächlich die Bindungsstelle für Cytohesin-1 darstellte. Sowohl sIg-CD18<sub>tm/cyt</sub>-TRG als auch ein CD18-Peptid, das sich aus den 16 aminoterminalen Aminosäuren der cytoplasmatischen Domäne zusammensetzte und die WKA(723–725)TRG-Mutation trug (CD18<sub>cyt</sub>-TRG16), wiesen keine Bindungsaffinität für Cytohesin-1 auf. Ähnliche Ergebnisse lieferten *in vitro*-Studien von T. Knorr, im Labor von Dr. W. Kolanus, die zeigten, daß CD18<sub>cyt</sub>-TRG16 nicht mehr in der Lage war, mit ARF1 um die Bindung von Cytohesin-1 zu kompetitieren. Im Gegensatz dazu konnte ein ähnlich synthetisiertes Peptid, das die Wildtyp-CD18-Sequenz trug, ARF1 als Interaktionspartner von Cytohesin-1 verdrängen.

Es ist anzunehmen, daß Konformationsänderungen des sIg-TRG-Fusionsproteins bzw. des Peptids CD18<sub>cyt</sub>-TRG16 bei der Analyse ihrer Bindungseigenschaften keine signifikante Rolle spielten.

### **5.3 Die Interaktion von CD18 und Cytohesin-1 ist wichtig für die Regulation der Zelladhäsion, vermittelt durch LFA-1**

Funktionale Studien, bei denen die Adhäsionsfähigkeit von Zellen, die LFA-1 exprimierten, an ICAM-1-Fc (ein Fusionsprotein bestehend aus der extrazellulären Domäne von ICAM-1 und einem Immunglobulin-Fusionsanteil) analysiert wurde, ergaben, daß die Interaktion von CD18 und Cytohesin-1 eine wesentliche Rolle bei der Regulation der durch LFA-1 vermittelten Zelladhäsion spielte.

HeLa-Zellen, auf denen LFA-1 mit Hilfe des Vaccinia-Virus-Expressionssystems exprimiert wurde, ähnlich wie die LFA-1-defizienten T-Zellklone SK- $\beta_2.7$  und LAD19, deren LFA-1-Expression, ebenfalls mittels rekombinanter Vaccinia-Viren, rekonstituiert werden konnte, zeigten nur dann eine verstärkte Adhäsion an ICAM-1-Fc, wenn sie Wildtyp-LFA-1 expri-



mierten. Die Expression von LFA-1(TRG) führte nur zu einem geringen bzw. zu keinem Anstieg der Zelladhäsion.

In allen Fällen mußte jedoch der Zelladhäsion eine Integrin-Aktivierung durch extra- bzw. intrazellulär wirkende Stimuli vorausgehen, da Integrine in aller Regel in einem inaktiven Zustand auf der Zelloberfläche exprimiert werden und ihre Bindung an den Liganden erst durch Aktivierungssignale induziert wird.

Die Aktivierung von LFA-1 auf HeLa-Zellen erfolgte dabei direkt durch den anti-CD18-Antikörper KIM185 (Andrew *et al.*, 1993). Der üblicherweise bei *in vitro*-Zelladhäsionsstudien eingesetzte Phorbol-12-myristat-13-acetat (Dustin und Springer, 1989) bewirkte keine Stimulierung von LFA-1, das ektopisch auf HeLa-Zellen exprimiert wurde. Vergleichbare Befunde lieferten auch Experimente mit K562-Zellen (Ortlepp *et al.*, 1995; Lub *et al.*, 1997; vgl. 4.3.2). Es wird vermutet, daß diesen Zellen spezifische regulatorische Faktoren fehlen, die normalerweise in Lymphocyten exprimiert werden.

Adhäsionsstudien von Ortlepp *et al.* (1995) ergaben, daß KIM185 spezifisch die Bindung von LFA-1 an ICAM-1, nicht aber an andere ICAM-Liganden stimulieren konnte. Zwar wird angenommen, daß die Aktivierungsfähigkeit von KIM185 zumindest teilweise von intrazellulären Faktoren abhängt, jedoch konnte der Einsatz dieses Antikörpers keinen eindeutigen Hinweis dafür liefern, daß die Aktivierung des Integrins durch intrazelluläre Signale induziert wurde.

Um den Einfluß intrazellulärer Signalkaskaden auf die LFA-1-Aktivierung zu untersuchen, wurden SK- $\beta_2.7$ - bzw. LAD19-T-Zellklone verwendet. Diese Zellen stellten zudem ein physiologischeres Modellsystem zur Analyse der LFA-1-Funktion dar. Sowohl die Antikörpervermittelte Stimulierung des T-Zell-Rezeptors als auch die Aktivierung der Protein Kinase C durch PMA, Ereignisse, die normalerweise eine Aktivierung des LFA-1-Integrins initiieren (Dustin und Springer, 1989; van Kooyk *et al.*, 1989, Rothlein und Springer, 1986; Burn *et al.*, 1988), führten zu keiner stabilen Bindung von LFA-1 an ICAM-1-Fc, wenn das Integrin die TRG-Mutation in der CD18-Untereinheit trug.

Eine wichtige Frage im Rahmen dieser Adhäsionsanalysen war, ob LFA-1(TRG) prinzipiell in der Lage war, ICAM-1 zu binden oder ob die TRG-Mutation in der membrannahen Region eine Konformationsänderung des gesamten Integrins bewirkte, so daß eine Aktivierung von LFA-1 nicht mehr möglich war.

Zur Kontrolle wurde die Integrin-Aktivierung durch  $Mn^{2+}$  bzw.  $Mg^{2+}$  analysiert. Diese divalenten Kationen können die Bindung von LFA-1 an ICAM-1 direkt und unabhängig von in-

trazellulären Faktoren induzieren (Labadia *et al.*, 1998; Petruzelli *et al.*, 1998; Dransfield *et al.*, 1992).

Es zeigte sich, daß Wildtyp-LFA-1 und LFA-1(TRG) ICAM-1-Fc nach  $Mn^{2+}$ - bzw.  $Mg^{2+}$ -Stimulation in vergleichbarer Weise binden konnten. Die TRG-Mutation schien somit keinen Konformationszustand des Integrins zu induzieren, der eine Aktivierung von LFA-1 inhibierte.

Die bis dahin durchgeführten Zelladhäsionsstudien konnten keinen eindeutigen Hinweis darauf liefern, daß Cytohesin-1 direkt in die Integrin-Aktivierung involviert war. Daher wurden HeLa-Zellen generiert, die Wildtyp-LFA-1 bzw. LFA-1(TRG) stabil exprimierten. Um den direkten Einfluß von Cytohesin-1 zu analysieren, wurde das Protein transient überexprimiert und die Zelladhäsion an ICAM-1-Fc bestimmt. Wie erwartet, konnte die Expression von Cytohesin-1 nur Wildtyp-LFA-1-positive HeLa-Zellen zu einer verstärkten Adhäsion an ICAM-1-Fc aktivieren, nicht dagegen Zellen, die die LFA-1(TRG)-Mutante trugen. Diesen Effekt zeigten die Zellen sowohl nach einer Inkubation mit KIM185 als auch ohne eine zusätzliche Stimulierung.

Diese Daten bestätigten die Vermutung, daß Cytohesin-1 durch Interaktion mit CD18 eine Aktivierung von LFA-1 und damit die Bindung an ICAM-1 induzierte. Die Mutation der Cytohesin-1-Bindungsstelle von CD18 resultierte daher in einem LFA-1-Molekül, das nicht mehr zur Bindung an ICAM-1 aktiviert werden konnte.

Zusätzlich stützten die durchgeführten Adhäsionsanalysen die Annahme, daß KIM185 in Kooperation mit intrazellulären Faktoren eine Integrin-Stimulierung bewirkte. LFA-1, das in der Lage war mit Cytohesin-1 zu interagieren, zeigte nach Inkubation mit KIM185 eine wesentlich höhere Fähigkeit an ICAM-1-Fc zu binden als LFA-1(TRG), dessen Interaktion mit Cytohesin-1 inhibiert war.

Ähnliche Eigenschaften publizierten Petruzelli *et al.* (1998) für den aktivierenden anti-CD18-Antikörper CBR LFA-1/2. Adhäsionsstudien mit einer B-Zelllinie zeigten, daß LFA-1, das aufgrund von Deletions- bzw. Punktmutationen in der cytoplasmatischen Domäne von CD18 PMA-insensitiv war, auch durch CBR LFA-1/2 nicht mehr zur Bindung an ICAM-1 aktiviert werden konnte.  $Mn^{2+}$ -Inkubation dagegen führte bei allen getesteten Mutanten zu einer vergleichbar hohen Bindung an ICAM-1.

HeLa-Zellen, die LFA-1 und die isolierte PH-Domäne von Cytohesin-1 koexprimierten, konnten mit Hilfe von KIM185 nur noch in geringem Maße zur Adhäsion an ICAM-1-Fc stimuliert werden. Da die Überexpression der PH-Domäne normalerweise eine vollständige Inhibition der LFA-1-abhängigen Zelladhäsion bewirkt (Kolanus *et al.*, 1996), sollte das durch

KIM185 gesteigerte Adhäsionsvermögen folglich Hinweise auf das Aktivierungspotential des Antikörpers liefern, das unabhängig von intrazellulären Faktoren auftritt.

Der Mechanismus, durch den KIM185 mit intrazellulären Regulatoren wechselwirken könnte, ist unklar. Es wäre denkbar, daß eine durch KIM185 induzierte Konformationsänderung im extrazellulären Bereich des Integrins durch die Plasmamembran hindurch in die intrazelluläre Domäne transloziert wird. Dies könnte die Interaktion von Cytohesin-1 und CD18 begünstigen und zu einer höher affinen Konformation von LFA-1 und damit zu einer verstärkten Adhäsion an ICAM-1 führen.

Die Expression der isolierten PH-Domäne führte zu keiner vollständigen Inhibition der Adhäsion von HeLa-Zellen, die LFA-1 stabil exprimierten. Die Zellen wiesen eine unverändert hohe Grundadhäsion auf. Dies legte die Vermutung nahe, daß das Adhäsionsvermögen unstimulierter Zellen auf eine Aktivierung des Integrins zurückzuführen war, die entkoppelt von intrazellulären Regulationsmechanismen induziert wurde. Möglicherweise trat aufgrund der hohen Expressionsdichte eine partielle, spontane Aggregation von LFA-1 auf.

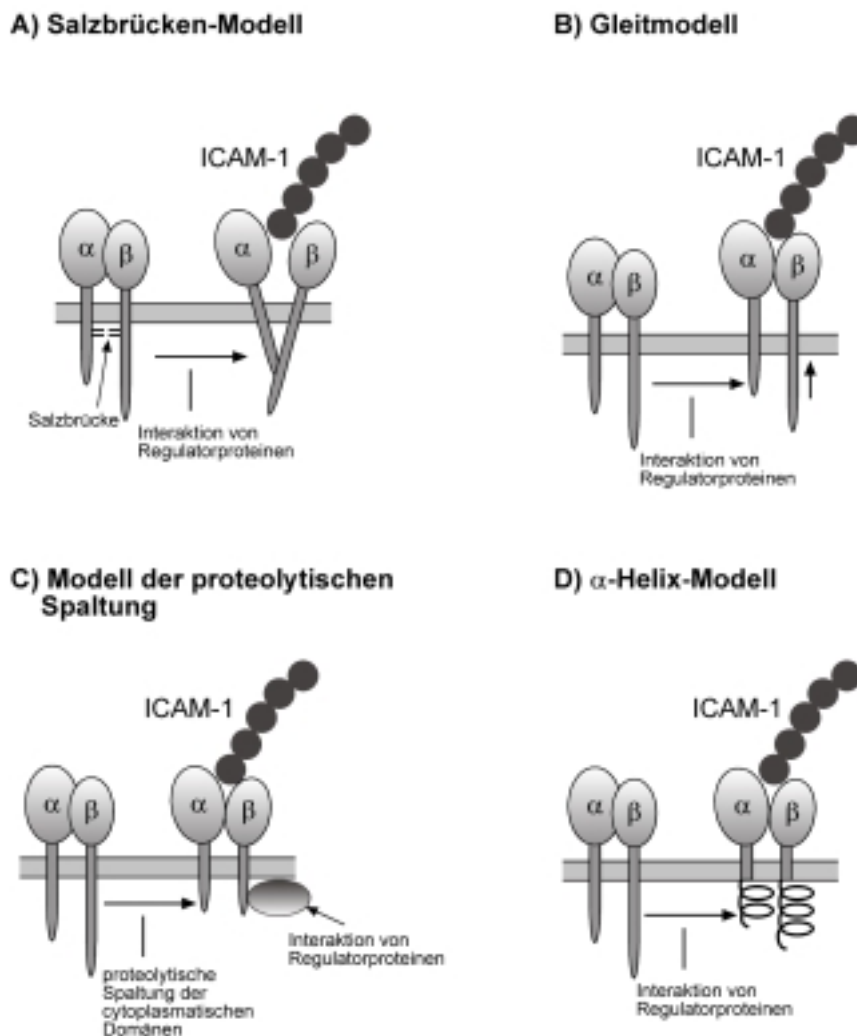
#### 5.4 Mechanistische Modelle zur Affinitätskontrolle von LFA-1

Welche Modifikationen bzw. Mechanismen könnten durch die Interaktion von Cytohesin-1 und CD18 zu einer Aktivierung von LFA-1 führen? Verschiedene Modelle zur Regulation der Integrin-Funktion wurden aufgestellt, die mögliche Mechanismen unter Beteiligung der cytoplasmatischen Domänen diskutieren (Abb. 29).

Hughes *et al.* (1996) beispielsweise postulierten für das Blutplättchen-Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  eine potentielle Salzbrücke zwischen den membranproximalen cytoplasmatischen Bereichen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Domäne. Eine Spaltung dieser Salzbrücke durch Einführung von Punktmutationen induzierte ihrer Ansicht nach eine Konformationsänderung im extrazellulären Bereich des Integrins und führte damit zu einem konstitutiv aktiven  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (Abb. 29A). Ebenfalls ausgehend von Studien an  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (Kouns *et al.*, 1992; Du *et al.*, 1995) stellte J. W. Smith (1997) die Hypothese auf, daß eine proteolytische Spaltung einer oder beider cytoplasmatischen Domänen des Integrins erst die Bindung von Regulator-Proteinen ermöglicht. Dieser Regulationsmechanismus wäre jedoch irreversibel (Abb. 29C). Denkbar wäre auch die bereits dargestellte Ausbildung einer  $\alpha$ -helikalen Sekundärstruktur der cytoplasmatischen Domänen, verbunden

mit einer Signaltransduktion über die transmembrane Region in den extrazellulären Bereich des Integrins (Marcantonio und David, 1997; vgl. 5.2).

Im Hinblick auf die Aktivierung von LFA-1 könnte hierbei Cytohesin-1 eine Strukturänderung der cytoplasmatischen Domäne von CD18 induzieren. Dieses Modell stünde in Einklang mit dem Modell einer potentiellen Salzbrücke, die durch eine Interaktion mit Cytohesin-1 aufgebrochen werden könnte (Abb. 29D).



**Abb. 29: Schematische Darstellung möglicher Modelle zur Integrin-Aktivierung unter Beteiligung der cytoplasmatischen Domänen.**

**A) Salzbrücken-Modell:** Die cytoplasmatischen Domänen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette sind nicht-kovalent über eine potentielle Salzbrücke assoziiert. Eine Spaltung dieser Verbindung induziert Konformationsänderungen im extrazellulären Bereich des Integrins und begünstigt somit die Ligandenbindung. **B) Gleitmodell:** Die membranproximalen Bereiche der cytoplasmatischen Domänen können teilweise in die Plasmamembran hineingleiten und dadurch, ebenfalls durch Konformationsänderungen der extrazellulären Domäne, eine Aktivierung des Integrins induzieren. **C) Modell der proteolytischen Spaltung:** Die cytoplasmatischen Domänen werden proteolytisch gespalten. Dies ermöglicht die Interaktion spezifischer Regulatorproteine mit den neu formierten cytoplasmatischen Ketten und damit die Integrin-Aktivierung. **D)  $\alpha$ -Helix-Modell:** Durch die Assoziation mit regulatorischen Faktoren wird eine  $\alpha$ -helikale Struktur der cytoplasmatischen Domänen des Integrins begünstigt. Die Konformationsänderung wird in den extrazellulären Bereich transduziert und führt zur Aktivierung des Integrins.

Auch ein Modell, wonach die membranproximale Region der cytoplasmatischen Ketten nach Interaktion mit spezifischen Regulatoren in die Lipid-Doppelschicht hineingleiten und damit Konformationsänderungen im extrazellulären Bereich induzieren könnte, wird vorgeschlagen (Williams *et al.*, 1994). Dieses Modell (Abb. 29B) wird auch durch Studien von Armulik *et al.* (1999) unterstützt, die zeigen, daß beispielsweise die N-terminalen Aminosäuren K724 - I727 der cytoplasmatischen Domäne von  $\beta_2$  noch in der Plasmamembran liegen könnten.

Der genaue Mechanismus, der die intramolekulare Signaltransduktion von LFA-1 ermöglicht, bleibt noch zu klären. Prinzipiell wäre eine Kombination verschiedener Modelle denkbar:

Cytohesin-1 könnte hierbei durch die Interaktion mit CD18 die Konformation der cytoplasmatischen Domäne modifizieren und dadurch die nicht-kovalente cytoplasmatische  $\alpha/\beta$ -Heterodimerformierung aufbrechen. Als Folge wäre das partielle Hineingleiten der membranproximalen Region der cytoplasmatischen Domäne von CD18 und/oder CD11a in die Plasmamembran denkbar und damit die Induktion einer LFA-1-Konformation, die eine erhöhte Affinität für ICAM-1 aufweist.

## 5.5 Die Bedeutung der Affinitätsänderung von LFA-1 für die Ligandenbindung

Hinweise darauf, daß Cytohesin-1 durch Interaktion mit CD18 eine Konformationsänderung im extrazellulären Bereich des LFA-1-Integrins und damit eine Affinitätsänderung induzieren könnte, lieferten Experimente mit dem monoklonalen Antikörper 24 (mAk 24).

MAk 24 detektiert und stabilisiert ein Epitop in der  $\alpha$ -Untereinheit von  $\beta_2$ -Integrinen, das von diesen nur im aktivierten Zustand exprimiert wird und u. a. durch die divalenten Kationen  $Mn^{2+}$  und  $Mg^{2+}$  oder durch die Quervernetzung des T-Zell-Rezeptor/CD3-Komplexes induziert werden kann (Dransfield *et al.*, 1992; Porter und Hogg, 1997).

Cytohesin-1 war in der Lage, die Expression des Epitops 24 auf LFA-1 zu induzieren. Weiterführende Analysen von Dr. W. Kolanus konnten zudem zeigen, daß eine Komplexierung von  $Ca^{2+}$  durch EGTA die Expression des Epitops 24 durch Cytohesin-1 begünstigte (Geiger *et al.*, 2000). Dieser Befund stützte u. a. die Vermutung, daß  $Ca^{2+}$  LFA-1 in einer inaktiven Konformation stabilisieren kann (Dransfield *et al.*, 1992). Überraschenderweise zeigten die Arbeiten von Dr. W. Kolanus aber auch, daß das Auftreten des Epitops 24 nicht mit einer gesteigerten Bindung von löslichem ICAM-1-Fc an LFA-1 korrelierte (Geiger *et al.*, 2000).

Die Bindung von löslichem ICAM-1 an Zellen, die LFA-1 exprimieren, beruht größtenteils auf der Bindungsaffinität und weniger auf der Bindungsavidität des Rezeptors, wobei die Avidität u. a. durch die Dichte und den Aggregationsgrad von Rezeptor und Ligand charakterisiert ist (Ganpule *et al.*, 1997).

Der hochaktive Zustand von LFA-1 ist mit der Expression des Epitops 24 korreliert. Obwohl es Hinweise gibt, daß Affinitätsänderungen beispielsweise bei  $\beta_1$ - und  $\beta_3$ -Integrinen wichtig für die Regulation der Ligandenbindung sind, ist diese Frage für LFA-1 kaum geklärt. Es wird jedoch angenommen, daß Affinitätsänderungen zur Gewährleistung einer stabilen Zelladhäsion an ICAM-1 eine untergeordnete Rolle spielen. Vielmehr scheinen hierbei Aviditätsänderungen des Integrins entscheidend zu sein (van Kooyk *et al.*, 1999; van Kooyk und Figdor, 2000).

Da Cytohesin-1 die stabile Adhäsion von Jurkat E6 an ICAM-1 induzieren kann, liegt die Vermutung nahe, daß das Protein hauptsächlich durch Regulation der Integrin-Avidität und weniger der –Affinität die Aufrechterhaltung einer stabilen Zelladhäsion gewährleistet. Das Auftreten von Affinitätsänderungen ist dabei jedoch nicht auszuschließen. Plausibel erscheint dies durch die Detektion des Epitops 24.

## **5.6 Die GEF-Aktivität von Cytohesin-1 ist in die Regulation der T-Zell-Adhäsion involviert**

Im Jahr 1996 wurde beschrieben, daß Cytohesin-2, ein Mitglied der Cytohesin-Familie, den Guaninnukleotid-Austausch an ARF-Proteinen *in vitro* katalysieren konnte (Chardin *et al.*, 1996). ARF(ADP ribosylation factor)-Proteine sind kleine G-Proteine und gehören der Ras-Superfamilie an.

Wenig später wurde gezeigt, daß auch Cytohesin-1 (Meacci *et al.*, 1997) und Cytohesin-3 (Klarlund *et al.*, 1998) als Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEF) fungieren können.

Eine interessante Frage war daher, ob die GEF-Aktivität von Cytohesin-1 auch in der Regulation der T-Zell-Adhäsion, vermittelt durch LFA-1, eine Rolle spielte. Zur Analyse dieser Problematik wurden die Eigenschaften der GEF-inaktiven Punktmutante Cytohesin-1(E157K) untersucht. Cytohesin-1(E157K) war in Anlehnung an Arbeiten von Mossessova *et al.* (1998) generiert worden, die zeigten, daß der Aminosäurerest E156 der SEC7-Domäne von Cytohesin-2 kritisch für die GEF-Aktivität *in vitro* war. Wenig später konnte mit Hilfe von NMR-Strukturanalysen dokumentiert werden, daß der homologe Aminosäurerest E157 der SEC7-

Domäne von Cytohesin-1 ebenfalls essentiell für den Guaninnukleotid-Austausch an ARF1 *in vitro* zu sein schien (Betz *et al.*, 1998). Arbeiten von T. Knorr konnten diese Vermutung bestätigen. Die Mutation des Aminosäurerestes E157 von Cytohesin-1 nach K führte zu einem vollständigen Verlust der GEF-Funktion (Knorr *et al.*, 2000).

*In vitro*-Präzipitationsanalysen zeigten, daß Cytohesin-1(E157K), ähnlich Cytohesin-1, in der Lage war, mit der cytoplasmatischen Domäne von CD18 zu interagieren. Zusätzlich ergaben Experimente von Dr. W. Kolanus, daß die Überexpression von Cytohesin-1(E157K) in Jurkat E6-Zellen die Expression des Epitops 24 auf LFA-1 induzierte (Geiger *et al.*, 2000).

Das für die Guaninnukleotid-Austauschfunktion kritische Glutamat 157 erwies sich somit als nicht essentiell für die Interaktion von Cytohesin-1 und CD18. Der Verlust der GEF-Aktivität zeigte allerdings entscheidende Auswirkungen auf die stabile Adhäsion von Jurkat E6-Zellen an ICAM-1-Fc. Die Überexpression von Cytohesin-1(E157K) in diesen Zellen inhibierte die Adhäsion vollständig.

Dieser Befund verdeutlichte, daß der GEF-Funktion von Cytohesin-1 eine bedeutende Rolle bei der Aufrechterhaltung einer stabilen Adhäsion von Zellen an ICAM-1 zukam. Die Interaktion von Cytohesin-1 und LFA-1 war hierfür nicht ausreichend.

## 5.7 ARF-Proteine und ihre Bedeutung für die Zelladhäsion

Die Beobachtung, daß die GEF-Aktivität von Cytohesin-1 eine wichtige Funktion in der Zelladhäsion spielte, warf die Frage auf, welche Signalwege durch Aktivierung von ARF-Proteinen die Bindung von LFA-1 an ICAM-1 regulieren konnten.

ARF-Proteine stellen wichtige Faktoren in vesikulären Transportprozessen dar (Rothman, 1994; Moss und Vaughan, 1995). Es wäre also denkbar, daß sie an Internalisierungs- und Recycling-Prozessen des Integrin-Rezeptors beteiligt sind, die in adhären oder wandernden Zellen stattfinden können. Lawson und Maxfield (1995) beispielsweise publizierten, daß das  $\alpha_V\beta_3$ -Integrin in migrierenden neutrophilen Zellen mittels Endocytose und Recycling an die Migrationsfront der Zelle transportiert wird. Ein ähnliches Modell wird auch für LFA-1 von Fabbri *et al.* (1999) vorgeschlagen. Ihren Arbeiten zufolge trägt das  $\beta_2$ -Integrin ein konserviertes Internalisierungssignal, das einen endocytotischen Zyklus und damit die Konzentration des Integrin-Rezeptors jeweils an Orten der verstärkten Adhäsion ermöglichen könnte. Eine Inaktivierung dieses Sequenz-Motivs hatte jedoch keinen Einfluß auf die Adhäsionsfähigkeit von LFA-1 und das „Spreading“ (siehe unten) der Zellen. Internalisierungsprozesse spielen

daher vermutlich keine entscheidende Rolle bei der Regulierung der LFA-1-abhängigen Zelladhäsion.

Zusätzlich zur Funktion im intrazellulären Vesikeltransport wurde aber auch beschrieben, daß ARF-Proteine an der Modulation des Cytoskelettes beteiligt sein könnten. So scheint beispielsweise ARF1 in den Transport von Paxillin in Fokalkontakte involviert zu sein (Norman *et al.*, 1998), während ARF6 möglicherweise eine Rolle in der Regulation der Aktin-Polymerisation spielt (Radhakrishna *et al.*, 1996; D'Souza-Schorey *et al.*, 1997).

Der mögliche Einfluß der Cytohesin-1-GEF-Funktion auf die Modulation des Cytoskelettes wurde durch Arbeiten von Dr. W. Nagel demonstriert. Jurkat E6-Zellen, die Cytohesin-1(E157K) überexprimierten und auf einer mit ICAM-1-Fc beschichteten Unterlage aufgebracht worden waren, waren sowohl in ihrer Adhäsionsfähigkeit als auch in ihrem „Spreading“-Verhalten stark eingeschränkt bzw. inhibiert (Geiger *et al.*, 2000).

Das „Spreading“, eine Modifikation der Zellmorphologie, tritt nach oder während der Rezeptor-Bindung auf und wird vermutlich über die cytoplasmatischen Domänen des Integrins reguliert (Peter und O'Toole, 1995; Pyszniak *et al.*, 1997; van Kooyk *et al.*, 1999).

Die intrazellulären Domänen der Integrine können Komponenten des Cytoskelettes, wie etwa  $\alpha$ -Actinin oder Filamin binden (vgl. 5.2). Da das „Spreading“ von Zellen mit einer Modulation des Cytoskelettes einhergeht, ist es also durchaus denkbar, daß ARF-Moleküle über Mechanismen der Cytoskelett-Reorganisation in die Regulation der T-Zell-Adhäsion involviert sind.

Welches ARF-Protein an der spezifischen Regulation der LFA-1-abhängigen Zelladhäsion beteiligt ist, bleibt allerdings noch zu klären. Bisher wird hauptsächlich ARF1 als Substrat für Cytohesin-1 diskutiert (Meacci *et al.*, 1997; Pacheco-Rodriguez *et al.*, 1998; Knorr *et al.*, 2000). ARF1 ist in vesikuläre Transportprozesse vom ER zum Golgi und innerhalb des Golgi-Apparates involviert (Rothman, 1994; Moss und Vaughan, 1995). Seine Funktion in der Reorganisation des Plasmamembran-Cytoskelettes bedarf jedoch noch der weiteren Aufklärung. *In vitro*-Analysen zeigten, daß Cytohesin-1 die Bindung von ARF1 an Golgi-Membranen induzieren konnte (Meacci *et al.*, 1997). Die Frage, ob Cytohesin-1 in intakten Zellen ebenfalls an den Golgi-Komplex lokalisiert, wird jedoch zum jetzigen Zeitpunkt kontrovers diskutiert (Knorr *et al.*, 2000; Nagel *et al.*, 1998a; Lee *et al.*, 2000).

Studien, die den Einfluß von BFA auf die durch Cytohesin-1 induzierte T-Zell-Adhäsion untersuchten, lieferten keinen Hinweis auf eine Inhibition der LFA-1-Aktivierung durch das Toxin. BFA inhibiert vesikuläre Transportprozesse vom ER zum Golgi. Die GEF-Aktivität von Cytohesin-1 wird nicht durch BFA *in vitro* blockiert (Meacci *et al.*, 1997), allerdings in-



hibiert BFA den Guaninnukleotid-Austausch an ARF1 in Zellextrakten (Donaldson *et al.*, 1992; Helms und Rothman, 1992). Die Ergebnisse der Zelladhäsionsstudien würden daher gegen ARF1 als physiologisches Substrat von Cytohesin-1 sprechen.

Die *in vivo*-Spezifität der Cytohesin-1/ARF-Interaktion geht möglicherweise *in vitro* verloren, wodurch ein BFA-insensitiver GDP/GTP-Austausch an ARF1, katalysiert durch Cytohesin-1, ermöglicht wird.

Isolierte SEC7-Domänen der Cytohesin-Familie weisen eine geringere Spezifität für ARF-Proteine *in vitro* auf und so konnte für die SEC7-Domäne von Cytohesin-1 gezeigt werden, daß sie neben ARF1 und ARF5 auch den Guaninnukleotid-Austausch an ARF6 katalysieren kann (Pacheco-Rodriguez *et al.*, 1998). ARF6 lokalisiert an die Plasmamembran und an Endosomen (Yang *et al.*, 1998; D'Souza-Schorey *et al.*, 1995; Peters *et al.*, 1995) und wurde schon als Substrat für Cytohesin-2 beschrieben, das in die Regulierung des Aktin-Cytoskettes involviert sein könnte (Frank *et al.*, 1998).

Arbeiten von T. Knorr lieferten allerdings keine Hinweise darauf, daß ARF6 ein physiologisches Substrat für Cytohesin-1 darstellen könnte (Knorr *et al.*, 2000).

Ob eines der bekannten ARF-Moleküle ein spezifisches Substrat von Cytohesin-1 *in vivo* sein könnte, ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht eindeutig geklärt. Viele Analysen, die sich mit dieser Problematik beschäftigten, wurden in *in vitro*-Systemen durchgeführt. Die Übertragung der Ergebnisse auf *in vivo*-Verhältnisse ist schwierig, da die Spezifität von Reaktionen in *in vitro*-Systemen oft nicht gewährleistet ist.

Zudem zeigten Arbeiten von Dr. W. Kolanus und T. Knorr, daß die Überexpression von ARF1 bzw. ARF6 in Jurkat E6 keinen Einfluß auf die Adhäsion der Zellen an ICAM-1-Fc hatte. Dabei wurden sowohl Wildtyp-ARF als auch Mutanten, die eine dominant negative bzw. eine konstitutiv aktive Form des ARF-Proteins repräsentierten, analysiert.

ARF-Proteine sind ubiquitär in eukaryotischen Zellen exprimiert (Rothman, 1994), während Cytohesin-1 hauptsächlich in Zellen des hämatopoetischen Systems zu detektieren ist. Es ist daher nicht auszuschließen, daß in diesen Zellen spezifische ARF- oder ARF-ähnliche Proteine existieren, die bis heute noch nicht identifiziert worden sind und die als spezifische Substrate für Cytohesin-1 fungieren.

## 5.8 Die PI3-Kinase ist an der Aktivierung der LFA-1-abhängigen T-Zell-Adhäsion beteiligt

Die Spezifität von ARF-Proteinen gegenüber Mitgliedern der Cytohesin-Familie *in vitro* wird u. a. durch Polyphosphoinositide reguliert. So ließ sich beispielsweise der von Cytohesin-3 katalysierte GDP/GTP-Austausch an ARF1 und ARF5 selektiv durch Anwesenheit von PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, nicht aber durch PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> steigern (Klarlund *et al.*, 1998).

Die GEF-Aktivität von Cytohesin-2 konnte durch PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-haltige Liposomen (Chardin *et al.*, 1996), die durch Cytohesin-1 vermittelte GTP-Bindung an ARF1 wiederum signifikant durch PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> erhöht werden (Knorr *et al.*, 2000).

PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> und PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> sind Phospholipide der Plasmamembran und können als Membranlokalisationselemente fungieren, die Zielproteine an spezifische zelluläre Organellen rekrutieren (Heller-Harrison *et al.*, 1996). Als Rekrutierungsmodule dienen dabei PH-Domänen (Lemmon *et al.*, 1996; Pawson, 1995; Shaw, 1996).

So wurde z. B. für die PH-Domäne von PLC- $\delta_1$  gezeigt, daß sie über die Bindung von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> an zelluläre Membranen lokalisiert wird (Cifuentes *et al.*, 1993). Eine spezifische Bindung der PH-Domäne von Cytohesin-2, die eine hohe Homologie zur PH-Domäne von PLC- $\delta$  aufweist, an PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, konnte ebenfalls demonstriert werden (Chardin *et al.*, 1996; Paris *et al.*, 1997). Cytohesin-3 dagegen benötigte die Anwesenheit von PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, um über seine PH-Domäne an die Membran rekrutiert zu werden (Klarlund *et al.*, 1997).

Arbeiten von Dr. W. Nagel und von Klarlund *et al.* (1997) ließen vermuten, daß auch Cytohesin-1 durch einen ähnlichen Mechanismus an die Plasmamembran lokalisiert wurde. Cytohesin-1 band mit einer hohen Affinität über seine PH-Domäne an PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> *in vitro*. Eine Punktmutante der PH-Domäne, Cytohesin-1(R281C), deren Interaktion mit PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> inhibiert war, wurde im Gegensatz zu Wildtyp-Cytohesin-1 nicht mehr an die Plasmamembran rekrutiert (Nagel *et al.*, 1998a).

PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> ist ein Produkt der PI3-Kinase und entsteht durch die Phosphorylierung der D-3 Position von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> (Whitman *et al.*, 1988). Die PI3-Kinase ist in die Regulation verschiedenster zellulärer Funktionen involviert und eine mögliche Rolle des Enzyms in der Regulierung von Integrin-Funktionen wurde ebenfalls beschrieben (Shimizu und Hunt, 1996; Ward *et al.*, 1996).

Shimizu *et al.* (1995) publizierten beispielsweise, daß die antikörperinduzierte Stimulierung von CD2 zu einer gesteigerten Adhäsion von  $\beta_1$ -Integrinen an Fibronectin und VCAM-1 führte und dieser Signalweg abhängig von der PI3-Kinase-Aktivität war.

Ähnliche Ergebnisse lieferten Zelladhäsionsstudien, die die Aktivierung von  $\beta_1$ -Integrinen, nach Stimulierung der Oberflächenrezeptoren CD28 (Zell *et al.*, 1996) bzw. CD7 (Chan *et al.*, 1997), analysierten. In beiden Fällen konnte die Zelladhäsion durch Wortmannin, einen spezifischen Inhibitor der PI3-Kinase, blockiert werden.

Ausgehend von diesen Beobachtungen lag die Vermutung nahe, daß PI3-Kinase auch eine Rolle bei der Regulation der LFA-1-Funktion spielen könnte. Adhäsionsstudien mit Jurkat E6-Zellen konnten diese Hypothese bekräftigen.

Die Überexpression einer konstitutiv aktiven Form der PI3-Kinase (P110\*) induzierte eine verstärkte Adhäsion der Zellen an ICAM-1-Fc, die durch Wortmannin wiederum signifikant reduziert werden konnte. Ferner zeigte sich, daß die Koexpression von P110\* und der PH-Domäne von Cytohesin-1 eine vollständige Inhibition der Zelladhäsion zur Folge hatte. Dieses Resultat trat nicht auf, wenn P110\* und PH(R281C) koexprimiert wurden.

PI3-Kinase schien also die Aktivierung von LFA-1 durch eine Rekrutierung von Cytohesin-1 an die Plasmamembran zu regulieren. Zellfraktionierungsexperimente von Dr. W. Nagel stützten diese Annahme. Sie konnten zeigen, daß nach Überexpression von P110\* in Jurkat E6-Zellen, endogenes Cytohesin-1 verstärkt in der Membranfraktion zu detektieren war (Nagel *et al.*, 1998a). Die Membranrekrutierung erfolgte dabei vermutlich durch die PH-Domäne, die Assoziation mit der Plasmamembran durch Bindung von PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> (Nagel *et al.*, 1998a und b).

Ein ähnliches Modell zur Aktivierung von LFA-1 schlugen auch Hmama *et al.* (1999) vor. Sie analysierten die durch LPS induzierte Adhäsion von Monocyten an ICAM-1 und kamen zu der Schlußfolgerung, daß LPS durch Bindung an CD14 eine intrazelluläre Signalkaskade aktivierte, in die neben dem kleinen G-Protein Rho auch PI3-Kinase, PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> und Cytohesin-1 involviert waren und die in einer Aktivierung von LFA-1 resultierte.

Zusätzlich zur Regulation der Cytohesin-1-Funktion war es aber auch denkbar, daß PI3-Kinase ebenso die Aktivität anderer Faktoren kontrollieren konnte, die für die Induktion einer stabilen Zelladhäsion nötig waren. Diese Annahme wurde durch die Beobachtung gestützt, daß die Adhäsionsfähigkeit von Jurkat E6-Zellen, die Cytohesin-1 überexprimierten, ebenfalls durch Wortmannin partiell inhibiert werden konnte.

Die Rekrutierung von Cytohesin-1 an die Plasmamembran durch Überexpression erfolgte vermutlich, aufgrund der hohen Expressionsdichte des Proteins, direkt und damit größtenteils

unabhängig vom Regulationsmechanismus der PI3-Kinase. Die partielle Inhibition der Zelladhäsion konnte also ein Hinweis darauf sein, daß PI3-Kinase möglicherweise auch regulatorisch in Signalwege involviert war, die durch die GEF-Aktivität von Cytohesin-1 induziert wurden und wichtig für die Induktion einer stabilen Zelladhäsion an ICAM-1 waren.

Shpetner *et al.* (1996) beispielsweise zeigten, daß eine Inkubation von eukaryotischen Zellen mit Wortmannin zu einer drastischen Veränderung der Endosomen-Morphologie führte. Sie nahmen daher an, daß PI3-Kinase möglicherweise auch eine Rolle bei der Regulation der ARF-Aktivität spielen könnte.

## **5.9 Die Adhäsion von T-Zellen an ICAM-1 wird durch einen dualen Wirkmechanismus von Cytohesin-1 reguliert**

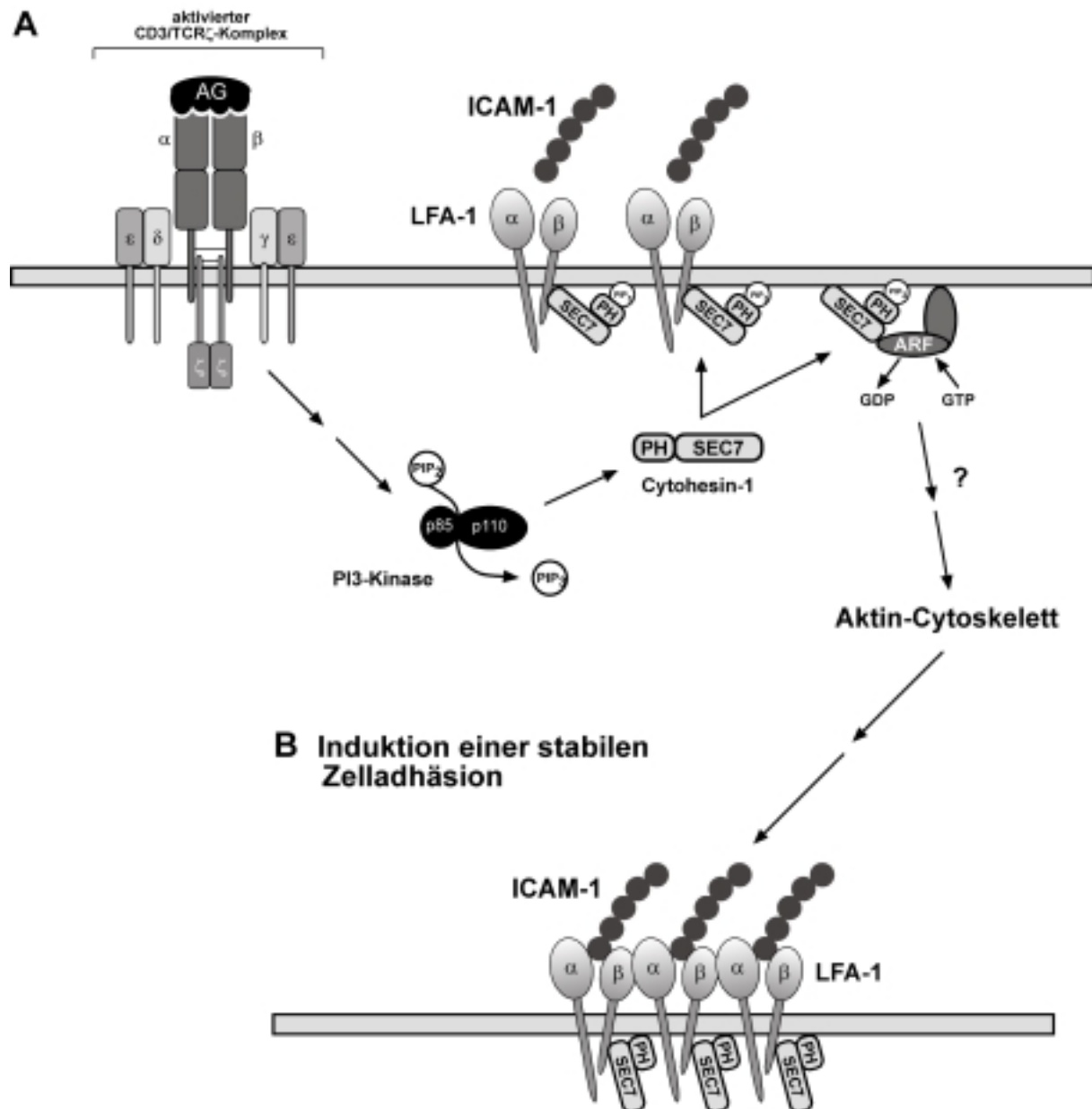
Die Ergebnisse dieser Arbeit, sowie weitere Daten von Dr. W. Nagel und T. Knorr, legen die Vermutung nahe, daß Cytohesin-1 durch zwei distinktive Wirkmechanismen in die Regulation der T-Zell-Adhäsion, die durch LFA-1 vermittelt wird, involviert ist (Abb. 30).

Durch Aktivierung der PI3-Kinase wird Cytohesin-1 verstärkt an die Plasmamembran rekrutiert. Die molekularen Prozesse, die dabei zur Stimulierung der Kinase führen sind nicht eindeutig geklärt. Eingehender wurden diese Mechanismen allerdings für die Aktivierung der  $\beta_1$ -Integrin-abhängigen Zelladhäsion untersucht.

Die Aggregation von T-Zell-Oberflächenrezeptoren, wie beispielsweise des CD3/T-Zell-Rezeptor-Komplexes, von CD2 oder CD7, kann hierbei eine direkte oder indirekte Aktivierung der PI3-Kinase induzieren. Die direkte Aktivierung erfolgt durch Assoziation der Kinase mit den cytoplasmatischen Domänen der Rezeptoren. Eine indirekte Stimulierung wird durch rezeptorassoziierte Proteintyrosinkinasen vermittelt. Ähnliche Modelle werden auch für die  $\beta_2$ -Integrin-abhängige Zelladhäsion diskutiert (Ward *et al.*, 1996; Shimizu und Hunt, 1996).

Die Rekrutierung von Cytohesin-1 an die Plasmamembran erfolgt vermutlich über seine PH-Domäne durch Bindung an PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, einem Phospholipid und Produkt der PI3-Kinase. Die Lokalisation an die Membran könnte die SEC7-Domäne von Cytohesin-1 in räumliche Nähe zu CD18, der  $\beta$ -Kette des LFA-1-Integrins bringen und somit die spezifische Interaktion des Regulators mit der cytoplasmatischen Region der CD18-Untereinheit gewährleisten.

Diese Interaktion induziert vermutlich eine Konformationsänderung im extrazellulären Bereich des LFA-1-Integrins. Sie ist jedoch nicht hinreichend, um eine stabile Bindung an ICAM-1 zu gewährleisten.



**Abb. 30: Modell des dualen Wirkmechanismus von Cytohesin-1.**

**A)** und **B)** Die Stimulierung von Zelloberflächenrezeptoren, die in die Integrin-Aktivierung involviert sind (stellvertretend hierfür wurde der CD3/TCR-Komplex dargestellt), führt zu einer Aktivierung der PI3-Kinase und damit zu einer verstärkten Rekrutierung von Cytohesin-1 an die Plasmamembran. Die Rekrutierung erfolgt dabei über die PH-Domäne von Cytohesin-1, die Assoziation mit der Membran durch Bindung von PtdIns-(3,4,5)P<sub>3</sub>, einem Produkt der PI3-Kinase. Lokalisiert an der Plasmamembran kann Cytohesin-1 mit der cytoplasmatischen Domäne von CD18 interagieren bzw. den GDP/GTP-Austausch an ARF- oder ARF-ähnlichen Proteinen katalysieren. Erst das Zusammenwirken dieser beiden Funktionen induziert eine stabile Zelladhäsion an ICAM-1.

Um eine stabile LFA-1/ ICAM-1-Interaktion und eine damit einhergehende stabile Zelladhäsion zu ermöglichen, ist zusätzlich die GEF-Aktivität von Cytohesin-1 entscheidend. Diese Funktion wird ebenfalls durch die SEC7-Domäne vermittelt.

Hierbei katalysiert Cytohesin-1 den GDP/GTP-Austausch an ARF- oder ARF-ähnlichen Proteinen und reguliert dadurch deren Aktivierung. Die Membranlokalisation von Cytohesin-1 gewährleistet vermutlich auch in diesem Fall die Interaktion der SEC7-Domäne mit seinem spezifischen Substrat.

Welche Signalwege durch das GTP-bindende Protein induziert werden ist noch unklar. Es wäre allerdings denkbar, daß Modulationen des Cytoskelettes reguliert werden, die eine Aggregation von LFA-1-Molekülen auf der Zelloberfläche und damit die Aviditätsänderung des Integrins begünstigen.

Studien von van Kooyk *et al.* (1999) legen die Vermutung nahe, daß die Multimerisierung von LFA-1 entscheidend für eine stabile Zelladhäsion ist. Van Kooyk *et al.* (1999) propagieren ein Modell, wonach das Integrin durch Interaktion mit dem Aktin-Cytoskelett in einem inaktiven Zustand stabilisiert wird. Die Aktivierung von LFA-1 führt zu einer temporären Lösung des Integrins aus diesem cytoskelettalen Verband. Hierdurch wird die laterale Mobilität der Integrin-Moleküle und damit ihre Fähigkeit zur Aggregation erhöht. Erst die dadurch induzierte Aviditätsänderung des Integrins gewährleistet eine stabile Zelladhäsion an ICAM-1 durch LFA-1.

Zu klären bleibt die Frage, ob ein Cytohesin-1-Molekül mit CD18 interagieren und gleichzeitig als GEF aktiv sein kann oder ob diese beiden Funktionen parallel, von unterschiedlichen Molekülen ausgeübt werden.

GDP/GTP-Austauschstudien mit Cytohesin-1, ARF1 und verschiedenen CD18-Peptiden, deren Aminosäuresequenzen unterschiedlichen Bereichen der cytoplasmatischen Domäne entsprachen, deuteten darauf hin, daß die Formierung ternärer Komplexe aus diesen drei Proteinen unwahrscheinlich war. Ein CD18-Peptid, das in der Lage war, mit Cytohesin-1 zu interagieren, schien gleichzeitig den GDP/GTP-Austausch an ARF1 zu inhibieren.

Kompetitionsbindungsstudien von T. Knorr, die die Protein-Protein-Bindungsverhältnisse von gereinigtem ARF1-Protein und Cytohesin-1 bei Anwesenheit von CD18-Peptiden analysierten, lieferten vergleichbare Ergebnisse. Sie zeigten, daß CD18 erfolgreich mit ARF1 um die Bindung an Cytohesin-1 konkurrieren konnte.

Es scheint daher wahrscheinlich, daß ein Cytohesin-1-Molekül entweder als Interaktor für CD18 oder als GEF fungiert. Beide Funktionen sind allerdings nötig, um eine stabile Adhäsion von T-Zellen an ICAM-1 zu gewährleisten.

## 5.10 Ausblick

In dieser Arbeit konnte die für die Vermittlung der Interaktion mit Cytohesin-1 kritische Region der cytoplasmatischen Domäne von CD18 auf die drei Aminosäurereste WKA(723 - 725) lokalisiert werden. Die Rolle des Aminosäurerestes H728 wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht näher analysiert. Es wäre denkbar, daß H728 zur Stabilisierung der Cytohesin-1/CD18-Interaktion beiträgt, da die Mutation dieses Aminosäurerestes nach R eine verminderte Interaktion der SEC7-Domäne mit der cytoplasmatischen Domäne von CD18 im Hefesystem zur Folge hatte. Die biochemische und funktionale Charakterisierung von LFA-1, dessen CD18-Untereinheit eine entsprechende Punktmutation trägt, könnte hierzu nähere Erkenntnisse liefern.

Zusätzlich wäre auch die Identifikation des/der kritischen Aminosäurereste(s) der SEC7-Domäne interessant, die die Interaktion mit CD18 vermitteln. Dies könnte möglicherweise auch zur Klärung der Frage beitragen, ob ein Cytohesin-1-Molekül das  $\beta_2$ -Integrin binden und gleichzeitig den Guaninnukleotid-Austausch an ARF katalysieren kann oder ob diese Funktionen von verschiedenen Molekülen parallel ausgeführt werden. Liegen die Interaktionsstellen für das Integrin und die GTPase in unmittelbarer Nähe, so würde dies ein Argument für das zweite Modell liefern.

Einen weiteren wichtigen Punkt stellt die Aufklärung der physiologischen Relevanz der Cytohesin-1-GEF-Funktion dar. Ist der Austauschfaktor tatsächlich an der Regulation der Aktin-Cytoskelett-Modulation beteiligt? Die Kenntnis der spezifischen GTPase ist hierzu erforderlich. Mit der erst kürzlichen Identifikation von ARD1, einem Mitglied der ARF-Familie, als Interaktor für Cytohesin-1 (Vitale *et al.*, 2000), könnte man der Lösung dieser Frage vielleicht schon einen Schritt näher gekommen sein.

Die bisherigen Erkenntnisse implizieren für Cytohesin-1 eine Rolle in der Regulation der durch LFA-1 vermittelten „inside-out“-Signaltransduktion. Es wäre allerdings denkbar, daß das Protein auch in das „outside-in-signaling“, die Signalübertragung vom extrazellulären in den intrazellulären Raum, involviert ist. Zur Klärung dieser Problematik, ebenso wie zur detaillierteren Aufklärung der direkten Regulation von Cytohesin-1, wäre die Kenntnis weiterer, bisher unbekannter Interaktionspartner von Cytohesin-1 von Vorteil.

Ebenso könnte hierbei auch die funktionale Charakterisierung der LFA-1(TRG)-Mutante, im Hinblick auf eine mögliche Modulation der „outside-in“-Signalkaskade, einen wichtigen Beitrag leisten. So wäre beispielsweise die Analyse der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren durch das Wildtyp- bzw. das mutierte Integrin interessant.

## 6 Zusammenfassung

Das Leukocyten-spezifische Integrin LFA-1 spielt eine wichtige Rolle bei der Immunantwort, durch die Vermittlung dynamischer Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Interaktionen. Die kontrollierte Adhäsion bzw. Deadhäsion von Leukocyten bedarf einer spezifischen Regulation des LFA-1-Integrins und die Aufklärung der molekularen Grundlagen dieser Vorgänge ist von großem Interesse.

Cytohesin-1 war unmittelbar vor Beginn dieser Arbeit als cytoplasmatischer Regulationsfaktor der durch LFA-1 vermittelten Zelladhäsion identifiziert worden und seine spezifische Interaktion mit der cytoplasmatischen Domäne von CD18 konnte *in vitro* dokumentiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit gelang es zunächst, die Assoziation von Cytohesin-1 und LFA-1 auch endogen, im intakten Zellverband, mittels Kolokalisationsstudien in der lymphoblastoiden B-Zelllinie LCL-721, zu demonstrieren. Ferner konnte mit Hilfe von Mutationsanalysen die, für die Interaktion kritische Region in der cytoplasmatischen Domäne von CD18 lokalisiert werden. Sie befindet sich im aminoterminalen Bereich und umfaßt die Aminosäuren WKA(723 - 725). Die Mutation dieser Aminosäurereste nach TRG resultierte in einem vollständigen Interaktionsverlust mit Cytohesin-1. Die Inhibition der Cytohesin-1/CD18-Bindung konnte dabei sowohl durch Protein-Protein-Interaktionsanalysen in Hefe als auch durch biochemische Bindungsstudien *in vitro* dokumentiert werden, wobei jeweils Fusionsproteine der cytoplasmatischen Domäne von CD18 charakterisiert wurden.

Funktionale Analysen der WKA(723-725)-Region von CD18 ergaben, daß die Mutation von WKA(723-725) nach TRG im intakten LFA-1-Molekül eine signifikante Reduktion der Integrin-Aktivität zur Folge hatte. Sowohl T-Zellklone als auch nicht hämatopoetische Zellen, wie HeLa, wiesen nach Expression von LFA-1(TRG), mit Hilfe rekombinanter Vaccinia-Viren, eine stark reduzierte Adhäsionsfähigkeit an immobilisiertes ICAM-1 auf. Ferner ergaben funktionale Studien mit HeLa-Zellen, die LFA-1 stabil exprimierten, daß Cytohesin-1 nur dann eine gesteigerte Adhäsion dieser Zellen an ICAM-1 induzierte, wenn sie Wildtyp-LFA-1 exprimierten. HeLa-Zellen, die LFA-1(TRG) exprimierten, ließen sich durch Cytohesin-1 zu keiner verstärkten Adhäsion aktivieren.

Diese Ergebnisse demonstrierten die Bedeutsamkeit der Cytohesin-1/CD18-Interaktion für eine effiziente, durch LFA-1 vermittelte Zelladhäsion. Unklar war jedoch der Mechanismus, durch den Cytohesin-1 die Integrin/Liganden-Bindung regulierte. Studien mit dem Reporterantikörper 24 ließen darauf schließen, daß Cytohesin-1 durch die Bindung an CD18 eine



Konformationsänderung in der extrazellulären Domäne des LFA-1-Integrins induzieren konnte, die möglicherweise die Affinität des Rezeptors modulierte. Diese Modulation der LFA-1-Konformation schien jedoch nicht hinreichend für eine stabile Bindung an ICAM-1 zu sein, wie eingehendere Analysen von Dr. W. Kolanus zeigten. Vielmehr erforderte eine effiziente Zelladhäsion zusätzlich die Guaninnukleotid-Austauschfunktion (GEF-Funktion) von Cytohesin-1, da die GEF-defekte Punktmutante, Cytohesin-1(E157K), nicht mehr in der Lage war, die Adhäsion von Jurkat E6-Zellen an ICAM-1 stabil zu induzieren. Biochemische Interaktionsstudien konnten dabei zeigen, daß die Mutante weiterhin fähig war, die cytoplasmatische Domäne von CD18 zu binden.

Diese und weitere Ergebnisse von Dr. W. Nagel, die einen Zusammenhang zwischen der GEF-Funktion von Cytohesin-1 und dem „Spreading“ von adhärennten Jurkat E6-Zellen aufzeigten, legen die Vermutung nahe, daß Cytohesin-1 durch einen dualen Mechanismus in die LFA-1-Regulation involviert ist. Sowohl die direkte Interaktion von Cytohesin-1 und dem Integrin als auch seine GEF-Funktion stellen essentielle Faktoren für eine stabile Zelladhäsion, die durch LFA-1 vermittelt wird, dar. Welche funktionalen Mechanismen dabei durch den Guaninnukleotid-Austausch und der damit verbundenen Aktivierung einer GTPase induziert werden, ist noch unklar. Primär wäre eine Modulation des Aktin-Cytoskelettes und eine damit verbundene erhöhte laterale Mobilität der Integrine denkbar, die eine verstärkte Rezeptormultimerisierung und dadurch eine Aviditätsänderung des Integrins ermöglicht.

Weitere Studien dieser Arbeit analysierten die Regulation von Cytohesin-1 selbst. Es konnte gezeigt werden, daß PI3-Kinase in die Kontrolle der Cytohesin-1-Funktion involviert war. Die Überexpression einer konstitutiv aktiven Form dieser Kinase (P110\*) führte zu einer gesteigerten Adhäsion von Jurkat E6-Zellen an ICAM-1. Eine Inkubation dieser Zellen mit dem PI3-Kinase-spezifischen Inhibitor Wortmannin resultierte dagegen in einer signifikanten Reduktion der Zelladhäsion.

Weitere funktionale Analysen, die die Zelladhäsion von Jurkat E6-Zellen nach Koexpression von P110\* und der PH-Domäne von Cytohesin-1 untersuchten, sowie eingehendere Studien von Dr. W. Nagel, ermöglichten die Entwicklung eines Modells zur Regulation von Cytohesin-1. Demzufolge führt die Aktivierung der PI3-Kinase zu einer verstärkten Rekrutierung von Cytohesin-1 an die Plasmamembran. Als Rekrutierungsmodul fungiert dabei die PH-Domäne, die durch Bindung von PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, einem Produkt der PI3-Kinase, die Assoziation mit der Membran gewährleistet. Die Rekrutierung von Cytohesin-1 an die Plasmamem-

bran führt zur Aktivierung von LFA-1 und der damit verbundenen stabilen Zelladhäsion an ICAM-1.

## 7 Literaturverzeichnis

- Achstetter, T., Franzusoff, A., Field, C., Schekman, R.** (1988)  
SEC7 encodes an unusual, high molecular weight protein required for membrane traffic from the yeast Golgi apparatus. *J Biol Chem* **263**: 11711-7.
- Albelda, S.M., Buck, C.A.** (1990)  
Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J* **11**: 2868-80.
- Andersson, L.C., Nilsson, K., Gahmberg, C.G.** (1979)  
K562-A human erythroleukemic cell line. *Int J Cancer* **23**: 143-47.
- Andrew, D., Shock, A, Ball, E., Ortlepp, S., Bell, J., Robinson, M.** (1993)  
KIM185, a monoclonal antibody to CD18 which induces a change in the conformation of CD18 and promotes both LFA-1- and CR3-dependent adhesion. *Eur J Immunol* **23**: 2217-22.
- Aplin, A.E., Howe, A.K., Juliano, R.L.** (1999)  
Cell adhesion molecules, signal transduction and cell growth. *Curr Opin Cell Biol* **11**: 737-44.
- Armulik, A., Nilsson, I., von Heijne, G., Johansson, S.** (1999)  
Determination of the border between the transmembrane and cytoplasmic domains of human integrin subunits. *J Biol Chem* **274**: 37030-4.
- Arnaout, M.A., Todd, R.F., Dana, N., Melamed, J., Schlossman, S.F., Colten, H.R.** (1983)  
Inhibition of phagocytosis of complement C3- or immunoglobulin G-coated particles and of C3bi binding by monoclonal antibodies to a monocyte-granulocyte membrane glycoprotein (Mo1). *J Clin Invest* **72**: 71-9.
- Arnaout, M.A.** (1990a)  
Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. *Blood* **75**: 1037-50.
- Arnaout, M.A.** (1990b)  
Leukocyte adhesion molecules deficiency: its structural basis, pathophysiology and implications for modulating the inflammatory response. *Immunol Rev* **114**: 145-80.
- Arnaout, M.A., Dana, N., Gupta, S.K., Tenen, D.G., Fathallah, D.M.** (1990)  
Point mutations impairing cell surface expression of the common beta subunit (CD18) in a patient with leukocyte adhesion molecule (Leu-CAM) deficiency. *J Clin Invest* **85**: 977-81.
- Bajt, M.L., Loftus, J.C.** (1994)  
Mutation of a ligand binding domain of beta 3 integrin. Integral role of oxygenated residues in alpha IIb beta 3 (GPIIb-IIIa) receptor function. *J Biol Chem* **269**: 20913-9.
- Bauer, T.R., Schwartz, B.R., Conrad Liles, W., Ochs, H.D., Hickstein, D.D.** (1998)  
Retroviral-mediated gene transfer of the leukocyte integrin CD18 into peripheral blood CD34+ cells derived from a patient with leukocyte adhesion deficiency type 1. *Blood* **91**: 1520-6.
- Berlin, C., Bargatze, R.F., Campbell, J.J., von Andrian, U.H., Szabo, M.C., Hasslen, S.R., Nelson, R.D., Berg, E.L., Erlandsen, S.L., Butcher, E.C.** (1995)  
alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. *Cell* **80**: 413-22.
- Berton, G., Lowell, C.A.** (1999)  
Integrin signalling in neutrophils and macrophages. *Cell Signal* **11**: 621-35.
- Betz, S.F., Schnuchel, A., Wang, H., Olejniczak, E.T., Meadows, R.P., Lipsky, B.P., Harris, E.A.S., Staunton, D.E., Fesik, S.W.** (1998)  
Solution structure of the cytohesin-1 (B2-1) Sec7 domain and its interaction with the GTPase ADP ribosylation factor 1. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 7909-14.

**Birnboim, H.C., Doly, J.** (1979)

A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-23.

**Bradford, M.M.** (1976)

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-54.

**Burn, P., Kupfer, A., Singer, S.J.** (1988)

Dynamic membrane-cytoskeletal interactions: specific association of integrin and talin arises in vivo after phorbol ester treatment of peripheral blood lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 497-501.

**Casadaban, M.J., Cohen, S.N.** (1980)

Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **138**: 179-207.

**Chan, A.S., Mobley, J.L., Fields, G.B., Shimizu, Y.** (1997)

CD7-mediated regulation of integrin adhesiveness on human T cells involves tyrosine phosphorylation-dependent activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Immunol* **159**: 934-42.

**Chardin, P., Paris, S., Antony, B., Robineau, S., Beraud-Dufour, S., Jackson, C.L., Chabre, M.** (1996)

A human exchange factor for ARF contains Sec7- and pleckstrin-homology domains. *Nature* **384**: 481-4.

**Cifuentes, M.E., Honkanen, L., Rebecchi, M.J.** (1993)

Proteolytic fragments of phosphoinositide-specific phospholipase C-delta 1. Catalytic and membrane binding properties. *J Biol Chem* **268**: 11586-93.

**Cohnheim, J.** (1889)

Lectures on General Pathology: A Handbook for Practitioners and Students. London: New Sydenham Society.

**Corbi, A.L., Miller L.J., O'Connor, K., Larson, R.S., Springer, T.A.** (1987)

cDNA cloning and complete primary structure of the alpha subunit of a leukocyte adhesion glycoprotein, p150,95. *EMBO J* **6**: 4023-8.

**Danilenko, D.M., Rossitto, P.V., Van der Vieren, M., Le Trong, H., McDonough, S.P., Affolter, V.K., Moore, P.F.** (1995)

A novel canine leukointegrin, alpha d beta 2, is expressed by specific macrophage subpopulations in tissue and a minor CD8+ lymphocyte subpopulation in peripheral blood. *J Immunol* **155**: 35-44.

**Darribere, T., Skalski, M., Cousin, H.L., Gaultier, A., Montmory, C., Alfandari, D.** (2000)

Integrins: regulators of embryogenesis. *Biol Cell* **92**: 5-25.

**Dib, K., Andersson, T.** (2000)

BETA 2 integrin signaling in leukocytes. *Front Biosci* **5**: D438-51.

**Donaldson, J.G., Finazzi, D., Klausner, R.D.** (1992)

Brefeldin A inhibits golgi membrane-catalysed exchange of guanine nucleotide onto ARF protein. *Nature* **360**: 350-2.

**Donaldson, J.G., Jackson, C.L.** (2000)

Regulators and effectors of the ARF GTPases. *Curr Opin Cell Biol* **12**: 475-82.

**Dotto, G.P., Zinder, N.D.** (1984)

Reduction of the minimal sequence for initiation of DNA synthesis by qualitative or quantitative changes of an initiator protein. *Nature* **311**: 279-80.

**Dransfield, I., Hogg, N.** (1989)

Regulated expression of Mg<sup>2+</sup> binding epitope on leukocyte integrin alpha subunits. *EMBO J* **8**: 3759-65.

- Dransfield, I., Cabanas, C., Craig, A., Hogg, N.** (1992)  
Divalent cation regulation of the function of the leukocyte integrin LFA-1. *J Cell Biol* **116**: 219-26.
- D'Souza-Schorey, C., Boshans, R.L., McDonough, M., Stahl, P.D., Van Aelst, L.** (1997)  
A role for POR1, a Rac1-interacting protein, in ARF6-mediated cytoskeletal rearrangements. *EMBO J* **16**: 5445-54.
- D'Souza-Schorey, C., Li, G., Colombo, M.I., Stahl, P.D.** (1995)  
A regulatory role for ARF6 in receptor-mediated endocytosis. *Science* **267**: 1175-78.
- Du, X., Saido, T.C., Tsubuki, S., Indig, F.E., Williams, M.J., Ginsberg, M.H.** (1995)  
Calpain cleavage of the cytoplasmic domain of the integrin beta 3 subunit. *J Biol Cell* **270**: 26146-51.
- Duncan, B.K., Rockstroh, P.A., Warner, H.R.** (1978)  
Escherichia coli K-12 mutants deficient in uracil-DNA glycosylase. *J Bacteriol* **134**: 1039-45.
- Dustin, M.L., Springer, T.A.** (1989)  
T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature* **341**: 619-24.
- Dustin, M.L., Springer, T.A.** (1991)  
Role of lymphocyte adhesion receptors in transient interactions and cell locomotion. *Annu Rev Immunol* **9**: 27-66.
- Edelmann, G.M., Crossin, K.L.** (1991)  
Cell adhesion molecules: implications for a molecular histology. *Annu Rev Biochem* **60**: 155-190
- Edwards, C.P., Champe, M., Gonzalez, T., Wessinger, M.E., Spencer, S.A., Presta, L.G., Berman, P.W., Bodary, S.C.** (1995)  
Identification of amino acids in the CD11a I-domain important for binding of the leukocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) to intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). *J Biol Chem* **270**: 12635-40.
- Egenthaler, M., Hofferer, L., Shattil, S.J., Ginsberg, M.H.** (1997)  
A conserved sequence motif in the integrin beta3 cytoplasmic domain is required for its specific interaction with beta3-endonexin. *J Biol Chem* **272**: 7693-8.
- Fabbri, M., Fumagalli, L., Bossi, G., Bianchi, E., Bender, J.R., Pardi, R.** (1999)  
A tyrosine-based sorting signal in the beta2 integrin cytoplasmic domain mediates its recycling to the plasma membrane and is required for ligand-supported migration. *EMBO J* **18**: 4915-25.
- Falkner, F.G., Moss, B.** (1988)  
Escherichia coli gpt gene provides dominant selection for vaccinia virus open reading frame expression vectors. *J Virol* **62**: 1849-54.
- Fields, S., Song, O.** (1989)  
A novel genetic system to detect protein-protein interaction. *Nature* **340**: 245-6.
- Fields, S., Sternglanz, R.** (1994)  
The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet* **10**: 286-92.
- Franco, M., Chardin, P., Chabre, M., Paris, S.** (1995)  
Myristoylation of ADP-ribosylation factor 1 facilitates nucleotide exchange at physiological Mg<sup>2+</sup> levels. *J Biol Chem* **270**: 1337-41.
- Franco, M., Boretto, J., Robineau, S., Monier, S., Goud, B., Chardin, P., Chavrier, P.** (1998)  
ARNO3, a Sec7-domain guanine nucleotide exchange factor for ADP ribosylation factor 1, is involved in the control of Golgi structure and function. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 9926-31.
- Frank, S., Upender, S., Hansen, S.H., Casanova, J.E.** (1998a)  
ARNO is a guanine nucleotide exchange factor for ADP-ribosylation factor 6. *J Biol Chem* **273**: 23-7.

- Frank, S.R., Hatfield, J.C., Casanova, J.E.** (1998b)  
Remodeling of the actin cytoskeleton is coordinately regulated by protein kinase C and the ADP-ribosylation factor nucleotide exchange factor ARNO. *Mol Biol Cell* **9**: 3133-46.
- Friedrichson, T., Kurzchalia, T.V.** (1998)  
Microdomains of GPI-anchored proteins in living cells revealed by crosslinking. *Nature* **394**: 802-5.
- Gahmberg, C.G., Tolvanen, M., Kotovuori, P.** (1997)  
Leukocyte adhesion--structure and function of human leukocyte beta2-integrins and their cellular ligands. *Eur J Biochem* **245**: 215-32.
- Ganpule, G., Knorr, R., Miller, J.M., Carron, C.P., Dustin, M.L.** (1997)  
Low affinity of cell surface lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) generates selectivity for cell-cell interactions. *J Immunol* **159**: 2685-92.
- Geiger, C., Nagel, W., Boehm, T., van Kooyk, Y., Figdor, C.G., Kremmer, E., Hogg, N., Zeitlmann, L., Dierks, H., Weber, K.S., Kolanus, W.** (2000)  
Cytohesin-1 regulates beta-2 integrin-mediated adhesion through both ARF-GEF function and interaction with LFA-1. *EMBO J* **19**: 2525-36.
- Gluzman, Y.** (1981)  
SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* **23**: 175-82.
- Gonzalez-Amaro, R., Sanchez-Madrid, F.** (1999)  
Cell adhesion molecules: selectins and integrins. *Crit Rev Immunol* **19**: 389-429.
- Grayson, M.H., Van der Vieren, M., Sterbinsky, S.A., Michael Gallatin, W., Hoffman, P.A., Staunton, D.E., Bochner, B.S.** (1998)  
alpha2beta1 integrin is expressed on human eosinophils and functions as an alternative ligand for vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1). *J Exp Med* **188**: 2187-91.
- Guan, J.L.** (1997)  
Focal adhesion kinase in integrin signaling. *Matrix Biol* **16**: 195-200.
- Gyuris, J., Golemis, E., Chertkov, H., Brent, R.** (1993)  
Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell* **75**: 791-803.
- Hanahan, D.** (1983)  
Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-80.
- Hannigan, G.E., Leung-Hagesteijn, C., Fitz-Gibbon, L., Coppolino, M.G., Radeva, G., Filmus, J., Bell, J.C., Dedhar, S.** (1996)  
Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. *Nature* **379**: 91-6.
- Heller-Harrison, R.A., Morin, M., Guilherme, A., Czech, M.P.** (1996)  
Insulin-mediated targeting of phosphatidylinositol 3-kinase to GLUT4-containing vesicles. *J Biol Chem* **271**: 10200-4.
- Helms, J.B., Rothman, J.E.** (1992)  
Inhibition by brefeldin A of a Golgi membrane enzyme that catalyzes exchange of guanine nucleotide bound to ARF. *Nature* **360**: 352-4.
- Hemler, M.E.** (1998)  
Integrin associated proteins. *Curr Opin Cell Biol* **10**: 578-85.
- Hibbs, M.L., Xu, H., Stacker, S.A., Springer, T.A.** (1991a)  
Regulation of adhesion of ICAM-1 by the cytoplasmic domain of LFA-1 integrin beta subunit. *Science* **251**: 1611-3.

- Hibbs, M.L., Jakes, S., Stacker, S.A., Wallace, R.W., Springer, T.A.** (1991b)  
The cytoplasmic domain of the integrin lymphocyte function-associated antigen 1 beta subunit: sites required for binding to intercellular adhesion molecule 1 and the phorbol ester-stimulated phosphorylation site. *J Exp Med* **174**: 1227-38.
- Hmama, Z., Knutson, K.L., Herrera-Velitz, P., Nandan, D., Reiner, N.E.** (1999)  
Monocyte adherence induced by lipopolysaccharide involves CD14, LFA-1, and cytohesin-1. Regulation by Rho and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* **274**: 1050-7.
- Hochhauser, S.J., Weiss, B.** (1978)  
Escherichia coli mutants deficient in deoxyuridine triphosphatase. *J Bacteriol* **34**: 157-66.
- Hogg, N., Landis, R.C., Bates, P.A., Stanley, P., Randi, A.M.** (1994)  
The sticking point: how integrins bind to their ligands. *Trends Cell Biol* **4**: 379-82.
- Horwitz, A.F.** (1998)  
Integrine. *Spektrum der Wissenschaft. Scientific American* **1**: 86-94.
- Hu, Q., Klippel, A., Muslin, A.J., Fantl, W.J., Williams, L.T.** (1995)  
Ras-dependent induction of cellular responses by constitutively active phosphatidylinositol-3 kinase. *Science* **268**: 100-2.
- Huang, C., Zang, Q., Takagi, J., Springer, T.A.** (2000)  
Structural and functional studies with antibodies to the integrin beta 2 subunit. A model for the I-like domain. *J Biol Chem* **275**: 21514-24.
- Hughes, B.J., Hollers, J.C., Crockett-Torabi, E., Smith, C.W.** (1992)  
Recruitment of CD11b/CD18 to the neutrophil surface and adherence-dependent cell locomotion. *J Clin Invest* **90**: 1687-96.
- Hughes, P.E., O'Toole, T.E., Ylanne, J., Shattil, S.J., Ginsberg, M.H.** (1995)  
The conserved membrane-proximal region of an integrin cytoplasmic domain specifies ligand binding affinity. *J Biol Chem* **270**: 12411-7.
- Hughes, P.E., Diaz-Gonzalez, F., Leong, L., Wu, C., McDonald, J.A., Shattil, S.J., Ginsberg, M.H.** (1996)  
Breaking the integrin hinge. A defined structural constraint regulates integrin signaling. *J Biol Chem* **271**: 6571-4.
- Hughes, P.E., Renshaw, M.W., Pfaff, M., Forsyth, J., Keivens, V.M., Schwartz, M.A., Ginsberg, M.H.** (1997)  
Suppression of integrin activation: a novel function of a Ras/Raf-initiated MAP kinase pathway. *Cell* **88**: 521-30.
- Huth, J.R., Olejniczak, E.T., Mendoza, R., Liang, H., Harris, E.A., Lupher, M.L. Jr, Wilson, A.E., Fesik, S.W., Staunton, D.E.** (2000)  
NMR and mutagenesis evidence for an I domain allosteric site that regulates lymphocyte function-associated antigen 1 ligand binding. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 5231-6.
- Hynes, R.O.** (1992)  
Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**: 11-25.
- Ish Horowicz, D., Burke, J.F.** (1981)  
Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res* **9**: 2989-98.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., Kimura, A.** (1983)  
Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* **153**: 163-8.
- Jensen, F.C., Girardi, A.J., Gilden, R.V., Koprowski, H.** (1964)  
Infection of human and simian tissue cultures with Rous sarcoma virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **52**: 53-9.

- Kamata, T., Wright, R., Takada, Y.** (1995)  
Critical threonine and aspartic acid residues within the I domains of beta 2 integrins for interactions with intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and C3bi. *J Biol Chem* **270**: 12531-5.
- Kashiwagi, H., Schwartz, M.A., Eigenthaler, M., Davis, K.A., Ginsberg, M.H., Shattil, S.J.** (1997)  
Affinity modulation of platelet integrin alphaIIb beta3 by beta3-endonexin, a selective binding partner of the beta3 integrin cytoplasmic tail. *J Cell Biol* **137**: 1433-43.
- Klarlund, J.K., Guilherme, A., Holik, J.J., Virbasius, J.V., Chawla, A., Czech, M.P.** (1997)  
Signaling by phosphoinositide-3,4,5-trisphosphate through proteins containing pleckstrin and Sec7 homology domains. *Science* **275**: 1927-30.
- Klarlund, J.K., Rameh, L.E., Cantley, L.C., Buxton, J.M., Holik, J.J., Sakelis, C., Patki, V., Corvera, S., Czech, M.P.** (1998)  
Regulation of GRP1-catalyzed ADP ribosylation factor guanine nucleotide exchange by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* **273**: 1859-62.
- Knorr, R., Dustin, M.L.** (1997)  
The lymphocyte function-associated antigen 1 I domain is a transient binding module for intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 and ICAM-3 in hydrodynamic flow. *J Exp Med* **186**: 719-30.
- Knorr, T., Nagel, W., Kolanus, W.** (2000)  
Phosphoinositides determine specificity of the guanine-nucleotide exchange activity of cytohesin-1 for ADP-ribosylation factors derived from a mammalian expression system. *Eur J Biochem* **267**: 3784-91.
- Kolanus, W., Nagel, W., Schiller, B., Zeitlmann, L., Godar, S., Stockinger, H., Seed, B.** (1996)  
Alpha L beta 2 integrin/LFA-1 binding to ICAM-1 induced by cytohesin-1, a cytoplasmic regulatory molecule. *Cell* **86**: 233-42.
- Kolanus, W., Seed, B.** (1997)  
Integrins and inside-out signal transduction: converging signals from PKC and PIP3. *Curr Opin Cell Biol* **9**: 725-31.
- Konrad, E.B., Lehman, I.R.** (1975)  
Novel mutants of Escherichia coli that accumulate very small DNA replicative intermediates. *Proc Natl Acad Sci USA* **72**: 2150-4.
- Kouns, W.C., Hadvary, P., Haering, P., Steiner, B.** (1992)  
Conformational modulation of purified glycoprotein (GP) IIb-IIIa allows proteolytic generation of active fragments from either active or inactive GPIIb-IIIa. *J Biol Chem* **267**: 18844-51.
- Krauss, K., Altevogt, P.** (1999)  
Integrin leukocyte function-associated antigen-1-mediated cell binding can be activated by clustering of membrane rafts. *J Biol Chem* **274**: 36921-7.
- Kumar, C.C.** (1998)  
Signaling by integrin receptors. *Oncogene* **17**: 365-73.
- Kunkel, T.A.** (1985)  
Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 488-92.
- Labadia, M.E., Jeanfavre, D.D., Caviness, G.O., Morelock, M.M.** (1998)  
Molecular regulation of the interaction between leukocyte function-associated antigen-1 and soluble ICAM-1 by divalent metal cations. *J Immunol* **161**: 836-42.
- Laemmli, U.K.** (1970)  
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-5.
- LaFlamme, S.E., Homan, S.M., Bodeau, A.L., Mastrangelo, A.M.** (1997)  
Integrin cytoplasmic domains as connectors to the cell's signal transduction apparatus. *Matrix Biol* **16**: 153-63.



- Landis, R.C., Bennett, R.I., Hogg, N.** (1993)  
A novel LFA-1 activation epitope maps to the I domain. *J Cell Biol* **120**: 1519-27.
- Larson, R.S., Springer, T.A.** (1990)  
Structure and function of leukocyte integrins. *Immunol Rev* **114**: 181-217.
- Lawson, M.A., Maxfield, F.R.** (1995)  
Ca(2+)- and calcineurin-dependent recycling of an integrin to the front of migrating neutrophils. *Nature* **377**: 75-9.
- Lecoanet-Henchoz, S., Gauchat, J.F., Aubry, J.P., Graber, P., Life, P., Paul-Eugene, N., Ferrua, B., Corbi, A.L., Dugas, B., Plater-Zyberk, C.** (1995)  
CD23 regulates monocyte activation through a novel interaction with the adhesion molecules CD11b-CD18 and CD11c-CD18. *Immunity* **3**: 119-25.
- Lee, J.O., Rieu, P., Arnaout, M.A., Liddington, R.** (1995)  
Crystal structure of the A domain from the  $\beta$  subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18). *Cell* **800**: 631-38
- Lee, S.Y., Mansour, M., Pohajdak, B.** (2000)  
B2-1, a Sec7- and pleckstrin homology domain-containing protein, localizes to the Golgi complex. *Exp Cell Res* **256**: 515-21.
- Leitinger, B., Hogg, N.** (2000)  
Effects of I domain deletion on the function of the beta2 integrin lymphocyte function-associated antigen-1. *Mol Biol Cell* **11**: 677-90.
- Lemmon, M.A., Ferguson, K.M., Schlessinger, J.** (1996)  
PH domains: diverse sequences with a common fold recruit signaling molecules to the cell surface. *Cell* **85**: 621-4.
- Ley, K.** (1996)  
Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process. *Cardiovasc Res* **32**: 733-42.
- Liliental, J., Chang, D.D.** (1998)  
Rack1, a receptor for activated protein kinase C, interacts with integrin beta subunit. *J Biol Chem* **273**: 2379-83.
- Lindahl, T.** (1974)  
An N-glycosidase from Escherichia coli that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues. *Proc Natl Acad Sci USA* **71**: 3649-53.
- Lippincott-Schwartz, J., Yuan, L., Tipper, C., Amherdt, M., Orci, L., Klausner, R.D.** (1991)  
Brefeldin A's effects on endosomes, lysosomes, and the TGN suggest a general mechanism for regulating organelle structure and membrane traffic. *Cell* **67**: 601-16.
- Liu, L., Pohajdak, B.** (1992)  
Cloning and sequencing of a human cDNA from cytolytic NK/T cells with homology to yeast SEC7. *Biochim Biophys Acta* **1132**: 75-8.
- Loftus, J.C., Smith, J.W., Ginsberg, M.H.** (1994)  
Integrin-mediated cell adhesion: the extracellular face. *J Biol Chem* **269**: 25235-8.
- Lopata, M.A., Cleveland, D.W., Sollner, Webb, B.** (1984)  
High level transient expression of a chloramphenicol acetyl transferase gene by DEAE-dextran mediated DNA transfection coupled with a dimethyl sulfoxide or glycerol shock treatment. *Nucleic Acids Res* **12**: 5707-17.

- Lopez Rodriguez, C., Nueda, A., Grosppierre, B., Sanchez-Madrid, F., Fischer, A., Springer, T.A., Corbi, A.L.** (1993)  
Characterization of two new CD18 alleles causing severe leukocyte adhesion deficiency. *Eur J Immunol* **23**: 2792-8.
- Lub, M., van Kooyk, Y., Figdor, C.G.** (1995)  
Ins and outs of LFA-1. *Immunol Today* **16**: 479-83.
- Lub, M., van Vliet, S.J., Oomen, S.P., Pieters, R.A., Robinson, M., Figdor, C.G., van Kooyk, Y.** (1997)  
Cytoplasmic tails of beta 1, beta 2, and beta 7 integrins differentially regulate LFA-1 function in K562 cells. *Mol Biol Cell* **8**: 719-28.
- Mackett, M., Smith, G.L., Moss, B.** (1982)  
Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 7415-9.
- Marcantonio, E.E., David, F.S.** (1997)  
Integrin receptor signaling: the propagation of an alpha-helix model. *Matrix Biol* **16**: 179-84.
- McDowall, A., Leitinger, B., Stanley, P., Bates, P.A., Randi, A.M., Hogg, N.** (1998)  
The I domain of integrin leukocyte function-associated antigen-1 is involved in a conformational change leading to high affinity binding to ligand intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1). *J Biol Chem* **273**: 27396-403.
- Meacci, E., Tsai, S.C., Adamik, R., Moss, J., Vaughan, M.** (1997)  
Cytohesin-1, a cytosolic guanine nucleotide-exchange protein for ADP-ribosylation factor. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 1745-8.
- Moss, J., Vaughan, M.** (1995)  
Structure and function of ARF proteins: activators of cholera toxin and critical components of intracellular vesicular transport processes. *J Biol Chem* **270**: 12327-30.
- Moss, J., Vaughan, M.** (1998)  
Molecules in the ARF orbit. *J Biol Chem* **273**: 21431-4.
- Mossessova, E., Gulbis, J.M., Goldberg, J.** (1998)  
Structure of the guanine nucleotide exchange factor Sec7 domain of human arno and analysis of the interaction with ARF GTPase. *Cell* **92**: 415-23.
- Mould, A.P.** (1996)  
Getting integrins into shape: recent insights into how integrin activity is regulated by conformational changes. *J Cell Sci* **109**: 2613-8.
- Mullis, K.B., Faloona, F.A.** (1987)  
Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**: 335-50.
- Nagel, W., Zeitlmann, L., Schilcher, P., Geiger, C., Kolanus, J., Kolanus, W.** (1998a)  
Phosphoinositide 3-OH kinase activates the beta2 integrin adhesion pathway and induces membrane recruitment of cytohesin-1. *J Biol Chem* **273**: 14853-61.
- Nagel, W., Schilcher, P., Zeitlmann, L., Kolanus, W.** (1998b)  
The PH domain and the polybasic c domain of cytohesin-1 cooperate specifically in plasma membrane association and cellular function. *Mol Biol Cell* **9**: 1981-94.
- Nelson, C., Rabb, H., Arnaout, M.A.** (1992)  
Genetic cause of leukocyte adhesion molecule deficiency. Abnormal splicing and a missense mutation in a conserved region of CD18 impair cell surface expression of beta 2 integrins. *J Biol Chem* **267**: 3351-7.
- Nishizuka, Y.** (1986)  
Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* **233**: 305-12.

- Norman, J.C., Jones, D., Barry, S.T., Holt, M.R., Cockcroft, S., Critchley, D.R.** (1998)  
ARF1 mediates paxillin recruitment to focal adhesions and potentiates Rho-stimulated stress fiber formation in intact and permeabilized Swiss 3T3 fibroblasts. *J Cell Biol* **143**: 1981-95.
- Ogasawara, M., Kim, S.C., Adamik, R., Togawa, A., Ferrans, V.J., Takeda, K., Kirby, M., Moss, J., Vaughan, M.** (2000)  
Similarities in function and gene structure of cytohesin-4 and cytohesin-1, guanine nucleotide-exchange proteins for ADP-ribosylation factors. *J Biol Chem* **275**: 3221-30.
- Ohta, Y., Stossel, T.P., Hartwig, J.H.** (1991)  
Ligand-sensitive binding of actin-binding protein to immunoglobulin G Fc receptor I (FcγRI). *Cell* **67**: 275-82.
- O'Neill, G.M., Fashena, S.J., Golemis, E.A.** (2000)  
Integrin signalling: a new Cas(t) of characters enters the stage. *Trends Cell Biol* **10**: 111-9.
- Ortlepp, S., Stephens, P.E., Hogg, N., Figdor, C.G., Robinson, M.K.** (1995)  
Antibodies that activate beta 2 integrins can generate different ligand binding states. *Eur J Immunol* **25**: 637-43.
- Otey, C.A., Pavalko, F.M., Burridge, K.** (1990)  
An interaction between alpha-actinin and the beta 1 integrin subunit in vitro. *J Cell Biol* **111**: 721-9.
- O'Toole, T.E.** (1997)  
Integrin signaling: building connections beyond the focal contact? *Matrix Biol* **16**: 165-71.
- Pacheco-Rodriguez, G., Meacci, E., Vitale, N., Moss, J., Vaughan, M.** (1998)  
Guanine nucleotide exchange on ADP-ribosylation factors catalyzed by cytohesin-1 and its Sec7 domain. *J Biol Chem* **273**: 26543-8.
- Panicali, D., Paoletti, E.** (1982)  
Construction of poxvirus as cloning vectors: insertion of the thymidine kinase gene from herpes simplex virus into the DNA of infectious vaccinia virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 4927-31.
- Paris, S., Beraud-Dufour, S., Robineau, S., Bigay, J., Antonny, B., Chabre, M., Chardin, P.** (1997)  
Role of protein-phospholipid interactions in the activation of ARF1 by the guanine nucleotide exchange factor Arno. *J Biol Chem* **272**: 22221-6.
- Pavalko, F.M., LaRoche, S.M.** (1993)  
Activation of human neutrophils induces an interaction between the integrin beta 2-subunit (CD18) and the actin binding protein alpha-actinin. *J Immunol* **151**: 3795-807.
- Pawson, T.** (1995)  
Protein modules and signalling networks. *Nature* **373**: 573-80.
- Peter, K., O'Toole, T.E.** (1995)  
Modulation of cell adhesion by changes in alpha L beta 2 (LFA-1, CD11a/CD18) cytoplasmic domain/cytoskeleton interaction. *J Exp Med* **181**: 315-26.
- Peters, P.J., Hsu, V.W., Ooi, C.E., Finazzi, D., Teal, S.B., Oorschot, V., Donaldson, J.G., Klausner, R.D.** (1995)  
Overexpression of wild-type and mutant ARF1 and ARF6: distinct perturbations of nonoverlapping membrane compartments. *J Cell Biol* **128**: 1003-17.
- Petruzzelli, L., Maduzia, L., Springer, T.A.** (1995)  
Activation of lymphocyte function-associated molecule-1 (CD11a/CD18) and Mac-1 (CD11b/CD18) mimicked by an antibody directed against CD18. *J Immunol* **155**: 854-66.
- Petruzzelli, L., Maduzia, L., Springer, T.A.** (1998)  
Differential Requirements for LFA-1 binding to ICAM-1 and LFA-1-mediated cell aggregation. *J Immunol* **160**: 4208-16.

- Peyroche, A., Paris, S., Jackson, C.L.** (1996)  
Nucleotide exchange on ARF mediated by yeast Gea1 protein. *Nature* **384**: 479-81.
- Pfaff, M., Liu, S., Erle, D.J., Ginsberg, M.H.** (1998)  
Integrin beta cytoplasmic domains differentially bind to cytoskeletal proteins. *J Biol Chem* **273**: 6104-9.
- Porter, J.C., Hogg, N.** (1997)  
Integrin cross talk: activation of lymphocyte function-associated antigen-1 on human T cells alters alpha4beta1- and alpha5beta1-mediated function. *J Cell Biol* **138**: 1437-47.
- Porter, J.C., Hogg, N.** (1998)  
Integrins take partners: cross-talk between integrins and other membrane receptors. *Trends Cell Biol* **8**: 390-6.
- Pyszniak, A.M., Carpenito, C., Takei, F.** (1997)  
The role of LFA-1 (CD11a/CD18) cytoplasmic domains in binding to intercellular adhesion molecule-1 (CD54) and in postreceptor cell spreading. *Exp Cell Res* **233**: 78-87.
- Rabb, H., Michishita, M., Sharma, C.P., Brown, D., Arnaout, M.A.** (1993)  
Cytoplasmic tails of human complement receptor type 3 (CR3, CD11b/CD18) regulate ligand avidity and the internalization of occupied receptors. *J Immunol* **151**: 990-1002.
- Radhakrishna, H., Klausner, R.D., Donaldson, J.G.** (1996)  
Aluminum fluoride stimulates surface protrusions in cells overexpressing the ARF6 GTPase. *J Cell Biol* **134**: 935-47.
- Reitnauer, P.J., DeMars, R., Sondel, P.M.** (1985)  
The proliferative immune response to autologous Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cells. I. Studies with HLA haplotype loss variants demonstrate a role for MHC-linked genes. *Hum Immunol* **13**: 177-91.
- Romeo, C., Seed, B.** (1991)  
Cellular immunity to HIV activated by CD4 fused to T cell or Fc receptor polypeptides. *Cell* **64**: 1037-46.
- Rothlein, R., Springer, T.A.** (1986)  
The requirement for lymphocyte function-associated antigen 1 in homotypic leukocyte adhesion stimulated by phorbol ester. *J Exp Med* **163**: 1132-49.
- Rothman, J.E.** (1994)  
Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* **372**: 55-63.
- Ruden, D.M., Ma, J., Li, Y., Wood, K., Ptashne, M.** (1991)  
Generating yeast transcriptional activators containing no yeast protein sequences. *Nature* **350**: 250-2.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N.** (1985)  
Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-4.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A.** (1988)  
Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-91.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.** (1989)  
Molecular Cloning: A laboratory manual. 2<sup>nd</sup> edition. (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Schiestl, R.H., Gietz, R.D.** (1989)  
High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet* **16**: 339-346.

- Schlaepfer, D.D., Hunter, T.** (1998)  
Integrin signalling and tyrosine phosphorylation: just the FAKs? *Trends Cell Biol* **8**: 151-7.
- Seed, B.** (1987)  
An LFA-3 cDNA encodes a phospholipid-linked membrane protein homologous to its receptor CD2. *Nature* **329**: 840-2.
- Sharma, C.P., Ezzell, R.M., Arnaout, M.A.** (1995)  
Direct interaction of filamin (ABP-280) with the beta 2-integrin subunit CD18. *J Immunol* **154**: 3461-70.
- Shattil, S.J., Hoxie, J.A., Cunningham, M., Brass, L.F.** (1985)  
Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa complex during platelet activation. *J Biol Chem* **260**: 11107-14.
- Shaw, G.** (1996)  
The pleckstrin homology domain: an intriguing multifunctional protein module. *BioEssays* **18**: 35-46.
- Shimizu, Y., Mobley, J.L., Finkelstein, L.D., Chan, A.S.** (1995)  
A role for phosphatidylinositol 3-kinase in the regulation of beta 1 integrin activity by the CD2 antigen. *J Cell Biol* **131**: 1867-80.
- Shimizu, Y., Hunt, S.W. 3rd.** (1996)  
Regulating integrin-mediated adhesion: one more function for PI 3-kinase? *Immunol Today* **17**: 565-73.
- Shpetner, H., Joly, M., Hartley, D., Corvera, S.** (1996)  
Potential sites of PI-3 kinase function in the endocytic pathway revealed by the PI-3 kinase inhibitor, wortmannin. *J Cell Biol* **132**: 595-605.
- Sigal, A., Bleijs, D.A., Grabovsky, V., van Vliet, S.J., Dwir, O., Figdor, C.G., van Kooyk, Y., Alon, R.** (2000)  
The LFA-1 integrin supports rolling adhesions on ICAM-1 under physiological shear flow in a permissive cellular environment. *J Immunol* **165**: 442-52.
- Sligh, J.E. Jr, Hurwitz, M.Y., Zhu, C.M., Anderson, D.C., Beaudet, A.L.** (1992)  
An initiation codon mutation in CD18 in association with the moderate phenotype of leukocyte adhesion deficiency. *J Biol Chem* **267**: 714-8.
- Smith, J.W.** (1997)  
Allostery and proteolysis: two novel modes of regulating integrin function. *Matrix Biol* **16**: 173-8.
- Springer, T.A.** (1990)  
Adhesion receptors of the immune system. *Nature* **346**: 425-34.
- Springer, T.A.** (1994)  
Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* **76**: 301-14.
- Stewart, M., Thiel, M., Hogg, N.** (1995)  
Leukocyte integrins. *Curr Opin Cell Biol* **7**: 690-6.
- Stewart, M., Hogg, N.** (1996)  
Regulation of leukocyte integrin function: affinity vs. avidity. *J Cell Biochem* **61**: 554-61.
- Studier, F.W., Moffatt, B.A.** (1986)  
Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**: 113-30.
- Sussman, D.J., Milman, G.** (1984)  
Short-term, high-efficiency expression of transfected DNA. *Mol Cell Biol* **4**: 1641-3.

- Tabor, S., Richardson, C.C.** (1985)  
A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 1074-8.
- Takada, Y., Kamata, T., Irie, A., Puzon-McLaughlin, W., Zhang, X.P.** (1997)  
Structural basis of integrin-mediated signal transduction. *Matrix Biol* **16**: 143-51.
- Tian, L., Kilgannon, P., Yoshihara, Y., Mori, K., Gallatin, W.M., Carpen, O., Gahmberg, C.G.** (2000)  
Binding of T lymphocytes to hippocampal neurons through ICAM-5 (telencephalin) and characterization of its interaction with the leukocyte integrin CD11a/CD18. *Eur J Immunol* **30**: 810-8.
- Tuckwell, D.S., Brass, A., Humphries, M.J.** (1992)  
Homology modelling of integrin EF-hands. Evidence for widespread use of a conserved cation-binding site. *Biochem J* **285**: 325-31.
- Tyndall, R.L., Jacobson, K.B., Teeter, E.** (1965)  
Characterization of HeLa cell and viral ribonucleic acid by oligonucleotide analysis. *Biochim Biophys Acta* **108**: 11-17.
- Van der Vieren, M., Le Trong, H., Wood, C.L., Moore, P.F., St John, T., Staunton, D.E., Gallatin, W.M.** (1995)  
A novel leukointegrin, alpha d beta 2, binds preferentially to ICAM-3. *Immunity* **3**: 683-90.
- van Kooyk, Y., van de Wiel-van Kemenade, P., Weder, P., Kuijpers, T.W., Figdor, C.G.** (1989)  
Enhancement of LFA-1-mediated cell adhesion by triggering through CD2 or CD3 on T lymphocytes. *Nature* **342**: 811-3.
- van Kooyk, Y., Weder, P., Hogervorst, F., Verhoeven, A.J., van Seventer, G., te Velde, A.A., Borst, J., Keizer, G.D., Figdor, C.G.** (1991)  
Activation of LFA-1 through a Ca<sup>2+</sup>(+)-dependent epitope stimulates lymphocyte adhesion. *J Cell Biol* **112**: 345-54.
- van Kooyk, Y., Weder, P., Heije, K., Figdor, C.G.** (1994)  
Extracellular Ca<sup>2+</sup> modulates leukocyte function-associated antigen-1 cell surface distribution on T lymphocytes and consequently affects cell adhesion. *J Cell Biol* **124**: 1061-70.
- van Kooyk, Y., van Vliet, S.J., Figdor, C.G.** (1999)  
The actin cytoskeleton regulates LFA-1 ligand binding through avidity rather than affinity changes. *J Biol Chem* **274**: 26869-77.
- Van Kooyk, Y., Figdor, C.G.** (2000)  
Avidity regulation of integrins: the driving force in leukocyte adhesion. *Curr Opin Cell Biol* **12**: 542-47.
- Varma, R., Mayor, S.** (1998)  
GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature* **394**: 798-801.
- Vennegoor, C.J., van de Wiel-van Kemenade, E., Huijbens, R.J., Sanchez-Madrid, F., Melief, C.J., Figdor, C.G.** (1992)  
Role of LFA-1 and VLA-4 in the adhesion of cloned normal and LFA-1 (CD11/CD18)-deficient T cells to cultured endothelial cells. *J Immunol* **148**: 1093-101.
- Vitale, N., Pacheco-Rodriguez, G., Ferrans, V.J., Riemenschneider, W., Moss, J., Vaughan, M.** (2000)  
Specific functional interaction of human cytohesin-1 and ADP-ribosylation factor domain protein (ARD1). *J Biol Chem* **275**: 21331-9.
- Wallace, R.B., Miyada, C.G.** (1987)  
Oligonucleotide probes for the screening of recombinant DNA libraries. *Methods Enzymol* **152**: 432-42.
- Ward, S.G., June, C.H., Olive, D.** (1996)  
PI 3-kinase: a pivotal pathway in T-cell activation? *Immunol Today* **17**: 187-96.

- Wary, K.K., Mariotti, A., Zurzolo, C., Giancotti, F.G.** (1998)  
A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth. *Cell* **94**: 625-34.
- Weber, K.S., York, M.R., Springer, T.A., Klickstein, L.B.** (1997)  
Characterization of lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1)-deficient T cell lines. *J Immunol* **158**: 273-9.
- Weber, K.S., Klickstein, L.B., Weber, C.** (1999)  
Specific activation of leukocyte beta2 integrins lymphocyte function-associated antigen-1 and Mac-1 by chemokines mediated by distinct pathways via the alpha subunit cytoplasmic domains. *Mol Biol Cell* **10**: 861-73.
- Weiss, A., Wiskocil, R.L., Stobo, J.D.** (1984)  
The role of T3 surface molecules in the activation of human T cells: a two-stimulus requirement for IL 2 production reflects events occurring at a pre-translational level. *J Immunol* **133**: 123-8.
- Whitman, M., Downes, C.P., Keeler, M., Keller, T., Cantley, L.** (1988)  
Type I phosphatidylinositol kinase makes a novel inositol phospholipid, phosphatidylinositol-3-phosphate. *Nature* **332**: 644-6.
- Williams, M.J., Hughes, P.E., O'Toole, T.E., Ginsberg, M.H.** (1994)  
The inner world of cell adhesion: integrin cytoplasmic domains. *Trends Cell Biol* **4**: 109-12.
- Wood, S.A., Park, J.E., Brown, W.J.** (1991)  
Brefeldin A causes a microtubule-mediated fusion of the trans-golgi network and early endosomes. *Cell* **67**: 591-600.
- Wright, S.D., Rao, P.E., van Voorhis, W.C., Craigmyle, L.S., Iida, K., Talle, M.A., Westberg, E.F., Goldstein, G., Silverstein, S.C.** (1983)  
Identification of the C3bi receptor of human monocytes and macrophages by using monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 5699-703.
- Yang, C.Z., Heimberg, H., D'Souza-Schorey, C., Mueckler, M.M., Stahl, P.D.** (1998)  
Subcellular distribution and differential expression of endogenous ADP-ribosylation factor 6 in mammalian cells. *J Biol Chem* **273**: 4006-11.
- Yednock, T.A., Cannon, C., Vandevent, C., Goldbach, E.G., Shaw, G., Ellis, D.K., Liaw, C., Fritz, L.C., Tanner, L.I.** (1995)  
Alpha 4 beta 1 integrin-dependent cell adhesion is regulated by a low affinity receptor pool that is conformationally responsive to ligand. *J Biol Chem* **270**: 28740-50.
- Zeitlmann, L., Knorr, T., Knoll, M., Romeo, C., Sirim, P., Kolanus, W.** (1998)  
T cell activation induced by novel gain-of-function mutants of Syk and ZAP-70. *J Biol Chem* **273**: 15445-52.
- Zell, T., Hunt, S.W. 3rd, Mobley, J.L., Finkelstein, L.D., Shimizu, Y.** (1996)  
CD28-mediated up-regulation of beta 1-integrin adhesion involves phosphatidylinositol 3-kinase. *J Immunol* **156**: 883-6.
- Zervos, A.S., Gyuris, J., Brent, R.** (1993)  
Mxi1, a protein that specifically interacts with Max to bind Myc-Max recognition sites. *Cell* **72**: 223-32.
- Zhang, Z., Vuori, K., Wang, H., Reed, J.C., Ruoslahti, E.** (1996)  
Integrin activation by R-ras. *Cell* **85**: 61-9.

## 8 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Antigenpräsentierende Zelle ( <u>antigen presenting cell</u> )
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARF	ADP-Ribosylierungsfaktor ( <u>ADP-ribo</u> sylation <u>f</u> actor)
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-indolylphosphat
BFA	Brefeldin A
bidest.	zweifach destilliert
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin ( <u>bovine serum albumin</u> )
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	Zelloberflächenmarker ( <u>cluster of differentiation</u> )
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie ( $3,7 \times 10^{10}$ Zerfälle pro Sekunde)
cIg	cytoplasmatisches Immunglobulin
Cyh-1	Cytohesin-1
cyt	cytoplasmatisch
DAG	Diacylglycerin
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
DEAE	Diethylaminoethyl
d. h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <u>desoxyribo</u> nucleic <u>a</u> cid)
dNTP	Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DTSSP	Dithiobis(sulfosuccinimidylpropionat)
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
dUTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	enhanced <u>chemi</u> luminescence
EDTA	Dinatriumsalz des Ethylendiamintetraacetats
EGF	Epidermiswachstumsfaktor ( <u>epidermal growth f</u> actor)
ER	endoplasmatisches <u>R</u> etikulum
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
F	Farad
FACS	fluoreszenzaktivierte Zelltrennung ( <u>fluorescence activated cell sorting</u> )



Fc	fragment crystallizable
FCS	Fötale Kälberserum (fetal calf serum)
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
g	Gramm
GAP	GTPase-Aktivierungsprotein
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guaninnukleotid-Austauschfaktor (guanine nucleotide exchange factor)
GMP	Guanosinmonophosphat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde(n)
HBSS	Hank's buffered salt solution
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase)
ICAM	interzelluläres Adhäsionsmolekül (intercellular adhesion molecule)
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
inkl.	inklusive
IP <sub>3</sub>	Inositol-(1,4,5)-triphosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LAD	Leukocyten-Adhäsionsdefizienz
LB	Luria-Broth
LFA-1	lymphocyte function-associated antigen-1
LMP	niedriger Schmelzpunkt (low melting point)
log.	logarithmisch
Lsg.	Lösung
M	molar
MadCAM-1	mucosal cell-adhesion molecule-1
mAk	monoklonaler Antikörper
MAP-Kinase	mitogenaktivierte Proteinkinase
max.	maximal
MBq	Mega-Becquerel
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
min	Minute
Mio.	Million
ml	Milliliter
mM	millimolar
mmol	Millimol
MOI	multiplicity of infection
MPA	Mycophenolsäure (mycophenolic acid)
mRNA	messenger ribonucleic acid
NBT	Nitroblau-tetrazoliumchlorid
ng	Nanogramm
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen

nm	Nanometer
NP40	nichtionisches Detergenz P40
OD	optische Dichte
ONPG	o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galaktosid
p.a.	zur Analyse (pro analysii)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBL	peripheral blood lymphocytes
PBS	Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung (phosphat buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PEG	Polyethylenglykol
pfu	Plaque bildende Einheiten (plaque forming units)
PH	Pleckstrin-Homologie
PHA	Phytohämagglutinin
PI 3-Kinase	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase
PMA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat
pmol	Picomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PtdIns[3,4,5]P <sub>3</sub> oder PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphat
PtdIns[4,5]P <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNaseA	RibonukleaseA
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Bäckerhefe)
SDS	Natriumdodecylphosphat (sodium dodecyl sulfate)
sek	Sekunden
sIg	Oberflächen-Immunglobulin (surface immunoglobuline)
sog.	sogenante(s)
ssDNA	einzelsträngige DNA (single stranded DNA)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA Pufferlösung
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (Tris-buffered saline)
TBST	Tris-gepufferte Kochsalzlösung + Tween20 (Tris-buffered saline + Tween20)
TCR	T-Zell-Rezeptor (T-cell receptor)
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
tm	transmembran
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween20	Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat
U	Enzymeinheiten (units)
u. a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen (volume per volume)
VCAM	vascular cell adhesion molecule

VLA	<u>v</u> ery <u>l</u> ate <u>a</u> ntigen
Vol.	Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen (weight per volume)
WB	Western Blot
wt	Wildtyp
x g	-fache Erdbeschleunigung
z. B.	zum Beispiel

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen danken, die auf ihre Weise dazu beigetragen haben, daß diese Arbeit entstehen konnte. Mein besonderer Dank gilt:

Prof. Dr. W. Kolanus, auf dessen Anregung und unter dessen Anleitung diese Arbeit am Genzentrum der LMU München entstanden ist. Ihm danke ich besonders für die Vergabe des interessanten Themas, die stete Diskussionsbereitschaft, die unzähligen Ideen zur Lösung wissenschaftlicher Probleme und für die Gelegenheiten, an wissenschaftlichen Tagungen teilnehmen zu dürfen.

Prof. Dr. R. Grosschedl, vor allem für seine Bemühungen, den wissenschaftlichen Austausch der einzelnen Arbeitsgruppen des Genzentrums untereinander verstärkt zu fördern.

Dr. S. Godar vom Institut für Immunologie (Wien, Österreich), für seine stete Hilfsbereitschaft und Unterstützung in „CoIP“-Fragen und D. A. Bleijs vom Department of Tumor Immunology (Nijmegen, Niederlande) für die Kultivierung und Bereitstellung von LAD19-Zellen.

Dr. Wolfgang Nagel, für seine stete Bereitschaft zur Diskussion wissenschaftlicher Probleme und für viele praktische Tips.

Dem „A2.13“-Team. Thomas Knorr, Thomas Böhm und Henning Dierks vor allem für die Unterstützung bei meinen Computerfragen, Thomas Böhm auch für die Einführung in die „Geheimnisse“ der konfokalen Lasermikroskopie. Lutz Zeitlmann danke ich vor allem für Tips und Hilfestellungen bei wissenschaftlichen Fragen, Pinar Sirim vor allem für die Verstärkung der Frauenpower im Labor und Pierre Schilcher für seine unermüdliche Produktion kompetenter Zellen. Besonders bedanken möchte ich mich aber auch für die stets heitere Laboratmosphäre, die dazu beitrug, so manches gescheiterte Experiment leichter „abzuhaken“.

Steffi und Alex für die Durchsicht dieser Arbeit.

Bettina, Barbara und Tram, die mich immer wieder moralisch unterstützten und die durch unzählige Diskussionen viele große Probleme in kleine Widrigkeiten verwandeln konnten.

## Lebenslauf

### Personalien

Name: Christiane Geiger  
 Geburtsdatum: 27.12.1968  
 Geburtsort: Deggendorf  
 Familienstand: ledig

### Schulbildung

1975-80 Grund- und Teilhauptschule Mietraching/Deggendorf  
 1980-89 Comenius-Gymnasium Deggendorf  
 Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

### Hochschulstudium

10.1989-12.1995 Chemie-Diplom an der Ludwig-Maximilians-Universität München:  
 07.1992 Diplom-Vorprüfung  
 02.1995 Diplom-Hauptprüfung  
 04.1995-12.1995 Diplomarbeit unter Betreuung von Prof. Dr. E. Fanning, angeleitet von PD Dr. H.-P. Nasheuer  
 Thema: Untersuchungen zur Wirtszellspezifität der DNA-Replikation von Papovaviren

Zuerkennung des Diplom-Chemiker-Univ.-Grades am 11.12.1995.

### Promotion

04.1996-01.2001 Anfertigung der Dissertation unter Betreuung von Prof. Dr. W. Kolanus am Genzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München

### Berufliche Tätigkeit

08.1992-10.1992 stud. Hilfskraft am Institut für Holzforschung der LMU München  
 04.1995-12.1995 stud. Hilfskraft am Institut für Biochemie der LMU München  
 04.1996-03.2001 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Genzentrum der LMU München