

**FLUORESCENZ-MIKROSKOPISCHE
UNTERSUCHUNG DER INAKTIVIERUNG DER
TYROSINKINASE SRC IM
INTEGRIN $\alpha_{IIb}\beta_3$ -SIGNALWEG**



Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Martin Christian Vielreicher
aus Straubing

Würzburg, 2008

Eingereicht am: 21.12.2007 im Dekanat der Fakultät für Biologie

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Martin J. Müller (Fakultät für Biologie)

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Ulrich Walter (Fakultät für Medizin)

2. Gutachter: Prof. Dr. Georg Krohne (Fakultät für Biologie)

Betreuer: Prof. Dr. Gregory S. Harms (Rudolf-Virchow-Zentrum)

PD Dr. Elke Butt-Dörje (Institut für Klinische Biochemie)

Tag des Promotionskolloquiums: 05.03.2008.....

Doktorurkunde ausgehändigt am:

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	4
SUMMARY.....	6
EINLEITUNG.....	8
FIBRINOGEN-BINDUNG AN INTEGRIN $\alpha_{IIb}\beta_3$	9
ROLLE DER TYROSINKINASE SRC	12
SRC-INAKTIVIERUNG DURCH CSK	14
DER „OUTSIDE-IN“ SIGNALWEG ZUM ZYTOSKELETT	15
ZELLADHÄSION UND DIE ROLLE VON SRC	17
ZIEL DER ARBEIT	20
MATERIALIEN UND METHODEN.....	25
MOLEKULARBIOLOGISCHE TECHNIKEN	25
ZELLKULTUR-EXPERIMENTE	33
PROTEINBIOCHEMISCHE TECHNIKEN	34
FLUORESCENZ-MIKROSKOPIE	38
ERGEBNISSE.....	46
MARKIERUNG UND EXPRESSION VON SRC UND CSK	46
UNTERSUCHUNG DER SRC-/CSK-FUSIONSPROTEINE.....	49
SRC-CSK INTERAKTION IN DEN LAMELLIPODIEN	52
DYNAMISCHER ABLAUF DER SRC-CSK-INTERAKTION	54
SRC-YFP PHOSPHORYLIERUNG DURCH CSK-CFP	58
BEDEUTUNG VON SRC-TYR529 FÜR DIE ZELLADHÄSION.....	60
CSK-KINASE: BEDEUTUNG FÜR DIE LAMELLIPODIENFUNKTION	62
DISKUSSION.....	63
ANSÄTZE ZUR VISUALISIERUNG DER SRC-AKTIVIERUNG.....	64
FRET-NACHWEIS DER SRC-CSK-INTERAKTION	65
MECHANISMUS DER SRC-INAKTIVIERUNG DURCH CSK.....	66
ABLAUF DER SRC-INAKTIVIERUNG IM $\alpha_{IIb}\beta_3$ -SIGNALWEG.....	67
EFFEKT DER SrcY529F-MUTATION.....	69
EFFEKT DER CskK222R-MUTATION.....	69
AUSBLICK	70
REFERENZEN	71
ABKÜRZUNGEN.....	76
DANKSAGUNGEN.....	78
ERKLÄRUNG.....	80
CURRICULUM VITAE.....	81
PUBLIKATIONEN	83

ZUSAMMENFASSUNG

Essentiell für die Blutstillung (Hämostase) ist die Thrombozyten- oder Blutplättchen-Adhäsion und die Thrombus-Bildung. Beide Vorgänge werden hauptsächlich durch den Thrombozyten-Rezeptor Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ vermittelt. Nach Bindung des Liganden Fibrinogen ändert sich die Rezeptor-Konformation, Integrine assoziieren und ein intrazelluläres Signalnetzwerk wird aktiviert, welches die Organisation des Aktin-Zytoskeletts steuert. Diese Zytoskelett-Reorganisationen sind Grundlage für zelluläre Adhäsions- und Aggregations-Prozesse.

Die Signalvermittlung vom Integrin zum Zytoskelett wird durch die Protein-Tyrosinkinase Src eingeleitet, deren Aktivitätszustand den Signalweg reguliert. Bei der Src-Aktivierung wird Tyrosin 418 durch Autokatalyse phosphoryliert. Die Kinase muss jedoch wieder inaktiviert werden. Dies übernimmt in Plättchen ausschließlich die Tyrosinkinase Csk (C-terminale Src Kinase) durch Phosphorylierung von Tyrosin 529 im C-terminalen Ende des Proteins. Die Csk-vermittelte Inaktivierung von Src stellt den entscheidenden Kontrollschritt des $\alpha_{IIb}\beta_3$ -vermittelten Signalwegs dar.

Obwohl bekannt ist, dass die Src-Aktivierung bei der Zelladhäsion an den Zellrändern der Lamellipodien geschieht und man den Mechanismus und die Kinetik der Src-Csk Interaktion genauer versteht, ist bislang immer noch unbekannt, wo und wie Src inaktiviert wird bzw. welche Rolle der Src-Inaktivierung genau zukommt.

FRET (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer) ist ein physikalischer Effekt, mit dem Interaktionen beliebiger fluoreszenzmarkierter Proteine mikroskopisch detektiert werden können. Diese Technik wurde genutzt, um die Src-Csk-Interaktion während der $\alpha_{IIb}\beta_3$ -vermittelten Fibrinogen-Adhäsion in einer etablierten Thrombozyten-Modellzelllinie (A5-CHO) direkt visualisierbar zu machen.

Es zeigten sich starke Src-Csk Interaktionen (FRET-Signale) an den Zellrändern aktiver Lamellipodien und zusätzlich in Fokalkontakten, wo beide Proteine mit Vinculin, einem Fokalkontakte-Marker, co-lokalisierten. Die Proteininteraktionen folgten einem hochdynamischen Ablauf. Nach der Akkumulation der Src-Csk Komplexe an den Zellrändern wanderten sie in Abständen von 2-3 Minuten nach innen, fragmentierten und bildeten schließlich stabile Fokal-Adhäsionen. FRET-Signale an den Zellrändern fanden sich vor allem in ruhenden Lamellipodien bzw., während des Lamellipodien-Rückzugs, in wachsenden Lamellipodien traten die FRET-Signale dort dagegen nicht auf.

In unabhängigen biochemischen Tests im Zeitfenster der FRET-Beobachtungen wurde ein spezifischer Anstieg der Src-Tyr529-Phosphorylierung (Inaktivierung) und eine parallele Abnahme der Src-Tyr418-Phosphorylierung (Aktivierung) gemessen.

Weiterführende Ergebnisse lieferten Versuche mit Src- und Csk-Mutanten. Die Co-Expression von Wildtyp-Src mit Kinase-inaktivem CskK222R hatte weder einen Effekt auf die Adhäsion und Ausbreitung der Zellen noch auf die Präsenz von FRET, es änderte sich jedoch drastisch die zelluläre Verteilung der FRET-Signale sowie das Wachstum und die Form der Lamellipodien. Die Co-Expression von Wildtyp-Csk mit konstitutiv aktivem SrcY529F verursachte dagegen eine stark verringerte Adhäsionsfähigkeit und Hemmung der Lamellipodien-Bildung. Die Fokal-Adhäsionspunkte in diesen Zellen waren sehr schwach und überdimensioniert und lagen ungeordnet verteilt in der Adhäsionsebene. Zusätzlich verursachte SrcY529F eine starke Überaktivierung des Zytoskeletts und das fast vollständige Verschwinden der FRET-Signale.

Die ermittelten Daten zeigen, dass die enge Kontrolle der Src-Aktivität durch Csk eine bedeutende Rolle für die funktionelle Zell-Adhäsion and -Ausbreitung spielt. Co-Immunpräzipitations-Resultate und Messungen der Menge an markiertem Protein in Zellen, in welchen FRET detektierbar war, untermauern zusätzlich unsere These, zum ersten Mal die Src-Regulation durch Csk in lebenden Zellen direkt beobachtbar gemacht zu haben. Dieser neue FRET-Ansatz kann auch als Reporter-System für Prozesse der Src-Inaktivierung in anderen Signalwegen und Zellen angewendet werden. Das Messprinzip kann weiterhin auf das Studium der Inaktivierung weiterer Mitglieder der Familie der Src-Kinasen (in verschiedensten Signalwegen) erweitert werden.

SUMMARY

Platelet adhesion and thrombus formation required for functional hemostasis depends on integrin receptor mediated "outside-in" signaling to the cytoskeleton. Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ is the major integrin on the platelet surface and acts as a specific receptor for the plasma protein fibrinogen. Fibrinogen binding causes clustering of integrins within the plasma membrane activating the protein tyrosine kinase Src (signal initiation) by phosphorylation of tyrosine 418. Src, however, is negatively regulated by another tyrosine kinase, Csk (C-terminal Src kinase), which phosphorylates tyrosine 529.

Although, in adhering cells, it is believed that Src is getting activated at lamellipodia leading edges, neither the cellular location nor the dynamics and exact role of Src inactivation is known to date.

Here, we studied Src inactivation during $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ -dependent adhesion to fibrinogen in the established platelet model cell line A5-CHO. Using a live cell FRET (fluorescence resonance energy transfer) microscopy technique with CFP and YFP label molecules (cyan and yellow fluorescent protein), we were able to image highly dynamic Src-Csk interactions at the leading edges of active lamellipodia. Every 2-3 minutes, signals detecting Src-Csk interactions (complexes) appeared at the cell periphery before they begin to move inward in the cell and reorganize while lamellipodia start to protrude (grow). FRET signals were also found in small accumulations at the fringe and also further to the centre of the adhesion plane (focal complexes and adhesions). Src and Csk co-localize with vinculin (a focal adhesion marker) within these regions. During the runtime of FRET observation a specific increase in Src-Tyr529 phosphorylation with a parallel decrease in Src-Tyr418 phosphorylation was observed supporting the idea that Src inactivation occurs within the cells.

The role of Src-Csk interaction was studied in further detail using Src and Csk mutants. The data revealed that co-expression of inactive CskK222R did not alter the presence of FRET signals, but fundamentally changed its distribution within the cell. Furthermore it caused lamellipodia shape changes and a tendency of constant lamellipodia protrusion. Co-expression of constitutively active SrcY529F in turn caused a severe adhesion and spreading dysfunction. Adherent cells showed very weak, disorganized and oversized focal adhesions, a hyper-activated cytoskeleton (visible in fast-changing membrane blebs) and absence of FRET signals.

Results from immunoprecipitation analyses and protein level determination within cells, in which FRET was detectable, further supported that we were able, for the first time, to directly visualize Src (and integrin) regulation by Csk control in live cells. The results show that Src control by Csk is ultimately required for lamellipodia and focal adhesion function and thus for cell anchorage and spreading. The novel FRET-approach reported here can be readily applied to other integrin and signaling pathways including the study of closely related Src family kinases (SFKs). Results may also contribute to a better understanding of the processes of tumor formation.

EINLEITUNG

Die Blutgerinnung ist ein hochkomplexer zellulär-biochemischer Vorgang, dessen geordneter Ablauf ein funktionales Blutkreislauf-System mit optimaler Gewebe- und Organversorgung ermöglicht und nach Verletzungen eine schnelle und vollständige Reparatur beschädigter Gefäße gewährleistet.

Bei der Blutstillung (Hämostase) greifen zwei Abläufe ineinander, die zelluläre (primäre) und die plasmatische (sekundäre) Hämostase. Bei der zellulären Hämostase haften Thrombozyten (Blutplättchen oder Plättchen) an beschädigte subendotheliale Gefäßregionen (Adhäsion), decken diese ab (Spreizung), aggregieren miteinander und bilden so einen weißen Primärthrombus als erste Abdeckung der Schadstelle. Die darauffolgende plasmatische Hämostase bewirkt in einer Gerinnungskaskade über Komponenten des Blutplasmas die Polymerisation von Fibrinogen zu einem Fibrin-Netzwerk und damit zur Bildung eines stabilen roten Thrombus. Nach vollständiger Gefäßreparatur werden gebildete Thromben wieder aufgelöst (Gawaz, 2002).

Die Plättchen-Adhäsion und -Aggregation erfordert u.a. Änderungen der Zellmorphologie, denen Reorganisationen von Aktin-Filamenten zugrunde liegen. Daher sind die Signalprozesse vom Rezeptor zum Aktinzytoskelett sehr bedeutsam. In Abbildung 1A sind die Phasen der Plättchenadhäsion mit den charakteristischen morphologischen Veränderungen („shape change“) gezeigt.

Das wichtigste und am stärksten exprimierte Oberflächen-Glykoprotein in der Plättchenmembran ist Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ (GP I Ib-IIIa) ein spezifischer Adhäsionsrezeptor für die Bindung von Fibrinogen, welcher Zell-Zell und Zell-Matrix-Interaktionen vermittelt. Nach der Aktivierung von $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ wird ein intrazelluläres Netzwerk an Protein-Tyrosinkinasen und -Phosphatasen aktiv, welche die Signale für die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts vermitteln.

Initiiert werden „outside-in“ Signale von der Membran-gebundenen Tyrosinkinase Src, deren Aktivierungszustand daher den Signalweg reguliert. Für die geordnete Umorganisation des Zytoskeletts muss Src selbst reguliert werden, somit ist die Src-Inaktivierung fundamental wichtig für das Verständnis der Plättchenfunktion. Obwohl die Tyrosinkinase Csk (C-terminale Src Kinase) als Src-Regulator identifiziert ist, ist bislang gänzlich unbekannt, wo die Src-Inaktivierung stattfindet und wie sie dynamisch verläuft (Gawaz, 2002).

In dieser Arbeit nutzten wir eine mikroskopische Technik, um Src-Csk Proteininteraktionen (Src-Inaktivierung) in lebenden Zellen zu beobachten. Wir exprimierten dazu fluoreszenzmarkierte Src- und Csk-Proteine in Plättchen-Modellzellen und verfolgten Ihre Interaktionen während der Zelladhäsion auf einer Fibrinogenmatrix mittels FRET (**F**luoreszenz-**R**esonanz-**E**nergie-**T**ransfer)-Mikroskopie.

FIBRINOGEN-BINDUNG AN INTEGRIN $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$

Humane Thrombozyten tragen an ihrer Oberfläche eine sehr hohe Anzahl des Fibrinogenrezeptors Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ (60.000-100.000 pro Zelle), das mit 1-2 % des Gesamtproteingehalts mit Abstand häufigste Membranglykoprotein in der Plättchenmembran (Gawaz, 2002).

Integrine bestehen aus einer α - und einer β -Kette mit je einer kleinen zytoplasmatischen, einer einzelnen Transmembran- und einer großen extrazellulären Domäne. Die Extrazellulärdomänen binden das Ligandenmolekül, wodurch es zu Konformationsänderungen im Rezeptor kommt, die ins Zellinnere vermittelt werden. Dort wird ein entsprechendes Signal über Integrin-assoziierte Proteine der Familie der Tyrosinkinase weitergeleitet (Giancotti et al., 1999).

Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ (Abb. 1B) ist ein bidirektionaler Rezeptor, da er auf Signale von beiden Seiten der Plasmamembran reagiert und diese übermitteln kann. Der Rezeptor ist sehr genau studiert und gilt als Modellrezeptor beim Studium der Integrinfunktion (Schwartz, 2001). Auf ruhenden Plättchen befindet sich das Integrin in einer niedrigaffinen Konformation. In diesem Zustand kann $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ nur immobilisiertes, nicht aber lösliches Fibrinogen binden. Aktivierung der Thrombozyten über co-stimulierende Rezeptoren führt zum Übergang in einen hochaffinen Zustand („inside-out“-Signalweg), in dem auch lösliches plasmatisches Fibrinogen gebunden werden kann (bedeutend für die Zellaggregation). Die Bindung des Fibrinogenmoleküls führt schließlich zum dritten, dem ligandenbesetzten Konformationszustand des Integrins (Gawaz, 2002 und Shattil, 2005).

Sowohl die Plättchen-Adhäsion und -ausbreitung als auch die Aggregation wird über Bindung des Adhäsionsmoleküls Fibrinogen an Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ vermittelt. Fibrinogen (die inaktive Vorstufe des Faserproteins Fibrin, Abb. 1C) ist ein multivalentes, dimerisches Plasmaprotein bestehend aus 3 unterschiedlichen Proteinketten ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$, Abb. 1B). Es besitzt eine dreiköpfige (trinoduläre) Struktur

mit der Domänenfolge D-E-D, wobei jede D-Domäne zwei RGD (Arg-Gly-Asn)-Aminosäuresequenz-Motive besitzt, die je spezifisch von einer Bindungsdomäne eines Integrin-Rezeptors erkannt und gebunden wird (Abb. 1C). Auf diese Weise kann ein Fibrinogenmolekül sowohl Integrine auf benachbarten Thrombozyten, als auch in der Membran derselben Zelle miteinander vernetzen (Fibrinogenbrücken), was die Grundlage für den Prozess der Zellaggregation und die „outside-in“-Signalaktivierung durch Clusterbildung ist (Gawaz, 2002, Abb. 1D).

Durch die Vernetzung von Rezeptoren innerhalb der Membran entstehen sog. Mikrocluster. Die biochemische Induzierung der Integrin-Clusterbildung führt direkt zur Signalaktivierung (Buensuceso et al., 2003). In Experimenten mit Blutplättchen wie auch mit dem Plättchen-Zellmodell A5-CHO (CHO-Zelllinie mit konstitutiv überexprimierten humanen $\alpha_{IIb}\beta_3$) konnten die initialen Abläufe des „outside-in“-Signalwegs zum Aktin-Zytoskelett weitgehend aufgeklärt werden (Oberfell et al., 2002; Arias-Salgado et al., 2003; Shattil, 2005).

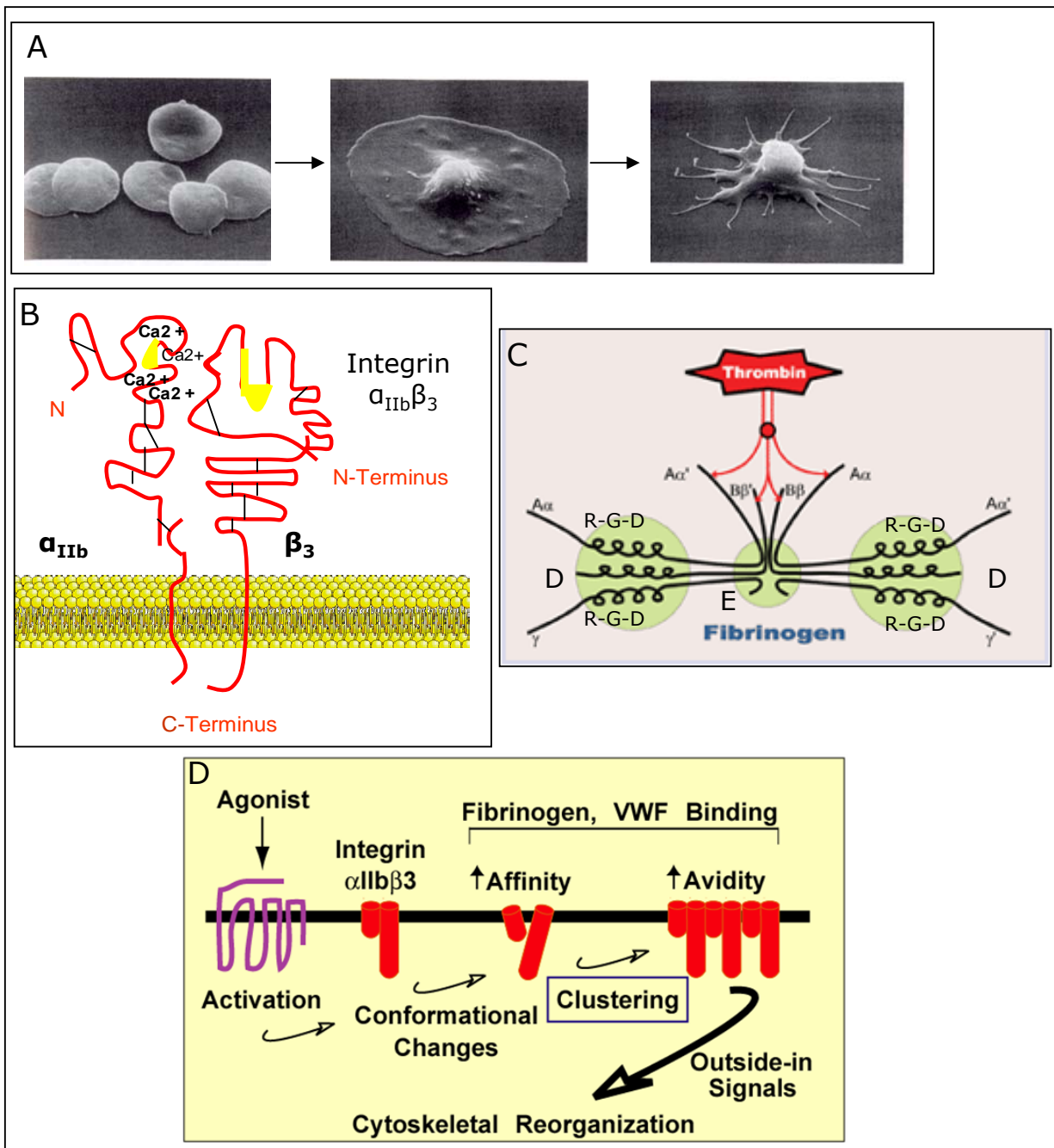


Abb. 1. Fibrinogenadhäsion und „outside-in“ Signalweg zum Zytoskelett.

A) Phasen der Plättchen-Adhäsion: Elektronenmikroskopische Aufnahmen (3000x) von ruhenden Zellen (links), reversibel über Pseudopodien adhärenierten (mitte) und gespreizten, fest adhärenierten Zellen (rechts) (Quelle: Alberts et al., 2002 und www.platelet-research.org). B) Aktivierung des Fibrinogen-Rezeptors $\alpha_{IIb}\beta_3$: Der Integrinrezeptor besteht aus einer α - und einer β -Kette, die nicht-kovalent aneinander binden. Nach Bindung der Fibrinogen-RGD-Sequenz (gelb markierte Region) kommt es zur Signaltransduktion in die Zelle. C) Struktur von Fibrinogen: Das trinoduläre Plasma-Molekül (D-,E-,D-Domäne) besteht aus je 2 α -, β - und γ -Ketten (Hexamer). Je 2 Bindestellen für den Fibrinogenrezeptor (RGD-Motive) befinden sich in den D-Domänen. Thrombin spaltet Fibrinogen in der E-Domäne, was zur Bildung von vernetzenden Fibrinpolymeren führt, welche für die sekundäre Hämostase wichtig sind (Quelle: www.aniara.com). D) Bidirektionalität von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$: Der Rezeptor kann über Agonisten-Rezeptoren (z.B. Thrombin-Rezeptor) vom Zellinneren („inside-out“ Signalweg) oder über immobilisiertes Fibrinogen bzw. von-Willebrand-Faktor (vWF) („outside-in“ Signalweg) aktiviert werden. Rezeptor-Liganden-Bindung führt zur Signalweg-Aktivierung, wodurch Reorganisationen des Zytoskeletts resultieren.

ROLLE DER TYROSINKINASE SRC

Nach Liganden-induzierter Integrinaktivierung wird als erstes intrazelluläres Protein die Tyrosinkinase Src aktiviert, womit dem Protein die Rolle eines Schalterproteins zukommt. Src vermittelt somit, wie in einer Großzahl weiterer Integrin-Signalwege, die Integrin-Zytoskelett-Interaktion (Felsenfeld et al., 1999).

Das Src (oder c-Src) Protein ist sehr genau studiert worden. Entdeckt wurde die virale Variante von Src (v-Src) als Onkogen, welches für die transformierende Wirkung des Rous-Sarkoma-Virus (RSV, entdeckt 1911 durch Peyton Rous) verantwortlich ist. Das RSV ist ein krebserzeugendes Virus bei Hühnern und ruft die Bildung von Bindegewebs-Sarkomen hervor (engl.: **sarcoma**, Src). C-Src wurde 1979 durch Bishop und Varmus entdeckt und als zelluläres Homolog von v-Src identifiziert (Oppermann et al., 1979). Es wird daher als erstes Proto-Onkogen bezeichnet und wurde in der Folge v.a. im Kontext der Krebsforschung intensiv erforscht.

Src ist ein Mitglied der Familie der Src-Tyrosinkinasen (SFKs), zu denen weitere prominente Vertreter wie Fyn, Yes, Lck, Fgr, etc. gehören, ebenfalls Proteine, die Membran-Rezeptoren an eine Vielzahl an Signalwegen koppeln. Src ist ubiquitär in Säugerzellen exprimiert. Das Protein ist in einer Vielzahl von Signalwegen (G-Protein-gekoppelte-, Zytokin-, Immun-Rezeptoren, usw.) involviert und übernimmt dabei häufig die Rolle eines Schlüsselproteins (Thomas & Brugge, 1997).

Src ist über Palmitoylierung seiner N-terminalen Region in der Membran verankert (Abb. 2A). Dieser Region folgt eine SH3-, eine SH2- und eine aus 2 Untereinheiten bestehende Kinasedomäne. Am C-terminalen Ende befindet sich eine Schwanzregion, der eine wichtige regulatorische Funktion zukommt (Cole et al., 2003).

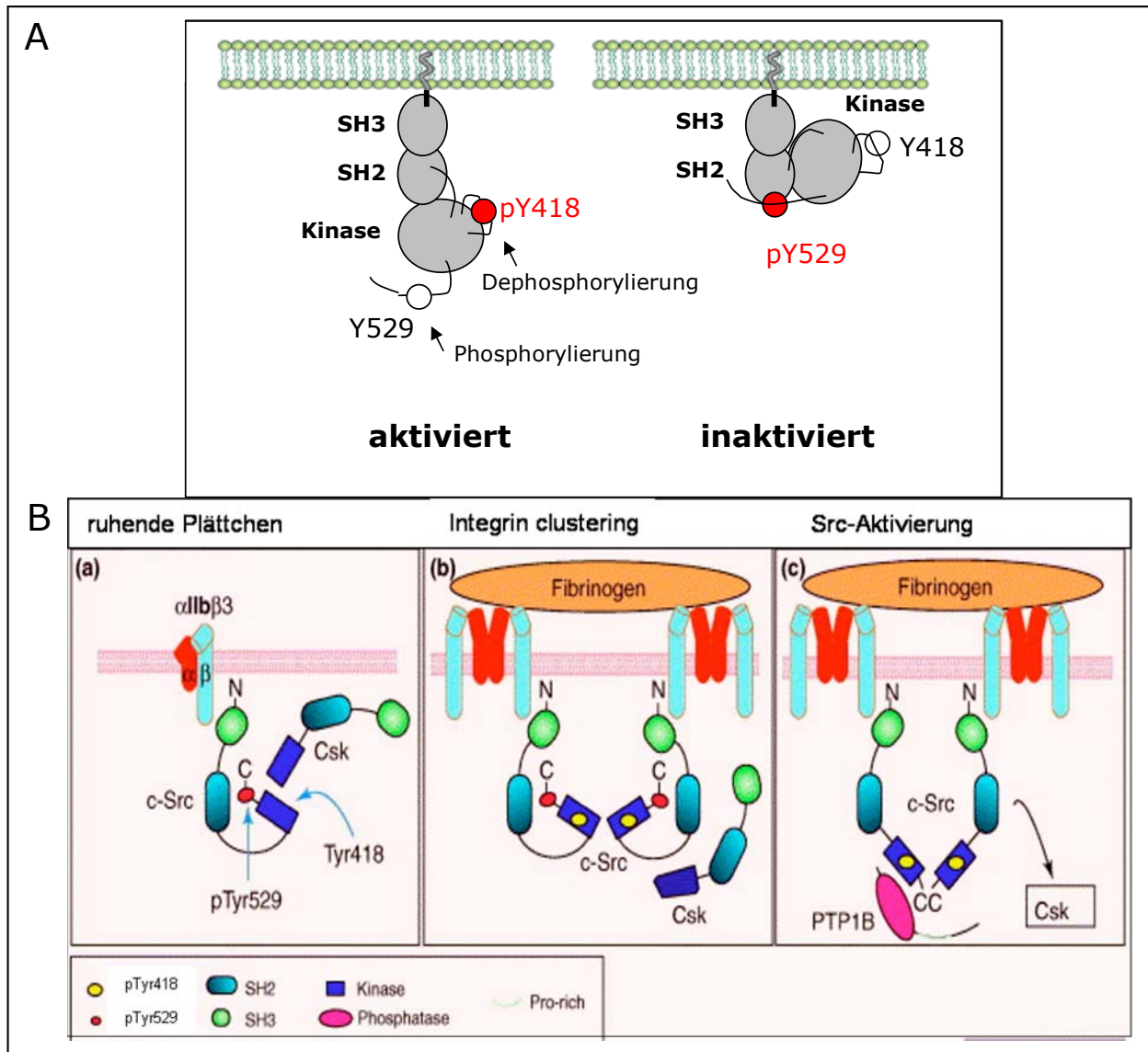


Abb. 2. Der „outside-in“ Signalweg wird von der Tyrosinkinase Src reguliert.

A) Aktive und inaktive Src-Form: In der aktiven Form ist das Protein in einer offenen Konformation, Tyr418 ist phosphoryliert, Tyr529 dephosphoryliert. In der inaktiven Form befindet sich die Kinase in einer geschlossenen Konformation, die C-terminale Schwanzregion mit pTyr529 wird von der SH2-Domäne gebunden, Tyr418 ist dephosphoryliert. B) Modell der initialen Abläufe der Signalaktivierung (aus: Shattil, 2005). In ruhenden Plättchen mit inaktivem Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (a) assoziiert Src mit der β_3 -Kette, Csk bindet Src und hält das Protein in einer inaktiven Konformation (Phosphorylierung von Tyr529). Bindung von Fibrinogen (b) verursacht Integrin-Aktivierung und -Clusterbildung, wodurch es zur Src-Autophosphorylierung am Aktivierungs-Tyrosin 418 und Csk-Dissoziation kommt. In der Folge wird der Csk-Gegenspieler PTP-1B rekrutiert (c). Dieser dephosphoryliert Src-Tyr529. Daraufhin kommt es zur Konformationsänderung und vollen Aktivierung von Src.

Src kommt in zwei Konformationen, einer aktiven und einer inaktiven, vor (Abb. 2B). Verantwortlich dafür ist im Wesentlichen der Phosphorylierungszustand zweier Tyrosinreste, Tyr418 (in der Kinasedomäne) und Tyr529 (in der Schwanzregion). Im inaktiven Zustand (geschlossene Konformation) liegt Tyr418 dephosphoryliert, Tyr529 dagegen phosphoryliert vor. Im aktiven Zustand (offene Konformation) ist dagegen Tyr418 phosphoryliert und Tyr529 dephosphoryliert.

Eine Reihe von Proteinen, welche Tyr418/Tyr529 phosphorylieren oder dephosphorylieren wurden bislang identifiziert. In humanen Zellen kommt für die Tyr418-Phosphorylierung nach heutigem Wissensstand nur trans-Autokatalyse in Frage, während die Dephosphorylierung durch eine bislang unbekannte Phosphatase katalysiert wird. Die Tyr529-Dephosphorylierung dagegen kann von einer Reihe von Proteinen katalysiert werden (z.B. PTP-1B, Shp1 und Shp2, PTP- α , PTP- δ , PTP- ϵ und CD45; Roskoski, 2005); gut untersucht in Plättchen ist jedoch insbesondere die Dephosphorylierung durch die zytoplasmatische Protein-Tyrosin-Phosphatase PTP-1B (Arias-Salgado, 2005). Für die Tyr529-Phosphorylierung wurden Csk und Chk (Csk-homologe Kinase) identifiziert, wobei in humanen Plättchen ausschließlich Csk nachgewiesen ist (Thomas & Brugge, 1997; Cole et al., 2003; www.phosphosite.org).

SRC-INAKTIVIERUNG DURCH CSK

In dieser Arbeit wird die Src-Inaktivierung durch Csk untersucht. Csk ist wie Src ebenfalls ubiquitär in Säugerzellen exprimiert und phosphoryliert das negativ-regulierende Tyrosin in der C-terminalen Region aller SFKs mit einheitlichem Mechanismus (Cole et al., 2003).

Csk ist eine zytoplasmatische Tyrosinkinase mit ähnlichem Aufbau wie Src (Domänenstruktur s. Abb. 2B), jedoch ohne Membrananker und Schwanzregion. Das Protein phosphoryliert Tyr529 in der freiliegenden Schwanzregion von aktivem Src. Dadurch wird diese Region von der Src-SH2-Domäne gebunden und Src kehrt in den inaktiven Zustand zurück (geschlossene Konformation, Abb. 2B), in dem es durch Csk-Bindung verbleibt (Cole et al., 2003; Obergfell et al., 2003).

Der Phosphorylierungs-Mechanismus konnte wegen seiner hohen Selektivität genau studiert werden und stellt einen Modellmechanismus der Tyrosinphosphorylierung von Proteinen dar. Die rasch ablaufende Reaktion erfolgt mit biphasischem Klammermechanismus („chemical clamping“). Csk interagiert mit der aktiven Src-Form durch Bindung mit seiner SH2-Domäne an die frei liegende Src-Schwanzregion (Src-Erkennung), gefolgt von der Phosphorylierung von Tyr529 mit seiner Kinasedomäne (Lieser et al., 2005).

DER „OUTSIDE-IN“ SIGNALWEG ZUM ZYTOSKELETT

Der Ablauf des Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ „outside-in“ Signalweges wurde in Plättchen und in den Modellzellen A5-CHO untersucht und von Shattil (2005) folgendermaßen zusammenfassend dargestellt (vgl. zu Abb. 2B):

Ein Pool des membranlokalisierten Src ist konstitutiv mit dem Integrin über Assoziation mit der zytoplasmatischen Domäne der β_3 -Kette verbunden und in diesem Zustand in einer teilweise aktivierten Konformation. Kommt es zur fibrinogen-vermittelten Integrin-Mikrocluster-Bildung, so assoziieren auch Src-Moleküle, was zur trans-Autophosphorylierung an Tyr418, Öffnung der Konformation und Csk-Dissoziation führt (wann Src wieder inaktiviert wird ist ungeklärt). Dadurch kann PTP-1B an Src binden und Tyr529 dephosphorylieren, wodurch es zur vollständigen Src-Aktivierung kommt.

Anschließend wird Syk, ein frühes Src-Substrat, zum Integrin-Src Komplex rekrutiert und durch Tyrosin-Phosphorylierung aktiviert. Src und Syk phosphorylieren weitere Proteine.

Daraufhin wird das Signal über nachfolgende Proteinkaskaden mittels Tyrosinkinase und -phosphatasen (wie FAK und CAS) und mithilfe von Adapterproteinen (wie z.B. Talin, Paxillin und Vinculin) an das Zytoskelett weitergeleitet (Abb. 3A). Auf diese Weise wird Einfluss auf die Polymerisation und Organisation von Aktinfilamenten genommen, Prozesse welche Änderungen der Zellmorphologie zugrunde liegen.

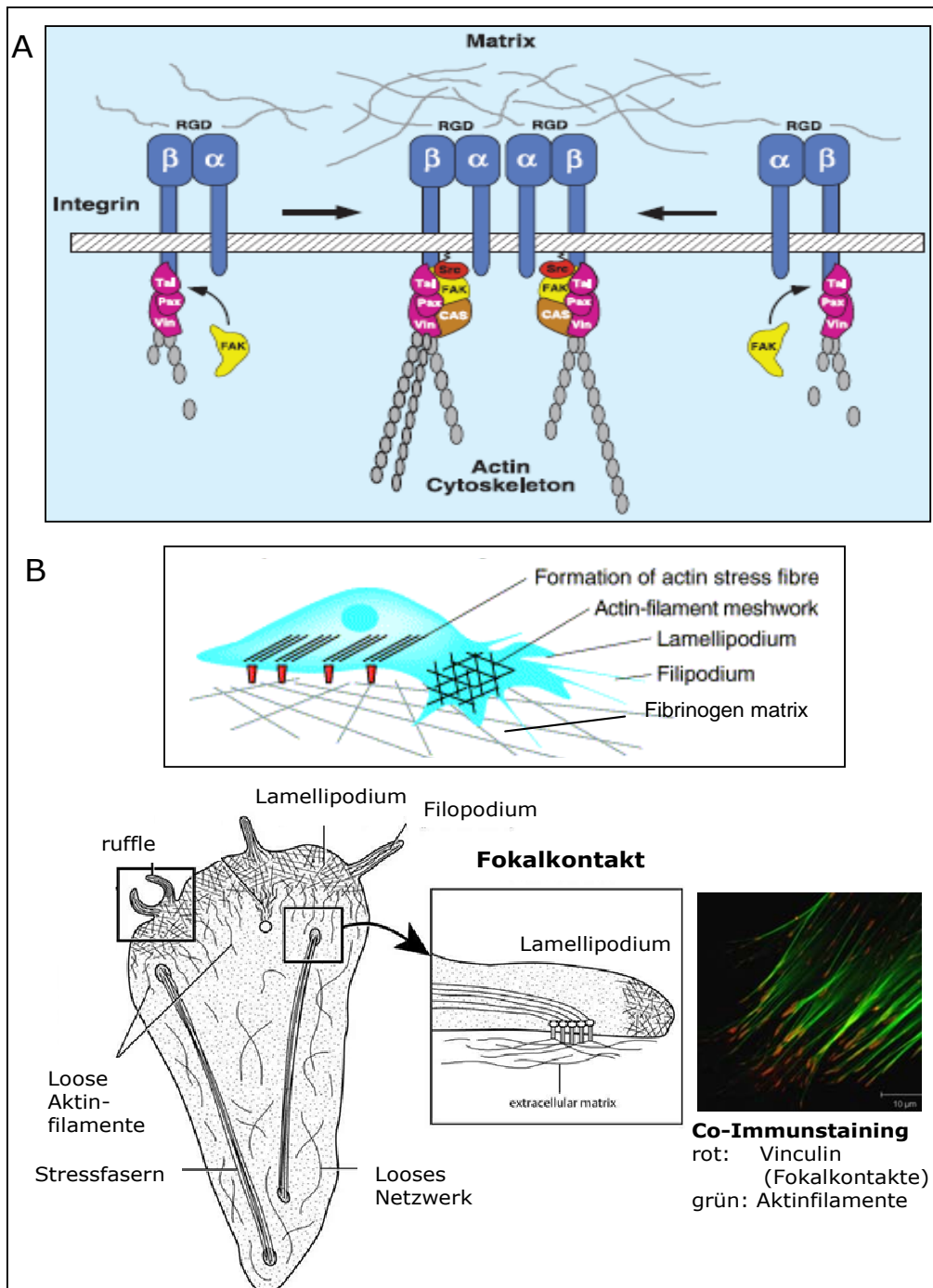


Abb. 3. Integrine verbinden die ECM mit dem Zytoskelett.

A) Modell für „outside-in“ Signalwege: Extrazellulär binden Integrine an die ECM, intrazellulär sind sie mit der β -Kette über Tyrosinkinasen und -phosphatasen sowie Adapterproteinen mit Aktin verbunden. Infolge der irreversiblen Bindung der ECM kommt es zur Integrin-Clusterbildung, wodurch weitere Signalproteine an die β_3 -Kette rekrutiert werden. Dies führt zur Polymerisation und Reorganisation von Aktinfilamenten (Quelle: Giancotti et al., 1999). B) Aufbau des Zytoskeletts und Funktion bei der Zelladhäsion: Bild oben: Zellen haften am Substrat über Integrin-basierte Fokalkontakte, die Ankerpunkte für Stressfasern für die Regulation der Zellspannung sind (Bild aus Carragher & Frame, 2004). Links und Mitte: Schematische Darstellung des Zytoskeletts einer adhärenen Zelle: Parallel gelagerte Aktinfilament-Bündel bilden die Grundlage von Stressfasern und Filopodien. In Lamellipodien ist das Zytoskelett als quervernetztes membranassoziertes Aktinnetzwerk organisiert (Quelle: Webseite Prof. Bähler, Uni Münster). Rechts: Immunfluoreszenzaufnahme (100x) von Fokalkontakten (rot) und Stressfasern (grün) einer adhärenen Zelle (Quelle: www.answers.com).

Wo und wie diese Prozesse ablaufen und welche Rolle sie für Adhäsion und Migration spielen kann nur in Fibrinogen-adhärenenten Zellen untersucht werden. Adhäsionsprozesse spielen bei Blutplättchen eine zentrale Rolle. Bei der Bildung des Primärthrombus kommt es zur $\alpha_{IIb}\beta_3$ -abhängigen Ausbreitung der Plättchen. Adhäsion an immobilisiertes Fibrinogen vermutet man ferner beim pathophysiologischen Wachstum atherosklerotischer Plaques auf deren Oberfläche man einen hohen Anteil an Fibrinogen fand (Agnestkirchner, 2000). Zunächst einige Erklärungen zu Adhäsion und Migration.

ZELLADHÄSION UND DIE ROLLE VON SRC

Bei der Zelladhäsion auf der extrazellulären Matrix (ECM, Matrixadhäsion) bilden die Zellen sog. Fokal- oder Haftkontakte aus und breiten sich auf der Matrix aus. Fokalkontakte sind verankernde Zellverbindungen, die das Aktin-Zytoskelett der Zelle mechanisch an das Substrat koppeln. Sie sind auf klar abgegrenzte Bereiche der Zelle beschränkt, an denen die Plasmamembran sehr nahe an das Substrat heranreicht und können sich aus über 50 verschiedenen Proteinen zusammensetzen, was einen beträchtlichen Funktionsumfang zulässt.

Fokalkontakte spielen überall dort eine wichtige Rolle, wo Zellen in einer ECM gebunden sind (z.B. in Geweben) oder Kontakte zu ihr aufnehmen bzw. sich wieder von ihr lösen müssen. Im vaskulären System müssen beispielsweise Blutplättchen und andere Blutzellen an bestimmte Gefäßregionen (beschädigte Gefäße, entzündetes Gewebe) entgegen dem Blutstrom anhaften können. Tumorzellen hingegen zeigen Fehlfunktionen der Fokalkontakte, was dazu führt, dass sie sich von ihrem normalen Zellverband lösen, diesen verlassen (Migration) und in Fremdgewebe einwandern (Invasion).

Fokalkontakte dienen nicht nur der Verankerung der Zelle, sondern fungieren darüber hinaus als Signalüberträger (Mechanosensoren), die die Zelle über den Zustand der ECM informieren und ihr Verhalten somit beeinflussen. Dies geschieht meist über die Aktivierung von Signalproteinen (z.B. Src) und bewirkt das Wachstum der Kontaktpunkte.

Der Kontakt zu Proteinen der ECM wird hauptsächlich über Integrine vermittelt. Die Integrin β -Untereinheit ist auf der intrazellulären Seite über Adapterproteine wie Talin, α -Aktinin, Filamin und Vinculin an Aktinfilamente gekoppelt. Daneben finden sich in den Haftkontakten viele signalübertragende Proteine wie die Tyrosinkinase Src, Syk oder FAK (Abb. 3A).

Bei sessilen Zellen sind Fokalkontakte im Normalfall recht stabil, während sie bei wandernden (migrierenden) Zellen kurzzeitig auf- und abgebaut werden können. Bei der Migration, aber auch bei der Ausbreitung, bilden sich an den Zellrändern breit angelegte, flächige Membran-Ausstülpungen, sog. Lamellipodien (Abb. 3B, oben). Strukturell liegt ihnen ein eng mit der Plasmamembran assoziiertes quervernetztes Aktin-Netzwerk (sog. kortikales Zytoskelett) zugrunde - im Gegensatz zu den sonst gebildeten parallel gebündelten Aktinfilamenten (z.B. in Stressfasern, Abb. 3B-rechtes Bild).

Bei migrierenden Zellen ändert sich die Proteinzusammensetzung und Morphologie von Fokalkontakten im Laufe ihres Bestehens, weshalb sie in verschiedene Typen eingeteilt wurden (de Virgilio et al., 2004): Frühe Adhäsionen entstehen beim Vorschub des Lamellipodiums („protrusion“) nahe der Zellfront und werden Fokalkomplexe („focal complexes“) genannt. Sie sind recht klein ($<1 \mu\text{m}^2$), rundlich, befinden sehr nahe ($0-3 \mu\text{m}$) am Zellrand und enthalten neben Integrin weitere Proteine wie Talin und Paxillin. Die meisten Fokalkomplexe lösen sich während des Lamellipodien-Rückzugs („retraction“) wieder auf. Die übrigen vergrößern sich und reifen zu stabilen fokalen Adhäsionen („focal adhesions“), indem sie weitere Proteine (z.B. Zyxin) rekrutieren. Fokaladhäsionen sind längliche, $2-3 \mu\text{m}^2$ große Stressfaser-gekoppelte Adhäsionsstrukturen, die in der gesamten basalen Zellebene vorkommen können.

Src wurde mit der Bildung und dem Fortschreiten maligner Tumore beim Menschen in Verbindung gebracht. In einer hohen Anzahl menschlicher Tumore aus Leber, Niere oder Lunge detektierte man überexprimiertes und/oder überaktiviertes Src, was zu reduzierter Anzahl und zur Schwächung von Fokalkontakten führte. Übereinstimmend mit diesem Befund fand man, dass niedrige Csk-Levels ebenfalls eine schwächende Wirkung auf fokale Kontakte haben (Yeatman, 2004). Es liegt nahe anzunehmen, dass Csk-Fehlfunktionen ebenfalls zur Krebsentwicklung beitragen könnten. Tatsächlich fand man diese Verbindung auch (Yeatman, 2004). Überaktivierung von Csk dagegen hat einen gegenteiligen Effekt, nämlich erhöhte Anzahl und Stabilisierung von Fokalkontakten. In Mausmodellen zeigte sich, dass Csk-Überexpression fokale Kontakte stärkt und auf diese Weise das Metastasieren unterdrückt (Nakagawa, et al., 2000). Antikörperfärbungen zeigten, dass in stabilen Fokalkontakten Csk mit Src co-lokalisiert und dass Src Inaktivierung durch Csk eine bedeutende Rolle in der Regulation der Bildung und Stabilität von Fokalkontakten hat (Yeatman, 2004).

Mittels Immunfärbungen konnte Obergfell et al. (2002) zeigen, dass in der Zellperipherie (Lamellipodien und Filopodien) von Fibrinogen-adhärennten Plättchen aktiviertes Src (Src-pTyr418) konzentriert ist, was nahe legt, dass in dieser Region bei Zell-Ausbreitung Src aktiviert wird (Abb. 4A). In weiteren Experimenten mit Plättchen-Modellzellen (A5-CHO, Zellen auf Fibrinogen) untersuchte de Virgilio et al. (2004) Src-Proteininteraktionen. Die Gruppe konnte nachweisen, dass sich sowohl Integrin-Src (Abb. 4B) als auch Src-Syk Interaktionen entlang der Zellränder ausbilden, was für Integrin-Clusterbildung gefolgt von Signalaktivierung und -weiterleitung über Src und Syk spricht.

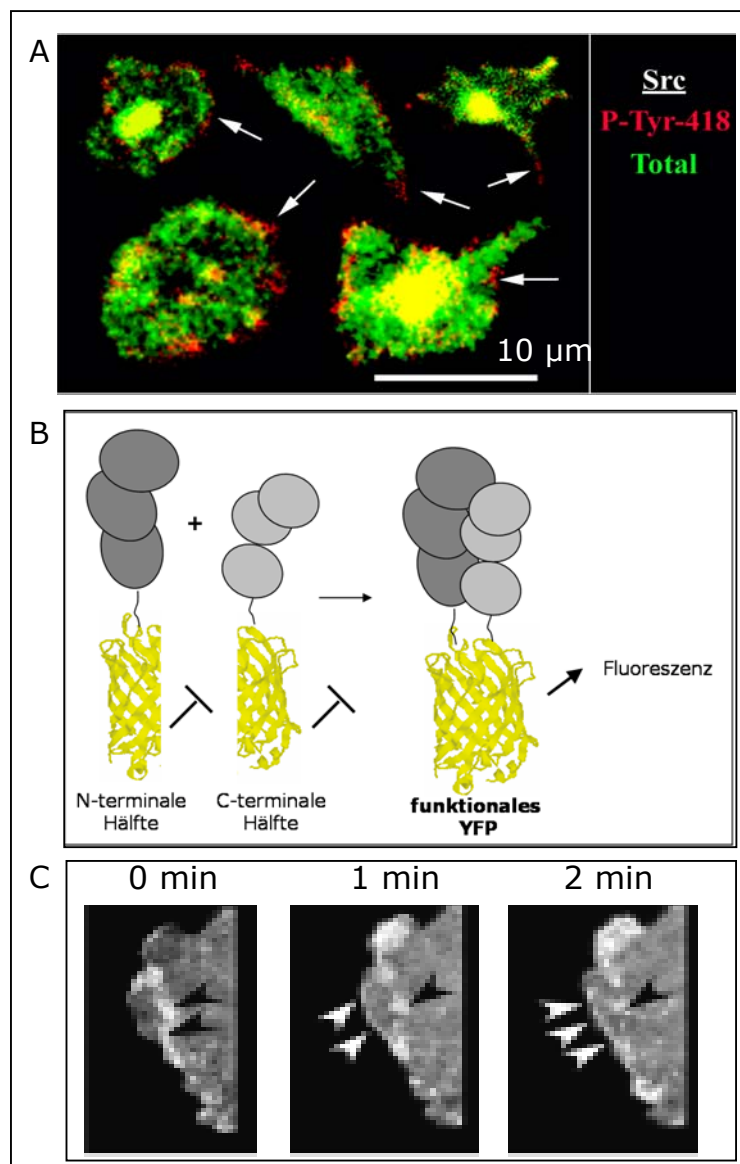


Abb. 4. Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ „outside-in“ Signalweg – mikroskopische Daten.

Bislang ist nur wenig von den räumlich-zeitlichen Aspekten der Signalvorgänge bekannt. A) Immunlokalisation (100x) von aktivem Src (anti- Src-pTyr418, rot) und Gesamt-Src („Total“, grün) wurden an fixierten, Fibrinogen-adhärennten Plättchen durchgeführt (Quelle: Obergfell et al., 2002). Während Src in der gesamten Zelle lokalisiert, findet sich die aktive Form vor allem an den Zellrändern und Spitzen der Filopodien (weiße Pfeile). B) BiFC-Prinzip: Die N- und C-terminalen Hälften von YFP werden an die Interaktionspartner gekoppelt. Bei Interaktion bildet sich ein funktionales fluoreszierendes YFP aus. C) Visualisierung von Proteininteraktionen zwischen Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ und Src (analog für Src-Syk) mittels Echtzeit-BiFC an lebenden A5-CHO Zellen (63x): Integrin-Src Komplexe bilden sich an den Rändern der Lamellipodien aus und wandern dann Richtung Zell-einwärts (Quelle: de Virgilio et al., 2004).

Zeitraffer-Aufnahmen mit der BiFC (Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation)-Technik (Abb. 4C) zeigen, dass nach Ausbildung der Proteinkomplexe am Zellrand diese anschließend nach innen wandern und sich zu Fokalkomplex-artigen Strukturen organisieren.

ZIEL DER ARBEIT

Ziel der Arbeit war die Untersuchung früher Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ -abhängiger Signalprozesse unter Beteiligung von Src mit modernen mikroskopischen Methoden. In den natürlichen Zellen, den Thrombozyten, ist die Beobachtung von dynamischen Signalprozessen aufgrund des Fehlens einer eigenen Biosynthesemaschinerie zur Expression der fluoreszenzmarkierten Proteine nicht möglich und die Herstellung solcher Zellen über ihre Vorläuferzellen (Megakaryozyten) bislang kaum effektiv möglich. Zudem sind Thrombozyten zu klein für den detaillierten lichtmikroskopischen Einsatz, ihre Kurzlebigkeit und leichte Aktivierbarkeit (Aggregations-Neigung) würde die Analyse weiter erschweren.

Aus diesem Grund wurde auf die etablierte Modellzelllinie A5-CHO zurückgegriffen. Diese Zelllinie überexprimiert konstitutiv das humane vollfunktionale Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$, und viele der aus Plättchen bekannten Signalantworten werden in dieser Zelllinie rekapituliert. Ziel war somit, adhäsionsabhängige Signalprozesse über $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ in A5-CHO-Zellen zu untersuchen.

In Frage kamen Interaktionen von Src mit Syk, Csk oder PTP-1B. Der Src-Syk-Interaktionsnachweis wurde kurz nach Beginn der Arbeit veröffentlicht (de Virgilio, 2004). Da über die Src-Csk Interaktion einiges bekannt und sie besser definiert als die Src-PTP1B Interaktion war, hatten wir uns entschieden, sie genauer zu untersuchen. Für die Interaktionsuntersuchungen sollten moderne „Cell Imaging“-Methoden wie FRET-, Konfokal- oder TIRF-Mikroskopie eingesetzt werden.

Konventionelle biochemische, genetische oder auch mikroskopische Verfahren können keine Aussage darüber liefern, wie Signalprozesse tatsächlich in den Zellen ablaufen. Durch die Möglichkeit der Protein-Markierung mit GFP (grün fluoreszierendes Protein) wurde diese Limitation jedoch teilweise überwunden. Die Bedeutung des GFP liegt in der Möglichkeit, das Fluoreszenzprotein an beliebige Proteine Gen-spezifisch zu fusionieren und anhand der Fluoreszenz zellulär zu verfolgen.

Um Signalprozesse zu verstehen reicht es jedoch nicht aus, nur einzelne Proteine zu verfolgen, vielmehr ist es entscheidend, Interaktionen von Proteinen lokalisieren zu können. Aus diesem Grund wurde die Technik BiFC entwickelt (Hu et al., 2002). Die zu untersuchenden Interaktionspartner werden dabei je an die N- und C-terminalen (komplementären) Hälften des Fluoreszenzproteins YFP (eine Variante des GFP) kloniert, so dass bei Proteininteraktion das funktionelle YFP rekonstituiert werden kann. Diese Methode hat jedoch mehrere Nachteile. Zum einen lösen sich

einmal gebildete Proteinkomplexe nur schwer wieder voneinander, zum anderen erfordert die YFP-Reifung relativ lange (mehrere Stunden; de Virgilio et al., 2004). Da Signalprozesse dynamisch sind und meist die Assoziation und Dissoziation von Signalproteinen erfordern, stellt BiFC nur eine unvollständige Methode zur Verfolgung von Proteininteraktionen dar.

Eine weitaus bessere Entwicklung ist FRET. FRET bezeichnet einen physikalischen Effekt, bei dem Energie eines angeregten Fluoreszenzmoleküls (Donor) strahlungsfrei auf ein Akzeptormolekül übertragen wird, welches sich im Abstand von 15 bis 100 Å befindet. Da diese Distanzen den Dimensionen von Proteininteraktionen entsprechen, ist die FRET-Technik sehr gut für die Visualisierung von Interaktionen geeignet (Abb. 5C-D; Jares-Erijman & Jovin, 2003 und 2006).

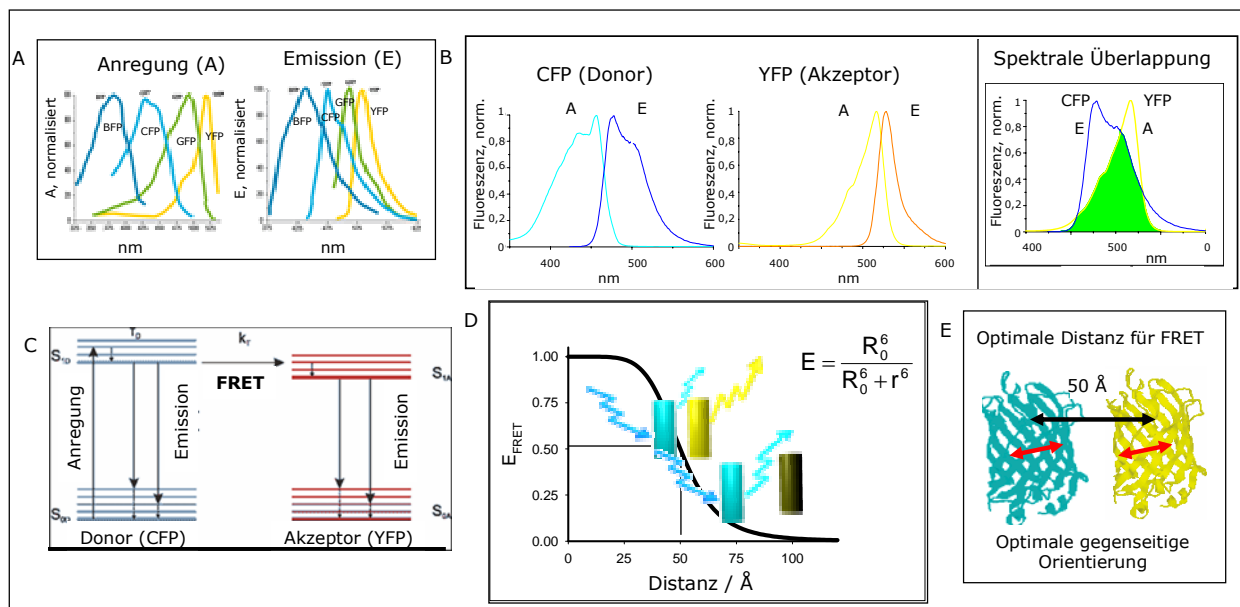


Abb. 5. FRET zwischen CFP und YFP.

FRET ist der strahlungslose Energietransfer von einem angeregten Donormolekül auf ein Akzeptormolekül. A) Varianten des GFP und ihre Anregungs- und Emissions-Spektren, aus denen sich die spektralen Eigenschaften herleiten. B) CFP und YFP: Das Emissionsspektrum des CFP und das Anregungsspektrum des YFP sind stark überlappend (>70 %). Dies begünstigt die Effektivität und Messbarkeit von FRET. C) Schematische Darstellung der Energieniveaus beim FRET-Übergang (Jablonski-Diagramm): Donoranregung führt entweder zur Donoremission (CFP-Fluoreszenz) oder (mit einer definierten Rate) zu FRET und in der Folge Akzeptoremission (YFP-Fluoreszenz), ausschließlich von höheren zu niedrigeren Energiezuständen. Je höher der Überlappungsbereich der angeregten Zustände, desto höher die FRET-Effizienz. D) Distanz-Abhängigkeit: Die FRET-Effizienz folgt einer Distanzabhängigkeit mit der sechsten Potenz. Nur bei intermolekularen Abständen von max. 100 Å tritt FRET auf, wobei sich die Fluorophore CFP und YFP bis max. 40 Å annähern können. E) Maximaler FRET-Transfer tritt bei einem Abstand von 50 Å und paralleler Dipol-Orientierung der Moleküle (rote Pfeile) auf.

Aus GFP wurden diverse modifizierte Versionen von Fluoreszenzproteinen mit veränderten Fluoreszenzspektren entwickelt, die entsprechend ihres Emissions-Wellenlängenbereichs benannt sind, z.B. CFP (cyan) oder YFP (gelb fluoreszierendes

Protein, Abb. 5A). Aufgrund dieser Eigenschaften können CFP als Donor und YFP als Akzeptor für FRET Untersuchungen von Proteininteraktionen eingesetzt werden, wenn beide je durch Klonierung an ein Protein gekoppelt werden. Der maximale FRET-Transfer ist gegeben bei einem CFP-YFP-Abstand von 50 Å, bei größeren Abständen klingt FRET sehr schnell ab (R^6 -Gesetz). Dies zusammen mit der Anforderung einer konstanten gegenseitigen Orientierung (Dipole der beiden Fluorophore parallel) schließt FRET durch zufällige CFP-YFP Bindungen weitgehend aus (Abb. 5E). Mittlerweile wurden sowohl CFP als auch YFP weiter optimiert (eCFP/eYFP, e: enhanced), so dass sie stabiler gegen Photobleichen sind und eine höhere Quantenausbeute (Emission/Absorption) aufweisen.

Die spektrale Überlappung des CFP-Emissionsspektrums mit dem YFP-Anregungsspektrum (> 70 %, Abb. 5B) ermöglicht FRET und die Verteilung des CFP Anregungsspektrums und des YFP Emissionsspektrums erlaubt eine hinreichende Möglichkeit der spektralen Entmischung (Dekonvolution) und Trennung von CFP- und YFP-Detektion und damit die Messung des FRET-Energietransfers. Spezifische YFP Emission, welche nach CFP-Laseranregung durch FRET entsteht kann auf verschiedene Weise bestimmt werden (Abb. 5B und 11).

Proteininteraktionen in lebenden Zellen können somit mittels FRET (zwischen CFP und YFP) gemessen werden. Beide Fluorophore sind genetisch an zu untersuchende Proteine gekoppelt und werden von den Zellen exprimiert.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten der Nutzung der FRET-Technik. Zum einen kann man FRET für die Visualisierung der Interaktion zweier Signalproteine verwenden, indem man eines der Proteine mit CFP, das andere mit YFP koppelt (intermolekulare FRET-Messung).

Eine weitere Möglichkeit besteht aber in der Nutzung von Sensor-Molekülen. Wie bereits erwähnt ist die FRET Stärke innerhalb bestimmter Grenzen stark distanzabhängig (Abb. 5D). Diese Tatsache macht man sich dadurch zunutze, dass man Konstrukte kloniert, welche auf bestimmte Stimuli mit Konformationsänderungen reagieren, wodurch sich der Abstand der im Sensormolekül endständig liegenden CFP und YFP Moleküle signifikant ändert. So kann die Moleküländerung direkt über die Änderung der FRET-Intensität ausgelesen werden. Der Src-Sensor in Abbildung 6 wurde von Wang et al. (2005) entwickelt.

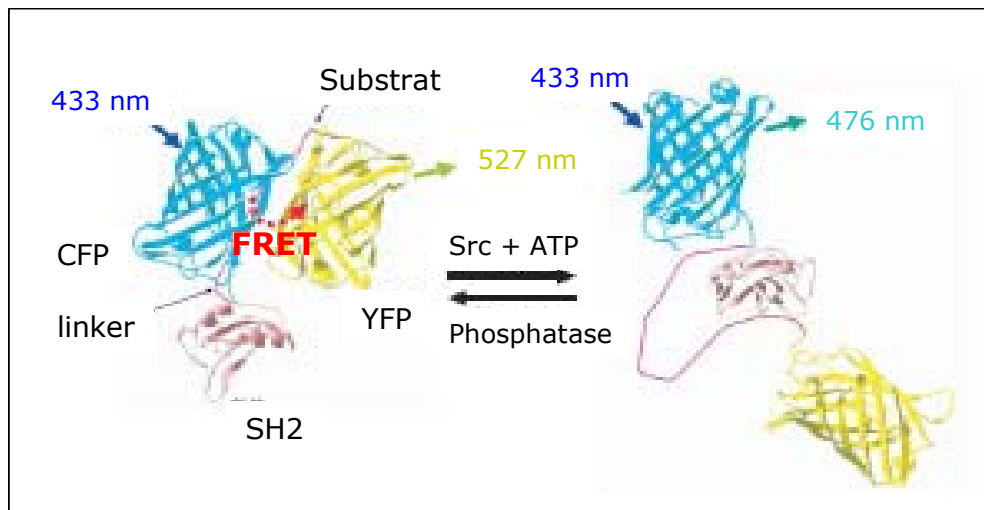


Abb. 6. FRET-Nachweis von molekularen Vorgängen in Zellen.

Die Distanzabhängigkeit von FRET im makromolekularen Maßstab (50-100 Å) kann für den Nachweis von Signalvorgängen in Zellen (z.B. Konformationsänderungen von Proteinen) ausgenutzt werden. Ein Src-Sensormolekül wurde entwickelt, um die Aktivität der Src Kinase in lebenden Zellen nachweisen zu können (Quelle: Wang et al., 2005). Das Sensormolekül besteht aus CFP und YFP-Molekülen, welche eine Src-SH2 Domäne und eine Src-Zielsequenz flankieren. Phosphoryliert Src dieses Substrat, so bindet die SH2-Domäne daran, was zu einer starken Konformationsänderung des gesamten Sensor-Moleküls führt. Mit der Änderung der Molekülarchitektur geht eine messbare Änderung der FRET-Effizienz einher. Neben dieser Nachweismethode intramolekularer Vorgänge können auch Protein-Protein-Interaktionen (intermolekulare Vorgänge) analysiert werden.

Dieser Sensor zeigt an, wo es in der Zelle zur Aktivierung der Src-Kinase kommt. Aktiviertes Src phosphoryliert dabei eine kurze Aminosäuresequenz des Moleküls wodurch eine hochaktive Bindestelle für die Src SH2-Domäne entsteht. Die hervorgerufene Konformationsänderung des Sensors führt schließlich zu Änderungen der FRET Effizienz-Werte, welche einfach errechnet und dargestellt werden können. Diese bilden die Basis für die vorliegende Studie zur Src-Csk Interaktion.

Um Src-Csk Interaktionen untersuchen zu können, werden hier Src mit YFP und Csk mit CFP fusioniert und die Fusionskonstrukte in den A5-CHO Zellen co-exprimiert. Binden die Chimärenproteine in den Fibrinogen-adhären Zellen aneinander, so ist FRET möglich (Abb. 7).

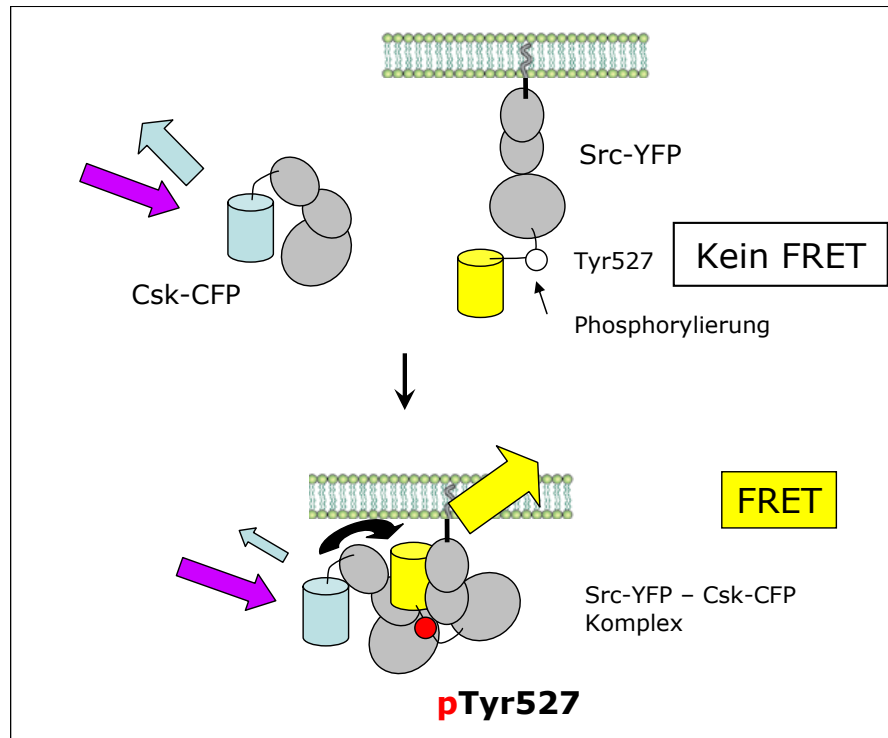


Abb. 7. Modell der FRET-Detektion der Src-Csk Proteininteraktion
 Src soll am C-Terminus mit YFP, Csk am N-Terminus mit CFP gelabelt werden. Bei Interaktion des zytosmatischen Csk-CFP mit dem Membran-verankerten aktivierten Src-YFP binden beide Proteine aneinander. Misst man FRET in Zellen, welche nur das CFP- und YFP-Molekül exprimieren (keine Bindung möglich) und nimmt den Wert als Basiswert, so lassen sich Src-YFP - Csk-CFP Interaktionen spezifisch nachweisen. Da bei Interaktion Src von Csk inaktiviert wird, erhält man mit dieser Methode gleichzeitig einen Sensor für Src- und damit Signalweg-Inaktivierung.

MATERIALIEN UND METHODEN

Methoden-Protokolle wurden u.a. der Internetseite Protocol-Online (www.protocol-online.org), welche Protokolle von Forschungslabors, Biotech-Firmen und privaten Webseiten weltweit listet, entnommen. Weitere Informations-Quellen werden in den jeweiligen Unterpunkten genannt.

MOLEKULARBIOLOGISCHE TECHNIKEN

Gängige Standardtechniken der Molekularbiologie wie die Kultivierung und Transformation von E.coli sowie DNA-Isolation, -Verdau und -Separation werden hier nicht genauer beschrieben. Detaillierte Informationen zu diesen Punkten finden sich in den entsprechenden Standardwerken der Molekularbiologie (z.B. Sambrook & Russell, 2006), bei Protocol-Online und in den Produktanleitungen von Anbietern entsprechender kommerzieller Hersteller.

Vermehrung und Isolation der DNA-Konstrukte

Für die Vermehrung von DNA-Konstrukten wurde der elektrokompetente E.coli Stamm DH10B (Invitrogen) verwendet. Die Transformation von DNA-Konstrukten in diesen Stamm wurde mittels Elektroporation mit dem „MicroPulser“ (BioRad Laboratories) nach Herstellerempfehlungen durchgeführt. Transformierte Zellen wurden auf LB-Platten (1,5 % Agar-Agar, Carl Roth) mit den jeweiligen Antibiotika (je nach Plasmidtyp mit 100 µg/ml Ampicillin oder 30 µg/ml Kanamycin) selektiv vermehrt. Nach Reinigungsausstrichen einzelner Klone wurden Einzel-Kolonien in TB-Flüssigmedium (mit den entsprechenden Antibiotika) zu hohen Zelldichten (bis $OD_{600}=8$) vermehrt.

Für die DNA-Isolation wurden kommerzielle Anionenaustauscher-Säulenkits verwendet („Plasmid Mini“, „NucleoBond AX-500 Maxi“; Macherey-Nagel). Die DNA-Konzentration wurde durch Spektrophotometrie mit dem „Bio-Photometer“ (Eppendorf) gemessen (50 µg/ml DNA entspricht einer OD_{260} von 1). Nur DNA-Präparationen mit einem geringen Wert an Protein-Verunreinigung ($A_{260nm}/A_{280nm}>1,8$; A: Absorption) wurden verwendet und standardmäßig auf 1 µg/µl eingestellt. Zur Kontrolle wurden Präparationen mit Restriktions-Endonukleasen nach Herstellerangaben (i.d.R. Fermentas) verdaut und entstehende Fragmentlängen mittels Agarose-Gelelektrophorese („Broad band“ Agarose, Carl Roth) überprüft. Als DNA-Standard diente der „gene ruler-1kb DNA

ladder“ von Fermentas. Der kodierende Bereich wurde sequenziert (MWG Biotech). Transformierte E.coli wurden in Cryo-Röhrchen („RotiStore“, Carl Roth) als Glycerin-Dauerkulturen eingefroren und bei -20° C aufbewahrt.

Verwendete Puffer und Medien (je 1l):

Agarose-Gelelektrophorese-Puffer:

242 g Tris; 57 ml Eisessig; 50 mM EDTA; pH 8,0

Bakterienmedien:

- LB (Luria-Bertani): 10 g Bacto-Trypton, 5 g Hefextrakt, 10 g NaCl, pH 7,0
- TB (Terrific Broth): Lösung A plus Lösung B
 - Lösung A (900 ml): 12 g Trypton; 24 g Hefextrakt; 4,6 ml Glycerin (87 %)
 - Lösung B (100 ml): 2,31 g KH₂PO₄; 16,43 g K₂HPO₄

Technische Schritte bei der Klonierung

Für die Fluoreszenz-Markierung von Signalproteinen wurde die CFP- bzw. YFP-Sequenz an die entsprechenden Gensequenzen kloniert, so dass fluoreszierende Fusions- oder Chimärenproteine entstehen.

Die Strategie war dabei folgendermaßen:

Zu klonierende DNA-Sequenzen wurden mittels PCR mit Primern, welche spezifische Restriktionsschnittstellen enthalten, amplifiziert. Die Fragmente wurden anschließend in geeignete Zielvektoren so kloniert, dass CFP- bzw. YFP-markierte Proteine kodiert werden.

Für die Auswahl einer effektiven Klonierungs-Strategie mussten alle DNA-Zielsequenzen und potentiellen Primer-Kandidaten genau analysiert werden. Als Primeranalyse-Software wurde zum einen das Programm „Primer3“ (www.frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3.cgi), zum anderen der „Oligonucleotide Properties Calculator“ verwendet (www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html). Die Analyse von Restriktions-Schnittstellen in DNA erfolgte mit dem „Restrictionmapper“ (www.restrictionmapper.org).

Die Analyse von DNA- und Protein-Sequenzen erfolgte mit den Programmen „BLAST“ (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool) und „BLAST-2-SEQUENCES“ (siehe National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov). Auf derselben Seite wurde v.a. auch die DNA-Datenbank „Entrez Nucleotide“ benutzt. Für die Translation von DNA- in Protein-Sequenzen wurde das „ExpASY Translate Tool“ des Swiss Institute of Bioinformatics (www.expasy.org/tools/dna.html) verwendet.

Von dieser Seite wurden die Protein-Datenbank-Funktionen „Swiss-Prot“ und „TrEMBL“ benutzt. Als weitere Proteindatenbank (Protein-Familien, Domänen, funktionelle Regionen) diente „EBI InterPro“ des European Bioinformatics Institute (www.ebi.ac.uk/interpro).

PCR

DNA-Abschnitte wurden mit der PCR-Technik amplifiziert. Dazu diente die thermostabile DNA-Polymerase Pfu (aus *Pyrococcus furiosus*), welche aufgrund ihrer 3'-5'-Korrekturleseaktivität eine sehr geringe Fehlerrate bei der Polymerisation gewährleistet, allerdings auf Kosten der Polymerisationsgeschwindigkeit.

Um amplifizierte DNA-Fragmente in die multiple Klonierungsstelle (multiple cloning site, MCS) geeigneter Zielvektoren klonieren zu können, wurden maßgeschneiderte, hochspezifisch bindende Oligonukleotid- (Primer-) Paare konstruiert (MWG-Biotech), deren 5'-Ende passende Restriktionsschnittstellen tragen.

Die PCR-Primerpaare mussten folgende Kriterien erfüllen:

- Länge 18-30 b
- gleichmäßige G/C-Verteilung und 40-60 % GC-Anteil in der Binderegion
- vergleichbare „Annealing“-Temperaturen (T_a) zwischen 55 und 75° C ($\Delta T_a \leq 5^\circ \text{C}$)
- variable Zahl an endständigen Adeninen für effektiven Restriktionsverdau

Zusätzlich wurden die Primer auf Homo- bzw. Hetero-Dimerisierung (Stringenz: 5 Basen) sowie Sekundärstrukturbildung mit den oben genannten Analyseprogrammen untersucht.

Die PCR am „T-Gradient“-Thermocycler (Biometra) erfolgte mit der „hot start“-Methode (Start mit Denaturierungsschritt bei 95° C, 6 min) bei einer Amplifikationstemperatur von 72° C, 30-38 Polymerisations-Zyklen und einem finalen 7-minütigen Extensionsschritt (72° C).

Es wurden je 100 µl Ansätze folgender Zusammensetzung verwendet:

- 1 µl Pfu Polymerase (2,5 Units)
- 10 µl Pfu-Puffer (10x, Fermentas; + 2 mM MgSO₄)
- 2 µl dNTP mix (200 mM, Fermentas)
- 1 µl DNA-template (0,5-1 pg)
- je 1 µl Primer 1 und 2 (je 100 pmol)
- ad 100 µl: ent-ionisiertes „Milli-Q“-Wasser (38 MΩ, Millipore-Entsalzer)

Für das Gelingen der PCR-Reaktionen mussten teilweise unterschiedliche Annealing-Temperaturen sowie Mg^{2+} - und Primer-Konzentrationen getestet werden.

DNA-Verdau und elektrophoretische Separation

Der Erfolg der PCR wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese (0,7–1,2 %) überprüft. Der DNA-Nachweis erfolgte standardmäßig durch den DNA-Interkalationsfarbstoff Ethidiumbromid (Carl Roth) bzw. – zum Nachweis sehr geringer Mengen – mit SYBR-Gold (Molecular Probes). Banden wurden am „Dark Reader“ (sehr geringer Anteil schädlicher UV-Strahlung; Clare Chemical Research) überprüft und am „E.A.S.Y Win32“-System (Herolab) durch photographisch dokumentiert.

Fragmente der erwarteten Länge wurden aus dem Gel isoliert und mittels Gelextraktion („NucleoSpin Extract“-Kit, Macherey-Nagel), anschließend mit Restriktionsenzymen verdaut und erneut gereinigt.

Ligation

Nach entsprechendem Verdau (und Reinigung) des Zielkonstrukts wurden DNA-Fragment und Zielvektor durch T4-DNA Ligase miteinander ligiert (16° C, üN).

Dabei ist die richtige Menge und das richtige Verhältnis der beiden Fragmente im Ligationsansatz bedeutend (hier wurde auf eine publizierte Formel zurückgegriffen, nach Mülhardt, 2003).

Ein Ligationsansatz hatte folgende typische Zusammensetzung:

1 µl	T4- DNA-Ligase (Fermentas)
2 µl	T4- DNA-Ligase-Puffer (10x, Fermentas)
33 ng	Insert-DNA
25 ng	Vektor-DNA
ad 20 µl	Milli-Q Wasser

Den Ligationen folgte jeweils ein Hitze-Schritt (65° C/ 10 min) zur Ligase-Inaktivierung. Geringe Mengen (0,8-1 µl) der Ligationsansätze (Salzkonzentration) wurden in E.coli elektroporiert, selektiv vermehrt (mehrere unterschiedliche Ansätze, da die Ligations-Effektivität nicht genau vorhersagbar war) und vermehrte DNA schließlich isoliert. Die Richtigkeit der Klonierung wurde durch Kontroll-

Verdaue und Sequenzierung der kodierenden Sequenz getestet. Zudem wurde die Proteinexpression und korrekte Lokalisation analysiert.

KLONIERUNG

Alle Konstrukte sind in der „Liste der DNA-Konstrukte“ aufgeführt.

p-Src/Venus und p-SrcK295R/Venus

Alle Src Konstrukte kodieren für die Src-Sequenz aus Huhn (Swiss-Prot: P00523), welche sich aber nur geringfügig von der entsprechenden humanen Sequenz (Swiss-Prot: P12931) unterscheidet. Alle Src-Sequenzen wurden mit der „Venus“ Sequenz markiert (alternativ: „super-enhanced“ YFP oder seYFP, Nagai et al., 2002). Venus ist eine Weiterentwicklung von eYFP (eYFP-F46L; Miyawaki et al., 1997; Kremers et al., 2006). Ein Konstrukt, in dem Venus in die Xba1/Xho1 Restriktions-Schnittstelle des pcDNA3-Plasmids kloniert wurde (p-Venus), war vorhanden. Da Src einen N-terminalen Membrananker besitzt und eine intramolekulare Platzierung des „Tags“ nicht in Frage kommt, ist die Klonierungsstelle für Venus vorgegeben (C-Terminus). Die kodierende Sequenz für Src_{wt} und SrcK295R (ohne das STOP-Codon) wurde aus den p-Src Konstrukten mit den PCR-Primerpaar src-for (5`-AGGATCCATGGGGAGCAGCAAGAGCAAGC, unterstrichen: BamH1-Schnittstelle) und src-rev (5`-AGAATTCTAGGTTCTCTCCAGGCTGGTACTGG, unterstrichen: EcoR1) amplifiziert (Abb. 8A - links). Die Fragmente wurden anschließend in die BamH1-EcoR1-Restriktions-Schnittstellen von p-Venus kloniert, so dass die entsprechenden p-Src/Venus Konstrukte entstehen (Abb. 8A - rechts). Auf diese Weise entstanden Konstrukte, welche für Src-Venus Proteine kodieren, bei denen der Fluoreszenz-Tag (mit einem Linker von 14 AS Länge) am Src C-Terminus sitzt (Abb. 12A). Der Einfachheit halber werden die exprimierten Proteine in der Folge als Src-YFP (Src_{wt}-YFP bzw. Src-YFP, SrcK295R-YFP) bezeichnet.

KLONIERUNG VON p-SrcY529F/Venus

Um Venus-markiertes SrcY529F zu klonieren wurde wiederholt der beschriebene PCR-Ansatz verfolgt, jedoch ohne Erfolg. Da ein entsprechendes Konstrukt unabdingbare Voraussetzung für diese Arbeit war, musste ein anderer Ansatz gefunden werden.

Idee war, einfach die Sequenz mit der Mutation aus dem vorhandenen p-SrcY527F Konstrukt (Thomas et al., 1991, Harris et al., 1999) herauszuschneiden und dieses dann in p-Src_wt/Venus zu klonieren. Die Endonuklease Xcm1 (NE Biolabs) ist ein Klasse2-Restriktionsenzym, welches eine unterbrochene 6er-Palindromsequenz (5`-CCAxXXXXXXXXTGG-3`) erkennt und in der Mitte so schneidet, dass ein Ein-Basen-3`-Überhang entsteht. Im Src-Gen (1602 b) befinden sich zwei Xcm1-Schnittstellen (Basen 1176 bis 1582). Es entsteht ein 406 b-Fragment, welches die Mutation (TTC statt TAC) enthält, die für den Y527F AS-Austausch im Src-Protein verantwortlich ist. Dieses Fragment wurde in einem speziellen Agarosegel („High Resolution“ Agarose, Carl Roth) aufgetrennt und isoliert. Parallel wurde das p-Src_wt/Venus Konstrukt ebenfalls mit Xcm1-verdaut (keine Schnittstelle im Vektor) und die 5`-Phosphatgruppen mittels SAP (shrimp alkaline phosphatase, Promega) entfernt, so dass die Rezirkularisierung unterbunden wird. Dann wurde das 406 Basen-Fragment in den Vektor ligiert, so dass ein p-SrcY527F/Venus-Konstrukt entsteht (Abb. 8B). In Anlehnung an die Mutationsstelle in der humanen Proteinsequenz (Y529) und zur Vereinfachung wird das kodierte Protein in der Folge SrcY529F-YFP genannt.

KLONIERUNG VON p-Cerulean/Csk

Csk-Konstrukte, welche für die Protein-Sequenz aus Ratte (Swiss-Prot: P41240) kodieren, standen zur Verfügung (s. Tabelle „Liste der DNA-Konstrukte“ unten). Das eCFP (enhanced CFP) in p-eCFP/Csk_wt (beschrieben in Matsuoka et al., 2004) wurde durch das weiterentwickelte „Cerulean“ durch eine PCR-basierte Strategie ersetzt, da Cerulean spezifische photophysikalische Vorteile gegenüber dem eCFP besitzt (höhere Stabilität gegen Photobleichen, bessere Quantenausbeute; Rizzo et al., 2004; Kremers et al., 2006) und daher noch exaktere und zuverlässigere FRET Resultate zulässt.

Die gesamte Cerulean-Sequenz wurde mittels PCR aus dem Vektor p-βArrestin₂/Cerulean mit dem Primerpaar cerulean_for (5`-CAGAGCTAGCATGGTGAGCAAGGGCGAG-3`, eingefügtes Start-ATG, unterstrichen: Nhe1) und cerulean_rev (5`-AAGTGTCGACCTTGTACAGCTCGTCC-3`, ohne STOP-Codon, unterstrichen: Sal1) amplifiziert. Anschließend wurde das DNA-Fragment in die Nhe1-Sal1-Restriktionsschnittstelle von p-eCFP/Csk_wt kloniert (Abb. 8C). Im kodierten Protein sitzt Cerulean am N-Terminus von Csk (Abb. 12B). Das Konstrukt

ohne STOP- und davorliegendes Codon, unterstrichen: BamH1) entstand ein PCR-Produkt, welches geeignet für die Klonierung war. Das verdaute und isolierte 1305 b-Fragment wurde in die Sal1- und BamH1-Schnittstellen von p-Cerulean/Csk erfolgreich kloniert (Abb. 8D, 12C).

p-Syk/Cerulean:

Auch die Klonierung von p-Syk/Cerulean-Konstrukten wurde parallel verfolgt, hatte jedoch keinen Erfolg (p-EMCV-Syk Konstrukte wurden von S.Shattil zur Verfügung gestellt).

Desweiteren wurden α_{IIB} und β_3 DNA-Konstrukte angefordert und in die Sammlung der Konstrukte aufgenommen.

Liste der DNA-Konstrukte

Vektor	Plasmid	kloniertes Gen	Klonierung	Vektorherkunft
p-Src (8,6 kb)	pLNCX: 6,6 kb, Amp, Pcmv, shuttle	Src (Huhn): 1602 b	Hind3-Cla1	S. Shattil (Scripps Research Institute, USA)
p-Venus (6,15 kb)	pcDNA3: 5,4 kb, Amp., Pcmv, shuttle	Venus: 720 b	Xho1-Xba1	J.-P. Vilardaga (Pharmakologie, Universität Würzburg)
p-Src/Venus (7,75 kb)	p-Venus	Src: 1599 b	BamH1-EcoR1	selbst kloniert (3 Konstrukte)
p-Csk	pcDNA3: Amp., Pcmv, shuttle	Csk (Ratte): 1350 b	-	S. Nada (Osaka University, Japan)
p-eCFP/Csk (6,05 kb)	pECFP-C1: 4,7 kb, Kan., Pcmv, shuttle	Csk: 1347 b	Sal1-Kpn1	
p-βArrestin2/ Cerulean	pcDNA3; 5,4 kb, Amp., Pcmv, shuttle	Cerulean: 714 b	Hind3-Xba1	C. Krasel (Pharmakologie, Universität Würzburg)
p-Cerulean/Csk (6,05 kb)	p-eCFP/Csk	Cerulean: 711 b	Nhe1-Sal1	selbst kloniert
p-PTP1B (9,4 kb)	pWZL-Hygro: 8,1 kb, Amp, Pcmv, shuttle	PTP1B (Mensch): 1308 b	BamH1-EcoR1	B. Neel (Harvard University, USA)
p-Cerulean/PTP1B (6,0 kb)	p-Cerulean/Csk	PTP1B: 1308 b	Sal1-BamH1	selbst kloniert

ZELLKULTUR-EXPERIMENTE

Informationen zu Zelllinien wurden auf der Webseite der DSMZ (**D**eutsche **S**ammlung von **M**ikroorganismen und **Z**ellkulturen, Braunschweig: www.dsmz.de/index.htm) bezogen.

Für die Zellkultur-Experimente wurden vor allem A5-CHO Zellen (Thrombozyten-Modellzellen) eingesetzt. Die Megakaryozyten-Zelllinie MEG-01 (erhalten von A. Smolenski, Universität Frankfurt a.M.) wurde ebenfalls kultiviert, kam für Experimente jedoch mangels effektiver Transfektionsprotokolle nicht zum Einsatz.

ZELLKULTUR

Die zugrundeliegende Zelllinie CHO wurde aus den Ovarien eines chinesischen Gold-Hamsters isoliert (Puck et al., 1958). Diese adhären Zellen wurden genetisch so modifiziert, dass sie den humanen Fibrinogenrezeptor (Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$) stabil in seiner funktionellen Form exprimieren (A5-CHO: O'Toole et al., 1990; Frojmovic et al., 1991). A5-CHO Zellen sind als Plättchenmodell-Zellen etabliert, da viele der von Plättchen bekannten Signal-Ereignisse in diesen Zellen rekapituliert werden (Shattil, 2005).

Die Zellen (Abb. 9; erhalten von M. Ginsberg, Scripps Research Institute, USA) wurden in entsprechendem Wachstums-Medium [DMEM #D5671, 10 % FBS, Penicillin/Streptomycin-Mix (Sigma), 2 mM L-Glutamin und Mix nicht-essentieller AS (PAA Laboratories), nach Empfehlung des Labors Shattil, O'Toole et al., 1994] für maximal 2 Wochen kultiviert, da nur innerhalb dieser Zeitspanne die Integrin-Expression auf konstantem Level bleibt (Information von S. Shattil). Die Zellen wurden in einem CO₂-Inkubator (Serie CB, Binder) bei 6 % CO₂ und 37° C kultiviert. Bei der Arbeit unter der Sterilbank (UVF, BDK Luft- und Reinraumtechnik) kamen die Zellen nicht mit Glasgefäßen (z.B. Pipetten) in Kontakt, da negativ geladene Oberflächen Integrine aktivieren können. Es wurden daher nur Plastikgefäße wie Kultur-/6-well-Platten, Falcon-Röhrchen oder Plastik-Pipettenspitzen (Sarstedt) benutzt. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage bei einer Konfluenz von 90-100 % unter Verwendung entsprechender Zell-Ablösungsreagenzien (Vorgehensweise nach Empfehlung der Hersteller) meist 1:8 bis 1:10 vorsichtig gesplittet (PBS-ohne CaCl₂/MgCl₂; # D8537, Sigma) und sanft bei 430 g für 2 min zentrifugiert. Wenn die Zellen weiterkultiviert oder, nach Transfektion, für Expressions-Analysen verwendet wurden, nutzten wir das klassische Ablösereagens Trypsin-EDTA (Sigma). In Fällen, wo Signalaktivierungs-

Prozesse studiert wurden, kam Alfazym (PAA) zum Einsatz, da dieses wesentlich sanfter ist und kaum Rezeptorverdau verursacht, was ebenfalls Signalaktivierung (und damit falsch-positive Resultate) zur Folge haben kann. Zur Langzeitaufbewahrung wurden die Zellen in einem DMSO-Einfriermedium verdünnt und durch stufenweise Abkühlung [4° C, -20° C, -196° C (flüssiger Stickstoff)] kryokonserviert (nach Lindl, 2002). Zur Rekultivierung wurden die Zellen im Wasserbad (37° C) gerade eben aufgetaut und sofort durch tropfenweise Zugabe von 5-6 ml Kulturmedium (RT) innerhalb von 2-3 min in Suspension gebracht. Nach sanfter Zentrifugation (Beseitigung des Zellgifts DMSO; 430 g/2 min) wurde das Pellet in Kulturmedium resuspendiert und die Zellen zunächst 2 Tage ungestört kultiviert.

TRANSFEKTIONEN

Für die Protein-Überexpression wurden DNA-Konstrukte mittels Transfektion in A5-CHO gebracht. Transfektionen wurden (nach vergleichender Tests mit anderen Transfektions-Agentien) immer mit Lipofectamine2000 nach den Empfehlungen des Herstellers (Invitrogen) bei einer Zelldichte von ca. 90-100 % durchgeführt. Zu transfizierende DNA und Lipofectamine2000 wurden in DMEM (#D5671)-Medium verdünnt (DNA: Lipofectamine2000=1:2,5) und dann zu den Zellen gegeben. Nach 24 h wurden das Medium ersetzt und die Zellen (um Zelldichte-Stress aufgrund weiterer Proliferationen zu vermeiden) gesplittet (1:3) und für weitere 24 h kultiviert.

PROTEINBIOCHEMISCHE TECHNIKEN

In diesem Abschnitt sind die Methoden zur Herstellung der Zell-Lysate, der Protein-Konzentrationsbestimmung und -auftrennung, der Immundetektion von Proteinen und der biochemischen Assays zusammengefasst. Letztere wurden eingesetzt, um die Src-Aktivität (Phosphorylierungs-Assays) und -Rezeptor-Assoziation (Co-Immunpräzipitation) zu untersuchen.

HERSTELLUNG VON ZELL-LYSATEN

Die A5-CHO Kulturzellen wurden standardmäßig (40-48 h nach Transfektion) mit PBS (37° C) 2x gewaschen, geerntet und zentrifugiert. Das Pellet wurde in eiskaltem RIPA-Lysepuffer (Upstate) aufgenommen und für 10 min auf Eis lysiert.

Zum Schutz vor Abbauprozessen wurde der Lysepuffer mit Protease-Inhibitoren (Complete, Roche Diagnostics) und Phosphatase-Inhibitoren (10 mM NaF; Phosphatase-Inhibitor-Cocktail2, Sigma) versetzt. Nach der Lyse wurden unlösliche Zellfragmente abzentrifugiert (2 min, 16.000 g, 4° C). Lysate von Thrombozyten standen zur Verfügung. Die Plättchen wurden aus Vollblut freiwilliger Probanden (Mitarbeiter des Instituts für klinische Biochemie) isoliert.

PROTEIN-KONZENTRATIONSMESSUNG

Der Gesamt-Proteingehalt wurde mittels des weitgehend Detergenzien-kompatiblen BCA-Tests (Pierce) nach Herstellerangaben bestimmt (Messung der Biuret-Reaktion). Hierfür wurde das Lysat in 2 Verdünnungen mit dem Assaymix versetzt, in 96-well-Platten pipettiert, eine Stunde inkubiert (37° C) und die Extinktion bei 562 nm kolorimetrisch mit dem „Microplate-Reader“ (SpectraMax 340, Molecular Devices) gemessen. Die Proteinkonzentrationen im Lysat wurden anschließend je auf 1 µg/µl eingestellt.

GELELEKTROPHORESE UND IMMUNBLOTTING

Je 5 µg der Lysate wurden mit SDS-Proteinauftragspuffer [RotiLoad1 (reduzierend), RotiLoad2 (nicht-reduzierend); Carl Roth] versetzt und erhitzt (5 min, 95° C) und anschließend auf 7,5 %-igen Polyacrylamid-Gelen (RotiphoreseGel30, Carl Roth) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte standardmäßig mittels denaturierender SDS-PAGE (Sammel- und Trenngel) nach dem Molekulargewicht (Proteinstandard: „PageRuler prestained protein ladder“, Fermentas).

Die aufgetrennten Proteine wurden auf Nitrozellulose-Membranen (Hybond-P, Amersham) transferiert (Wet-blotting: 1 h, 4° C, 2 Ampere, „Trans-Blot Cell“; Biorad). Zur Transferkontrolle wurden die Blots mit Ponceau S (0.1 % (w/v), in 5 % Essigsäure; Sigma) gefärbt (2 min) und gewaschen (TBS), so dass Proteinbanden mit hohem Kontrast erscheinen, wobei die Stärke der Rotfärbung als direkt proportional zur Menge an transferierten Protein angenommen wird. Ponceau S ist ein roter, negativ geladener Farbstoff, der an positiv geladene AS bindet.

Die Blots wurden zunächst mit Blockierlösung (s.u.) für 1 h (4° C) geblockt, um unspezifische Bindestellen abzusättigen. Anschließend wurden die transferierten Proteine mit den jeweiligen Primär-AKs detektiert (Inkubation: 1-1,5 h/RT oder üN/4° C), welcher anschließend von einem HRP-konjugierten Sekundär-AK (30 min/RT) erkannt wird. Nach den Inkubationen folgte jeweils 3x 2 minütiges

Waschen mit TBST. Die Proteinbanden wurden mittels verstärkter Chemilumineszenz (ECL plus, Amersham) auf Röntgenfilmen detektiert (Exposition: 10 s bis 5 min).

Verwendete Lösungen und Reagenzien:

- Elektrophorese-Puffer:
25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % SDS
- Transfer-Puffer (nach Towbin):
25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % SDS; 20 % Methanol; pH 8,3
- TBS: 20 mM Tris; 0,9 % NaCl; pH 7,4
- TBST: TBS + 0,1 % Tween-20 (Appllichem)
- Blockierlösung: 5 % Trockenmilchpulver (w/v) in TBST
Trockenmilchpulver (fettfrei): „Immunoblot blocking reagent“ (Upstate)

Verwendete Antikörper (c: Endkonzentrationen)

Primär-AKs:

- anti- v-Src (Ab-1, Klon 327, monoklonal, aus Maus), AK gegen Gesamt-Src (Sigma, #S1686), c=2 µg/ml
- anti- Src-pTyr418 (aktive Src-Form) und anti- Src-pTyr529 (inaktive Src-Form) (beide polyklonale, phospho-spezifische AKs aus Kaninchen, BioSource, #44-660G und #44-662G), je c=1:1000-Verdünnung der Stammlösung
- anti- Csk (monoklonal), Klon 52 (aus Maus) (BD Biosciences, #610080), c=1:500-Verdünnung der Stammlösung
- anti- β_3 (monoklonal), Klon SAP (aus Maus) (Santa Cruz, #sc-13579), c=1 µg/ml
- anti- PTP-1B (polyklonal, aus Kaninchen), (Upstate, #07-088) c=1 µg/ml
- anti- Phosphotyrosin (monoklonal), Klon 4G10 (aus Maus) (Upstate, #05-321), c=0,5 µg/ml
- anti- Syk (monoklonal), Klon 4D10.1 (aus Maus) (Upstate, #05-434), c=1 µg/ml

Sekundär-AKs für Western blot:

- anti- Maus IgG (polyklonal, aus Ziege) (Biomol)
- HRP-konjugierter anti- Kaninchen IgG und anti- Maus-IgG (beide polyklonal, aus Ziege, Bio-Rad #170-6515 und #170-6516).

BIOCHEMISCHE ASSAYS

Hier wurde die adhäsionsabhängige Src-Aktivität und die Integrinbindung der verschiedenen Src-Proteine (Wildtyp und Mutationen) untersucht.

Src-Phosphorylierung

Die Src-Aktivität und subzelluläre Lokalisation während der Adhäsion an Fibrinogen wurde über die Messung des Src-Phosphorylierungs-Status untersucht.

Aktives und inaktives Src lassen sich mit phospho-spezifischen AKs leicht unterscheiden. Src_wt/Csk_wt (bzw. Src_wt-YFP/Csk_wt-CFP) co-exprimierende Zellen (100 mm Platten) wurden mit Alfacym geerntet, in 6 ml Mikroskopiemedium (s. „Zellvorbehandlung“ unter „Fluoreszenzmikroskopie“) verdünnt und für 1 h unter regelmäßigem Aufwirbeln (alle 5 min) im CO₂-Schrank inkubiert.

Dann wurden die Zellen auf 100 mm Agarplatten, die mit Fibrinogen (oder BSA) beschichtet wurden (nach Haimovich et al., 1993), und den jeweils angegebenen Zeiten im CO₂-Schrank inkubiert. Fibrinogen-adhärenente Zellen wurden 2x mit eiskaltem PBS gewaschen, mit 600 µl eiskaltem Lyse-Puffer überschichtet und anschließend mit einem Gummischaber abgeschabt und danach komplett lysiert (10 min, 4° C). Nicht-adhärenente Zellen der BSA-Platten wurden ebenfalls 2x gewaschen, abzentrifugiert und 10 min auf Eis lysiert. Nach Abzentrifugation (Beseitigung der Zelltrümmer) und BCA-Test wurden gleiche Mengen Gesamt-Protein elektrophoretisch aufgetrennt und geblottet. Dann erfolgte eine Immundetektion nach Gesamt-Src und der aktiven bzw. inaktiven Src-Form. Als Kontrolle dienten Thrombin-stimulierte (aktiviertes Src) und unstimulierte (inaktives Src) Plättchen-Lysate. Im Src-Protein aus Huhn ist Tyrosin 416 (humanes Src: Tyr418) der Marker für aktiviertes Src und Tyrosin 527 (humanes Src: Tyr529) der Marker für inaktives Src. Hier werden die Marker Tyr418 und Tyr529 verwendet. Die Banden auf dem Röntgenfilm wurden gescannt und durch kalibrierte Densitometrie mittels ImageJ-Software [National Institutes of Health (NIH), USA] quantifiziert. Zeitliche Änderungen in den Mengen an aktiven bzw. inaktiven Src wurden als Prozentwerte (normalisiert) errechnet und graphisch dargestellt.

Co-Immunpräzipitation

Die Src-Rezeptor-Assoziation wurde mit Co-Immunpräzipitation (Co-IP) untersucht. Zellen wurden in RIPA-Lysepuffer (ohne Deoxycholin, inkl. Inhibitoren) geerntet. 500 µg abzentrifugiertes Lysat (16.000 g, 2 min) wurde mit 2 µg anti- β₃-AK (Klon N-20, monoklonaler AK aus Maus, Santa Cruz, #sc-6627) für 2 h auf Eis inkubiert, gefolgt von weiteren 2 h Inkubation mit Protein G-gekoppelten Sepharose-Kügelchen (4-fast-flow, Amersham). Die Kügelchen wurden 3x mit Lysepuffer sanft gewaschen und anschließend assoziierte Proteinkomplexe durch Kochen in SDS-Probenpuffer (5 min) abgelöst, elektrophoretisch aufgetrennt und über Immunblotting detektiert.

FLUORESZENZ-MIKROSKOPIE

Für Beobachtungen funktioneller Vorgänge auf Einzelzell-Ebene mittels Fluoreszenz-Mikroskopie wurden die Zellen besonders sanft geerntet und anschließend mit geringen Serummengen 1 h im Inkubator vorbehandelt. Anschließend wurden A5-CHO-Zellen auf eine Fibrinogenmatrix aufgebracht, an die sie $\alpha_{IIb}\beta_3$ -abhängig adhäreren.

Mikroskopische Aufnahmen wurden sowohl mit lebenden Zellen („live cell imaging“) als auch mit fixierten Zellen durchgeführt, wobei sowohl die Protein-Lokalisation als auch Interaktionen der Proteine (FRET-Mikroskopie) untersucht wurde.

Zellvorbehandlung

Die Zellen wurden mit Alfazym 2 Tage nach Transfektion geerntet, in 2 ml Mikroskopiemedium [DMEM ohne Phenolrot, #D1145 (Sigma), 1 % FBS, 2 mM L-Glutamin, Mix nicht-essentieller AS)] resuspendiert und für 1 h bei 37° C unter Zellkultur-Bedingungen inkubiert (alle 5 min Aufwirbeln). Parallel wurden fluoreszenzfreie Mikroskopie-Deckgläser (No.1, $\varnothing=24$ mm, Hartenstein) fettfrei gewaschen (100 % Ethanol) und mit Fibrinogenlösung (100 $\mu\text{g/ml}$ in PBS; pH 8,3) 1 h bei 37° C inkubiert, so dass sich eine Matrix aus immobilisiertem Fibrinogen bilden kann. Danach wurden die Deckgläser in einer speziellen Halterung fixiert, die Zellen darauf plattiert und 25 min unter Zellkultur-Bedingungen inkubiert. Nach Abwaschen nicht-adhärenter Zellen (PBS) wurden die adhäreren Zellen (Adhäsions-Assay, Abb. 9B) mit Mikroskopiemedium (37° C) überschichtet und auf dem Objektiv platziert. Der Fokus wurde auf die Lamellipodien von Zellen mit mittlerer und ausgeglichener CFP- und YFP-Fluoreszenz justiert.

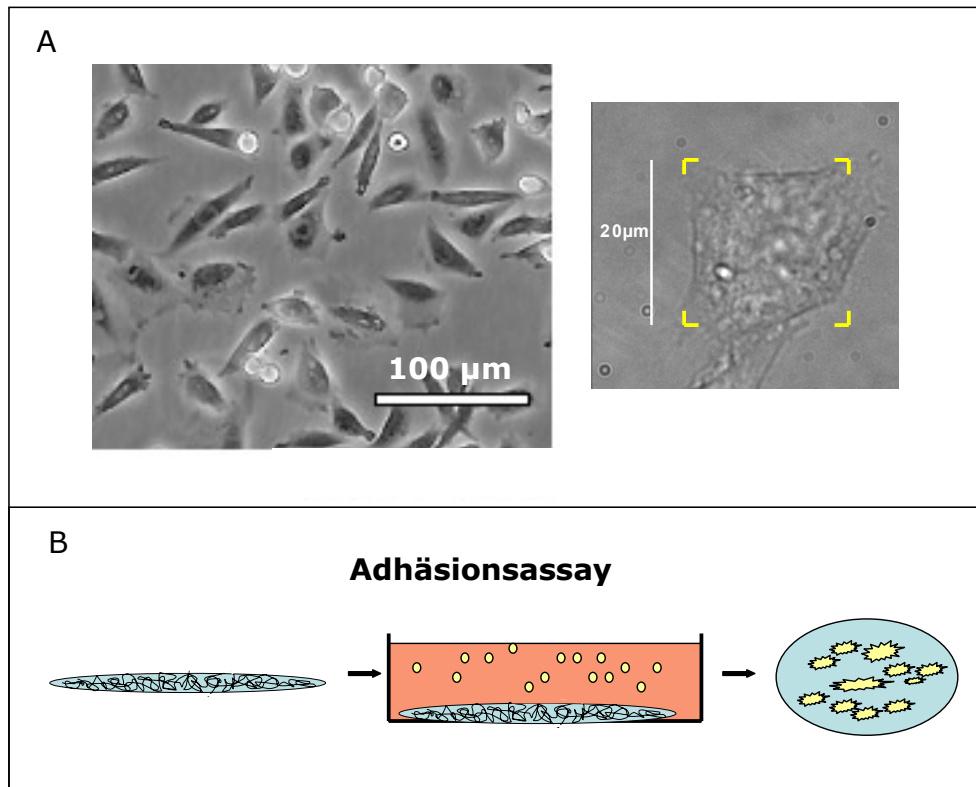


Abb. 9. A5-CHO Zell-Adhäsion.

A) A5-CHO überexprimieren konstitutiv den Integrin Rezeptor $\alpha_{IIb}\beta_3$ (rechts: Einzelzelle). B) Über diesen Rezeptor adhären die Zellen selektiv auf einem mit immobilisiertem Fibrinogen beschichteten Mikroskopie-Deckglas und breiten sich darauf unter Lamellipodienbildung aus. Dabei werden „outside-in“ Signalprozesse wie in humanen Thrombozyten aktiviert.

FLUORESZENZ-LOKALISATION

Konfokale Mikroskopie

Mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM) wurden Fluoreszenzmarkierte Proteine mit hoher räumlicher Auflösung lokalisiert und Bewegungen zeitlich verfolgt (Zeitraffer-Verfahren, „time-lapse“-Mikroskopie).

Es wurde ein Konfokalmikroskop (TCS-SP2; Objektiv: 63x/N.A.: 1,32; Öl; HCX-PL-APO-CS; Leica), welches mit 2 Laserlinien (430 nm für CFP- und 514 nm für YFP-Anregung) und einem Anregungs-Strahlteiler (RSP 455 für 430 nm und DD458/514 für 514 nm) ausgestattet war, benutzt. Die Zellen wurden mit einer Abtastrate von 400 Hz gescannt und die Bilder 4-8x gemittelt („Averaging“). Durch Bewegungen in den Zellen war häufigeres Mitteln nicht möglich, ohne an Auflösung zu verlieren. Die Fluoreszenz-Detektion erfolgte mittels zwei hoch-sensitiven Photomultipliern in selektiven Wellenlängenbereichen (463-496 nm für CFP, 549-600 nm für YFP). Die Bilder (512x512 Pixel) wurden ins „.tif“-Format konvertiert und hinsichtlich Kontrast und Helligkeit optimiert [Software: ImageJ; National Institutes of Health (NIH), USA].

Co-Immunlokalisation von Vinculin, Src-YFP und Csk-CFP

Für dieses Experiment wurde das SP5-, eine Weiterentwicklung des SP2-Konfokalmikroskops (Leica) verwendet. Auf Fibrinogen-beschichtete Deckgläser ausplattierte, Src_wt-YFP/Csk_wt-CFP co-exprimierende Zellen wurden nach 40 min Adhäsion gewaschen (2x PBS) und anschließend mit 4 % (w/v, in PBS) para-Formaldehyd (Applichem) fixiert (RT, 10 min). Anschließend wurden die Zellen durch Inkubation in 0,1 % Triton X-100 (w/v, in PBS: 5 min, RT) permeabilisiert, erneut 3x gewaschen, 1 h geblockt (5 mg/ml BSA in PBS) und für 1 h (RT) zunächst mit anti-Vinculin (monoklonaler AK aus Maus, Sigma), dann mit einem Cy3-konjugierten Sekundär-AK (anti-Maus IgG, Dianova) inkubiert (45 min, RT). Dann wurde die Co-Immunlokalisation durchgeführt. Die Cy3-Anregung erfolgte bei 561 nm, die Detektion bei 582-692 nm. Die CFP-Anregung erfolgte bei 405 nm. Die sonstigen Einstellungen waren identisch zu den unter „Konfokale Mikroskopie“ beschriebenen.

TIRF Mikroskopie

Mit dieser Technik wird selektiv die Fluoreszenz nahe der Oberfläche aufgenommen, was Aussagen über die Proteinlokalisation in der Adhäsionsebene erlaubt (Axelrod, 2001). Die Zellen wurden auf spezielle, zuvor mit Fibrinogen beschichtete, Plastikammern ausplattiert, auf denen sie normal adhären können. Die verwendeten Kammern besitzen einen sehr dünnen Boden (Dicke: 180 μm), der aus Plastikmaterial mit zu Glas vergleichbarer optischer Dichte besteht (μ -slides, Ibidi). Dies ist die Voraussetzung für die TIRF (total internal reflection fluorescence)-Anregung (Abb. 10). Der Laserstrahl wird dabei über das Objektiv im Grenzwinkel der Totalreflektion auf den Boden der Plastikammer gerichtet. Dadurch entsteht ein Anregungsfeld („evanescent field“) in einem Bereich bis zu 150 nm überhalb der Oberfläche und damit der Adhäsionsebene der entsprechenden Zellen (selektive Anregung). Somit können Src-YFP und Csk-CFP in dieser Ebene über die Fluoreszenz visualisiert und lokalisiert werden. Die Plastikammern wurden in speziellen Halterungen auf dem TIRF Objektiv (Fluar 100x; N.A.: 1,45; Öl; DIC-III; Zeiss) platziert. Das TIRF-Mikroskop besteht aus einem inversen Mikroskop (Axiovert 200M, Zeiss), welches für die TIRF-Messungen mit einem „imaging slider“-System und einem achromatischen 2-Kanal-UV/Epifluoreszenz Kondensator No.1 (beide Komponenten von Zeiss) ausgerüstet ist. Die Fluoreszenz-Anregung erfolgte über einen Luft-gekühlten Argon-Ionen (Ar^+)-

Laser (2 Linien: 458 nm für CFP und 514 nm für YFP). Mittels der Zeiss-Imaging-Software wurden Bilder auf einer CCD Kamera (AxioCamMR, Zeiss) aufgenommen (Auflösung: 1388x1040 pixel), ins ".tif"-Format konvertiert und der Kontrast und die Helligkeit optimiert (ImageJ).

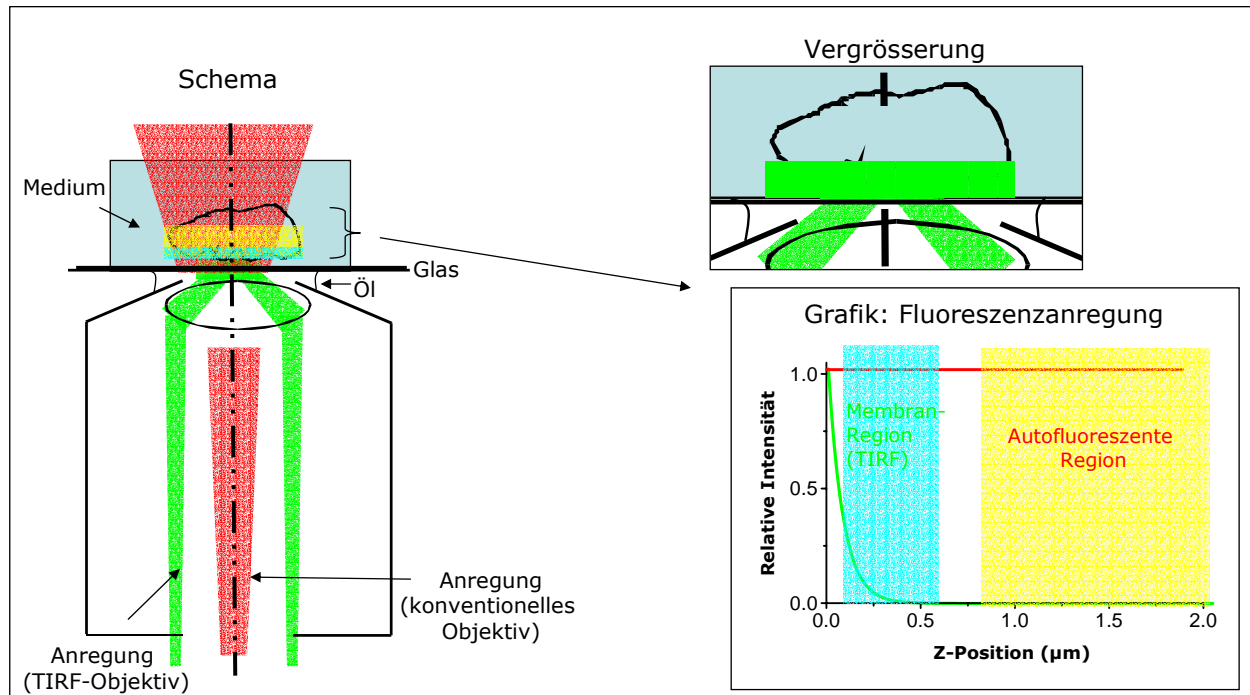


Abb. 10. TIRF Mikroskopie.

TIRF nutzt das Prinzip der Totalreflexion. Im TIRF Objektiv (links, grün) wird der Laserstrahl so eingekoppelt, dass er im Grenzwinkel der Totalreflexion auf die Oberfläche trifft. Dadurch bildet sich ein elektromagnetisches Oberflächenfeld („evanescent wave“, rechts oben, vergrößerter Ausschnitt) aus, durch welche nur Fluoreszenzmoleküle oberhalb von ca. 150 nm der Oberfläche (Zellmembrannahen Regionen) spezifisch angeregt werden. Weiter entfernt liegende Zellregionen, in denen endogene gebildete Flavine (und damit störende Autofluoreszenz) vorkommen, werden im Gegensatz zur konventionellen Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie (Schema, links) nicht angeregt. Rechts: Grafische Verdeutlichung der Vorteile der TIRF-Anregung.

VISUALISIERUNG VON PROTEIN-INTERAKTIONEN

Protein-Interaktionen wurden mittels FRET mikroskopisch untersucht. Dynamische FRET-Messungen an lebenden Zellen wurden mit Weitfeld-Mikroskopie (hohe zeitliche Auflösung) und konfokaler Mikroskopie (sehr gute räumliche Auflösung) durchgeführt. Statische FRET-Messungen wurden an fixierten Zellen mittels Konfokalmikroskopie durchgeführt.

FRET Imaging und –Quantifizierung mit Weitfeld-Mikroskopie

Für die FRET-Messungen wurde das Zellvorbehandlungs-Protokoll optimiert: Um Autofluoreszenz, die durch Zell-Stress bei hohen Zelldichten entsteht, zu vermeiden, wurden die Zellen einen Tag nach Transfektion gesplittet (1:3). Die Zellen wurden Trypsin-frei geerntet (Ersatz durch Alfazym), um Voraktivierung des Signalwegs zu umgehen, die aus partiellem Integrin-Verdau entstehen könnte (dies könnte u.U. falsch-positive FRET-Signale erzeugen).

Ein inverses Mikroskop (Axiovert 200, Zeiss) mit einem PlanApochromat-Objektiv (63x; N.A.: 1,4; Öl) wurde eingesetzt. Es wurden Methoden nach Vilardaga & Steinmeyer (2005) benutzt (Abb. 11). Das Laserlicht stammte aus zwei Quellen (Abb. 11A): Die 860 nm-Linie eines verstellbaren Titan-Saphir-Lasers (Mira, Coherent) wurde durch einen Lithium-Niobat Kristall (CASIX/Linos) Frequenzverdoppelt (430 nm) und anschließend mittels eines Zweifarben-Spiegels (Chroma Technology) gefiltert. Diese Linie diente der CFP-Anregung. YFP wurde durch einen Ar⁺-Laser (Innova, Coherent) bei 514 nm angeregt. Über Einkopplung in Optikfasern (Thorlabs; „multi-mode“ Faser für 430 nm, single-mode Faser für 514 nm) wurden die Laserlinien zum Mikroskop geleitet. Die beiden Laserstrahlen wurden dann an einem Zweifarben-Spiegel (mittlere Wellenlänge: 480 nm, Chroma) vereinigt und so feinjustiert, dass beide Linien auf dieselbe Anregungsenergie (500 µW), dieselbe Position und denselben Anregungs-Querschnitt direkt oberhalb des Objektivs haben. Zwischen beiden Anregungswellenlängen wurde mittels mechanischer Verschlüsse („shutter“, LS-500, nm-Laser-Products) umgeschaltet, so dass nacheinander 2 Fluoreszenz-Anregungen mit 100 ms Verzögerung möglich sind. Das erste im Detektionsweg befindliche Filtersystem bestand aus einem Zweifarben-Spiegel mit hoher Reflektivität im Bereich 425-460 nm sowie 515-530 nm und starker Transmission bei 460-505 nm und 540-610 nm und einem Emissionsfilter (Chroma) mit hoher Transmission bei 465-495 nm (CFP-Emission) und 550-610 nm (YFP-Emission). Der Detektionsstrahl wurde über einen Farbkeil (Chroma) in zwei Farbbereiche aufgetrennt. Die beiden Keil-Oberflächen (1° Neigungswinkel) sind mit zwei unterschiedlichen Farbbeschichtungen versehen (mittlere Wellenlänge: 510 nm), durch welche je zwei getrennte Bilder in den CFP- und YFP-Emissions-Wellenlängen zur Kamera reflektiert werden.

Dies resultiert in zwei aufeinander folgenden Aufnahmen mit je zwei getrennten Bildern pro Fluorophor. Zur Detektion wurde eine auf -35° C gekühlte CCD-Kamera (SPEC-10, 400B TE, Roper Scientific) mit einer Auflösung von 400x1340 Pixel (Pixelgröße: 20 µm) verwendet.

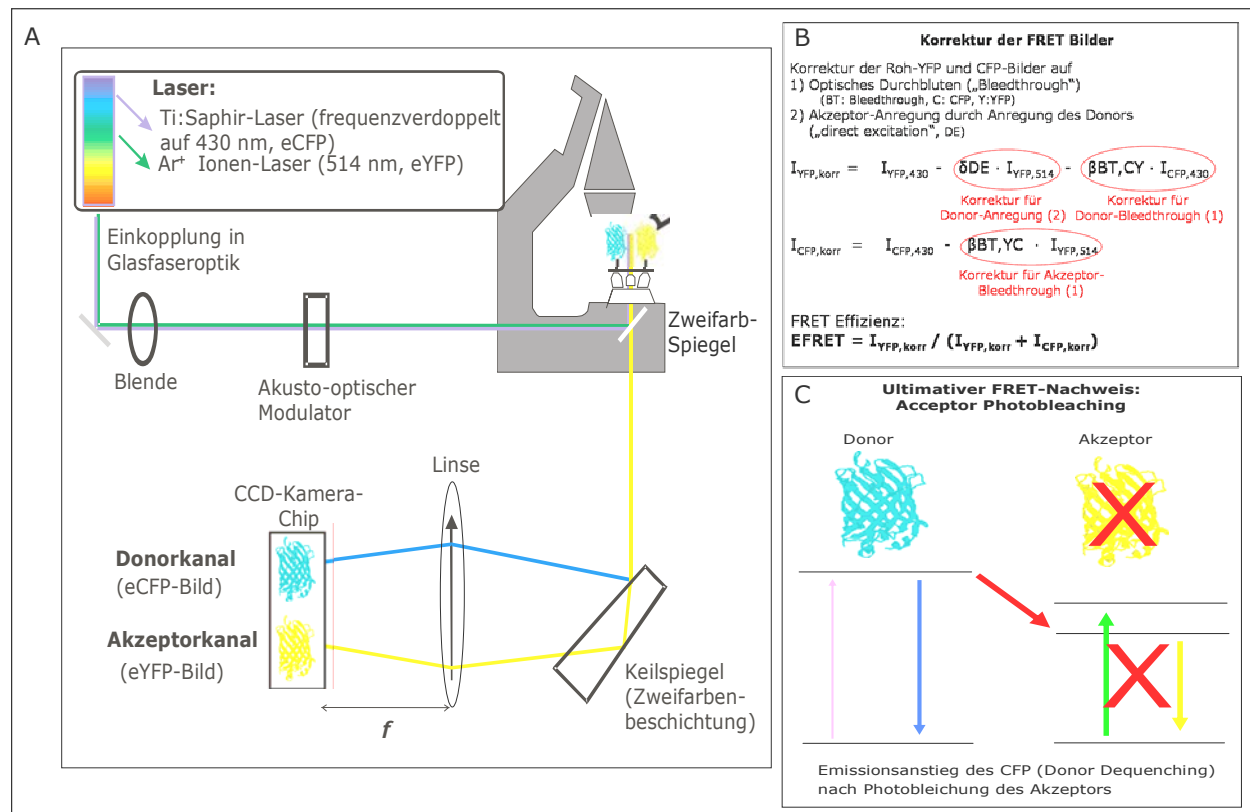


Abb. 11. FRET Effizienz-Messung am Weitfeld-Mikroskop.

A) Aufbau zur Messung von E_{FRET} : Die beiden Laserlinien für CFP- und YFP- Anregung wurden in das Mikroskop eingekoppelt (je nur eine Linie zur selben Zeit) und über einen Zweifarben-Spiegel, welcher die Anregungslinien zu 100 % reflektiert, auf die Probe geleitet. Emissionslicht von der Probe wird jedoch durchgelassen, über einen Zweifarben-beschichteten Keilspiegel in 2 Fluoreszenz-Bereiche separiert und in getrennten Kanälen (Kamera-Chip) detektiert. B) Korrekturberechnungen: YFP-Bilder müssen zweifach, CFP-Bilder einfach von unspezifischer Fluoreszenz bereinigt werden, so dass daraus E_{FRET} -Bilder (Formel) errechnet werden können (Näheres s. Methodenteil). C) Kontrollexperiment: Bei Anwesenheit von FRET sollte nach vollständiger Photobleichung des FRET-Akzeptors YFP anschließend die Fluoreszenzintensität des CFP signifikant zunehmen („Dequenching“).

Auf Fibrinogen-beschichteten Deckgläsern adhären und oberhalb des Objektivs fixierte Zellen wurden über einen Objektivheizer (37° C) warm gehalten. Die durch die mechanischen Schließer kontrollierte Anregungszeit (100-400 ms) wurde jeweils so angepasst, dass für unterschiedliche zelluläre CFP- und YFP-Fluoreszenz-Niveaus kompensiert wurde. Mithilfe eines Programms, welches die Schließvorrichtungen steuert, wurden alle 5 s über eine Zeitdauer bis zu 10 min Fluoreszenz-Bilder (150x150 Pixel) aufgenommen. Diese Bilder wurden dann in ImageJ exportiert, um daraus FRET-Bilder zu errechnen.

Berechnung der FRET-Bilder (Abb. 11B):

FRET-Effizienzen (E_{FRET}) wurden als das Verhältnis der Gesamt-Intensität im Akzeptor-Kanal (YFP) zur Summe der Intensitäten im Akzeptor- und Donor-(CFP) Kanal bei einer Anregungs-Wellenlänge von 430 nm errechnet ($I_{\text{YFP},430}$, $I_{\text{CFP},430}$).

Die Fluoreszenzwerte in den aufgenommenen Bildern mussten zunächst korrigiert werden ($I_{\text{YFP},\text{korr}}$, $I_{\text{CFP},\text{korr}}$, s. Abb. 11): Berücksichtigt werden musste das Optische Durchbluten [„Bleedthrough“ (BT) oder „Crosstalk“] von CFP in den YFP Detektionskanal ($r_{\text{BT,CY}} \cdot I_{\text{CFP},430}$) und umgekehrt von YFP in den CFP Detektionskanal ($r_{\text{BT,YC}} \cdot I_{\text{YFP},514}$) sowie direkte YFP Anregung („direct excitation“, DE) durch die gewählte Anregungs-Wellenlänge ($r_{\text{DE}} \cdot I_{\text{YFP},514}$).

$$I_{\text{YFP},\text{korr}} = I_{\text{YFP},430} - r_{\text{DE}} \cdot I_{\text{YFP},514} - r_{\text{BT,CY}} \cdot I_{\text{CFP},430}$$

$$I_{\text{CFP},\text{korr}} = I_{\text{CFP},430} - r_{\text{BT,YC}} \cdot I_{\text{YFP},514}$$

$$E_{\text{FRET}} = I_{\text{YFP},\text{korr}} / (I_{\text{YFP},\text{korr}} + I_{\text{CFP},\text{korr}})$$

Die BT- und DE-Korrekturfaktoren wurden mit solchen Zellen ermittelt, die YFP- oder CFP-gekoppelte Konstrukte einzeln exprimieren. Verwendet wurden SrcK295R-YFP bzw. CskK222R-CFP (beide Kinase-inaktiv), da bei Expression beider Proteine normale Adhäsion und Lamellipodien-Bildung stattfand.

Die direkte YFP-Anregung bei 430 nm war 3 % des Werts, den man mit 514 nm-Anregung erhält ($r_{\text{DE}} = 0,03$), die direkte CFP-Anregung bei 514 nm war dagegen vernachlässigbar. Bleedthrough von CFP in den YFP-Detektionskanal war 19 % ($r_{\text{BT,CY}} = 0,19$) und von YFP in den CFP-Detektionskanal 12 % ($r_{\text{BT,YC}} = 0,12$).

Diese BT- und DE-Werte wurden bei der Berechnung aller aufgenommenen FRET-Bilder berücksichtigt. Die Hintergrund-Fluoreszenz ohne Laser-Anregung war vernachlässigbar klein. Weitere Quellen von Fluoreszenz wie von den Zellen v.a. unter Stress gebildete Flavine (Autofluoreszenz), sowie vom Inkubations-Medium oder Fibrinogen war ebenfalls gering, sie wurden aber bei allen Berechnungen berücksichtigt. Niedrige Autofluoreszenz-Werte im relevanten Wellenlängen-Bereich in dieser Zelllinie wurden bereits durch van Zandvoort et al. (2002) gemessen. Die Detektionseffizienzen im gewählten mikroskopischen System waren 7 % (CFP) und 5 % (YFP). Aus den FRET-Einzelbilderserien wurden anschließend Videosequenzen generiert (ImageJ), in denen die zeitlichen Veränderungen gut zu erkennen sind.

FRET Kontroll-Messung (Abb. 11C):

Als klassisches FRET Kontroll-Experiment wurden „Acceptor Photobleaching“-Messungen (Photobleichen des FRET-Akzeptors YFP) durchgeführt. Nach kompletter

YFP-Photobleichung (514 nm) in den Lamellipodien von Src_wt-YFP/Csk_wt-CFP-co-exprimierenden Zellen war anschließend ein signifikanter Anstieg der CFP-Fluoreszenz (430 nm) und eine Verringerung der E_{FRET} -Werte zu beobachten, was als zusätzlicher Beweis für die Anwesenheit von FRET gilt.

FRET-Imaging mit konfokaler Mikroskopie

Für hochaufgelöste Aufnahmen wurde das TCS SP2 Konfokal-Mikroskop von Leica benutzt. Mittels der „FRET-sensitized emission wizard“ Software (FRET durch stimulierte Emission), welcher CFP, YFP und FRET Bilder zeilenweise („line-by-line“, Xia & Liu, 2001) simultan aufnimmt (Anregung: 430 nm, 514 nm) konnten FRET Aufnahmen generiert werden. Untransfizierte sowie einfach transfizierte A5-CHO Zellen (s. „FRET-Imaging mit Weitfeld-Mikroskopie“) wurden als Kontrollen benutzt. Die Detektions-Kanäle wurden, wie beschrieben („Konfokale Mikroskopie“), eingestellt, wobei FRET im Wellenlängenbereich 549-600 nm detektiert wurde. Um das Signal-Rausch-Verhältnis („signal-to-noise ratio“) zu erhöhen, wurden die Verstärkungswerte („gain“) der Detektions-Kanäle (Photomultiplier-Röhren) optimiert. Mit einer Abtastungsrate von 400 Hz und 8x „Averaging“ konnten Bilderserien mit zeitlichen Abständen von 25 s aufgenommen werden. Es wurden 18 Bilder (512x512 Pixel) über 8 min aufgenommen („time-lapse“), ins „.tif“-Format konvertiert und mit ImageJ optimiert. FRET Bilder wurden farbkodiert, um eine bessere Unterscheidbarkeit der unterschiedlichen Signal-Intensitäten zu gewährleisten. Aus den Einzelbilder-Serien wurden anschließend mit ImageJ Videos („.avi“-Format) generiert.

FRET-imaging an fixierten Zellen

Auf Fibrinogen-Deckgläsern adhärierende Zellen, welche Src_wt-YFP und Csk_wt-CFP co-exprimieren, wurden mit para-Formaldehyd (Applichem) 10 min bei RT fixiert. Nach mehrmaligem Waschen (PBS) wurde ein Tropfen Aquatex (wässriges Eindeckmedium, Merck) auf einen Objektträger (Euromexx) vorgelegt, die Zell-Seite des Deckglases auf den Tropfen platziert und nach einem Tag mittels Konfokal-FRET-Mikroskopie analysiert.

ERGEBNISSE

MARKIERUNG UND EXPRESSION VON SRC UND CSK

Um Interaktionen zwischen Src und Csk mittels FRET-Mikroskopie nachweisen zu können, müssen beide Proteine fluoreszenzmarkiert werden. Für Lebendzell-Beobachtungen gut geeignet und entsprechend häufig angewandt ist die Protein-Markierung mit CFP (FRET-Donor) und YFP (FRET-Akzeptor).

Es standen uns CFP-markierte Csk Konstrukte zur Verfügung, die in FRET Untersuchungen bereits erfolgreich eingesetzt wurden (Matsuoka et al., 2004). Daher lag es nahe, zunächst das „tagging“ von Src mit YFP zu testen. Als YFP Konstrukt stand das „super enhanced“ YFP (seYFP oder „Venus“) zur Verfügung, ein auf FRET Untersuchungen optimiertes YFP, bei dem zudem die unerwünschte Eigenschaft der Homo-Dimerisierung eliminiert ist. Venus ist zudem stabiler gegen Photobleichen bei stärkerer Laseranregung. Da Src N-terminal in der Plasmamembran verankert ist, wurde die YFP-Markierung an das C-terminale Ende kloniert. Dem Umstand, dass das Ziel-Tyrosin für Csk (Src-Tyr529) nahe dem Src-C-Terminus liegt, wurde dadurch Rechnung getragen, dass ein verlängerter Linker (14 AS) generiert wurde, der beide Proteine deutlich voneinander abtrennt (Abb. 12A). Neben der Klonierung von Src_{wt}-YFP wurden auch die Src-Mutanten SrcK295R (Kinase-inaktiv) und SrcY529F (konstitutiv aktiv, nicht inaktivierbar durch Csk) mit Venus ligiert (SrcK295R-YFP, SrcY529F-YFP). Alle Src-YFP Proteine lokalisieren nach Einzeltransfektionen wie erwartet in der Plasmamembran.

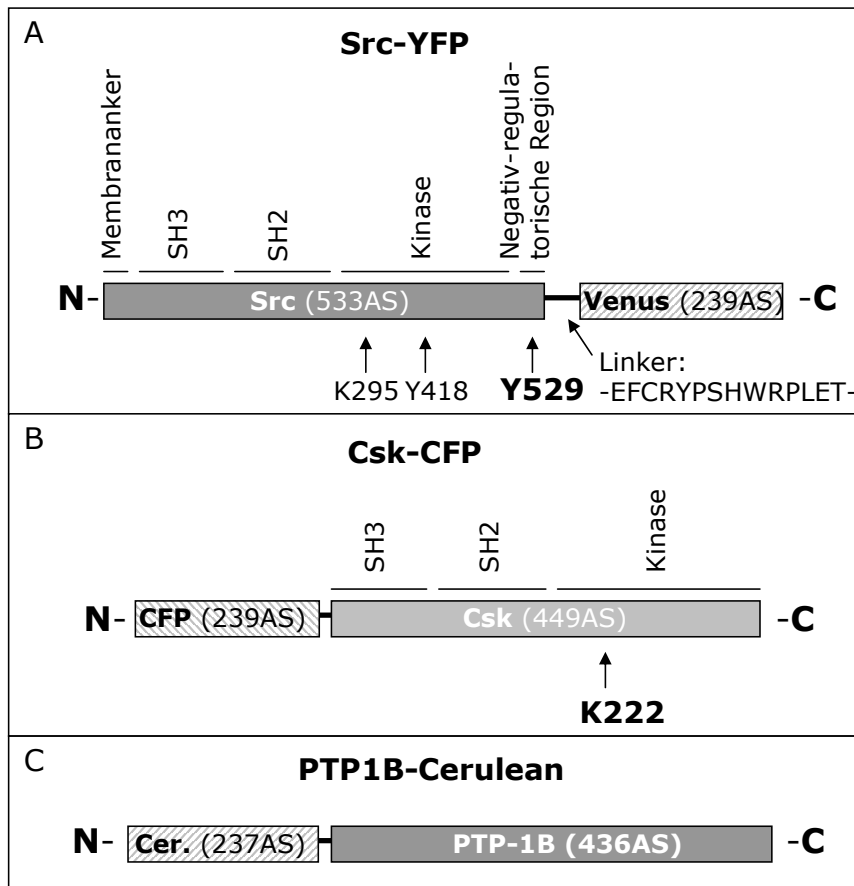


Abb. 12. Strukturen der verwendeten Fusionsproteine.

(A) Alle Src-Proteine wurden über einen 14 AS-Linker C-terminal mit seYFP verbunden. Lys295 und Tyr418 (aktivierendes Tyrosin) liegen in der Kinasedomäne, Tyr529 in der negativ regulatorischen „tail“-Region. (B) Csk-Proteine wurden am N-Terminus mit CFP verknüpft. (C) PTP-1B wurde am N-Terminus mit Cerulean fusioniert.

Western Blot Analysen zeigen, dass es sich bei der Expression tatsächlich um Src (60 kDa) handelt und dass die YFP-Markierung die erwartete Mobilitätsverschiebung von 27 kDa verursacht (Src-YFP: 87 kDa, Abb. 13A1). In den A5-CHO Zellen finden sich nur sehr geringe Mengen an Src, die erst bei langen Film-Inkubationszeiten sichtbar werden (Abb. 13A2).

In den bereits erwähnten CFP-markierten Csk-Konstrukten war CFP am Csk-N-Terminus kloniert. Ein Wildtyp Konstrukt Csk-CFP und ein Kinase-inaktives CskK222R-CFP (kann Src nicht inaktivieren) standen ebenfalls zur Verfügung (Abb. 12B). In Western Blots erscheint Csk bei 43 kDa, Csk-CFP bei 70 kDa (CFP: 27 kDa). Auch Csk wird offensichtlich kaum endogen in A5-CHO gebildet (Abb. 13B). Nach Co-Transfektion werden sowohl Src-YFP als auch Csk-CFP exprimiert (Abb. 13C). Desweiteren wurde ein Csk_wt-Cerulean aus dem Csk_wt-CFP erfolgreich kloniert und später bei den FRET Analysen eingesetzt.

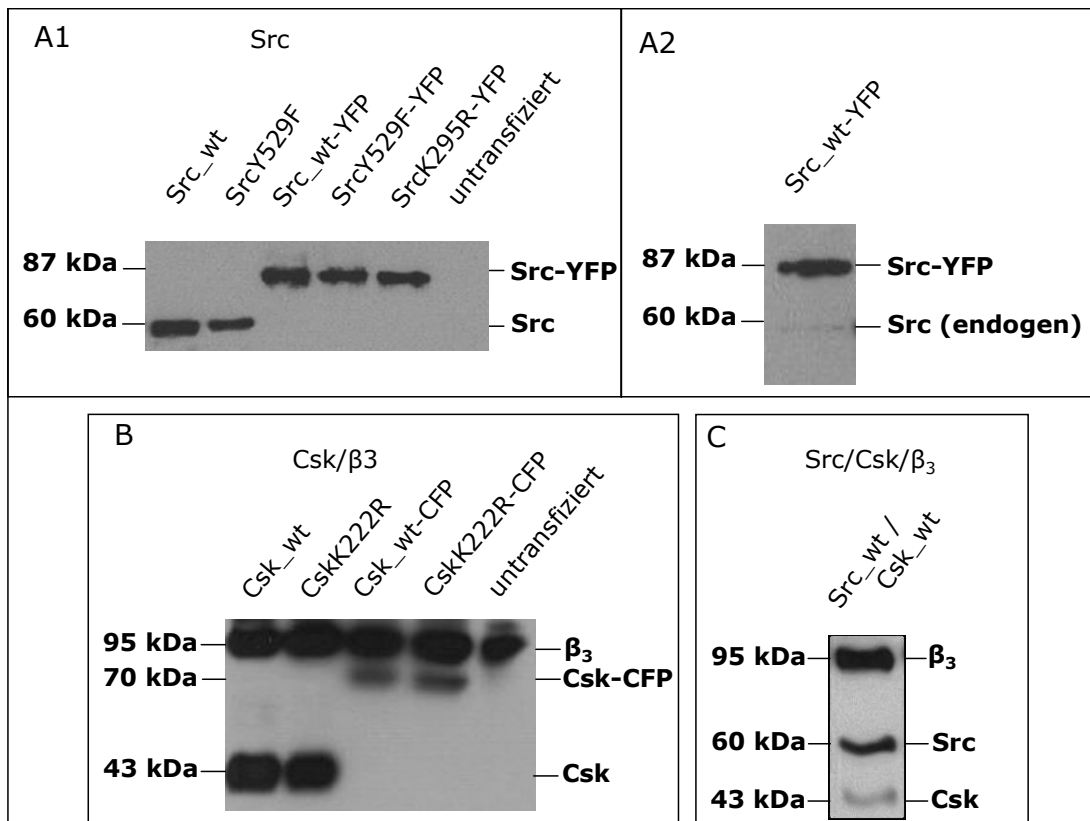


Abb. 13. Expressionsanalyse.

A5-CHO Zellen wurden mit den einzelnen Src-Konstrukten transfiziert und nach 2 Tagen mittels Western Blot analysiert. A) Unmarkierte Src Proteine wandern einheitlich bei 60 kDa, YFP-markierte bei 87 kDa (A1). Src wird endogen nur in sehr geringen Mengen gebildet (A2). (B) Csk-Proteine wandern bei 43 kDa, CFP-markierte Proteine bei 70 kDa (kein endogenes Csk). Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (nachgewiesen über β_3 : 95 kDa) ist stark überexprimiert (B und C). Nach Co-Transfektion bilden die Zellen sowohl Src als auch Csk (simultaner Nachweis, C).

Bei einer weiteren Klonierung wurde ein p-Cerulean/PTP1B- aus dem p-Cerulean/Csk-Konstrukt erfolgreich hergestellt (Abb. 12C; PTP-1B ist der Gegenspieler von Csk in Thrombozyten und dephosphoryliert Src-Tyr529). Im Western Blot wurde eine korrekte Bande bei 50 kDa detektiert (nicht gezeigt). Nach Einzeltransfektion in A5-CHO Zellen lokalisiert das Fusionsprotein Cerulean-PTP1B im endoplasmatischen Reticulum (E.R., Abb. 14A, vgl. zu 14B). In einer anderen Arbeit wurde dieselbe Lokalisation für PTP-1B-GFP gezeigt (Hernández et al., 2006).

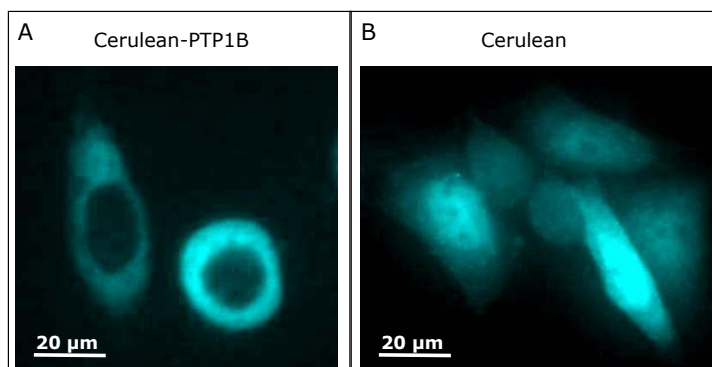


Abb. 14. Subzelluläre Lokalisation von Cerulean-PTP1B.

A5-CHO-Zellen wurden mit p-Cerulean/PTP1B transfiziert und nach 2 Tagen mit Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie (63x) analysiert. Das Cerulean-PTP1B Fusionsprotein lokalisiert nicht, wie Cerulean im Zytoplasma (B), sondern im kernnahen E.R. (A).

P-Cerulean/PTP1B fand im Rahmen dieser Arbeit, welche sich ausschließlich auf die Src-Csk Interaktion konzentriert, jedoch keine weitere Verwendung.

UNTERSUCHUNG DER SRC-/CSK-FUSIONSPROTEINE

Abbildung 13C zeigt, dass nach Co-Transfektion Src-YFP und Csk-CFP ungefähr gleich stark gebildet werden (identisches Ergebnis für Src/Csk, nicht gezeigt). Dass das in A5-CHO stark überexprimierte Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ von der transienten Überexpression von Src und Csk unbeeinflusst bleibt, zeigt Abbildung 13B und C.

Da für diese FRET-Untersuchungen ein Überexpressionsansatz gewählt wurde, stellte sich als nächstes die Frage, welche Src-YFP/Csk-CFP Konzentration in den relevanten FRET-positiven Zellen vorliegt und ob diese physiologisch ist. Die tatsächliche Relevanz der FRET-Ergebnisse (verglichen mit humanen Thrombozyten) muss also bestätigt werden. Dies geschah durch einen Protein-Konzentrationsvergleich.

In A5-CHO Zellen, welche eindeutig FRET zeigen (Abb. 18A), wurden die Src-YFP und Csk-CFP Konzentrationen über die Intensität ihrer Fluoreszenzemission unter genau bekannten Anregungs- und Mikroskopie-Bedingungen ermittelt (Abb. 15). In Einzelmolekülstudien mit gereinigten Fluoreszenzproteinen (Harms et al., 2001; Steinmeyer et al., 2005), durchgeführt am identischen Weitfeld-System wie die FRET Messungen, wurden Fluoreszenzintensitäten einzelner Venus (YFP)- bzw. Cerulean (CFP)-Proteine bei variablen Anregungsstärken und -zeiten ermittelt.

Durch die bekannten Anregungs-Intensitäten und -Zeiten wurde auf diese Weise aus den gemessenen Intensitäten auf die Anzahl der fluoreszierenden Proteine rückgeschlossen. Bei YFP-Anregung mit 514 nm wird Fluoreszenz aus einem Fokusbereich (Fokustiefe, „depth of focus“) von $\sim 0,4 \mu\text{m}$ detektiert (numerische Apertur: 1,4; Refraktionsindex (Öl): 1,515).

Es ergibt sich so (in der Adhäsionsebene) ein durchschnittlicher Wert von 1050 Molekülen Src-YFP pro Femtoliter (fl), was einer Konzentration von $2 \mu\text{M}$ entspricht (Csk-CFP: $4 \mu\text{M}$).

Verglichen mit Thrombozyten (Src-Konzentration von $\sim 26 \mu\text{M}$, Abb. 15) ist Src somit unterrepräsentiert. Die Src-Konzentration in Plättchen ist jedoch, verglichen mit anderen Zellen, aussergewöhnlich hoch (Brown & Cooper, 1996; Thomas & Brugge, 1997). Daher kann man von einem in etwa physiologischen Expressionslevel der interagierenden Fusionsproteine Src-YFP und Csk-CFP in

unserem Zellmodell A5-CHO (und damit von starker Aussagekraft der Ergebnisse für Thrombozyten) ausgehen.

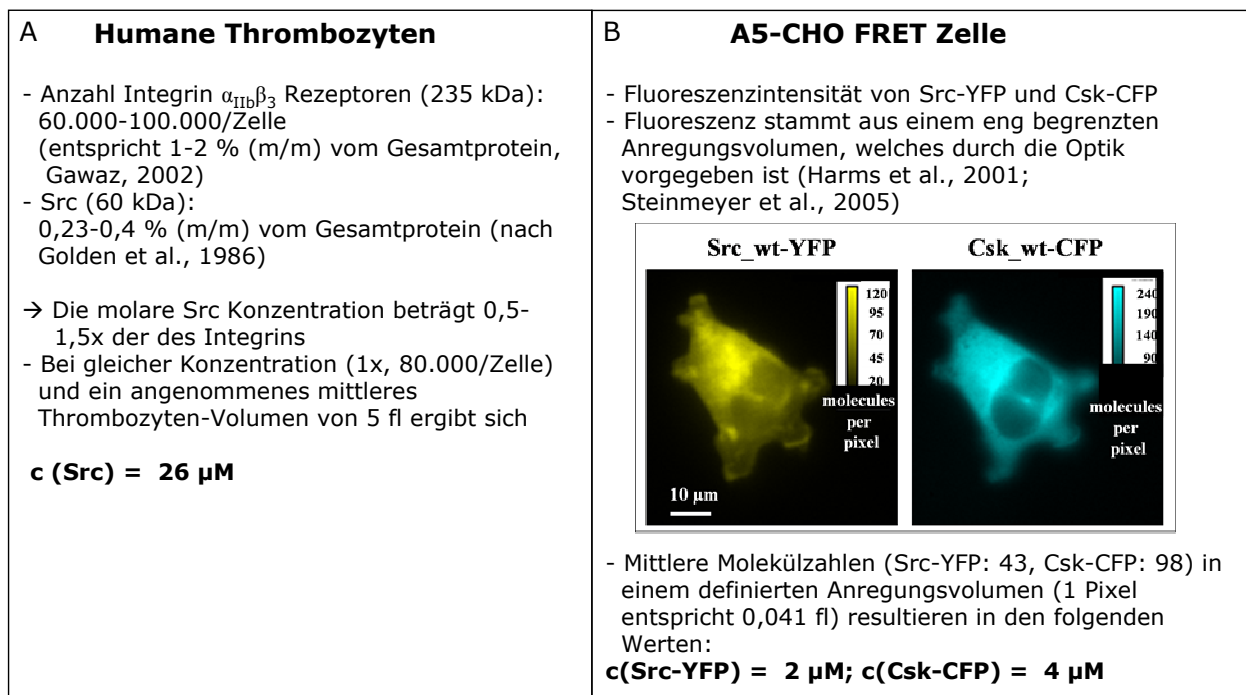


Abb. 15. Vergleich der Protein-Levels in Thrombozyten und Zellen mit FRET.

A) In humanen Blutplättchen ergibt sich (aus für Src und Integrin bekannten prozentualen Werten am Gesamtprotein und aus der Anzahl an Integrin-Rezeptoren) eine Src-Konzentration von 26 μ M.

B) Src-YFP und Csk-CFP Konzentrationen in FRET-positiven A5-CHO Zellen: Protein-Konzentrationen wurden über die Intensität der Fluoreszenzemission unter definierten Anregungsbedingungen ermittelt. Die Schätzung ergibt für Src-YFP 2 μ M, für Csk-CFP 4 μ M. Somit befinden sich die Proteinmengen der FRET-Interaktionspartner trotz Überexpressionsansatz in relevanten A5-CHO Einzelzellen im physiologischen Bereich.

Da die Integrin-abhängigen Signalprozesse nahe der Membran ablaufen, wurden als nächstes die Proteinlokalisierung auf der Adhäsionsebene (Ebene der Lamellipodien) mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht (Abb. 16). Im E.R. gebildetes Src-YFP fand sich in erster Linie punktförmig in der basalen Membran und an den Zellrändern („leading edges“) der Lamellipodien (Abb. 16A). Auch Csk-CFP war an den Zellrändern akkumuliert (Abb. 16B). Das Überlagerungsbild („overlay“, Abb. 16C) zeigt die partielle Co-Lokalisation (in gelb).

Um noch genauere Aufschlüsse über Proteinlokalisationen zu bekommen, wurden darüber hinaus noch TIRF (**T**otal **I**nternal **R**eflection **F**luorescence)-Mikroskopie-Aufnahmen durchgeführt (Abb. 16D-E). Mit TIRF wird selektiv ein Bereich von weniger als 150 nm oberhalb der Glasoberfläche des Mikroskopie-Deckglases angeregt, was erlaubt, ausschließlich Proteine in dieser Raumbene zu analysieren. Während mit YFP-Anregung keine neuen Ergebnisse gefunden wurden (Abb. 16D)

offenbaren sich bei CFP-Anregung erstaunliche Details: Das Protein akkumuliert sehr deutlich nahe der Zellränder (in Abständen zwischen 1-5 μm) (Abb. 16E).

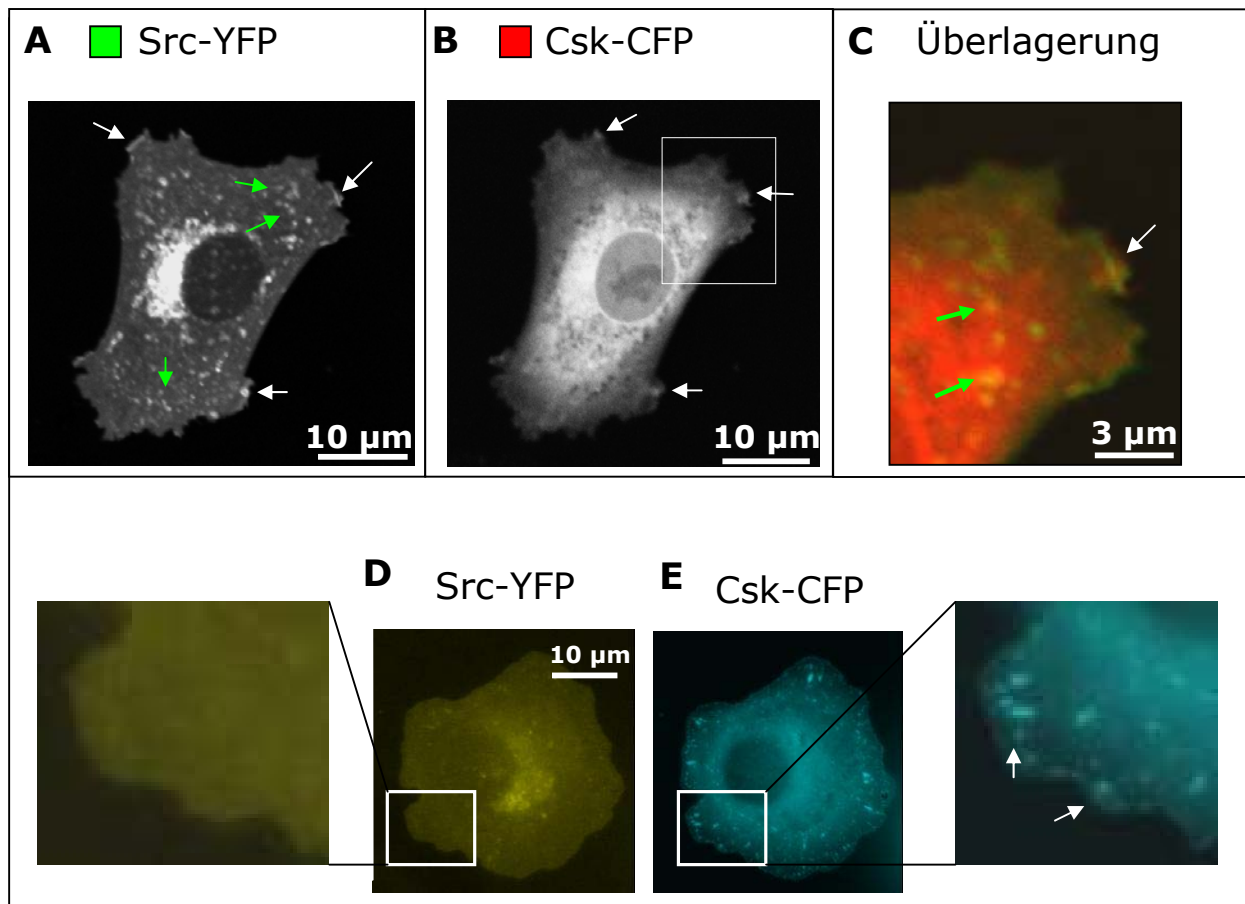


Abb. 16. Fluoreszenzlokalisierung in Src-YFP/Csk-CFP co-exprimierenden Zellen.

A5-CHO Zellen wurden 2 Tage nach Transfektion auf Fibrinogen gebracht und 30 min später (mit Fokus auf die Lamellipodien) analysiert. (A-C) Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (63x): (A) Src-YFP lokalisiert in basalen punktförmigen Strukturen (grüne Pfeile) und an den Zellrändern einiger Lamellipodien (weiße Pfeile), wo auch zytoplasmatisches Csk-CFP akkumuliert (B, weiße Pfeile). (C) Im Überlagerungsbild („overlay“) in der in B) weiß eingerahmten Box ist zudem partielle Co-Lokalisation in den Punktstrukturen erkennbar. (D-E) TIRF-Mikroskopie (100x): Von der Src-YFP Lokalisation (Bild D) sind keine weiteren Details erkennbar, jedoch zeigt Bild E deutlich, dass Csk-CFP in der Peripherie der Adhäsionsebene rings um die Zelle herum deutlich akkumuliert.

Es ist somit nachgewiesen, dass sich sowohl Src-YFP als auch Csk-CFP in Fibrinogen-adhärenenten Zellen in unmittelbarer Nähe zur basalen Membran befinden, wo auch Integrin $\alpha_{\text{Ib}}\beta_3$ an Fibrinogen bindet und der „outside-in“ Signalweg stattfindet.

Ob Src-YFP überhaupt an Integrin bindet wurde mit Co-IP untersucht. Dazu wurden Zellen, welche Src-YFP/Csk-CFP co-exprimieren, auf Fibrinogen ausgesät, nach 45 min lysiert und anschließend eine Co-IP mit einem anti- β_3 -AK durchgeführt. Sowohl Src-YFP als auch Csk-CFP co-immunpräzipitieren mit dem Integrinrezeptor (Abb. 17A), ein Resultat, das in derselben Weise auch mit unmarkierten Src/Csk

gefunden wurde (Abb. 17B). IPs mit Primär-AKs gegen GFP (polyklonal, aus Kaninchen, #ab6556; Abcam) und Src (Klon H-12, monoklonal, aus Maus, #sc-5266, Santa Cruz) führten zu denselben Ergebnissen, zeigten jedoch im Western Blot eine geringere Spezifität.

Dieses Ergebnis zeigt, dass in fibrinogenstimulierten Zellen Src-YFP direkt an Integrin $\alpha_{Ib}\beta_3$ bindet und Csk-CFP ebenfalls in diesen Komplex eingebunden ist. Vergleichbare Ergebnisse mit unmarkierten Proteinen wurden publiziert (Arias-Salgado et al., 2003; Oberfell et al., 2002).

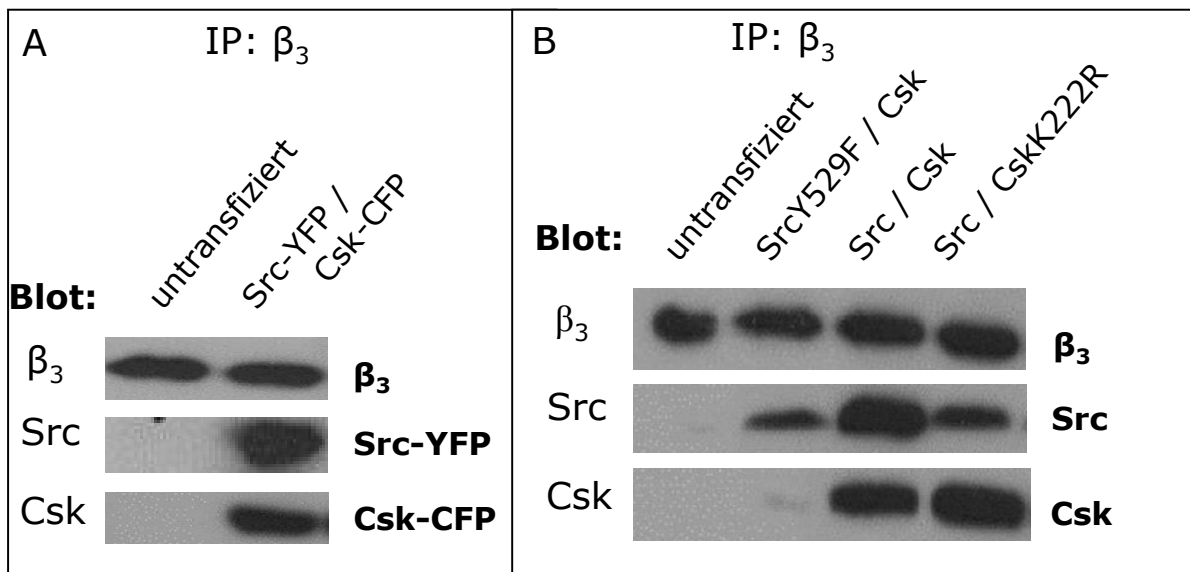


Abb. 17. Nachweis der Integrin-Src-Csk Komplexbildung durch Co-IP-Analyse.

Transfizierte Zellen wurden 2 Tage nach Transfektion für 45 min auf Fibrinogen aufgebracht und lysiert. Anschließend wurden Co-IPs mit einem Antikörper gegen β_3 durchgeführt. (A) Src-YFP/Csk-CFP exprimierende Zellen: beide Fusionsproteine werden spezifisch mit β_3 co-immunpräzipitiert, sind also in Fibrinogen-adhärenenten Zellen assoziiert mit dem Integrin. (B) Zellen mit Expression von unmarkiertem Src/Csk: In Zellen, welche Src/Csk bzw. Src/CskK222R bilden, assoziieren beide Signalproteine mit β_3 . In Zellen, welche SrcY529F/Csk bilden, wurde nur Src immunpräzipitiert.

SRC-CSK INTERAKTION IN DEN LAMELLIPODIEN

Ort und Dynamik der Src-Csk-Interaktion kann durch eine FRET-Analyse beantwortet werden. Für die FRET-Messung (an einem Weitfeld-Lasermikroskopie-System) wurden adhärenente Src-YFP/Csk-CFP co-exprimierende Zellen ausgewählt (Messung in der Lamellipodien-Ebene). In der anschließenden FRET-Berechnung zeigte sich, dass nur in Zellen mit einem mittleren Expressionslevel von Src-YFP und Csk-CFP im Verhältnis von $\sim 1:1$ ein positives FRET Signal zu sehen ist.

Eine typische FRET-Effizienz-Aufnahme ($E_{\text{FRET}} = 15\text{-}30\%$) einer adhärennten Zelle ist in Abb. 18A zu sehen. Das Falschfarbenbild zeigt, dass FRET vor allem an den Zellrändern auftritt und dort ein wesentlich höherer E_{FRET} -Wert als weiter innerhalb der Adhäsionsebene gemessen wird. Dies legt nahe, dass die Src-Csk Interaktion möglicherweise eng mit der Zellausbreitung verbunden ist.

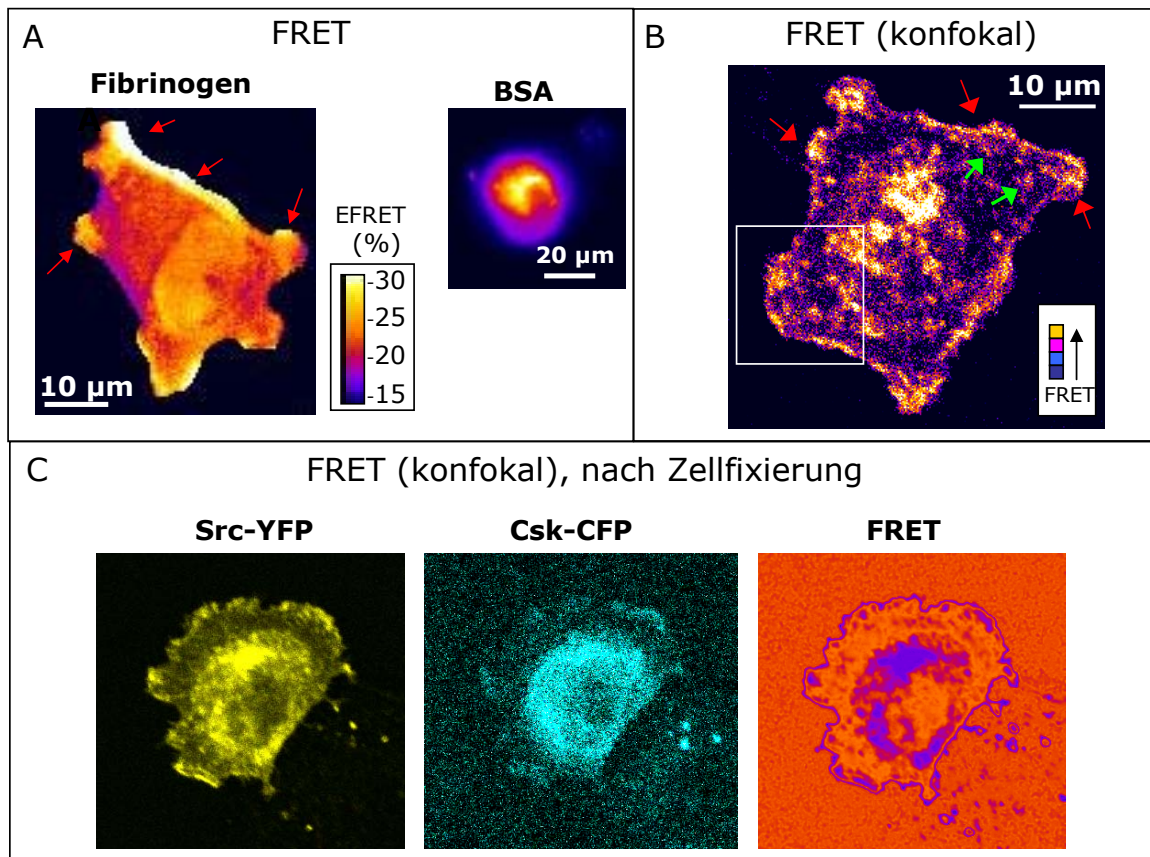


Abb. 18. Lokalisation der Src-YFP – Csk-CFP Proteininteraktionen durch FRET-Mikroskopie. Die Zellen wurden 2 Tage nach Transfektion auf Fibrinogen gebracht und nach 30 min analysiert. (A) Weitfeld-FRET-Mikroskopie (63x): Die FRET-Effizienz (E_{FRET})-Werte (15-30 %) sind nicht gleichmäßig verteilt, sondern finden sich vor allem in wachsenden Zellrändern der Lamellipodien (A1, rote Pfeile). FRET ist Fibrinogen-spezifisch und in unstimulierten Zellen (nicht adhärennt auf BSA, A2) wesentlich niedriger. (B) Konfokale FRET-Mikroskopie (63x): FRET akkumuliert teilweise entlang der Zellränder (rote Pfeile), ist aber auch in punktförmigen Strukturen weiter Zell-einwärts (grüne Pfeile) zu finden. (C) Auch nach Zellfixierung (4 % para-Formaldehyd) ist die Src-YFP/Csk-CFP-Lokalisation sowie die FRET-Verteilung noch eindeutig erkennbar (rechts, konfokale Mikroskopie, 63x).

Um die Anwesenheit von FRET zu bestätigen, wurde ein unabhängiges klassisches „Acceptor Photobleaching“ Kontrollexperiment durchgeführt. Dazu wird nach einer abgeschlossenen FRET-Bilderserie das YFP (FRET-Akzeptor) komplett ausgebleicht. In der darauffolgenden FRET-Messung zeigte sich dann ein ca. 10 %-iger Anstieg der Intensität von CFP, ein eindeutiger Nachweis, dass FRET ursprünglich tatsächlich vorhanden war.

DYNAMISCHER ABLAUF DER SRC-CSK-INTERAKTION

FRET kann auch konfokalmikroskopisch gemessen werden (sensitized emission FRET, s. „Materialien und Methoden“). In den resultierenden Bildern (Abb. 18B) ist der hohe unspezifische Fluoreszenz-Hintergrund herausgerechnet, wodurch die FRET-Signale wesentlich feiner aufgelöst werden. Es ist besonders deutlich zu sehen, dass Src-YFP und Csk-CFP an den Zellrändern der Lamellipodien interagieren (18B, weiße Box und rote Pfeile). Darüberhinaus zeigt sich, dass FRET Signale nicht nur an den Zellrändern, sondern auch in punktförmigen Strukturen weiter innerhalb der Adhäsionsebene lokalisiert sind (Abb. 18B, grüne Pfeile). Vergleichbare Ergebnisse wurden auch nach Fixierung der Zellen mit para-Formaldehyd (Abb. 18C) erzielt.

Dass es sich dabei um Fokalkomplexe handelt, zeigen Co-Immunfärbungen, in denen Src-YFP und Csk-CFP mit dem Fokalkontaktmarker Vinculin co-lokalisieren (Abb. 19).

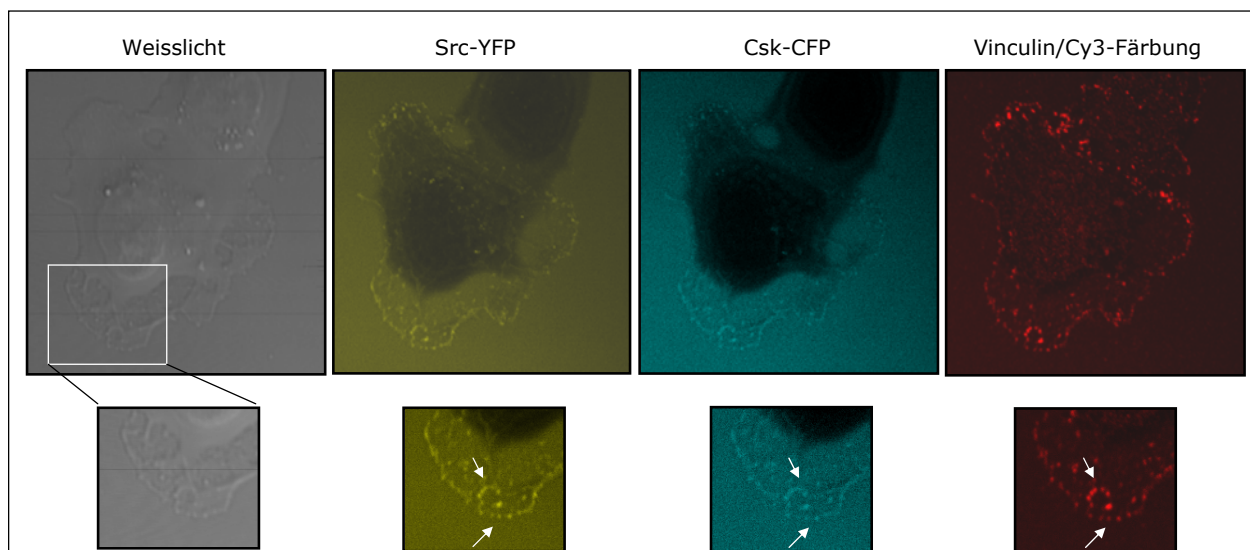


Abb. 19. Nachweis der Lokalisation von Src-YFP/Csk-CFP in den Fokalkontakten.

Src-YFP/Csk-CFP co-exprimierende Zellen wurden nach 40 min Adhäsion mit para-Formaldehyd (4 %) fixiert, permeabilisiert und mit einem Vinculin-spezifischen AK/Cy3-markierten Sekundär-AK gefärbt. Im Bereich des ausgewählten Lamellipodiums (links, weiße Box) wird deutlich, dass Src-YFP, Csk-CFP und Vinculin (Marker für Fokaladhäsionspunkte) in den Fokalkontakten co-lokalisieren. Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (63x).

Welche Bedeutung die FRET-Akkumulation an den Zellrändern hat wird anhand einer anderen Zelle mit starkem FRET Signal deutlich (Abb. 20A). In der Bilderserie (alle 50 s) ist eine starke, sehr schnelle Formveränderung eines großen Lamellipodiums zu sehen. Nach aussen zeigende blaue Pfeile markieren lokale Regionen des Wachstums („protrusion“), nach innen gerichtete rote Pfeile zeigen Bereiche des Rückzugs („retraction“). Es ist deutlich eine starke Korrelation

zwischen FRET an den Zellrändern und „retraction“ sowie zwischen FRET-Abwesenheit und „protrusion“ zu erkennen. Während Src-Csk Interaktion an den Zellrändern das Wachstum offenbar verhindert (oder den Lamellipodien-Rückzug bewirkt) erlaubt die Abwesenheit von Src-Csk-Komplexen (zum Beispiel durch Abtransport nach innen und Verlagerung in die Fokalfunkte) die Lamellipodienexpansion („protrusion“).

Zeitliche Veränderungen der FRET-Lokalisation wurden in „time-lapse“-Aufnahmen (alle 5 s) am Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop untersucht (Abb. 20B). In den Aufnahmen ist eine Art Welle zu sehen, die sich vom Zellrand aus nach innen bewegt, während die Spitze des Lamellipodiums nach vorne wächst. Dies wird besonders in den Weißlicht-Bildern deutlich, die die zeitliche Wanderung von Src-YFP zeigen. Wie aus Abb. 21 hervorgeht bewegt sich diese Welle mit einer Geschwindigkeit von ~ 90 nm/s fort und deutet auf einen aktiven Transport hin.

Räumlich besser aufgelöst sind die Bilder vom konfokalen Setup in Abb. 20C (alle 25 s). Zunächst akkumulieren FRET-Signale entlang des Zellrands eines Lamellipodiums (rote Pfeile, 0 s). Kurze Zeit später (25-50 s) wandern die FRET-Komplexe nach innen (weiße Pfeile), während das Lamellipodium nach vorne wächst (blaue Pfeile). Schließlich fragmentieren die zusammenhängenden FRET-Signale (weiße Pfeile, 75 s) und lagern sich um zu punktförmigen Strukturen (grüne Pfeile, 100 s). Zu diesem Zeitpunkt (ca. 2 min) beginnt der Prozess von Neuem mit der FRET-Signal-Akkumulation an den Zellrändern (rote Pfeile).

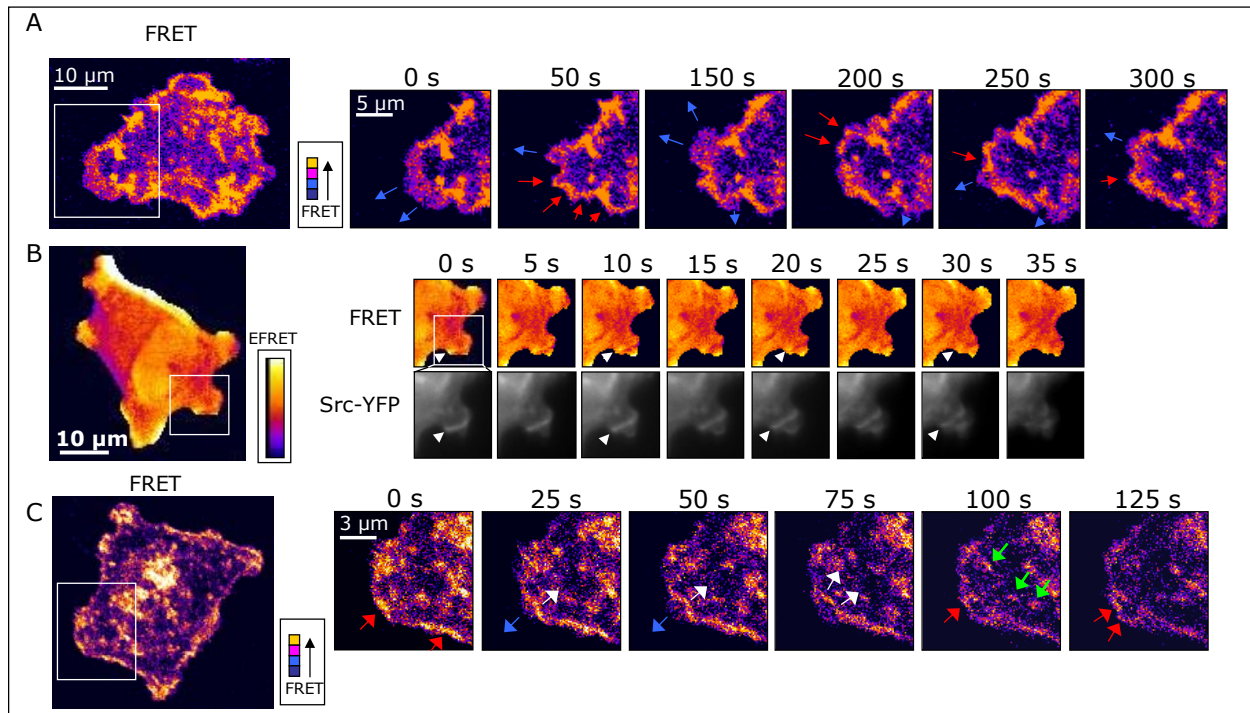


Abb. 20. Visualisierung der Zeitabhängigkeit von FRET.

Mit Src-YFP/Csk-CFP co-transfizierte Zellen (2 Tage nach Transfektion) wurden nach 30 min auf Fibrinogen mit „time-lapse“-FRET-Mikroskopie untersucht (A und C: konfokal; B: Weitfeld, je 63x). (A) zeigt eine Zelle mit starken FRET Signalen in einem sehr aktiven Lamellipodium. In den Wachstumsregionen (blaue Pfeile) ist das FRET Signal fast verschwunden, während es dort stark akkumuliert, wo sich das Lamellipodium zurückzieht. (B) Zelle von Abb. 18A1: Im markierten Lamellipodium wandert eine FRET-„Welle“ schnell in der Adhäsionsebene von der Peripherie nach innen (weiße Pfeile, vgl. zur Src-YFP Sequenz). (C) Mobilität der FRET-Komplexe im Detail: Nach initialem Auftreten am Lamellipodienrand bewegt sich das FRET-Signal charakteristisch nach innen zu Fokaladhäsionspunkten. Abläufe wiederholen sich in regelmäßigen Abständen von ~2 min.

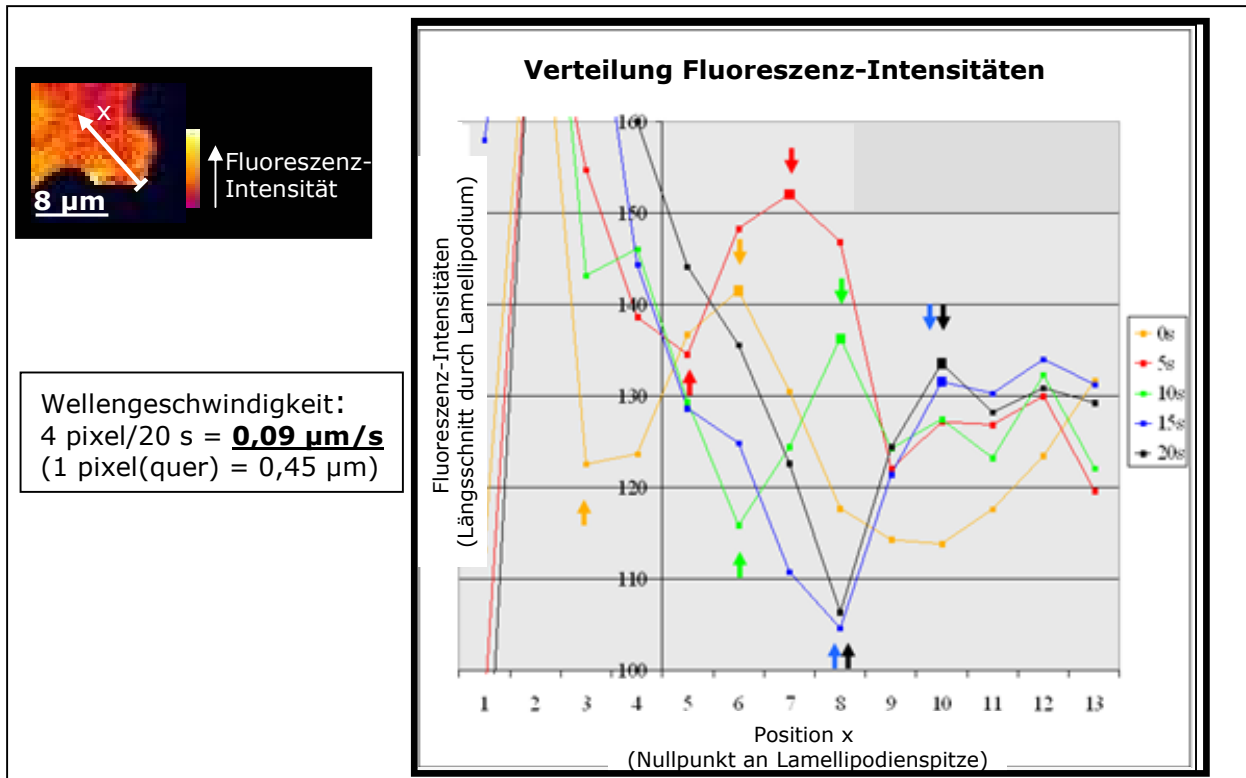


Abb. 21. Bestimmung der Geschwindigkeit der FRET-Wanderung.

Ermittlung der Fortpflanzungs-Geschwindigkeit des FRET-Signals in Abb. 20B: Die Bewegung wurde entlang einer Achse längs durch das betreffende Lamellipodium analysiert (Nullpunkt: Lamellipodienspitze), was auf Pixelebene einer Diagonalebewegung des Signals nach links oben entspricht. Im gewählten optischen Aufbau entspricht eine Pixeldiagonale auf Zellebene einer Distanz von $0,45 \mu\text{m}$ (links). Binnen 20 s (Bilderfolge: 5 s) schreitet die „FRET-Welle“ 4 Pixeldiagonalen voran, was einer realen Geschwindigkeit von $\sim 90 \text{ nm/s}$ entspricht. Rechts: Zeitabhängige Pixelintensitäten entlang der x-Achse: Die Intensitäts-Minima und -Maxima markieren eine in der Zelle nach innen wandernde „Signalwelle“.

Den dynamischen Relokalisationen liegen Reorganisationen des Aktin-Zytoskeletts zugrunde, welches mit dem Integrin verknüpft ist.

Ob die FRET-Signale membrangebunden sind (z.B. über das Integrin) oder sich im Zytoplasma befinden wurde durch fraktionierte Auftrennung (Ultrazentrifugation) der Src-YFP/Csk-CFP co-exprimierenden Zellen nach 45 min auf Fibrinogen in Zytosol und Membran untersucht. Die Resultate waren nicht eindeutig und zeigten, dass Src-YFP nicht exklusiv membrangebunden vorlag, sondern auch im Zytoplasma zu finden war. Wahrscheinlich sind die Ergebnisse auf Zellen in der heterogenen Population zurückzuführen, die nur einzeltransfiziert sind und Src-YFP stark im Zytosol überexprimieren.

SRC-YFP PHOSPHORYLIERUNG DURCH CSK-CFP

Die bisherigen Beobachtungen mit Src-YFP und Csk-CFP sprechen dafür, dass die Markierung die Proteinfunktion nicht merklich beeinflusst. Direkt messbar ist ein solcher Effekt aber letztlich nur über einen biochemischen Assay. Ob Src-YFP effektiv Fibrinogen-abhängig aktiviert werden kann wurde in einem ersten Assay über die Messung der Src-vermittelten Phosphorylierung von Syk, einem der ersten Substrate von aktivierter Src-Kinase, mittels anti-Syk und anti-Phosphotyrosin-AKs getestet. Es konnte jedoch keine eindeutige und reproduzierbare Änderung der Syk-Phosphorylierung gemessen werden, weswegen dieser experimentelle Ansatz aufgegeben wurde.

In der Folge wurde ein direkterer Ansatz, die Untersuchung der Src-Tyr529-Phosphorylierung, gewählt. Da die FRET-Analyse zwar Interaktionen zwischen Src-YFP und Csk-CFP visualisieren, jedoch nicht klären konnte, ob es in den Zellen auch tatsächlich zur Src-Inaktivierung (Phosphorylierung von Src-Tyr529) kommt, zeigt die zeitabhängige Phosphorylierung von Src-pTyr529 gleichzeitig, ob Src-YFP von Csk-CFP inaktiviert werden kann.

Es wurden Zellen, welche Src und Csk co-exprimieren auf Fibrinogen plattiert und nach definierten Zeitpunkten (20, 30, 45 min) lysiert. Parallel wurden Zellen unmittelbar nach der Präinkubationsphase (0 min, Referenz 1) und nach 45 min auf BSA lysiert (keine Stimulation, Referenz 2). In Western Blots wurde jeweils die absolute Src-Menge (Gesamt-Src) und die Menge an Src-pTyr529 („inaktiv“) und Src-pTyr418 („aktiv“) detektiert und mittels kalibrierter Densitometrie quantifiziert (Abb. 22).

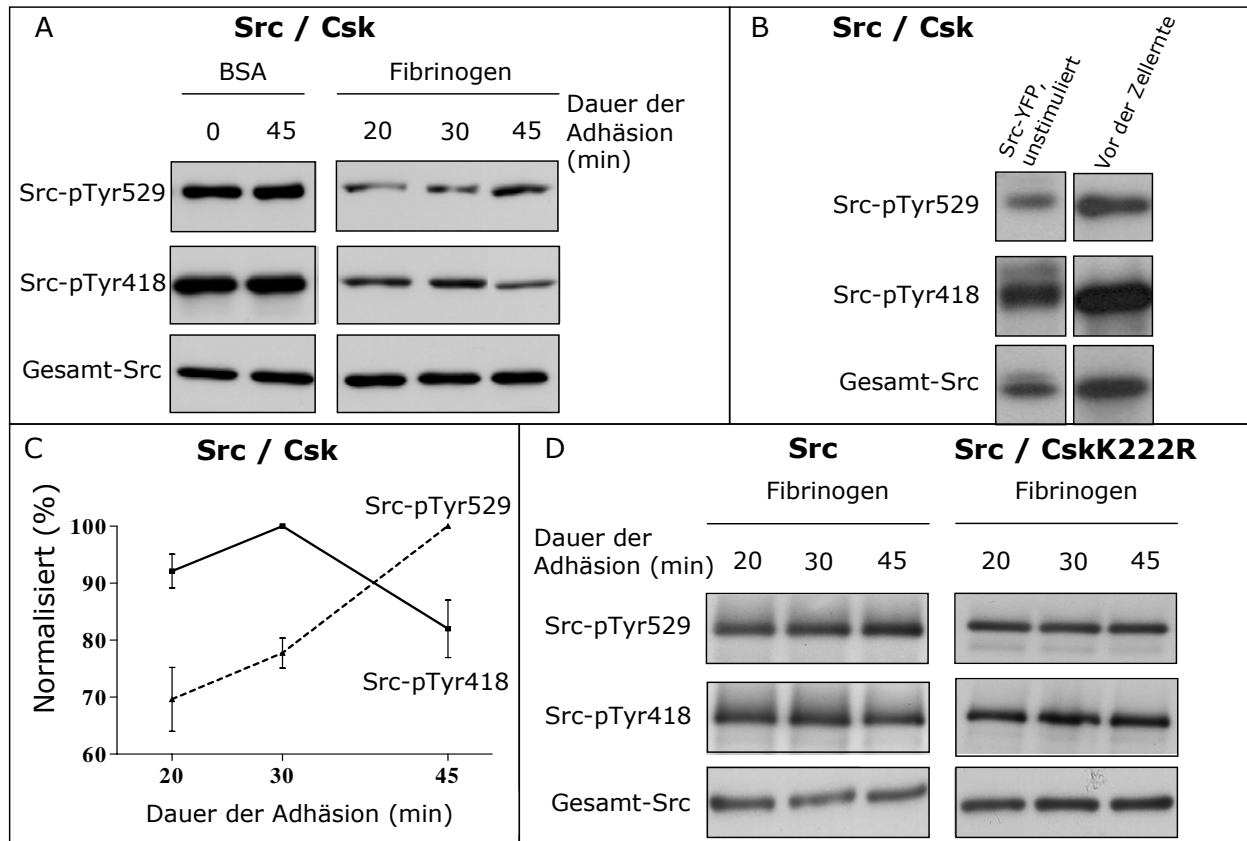


Abb. 22. Biochemischer Nachweis der Src-Phosphorylierung durch Csk.

A5-CHO Zellen wurden 2 Tage nach Transfektion auf Fibrinogen gebracht und zu unterschiedlichen Zeiten lysiert. Die Fibrinogen-abhängige Src-Phosphorylierung wurde in den Lysaten mit phosphospezifischen Antikörpern gegen Src-pTyr529 und Src-pTyr418 sowie Gesamt-Src in Western Blots nachgewiesen und mittels Densitometrie quantifiziert. (A-C) Expression von Src/Csk: Zwischen 20 und 45 min kommt es zu ansteigender Src-Tyr529 Phosphorylierung (A, C). Die Src-Präaktivierung ist ein Artefakt des experimentellen Ansatzes und tritt auch in Src einzeltransfizierten Zellen auf (B). In Kontrollzellen (D) ohne bzw. mit Kinase-inaktivem Csk kommt es zu keinem Anstieg von Src-pTyr529, die Tyr529-Phosphorylierung ist also Csk-spezifisch.

Während sich die Src-Phosphorylierung in der Referenz nicht ändert sieht man einen spezifischen Anstieg an Src-pTyr529 sowie einen parallelen Abfall bei Src-pTyr418 (Abb. 22A und C). Vergleichbare Resultate wurden erzielt mit Zellen, die die markierten Varianten Src-YFP/Csk-CFP co-exprimierten.

Die hohe Präaktivierung (Src-pTyr418) in den Referenz-Zellen stammt wahrscheinlich von solchen Zellen der Population, die nur das Src Konstrukt exprimierten (ohne negativ regulierendes Csk), da dasselbe Phänomen auch bei nur mit Src transfizierten Zellen auftrat (Abb. 22B).

In Kontrollexperimenten (Abb. 22D) wurden Zellen, welche nur Src bzw. Src und CskK222R (Kinase-inaktiv) exprimieren, verwendet. In keiner der beiden Zellen war ein Anstieg der Src-Tyr529 Phosphorylierung nachweisbar. Dies zeigt, dass keine endogene Src-Tyr529 Kinaseaktivität in den Zellen vorhanden ist und tatsächlich

nur die Csk-Kinasefunktion (welche in CskK222R ausgeschaltet ist) für den spezifischen Anstieg der Src-Tyr529 Phosphorylierung in den Wildtyp-Zellen verantwortlich ist. Allerdings war auch kein messbarer Anstieg der Src-Tyr418 Phosphorylierung zu sehen, was sich aber dadurch erklären lässt, dass die Src-Aktivierung an die negative Kontrolle durch Csk gekoppelt ist. Eine genauere Analyse dieser Zusammenhänge ist mit dem gewählten experimentellen Ansatz aber leider nicht möglich.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass es während der Adhäsion an Fibrinogen in den Zellen zur Phosphorylierung von Src-Tyr529 durch Csk kommt. Es ist also wahrscheinlich, dass es an den mit FRET nachgewiesenen Orten der Src-Csk Interaktion auch tatsächlich zur spezifischen Src Inaktivierung durch Csk kommt.

BEDEUTUNG VON SRC-TYR529 FÜR DIE ZELLADHÄSION

Um weitere Einblicke in die Prozesse der Src-Inaktivierung durch Csk während Fibrinogen-Adhäsion zu erhalten wurden mutierte Src und Csk Konstrukte eingesetzt. Es wurden Zellen verwendet, die SrcY529F-YFP (konstitutiv aktiv) zusammen mit Csk-CFP co-exprimieren (keine Inaktivierung durch Csk). Diese Zellen zeigen nach der Transfektion sehr starke Proliferation in Kultur und tendieren zur Ablösung vom Boden der Kulturschale. Auf Fibrinogen adhärieren sie nicht oder nur sehr schwach unter Bildung einer kleinen Adhäsionsfläche (Abb. 23A-G), in der sich vorzugsweise SrcY529F-YFP in großen unförmigen Strukturen ansammelt (Abb. 23A, vgl. zu B und C). Die Zellen bilden außerdem blasenartige Auswüchse (Abb. 23D und E; engl.: „membrane blebs“), die, wie Abbildung 23E zeigt, von konstitutiv aktivem SrcY529F-YFP verursacht werden und sich auch in der Abwesenheit von Csk-CFP bilden (Src-YFP allein verursacht keine „membrane blebs“, Abb. 23F). Konfokale FRET-Aufnahmen dieser Zellen zeigen, dass kaum Protein-Interaktionen zwischen SrcY529F-YFP und Csk-CFP auftreten, insbesondere nicht in der Membran (Abb. 23D, wie in Zellen mit Src-YFP/Csk-CFP, vgl. zu Abb. 8B). In einer FRET-Bilderserie (Abb. 23G) wird deutlich, dass sich die „membrane blebs“ sehr schnell bilden und wieder verschwinden und an allen Stellen der Zelloberfläche entstehen können.

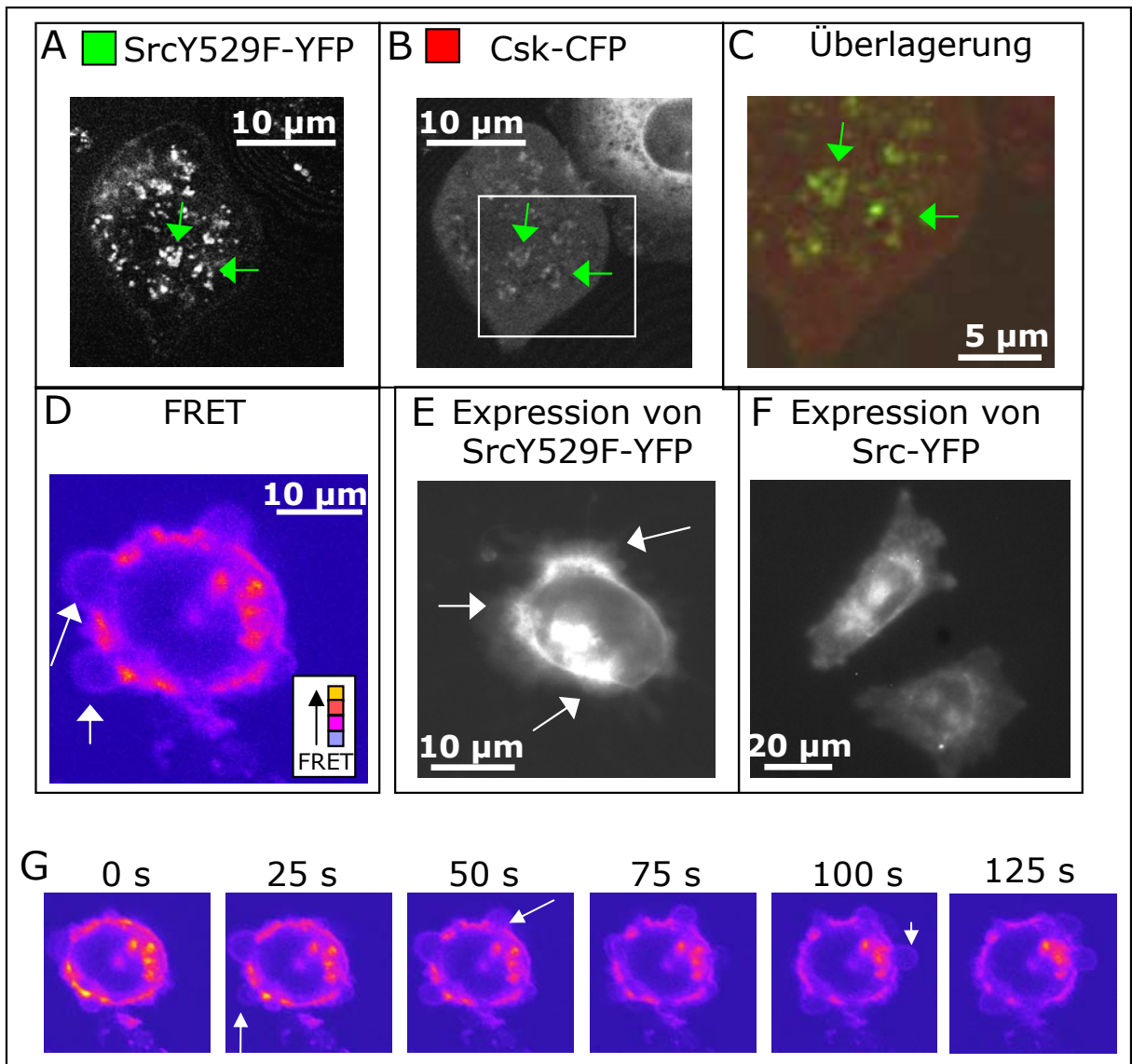


Abb. 23. Effekt der Expression von SrcY529F-YFP/Csk-CFP.

Die Zellen wurden 2 Tage nach Transfektion auf Fibrinogen gebracht (A-D und G: konfokale, E und F: Weitfeld-Mikroskopie; je 63x). Die Zellen adhärieren nur leicht auf Fibrinogen ohne Lamellipodien-Bildung. SrcY529F-YFP clustert stark in Punkten innerhalb der Adhäsionsfläche. Die Zellen bilden Membranblasen (D), deren Bildung auf konstitutive Src-Aktivierung und nicht etwa auf Csk-Expression zurückzuführen ist (Blasenbildung in E, nicht aber in F). Die Blasen wachsen sehr schnell und unkontrolliert in wechselnden Zell-Regionen (G, weiße Pfeile). FRET-Werte in der Zellmembran sind sehr gering (D und G).

Eine anti- β_3 Co-IP (Abb. 7B) bestätigt den FRET-Befund dahingehend, dass zwar SrcY529F-YFP, nicht aber Csk-CFP mit β_3 co-immunpräzipitiert. Csk-CFP bindet demnach in Abwesenheit von Tyrosin 529 nicht mehr an Src.

CSK-KINASE: BEDEUTUNG FÜR DIE LAMELLIPODIENFUNKTION

In einem weiteren Kontrollexperiment wurden Zellen verwendet, die Src-YFP und CskK222R-CFP (Kinase-inaktiv) co-exprimieren und in denen einmal aktiviertes Src nicht mehr effektiv durch Csk inaktiviert werden kann. Nach der Transfektion verhalten sich die Zellen wie Wildtyp-Zellen (Expression von Src-YFP/Csk-CFP). Nach Ausplattieren auf Fibrinogen adhärieren sie und breiten sich effektiv aus, bei genauerem Hinsehen erkennt man allerdings (Abb. 24A bis D), dass sie keine normal strukturierten, sondern nur noch flächige Lamellipodien mit spitz zulaufenden Rändern bilden (Abb. 24A und B). Src-YFP lokalisiert normal (Abb. 24A, vgl. zu Abb. 16A), während CskK222R fast ausschließlich in den Spitzen, kaum dagegen in den restlichen Bereichen der Lamellipodien vorhanden ist (Abb. 24B). Außerdem treten eine Vielzahl an Filopodien oder Mikrospikes auf (Abb. 24A und C, weiße Pfeile).

Konfokale FRET Aufnahmen machen deutlich, dass Src-YFP und CskK222R miteinander interagieren (Abb. 24D, dasselbe Ergebnis liefert die IP, Abb. 17B). Die FRET-Protein-Komplexe umgeben die Zelle wie einen Ring und wandern scheinbar nicht, wie bei Wildtyp-Zellen, weiter nach innen. Auch sind kaum FRET-Signale in den Fokalkontakten zu sehen. Dies wird bestätigt durch entsprechende FRET-Videsequenzen (nicht gezeigt), in denen die FRET-Signale räumlich statisch bleiben. Desweiteren charakteristisch ist eine stetige Zellausbreitung und das Auswachsen kleiner Membranbereiche, in denen keine FRET Signale auftreten. Die CskK222R-Mutation hat damit im Wesentlichen Auswirkungen auf die Bildung der Zellränder sowie auf Lamellipodien-Struktur und -Wachstum.

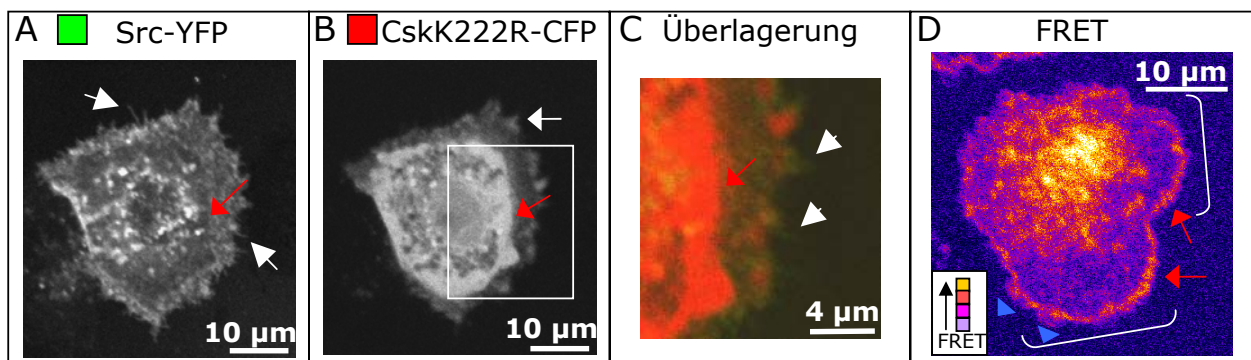


Abb. 24. Effekt der Expression von Src-YFP/CskK222R-CFP.

Die Zellen wurden wie in Abb. 23 erläutert behandelt und mit konfokaler Mikroskopie (63x) analysiert. Die Zellen adhärieren und breiten sich effektiv aus, zeigen aber Veränderungen in den Lamellipodien [„Mikrospikes“ (weiße Pfeile in A, spitze Ränder in B) und flächige Lamellipodien (weiße Klammern in D)]. CskK222R zeigt Misslokalisierung in den Lamellipodien (B, roter Pfeil). FRET-Signale sind messbar, zeigen jedoch eine abnorme Lokalisation und Dynamik.

DISKUSSION

Integrin „outside-in“ Signalwege beeinflussen eine Vielzahl zellulärer Reaktionen, unter anderem Zytoskelett-Umlagerungen (Reorganisationen), welche der Lamellipodien- und Fokalkontakte-Bildung und -Funktion zugrunde liegen. Als Schalterprotein reguliert die Tyrosinkinase Src Signale vom Integrin zum Zytoskelett (Felsenfeld et al., 1999). Die Rolle von Src im Plättchen-spezifischen Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ „outside-in“ Signalweg wurde in den letzten Jahren intensiv erforscht (Woodside et al., 2001; Oberfell et al., 2001 & 2002; Buensuceso et al., 2003; Arias-Salgado et al., 2003 & 2005).

Da die negative Regulierung von Src in Thrombozyten nur von Csk gesteuert wird, eignet sich das Studium der Plättchen-spezifischen Src-Inaktivierung ideal zur genaueren Analyse der Regulation der Integrin-abhängigen Zytoskelett-Reorganisation. In dieser Arbeit gelang es, ein FRET-System zu generieren, welches Src-Csk Interaktionen im Plättchen-spezifischen $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ Signalweg sichtbar macht.

Die wesentlichen Beobachtungen waren:

- (a) Src wird an den Zellrändern neu gebildeter Lamellipodien durch Csk inaktiviert.
- (b) Dabei gebildete Src-Csk-Komplexe finden sich nur während des Lamellipodien-Rückzuges, nicht während des Wachstums.
- (c) Durch Fortbewegung der Komplexe von den Zellrändern nach innen startet das Lamellipodien-Wachstum. Die Komplexe bewegen sich in der basalen Lamellipodienmembran zu Fokaladhäsionen, welche in der gesamten Adhäsionsebene lokalisieren.
- (d) Spezifische Src- und Csk-Mutationen verhindern diesen geordneten Ablauf und geben Einblicke in die Regulation von Zelladhäsion, Zellausbreitung und Src-Csk-Interaktion.

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse spiegeln die eigene Publikation im Journal of Biological Chemistry wieder (Vielreicher et al., 2007).

ANSÄTZE ZUR VISUALISIERUNG DER SRC-AKTIVIERUNG

In den letzten Jahren wurde durch Verbesserung der Techniken zur Visualisierung von Protein-Protein-Interaktionen in lebenden Zellen immer neue Erkenntnisse über zelluläre Signalprozesse gewonnen. Dabei wurden vielerlei Ansätze getestet wie die Entwicklung von Sensormolekülen, welche möglichst spezifisch stimulierbar sein müssen und deren Reaktion eindeutig messbar sein muss. Beispiele für solche FRET-sensitive Sensoren sind der Ca^{2+} -, der cAMP- und der cGMP- Sensor. Diese eignen sich für die Beobachtung von Konzentrations-Änderungen kleiner Signalmoleküle („second messengers“), da ihre Bindung hinreichend starke und durch FRET detektierbare Konformationsänderungen im Sensormolekül nach sich ziehen.

Es wurden aber auch Sensoren entwickelt, deren strukturelle Änderungen durch spezifische Phosphorylierung einer internen Ziel-Sequenz („target sequence“) ausgelöst wird. Ein Beispiel dafür ist der von Wang et al. (2005) entwickelte Src-Sensor, der es ermöglicht, spezifisch den durch Src-Kinase katalysierten Phosphorylierungs-Prozess sichtbar zu machen. In HUVEC-Zellen wurden durch Integrin-vermittelte Zytoskelett-Stimulation (Bindung Fibronectin beschichteter „microbeads“) Orte mit Src-Aktivität visualisiert. Die Src-Aktivierung ereignete sich zum einen proximal an der Stimulationsstelle, sie wurden aber auch - vermittelt durch das Aktin-Zytoskelett - auf distal gelegene Membran-Regionen übertragen, wo sie sich charakteristisch wellenförmig fortpflanzte. Die Ergebnisse sind im Wesentlichen: (a) Integrin-Clusterbildung führt direkt zur Src-Aktivierung (FRET-Signale an der Kontaktstelle des „microbead“), (b) Zellspannung (durch Kraftausübung auf das Zytoskelett) kann ebenfalls Src-Aktivierung stimulieren und (c) Src-Aktivierung kann sich entlang der Membran fortpflanzen, mglw. durch trans-Autoaktivierung benachbarter Moleküle. Aus der Wang-Studie kann jedoch keine Aussage über die Src-Inaktivierung abgeleitet werden.

Wie der Src-Regulator Csk aktiviert wird wurde von Matsuoka et al. (2004) untersucht. Die Autoren nutzten sowohl einen Einzelmolekül-FRET-Indikator, als auch einen Ansatz der FRET-Messung durch Protein-Protein-Interaktion, um die Csk-Cbp (**Csk-Binde**protein, Csk-Aktivator) Interaktion zu visualisieren. Durch Src-vermittelte Aktivierung von Cbp kommt es zur Rekrutierung und Aktivierung von Csk. Die Src-Inaktivierung erfolgt jedoch erst im darauffolgenden Schritt und wurde nicht gezeigt.

Trotz der großen Relevanz existierte bislang keine Methode, um die Src-Inaktivierung bzw. inaktivierte Src-Kinase in lebenden Zellen zu studieren, obwohl sich beim Übergang von der aktiven hin zur inaktiven Src-Form die Konformation stark ändert (offen-gestreckt hin zu geschlossen-kompakt), was eine gute Voraussetzung für ein Sensormolekül wäre. Ein Problem stellt jedoch die Membran-Verankerung des Proteins dar, so dass Src nur an einem Ende fluoreszenzmarkiert werden kann. Eine BiFC-Messung analog des Ansatzes von de Virgilio et al. (2004) wäre sicher möglich, jedoch hat diese Technik die bereits angesprochenen Nachteile. Eine Möglichkeit dennoch Informationen über die Src-Inaktivierung zu gewinnen, wäre die Anwendung Phosphotyrosin-529 spezifischer Antikörper in Immunfluoreszenz-Messungen, also mit fixierten Zellen. Diese Messungen sind jedoch schwierig, da Phosphotyrosin-529 in inaktiver Src-Kinase fest von der Src-SH2-Domäne gebunden wird und schwer zugänglich ist.

FRET-NACHWEIS DER SRC-CSK-INTERAKTION

Die eleganteste und zugleich am wenigsten mit natürlichen Protein-Protein-Interaktionen interferierende Methode zur Visualisierung der Src-Inaktivierung ist die FRET-Messung zwischen Src-YFP und Csk-CFP (Vielreicher et al., 2007).

Die A5-CHO Zellen, welche den humanen Fibrinogen-Rezeptor in seiner funktionellen Form überexprimieren, bilden nur sehr geringe endogene Mengen an Src und Csk und sind sehr gut für die mikroskopische FRET-Messung geeignet, da sie nur sehr geringe Autofluoreszenz im gelben Bereich, in welchem FRET detektiert wird, aufweisen und ausreichend groß und wenig empfindlich sind. Mit den Zellen wurden in der Vergangenheit viele Reaktionen der Plättchen-spezifischen Signalwege untersucht und es hat sich gezeigt, dass sie als Modellzellen für die Untersuchung des $\alpha_{IIb}\beta_3$ „outside-in“-Signalwegs und der Lamellipodien- und Fokalkontakte-Funktion sehr gut geeignet sind.

Die gewählte Art der Protein-Markierung (CFP/YFP, YFP C-terminal an Src) hatte, wie gezeigt, keine erkennbaren negativen Effekte, weder auf die Expression, noch auf die Lokalisation der Fusionsproteine: Src-YFP-Proteine lokalisieren in der Plasmamembran, Csk-CFP-Proteine im Cytosol. Analog lokalisierten bei Fibrinogen-Adhäsion Src-YFP- und Csk-CFP- in den Fokalkontakten wie die Co-Lokalisation mit Vinculin und die TIRF-Mikroskopie zeigt (gleiches gilt für Src und Csk; Yeatman, 2004).

Die Fluoreszenz-Markierung hat auch keinen nennenswerten Einfluss auf die Src- und Csk-Assoziation mit dem Integrin-Rezeptor, wie die IP-Ergebnisse demonstrieren. Bestätigt wird dies durch die Mikroskopie, wo sich Src-YFP- und Csk-CFP- sowie FRET-Signale an den Zellrändern ausbilden, wo es nach Shattil (2005) durch Fibrinogen-Bindung zur starken Integrin-Clusterbildung kommt. Abgesehen vom Lokalisationsverhalten scheinen die Fluoreszenz-„Tags“ auch die Src-Phosphorylierung an Tyr529 nicht wesentlich zu behindern. Die zeitabhängigen Phosphorylierungs-Assays zeigen einen Csk-spezifischen prozentualen Anstieg der Menge an Src_pTyr529 während der Adhäsion der Zellen und sind ein starkes Argument dafür, dass in den mit FRET detektierten Src-Csk-Proteininteraktionen es auch tatsächlich zur Src-Inaktivierung (also zur Phosphorylierung) kommen kann. Weitere Argumente liefern die FRET-Ergebnisse bei Expression der Mutanten, denn dort treten trotz Austausch nur einer einzigen Aminosäure (SrcY529F, CskK222R) völlig unterschiedliche FRET-Verteilungen, -Dynamiken und auch -Intensitäten auf.

Die in den Weitfeld-Mikroskopie-Untersuchungen ermittelten E_{FRET} -Werte bewegen sich im normalen Bereich für intermolekulares FRET zwischen CFP- und YFP-markierten Proteinen. E_{FRET} tritt Fibrinogen-spezifisch (Vergleich zur BSA-Kontrolle) an den Zellrändern aktiver Lamellipodien auf (kein FRET nach vollständiger Zell-Ausbreitung), ein eindeutiger Hinweis auf die Bedeutung dieser Reaktion für die Lamellipodienfunktion. Werden mutierte Proteine co-exprimiert, so werden entweder gar keine Lamellipodien gebildet (SrcY529F) bzw. die Lamellipodienausbildung und die koordinierte Funktion ist gestört (CskK222R).

MECHANISMUS DER SRC-INKTIVIERUNG DURCH CSK

Aufgrund der sehr hohen Selektivität und Bedeutung wurde die Src-Inaktivierung durch Csk bereits länger in in-vitro Experimenten studiert. Erst kürzlich konnten Lieser et al. (2005 und 2006) und Wong et al. (2005) die Kinetik dieser Reaktion genauer aufklären. Ihre Ergebnisse legen nahe, dass es sich um einen sehr schnellen, bevorzugten und spezifischen Mechanismus mit biphasischem Charakter handelt (Abb. 25). Im ersten Schritt erfolgt die Csk-Bindung über die SH2-Domäne (Csk·Src). Dieser Schritt steuert die Src-Erkennung. Im zweiten Schritt erfolgt die schnelle Phosphorylierung von Tyrosin 529 im C-terminalen Ende des Src-Proteins (Csk·P-Src) durch einen Klammermechanismus („chemical clamping“), wodurch Src und Csk chemisch aneinander gebunden sind. Erst danach geht die

Phosphorylierung vollständig auf Src über und die Proteine dissoziieren (Csk + p-Src).

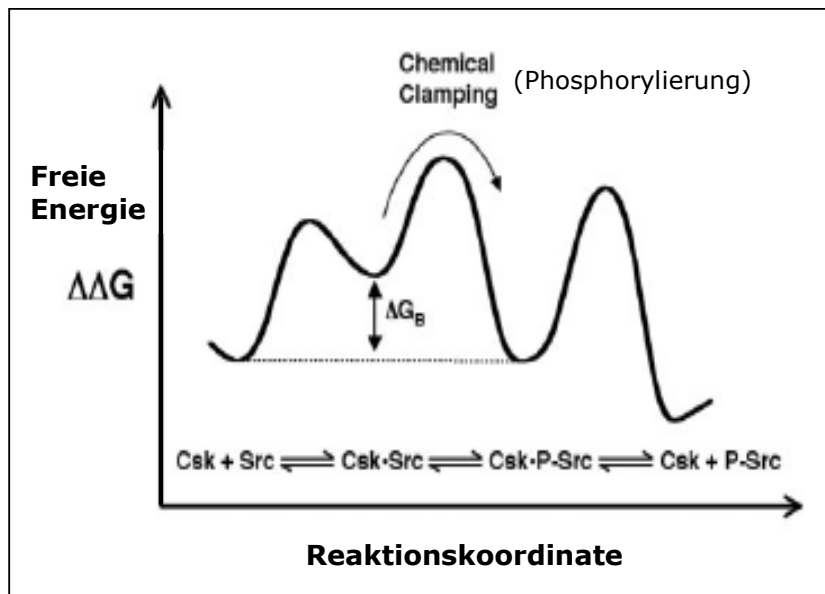


Abb. 25. Kinetik der Src-Phosphorylierung durch Csk.

Schema zum Ablauf der biphasischen Phosphorylierung, basierend auf Ergebnissen mit Kinase-inaktivem Src (Abbildung verändert, nach: Lieser et al., 2005). Die Src-Csk-Komplexbildung (Csk·Src) ist relativ instabil (hoher Wert der freien Energie), dennoch kann Src durch Csk mittels eines hocheffektiven und sehr schnellen „chemical clamping“-Schrittes effektiv erkannt und phosphoryliert werden. Nachfolgend kommt es zur Abdissoziation von Csk.

Auf diesen Reaktions-Ablauf wird bei der Diskussion der FRET-Ergebnisse mit den Mutanten SrcY529F (konstitutiv aktiv) und CskK222R (Kinase-inaktiv) zurückgegriffen.

ABLAUF DER SRC-INKTIVIERUNG IM $\alpha_{I\text{Ib}}\beta_3$ -SIGNALWEG

In Src_{wt}-YFP/Csk_{wt}-CFP co-exprimierenden Zellen sind in Abständen von 1-2 min entlang der Zellränder aktiver Lamellipodien starke FRET-Signale zu sehen. Shattil (2005) nimmt an, dass es an den Zellrändern der Lamellipodien durch die Bindung von Fibrinogen zur Clusterbildung von Integrin $\alpha_{I\text{Ib}}\beta_3$ Rezeptoren kommt, welche zur Autoaktivierung assoziierter Src Kinasen führt. Dadurch wird der „outside-in“ Signalweg initiiert. Begründet wird dies hauptsächlich durch Ergebnisse von de Virgilio et al. (2004). In von dieser Gruppe publizierten Videosequenzen, welche allerdings nur eine geringe zeitliche Auflösung (1 Bild pro Minute) besitzen zeigt sich, dass sich Src- β_3 - und Src-Syk-Interaktionen (BiFC-Signale) periodisch an den Zellrändern formieren.

Die hier beobachteten Src-Csk FRET-Komplexe zeigen jedoch, dass der Signalweg an den Zellrändern auch wieder abgeschaltet wird. Die Interaktionen traten bei Lamellipodienrückzug, nicht jedoch bei Wachstum auf. Dies lässt vermuten, dass die Src-Csk Interaktion die Lamellipodien-Bewegung über die Steuerung des

Zytoskeletts bestimmt, wobei Src-Csk-Assoziation (Src-Inaktivierung, FRET) zu Inhibition des Wachstums („retraction“) und Csk-Dissoziation (Src-Aktivierung, kein FRET) zu Wachstum („protrusion“) führt.

Unterstützt wird diese These durch Beobachtungen bei Wang et al. (2005). Dort führt die Src-Aktivierungs-Wanderwelle bei Erreichen des Zellrands zu einem deutlich sichtbaren, lokal beschränkten Lamellipodien-Vorschub. Die Src-Aktivierungs-Fortpflanzung entlang der Membran kann im Übrigen durch Src-trans-Autophosphorylierung (Shattil, 2004) erklärt werden. Möglicherweise spielt dies auch bei der $\alpha_{IIB}\beta_3$ -vermittelten Adhäsion eine Rolle. Wie die Src-Aktivierung genau abläuft sollte durch Verwendung des Src-Sensors (Wang et al., 2005) aufgeklärt werden. Leider wurde uns das entsprechende Konstrukt jedoch nicht zur Verfügung gestellt.

Aus den Videosequenzen von de Virgilio et al. (2004) geht hervor, dass die Src- β_3 - und Src-Syk-Interaktionen nach wenigen Minuten nach innen wandern, so dass angenommen werden muss, dass das Integrin selbst in Verbindung mit Src (und dieses zusammen mit Syk) entlang der Lamellipodienbasis (basale Membran) nach innen transportiert wird.

Unsere Ergebnisse legen nahe, dass auch Src periodisch inaktiviert wird und dann nach innen wandert. Die hohe Wanderungsgeschwindigkeit der Src-Csk-Komplexe (~ 90 nm/s) lässt auf einen aktiven, Zytoskelett-vermittelten Transport schließen. Da Fokalkontakte („focal complexes“) auf Integrin-Clusterbildung basieren, für die Erlangung voller Stabilität aber erst reifen müssen („Fokaladhäsionen“, „focal adhesions“), kann angenommen werden, dass sich die „Fokalkomplexe“ an den Zellrändern bilden, diese dann aber durch das Zytoskelett innerhalb der Membran mobil sind. Erst weiter innen in der Region der Lamellen reifen die Fokalkontakte dann aus und werden sessil. Mit Konfokalmikroskopie gemessene FRET-Signale fanden sich sowohl an den Zellrändern als auch in den Fokaladhäsionen. Dies stimmt mit dem Befund überein, dass Src und Csk in stabilen Fokalkontakten co-lokalisieren (Yeatman, 2004).

Der mögliche Ablauf in den Lamellipodien kann damit folgendermaßen zusammengefasst werden (Vielreicher et al., 2007): Nach einer kurzer Periode der Src-Aktivierung (und Signalweg zum Aktin-Zytoskelett) an den Zellrändern wird Csk rekrutiert, welches Src hochspezifisch und schnell inaktiviert und an Src bindet. Dieser Schritt beendet auch die Aktinfilament-Polymerisation, was schließlich zum Wachstums-Stopp bzw. Rückzug der Lamellipodien führt. Anschließend werden

Integrin-Src-Csk Komplexe (die möglicherweise auch Syk enthalten) nach innen gezogen. Dies kann an den Zellrändern durch neue Fibrinogen-Bindung zur erneuten Integrin-Aktivierung und Lamellipodien-Wachstum (durch Aktinfilament-Polymerisation) führen.

EFFEKT DER SrcY529F-MUTATION

Das SrcY529F Protein hat eine deutlich erhöhte Kinaseaktivität und ist nicht mehr regulierbar durch Csk (Yeaman, 2004). Zellen, die SrcY529F-YFP/Csk-CFP co-exprimieren zeigen abnorm strukturierte und verteilte Fokalkontakte (in denen Csk kaum zu finden ist) und sind nicht fähig, sich geordnet auf Fibrinogen auszubreiten. Dies stimmt mit den Betrachtungen von Yeaman (2004) überein, nach denen stabile Fokalkontakte nur bei Anwesenheit von Csk und Inaktivierbarkeit von Src möglich sind. Die permanente Src-Aktivierung verhindert die Ausbildung stabiler Fokalkontakte möglicherweise direkt durch Beeinflussung der stabilen Ligandenbindung des Integrins. Die starke Src-Lokalisation in den deformierten Fokalkontakten kommt möglicherweise durch von SrcY529F durch Phosphorylierung anderer Tyrosinkinase und Cytoskelett-Adapterproteine bewirkter verstärkter Bündelung von Aktin-Filamenten zustande.

Der durch Src regulierte Signalweg zum Zytoskelett führt bei Expression von SrcY529F zur starken Zytoskelett-Hyperaktivierung. Eine Folge ist die Ausbildung von Membranblasen („membrane blebs“), denen Veränderungen des kortikalen Zytoskeletts zugrunde liegen, wie Charras et al. (2006) herausfand. Die Unkoordiniertheit und Dynamik dieser Membranblasenbildung zeigt deutlich die Auswirkungen ungebremster Src-Aktivität.

Es zeigt sich kein (oder deutlich verringertes) FRET, was anzeigt, dass SrcY529F und Csk offenbar nicht interagieren können. Dies steht im Einklang mit dem durch Lieser et al. (2005) vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus, nachdem eine Src-Csk Interaktion ohne Src-Phosphorylierung nur schwer möglich ist (Abb. 25).

EFFEKT DER CskK222R-MUTATION

Die Effekte der Kinasemutante CskK222R zeigen sich in anderer Weise. Obwohl diese Mutante Src nicht oder nur verringert inaktivieren kann, sind die Zellen zu effektiver Adhäsion und Ausbreitung befähigt und breiten sich sogar noch flächiger als normal aus, was für die bevorzugte Ausbildung starker Fokalkontakte spricht. Bis einschließlich der Lamellen (die an die Lamellipodien angrenzende innere

Zellregion; Small & Resch, 2005) ähneln die Zellen vollständig den Wildtyp-Zellen, in der Peripherie jedoch sind deutliche Unterschiede sichtbar. In den Lamellipodien ist CskK222R in sehr viel geringerer Menge vorhanden. Dies spricht zum einen für eine Lokalisierungs-Rolle der Csk-Kinasefunktion, zum anderen beleuchtet dieser Befund aber auch die Unterschiedlichkeit dieser beiden Regionen. Denkbar ist, dass Fluoreszenz-Unterschiede von besonders flach ausgeprägten Lamellipodien verursacht sind oder aber es existiert eine molekulare Ursache – infrage kommt z.B. das anders strukturierte Zytoskelett in den Lamellen, verglichen mit den Lamellipodien.

Der Zellrand ist nicht in mehrere Lappen unterteilt, sondern weist eine einzelne sehr breite Membranfront auf. Die fehlende oder reduzierte Fähigkeit zur Inaktivierung von Src führt an den Zellrändern zu konstantem Migrationsverhalten (jedoch keine Netto-Migration der Zelle), was schließlich die ausgebreitete flache Zell-Morphologie bedingt.

Die Ansammlungen der FRET-Komplexe umranden den gesamten Zellrand wie ein Saum, was nur bedeuten kann, dass der Einwärts-Transport über das Zytoskelett nicht ablaufen kann. Mögliche Ursache wäre, dass CskK222R zwar effektiv an Src bindet, da es dieses aber nicht inaktivieren (phosphorylieren) und anschliessend abdissoziieren kann, bleibt Src in der aktiven Konformation und kann seine Substrate phosphorylieren. Nach dem von Lieser et al. (2005) vorgeschlagenen Reaktionsmodell sollte ohne Src-Phosphorylierung eine Src-Csk Interaktion (FRET) – analog SrcY529F–Csk – kaum möglich sein. Offenbar spielen bei Interaktion von Src mit CskK222R noch weitere Prozesse eine Rolle.

AUSBLICK

Die Ergebnisse zusammenfassend kann resümiert werden: Unser intermolekularer FRET-Ansatz agiert als sensitiver allgemeiner Reporter der Src-Inaktivierung in lebenden Zellen. Die Csk-vermittelte Src-Regulation im Plättchen-spezifischen $\alpha_{IIb}\beta_3$ Signalweg ist detailliert beschrieben worden und liefert die Grundlage seiner Regulation. Das FRET-Sensor-System liefert ein Werkzeug, um sowohl die Inaktivierung von Src in anderen Integrin-Signalwegen wie dem $\alpha_V\beta_3$ Signalweg (z.B. Endothelzellen) oder anderen Nicht-Integrin-Signalwegen. Ferner sollte das System auch auf das Studium der Inaktivierung weiterer SFKs in β_1 - und β_2 -Integrin- sowie anderen Rezeptor-vermittelten Signalwegen erweitert werden können.

REFERENZEN

Agneskirchner, J. (2000) Plättchenfunktion- und -Morphologie bei Patienten mit hyper- und hyporeaktivem Hämostasesystem und bei Membranrezeptor-blockade (Dissertation).

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2002) *Molecular Biology of the Cell*, 4. Auflage, Garland Science, New York.

Arias-Salgado, E. G., Lizano, S., Sarkar, S., Brugge, J. S., Ginsberg, M. H. and Shattil, S. J. (2003) Src kinase activation by direct interaction with the integrin $\beta 3$ cytoplasmic domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(23), 13298-13302.

Axelrod D. (2001) Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology. *Traffic* (2), 764-774.

Brown M. T. & Cooper J. A. (1996) Regulation, substrates and functions of Src. *Biochim Biophys Acta* 1287(2-3), 121-49.

Buensuceso, C., de Virgilio, M., Shattil S. J. (2003) Detection of Integrin α IIB β 3 Clustering in Living Cells. *J Biol Chem* 278(17), 15217-24.

Calderwood, D. A., Shattil, S. J., and Ginsberg, M. H. (2000) Integrins and Actin Filaments: Reciprocal Regulation of Cell Adhesion and Signaling. *J Biol Chem* 275(30), 22607-22610.

Carragher, N. O. & Frame, M. C. (2004) Focal adhesion and actin dynamics: a place where kinases and proteases meet to promote invasion. *Trends Cell Biol* 14(5):241-9.

Charras, G. T., Hu, C. K., Coughlin, M., and Mitchison, T. J. (2006) Reassembly of contractile actin cortex in cell blebs. *The Journal of Cell biology* 175(3), 477-490.

Cole, P. A., Shen, K., Qiao, Y., and Wang, D. (2003) Protein tyrosine kinases Src and Csk: a tail's tale. *Curr Opin Chem Biol* 7(5), 580-585.

de Virgilio, M., Kiosses, W. B., and Shattil, S. J. (2004) Proximal, selective, and dynamic interactions between integrin α IIB β 3 and protein tyrosine kinases in living cells. *The Journal of cell biology* 165(3), 305-311.

Felsenfeld, D. P., Schwartzberg, P. L., Venegas, A., Tse, R., and Sheetz, M. P. (1999) Selective regulation of integrin-cytoskeleton interactions by the tyrosine kinase Src. *Nat Cell Biol* 1(4), 200-206.

Frojmovic, M. M., O'Toole, T. E., Plow, E. F., Loftus, J. C., and Ginsberg, M. H. (1991) Platelet Glycoprotein IIb-IIIa (alpha IIb beta 3 Integrin) Confers Fibrinogen- and Activation-Dependent Aggregation on Heterologous Cells. *Blood* 78(2), 369-376.

- Gawaz, M. (2002) *Blood Platelets*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Giancotti, F. G. & Ruoslahti, E. (1999) Integrin Signaling. *Science* 285(5430), 1028-1032.
- Giannone, G., Dubin-Thaler, B. J., Dobereiner, H. G., Kieffer, N., Bresnick, A. R., and Sheetz, M. P. (2004) Periodic Lamellipodial Contractions Correlate with Rearward Actin Waves. *Cell* 116(3), 431-443.
- Golden, A., Nemeth, S. P., and Brugge, J. S. (1986) Blood Platelets Express High Levels of the pp60c-src-Specific Tyrosine Kinase Activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 83(4), 852-856.
- Haimovich, B., Lipfert, L., Brugge, J. S., and Shattil, S. J. (1993) Tyrosine Phosphorylation and Cytoskeletal Reorganization in Platelets Are Triggered by Interaction of Integrin Receptors with Their Immobilized Ligand. *J Biol Chem* 268(21), 15868-15877.
- Harms, G. S., Cognet, L., Lommerse, P. H., Blab, G. A., and Schmidt, T. (2001) Autofluorescent proteins in single-molecule research: applications to live cell imaging microscopy. *Biophys J* 80(5), 2396-2408.
- Harris, K. F., Shoji, I., Cooper, E. M., Kumar, S., Oda, H., and Howley, P. M. (1999) Ubiquitin-mediated degradation of active Src tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(24), 13738-13743.
- Hebert, T. E., Gales, C., and Rebois, R. V. (2006) Detecting and imaging protein-protein interactions during G protein-mediated signal transduction in vivo and in situ by using fluorescence-based techniques. *Cell Biochem Biophys* 45(1), 85-109.
- Hernández M. V., Sala M. G., Balsamo J., Lilien J., Arregui C. O. (2006) ER-bound PTP1B is targeted to newly forming cell-matrix adhesions. *J Cell Sci* 119(Pt 7), 1233-43.
- Hu C. D., Chinenov Y., Kerppola T. K. (2002) Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell* 9(4), 789-98.
- Jares-Erijman, E. A. & Jovin, T. M. (2003). FRET imaging. *Nat Biotechnol.* 21(11):1387-95.
- Jares-Erijman, E. A. & Jovin, T. M. (2006). Imaging molecular interactions in living cells by FRET microscopy. *Curr Opin Chem Biol.* 10(5):409-16.
- Kenworthy, A. K. (2001) Imaging protein-protein interactions using fluorescence resonance energy transfer microscopy. *Methods* 24(3), 289-296.
- Kremers, G. H., Goedhart, J., van Munster, E. B. and Gadella, Jr.; T. W. J. (2006) Cyan and yellow super fluorescent proteins with improved brightness, protein folding, and FRET Förster radius. *Biochemistry* 45, 6570-6580.

- Lieser, S. A., Shindler, C., Aubol, B. E., Lee, S., Sun, G., and Adams, J. A. (2005) Phosphoryl transfer step in the C-terminal Src kinase controls Src recognition. *J Biol Chem* 280(9), 7769-7776.
- Lieser S. A., Shaffer J. and Adams J. A. (2006) Src tail phosphorylation is limited by structural changes in the regulatory tyrosine kinase Csk. *J Biol Chem* 281(49), 38004-12.
- Lindl, T. (2002) Zell- und Gewebekultur, 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin.
- Matsuoka, H., Nada, S., and Okada, M. (2004) Mechanism of Csk-mediated Down-regulation of Src Family Tyrosine Kinases in Epidermal Growth Factor Signaling. *J Biol Chem* 279(7), 5975-5983.
- Miyawaki A., Llopis J., Heim R., McCaffery J. M., Adams J. A., Ikura M., Tsien R. Y. (1997) Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* 388(6645), 882-7.
- Mülhardt, C. (2003) Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics, 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin.
- Nagai, T., Ibata, K., Park, E. S., Kubota, M., Mikoshiba, K., and Miyawaki, A. (2002) A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol* 20(1), 87-90.
- Nakagawa, T., Tanaka, S., Suzuki, H., Takayanagi, H., Miyazaki, T., Nakamura, K., and Tsuruo, T. (2000) Overexpression of the csk gene suppresses tumor metastasis in vivo. *Int J Cancer* 88(3), 384-391.
- Obergfell A., Judd B. A., del Pozo M. A., Schwartz M. A., Koretzky G. A., Shattil S. J. (2001) The Molecular Adapter SLP-76 Relays Signals from Platelet Integrin α IIB β 3 to the Actin Cytoskeleton. *J Biol Chem* 276(8), 5916-23.
- Obergfell, A., Eto, K., Mocsai, A., Buensuceso, C., Moores, S. L., Brugge, J. S., Lowell, C. A., and Shattil, S. J. (2002) Coordinate interactions of Csk, Src, and Syk kinases with α IIB β 3 initiate integrin signaling to the cytoskeleton. *The Journal of cell biology* 157(2), 265-275.
- Oppermann, H., Levinson, A. D., Varmus, H. E., Levintow, L., Bishop, J. M. (1979) Uninfected vertebrate cells contain a protein that is closely related to the product of the avian sarcoma virus transforming gene (src). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76(4):1804-8.
- O'Toole, T. E., Loftus, J. C., Du, X. P., Glass, A. A., Ruggeri, Z. M., Shattil, S. J., Plow, E. F., and Ginsberg, M. H. (1990) Affinity modulation of the α IIB β 3 integrin (platelet GPIIb-IIIa) is an intrinsic property of the receptor. *Cell Regul* 1(12), 883-893.
- O'Toole, T. E., Katagiri, Y., Faull, R. J., Peter, K., Tamura, R., Quaranta, V., Loftus, J. C., Shattil, S. J., and Ginsberg, M. H. (1994) Integrin Cytoplasmic Domains Mediate Inside-Out Signal Transduction. *The Journal of cell biology* 124(6), 1047-1059.

- Puck, T. T., Cieciura, S. J., Robinson, A. (1958) Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J Exp Med* 108(6):945-56.
- Rizzo, M. A., Springer, G. H., Granada, B., and Piston, D. W. (2004) An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET. *Nat Biotechnol* 22(4), 445-449.
- Roskoski R. Jr. (2005) Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 331(1), 1-14.
- Sambrook J. & Russell, D. W. (2006) *The Condensed Protocols: From Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Taschenbuch)*, 1. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.
- Schwartz M. A. (2001) Integrin signaling revisited. *Trends Cell Biol* 11(12), 466-70.
- Shattil, S. J. (2005) Integrins and Src: dynamic duo of adhesion signalling. *Trends Cell Biol* 15(8), 399-403.
- Small, J. V. & Resch, G. P. (2005) The comings and goings of actin: coupling protrusion and retraction in cell motility. *Curr Opin Cell Biol* 17(5), 517-523.
- Steinmeyer, R., Noskov, A., Krasel, C., Weber, I., Dees, C., and Harms, G. S. (2005) Improved Fluorescent Proteins for Single-Molecule Research in Molecular Tracking and Co-Localization. *J Fluoresc* 15(5), 707-721.
- Thomas, J. E., Soriano, P., and Brugge, J. S. (1991) Phosphorylation of c-Src on Tyrosine 527 by Another Protein Tyrosine Kinase. *Science* 254(5031), 568-571.
- Thomas, S. M. & Brugge, J. S. (1997) Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 513-609.
- van Zandvoort, M. A., de Grauw, C. J., Gerritsen, H. C., Broers, J. L., oude Egbrink, M. G., Ramaekers, F. C., Slaaf, D. W. (2002) Discrimination of DNA and RNA in Cells by a Vital Fluorescent Probe: Lifetime Imaging of SYTO13 in Healthy and Apoptotic Cells. *Cytometry* 47(4), 226-35.
- Vielreicher, M., Harms, G., Butt, E., Walter, U. and Obergfell, A. (2007) Dynamic Interaction between Src and C-terminal Src Kinase in Integrin α IIb β 3-mediated Signaling to the Cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 282(46), 33623-33631.
- Villardaga, J. P., Steinmeyer, R., Harms, G. S., and Lohse, M. J. (2005) Molecular basis of inverse agonism in a G protein-coupled receptor. *Nat Chem Biol* 1(1), 25-28.
- Wang, Y., Botvinick, E. L., Zhao, Y., Berns, M. W., Usami, S., Tsien, R. Y., and Chien, S. (2005) Visualizing the mechanical activation of Src. *Nature* 434(7036), 1040-1045.
- Wong, L., Lieser, S. A., Miyashita, O., Miller, M., Tasken, K., Onuchic, J. N., Adams, J. A., Woods, V. L. Jr., Jennings, P. A. (2005) Coupled motions in the SH2 and kinase domains of Csk control Src phosphorylation. *J Mol Biol* 351(1):131-43.

Woodside D. G., Oberfell A., Leng L., Wilsbacher J. L., Miranti C. K., Brugge J. S., Shattil S. J., Ginsberg M. H. (2001) Activation of Syk protein tyrosine kinase through interaction with integrin beta cytoplasmic domains. *Curr Biol* 11(22), 1799-804.

Xia, Z. & Liu, Y. (2001) Reliable and Global Measurement of Fluorescence Resonance Energy Transfer Using Fluorescence Microscopes. *Biophys J* 81(4), 2395-2402.

Yeaman, T. J. (2004) A Renaissance for Src. *Nat Rev Cancer* 4(6), 470-480.

Zhang, J., Campbell, R. E., Ting, A. Y., and Tsien, R. Y. (2002) Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(12), 906-918.

ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Amp.	Ampicillin (Antibiotikum)
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar (base pair)
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
BT	optisches Durchbluten (Bleedthrough, "Cross-talk")
CFP	cyan fluoreszierendes Protein (cyan fluorescent protein)
CHO	chinese hamster ovary - Zelllinie
Csk	C-terminale Src Kinase
DE	Direkte Fluoreszenzanregung (direct excitation)
DMEM	Dulbecco`s modifiziertes Eagle`s-Medium (für adhärente Zellen)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxy-Ribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
ECL	verstärkte Chemilumineszenz (enhanced chemiluminescence)
ECM	extrazelluläre Matrix
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (Komplexbildner zweiwertiger Ionen wie Ca^{2+} und Mg^{2+})
E_{FRET}	FRET-Effizienz
FAK	Fokale-Adhäsionen-Kinase (focal adhesion kinase)
FBS	fötales Rinderserum (fetal bovine serum)
fl	Femtoliter [10^{-15} l = $1 (\mu\text{m})^3$]
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
g	Gramm, g-Zahl (Erdbeschleunigung)
GFP	grün fluoreszierendes Protein (green fluorescent protein)
GP	Glykoprotein
h	Stunde (hour)
HRP	Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase, Chemilumineszenz-Enzym)
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
kb	Kilobase
Kan.	Kanamycin (Antibiotikum)
kDa	Kilo-Dalton (entspricht 1000 g/mol))
l	Liter
M	molar (g/mol)
min	Minute
N.A.	numerische Apertur (eines Objektivs)
OD_{xxx}	optische Dichte bei $\lambda = \text{xxx nm}$ (logarithmisches Maß der Lichtabsorption)
PBS	Phosphat-gepufferte physiologische Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
Pfu	hitzestabile DNA-Polymerase für PCR
PRR	Prolin-reiche Region (proline-rich region)
PTP	Protein-Tyrosin Phosphatase
RIPA	Radioimmunpräzipitationassay-Lysepuffer (für eukaryotische Zellen)

rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
seFRET	FRET durch stimulierte Emission (sensitized emission FRET)
SH	Src-Homologiedomäne (z.B. SH2, SH3-Domäne)
SDS	Natrium-Dodecyl-sulfat (sodium dodecyl sulphate)
PAGE	Poly-Acrylamid-Gel-Elektrophorese
SFK	Protein aus der Familie der Src Kinasen (Src family kinase)
t	Zeit (time)
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (Tris-buffered saline)
TIRF	Fluoreszenzanregung nach dem Prinzip der internen Totalreflexion (total internal reflection fluorescence)
Tris	Tris-(hydroxymethyl-) aminomethan (chemisch inerte physiologische Puffersubstanz)
üN	über Nacht
UV	Ultraviolett-Strahlung
v	Volumen (volume)
w	Gewicht (weight)
wt	Wildtyp
YFP	gelb fluoreszierendes Protein (yellow fluorescent protein)
Ω	Ohm (Widerstand)

Größen-Einheiten

M	Mega- (10^6)
K	Kilo- (10^3)
m	milli- (10^{-3})
μ	mikro- (10^{-6})
n	nano- (10^{-9})
p	pico- (10^{-12})
f	femto- (10^{-15})

L-Aminosäuren (proteinogene)

Alanin (A, Ala)	Methionin (M, Met)
Cystein (C, Cys)	Asparagin (N, Asn)
Aspartat (D, Asp)	Prolin (P, Pro)
Glutamat (E, Glu)	Glutamin (Q, Gln)
Phenylalanin (F, Phe)	Arginin (R, Arg)
Glycin (G, Gly)	Serin (S, Ser)
Histidin (H, His)	Threonin (T, Thr)
Isoleucin (I, Ile)	Valin (V, Val)
Lysin (K, Lys)	Tryptophan (W, Trp)
Leucin (L, Leu)	Tyrosin (Y, Tyr)

DNA-Basen

Adenin (A)
Guanin (G)
Thymin (T)
Cytosin (C)

DANKSAGUNGEN

Die vorliegende Arbeit entstand zwischen März 2004 und Dezember 2007 an der Universität Würzburg am Institut für Klinische Biochemie (Prof. Walter) und am Rudolf-Virchow-Zentrum (Prof. Harms). Sie wurde bis März 2006 von Dr. med. Obergfell und danach von PD Dr. Butt betreut.

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Walter, der mir die Möglichkeit gab, diese Doktorarbeit in Kooperation mit Prof. Dr. Gregory Harms anzufertigen. Danke für das Interesse und für die freundliche Bereitschaft, das Projekt finanziell gut zu unterstützen.

Herrn Prof. Dr. Georg Krohne danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

PD Dr. Elke Butt danke ich für Ihre unkomplizierte Betreuung, die zupackende und schnelle Hilfe bei Problemen und Ihre freundliche zuvorkommende Art.

Danken möchte ich ebenfalls besonders Prof. Dr. Gregory Harms, bei dem ich durch die gewährten Freiheiten sehr viel lernen konnte und dessen unverwechselbare Art mich immer wieder von Neuem für mein Thema faszinierte. Greg, der „spirit“ und die „crazyness“ in Deiner Arbeitsgruppe sowie die unkonventionelle und direkte Herangehensweise, um Wissenschaft zu betreiben bleiben mir sicher unvergessen. Danke für das in mich gesetzte Vertrauen.

Ein großes Dankeschön auch an die Adresse der Arbeitsgruppe Harms für die stets gute Stimmung und die Bereitschaft, immer über Wissenschaft zu sinnieren (auch mal nach Mitternacht im Labor bei einem guten Tropfen). Nicht zu vergessen ist auch Dr. Ralf Steinmeyer, dem ich für die hilfreichen Diskussionen, die das FRET-Projekt in der Anfangsphase maßgeblich ankurbelten, danke.

Mein besonderer Dank gilt meinen langjährigen Freunden, die immer Interesse und vollstes Verständnis und Respekt vor meiner Arbeit hatten. Ich denke Ihr wisst, wen ich meine: Christian Harrar, Christian Hart und Christian Schmidbauer. Aber

auch die Würzburger Leute dürfen nicht vergessen werden, ich denke da z.B. an Naresh Thumati.

Meiner Freundin Conny bin ich ein großes Dankeschön schuldig: Danke für Dein Durchhaltevermögen und die Geduld während der schwierigen Zeit der letzten anderthalb Jahre, für Deine immer positive Art und für Deine Liebe.

Natürlich gilt mein Dank auch meinen Eltern für Ihre Unterstützung.

Dr. med. Achim Obergfell hatte das völlig neue Forschungsthema in Würzburg initiiert. Wegen fehlender Unterstützung und mangelndem fachlichen sowie menschlichen Engagement kann ich ihm leider nicht danken. Leider wurde eine große Anzahl von Ankündigungen und Versprechen nicht eingehalten und nach seinem Weggang wurde jede Unterstützung verantwortungslos vollständig beendet. Dies war Ursache vieler Probleme und verlängerte merklich meine Promotionszeit.

Diese Arbeit wurde mit Fördermitteln der DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft) unterstützt [Ob137/3-1 (A. Obergfell, U. Walter), SFB688/TPA2 (U. Walter) und FZ-82 (G. Harms)].

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich,

dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form keinem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen. Ich erkläre ferner, dass ich bisher keine akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, Dezember 2007

.....

Unterschrift

CURRICULUM VITAE

Martin Christian Vielreicher

Persönliche Daten

Geboren am 04. August 1976 in Straubing

Nationalität deutsch

Familienstand ledig

Ausbildung

seit 01/2004	Bayer. Julius-Maximilians-Universität, Würzburg
seit 03/2004	Promotion im Fach Biologie am Institut für klinische Biochemie & Pathobiochemie/Zentrallabor (IKBZ, Leitung: Prof. Walter) und Rudolf-Virchow-Zentrum, Arbeitsgruppe Molekulare Mikroskopie (Prof. Harms)
	Graduierten-Programm der Internationalen Graduiertenschule (Klasse: Biomedizin) der Universität
01-02/2004	Ausbildungs-Stipendium (IKBZ, Prof. Walter)
10/1996-10/2002	Universität Regensburg
1998-2002	Studium der Molekularen Biologie an der Fakultät für Biologie und vorklinische Medizin, Diplomarbeit am Lehrstuhl für Zellbiologie (Prof. Tanner, Dr. Stolz), Abschluss: Diplom
1996-1998	Studium der Chemie an der Fakultät für Chemie und Pharmazie, Abschluss: Vordiplom
1986 - 1995	naturwissenschaftliches Gymnasium Ludwigsgymnasium, Straubing (Abitur) Veit-Höser-Gymnasium, Bogen

Wissenschaftliche Erfahrungen

Promotion

Forschungs-Projekt: Integrin-vermittelte Signaltransduktion in Thrombozyten
– Visualisierung und Charakterisierung der Inaktivierung
des Regulatorproteins Src Kinase mit modernen
fluoreszenzmikroskopischen Methoden

Betreuung: Prof. Dr. Harms, PD Dr. Butt-Dörje, Dr. med. Obergfell,
Prof. Dr. med. Walter

Diplomarbeit (10/2001–09/2002)

Forschungs-Projekt: Identifizierung und Charakterisierung des H⁺ - Vitamin B6
Symporter-Proteins in *Saccharomyces cerevisiae*

Betreuung: Dr. Stolz, Prof. Dr. Tanner

PUBLIKATIONEN

Wissenschaftliche Artikel:

- 1) "Dynamic Interaction between Src and C-terminal Src Kinase in Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -mediated Signaling to the Cytoskeleton." *J Biol Chem* 2007, 282 (46): 33623-33631. **Vielreicher, M.**, Harms, G., Butt, E., Walter, U. and Obergfell, A.
- 2) "Tpn1p, the Plasma Membrane Vitamin B6 Transporter of *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* 2003, 278 (21): 18990-18996. Stolz, J & **Vielreicher, M**
- 3) "Mechanism of Sulfide-Quinone Reductase Investigated Using Site-Directed Mutagenesis and Sulfur Analysis." *Biochemistry* 2002, 41:11552-11565. Griesbeck, C., Schuetz, M., Schoedl, T., Bathe, S., Nausch, L., Mederer, N., **Vielreicher, M.** und Hauska, G.

Abstracts:

- 1) Vortrag
"Dynamic regulation of Src by Csk in Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -mediated signaling – protein in-teractions imaged with FRET."
50. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung e.V. (GTH) (15.-18.02.2006, Kongresszentrum Basel/Schweiz). Publiziert in *Haemostaseologie* 2006; 26: 1-94. **Vielreicher, M.**, Steinmeyer, R., Harms, G., Walter, U. und Obergfell, A.
- 2) Poster
"Dynamic regulation of Src by Csk in Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -mediated signaling."
47. Jahrestagung der American Society of Hematology (ASH, 10.-13.12.2005, Atlanta Congress Center/USA). Publiziert in *BLOOD* 2005; 106: Abstract 2661. **Vielreicher, M.**, Steinmeyer, R., Harms, G., Walter, U. und Obergfell, A.
- 3) Poster
„Studium initialer Schritte der fibrinogenvermittelten Signaltransduktion mithilfe von Fluoreszenzmikroskopie.“
4. Bad Brückenauer Wintertagung (Sinntalklinik, 25.-26.02.2005). **Vielreicher, M.**, Steinmeyer, R., Harms, G., Walter, U. und Obergfell, A.