Funktionsanalyse von Fokalkontaktproteinen der Parvin-Familie durch Knockout in der Maus

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der

Mathemathisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Ingo Thievessen

aus Hilden

Februar 2007

Aus dem Institut für Genetik

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Die Arbeiten für die vorliegende Dissertation wurden unter der Betreuung von Frau Prof. Dr. E. Knust, Institut für Genetik, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und der Leitung von Herrn Prof. Dr. R. Fässler am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried durchgeführt.

Gedruckt mit der Genehmigung der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent:	Prof. Dr. E. Knust
Koreferent:	Prof. Dr. J. D´Haese
Tag der mündlichen Prüfung:	27.04.2007

Für Holger

1. Einleitung **1**

1.1. Grundlagen der Zell-Adhäsion 1

1.2. Integrin vermittelte Zell-Extrazellulärmatrix-Adhäsion *in vitro* 3

1.2.1. Integrine 3

1.2.2. Adapter- und Signalproteine 4

1.2.3. Morphologie und Funktion von Zell-Matrix-Adhäsion *in vitro* 6

1.3. Integrin-vermittelte Zell-Matrix-Adhäsion *in vivo* 9

1.3.1. Studien an Invertebraten 10

1.3.2. Embryonalentwicklung in der Maus 11

1.3.3. Vaskuläres System 13

1.3.4. Herz und Skelettmuskel 15

1.3.5. Hämatopoetische Zellen 17

1.4. Der ILK/PINCH/Parvin- (IPP) Komplex 19

1.4.1. Komplexbildung 19

1.4.2. Zelluläre Funktionen 22

1.4.3. Funktionsanalysen *in vivo* 26

1.5. Die Parvine 31

1.5.1. Proteinstruktur und Expression 32

1.5.2. Interaktionspartner und Funktionen 34

1.6. Zielsetzung der Arbeit 38

2. Material und Methoden **40**

2.1. Material 40

2.1.1. Verwendete Mauslinien 40

2.1.2. Zellinien und Primärzellen 40

2.1.3. Antikörper 40

2.1.4. DNA-Bibliothek, Vektoren und Plasmide 42

2.1.5. Oligonukleotide 43

2.1.6. Enzyme/Proteine 43

2.1.7. Zellkulturmedien 44

2.1.8. Medien, Puffer, Lösungen 45

2.1.9. Chemikalien 47

2.1.10. Kits und Verbrauchsmaterial 49

2.1.11. Geräte 49

2.1.12. Software und Datenbanken 50

2.2. Methoden 50
2.2.1. Herstellung Isoform spezifischer Parvinpeptid Antiseren 50
Generierung der Antiseren 50
Charakterisierung der Antiseren 51
2.2.2. Klonierungstechniken 52
Identifizierung von Parvin-positiven PAC-Klonen 52
Bakterienkultur und Plasmidpräparationen 52
Generierung kompetenter Bakterien 52
Restriktionsverdau und Aufreinigung von DNA 53
Ligation und Transformation von DNA 53
Kontrolle von Plasmid-Klonierungen 53
2.2.3. Generierung von Parvin-defizienten Mäusen 54
Erläuterungen zu den verwendeten Deletionsstrategien 54
ES-Zellkultur 55
Elektroporation genomischer Deletionskonstrukte in ES-Zellen 55
Selektion und klonale Expansion Antibiotikum-resistenter ES-Zellen 56
Identifizierung homolog rekombinanter ES-Zell-Klone 57
Blastozysten-Injektion/Transfer und Verpaarungsschemata 58
Genotypisierung von Mäusen und ES-Zellen 58
2.2.4. Isolierung und Kultivierung verschiedener Primärzellen 59
Murine embryonale Fibroblasten (MEF) 59
Knochenmark-differenzierte Makrophagen und Dendritische Zellen 60
Einzelzellsuspensionen aus der Milz 61
2.2.5. Southern- und Northern-blot 61
2.2.6. Western-blot 62
2.2.7. Präparation von Proteinlysaten und Immunpräzipitaten 62
2.2.8. Lipofektion von Zellen 63
2.2.9. Schnittechniken 63
2.2.10. Färbetechniken 64
2.2.11. Laufbandtraining von Mäusen 67
2.2.12. Proliferationsassay 67
2.2.13. Adhäsionsassay 68
2.2.14. Zeitabhängige Messung der Zell-Substrat Kontaktfläche 68
2.2.15. *In vitro*-Wundheilungsexperiment 69

2.2.16. *In vivo*-Migration fluoreszenz-markierter Dendritischer Zellen 69
2.2.17. Einwanderung Fluoreszenz-markierter Lymphozyten in Milz und Lymphknoten 69
2.2.18. FACS-Analysen 70
3. Ergebnisse 71
3.1. Generierung Isoform-spezifischer Parvinpeptid Antikörper 71
3.2. Gewebespezifische Expression und *in vitro* subzelluläre Lokalisation von Parvin Isoformen 75
3.2.1. Expression von α- und β-Parvin in der Embryonalentwicklung 75
3.2.2. Expression von α- und β-Parvin in adulten Geweben 79
3.2.3. Subzelluläre Lokalsation von α- und β-Parvin in NIH3T3-Fibroblasten 80
3.3. Generierung und Analysen β-Parvin-defizienter Mäuse 82
3.3.1. Generierung einer β-Parvin-defizienten Mauslinie 82
Deletionsstrategie und Genotypisierung 82
Deletion von *Parvb* 85
3.3.2. β-Parvin-defiziente Mäuse zeigten keinen offensichtlichen Phänotyp 87
3.3.3. Morphologisch/histologische Analysen 90
Herz 91
Skelettmuskel 95
Niere, Lunge, Leber, Milz 96
Nervensystem 97
3.3.4. Biochemische Analysen von Gewebe-Lysaten und -RNA 99
3.3.5. Analysen von Herz und Skelettmuskel nach Belastungstraining 103
3.3.6. Charakterisierung β-Parvin-defizienter Zellen 108
Isoform-Spezifität der PIX/Parvin-Bindung 109
β-Parvin-defiziente, primäre murine embryonale Fibroblasten 110
β-Parvin-defiziente, *in vitro* differenzierte Makrophagen 114
In vivo-Adhäsion β-Parvin-defizienter Makrophagen in der Milz 115
In vivo-Migration β-Parvin-defizienter, *in vitro* differenzierter Dendritischer Zellen 116
3.4. Quantitative Analysen der in vivo-Migration γ-Parvin-defizienter Leukozyten 117
In vivo-Migration γ-Parvin-defizienter, in vitro differenzierter Dendritischer Zellen 118
Einwanderung γ-Parvin-defizienter T- und B-Lymphozyten in Milz

und Lymphknoten 119
3.5. Generierung und initiale Analysen β-/γ-Parvin-doppeldefizienter Mäuse 120
3.5.1. Generierung einer β-/γ-Parvin-doppeldefizienten Mauslinie 120
Deletionsstrategie und Genotypisierung 121
Doppeldeletion von *Parvb* und *Parvg* 124
3.5.2. β-/γ-Parvin-doppeldefiziente Mäuse zeigten keinen offensichtlichen Phänotyp 128
3.5.3. Initiale Analysen β-/γ-Parvin-defizienter Makrophagen 129
β-/γ-Parvin-defiziente, *in vitro* differenzierte Makrophagen 130
In vivo-Adhäsion β-/γ-Parvin-defizienter Makrophagen in der Milz 130
3.6. Charakterisierung der α-Parvin-Defizienz in der Embryonalentwicklung 134
3.6.1. Initiale Analysen α-Parvin-defizienter Embryonen 134
3.7. Generierung einer Mauslinie mit konditional modifiziertem *Parva* 137
3.7.1. Deletionsstrategie und Genotypisierung 137
3.7.2. Bisher durchgeführte Schritte der konditionalen Deletion von *Parva*/α-Parvin 140
4. Diskussion 142
4.1. Generierung Isoform-spezifischer Parvinpeptid Antikörper 142
4.2. Gewebespezifische Expression und in vitro subzelluläre Lokalisation von Parvin Isoformen 143
4.3. Generierung und Analysen β-Parvin-defizienter Mäuse 145
4.3.1. β-Parvin-Defizienz in der Embryonalentwicklung und der adulten Homöostase 145
Embryonalentwicklung 145
Adulte Homöostase 146
4.3.2. Herz- und Skelettmuskelanalysen nach Belastungstraining 151
4.3.3. β-Parvin-defiziente MEF 154
4.4. Adhäsion und Migration β-, γ- und β-/γ-Parvin-defizienter Leukozyten 155
4.4.1. Makrophagen 156
4.4.2. Dendritische Zellen 158
4.4.3. T- und B-Lymphozyten 159
4.5. α-Parvin in der Embryonalentwicklung 160
4.5.1. Konstitutive Defizienz von α-Parvin in der Embryonalentwicklung 160
4.5.2. Konditionale Modifikation von *Parva* 163

4.6. Die Parvin-Familie 164

5. Zusammenfassung 166

6. Literatur 170

7. Abkürzungen 185

8. Erklärung 187

9. Danksagung 188

1. Einleitung

1.1 Zell-Adhäsion

Für Entwicklung und Physiologie multizellulärer Organismen ist ein koordiniertes Verhalten von Zellen im Verband wesentlich. Dieses bedarf des Austausches von Information verschiedenster Art zwischen Zellen bzw. Zellpopulationen. So werden beispielsweise Wachstumsfaktoren, Chemokine, Hormone oder Ionen auf sehr unterschiedlichen Wegen (endokrin, parakrin, autokrin) und über verschiedenste zelluläre Strukturen wie Synapsen, Nexus-Kontakte oder andere Rezeptorkomplexe ausgetauscht. Zudem sind Zellen jedoch auch mechanisch in Gewebe integriert über Zell-Zell- bzw. Zell-Extrazellulärmatrix-Adhäsionsstrukturen, die intrazellulär Verbindungen zum Zytoskelett herstellen. Eine adäquate zelluläre Antwort auf Informationen verschiedener Natur benötigt neben deren eigentlicher Rezeption auch deren koordinierte Verarbeitung. Im Hinblick auf die mechanische Integration von Zellen in Gewebe wird dies deutlich etwa bei der Abhängigkeit morphologisch-mechanischer Prozesse wie Zell-Migration und -Differenzierung oder Muskelkontraktion von biochemischen oder elektrischen Signalen wie Chemokinen oder Wachstumsfaktoren bzw. dem Ioneneinstrom. Umgekehrt ist die Verarbeitung biochemischer Signale, etwa Überlebensfaktoren, abhängig von der mechanischen Integration einer Zelle bzw. deren Adhäsionstatus, der hier als Kontrollmechanismus fungiert und beispielsweise für eine Metastasierung von Tumorzellen außer Kraft gesetzt werden muss. Die adhäsionsvermittelte, mechanische Integration von Zellen in Gewebe erfüllt daher zwei grundlegende Funktionen, die Übertragung mechanischer Kräfte zwischen benachbarten Zellen bzw. Zellen und ihrer Matrix sowie eine Integration mechanischer und anderer Signaltransduktionsprozesse. Beide Prozesse bestimmen Form und Funktion von Geweben massgeblich.

Wenngleich mechanisch belastbare Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Adhäsionsstrukturen morphologisch-funktionale Anpassung an gewebespezifische Anforderungen zeigen, folgen sie alle einem Bauprinzip. Intrazellulär ist das Aktin- oder Intermediärfilamentsystem über Adapter- oder Plaqueproteine wie Talin oder Dystrophin bei Zell-Matrix-Verbindungen, bzw. Catenine oder Desmoplakine bei Zell-Zell-Verbindungen an Transmembranproteine (Cadherine, Integrine, Dystroglykan) gebunden. Diese binden extrazellulär wiederum Transmembranproteine anderer Zellen bzw. Komponenten der extrazellulären Matrix wie Fibronektin, Kollagene oder Laminine und vermitteln so die Adhäsion der Zelle. Tabelle 1.1 gibt einen Überblick über die verschiedenen Typen von Zell-Zell- und Zell-Matrix-

Adhäsionsstrukturen. Dieses „Baukasten-Prinzip“ ermöglicht Zellen zum einen eine Anpassung an die mechanischen Anforderungen eines Gewebes, durch die Kopplung verschiedener Zytoskelettsysteme an das Zelläußere. Zudem ermöglicht die Vielzahl von Adapter- bzw. assoziierten Signalproteinen eine Regulation der Kopplung in Abhängigkeit von Signalprozessen in der Zelle. Umgekehrt nehmen Adapter- und Signalproteine in Abhängigkeit vom Adhäsionsstatus der Zelle Einfluss auf deren Signalprozesse. Da Intermediärfilamente eine hohe Stabilität und Zugfestigkeit aufweisen, wird ihnen bzw. den assoziierten, desmosomalen Zell-Zell- bzw. hemidesmosomalen Zell-Matrix-Verbindungen primär kraftübertragende Funktion zugerechnet (Lodish et al., 1998). Im Gegensatz hierzu zeigt das Aktin-Zytoskelett eine hohe Dynamik und bestimmt morphologisch-dynamische Prozesse maßgeblich mit. Die Aktin-basierten Zell-Zell- und insbesondere Zell-Matrix-Adhärenzen zeigen dementsprechend einen vergleichsweise dynamischen Charakter und ausgeprägte Signaltransduktionsaktivität. So sind sie über die Adhäsion hinaus entscheidend für die Regulation unterschiedlichster zellulärer Prozesse wie Migration, Überleben, Proliferation oder Differenzierung (Hynes, 2002,; Lee und Juliano, 2004). Da die Integrin-vermittelte, Aktin-gekoppelte Zell-Matrix-Adhäsion Gegenstand dieser Arbeit ist, soll diese im folgenden Abschnitt näher behandelt werden.

Tab. 1.1: Mechanisch belastbare Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen (nach Alberts et al., 2002)

	Transmembran-Protein	*Extrazellulärer Ligand*	*Zytoskelett-Verbindung*	*Adapterproteine (Beispiele)*
Zell-Zell-Adhärenz	Cadherine	Cadherine	Aktin	Catenine, Vinculin, α-Aktinin
Desmosom	Cadherine (Desmogleine, Desmocolline)	Cadherine	Intermediär-filamente	Desmoplakine, Plakoglobine
Zell-Matrix-Adhärenz	Integrine, Dystroglykan	Extrazelluärmatrix (Kollagene, Fibronektin, Laminine, ...)	Aktin	Talin, Vinculin, α-Aktinin, Tensin
Hemidesmosom	Integrin ($\alpha_6\beta_4$)	Extrazellulärmatrix	Intermediär-filamente	Desmoplakin-ähnliche Proteine

1.2 Integrin vermittelte Zell-Matrix-Adhäsion

1.2.1 Integrine

Die ausgeprägte Verknüpfung von Adhäsion und Signaltransduktion in Aktin- bzw. Integrin-vermittelten Zell-Matrix-Adhäsionen spiegelt sich zum einen in der großen Variabilität von Adapter- und Signalproteinen wider, zum anderen auch in den Eigenschaften der transmembranen Verbindungsproteine. Integrine werden auch als Adhäsionsrezeptoren bezeichnet und sind αβ-Heterodimere (Typ I Transmembranproteine). Die 18 bekannten α- und 8 bekannten β-Untereinheiten assoziieren zu 24 bekannten Dimeren. Die Ligandenspezifität wird dabei von der αβ-Paarung bestimmt (van der Flier und Sonnenberg, 2001). Basierend auf Sequenzhomologie bzw. Ligandenspezifität sowie Expressionsmuster lassen sich die Dimere in funktionale Subfamilien einteilen (Abb. 1.2.1). Zahlenmäßig stark vertreten sind dabei β1- und β3-Integrin basierte Dimere, sie zeigen eine entsprechend große Ligandenvielfalt. β1-Dimere stellen Kollagen- und Laminin-Rezeptoren, β1- und β3-Dimere Rezeptoren für die „RGD"-Sequenz in Fibronektin und Vitronektin. Die hauptsächlich leukozyten-spezifisch exprimierten β2- und β7-Dimere vermitteln in erster Linie Zell-Zell-Adhäsion über Bindung von Adhäsionsmolekülen der Ig-Superfamilie. Das α6β4-Dimer stellt den Intermediärfilament-gekoppelten Rezeptor für Laminin-5 in Basalmembranen (Hynes, 2002).

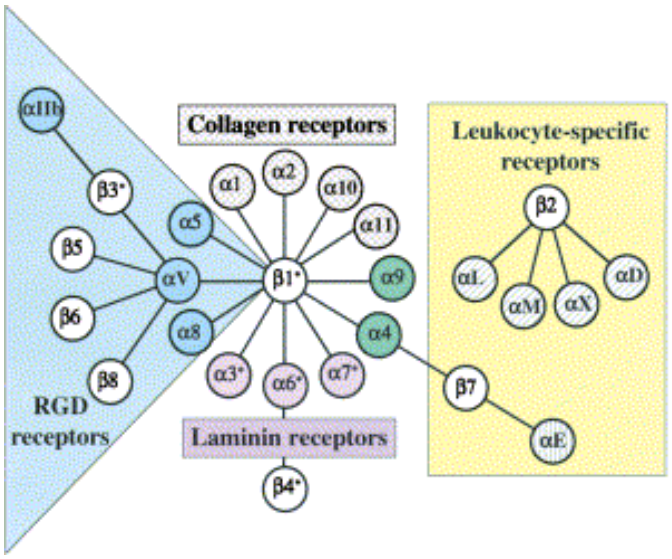


Abb. 1.2.1: Integrin-Rezeptoren (Hynes, 2002)

Die Regulation von Integrinen erfolgt auf zwei verschiedenen Ebenen. Über das „inside-out signaling" wird die Regulation der *Affinität* nicht ligierter Integrine durch Protein-

Interaktionen um die cytoplasmatischen Domänen besonders der β-Untereinheiten reguliert (Calderwood, 2004). Dabei scheint das F-Aktin-bindende FERM-Domänen Protein Talin entscheidend für die Aktivierung einer Vielzahl verschiedener Integrin-Dimere zu sein, indem es durch Bindung eines C-terminal gelegenen NPxY-Motivs der β-Untereinheiten die enge Assoziation zwischen intrazellulär-membranproximalen Bereichen der beiden Untereinheiten aufhebt (Tadokoro et al., 2003). Die resultierende extrazelluläre Konformationsänderung von einer abgewinkelten, geschlossenen zu einer aufrechten, offenen Konformation ermöglicht die Ligandenbindung (Lu et al., 2001; Takagi et al., 2001, 2002) (Abb. 1.4.1). Die Bindung selbst stabilisiert die offene Konformation des Dimers. Über das „outside-in signaling" werden dann wiederum Interaktionen um die zytoplasmatischen Domänen der Untereinheiten reguliert (Calvete, 2004). Neben anderen Signalprozessen wird so insbesondere die lokale Zytoskelett-Reorganisation zur Manifestierung bzw. Maturierung von Adhäsionen induziert. Als zweite Integrin-regulatorische Ebene ist hier deren lokale Kondensation („Clustering") von Bedeutung. Die *Avidität* von Integrinen reguliert über deren lokale Dichte auf der Zelloberfläche die Topologie extrazellulärer Liganden-Bindungsstellen (Li et al., 2003a). Dabei scheint die fokale Kondensation wiederum von der (offenen) Konformation der Integrine abzuhängen, die eine laterale Homo-Oligomerisierung von α- (Dimere) sowie β-Untereinheiten (Trimere) begünstigt (Li et al., 2003a). Die Kondensation von Integrinen führt so extrazellulär zu einer Verdichtung hochaffiner Bindungsstellen („inside-out"), intrazellulär („outside-in") werden die Maturierung von Adhäsionen sowie assoziierte Signalprozesse induziert. Beide Prozesse begünstigen sich gegenseitig auf Ebene der Aviditäts-, wie auch der Affinitäts-Regulation.

1.2.2 Adapter- und Signalproteine

Derzeit sind über 60 Fokalkontaktproteine bekannt, die fast durchgehend multiple Bindungspartner aufweisen (Zamir und Geiger, 2001; Lo, 2006). Darunter sind Adapterproteine, die Integrine und F-Aktin direkt oder indirekt miteinander verbinden und so mechanische Kräfte übertragen können. Hierzu gehören unter anderem Talin, Vinculin, α-Aktinin oder Tensin. Weiterhin finden sich Adapter- oder Gerüstproteine, die Signalprozesse regulieren, etwa Paxillin oder p130Cas, sowie Kinasen, Phosphatasen und andere Enzyme, die Signalprozesse aktiv steuern. Die funktionellen Hintergründe einzelner Interaktion sind vielfach nur unzureichend verstanden. Zudem zeigen sich viele der hauptsächlich in Zellkultur untersuchten Prozesse variabel in Bezug auf Zelltyp und experimentellen Ansatz.

Einige wesentliche Interaktionen um die Bildung von Adhäsionsstrukturen in zweidimensionaler Zellkultur, deren Dynamik und Adhäsivität sollen hier erwähnt werden. Essentiell zu Beginn der Adhäsionsbildung scheint die Src- oder FAK-vermittelte Y^{649}-Phosphorylierung von Phosphatidyl-Inositol-4-phosphat-5-Kinase1γ (PIPK1γ) zu sein, die eine Interaktion von PIPK1γ und Talin sowie deren Membrantranslokation ermöglicht (Ling et al., 2003; Ling et al., 2002). Die Phosphatidyl-Inositol-(4,5)-bisphosphat (PIP_2) abhängige Bindung von Talin aktiviert das Integrin-Dimer (Tadokoro et al., 2003). Weiterhin ermöglicht Talin eine direkte mechanische Kopplung von F-Aktin und Integrinen (Giannone et al., 2003; Jiang et al., 2003). Wichtiger Bindungspartner von Talin ist Vinculin, dass wahrscheinlich die Verbindung zwischen Aktin und Integrinen über die Bindung an F-Aktin und Talin verstärkt (Galbraith et al., 2002; Cohen et al., 2006; Saunders et al., 2006). Vinculin bindet eine Vielzahl weiterer Proteine wie etwa Paxillin, Arp 2/3, α-Aktinin oder PKCα (Wood et al., 1994; DeMali et al., 2002; Bois et al., 2006; Ziegler et al., 2002; Weekes et al., 1996) und ist zudem PIP_2-reguliert (Gilmore und Burridge, 1996; Chandrasekar et al., 2005). Möglicherweise bietet es so eine Signalintegrationsstelle zur Regulation der F-Aktin-Integrin-Kopplung (DeMali, 2004; Bakolitsa et al., 2004). Negativ reguliert wird die Talin-vermittelte F-Aktin-Integrin Verbindung bzw. die Halbwertszeit fokaler Adhäsionen unter anderem durch die Calpain-vermittelte Proteolyse von Talin (Franco et al., 2004). Paxillin ist ein weiteres Adapterprotein, das als Gerüstprotein besonders für die dynamische Regulierung von Fokal-Adhäsionen wichtig ist. Abhängig besonders von Serin/Threonin-Phosphorylierung durch MAP-Kinasen (Mitogenic activated protein kinases), Protein-Kinase C oder PAK3 (p21 activated kinase) erfolgt die Rekrutierung von Paxillin in Zell-Matrix-Adhäsionen (Brown und Turner, 2004). Verstärkt abhängig von der Paxillin Tyrosin-Phosphorylierung durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, Src oder FAK (Focal adhesion kinase) erfolgt die Assemblierung verschiedener Signalprotein-Komplexe. Unter anderem gehören hierzu DOCK180/Cas/Crk- (Zaidel-Bar, 2005; Birge et al., 1993) und GIT/PIX/PAK-Komplexe (Nayal et al., 2006; Nishiya et al., 2005). Sie sind zentrale Regulatoren des Rho-GTPase-Systems und nehmen so Einfluss auf Zytoskelett-Reorganisation und Migration. Die Assoziation von Paxillin, p130Cas und Src/FAK reguliert auch die Halbwertszeit von Adhäsionen, unter anderem über die FAK-abhängige Rekrutierung von Calpain2 (Carragher et al., 2003). Weiterhin konkurrieren FAK und Vinculin möglicherweise um die Paxillin-Bindung und regulieren so die Halbwertszeit von Fokalkontakten bzw. die Adhäsion antagonistisch (Subauste et al., 2004). FAK und Src vermitteln adhäsionsabhängig jedoch auch proliferations-, differenzierungs- oder zellüberlebens-relevante Signalprozesse über Erk (Extracellular signal

related kinase), PI3-Kinase (Phosphoinositol-3-Phosphat) oder JNK (c-Jun N-terminal kinase) (Schlaepfer et al., 1999). Paxillin hat somit integrative und differenzierende Funktion an der Schnittstelle von Adhäsion und Signaltransduktion (Schaller, 2001; Turner, 2000). Eher strukturelle bzw. kraftübertragende Funktion wird dem F-Aktin bündelnden und Integrin-bindenden Protein α-Aktinin zugerechnet (Otey und Carpen, 2004). Es ist in verschiedensten Zytoskelett- und Matrix-Adhäsionsstrukturen lokalisiert, sehr ausgeprägt aber in maturierten Fokal-Kontakten, assoziiert mit den Enden von kontraktilen Stressfasern zu finden, in denen es zudem die Aktin-Filamente bündelt. Tensin ist vornehmlich in den zentraler gelegenen, fibrillären Adhäsionen lokalisiert (Zamir et al., 2000, 1999). Unklar ist, ob es eher als mechanische Verbindung von F-Aktin und Integrinen fungiert oder ähnlich wie Paxillin eine Plattform zur Assemblierung von Signalkomplexen bildet (Torgler et al., 2004; Lo, 2006). Die funktionelle Einordung des ILK/PINCH/Parvin-Komplexes erscheint derzeit ebenfalls noch schwierig. Prinzipiell scheinen aber sowohl eine Rolle bei der Kraftübertragung, über die ILK/Parvin-vermittelte F-Aktin-Integrin-Verbindung möglich, als auch Funktionen als Signalplattform. Hierauf wird jedoch in den Abschnitten 1.3 und 1.4 näher eingegangen.

1.2.3 Morphologie und Funktion von Zell-Matrix-Adhäsionen *in vitro*

Die Bildung fokaler Adhäsionen ist sehr gut auf rigiden Substraten in zweidimensionaler Zellkultur zu beobachten. Es lassen sich Fokal-Komplexe mit einer Größe im µm-Bereich von elongierten Fokal-Adhäsionen sowie längeren, fibrillären Adhäsionen unterscheiden (Zaidel-Bar et al., 2003; Zaidel-Bar et al., 2004). Die hoch dynamischen Fokal-Komplexe sind in peripheren Bereichen der Zelle zu finden. Neben Basiskomponenten wie Talin oder Vinculin zeigen sie ausgeprägte Tyrosin-Phosphorylierung, was den dynamischen Um- bzw. Aufbau der Kontakte widerspiegelt (Zaidel-Bar et al., 2003). Unter Zugkraft, etwa durch den zentripetalen Aktin-Fluss, maturieren sie zu Fokal-Adhäsionen (Galbraith et al., 2002; Zamir et al., 2000). Dies zeigt sich in einem Größenwachstum in Richtung der Kraft (Balaban et al., 2001; Riveline et al., 2001). Dementsprechend sind Fokal-Adhäsionen an stärkere, meist kontraktile Aktomyosin-Bündel (Stressfasern) gekoppelt. Der enge Zusammenhang zwischen Kontraktilität und Dynamik von Fokal-Komplexen bzw. -Adhäsionen zeigt sich bei Inhibition der Kontraktilität, was zur Auflösung der Kontakte führt (Zamir et al., 2000). Die weitere Reifung zu fibrillären Adhäsionen im Zentrum der Zelle wird begünstigt durch vergleichsweise flexible Substrate wie Fibronektin (Katz et al., 2000). Begleitet wird sie dementsprechend von einem Übergang von β3- zu β1-Integrin (Pankov et al., 2000). Die Integrin-F-Aktin-Verbindung fibrillärer Adhäsionen wird hauptsächlich durch Tensin

vermittelt (Zamir et al., 1999). Weiter kommt es hier zum fibrillären Umbau der Fibronektin-Matrix. Die Maturierung fibrillärer Adhäsionen aus Fokal-Kontakten erfolgt ebenfalls kraftabhängig, endogen oder exogen, während im Unterschied zu Fokal-Kontakten und –Komplexen der Erhalt fibrillärer Adhäsionen relativ unabhängig von Kontraktilität ist (Zamir et al., 2000, 1999).

Der enge Zusammenhang zwischen Kraftübertragung/Mechanik und Maturierung von Zell-Matrix-Kontakten sowie der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts wird besonders deutlich bei Betrachtung der Integrin-abhängigen *Migration* von Zellen. Die an der Front der Zelle, unter dem Lamellipodium entstehenden, initialen Adhäsionen reifen zu Fokal-Komplexen, die dann im Übergangsbereich zur Lamelle unter Kopplung an kontraktile Aktomyosin-Bündel weiter maturieren zu Fokalkontakten. Gupton et al. (2003) haben gezeigt, dass die treibende Kraft der Migration nicht vom Lamellipodium, sondern von der Aktomyosin-vermittelten Kontraktion im Bereich der Lamelle ausgeht, die an maturierten Fokalkontakten bzw. hinter dem Lamellipodium als Widerlager ansetzt. Die Dynamik des Lamellipodiums ist in erster Linie nicht Aktomyosin-abhängig sondern basiert auf Aktin-Polymerisation (Danuser und Waterman-Storer-paper, 2003). Wenig charakterisiert sind in diesem Zusammenhang die unter Aktin-Polymerisation im Bereich des Lamellipodiums auf das Substrat ausgeübten Kräfte bzw. deren Bedeutung für die Reifung initialer Adhäsionen zu Fokalkomplexen. Zumindest wird besonders initialen Substratkontakten und Fokal-Komplexen *mechanosensorische Funktion* zugeordnet, was eine solche Funktion auch für das Lamellipodium wahrscheinlich macht (RPTPα, Vogel und Sheetz, 2006). Die für die koordinierte Funktion von Lamellipodium und Lamelle nötige *Reorganisation des Zytoskeletts* ist ebenfalls stark abhängig von der lokal unterschiedlichen Substratbindung über Fokal-Komplexe bzw. –Kontakte. Zentrales regulatorisches System sind hier die Rho-GTPasen (DeMali et al., 2003). Neben der bereits erwähnten Rolle von Paxillin für die Assemblierung Rho-GTPase-regulierender Komplexe wurde auch für Integrin-linked kinase (ILK) regulatorische Funktionen beschrieben (Grashoff et al., 2004). Rho-Aktivität stimuliert insbesondere die Bildung kontraktiler Stressfasern, während Rac-Aktivität für die Bildung von Lamellipodien und Cdc42 für die Bildung der fingerförmigen Filopodien wichtig sind (Rodriguez et al., 2003). Neben weiteren adhäsionsabhängigen Signalprozessen wie der Regulation von Proliferation oder Differenzierung ist auch die Unterdrückung von Anoikis, des durch fehlenden Substratkontakt induzierten Zelltodes, essentiell abhängig vom Adhäsionsstatus der Zelle. Wesentliche Schaltstelle ist hier der Phosphatidyl-Inositol-3-

Phosphat-Kinase (PI3-Kinase)/Proteinkinase B/Akt-Signaltransduktionsweg (Frisch und Screaton, 2001).

Podosomen sind weitere Aktin-basierte *in vitro* Zell-Matrix Kontakte, deren mögliche adhäsiven Funktionen jedoch weitgehend unklar sind. Die mittels totaler interner Reflexionsfluoreszenz- (TIRF) Mikroskopie nachweisbare enge Substratbindung sowie Integrin-Lokalisation deuten dies aber zumindest an (Linder und Äpfelbacher, 2003). Typischerweise zeigen sie myeloide Zellen wie Dendritische Zellen, Makrophagen oder Osteoklasten, sie können jedoch auch in einer Reihe anderer Zellen, beispielsweise Endothelzellen oder glatten Muskelzellen induziert werden (Gimona et al., 2003; Moreau et al., 2003). Sie bestehen aus einem runden Aktin-haltigen Kern, der umgeben ist von einem Ring aus Plaque-Proteinen wie Talin, Vinculin oder Paxillin sowie Integrinen (Linder und Kopp, 2005). Sie haben einen Durchmesser von 0,5-1 µm und reichen 0,2-0,4 µm tief in die Zelle hinein. Der komplexe Aufbau lässt auf weitere Funktionen schließen. So scheinen Podosomen der *Matrix-Degradation* zu dienen. Sie zeigen eine Anreicherung von Matrix-Metalloproteinasen (Sato et al., 1997; Delaisse et al., 2000). Auch wurde Matrix-Degradation im Bereich von Podosomen beobachtet (Burgstaller und Gimona, 2005; Osiak et al., 2005). Eine Matrix-Degradation könnte Dendritischen Zellen oder Monozyten bei der Migration durch Gewebe, eventuell durch Basalmembranen behilflich sein. Nachvollziehbar ist in diesem Zusammenhang die morphologische und biochemische Verwandtschaft zu Invadopodien wie sie in metastasierenden Zellen zu beobachten sind (Buccione et al., 2004). *In vivo* sind Podosomen als Adhäsionsstrukturen zwischen Osteoklasten und der mineralisierten Knochenmatrix zu beobachten (Jurdic et al., 2006).

Unterschiede in Morphologie und Funktion von Zell-Matrix-Adhäsion zwischen zwei- und dreidimensionaler Zellkultur sind vergleichsweise wenig untersucht. Cukierman et al. (2001) jedoch haben morphologische und funktionale Differenzen der Zell-Matrix-Adhäsionen von Fibroblasten auf zweidimensionalem Fibronektin-Substrat und in dreidimensionalen, von Zellen sezernierten Matrizes unter verschiedenen Bedingungen beschrieben. So zeigten Zellen in dreidimensionaler Matrix vergleichsweise lange (20 µm), dünne Adhäsionsstrukturen mit geringem Anteil Phospho-FAK. Die Zellen zeigten eine verstärkte Adhäsion, erhöhte Migrationsgeschwindigkeit und Proliferation. Zudem schienen diese Prozesse stärker als auf zweidimensionalem Substrat abhängig vom Fibronektin-Rezeptor $\alpha 5\beta 1$-Integrin. Dementsprechend waren für Morphologie und Funktion dieser 3D-Adhäsionen neben der molekularen Komposition und Topografie der Matrix auch deren mechanische Eigenschaften entscheidend. Der enge Zusammenhang zwischen zellulärer Mechanik und Signaltransduktion

zeigte sich hiermit in Substraten, die *in vivo*-Umgebungen deutlich ähnlicher sind sogar noch stärker als in zweidimensionaler Zellkultur.

In vitro beobachtete Integrin-abhängige Zell-Matrix-Adhärenzen zeigen somit in Abhängigkeit von ihrer Morphologie eine enorme funktionelle Vielfalt. Über die Kopplung mechanisch-adhäsiver und Signal-Funktionen regulieren sie eine Vielzahl von Prozessen wie die Reorganisation des Zytoskeletts, Mechanotransduktion, Zell-Migration, Matrix-Umbau, Zell-Überleben, Proliferation oder Differenzierung.

1.3 Integrin-vermittelte Zell-Matrix-Adhäsion *in vivo*

Die *in vivo*-Relevanz funktionierender Integrin-vermittelter Zell-Matrix-Adhäsion verdeutlichen die oft starken oder letalen Phänotypen der Funktionsverlustmutanten von Integrinen bzw. assoziierten Proteinen in der Maus, sowie auch in *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* (Bouvard et al., 2001; Hynes, 2002; Brown, 2000). Jedoch zeigt eine Vielzahl von Integrin- oder Fokalkontaktprotein-Mutanten auch nur sehr schwache, spezifische oder scheinbar keine Phänotypen, was auf funktionelle Redundanz bzw. Kompensation bei Integrinen sowie Fokalkontaktproteinen schließen lässt. Die Möglichkeit, dass eine Zelle essentielle Funktionen mehrfach absichert, anstatt sie nur einem Gen zu übertragen erscheint hier plausibel. So gibt es zumindest bei den Fokalkontaktproteinen in fast jeder Gen-Familie eine Isoform oder eine Kombination mehrerer mit sehr starkem Deletions-Phänotyp, was die grundlegende Bedeutung der meisten Familien von Adhäsionsproteinen belegt (Lo, 2006). Hier kommen verstärkt gewebespezifische Anforderungen an die Integrin-vermittelte Zell-Matrix-Adhäsion zum Tragen, so dass eine Deletion einzelner Isoformen unter standardisierten Haltungsbedingungen nicht zwingend zu einem spontanen Phänotyp führen muss. Da die Invertebraten *D. melanogaster* und *C. elegans* wesentlich weniger Integrine haben und zudem meist nur eine Isoform intrazellulärer Fokalkontaktproteine sind Redundanz bzw. Kompensations-Probleme deutlich seltener. Deshalb eignen sie sich besonders zur Charakterisierung grundlegender Funktionen der untersuchten Proteine. Neben grundlegenden Funktionen sind es jedoch genau solche gewebespezifischen Funktionen von Zell-Matrix-Adhäsionsproteinen, die die Entwicklung höherer Organismen begleitet haben. Deren Charakterisierung bedarf daher geeigneter Untersuchungsansätze *in vivo*, insbesondere im Fall von Zell-Matrix-Adhäsion, da die extrazelluläre Matrix in Zellkultur in ihrer molekularen Zusammensetzung, Topografie und mechanischer Beschaffenheit grundlegend von fast allen *in vivo*-Substraten abweicht.

In den folgenden Abschnitten soll daher gewebespezifisch auf die Phänotypen von Integrin- bzw. Fokalkontaktprotein-Deletionsmutanten eingegangen werden. Den in der Arbeit durchgeführten Analysen entsprechend sind dies das vaskuläre System, Herz und Skelettmuskel sowie hämatopoetische Zellen. Zudem soll ein Abriss einiger Deletionsmutanten in *D. melanogaster* und *C. elegans* gegeben werden.

1.3.1 Studien an Invertebraten

Eine ausgeprägte lokale Kondensation von Integrinen bzw. eine mit Fokalkontakten vergleichbare Morphologie von Zell-Matrix-Adhärenzen ist *in vivo* eher selten zu beobachten. In erster Linie sind Gewebe mit vergleichsweise starker mechanischer Beanspruchung beschrieben, wie Muskelgewebe oder Epithelien. In basalen Keratinozyten der Maus haben Fuchs et al. (1997) die Bildung fokaler Kontakte zur Basalmembran beschrieben. Die basalen Zellen der Flügel-Imaginalscheiben in *Drosophila melanogaster* zeigen ebenfalls Fokalkontakt-ähnliche Strukturen (Brown et al., 2002). Auch die epidermalen Verankerungspunkte der Muskulatur im *D. melanogaster* Embryo stellen, ähnlich den hypodermalen Anheftungspunkten der Körperwandmuskulatur in *Caenorhabditis elegans* („dense bodies“) *in vivo*-Homologe von Fokalkontakten dar (Francis und Waterston, 1985; Hresko et al., 1994). Die genannten Strukturen sind in erster Linie vor dem Hintergrund mechanischer Adhäsionsfunktion untersucht.

Der überwiegende Teil von Deletionsmutanten von Integrinen und Fokalkontaktproteinen zeigt Defekte in der Organisation dieser Gewebe oder Letalität, so die myospheroid-Mutante von *D. melanogaster*. Sie ist eine Deletionsmutante des mit der Vertebraten-β1/β2/β7-Integrin-Gruppe eng verwandten βPS-Integrins. Auffälligster Phänotyp ist hier die fehlende Adhäsion der Körpermuskulatur an die der Kutikula unterliegenden Epidermiszellen (Brown, 1994, 1993; Prokop, 1998; Wright, 1960). Sehr ähnlich tritt dieser Phänotyp bei der korrespondierenden αPS2-Untereinheit, ebenso wie bei Deletionsmutanten der Talin- oder ILK-Homologe in *D. melanogaster* auf (Brown, 2002, 1994; Zervas et al., 2001). Interessanterweise zeigt die Deletion von Vinculin keinen derartigen Phänotyp (Alatortsev et al., 1997). Ähnlich ist die Deletion von βpat-3/Integrin in *C. elegans* letal, in Verbindung mit Defekten in der Assemblierung von „dense-bodies“ und M-Linien bzw. einem Muskelkontraktions-Defekt (Williams and Waterston, 1994). Auch hier zeigen die Deletionen von αpat-2/Integrin sowie der ILK-, PINCH-, Parvin- und Mig-2/Kindlin-Homologe vergleichbare Phänotypen (Williams und Waterston, 1994; Mackinnon et al., 2002; Hobert et al., 1999; Lin et al., 2003; Rogalski et al., 2000). Wenngleich schwächer, resultiert auch der

Verlust von Vinculin in einem ähnlichen Phänotyp (Barstead et al., 1991). Für Talin ist lediglich beschrieben, dass seine Rekrutierung zu „dense-bodies“ Integrin-abhängig ist (Moulder et al., 1996). Die Assemblierung der „dense-bodies“ sowie auch der M-Linie in *C. elegans* (Williams and Waterston, 1994) hängt essentiell von der Expression von unc-52 ab. Das Homolog zur Basalmembrankomponente Perlecan ist für die korrekte Lokalisation von βpat-3/Integrin essentiell (Francis und Waterston, 1991; Williams und Waterston, 1994; Hresko et al., 1994; Rogalski et al., 1993). Ähnlich wie bei der Bildung fibrillärer Adhäsionen in zweidimensionaler Zellkultur (vgl. 1.2), zeigt sich hier erneut ein wichtiger Zusammenhang von Matrix-Assemblierung und β1-Integrin-Funktion. Dies wurde darüber hinaus auch in der frühen Embryonalentwicklung der Maus gezeigt (vgl. 1.3.2). Neben der essentiellen Funktion dieser Integrin-vermittelten Zell-Matrix-Adhärenzen für die mechanische Adhäsion zeigt die Ähnlichkeit der einzelnen Deletions-Phänotypen in *D. melanogaster* wie auch *C. elegans* die Bedeutung des einzelnen Proteins als essentieller Bestandteil der jeweiligen Zell-Matrix-Adhärenz.

1.3.2 Embryonalentwicklung der Maus

Das ubiquitär exprimierte β1 Integrin stellt mit 12 Dimeren, darunter Laminin-, RGD- und Kollagen-Rezeptoren die größte Gruppe von Integrinen (Hynes, 2002). Dementsprechend zeigen β1-Integrin defiziente Mäuse den weitaus stärksten Phänotyp unter den Integrin-Mutanten. Die Embryonen sterben kurz nach der Implantation in die Uteruswand, da die innere Zellmasse der Blastozysten abstirbt (E6.5, Abb. 1.3.2) (Fässler und Meyer, 1995). Untersuchungen an embryoiden Körpern (EB), einem *in vitro*-Modell für die Keimblattdifferenzierung haben unter Laminin-γ_1-Defizienz gezeigt, dass für eine normale Kavitation die Assemblierung der Basalmembran durch das primitive Endoderm der Blastozyste entscheidend ist (Li et al., 2003b; Murray et al., 2000). Sie ermöglicht die Differenzierung von benachbarten Zellen der inneren Zellmasse in Ektoderm-Zellen, was für die Induktion von Apoptose in der inneren Zellmasse und die Kavitation nötig ist (Coucouvanis und Martin, 1995). Wie Laminin γ_1-defiziente EB zeigen β1-Integrin-defiziente EB keine Differenzierung bzw. Polarisierung des Ektoderms und keine Kavitation (Aumailley et al., 2000). Da die exogene Zugabe von Laminin zu einer Ektoderm-Polarisierung sowie zur Kavitation führt, ist der wahrscheinlichste Grund für die Letalität unter β1-Integrin-Defizienz eine defekte Basalmembranassemblierung aufgrund gestörter Laminin γ_1-Sekretion des primitiven Endoderms. Die Deletion von α5-Integrin führt zu Letalität an E9.5-10. Gründe sind vaskuläre und Mesoderm-Defekte, sowie Apoptose von Neuralleisten-Zellen (Yang et

al., 1993; Goh et al., 1997). Der Phänotyp ähnelt dem unter Fibronektin-Defizienz, ist jedoch schwächer. Die Embryonen sterben an E8.5 an Defekten beim Neuralrohr-Verschluss, im kardiovaskulären System und bei der Somitenbildung (George et al., 1993) (vgl. 1.3.3). α4-Integrin-defiziente Embryonen zeigen vaskuläre, Herz- und Schädel-Defekte und sterben zum Teil zwischen E9.5-11.5 aufgrund mangelnder Fusion von Chorion und Allantois. Überlebende Embryonen sterben wenig später an Herz-Ödemen. Von den α4β1-Integrin-Liganden Fibronektin und V-CAM zeigt V-CAM eine größere Ähnlichkeit mit der α4-Defizienz, weshalb die Defekte wahrscheinlich hier eher in mangelnder V-CAM-Interaktion begründet liegen (Gurtner et al., 1995; Kwee et al., 1995). αv-defiziente Embryonen sterben zum größten Teil aufgrund mangelnder Interaktion von embryonalen und maternalen Gefäßen in der Labyrinth-Schicht der Plazenta zwischen E10 und E12 sowie perinatal an Blutungen und Gaumenspalten (Bader et al., 1998; McCarty et al., 2002). Dieser Phänotyp ähnelt ebenfalls dem unter Fibronektin-Defizienz. α5/αv-doppeldefiziente Embryonen jedoch zeigen einen stärkeren Phänotyp als Fibronektin-defiziente, so dass eine fehlende Fibronektin-Interaktion wengleich ein Hauptgrund, so doch nicht der alleinige Grund für die α5- und αv-Defekte sein kann (Yang et al., 1999).

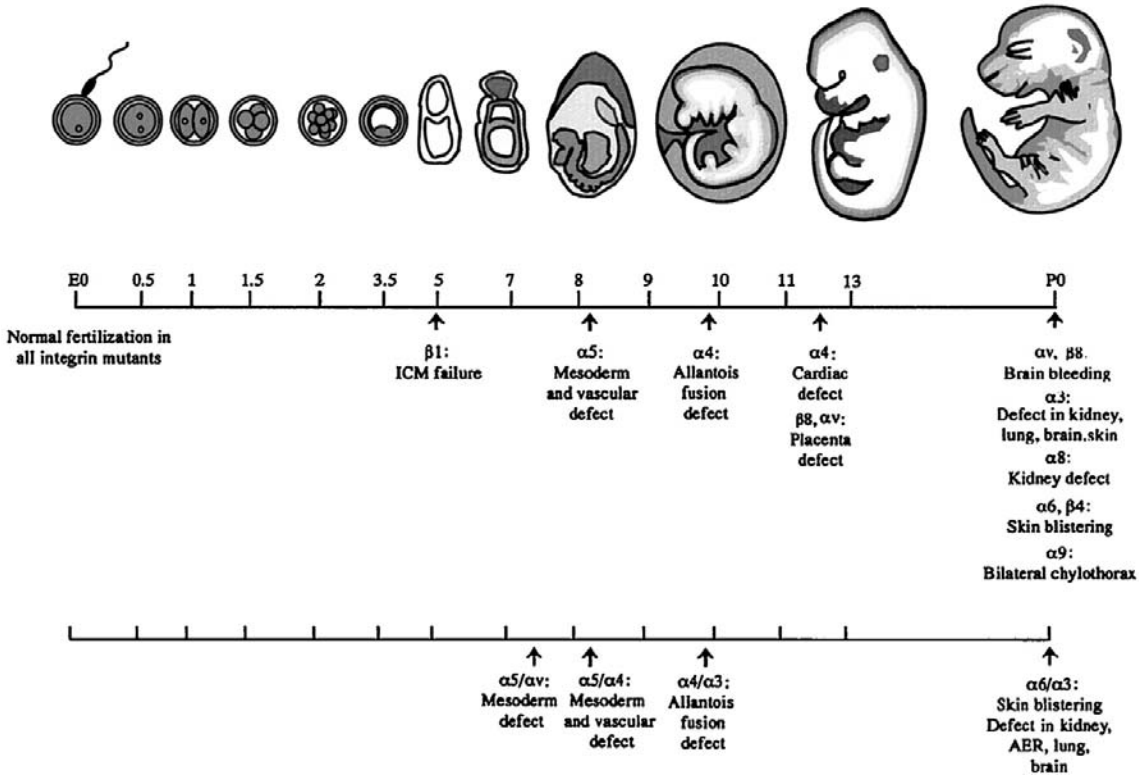


Abb. 1.3.2: Integrin-Deletionsphänotypen während der Mausentwicklung (nach Bouvard et al., 2001)

Die Deletion verschiedener Fokalkontaktproteine zeigt weniger distinkte Phänotypen, was bei Interaktionen mit einer großen Zahl unterschiedlicher Integrin-Dimere verständlich erscheint. So sterben Vinculin-defiziente Embryonen zwischen E8 und E10 an unterschiedlichen, in erster Linie wohl migrations-bedingten Defekten. Wesentlich sind hier eine stark beeinträchtigte Morphologie von Herz und Zentralnervensystem (Xu et al., 1998). Talin-Defizienz führt zu Letalität zwischen E8.5 und E9.5 aufgrund einer stark gestörten Gastrulation (Monkley et al., 2000). Die Defekte in der Organisation verschiedener Gewebe rührt wahrscheinlich ebenfalls von einer gestörten Migration besonders des Mesoderms her. Die Deletion von Paxillin zeigt einen ähnlichen Phänotyp wie die von Fibronektin. Die Tiere sterben zwischen E8.5 und E9.5 an verschiedenen Defekten, besonders im Herz und bei der Somitenbildung (Hagel et al., 2002). Die Deletionen von ILK und PINCH wiederum zeigen mit peri-implantär letalen Phänotypen noch frühere Letalität als andere Fokalkontaktproteine (Sakai et al., 2003; Li et al., 2005). Die vergleichsweise große Ähnlichkeit zur β1-Integrin-Deletion deutet eine enge funktionale Beziehung zwischen den Proteinen an. Dies wird in Abschnitt 1.4 näher besprochen.

1.3.3 Vaskuläres System

Prinzipiell lässt sich die Bildung des Gefäßsystems in zwei Prozesse unterteilen, Vaskulogenese, die *de novo*-Bildung von Gefäßen und Angiogenese, den Umbau bereits bestehender Gefäße zur Anpassung an gewebespezifische Bedingungen (Gilbert, 2000). Zu Beginn der embryonalen Vaskulogenese differenzieren Zellen des splanchnischem Mesoderms in Hämangioblasten, die sowohl Vorläufer von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen als auch Vorläufer von Angioblasten darstellen. Unter Aggregation von Hämangioblasten in sogenannte Blutinseln kommt es zur Differenzierung der Zellen, zentral in den Blutinseln zu hämatopoetischen Stammzellen, peripher zu Angioblasten. Letztere bilden ein Netzwerk von Röhren, den primären Kapillarplexus. Dieser wird dann während der Angiogenese reorganisiert in ein geordnetes Netzwerk mit Kapillaren, Arterien und Venen unterschiedlicher Größe zur optimalen Blutversorgung des Organs. Extraembryonal erfolgen analog Vaskulogenese und Angiogenese der Dottersackgefäße.

Im Hinblick auf die Abhängigkeit von Integrin-vermittelter Zell-Matrix-Adhäsion scheint die korrekte Ausbildung des Gefäßystems besonders auf Fibronektin-Interaktion angewiesen zu sein (Bouvard et al., 2001). Dies zeigt sich bei einem genaueren Vergleich Fibronektin-defizienter mit α5-Integrin-defizienten Embryonen. α5β1-Integrin stellt den wichtigsten Fibronektin-Rezeptor dar. α5-Integrin-defiziente Embryonen haben Defekte in der

embryonalen sowie der Dottersack-Vaskularisierung (Yang et al., 1993). Im Dottersack finden Hämatopoese und die Bildung von Blutinseln statt. Jedoch kommt es dann zur Ablösung des Endoderms vom Mesoderm, was die Ausbildung eines primären Plexus verhindert, die Blutzellen treten aus den Gefäßen aus. Die Ablösung der beiden Keimblätter könnte sich in mangelnder Zell-Matrix-Adhäsion begründen. Herz und weitere embryonale Gefäße werden unter α5-Integrin-Defizienz gebildet, sind jedoch geschwollen und undicht. Der Verlust von Fibronektin führt zu einem völligen Verlust der Dottersackvaskulatur, sowie, abhängig vom genetischen Hintergrund, zu einer Fehlentwicklung des Herzens durch Fehlorganisation von Endo- und Myokard (C57Bl/6) bzw. einem Fehlen des Herzens (sv/129) (George et al., 1993, 1997). Die Bildung von Gefäßen ist aufgrund mangelnder Interaktion von Endothelzellen und Mesoderm grundlegend gestört. Den grundlegenden vaskulogenetischen Defekten unter Fibronektin-Defizienz steht eine intakte Initiierung der Vaskulogenese unter α5-Defizienz gegenüber, jedoch verhindert die mangelhafte Interaktion zwischen Endothel- und Mesoderm-Zellen die korrekte Ausbildung der Gefäße. Ähnlich zeigen Embryonen defizient für VEGF-R1 oder defizient in der Angiopoetin-1-Signaltransduktion Vaskulogenesedefekte aufgrund fehlerhafter Endothel-Mesoderm-Interaktionen (Fong et al., 1995; Sato et al., 1995; Suri et al., 1996). α4-Integrin-defiziente Embryonen zeigen ebenfalls vaskuläre Defekte als wichtigste Todesursache, jedoch milder als unter α5-Integrin-Verlust. Die meisten Tiere sterben aufgrund fehlender Verbindung von Allantois und Chorion, später an Herz-Ödemen aufgrund mangelhafter Adhäsion von Epi- und Myokard. Konsistent mit grundlegenden Funktionen von Fibronektin/Integrin-Interaktionen für die Vaskulogenese haben Analysen an β1-Integrin-defizienten embryoiden Körpern eine verzögerte Vaskulogenese gezeigt (Bloch et al., 1997). α1-Integrin defiziente Embryonen zeigen eine normale Vaskulogenese und embryonale Angiogenese, jedoch eine verringerte Tumorangiogenese, begründet in einer Inhibition der Endothelzell-Proliferation aufgrund von Überexpression der Matrix-Metalloproteinasen 7 und 9 (Gardner et al., 1996). Die Defizienz von αv-Integrin, das eine Reihe von RGD- (Arg-Gly-Asp) Rezeptoren stellt, zeigt Letalität aufgrund eines Plazenta-Defektes (Bader et al., 1998). Jedoch sind die vaskulären Defekte der Embryonen ansonsten vergleichsweise gering, so dass 20% der Tiere sogar ohne sichtbare Gefäßdefekte geboren werden. Dies stellt eine wesentliche Funktion von αv-Integrin für Vaskulogenese sowie auch Angiogenese in Frage. Dass verschiedene Vitronektin-Liganden ebenfalls recht schwache vaskuläre Phänotypen zeigen, deutet wiederum auf Fibronektin als zentralen Mediator Integrin-vermittelter Zell-Matrix-Adhäsion in der Entwicklung des Gefäßystems hin.

1.3.4 Herz und Skelettmuskel

Die Zell-Matrix-Adhärenzen in Herz- und Skelettmuskulatur sind vergleichsweise eng miteinander verwandt. Jedoch zeigen sie, entsprechend der unterschiedlichen funktionalen Anforderungen besonders an die Geometrie der Kraftübertragung zum Teil grundlegende Unterschiede in Morphologie und Funktion. Neben der Kraftübertragung kommen ihnen auch mechanosensorische Funktionen zu, die sehr unterschiedlich sein können. So müssen sie beispielsweise die hypertrophe Langzeit-Anpassung des Herzens oder die proliferative Antwort des Skelettmuskels an eine erhöhte Dauerbelastung regulieren. Der Zusammenhang von kraftübertragenden und Signaltransduktions-Funktionen ist in quergestreiften Muskelgeweben sehr eng.

Die Muskel-Sehnen-Verbindung oder myotendinose Übergangszone ist die wichtigste Zell-Matrix-Adhärenz des Skelettmuskels zur longitudinalen Kraftübertragung. Sie erstreckt sich von den distalen Enden des Muskels in das Gewebe hinein, wo die Muskelfasern über fingerförmige Membranfortsätze und -Einstülpungen den Kontakt zu den Sehnenfortsätzen herstellen (Trotter, 2002; Berthier und Blaineau, 1997). Die so vergrößerte Kontaktfläche zur Sehne ermöglicht die starke mechanische Belastung der Verbindung. Kostamere, die lateralen Adhärenzen zwischen subsarkolemmalen Z-Scheiben und dem Sarkolemma sind in Skelett- sowie Herzmuskulatur zu finden (Pardo et al., 1983). Sie übertragen ebenfalls einen Teil der longitudinalen Kräfte, lateral auf das Bindegewebe (Danowski et al., 1992). Zudem wird ihnen insbesondere mechanosensorische Funktion zugeschrieben (Brancaccio et al., 2006; Ervasti, 2003). In differenzierenden Myoblasten entstehen sie aus fokalkontaktähnlichen, länglichen Vorläuferstrukturen (Schröder et al., 2002). Im Herzmuskel sind neben Kostameren weiterhin die charakteristischen Glanzstreifen zu beobachten, welche hier die wesentlichen Überträger longitudinaler Kräfte sind. Sie zeigen eine stufenförmige Morphologie mit transversal und longitudinal zur Kontraktionsrichtung verlaufenden Bereichen. Sie sind keine reinen Zell-Matrix-Adhärenzen, die longitudinalen Abschnitte zeigen Desmosomen, die transversalen Bereiche Zell-Zell-Adhärenzcharakter (Perriard et al., 2003). Während Differenzierung bzw. Maturierung der Kardiomyozyten formieren sich die Glanzstreifen mit zunehmender Polarisierung der Kardiomyozyten. Mechanosensorische bzw. Mechanotransduktionsfunktionen dieser Adhärenzen dienen weniger einer Anpassung der Muskelkontraktion an akute, sondern eher an längerfristige Belastungsänderungen, so dass etwa bei erhöhter Dauerbelastung eine Muskelzunahme bzw. Stabilisierung des Gewebes erfolgen kann. Im Skelettmuskel kommt es hierbei zu einer verstärkten Proliferation. Da Kardiomyozyten postnatal nicht mehr proliferieren, kommt es hier zu einem hypertrophen

Aufbau von kontraktilem Gewebe sowie ähnlich dem Skelettmuskel zu einer Stabilisierung der Kardiomyozyten durch Unterdrückung von Apoptose (Heineke und Molkentin, 2006).
Die einzige dauerhaft in Herz- und Skelettmuskulatur exprimierte β-Integrin Untereinheit ist β1-Integrin, wobei von der embryonal primär exprimierten β1A-Spleissvariante postnatal in beiden Geweben auf die β1D-Spleissvariante gewechselt wird (Belkin et al., 1996). Ähnlich wird postnatal ein Großteil der embryonal exprimierten α-Untereinheiten (α1, α3, α4, α5, α6, α7, α9, αv) herunterreguliert, so dass im adulten Muskel hauptsächlich α7β1-Integrin exprimiert wird (Bouvard et al., 2001). Damit kommt es zu einem Umschalten von Laminin-, Fibronektin- und Kollagen-Rezeptoren in differenzierenden Myoblasten bzw. Kardiomyozyten zu primär Laminin-vermittelter Adhäsion (Laminin-2 und -4) in der adulten Homöostase von Herz- und Skelettmuskel, was eine Funktion der β1-Integrin/Fibronektin-Interaktion besonders für die Entwicklung quergestreifter Muskulatur und eine Funktion der α7β1-Integrin/Laminin-Interaktion primär in der Homöostase andeutet. Entsprechend zeigen α7-Integrin defiziente Mäuse keine Defekte in der Myogenese, postnatal aber eine progressive Muskeldystrophie (Mayer et al., 1997). Auch wurden humane und murine Mutationen im α7-Integrin- bzw. im Laminin α_2-Gen mit sehr ähnlichen Phänotypen beschrieben. Von den postnatal herunterregulierten α-Integrin-Untereinheiten ist nur für den chimären Verlust des Fibronektin-Rezeptors α5(β1)-Integrin ein Muskelphänotyp beschrieben. Hier kommt es ebenfalls zur Dystrophierung des Muskels, jedoch als Folge von beeinträchtigtem Zell-Überleben und reduzierter Adhäsion der Myoblasten (Taverna et al., 1998). Die Situation unter β1-Integrin-Defizienz ist nicht wirklich klar. Während Schwander et al. (2003) Defekte bei der Fusion von β1-Integrin-defizienten Myoblasten, sowie deren Sarkomer- und Kostamerassemblierung beschrieben haben, wurde in anderen Studien lediglich eine Verzögerung dieser Prozesse beobachtet (Hirsch et al., 1998; Rohwedel et al., 1998). Die Homöostase im adulten Skelettmuskel β1-Integrin-defizienter Chimären zeigte keine Hinweise auf Dystrophierung, dies kann bedingt sein durch einen Selektionsnachteil von β1-Integrin-defizienten Zellen sowie durch Kompensation durch Wildtyp-Zellen (Hirsch et al., 1998). Die unter Integrin-Defizienz entwickelten Muskeldystrophien sind im Vergleich zu Dystrophien mit Hintergrund im Dystroglykan-Komplex vergleichsweise mild. (Mayer, 2003). Die Situation im Herzen hingegen zeigt sich etwas anders. Während die Substitution der embryonal und adult exprimierten Spleissvariante β1D durch die rein embryonal exprimierte β1A-Variante im Herz zu einer kompensatorischen Hypertrophie führt, zeigt der Skelettmuskel dieser Tiere keine Dystrophierung (Baudoin et al., 1998). Mäuse mit konditionaler Deletion von β1-Integrin im Herz zeigen eine Fibrosierung des Herzens mit

dilatativer Kardiomyopathie (Shai et al., 2002). Ähnlich zeigt die transgene Expression eines dominant negativen β1-Integrins mit Substitution der Transmembran- sowie der extrazellulären Domäne durch CD4 abhängig von der Expressionsstärke des Transgens eine letale Hypertrophie mit fibrotischem Herz (Keller et al., 2001). Die herzspezifische Überexpression von konstitutiv aktivem α5-Integrin führt zu Kardiomyopathie und früher postnataler Letalität der Tiere (Valencik et al., 2001).

Während dem Dystroglykan-Komplex im Muskel primär kraftübertragende Funktion zugeschrieben wird, scheinen Integrinen in ihrer Eigenschaft zur adhäsionsabhängigen Signaltransduktion zudem wichtige Funktionen bei der Mechanotransduktion zu haben (Davies und Nowak, 2006; Brancaccio et al., 2006). Wie die genannten Phänotypen zeigen, sind diese in Skelett- besonders aber Herzmuskulatur für eine funktionierende Homöostase entscheidend. Unter Integrin-Defizienz kommt es zur fehlgesteuerten Prozessierung der an Kostamer, Z-Scheibe, Glanzstreifen oder Muskel-Sehnen-Verbindung mechanisch induzierten Signale (Brancaccio et al., 2006; Mayer, 2003; Ervasti, 2003). Mechanoresponsive Signalprozesse in quergestreiften Muskeln sind unter anderem PI-3-Kinase/Akt- oder GSK-3β-vermittelt, wie zahlreiche Studien, besonders an Herzen transgener Mäuse und konditionaler Deletionsmutanten gezeigt haben. So haben Condorelli et al. (2002) eine Hypertrophie des Herzens unter konstitutiver Aktivierung von Akt in transgenen Mäusen beschrieben. Auch wurde eine Zunahme bzw. Abnahme des Herz-Körper-Indexes in transgenen Mäusen mit konstitutiv-aktiver bzw. dominant-negativer PI-3-Kinase beobachtet (Shioi et al., 2000). PI-3-Kinase defiziente Mäuse zeigten zudem eine verstärkte Resistenz gegen die Isoproterenol-induzierte Hypertrophie des Herzens (Oudit et al., 2003). Mäuse mit transgener, konstitutiver Aktivierung von GSK-3β waren dementsprechend resistent gegen eine durch Calcineurin-Überexpression induzierte Hypertrophie (Antos et al., 2001; Molkentin et al., 1998). Die zentrale Funktion PI-3-K/Akt/GSK-3β-vermittelter Signale bei hypertropher Stimulierung und die Ähnlichkeit zu Phänotypen unter Integrin-Defizienz, insbesondere im Herzen, stellt die Frage, ob PI-3-K/Akt/GSK-3β-vermittelte hypertrophe Signalprozesse durch Integrine initiiert werden und wenn ja, wie sie Integrin-proximal prozessiert werden.

1.3.5 Hämatopoetische Zellen

Die Entwicklung des Hämatopoetischen Systems lässt sich grob in zwei Phasen einteilen. Die „primitive Phase“ (E8.5) verläuft in enger Interaktion mit der Vaskulogenese des Gefäßsystems (vgl. 1.3.3). Zellen des splanchnischen Mesoderms differenzieren zu

Hämangioblasten, welche nach Aggregation in Blutinseln unter anderem zu hämatopoetischen Vorläufern differenzieren. So wird eine erste Versorgung des sich entwickelnden Embryos mit Blutzellen bzw. ersten Gefäßen sichergestellt (Gilbert, 2000). Dauerhafte hämatopoetische Stammzellen werden jedoch erst später in der „adulten Phase“ gebildet. Hier werden pluripotente hämatopoetische Stammzellen im Aorta-nahen Mesoderm gebildet, die ab E10 beginnen, die fötale Leber zu besiedeln, das wichtigste blutbildende Organ im Embryo. Später werden zunehmend weitere hämatopoetische Organe wie Milz, Thymus oder Knochenmark besiedelt, bis in der adulten Maus das Knochenmark Sitz der hämatopoetischen Stammzellen wird. Ein funktionierendes Hämatopoetisches System erfordert jedoch ebenso die Zirkulation differenzierter hämatopoetischer bzw. Immunzellen. Hierfür sind verschiedene Integrin-abhängige Prozesse zentral, wie endotheliale Adhäsion, transendotheliale und interstitielle Migration sowie lokale Spezifizierung oder Differenzierung. Dementsprechend sind die Anforderungen an Integrin-vermittelte Adhäsion bei hämatopoetischen Zellen sehr spezialisiert.

Die Deletion von β1-Integrin im hämatopoetischen System zeigt, dass es für die Besiedlung der fötalen Leber durch hämatopoetische Stammzellen essentiell ist (Hirsch et al., 1996; Potocnik et al., 2000). Auch zeigen β1-Integrin-defiziente adulte hämatopoetische Stammzellen eine beeinträchtigte Besiedlung des Knochenmarks, wenngleich die adulte Hämotopoese funktionell ist (Bungartz et al., 2006). Grund für die Defekte scheint eine reduzierte endotheliale Adhäsion der Zellen zu sein (Potocnik et al., 2000). Weiterhin ist die transendotheliale Migration von Neutrophilen β1-Integrin abhängig (Johnston und Kubes, 1999; Taooka et al., 1999). Deletion von β7-Integrin führt unter anderem zu einem T-Zell-Migrationsdefekt, der eine Unterentwicklung der Peyer´schen Plaques des Darms zur Folge hat (Wagner et al., 1996). Zentrale α-Untereinheit für diese β1- bzw. β7-Integrin-vermittelten Funktionen scheint α4-Integrin zu sein. So zeigen α4-Integrin-defiziente T-Zellen eine beeinträchtigte Migration in die Peyer´schen Plaques (Arroyo et al., 1996). Weiterhin haben α4-defiziente Chimären verschiedene embryonale und postnatale Differenzierungsdefekte hämatopoetischer Vorläufer gezeigt, die *in vitro* nicht vergleichbar auftreten (Arroyo et al., 1999). Daher sind diese auf *in vivo*-Matrix-Interaktionen zurückzuführen, so dass diese Defekte, ähnlich denen in β1- bzw. β7-defizienten Zellen, sehr wahrscheinlich auch Folgen mangelnder Adhäsion sind. Das Leukozyten-spezifisch exprimierte β2-Integrin vermittelt über die Interaktion mit dem endothelialen Adhäsionsprotein I-CAM die nach dem Selektin-vermittelten Abrollen der Zellen feste Adhäsion, die eine anschließende Extravasation ermöglicht. Die Extravasation von Neutrophilen im Bereich von Entzündungsherden oder die

Besiedlung verschiedener Lymphgewebe durch Lymphozyten sind Prozesse, für die eine Abhängigkeit von β2-Integrin-Dimeren, etwa LFA-1 (αLβ2) gezeigt wurde (Ding et al., 1999; Berlin-Rufenach, 1999). Redundant reguliert von α4β1- und αLβ2-Integrin ist die Lokalisation von B-Lymphozyten in der Marginalzone der Milz (Lu et al., 2002). In der Marginalzone sitzen verschiedene Immunzellen als eine erste Barriere gegen lösliche Antigene, die hier mit dem Blutstrom von der weisen in die rote Pulpa übertreten und so abgefangen bzw. detektiert werden können. Die Adhäsion der B-Zellen dient hier deren korrekter Positionierung im Gewebe. Die Redundanzverhältnisse zwischen β1 und β7, sowie β2 Integrin vermittelter Adhäsion bei Extravasastions- bzw. Einwanderungsprozessen von Leukozyten sind jedoch nicht wirklich klar. Ein weiterer, stark Integrin-abhängiger Prozess ist die Aktivierung bzw. Aggregation von Blutplättchen. Als zentral für die Thrombin- oder Kollagen-induzierte Aggregation ist die Aktivierung von αIIbβ3-Integrin. Das aktivierte Dimer bindet Fibrinogen, so dass es unter Aggregation der Blutplättchen zur Thrombus-Bildung kommt (Shattil et al., 1999). Dementsprechend führt der funktionale Verlust von αIIbβ3-Integrin, etwa bei Patienten mit Glanzmann-Thrombasthenie oder in αIIb- sowie β3-Integrin-defizienten Mäusen, zu einer verzögerten Blutgerinnung (Hodivala-Dilke et al., 1999; Tronik-Le et al., 2000).

1.4 Der ILK/PINCH/Parvin- (IPP) Komplex

Neben eher klassischen Vertretern von Fokalkontakt lokalisierten Kinasen wie Src oder FAK ist Integrin-linked Kinase (ILK) in den vergangenen Jahren zunehmend in den Blickpunkt verschiedener Studien gerückt. Hierzu gehören neben grundlagenorientierten, zellbiologischen Arbeiten vor allem eine Vielzahl tumorrelevanter Studien sowie eine zunehmende Zahl von *in vivo*-Deletionsstudien in Maus, Zebrafisch und Invertebraten (Legate et al., 2006). Jedoch zeigen sich Befunde unterschiedlicher Studien zum Teil grundlegend verschieden, was in erster Linie die Kinase-Aktivität von ILK bzw. deren physiologische Relevanz betrifft. Vor diesem Hintergrund stellt sich zunehmend die grundsätzliche Frage nach einer Funktion von ILK als Kinase oder, eingebunden in den ILK/PINCH/Parvin- (IPP) Komplex, als Struktur- und Gerüstprotein (Zervas und Brown, 2002).

1.4.1 Komplexbildung

In einem „Yeast two-hybrid screen“ gegen die cytoplasmatische Domäne von β1-Integrin wurde ILK 1996 entdeckt (Hannigan et al., 1996). 2002 wurde mittels Ko-Immunpräzipitation

weiterhin eine Interaktion von ILK und β3-Integrin in Blutplättchen beschrieben (Pasquet et al., 2002). Invertebraten wie Vertebraten besitzen nur ein funktionelles ILK-Gen, das ubitquitär exprimiert wird. Das 52 kDa ILK-Protein besteht aus drei Domänen (Abb. 1.4.1). Dies sind zunächst vier N-terminal gelegene Ankyrin- bzw. Ankyrin-ähnliche Module. Ankyrin-Module sind weit verbreitete Protein-Protein-Interaktionsmotive, von denen jedoch relativ unklar ist, wie ihre Bindungsspezifität zustande kommt. Primär zeigen sie keine spezifischen Bindungssequenzen, vielmehr sind Reste, die an Interaktionen beteiligt sind über das ganze Molekül verteilt (Li et al., 2006). Eventuell ermöglicht eine elastische, federartige Struktur der Module die Regulation von Protein-Interaktionen, Faltung oder mechanischer Stabilität (Lee et al., 2006). C-terminal besitzt ILK eine Serin/Threonin-Kinase-Domäne. Diese zeigt ebenfalls die Mutation verschiedener konservierter Reste (Hanks et al., 1988). Neben einer Vielzahl anderer Bindungsstellen liegt auch die Integrin-Bindungsstelle in der Kinase-Domäne. Zwischen Ankyrin-Repeats und Kinase-Domäne liegt ein PH- (pleckstrin-homology) Domänen ähnliches Motiv, das mit der Kinase-Domäne teilweise überlappt. Als Ligand des PH-Domänen-Motivs wurde Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat (PIP_3) beschrieben (Delcomenne et al., 1998; Persad et al., 2000). 1999 wurde PINCH1 als weiterer ILK-Bindungspartner identifiziert (Tu et al., 1999). PINCH1 (37 kDa) zeigt ebenso wie ILK ubiquitäre Expression und besteht aus 5 LIM-Domänen, von denen die N-terminal gelegene an die ILK-Ankyrin-Module bindet (Li et al., 1999). Weiterhin besitzt es C-terminal eine Kernlokalisationssequenz. LIM-Domänen bestehen aus einer repetitiven Folge Cystein-reicher Zn^{2+}-Fingermotive und vermitteln ebenfalls Protein-Protein-Interaktionen. Die Bindungen von PINCH1 und der weniger breit exprimierten PINCH2-Isoform an ILK erfolgen unter gegenseitigem Ausschluss (Braun et al., 2003; Zhang et al., 2002). Weitere Bindungspartner von ILK sind die Parvin-Proteine. Sie wurden von mehreren Gruppen parallel zwischen 2000 und 2001 entdeckt bzw. als ILK-Interaktoren identifiziert (Olski et al., 2001; Nikolopoulos und Turner, 2000; Tu et al., 2001; Yamaji et al., 2001). Vertebraten besitzen 3 Parvine, α-Parvin/Aktopaxin/CH-ILKBP (calponin-homology domain ILK-binding protein), β-Parvin/Affixin und γ-Parvin, die unterschiedliche Expression zeigen (vgl. 1.5). Während α- und β-Parvin breit exprimiert werden, ist γ-Parvin auf hämatopoetische Zellen beschränkt (Korenbaum et al., 2001; Chu et al., 2006). Als wesentliches Strukturmerkmal ist allen Parvinen gemein eine F-Aktin-bindende Domäne, bestehend aus zwei Calponin-homologen (CH) Domänen, α- und β-Parvin besitzen zusätzlich N-terminale Kernlokalisationssequenzen. Die Parvine binden, ebenfalls unter gegenseitigem Ausschluss, an die Kinase-Domäne von ILK (Tu et al., 2001; Yamaji et al., 2001; Zhang et al., 2004).

ILK, PINCH und Parvin arbeiten nicht allein, sondern bilden zytosolisch einen ternären Komplex, der dann zur Plasmamembran bzw. in Zell-Matrix-Adhäsionen rekrutiert wird. Diese Komplexbildung ist essentiell für die Stabilisierung aller drei Proteine, wie der Verlust von PINCH und Parvin in ILK-defizienten Zellen oder der Verlust von ILK und Parvin in PINCH-defizienten Zellen zeigt (Fukuda et al., 2003). Der Abbau ungebundener Komponenten des Komplexes ist dabei proteasomal vermittelt. Die Expression von 2 PINCH- und 3 Parvin-Isoformen als potentielle Komponenten von IPP-Komplexen ermöglicht theoretisch so die Formierung von 6 verschiedenen IPP-Komplexen. Vor dem Hintergrund unterschiedlicher Expressionsmuster der einzelnen PINCH- und Parvin-Isoformen deutet dies eine hohe Spezialisierung von IPP-Funktionen in verschiedenen Zelltypen bzw. Geweben an.

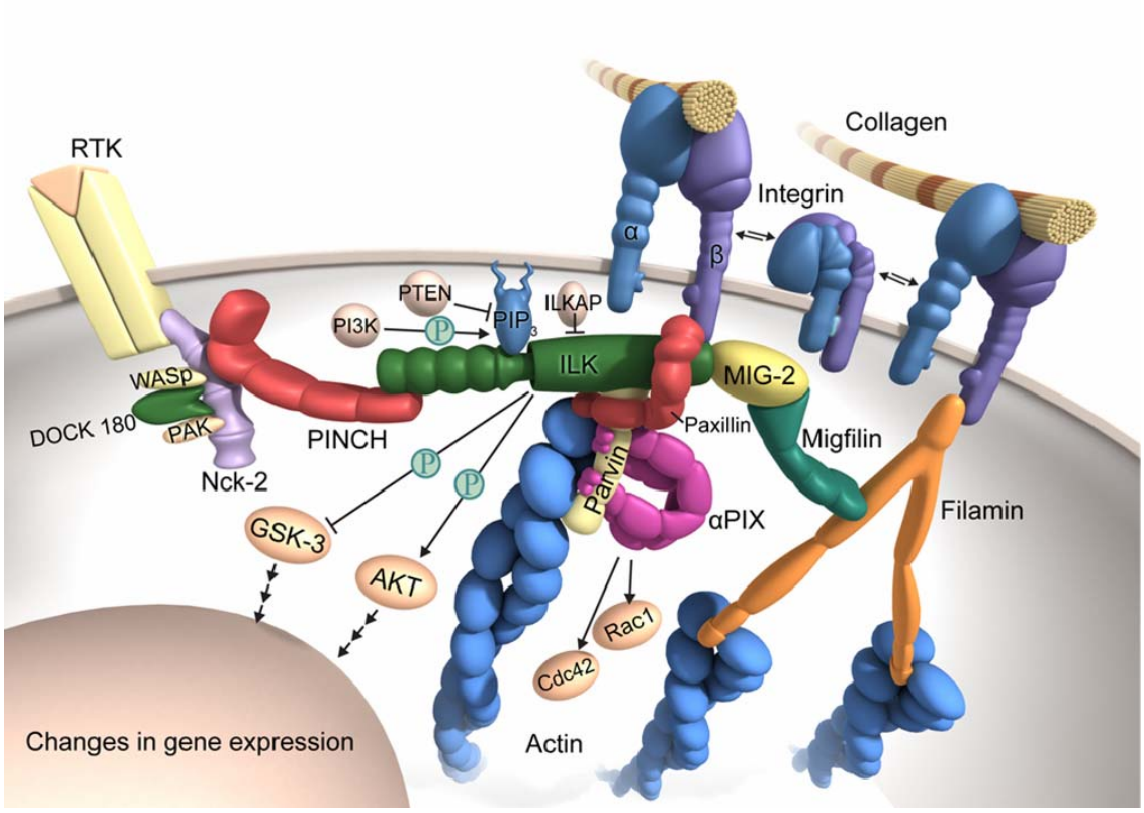


Abb. 1.4.1: Der ILK/PINCH/Parvin-Komplex (Grashoff et al., 2004)

Neben der Stabilisierung der Komponenten ist weiterhin die Rekrutierung des Komplexes zur Plasmamembran abhängig von der zytosolischen Formierung (Zhang et al., 2002). Darüber hinaus hängt die eigentliche Rekrutierung noch entscheidend von Komplex-externen Interaktionen ab. Mögliche Kandidaten für die Rekrutierung sind zunächst β1- bzw. β3-Integrin. So haben Mackinnon et al. (2002) in *C. elegans* gezeigt, dass die Lokalisierung von pat-4/ILK von βpat-3/Integrin abhängt. Auch für Paxillin, das die Kinase-Domäne von ILK sowie α-Parvin bindet scheint eine Rolle bei der Rekrutierung zu spielen, da eine Paxillin-

bindungsdefiziente ILK-Mutante nicht rekrutiert wird (Nikolopoulos und Turner, 2000, 2001, 2002). Desweiteren wurde die Bindung von ILK an Kindlin/Mig-2 beschrieben, das über die Interaktion mit Migfilin/Filamin bzw. β-1/3Integrin eine Membranrekrutierung des ILK/PINCH/Parvin-Komplexes vermitteln könnte (Mackinnon et al., 2002; Kloeker et al., 2004; Tu et al., 2003) (Abb. 1.4.1).

1.4.2 Zelluläre Funktionen

Zu grundlegenden zellulären Funktionen, die ILK- bzw. IPP-reguliert sind, gehören Adhäsion, Zellspreiten, Fokalkontakt-Bildung, Matrix-Umbau sowie Zell-Überleben und Proliferation (Grashoff et al., 2004). Zugrunde liegen hier hauptsächlich Überexpressions- bzw. Depletionsstudien. In zweidimensionaler Zellkultur führen beide Manipulationen häufig zu recht ähnlichen Phänotypen. Dies sind eine Abrundung der Zellen, keine adäquate Aktin- und Fokalkontakt-Organisation, eine verminderte Adhäsion und Proliferations- bzw. Überlebensstörungen (Hannigan et al., 1996; Sakai et al., 2003; Radeva et al., 1997). Ähnliche Defekte wurden ebenfalls unter Depletion von PINCH (Li et al., 2005; Stanchi et al., 2005; Zhang et al., 2002; Xu et al., 2005) oder Parvinen beobachtet (Yamaji et al., 2001; Zhang et al., 2004). Hierbei ist die genaue Funktionsweise des Komplexes jedoch relativ ungeklärt. Wie in Abbildung 1.4.1 angedeutet, arbeitet ILK hier möglicherweise als Kinase, sicher jedoch als Gerüstprotein. Durch ILK-, PINCH- und Parvin-vermittelte Interaktionen ausserhalb des Komplexes hat dieser über die reine strukturelle Verbindung zu Integrinen und F-Aktin hinaus vielfach regulatorische Verbindung zu Aktin-, Adhäsions- und Signal-prozessierenden Proteinen.

Für PINCH1 wurde die Interaktion mit dem Rezeptor-Tyrosin-Kinasen assoziierten SH2/SH3-Domänen Adapterprotein Nck-2 beschrieben, das mit den Rho-GTPase-Modulatoren DOCK180 und PAK interagiert (Tu et al., 1998). Da Nck-2-defiziente Mäuse jedoch keinen Phänotyp zeigen, anders als der letale Verlust von PINCH1, ist die physiologische Relevanz der PINCH1/Nck-2-Interaktion unklar (Bladt et al., 2003). Ein Einfluss von PINCH1 auf den JNK-Signaltransduktionsweg, über die für PINCH1 spezifische Interaktion mit dem JNK-Negativ-Regulator Rsu1 (Ras-supressor 1) wurde *in vivo* beschrieben (Kadrmas et al., 2004; Dougherty et al., 2005). Weiterhin wurde für Thymosin-β4 eine Stimulation von Migration und Zellüberleben von Herzzellen gezeigt, abhängig von einer Interaktion mit PINCH1 (Bock-Marquette et al., 2004). Auch hier ist die physiologische Relevanz der Bindung unklar, da die konditionale Deletion von PINCH1 in Kardiomyozyten keine entsprechenden Defekte zeigte (Liang et al., 2005). Möglicherweise kompensiert hier

PINCH2. Weiterhin wurde für PINCH1 Kernlokalisation gezeigt, was aufgrund der Zn^{2+}-Fingermotive eventuelle genregulatorische Aktivität andeutet (Campana et al., 2003; Li et al., 2005; Hobert et al., 1999). Dies, sowie die bisher dokumentierten Interaktoren lassen auf besondere Funktionen von PINCH bei der Interaktion von IPP-Komplexen mit verschiedenen Signalprozessen der Zelle schließen.

Die Parvine ermöglichen prinzipiell eine strukturell-mechanische Kopplung des Komplexes an das Aktin-Zytoskelett über die direkte F-Aktin-Bindung (Olski et al., 2001). Weiterhin zeigen sie wie auch PINCH die Bindung verschiedener, insbesondere Aktin-Zytoskelett-regulatorischer Proteine und dienen so eventuell deren Rekrutierung. Diese Interaktionen werden in Abschnitt 1.5 näher beschrieben und sollen hier nur kurz erwähnt werden. Neben der Paxillin/ILK-Bindung haben Nikolopoulos et al. (2000) die Bindung von Paxillin sowie seines Homologs Hic-5 an α-Parvin dokumentiert. Weiterhin wurde die Interaktion von α-Parvin und der Cofilin-aktivierenden Kinase TESK1 (testicular kinase 1) beschrieben (LaLonde et al., 2005). Auch die von LaLonde et al. (2006) beschriebene Interaktion von α-Parvin und dem Cdc42/Rac-spezifischen GTPase-aktivierenden Protein (GAP) CdGAP zeigt eine regulatorische Verbindung zum Aktin-Zytoskelett. Für β-Parvin wurde die Interaktion mit dem Cdc42/Rac-1-spezifischen Guaninnukleotid-Austauschfaktor (GEF) α-PIX (PAK-interacting exchange factor-α) beschrieben (Rosenberger et al., 2003). Weiterhin wurde die Bindung an sarkomeres und nicht-sarkomeres α-Aktinin gezeigt (Yamaji et al., 2004). Schließlich wurde eine Interaktion mit dem muskelspezifisch exprimierten Protein Dysferlin dokumentiert, das eine Rolle bei Membranreparaturprozessen haben soll (Matsuda et al., 2005). Es ist nicht näher untersucht, ob die Parvin-Interaktionen Isoform-spezifisch sind.

Für fast alle dieser Komplex-externen Interaktionspartner (Nck-2/DOCK180/PAK (PINCH), Paxillin (ILK, α-Parvin), Tesk1 und CdGAP (α-Parvin), α-PIX und α-Aktinin (β-Parvin)) wurden Funktionen bei der Regulation des Rho-GTPase-Systems bzw. des Aktin-Zytoskeletts direkt beschrieben, so dass ein wichtiger regulatorischer Einfluss verschiedener IPP-Komplexe auf das Rho-GTPase-System sehr wahrscheinlich erscheint. Gleiches gilt für einen regulatorischen Einfluss auf Maturierung und Halbwertszeit von Adhäsionen. Außer über Rho-GTPasen könnte hier zudem eine direkte Rekrutierung von Calpain4 über GIT/PIX/PAK-Komplexe Funktionen haben (Rosenberger et al., 2005; Franco et al., 2004). Möglich ist zudem die Abhängigkeit der IPP-vermittelten Regulation solcher Funktionen von Rezeptortyrosinkinase-Aktivität. Wie der erwähnte Einfluss von PINCH auf die JNK-Aktivität zeigt, kann jedoch auch die adhäsionsabhängige Signalmodulation IPP-reguliert

sein. Derartige Funktionen von IPP-Komplexen könnten viele der Eingangs beschriebenen Effekte von ILK-, PINCH- oder Parvin-Überexpression bzw. -Depletion erklären.

IPP-abhängige Signaltransduktionsprozesse zur Regulation von Proliferation und Zellüberleben sind hauptsächlich als ILK-reguliert beschrieben. Zentral sind hier Befunde, die eine Unterdrückung von Anoikis bzw. eine adhäsionsunabhängige Proliferation unter ILK-Überexpression gezeigt haben (Radeva et al., 1997; Attwell et al., 2000). Umgekehrt wurde Zellzyklusarrest und Apoptose sowie Repression des E-Cadherin-Repressors Snail durch ILK-Inhibition dokumentiert (Persad et al., 2000; Tan et al., 2001). Weiterhin existieren Hinweise auf onkogene Funktion von ILK in verschiedenen Tumoren bzw. TumorZelllinien (Tan et al., 2004; Graff et al., 2001; Dai et al., 2003; Marotta et al., 2003). Auch wurde ILK mit dem mesenchymalen Übergang epithelialer Zellen (EMT) assoziiert (Novak et al., 1998; Wu et al., 1998; White et al., 2001). Als zentrale Mediatoren dieser Prozesse wurden Proteinkinase B/Akt sowie Glykogensynthase-Kinase-3β (GSK-3β) beschrieben, die von ILK phosphoryliert, dadurch aktiviert (PKB/Akt) bzw. reprimiert (GSK-3) werden und so Proliferation und Überleben von Zellen regulieren (Delcomenne et al., 1998; Troussard et al., 2003). Mehrere Studien haben ILK als die für eine volle Aktivierung von PKB/Akt notwendige „PDK-2" (phosphatidylinositiol-3-phosphate kinase dependent kinase 2) beschrieben (Delcomenne et al., 1998; Persad et al., 2001). PDK-1 vermittelt die T308-Phosphorylierung von PKB/Akt, jedoch nicht die S473-Phosphorylierung (Lawlor et al., 2001). Die postulierte PDK-2 müsste PIP_3-, PI3-K- und PTEN- (phosphatase and tensin homologue on chromosome ten) reguliert sein, Bedingungen, die ILK erfüllt (Delcomenne et al., 1998; Persad et al., 2000) (Abb. 1.4.1). Jedoch wurde in ILK-defizienten Chondrozyten *in vitro* wie *in vivo* kein basal veränderter S473-Phosphorylierungsstatus von Akt beobachtet (Grashoff et al., 2003). In ILK-defizienten Fibroblasten wurde weiterhin eine normale Induktion der S473-Phosphorylierung durch Insulin und PDGF (platelet derived growth factor) beobachtet (Sakai et al., 2003). Die Ausbildung der in *D. melanogaster* und *C. elegans* unter ILK-Defizienz beobachteten Muskelassemblierungs- bzw. Anheftungsdefekte konnte zudem durch Re-Expression verschiedener Kinase-defizienter ILK-Mutanten unterbunden werden (Zervas et al., 2001; Mackinnon et al., 2002). Zudem zeigt die ILK-Kinase-Domäne Mutationen konservierter Reste sowie Sequenzabweichungen in konservierten Subdomänen zwischen verschiedenen Spezies, was eine konservierte Kinase-Aktivität in Frage stellt (Hanks et al., 1988; Legate et al., 2006). Möglicherweise vermittelt ILK die Akt S473-Phosphorylierung auch indirekt, etwa durch Membran-Rekrutierung einer „PDK-2" (Lynch et al., 1999). Eine unter siRNA-vermittelter α-Parvin-Depletion beobachtete, defekte Akt-

Aktivierung konnte auf eine fehlende Membranlokalisierung zurückgeführt werden (Fukuda et al., 2003). Auch wurde in einem mit einer Membranfraktion isolierten PKB/Akt- und ILK-enthaltenden Protein-Komplex Akt S473-Phosphorylierung beobachtet, die unabhängig von ILK war (Hill et al., 2002). Hier wurde sie durch DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK) vermittelt (Feng et al., 2004). Jüngere Studien weisen weiterhin auf den mTor- (mammalian target of rapamycin) und rictor-enthaltenden Komplex mTORC2 als Akt S473-Kinase hin (Jacinto et al., 2006; Shiota et al., 2006; Frias et al., 2006). Die reprimierende Phosphorylierung von GSK-3β in Abhängigkeit von ILK haben Delcomenne et al. (1998) beschrieben. Als Folge dessen führt eine β-Catenin-Stabilisierung Tcf/Lef-abhängig zu einer verstärkten Transkription proliferations-stimulierender Zielgene wie Cyclin D1 oder c-myc (Novak et al., 1999, 1998). Zudem erscheint eine E-Cadherin-Repression durch Snail-Induktion, abhängig von ILK/β-Catenin/Tcf/Lef möglich (Tan et al., 2001). Wahrscheinlich arbeiten die genannten Signalprozesse sequentiell bzw. synergistisch, da Akt GSK-3β phosphoryliert (Lawlor und Alessi, 2001). Vor diesem Hintegrund erscheint eine Bedeutung von ILK für die Regulation von Akt und GSK-3β bzw. für die Akt- und GSK-3β-abhängige Regulation von Proliferation und Zellüberleben nicht unwahrscheinlich. Jedoch ist eine Kinase-Aktivität von ILK bzw. die Phosphorylierung von Akt und/oder GSK-3β durch ILK nicht wirklich sicher. Unter Annahme einer direkten Phosphorylierung durch ILK erscheint zudem deren physiologische Relevanz fragwürdig. Schließlich besteht auch die Möglichkeit, dass die beschriebenen Funktionen von ILK nicht über Akt vermittelt werden. So haben Jacinto et al. (2006) gezeigt, dass die nach mTORC2-Funktionsverlust fehlende Akt S473-Phosphorylierung nicht zu einer reduzierten Phosphorylierung von GSK-3β führte. Mehrfach beschrieben wurde die Cdc42-abhängige Regulation von GSK-3β über den Par6/PKCζ-Komplex (Wu et al., 2006; Etienne-Manneville et al., 2005; Etienne-Manneville und Hall, 2003)

Eine weitere für ILK bzw. den IPP-Komplex beschriebene Funktion liegt in der Assemblierung von fibrillären Adhäsionen, wie Vouret-Craviari et al. (2004) unter ILK-Depletion gezeigt haben. Ähnlich führt eine Störung der ILK/PINCH sowie der ILK/Parvin-Interaktion zu einer defekten Fibronektin-Deposition (Guo und Wu, 2002). Hier zeigt sich ein enger funktioneller Zusammenhang von IPP-Komplexen und β1-Integrin, das ebenfalls die Assemblierung fibrillärer Adhäsionen vermittelt (Wennerberg et al., 1996; Danen et al., 2002).

Diese vorwiegend *in vitro* durchgeführten Studien von ILK bzw. IPP-Komplexen deuten somit prinzipiell auf eine Aktin-Zytoskelett- sowie Adhäsions-modulierende Funktion hin.

Wichtiges Ziel scheint dabei das Rho-GTPase-System zu sein, insbesondere Rac und Cdc42. Eine modulierende Wirkung auf Adhäsionen deutet sich in einer Funktion des IPP-Komplexes für den Fibronektin-Matrix-Umbau an. Die adhäsionsabhängige Regulation der Proliferations- bzw. Zellüberlebens-relevanten Kinasen Akt und GSK-3β durch IPP-Komplexe erscheint möglich, wenngleich eine physiologisch relevante Kinase-Funktion von ILK hierbei fraglich ist. Eine mögliche Funktion für die mechanische Kraftübertragung zwischen F-Aktin und Integrin über die Parvin/ILK-Bindung ist nicht untersucht.

1.4.3 Funktionsanalysen *in vivo*

Ein Großteil der *in vivo*-Studien von IPP-Komponenten beschreibt die Deletion von ILK, einige wenige beschreiben die von PINCH oder Parvinen. Dabei spiegeln die Deletions-Phänotypen verschiedene der *in vitro* beschriebenen Funktionen wider. So zeigen sich Funktionen bei der Aktin-Reorganisation oder bei der Modulation β1 Integrin-vermittelter Adhäsion, insbesondere auf Fibronektin und Laminin. Es gibt wenige *in vivo* Hinweise für eine ILK-Kinase-abhängige Regulation PKB/Akt-vermittelter Signalprozesse. Zusätzlich weisen insbesondere Studien in *D. melanogaster* und *C. elegans* auf eine Bedeutung des Komplexes für die mechanische Adhäsion hin. Wenngleich die Deletions-Phänotypen von β1 Integrin und ILK, sowie PINCH oder Parvin in vielen Studien große Ähnlichkeit zeigen, gibt es doch Unterschiede, die auf distinkte Funktionen der einzelnen IPP-Komponenten sowie des IPP-Komplexes und β1-Integrin hinweisen.

Die konstitutive Deletion von ILK in der Maus führt peri-implantär (E5.5-E6.5) zu Letalität (Sakai et al., 2003). Ähnlich der konstitutiven Deletion von β1 Integrin ist die Kavitation gestört, begleitet von einer fehlenden Polarisierung des Epiblasten (vgl. 1.3.2). Die Analyse ILK-defizienter EB hat auch hier das fast vollständige Ausbleiben der Kavitation gezeigt, obwohl hier, anders als unter β1-Integrin-Defizienz eine Basalmembran assembliert wird. Die ILK-Defizienz resultiert jedoch in einer ausgeprägten basalen F-Aktin-Akkumulierung in Epiblast-Zellen. Dass β1 Integrin-defiziente EB nach Zugabe von Laminin Kavitation zeigen, sich also weiter entwickeln als ILK-defiziente EB, deutet an, dass ILK in der frühen Embryonalentwicklung Funktionen haben muss, die distinkt von den β1-Integrin-vermittelten sind. Diese könnten eventuell β3-Integrin-vermittelt sein. Da β3 Integrin-Defizienz jedoch keinen letalen Phänotyp zeigt, müssten diese ILK-Funktionen redundant durch β3- und β1-Integrin vermittelt werden oder unter noch nicht gezeigter Bindung anderer β Integrine (Hodivala-Dilke et al., 1999). PINCH1-defiziente Embryonen sterben ebenfalls peri-implantär, jedoch etwas später (E6.5-E7.5) (Li et al., 2005). Eine Kavitation in PINCH1-

defizienten EB findet statt, wenngleich beeinträchtigt. Parallel jedoch zeigen Endoderm-Zellen hier Apoptose und eine beeinträchtigte Zell-Zell-Adhäsion, Defekte, die unter ILK-Defizienz nicht beschrieben wurden. Hier zeigt sich, dass IPP-Komponenten neben den primären Komplex-abhängigen Funktionen auch distinkte Funktionen zu haben scheinen. Die konstitutive Deletion von PINCH2 ist nicht letal, auch zeigen die Tiere keinen offensichtlichen Phänotyp (Stanchi et al., 2005). Die Heraufregulierung von PINCH1 weist auf kompensatorische Funktion von PINCH1 unter PINCH2-Verlust hin. Die konditionale Deletion von ILK in Chondrozyten führt zu perinataler Letalität aufgrund einer Gaumenspalte sowie weiterer Skelettfehlbildungen (Grashoff et al., 2003). Hierbei zeigen Chondrozyten in der Wachstumsfuge der Knochen eine gestörte Morphologie und Proliferation. Wiederum sehr ähnlich, jedoch ausgeprägter ist der Phänotyp unter β1 Integrin-Defizienz in Chondrozyten. Hier zeigen die Chondrozyten zudem einen Rotationsdefekt und eine veränderte Organisation der Matrix (Aszodi et al., 2003). Insgesamt zeigen die Analysen der ILK- bzw. PINCH1-Mutanten in der frühen Embryonalentwicklung bzw. in Chondrozyten im Vergleich zur β1 Integrin-Defizienz kaum weniger drastische Defekte. Jedoch zeigt sich im Vergleich zu β1 Integrin weniger Einfluss des IPP-Komplexes auf die Organisation der Matrix (Basalmembran bzw. Kollagen), jedoch verstärkt auf die Organisation des Aktin-Zytoskeletts.

Weiterhin sind mögliche IPP-Funktionen, besonders für die Regulation stark Fibronektin-abhängiger Prozesse interessant, etwa bei der Vaskulogenese. Wie in Abschnitt 1.3.3 erwähnt, haben sowohl Fibronektin- wie auch α5β1 Integrin-defiziente Embryonen ausgeprägte Vaskulogenesedefekte (Yang et al., 1993; George et al., 1993, 1997). Zudem hat die Analyse von β1 Integrin-defizienten EB eine Verzögerung der Vaskulogenese gezeigt (Bloch et al., 1997). Eine Studie unter konditionaler Deletion von ILK im Gefässystem hat hier ebenfalls Letalität gezeigt, verbunden mit einem gestörten Einwachsen embryonaler Gefäße in die Plazenta sowie einem fast vollständigen Fehlen der Dottersack-Gefäße (Friedrich et al., 2004). Hier deutet sich ein enger Zusammenhang von Fibronektin/β1 Integrin-vermittelten und IPP-Funktionen *in vivo* an, wie er bereits *in vitro* beobachtet wurde. In zweidimensionaler Zellkultur hat der IPP-Komplex für den Umbau von Fibronektin-Matrix wichtige Funktion (vgl. 1.4.2). Daher stellt sich die Frage nach einer solchen Bedeutung *in vivo*. Die Analyse von PINCH und Parvin in der vaskulären Entwicklung wird hier weitere Aussagen ermöglichen.

Eine verhältnismäßig große Zahl von Studien zu IPP-Deletionsmutanten beschreibt muskuläre Phänotypen. Mäuse mit konditionaler Deletion von ILK im Herz entwickeln postnatal spontan

eine dilatative Kardiomyopathie und sterben im Alter von 6 – 12 Wochen (White et al., 2006). Umgekehrt zeigten Mäuse transgen für die ILK^{R211A}-Mutante, für die eine reduzierte Akt-Phosphorylierung sowie reduzierte α-Parvin-Bindung beschrieben wurde, geringere Suszeptibilität für eine Angiotensin II-induzierte Hypertrophie (Lu et al., 2006). Die ILK^{L308P}-Mutante, für die ein Verlust der β-Parvin-Bindung sowie der Kinase-Aktivität beschrieben wurde, führt im Zebrabärbling *Danio rerio* zur Ausbildung eines letalen Kontraktionsphänotyps (Bendig et al., 2006). Die konditionale Deletion von PINCH1 im Herzen zeigt keinen offensichtlichen Phänotyp (Liang et al., 2005). Hier ist eine Kompensation durch PINCH2 jedoch nicht unwahrscheinlich, da es ebenfalls im Herzen exprimiert wird (Braun et al., 2003). Die konditionale Deletion von β1 Integrin im Herz resultiert ähnlich wie die von ILK in der Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie (Shai et al., 2002). Auffällig ist die durchweg normale Embryonal- bzw. morphologische Entwicklung der Herzen bei der Ausbildung spontaner bzw. induzierter Phänotypen unter Kontraktion. Dies weist auf eine wichtige Funktion des IPP-Komplexes bzw. β1 Integrin in der Homöostase des Herzens hin. Die konditionale ILK-Defizienz im Skelettmuskel führt zur Ausbildung einer milden Dystrophie, die belastungsabhängig verstärkt wird (Chang et al., Manuskript in Vorbereitung). Die embryonale Differenzierung von Myoblasten ist jedoch nicht betroffen, was auch hier zumindest primär auf Homöostase-Funktionen hindeutet. Zudem zeigen *in vitro*-Studien zur Funktion von ILK in der Myogenese keine einheitlichen Ergebnisse (Huang et al., 2000; Miller et al., 2003b). Die Skelettmuskel-spezifische β1 Integrin-Defizienz ist letal, was sich jedoch in einem Diaphragma-Defekt begründet (Schwander et al., 2003). Die Funktionen von β1 Integrin in der Myogenese sind ebenfalls unklar (vgl. 1.3.4) (Hirsch et al., 1998). Jedoch zeigt die Muskel-Dystrophie in α5 Integrin-Chimären als Folge von Apoptose- und Adhäsionsdefekten der Myoblasten eine Funktion von β1-Integrin in der Myogenese (Taverna et al., 1998). α7β1-defiziente Mäuse entwickeln eine Muskeldystrophie, bedingt durch Defekte in der Muskel-Sehnen-Verbindung, was eine Funktion von β1 Integrin in der Homöostase belegt (Mayer et al., 1997; Miosge et al., 1999). Vor dem Hintergrund der bisherigen Arbeiten erscheint eine grundlegende Funktion des IPP-Komplexes für die Differenzierung von Myoblasten bzw. Kardiomyozyten eher unwahrscheinlich. Eine ähnlich enge Kopplung von Fibronektin/α5β1 Integrin und dem IPP-Komplex wie im vaskulären System scheint in Muskel und Herz somit nicht gegeben zu sein. Primär scheint hier die Homöostase bzw. Funktionen der Laminin/β1 Integrin-Interaktion IPP-abhängig zu sein.

ILK-Defizienz in *D. melanogaster* zeigt als wesentlichen Phänotyp ein kontraktionsbedingtes Ablösen der sich entwickelnden, embryonalen Muskulatur von der Sehnen-Matrix der Epidermiszellen (Zervas et al., 2001). Sehr ähnlich, jedoch stärker sind auch hier die Phänotypen unter Verlust von βPS- sowie αPS2-Integrin (Brown, 1994). Wesentlicher Unterschied ist jedoch der Adhäsionsverlust zwischen Muskel und Sehnen-Matrix unter Integrin-Defizienz und der Verlust der Integrin/Aktin-Verbindung bei ILK-Defizienz. PINCH-defiziente Embryonen zeigen unter anderem einen zum ILK-Funktionsverlust fast identischen Muskel-Adhäsions-Phänotyp (Clark et al., 2003). Der Phänotyp gibt nur begrenzt Auskunft darüber, ob die IPP-Komponenten für die myogene Differenzierung benötigt werden, da in *D. melanogaster* die Kontraktion bereits vor der Sarkomerassemblierung beginnt (Bökel und Brown, 2002). Zumindest für αPS2-Integrin aber wurde eine Funktion für die Muskeldifferenzierung beschrieben (Bloor und Brown, 1998). Der pat- (paralyzed and arrested at twofold-stage) Phänotyp zeigt sich bei Funktionsverlust der *C. elegans*-Homologe βpat-3/Integrin, pat-4/ILK, unc97/PINCH sowie pat-6/Parvin. Dieser ist grundlegend charakterisiert durch eine defekte Assemblierung von „dense-bodies“ und M-Linien, den hypodermalen Adhäsionsstrukturen der Körperwand-Muskulatur (Williams und Waterston, 1994; Mackinnon et al., 2002; Hobert et al., 1999; Lin et al., 2003). Der pat-Phänotyp zeigt stärker myogenen Charakter, da für die Sarkomerassemblierung die unc52/Perlecan-vermittelte Lokalisierung von βpat3/Integrin, pat-4/ILK, unc97/PINCH und pat6/Parvin bzw. eine funktionelle Adhäsion an die Basalmembran essentiell ist (Bökel und Brown, 2002; Lin et al., 2003). Insgesamt zeigen die Funktionsverlust-Phänotypen der β1 Integrin- und IPP-Homologe in Invertebraten erneut deren engen funktionalen Zusammenhang. Interessant ist dies auch aus phylogenetischen Gesichtspunkten. Ähnlich den Herz- bzw. Skelettmuskelphänotypen sind sie primär mechanisch induziert. Daher stellen sie auch die Frage nach einer möglichen IPP-Funktion als mechanische Verbindung zwischen F-Aktin und Integrinen.

Eine defekte Akt- bzw. GSK-3β-regulatorische Kinase-Aktivität von ILK scheint nicht die Ursache für die Funktionsverlust-Phänotypen in *D. melanogaster* und *C. elegans* zu sein, da die Entwicklung der Phänotypen unter Re-Expression Kinase-inaktiver ILK-Mutanten nicht zu beobachten war (Zervas et al., 2001; Mackinnon et al., 2002). Zudem zeigt der Funktionsverlust von dAkt einen anderen Phänotyp als der von IPP-Komponenten (Staveley et al., 1998). Ebenso konnte der Phänotyp ILK-defizienter Mäuse nicht mit einer verringerten Phosphorylierung von PKB/Akt in Zusammenhang gebracht werden, da ILK-defiziente Fibroblasten keine verringerte S473-Phosphorylierung zeigten (Sakai et al., 2003). Ähnlich

zeigten ILK-defiziente Chondrozyten *in vivo* keine reduzierte Akt S473-Phosphorylierung (Grashoff et al., 2003). Hingegen zeigten Mäuse mit konditionaler Defizienz von ILK im Endothel Letalität und Apoptose der Endothelzellen, begleitet von einer reduzierten Akt S473-Phosphorylierung (Friedrich et al. 2004). Diese konnte zwar nach Re-Expression von ILK, nicht aber nach Re-Expression von konstitutiv-aktiver PKB/Akt unterbunden werden. Troussard et al. (2003) haben eine Reduzierung der Akt S473-Phosphorylierung in ILK-defizienten Makrophagen beobachtet. Diese ging mit verstärkter Apoptose einher und konnte nach Re-Expression von ILK^{WT} und ILK^{S343D} (konstitutiv-aktiv) nicht aber ILK^{S343A} (Kinase-inaktiv) wiederhergestellt werden. Weiterhin zeigten Mäuse mit konditionalem ILK-Verlust im Herz eine Reduktion der Akt S473-Phosphorylierung (White et al., 2006). Der letale Kontraktionsphänotyp der Kinase-inaktiven sowie β-Parvin-Bindungs-defizienten ILK^{L308P}-Mutante („main squeeze“) in *D. rerio* konnte unter Re-Expression von konstitutiv-aktiver PKB/Akt partiell unterbunden werden. ILK^{WT} Re-Expression, nicht jedoch ILK^{R211A}-Re-Expression führte zu einer vollständigen Unterdrückung des Phänotyps. Ähnlich wie für die ILK^{L308P}- wurde jedoch auch für die ILK^{R211A}-Mutante neben reduzierter Akt-Phosphorylierung zusätzlich Parvin-Bindungs-Defizienz dokumentiert, was zum Phänotyp beitragen könnte (α-Parvin) (Persad et al., 2001; Attwell et al., 2003). Unter diesem Gesichtspunkt ist auch die geringere Suszeptibilität für die Angiotensin II-induzierte Herzhypertrophie von Mäusen mit herzspezifischer ILK^{R211A}-Überexpression zu sehen (Lu et al., 2006). Die herzspezifische ILK-Überexpression in Mäusen führt zu einer spontanen Hypertrophie, dies bei der ILK^{WT} und ILK^{S343D}-Mutante jedoch in gleichem Ausmaß (Lu et al., 2006). Eine Kinase-Aktivität von ILK bzw. eine Regulation von PKB/Akt oder GSK-3β über direkte Phosphorylierung von ILK erscheint in Anbetracht dieser *in vivo* durchgeführten Studien noch unwahrscheinlicher. Jedoch ist eine gewebespezifische Regulation der Akt-Aktivität durch ILK vorstellbar, insbesondere im Herzen. Ein Zusammenhang ist aufgrund der Konsistenz der transgenen bzw. Funktionsverlust-Phänotypen von β1 Integrin, ILK, PI-3-K, PKB/Akt und GSK-3β naheliegend (vgl. 1.3.4). Denkbar wäre eine Funktion von ILK als mechanoresponsive Verbindung zwischen β1 Integrin und PKB/Akt-vermittelten oder auch PKB/Akt-unabhängigen Signalprozessen zur Stabilisierung von Herz- und Skelettmuskelzellen.

Ein ähnlich wichtiger funktioneller Zusammenhang zwischen ILK und β3 Integrin wie zwischen ILK und β1 Integrin schließt der vergleichsweise schwache Phänotyp unter β3 Integrin-Defizienz aus. Im wesentlichen zeigen die Tiere Störungen der Blutplättchen-Aggregation und Osteoklastendefekte (Hodivala-Dilke et al., 1999; McHugh et al., 2000). Im

Hinblick auf die von Pasquet et al. (2002) in Blutplättchen beschriebene, Aggregations-fördernde Interaktion von ILK und β3 Integrin gibt es keine Vergleichsstudien *in vivo*. Yamaji et al. (2002) haben ebenfalls *in vitro* die Translokation von ILK und β-Parvin in das kortikale Aktin-Zytoskelett nach Thrombin-Stimulierung beschrieben. Stevens et al. (2004) hingegen haben die Kollagen-induzierte Interaktion von ILK und α2β1 Integrin in Blutplättchen beschrieben. Jedoch ist die Rolle von α2β1 Integrin für die Kollagen-induzierte Aktivierung von Blutplättchen fraglich, da Nieswandt et al. (2001) unter β1 Defizienz eine normale Aktivierung durch Kollagen induzieren konnten. Studien zur Funktion von ILK in Osteoklasten sind nicht beschrieben. Die Frage nach einer Funktion der ILK/β3 Integrin-Interaktion für die Aktivierung von Blutplättchen *in vivo* ist daher grundlegend für die physiologische Analyse dieser Interaktion.

Der konditionale Funktionsverlust von ILK in T-Zellen führt zu einer Reduzierung der Thymuszellzahl im Alter von 6-8 Wochen. Dieser liegt zum einen Apoptose, zum anderen möglicherweise eine defekte Zirkulation bzw. Wanderung der T-Zellen zu Grunde, bedingt durch einen Chemotaxis-Defekt (Liu et al., 2005).

Die *in vivo* durchgeführten Analysen zu IPP-Funktionen zeigen somit deutliche Parallelen zu *in vitro*-beschriebenen Funktionen. Über die Regulation von Aktin-Reorganisation oder Adhäsions-abhängigen Zellüberlebens- bzw. Proliferationssignalen, eventuell auch den Umbau von Fibronektin-Matrix oder als mechanische Aktin/Integrin-Verbindung, steuern IPP-Komplexe Prozesse in der frühen Embryonalentwicklung, der vaskulären Entwicklung oder der Homöostase von quergestreiften Muskelgeweben. Prinzipiell stützen die *in vivo*-Studien die Annahme einer physiologisch relevanten Kinase-Funktion von ILK nicht. Durchgehend zeigt sich ein enger funktioneller Zusammenhang mit β1 Integrin, wobei auch distinkte Funktionen des IPP-Komplexes bzw. seiner Komponenten zu beobachten sind. Belege für die Signifikanz der ILK/β3 Integrin-Interaktion *in vivo* stehen noch aus.

1.5 Die Parvine

Zwischen 2000 und 2001 wurden die Parvine von drei Gruppen parallel erstmals beschrieben. Der Dokumentation der ILK-, Paxillin- und F-Aktin-Bindung folgten hauptsächlich Studien zum Einfluss der Parvine auf das Zellspreiten. In erster Linie sind hier Arbeiten zu α-Parvin, weniger zu β- und γ-Parvin veröffentlicht. Untersucht wurde hierbei mehrfach ein Einfluss auf das Rho-GTPase-System, jedoch ist auch regulatorischer Einfluss auf PKB/Akt beschrieben. Anders als bei ILK und PINCH, sind dies fast kaum *in vivo*-, sondern in erster

Linie Zellkultur-Studien. Trotz hoher Homologie der einzelnen Isoformen sind mehrfach verschiedene oder eventuell antagonistische Funktionen der Parvine beschrieben, so dass sich unter anderem die Frage stellt, ob die einzelnen Parvine grundlegend ähnliche Funktionen haben oder funktionale Diversität zeigen.

1.5.1 Proteinstruktur und Expression

Die Parvine gehören zur α-Aktinin-Superfamilie von CH- (Calponin-homolog) Domänen enthaltenden Proteinen (Olski et al., 2001). Vertebraten besitzen drei Parvin-Isoformen, α-, β- und γ-Parvin bzw. drei Parvin-Gene (Korenbaum et al., 2001). Invertebraten haben nur ein Parvin-ähnliches Protein, niedere Eukaryonten besitzen kein Parvin. Die murinen und humanen Parvine zeigen eine hohe Sequenzhomologie, im Fall von α-Parvin mit 98% identischen Resten am höchsten. Die murinen Parvine sind 42,1 kDa (α-Parvin), 41,3 kDa und 37,5 kDa (γ-Parvin) groß. Die klassisch aus zwei CH-Domänen bestehende F-Aktin-bindende Domäne (ABD) ist dabei das wesentliche strukturelle Merkmal aller Parvine (Abb. 1.5.1). Jedoch zeigen die CH-Domänen der ABD der Parvine ein auffälliges Verwandtschaftsverhältnis zu den CH-Domänen anderer ABD. Die ABD von Proteinen der α-Aktinin-Superfamilie besteht aus einer CH1- (TYP1) und CH2- (Typ2) Domäne, wobei ein wesentliches Charakteristikum der Typ1- im Gegensatz zur Typ2-Domäne ihre intrinsische F-Aktin-Bindung ist. Die größte Ähnlichkeit sowohl bei der CH1- wie auch der CH2-Domäne der Parvine besteht zu den Typ1-CH-Domänen der α-Aktinin-Superfamilie. Jedoch zeigen die CH1- und CH2-Domänen der Parvine höhere Sequenzhomologie untereinander als jeweils zur CH1- bzw. CH2-Domäne der restlichen α-Aktinin-Familie, weshalb Gimona et al. (2002) sie unter „Typ4“ (CH1) und „Typ5“ (CH2) eingeordnet haben. Die beiden CH-Domänen der Parvine stellen somit einen eigenen phylogenetischen Zweig in der α-Aktinin-Superfamilie dar. Die von Olski et al. (2001) mittels Ko-Sedimentation untersuchte α-Parvin//F-Aktin-Affinität ist mit einem Dissoziationskoeffizienten von 8,4 µM vergleichbar mit der anderer Proteine der α-Aktinin-Familie. Weiterhin auffällig an der Parvin-ABD ist eine ungewöhnlich lange Verbindungssequenz (60 AS) zwischen den CH-Domänen. Diese ist in anderen F-Aktin-bindenden CH-Domänen Proteinen meist nur wenige Aminosäuren lang (Gimona et al., 2002). N-terminal zeigen α- und β-Parvin, nicht aber γ-Parvin zwei Kernlokalisationssequenzen, deren Funktionalität jedoch nicht untersucht ist. Weiterhin haben α-und β-Parvin N-terminal Bindungsmotive für SH3- (src-homology-3) Domänen. Die Mehrzahl der beschriebenen Interaktionen der Parvine läuft über die CH2-Domäne, weitere

Bindungspartner sind jedoch auch in der CH1-Domäne sowie N-terminal zu finden (Abb. 1.5.1).

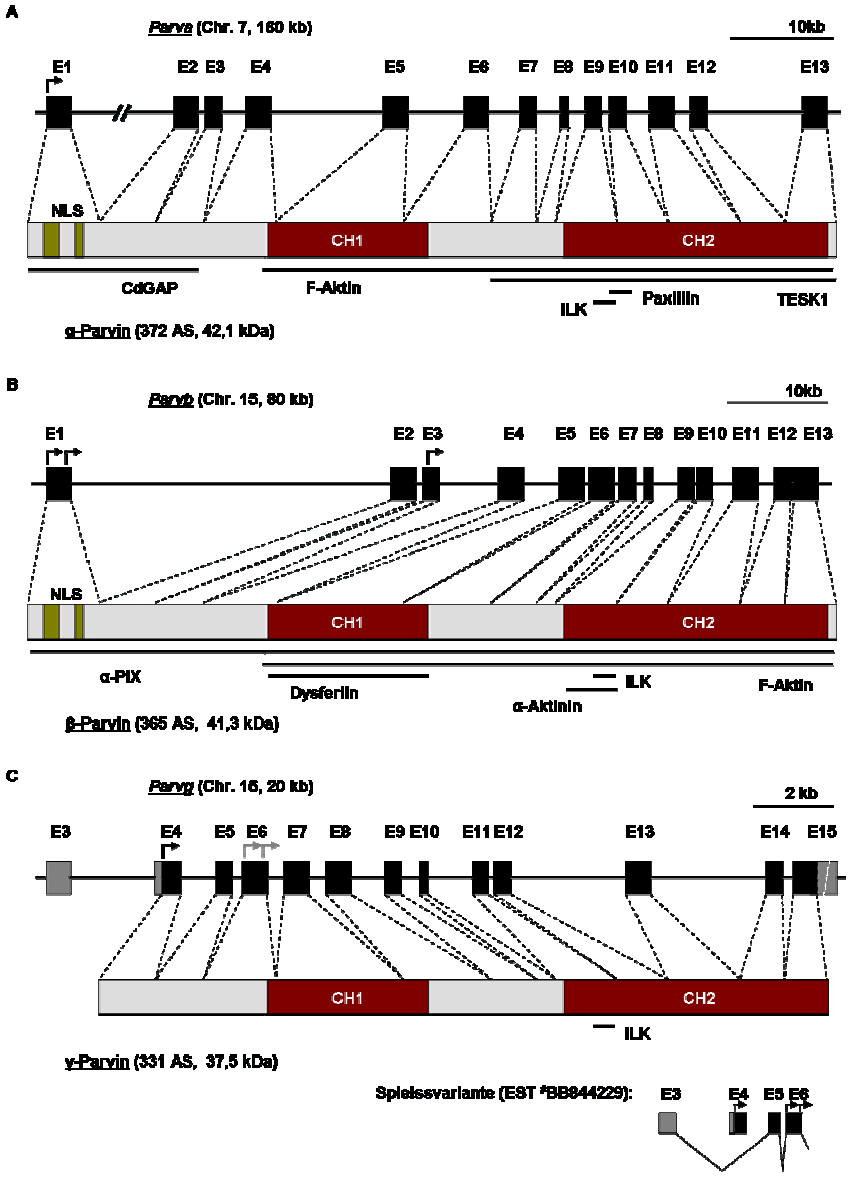


Abb. 1.5.1: Gen- und Proteinstruktur der murinen Parvine; A: Parva/α-Parvin; B: Parvb/β-Parvin; C: Parvg/γ-Parvin; Pfeile: (potentielle) Startkodons, NLS: Kernlokalisationssequenz, CH: Calponin-homologe Domäne, Bindungsstellen von Interaktionspartnern (vgl. 1.5.2) sind schwarz unterlegt

Innerhalb der Parvin-Familie zeigen α- und β-Parvin untereinander ausgeprägtere Sequenzhomologie als zu γ-Parvin (Olski et al., 2001). Murines α- und β-Parvin zeigen 73% identische und 85% ähnliche Reste, während die Homologie zu γ-Parvin nur 42%/67% (α-Parvin) und 43%/66% (β-Parvin) beträgt. Interessanterweise ist α-Parvin zwischen Mensch und Maus am stärksten konserviert mit 98%/99% Homologie, während die anderen Parvine mit 92%/96% (β-Parvin) und 79%/88% (γ-Parvin) weniger konserviert sind. Grundsätzlich

zeigen die Parvine N-terminal geringere Sequenzhomologie als in der Aktin-bindenden Domäne, am konserviertesten ist die CH2-Domäne. Die Exon-Intron-Struktur der murinen Parvin-Gene ist hoch konserviert, wenngleich die Größe der Introns stark variiert. Das murine α-Parvin-Gen (*Parva*) liegt auf Chromosom 7, während die murinen β- und γ-Parvin-Gene (*Parvb*, *Parvg*) direkt benachbart auf Chromosom 15 liegen, durch nur 12 kb voneinander getrennt (Olski et al., 2001). Für α-Parvin wurde regulatorische Serin/Threonin-Phosphorylierung am N-Terminus gezeigt (Curtis et al., 2002; Clarke et al., 2004). Die entsprechenden Serin-Reste sind zwischen α-, β- und γ-Parvin nur partiell konserviert. β-Parvin zeigt neben dem initialen Startkodon zwei weitere Methionin-Kodons mit Kozak- bzw. Kozak-ähnlicher Sequenz, die im humanen β-Parvin (Affixin) funktional scheinen (Yamaji et al., 2001). Für α- bzw. γ-Parvin sind keine Translationsvarianten beschrieben. Das erste γ-Parvin/*Parvg* Exon (Exon3 entsprechend der Nomenklatur für das humane Ortholog) wird nicht translatiert, weshalb γ-Parvin die Kernlokalisationssequenzen fehlen. Das *Parvg*-Transkript wird weiterhin alternativ gespleisst (Abb. 1.5.1). Poly-Adenylierung wurde für α- und β-Parvin gezeigt (Olski et al., 2001).

Die murinen Parvine zeigen unterschiedliche Expressionsmuster, die den humanen Orthologen jeweils recht ähnlich sind (Korenbaum et al., 2001). Nothern-blot Analysen haben für humanes bzw. murines α-Parvin eine breite Expression, am stärksten in Herz, Niere und Leber gezeigt (Olski et al., 2001; Korenbaum et al., 2001). β-Parvin zeigt ebenfalls breite Expression, neben Milz und Lunge ist die Expression in Herz und Skelettmuskulatur auffällig stark. γ-Parvin ist in lymphoiden Geweben exprimiert. Chu et al. (2006) haben die auf hämatopoetische Zellen begrenzte Expression von γ-Parvin auf Proteinebene gezeigt. Sie haben weiterhin das Fehlen von α-Parvin in hämatopoetischen Zellen gezeigt, α- und γ-Parvin sind somit komplementär exprimiert. Die breite Expression von β-Parvin haben Yamaji et al. (2001) auf Proteinebene bestätigt.

1.5.2 Interaktionspartner und Funktionen

Neben der Bindung von ILK sowie von F-Aktin, letztere wurde direkt bisher nur für α-Parvin dokumentiert (Olski et al., 2001), zeigen die Parvine eine Reihe weiterer Interaktionen, die insbesondere auf Funktionen bei der Aktin-Reorganisation schließen lassen (Abb. 1.5.1). Studien zur Funktion der Parvine stammen von einigen wenigen Gruppen, die meist nur an einer Isoform arbeiten. Daher ist zumeist nicht untersucht, welche der Interaktionen einzelner Isoformen spezifisch für diese sind und welche möglicherweise für alle Parvine gelten. Dies

ist besonders interessant, da für die beiden hoch homologen Isoformen α- und β-Parvin unterschiedliche Funktionen bei der Regulation von Zellspreiten und Apoptose nahegelegt wurden.

Verschiedene Studien beschreiben die Lokalisation von Parvinen in einem Großteil von Zell-Matrix-Adhäsionsstrukturen. Für α-Parvin wurde Lokalisation in Fokalkontakten, Fokalkomplexen, im Leitsaum der Zelle, in fibrillären Adhäsionen, in Kostameren von Kardiomyozyten *in vitro* sowie im Nukleus beobachtet (Olski et al., 2001; Nikolopoulos und Turner, 2000). β-Parvin-Lokalisation wurde in Fokalkontakten, im Leitsaum, subsarkolemmal in Skelettmuskelfasern, sowie in initialen, Vinculin-negativen Zell-Matrix-Kontakten adhärierender CHO-Zellen beobachtet (Yamaji et al., 2001, 2004). Eine mögliche Lokalisation in fibrillären Adhäsionen wurde nicht untersucht. Parvine zeigen keine α-Aktinin-ähnliche Lokalisation in Stressfasern. Ebenso wurde keine Lokalisation in Zell-Zell-Kontakten beobachtet.

Regulatorische Mechanismen von Lokalisation und Funktion von Parvinen sind relativ ungeklärt. Nikolopoulos und Turner (2000) haben die Bindung von α-Parvin und Paxillin dokumentiert. Diese vermittelt, zumindest partiell, die Rekrutierung des Komplexes in Fokalkontakte (Nikolopoulos und Turner, 2000, 2002). Weiterhin scheint hierfür jedoch auch die ILK-Paxillin-Bindung nötig zu sein (Nikolopoulos und Turner, 2002). Wenngleich eine Bindung von β- oder γ-Parvin an Paxillin nicht direkt gezeigt wurde, erscheint diese aufgrund der in allen Isoformen vorhandende Paxillin-Bindungsstelle nicht unwahrscheinlich. Als direkt Funktions-regulatorischer Mechanismus wurde bisher Serin/Threonin-Phosphorylierung von Parvinen gezeigt. Curtis et al. (2002) haben die N-terminale Phosphorylierung von α-Parvin durch CyclinB/Cdk2 während der Mitose sowie die anschließende Dephosphorylierung zu Beginn der G1-Phase gezeigt. Clarke et al. (2004) haben die eventuell Erk2-vermittelte Phosphorylierung von α-Parvin als relevant für das Zellspreiten beschrieben. Die entsprechenden N-terminalen Reste sind zwischen α-, β- und γ-Parvin jedoch nur teilweise konserviert, so dass hier möglicherweise Isoform-spezifische, Regulationsmechanismen der Parvine ansetzen. Für β-Parvin wurde die *in vitro*-Phosphorylierung durch ILK während des Zellspreitens beschrieben, die eine Interaktion mit α-Aktinin vermitteln soll (s.u.) (Yamaji et al., 2004).

Sowohl α- wie auch β-Parvin zeigen Interaktionen mit Rho-GTPase-Regulatoren bzw. Zytoskelett-regulatorischen Proteinen. Über eine Sequestrierung von TESK1 (testicular kinase 1) reguliert α-Parvin möglicherweise das Zellspreiten negativ, da die TESK1-vermittelte Phosphorylierung und Aktivierung von Cofilin inhibiert wird (LaLonde et al., 2005). Die F-

Aktin-schneidende Aktivität von Cofilin wird unter anderem für die Bildung besonders Aktin-Polymerisations/Depolymerisations-abhängiger Strukturen, etwa Lamellipodien benötigt (Ghosh et al., 2004; Pollard und Borisy, 2003). Funktionell ähnlich scheint die ebenfalls von LaLonde et al. (2006) beschriebene Interaktion von α-Parvin mit dem Cdc42/Rac-spezifischen GAP CdGAP. Möglicherweise rekrutiert α-Parvin CdGAP in Fokalkontakte und reguliert so Lamellipodienbildung, Spreiten und Migration. Beide Interaktionen beschreiben inhibitorische Effekte auf Rac bzw. Cdc42. Dementsprechend haben Fukuda et al. (2003) ein verstärktes Zellspreiten unter α-Parvin-Verlust beschrieben. Auch führte die siRNA-vermittelte Depletion von α-Parvin in HeLa-Zellen zu verstärkter Rac-Aktivierung und Lamellipodien-Bildung (Zhang et al., 2004). Für β-Parvin hingegen wurde die Interaktion mit dem Rac/Cdc42-spezifischen GEF α-PIX beschrieben (Rosenberger et al., 2004). Mishima et al. (2004) haben dahingehend eine Aktivierung von Rac/Cdc42 unter Überexpression des α-PIX-bindenden N-Terminus bzw. der CH1-Domäne von β-Parvin beobachtet. Yamaji et al. (2001) zeigten unter diesen Bedingungen ein beschleunigtes Zellspreiten. Jedoch haben Zhang et al. (2004) unter Überexpression des gesamten β-Parvin-Proteins keine Aktivierung von Rac beobachten können, ebenso keine reduzierte Rac-Aktivierung nach siRNA-vermittelter Depletion von β-Parvin. Auch zeigten die hier verwendeten HeLa-Zellen keine morphologische Veränderung nach β-Parvin-Verlust oder Überexpression. Dennoch deutet die α-PIX/β-Parvin-Interaktion grundsätzlich auf eine Rac/Cdc42-aktivierende Funktion von β-Parvin hin. Weiterhin wurde eine Interaktion von β-Parvin und α-Aktinin beschrieben, die eine Fokalkontakt-Lokalisation von α-Aktinin vermitteln soll (Yamaji et al., 2004). In den hier verwendeten HT1080-Fibroblasten führte der siRNA-vermittelte Verlust von β-Parvin zu einer drastischen Abrundung der Zellen. Insgesamt deuten die bisherigen Funktionsstudien zu α-und β-Parvin bei der Rho-GTPase-vermittelten Regulation des Zellspreitens auf gegenläufige Funktionen der beiden Isoformen hin, mit einer inhibitorischen Funktion von α-Parvin und einer stimulierenden Funktion von β-Parvin. Dahingehend haben Zhang et al. (2004) die reduzierte Bildung von ILK/α-Parvin-Komplex unter Überexpression von β-Parvin beschrieben, was eine kompetitive ILK-Bindung beider Isoformen nahelegt. Zudem beobachteten sie eine einseitige Abhängigkeit der β-Parvin-Expression von der α-Parvin-Expression.

Neben möglicherweise divergenten Funktionen von α-und β-Parvin auf die Rho-GTPase-Aktivierung zeigt sich eine ähnliche Situation im Hinblick auf die Regulation des Zellüberlebens, für dass mehrfach eine starke Abhängigkeit von ILK beschrieben wurde (Radeva et al., 1997; Attwell, 2000). So zeigten mehrere Studien eine Abhängigkeit des

Zellüberlebens von α-Parvin (Chen et al., 2005; Fukuda et al., 2003). Eventuell vermittelt α-Parvin hierbei die Membrantranslokation von PKB/Akt bzw. deren Aktivierung (Fukuda et al., 2003). Jedoch konnten Zhang et al. (2004) keine reduzierte Apoptose unter α-Parvin-Überexpression in HeLa-Zellen beobachten. Für β-Parvin hingegen haben Zhang et al. (2004) die Induktion von Apoptose unter Überexpression in HeLa-Zellen beschrieben. Auch wurde eine verringerte β-Parvin-Expression in Brusttumorproben sowie die Inhibition von adhäsionsunabhängigem Zellwachstum unter β-Parvin-Überexpression beobachtet (Mongroo et al., 2004). Diese Ergebnisse deuten eine anti-apoptotische Funktion von α-Parvin bzw. eine pro-apoptotische Funktion von β-Parvin an.

Die Regulation von Aktin-Zytoskelett und Zellüberleben sind Prozesse, die für die Stabilisierung bzw. die Hypertrophie von Kardiomyozyten von Bedeutung sind. Die Ausbildung einer dilatativen Kardiomyopathie in ILK-defizienten Herzen bzw. die einer Hypertrophie unter ILK-Überexpression stellt die Frage, in wieweit solche Funktionen Parvin-vermittelt sind (White te al., 2006; Lu et al., 2006). Dahingehend haben Bendig et al. (2006) den Kontraktionsdefekt der ILK^{L308P}-Mutante in *D. rerio* unter Morpholino-vermitteltem β-Parvin-Verlust phänokopieren können. Ähnlich haben Chen et al. (2005) eine Funktion von α-Parvin bei der Fibronektin-induzierten Hypertrophie und Apoptose-Inhibition von Kardiomyozyten *in vitro* beschrieben. Der Funktionsverlust des *C. elegans* Parvin-Orthologs pat-6 führt zu Defekten in der Assemblierung der dense-bodies, die die Adhäsion der Muskeln des Hautmuskelschlauches an die Basalmembran der Hypodermis vermitteln (Mackinnon et al., 2002). Dies führt zu einem Kontraktionsdefekt der sich entwickelnden Muskulatur und zu einem Arrest der Embryonalentwicklung. Ein weiterer, jedoch lediglich mittels Ko-Immunpräzipitation gezeigter Bindungspartner von β-Parvin ist das sarkolemmale Protein Dysferlin (Matsuda et al., 2005). Für Dysferlin und β-Parvin wurde eine verringerte Expression in verschiedenen, leichten Muskeldystrophien gezeigt. Dysferlin scheint eine Rolle bei Ca^{2+}-abhängigen Membranreparaturprozessen zu spielen (Bansal et al., 2003; Bansal und Campbell, 2004). Mögliche Funktionen der Parvine in Muskelgeweben können somit recht verschiedener Natur sein. Hierzu gehören die adhäsionsabhängige Signaltransduktion sowie eventuell mechanische Adhäsion und Membranumbau. Vor dem Hintergrund einer möglichen Rolle von ILK bei der Stabilisierung von Kardiomyozyten sind die Parvine als mögliche Vermittler solcher Funktionen interessant.

Vergleichsweise wenig funktionelle Studien sind zu γ-Parvin bekannt. Aufgrund des unter ILK-Defizienz beschriebenen Chemotaxis-Defekts in T-Lymphozyten ist für γ-Parvin weiterhin eine Untersuchung von T- sowie B-Lymphozyten interessant, insbesondere, da es

die einzige Parvin-Isoform in diesen Zellen ist (Chu et al., 2006). Für γ-Parvin wurde eine mögliche Funktion bei der Polarisierung von Zellen einer Monozyten-abgeleiteten Zelllinie beschrieben (Liu et al., 2005; Yoshimi et al., 2006). So zeigten adhärierende Zellen unter γ-Parvin-Verlust das Fehlen einer polarisierten PTEN-Verteilung. Jedoch zeigten die Zellen für Monozyten ungewöhnliche Adhäsionsstrukturen wie Fokalkontakte. Zudem ist eine Ko-Expression von β-Parvin in diesen Zellen nicht unwahrscheinlich, was über eine Interaktion mit α-PIX prinzipiell ebenfalls chemotaktische Funktion ausüben könnte (Rosenberger et al., 2004; Li et al., 2003c). Jedoch erscheinen Funktionen von γ- sowie auch β-Parvin bei der Polarisierung und Migration bzw. Zirkulation von Leukozyten nicht unwahrscheinlich.
Die bisher veröffentlichen Arbeiten zur Funktion der Parvine beziehen sich meist auf *in vitro*-Daten. Sie weisen ähnlich wie Studien zu ILK und PINCH auf Funktionen bei der Regulation von Rho-GTPasen und eventuell des Zellüberlebens hin. Hierbei haben α- und β-Parvin möglicherweise divergente Funktionen. Diese *in vitro* beschriebenen Funktionen machen eine Funktion der Parvine für die Vermittlung β1 Integrin/ILK-vermittelter mechanoresponsiver Signale zur Stabilisierung von Kardiomyozyten nicht unwahrscheinlich. Die fehlende Adhäsion der Muskulatur von *C. elegans* an die hypodermale Basalmembran unter pat-6/Parvin-Funktionsverlust stellt zudem die Frage einer Funktion von Parvinen für die mechanische Adhäsion. β-Parvin sowie speziell auch γ-Parvin könnten Funktionen bei Polarisierung und Migration von Leukozyten haben.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

In vitro und *in vivo* durchgeführte Studien von β1 Integrin- sowie ILK-vermittelten Adhäsionsprozessen haben einen engen funktionalen Zusammenhang der beiden Proteine gezeigt. Abhängig von β1 Integrin/ILK sind sowohl Prozesse der Embryonalentwicklung, wie die Keimblattdifferenzierung oder die Vaskulogenese als auch adulte Homöostaseprozesse, etwa in Herz- und Skelettmuskulatur. Hierbei scheint ILK als wichtiger Regulator des Aktin-Zytoskeletts zu fungieren.
Da Parvine prinzipiell sowohl strukturelle als auch regulatorische Verbindung zwischen dem ILK/PINCH/Parvin-Komplex und dem Aktin-Zytoskelett vermitteln können, stellt sich die Frage, in wieweit Parvine als Mediatoren der beschriebenen ILK-Funktionen agieren. Bisher veröffentlichte Studien zur Funktion von Parvinen wurden in erster Linie *in vitro* durchgeführt und charakterisieren die Parvine grundlegend. *In vivo*-Funktionen sind jedoch kaum beschrieben, wenngleich die Parvine aufgrund der Präsenz von drei Isoformen die

gewebespezifischen Funktionen von ILK-PINCH/Parvin-Komplexen wahrscheinlich grundlegend bestimmen.

Ziel der Arbeit ist daher die funktionelle Charakterisierung von Parvin-Proteinen *in vivo* durch Generierung und Analyse Parvin-defizienter Mauslinien. Die Analysen erfolgten unter Berücksichtigung der gewebespezifischen Expression der einzelnen Parvine sowie im Hinblick auf mögliche Bedeutung bei β1 Integrin/ILK-vermittelten Adhäsions- bzw. Signalprozessen. Primäres Interesse galt hierbei β-Parvin und einer möglichen Funktion bei der Mechanotransduktion in Kardiomyozyten. Weiterhin wurden verschiedene β-, γ- und β-/γ-Parvin-defiziente Leukozyten in ihrem Migrations- bzw. Spreitverhalten analysiert. Schließlich wurde die Defizienz von α-Parvin während der Embryonalentwicklung charakterisiert.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Mauslinien

Zur Generierung von Blastozysten für die Injektion von ES-Zellen wurde die C57Bl/6J-Linie verwendet, die durch eine schwarze Fellfarbe gekennzeichnet ist. Die gleichzeitige Verwendung von R1 ES-Zellen, abgeleitet von der 129/sv-Linie mit brauner Fellfarbe für die Generierung homolog-rekombinanter ES-Zell-Klone ermöglichte so einen Rückschluss auf den Grad des Chimärismus nach der Blastozysten-Injektion. Zur Herstellung scheinschwangerer Weibchen wurden C57Bl/6J-Weibchen mit vasektomierten FVB-Männchen verpaart. Sämtliche Analysen wurden an Tieren mit aus 129/Sv und C57Bl/6J gemischtem genetischen Hintergrund durchgeführt.

2.1.2 Zelllinien und Primärzellen

Für die Herstellung homolog rekombinanter ES-Zell-Klone wurde die von der sv/129-Linie abgeleitete R1 ES-Zelllinie verwendet (Nagy et al., 1993). Die für die ES-Zellkultur verwendeten Nährzellen, mitotisch inaktivierte murine embryonale Fibroblasten, wurden aus C57Bl/6J-Tieren mit Neomyzin-Resistenz-Transgen hergestellt. Für die in 3.2.3 beschriebenen Versuche zur subzelluären Lokalisation verschiedener Parvin-Isoformen wurden NIH3T3-Zellen verwendet, die neben guten Transfektionseigenschaften gut visualisierbare Adhäsionsstrukturen aufweisen. Zur Charakterisierung von Parvin-Defizienzen auf zellulärer Ebene wurden verschiedene Primärzellen untersucht. Murine embryonale Fibroblasten (MEF) wurden aufgrund ihrer nahen Verwandschaft zu den in vielen zellbiologischen Studien verwendeten fibroblastoiden Zelllinien gewählt. Aufgrund ihrer ausgeprägten Migrationseigenschaften wurden aus Knochenmark *in vitro* differenzierte dendritische Zellen (DC) für *in vivo*-Migrationsversuche und *in vitro* differenzierte Makrophagen für Spreitversuche verwendet.

2.1.3 Antikörper

Anti α-Tubulin	Chemicon, Hampshire, UK
Anti α-Aktin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti Erk1/2 (total)	Cell Signaling/NEB, Frankfurt a.M.

Anti Erk1/2 (Y202-phosphoryliert)	Cell Signaling/NEB, Frankfurt a.M.
Anti GAP-DH	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti ILK (Western-blot)	Becton-Dickinson (BD), Heidelberg
Anti ILK (Immunfluoreszenz)	Cell Signaling/NEB, Frankfurt a.M.
Anti β1-Integrin	Chemicon, Hampshire, UK
Anti PINCH1	polyklonales Peptid-Antiserum (Hase), MPI
Anti α-Parvin	polyklonales Peptid-Antiserum (Hase), MPI
Anti β-Parvin	polyklonales Peptid-Antiserum (Hase), MPI
Anti γ-Parvin	polyklonales Peptid-Antiserum (Hase), MPI
Anti PINCH-1	polykonales Peptid-Antiserum, (Hase), MPI
Anti α-Aktinin2 (muskelspezifisch)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti PE-CAM	BD, Heidelberg
Anti Paxillin	Transduction Laboratories/BD, Heidelberg
Anti Akt (total)	Cell Signaling/NEB, Frankfurt a.M.
Anti Akt (S473-phosphoryliert)	Cell Signaling/NEB, Frankfurt a.M.
Anti GSK3-β (total)	Cell Signaling/NEB, Frankfurt a.M.
Anti GSK3-β (S9-phosphoryliert)	Cell Signaling/NEB, Frankfurt a.M.
Anti Neurofilament 160	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti MOMA-1	BMT-Technolgies, Basel
Anti MARCO	Serotec, Düsseldorf
Anti F4/80	Serotec, Düsseldorf
PanLaminin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti CD3-Biotin	BD, Heidelberg
Anti B220-Biotin	BD, Heidelberg
Streptavidin-cy5	Jackson Immunoresearch, West Grove, Hampshire, UK
anti-GFP	BD, Heidelberg
anti-GST	Upstate-Technolgies über Chemicon, Hampshire, UK
Anti-Maus IgG-HRP-Konj.	BioRad, München
Anti-Hase IgG-HRP-Konj.	BioRad, München
Anti-Ratte IgG-HRP-Konj.	Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA
Anti-Maus IgG-cy3-Konj.	Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA
Anti-Hase IgG-cy3-Konj.	Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA
Anti-Maus IgG-Alexa488-Konj.	Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA
Anti-Hase IgG-Alexa488-Konj.	Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA

2.1.4 DNA-Bibliothek, Vektoren, Plasmide und DNA/RNA-Sonden

Als Ausgangsmaterial für die Klonierung genomischer Deletionskonstrukte diente die RPC12l-PAC- (P1 derived artificial chromosome) DNA-Bibliothek (129/Sv; Human Genome Mapping Project Center, Cambridge, UK). Diese enthält DNA der Klone auf 10 Membranen. Zwei bis drei Klone pro Isoform dienten als Ausgangsmaterial zur Isolierung genomischer DNA für die Klonierung der Deletionskonstrukte. Sämtliche Klonierungsschritte zur Erstellung der genomischen Deletionskonstrukte p*Parva*^{fl} , p*Parvb*$^{\Delta}$ und p*Parvg*^{fl} sowie der DNA-Sonden für Southern-, Northern-blot und *in situ*-Hybridisierungen wurden unter Verwendung der Bluescript-Vektoren KSII+ bzw. SKII+ (Stratagene, Amsterdam, NL) durchgeführt.

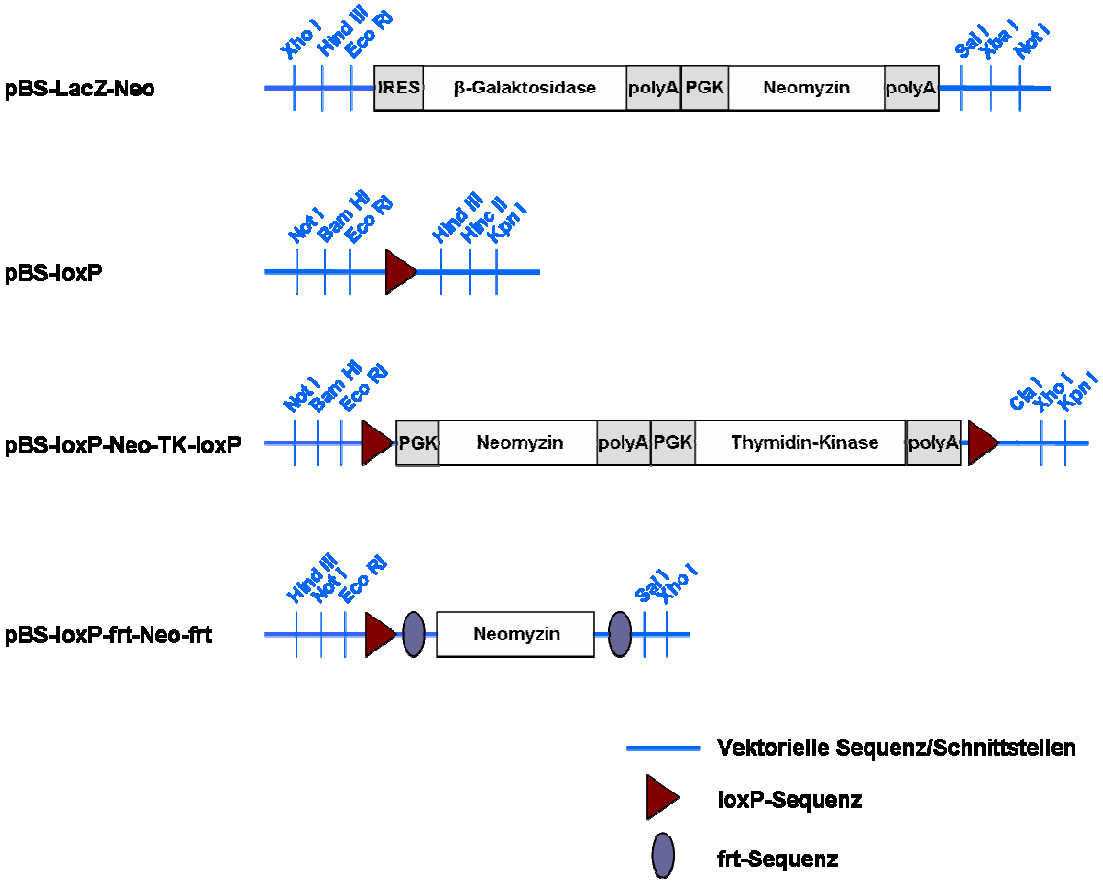


Abb. 2.1.4: Verwendete Selektionskassetten; pBS-LacZ-Neo (pParvb$^{\Delta}$), pBS-loxP und pBS-loxP-Neo-TK-loxP (pParvg ^{fl}), pBS-loxP-frt-Neo-frt (pParva ^{fl}), jeweils in pBluescript II KS/SK; IRES: internal ribosomal entry site, polyA: Poly-Adenylierungssequenz, PGK: Phospho-Glyzerat-Kinase-Promotor

Für die Identifizierung Parvin-positiver PAC-Klone, *in situ*-Hybridisierungen und Northern-blot-Analysen von α- bzw. β-Parvin wurden 500-700 bp lange, C-terminal gelegene Fragmente der cDNAs bzw. bis in den 3´-untranslatierten Bereich des *Parva*-Transkripts

gelegen, verwendet. Das während der Generierung der *Parvb*/*Parvg* Doppeldeletionsmutante verwendete Plasmid zur Cre-Rekombinase-Expression (pICcre) enthält die Cre-cDNA im pUC14-Vektor (TaKaRa-Biomedicals, Cambrex, Potsdam). Für die *in vitro*-Translation von α-, β- und γ-Parvin wurden die cDNAs in den pCS2+-Vektor (SP6-Promotor) kloniert. Die Konstrukte zur Expression von GFP-markiertem α- und β-Parvin (pAP-GFPC1, pBP-GFPC1) wurden durch Klonierung der cDNAs (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. A.A. Noegel, Universität Köln) in den pEGFP-C1 Vektor (Clontech, Palo Alto, CA, USA) erstellt. Abbildung 2.1.4 zeigt die für die Klonierung der genomischen Deletionskonstrukte verwendeten Selektionskassetten bzw. Plasmide.

2.1.5 Oligonukleotide

Folgende Oligonukleotide wurden zur Genotypisierung von Mäusen bzw. ES-Zellen verwendet. Die genomische Lokalisation der Oligonukleotide ist in den Abbildungen 3.3.1.1, 3.4.1.2 und 3.5.1 gezeigt.

Tab. 2.1.5: Oligonukleotide für die Genotypisierung von Mäusen bzw. ES-Zellen

Name	Lokalisation	Sequenz
BPI2f	*Parvb* Intron2	5′-GTGAACTTCACTGGACTCTT-3′
BPE3r	*Parvb* Exon3	5′-TCCTTGAACTTGGGGTCTTCT-3′
PGKf	Neomyzin-Resistenzkass.	5′-GATTAGATAAATGCCTGCTC-3′
GPI5f	*Parvg* Intron5	5′-CCTCACATACCAGGATGA-3′
GPI5r	*Parvg* Intron5	5′-CCAGGTCAGCAACTCCTA-3′
GPI6r	*Parvg* Intron6	5′-GCTCTATAGAATCGTCTGGC-3′
Cref	Cre-Transgen	5′-AACATGCTTCATCGTCGG-3′
Crer	Cre-Transgen	5′-TTCCGATCATCAGCTACACC-3′
APloxPf	*Parva* Intron3	5′-CTGAGTGACATGGAGTTTGAG-3′
APloxPr	*Parva* Intron3	5′-GGACTTGTGGACTAGTTAGAC-3′
APE2f	*Parva* Exon2	5′-GAAGGAATGAACGCCATCAAC-3′

2.1.6 Enzyme/ Proteine

Taq DNA-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
DNA-Polymerase I large fragment	Roche, Mannheim
T4 DNA-Ligase („Fast link“)	Epicentre, über Biozym, Oldendorf
RNA-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe

Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Restriktionsendonukleasen	NEB, Frankfurt a.M.
Fibronektin	Merck, Darmstadt
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin	Gibco Life Technologies/Invitrogen, Karlsruhe
Kollagen I	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Laminin	Fr. Dr. T. Sasaki, MPI f. Biochemie
Vitronektin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bovines Serum Albumin	PAA-Laboratories, Pasching
Alkalische Phosphatase (Shrimp)	Roche, Mannheim
LIF (Leukemia inhibitory factor)	Chemicon, Hampshire, UK
Protein A-Trisacryl	Perbio Science, Bonn
Glutathione-Sepharose-Perlchen	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.1.7 Zellkulturmedien

EF-Medium

DMEM, 10% FCS, Penizillin/Streptomyzin

ES-Medium

DMEM, 20% FCS, 0,1 mM β-Mercaptoethanol, 1x nicht essentielle Aminosäuren, 1000 U/ml Leukemia inhibitory factor (LIF), zur Selektion 500 µg/ml G418 bzw. 2 µM FIAU

R10-Medium

RPMI, 10% FCS, Penizillin/Streptomyzin, 0,1 mM β-Mercaptoethanol, 10% Kulturüberstand einer GM-CSF-prouzierenden Zelllinie (Differenzierung in DCs) bzw. 10% M-CSF-haltiger Kulturüberstand von L929-Zellen (Differenzierung in Makrophagen) (vgl. 2.2.4)

Einfriermedium (ES-Zellen, Fibroblasten)

DMEM, 20% FCS, 10% DMSO

Einfriermedium (Makrophagen und DCs)

FCS, 10% DMSO

Soweit nicht anders vermerkt, wurden Medien und Zusätze von Gibco Life Technologies bezogen.

2.1.8 Medien, Puffer, Lösungen

Ac-Puffer

0,015% Triethanolamin, 0,5% Essigsäure, pH 8.0

Agarosegel zur elektrophoretischen Trennung von RNA

1,5% Agarose, 1x MOPS, 7% Formaldehyd

Anilinblau-Orange G-Färbelösung (2x)

0,5% Anilinblau, 2% Orange G, 8% Eisessig in H_2O, (aufkochen und filtrieren)

Azokarmin G-Färbelösung

0,5% Azokarmin G, 1% Eisessig in H_2O, (aufkochen und filtrieren)

Blockpuffer

1xTBS, 0,1% Tween 20, 10% Magermilchpulver

Blotpuffer

25 mM Tris, 150 mM Glyzin, 15% Isopropanol, pH 8.3

Church-Puffer (Hybridisierungspuffer Southern-/Northern-blot, 1 L)

500 ml NaPi-Lösung, 350 ml 20% SDS, 1 ml 0,5 M EDTA, 100 µg/ml einzelsträngige DNA, 1% BSA, pH 7.2

Church-Wash (Waschpuffer Southern-/Northern-blot,1 L)

40 ml NaPi-Lösung, 50 ml 20% SDS, pH 7.2

DNA-Denaturierungspuffer (Southern-blot)

1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH

DNA-Ladepuffer

30% Glyzerol, 0,25% Bromphenolblau, pH 8.0

FACS-Puffer

1% FCS, 2mM EDTA in PBS

Hybridisierungslösung (*in situ*-Hybridisierung)

50% Formamid, 10% Dextransulfat, 10 mM Tris, 5 mM EDTA, 150 µg/ml tRNA, 150 µg/ml ssDNA, 10 mM DTT, 10 mM β-Mercaptoethanol, in DEPC-Wasser

IP-Puffer

150 mM Tris, 50mM NaCl, 1mM EDTA, 0,5% Nonidet P40, 1 Tablette Proteaseinhibitoren/ 10 ml, 0,7 µg/ml Pepstatin, pH 8.0

Lämmli-Puffer

120 mM Tris, 10% SDS, 10% Glyzerol, 25% β-Mercaptoethanol, 0,01% Bromphenolblau

Laufpuffer SDS-Polyacrylamidgele (5x, 1L)

30,285g Tris, 151,4g Glyzin, 25ml SDS (20%)

LB-Agar

1,5% (w/v) Agar in LB-Medium, 100µg/ml Ampicillin o. 50µg/ml Kanamycin

LB-Medium

10g Trypton, 5g Hefeextrakt, 10g NaCl, pH 7.5

Lysepuffer (DNA)

100 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 0,2% SDS, 200 mM NaCl, 100 µg/ml Proteinase K, pH 8.5

Lysepuffer (Erythrozyten)

0,15 M NH_4Cl, 1 mM $KHCO_3$, 0,1 mM EDTA

Lysepuffer (GST/GFP Ko-Präzipitation)

150mM TrisHCl pH 8.0, 50mM NaCl, 1mM EDTA, 0,5% NP40, 0,7 µg/ml Pepstatin, 1 Tablette Proteaseinhibitoren/ 10 ml

NaPi-Lösung

684 ml 1 M Na_2HPO4, 316 ml 1 M NaH_2PO4, pH 7.2

Neutralisierungspuffer (Southern-blot)

1,5 M NaCl, 0,5 M Tris, pH 8.0

PBS

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na_2HPO_4, 1,5 mM KH_2PO_4, pH 7.2

PBSMT

2% Magermilchpulver, 0,1% Triton X-100 in PBS

PBT

0,2% BSA, 0,1% Triton X-100 in PBS

Phosphatpuffer (500 ml, 0,1 M)

10,86 g Na_2HPO_4, 1,31 g Na H_2PO_4, pH 7.4

Polyacrylamidgel für die Elektrophorese

Trenngel: 5,9 ml H_2O, 3,8 ml 1,5 M Tris-HCl, 5 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30%/0,8%), 75 µl 20% SDS, 150 µl 10% APS, 6 µl TEMED, pH 8.8

Sammelgel: 5,8 ml H_2O, 1 ml 1 M Tris-HCl, 1,08 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30%/0,8%), 50 µl APS, 12 µl TEMED, pH 6.8

Proteinase K-Lösung (*in situ*-Hybridisierung)

10 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 10 µg/ml Proteinase K

RIPA-Puffer

50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P40, 0,1% SDS, 0,5% Na-Desoxycholat, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 Tablette Proteaseinhibitoren/ 10 ml, Phosphataseinhibitorcocktails #1 und #2 (je 1:100), pH 7.5

RNA-Denaturierungspuffer (10 ml, Northern-blot)

9,5 ml Formamid, 20 mM EDTA, 0,25% SDS, 2,5 mg Bromphenolblau

Stopppuffer (Adhäsionsassay)

50 mM Glyzin, 5 mM EDTA, pH 10.4

SSC (20x, 1 L)

175,3 g NaCl, 88,2 g Na-Zitrat, pH 7.0

„Stripping"-Puffer (Southern-/Northern-blot)

100 ml H_2O, 100 ml TE, 1 ml 20%SDS

"Stripping"-Puffer (Western-blot)

62,5 mM Tris-HCl, 2% SDS, 100 mM β-Mercaptoethanol, pH 6.7

Substratpuffer (Adhäsionsassay)

0,1 M Na-Zitrat, 7,5 mM NPAG, pH 5.0, vor Gebrauch 1:1 Volumen 0,5% Triton X-100 zusetzen, Aufbewahrung bei –20°C

TAE-Puffer

40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8.0

TBS

50mM TrisHCl, 150mM NaCl, pH 7.4

TBST

TBS, 0,1% Tween 20

TE-Puffer

10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0

TFBI

25 mM KAc, 50 mM $MnCl_2$, 100 mM $RbCl_2$, 10 mM $CaCl_2$, 15% Glyzerol, pH 5.8

TFBII

10 mM MOPS, 75 mM $CaCl_2$, 10 mM $RbCl_2$, 15% Glyzerol, pH 7.0

2.1.9 Chemikalien

Acrylamid	National Diagnostics, Hessle Hull, UK
Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Peqlab, Erlangen
5´-Aminosalizylsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Ampicillin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anilinblau	Merck, Darmstadt
Azokarmin G	Merck, Darmstadt
APS	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
BigDye	Applied Biosystems
CFSE	Molecular Probes
Diaminobenzidin (DAB)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DNA-Längenstandard	Invitrogen, Karlsruhe
dNTP (Desoxyribonukleosidtriphosphate)	Fermentas, St. Leon-Rot
Formamid	Merck, Darmstadt
Freundsches Adjuvant (kompl./inkompl.)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Giemsa	Merck, Darmstadt
Glycerol	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
HEPES	Biomol, Hamburg
Filme f. Southern/Northern-blot	Kodak, über Sigma-Aldirch, Taufkirchen
Hyperfilm	General Electrics, Freiburg
Immobilon (PVDF-Membran)	Millipore, Schwalbach
Kanamycin	Sigma-Aldrich,Taufkirchen
Lipofectamin 2000 plus	Invitrogen, Karlsruhe
Lipopolysaccharide	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Magermilchpulver	Fluka, Buchs
Neomycin	Gibco Life Technologies/Invitrogen, Karlsruhe
Nonidet P-40	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Orange G	Merck, Darmstadt
Oligo-dT-Primer	Metabion, Martinsried
PBS (Zellkultur)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fotoemulsion	Kodak, über Sigma-Aldirch, Taufkirchen
EDTA complete mini (Proteaseinhibitoren)	Roche, Mannheim
Phosphataseinhibitorcocktail #1	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phosphataseinhibitorcocktail #2	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
SDS	Roth, Karlsruhe

7-AAD	eBioscience
TAMRA	Molecular Probes
TEMED	Serva, Heidelberg
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe
Trypton	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Serva, Heidelberg

Alle weiteren Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt von Sigma-Aldrich (Taufkirchen) oder Merck (Darmstadt) bezogen.

2.1.10 Kits und Verbrauchsmaterial

ECL-Kit	Perkin-Elmer, Rotgau
BCA-Proteinassay (Lowry)	Perbio Science, Bonn
Qiagen Plasmid Mini/Maxi-Kits	Qiagen, Hilden
Qiaquick Gel-Extraction-Kit	Qiagen, Hilden
Imject Maleimid activated mcKLH-Kit	Perbio Science, Bonn
Rediprimer II Kit	Amersham Pharmacia, Freiburg
SulfoLink-Kit	Perbio Science, Bonn
Adapterverbindung für Einmalspritzen, B	Braun
In vitro-transcription/labeling-kit, 33P	Invitrogen, Karlsruhe
Zellkulturgefässe	Falcon/BD, Heidelberg
Sterilfilter	Millipore, Schwalbach
TNT coupled transcription/translation Syst.	Promega, Mannheim

2.1.11 Geräte

T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen
SDS-PAGE/Blotting-System (Mini)	BioRad, München
MR 5000 ELISA-Reader	Dynatech
UV Stratalinker 2400	Stratagene, Amsterdam, NL
Leica MZFLIII (Binokular)	Leica, Bensheim
Axio Imager Z1 (Fluoreszenzmikr.)	Zeiss, Jena
Axioskop (Lichtmikr.)	Zeiss, Jena

Axiovert 200M (Videomikr.)	Zeiss, Jena
Leica DM IRE 2/TCS SP2/GreNe-Laser	Leica, Bensheim (Konfokalmikr.)
Verfahrtisch	Märzhäuser
Mikroskop-Inkubator	EMBL-Precision Engineering Systems
FacsCalibur	Becton-Dickinson, Heidelberg
Optimax 2010 (Entwicklermaschine)	Protec, Oberstenfeld
Gene-Pulser	BioRad, München
Polytron	Ika, Reutlingen
Szintillationszähler	Beckman, Unterschleissheim
HE-Färbemaschine	Thermo-Shandon
HM 500 OM Vakuum-Kryostat	Mikrom, Walldorf
HM 355 S Kühl-Mikrotom	Mikrom, Walldorf

2.1.12 Software und Datenbanken

NCBI, Ensembl, Celera Genomics, EBI (European Bioinformatics Institute), ExPASy Proteomics-Server, "Baylor College of Medicine"-Search launcher, Metamorph, Webcutter

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellung Isoform-spezifischer Parvinpeptid-Antikörper

Generierung der Antiseren

Mittels Immunisierung von Hasen mit KLH-gekoppelten (Keyhole-limpet hemocyanin) Peptiden wurden polyklonale, isoform-spezifische Parvin-Antikörper hergestellt. Aufgrund geringer Sequenzhomologie zwischen α-, β- und γ-Parvin im Bereich der N-Termini, sowie hoher Wahrscheinlichkeit zytoplasmatischer bzw. Lösungsmittel-Exposition und geringer Wahrscheinlichkeit von Sekundärstrukturbildung der N-Termini (ExPASy Proteomics Server) wurden 14-16 Aminosäuren lange N-terminale Peptide gewählt. Das N-terminal gelegene Epitop des β-Parvin Antikörpers ermöglichte keine Detektion der von Yamaji et al. (2001) beschriebenen, kürzeren Translationsvarianten von β-Parvin (Abb. 1.5.1.B). Die Peptide wurden im Rahmen des Services der Abteilung für bioorganische Chemie des Max-Planck-Institutes für Biochemie synthetisiert und lyophilisiert. Je 2 mg Peptid wurden unter Verwendung des Imject Maleimid activated mcKLH-Kits an KLH als Trägerprotein zur Stimulierung der spezifischen Immunantwort den Herstellerangaben entsprechend gekoppelt. Vor der Immunisierung der Hasen wurden Serumproben (Prä-Immunseren) im Western-blot

auf die Reaktivität verschiedener Sekundärantikörper getestet und Tiere mit geringer Reaktivität ausgewählt. Die initiale Immunisierung der Hasen erfolgte unter Verwendung von komplettem, je drei weitere Immunisierungen unter Verwendung von inkomplettem Freund´schem Adjuvans. Zur Injektion wurden 500 µg Peptid, suspendiert in 500 µl PBS in 500 µl Adjuvans zwischen zwei Einmalspritzen mit Adapterverbindung emulgiert und den Hasen anschließend subkutan injiziert (20G x ½). Die Injektionen erfolgten in 2-Wochen-Intervallen, das abschließende Ausbluten der Tiere erfolgte 12 Tage nach der vierten Injektion. Die so gewonnenen 70-150 ml Vollblut wurden in 50 ml Falcon-Röhrchen zur Gerinnung eine Stunde bei 37°C inkubiert. Der Blutkuchen wurde im Falcon-Röhrchen in grobe Stücke zerteilt und über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Blutzellen wurden anschließend für 10 Minuten bei 3000 U/min abzentrifugiert. Das Serum wurde durch eine weitere Zentrifugation bei 10000 U/min von Zelltrümmern gereinigt. Schliesßlich erfolgte eine Affinitätsaufreinigung der Seren gegen das jeweilige Peptid mit Hilfe des SulfoLink-Kits den Herstellerangaben entsprechend. Die Lagerung der Antikörper erfolgte in Aliquots bei –80°C.

Charakterisierung der Antikörper

Die Reaktivität der Antiseren gegen die korrespondierenden Peptide wurde mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Assays unter Beschichtung der jeweiligen Peptide untersucht. Hierzu wurden 96-Well-Platten mit 50 µl Peptid-Lösung (1mg/ml PBS) über Nacht bei 4°C beschichtet und anschließend getrocknet. Nach Blockierung in 1% BSA/PBS für 1 h wurden die Wells dreimal mit 0,05% Tween/PBS gewaschen und für 1,5 h in Verdünnungsreihen der Antiseren inkubiert. Nach erneutem Waschen (3x) wurde 1,5 h in HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper (1:1000) inkubiert und wiederum 3x gewaschen. Nach Aufgabe von 50 µl 5´-Aminosalizylsäure in Phosphatpuffer (1mg/ml) wurde H_2O_2 in einer Endkonzentration von 0,05% zugegeben und 20 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl 1N NaOH gestoppt, und die optische Dichte bei 490 nm gemessen. Im Mikrotiterplatten-Assay wurde weiterhin die Isoform-Spezifität der Antiseren getestet. Hierfür wurde die Kreuzreaktion der Antiseren gegen die Peptide der anderen Isoformen untersucht. Die Spezifität der affinitätsgereinigten Antikörper wurde schließlich mittels Western-blot von *in vitro* translatiertem α-, β- und γ-Parvin Protein getestet. Hierfür wurden die cDNAs der Parvine in den pCS2+-Vektor kloniert und unter Verwendung des „TNT coupled transcription/translation Systems“ Kit (Promega) SP6-Promotor-vermittelt im Retikulozyten-Lysat translatiert. Der Versuch wurde von Frau Haiyan Chu im Rahmen ihrer Promotion in der Abteilung für molekulare Medizin am MPI für Biochemie durchgeführt.

2.2.2 Klonierungstechniken

Identifizierung Parvin-positiver PAC-Klone

Die Membranen der RPC12l-PAC-DNA-Bibliothek (129/Sv; Human Genome Mapping Project Center, Cambridge, UK) wurden mit cDNA-Sonden von *Parva*, *Parvb* und *Parvg* (EST-Klone, I.M.A.G.E., UK-HGRP RC) analog zum in Abschnitt 2.2.3 beschriebenen Southern-blot-Protokoll hybridisiert, um Parvin-positive PAC-Klone zu identifizieren. Jeweils mehrere positive Klone wurden für *Parva*, *Parvb* und *Parvg* bestellt und dienten nach initialen Testverdaus als Ausgangsmaterial zur Isolierung genomischer DNA für die Klonierung der Deletionskonstrukte p*Parva*^{fl}, p*Parvb*$^{\Delta}$ und p*Parvg*^{fl} (Abb. 3.3.1.1.C, 3.5.1.2.C, 3.7.1.C).

Plasmidpräparationen

Minipräparationen wurden nach modifiziertem Protokoll unter Verwendung des Qiagen Plasmid Mini Kit durchgeführt. Zwei ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum wurden mit einer einzelnen, frischen Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht geschüttelt. 1,5 ml der Kultur wurden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß bei 6000xg für 5 min zentrifugiert. Die pelletierten Bakterien wurden in 200 µl P1 mit 100µg/ml RNAse resuspendiert und durch Zugabe von 200 µl P2 und 5 min Inkubation bei RT lysiert. Das Lysat wurde mit 200 µl gekühltem P3 über 5 min auf Eis neutralisiert und anschließend 5 min bei 20000xg zentrifugiert. Die Plasmid-DNA wurde aus dem Überstand durch Zugabe von 500 µl Isopropanol gefällt und 5 min bei 20000xg pelletiert. Das Pellet wurde mit 400 µl Ethanol (100%) gewaschen und luftgetrocknet. Die DNA wurde in 50 µl Wasser aufgenommen.

Maxipräparationen wurden unter Verwendung des Qiagen Plasmid Maxi Kits nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde je nach Größe des sichtbaren Pellets in 100-200 µl Wasser aufgenommen. Die Qualität von Maxipräparationen wurde auf einem Agarosegel überprüft. Die Konzentration von doppelsträngiger DNA wurde photometrisch bestimmt.

Generierung kompetenter Bakterien

50 µl kompetenter DH5α- bzw. JM110-Zellen wurden über Nacht bei 37°C in 5 ml LB-Medium mit 0,02 M $MgSO_4$ und 0,01 M KCl kultiviert. 150 ml LB-Medium (0,02 M $MgSO_4$ und 0,01 M KCl) wurden mit 1 ml der Übernachtkultur angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD_{600} von 0,3-0,4 geschüttelt. Die Kultur wurde für 10 min auf Eis inkubiert und dann 10 min

bei 6000xg und 4°C zentrifugiert. Die Zellen wurden resuspendiert in 37,5 ml TFBI, 10 min auf Eis inkubiert und erneut 10 min bei 6000xg und 4°C abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 4 ml TFBII resuspendiert und in 50 µl Aliquots auf Trockeneis/Isopropanol eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei –80°C.

Restriktionsverdau und Aufreinigung von DNA

Zur präparativen Gewinnung von DNA zu Klonierungszwecken wurden 2-4 µg Plasmid- bzw. Vektor-DNA mit 5 U des entsprechenden Restriktionsenzyms bzw. der entsprechenden Mischung von Restriktionsenzymen (5 U je Enzym) eine Stunde bei entsprechender Temperatur verdaut. Nach der Inaktivierung von Restriktionsenzymen wurden die Ansätze auf einem Agarosegel (0,8-2,0%) elektrophoretisch aufgetrennt. Linearisierte Vektor-DNA wurde zuvor durch Zugabe von 1 µl alkalischer Phosphatase (Shrimp, Roche) und 30 min Inkubation bei 37°C dephosphoryliert. Stumpfe Enden zu ligierender DNA-Fragmente wurden durch Zugabe von 1 µl Klenow-Enzym, 30 min Inkubation bei RT und 10 min Inaktivierung bei 75°C generiert. Die Aufreinigung der via UV-Licht (365nm) visualisierten DNA-Fragmente erfolgte unter Verwendung des Qiaquick Gel-Extraction Kits gemäß Herstellerangaben. Die Reinheit der DNA-Fragmente und die DNA-Konzentration der Präparationen wurden gelelektrophoretisch bzw. photometrisch bestimmt.

Ligation und Transformation von Plasmid-DNA

Vektor- und Insert-DNA wurden je nach Größe des Inserts in einem Verhältnis von 1:5 bis 1:15 in einer Gesamt-DNA-Menge von ca. 500 ng zur Ligation („Fast link“ T4 DNA-Ligase, Epicentre) eingesetzt. Nach einer Inkubation von 5-10 min bei RT wurden 1-2 µl des Ligationsansatzes (ca. 25-50 ng Plasmid-DNA) zu 50 µl kompetenten DH5α- bzw. JM110-Zellen pipettiert. Der Ansatz wurde 45 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (42°C, 90 s) zur Aufnahme der DNA wurden die Bakterien 5 min auf Eis inkubiert, nach Zugabe von 1 ml Antibiotikum-freien LB-Medium 30 min bei 37°C geschüttelt, kurz abzentrifugiert, in einem nach Abgießen verbleibenden Volumen LB-Medium auf Antibiotikum-haltigen Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Kontrolle von Plasmid-Klonierungen

Die Klonierung von genomischen Deletionskonstrukten sowie Expressionsplasmiden wurde durch Restriktionsverdau sowie nach wichtigen Schritten durch Sequenzierung verfolgt. Hierzu wurden Oligonukleotide mit Parvin-Exon- oder -Intronsequenzen sowie Sequenzen

der Selektionskassetten benutzt. Die Sequenzierungen wurden durchgeführt vom Sequenzierservice des Max-Planck-Instituts für Biochemie unter Verwendung von „BigDye 3.1“ Sequenziermixes (Applied Biosystems).

2.2.3 Generierung von Parvin-defizienten Mäusen

Erläuterungen zu den verwendeten Deletionsstrategien

Für die Deletion von *Parvb* wurde eine klassische konstitutive Deletionsstrategie (Abb. 3.3.1.1) gewählt, mit deren Hilfe Spleissdonor bzw. -Akzeptor von Exon2 und Exon3 sowie das gesamte Intron2 aus dem Gen entfernt wurden. Die Poly-Adenylierung des β-Galaktosidase- bzw. des Neomyzin-Transkripts der Selektionskassette diente der Unterbrechung der *Parvb*-Transkription 3´-gelegen von der eingeführten Deletion. Desweiteren beinhaltete die Deletion das für die Translation der kurzen Form von β-Parvin („ssβ-Parvin“) wichtige Startkodon in Exon3 (Abb. 1.5.1).

Die Doppel-Deletion von *Parvb* und *Parvg* wurde dadurch erschwert, dass die beiden Gene auf Chromosom 15 direkt benachbart liegen, durch nur 12 kb getrennt, was eine Verpaarung von *Parvb*- und *Parvg*-Einzelmutanten aufgrund der geringen Segregationswahrscheinlichkeit der beiden Gene nicht sinnvoll erscheinen ließ (Abb. 3.5.1.1). Daher wurden beide Gene sequentiell auf ES-Zell Ebene modifiziert. Zunächst wurde das *Parvg* Exon6 mit Hilfe des p*Parvg*^{fl}-Konstruktes loxP-flankiert. Die Excision von Exon6 führt zu einer Leserasterverschiebung mit anschliessender Translationstermination. Die hierfür verwendete, ebenfalls loxP-flankierte Selektionskassette bot neben der Neomyzin-Resistenz auch die Möglichkeit zur Thymidin-Kinase Negativ-Selektion durch das Thymidin-Analog 1-[2-deoxy-2-fluoro-8-d-arabinofuranosyl]-5-iodouracil (FIAU), was eine Excision der Selektionskassette auf ES-Zell Ebene durch Elektroporation eines Cre-Expressionsplasmides möglich machte. So erhaltene *Parvg*E6$^{+/fl}$-ES-Zellen wurden im zweiten Schritt mit dem p*Parvb*-Deletionskonstrukt elektroporiert und erneut unter Neomyzin selektiert. Zur Bestätigung, dass die beiden Rekombinationsereignisse auf demselben Chromosom stattgefunden hatten, wurde die (Ko-) Segregation beider Allele nach Verpaarung von doppelt heterozygoten Tieren untersucht. Nach Verpaarung mit Deleter-Cre transgenen Mäusen zur Deletion von *Parvg* Exon6 wurden schließlich *Parvb*$^{+/-}$*Parvg*$^{+/-}$-Tiere zum Erhalt von Doppeldeletionsmutanten gekreuzt. Die Strategie der *Parvg*-Deletion für die Doppeldeletion wurde konditional gewählt, da eine konstitutive Deletion von γ-Parvin als dominante Isoform im hämatopoietischen System bzw. eine Doppeldeletion von β- und γ-Parvin als einzige Parvine in myeloiden Zellen und Blutplättchen hätte letal sein können.

Die Strategie zur konditionalen Modifikation von *Parva* wurde angelehnt an die Strategie der bereits erfolgreich durchgeführten, konstitutiven Deletion von *Parva* (vgl. 3.6, Montanez und Fässler, unpubliziert). Exon3 wurde loxP-flankiert, was bei Excision des Exons und Spleissen von Exon2 an Exon4 zu einer Leserasterverschiebung mit Translationstermination in Exon4 führt. Die Neomyzin-Resistenzkassette wurde zudem frt-flankiert, was eine einfache *in vivo* Excision der Kassette durch Einkreuzen einer frt-Linie ermöglicht.

ES-Zellkultur

Die Kultur muriner embryonaler Stammzellen (R1-Linie) erfolgte als Ko-Kultur mit Nährzellen, mitotisch inaktivierten embryonalen Fibroblasten, zur Verhinderung der Differenzierung der ES-Zellen. Ein wesentlicher Faktor hierfür ist das von den Nährzellen exprimierte, membranständige LIF (Leukemia inhibitory factor). Neben der Präsentation von membranständigem LIF wurde den ES-Zellen lösliches LIF mit dem ES-Medium zugeführt, um eine Differenzierung effektiver zu unterdrücken. Die ES-Zellen wurden 1:5 bis 1:7 gesplittet bzw. ES-Zell Kolonien wurden „gepickt“, wenn die Kolonien möglichst groß waren, aber noch keine zentrale, bräunliche Verfärbung zeigten (beginnende Differenzierung).

Elektroporation genomischer Deletionskonstrukte in ES-Zellen

100 µg des jeweiligen Konstruktes wurden in einem Reaktionsvolumen von 200 µl mit 100 U NotI über Nacht verdaut. Nach Kontrolle von 1 µl des Ansatzes auf einem Agarosegel (0,8%) wurde die linearisierte DNA in 1x Volumen des Ansatzes Phenol/Chloroform und anschließend 1x Volumen Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert, durch Zugabe von 0,1x Volumen 3M Na-Acetat (pH 5.2) und 2,5x Volumen Ethanol unter starkem, abrupten Schütteln gefällt und mit einer Pipettenspitze in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 70% Ethanol überführt. Die Aufbewahrung erfolgte bei -20°C. Für die Elektroporation wurde die DNA unter sterilen Bedingungen getrocknet, in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel in 700 µl PBS aufgenommen und 10-15 min gevortext. Die ES-Zellen wurden trypsiniert und in 10 ml ES-Medium resuspendiert. Nach Bestimmung der Gesamtzellzahl in einer Neubauerkammer wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, $4x10^7$ Zellen erneut abzentrifugiert, in 700 µl DNA-haltigem PBS resuspendiert und in eine Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 0,8 kV und 3 µF und wurde anhand der Zeitkonstanten (ungefähr 0,04 ms) kontrolliert. Anschließend wurden die

Zellen auf acht 10cm-Schalen ausplattiert und für 24 h (Neomyzin) bzw. 48 h (FIAU) ohne Antibiotikum kultiviert.

Selektion und klonale Expansion Antibiotikum-resistenter ES-Zellen

24 h nach Elektroporation des p*Parva*$^{\Delta}$-Deletionskonstruktes bzw. der konditionalen p*Parva*^{fl}- und p*Parvg*^{fl}-Konstrukte wurde auf G418-haltiges ES-Medium (0,5 mg/ml) zur Selektion gewechselt. Für die Cre-Rekombinase vermittelte *in vitro* Excision der Selektionskassette aus homolog rekombinanten *Parvg*$^{+/fl}$-ES-Zellen (Abb. 3.5.1.1) wurde 48 h nach Elektroporation des pIC-cre Plasmids mit der Negativselektion (2 µM FIAU, 1-[2-deoxy-2-fluoro-8-d-arabinofuranosyl]-5-iodouracil) begonnen. Selektiert wurde 6-8 Tage, wobei das Medium alle 24 h gewechselt wurde. Nach Heranwachsen der Kolonien wurden mit einer 200 µl Pipette möglichst grosse, rundlich aufstehende Kolonien ohne bräunliche Verfärbung gepickt. Die gepickten Kolonien wurden in 150 µl Trypsin/EDTA-Lösung pro Well (96-Well Platte) 5 min trypsiniert, mit etwas ES-Medium suspendiert und in eine 24-Well Platte auf zuvor ausplattierte Nährzellen transferiert. 24 Kolonien je Durchlauf wurden gepickt, trypsiniert und transferiert. Insgesamt wurden so 360 Kolonien pro Konstrukt auf 12 24-Well Platten zur Expansion transferiert. Nach einmaligem Medienwechsel 24 h nach dem Transfer wurden die Zellen für 3-5 Tage kultiviert bzw. bis sich das Medium gelb zu verfärben begann. Um die Hälfte jedes Klones einzufrieren und die andere Hälfte zur Genotypisierung weiter zu expandieren wurden die Zellen einer 24-Well Platte in 120 µl Trypsin/EDTA pro Well 5 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml Einfriermedium für ES-Zellen gestoppt, 0,5 ml der Suspension wurden sofort auf Trockeneis eingefroren. Anschließend wurden die Wells der Platte mit je 1,5 ml ES-Medium (ohne Antibiotikum) aufgefüllt, um den toxischen Effekt von DMSO durch Verdünnung zu minimieren. Die Zellen konnten 6-16 h adhärieren. Dann wurde auf 1 ml ES-Medium (mit Antibiotikum) gewechselt und die Zellen kultiviert bis das Medium leuchtend gelb wurde. Zur Lyse der Zellen wurde das Medium durch 0,5 ml Lysepuffer pro Well ersetzt. Die Zellen wurden weiter im Inkubator belassen bis zur Lyse der Zellen aller Wells bzw. Platten. Durch Zugabe von 0,5 ml Isopropanol und langsames Schwenken bei RT über Nacht wurde die DNA gefällt und als netzartige Struktur im Well sichtbar. Diese wurde mit einer 200 µl Pipettenspitze aufgedreht, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 200 µl TE überführt und über Nacht bei 55°C inkubiert. Die Lagerung der DNA bis zur Genotypisierung erfolgte bei RT.

Identifizierung homolog-rekombinanter ES-Zell Klone

Die Identifizierung von ES-Zell Klonen mit homolog-rekombinanter Integration der modifizierten *Parva*-, *Parvb*- und *Parvb*-Allele erfolgte mittels Southern-blot Analyse. Die Lage der (externen und internen) Sonden sowie die Restriktionsstellen der verwendeten Enzyme sind in den Abbildungen 3.3.1.1, 3.5.1.2 und 3.7.1 dargestellt. Es wurden 20 µl der DNA-Präparation der expandierten ES-Zell Klone mit 40-50 U des jeweiligen Restriktionsenzyms bzw. der entsprechenden Mischung in einem Volumen von 30 µl unter Zugabe von 100 µg/ml BSA über Nacht verdaut. Die Ansätze wurden auf einem Agarosegel (0,8%) für 6-8 h bei 3 V/cm aufgetrennt. Das Gel wurde mit einem angelegten Lineal unter UV-Licht fortografiert, um im Anschluss die Laufweite von DNA-Fragmenten auf dem Blot dem Längenstandard zuordnen zu können. Das Gel wurde 10 min in 2N HCL depuriniert, dann 2x 20 min in Denaturierungspuffer geschüttelt, kurz mit Wasser gewaschen und dann 2x 20 min in Neutralisierungspuffer geschüttelt. Die DNA wurde in 10x SSC über Nacht auf eine Nylon-Membran geblottet und anschließend die Positionen der Ladewells auf der Membran mit einem Bleistift markiert. Die DNA wurde auf dem Blot durch UV-Bestrahlung vernetzt und 2 h bei 80°C gebacken. Zur Präparation von DNA-Sonde wurden 4-5 µg Plasmid-Maxipräparation verdaut und das Insert mit Hilfe des Qiaquick-Gelextraction-Kit aufgereinigt. Das Eluat wurde auf einem Agarosegel (1%) untersucht. 5-15 µl des gereinigten Inserts wurden unter Verwendung des Rediprimer II-Kit gemäß Herstellerangaben mit ^{32}P-dCTP markiert und über eine G50-Sepharose/TE-Säule in einer Einmalspritze 3 min bei 1200 U/min zur Aufreinigung zentrifugiert. Die β^--Emission des Eluats wurde im Szintillationszähler bestimmt und das Eluat auf 0,5-1 x10^6 cpm/ml mit Church-Puffer verdünnt. Die Membran wurde 1,5-2 h in Church-Puffer bei 65°C prähybridisiert. Anschließend erfolgte die Hybridisierung mit der Sonde bei 65°C über Nacht unter Verwendung von möglichst wenig Hybridisierungslösung. Die Membran wurde im Anschluss 2x 30 min in Church-Wash gewaschen, in Zellufanfolie gepackt und in eine Röntgenkassette geklebt. Es wurden zwei Filme aufgelegt, von denen der untere in der Kassette fixiert und der obere Film nach Übernachtexposition in der Entwicklermaschine entwickelt wurde. Die Expositionszeit für den unteren Film wurde entsprechend der Signalstärke nach Übernachtexposition des ersten Films gewählt. Klone mit annähernd gleicher Signalstärke von wildtypischem und rekombinantem Allel wurden für die Blastozysten-Injektion gewählt bzw. genauer charakterisiert.

Blastozysten-Injektion/Transfer und Verpaarungsschemata

Zunächst wurden gezielte Verpaarungen von C57Bl/6J-Mäusen angesetzt. Parallel wurden als homolog-rekombinant identifizierte ES-Zell Klone aufgetaut und in einem Well pro Klon einer 6-Well Platte mit täglichem Medienwechsel kultiviert. Zum Erhalt scheinschwangerer Ammenweibchen für den Blastozysten-Transfer wurden zusätzlich gezielte Verpaarungen von vasektomierten FVB-Männchen mit C57Bl/6J-Weibchen angesetzt. Für die Blastozysten-Injektion (E3.5) wurden die ES-Zellen trypsiniert und zweimal in ES-Medium gewaschen. 10% der Suspension wurden erneut in ES-Medium gewaschen, der Überstand nach Zentrifugation bis auf 100-200 µl abgesaugt, die Zellen durch leichtes Schnippen des Röhrchens resuspendiert und bis zur Injektion auf Eis aufbewahrt. Die Mikroinjektion der ES-Zellen sowie der Blastozysten-Transfer wurden von der transgenen Service-Einheit des Max-Planck-Institutes für Biochemie durchgeführt. Die ES-Zellen wurden in die ausgespülten C57Bl/6J-Blastozysten injiziert, die anschließend den Ammen (2.5p.c.) intrauterin implantiert wurden. Aufgrund des genetischen Hintergrunds der zur homologen Rekombination eingesetzten R1 ES-Zelllinie (129/Sv) ließ sich der Grad des Chimärismus der Nachkommen nach Blastozysten-Transfer anhand des Prozentsatzes brauner Fellfarbe erkennen, von 50-60% bei gleichmäßiger schwarz-brauner Streifung bis hin zu 90-100% bei ausschließlich brauner erkennbarer Fellfarbe. Männchen mit hohem Chimärismus wurden aufgrund einer hohen Wahrscheinlichkeit von Keimbahninsertion der modifizierten Allele für die weitere Verpaarung (C57Bl/6J) gewählt. Aus diesen Verpaarungen hervorgegangene heterozygot mutante Tiere wurden im nächsten Verpaarungsschritt rückgekreuzt um homozygot mutante Tiere für die Analyse zu erhalten. Zur Deletion des *Parvg* Exon6 in den $Parvb^{+/-}Parvg^{+/fl}$-Tieren (Abb. 3.5.1.1) wurden diese heterozygoten Doppelmutanten mit Deleter-Cre Tieren verpaart und die $Parvb^{+/-}Parvg^{+/-}$-Nachkommen zur Generierung der Doppeldeletionsmutanten verpaart. Für alle im Rahmen der Arbeit durchgeführten Analysen wurden Tiere mit gemischtem genetischen Hintergrund (129Sv / C57Bl/6J) verwendet.

Genotypisierung von Mäusen und ES-Zellen

Die Genotypisierung von Mäusen erfolgte analog zu der von ES-Zellen (s. oben). Die ersten 100 Tiere der β-Parvin Linie wurden mittels Southern-blot (externe Sonde) und PCR genotypisiert, um die Zuverlässigkeit der PCR zu testen. Die Genotypisierung von Tieren der β- und γ-Parvin doppelmutanten Linie wurde ausschließlich mittels PCR durchgeführt, da zu diesem Zeitpunkt die Zuverlässigkeit der *Parvb*-PCR bekannt war und die *Parvg*-Genotypisierung bei keinem sämtlicher genotypisierten Tiere eine Abweichung von der

erwarteten Ko-Segregation der Allele zeigte (Abb. 3.5.1.3.D, Tab. 3.5.2). Die Genotypisierung von Tieren der konstitutiven *Parvg*-Linie erfolgte mittels PCR nach Chu et al. (2006). Zur Gewinnung der DNA wurde den Tieren nach Ohrmarkierung ein etwa 3 mm langes Stück von der Schwanzspitze abgeschnitten und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß in 500 µl Lysepuffer über Nacht bei 55°C geschüttelt. Die DNA wurde mit 1x Volumen Phenol/Chloroform extrahiert. Für die PCR wurde ein Aliquot des wässrigen Überstands 1:5 mit Millipore-Wasser verdünnt und direkt zur Reaktion eingesetzt (1 µl pro 20 µl Reaktion). Die Reaktionen wurden unter den in Tabelle 2.2.3 aufgeführten Bedingungen durchgeführt.

Tab. 2.2.3: PCR-Programme für die Genotypisierung von Mäusen bzw. ES-Zellen

Schritt	*Parva*, *Parvb*, *Parvg*	Cre-Transgen
Denaturierung	95°C, 5 min intitial, 30 s zyklisch	95°C, 5 min initial, 30 s zyklisch
Annealing	53°C, 30 s	63-53°C (touchdown), dann 53°C, 30 s
Elongation	72°C, 1 min zyklisch, 5 min final	72°C, 1 min zyklisch, 5 min final
Zyklen	35x	10x (touchdown), dann 35x

Für die Southern-blot Analyse wurde die DNA weiter mittels 1x Volumen Chloroform extrahiert, mit Isopropanol gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen und in 100 µl Wasser 60 min bei 55°C gelöst. Für den Verdau wurden 15 µl der DNA-Präparation mit 40 U BamHI in einem Volumen von 30 µl über Nacht verdaut. Die weitere Prozedur war identisch mit dem Southern-blot Verfahren zur Identifizierung homolog rekombinanter ES-Zell Klone (s. oben).

2.2.4 Isolierung und Kultivierung verschiedener Primärzellen

Murine embryonale Fibroblasten

Murine embryonale Fibroblasten (MEF) wurden zum einen als Neomyzin-resistente, mitotisch inaktivierte Nährzellen für die ES-Zellkultur (2.2.3) verwendet, zum anderen, aus *Parvb*$^{+/+}$- und *Parvb*$^{-/-}$-Embryonen gewonnen für zellbiologische Analysen verwendet.

Für die Präparation von Nährzellen wurden C57Bl/6J-Mäuse die ein Neomyzin-Resistenz-Transgen tragen gezielt verpaart. Die Embryonen von 1-3 Weibchen wurden am Tag E14.5 unter sterilen Bedingungen entnommen. Unter PBS wurden Dottersack, Kopf sowie innere Organe der Embryonen entfernt und verworfen, die Embryonen in kleinere Stücke geschnitten und in einem 50 ml Falcon-Röhrchen vereinigt. Nach Zugabe von 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung pro Embryo wurden die Gewebestücke mittels mehrfachem Pipettieren durch eine 5 ml Pipette weiter zerkleinert und 10 min bei 37°C inkubiert. Die Prozedur wurde unter

Verwendung einer 5 ml Glaspipette, dann einer 2 ml Glaspipette wiederholt. Nach Absinken größerer Gewebestücke wurde die Zellsuspension abpipettiert und auf 10 cm-Zellkulturschalen in 10 ml EF-Medium ausplattiert (1 Schale pro Embryo) und kultiviert. Bei einem Konfluenzgrad von 80-90% (1-2 Tage) wurden die Zellen trypsiniert, 5 min bei 900 U/min abzentrifugiert und auf 175cm^2-Zellkulturflaschen (1 Flasche pro Embryo) zur Expansion ausplattiert. Nach Erreichen von 100% Konfluenz wurden die Zellen für weitere 1-2 Tage kultiviert (Superkonfluenz), trypsiniert und in zwei Fraktionen (9:1 Teile) abzentrifugiert. 1 Teil wurde als zweite Passage in der gleichen Anzahl 175cm^2-Flaschen wie die erste Passage erneut kultiviert, die anderen 9 Teile wurden als Pellet in einem 50 ml Falcon-Röhrchen in der Röntgen-Anlage für 5 min zur mitotischen Inaktivierung bestrahlt und anschließend in 0,5 ml Aliquots eingefroren. Mit der zweiten Passage wurde ebenso verfahren.

Analog erfolgte die Präparation von MEF für Adhäsions-, Spreit- und Migrationsexperimente *in vitro* unter β-Parvin Defizienz. Sie stammten aus *Parvb*$^{+/-}$-Verpaarungen, die Zellen der einzelnen Embryonen wurden getrennt expandiert und es wurde nur eine erste Passage von MEF für analytische Zwecke isoliert, um den Primärzellcharakter möglichst wenig zu beeinflussen. Desweiteren wurden MEF für die Analyse nicht mitotisch inaktiviert. Für die Genotypisierung der Embryonen wurde Dottersackgewebe verwendet.

Knochenmark-differenzierte Makrophagen und Dendritische Zellen

Aus Knochenmark *in vitro* differenzierte Makrophagen sowie Dendritische Zellen wurden für Spreit- bzw. Migrationsversuche generiert. Die Femuren von Hinterläufen adulter Mäuse wurden aus den Tieren präpariert und von Geweberesten befreit. Die Knochenenden wurden unter sterilen Bedingungen abgeschnitten und das Knochenmark von 2-4 Femuren mit einer Injektionsnadel und 5 ml kaltem PBS pro Femur ausgespült. Nach zweimaligem Waschen in PBS wurde die Gesamtzellzahl bestimmt und die Zellen in 9 ml R10-Medium auf Petri-Schalen ausplattiert (1x 10^6 Zellen pro Schale). Zur Differenzierung in Makrophagen wurden 10% „Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor"- (M-CSF) haltiger Zellkulturüberstand zugegeben, zur Differenzierung in Dendritische Zellen 10% „Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor"- (GM-CSF) haltiger Kulturüberstand (Lutz et al., 1999; Rutherford und Schook; 1992). Am dritten Tag der Kultur wurden 10 ml frisches R10-Medium (inklusive 10% M-CSF bzw. GM-CSF) zugegeben. Am sechsten Tag der Kultur wurden vorsichtig 10 ml Medium abgenommen und durch 10 ml frisches R10-Medium (20% M-CSF bzw. GM-CSF ersetzt). Makrophagen wurden nach morphologischer Begutachtung

am neunten Tag eingefroren bzw. für Spreitversuche auf FN-beschichtete (10 µg/ml) 6-Well Platten ausgesät. Dendritische Zellen wurde am achten Tag durch Zugabe von 200 ng/ml Lipopolysacchariden (LPS) in das Medium stimuliert bzw. maturiert, bevor sie am neunten Tag Fluoreszenz-markiert und zur *in vivo* Migrationsanalyse (2.2.16) eingesetzt wurden.

Einzelzellsuspensionen aus der Milz

Versuche zur Einwanderung von Lymphozyten in Lymphknoten und Milz erfolgten unter venöser Injektion von Einzelzellsuspensionen der Milz, angereichert für Lymphozyten. Die Milz wurde hierfür zur Vereinzelung der Zellen und zur Entfernung von Endothel mit dem Stempel einer Einmalspritze unter PBS durch einen Zellfilter passagiert. Die Zellen wurden für 5 min bei 1200 rpm abzentrifugiert. Zur osmotischen Lyse von Erythrozyten wurde das Zellpellet in 5 ml Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in PBS resuspendiert und wie in Abschnitt 2.2.17 beschrieben Fluoreszenz-markiert und für die Einwanderungsversuche verwendet.

2.2.5 Southern- und Northern-blot

Die Genotypisierung von ES-Zell Klonen und Mäusen wurde mittels Southern-blot durchgeführt und ist in Abschnitt 2.2.3 erläutert. Northern-blot Analysen wurden zur Bestätigung des Verlustes von *Parvb*-Transkript sowie zur Charakterisierung der *Parva*-Transkription in *Parvb*$^{-/-}$-Tieren durchgeführt (Herz, Skelettmuskel). Die Organe wurden entnommen und in 1 ml Trizol je 100 mg Gewebe homogenisiert (Polytron). Sie wurden 1 h auf Eis inkubiert und währenddessen alle 10 min für 1 min gevortext. Nach zweimaliger Chloroform-Extraktion (0,2x bzw. 1x Volumen) mit je 5 min Inkubation auf Eis und 15 min Zentrifugation bei 12000 U/min und 4°C wurde die RNA durch Zugabe von 1x Volumen Ispropanol für 5 min auf Eis gefällt. Nach Pelletierung (15 min, 12000 U/min, 4°C) wurde die RNA mit 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 25-50 µl DEPC-Wasser gelöst. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt und die RNA bei –80°C gelagert. Für die gelelektrophoretische Auftrennung wurden 15 µg Total-RNA in Denaturierungspuffer (20 µl Gesamtvolumen) 10 min bei 56°C denaturiert und nach Zugabe von 2 µl RNA-Ladepuffer auf einem Formaldehyd-haltigen Agarosegel (0,8%) für 3-4 h bei 5-6 V/cm aufgetrennt. Das Gel wurde unter UV-Licht unter Anlegen eines Lineals fotografiert, um die Laufweite der 18S bzw. 28S rRNA zu messen. Die RNA wurde in 10x SSC über Nacht auf eine Nylon-Membran geblottet. Die Markierung der cDNA-Sonden sowie die Hybridisierung erfolgten analog zum Southern-blot Verfahren (vgl. 2.2.3).

2.2.6 Western-blot

Denaturierende, reduzierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) mit anschließendem Western-blot wurde zur Charakterisierung von Proteinlysaten und Immun-Präzipitaten von Geweben oder Zellen in Kultur genutzt. Die Auftrennung von Proteingemischen in SDS-Gelen erfolgte bei 6-8 V/cm, geblottet wurde bei 0,3 V/cm^2 Gel für 15-18 h unter Eiskühlung im „Nassblotter" auf eine zuvor in Blot-Puffer äquilibrierte PVDF-Membran. Nach kurzem Waschen der Membran in TBS/0,1% Tween20 (TBST) wurden unspezifische Bindungsstellen durch 1 h Schwenken der Membran bei RT in TBST/5% Magermilchpulver blockiert. Die Inkubation mit Primärantikörpern wurde über Nacht bei 4°C, die mit HRP-konjugierten Sekundärantikörpern 1h bei RT durchgeführt. Mit Ausnahme der Akt, Erk und GSK-3 Antikörper (Cell signaling, TBST/5% BSA) wurden alle Antikörper in TBST/5% Magermilch verwendet. Nach Antikörperinkubation wurde die Membran jeweils 1x 15 min und 2x 5min in TBST gewaschen. Zur Detektion wurde die Membran in 75µl ECL-Substratlösung (Perkin-Elmer) pro cm^2 Membran 2-3 Minuten geschwenkt, abgetropft, in Frischhaltefolie gelegt und in einer Röntgenkassette fixiert. Die für 1-10 min aufgelegten Röntgenfilme wurden automatisiert entwickelt.

2.2.7 Präparation von Proteinlysaten und Immunpräzipitaten

Die Präparation von Proteinlysaten aus Geweben bzw. Zellen zur direkten Western-blot Analyse erfolgte in RIPA-Puffer, die Präparation von Lysaten für Immunpräzipitationen erfolgte in RIPA- bzw. IP-Puffer. Gewebe wurden in 1 ml Puffer je 100 mg Gewebe mit dem Polytron homogenisiert und anschließend 15 min auf Eis lysiert, Zellen in Kultur wurden in 0,5 ml Puffer je 10 cm-Zellkultur-Schale 15 min auf Eis lysiert. Die Lysate wurden 15 min bei 14000 U/min und 4°C zentrifugiert, um Zelltrümmer bzw. unlösliches Protein zu entfernen. Die Gesamtprotein-Konzentration wurde unter Verwendung des BCA-Proteinassay-Kit (Pierce) nach Herstellerangaben bestimmt.

Für die Analyse von *Proteinrohlysaten* wurden 20-40 µg Totalprotein pro Spur in Lämmli-Puffer in einem Gesamtvolumen von 40 µl 5 min bei 95°C denaturiert, 5 min auf Eis inkubiert und im SDS-Gel aufgetrennt.

Für die in Abbildung 3.3.4.2.C gezeigten *Immunpräzipitationen von Parvinen* wurde je 1 mg Totalprotein in 0,5 ml RIPA-Puffer eingesetzt. Zur Minderung unspezifischer Bindung der für die Präzipitation von α- und β-Parvin eingesetzten Protein A/Trisacryl Perlchen während der späteren Präzipitation wurden die Lysate mit 50 µl Perlchen (in RIPA-Puffer gewaschen) 10 min unter Drehen bei 4°C vorgereinigt und die Perlchen anschließend abzentrifugiert. Zum

Überstand wurden 5 µl α-Parvin Antikörper bzw. 10 µl β-Parvin Antikörper (affinitätsgereinigt) bzw. je 1 µl Prä-Immunserum gegeben. Nach 1,5 h Inkubation bei 4°C wurden erneut 50 µl gewaschene Perlchen zugegeben und der Ansatz eine weitere Stunde bei 4°C inkubiert. Die Perlchen wurden abzentrifugiert und 3x in RIPA-Puffer gewaschen. Die Immunkomplexe wurden in 50 µl Lämmli-Puffer für 7 min bei 95°C dissoziiert und die Perlchen abzentrifugiert. Der Überstand wurde 5 min auf Eis inkubiert und vollständig in einem SDS-Gel aufgetrennt.

Die Analyse einer möglichen Interaktion von α-Parvin mit PIX-Proteinen mittels *GST-PIX/GFP-Parvin Ko-Präzipitation* wurde in Kooperation mit Dr. rer nat K. Kutsche am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf von Dr. rer nat Georg Rosenberger durchgeführt. Die Zellen wurden in 1 ml Lysepuffer auf Eis lysiert, 100 µl wurden als Rohlysat zurückgehalten, 900 µl direkt mit 50 µl gewaschenen Glutathione-Sepharose Perlchen versetzt und 5 h bei 4°C inkubiert. Die Perlchen wurden bei 6000x g abzentrifugiert, mit TBS gewaschen und in 50 µl Lämmli-Puffer bei 95°C inkubiert. Je 20 µl Rohlysat bzw. Präzipitat wurden für die SDS-PAGE eingesetzt.

2.2.8 Lipofektion von Zellen

Zur Visualisierung der subzellulären Lokalisation von α- und β-Parvin wurden NIH3T3-Fibroblasten mit den GFP-Parvin Expressionsplasmiden pAP-GFPC1 bzw. pBP-GFPC1 transfiziert. Hierfür wurden die Zellen in 6 cm-Schalen unter subkonfluenten Bedingungen mit 6 µg DNA je Plasmid unter Verwendung von Lipofektamin 2000 plus gemäß Herstellerangaben transfiziert. 24-36 h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert bzw. trypsiniert, auf FN-beschichtete (10 µg/ml) Deckgläschen für die Mikroskopie ausgesät und weitere 4-6 h adhärieren gelassen. Zur Analyse einer möglichen Interaktion von α-Parvin und PIX-Proteinen wurden COS-Zellen mit verschiedenen Kombinationen von GFP-Parvin und GST-PIX-Plasmiden ko-transfiziert. $1{,}6 \times 10^6$ Zellen wurden mit 6 µg DNA je Plasmid unter Verwendung von Lipofectamin 2000 transfiziert und 18-24 h inkubiert.

2.2.9 Schnittechniken

Kryo- und Paraffinschnitte von Embryonen bzw. adulten Geweben wurden im Rahmen der histologischen Analysen mittels Hämatoxylin/Eosin- (HE) Färbung, *in situ*-Hybridisierung und Immunfärbungen untersucht. Kryoschnitte wurden für immunhistochemische Analysen

verschiedener adulter Gewebe verwendet, Paraffinschnitte für die *in situ*-Hybridisierung embryonaler Gewebe und die Histologie adulter Gewebe.

Für die Herstellung von *Kryoschnitten* wurden die entnommenen Organe unfixiert in einer mit Kryomatrix gefüllten Kassette eingebettet und auf einer auf Trockeneis vorgekühlten Kupferplatte rasch eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Skelettmuskelgewebe wurde nach Entnahme direkt in Alufolie gewickelt, in einem mit Isopentan gefüllten, in flüssigem Stickstoff gekühlten Becher gegeben, nach ungefähr 1 min entnommen und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die anschließende Lagerung erfolgte ebenfalls bei -80°C. Zum Schneiden wurden die Gewebeblöcke bzw. das Skelettmuskelgewebe mit etwas Kryomatrix an der Kryostathalterung fixiert und entsprechend der Schnittebene positioniert. Die Schnittdicke für Kryoschnitte betrug 8 µm. Die Lagerung der Schnitte bis zur Färbung erfolgte bei -80°C.

Für die Herstellung von *Paraffinschnitten* wurden die Organe bzw. Embryonen nach Entnahme über Nacht in 4% PFA/PBS fixiert und über Nacht bei 4°C in 70% Ethanol dehydriert. Am nächsten Morgen wurden sie je 1 h in 80%, 90% und 100% Ethanol bei RT weiter dehydriert, dann 2x 20 min in Xylol und 3x 2h in Paraffin (60°C) inkubiert. Anschließend erfolgte die Einbettung in Paraffin in Kassetten. Die Dicke der Paraffinschnitte betrug ebenfalls 8 µm. Wurden Embryos für die *in situ*-Hybridisierung geschnitten, wurde das Mikrotom unter Verwendung von DEPC-Wasser betrieben. Paraffinschnitte wurden nach Trocknung bei 4°C gelagert.

Für die Analyse von β-Parvin-defizientem Herzmuskelgewebe wurden weiterhin Semidünnschnitte sowie Ultradünnschnitte für die Elektronenmikroskopie hergestellt. Dies wurde an der Deutschen Sporthochschule Köln, Abteilung für molekulare und zelluläre Sportmedizin, unter Leitung von Prof. Dr. med W. Bloch durchgeführt.

2.2.10 Färbetechniken

Neben der Färbung von Gewebeschnitten bzw. Zellen auf Objektträgern mittels HE-Färbung, Immunfluoreszenz oder radioaktiver *in situ*-Hybridisierung wurden ganze Embryonen sowie Dottersackgewebe („whole-mounts“) mittels Immunfärbung untersucht. Zudem wurde Herzmuskelgewebe nach Azan-Färbung von Paraffinschnitten, sowie nach Kontrastierung bzw. Färbung von Ultra- bzw. Semi-Dünnschnitten untersucht.

Für die *HE-Färbung* von Paraffinschnitten wurden diese zunächst durch 2x 20 min Inkubation in Xylol entparaffiniert, in absteigender Ethanolreihe (je 1 min 100%, 90%, 80% und 70%) rehydriert und kurz in PBS gewaschen. Dann wurden sie 5 min bei RT in 4%

PFA/PBS nachfixiert und automatisiert gefärbt durch jeweils 20-25 s Inkubation in Wasser, Hämatoxylin, 2x Wasser, Eosin (B), 2x Wasser, aufsteigender Ethanol-Reihe (70%, 80%, 90%, 2x 100%) und Xylol. Aus dem Xylol entnommen wurden die Schnitte in Entellan eingedeckt und getrocknet.

Für die *Azanfärbung* wurden Herzschnitte wie oben beschrieben entparaffiniert, rehydriert und nachfixiert. Die Färbung erfolgte nach Heidenhain (1915) in Azokarmin G-Lösung für 15 min bei 56°C, waschen in Wasser, Differenzierung in Anilin-Alkohol (0,1% Anilinöl in 96% Ethanol) und 1 min auswaschen des Anilins mit Essigsäure/Ethanol (1%). Nach 2 h Inkubation in 5% Phosphorwolframsäure und waschen in Wasser wurde 2 h in Anilinblau-Orange G-Lösung gefärbt. Nach 1x waschen in Wasser wurden die Schnitte in 96% Ethanol differenziert, in Xylol überführt und in Entellan eingedeckelt.

Für *Immunfluoreszenzfärbungen* von Kryoschnitten wurden diese nach Fixierung in PBS gewaschen, 5 min in 0,5% Triton X-100/PBS permeabilisiert, erneut gewaschen und 30 min in 1% BSA/PBS blockiert. Die Schnitte eines Objektträgers wurden mit Hilfe eines Fettstiftes isoliert und über Nacht mit dem Primärantikörper in BSA/PBS bei 4°C inkubiert. Vor, sowie nach der Inkubation mit Fluoreszenz-gekoppeltem Sekundärantikörper (1 h, RT), wurden die Schnitte 3x 5 min gewaschen. Schließlich wurden sie in Evanol eingedeckelt und bei 4°C getrocknet. Die Immunfluoreszenzfärbung von Zellen wurde auf 1cm-Deckgläschen in 24-Well-Platten analog zu Kryoschnitten durchgeführt.

Für die radioaktive *in situ-Hybridisierung* von Gewebeschnitten wurden wässrige Lösungen für sämtliche Arbeitsschritte bis zur Entwicklung in DEPC-Wasser angesetzt. Die Schnitte wurden zunächst 2x 10 min in Xylol entparaffiniert, in absteigender Ethanolreihe (je 30 s 100%, 90%, 80%, 70%) rehydriert und 2x 5 min in DEPC-Wasser gewaschen. Nach 10 min Proteinase K-Verdau (RT) wurde 5 min mit PFA/PBS nachfixiert und erneut 2x 5 min gewaschen. Nach 5 min Äquilibrierung in Ac-Puffer wurde sie in Ac-Puffer mit Essigsäureanhydrid 10 min bei RT blockiert. Die Schnitte wurden 2x 5 min gewaschen, in aufsteigender Ethanolreihe (je 30 s 70%, 80%, 90% und 2x 100%) dehydriert und luftgetrocknet. Zur Linearisierung der Sonde wurden 20µg Plasmid über Nacht in einem Volumen von 200 µl verdaut, mit 1:1 Phenol/Chloroform extrahiert und durch Zugabe von 20 µl 3 M Na-Acetat (pH 5.2) und 500 µl Ethanol 30 min bei –20°C gefällt. Die DNA wurde 30 min bei 20000x g und 4°C abzentrifugiert und nach Trocknung in 20 µl Wasser gelöst. 1 µl der Präparation wurde auf einem Agarosegel (1%) getestet. Die *in vitro*-Transkription der Sonde wurde unter Verwendung des SP6/T7 Transcription-Kit (Invitrogen) mit T7/T3 RNA-Polymerase und ^{33}P-markiertem UTP gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Der Ansatz

wurde DNAse behandelt, in 80 µl Wasser aufgenommen und über eine TE-Puffer äquilibrierte Säule gereinigt (1000x g, 1 min, 4°C). Die RNA wurde mit 1/10x Volumen LiCl und 2,5x Volumen Ethanol 30 min bei –20°C gefällt, abzentrifugiert (30 min, 20000x g, 4°C), getrocknet und in 22 µl TE aufgenommen. Für die Hybridisierung wurde die Sonde in Hybridisierungslösung (4x 10^4 cpm/µl) 5 min bei 95°C denaturiert und 2 min auf Eis inkubiert. 20-30 µl Sonde wurden auf jeden Schnitt aufpipettiert, mit einem Stück Parafilm verteilt und bedeckt und in einer feuchten Kammer (2x SSC, 50% Formamid, 0,15% β-Mercaptoethanol) bei 52°C über Nacht hybridisiert. Nach Entfernung des Parafilm unter 5x SSC/0,15% β-Mercaptoethanol bei 50 °C wurden die Schnitte 2x 30 min bei 52°C in Waschpuffer und 2x 1min bei RT in 2x SSC gewaschen, 30 min bei 37°C mit 20 µg/ml RNAse A in 2x SSC behandelt und erneut 2x in Waschpuffer und 2x SSC gewaschen. Nach Dehydrierung in Ethanol (je 1 min 70%, 2x 100%) wurden die Schnitte luftgetrocknet und in einer Röntgenkassette fixiert. Der aufgelegte Film wurde nach Übernachtexposition entwickelt und entsprechend der Signalstärke wurden die Schnitte nach Aufbringen von Fotoemulsion (37°C, 30 min Trocknung bei RT) 2-4 Wochen bei 4°C lichtgeschützt aufbewahrt. Zur Entwicklung wurden die Schnitte in der Dunkelkammer kurz in Wasser geschwenkt, 3 min in Entwicklerlösung, dann 2x 5 min in Fixierlösung gegeben und 30-60 min in Wasser gewaschen. Nach 5 min Giemsa-Färbung (1:10) wurden die Schnitte unter abwechselndem Schwenken in 2% Essigsäure/Ethanol und Isopropanol und anschließender Inkubation (3 min) in Ethanol differenziert, 10 min in Xylol inkubiert und in Entellan eingedeckt.

Für die *„whole-mount Immunfärbung" von E9.5-Embryonen* gegen Neurofilament 160 (vgl. 3.3.3) wurden diese nach Entnahme von Dottersack und Amnion befreit, in PBS gewaschen und über Nacht in Methanol/DMSO (4:1) fixiert. Anschließend wurden endogene Peroxidasen durch 5 h Inkubation in Methanol/DMSO/30% H_2O_2 (4:1:1) blockiert, dann 2x 1 h bei RT in PBSMT blockiert und schließlich für 3 Tage bei 4°C in Primärantikörper (NF 160, 1:300 in PBSMT; Sigma-Aldrich) inkubiert. Nach 3x 1h waschen in PBSMT bei 4°C und 4x 1h waschen in PBSMT bei RT wurde über Nacht in Sekundärantikörper inkubiert (anti-Maus HRP-Konj., 1:200; BioRad). Nach wiederholtem Waschprotokoll wurde 20 min in PBT gewaschen und anschließend 40 min in DAB/PBT (0,3 mg/ml) inkubiert. Nach Zugabe von 30%igem H_2O_2 (1:1000) wurde der Färbevorgang am Binokular verfolgt und nach wenigen Minuten durch Überführung der Embryonen in PBT gestoppt. Nach Dehydrierung in Methanol (25%, 50%, 75%, 100%, je 15 min) wurden die Embryonen in ein Glassgefäß mit glattem Boden überführt und unter geringem Flüssigkeitsspiegel in Benzyl-Alkohol/Benzyl-

Benzoat geklärt und fotografiert. Die *„whole-mount Immunfärbung" von Dottersackgewebe* erfolgte in 1,5 ml Einmalreaktionsgefäßen. Die Gewebe wurde bei 4°C über Nacht in 4:1 Methanol/DMSO fixiert, 2x 1 h in 0,1% Tween-20/PBS rehydriert bzw. permeabilisiert, 2x 1 h in 10% Ziegenserum/5% BSA/PBS blockiert und über Nacht bei 4°C mit Primärantikörper inkubiert. Anschließend wurden sie in 0,1% Tween-20/TBS für 6 h gewaschen und wiederum über Nacht lichtgeschützt in Sekundärantikörper inkubiert. Anschließend wurden die Gewebe 3x 20 min in PBS gewaschen, auf einem Objektträger ausgebreitet und in Evanol eingedeckt. Kontrastierung bzw. Färbung von *Ultra- und Semi-Dünnschnitten* von Herzmuskelgewebe wurden an der Deutschen Sporthochschule Köln, Abteilung für molekulare und zelluläre Sportmedizin, unter Leitung von Prof. Dr. med W. Bloch durchgeführt.

2.2.11 Laufbandtraining von Mäusen

Aufgrund der prominenten Expression von β-Parvin in Herz- und Skelettmuskel wurde mit *Parvb*$^{-/-}$- und Kontroll-Tieren ein gezieltes Belastungstraining für Herz und Skelettmuskel durchgeführt. Unter permanenter Aufsicht wurden 8 Kontroll- und 8 β-Parvin defiziente Weibchen auf einem sich mit 20 m/min und 10% Steigung bewegenden Laufband 1 h pro Tag, 28 Tage in Folge zum Laufen forciert. Die Tiere wurden anschließend physiologisch (Ultraschall), Herz- und Skelettmuskel histologisch (Semidünnschnitte) und biochemisch (Western-blot) untersucht. Das Training der Tiere, sowie die histologische Auswertung wurde in Kooperation mit der Deutschen Sporthochschule in Köln, in der Abteilung für zelluläre und molekulare Sportmedizin unter Leitung von Prof. Dr. med W. Bloch durchgeführt. Die Messung der Herzparameter erfolgte am Institut für Physiologie I der Medizinischen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität unter Leitung von Prof. Dr. B.K. Fleischmann.

2.2.12 Proliferationsassay

Ein möglicher Einfluss der β-Parvin Deletion auf die Zellproliferation wurde anhand der Zunahme der Zellzahl über die Zeit untersucht. In 24-Well-Platten wurden 3x 10^4 *Parvb*$^{+/+}$- bzw. *Parvb*$^{-/-}$-MEF pro Well ausgesät und zur Synchronisierung des Zellzyklus 20-24 h in EF-Medium mit 0,5% FCS kultiviert. Nach Wechsel auf normales EF-Medium (10% FCS) wurde über einen Zeitraum von 120 h alle 24 h die Zellzahl pro Well bestimmt. Hierzu wurden die Zellen eines Wells in 100 µl Trypsin/EDTA-Lösung für 5 min trypsiniert, resuspendiert und in einer Neubauerkammer gezählt. Es wurden *Parvb*$^{+/+}$- und *Parvb*$^{-/-}$-MEF aus je 3

verschiedenen Präparationen in 2 unabhängigen Experimenten unter 3x Bestimmung je Experiment verglichen.

2.2.13 Adhäsionsassay

Die Adhäsion von *Parvb*$^{+/+}$- und *Parvb*$^{-/-}$-MEF auf Fibronektin, Vitronektin, Laminin-5 und Kollagen-1 wurde verglichen. Als Kontrolle für Integrin-unabhängige bzw. unspezifische Adhäsion wurde Poly-L-Lysin als Substrat mitgeführt. Je 6 Wells einer 96-Well-Platte wurden mit 50 µl einer Lösung der angegebenen Substrate (10 µg/ml) über Nacht bei 4°C beschichtet. Nach einmaligem Waschen wurden die Wells sowie 2x 3 zusätzliche Wells für 1 h mit 50 µl DMEM/2% BSA blockiert. Nach erneutem Waschen wurden 1x 10^4 Zellen pro Well in EF-Medium mit 0,5% FCS ausgesät sowie 3x 10^4 Zellen je Genotyp zurückgehalten. Nach einer Adhäsionszeit von 20 min wurden die Wells unter Verwendung einer Mehrkanalpipette gleichmäßig 3x mit 100 µl PBS gewaschen. Die Wells wurden mit je 50 µl Substratpuffer befüllt. Nach Zentrifugation der 3x 10^4 *Parvb*$^{+/+}$- bzw. *Parvb*$^{-/-}$-MEF und Resuspension in je 150 µl Substratpuffer wurden diese ebenfalls auf je 3 Wells verteilt (Maximalwert). Die Platte wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 75 µl basischem Stoppuffer und gelblicher Verfärbung der Lysate wurde die Absorption bei 405 nm im Mikrotiterplatten-Leser bestimmt. Die Messwerte wurden um Unterschiede in den Maximalwerten bereinigt. Es wurden die Werte aus 2 Experimenten mit je 2 unterschiedlichen Präparationen (3x Bestimmungen, s.o.) von *Parvb*$^{+/+}$- bzw. *Parvb*$^{-/-}$-MEF gemittelt.

2.2.14 Zeitabhängige Messung der Zell-Substrat-Kontaktfläche

Die Messung der Zell-Substrat-Kontaktfläche während des Spreitens von *Parvb*$^{+/+}$- und *Parvb*$^{-/-}$-Makrophagen erfolgte durch automatisierte Lebend-Zell-Beobachtung in Fibroektin beschichteten 6-Well-Platten (10 µg/ml). Anhand weniger, zuvor ausplattierter und bereits adhärenter Zellen (3000 Zellen/Well) wurden einzelne Bildausschnitte vorfokussiert und deren Position am PC gespeichert (automatischer Verfahrtisch). Anschließend wurden 1,5x 10^5 Zellen pro Well in R10-Medium ausgesät. Über einen Zeitraum von 90 min wurden die gespeicherten Bildausschnitte der einzelnen Wells alle 2 min wiederholt angefahren und fotografiert. Am PC wurde dann mittels Metamorph-Software die Zell-Substrat-Kontaktfläche von 10 Zellen pro Bildausschnitt in Abhängigkeit von der Zeit gemessen. Pro Experiment wurden 2 Bildausschnitte von je 2 Präparationen von *Parvb*$^{+/+}$- und *Parvb*$^{-/-}$-Zellen gefilmt. Es wurden 3 Experimente mit insgesamt 4 Präparationen je Genotyp durchgeführt.

2.2.15 *In vitro* Wundheilungsexperiment

Die Fähigkeit von *Parvb*$^{+/+}$- und *Parvb*$^{-/-}$-MEF zu gerichteter Migration wurde in einem *in vitro*-Wundheilungsversuch unter automatisierter Lebend-Zell-Beobachtung untersucht. Hierzu wurden die Zellen in 6-Well-Platten unter nahezu konfluenten Bedingungen ausgesät und 24 h kultiviert. In die nun geschlossenen Zelllagen wurden mit einer sterilen, abgeschmolzenen Pasteurpipette Spalte von 200-300 µm gesetzt (2 Spalte pro Well). Drei Bildausschnitte je Spalt wurden auf dem Verfahrtisch über einen Zeitraum von 8 h alle 10 min angefahren und fotografiert. Aus der Verschlusszeit in Abhängigkeit von der initialen Spaltbreite wurde die mittlere Wanderungsgeschwindigkeit der Zellen errechnet. Es wurden 2 Experimente mit je 3 Präparationen von *Parvb*$^{+/+}$- und *Parvb*$^{-/-}$-MEF (1Well je Präparation) durchgeführt.

2.2.16 *In vivo*-Migration Fluoreszenz-markierter Dendritischer Zellen

Für die Analyse der *in vivo*-Migration von aus Knochenmark *in vitro* differenzierten Dendritischen Zellen (vgl. 2.2.4) wurden diese nach LPS-Stimulierung zunächst fluoreszenz-markiert. Dies erfolgte genotyp-spezifisch in 3mM CFSE (grün) bzw. 10 µM TAMRA (rot) unter Kreuzmarkierung in PBS für 10 min bei RT. Nach 2x waschen in 10x Volumen PBS wurden DC der verschiedenen Genotypen bzw. Markierungen im Verhältnis 1:1 gemischt. Anschließend wurden Empfängermäusen 1x 10^6 Zellen/20 µl Suspension subkutan in jede Fußsohle der Hinterbeine injiziert. Nach 24h bzw. 48 h wurden die poplietalen Lymphknoten der Empfängertiere entnommen und für die Präparation von Kryoschnitten in Kryomatrix eingefroren bzw. für die FACS-Analyse präpariert (vgl. 2.2.18).

2.2.17 Einwanderung von Fluoreszenz-markierten Lymphozyten in Milz und Lymphknoten

Die Fluoreszenzmarkierung von Einzelzellsuspensionen der Milz erfolgte analog zu der von Dendritischen Zellen (vgl. 2.2.16). Nach 1:1-Mischung wurden Empfängermäusen 2x 10^7 Zellen/200 µl Suspension in die Schwanzvene injiziert. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde lichtgeschützt für 30 min bei 37°C in Dunkelheit inkubiert und anschließend bei 4°C gelagert. 90 min bzw. 24 h nach Injektion wurden den Tieren die Milz bzw. die axillären, brachialen und inguinalen Lymphknoten entnommen und für die FACS-Analyse präpariert (vgl. 2.2.18).

2.2.18 FACS-Analysen

Für die Messung der interstitiellen Migration von DC (vgl. 2.2.16) wurden die poplietalen Lymphknoten der Empfängertiere zunächst unter PBS durch einen Zellfilter passagiert, 5 min bei 1200 rpm abzentrifugiert, in 5 ml PBS gewaschen, erneut abzentrifugiert und in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen. Unter Verwendung eines FacsCalibur (BD) wurden anschließend alle Zellen je Probe gezählt und das Verhältnis von Wildtyp- zu mutanten DC anhand des Verhältnisses rot- zu grün-fluoreszenter Zellen (bzw. umgekehrt) bestimmt.

Für die Messung der Einwanderung von T- sowie B-Lymphozyten in Milz und Lymphknoten wurden die Gewebe nach Entnahme ebenfalls durch einen Zellfilter passagiert. Hierbei wurden die Zellen der verschiedenen Lymphknoten vereinigt. Die Erythrozyten in Milzproben wurden anschließend durch 5 min Inkubation in Erythrozyten-Lysepuffer lysiert. Alle Proben, sowie die vor der Injektion zurückgehaltenen Aliquots der Suspensionen (vgl. 2.2.17) wurden dann 1x in PBS und anschließend 1x in FACS-Puffer gewaschen, durch 5 min Zentrifugation bei 1200 rpm. Zur Differenzierung von T- und B-Zellen wurden jeweils 5x 10^6 Zellen (Milz) bzw. 1x 10^6 Zellen (Lymphknoten) in 96-Well-Platten mit Rundboden abzentrifugiert und mit Anti CD3-Biotin (T-Zellen) bzw. Anti B220-Biotin (B-Zellen) für 15 min lichtgeschützt bei 4°C inkubiert. Nachdem die Zellen abzentrifugiert und 1x mit FACS-Puffer gewaschen wurden, erfolgte die Inkubation mit cy5-markiertem Streptavidin lichtgeschützt für 10 min bei 4°C. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert und gewaschen. Zur Vermeidung von Autofluoreszenz durch tote Zellen wurden diese vor der FACS-Messung durch Zugabe von 7-AAD in die Suspension markiert. Anschließend erfolgte die FACS-Messung der gesamten Probe, wobei 7-AAD-positive Zellen aus der Zählung ausgeschlossen wurden. Es wurde der Anteil bzw. das Verhältnis von Wildtyp- und mutanten T- bzw. B-Lymphozyten bestimmt und um das Verhältnis vor Injektion bereinigt.

Für die statistische Auswertung von DC wurden die Ergebnisse aus 5, für die von Lymphozyten aus 3 Versuchen mit je 3-6 Tieren pro Zeitpunkt (2x 1-3 Tiere unter kreuzweiser Fluoreszenzmarkierung) gemittelt. Die T- bzw. B-Zell-spezifische Immunfärbung erfolgte in Doppelbestimmung für Milz sowie vereinigte Lymphknoten jeder Empfängermaus. Für die Auswertung wurde die „Cell-Quest-pro“-Software (BD) verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Generierung Isoform-spezifischer Parvinpeptid Antikörper

Zur Analyse der Expression der verschiedenen Parvin-Isoformen wurden polyklonale Peptid-Antikörper, spezifisch für α-, β- und γ-Parvin hergestellt. Die hierfür verwendeten Peptide wurden in der Arbeitsgruppe für bioorganische Chemie des Max-Planck-Institutes für Biochemie synthetisiert. Als N-terminale Aminosäure wurde jedem Peptid zusätzlich ein Cystein-Rest hinzugefügt, was die Kopplung an KLH (Keyhole-limpet hemocyanin) als immunogenes Trägerprotein ermöglichte. Die Immunisierung der Hasen am Max-Planck-Institut für Biochemie erfolgte in vier Injektionen über einen Zeitraum von acht Wochen. Die Seren der anschließend ausgebluteten Tiere wurden gegen das korrespondierende Peptid affinitätsgereinigt.

Abbilding 3.1.1 zeigt die verwendeten Peptide in der Primärsequenz der jeweiligen Parvin Isoform. Ein Kriterium für die Auswahl der Peptide war eine möglichst geringe lokale Sequenzhomologie zwischen den Isoformen. Die Parvine zeigen eine hohe Sequenzhomologie im Bereich der F-Aktin bindenden Domäne (ABD), während der Bereich N-terminal der ABD bei den Parvinen eine deutlich geringere Sequenzhomolgie zeigt (Olski et al., 2001). Desweiteren wurden die Peptide nach geringer Wahrscheinlichkeit von Sekundärstrukturbildung und hoher Wahrscheinlichkeit von zytoplasmatischer bzw-Lösungsmittelexposition ausgewählt (ExPASy Proteomics Server). Auch wurden Peptide mit vielen hydrophoben Resten wegen schlechter Löslichkeit während der Kopplungsreaktion vermieden. Unter diesen Voraussetzungen wurden für die drei Isoformen Peptide von 14-16 Aminosäuren nahe des N-Terminus gewählt, α-Parvin$^{P5\text{-}S19}$, β-Parvin$^{S3\text{-}M16}$ und γ-Parvin$^{E2\text{-}A17}$.

```
α-Parvin MATSPQKSPLVPKSPTPKSPPSRKKDDSFLGKLGGTLARRKKAKEVSEFQEEGMNAINLPLSPISFELD
β-Parvin ------MSSAPPRSPTPRAP-KMKKDESFLGKLGGTLARKKKTREVTDLQEEGKSAINSPMAPALVDIH
γ-Parvin ----------------------MELEFLYDL---------------LQLP-----------KEVAQ
```

Abb. 3.1.1: Primärsequenzen der N-Termini von murinem α-, β- und γ-Parvin. Die für die Generierung der Parvin-Antikörper synthetisierten Peptide, α-Parvin$^{P5\text{-}S19}$, β-Parvin$^{S3\text{-}M16}$ und γ-Parvin$^{E2\text{-}A17}$ sind unterlegt.

Die noch nicht aufgereinigten Antiseren wurden zunächst im Hinblick auf ihre Isoform-spezifische sowie auf unspezifische Kreuzreaktivitäten gegen die anderen Isoformen mittels indirekter Immunfluoreszenz im Mikrotiterplatten-Assay charakterisiert. Die Antiseren sowie Prä-Immunseren der Hasen wurden in mit Peptid beschichteten Platten inkubiert und ausgewaschen. Der Nachweis von gebundenem Antikörper erfolgte durch Inkubation mit HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper unter Zugabe von 5´-Aminosalizylsäure und H_2O_2 und

anschließender Messung der optischen Dichte bei 490 nm. Die spezifische Reaktivität wurde durch Inkubation der Antiseren mit den korrespondierenden Peptiden untersucht, die Kreuzreaktivität unter Inkubation mit den Peptiden der anderen Isoformen.

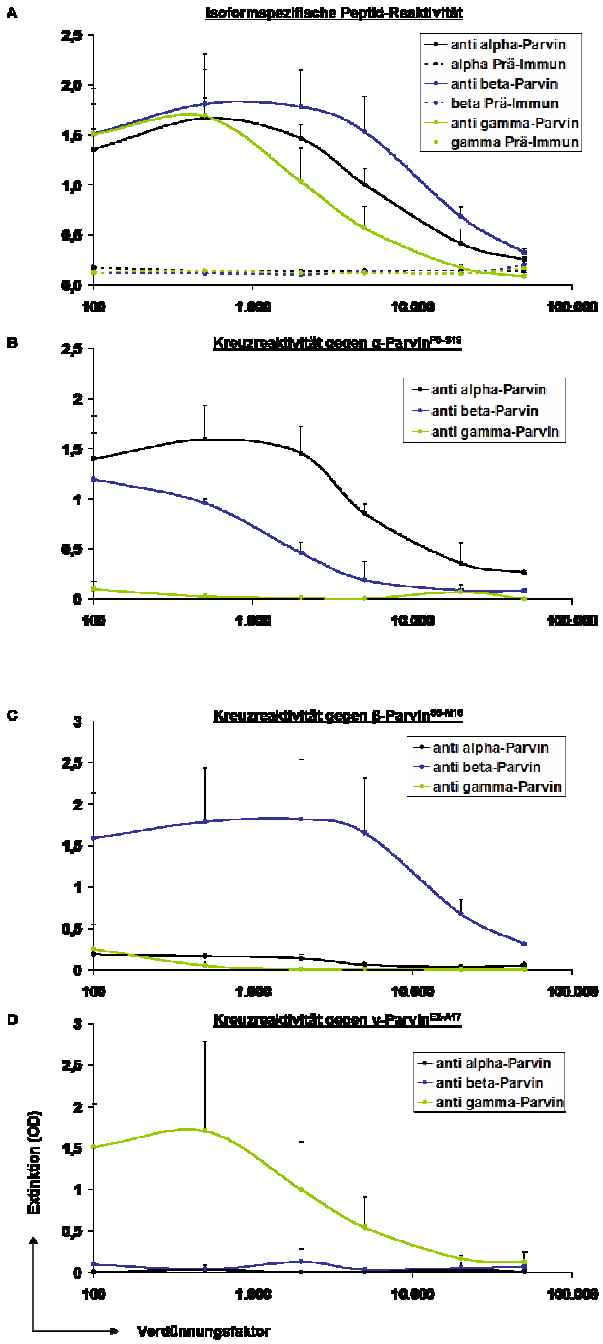


Abb. 3.1.2.: Reaktivität der Parvin-Antiseren gegen die zur Immunisierung verwendeten Peptide im Mikrotiterplatten-Assay; A: Reaktivität der Antiseren sowie der entpsrechenden Prä-Immunseren gegen das Peptid der korrespondierenden Isoform; B: Reaktivität der Antiseren gegen α-Parvin$^{P5\text{-}S19}$; C: Reaktivität der Antiseren gegen β-Parvin$^{S3\text{-}M16}$; D: Reaktivität der Antiseren gegen γ-Parvin$^{E2\text{-}A17}$; Die Platten wurden mit 1 mg/ml Peptid über Nacht beschichtet, mit BSA blockiert, und je 1h mit Primär- bzw. HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper inkubiert. Nachweis gebundenen Antikörpers durch Zugabe von 5´-Aminosalizylsäure und H_2O_2 und Messung der OD_{490}

Abbildung 3.1.2.A zeigt die spezifische Reaktivität von α-, β- und γ-Parvin Antiserum gegen α-Parvin$^{P5\text{-}S19}$, β-Parvin$^{S3\text{-}M16}$ bzw. γ-Parvin$^{E2\text{-}A17}$ im Vergleich zum jeweiligen Prä-Immunserum. Keines der Prä-Immunseren zeigte Reaktivität gegen das spezifische Peptid. Hingegen zeigten alle drei Antiseren eine deutliche spezifische Reaktivität bis in Verdünnungen von 1:5000-1:10000. Abbildung 3.1.2.B zeigt die Reaktivität von α-, β- und γ-Parvin Antiserum gegen α-Parvin$^{P5\text{-}S19}$. Der deutlichen Reaktivität von Anti α-Parvin stand eine kaum messbare Reaktivität von Anti γ-Parvin gegenüber. Anti β-Parvin hingegen zeigte in Verdünnungen unterhalb 1:2000 eine Kreuzreaktivität gegen α-Parvin$^{P5\text{-}S19}$. Eine Kreuzreaktivität gegen β-Parvin$^{S3\text{-}M16}$ konnte weder bei Anti α- noch γ-Parvin beobachtet werden (Abb. 3.1.2.C), ebenso wenig wurde Kreuzreaktivität von Anti α- oder β-Parvin gegen γ-Parvin$^{E2\text{-}A17}$ beobachtet (Abb. 3.1.2.D).

Die affinitätsgereinigten Antikörper wurden weiterhin mittels Western-blot Analyse von *in vitro* translatiertem α-, β- sowie γ-Parvin Protein charakterisiert. Dieser Versuch wurde im Rahmen ihrer Promotion von Frau Haiyan Chu in der Abteilung für Molekulare Medizin, Max-Planck-Institut für Biochemie durchgeführt. Abbildung 3.1.3 zeigt eine Western-blot Analyse von α-Parvin- (Spur 2), β-Parvin- (Spur 3) und γ-Parvin-Translatat (Spur 4) mit leerem Vektor als Negativ- und Milz-Lysat als Positiv-Kontrolle (Spuren 5 bzw. 1). Die sequenzielle Inkubation der Membran mit Anti α-, β- und γ-Parvin zeigte in allen drei Fällen deutliche Banden in den Spuren der Zielproteine auf Höhe der rechnerischen Molekulargewichte (α-Parvin: 42,3kDa, β-Parvin: 41,7 kDa, γ-Parvin: 37,5 kDa), was die spezifische Reaktivität der drei Antikörper gegen partiell denaturiertes Protein belegt. Alle drei Banden fanden sich zudem auch bei Reaktion mit Lysat der Milz (Spur 1), für die mRNA-Expression aller drei Parvin Isoformen gezeigt wurde (Korenbaum et al., 2001, Olski et al., 2001). Eine Kreuzreaktivität der Antikörper mit den anderen Isoformen sowie mit dem Translatat des leeren Vektors konnte weder für α- und γ-Parvin, noch für β-Parvin bei den entsprechenden Molekulargewichten beobachtet werden. Eine weitere Bande zeigte Anti β-Parvin im Bereich von ca. 30 kDa über alle Lysate hinweg. Auch Anti γ-Parvin zeigte weitere Banden in allen Lysaten, bei ca. 30 kDa sowie bei ca. 55 kDa. Das Vorkommen dieser Banden in allen Lysaten lässt darauf schließen, dass es sich hierbei nicht um Parvin-spezifische, sondern unspezifische Banden handelt. Diese Banden bzw. eine generelle Tendenz zu gewebe-spezifischen, unspezifischen Banden zeigten beide Antikörper in weiteren Western-blot Analysen (Abb. 3.2.2, 3.3.2.1 und 3.5.2.1).

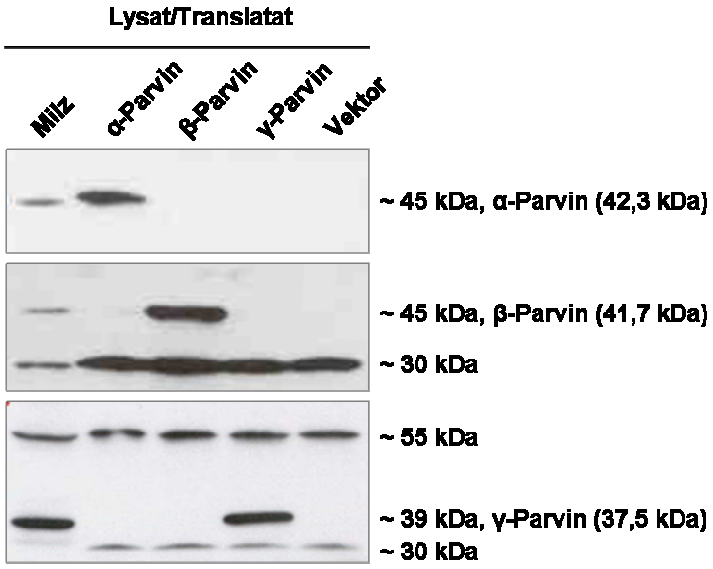


Abb. 3.1.3: Western-blot Analyse von in vitro translatiertem α-, β- und γ-Parvin Protein; Inkubation mit den affinitätsgereinigten Parvin-Antikörpern: α-Parvin, (1:5000, oben), β-Parvin (1:2500, Mitte), γ-Parvin (1:2500, unten); Positivkontrolle: Milz (Spur 1); Negativ-Kontrolle: leerer pCS2^{+}-Vektor; SDS-PAGE: 10% Acrylamid

Die Immunfluoreszenzfärbung von murinen, embryonalen Fibroblasten (MEF) mit Anti α-Parvin zeigte eine deutliche Fokal-Adhäsionsfärbung (Abb. 3.3.6.3), so dass dieser Antikörper auch für die Immunfärbung von Zellen bzw. Geweben verwendet wurde. Weitere Versuche zur Eignung von Anti β- und γ-Parvin für die Immunfluoreszenz von Zellen und Geweben wurden unter verschiedenen Fixierungsbedingungen (Paraformaldehyd, Methanol, Aceton) bei verschiedenen Antikörperverdünnungen durchgeführt. Der Vergleich von Wildtyp und Parvin-defizienten Geweben bzw. Zellen oder der Vergleich mit reinen Sekundärantikörperfärbungen sowie β-/γ-Parvin-GFP Fluoreszenz zeigte keine spezifischen Signale, so dass diese Antikörper für das Färben von Zellen und Geweben nicht verwendet wurden.

Im Fall des β-Parvin Antikörpers ist zu erwähnen, dass die Wahl des N-terminalen Peptides die Erkennung der kürzeren Translationsvarianten (Yamaji et al., 2001, Abb. 1.5.1.B) von vornherein ausschloss. Aus diesem Grunde wurden weitere β-Parvin Antiseren erstellt unter Verwendung zweier Peptide aus der CH1-Domäne (Q158-R169) und dem Bereich zwischen den CH-Domänen (H219-M234; Abb. 8.2, Anhang). Diese zeigten zwar Reaktivität gegen das jeweilige Peptid, jedoch keine spezifischen Signale in der Western-blot Analyse von Milz-Lysat (Abb. 3.1.4). Als Kontrolle diente Milz-Lysat von β-Parvin defizienten Mäusen (vgl. 3.3.1) sowie die sequentielle Inkubation der Membranen mit Anti β-Parvin$^{S3\text{-}M16}$.

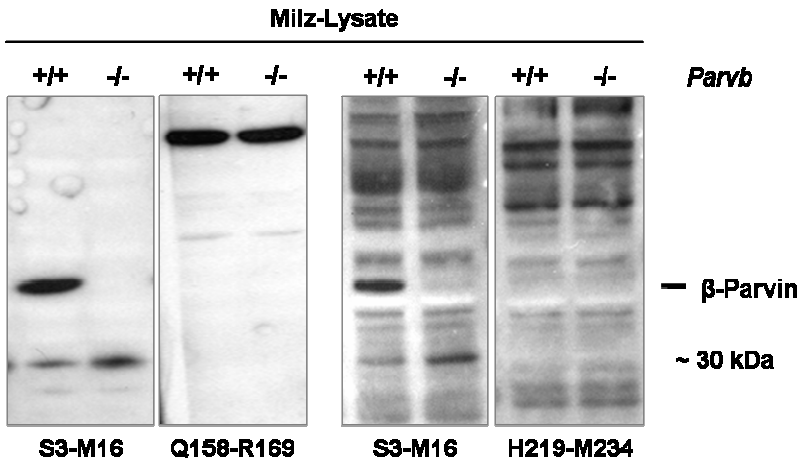


Abb. 3.1.4: Western-blot-Analyse von Wildtyp- und β-Parvin-defizienten Milz-Lysaten zum Test der Antiseren gegen β-Parvin$^{Q158\text{-}R169}$ und β-Parvin $^{H219\text{-}M234}$; Anti β-Parvin $^{S3\text{-}M16}$ diente als Positiv-Kontrolle; SDS-PAGE: 10% Acrylamid

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Anti α-Parvin$^{P5\text{-}S19}$ Eignung zur spezifischen Immundetektion auf Zellen, sowie im Western-blot zeigte. Anti β-Parvin$^{S3\text{-}M16}$ und Anti γ-Parvin$^{E2\text{-}A17}$ ermöglichten nur im Western-blot eine spezifische Detektion der Proteine anhand der Größenzuordnung. Die Detektion kürzerer β-Parvin Translationsvarianten ermöglichte Anti β-Parvin$^{S3\text{-}M16}$ nicht.

3.2 Gewebespezifische Expression und *in vitro* subzelluläre Lokalisation von Parvin Isoformen

Um eine gezielte Analyse Parvin-defizienter Mäuse zu ermöglichen wurde die gewebespezifische Expression von α- und β-Parvin mittels radioaktiver *in situ*-Hybridisierung von Embryonen (E14.5) sowie mittels Western-blot adulter Gewebe untersucht. Eine weitere Charakterisierung der Expression von γ-Parvin wurde hier nicht durchgeführt, da Chu et al. (2006) bereits die spezifisch hämatopoetische Expression charakterisiert haben. Da Korenbaum et al. (2001) mittels Northern-blot Analysen bereits für alle Parvine eine Expression von E8.5-E12.5 gezeigt haben, wurde auf eine eingehendere Analyse der zeitlichen Expression von α- und β-Parvin ebenfalls verzichtet.

3.2.1 Expression von α- und β-Parvin in der Embryonalentwicklung

Die Charakterisierung der gewebespezifischen Expression von *Parva* und *Parvb* (E14.5) erfolgte mittels *in situ*-Hybridisierung. 8 µm dicke Paraffin-Schnitte wurden mit radioaktiv

(P^{33}) markierten Antisense-Sonden gegen *Parva* und *Parvb* sowie zur Kontrolle mit den entsprechenden Sense-Sonden hybridisiert. Nach ein- bis zwei-wöchiger Inkubation in Fotoemulsion wurden die Schnitte entwickelt und mikroskopisch analysiert.

Abbildung 3.2.1.1 zeigt die Übersichtsdarstellung von aufeinander folgenden Schnitten zweier Embryonen, jeweils hybridisiert gegen *Parva* und *Parvb*. Die nach Antisense-Hybridisierung beobachteten Signale fehlten nach Sense-Hybridisierung fast vollständig, was die Antisense-Signale als *Parva*- bzw- *Parvb*-spezifische Expression auswies. Zunächst konnte eine Expression beider Isoformen in einem Großteil der Organe bzw. Gewebe festgestellt werden. Ausnahme war hier das Zentralnervensystem, in dem weder klare *Parva*- noch *Parvb*-Expression detektiert werden konnte. Auffällig war weiterhin das in den meisten Geweben relativ großflächig starke Signal von *Parva* im Vergleich zu den in den meisten Geweben schwächer wirkenden *Parvb*-Signalen.

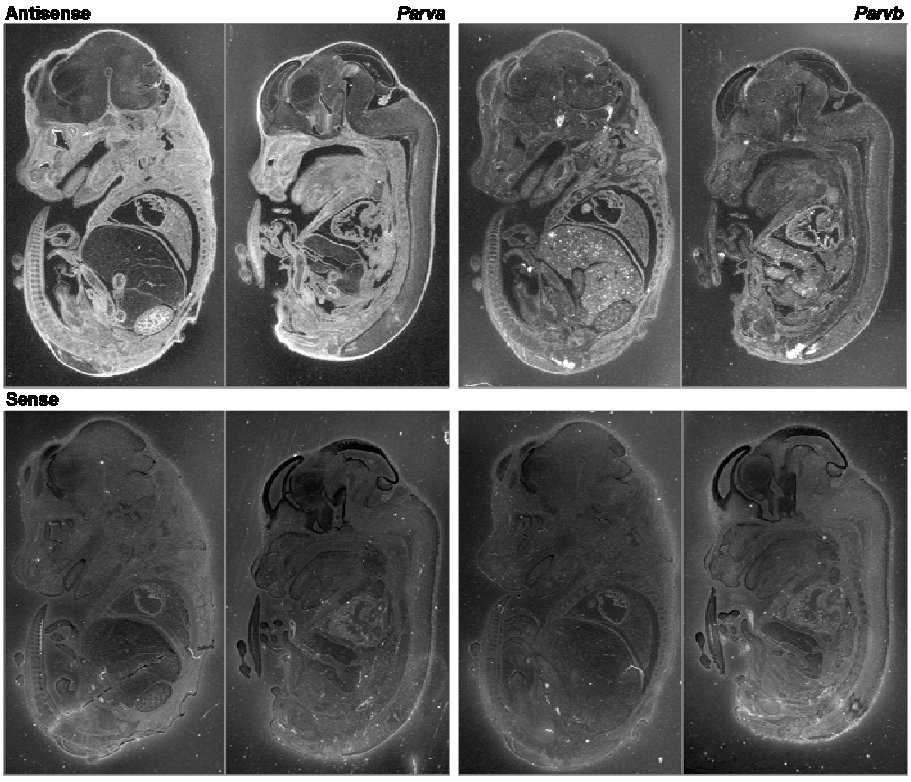
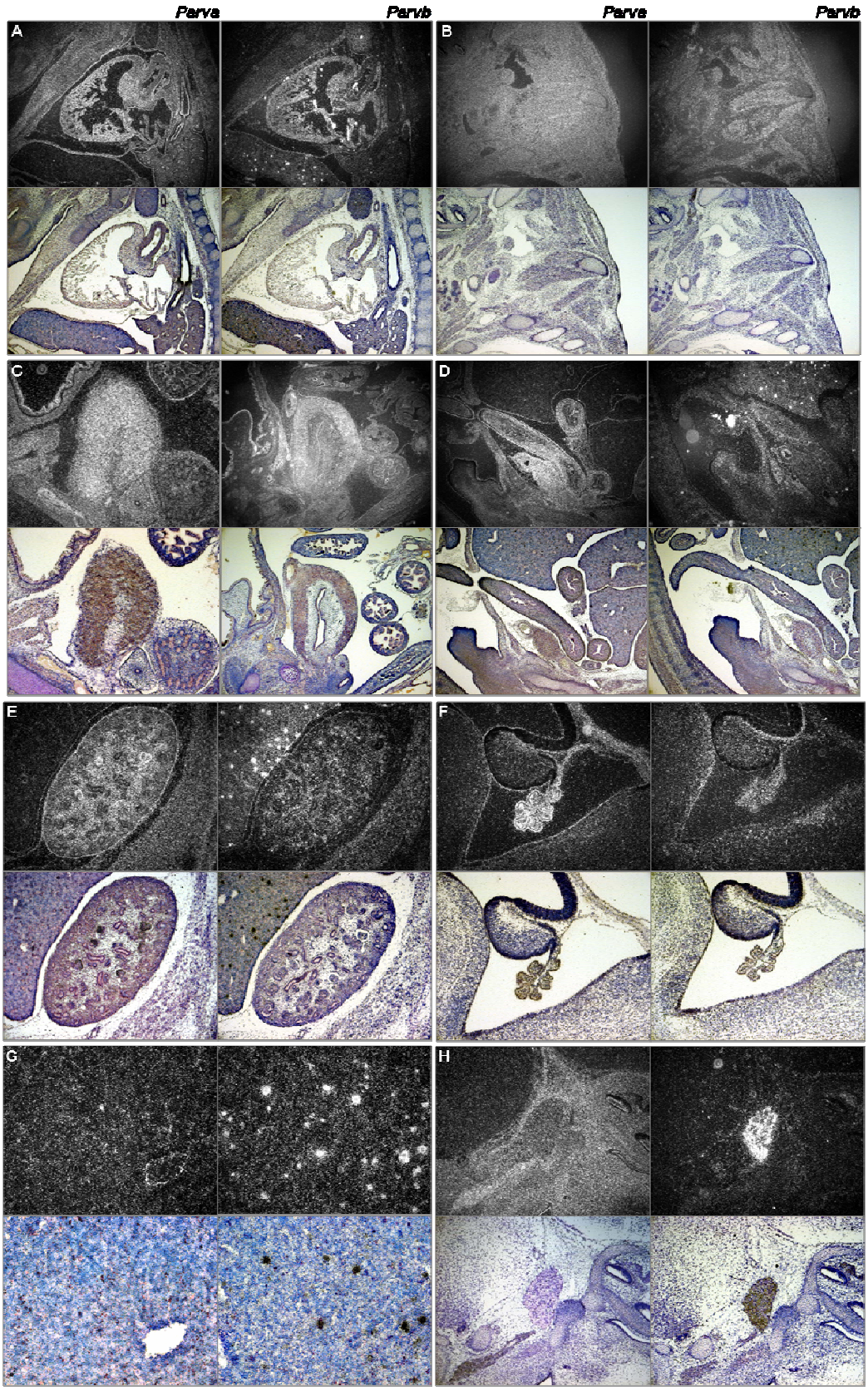


Abb. 3.2.1.1: Sagittal-Schnitte (8 µm, Paraffin) zweier Maus-Embryonen (E14.5) nach radioaktiver in situ-Hybridisierung; Mit Antisense- (oben) sowie Sense-Sonden (i. pBluescript II KS) als Negativ-Kontrolle (unten) wurden aufeinander folgende Schnitte der Embryonen gegen Parva/α-Parvin bzw. Parvb/β-Parvin hybridisiert


Parva
Parvb
Parva
Parvb
A
B
C
D
E
F
G
H

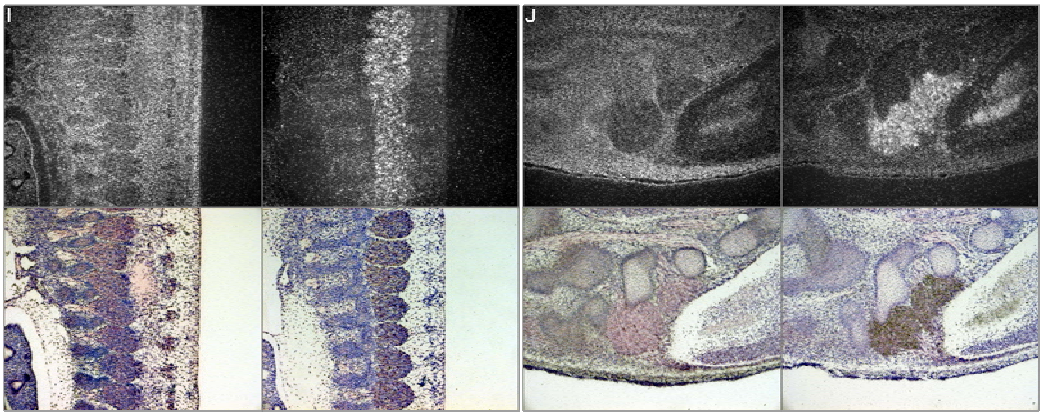


Abb. 3.2.1.2: Vergrößerung verschiedener Gewebe der in Abbildung 3.2.1.1 gezeigten Embryonen (E14.5) sowie Detaildarstellung weiterer embryonaler, Parvin-exprimierender Gewebe nach radioaktiver in situ-Hybridisierung von Sagittalschnitten; A: Herz (5x); B: Nackenmuskulatur (5x); C: Harnblase (Parva: 10x; Parvb: 5x); D: Dünndarm (5x); E: Niere (10x); F: Choroider Plexus (10x); G: Leber (10x); H: Trigeminalganglion (10x); I: Dorsale Wurzelganglien E12.5 (5x); J: Dorsale Wurzelganglien, terminal (10x); Dunkelfeld: Antisense-Hybridisierung gegen Parva (links) bzw. Parvb (rechts), Hellfeld: Giemsa-Färbung

Ausnahmen hiervon waren das Herz (Abb. 3.2.1.2.A) sowie quergestreifte Muskulatur, etwa im Nackenbereich (Abb. 3.2.1.2.B). Hier erschienen *Parva*- und *Parvb*-Signale in gleicher Intensität. Auffällig war hier das vergleichsweise schwache *Parvb*-Signal im direkt benachbarten mesenchymalen Gewebe, welches ein unvermindert starkes *Parva*-Signal zeigte. In der glatten Muskulatur der Harnblase konnten ebenfalls sehr ausgeprägte Signale beider Isoformen detektiert werden (Abb. 3.2.1.2.C). Die glatte Muskulatur des Darmes zeigte zwar Signale beider Isoformen, hier jedoch wieder ein im Vergleich zur Herz- oder Skelettmuskulatur schwaches *Parvb*-Signal bei starkem *Parva*-Signal (Abb. 3.2.1.2.D). Deutlichere Unterschiede in der Expression der Isoformen zeigten sich in anderen Organen, wie etwa der Niere. Ausgeprägte *Parva*-Signale waren hier wiederum in mesenchymalen Bereichen sowie assoziiert mit den Glomeruli zu sehen, während *Parvb*-Signale nur sehr schwach und zudem lediglich mit den Tubuli assoziiert schienen (Abb. 3.2.1.2.E). *Parva* zeigte weiterhin starke Expression im Choroiden Plexus, welcher ein nur schwaches *Parvb*-Signal aufwies (Abb. 3.2.1.2. F). Hingegen wurden starke, punkförmige Signale von *Parvb* in der Leber beobachtet, wie es für Megakaryozyten charakteristisch ist. Diese fehlten nach *Parva*-Hybridisierung völlig (Abb. 3.2.1.2.G). Wie auch in Abbildung 3.2.1.1 zu sehen konnte in der Leber generell keine klare *Parva*-Expression beobachtet werden. Eine auffällig starke Expression zeigte *Parvb* weiterhin im Trigeminal- sowie im superioren Glossopharyngealganglion (Abb. 3.2.1.2.H, 3.2.1.1) sowie den dorsalen Wurzelganglien (Abb. 3.2.1.2.I, 3.2.1.2.J, 3.2.1.1). In keinem dieser Ganglien konnte eine deutliche *Parva*-Expression detektiert werden.

3.2.2 Expression von α- und β-Parvin in adulten Geweben

Die adulte Expression der beiden Parvin-Isoformen wurde mittels Western-blot Analyse von Geweben nach SDS-haltiger Lyse untersucht. Die hierfür verwendeten Tiere waren acht bis 12 Wochen alt. Wie in Abbildung 3.2.2 zu sehen zeigten beide Isoformen auch in adulten Geweben nahezu ubiquitäre Expression. Ein direkter Vergleich der Expressionsstärke von α- und β-Parvin war hierbei durch die Verwendung von Antikörpern leider noch weniger möglich als nach *in situ*-Hybridisierung der embryonalen Schnitte, so dass hierzu keine Aussagen gemacht werden können. Konsistent mit der embryonal kaum nachweisbaren Parvin-Expression im Zentralnervensystem zeigten adulte Gehirnlysate eine kaum detektierbare Expression von α- und eine nur unwesentlich stärkere Expression von β-Parvin. Bei längerer Expositionszeit der Membranen wurden Banden beider Isoformen auch in Lysaten von Gehirn, Auge und Dünndarm sowie Skelettmuskel detektierbar. Aufgrund der bei längerer Expositionszeit extrem starken Banden von Herz-, Lungen- oder Harnblasenlysaten wurde auf diese Abbildung hier jedoch verzichtet. Im Gegensatz zu embryonalen Leberschnitten konnte in adulten Leberlysaten eine deutliche Expression von α-Parvin detektiert werden. Ähnlich wurden in der Lunge, die embryonal keine auffällig starke Expression zeigte adult die mitunter stärksten Signale beider Isoformen beobachtet. Nur bedingt konsistent mit den embryonalen Expressionsmustern sind die relativen Expressionsintensitäten der Parvine in Herz- und Skelettmuskel. Während α-Parvin in den quergestreiften Muskelgeweben eine im Vergleich zu anderen Organen sehr schwache Expression zeigte, konnte für β-Parvin, konsistent mit der embryonalen Expression eine starke Expression im Skelettmuskel und eine noch ausgeprägtere im Herzen beobachtet werden. Ein solches Expressionsverhältnis beider Isoformen wurde in keinem anderen der untersuchten Gewebe festgestellt.

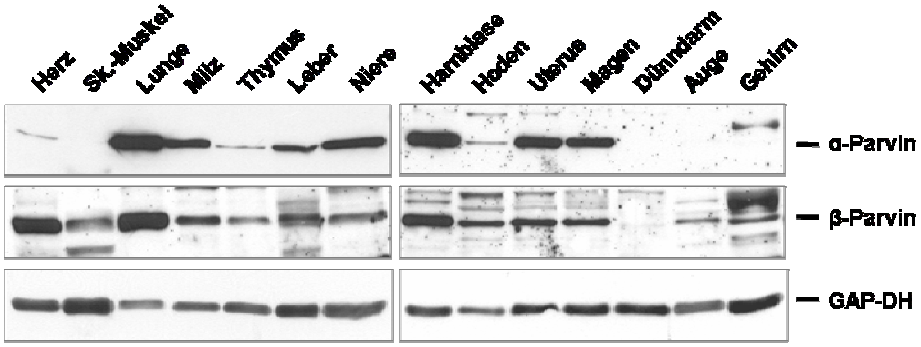


Abb. 3.2.2: Expressionsanalyse von α- und β-Parvin in adulten, murinen Geweben mittels Western-blot; Ladekontrolle: GAP-DH; SDS-PAGE: 10% Acrylamid

Expressionsanalysen von β-Parvin mittels β-Galaktosidase Färbung von Gewebeschnitten von *Parvb*$^{+/-}$-Tieren (vgl. 3.3.1) konnten leider nicht durchgeführt werden. Testversuche an verschieden dicken Paraffin-Schnitten (8-15 µm) mehrerer Organe zeigten keine Färbung. Die korrekte Durchführung des Färbeprotokolls wurde anhand der positiven Kontrollfärbung von Schnitten der gleichen Organe heterozygoter Tiere mit anderen, β-Galaktosidase enthaltenden Kassetten sichergestellt. Gleiches gilt für *Parva*$^{+/-}$-Tiere, für deren Generierung die gleiche Selektionskassette verwendet wurde (Montanez, Thievessen und Fässler, unpubliziert).

3.2.3 Subzelluläre Lokalisation von α- und β-Parvin in NIH3T3-Fibroblasten

Aufgrund der stark überlappenden Expressionsmuster von α- und β-Parvin (vgl. 3.2.1-3.2.2) sowie der Frage nach verschiedenen, eventuell antagonistischen Funktionen von α- und β-Parvin in Zellkulturstudien (vgl. 1.4.2) wurde der Frage nachgegangen, in wie weit sich auch die subzelluläre Lokalisation der Parvine ähnelt. Hierzu wurden NIH3T3-Fibroblasten, welche endogen α- und β-Parvin exprimieren mit GFP/α- bzw. GFP/β-Parvin Konstrukten transfiziert und jeweils die Ko-Lokalisation mit dem Fokalkontaktmarker Paxillin verglichen. Abbildung 3.2.3.A zeigt zunächst die Fluoreszenz nach GFP/α- bzw. GFP/β-Parvin-Transfektion im Vergleich zur Transfektion von leerem GFP-Vektor. Hier konnten für beide Isoformen ähnliche punktförmige Fluoreszenzmuster beobachtet werden, wie sie für Fokaladhäsionen in Fibroblasten charakteristisch sind. Ein solches Muster wurde nicht nach Transfektion mit leerem GFP-Vektor beobachtet, was das Fluoreszenzmuster als Parvin-spezifisch auswies. Abbildung 3.2.3.B zeigt die GFP-Fluoreszenz beider Parvin Isoformen im Vergleich mit der Immunfluoreszenz von Paxillin. Wie in den Überblendungen der Fluoreszenzen zu sehen, zeigten GFP/α-Parvin und GFP/β-Parvin eine nahezu vollständige Ko-Lokalisation mit Paxillin. Eine nukleäre Fluoreszenz konnte bei beiden Parvin-Isoformen beobachtet werden. Diese war jedoch nicht konsistent, sondern schien eher abhängig von der Expressionsstärke des GFP/Parvin-Konstruktes.

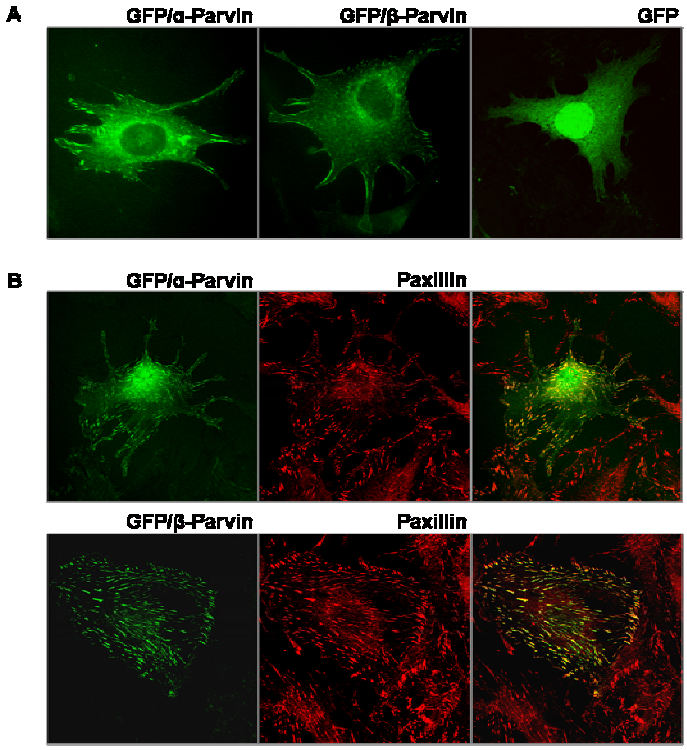


Abb. 3.2.3: Subzelluläre Lokalisation von α- und β-Parvin in NIH3T3-Fibroblasten; A: GFP-Fluoreszenz von NIH3T3-Zellen 30 h nach Lipofektion von GFP/α- (links) bzw. GFP/β-Parvin (Mitte) und pEGFP-C1-Vektor als Kontrolle (rechts), 4 h nach erneuter Ausplattierung auf Fibronektin (FN); B: GFP-Fluoreszenz von NIH3T3-Zellen nach Lipofektion von GFP/α- (oben) bzw. GFP/β-Parvin (unten) und erneuter Ausplattierung auf FN, Ko-Immunfärbung von Paxillin als Fokalkontaktmarker (cy3); nukleäre GFP-Fluoreszenz (B, GFP/α-Parvin) zeigte sich nach GFP/α- wie auch GFP/β-Parvin-Transfektion gleichermaßen inkonsistent (nicht gezeigt); Vergrößerung: 63x

Insgesamt zeigte die gewebespezifische Expressionsanalyse von α- und β-Parvin in der fortgeschrittenen Embryonalentwicklung wie auch adult eine nahezu ubiquitäre Expression beider Parvine mit Ausnahme des Zentralnervensystems, im Fall von α-Parvin auch der embryonalen Leber. Anders als β-Parvin, für das eine starke embryonale Expression hauptsächlich in quergestreiftem Muskelgewebe, peripheren Neuronen sowie Megakaryozyten beobachtet wurde, zeigte α-Parvin embryonal eine großflächig ausgeprägte Expression, auch in mesenchymalen Geweben, etwa in der Niere. In glatten Muskelgeweben zeigte sich β-Parvin variabel exprimiert. Im Choroiden Plexus zeigte α-Parvin, anders als β-Parvin starke Expression. Adult fiel neben der nun ausgeprägten Expression beider Parvine in der Lunge vor allem das im Vergleich zu sämtlichen anderen Geweben sehr niedrige Expressionsverhältnis von α- zu β-Parvin in Herz- und Skelettmuskel auf. Beide Isoformen zeigten eine fast vollständige Ko-Lokalisation mit Paxillin in NIH3T3-Zellen.

3.3 Generierung und Analysen β-Parvin defizienter Mäuse

Der Ansatz einer funktionalen Analyse von β-Parvin *in vivo* wurde aus veschiedenen Gründen gewählt. Zunächst war dies der hauptsächlich auf zellbiologische Studien beschränkte Literaturstand. Zudem deutete dieser auf eher divergente als redundante Funktionen von α- und β-Parvin. Demgegenüber stand die große Ähnlichkeit beider Isoformen, sowohl auf Sequenz- wie auch struktureller Ebene. Die breite Ko-Expression der Proteine in vielen Geweben trotz teils spezifischer Expressionsdomänen von β-Parvin stellte wiederum die Frage nach funktioneller Diversität und Redundanz innerhalb der Parvin-Familie. Vor diesem Hintergrund wurde die Frage nach β-Parvin-spezifischen Funktionen auf physiologischer Ebene durch vollständige funktionelle Zerstörung des Gens verfolgt.

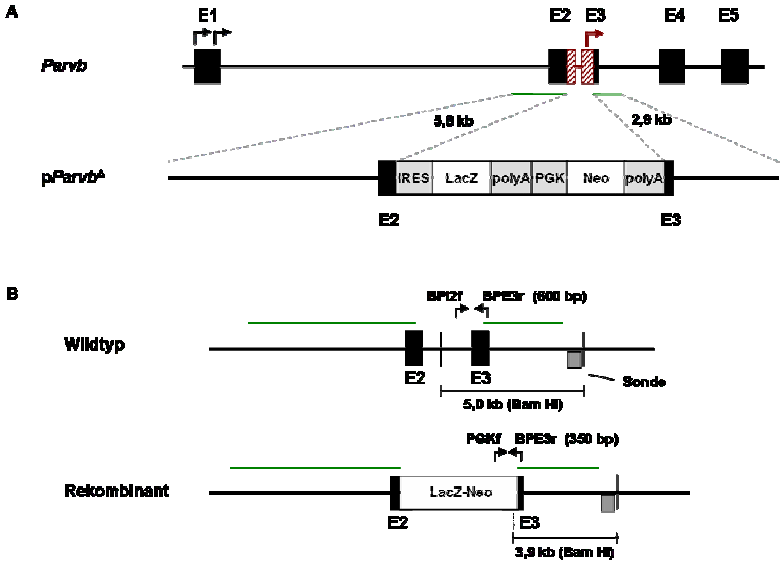
3.3.1 Generierung einer β-Parvin defizienten Mauslinie

Zur funktionalen Analyse von β-Parvin *in vivo* wurde mittels homologer Rekombination in murinen ES-Zellen und anschließender Blastozysteninjektion eine Mauslinie mit konstitutiver Defizienz von β-Parvin hergestellt. Hierfür wurde eine Kassette mit einem β-Galaktosidase Reportergen sowie einem Neomyzin Resistenzgen in das Gen eingeracht. Das Einbringen der Kassette in *Parvb* erfolgte unter gleichzeitiger Einführung einer Deletion von kodierender Sequenz sowie von für Translation und Spleißen von *Parvb*-Transkript wichtigen Elementen. Die für die homologe Rekombination des Deletionskonstruktes verwendete ES-Zelllinie (R1, 129/sv) weist einen anderen genetischen Hintegrund auf, als die für ES-Zell-Injektion und Blastozystentransfer verwendeten Blastozysten bzw. Weibchen (C57Bl/6J). Hochchimäre Männchen, erkennbar an dem Anteil brauner Fellfarbe wurden mit C57Bl/6J-Weibchen zum Erhalt heterozygoter Tiere rückgekreuzt. Diese wurden wiederum zum Erhalt β-Parvin defizienter Tiere untereinander verpaart. Für alle in den folgenden Abschnitten sowie in Abschnitt 3.4 beschriebenen Versuche wurden Tiere mit gemischten genetischen Hintergrund (129/sv und C57Bl/6J) verwendet, soweit nicht anders erwähnt im Alter von 8-12 Wochen.

<u>Deletionsstrategie und Genotypisierung</u>

Wie in Abbildung 1.5.1 dargestellt, weist *Parvb* drei mögliche Translationsinitiationskodons, Methionin-Kodons mit Kozak- oder Kozak-ähnlicher Sequenz auf, zwei in Exon1 und eines zu Beginn von Exon 3. Yamaji et al. (2001) haben gezeigt, dass zumindest im Fall des humanen β-Parvin, Affixin eine Funktionalität aller drei Kodons bei der Translationsinititation wahrscheinlich ist. Wenngleich die für die Deletion verwendete Selektionskassette Poly-Adenylierungssequenzen sowohl hinter dem β-Galaktosidase

Reportergen, wie auch dem Neomyzin Resistenzgen aufweist (Abb. 2.1.4) konnte eine Resttranskription 3´-gelegen von der Kassette grundsätzlich nicht ausgeschlossen werden. Aus diesen Gründen wurde nicht Exon1 als eigentliches Ziel der Deletionsstrategie gewählt. Eine Deletion wichtiger struktureller Elemente des Proteins erschien ebenfalls nicht günstig, da diese zum größten Teil innerhalb der F-Aktin bindenden Domäne und damit relativ weit C-terminal liegen. Die Expression eines relativ langen Restproteins mit eventuell dominant-negativen Funktionen hätte die Folge einer solchen Strategie sein können. Somit wurden Teile von Exon2, das gesamte Intron2 sowie Teile von Exon3 unter Einführung der Selektionskassette deletiert. Diese Deletion beinhaltete neben Spleißdonor bzw. -akzeptor von Exon2 und Exon3 auch das dritte Startkodon (Abb. 3.3.1.1.A, p*Parvb*$^{\Delta}$). Die Wahrscheinlichkeit der Expression eines Restpeptides ausgehend von Exon1 und Teilen von Exon2 sowie eventuelle dominant-negative Funktionen eines solchen Peptides erschienen aufgrund der Kürze von 135 bp kodierender Sequenz bzw. 45 Aminosäuren unwahrscheinlich. Desweiteren hätte ein eventueller, alternativer Spleißvorgang von Exon1 an Exon4 bei Resttranskription 3´-gelegen der Kassette zu einer Leserasterverschiebung geführt (Translationstermination in Exon8). Die Länge der für die Rekombination nötigen homologen Bereiche des p*Parvb*$^{\Delta}$-Konstruktes betrugen 5,8 kb (5´-flankierend) und 2,9 kb (3´-flankierend).



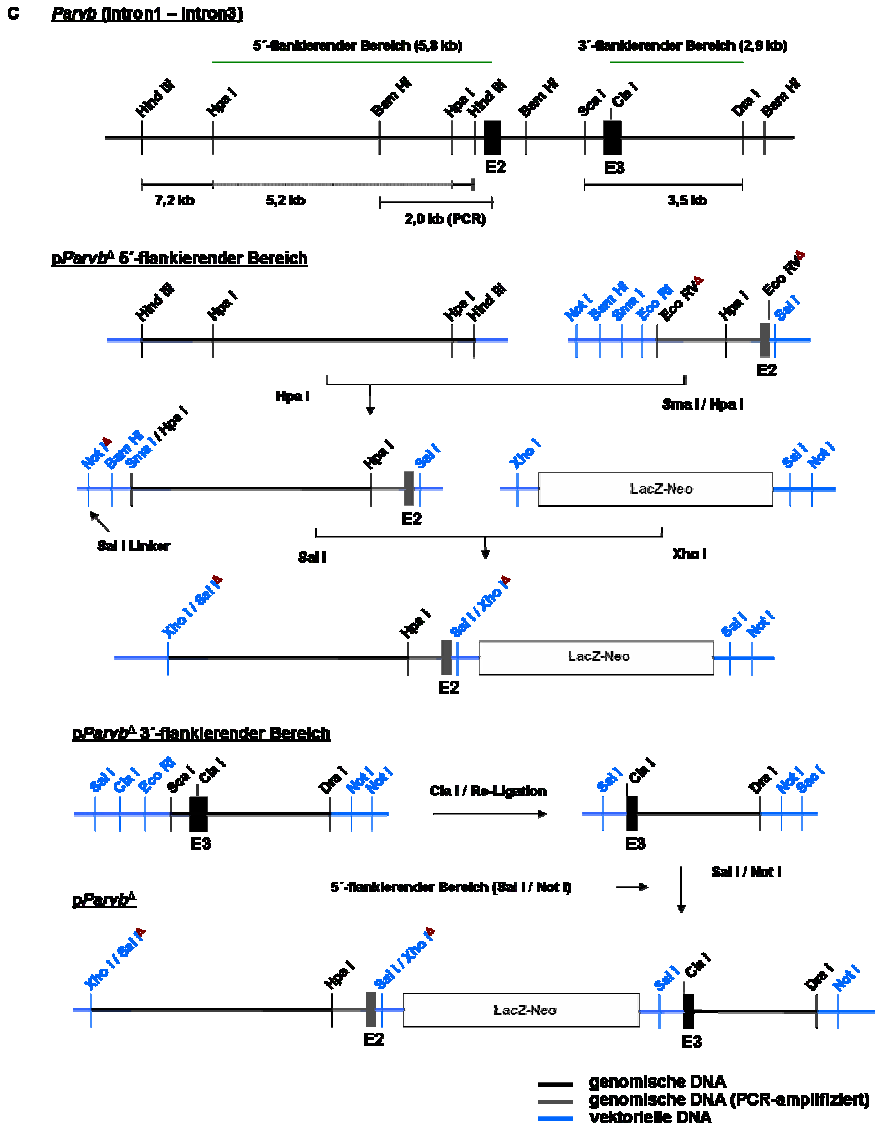


Abb. 3.3.1.1: Strategie zur konstitutiven Zerstörung des β-Parvin-Gens; A: Deletionskonstrukt pParvb$^{\Delta}$, Pfeile: (potentielle) Startkodons, rot: eingeführte Deletion, Kassette: pBS-LacZ-Neo (Abb. 2.1.4); B: Schema zur Genotypisierung von ES-Zellen bzw. Mäusen mittels Southern-blot nach Bam HI-Verdau und Hybridisierung mit externer Sonde (WT: 5,0 kb; Rek.: 3,9 kb) sowie mittels PCR unter simultaner Verwendung der Primer BPI2f, PGKf und BPE3r (WT: 600 bp; Rek.: 350 bp); C: Klonierung von pParvb$^{\Delta}$, 3 Subklone von 7,2 kb (5`-flankierender Arm), 2,0 kb (5´-flankierender Arm, PCR-amplifiziert) und 3,5 kb (3´-flankierender Arm) dienten als Ausgangspunkt für die Klonierung; grün: Homologie-Regionen, Vektor: pBluescript II KS/SK

Die Genotypisierung von ES-Zell-Klonen nach p*Parvb*$^{\Delta}$-Elektroporation und Neomyzin-Selektion (vgl. 2.2.3) bzw. von Mäusen der *Parvb*-Linie mittels Southern-blot wurde unter Bam HI-Restriktion der genomischen DNA durchgeführt. Wie in Abbildung 3.3.1.1.B dargestellt, wurde die endogene in Intron2 lokalisierte Bam HI-Erkennungssequenz deletiert und durch eine in der Kassette liegende, neu eingeführte Sequenz ersetzt. Dies ermöglichte die Detektion eines 5,0 kb großen Fragmentes bei einem Wildtyp-Allel und eines 3,9 kb großen Fragmentes bei rekombinantem Allel mit Hilfe der 3´-gelegenen, Homologie-externen

Sonde. Die PCR-basierte Genotypisierung von Mäusen der *Parvb*-Linie erfolgte unter simultanem Einsatz von 3 Primern. Die genomische Erkennungssequenz des BPI2f-Primers zur Amplifikation von wildtypischer DNA wurde mit der Deletion entfernt. Für das rekombinante Allel wurde der PGKf-Primer mit Bindung in der Kassette, nahe an deren 3´-Ende genutzt. Die gleichzeitige Verwendung beider Primer mit dem BPE3r-Primer, dessen Bindungsstelle in Exon3 außerhalb der Deletion lag führte zur Amplifikation eines ca. 600 bp langen wildtypischen bzw. eines ca. 350 bp langen rekombinanten Fragmentes in einer Reaktion.

Die Klonierung des p*Parvb*$^{\Delta}$-Konstruktes erfolge ausgehend von drei Subklonen genomischer DNA (Abb. 3.3.1.1.C). Diese beinhalteten ein 7,2 kb großes 5´-gelegenes Hind III-Fragment und ein 2,0 kb großes PCR-amplifiziertes Fragment zur Generierung des 5´-flankierenden Bereiches sowie ein 3,5 kb großes Sca I/Dra I-Fragment für den 3´-flankierenden Bereich. Die PCR-Amplifikation der 3´ der zweiten Hpa I Schnittstelle gelegenen Sequenz von Intron1 sowie des nicht deletierten Bereiches von Exon2 erfolgte aufgrund mangelnder Restriktionsstellen in Exon2. Zur Klonierung des 5´-flankierenden Bereiches wurden zunächst ein 5,2 kb großes Hpa I-Fragment des Hind III-Subklons und ein Teil des PCR-generierten Fragments von Intron1 und Exon2 (Sma I/Hpa I) unter Ligation stumpfer Enden fusioniert. Nach Einführung eines Sal I-Linkers und Sal I-Verdau wurde der 5´-flankierende Bereich mit dem 5´-Ende der Selektionskassette fusioniert (Xho I). Die Generierung des 3´-flankierenden Bereiches erfolgte unter Cla I-Verdau und Re-Ligation des 3,5 kb großen Sca I/Dra I-Subklons. Aufgrund der Sensitivität des Cla I-Enzyms gegen Dcm/Dam-Methylierung wurde dieser zuvor in nicht-methylierende JCM110-Bakterien des *Escherichia coli* Stammes kloniert. Anschließend wurde der 3´-flankierende Bereich nach Sal I/Not I-Verdau mit dem 3´-Ende der Selektionskassette im 5´-flankierenden Fragment fusioniert. Sämtliche Klonierungsschritte wurden durch Restriktionsverdau, bei PCR-Amplifikation und Ligation stumpfer Enden sowie nach finaler Ligation weiterhin durch Sequenzierung (Service-Einheit des Max-Planck-Institutes für Biochemie) kontrolliert.

Deletion von *Parvb*

Das *Parvb*$^{\Delta}$-Allel wurde über homologe Rekombination in murine R1-ES-Zellen eingebracht. Hierzu wurde das p*Parvb*$^{\Delta}$-Konstrukt mit Not I linearisiert (Abb. 3.3.1.1.C) und in R1-Zellen elektroporiert. Anschließend wurde über einen Zeitraum von 6 Tagen mit Neomyzin selektioniert. 360 der herangewachsenen ES-Zellklone wurden isoliert und auf 24-Well Platten expandiert. Eine Hälfte der Zellen jedes Klones wurde eingefroren, die andere Hälfte

wurde weiter expandiert. Die DNA der expandierten ES-Zell-Klone wurde isoliert und mittels Southern-blot nach Bam HI-Verdau auf homologe Rekombination des *Parvb*$^{\Delta}$-Allels untersucht. Anschließend wurden einige homolog-rekombinanten ES-Zell-Klone wieder in Kultur genommen. Nach dreitägiger Expansion wurden die ES-Zellen in C57Bl/6J-Blastozysten (E3.5) injiziert, die scheinschwangeren C57Bl/6J-Weibchen implantiert wurden. Der genetische Hintergrund der R1-ES-Zelllinie (129/sv) ermöglichte die Erkennung hochchimärer Männchen anhand der braunen Fellfarbe. Diese wurden mit C57Bl/6J-Weibchen verpaart. Heterozygote Tiere unter den Nachkommen zeigten die Keimbahninsertion der ES-Zellen in den entsprechenden chimären Männchen an. Die heterozygoten Nachkommen verschiedener Chimären wurden zum Erhalt homozygoter Tiere für Analysezwecke miteinander verpaart. Die Deletion von *Parvb* bzw. β-Parvin *in vivo* wurde mittels Southern-blot bzw. PCR verfolgt.

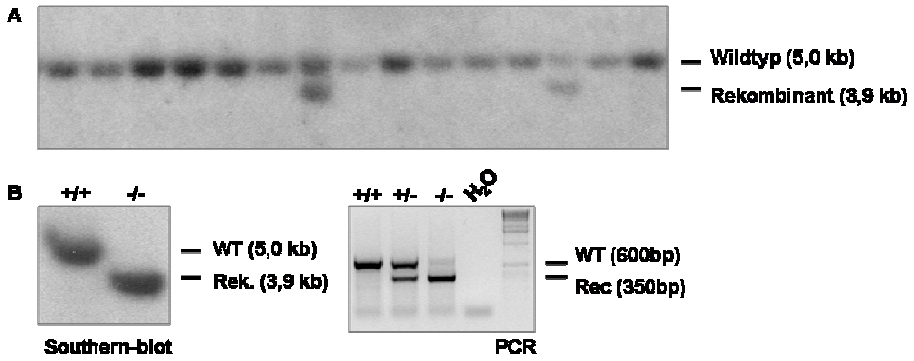


Abb. 3.3.1.2: Durchführung der Deletion von Parvb; A: Repräsentativer Southern-blot von 15 ES-Zellklonen nach pParvb$^{\Delta}$-Elektroporation und Neomyzin-Selektion, homolog-rekombinante Klone in den Spuren 7 und 13, Expositionszeit: 6 Tage; B: Repäsentative Darstellung der Genotypisierung von Mäusen von der aus homolog-rekombinanten ES-Zellklonen generierten β-Parvin-Linie mittels Soutern-blot (links) und PCR (rechts)

In 12 von 360 isolierten Klonen konnten nach Southern-blot mit Bam HI-Verdau Signale mit einer Größe von ca. 4 kb detektiert werden, etwas unterhalb der Wildtyp-Signale von ca. 5 kb wie sie in allen 360 untersuchten Klonen zu sehen waren. Dies entsprach einer Rekombinationseffizienz von 3,3%. Abbildung 3.3.1.2.A zeigt exemplarisch die Southern-blot Analyse von 15 ES-Zell-Klonen, von denen zwei als homolog-rekombinant identifiziert wurden (Spuren 7 und 13). Aus der Injektion von insgesamt 3 homolog-rekombinanten ES-Zell-Klonen gingen hochchimäre Männchen hervor, die weiter verpaart wurden. Die Verpaarungen erfolgten innerhalb jedes Klons, um klonal bedingte Unterschiede möglicher Phänotypen ausschließen zu können. Abbildung 3.3.1.2.B zeigt repräsentativ die Genotypisierung von Mäusen, die zu Beginn parallel mittels Southern-blot und PCR durchgeführt wurde. Die Southern-blots von genomischer DNA, isoliert aus den

Schwanzspitzen der Tiere (vgl. 2.2.3) zeigten die erwarteten Fragmente bei ca. 5 kb (5,0 kb, Wildtyp) bzw. ca. 4 kb (3,9 kb, rekombinant). Die PCR-basierte Genotypisierung zeigte die erwarteten Fragmente von 600 bp (Wildtyp) bzw. 350 bp (rekombinant). Abweichungen zwischen Southern-blot und PCR wurden nicht beobachtet.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die *in vitro* in *Parvb* eingeführte Deletion des dritten Startkodons sowie angrenzender kodierender Sequenzen und des Spleißdonor-/-akzeptorpaars von Exon2/3 über homologe Rekombination in ES-Zellen und die anschließende Blastozysteninjektion erfolgreich in die Keimbahn der Mäuse eingebracht wurde.

3.3.2 β-Parvin defiziente Mäuse zeigten keinen offensichtlichen Phänotyp

Um eine eventuelle Letalität der β-Parvin-Defizienz ausschließen zu können, wurde zunächst überprüft, ob die *Parvb*-Genotypen der Nachkommen von $Parvb^{+/-}$ x $Parvb^{+/-}$-Verpaarungen der erwarteten Mendelschen Verteilung entsprach. Anschließend wurden β-Parvin-defiziente adulte Tiere sowie Embryonen (E9.5) äußerlich bzw. makroskopisch untersucht. Desweiteren wurde überprüft, ob die in *Parvb* eingeführte Deletion wie erwartet zu einem Verlust von β-Parvin-Protein geführt hatte. Zur Überprüfung der Fertilität wurden Verpaarungen β-Parvin-defizienter Tiere durchgeführt.

Tabelle 3.3.2 zeigt die Genotyp-Verteilung von insgesamt 340 Tieren, weiter aufgeschlüsselt nach dem Geschlecht. Die geschlechtsunabhängige Verteilung bei 8-12 Wochen alten Tieren betrug 24,4% ($Parvb^{+/+}$), 53,8% ($Parvb^{+/-}$) und 21,8% ($Parvb^{-/-}$) und entsprach damit einer Mendelschen Verteilung. Auch das Verhältnis von Männchen zu Weibchen zeigte mit 53,2% zu 46,8% keine auffällige Abweichung. Die Genotypverteilung unter den Männchen betrug 21,5%, 54,7% und 23,8%, unter den Weibchen 27,7%, 52,8% und 19,5% ($Parvb^{+/+}$, $Parvb^{+/-}$ und $Parvb^{-/-}$). Lediglich Parvin-defiziente Weibchen (19,5%) zeigten einen etwas niedrigen Wert, der jedoch nicht auf eine Letalität der Tiere hindeutete.

Tab. 3.3.2: Verteilung der Parvb-Genotypen in der Nachkommenschaft (F1) aus Verpaarungen von $Parvb^{+/-}$-Tieren

	Total	$Parvb^{+/+}$	$Parvb^{+/-}$	$Parvb^{-/-}$
Total	340	83 (24%)	183 (54%)	74 (22%)
♂	181	39 (21%)	99 (55%)	43 (24%)
♀	159	44 (28%)	84 (53%)	31 (19%)

Abbildung 3.3.2.1.A zeigt repräsentativ eine Fotografie adulter Wildtyp- und β-Parvin-defizienter Tiere im Alter von 11 Wochen. Physische oder auch Verhaltensauffälligkeiten wurden bei den Tieren nicht beobachtet. Zur Überprüfung des Verlustes von β-Parvin wurden mittels Northern- bzw. Western-blot RNA-Präparationen von Herzen bzw. Protein-Lysate der Milz auf die Präsenz von *Parvb*-Transkript bzw. β-Parvin-Protein getestet. Wie in Abbildung 3.3.2.1.B zu sehen konnte in der RNA-Präparation von Parvb$^{-/-}$-Herz kein *Parvb*-Transkript detektiert werden. Auch die Western-blot Analyse von Milz-Lysat zeigte einen vollständigen Verlust der β-Parvin-spezifischen Bande bei ca. 45 kDa. Somit resultierte die eingeführte Deletion in der vollständigen Defizienz von β-Parvin *in vivo*. Verpaarungen von β-Parvin defizienten Tieren untereinander führten zu Nachkommenschaft (sämtlich negativ getestet für *Parvb*), was Fertilität auch unter β-Parvin-Defizienz zeigte. Die langzeitige Beobachtung einiger weniger Tiere (3 Paare *Parvb*$^{+/+}$/*Parvb*$^{-/-}$), die nicht zu Analysezwecken getötet worden waren, ergab bis zum Eintritt des natürlichen Todes keine Hinweise auf eine gegenüber dem Wildtyp verkürzte Lebenszeitspanne der β-Parvin-defizienten Tiere.

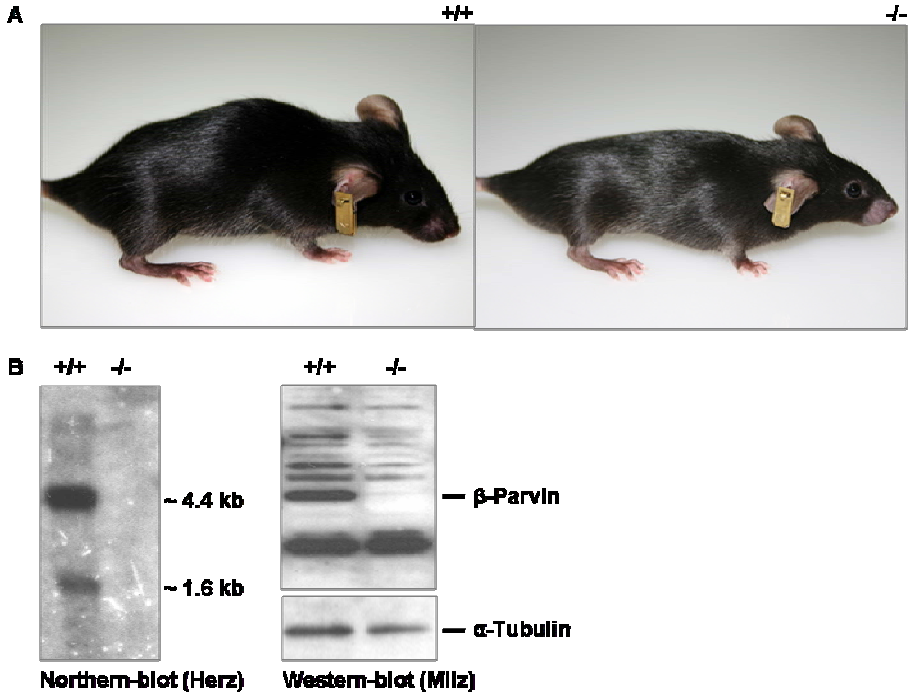


Abb. 3.3.2.1: Äußerliche Erscheinung von Parvb$^{-/-}$-Mäusen und Bestätigung der Parvb/β-Parvin-Depletion; A: Repräsentative Fotografie adulter Tiere (Weibchen) im Alter von 11 Wochen; B: Überprüfung des Verlustes von Parvb-Transkript und β-Parvin-Protein in Parvb$^{-/-}$-Tieren mittels Northern-blot von Herz-Lysaten (links) bzw. Western-blot von Milz-Lysaten (rechts)

Weiterhin wurde das Körpergewicht-bezogene, relative Gewicht verschiedener β-Parvin exprimierender Organe in adulten *Parvb*$^{+/+}$- und *Parvb*$^{-/-}$-Tieren (8-12 Wochen) verglichen (Abb. 3.3.2.2). Diese Versuche erfolgten insbesondere im Hinblick auf einen möglicherweise

veränderten Herz-Körper-Index, wie es für ILK-defiziente Herzen beschrieben wurde (White et al., 2006). Mit Werten von 6,26 +/- 0,52 mg/g (*Parvb*$^{+/+}$) und 7,12 +/- 0,78 mg/g (*Parvb*$^{-/-}$) war jedoch keine signifikante Änderung des Herz-Körper-Indexes zu beobachten. Auch die relativen Gewichte der anderen hier untersuchten Organe zeigten keine signifikante Änderung (Lunge: 4,98 +/- 1,01 mg/g (*Parvb*$^{+/+}$) und 4,45 +/- 0,93 mg/g (*Parvb*$^{-/-}$); Milz: 2,51 +/- 0,55 mg/g (*Parvb*$^{+/+}$) und 3,36 +/- 0,77 mg/g (*Parvb*$^{-/-}$); Leber: 40,83 +/- 8,36 mg/g (*Parvb*$^{+/+}$) und 38,76 +/- 7,87 mg/g (*Parvb*$^{-/-}$); Niere: 5,3 +/- 1,11 mg/g (*Parvb*$^{+/+}$) und 5,48 +/- 1,15 mg/g (*Parvb*$^{-/-}$)).

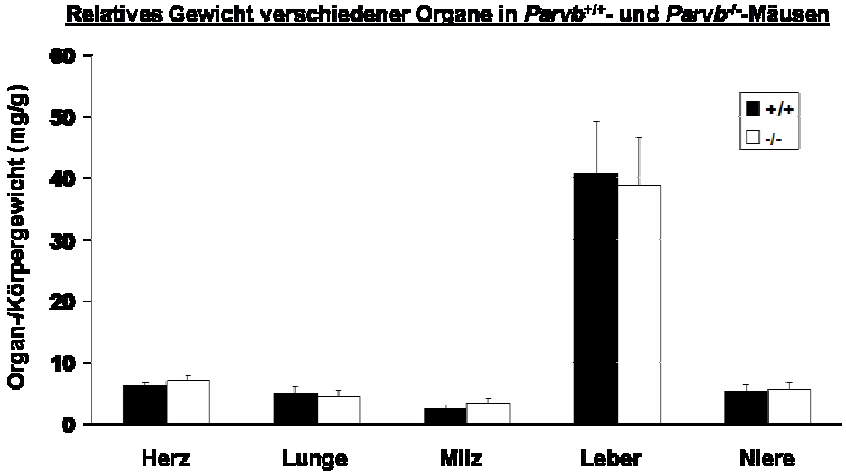


Abb. 3.3.2.2: Gewichte verschiedener, β-Parvin exprimierender Organe im Verhältnis zum Gesamtkörpergewicht in Wildtyp- und β-Parvin-defizienten, adulten Tieren unterschiedlichen Geschlechts (8-12 Wochen), n=12 (je 6 ♂ und 6 ♀), Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung

Abbildung 3.3.2.3.A zeigt repräsentativ zwei *Parvb*$^{+/+}$- bzw. *Parvb*$^{-/-}$-Embryos (E9.5). Äußerliche Auffälligkeiten wie etwa konsistente Größenunterschiede zwischen Wildtyp- und *Parvb*$^{-/-}$-Embryonen oder offensichtliche Entwicklungsdefekte der *Parvb*$^{-/-}$-Embryonen konnten auch hier nicht beobachtet werden (Abb. 3.3.2.3.B).

Es kann festgehalten werden, dass die in *Parvb* eingeführte Deletion zu einem Verlust von *Parvb*-Transkript bzw. zu einem vollständigen Verlust von β-Parvin Protein *in vivo* führte. Eine erste Begutachtung β-Parvin-defizienter Mäuse zeigte keinen offensichtlichen Phänotyp. Die Tiere waren vital, fertil und zeigten eine normale Lebenszeitspanne. Äußerliche Auffälligkeiten wurden weder an E9.5 noch postnatal beobachtet, sowie auch keine Verhaltensauffälligkeiten festgestellt wurden. Das relative Gewicht verschiedener β-Parvin exprimierender Organe war nicht signifikant verändert.

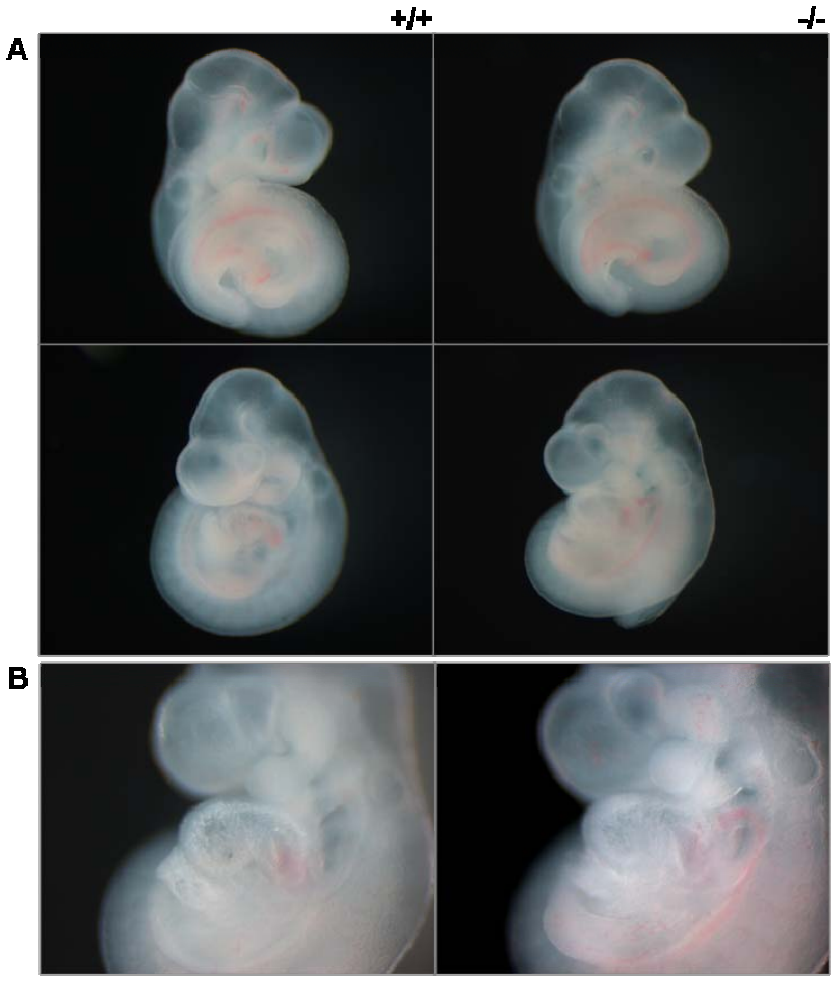


Abb. 3.3.2.3: Äußerliche Erscheinung β-Parvin-defizienter Embryonen an E9.5; A: Rechtsseitige (oben) und linksseitige (unten) Übersichtsdarstellung verschiedener Embryonen im Dunkelfeld; B: Vergrößerung der linksseitigen Darstellung mit Ansicht des Herzens; Genotypisierung anhand von Dottersackgewebe

3.3.3 Morphologisch/histologische Analysen

Dem Expressionsmuster von β-Parvin (vgl. 3.2) entsprechend wurden verschiedene adulte Organe auf ihre Gewebestruktur hin untersucht. Hierzu wurden Paraffin- bzw. Kryoschnitte von Herz, Skelettmuskel, Milz, Lunge, Niere und Leber mittels Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Weiterhin wurden β-Parvin defiziente Herzen mittels Azan-Färbung auf ihren Bindegewebsanteil, in der Transmissionselektronenmikroskopie auf die Ultrastruktur linksventrikulärer Kardiomyozyten sowie mittels Immunfluoreszenzfärbungen auf die Lokalisation β-Parvin assoziierter Proteine hin untersucht. Desweiteren wurde ein möglicher Einfluss des β-Parvin-Verlustes auf die Embryonalentwicklung des Nervensystems analysiert. Hierzu wurden Embryonen (E9.5) mittels „Whole-mount“ Immunfärbung gegen den neuronalen Marker Neurofilament 160 gefärbt.

Herz

Abbildung 3.3.3.1.A zeigt wildtypische bzw. β-Parvin defiziente Herzen im Frontal- bzw. Transversal-Schnitt bei niedriger Vergößerung. Konsistente Veränderungen in der Morphologie β-Parvin defizienter Herzen wurden nicht beobachtet. Die Untersuchungen erfolgten unter besonderem Augenmerk auf eventuelle Veränderungen der Dicke der linken Ventrikelwand, wie für ILK-defiziente Herzen beschrieben (White et al., 2006). Eine solche Veränderung konnte unter β-Parvin Defizienz jedoch nicht beobachtet werden. Ebenso zeigten weder Septum, rechter Ventrikel noch der atriale Teil des Herzen auffällige morphologische Veränderungen. Eine Charakterisierung des Ausflusstraktes wurde nicht vorgenommen. Die Betrachtung linksventrikulärer Kardiomyozyten zeigte ebenfalls keine Auffälligkeiten (Abb. 3.3.3.1.B).

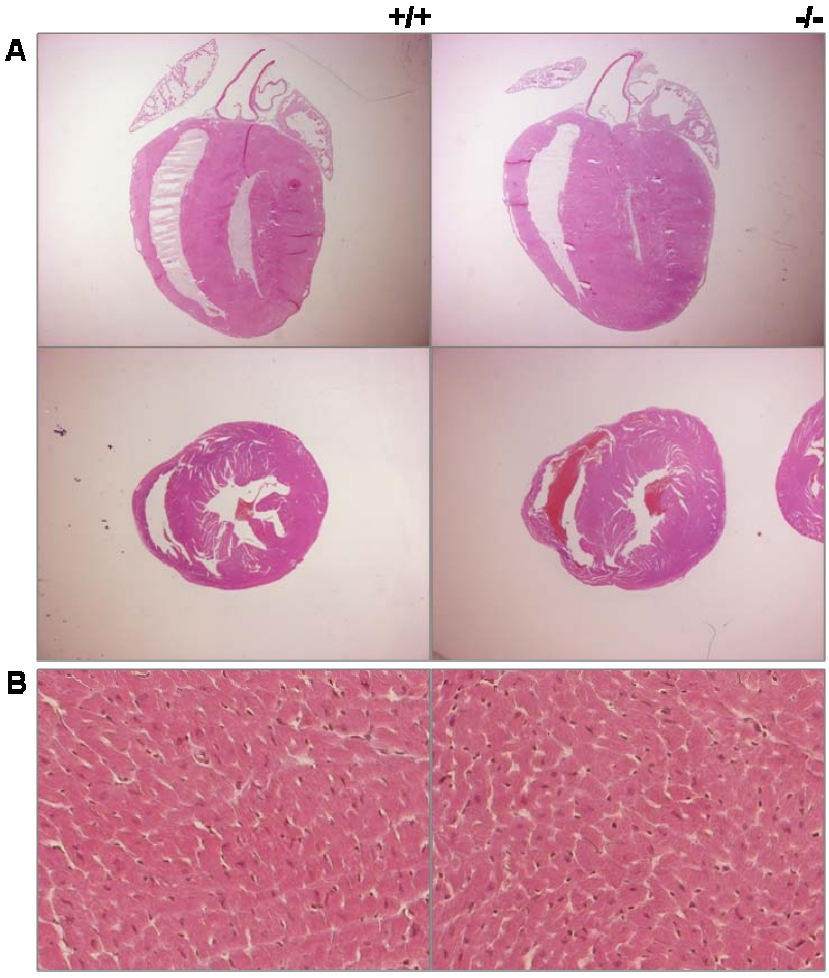


Abb. 3.3.3.1: Morphologie von Wildtyp- und β-Parvin-defizienten Herzen und linksventrikulären Kardiomyozyten; A: Frontal- (oben) und Transversal-Schnitte (unten) nach Hämatoxylin-Eosin- (HE) Färbung bei niedriger Vergrößerung (1,5x); B: Linksventrikuläre Kardiomyozyten nach HE-Färbung, 20x; Schnitte: 8 µm, Paraffin

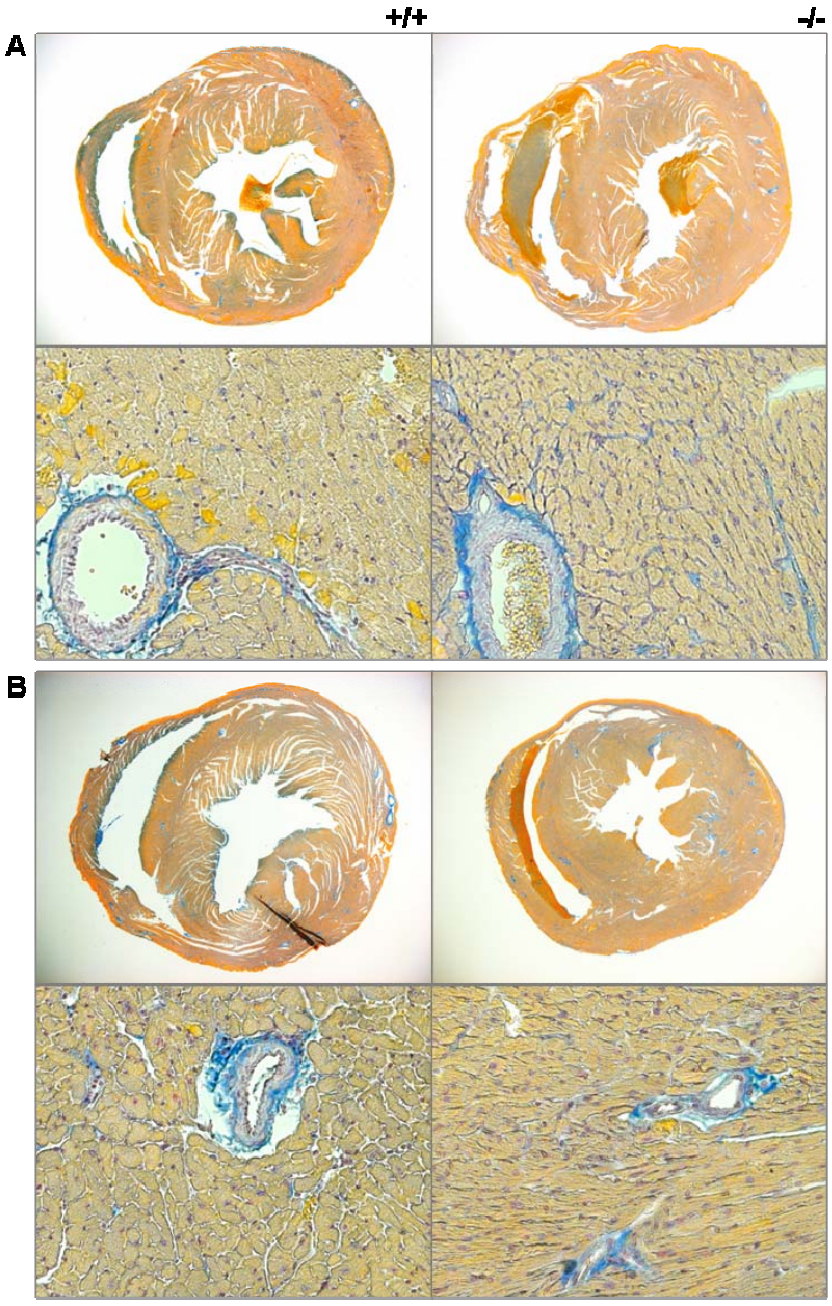


Abb. 3.3.3.2: Darstellung des Bindgewebes in Wildtyp und β-Parvin-defizienten Herzen junger und älterer Tiere; A: Transversalschnitte von Herzen 10 Wochen alter Tiere in der Übersicht (1,8x, oben) und bei höherer Vergrößerung (20x, unten) nach Azanfärbung; B: Transversalschnitte von Herzen 10 Monate alter Tiere in der Übersicht (1,8x, oben) und bei höherer Vergrößerung (20x, unten) nach Azanfärbung; Zytoplasma, Muskel: bräunlich-gelb, Kerne: violett-schwarz, Bindegewebe: blau

Die von White et al. (2006) durch ILK-Defizienz im Herzen induzierte, dilatative Kardiomyopathie zeigt weiterhin eine deutliche Zunahme des Bindegewebsanteils im Myokard. Daher wurde mittels Azan-Färbung das Bindegewebe von Herzen 8-12 Wochen

alter sowie älterer (10 Monate) β-Parvin-defizienter Tiere dargestellt. Wie die Abbildungen 3.3.3.2.A und 3.3.3.2.B in der Übersicht zeigen, konnte weder bei jungen adulten, noch älteren Tieren eine großflächige Zunahme des blau eingefärbten Bindegewebes beobachtet werden. Höhere Vergrößerungen aus dem Bereich des linken Ventrikels zeigten die ausgeprägte Assoziation von Bindegewebe mit Gefäßen sowie schwächer zwischen den Kardiomyozyten. Konsistente Veränderungen wurden hier für junge wie auch ältere β-Parvin-defiziente Tiere jedoch nicht beobachtet.

Im nächsten Schritt wurden β-Parvin defiziente Herzen mittels Transmissionselektronenmikroskopie auf ultrastrukturelle Veränderungen untersucht. Diese Versuche wurden in Kooperation mit der Abteilung für zelluläre und molekulare Sportmedizin unter Leitung von Prof. Dr. med W. Bloch an der Deutschen Sporthochschule Köln durchgeführt. Wie in Abbildung 3.3.3.3.A (20000x) zu sehen, zeigte β-Parvin-defizienter, linksventrikulärer Herzmuskel eine im Vergleich zum Wildtyp unauffällige Sarkomerstruktur. Die Betrachtung bei niedrigerer Vergrößerung (3000x, Abb. 3.3.3.3) ergab zudem keine Hinweise auf einen verstärkten Abbau bzw. eine Degradation von Myofibrillen, wie etwa gehäuft Veränderungen des Membransystems oder eine Aggregation von Mitochondrien.

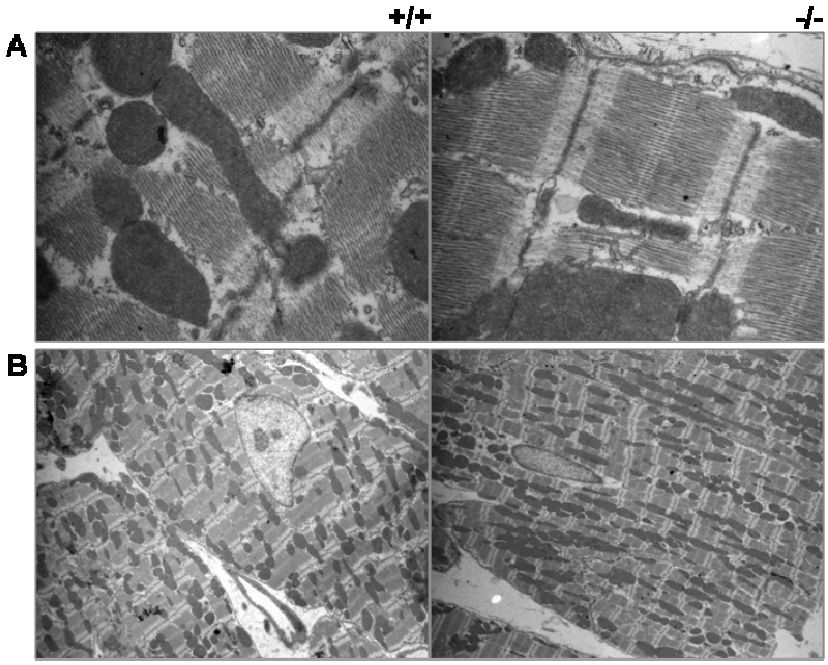


Abb. 3.3.3.3: Ultrastruktur von Wildtyp- und β-Parvin-defizientem, linksventrikulärem Herzmuskelgewebe im Transmissions-Elektronenmikroskop; A: Sarkomerstruktur, 20000x; B: Verteilung von Mitochondrien, 3000x

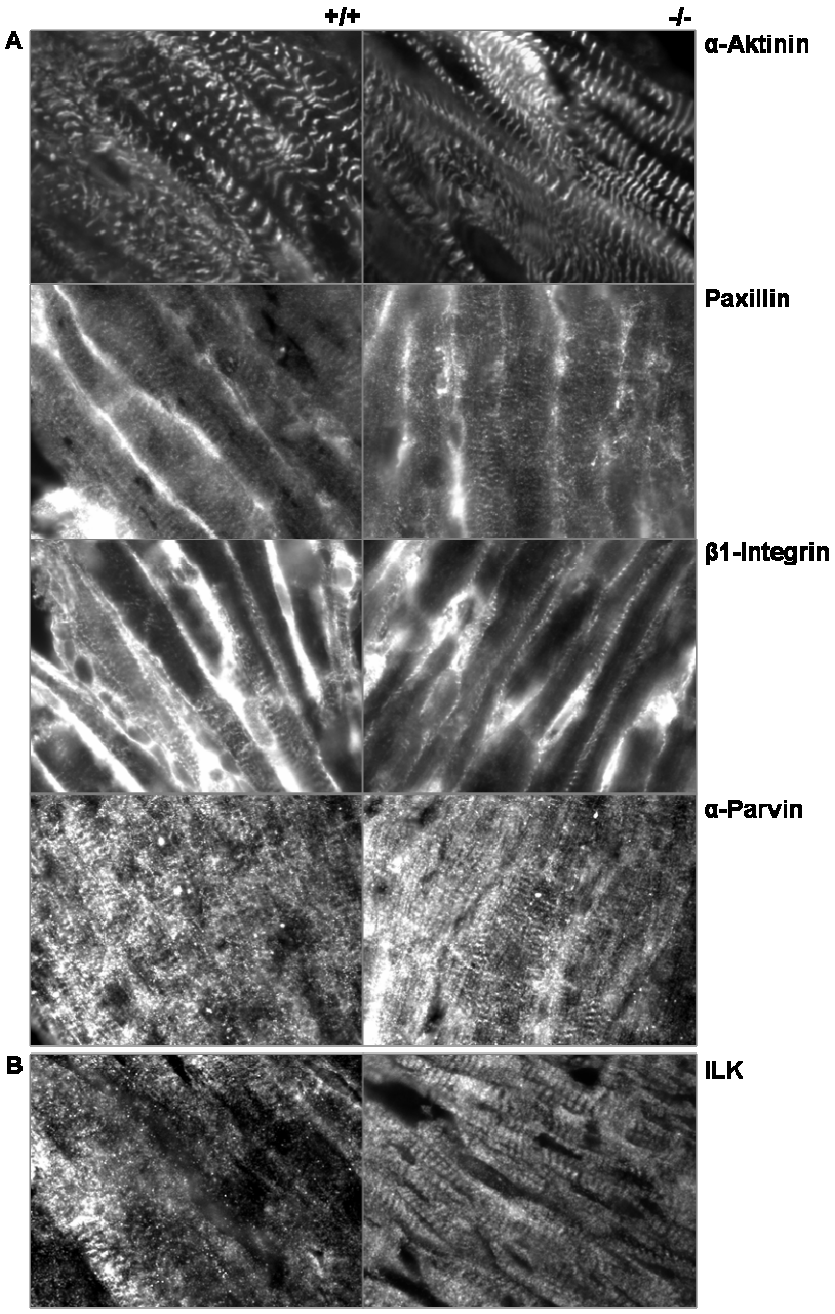


Abb. 3.3.3.4: Subzelluläre Lokalisation von β-Parvin-bindenden und -assoziierten Proteinen in linksventrikulärem Herzmuskel unter β-Parvin-Defizienz, Immunfluoreszenzfärbung von Kryoschnitten (8 µm) longitudinal geschnittener Kardiomyozyten; A: α-Aktinin, Paxillin, β1-Integrin, α-Parvin; B: ILK; Vergrößerung: 100x, Sekundärantikörper: cy3

Um einen möglichen Einfluss des β-Parvin-Verlustes auf die subzelluläre Lokalisation von Bindungspartnern bzw. assoziierten Proteinen zu untersuchen, wurden Kryoschnitte von Wildtyp und β-Parvin-defizienten Herzen für verschiedene Proteine immunfluoreszenzgefärbt. Hierfür wurden das als β-Parvin Bindungspartner beschriebene, Z-Scheiben markierende Protein α-Aktinin, der α-Parvin Bindungspartner Paxillin, α-Parvin

selbst, das ILK-bindende β1-Integrin sowie als direkter β-Parvin-Bindungspartner ILK gewählt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.3.3.4 zusammengestellt. Wie in Abbildung 3.3.3.4.A zu sehen, zeigte die α-Aktinin-Färbung unter β-Parvin-Defizienz ein im Vergleich zum Wildtyp unvermindert starkes, scharf abgegrenztes Fluoreszenzsignal was nicht auf eine Veränderung der α-Aktinin-Lokalisation oder gar auf eine Veränderung der Z-Banden-Struktur deutete. Die Paxillin- sowie β1 Integrin-Färbungen zeigten im Wildtyp und unverändert im β-Parvin-defizienten Gewebe eine für Fokalkontaktproteine zu erwartende Querstreifung mit verstärktem Signal in subsarkolemmalen Bereichen. Die Färbungen von α-Parvin zeigten ein sehr ähnliches Muster, jedoch mit stärkerer Hintergrundfärbung und weniger klar erkennbarer Signalzunahme im Bereich des Sarkolemmas. Ein verändertes Fluoreszenzmuster bei Verlust von β-Parvin wurde auch hier nicht beobachtet. Ein derartiges Fluoreszenzmuster wäre auch für ILK zu erwarten gewesen, konnte jedoch weder im Wildtyp noch unter β-Parvin-Defizienz beobachtet werden. Stattdessen zeigte die ILK-Färbung eine schwächer kondensierte Fluoreszenz mit breiterem Bandenmuster ohne Verstärkung im Bereich des Sarkolemmas (Abb. 3.3.3.4.B). Die Spezifität der ILK-Färbung ist daher fraglich. Färbungen mit anderen ILK-Antikörpern gaben keinen weiteren Aufschluss. Unterschiede zwischen Wildtyp und β-Parvin-Defizienz wurden jedoch auch hier nicht beobachtet.

Skelettmuskel

Aufgrund der relativ starken Expression von β-Parvin im Skelettmuskel wurden initiale Analysen an Kryoschnitten des *Vastus lateralis* Muskels durchgeführt. Hierfür wurden die Schnitte HE- bzw. für α-Aktinin und α-Parvin immungefärbt (Abb. 3.3.3.5). Die Analyse des Muskelgewebes nach HE-Färbung von Quer- bzw. Längsschnitten lieferte keine Anzeichen für Veränderungen der Muskelfaserdicke, etwa eine konsistente Ab- oder Zunahme oder eine hohe Zahl dünner Fasern, als Zeichen eines eventuellen kompensatorischen Muskelumbaus. Dementsprechend wurden zentralständige Zellkerne, als Zeichen von stattfindender De- bzw. Regeneration des Gewebes im β-Parvin-defizienten Muskel wie im Wildtyp nicht in auffälligem Maße beobachtet (Abb. 3.3.3.5.A). Die Immunfärbungen von α-Aktinin und α-Parvin lieferten wie bereits im Herzen kein verändertes Bild unter β-Parvin-Defizienz (Abb. 3.3.3.5.B). Analysen der Muskel-Sehnen-Verbindung standen zum Zeitpunkt der Einreichung der Arbeit noch aus.

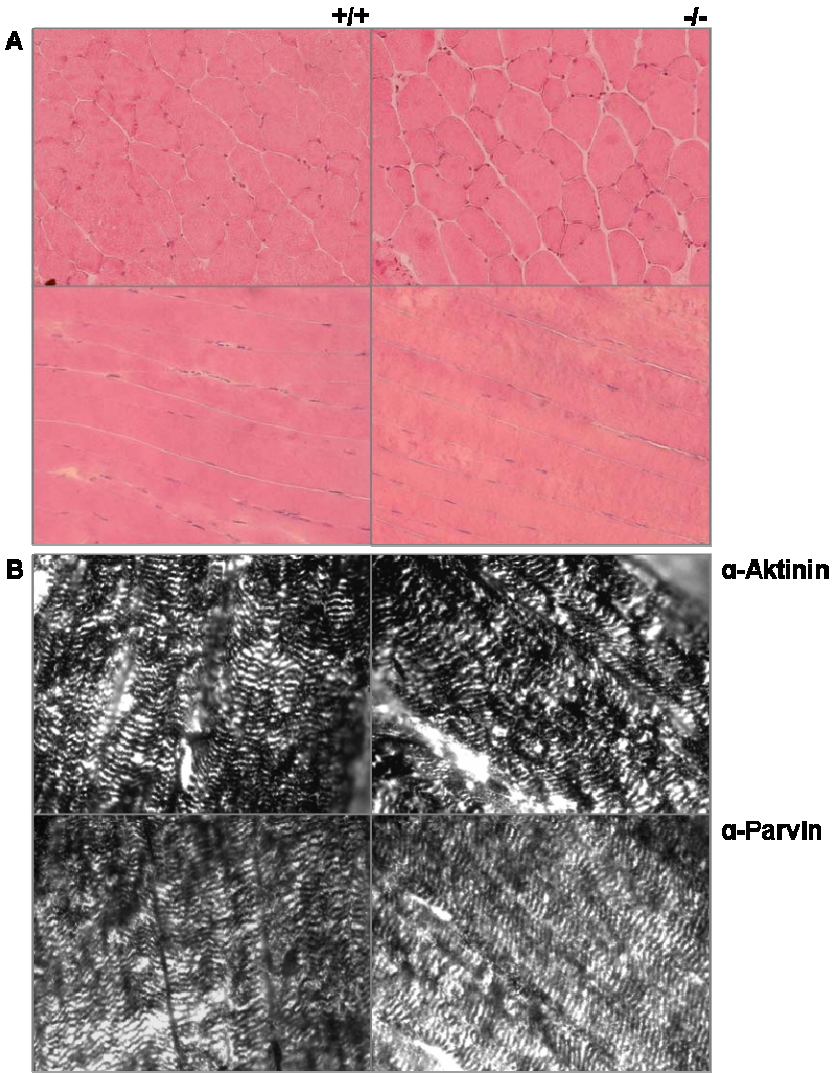


Abb. 3.3.3.5: Untersuchung von Vastus lateralis-Gewebe mittels HE- und Immunfluoreszenzfärbung, Kryoschnitte (8 µm); A: Quer- (oben) bzw- Längsschnitte (unten) nach HE-Färbung, Vergrößerung: 20x; B: Längsschnitte nach Immunfluorsezenzfärbung gegen α-Aktinin und α-Parvin, Vergrößerung: 63x, Sekundärantikörper: cy3

Niere, Lunge, Leber, Milz

Es wurden Paraffin-Schnitte von weiteren Organen mit deutlicher Expression von β-Parvin HE-gefärbt und vergleichend untersucht. Hierzu gehörten Niere, Lunge, Leber und Milz. Abbildung 3.3.3.6 zeigt repräsentativ Färbungen der verschiedenen Gewebe. In keinem der Organe wurden auffällige Unterschiede in der Gewebestruktur festgestellt. Färbungen der Niere zeigten eine normale Gliederung in Kortex und Medulla mit vergleichbarer Zahl von Glomeruli im Kortex sowie unverändert wirkender tubulärer Organisation der Medulla (Abb. 3.3.3.6.A). Die Untersuchung von Lungenschnitten zeigte keine auffällige Veränderung etwa der Größe der Alveolen sowie deren septaler Organisation (Abb. 3.3.3.6.B). Bronchiolen sowie Blutgefäße erschienen ebenfalls unauffällig. Die Struktur β-Parvin-defizienten

Lebergewebes zeigte auch keine auffälligen Veränderungen (Abb. 3.3.3.6.C). Weiterhin zeigten Schnitte von Wildtyp und β-Parvin-defizienter Milz eine vergleichbare Organisation von weißer und roter Pulpa (Abb. 3.3.3.6.D).

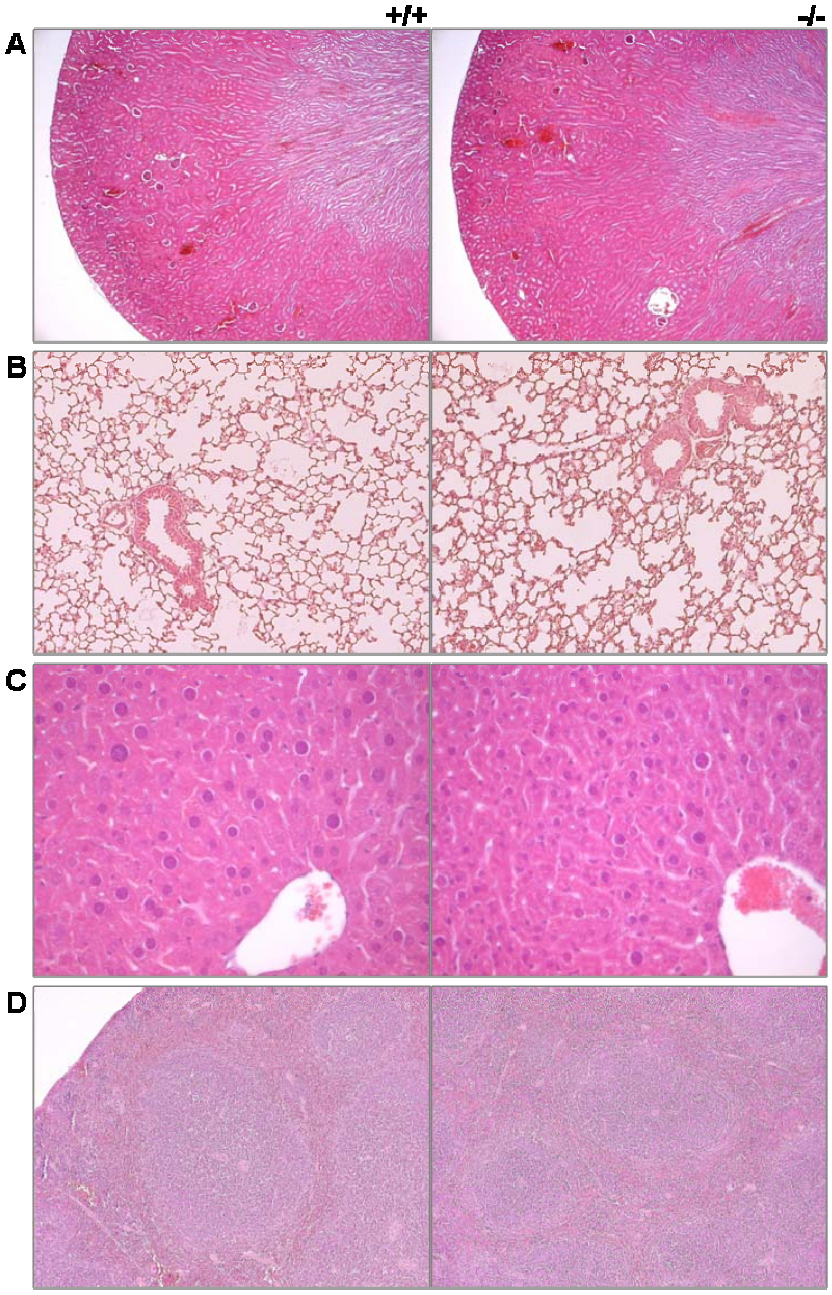


Abb. 3.3.3.6: Struktur verschiedener β-Parvin exprimierender Gewebe unter Wildtyp- bzw, β-Parvin-defizienten Bedingungen nach HE-Färbung; A: Niere, 5x: B: Lunge, 10x; C: Leber, 20x; D: Milz, 10x; Schnitte: Paraffin, 8 µm

Nervensystem

Aufgrund der starken Expression von β-Parvin in verschiedenen Kranial- sowie den dorsalen Wurzelganglien während der Embryonalentwicklung (vgl. Abb. 3.2.1.1., 3.2.1.2.H-J) wurde

die Entwicklung des Nervensystems zum Zeitpunkt E9.5 untersucht. Dies wurde mittels „Whole-mount“ Immunfärbungen von Embryonen mit dem neuronalen Marker Neurofilament 160 durchgeführt. Abbildung 3.3.3.7 zeigt verschiedene neuronale Strukturen nach Neurofilament 160-Färbung von Embryonen an E9.5. Wie in Abbildung 3.3.3.7.A im Wildtyp zu sehen, konnten mit der Färbung sowohl Kranialganglien wie auch dorsale Wurzelganglien angefärbt werden. Der Vergleich β-Parvin defizienter mit Wildtyp-Embryonen zeigte, dass die Kranialganglien an E9.5 in vergleichbarem Maße ausgebildet waren. Auch die dorsalen Wurzelganglien erschienen unter β-Parvin-Defizienz dem Wildtyp vergleichbar ausgebildet (Abb. 3.3.3.7.B). Ebenso wurde kein struktureller Unterschied in der Ausbildung der *Nervus vagus* festgestellt (Abb. 3.3.3.7.C).

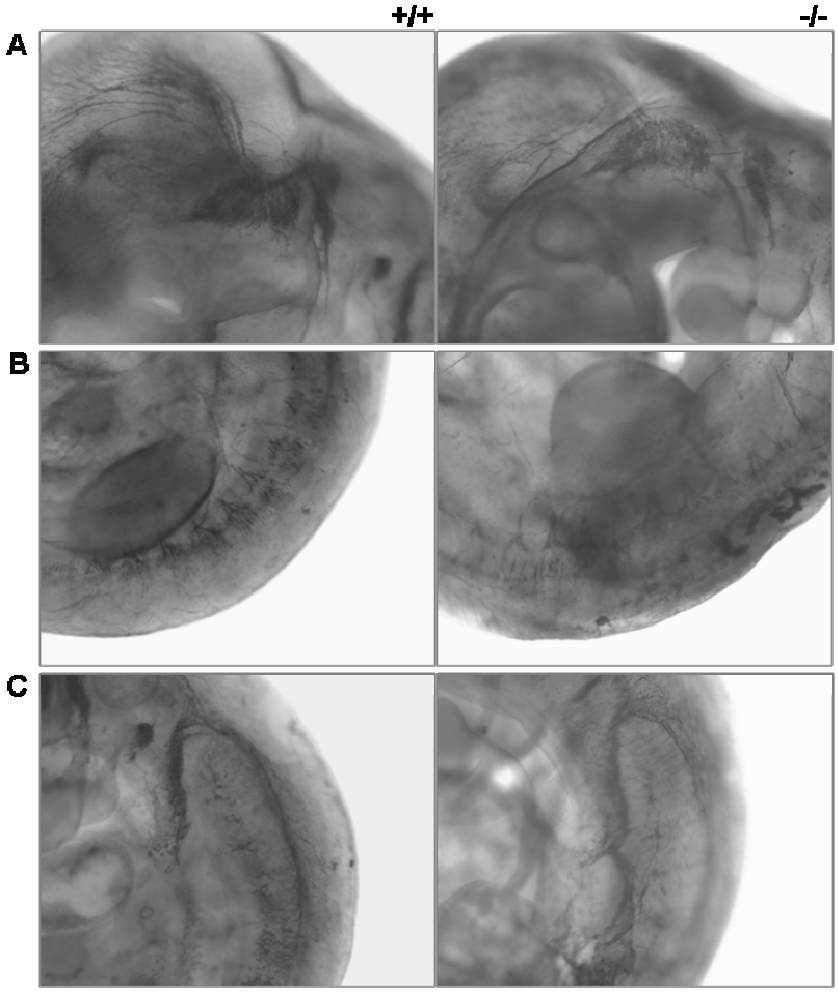


Abb. 3.3.3.7: Entwicklung des peripheren Nervensystems unter β-Parvin-Defizienz an E9.5, „Whole-mount“-Färbungen von Embryonen gegen Neurofilament-160; A: Kranialganglien links; B: dorsale Wurzelganglien (Parvb$^{+/+}$ linksseitig, Parvb$^{-/-}$ rechtsseitig); C: Nervus vagus links; Vergößerung: 6x

Die hier durchgeführten histologischen Analysen β-Parvin exprimierender Gewebe bzw. Organe zeigten ein unauffälliges Bild unter Defizienz von β-Parvin. Morphologische Veränderungen des Herzens wurden nicht beobachtet, ebenso keine auffälligen Veränderungen des Bindegewebsanteils, der Ultrastruktur oder der subzellulären Lokalisation β-Parvin assoziierter Proteine in linksventrikulären Kardiomyozyten. Erste Analysen des gemischt-faserigen Skelettmuskels Vastus lateralis lieferten keine Hinweise auf De- bzw. Regenerationsvorgänge des Muskels. Weiterhin konnte keine Beeinträchtigung der Gewebestrukturen von Niere, Lunge, Leber und Milz beobachtet werden. Stark β-Parvin exprimierende Kranial- und Spinalganglien zeigten keine sichtbare Beeinträchtigung ihrer Entwicklung in β-Parvin-defizienten Embryonen an E9.5.

3.3.4 Biochemische Analyse von Gewebe-Lysaten und -RNA

Um mögliche Effekte des Verlustes von β-Parvin auf Bindungspartner bzw. assoziierte Proteine biochemisch zu untersuchen, wurden Protein-Lysate verschiedener β-Parvin exprimierender Organe von adulten Wildtyp- und *Parvb*$^{-/-}$-Mäusen mittels Western-blot, sowie RNA-Präparationen von Herz und Skelettmuskel mittels Northern-blot analysiert.
Abbildung 3.3.4.1 zeigt eine Western-blot Analyse von Herz, Skelettmuskel (*Vastus lat.*), Lunge, Milz, Thymus, Leber und Niere von 10 Wochen alten Wildtyp bzw. *Parvb*$^{-/-}$-Mäusen. Immundetektiert wurden Komponenten des ILK/PINCH/Parvin-Komplexes. GAP-DH diente als Ladekontrolle und zeigte, trotz sichtbarer Differenzen des geladenen Gesamtproteins zwischen verschiedenen Geweben, etwa Thymus und Leber, keine sichtbaren Differenzen des Gesamtproteins zwischen Wildtyp- und *Parvb*$^{-/-}$-Proben der einzelnen Gewebe, so dass von gleichem Gesamtprotein von Wildtyp- und *Parvb*$^{-/-}$-Proben der jeweiligen Gewebe auszugehen ist. Die Detektion von β-Parvin zeigte den Verlust des endogenen Proteins in allen Geweben. Die im Lungenlysat auf β-Parvin-Höhe sichtbare Bande lief bei weiterer Auftrennung höher als β-Parvin, so dass von einer unspezifischen Reaktivität in der Lunge auszugehen ist. Die Detektion von γ-Parvin zeigte die erwartete hämatopoetisch begrenzte Expression. Jedoch wurde durch den Verlust von β-Parvin in keinem dieser Gewebe eine sichtbare Veränderung der γ-Parvin Expression induziert. Ähnlich zeigte α-Parvin in den meisten der analysierten Gewebe keine sichtbar veränderte Expression. Herz und Skelettmuskel aber zeigten eine deutliche Zunahme der α-Parvin Expression. Die unter Wildtypbedingungen sehr schwache bzw. kaum detektierbare Bande von α-Parvin in beiden quergestreiften Muskelgeweben zeigte deutliche Intensitätszunahme durch den Verlust von β-Parvin. Diese Erhöhung der α-Parvin Expression zeigte sich in allen durchgeführten

Versuchen völlig konsistent im Herz, während sie im Skelettmuskel nicht immer, häufig schwächer zu beobachten war. Eine Veränderung der ILK- sowie auch der PINCH1-Expression wurde in keinem der untersuchten Gewebe festgestellt. Die Detektion von PINCH1 zeigte in fast allen Geweben die erwartete Bande bei ungefähr 37 kDa, während in der Lunge zusätzlich eine Bande bei ungefähr 42 kDa beobachtet wurde. Diese wurde nicht näher charakterisiert, da sich keine Veränderung durch β-Parvin-Defizienz zeigte. Herz und Skelettmuskel aber zeigten kaum detektierbare Banden bei 37 kDa, jedoch eine sehr starke Bande bei ungefähr 45 kDa. Diese wurde ebenfalls nicht genauer charakterisiert, stellt jedoch möglicherweise eine muskelspezifische Spleiß-Variante des PINCH1-Proteins dar. Bei Datenbank-Suchen konnten teilweise muskulär exprimierte Sequenzbereiche (EST) identifiziert werden, die ein Spleißen von Exon2 an ein mögliches weiteres Exon bzw. an in Intron1 liegende Seqeuenz zeigten (#AK009390, Zunge; #DQ00368, Hoden). Die Größe des korrespondierenden Proteins beträgt ca. 45 kDa. Zudem zeigten unpublizierte Versuche (Chang et al., Manuskript in Vorbereitung) an C2C12-Myoblasten ein Umschalten von der 37 kDa auf die 45 kDa Bande während der Differenzierung der Zellen.

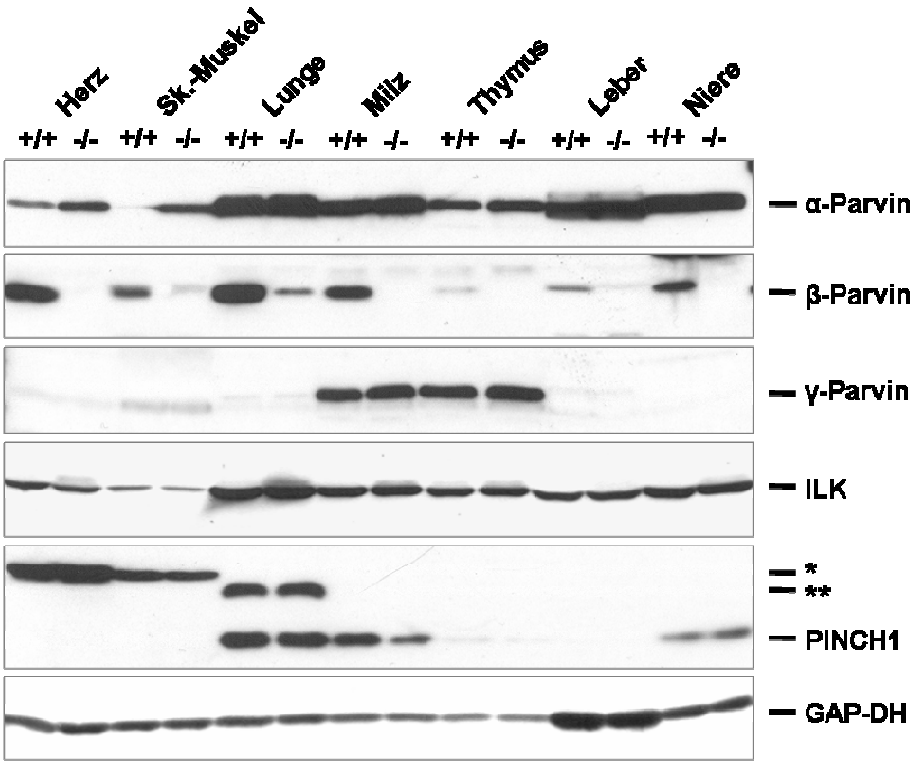


*Abb. 3.3.4.1: Expressionsanalyse von Komponenten des ILK/PINCH/Parvin-Komplexes in verschiedenen Wildtyp- und β-Parvin-defizienten Geweben mittels Western-blot; Ladekontrolle: GAP-DH, Gesamtprotein je Spur: 20 µg, *: 45 kDa Spleißvariante von PINCH-1, **: nicht näher charakterisiert, SDS-PAGE: 10% Acrylamid*

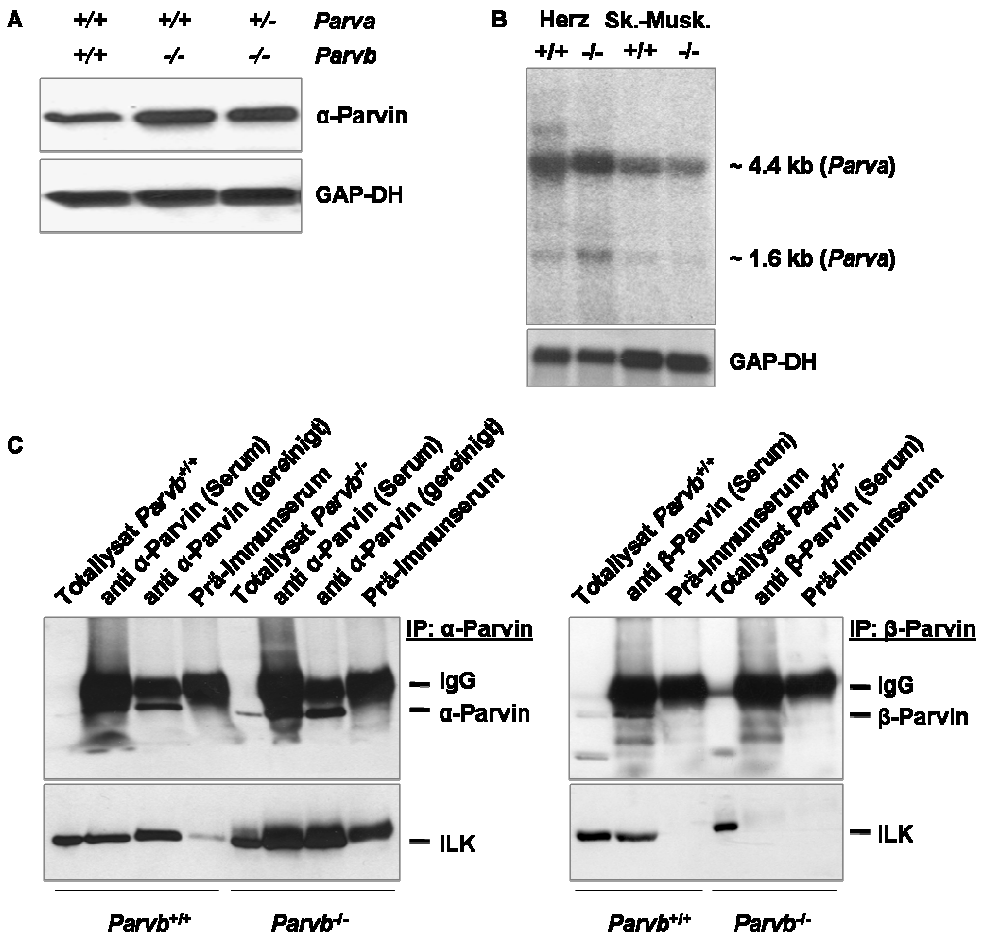


Abb. 3.3.4.2: Heraufregulation von α-Parvin unter β-Parvin-Defizienz und Ko-Präzipitationsversuche zur ILK/Parvin-Bindung; A: Western-blot Analyse der α-Parvin Expression in Herzen von Parva$^{+/+}$Parvb$^{+/+}$-, Parva$^{+/+}$Parvb$^{-/-}$- und Parva$^{+/-}$Parvb$^{-/-}$-Tieren; B: Northern-blot Analyse der Parva-Transkription in Wildtyp- und β-Parvin-defizientem Herz und Skelettmuskel, Exposition: 4 Tage; C: Ko-Präzizpitation von ILK mit α-Parvin (links) sowie β-Parvin (rechts) in RIPA-Lysaten von Herzgewebe (0,1% SDS), Prä-Immunseren bzw. Parvb$^{-/-}$-Herzlysate als Kontrollen

Die in Abbildung 3.3.4.2.A gezeigte Western-blot Analyse der α-Parvin Expression in Herzen von Wildtyp-, *Parvb*$^{-/-}$- und *Parva*$^{+/-}$*Parvb*$^{-/-}$-Tieren zeigte im direkten Vergleich einen schwächeren Anstieg der α-Parvin Expression bei heterozygoter *Parva*-Situation. Um zu überprüfen, ob die in Herz und Skelettmuskel beobachtete Heraufregulation von α-Parvin auf transkriptioneller Ebene oder posttranskriptionell stattfand, wurde eine Northern-blot Analyse beider Gewebe durchgeführt. Wie in Abbildung 3.3.4.2.B gezeigt, konnte nur eine marginale Zunahme der *Parva*-mRNA unter β-Parvin-Verlust im Herz und gar keine Zunahme im Skelettmuskel detektiert werden, so dass eine Induktion von *Parva*-mRNA durch β-Parvin-Defizienz als Grund für den Anstieg von α-Parvin Protein nahezu ausgeschlossen werden konnte. Das bei Verlust von β-Parvin erhöhte α-Parvin Protein bei nicht reduziertem ILK

Protein legte nahe, dass durch β-Parvin-Defizienz frei gewordene ILK-Bindungsstellen nun vermehrt durch α-Parvin besetzt wurden, mit der Folge einer Stabilisierung beider Proteine. Die Untersuchung von ILK-Immunpräzipitaten von Wildtyp und β-Parvin-defizienten Herzen auf einen eventuellen Anstieg gebundenen α-Parvins lieferte aber weder im Wildtyp noch unter β-Parvin-Defizienz detektierbare Mengen von α-Parvin. Testversuche mit einem weiteren, polykonalen ILK-Antikörper zeigten das gleiche Resultat, auch nach Variation der Pufferbedingungen. Da die vorhandenen ILK-Antikörper gegen die Kinase-Domäne des Proteins gerichtet sind, in der auch die Parvin-Bindungsstelle liegt, erschien es möglich, dass die Antikörper mit den Parvinen um die ILK-Bindung kompetitierten. Dementsprechend zeigten umgekehrte Kontrollversuche zur Parvin Immunpräzipitation unter verschiedenen Pufferbedingungen die Ko-Präzipitation von ILK. Wie in Abbildung 3.3.4.2.C zu sehen, wurde eine Stabilität von ILK/α-Parvin- sowie auch ILK/β-Parvin-Komplexen in Herzen nach Präzipitation mit verschiedenen Parvin-Antikörpern sogar unter 0,1% SDS (RIPA-Puffer) beobachtet. Aufgrund der wahrscheinlichen Kompetition zwischen α-Parvin und ILK-Antikörpern um die ILK-Bindung wurden Versuche zur Ko-Präzipitation von α-Parvin mit ILK nicht weiter verfolgt.

Anschließend wurde eine erste biochemische Charakterisierung β-Parvin-defizienter Herzen durchgeführt. Ausgehend von einer Substitution von β-Parvin durch α-Parvin in den ILK-Komplexen bei β-Parvin-Verlust wurde ein eventueller Effekt auf mögliche ILK-Kinase-Ziele untersucht. Hierzu gehörten die, besonders während Wachstum oder Belastung bzw. Hypertrophie für die Integrität von Kardiomyozyten wichtigen Kinasen Akt und GSK3α/β. Desweiteren wurde die Expression von CARP, einem herz- bzw. muskelspezifisch exprimierten Stressmarker, untersucht (Miller et al., 2003a). Hierzu wurden wiederum Western-blot Analysen von Herz-Lysaten durchgeführt. Abbildung 3.3.4.3 zeigt eine repräsentative Western-blot Analyse der Serin 473-Phosphorylierung von Akt, der Serin 21 bzw. 9-Phosphorylierung von GSK3α bzw. GSK3β sowie der CARP-Expression in Wildtyp und β-Parvin-defizienten Herzen. Es konnte keine konsistent erniedrigte oder erhöhte Phosphorylierung von Akt oder GSK3α/β beobachtet werden. Auch zeigte die CARP-Expression keinen Anstieg oder Abfall bei Substitution von β- durch α-Parvin.

Die biochemische Charakterisierung β-Parvin exprimierender Organe bzw. Gewebe zeigte keine Veränderung der γ-Parvin Expression nach β-Parvin Deletion. Ebenso zeigte die Mehrzahl der Gewebe keine sichtbare Veränderung der α-Parvin Expression. In Herz und Skelettmuskel hingegen wurde eine deutlich sichtbare Zunahme von α-Parvin Protein, jedoch

nicht -RNA unter β-Parvin-Defizienz festgestellt. In *Parva*$^{+/-}$*Parvb*$^{-/-}$-Tieren zeigte sich ein schwächerer Anstieg von α-Parvin Protein im Herzen. Veränderungen im ILK-Protein wurden nicht beobachtet. Gleiches gilt für das „ubiquitäre" 37 kDa sowie das muskelspezifische 45 kDa PINCH1-Protein. Mögliche ILK-Kinase-Ziele mit Bedeutung für die Integrität von Kardiomyozyten zeigten keinen veränderten Phosphorylierungsstatus durch die mögliche Substitution von β- durch α-Parvin. Auch ergab die unveränderte CARP-Expression in β-Parvin-defizienten Herzen kein Hinweis auf eine verstärkte Stresssituation. In Immunpräzipitationsversuchen konnte eine Stabilität von ILK/α-Parvin- sowie ILK/β-Parvin-Komplexen unter 0,1% SDS beobachtet werden.

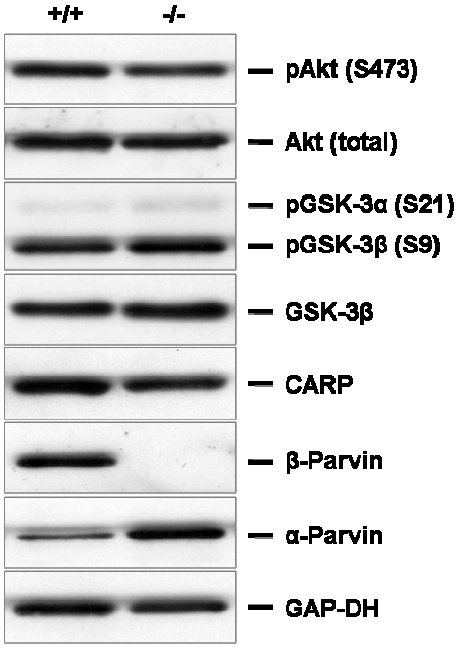


Abb. 3.3.4.3: Western-blot Analyse des Phospohrylierungsstatus bzw. der Expression verschiedener Signalproteine in Wildtyp- und β-Parvin-defizenten Herzen, Ladekontrolle: GAP-DH, SDS-PAGE: 10% Acrylamid

3.3.5 Analysen von Herz und Skelettmuskel nach Belastungstraining

Da nach Verlust von β-Parvin kein deutlicher Phänotyp unter basalen Bedingungen festgestellt werden konnte, wurden die Mäuse im nächsten Schritt unter Belastungsbedingungen auf einen Phänotyp untersucht. Ausgehend von der deutlich sichtbaren α-Parvin Zunahme bzw. Substitution von β- durch α-Parvin in Herz und Skelettmuskel wurde hierfür ein Laufbandtraining der Tiere gewählt. Anschließend wurden physiologische, histologische und biochemische Parameter aufgenommen. Die Substitution von β- durch α-Parvin in Herz und Skelettmuskel erschien zudem vor dem Hintergrund

möglicherweise sehr unterschiedlicher Funktionen der beiden Isoformen bei der Regulation von Zell-Spreiten und -Überleben von Fibroblasten *in vitro* interessant (Zhang et al., 2004). Das Belastungstraining wurde in der Abteilung für molekulare und zelluläre Sportmedizin unter Leitung von Prof. Dr. med W. Bloch an der Deutschen Sporthochschule in Köln durchgeführt. Hierfür wurden 8-12 Wochen alte, weibliche Tiere auf den Trainingslauf bei konstanter Geschwindigkeit konditioniert. Dies erfolgte unter Beobachtung und gegebenenfalls leichtem Anstoßen der Tiere. Das Lauftraining wurde wie in Abbildung 3.3.5.1 schematisch dargestellt bei einer Geschwindigkeit von 20 $m*min^{-1}$ und einer Steigung von 10%, eine Stunde pro Tag über einen Zeitraum von 4 Wochen durchgeführt. Nach Ablauf des Trainings wurden verschiedene Herz-Parameter in Ruhe aufgenommen. Dies wurde durchgeführt im Institut für Physiologie I der Medizinischen Fakultät der Rheinischen Freidrich-Wilhelms-Universität Bonn unter Leitung von Prof. Dr. B.K. Fleischmann. Nach Tötung der Tiere wurde der Herz-Körper-Index bestimmt, sowie Herz- und Muskelproben für die Histologie und Biochemie genommen.

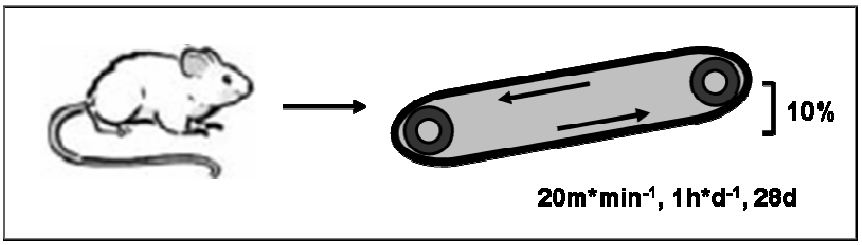


Abb. 3.3.5.1: Bedingungen für das Belastungstraining

Abbildung 3.3.5.2 zeigt eine Zusammenfassung der nach dem Belastungstraining erfassten physiologischen und histologischen Daten des Herzens. Wie in Abbildung 3.3.5.2.A dargestellt, wurde für β-Parvin-defiziente Tiere mit 5,93 +/- 0,28 mg/g Körpergewicht ein gegenüber den Wildtyp-Tieren (6,85 +/- 0,23 mg/g) leicht verringerter Herz-Körper-Index gemessen. Auch der an Semidünnschnitten ermittelte mittlere Durchmesser β-Parvin-defizienter Kardiomyozyten zeigte mit 14,0 +/- 0,64 µm einen gegenüber dem Wildtyp mit 18,34 +/- 1,47 µm verringerten Wert. Schließlich wurde für die Kapillarisierung der Herzen, gemessen an der Zahl von Gefäßen pro Kardiomyozyt unter β-Parvin-Defizienz mit 3,75 +/- 0,1 ein gegenüber dem Wildtyp (4,77 +/- 0,37) geringerer Wert gemessen. Die niedrigeren Werte für alle drei Parameter waren signifikant unter Annahme eines Signifikanzniveaus von 5%. Die mittels Ultraschall gemessene linksventrikuläre Masse zeigte bei den *Parvb*$^{-/-}$-Tieren mit 76,6 +/- 4,4 mg einen nicht signifikant reduzierten Wert (Wildtyp: 88,5 +/- 3,4 mg). Die Werte für Auswurffraktion (65,1 +/- 4,7% *Parvb*$^{-/-}$; 67,0 +/- 3,8% Wildtyp) und Herz-Rate

(504 +/- 27,4 min^{-1} *Parvb*$^{-/-}$; 492 +/- 17,9 min^{-1} Wildtyp) im Ruhezustand zeigten keine Abweichungen.

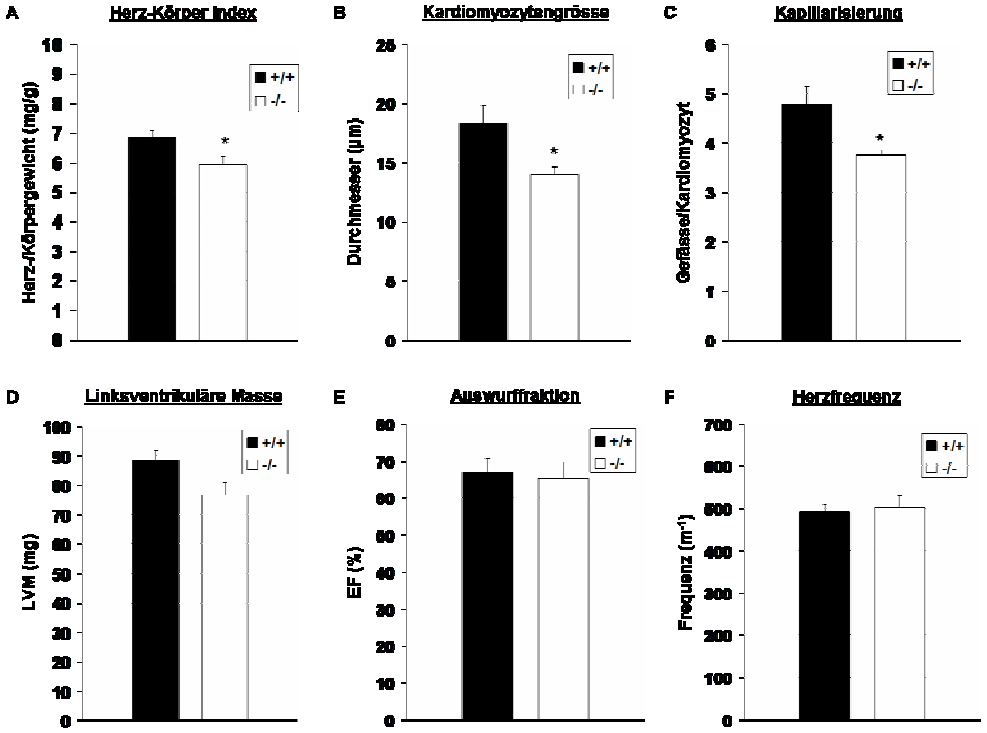


*Abb. 3.3.5.2: Verschiedene Herzparameter nach Beendigung des Belastungstrainings; A: Herz-Körper-Index, bestimmt durch Wiegen; B: Mittlerer Durchmesser der Kardiomyozyten, bestimmt an Semidünnschnitten; C: Kapillarisierung, bestimmt an Semidünnschnitten; D: Linksventrikuläre Masse, echokardiografisch bestimmt; E: Auswurffraktion, echokardiografisch bestimmt in Ruhe; F: Herz-Rate, echokardiografisch bestimmt in Ruhe; n=8, Fehlerbalken zeigen SEM, Statistik: Studentischer T-test, *: P<0,05; A, B, C durchgeführt an der Deutschen Sporthochschule, Köln; D, E, F durchgeführt am Institut für Physiologie I, Medizinische Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn*

Zur Überprüfung einer erfolgreichen Stressinduktion bzw. zur biochemischen Analyse der Stressantwort unter β-Parvin-Defizienz wurde initial eine Western-blot Analyse von Herz-Lysaten der trainierten Tiere sowie untrainierter Tiere durchgeführt. Die Ergebnisse der Analyse sind in Abbildung 3.3.5.3 gezeigt. Je Genotyp wurden die Herzen von 3 trainierten und 3 untrainierten Tieren untersucht. Die in den Spuren 10 und 14 aufgetrennten Lysate, von Tieren aus Verpaarungen der *Parva*- mit der *Parvb*-Linie, hatten die Genotypen *Parva*$^{+/-}$ *Parvb*$^{+/+}$ (Spur 10) bzw. *Parva*$^{+/-}$*Parvb*$^{-/-}$ (Spur 14). Zunächst zeigte die Immundetektion von α-Parvin in allen β-Parvin-defizienten Tieren die erwartete Heraufregulierung, mit Ausnahme des *Parva*$^{+/-}$*Parvb*$^{-/-}$-Tieres in Spur 14, wie schon ähnlich unter basalen Bedingungen beobachtet (Abb. 3.3.4.2.A). Damit konsistent zeigte sich das ILK-Protein in allen untersuchten Herz-Lysaten konstant mit Ausnahme der *Parva*$^{+/-}$*Parvb*$^{-/-}$-Situation, wo weniger

ILK-Protein detektiert wurde. Zur Überprüfung einer tatsächlich erfolgten Stessinduktion wurde die Phosphorylierung der mechanoresponsiven MAP-Kinasen Erk1/2 untersucht. Es konnte jedoch weder bei den β-Parvin-defizienten Tieren noch bei den Wildtypen eine Induktion der Erk1/2-Phosphorylierung durch das Training beobachtet werden. Ebenso wurde weder bei den Wildtypen noch den *Parvb*$^{-/-}$-Tieren eine Veränderung der CARP-Expression als Zeichen für eine veränderte Belastung gefunden. Die Akt-Phosphorylierung an S473 und T308 sowie die GSK3β-Phosphorylierung an S9 zeigten unter basalen Bedingungen wie auch nach Training eine hohe individuelle Varianz. Jedoch zeigten die Herzen nach Training tendenziell eine etwas erhöhte Phoshorylierung beider Kinasen. Expressionsunterschiede der Proteine konnten ausgeschlossen werden. Ebenso war kein Zusammenhang zwischen der Akt-Phosphorylierung an den beiden Resten bzw. zwischen der Akt- und GSK3β-Phosphorylierung bei einem Vergleich der Individuen zu erkennen. Ein Zusammenhang mit dem *Parvb*-Genotyp konnte aber wiederum nicht beobachtet werden. Lediglich das *Parva*$^{+/-}$ *Parvb*$^{-/-}$-Tier zeigte als einziges neben der erwähnten verringerten ILK-Expression auch eine verringerte Phosphorylierung aller untersuchten Kinasen Erk1/2, Akt und GSK3β (Spur 14). Aufgrund der möglicherweise reduzierten Kapillarisierung β-Parvin-defizienter Herzen nach dem Belastungstraining wurde schließlich mit einem panV-EGF-Antikörper die V-EGF Expression untersucht. Auch hier konnten weder Unterschiede zwischen basalem und trainiertem Status noch zwischen dem Genotyp der Tiere beobachtet werden.

Die histologische Untersuchung der Proben veschiedener Skelettmuskel (*Vastus lateralis* (*VL*), *Musculus gastrocnemius*, *Musculus soleus*, *Extensor digitorum longus* (*EDL*)) stand zum Zeitpunkt der Einreichung der Arbeit noch aus. Die biochemische Untersuchung von Skelettmuskel wurde mit der Analyse von Proben des *EDL*-Muskels mit hohem Anteil schnell-kontrahierender Fasern mittels Western-blot analog zum Herzen (Abb. 3.3.5.3) begonnen. Da Proben ungelaufener Tiere bis dahin noch nicht zur Verfügung standen, wurden in einer ersten Western-blot Analyse *EDL*-Proben gelaufener Tiere mit Proben des gemischt-faserigen *Vastus lateralis*-Muskels von ungelaufenen Tieren verglichen. Die bis zur Abgabe der Arbeit durchgeführten Analysen umfassten den Phosphorylierungsstatus von Erk1/2 sowie Akt. Wie in Abbildung 3.3.5.4 zu sehen zeigte die S473-Phosphorylierung von Akt leichte Tendenz zur verstärkten Phosphorylierung nach Training, jedoch unabhängig vom Genotyp der Tiere. Die Phosphorylierung von Erk1/2 war in den *EDL*-Proben der trainierten Tiere deutlich stärker als in den *VL*-Proben der ungelaufenen Tiere. Jedoch wurden auch hier keine Unterschiede zwischen Wildtyp- und β-Parvin-defizienten Tieren gefunden. Unterschiede in der Expression der Proteine als Grund für einen anderen

Phosphorylierungsstatus konnten ausgeschlossen werden. Dem Ursprung der verstärkten Erk1/2-Phosphorylierung in den gelaufenen *EDL*-Proben, Muskelspezifität oder Training, konnte im Rahmen der Arbeit jedoch nicht mehr nachgegangen werden.

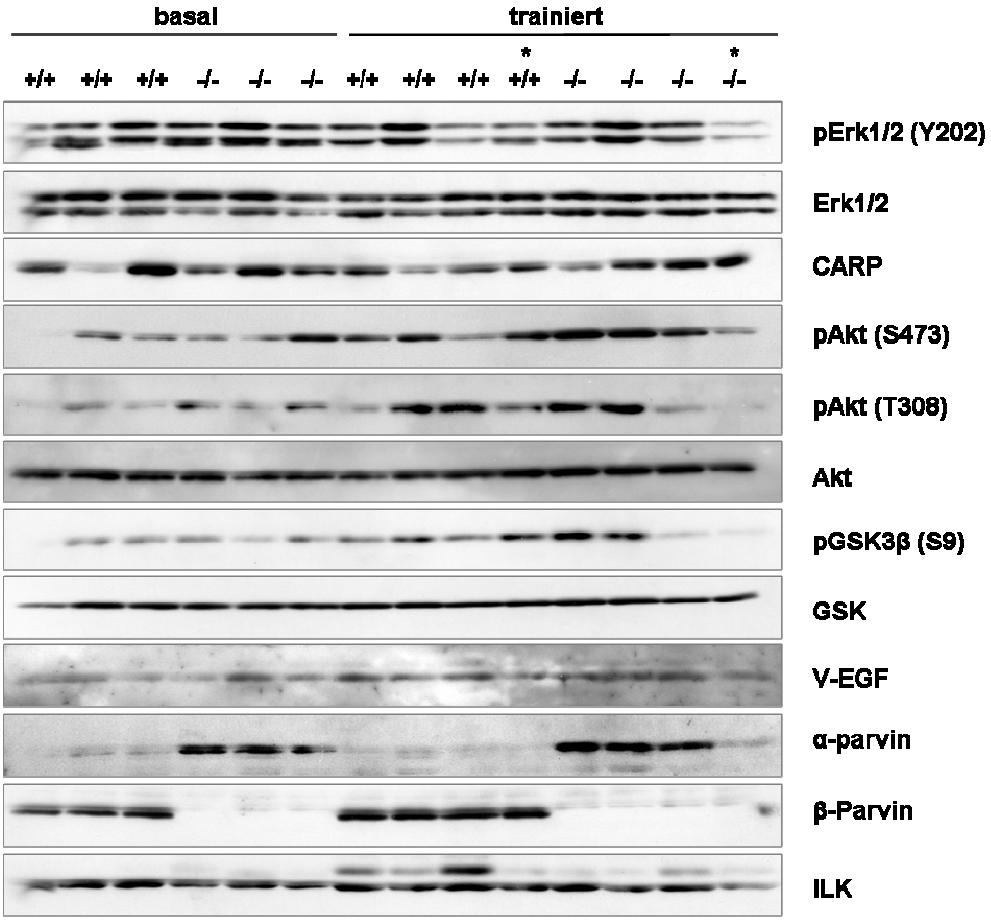


*Abb. 3.3.5.3: Western-blot Analyse der Expression bzw. des Phosphorylierungsstatus verschiedener Signalproteine und Komponenten des ILK/PINCH/Parvin-Komplexes in Wildtyp- und β-Parvin-defizienten Herzen vor und nach dem Belastungstraining, *: Parva$^{+/-}$Parvb$^{+/+}$ (Spur 10) bzw. Parva$^{+/-}$Parvb$^{-/-}$ (Spur 14); Gesamtprotein je Spur: 20 µg; SDS-PAGE: 10% Acrylamid*

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass im Herzen nur bedingt nachweisbar Stress durch die mechanische Belastung des Trainings induziert werden konnte, basierend auf unveränderter Erk1/2-Phospohrylierung sowie CARP-Expression und einer nur tendenziellen Erhöhung der Akt- und GSK3β-Phosphorylierung. Eine funktionale Beeinträchtigung β-Parvin-defizienter Herzen, gemessen an Herz-Rate und Ejektionsfraktion, als Folge des Trainings konnte nicht festgestellt werden, wenngleich Hinweise auf histologische Veränderungen vorlagen. Dies waren ein gegenüber dem Wildtyp verringerter Durchmesser der Kardiomyozyten und eine reduzierte Kapillarisierung des Myokards, signifikant unter Annahme einer 5%-Hürde. Weiterhin zeigten β-Parvin-defiziente Herzen tendenziell ein

niedrigeres Gewicht als Wildtyp-Herzen. In der biochemischen Analyse zeigten sich die β-Parvin-defizienten Herzen gegenüber den Wildtypen unverändert. Erste Versuche zur biochemischen Analyse des *Extensor digitorum longus*-Muskels ließen auf eine stärkere mechanische Belastung als im Herzen schließen. Dies zeigte sich in einer deutlichen Zunahme der Erk1/2-Phosphorylierung sowie einer tendenziell erhöhten Akt-Phosphorylierung. Jedoch lagen auch hier keine Anzeichen einer beeinträchtigten Stressantwort unter β-Parvin-Defizienz vor, da ein unverminderter Anstieg der Erk1/2-Phosphorylierung beobachtet wurde.

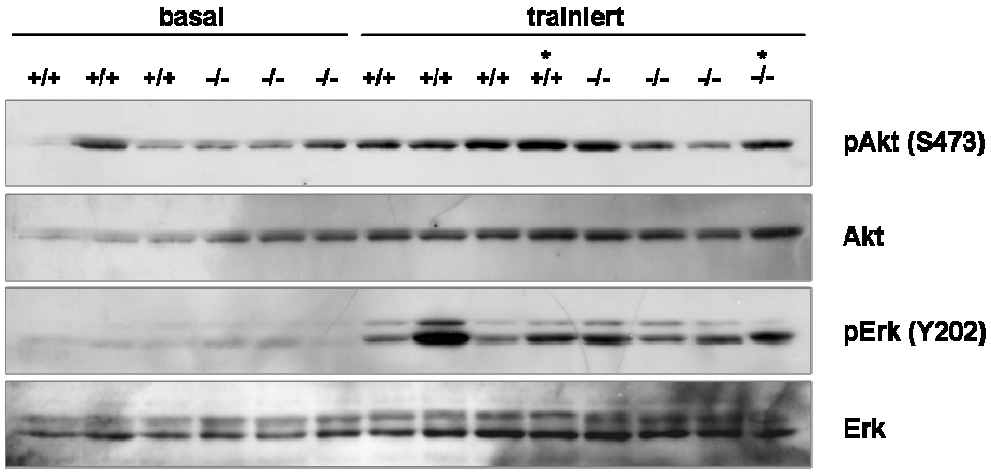


*Abb. 3.3.5.4: Western-blot Analyse der Expression und des Phosphorylierungsstatus von Akt und Erk1/2 in Wildtyp- und β-Parvin-defizienten Skelettmuskelgeweben; basal: Vastus lateralis, trainiert: EDL; *: Parva$^{+/-}$ Parvb$^{+/+}$ (Spur 10) bzw. Parva$^{+/-}$Parvb$^{-/-}$ (Spur 14); Gesamtprotein je Spur: 20 µg; SDS-PAGE: 10% Acrylamid*

3.3.6 Charakterisierung β-Parvin-defizienter Zellen

Die Charakterisierung β-Parvin-defizienter Zellen *in vivo* bzw. primärer Zellen *in vitro* richtete sich mit der Analyse des Adhäsions-, Spreit- oder Migrationsverhaltens primär auf Integrin-vermittelte zelluläre Prozesse. Aufgrund der in Abschnitt 3.3.4 beschriebenen α-Parvin-Stabilisierung unter β-Parvin-Defizienz und aufgrund des Fehlens eines offensichtlichen Phänotyps der *Parvb*$^{-/-}$-Mäuse schien eine funktionelle Kompensation des β-Parvin-Verlustes durch α-Parvin möglich. Daher sollten die Analysen von Zellen möglichst unabhängig von α-Parvin sein. Aufgrund des Fehlens von α-Parvin in myeloiden Zellen (Chu et al., 2006) wurde deshalb das Spreitverhalten von aus Knochenmark differenzierten Makrophagen *in vitro* untersucht. Auch wurde die Adhäsion von Makrophagen *in vivo*, mittels Immunfluoreszenzfärbung verschiedener Populationen von Makrophagen in der Milz untersucht. Weiterhin wurde die Migration von aus Knochenmark differenzierten Dendritischen Zellen *in vivo* verfolgt. Da PIX-Proteine möglicherweise für Adhäsion bzw.

Migration verschiedener Zellen von Bedeutung sind (Rosenberger et al., 2005; Li et al., 2003c), wurde die Isoform-Spezifität der Parvin/PIX-Bindung untersucht. Primäre murine embryonale Fibroblasten (MEF) wurden mit Blick auf eventuelle Funktionen der β-Parvin/PIX-Bindung auf ihre Morphologie bzw. F-Aktin- und Fokalkontaktstruktur sowie Adhäsion, Migration und Proliferation untersucht.

Isoform-Spezifität der PIX/Parvin-Bindung

Aufgrund der von Rosenberger et al. (2004) beschriebenen Bindung von α-PIX an β-Parvin, sowie einer möglichen funktionellen Redundanz zwischen α-und β-Parvin wurde untersucht, ob die PIX/Parvin-Bindung auf die genannten Isoformen beschränkt ist oder ob α-PIX bzw. der Heterodimerisierungspartner β-PIX auch α-Parvin binden. Dieser Versuch wurde in Kooperation mit Dr. rer nat K. Kutsche, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf von Dr. rer nat G. Rosenberger durchgeführt. Hierfür wurden GST/α-PIX bzw. GST/β-PIX mit den in Abschnitt 3.2.3 beschriebenen GFP/α-Parvin bzw. GFP/β-Parvin-Konstrukten in COS-Zellen ko-transfiziert. Nach GST-Präzipitation und Western-blot Analyse wurde auf Ko-Präzipitation des ko-transfizierten Parvins getestet.

Die Ergebnisse des Versuches sind in Abbildung 3.3.6.1 zusammengefasst. Leere GST- bzw. GFP-Vektoren dienten als Negativkontrollen, auf gleiches Gesamtprotein in den Totallysaten wurde mittels GAP-DH Detektion kontrolliert, die Expression der Parvine in den Totallysaten wurde mittels GFP-Detektion kontrolliert, schließlich wurde die GST-Präzipitation überprüft. Die GFP-Detektion in den Präzipitaten zeigte bei Ko-Expression von α-PIX wie auch β-PIX mit β-Parvin die Ko-Präzipitation von β-Parvin (Spuren 5 und 6). Hingegen konnte weder nach α-PIX/α-Parvin- noch nach β-PIX/α-Parvin-Ko-Expression eine Ko-Präzipitation von α-Parvin detektiert werden (Spuren 2 und 3). Die Parvin/PIX-Bindung schien somit spezifisch für β-Parvin zu sein.

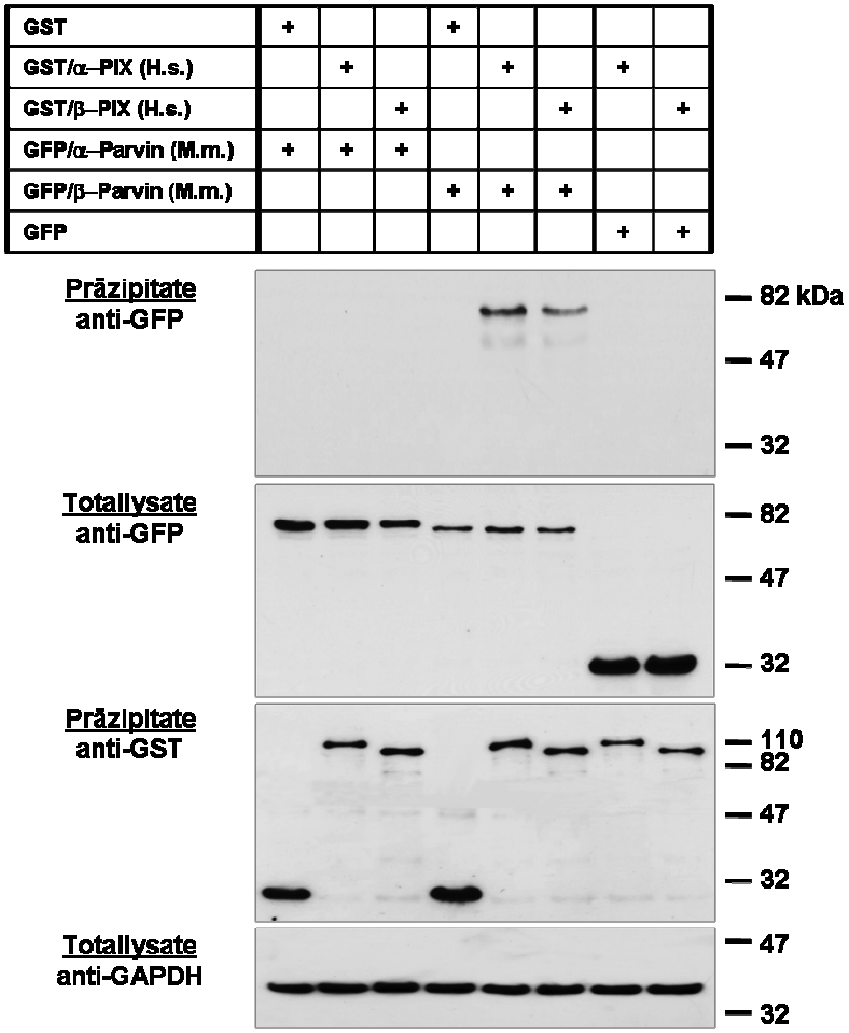


Abb. 3.3.6.1: Ko-Präzipitation von Parvinen mit PIX-Proteinen; GFP-Parvin-Konstrukte wurden in den angegebenen Kombinationen mit GST-PIX-Proteinen in COS-Zellen ko-transfiziert, nach 18-24 h Inkubation wurde mit GST-Antikörper präzipitiert und nach Western-blot auf Ko-Präzipitation des jeweils ko-transfizierten Parvins getestet; Ladekontrolle: GAP-DH, leere GFP- bzw. GST-Vektoren als Negativ-Kontrolle, Gesamtprotein je Spur bei Totallysaten: 20 µg, SDS-PAGE: 10% Acrylamid

β-Parvin-defiziente, primäre murine embryonale Fibroblasten

Die unter siRNA-vermittelter Depletion von β-Parvin beschriebenen Phänotypen sind sehr unterschiedlich, HT1080-Fibroblasten zeigten einen sehr ausgeprägten Spreitdefekt (Yamaji et al., 2003), während HeLa-Zellen keinen auffälligen morphologischen Phänotypen zeigten (Zhang et al., 2004). In einem *in vitro*-System sollten daher mögliche Folgen des vollständigen Verlustes von β-Parvin untersucht werden. Hierfür wurden MEF gewählt, da sie als primäre Zellen in relativ großer Zahl isoliert bzw. expandiert werden können und da sie ausgeprägte Fokalkontakte zeigen.

Abbildung 3.3.6.2 zeigt eine Fotographie von Wildtyp- und β-Parvin-defizienten MEF nach dritter Passage, wie sie für die hier gezeigten Versuche benutzt wurden, bei niedriger

Auflösung im Phasenkontrast. Der Vergleich von insgesamt 6 Wildtyp und 6 *Parvb*$^{-/-}$-Präparationen ergab keine Hinweise auf morphologische Defekte unter β-Parvin-Defizienz, die Zellen zeigten somit eine normale Spreitfähigkeit, der Zeitverlauf des Spreitens wurde nicht untersucht.

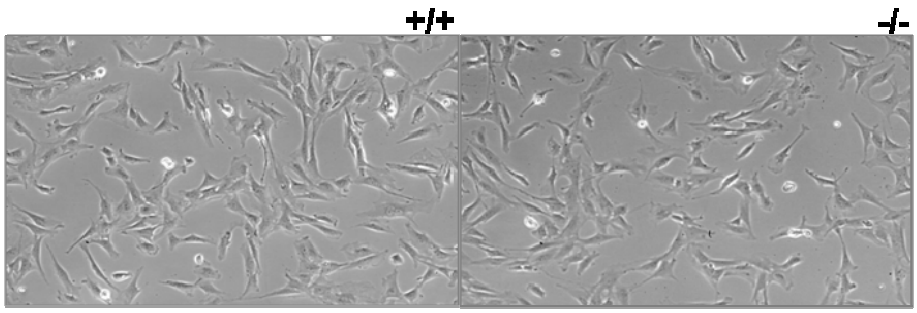


Abb. 3.3.6.2: Primäre murine embryonale Fibroblasten (MEF) von Parvb$^{+/+}$*- und Parvb*$^{-/-}$*-Embryonen; 3. Passage, Phasenkontrast, Vergrößerung: 10x*

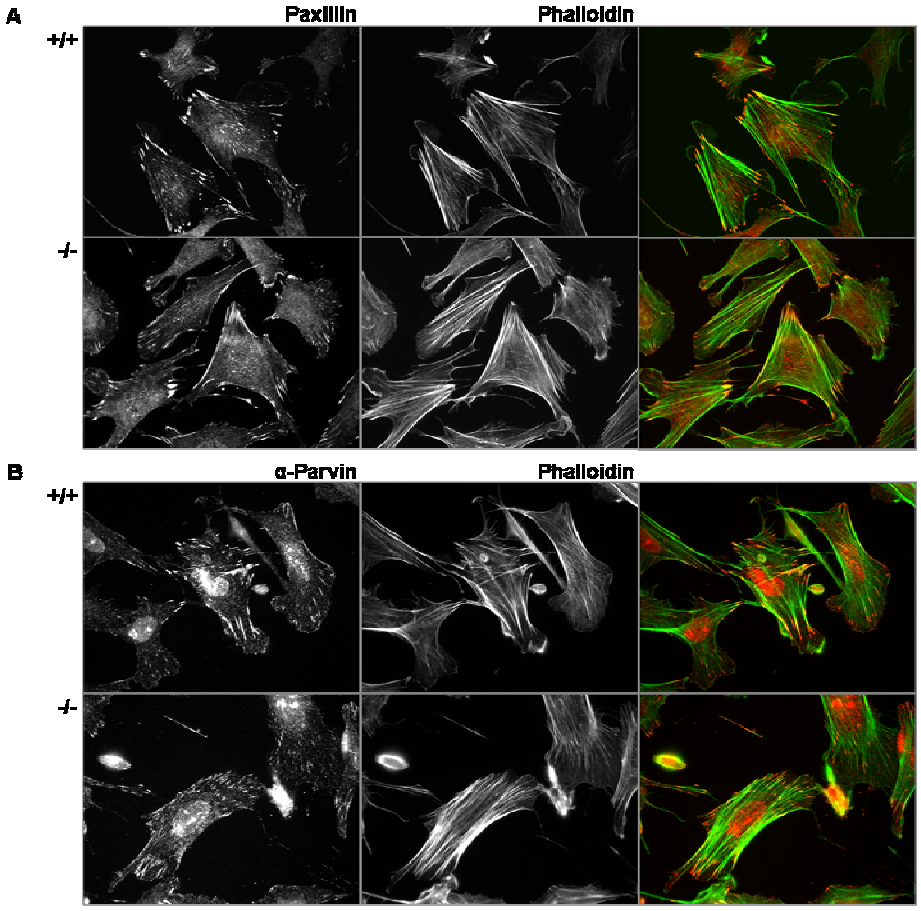


Abb. 3.3.6.3: Fokalkontakte und F-Aktin in Wildtyp- und β-Parvin-defizienten primären MEF; A: Paxillin/F-Aktin-Ko-Färbung; B: α-Parvin/F-Aktin-Ko-Färbung; 3. Passage, Fixierung: 4% PFA, Vergrößerung: 63x

Im nächsten Schritt wurden das F-Aktin-Zytoskelett sowie die Fokal-Adhäsionen fixierter MEF mittels Phalloidin- bzw. Paxillin- und α-Parvin-Immunfärbung visualisiert. Wie in Abbildung 3.3.6.3 zu sehen, zeigten β-Parvin-defiziente MEF eine von den Wildtypen nicht unterscheidbare Paxillin- (Abb. 3.3.6.3.A) bzw. α-Parvin-Färbung (Abb. 3.3.6.3.B). Entsprechend der Geometrie der Zellen konnten größere Fokalkontakte an den Enden der Stressfasern, kleinere häufig im Bereich von ausgedehnten Membranfortsätzen/Lamellipodien oder zentral gelegen beobachtet werden. Das F-Aktin-Zytoskelett zeigte im Wildtyp wie unter β-Parvin-Defizienz die Ausbildung von Stressfasern vornehmlich parallel zur Polarisation der Zellen und stets mit Paxillin- bzw. α-Parvin-Kontakt. Auch im kortikalen Aktin konnten keine Unterschiede zwischen Wildtyp- und *Parvb*$^{-/-}$-MEF festgestellt werden. Eine Aggregation von F-Aktin, wie für ILK-defiziente Zellen beschrieben fiel nicht auf. Somit ergaben diese Versuche keine Hinweise auf eine gestörte Interaktion von Adhäsionen und dem Aktin-Zytoskelett.

Zur funktionalen Charakterisierung der Adhäsion wurden Wildtyp- und β-Parvin-defiziente MEF auf verschiedenen Substraten, Fibronektin, Vitronektin, Laminin, Kollagen-1 und als Integrin unabhängige Kontrolle Poly-L-Lysin (jeweils 10 µg/ml) ausplattiert. Nach 20-minütiger Inkubation wurden nicht adhärente Zellen abgewaschen und der Prozentsatz adhärenter Zellen, normalisiert auf den Maximalwert bestimmt (vgl. 2.2.5.9). Die Ergebnisse der Versuche sind in Abbildung 3.3.6.4.A gezeigt. Die stärkste Adhäsion wurde auf den RGD-Liganden Fibronektin und Vitronektin gemessen mit 44,4 +/- 6,8% (Wildtyp) bzw. 47,3 +/- 6,3% (*Parvb*$^{-/-}$) auf Fibronektin und 37,6 +/- 21,1% (Wildtyp) bzw. 40,3 +/- 2,9% (*Parvb*$^{-/-}$) auf Vitronektin. Die Werte auf Laminin lagen bei 20,1 +/- 3,3% (Wildtyp) bzw. 19,9 +/- 2,6% (*Parvb*$^{-/-}$), auf Kollagen bei 22,5 +/- 3% (Wildtyp) bzw. 27,6 +/- 6% (*Parvb*$^{-/-}$). Die Werte für Poly-L-Lysin lagen bei 22,4 +/- 1% (Wildtyp) bzw. 29,8 +/- 4,3% (*Parvb*$^{-/-}$) und zeigten somit einen relativ hohen Hintergrund Integrin-unabhängiger bzw. unspezifischer Adhäsion an, der im Bereich der Werte für Laminin und Kollagen-1 lag. Somit konnte lediglich für Fibronektin und Vitronektin definitiv festgehalten werden, dass keine Beeinträchtigung der Adhäsion festgestellt wurde. Die Fähigkeit zur gerichteten Migration von Wildtyp- und β-Parvin-defizienten MEF wurde in *in vitro*-Wundheilungsversuchen untersucht. Hierzu wurden in konfluente Zellagen 200–300 µm breite Spalte gesetzt und der Wundverschluss per Videomikroskopie über 8h verfolgt. Aus dem Wundverschluss über die Zeit wurde die mittlere Wanderungsgeschwindigkeit der Zellen errechnet (Abb. 3.3.6.4.B). Diese betrug für Wildtyp-MEF 0,74 +/- 0,09 µm/min. β-Parvin-defiziente MEF zeigten mit 0,72 +/- 0,04 µm/min keine signifikante Abweichung. Weiterhin wurde die Proliferation der

MEF über einen Zeitraum von 120 h verfolgt. Ausgehend von 3 x10^4 Zellen je Well in 24-Well-Platten ausplattiert, wurde die Zellzahl nach 12, 24, 48, 72, 96 und 120 h durch Trypsinierung und Zählen in der Neubauerkammer bestimmt. Wie in Abbildung 3.3.6.4.C zu sehen, zeigten sich zumindest über den verfolgten Zeitraum von 5 Tagen keine signifikanten Unterschiede im Wachstum der Zellen. Abbildung 3.3.6.4.D zeigt repräsentativ eine Western-blot Analyse von Wildtyp- und *Parvb*$^{-/-}$-MEF. In mehreren Versuchen zeigten β-Parvin-defiziente MEF eine leicht erhöhte Expression von CyclinD1/2, was jedoch nicht konsistent zu beobachten war. Unverändert zeigten sich Phosphorylierung und Expression von Akt und GSK3. Ein Anstieg von α-Parvin-Protein wie in Herz und Skelettmuskel konnte in *Parvb*$^{-/-}$-MEF nicht beobachtet werden.

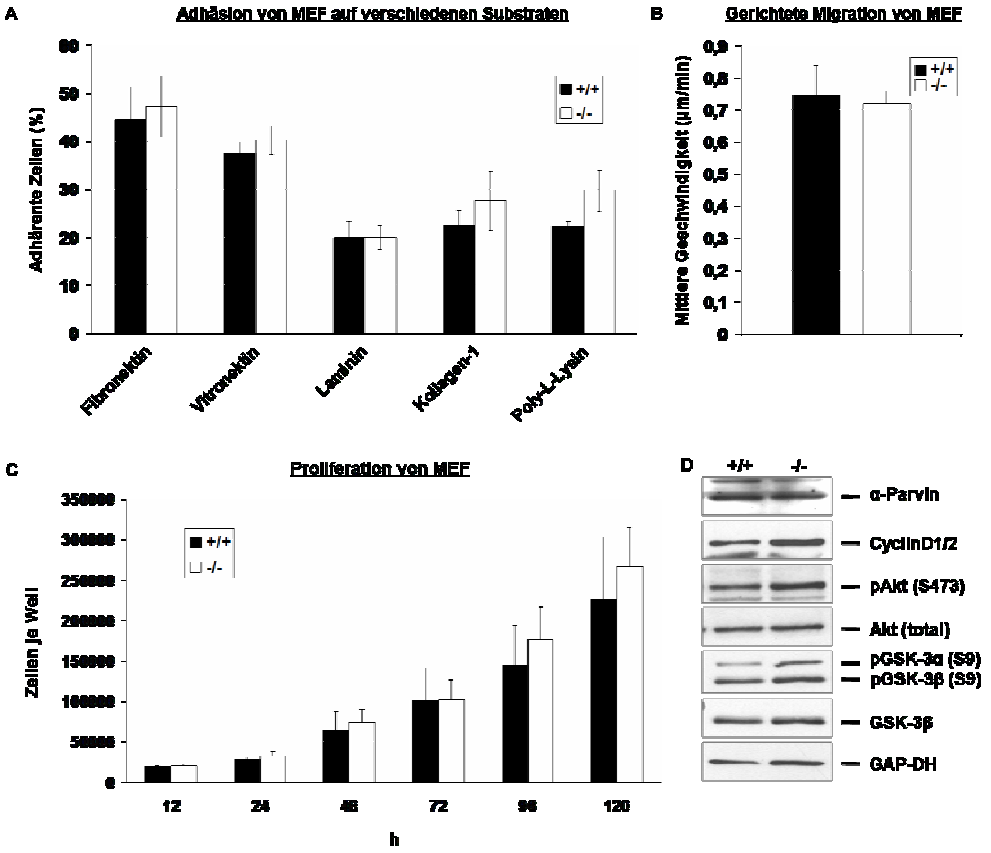


Abb. 3.3.6.4: Adhäsion, Migration und Proliferation von primären Wildtyp- und β-Parvin-defizienten MEF; A: Adhäsion auf verschiedenen Substraten (je 10 µg/ml), gezeigt ist der Prozentsatz adhärenter Zellen 20 min nach Ausplattierung, Kontrolle für Integrin-unabhängige Bindung: Poly-L-Lysin, n=4 (4 Präparationen v. MEF, je mit 3x-Bestimmung); B: Gerichtete Migration im in vitro-Wundheilungsversuch, gezeigt ist die mittlere Wanderungsgeschwindigkeit, errechnet aus der Verschlusszeit bei initialer Spaltbreite, n=6 (6 Präparationen v. MEF, je mit 2x-Bestimmung); C: Proliferation, gezeigt ist die Zellzahl über die Zeit, bestimmt in der Neubauerkammer, nach initialer Ausplattierung von 3x 10^4 Zellen je 24-Well, n=6 (6 Präparationen v. MEF, je mit 3x Bestimmung); D: Western-blot Analyse von primären MEF, Ladekontrolle: GAP-DH, Gesamtprotein je Spur: 20 µg, SDS-PAGE: 10% Acrylamid; Fehlerbalken geben die Standardabweichung an, Zellen: 3. Passage

β-Parvin-defiziente, *in vitro* differenzierte Makrophagen

Das Fehlen von α-Parvin in Makrophagen (Chu et al., 2006) machte diese für die Analyse möglicher β-Parvin-Funktionen interessant. Um ausreichende Mengen der Zellen zu gewinnen, wurde daher Knochenmark aus Femuren von Wildtyp- und *Parvb*$^{-/-}$-Mäusen isoliert und in Anwesenheit von „Makrophagen Kolonie-stimulierendem Faktor" (M-CSF) 8 Tage expandiert. Die so differenzierten Makrophagen wurden auf ihre Morphologie, ihr Spreitverhalten sowie biochemisch untersucht.

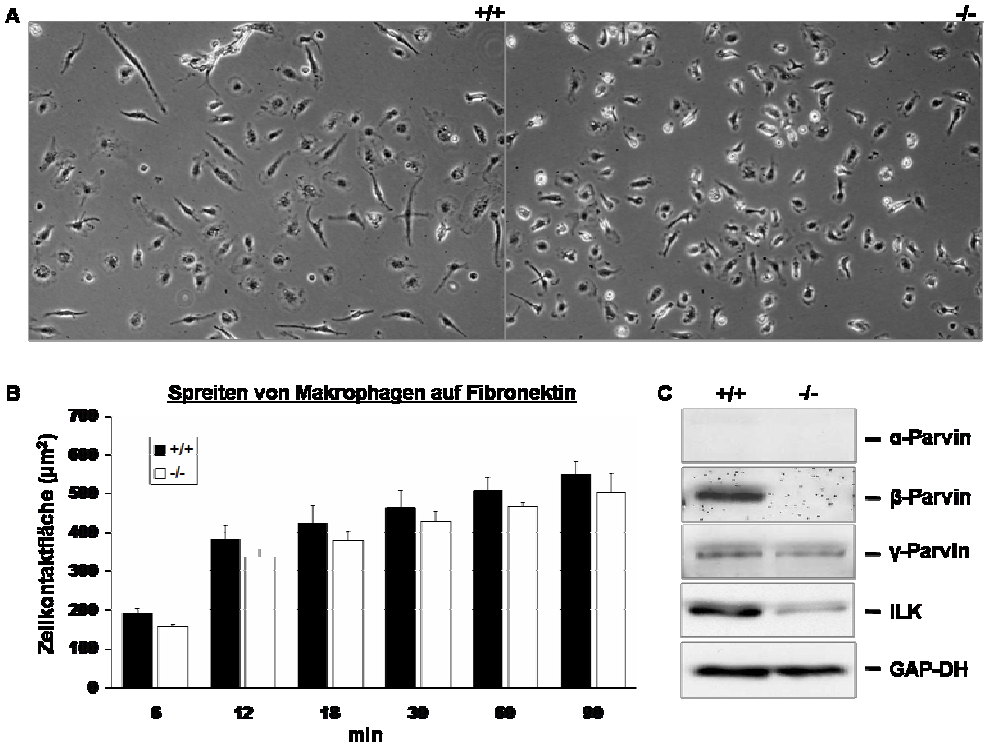


Abb. 3.3.6.5: Charakterisierung von Wildtyp- und β-Parvin-defizienten, in Anwesenheit von M-CSF aus Knochenmark differenzierten Makrophagen; A: Morphologie auf Fibronektin (FN, 10 µg/ml) am Tag 9 der Kultur, Phasenkontrast, Vergrößerung: 10x; B: Zeitlicher Verlauf des Zellspreitens nach Ausplattierung auf FN, Videomikroskopie über 90 min, Messung der Zell-Substrat-Kontaktfläche mit Metamorph, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung, n=6 (Je Genotyp 4 veschiedene Präparationen in 3 Experimenten mit jeweils 2 Präparationen, je Präparation 2 Bildausschnitte mit 20 Zellen je Bildausschnitt); C: Expressionsanalyse von ILK und Parvinen in Wildtyp- und β-Parvin-defizienten Makrophagen mittels Western-blot, GAP-DH als Ladekontrolle, SDS-PAGE: 10% Acrylamid

Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.3.6.5 wiedergegeben. β-Parvin-defiziente Makrophagen zeigten keine konsistenten morphologischen Veränderungen gegenüber den Wildtypen (Abb. 3.3.6.5.A). Unabhängig vom Genotyp wurden vorranging Zellen mit ausgeprägt runder Morphologie beobachtet. Jedoch wurde weiterhin auch eine große Zahl von Zellen mit stark spindelförmiger Morphologie beobachtet, wiederum unabhängig vom Genotyp der Zellen. Ein beeinträchtigtes Spreiten konnte wie schon bei den primären MEF auch hier nicht

beobachtet werden (Abb. 3.3.6.5.A und 3.3.6.5.B). Die zeitabhängige Messung der Zell-Substrat-Kontaktfläche mittels Videomikroskopie über einen Zeitraum von 90 Minuten zeigte zudem keinen signifikant verzögerten Verlauf des Spreitens, obwohl die Werte der β-Parvin-defizienten Makrophagen durchweg unter denen der Wildtyp-Zellen lagen (Abb. 3.3.6.3.B). Die biochemische Charakterisierung der Zellen im Hinblick auf Komponenten des ILK/PINCH/Parvin-Komplexes zeigte keine sichtbare Induktion von α-Parvin, sowie auch keine sichtbare Zunahme von γ-Parvin-Protein unter β-Parvin-Defizienz (Abb. 3.3.6.3.C). Hiermit konsistent konnte aber eine deutliche Reduktion von ILK-Protein in den *Parvb*$^{-/-}$-Makrophagen beobachtet werden.

In vivo-Adhäsion β-Parvin-defizienter Makrophagen in der Milz

Eine Analyse der Adhäsion β-Parvin-defizienter Makrophagen wurde *in vivo* durchgeführt. Hierzu wurden verschiedene Populationen von Makrophagen in der Milz, assoziiert mit der Marginalzone am Übergang zwischen weißer und roter Pulpa, mittels Immunfluoreszenz auf ihre Lokalisation im Gewebe hin untersucht. Da diese Makrophagen im Blutfluss von weißer zu roter Pulpa sitzen, bedarf ihre korrekte Lokalisation einer funktionierenden Adhäsion. Kryoschnitte von Wildtyp- bzw. *Parvb*$^{-/-}$-Milz wurden gegen MOMA-1-positive Makrophagen gefärbt, die die Grenze zwischen weißer Pulpa und Marginalzone markieren, gegen MARCO-positive Makrophagen, die die Marginalzone selbst markieren, sowie gegen F4/80-positive Makrophagen, die in der roten Pulpa sitzen. Der Gewebe-Hintergrund wurde unter Verwendung eines panLaminin-Antikörpers visualisiert.

Die Abbildungen 3.5.3.2-3.5.3.5 zeigen die Ergebnisse der Versuche, zusammengefasst mit den Ergebnissen für β-/γ-Parvin-doppeldefiziente Tiere. Letztere sollen jedoch in Abschnitt 3.5.3.2 besprochen werden. Abbildung 3.5.3.2 zeigt die Lokalisation MOMA-1-positiver Wildtyp-Makrophagen am Übergang von weißer Pulpa zur Marginalzone, wie in der Überblendung mit der Lamininfärbung zu erkennen. Eine vergleichbare Lokalisation und Anzahl der Zellen wurde auch unter β-Parvin-Defizienz beobachtet. Die Färbung MARCO-positiver Makrophagen zeigte die korrekte Lokalisation von Wildtyp- wie auch *Parvb*$^{-/-}$-Zellen in der Marginalzone selbst. Eine verringerte Zahl von Zellen konnte unter β-Parvin-Defizienz hier ebenfalls nicht beobachtet werden (Abb. 3.5.3.3). Wie in Abbildung 3.5.3.4 zu sehen, zeigte auch die Färbung F4/80-positiver Makrophagen in der roten Pulpa vergleichbare Ergebnisse für Lokalisation und Anzahl von Wildtyp- und β-Parvin-defizienten Zellen. Wie in Abbildung 3.5.3.5 bei höherer Vergrößerung weiterhin zu erkennen, zeigten die Makrophagen der verschiedenen Populationen unter Wildtyp- wie β-Parvin-defizienten Bedingungen stets

vergleichbare Morphologie, insbesondere charakterisiert durch weitreichende Zellfortsätze. Eine Beeinträchtigung der Adhäsion von Marginalzonenmakrophagen unter β-Parvin-Defizienz wurde also nicht festgestellt.

In vivo-Migration, β-Parvin-defizienter, *in vitro* differenzierter Dendritischer Zellen

Die Migration unter β-Parvin-Defizienz wurde weiterhin an aus Knochenmark differenzierten Dendritischen Zellen (DC) untersucht. Analog zur Generierung von Makrophagen wurden Knochenmarkzellen über einen Zeitraum von 9 Tagen expandiert, hier jedoch in Anwesenheit von „Granulozyten/Makrophagen Kolonie-stimulierendem Faktor" (GM-CSF). Die Stimulierung bzw. Reifung der Zellen erfolgte durch Zugabe von Lipopolysacchariden in das Medium und Inkubation über Nacht. Mit TAMRA als rotem und CFSE als grünem Farbstoff wurden die reifen DC dann genotyp-spezifisch Fluoreszenz-markiert. Anschließend wurden die Zellen 1:1 gemischt und Empfänger-Mäusen subkutan in die Fußsohle injiziert. 48 h nach Injektion wurden die in der Kniekehle sitzenden poplietalen Lymphknoten der Tiere entnommen. Nach Präparation von Kryoschnitten erfolgte eine fluoreszenzmikroskopische Analyse der interstitiell in die Lymphknoten migrierten Wildtyp- und *Parvb*$^{-/-}$-DC. Abbildung 3.3.6.6.A zeigt den T-Zell-Kortex eines poplietalen Lymphknotens nach Einwanderung von Wildtyp-DC (TAMRA, rot) und β-Parvin-defizienten DC (CFSE, grün) bei 20-facher Vergrößerung. Die Verteilung sowie die Zahl der Wildtyp- und *Parvb*$^{-/-}$-DC zeigte keine erkennbaren Unterschiede. Bei 40-facher Vergrößerung zeigte sich zudem eine vergleichbare Morphologie von Wildtyp- und β-Parvin-defizienten DC, ähnlich den Marginalzonenmakrophagen gekennzeichnet durch eine Vielzahl weitreichender, teils verzweigter Zellfortsätze. Wenngleich zum Zeitpunkt der Einreichung der Arbeit keine Quantifizierung der Migration durch FACS-Analyse oder Auszählen der markierten Zellen vorlag, konnte eine grobe Beeinträchtigung der interstitiellen Migration von DC unter β-Parvin-Verlust somit ausgeschlossen werden. Die biochemische Analyse der Parvin- und ILK-Expression in DC zeigte ein den Makrophagen sehr ähnliches Bild (Abb. 3.3.6.6.B). Es wurde weder eine Induktion von α-Parvin, noch eine konsistente Zunahme von γ-Parvin in den *Parvb*$^{-/-}$-DC beobachtet. Jedoch war auch hier ein Abfall des ILK-Proteins zu sehen, wenngleich dieser stets schwächer schien als in *Parvb*$^{-/-}$-Makrophagen (Abb. 3.3.6.5.C).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die hier durchgeführten Analysen zur Morphologie und zum Adhäsions-, Spreit- und Migrationsverhalten β-Parvin-defizienter Zellen keinen deutlichen Phänotypen gezeigt haben. β-Parvin-defiziente Makrophagen

zeigten *in vitro* und *in vivo* eine normale Morphologie, ein normales Spreiten *in vitro* sowie funktionale Adhäsion *in vivo*. Auch β-Parvin-defiziente DC zeigten keine veränderte Morphologie oder beeinträchtigte Migration *in vivo*. Jedoch konnte in beiden Zelltypen, anders als in Herz- oder Skelettmuskel keine Stabilisierung des ILK-Proteins durch eine Zunahme bzw. biochemische Kompensation eines anderen Parvins beobachtet werden. Vielmehr resultierte der β-Parvin-Verlust in einer Reduktion von ILK-Protein. Eine Bindung der adhäsions- bzw. migrationsrelevanten PIX-Proteine an α-Parvin konnte im direkten Vergleich mit β-Parvin nicht beobachtet werden. Dennoch zeigten β-Parvin-defiziente primäre MEF keine morphologischen Veränderungen, etwa des F-Aktins oder der Adhäsionsstrukturen. Auch wurde keine funktionale Beeinträchtigung von Adhäsion und Migration sowie Proliferation beobachtet.

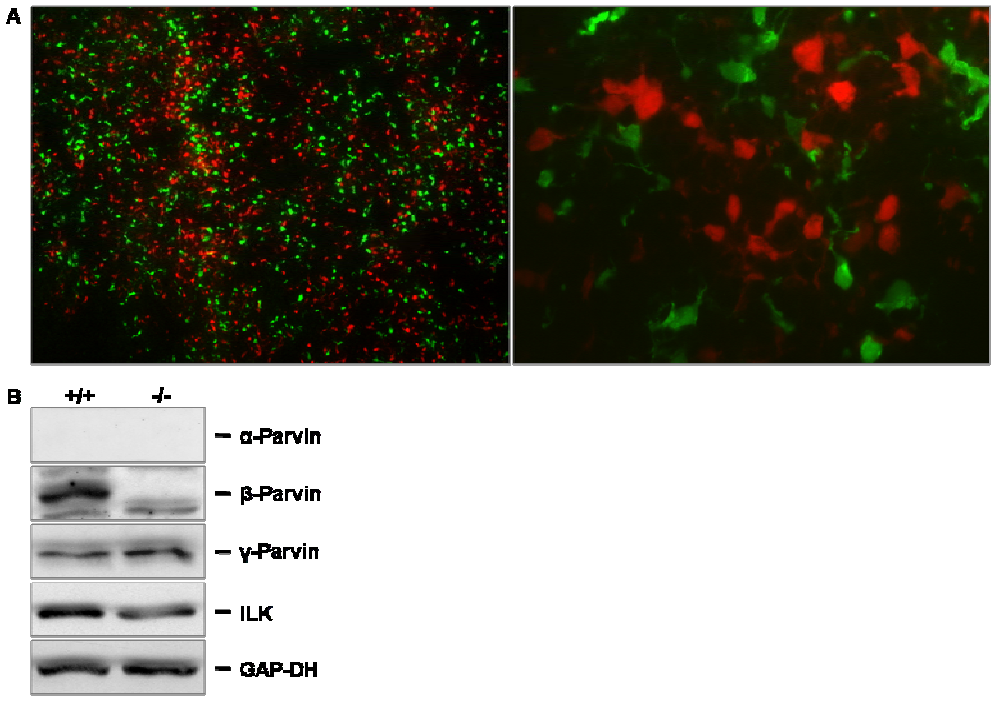


Abb. 3.3.6.6: In vivo-Migration sowie ILK- und Parvin-Expression Wildtyp- und β-Parvin-defizienter, unter GM-CSF aus Knochenmark differenzierter Dendritischer Zellen (DC); A: T-Zell-Kortex eines poplietalen Lymphknotens einer DC-Empfängermaus bei 20x (links) bzw. 40x (rechts) Vergrößerung, 48 h nach Injektion von Wildtyp- (TAMRA, rot) und β-Parvin-defizienten (CFSE, grün) DC in einer 1:1-Suspension, anschließender Entnahme der Lymphknoten aus dem Versuchstier und Präparation von Kryoschnitten (8 µm); B: Expressionsanalyse von ILK und Parvinen in Wildtyp- und β-Parvin-defizienten DC mittels Western-blot, GAP-DH als Ladekontrolle, SDS-PAGE: 10% Acrylamid

3.4 Quantitative Analysen der *in vivo* Migration γ-Parvin-defizienter Leukozyten

Die Generierung einer γ-Parvin-defizienten Mauslinie wurde von Frau Dr. Haiyan Chu im Rahmen ihrer Promotion in der Abteilung für Molekulare Medizin durchgeführt, sie ist nicht

Teil dieser Arbeit (Chu et al., 2006). Hierbei handelt es sich um eine Linie mit konstitutiver funktionaler Zerstörung von *Parvg*. Im Rahmen dieser Arbeit wurden jedoch verschiedene *in vivo*-Migrationsversuche mit γ-Parvin-defizienten hämatopoetischen Zellen durchgeführt. Zum einen wurden die Einwanderung γ-Parvin-defizienter T- sowie B-Lymphozyten in Milz und Lymphknoten sowie die interstitielle Migration von γ-Parvin-defizienten DC mittels FACS-Analyse quantitativ untersucht (vgl. 2.2.16-18).

In vivo-Migration, γ-Parvin-defizienter, *in vitro* differenzierter Dendritischer Zellen

Analog zur Migrationsanalyse β-Parvin-defizienter DC wurde diese auch für γ-Parvin-defiziente DC durchgeführt (vgl. 3.3.6). Wie bereits unter β-Parvin-Defizienz beobachtet, zeigten auch γ-Parvin DC in der histologischen Analyse eine den Wildtyp-DC vergleichbare interstitielle Migration in die poplietalen Lymphknoten nach 48 h (Chu et al., 2006). Um eine eventuell verlangsamte oder beschleunigte Migration unter γ-Parvin-Defizienz auszuschließen, wurde im nächsten Schritt eine quantitative Analyse der Einwanderung nach 24 h und 48 h durchgeführt. Hierfür wurden die Lymphknoten der Empfängertiere nach Entnahme durch einen Zellfilter passagiert und im FACS das Verhältnis rot- zu grün-fluoreszenter Zellen, bzw. umgekehrt bestimmt. Abbildung 3.4 zeigt den Quotienten aus Wildtyp/*Parvg*$^{-/-}$ -DC nach 24h und 48 h. Zu keinem der beiden Zeitpunkte konnte eine signifikante Abweichung von 1 beobachtet werden. Die quantitative Auswertung zeigte somit eine normale interstitielle Migration γ-Parvin-defizienter DC.

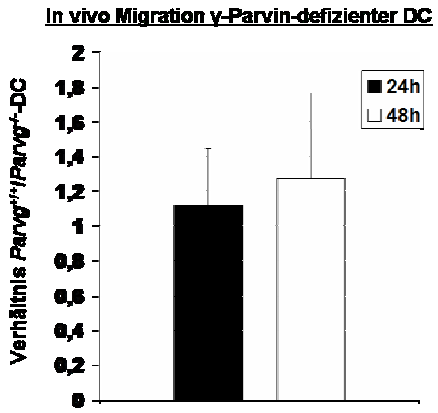


Abb. 3.4.1: Quantitative FACS-Analyse der interstitiellen Migration Wildtyp- und γ-Parvin-defizienter Dendritischer Zellen; 24h bzw. 48h nach Injektion Genotyp-spezifisch Fluoreszenz-markierter Wildtyp- und Parvg$^{-/-}$-DC in die Fußsohle von Empfängermäusen erfolgte die Isolierung und FACS-Messung von Zellen der poplietalen Lymphknoten; Fehlerbalken zeigen den SEM, Ergebnisse gemittelt aus 5 Versuchen mit je 3-6 Tieren

Einwanderung γ-Parvin-defizienter T- und B-Lymphozyten in Milz und Lymphknoten

Aufgrund der von Liu et al. (2005) beschriebenen Funktion von ILK für die T-Zell-Chemotaxis sowie der Expression von γ-Parvin als einzige Parvin-Isoform in Lymphozyten wurde die Einwanderung von intravenös injizierten T- und B-Lymphozyten in die Milz sowie verschiedene Lymphknoten unter γ-Parvin-Defizienz quantitativ untersucht. Hierfür wurden Einzelzellsuspensionen von Wildtyp- und γ-Parvin-defizienten Mäusen Genotyp-spezifisch Fluoreszenz-markiert, im Verhältnis 1:1 gemischt und Empfängermäusen in die Schwanzvene injiziert. Es wurde Kurz- und Langzeit-Einwanderung in Milz und Lymphknoten gemessen mittels FACS-Analyse von Einzelzellsuspensionen der Zielorgane unter Auszählung in beiden Fluoreszenzkanälen nach vorheriger T- bzw. B-Zell-Färbung. Die Abbildungen 3.4.2.A und B zeigen jeweils das Verhältnis von Wildtyp- zu γ-Parvin-defizienten Lymphozyten. Weder in Milz noch Lymphknoten konnte eine reduzierte oder erhöhte Einwanderung von T- oder B-Zellen unter γ-Parvin-Defizienz beobachtet werden. Dies gilt für die Kurz- wie auch Langzeit-Einwanderung. Somit zeigten γ-Parvin-defiziente B- und T-Lymphozyten eine normale Kurzzeit-Einwanderung sowie Zirkulation in Milz und Lymphknoten.

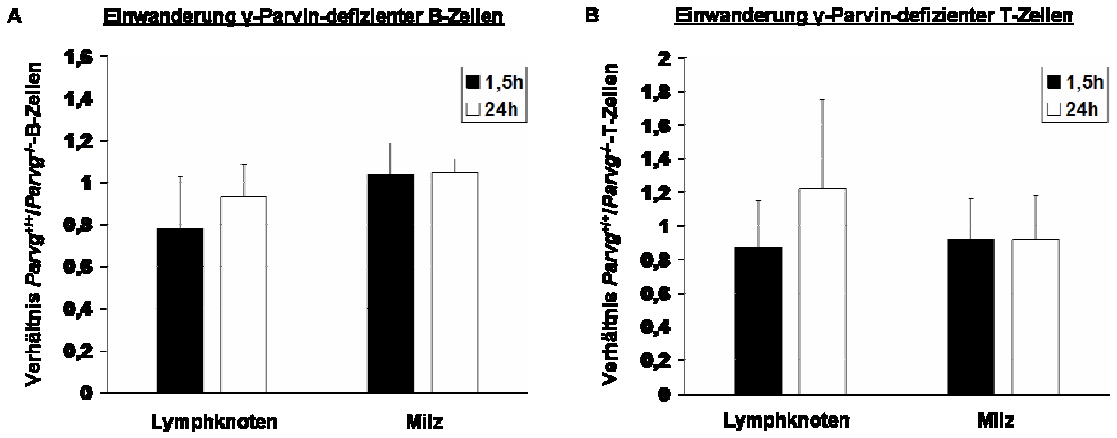


Abb. 3.4.2: Einwanderung intravenös injizierter Wildtyp- und Parvg$^{-/-}$-Lymphozyten in die Milz und Lymphknoten; Gezeigt ist das Verhältnis von Wildtyp- zu Parvg$^{-/-}$-Lymphozyten; Bestimmt wurde die Kurz- und Langzeit-Einwanderung unter Auszählung fluoreszenter Lymphozyten in Einzelzellsuspensionen von Milz und Lymphknoten nach T- bzw. B-Zell spezifischer Immunfärbung im FACS, Fluoreszenz-Markierung: Genotyp-spezifisch sowie kreuzweise mit CFSE und TAMRA, brachiale, axilläre und inguinale Lymphknoten wurden vereinigt; A: Einwanderung von B-Lymphozyten nach 1,5 h und 24 h, B-Zell-Marker: B220; B: Einwanderung von T-Lymphozyten nach 1,5 h und 24 h, T-Zell-Marker: CD3; Fehlerbalken zeigen den SEM, Ergebnisse gemittelt aus 3 Versuchen mit je 3-6 Tieren, Werte sind bereinigt um das Verhältnis von Wildtyp- zu γ-Parvin-defizienten B- bzw- T-Zellen in der Mischung vor Injektion (vgl. 2.2.17-18)

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass keine beeinträchtige Wanderung von Leukozyten unter γ-Parvin-Defizienz beobachtet werden konnte. Dies gilt für die interstitielle

Migration von Dendritischen Zellen sowie für die Einwanderung von Lymphozyten in Milz und Lymphknoten.

3.5 Generierung und initiale Analysen β-/γ-Parvin-doppeldefizienter Mäuse

Die Koexpression von β- und γ-Parvin in verschiedenen Zellen des hämatopoetischen Systems stellte, besonders aufgrund fehlender offensichtlicher Phänotypen in myeloiden Zellen unter β-Parvin- oder γ-Parvin-Defizienz, die Frage nach möglicher Redundanz der beiden Parvine. Dieser Frage sollte nach Depletion beider Proteine weiter nachgegangen werden. Zudem ermöglichte dies die Generierung vollständig Parvin-defizienter Zellen, was unter Doppeldefizienz von α- und β-Parvin aufgrund der Letalität α-Parvin-defizienter Tiere nicht möglich war. Unter Doppeldefizienz von β- und γ-Parvin galt besonderes Augenmerk wiederum myeloiden Zellen.

3.5.1 Generierung einer β-/γ-Parvin-doppeldefizienten Mauslinie

Die gruppierte Lokalisation von *Parvb* und *Parvg* auf Chromosom 15E3 (Abb. 3.5.1.1), direkt benachbart durch nur 12 kb voneinander getrennt, machte eine Seggregation der beiden Gene während der Meiose extrem unwahrscheinlich. Daher erschien eine Verpaarung der β- und γ-Parvin-Einzelmutanten zur Depletion beider Proteine nicht sinnvoll. Es wurden rekombinante Allele beider Gene sequenziell über homologe Rekombination in die ES-Zellen eingeführt. Zunächst wurde ein *Parvg*-Allel mit einem loxP-Sequenz-flankierten Exon und einer Kassette mit Neomyzin-Resistenz sowie Thymidin-Kinase-cDNA zur Negativselektion eingeführt (p*Parvg*^{fl}). Hier wurde eine konditionale Deletionsstrategie gewählt, da zu diesem Zeitpunkt der Phänotyp unter konstitutiver γ-Parvin-Defizienz noch nicht bekannt war und eine Letalität nicht auszuschließen war. Im nächsten Schritt wurde die Selektionskassette mittels Cre-Rekombinase *in vitro* deletiert, Klone wurden hier negativ selektiert. Dann wurde p*Parvb* eingeführt, Klone konnten jetzt erneut unter Neomyzin selektiert werden. Nach Blastozysten-Injektion wurden die Nachkommen aus den Verpaarungen verschiedener Chimären auf Ko-Seggregation beider rekombinanter Allele getestet um zu prüfen, ob die Rekombinationsereignisse für beide Gene auf demselben Chromosom stattgefunden hatten. Anschließend wurde das loxP-flankierte *Parvg*-Exon durch Einkreuzen einer „Deleter-Cre“-Linie deletiert und *Parvb*$^{+/-}$/*Parvg*$^{+/-}$-Tiere untereinander verpaart.

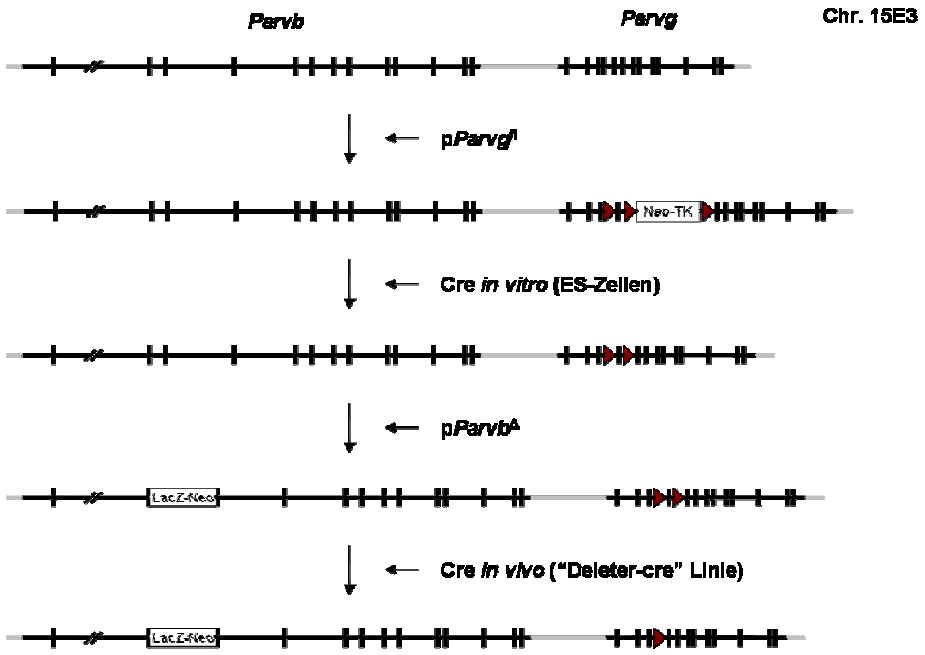


Abb. 3.5.1.1: Schema zur Doppeldeletion von Parvb und Parvg auf ES-Zell-Ebene bzw. in vivo; Parvb und Parvg liegen auf Chromosom 15E3, getrennt durch nur 12 kb genomische Sequenz

Deletionsstrategie und Genotypisierung

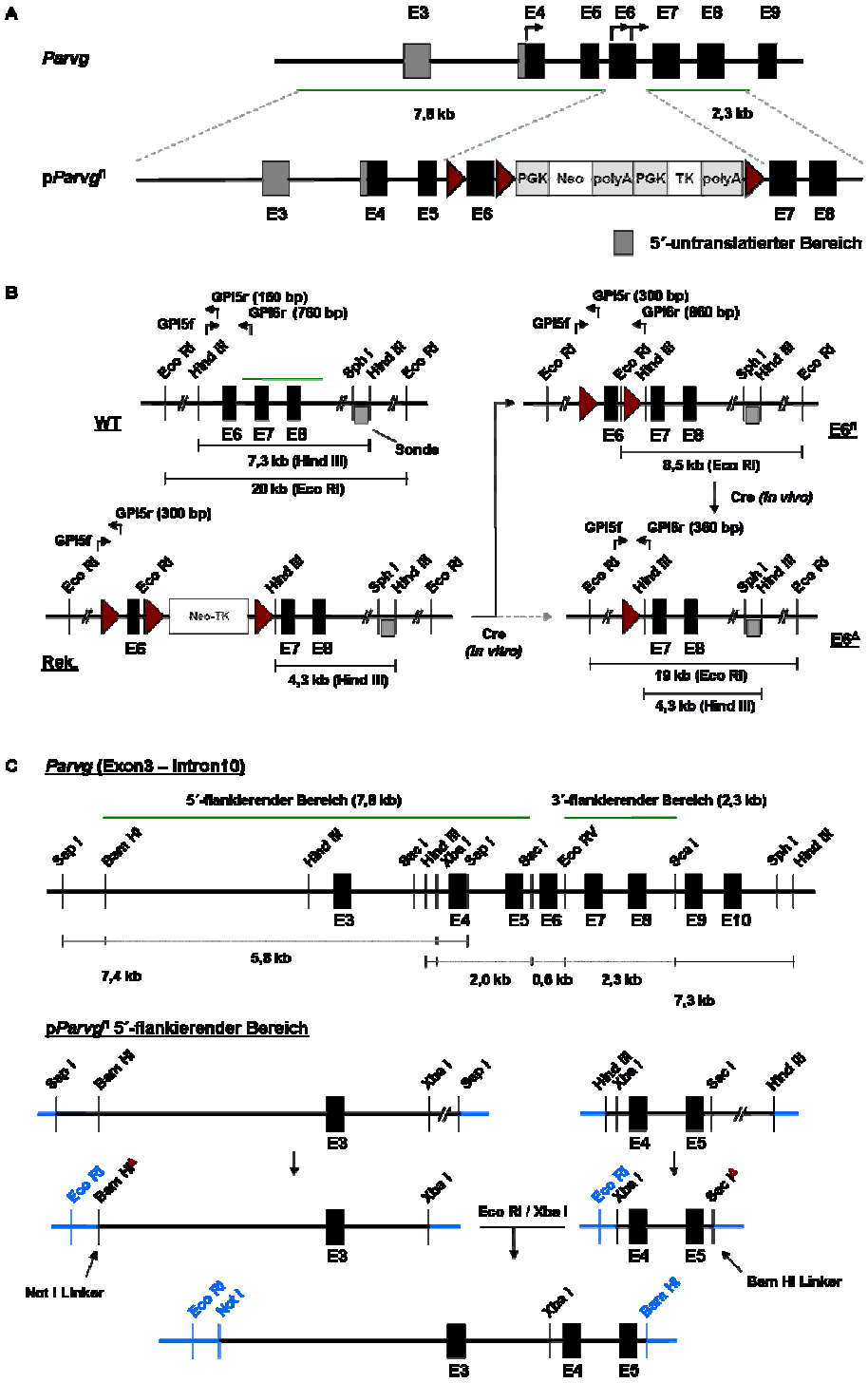
Wie in Abbildung 1.5.1.C dargestellt, trägt *Parvg* sein primäres Translationsinitiationskodon in Exon4. Jedoch wurde bei der EST-Suche ein alternatives Spleißen des untranslatierten Exon3 an Exon5 beobachtet, so dass das folgende ATG-Kodon bzw. die nächstfolgenden, zwei in Exon6 potentielle Startkodons darstellen. Daher wurde für die konditionale Modifikation von *Parvg* nicht Exon4, sondern Exon6 mit loxP-Sequenzen flankiert. Nach Spleißen von Exon5 an Exon7 bei deletiertem Exon6 käme es zu einer Leserasterverschiebung und als Folge dessen zur Termination der Translation nach weiteren 15 Aminosäuren.

Abbildung 3.5.1.2.A zeigt die konditionale Modifikation von *Parvg*. Mit der loxP-Flankierung von Exon6 wurde weiterhin eine Neomyzin/Thymidin-Kinase-Selektionskassette in Intron6 eingeführt, gefolgt von einer weiteren loxP-Sequenz. Kodierende Sequenz wurde nicht entfernt. Der 5´-flankierende homologe Bereich des p*Parvg*^{fl}-Konstruktes erstreckte sich über 7,8 kb weit in die 5´-untranslatierte Region des Gens. Die 3´-homologe Region reichte mit 2,3 kb bis in Intron8 hinein.

Abbildung 3.5.1.2.B zeigt schematisch die Genotypisierung der verschiedenen *Parvg*-Allele mittels Southern-blot und PCR. Die Unterscheidung des Wildtyp- und rekombinanten *Parvg*-Allels nach initialer p*Parvg*^{fl}-Rekombination erfolgte mittels Hind III-Verdau. Die in Intron3

gelegene, endogene Hind III-Schnittstelle ermöglichte die Detektion eines 7,3 kb großen Wildtyp-Fragments, während die Einführung einer neuen Hind III-Schnittstelle nahe der 3´-gelegenen loxP-Sequenz die Detektion eines 4,3 kb großen rekombinanten Fragments ermöglichte. Die Hybridisierung mit einer internen Sonde gegen das Neomyzin-Resistenzgen diente dem Ausschluss von ES-Zellklonen mit ungerichteter Integration des Konstruktes. Weiterhin konnte mit dem GPI5f/GPI5r-Primerpaar auf die Präsenz der 5´-gelegenen loxP-Sequenz (300 bp) geprüft werden, um Klone mit Verlust dieser Sequenz durch die homologe Rekombination (160 bp) zu verwerfen. Die Genotypisierung von ES-Zellklonen nach Cre-vermittelter Exzision der Selektionskassette erfolgte durch Hybridisierung mit der externen Sonde nach Eco RI-Verdau. Die Größe des so detektierten Wildtyp-Fragments betrug 20 kb. Aufgrund einer mit der Selektionskassette eingeführten neuen Eco RI-Schnittstelle betrug die Größe des Allels mit korrekt deletierter Selektionskassette und präsentem loxP-flankiertem Exon6 8,5 kb. Bei fälschlicher Entfernung der Selektionskassette mit dem loxP-flankierten Exon betrug die Fragmentgröße 19 kb. Neben dem GPI5f/GPI5r-Primerpaar zur Unterscheidung des Wildtyp-Allels und des loxP-flankierten Exon6 ermöglichte die Kombination von GPI5f- und GPI6r-Primer die Detektion des Wildtyp-Allels anhand eines 760 bp großen Amplikons, des loxP-flankierten Exon6 anhand eines 960 bp großen Amplikons und des *in vivo* deletierten Exon6 anhand eines 360 bp großen Fragmentes. Beide Primer-Kombinationen wurden zur Überprüfung der Exon6-Deletion *in vivo* eingesetzt. Die Genotypisierung von Mäusen erfolgte unter Verwendung des GPI5f/GPI6r-Primerpaares.

Abbildung 3.5.1.2.C fasst die Klonierung des p*Parvg*^{fl}-Konstruktes zusammen, die ausgehend von zwei Subklonen erfolgte. Dies waren ein 7,4 kb großer Sap I-Subklon zur Klonierung von Teilen des 5´-flankierenden Armes sowie ein 7,3 kb großer Hind III-Subklon für den 5`-flankierenden Arm, Exon6 mit Selektionskassette und den 3´-flankierenden Arm. Zunächst wurden ein 5,8 kb großes Bam HI/Xba I-Fragment des Sap I-Klons und ein 2,0 kb großes Xba I/Sac I-Fragment des Hind III-Klons, unter zusätzlicher Einbringung eines Bam HI-Linkers, zum 5´-flankierenden Bereich fusioniert. Exon6 wurde mittels Ecl 136II/Eco RV-Verdau aus dem Hind III-Klon geschnitten und in die Hinc II-Schnittstelle des pBS-loxP-Plasmides gesetzt. Der 3´-flankierende Bereich wurde mittels Eco RV/Sca I-Verdau in die Hinc II-Schnittstelle des pBS-Vektors gesetzt und nach Cla I/Xho I-Verdau 3´-gelegen hinter die Selektionskassette in das pBS-loxp-Neo/TK-loxP-Plasmid kloniert. Nach Einführen eines Kpn I-Linkers wurde dieses Konstrukt in die Kpn I-Schnittstelle des loxP/Exon6-Plasmides kloniert. Die Fusionierung des so modifizierten Teils von *Parvg* mit dem 5´-flankierenden Arm zum finalen p*Parvg*^{fl}-Konstrukt erfolgte über einen Not I/Bam HI-Verdau.


A
Parvg
E3
E4
E6
E6
E7
E8
E9
7,8 kb
2,3 kb
pParvgfl
PGK
Neo
polyA
PGK
TK
polyA
E3
E4
E5
E6
E7
E8
5'-untranslatierter Bereich
B
WT
GPI5f
GPI5r (180 bp)
GPI6r (760 bp)
Eco RI
Hind III
Sph I
Hind III
Eco RI
E6
E7
E8
Sonde
7,3 kb (Hind III)
20 kb (Eco RI)
E6fl
GPI5r (300 bp)
GPI6r (860 bp)
8,5 kb (Eco RI)
Cre (in vivo)
Rek.
GPI5r (300 bp)
Neo-TK
4,3 kb (Hind III)
Cre
(in vivo)
E6Δ
GPI6r (360 bp)
19 kb (Eco RI)
4,3 kb (Hind III)
C
Parvg (Exon3 – Intron10)
5'-flankierender Bereich (7,8 kb)
3'-flankierender Bereich (2,3 kb)
Sap I
Bam HI
Hind III
Sac I
Hind III
Xba I
Sap I
Sac I
Eco RV
Sca I
Sph I
Hind III
E3
E4
E5
E6
E7
E8
E9
E10
7,4 kb
5,6 kb
2,0 kb
0,6 kb
2,3 kb
7,3 kb
pParvgfl 5'-flankierender Bereich
Sap I
Bam HI
Xba I
Sap I
Hind III
Xba I
Sac I
Hind III
E3
E4
E5
Eco RI
Bam HI
Xba I
Eco RI / Xba I
Eco RI
Xba I
Sac I
Not I Linker
Bam HI Linker
Eco RI
Not I
Xba I
Bam HI
E3
E4
E5

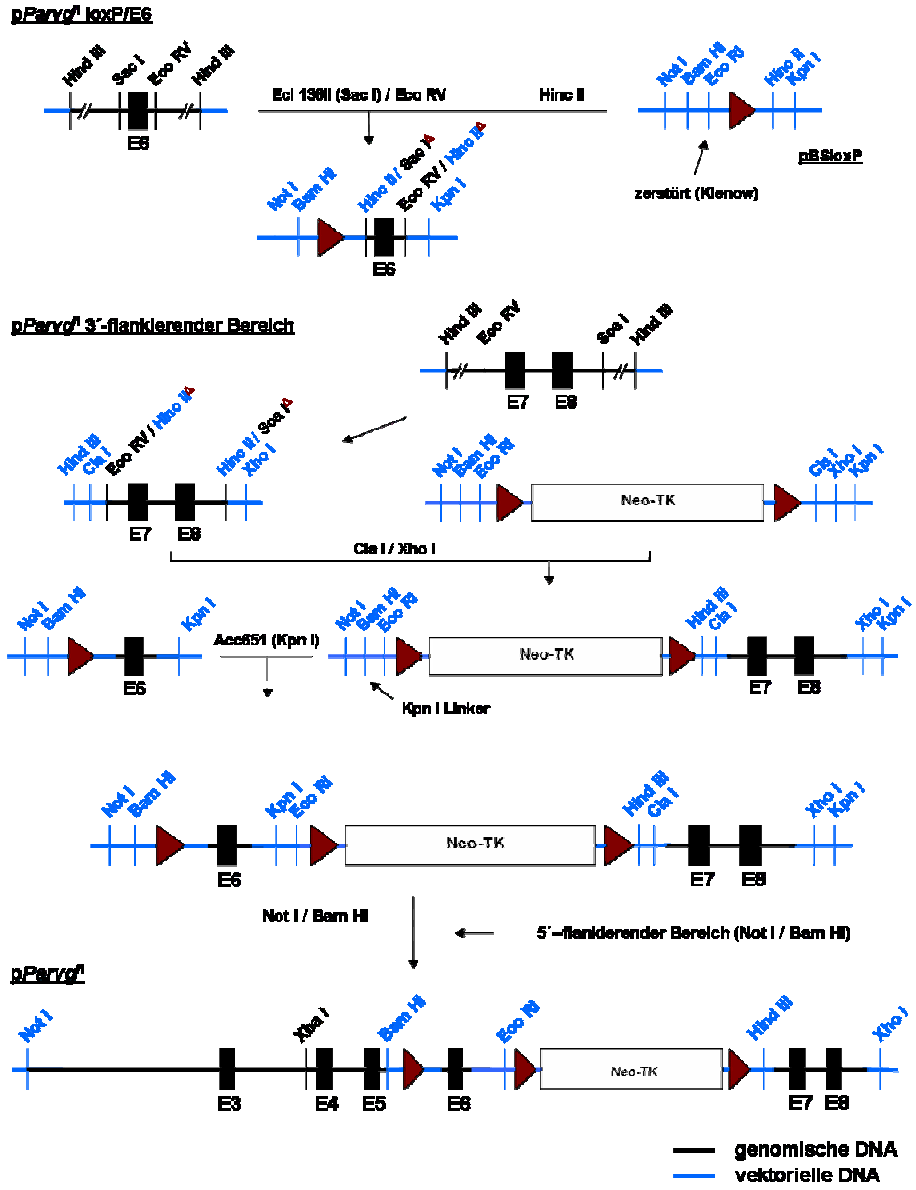


Abb. 3.5.1.2: Strategie zur konditionalen Modefikation bzw. Deletion von Parvg; A: Deletionskonstrukt pParvg^{fl}, Pfeile: (potentielle) Startkodons, Kassette: pBS-loxP-Neo-TK-loxP (Abb. 2.1.4); B: Genotypisierung von ES-Zellen bzw. Mäusen mittels Southern-blot nach Hind III oder Eco RI-Verdau sowie mittels PCR unter Verwendung der Primerkombinationen GPI5f/GPI5r bzw. GPI5f/GPI6r; C: Klonierung von pParvg^{fl}; 2 Subklone von 7,4 kb (5´-flankierender Arm) und 7,3 kb(5´-flankierender Arm, Exon6, 3´-flankierender Arm) dienten als Ausgangspunkt für die Klonierung; grün: Homologie-Regionen, rote Dreiecke: loxP-Sequenzen, Vektor: pBluescript II KS/SK

Doppeldeletion von *Parvb* und *Parvg*

Die Durchführung der Doppeldeletion von *Parvb* und *Parvg* erfolgte analog zur Deletion von *Parvb* (vgl. 3.3.1.2). Nach Not I-Linearisierung wurde das *Parvg*^{fl}-Allel in R1 ES-Zellen elektroporiert. Es wurde über einen Zeitraum von 6 Tagen mit Neomyzin selektiert. 360 ES-Zellklone wurden isoliert und auf 24-Well-Platten expandiert, eine Hälfte eingefroren, die

zweite Hälfte zur Isolierung von DNA weiter expandiert. Die DNA der Klone wurde mittels Southern-blot nach Hind III-Verdau auf homologe Rekombination getestet. Positive Klone, geprüft auf die Präsenz der 5´-gelegenen loxP-Sequenz und negativ getestet auf weitere ungerichtete Integration des Konstruktes wurden auf ihre Sensitivität gegen die FIAU-vermittelte Negativ-Selektion untersucht. Einige sensitive Klone wurden nach Cre-Elektroporation unter FIAU selektiert. Es wurden 240 Klone gepickt, expandiert, eingefroren und mittels Southern-blot nach Eco RI-Verdau charakterisiert. Positive Klone wurden auf ihre Keimbahnfähigkeit getestet. Dies erfolgte durch Blastozysten-Injektion und -Transfer sowie anschließender Verpaarung von chimären Männchen und Genotypisierung der Nachkommenschaft. In keimbahnfähige Klone wurde dann das *Parvb*$^{\Delta}$-Allel wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben eingeführt. Nach Blastozysten-Injektion und -Transfer (C57Bl/6J) eines positiven Klones wurde anhand der Seggregationsverhältnisse in der Nachkommenschaft der Chimären auf die Integration beider modifizierter Allele auf demselben Chromosom geprüft. Nach Verpaarung von *Parvb*$^{+/-}$/*Parvg*$^{+/fl}$-Tieren mit Deleter-Cre-Tieren wurde die Deletion von *Parvg* Exon6 PCR-basiert geprüft. Zum Erhalt von *Parvb*$^{-/-}$/*Parvg*$^{-/-}$-Tieren wurden *Parvb*$^{+/-}$/*Parvg*$^{+/-}$-Tiere untereinander verpaart. Die in den Abschnitten 3.5.2 und 3.5.3 gezeigten Versuche wurden an Tieren mit gemischtem genetischen Hintergrund (129/sv und C57Bl/6J) durchgeführt.

Abbildung 3.5.1.3.A zeigt in der oberen Darstellung repräsentativ einen Southern-blot nach Hind III-Verdau von ES-Zellklonen nach initialer *Parvg*^{fl}-Elektroporation, anhand dessen 6 der gezeigten 12 Klonen als homolog-rekombinant identifiziert wurden (Spuren 2, 5, 9-12). Insgesamt wurden 45 von 360 gepickten Klonen als homolog-rekombinant identifiziert (12,5%). Die zweite Darstellung zeigt die Detektion von ungerichteter Integration des Konstruktes in 2 der 14 gezeigten Klone (Spuren 7 und 12) nach Hind III-Verdau und Hybridisierung mit der Neomyzin-Sonde. Die untere Darstellung zeigt repräsentativ die Identifizierung von 2 der 10 gezeigten Klone (Spuren 1 und 4) als negativ für die 5´-gelegene loxP-Sequenz. LoxP-negative sowie Klone mit ungerichteter Integration wurden nicht weiter verwendet. Die rechte Darstellung zeigt eine Methylenblau-Färbung der Testkultur von 6 homolog-rekombinanten, loxP-positiven Klonen ohne ungerichtete Integration nach Inkubation in FIAU-haltigem Medium. Die Klone #28 und #251 zeigten die höchste Sensitivität gegen FIAU und versprachen damit eine effektive Negativselektion nach pICcre-Elektroporation. Daher wurden diese beiden Klone für die Cre-vermittelte Exzision der Selektionskassette verwendet.

Abbildung 3.5.1.3.B zeigt repräsentativ einen Southern-blot nach Eco RI-Verdau von 17 *Parvg* Subklonen von Klon #251 nach pICcre-Elektroporation und FIAU-Selektion. Nach Hybridisierung mit der externen *Parvg*-Sonde wurden 10 der gezeigten Klone (Spuren 1, 2, 6, 10-15, 17) als negativ für die Selektionskassette sowie positiv für Exon6 identifiziert. Insgesamt zeigten 137 der 240 gepickten Klone diesen Genotyp (57,1%). Je ein solcher Subklon von Klon #28 und #251 (#28.11, #251.11) wurde auf Keimbahnfähigkeit getestet. Die untere Darstellung von Abbildung 3.5.1.3.B zeigt die Genotypisierung von Tieren eines Wurfes aus chimärer Verpaarung von Klon #28.11 nach Eco RI-Verdau. 5 der 13 Tiere (Spuren 1, 3, 4, 9, 11) waren $Parvg^{+/fl}$, was die Keimbahnfähigkeit der ES-Zellen zeigte.

Der in Abbildung 3.5.1.3.C dargestellte Southern-blot zeigt die Identifizierung des einzigen homolog-rekombinanten von 800 gepickten ES-Zellklonen nach Einführung des p$Parvb^{\Delta}$-Konstruktes in $Parvg^{+/fl}$-Klone #28.11 und #251.11 (Spur 10). Die Durchführung erfolgte analog zu Abschnitt 3.3.1.

Abbildung 3.5.1.3.D zeigt das Ergebnis der PCR-basierten Genotypisierung von 18 Nachkommen aus chimären Verpaarungen nach Blastozysten-Injektion und Transfer des einzigen homolog-rekombinanten $Parvb^{+/-}/Parvg^{+/fl}$-Klons, von denen 9 $Parvb^{+/+}/Parvg^{+/+}$ und 9 $Parvb^{+/-}/Parvg^{+/fl}$ waren. Insgesamt wurden so 27 Nachkommen aus der Verpaarung von drei chimären Männchen genotypisiert, von denen 15 $Parvb^{+/+}/Parvg^{+/+}$ (56%) und 12 $Parvb^{+/-}/Parvg^{+/fl}$ (44%) waren. Diese nahezu gleiche Verteilung sowie das vollständige Fehlen von $Parvb^{+/-}/Parvg^{+/+}$- und $Parvb^{+/+}/Parvg^{+/fl}$-Nachkommen zeigte die Ko-Seggregation und die Integration der modifizierten *Parvb*- und *Parvg*-Allele auf demselben Chromosom.

Abbildung 3.5.1.3.E fasst die *in vivo*-Deletion von *Parvg* Exon6 zusammen. Diese wurde durch Verpaarung von $Parvb^{+/-}/Parvg^{+/fl}$-Tieren mit Tieren einer Deleter-Cre-Linie, die die Cre-Rekombinase in allen Zelltypen, so auch der Keimbahn exprimieren erreicht. Gezeigt ist die *Parvb*-Genotypisierung sowie die *Parvg*-Genotypisierung (GPI5f/GPI5r, zweite Darstellung von oben; GPI5f/GPI6r, dritte Darstellung von oben) in Abhängigkeit vom Cre-Genotyp von 4 Nachkommen dieser Verpaarungen. Die Spuren 1 und 2 zeigen Wildtyp-Tiere, Cre-negativ (Spur 1) bzw. Cre-positiv (Spur 2). Die Spuren 3 und 4 zeigen doppel-heterozygote Tiere, Cre-negativ (Spur 3) bzw. Cre-positiv (Spur 4). Die *Parvg*-Wildtyp-Signale (160 bp bzw. 760 bp) wurden unter Verwendung beider Primerpaare in allen 4 Tieren identifiziert. Das heterozygote, Cre-negative Tier zeigte nach Amplifizierung mit dem GPI5f/GPI5r-Primerpaar zusätzlich das 300 bp Amplikon des loxP-flankierten Exon6, nach Amplifizierung mit dem GPI5f/GPI6r-Primerpaar zusätzlich eine Bande bei ca. 900-1000 bp,

die der rechnerischen Größe des Fragments mit loxP-flankiertem Exon6 (960 bp) entsprach (vgl. Abb. 3.5.1.2.B). Mit der Expression von Cre-Rekombinase vor dem *Parvb*$^{+/-}$/*Parvg*$^{+/fl}$-Hintergrund wurden die Signale des Allels mit loxP-flankiertem Exon6 nicht mehr detektiert (Spur 4), jedoch wurde nach Amplifizierung mit dem GPI5f/GPI6r-Primerpaar nun das bei Deletion von Exon6 zu erwartende Fragment von 360 bp detektiert (vgl. 3.5.1.2.B). So identifizierte *Parvb*$^{+/-}$/*Parvg*$^{+/-}$-Tiere wurden untereinander verpaart, um *Parvb*$^{-/-}$/*Parvg*$^{-/-}$-Tiere für Analysezwecke zu erhalten.

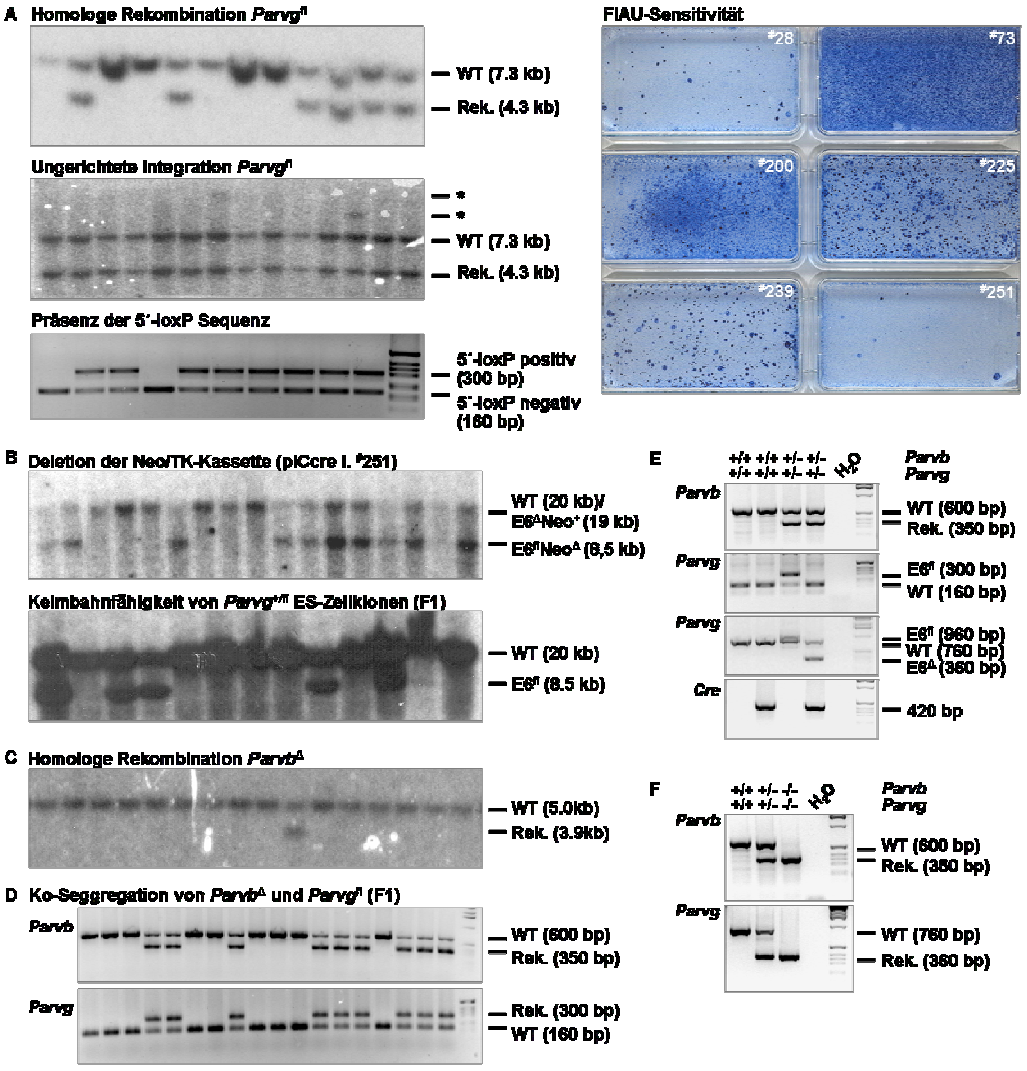


*Abb. 3.5.1.3: Doppeldeltion von Parvb und Parvg: A: Identifizierung homolog-rekombinanter ES-Zellklone nach pParvg^{fl}-Elektroporation, oben: Soutern-blot (Hind III-Verdau, externe Sonde, s. Abb. 3.5.1.2) von ES-Zellklonen nach pParvg^{fl}-Elektroporation und Neomyzin-Selektion, Mitte: Southern-blot (Hind III-Verdau, Neomyzin-Sonde) von homolog-rekombinanten (pParvg^{fl}) ES-Zellklonen, *: ungerichtete Integration, unten: PCR von homolog-rekombinanten ES-Zellklonen ohne ungerichtete Integration zum Test auf die 5´-gelegene loxP-Sequenz (Primer: GPI5f/GPI5r), rechts: Methylenblau-Färbung von Testkulturen 6 homolog-rekombinanter ES-Zellklone ohne ungerichtete Integration, mit 5´-loxP-Sequenz, für 6 Tage unter 2 µM FIAU; B: Cre-vermittelte Exzision der Neomyzin-Resistenz-Kassette, FIAU-Negativselektion, oben: Southern-blot (Eco RI-Verdau, Neomyzin-Sonde) von Subklonen von Klon #251 nach pICcre-Elektroporation und FIAU-Selektion,*

unten: Genotypisierung von F1-Tieren aus chimären Verpaarungen nach ES-Zell-Injektion/Blastozysten-Transfer Neomyzin-defizienter Klone zum Test auf Keimbahnfähigkeit; C: Homologe Rekombination von pParvb$^{\Delta}$ in Parvg$^{+/fl}$-Klonen, Southern-blot (Bam HI-Verdau, externe Sonde, s. Abb. 3.3.1.1.B) nach pParvb$^{\Delta}$-Elektroporation und Neomyzin-Selektion; D: Ko-Seggregation der modifizierten Parvb- und Parvg-Allele, PCR-Genotypisierung von F1-Nachkommen aus chimären Verpaarungen nach ES-Zell-Injektion/Blastozysten-Transfer eines Parvb$^{+/-}$Parvg$^{+/fl}$-Klons (Parvg: GPI5f/GPI5r); E: Deletion von Parvg Exon6 in vivo, PCR-Genotypisierung von Nachkommen aus Verpaarung von Parvb$^{+/-}$Parvg$^{+/fl}$-Tieren mit Tieren der Deleter-Cre-Linie, obere Darstellung Parvg: GPI5f/GPI5r, untere Darstellung Parvg: GPI5f/GPI6r; F: Genotypisierung der Nachkommen aus Verpaarungen von Parvb$^{+/-}$Parvg$^{+/-}$-Tieren mittels PCR (Parvg: GPI5f/GPI6r)

Abbildung 3.5.1.3.F zeigt repräsentativ die PCR-basierte Genotypisierung von Tieren für die Analyse aus heterozygoten Verpaarungen. Es wurden stets der *Parvb*-Genotyp (vgl. 3.3.1) und der *Parvg*-Genotyp (GPI5f/GPI6r-Primerpaar) bestimmt. Auf eine Genotypisierung mittels Southern-blot wurde verzichtet, da sich die PCR-basierte *Parvb*-Genotypisierung zuvor bereits als zuverlässig erwiesen hatte. Zudem wurde ausnahmslos eine Ko-Seggregation der modifizierten *Parvb*- und *Parvg*-Allele beobachtet.

3.5.2 β-/γ-Parvin-doppeldefiziente Mäuse zeigten keinen offensichtlichen Phänotyp

Zunächst wurde überprüft, ob die Genotypen der Nachkommenschaft aus Verpaarungen von *Parvb*$^{+/-}$/*Parvg*$^{+/-}$-Tieren den Mendelschen Vorhersagen folgte. Nach einer ersten äußeren Begutachtung der Tiere wurde dann weiterhin überprüft, ob die Modifikation von *Parvg*, sowie *Parvb* wie erwartet zu einem Verlust von γ-Parvin- und β-Parvin-Protein *in vivo* geführt hatte.

Tabelle 3.5.2 zeigt die Verteilung der *Parvb*- und *Parvg*-Genotypen von Nachkommen aus den bisher durchgeführten Verpaarungen doppel-heterozygoter Tiere. Die geschlechtsunspezifische Verteilung betrug mit 29 *Parvb*$^{+/+}$/*Parvg*$^{+/+}$-, 52 *Parvb*$^{+/-}$/*Parvg*$^{+/-}$- und 27 *Parvb*$^{-/-}$/*Parvg*$^{-/-}$-Tieren von insgesamt 108 Tieren 27%, 52% bzw. 25%. Die Verteilung bei den Männchen lag bei 23% *Parvb*$^{+/+}$/*Parvg*$^{+/+}$-, 51% *Parvb*$^{+/+}$/*Parvg*$^{+/+}$- und 26% *Parvb*$^{+/+}$/*Parvg*$^{+/+}$-Tieren, die bei den Weibchen lag bei 33% *Parvb*$^{+/+}$/*Parvg*$^{+/+}$, 44% *Parvb*$^{+/+}$/*Parvg*$^{+/+}$ und 23% *Parvb*$^{+/+}$/*Parvg*$^{+/+}$. Wenngleich der Anteil von Wildtyp-Weibchen etwas hoch lag, ergab diese Verteilung der Genotypen keine Hinweise auf eine Letalität unter den *Parvb*$^{-/-}$/*Parvg*$^{-/-}$-Tieren.

Tab. 3.5.2: Verteilung der Parvb/Parvg-Genotypen in der Nachkommenschaft (F1) aus Verpaarungen von Parvb$^{+/-}$Parvg$^{+/-}$-Tieren; Gemischte Genotypen (Parvb/Parvg) wurden nicht beobachtet

	Total	*Parvb*$^{+/+}$/*Parvg*$^{+/+}$	*Parvb*$^{+/-}$/*Parvg*$^{+/-}$	*Parvb*$^{-/-}$/*Parvg*$^{-/-}$
Total	108	29 (27%)	52 (48%)	27 (25%)
♂	69	16 (23%)	35 (51%)	18 (26%)
♀	39	13 (33%)	17 (44%)	9 (23%)

Die Fotografien in Abbildung 3.5.2.A zeigen repräsentativ zwei adulte Tiere im Alter von 12 Wochen. *Parvb*$^{+/+}$/*Parvg*$^{+/+}$- und *Parvb*$^{-/-}$/*Parvg*$^{-/-}$-Tiere waren äußerlich nicht zu unterscheiden. Verhaltensauffälligkeiten wurden bei den *Parvb*$^{-/-}$/*Parvg*$^{-/-}$-Tieren ebenfalls nicht beobachtet. Zur Überprüfung des Verlustes beider Proteine wurde eine Western-blot Analyse von Thymus-Lysaten von Wildtyp- und *Parvb*$^{-/-}$/*Parvg*$^{-/-}$-Tieren durchgeführt (Abb. 3.5.2.B). Das Fehlen der β- bzw. γ-Parvin-spezifischen Banden in dem *Parvb*$^{-/-}$/*Parvg*$^{-/-}$-Lysat bestätigte den Verlust beider Proteine. Ein Anstieg von α-Parvin konnte nicht beobachtet werden. Jedoch zeigte sich erneut eine Reduktion von ILK-Protein.

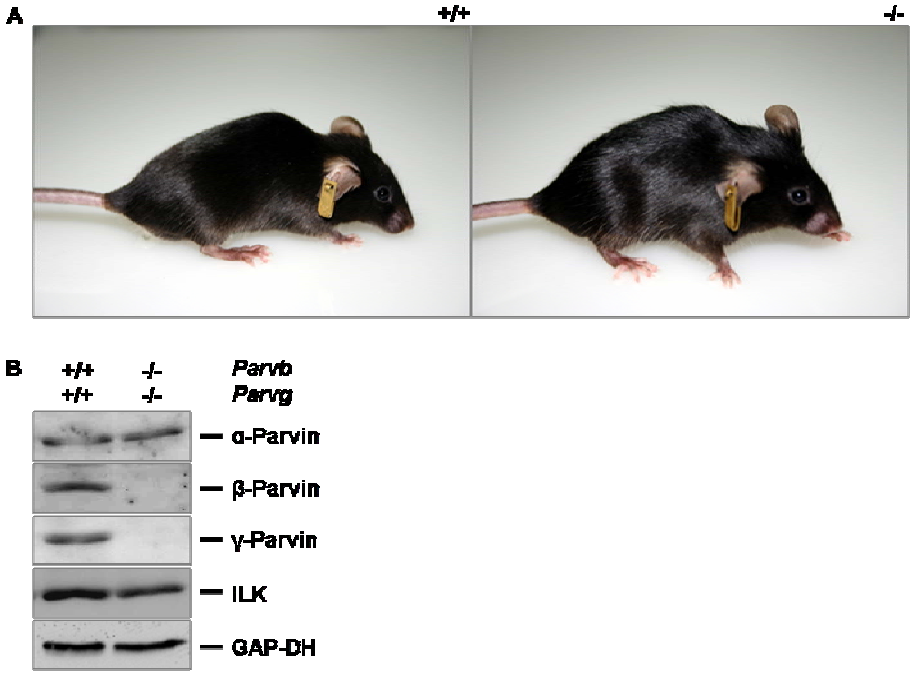


Abb. 3.5.2: Äußerliche Erscheinung von Parvb$^{-/-}$*Parvg*$^{-/-}$*-Mäusen und Bestätigung der Depletion von β- und γ-Parvin; A: Repräsentative Fotografie adulter Tiere (Weibchen) im Alter von 13 Wochen; B: Überprüfung des Verlustes von β- und γ-Parvin-Protein in Parvb*$^{-/-}$*Parvg*$^{-/-}$*-Tieren mittels Western-blot von Thymus-Lysaten, Ladekontrolle: GAP-DH, SDS-PAGE: 10% Acrylamid*

Insgesamt kann gesagt werden, dass die in *Parvb* und *Parvg* eingeführten Modifikationen zu einem Verlust beider Proteine geführt hatten. β-/γ-Parvin-doppeldefiziente Tiere waren vital und zeigten keinen offensichtlichen Phänotyp.

3.5.3 Initiale Analysen β-/γ-Parvin-doppeldefizienter Makrophagen

Um vollständig Parvin-defiziente mit β-Parvin-defizienten Makrophagen vergleichen zu können, wurden initiale Analysen analog zu den in den Abschnitten 3.3.6.3 und 3.3.6.4 beschriebenen Versuchen unter β-Parvin-Defizienz durchgeführt. Hierzu zählten zum einen eine morphologische Begutachtung von aus Knochenmark differenzierten Makrophagen,

sowie eine Analyse des Spreitverhaltens und der ILK- bzw. Parvin-Expression. Zum zweiten wurde die Adhäsion bzw. Gewebelokalisation von Makrophagen in der Marginalzone der Milz mittels Immunfärbung von Kryoschnitten untersucht.

β-/γ-Parvin-defiziente, in vitro-differenzierte Makrophagen

Abbildung 3.5.3.1.A zeigt repräsentativ die Fotografie von Wildtyp- bzw. Parvin-defizienten Makrophagen, generiert aus Knochenmark durch Kultivierung in Anwesenheit von M-CSF über einen Zeitraum von 9 Tagen. Die für Makrophagen typische, rundliche Morphologie war in Wildtyp-Zellen wie unter Parvin-Defizienz gleichermaßen vorherrschend. Weiterhin zeigte ein Teil der Zellen eine ausgeprägt spindelförmige Morphologie, wiederum unabhängig vom Genotyp. Konsistente Unterschiede zu den in Abschnitt 3.3.6 beschriebenen Makrophagen unter β-Parvin-Defizienz wurden nicht festgestellt. Morphologische Unterschiede zwischen Wildtyp- und Parvin-defizienten, aus Knochenmark differenzierten Makrophagen wurden somit nicht beobachtet. Mittels Videomikroskopie wurde weiterhin der zeitliche Verlauf des Spreitens von Wildtyp- und Parvin-defizienten Makrophagen über einen Zeitraum von 90 Minuten verfolgt (Abb. 3.5.3.1.B). Wildtyp- und Parvin-defiziente Makrophagen zeigten einen sehr ähnlichen zeitlichen Verlauf mit einer raschen Zunahme der Zell-Substrat-Kontaktfläche in den ersten 10-15 Minuten, die sich dann zunehmend abschwächte. Ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp- und Parvin-defizienten Zellen wurde zu keinem der Zeitpunkte beobachtet, wenngleich die Werte der Parvin-defizienten Zellen zu den frühen Zeitpunkten tendenziell etwas niedriger waren, ähnlich wie bereits unter β-Parvin-Defizienz beobachtet (Abb. 3.3.6.5.B). Abbildung 3.5.3.1.C zeigt eine repräsentative Western-blot Analyse der Parvin- und ILK-Expression in den untersuchten Makrophagen. Wie schon unter β-Parvin-Defizienz konnte auch unter β-/γ-Parvin-Defizienz keine Induktion von α-Parvin detektiert werden. Somit handelte es sich tatsächlich um Parvin-defiziente Zellen. Dementsprechend war ein dramatischer Rückgang der ILK-Expression zu verzeichnen.

In vivo-Adhäsion β-/γ-Parvin-defizienter Makrophagen in der Milz

Die Untersuchung der Adhäsion β-/γ-Parvin-defizienter Makrophagen in der Milz wurde parallel mit den in Abschnitt 3.3.6 beschriebenen Versuchen durchgeführt. Kryoschnitte der Milz von Wildtyp- bzw. β-/γ-Parvin-defizienten Tieren wurden gegen MOMA-1-positive Makrophagen gefärbt, die den Übergang zwischen weißer Pulpa und Marginalzone markieren, gegen MARCO-positive Makrophagen, die die Marginalzone selbst markieren, sowie gegen F4/80-positive Makrophagen der roten Pulpa. Zur Kontrastierung des Gewebes

wurde eine Ko-Färbung gegen Laminin durchgeführt. Wie in Abbildung 3.5.3.2 zu sehen zeigten MOMA-1-positive Makrophagen unter Wildtyp-Bedingungen und unter vollständiger Parvin-Defizienz eine Lokalisation an der Grenze zwischen weißer Pulpa und Marginalzone. Jedoch wurde darüber hinaus unter Parvin-Defizienz verstärkt eine Lokalisation MOMA-1-positiver Makrophagen im Bereich der Marginalzone beobachtet, was sich in weiteren Versuchen jedoch nicht als klar reproduzierbar zeigte. Hingegen wurde unter Parvin-Defizienz keine veränderte Lokalisation oder Anzahl von MARCO- (Abb. 3.5.3.3) bzw. F4/80-positiven (Abb. 3.5.3.4) Makrophagen in der Milz beobachtet. Wie schon unter β-Parvin-Defizienz konnte auch unter vollständiger Parvin-Defizienz keine veränderte Morphologie der verschiedenen Makrophagen beobachtet werden (Abb. 3.5.3.5). Klare Hinweise auf eine Beeinträchtigung der Adhäsion von Makrophagen in der Milz unter vollständiger Parvin-Defizienz wurden somit nicht beobachtet.

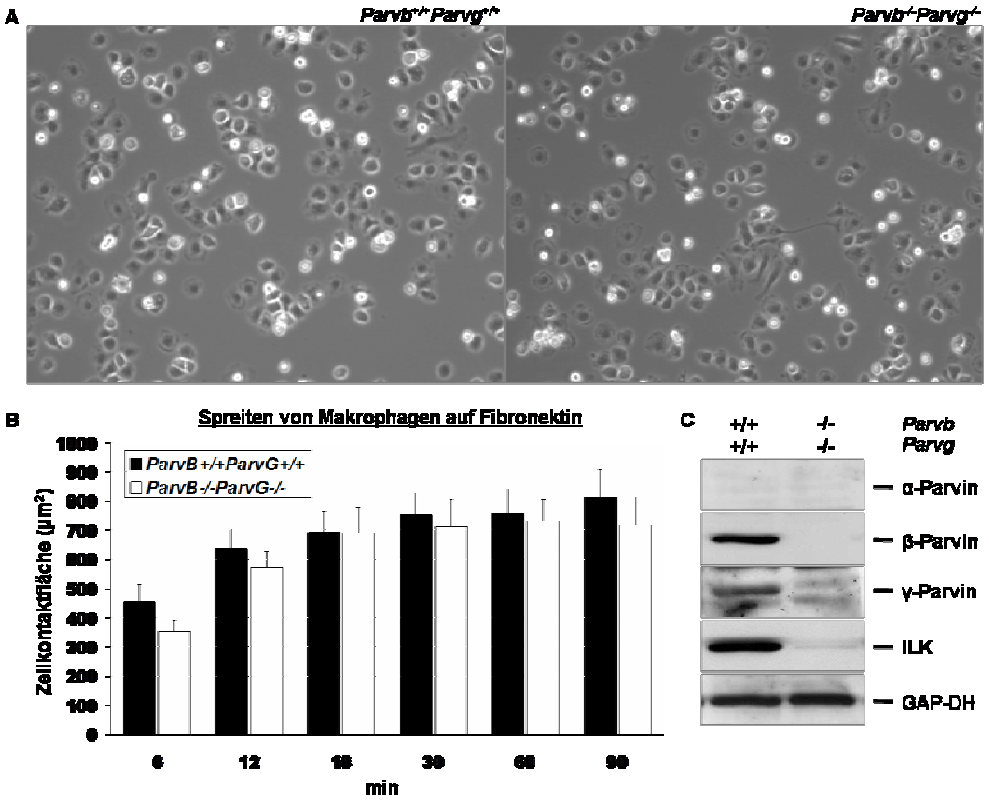


Abb. 3.5.3.1: Charakterisierung von Wildtyp- und β-/γ-Parvin-defizienten, in Anwesenheit von M-CSF aus Knochenmark differenzierten Makrophagen; A: Morphologie auf Fibronektin (FN, 10 µg/ml) am Tag 9 der Kultur, Phasenkontrast, Vergrößerung: 10x; B: Zeitlicher Verlauf des Zellspreitens nach Ausplattierung auf FN, Videomikroskopie über 90 min, Messung der Zell-Substrat-Kontaktfläche mit Metamorph, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung, n=6 (Je Genotyp 4 veschiedene Präparationen in 3 Experimenten mit jeweils 2 Präparationen, je Präparation 2 Bildausschnitte mit 20 Zellen je Bildausschnitt); C: Expressionsanalyse von ILK und Parvinen in Wildtyp- und β-/γ-Parvin-defizienten Makrophagen mittels Western-blot, GAP-DH als Ladekontrolle, SDS-PAGE: 10% Acrylamid

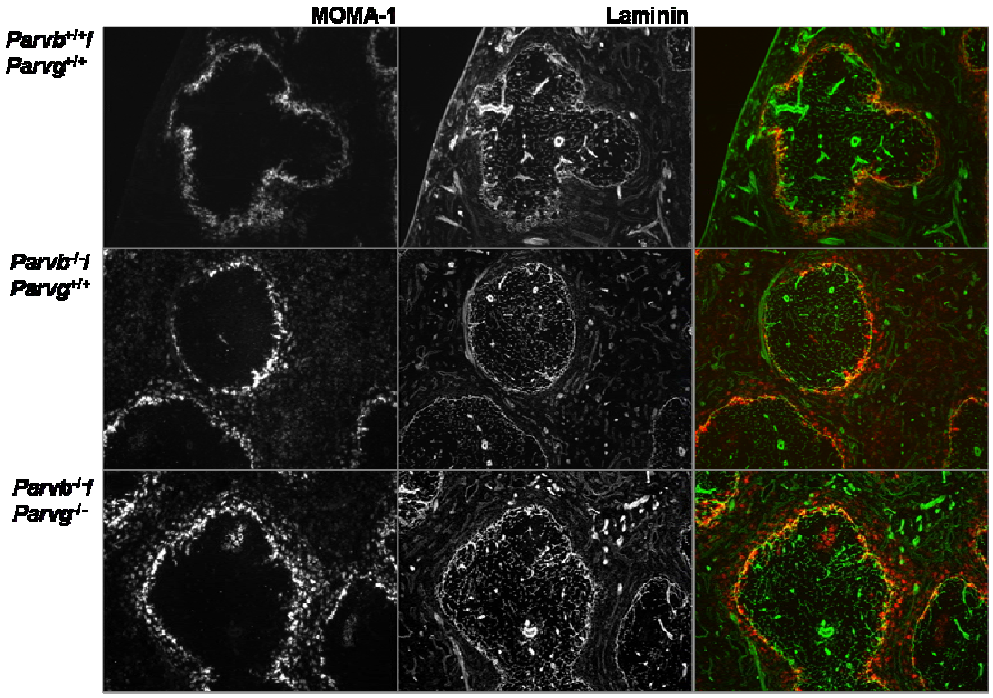


Abb. 3.5.3.2: Lokalisation von MOMA-1-positiven Makrophagen in der Milz von Wildtyp-, β-Parvin-defizienten und β-/γ-Parvin-defizienten Mäusen, Kryoschnitte (8 µm), Vergrößerung: 10x, MOMA-1: cy3, panLaminin (Alexa 488) zur Gewebekontrastierung

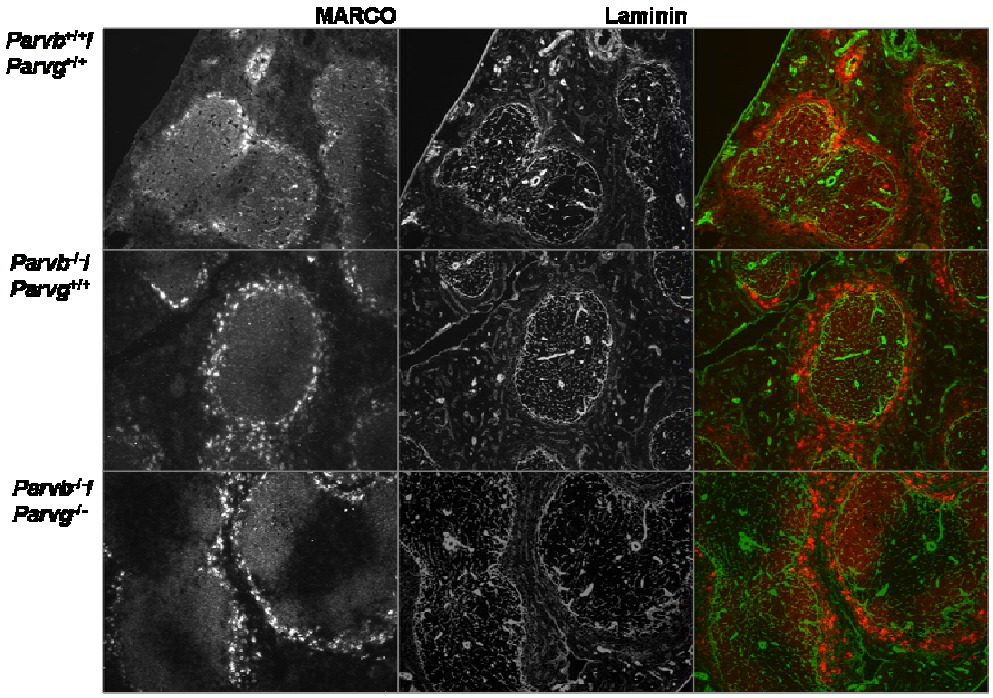


Abb. 3.5.3.3: Lokalisation von MARCO-positiven Makrophagen in der Milz von Wildtyp-, β-Parvin-defizienten und β-/γ-Parvin-defizienten Mäusen, Kryoschnitte (8 µm), Vergrößerung: 10x, MARCO: cy3, panLaminin (Alexa 488) zur Gewebekontrastierung

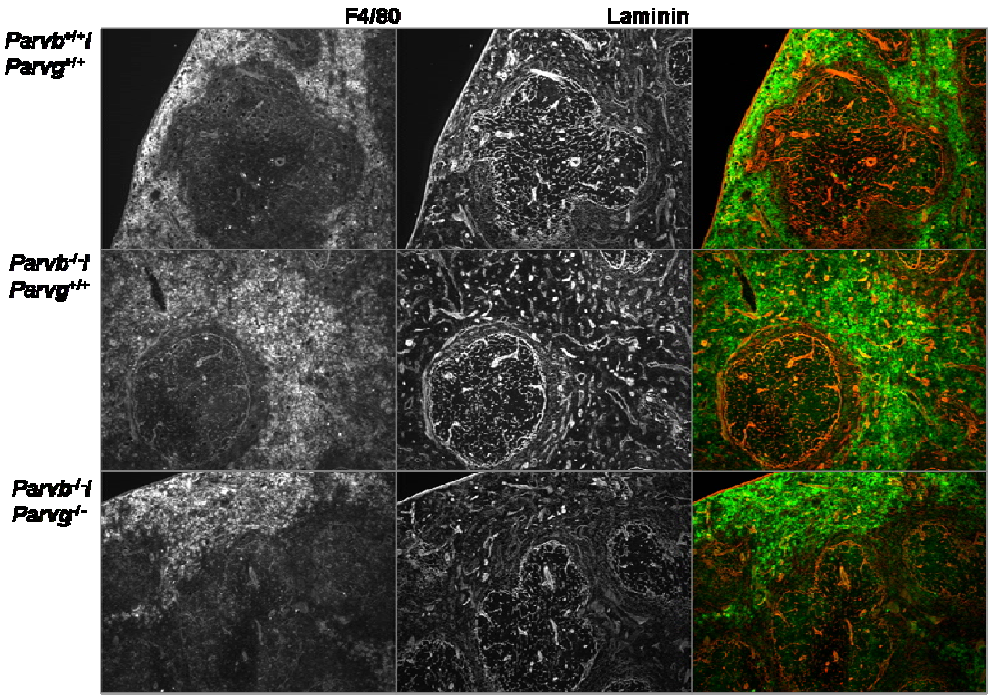


Abb. 3.5.3.4: Lokalisation von F4/80-positiven Makrophagen in der Milz von Wildtyp-, β-Parvin-defizienten und β-/γ-Parvin-defizienten Mäusen, Kryoschnitte (8 µm), Vergrößerung: 10x, F4/80: FITC-gekoppelt, panLaminin (cy3) zur Gewebekontrastierung

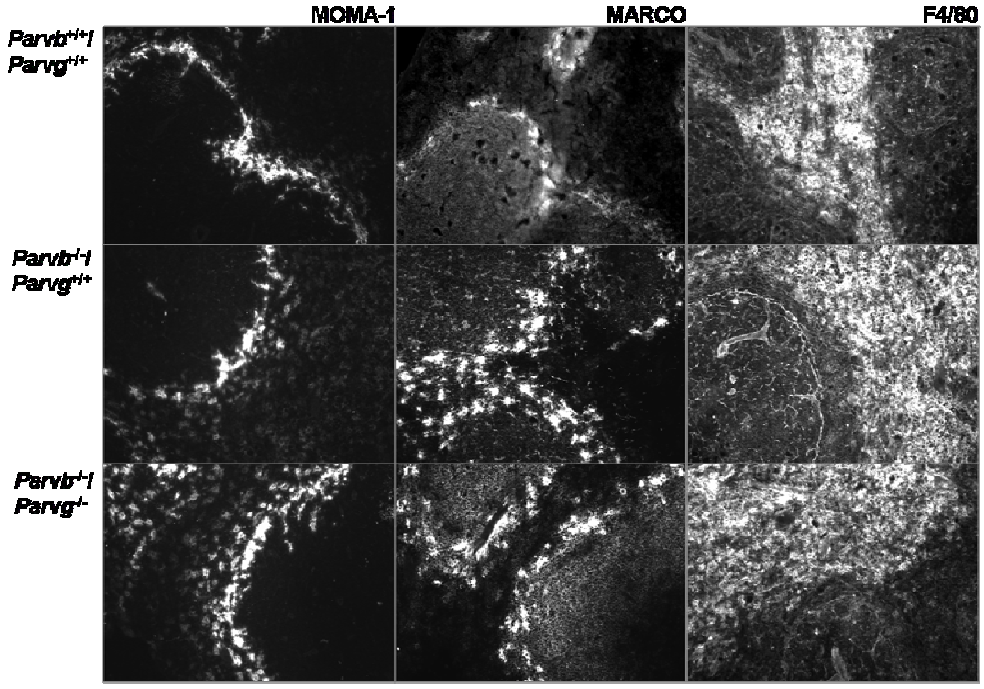


Abb. 3.5.3.5: Morphologie von MOMA-1-, MARCO- und F4/80-positiven Makrophagen in der Milz von Wildtyp-, β-Parvin-defizienten und β-/γ-Parvin-defizienten Mäusen, Vergrößerung: 20x, Präparate aus den Abbildungen 3.5.3.2-4

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die hier durchgeführten, initialen Analysen zu Morphologie, Spreiten und Adhäsion von Makrophagen unter Parvin-Defizienz keinen offensichtlichen Phänotyp gezeigt haben. Ähnlich wie unter β-Parvin-Defizienz, jedoch wesentlich stärker ausgeprägt, wurde ein Rückgang von ILK-Protein in Parvin-defizienten Makrophagen festgestellt. Eine Induktion von α-Parvin wurde nicht beobachtet.

3.6 Charakterisierung der α-Parvin-Defizienz in der Embryonalentwicklung

Frau Dr. Haiyan Chu hat im Rahmen ihrer Promotion in der Abteilung für Molekulare Medizin desweiteren eine Mauslinie mit konstitutiver Defizienz von α-Parvin generiert. Die bisher noch nicht publizierten Analysen werden hauptsächlich von Dr. Eloi Montanez, Abteilung für Molekulare Medizin durchgeführt. In Zusammenarbeit mit Dr. Eloi Montanez erfolgte jedoch im Rahmen dieser Arbeit eine initiale Analyse unter α-Parvin-Defizienz.

3.6.1 Initiale Analysen α-Parvin-defizienter Embryonen

Die konstitutive α-Parvin-Deletionsstrategie ist der von β-Parvin grundlegend ähnlich und soll hier nur kurz wiedergegeben werden. Mit Teilen von Exon2, dem gesamten Intron2 und Teilen von Exon3 wurde das Spleißdonor- und Akzeptorpaar von Exon2/3 deletiert. Eingeführt mit der Deletion wurde die pBS-LacZ-Neo-Kassette zur Neomyzin-Selektion. Die erfolgreiche Keimbahninsertion des modifizierten Allels sowie die Southern-blot- bzw. PCR-basierte Genotypisierung der Tiere wurde von Frau Dr. Haiyan Chu in ihrer Dissertation, Universität zu Köln dokumentiert (Chu, 2005).

Tabelle 3.6.1 zeigt die Verteilung der *Parva*-Genotypen in der Nachkommenschaft (F1) aus *Parva*$^{+/-}$-Verpaarungen über verschiedene Stadien der Embryonalentwicklung bzw. postnatal. Unter den 119 postnatal genotypisierten Mäusen wurden keine homozygot-mutanten Tiere gefunden, was eine embryonale Letalität der α-Parvin-defizienten Tiere zeigte. Zur Eingrenzung des Todeszeitpunktes bzw. -zeitraumes wurden gezielte Verpaarungen von *Parva*$^{+/-}$-Tieren angesetzt und Embryonen verschiedener Stadien entnommen. An E8.5 und E9.5 entsprach die Genotyp-Verteilung der Embryonen den Mendel´schen Vorhersagen. Jedoch schienen einige der *Parva*$^{-/-}$-Embryonen kleiner als Wildtyp-Embryonen (Abb. 3.6.1). Ebenso zeigten die Genotypen an E10.5 annähernd Mendel´sche Verteilung, jedoch war die Hälfte der *Parva*$^{-/-}$-Embryonen hier bereits tot. Als ausschlaggebend für die Vitalität eines Embryos wurde ein schlagendes Herz gewertet. Der größere Teil der α-Parvin-defizienten Embryonen an E10.5 war deutlich kleiner als Wildtyp-Embryonen, einige dieser Tiere zeigten

zudem Blutungen, besonders im Herzen. Der geringere Teil der *Parva*$^{-/-}$-Embryonen wirkte lediglich kleiner als die Wildtypen. Unter den 14 bisher untersuchten Tieren aus zwei Würfen an E11.5 waren nur zwei *Parva*$^{-/-}$-Embryonen, die beide bereits tot bzw. degeneriert waren.

Tab. 3.6.1 Verteilung der Parva-Genotypen in der Nachkommenschaft (F1) aus Verpaarungen von Parva$^{+/-}$*-Tieren, Genotypisierung anhand von Dottersackgewebe; *: Herz schlägt*

Stadium	Total (davon resorbiert)	*Parva*$^{+/+}$	*Parva*$^{+/-}$	*Parva*$^{-/-}$ (total)	*Parva*$^{-/-}$ (lebend*)
E8.5	55 (5)	8 (16%)	29 (58%)	13 (26%)	13
E9.5	25 (5)	6 (30%)	10 (50%)	4 (20%)	4
E10.5	58 (5)	10 (19%)	32 (60%)	11 (21%)	5
E11.5	14 (2)	5 (41,5%)	5 (41,5%)	2 (17%)	-
P0	49	17 (35%)	32 (65%)	-	-
P21	70	25 (36%)	45 (64%)	-	-

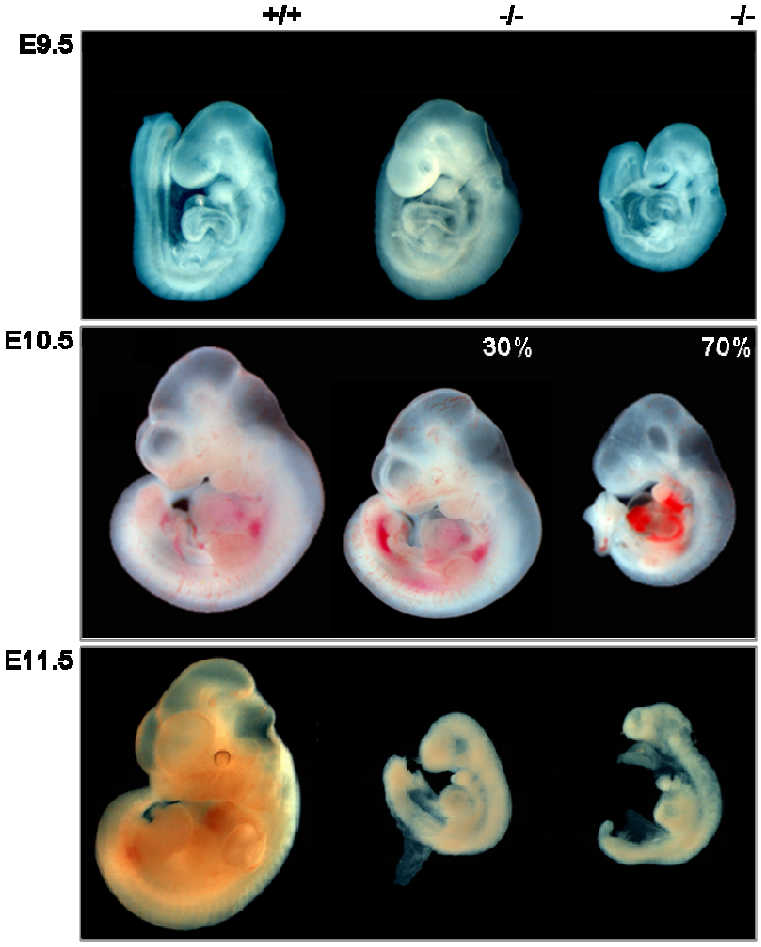


Abb. 3.6.1: Äußeres Erscheinungsbild von Wildtyp und α-Parvin-defizienten Embryonen an E8.5, E9.5 und E10.5

Da das Auftreten von Blutungen sowie der grobe Todeszeitpunkt in der fortgeschrittenen Embryonalentwicklung einen möglichen vaskulären Phänotyp andeuteten, wurde in einem weiteren Versuch das Dottersack-Gefäßsystem untersucht. Wie in Abbildung 3.6.2 in der Übersicht (links) zu sehen, zeigten Dottersäcke von Wildtyp-Embryonen ein verzweigtes Gefäßsystem, während unter α-Parvin-Defizienz größere Gefäße kaum zu finden waren. Zudem wurde Dottersackgewebe von Wildtyp und α-Parvin-Embryonen im „whole-mount"-Verfahren gegen den Gefäßmarker PECAM-1 immungefärbt und mittels konfokaler Mikroskopie untersucht. Wie in Abbildung 3.6.2 (rechts) zu sehen, zeigten die Wildtyp-Dottersäcke die Ausbildung differenzierter, verzweigter Gefäße. α-Parvin-defiziente Dottersäcke hingegen zeigten zwar die Bildung von einfachen Gefäßen bzw. eines primären Plexus, jedoch keinen Umbau in ein verzweigtes, aus kleineren und größeren Gefäßen bestehendes System.

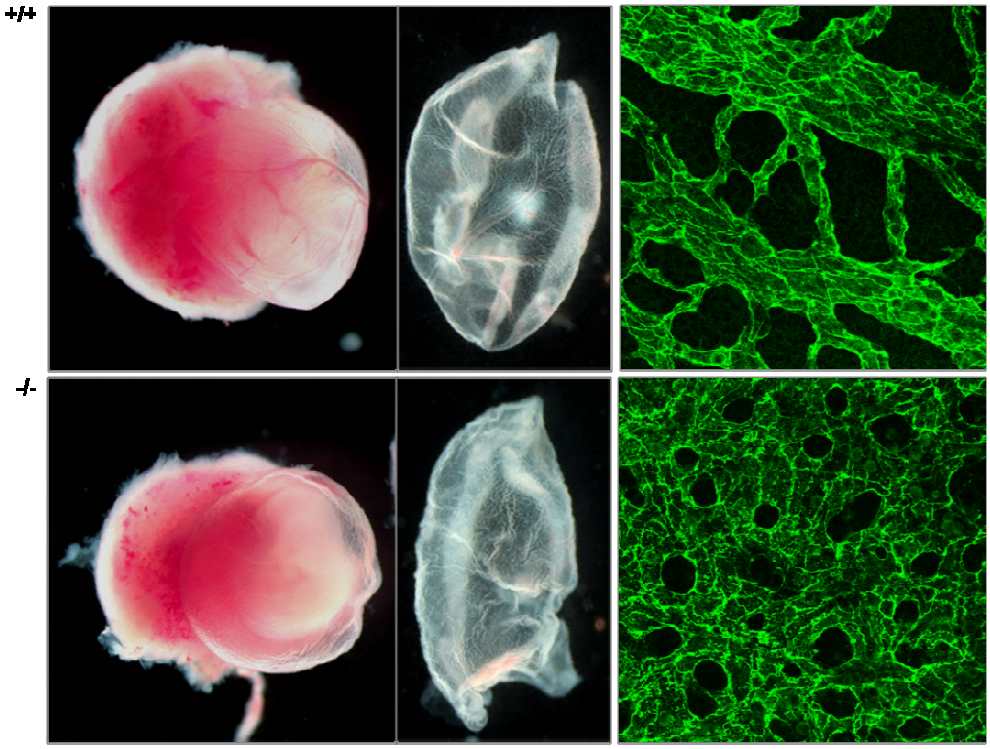


Abb. 3.6.2: Dottersack-Vaskulatur von Wildtyp- und α-Parvin-defizienten Embryonen an E10.5; Links Übersicht des Dottersacks in situ bzw. isoliert; Rechts: Konfokale Fotografie von Dottersackgewebe nach „Whole-mount"-Immunfärbung gegen den Gefäßmarker PECAM-1, Vergrößerung: 40x

Insgesamt kann festgehalten werden, dass die konstitutive Defizienz von α-Parvin zu Letalität in der fortgeschrittenen Embryonalentwicklung führte. Dabei zeigten die Embryonen ab E8.5-E9.5 ein zunehmend verlangsamtes Wachstum. An E10.5 zeigten sie zudem Blutungen sowie eine starke Beeinträchtigung der Gefäßbildung im Dottersack.

3.7 Generierung einer Mauslinie mit konditional modifiziertem *Parva*

Die Letalität der konstitutiven Depletion von α-Parvin in Mäusen erschwert die Analyse gewebespezifischer Funktionen von α-Parvin erheblich. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher mit der Generierung einer Mauslinie mit konditional deletierbarem *Parva*/α-Parvin begonnen. Zudem sollte die Verpaarung von gewebespezifisch α-Parvin-depletierten Mäusen mit Tieren der β-Parvin-Linie aufgrund der geringeren Wahrscheinlichtkeit von Letalität die Generierung weiterer vollständig Parvin-defizienter Gewebe bzw. Zellen ermöglichen. Die im Rahmen der Arbeit durchgeführten Schritte zur konditionalen Modifikation von Parva beinhalteten den Entwurf und die Klonierung des p*Parva*^{fl}-Konstruktes, sowie die ES-Zellkultur und Injektion der ES-Zellen mit anschließendem Blastozysten-Transfer.
Für die konditionale Modifikation von *Parva* wurde eine Selektionskassette mit Neomyzin-Resistenz in das Gen eingeführt. Die Kassette wurde flankiert mit frt-Sequenzen, was die einfache *in vivo*-Exzision der Kassette über das Einkreuzen einer frt-Linie ermöglicht. Die Kassette wurde zusammen mit einem benachbarten Exon durch loxP-Sequenzen flankiert, was die Deletion des Exons unter Verpaarung mit Cre-Rekombinase-transgenen Tieren ermöglicht.

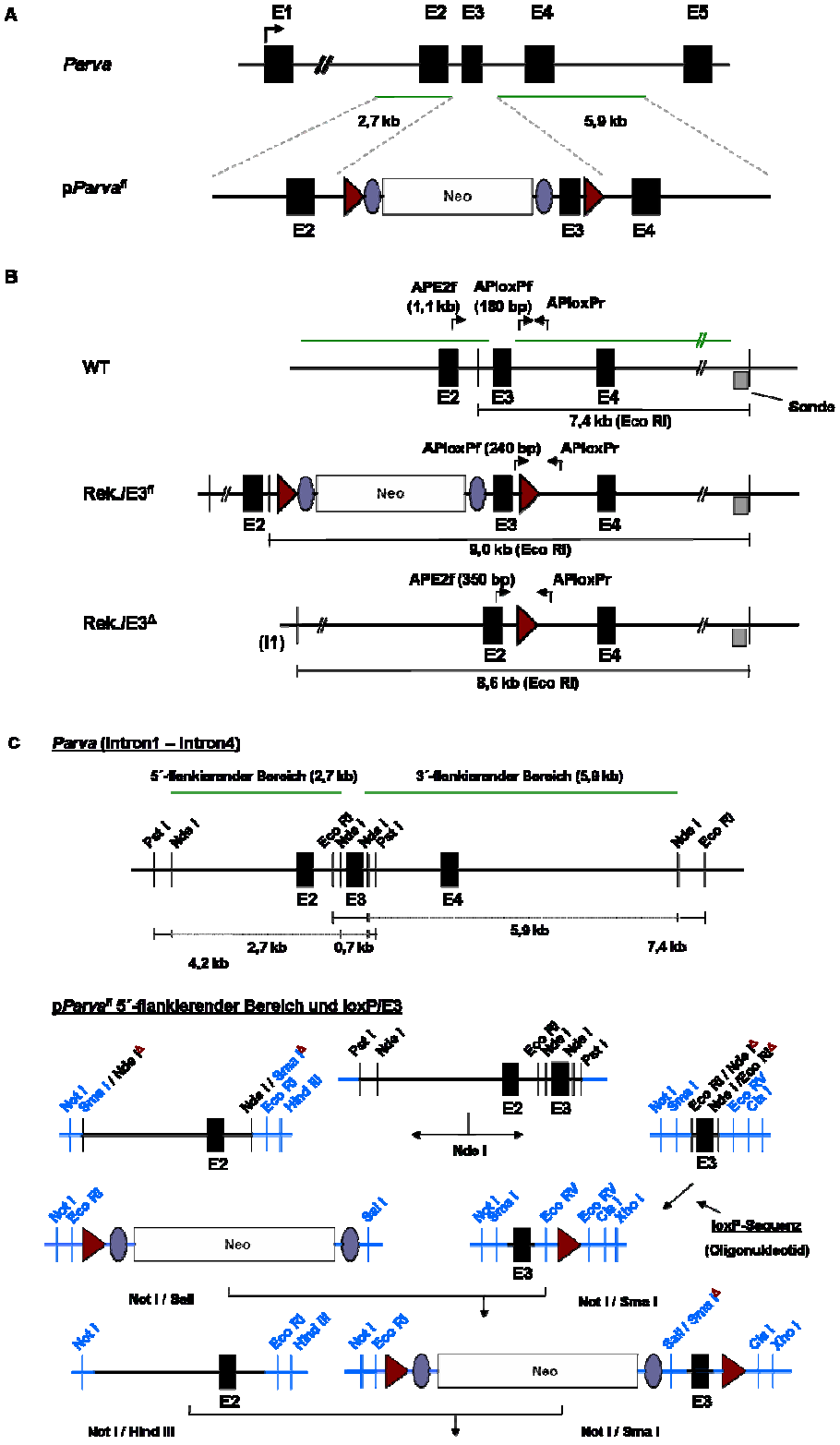
Deletionsstrategie und Genotypisierung

Abbildung 1.5.1.A zeigt die Gen- und Proteinstruktur von *Parva*. Da die erfolgreiche konstitutive Deletion von α-Parvin (Montanez, Thievessen und Fässler unpubliziert), sehr ähnlich der konstitutiven Deletion von β-Parvin auf Modifikationen von Exon2, Intron2 und Exon3 beruhte, wurde auch die konditionale Modifikation von *Parva* nahe des N-Terminus eingeführt. Wenngleich *Parva*, anders als *Parvb* keine weiteren ATG-Kodons mit Kozak-Sequenz als das in Exon1 gelegene Startkodon aufweist, wurde nicht Exon1 loxP-flankiert, da das *Parva* Intron1 mit 40 kb sehr groß ist und da sowohl Exon2 wie auch Exon3 zumindest je ein weiteres ATG-Kodon aufweisen. Eine Deletion von Exon2 hätte keine Verschiebung des Leserasters zur Folge gehabt und war daher nicht sinnvoll. Da Exon3 jedoch in einem anderen Leseraster als Exon2 endet, wurde Exon3 als eigentliches Ziel der Strategie gewählt. Bei einem Verlust von Exon3 und einem möglichen alternativen Spleißen von Exon2 an Exon4 käme es zur Translationstermination 7 Aminosäuren nach Beginn von Exon4. Die Gefahr eines funktionalen bzw. dominant-negativen N-terminalen Restpeptides erschien sehr gering. Das frt-flankierte Neomyzin-Resistenzgen wurde somit in Intron 2 eingeführt (Abb. 3.7.1.A). Die Kassette und Exon3 wurden weiterhin durch loxP-Sequenzen flankiert. Der 5´-homologe Bereich des p*Parva*^{fl}-Konstruktes erstreckte sich über insgesamt 2,7 kb, bis in Intron1 hinein.

Der 3´-homologe Arm reichte mit 5,9 kb bis in Intron4 hinein. ES-Zell-Kultur, -Injektion sowie Blastozysten-Transfer wurden analog zur Deletion von β-Parvin bzw. β-/γParvin-Doppeldeletion (vgl. 3.3.1) durchgeführt.

Abbildung 3.7.1.B zeigt die Genotypisierung der verschiedenen *Parva*-Allele. Mittels Southern-blot nach Eco RI-Verdau konnte ein Wildtyp-Fragment von 7,4 kb identifiziert werden. Die Deletion der endogenen, in Intron2 gelegenen Eco RI-Sequenz und die Neueinführung einer Sequenz nahe der 5´-gelegenen loxP-Sequenz ermöglichte die Identifizierung eines 9,0 kb großen rekombinanten Fragments in Anwesenheit der Kassette bzw. von Exon3. Die geplante Genotypisierung von Cre-Rekombinase exprimierenden Mäusen, unter Verlust von Exon3 sollte in der Detektion eines 8,6 kb großen Fragmentes resultieren, basierend auf einer weiteren, in Intron1 gelegenen Eco RI-Sequenz. Die PCR-basierte Identifizierung der Allele diente zum einen der Kontrolle auf die Präsenz der 3´-gelegenen loxP-Sequenz nach homologer Rekombination. Die APloxPf/APloxP/r-Primerkombination sollte zur Amplifizierung eines 180 bp großen Wildtyp- und eines 240 bp großen rekombinanten Fragmentes führen. Die Genotypisierung von Wildtyp- bzw. Tieren nach Exon3-Deletion sollte unter Verwendung des APE2f/APloxPr-Primerpaares zur Amplifizierung eines 1,1 kb großen Wildtyp- und eines 350 bp großen rekombinanten Fragmentes führen.

Die in Abbildung 3.7.1.C dargestellte Klonierung des p*Parva*^{fl}-Konstruktes erfolgte durch Modifikation von 3 Nde I-Fragmenten, die aus zwei Subklonen, einem 4,2 kb großen Pst I-Klon sowie einem 7,4 kb großen Eco RI-Klon, isoliert wurden. Ein 2,7 kb großes, Teile von Intron1, Exon2 und Teile von Intron2 umfassendes Nde I-Fragment diente als 5´-flankierender Arm. Ein 0,7 kb großes Nde I-Fragment wurde subkloniert und nach Einführung einer loxP-Sequenz in die Eco RV-Schnittstelle des Vektors in die Sal I-Schnittstelle des pBS-loxP-frt-Neo-frt-Plasmides kloniert. Nach Verdau des 5´-flankierenden Armes mit Not I/Hind III (Klenow) und Verdau des zentralen Fragments mit Not I/Sma I wurde der 5-flankierende Bereich vor die Selektionskassette gesetzt. Für diese Transformation wurden nicht Dcm/Dam-methylierende JM110-Bakterien verwendet, da für die finale Ligation ein Verdau mit dem methylierungssensitiven Cla I-Enzym durchgeführt werden sollte. Die Klonierung des 3´-flankierenden Bereichs erfolgte durch Subklonierung eines 5,9 kb großen Nde I-Fragmentes in JM110-Bakterien. Die anschließende finale Ligation erfolgte nach Cla I/Xho I-Verdau beider Teilfragmente.


A
E1
E2 E3
E4
E5
Parva
2,7 kb
5,9 kb
pParvaf
Neo
E2
E3
E4
B
APE2f (1,1 kb)
APloxPf (180 bp)
APloxPr
WT
E2
E3
E4
Sonde
7,4 kb (Eco RI)
APloxPf (240 bp)
APloxPr
RekJE3f
Neo
E2
E3
E4
9,0 kb (Eco RI)
APE2f (350 bp)
APloxPr
RekJE3Δ
(I1)
E2
E4
8,6 kb (Eco RI)
C
Parva (Intron1 – Intron4)
5´-flankierender Bereich (2,7 kb)
3´-flankierender Bereich (5,9 kb)
Pst I
Nde I
Eco RI
Nde I
Nde I
Pst I
Nde I
Eco RI
E2
E3
E4
5,9 kb
2,7 kb
0,7 kb
7,4 kb
4,2 kb
pParvaf 5´-flankierender Bereich und loxP/E3
Not I
Sma I / Nde I
Nde I / Sma I
Eco RI
Hind III
E2
Pst I
Nde I
Eco RI
Nde I
Nde I
Pst I
E2
E3
Nde I
Not I
Sma I
Eco RI / Nde I
Nde I / Eco RI
Eco RV
Cla I
E3
Not I
Eco RI
Neo
Sal I
Not I
Sma I
Eco RV
Eco RV
Cla I
Xho I
E3
loxP-Sequenz
(Oligonukleotid)
Not I / Sal I
Not I / Sma I
Not I
Eco RI
Hind III
E2
Not I
Eco RI
Neo
Sal I / Sma I
Cla I
Xho I
E3
Not I / Hind III
Not I / Sma I

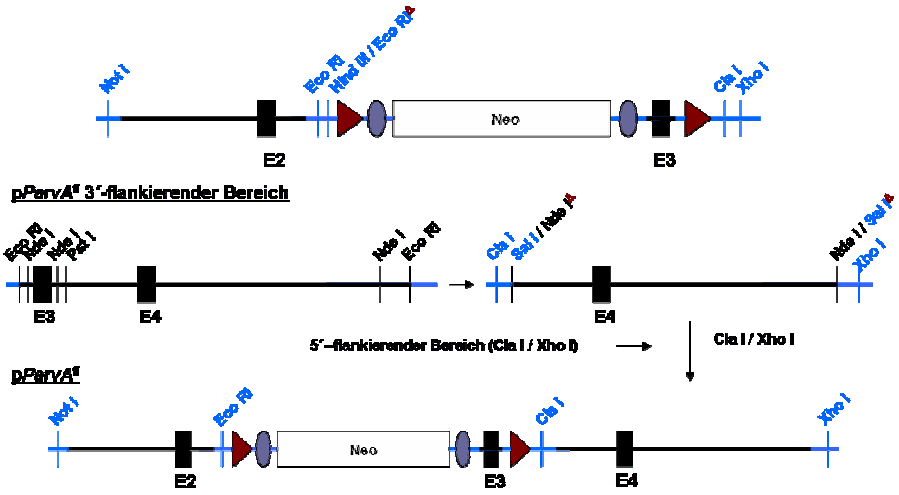


Abb. 3.7.1: Strategie zur konditionalen Modifikation bzw. Deletion von Parva/α-Parvin; A: Deletionskonstrukt pParva^{fl}, Pfeil: Startkodon, Kassette: pBS-loxP-frt-Neo-frt (Abb. 2.1.4); B: Schema zur Genotypisierung von ES-Zellen bzw. Mäusen mittels Southern-blot nach Eco RI-Verdau (Parva^{WT}: 7,4 kb, Parva^{fl}: 9,0 kb, Parva$^{\Delta}$: 8,6 kb) sowie mittels PCR unter Verwendung der Primerpaare APloxPf/APloxPr (Parva^{WT}: 180 bp, Parva^{fl}: 240 bp) bzw. APE2f/APloxPr (Parva^{WT}: 1,1 kb, Parva$^{\Delta}$: 350 bp); C: Klonierung von pParva^{fl}, 2 Subklone von 4,2 kb (5´-flankierender Arm, Exon3) und 7,4 kb (3´-flankierender Arm) dienten als Ausgangspunkt für die Klonierung; grün: Homologie-Regionen, rote Dreiecke: loxP-Sequenzen, blaue Ovale: frt-Sequenzen, Vektor: pBluescript II KS/SK

Bisher durchgeführte Schritte der konditionalen Deletion von *Parva*/α-Parvin

Das *Parva*^{fl}-Allel wurde nach Linearisierung mit Not I in R1-ES-Zellen elektroporiert. Nach 6-tägiger Neomyzin-Selektion wurden ES-Zellklone gepickt, auf 24-Well-Platten expandiert und je zur Hälfte eingefroren bzw. weiter expandiert zur Isolierung der DNA. Mittels Southern-blot nach Eco RI-Verdau wurden die Klone genotypisiert. Homolog-rekombinante Klone wurden auf die Präsenz der 3´-gelegenen loxP-Sequenz geprüft. Zellen von mehreren homolog-rekombinanten ES-Zellklonen mit vorhandener loxP-Sequenz wurden nach Rekultivierung in C57Bl/6J-Blastozysten injiziert, diese wiederum wurden scheinschwangeren C57Bl/6J-Weibchen implantiert. Eine Begutachtung der chimären Tiere nach dem Grad des Chimärismus wurde durchgeführt.

Abbildung 3.7.2.A zeigt repräsentativ einen Southern-blot von 19 der 360 gepickten ES-Zellklone nach Eco RI-Verdau, von denen 2 (Spuren 10 und 19) anhand der 9,0 kb großen Bande, zusätzlich zur 7,4 kb großen Wildtyp-Bande, als homolog-rekombinant identifiziert wurden. Mit 11 homolog-rekombinanten von insgesamt 360 Klonen betrug die Rekombinationseffizienz 3%. Anschließend wurden die 11 Klone mittels PCR unter Verwendung des APloxPf/APloxPr-Primerpaares auf das Vorhandensein der 3´-gelegenen loxP-Sequenz getestet (Abb. 3.7.2.B). Zwei der Klone zeigten den Verlust der Sequenz und

wurden nicht weiter verwendet. Nach Rekultivierung wurden Zellen von 6 der übrigen homolog-rekombinanten Klone in Blastozysten injiziert. Die Blastozysten eines Klons wurden jeweils einer Amme implantiert. Die kurz vor Abgabe der Arbeit geborenen Chimären zeigten für alle 6 der injizierten Klone Chimärismus bis zu 95% oder 100%.

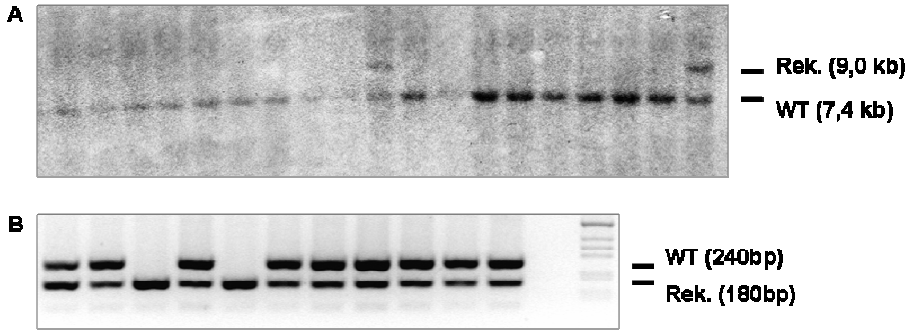


Abb. 3.7.2: Bisher durchgeführte Schritte zur konditionalen Deletion von Parva; A: Southern-blot (Eco RI-Verdau, externe Sonde) von ES-Zellklonen nach pParva^{fl}-Elektroporation und Neomyzin-Selektion, homolog-rekombinante Klone in den Spuren 10 und 19, Expositionszeit: 4 Tage; B: PCR von homolog-rekombinanten ES-Zellklonen zum Test auf die 5´-gelegene loxP-Sequenz (Primer: APloxPf/APloxPr), Verlust der loxP-Sequenz in den Spuren 3 und 5

4. Diskussion

In enger Interaktion vermitteln β1 Integrine und ILK eine Vielzahl von Zell-Matrix-Adhäsionsprozessen in der Embryonalentwicklung und adulter Homöostase. Hierbei sind die Funktionen von ILK abhängig von seiner Einbindung in den ILK/PINCH/Parvin- (IPP) Komplex, der wichtige Funktion bei der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts und davon abhängiger Prozesse hat. Die gewebespezifische Expression verschiedener PINCH- und Parvin-Isoformen bestimmt dabei die Zelltyp-spezifische Zusammensetzung von IPP-Komplexen und deren gewebespezifische Funktionen. Da die Parvine IPP-Komplexe sowohl strukturell wie auch regulatorisch mit dem Aktin-Zytoskelett verbinden, ist es wahrscheinlich, dass sie als wichtige Vermittler der IPP-abhängigen Aktin-Reorganisation fungieren. Eine teils distinkte aber auch redundante Expression der Parvine sowie eine in Zellkulturstudien nahegelegte funktionelle Divergenz insbesondere von α- und β-Parvin stellt die Frage, welche gewebespezifischen Funktionen die einzelnen Parvine vermitteln.
In der vorliegenden Arbeit wurde daher eine gewebespezifische, funktionelle Charakterisierung verschiedener Parvin-Isoformen anhand von Funktionsverlustmutanten durchgeführt. Diese wurden zuvor durch homologe Rekombination generiert. Die Analysen erfolgten unter Berücksichtigung der gewebespezifischen Expression der einzelnen Isoformen. Der Schwerpunkt der Analysen lag auf möglichen Funktionen von β-Parvin in Kardiomyozyten. Zudem wurden Adhäsion bzw. Motilität verschiedener Leukozyten unter β-, γ- und β-/γ-Parvin-Defizienz und die Embryonalentwicklung unter α-Parvin-Defizienz untersucht.

4.1 Generierung Isoform-spezifischer Parvinpeptid Antikörper

Für die Charakterisierung der gewebespezifischen Expression der Parvine wurden zunächst Isoform-spezifische Antikörper hergestellt. Die meisten der bereits beschriebenen polyklonalen und monoklonalen Parvin-Antikörper sind im Hinblick auf ihre Isoform-Spezifität nicht näher charakterisiert (Olski et al., 2001; Nikolopoulos und Turner, 2000; Tu et al., 2001; Yamaji et al., 2001; Zhang et al., 2004). Zudem sind sie meist gegen das entsprechende Vollängenprotein oder große Bereiche der jeweiligen Isoform gerichtet, was aufgrund der hohen Homologie innerhalb der Parvin-Familie Kreuzreaktivität nach sich ziehen kann. Dem Nachteil einer geringeren Zahl von Epitopen bei Peptid-Antikörpern steht der Vorteil meist höherer Spezifität gegenüber. Für die gewebespezifischen Expressionsanalysen wurden daher polyklonale Peptid-Antikörper gegen α-, β- und γ-Parvin

hergestellt und auf Kreuzreaktivität getestet. Als Immunogene wurden Peptide der hoch variablen N-Termini der drei Isoformen mit hoher Wahrscheinlichkeit einer Lösemittelexposition im nativen Protein gewählt (Abb. 3.1.1).

Alle drei Parvin Antikörper zeigten im Mikrotiterplatten-Assay sowie im Western-blot deutliche und spezifische Reaktivität gegen das korrespondierende Peptid bzw. Protein (Abb. 3.1.2-3). Lediglich im Mikrotiterplatten-Assay wurde eine schwache Kreuzreaktivität von Anti β-Parvin gegen α-Parvin$^{P5\text{-}S19}$ festgestellt (Abb. 3.1.2). Anti β- und Anti γ-Parvin zeigten jedoch, anders als Anti α-Parvin keine spezifische Reaktivität auf Gewebeschnitten bzw. fixierten Zellen.

Damit zeigten die generierten Peptid-Antikörper zunächst die erhoffte hohe Isoform-Spezifität. Zudem zeigten sie eine relativ starke Reaktivität im Western-blot bzw. gegen partiell denaturiertes Protein. Als Nachteil der Peptid-Strategie zeigten Anti β- und Anti γ-Parvin eingeschränkte Einsetzbarkeit. Damit wurden alle drei Antikörper im weiteren für Western-blot Analysen von Proteinlysaten verwendet. Für die Untersuchung fixierter Gewebe und Zellen hingegen wurde nur Anti α-Parvin verwendet. Aufgrund der Lage des Anti β-Parvin-Epitops am N-Terminus des Proteins (vgl. 3.1) ermöglichte der Antikörper keine Detektion der kürzeren Translationsvarianten.

4.2 Gewebespezifische Expression und *in vitro* subzelluläre Lokalisation von Parvin Isoformen

Bisherige Studien zur Expression der einzelnen Parvine haben eine breite Expression von α- und β-Parvin, sowie eine spezifisch hämatopoetische Expression von γ-Parvin gezeigt (Olski et al., 2001, Korenbaum et al., 2001; Yamaji et al., 2001; Chu et al., 2006). Jedoch liegt kein direkter Vergleich insbesondere der α- und β-Parvin-Expressionsmuster vor. Mittels radioaktiver *in situ*-Hybridisierung embryonaler Schnitte und Western-blot-Analyse von Gewebelysaten adulter Mäuse wurde daher die Expression von α- und β-Parvin vergleichend untersucht.

Mit Ausnahme des Zentralnervensystems zeigten beide Isoformen an E14.5 fast ubiquitäre Expression. Hierbei schien α-Parvin über verschiedenste Gewebe, etwa mesenchymal, muskulär oder vaskulär hinweg gleichmäßig stark exprimiert, während β-Parvin deutliche Unterschiede im Expressionsniveau zeigte und durchweg eher schwach exprimiert schien. Grundsätzlich zeigte α-Parvin an E14.5 damit universelle, β-Parvin wesentlich spezifischere Expression. Starke β-Parvin-Expression beschränkte sich auf quergestreifte, teilweise auch

glatte Muskulatur, periphere Neuronen und mit Megakaryozyten Vertreter der erythroiden Zelllinie. Auffällig war hierbei eine vergleichsweise schwache α-Parvin Expression in peripheren Neuronen und Megakaryozyten.

Auch adult zeigten beide Proteine fast ubiquitäre Expression, wobei nun auch β-Parvin ein ähnlich gleichmäßiges Expressionsmuster wie α-Parvin zeigte. Möglicherweise wird β-Parvin adult stärker exprimiert als während der Embryonalentwicklung. Konsistent hiermit haben Korenbaum et al. (2001) eine zunehmende Expression von β-Parvin in der späteren Embryonalentwicklung beobachtet. Für α-Parvin war dies nicht der Fall (Olski et al., 2001). Wie bereits embryonal zeigten beide Isoformen auch adult sehr schwache Expression im Gehirn. Die mitunter stärkste Expression von α- wie auch β-Parvin zeigte die adulte Lunge. Embryonal wurde hier keine klare Expression der Parvine beobachtet, was eine Heraufregulierung der Parvine in der Lunge während der späten Embryonalentwicklung, peri- oder postnatal andeutet. Im Gegensatz zu E14.5 erschien die adulte α-Parvin-Expression in Herz und Muskel extrem schwach. β-Parvin hingegen zeigte, wie bereits an E14.5 auch adult sehr starke Expression in Herz- und Skelettmuskulatur. Diese spätembryonale oder postnatale Verschiebung der muskulären Parvin-Expression von α- nach β-Parvin führt zu einem Expressionsverhältnis von α- zu β-Parvin im adulten Herz bzw. Skelettmuskel, wie es in keinem anderen adulten Gewebe beobachtet wurde. Aufschluss über die Expressionsregulation während der Myogenese geben die Unterschiede in der embryonalen und adulten Parvin Expression in Herz und Skelettmuskel jedoch nicht. Dennoch interessant ist in diesem Zusammenhang das Umschalten von der 37 kDa auf die 45 kDa-Spleißvariante von PINCH1 in differenzierenden C2C12-Myoblasten (Wang und Fässler, unpubl.), besonders vor dem Hintergrund möglicher IPP-Funktionen in der Homöostase von Herz- und Skelettmuskel (Chang et al., zur Publikation eingereicht). Die embryonale Expression von β-Parvin in peripheren Neuronen wurde adult nicht weiter verfolgt, wenngleich es im Gehirn etwas stärker exprimiert schien als α-Parvin. Die Situation in Blutplättchen adulter Tiere deckt sich mit der in Megakaryozyten an E14.5. β- jedoch nicht α-Parvin wird exprimiert (Prof. Dr. B. Nieswandt, persönliche Kommunikation). Damit zeigt sich eine interessante Situation der Parvin-Expression in hämatopoetischen Zellen. Der völligen Abwesenheit von α-Parvin steht die teilweise Expression von β-Parvin in der myeloiden und erythroiden Linie sowie die universelle Expression von γ-Parvin in hämatopoetischen Zellen gegenüber.

Insgesamt zeigt α-Parvin die breiteste Expression, embryonal scheint es in vielen Geweben dominant exprimiert. β-Parvin wird embryonal spezifischer exprimiert als α-Parvin. Deutliche Expression war auf Muskelgewebe, periphere Neuronen und Megakaryozyten beschränkt.

Während der Embryonalentwicklung bzw. postnatal wird β-Parvin aber offenbar heraufreguliert, so dass es in quegestreiften Muskelgeweben adult sogar dominant exprimiert scheint. γ-Parvin ist mit rein hämatopoetischer Expression die spezifischste Isoform. Auffällig ist die schwache α-Parvin Expression bzw. das Fehlen von α-Parvin in stark β- oder γ-Parvin-exprimierenden Geweben bzw. Zellen, was eine gewebespezifische Adaptation von IPP-Funktionen durch β- bzw. γ-Parvin andeutet. Dennoch sind α- und β-Parvin in vielen Geweben, wahrscheinlich auch in vielen Zelltypen koexprimiert. Die fast vollständige Kolokalisation beider Isoformen mit Paxillin zeigt die Präsenz beider Isoformen in denselben Adhäsionsstrukturen *in vitro*. Eine redundante subzelluläre Lokalisation beider Isoformen *in vivo* könnte Isoform-spezifische Funktionen bedeuten.

4.3 Generierung und Analysen β-Parvin-defizienter Mäuse

Die funktionale Zerstörung des β-Parvin-Gens *Parvb* erfolgte durch homologe Rekombination des p*Parvb*$^{\Delta}$-Konstruktes in R1 ES-Zellen. Mit 12 homolog-rekombinanten von insgesamt 360 isolierten Klonen war die Rekombinationseffizienz (3,3%) relativ niedrig. Ein Grund hierfür kann die 3´-gelegene Homologie-Region von nur 2,9 kb sein. Der Verlust von im Northern- wie Western-blot nachweisbaren Mengen *Parvb*-Transkript bzw. β-Parvin-Protein zeigte den vollständigen Funktionsverlust von β-Parvin in der *Parvb*-Linie (Abb. 3.3.2.1).

4.3.1 β-Parvin-Defizienz in der Embryonalentwicklung und adulten, basalen Homöostase

Embryonalentwicklung

β-Parvin-defiziente Mäuse waren vital und ohne offensichtlichen Phänotyp (vgl. 3.3.2). Dies zeigt zunächst, dass β-Parvin für die Embryonalentwicklung nicht essentiell ist. Die embryonalen Funktionen von ILK, deren Verlust zu Letalität an E5.5-E6.5 führt werden somit zumindest nicht exklusiv durch β-Parvin vermittelt (Sakai et al., 2003). Möglicherweise kompensiert α-Parvin für den β-Parvin-Verlust. Vorstellbar ist dies besonders vor dem Hintergrund der ubiquitären embryonalen α-Parvin-Expression (Abb. 3.2.1.1). Aufgrund der Zunahme der β-Parvin Expression in der späteren Embryonalentwicklung ist es zudem fraglich, ob β-Parvin frühembryonal stark exprimiert ist (Korenbaum et al., 2001). Somit könnten frühembryonale IPP-Funktionen grundsätzlich eher α-Parvin als β-Parvin vermittelt sein. Funktionen von β-Parvin könnte man daher eher in der späteren Embryonalentwicklung oder der adulten Homöostase erwarten. Jedoch zeigten β-Parvin-defiziente Tiere in der

spätembryonalen bzw. perinatalen Entwicklung ebenfalls keine Defekte wie sie unter ILK-Defizienz in Endothelzellen oder Chondrozyten beschrieben sind (Friedrich et al., 2004; Grashoff et al., 2003). Auch diese ILK-Funktionen sind somit nicht essentiell β-Parvin-vermittelt. In Anbetracht der engen funktionellen Beziehung zwischen Fibronektin, β1 Integrin und ILK in der vaskulären Entwicklung weist dies auf α-Parvin als wesentlichen Vermittler dieser Funktionen hin (vgl. 1.3.3, 1.4.3). Kompensation des β-Parvin-Verlustes durch α-Parvin ist jedoch auch in der späteren Embryonalentwicklung nicht unwahrscheinlich, da α-Parvin in fast allen β-Parvin-exprimierenden Geweben zu finden ist. Verschiedene Kranial- und Spinalganglien aber zeigten starke β- und schwache α-Parvin-Expression. Dennoch zeigte auch die Entwicklung des Nervensystems an E10.5 unter β-Parvin-Defizienz keine sichtbaren Defekte (Abb. 3.3.3.7). Dies schließt eine Kompensation der β-Parvin-Funktion durch α-Parvin im Nervensystem zwar nicht aus, jedoch würde man eventuell verstärkte α-Parvin Expression erwarten. Analysen der α-Parvin Expression in β-Parvin-defizienten Ganglien könnten hier Aufschluss geben. Da jedoch ein subtilerer Defekt in der neuronalen Entwicklung nicht auszuschließen ist, erscheinen weitere Analysen dahingehend sinnvoll. Von Interesse wäre auch eine Analyse der α-Parvin-Expression in Homogenaten ganzer Embryonen unter β-Parvin-Defizienz. Denn die Entbehrlichkeit von β-Parvin für eine Reihe embryonaler ILK-Funktionen wirft die grundsätzliche Frage auf, in wieweit Kompensation durch α-Parvin notwendig ist, oder wie verzichtbar β-Parvin prinizipiell für diese ILK-abhängigen Entwicklungsprozesse ist.

Adulte Homöostase

Ähnlich ist die Situation in adulten β-Parvin-defizienten Mäusen, die ebenfalls keinen offensichtlichen Phänotyp zeigten. Von Wildtyp-Tieren waren sie nicht zu unterscheiden, sie waren fertil und erreichten ein normales Alter. Eine Veränderung des Gewichts verschiedener β-Parvin exprimierender Organe, Lunge, Niere, Leber und Milz wurde nicht beobachtet.

In Anbetracht der starken Expression von β-Parvin im Herzen ist ein unveränderter Herz-Körper-Index unter β-Parvin-Defizienz bemerkenswert, da die konditionale ILK-Defizienz im Herzen zu einer starken Erhöhung des Herz-Körper-Indexes bzw. einer dilatativen, im Alter von 8-12 Wochen letalen Kardiomyopathie führt (White et al., 2006). Eine eingehendere Untersuchung β-Parvin-defizienter Herzen zeigte jedoch ebenfalls keine Defekte wie sie unter ILK-Defizienz im Herzen beobachtet wurden, etwa ein Verlust der Assoziation ventrikulärer Kardiomyozyten oder eine starke Zunahme des Bindegewebsanteils. Auch wurden keine

Veränderungen der ultrastrukturellen Organisation des Herzmuskels oder eine veränderte Lokalisation von β-Parvin assoziierten Proteinen beobachtet. Für die basale Homöostase des Herzens ist β-Parvin somit trotz dominanter Expression ebenfalls nicht essentiell. Dies ist weiterhin überraschend, da der Phänotyp unter Verlust von ILK im Herzen vergleichbar stark, eventuell stärker ist, als der von β1 Integrin (White et al., 2006; Shai et al., 2002). Hier ist zu bemerken, dass das im Vergleich zur konditionalen ILK-Defizienz verzögerte Auftreten einer Kardiomyopathie unter β1 Integrin-Defizienz (ungefähr 6 Monate) als möglichen Grund eine schlechtere Effizienz der Deletion hat. ILK scheint in der Homöostase des Herzens als wesentlicher Mediator von β1 Integrin zu fungieren, was einen ähnlich starken Phänotypen unter Parvin-Defizienz erwarten ließe. Vor diesem Hintergrund ist es unwahrscheinlich, dass die Funktion von β-Parvin als hier dominant exprimiertem Parvin grundsätzlich entbehrlich ist. Wahrscheinlicher ist hier tatsächlich eine Funktionsübernahme durch α-Parvin. Ähnliches scheint für den Skelettmuskel zu gelten. Hinweise auf eine wie von Mayer et al. (1997) unter Verlust von α7(β1) Integrin, sowie vergleichbar von Chang et al. (Manuskript in Vorbereitung) unter konditionalem Funktionsverlust von ILK beschriebene milde Dystrophie konnten unter β-Parvin-Defizienz nicht beobachtet werden. Die Tiere zeigten keine deutlich sichtbare Beeinträchtigung des Gangs wie Mäuse mit konditionaler Defizienz von ILK im Skelettmuskel. Auch wurde, zumindest im tieferen Muskelgewebe keine erhöhte Zahl zentralständiger Zellkerne oder eine erhöhte Varianz der Faserdicke beobachtet. Um eine schwache Dystrophierung des Muskels definitiv auszuschließen, sind jedoch Analysen der Muskel-Sehnen-Verbindung notwendig. Der enge funktionelle Zusammenhang von β1 Integrin und ILK sowie die Abhängigkeit innerhalb des IPP-Komplexes legen somit eine funktionelle Kompensation des β-Parvin-Verlustes bzw. Redundanz der beiden Isoformen nahe.

Funktionen von ILK in Lunge, Leber, Niere oder Milz sind *in vivo* nicht charakterisiert. In Anbetracht des im Vergleich zu Herz- und Skelettmuskulatur hohen Expressionsverhältnisses von α- zu β-Parvin überrascht die histologisch unauffällige Erscheinung dieser Organe unter β-Parvin-Defizienz nicht. Auch hier sind α-Parvin-Kompensation oder Redundanz denkbar. Die basale adulte Homöostase ist unter β-Parvin-Verlust somit nicht beeinträchtigt, wenngleich die adulte Expression von β-Parvin universeller erschien als die embryonale. Die starke Redundanz der adulten Expressionsmuster von α- und β-Parvin weist dennoch auf Isoform-spezifische Funktionen hin. Im Fall von β-Parvin scheinen diese unter basalen Zuchtbedingungen jedoch nicht physiologisch relevant zu sein.

Eine Voraussetzung für funktionelle Redundanz bzw. Kompensation durch α-Parvin in β-Parvin-defizienten Mäusen wäre die Stabilisierung von ILK. Tatsächlich war die Menge von ILK- sowie auch PINCH1-Protein in β-Parvin-defizientem Herz- und Skelettmuskel, wie auch allen anderen untersuchten Geweben nicht reduziert (Abb. 3.3.4.1). Jedoch zeigten Herz und Skelettmuskel, Gewebe mit starker β- und schwacher α-Parvin Expression, eine deutliche Heraufregulierung von α-Parvin-Protein unter β-Parvin-Defizienz. Dies legt nahe, dass α-Parvin und ILK sich hier gegenseitig und damit den gesamten ILK/PINCH/Parvin-Komplex stabilisieren, so dass β-Parvin im IPP-Komplex lediglich durch α-Parvin substituiert wird. Interessanterweise war die Expression von α-Parvin mRNA in β-Parvin-defizientem Herz- und Skelettmuskel unverändert (Abb. 3.3.4.2). Ähnlich zeigten die Herzen β-Parvin-defizienter Mäuse, die zusätzlich heterozygot für *Parva*/α-Parvin waren einen verringerten Anstieg von α-Parvin-Protein. Die Zunahme von α-Parvin ist somit höchstwahrscheinlich nicht transkriptionell reguliert, sondern durch Stabilisierung von α-Parvin-Protein über die vermehrte ILK-Bindung in IPP-Komplexen. Dies zeigt zunächst biochemische Redundanz zwischen α- und β-Parvin bei der IPP-Komplex-Bildung in Muskelzellen. Jedoch scheint der IPP-Komplex auch funktionell nicht grundlegend beeinträchtigt durch die Substitution von β- durch α-Parvin. Dies deutet das Ausbleiben sogar eines subtileren Herz- oder Muskelphänotyps unter β-Parvin-Defizienz vor dem Hintergrund der wichtigen Funktion von ILK in der Homöostase beider Gewebe an. Dies entspricht nicht den Ergebnissen von Zellkulturstudien, die zumeist divergente oder gar antagonistische Funktionen der beiden Isoformen nahe legen (Zhang et al., 2004; LaLonde et al., 2006, 2005; Yamaji et al., 2001; Troussard et al., 2003; Fukuda et al., 2003; Mishima et al., 2004; Mongroo et al., 2004). Prozesse die durch die beiden Parvine unterschiedlich reguliert werden sollen sind das Zellüberleben sowie das Zellspreiten, in Abhängigkeit von Rac und Cdc42. Für das Zellüberleben bzw. die Stabilisierung von Kardiomyozyten ist der PI-3-K/Akt/GSK-3β-Signaltransduktionsweg essentiell (vgl. 1.3.4; Condorelli et al., 2004; Shioi et al., 2000; Antos et al., 2001). Weiterhin wurde für ILK sowie auch α-Parvin regulatorischer Einfluss auf Akt und GSK-3β beschrieben. Daher würde man unter Annahme divergenter Einflüsse der beiden Parvine auf das Zellüberleben bei der vorliegenden Substitution von β- durch α-Parvin einen veränderten Status des PI-3-K/Akt/GSK-3β-Signalweges erwarten (vgl. 1.4.2; Delcomenne et al., 1998; Fukuda et al., 2003). Die basale Phosphorylierung von Akt und GSK-3β war jedoch unverändert in β-Parvin-defizienten Herzen (Abb. 3.3.4.3). Auch ergab eine unveränderte Expression des Herz-spezifischen Stressmarkers CARP keinen Hinweis auf verstärkten Stress des Herzmuskels. Die Annahme prinzipiell divergenter Funktionen von α- und β-Parvin für

das Zellüberleben wird durch diese Ergebnisse somit nicht gestützt. Vielmehr scheint zumindest in quergestreiften Muskelgeweben weitreichende funktionelle Redundanz zwischen α- und β-Parvin vorzuliegen.

Erste histologische Untersuchungen weiterer β-Parvin-exprimierender Organe zeigten ebenfalls keine strukturellen Veränderungen unter β-Parvin-Verlust. Hierzu zählten Lunge, Niere, Leber und Milz (Abb. 3.3.3.6). Eine ähnliche Zunahme der α-Parvin-Expression wie in Herz und Skelettmuskel wurde jedoch in keinem dieser Gewebe festgestellt, was prinzipiell zwei Gründe haben kann. Denkbar ist zum einen eine Zelltyp-spezifische Stabilisierung von α-Parvin in Herz- und Skelettmuskelzellen. Die für Herz- und Skelettmuskel spezifische Expression der 45 kDa-PINCH1-Version deutet tatsächlich auf eine spezielle IPP-Situation in diesen Geweben hin (Abb. 3.3.4.1). Dennoch ist dies nicht sehr wahrscheinlich, da die Substitution auf dem grundlegenden Mechanismus der IPP-Komplexbildung aus zytosolisch vorliegenden, konstant exprimierten Einzelkomponenten basiert. Bei gegebener Expression von α- und β-Parvin in anderen Geweben müsste unter β-Parvin-Verlust die „automatische" Rekrutierung von α-Parvin in IPP-Komplexe unterbunden werden. Dies müsste durch einen weiteren, Komplex-externen Faktor determiniert werden und zudem in den meisten Geweben bzw. Zelltypen geschehen. Alternativ müssten α- und β-Parvin grundsätzlich unterschiedliche subzelluläre Lokalisation zeigen. Zudem wäre in Folge des β-Parvin-Verlustes eine Destabilisierung von ILK zu erwarten, was aber in keinem dieser Gewebe beobachtet wurde. Wahrscheinlicher ist ein vergleichsweise schwacher, im Western-blot nicht sichtbarer Anstieg von α-Parvin-Protein in anderen Geweben, die unter Wildtyp-Bedingungen ohnehin meist mehr α-Parvin und weniger β-Parvin als Herz und Skelettmuskel exprimieren. Somit ist relativ gewebeunspezifische und funktionell weitreichende Redundanz bzw. Kompensation durch α-Parvin der wahrscheinlichste Grund für das Ausbleiben von Phänotypen unter β-Parvin-Defizienz. Eine grundlegend andere Situation scheint im Zebrabärbling *D. rerio* vorzuliegen. Die von Bendig et al. (2006) beschriebene ILK-Mutante „main-squeeze" trägt die L308P-Mutation, für die Bendig et al. (2006) *in vitro* eine reduzierte Kinase-Aktivität sowie den Verlust der β-Parvin-Bindung gezeigt haben. Die Mutante zeigt einen letalen Kontraktionsdefekt des Herzens bei ansonsten normaler Entwicklung der Tiere, auch des Herzens. Dieser Phänotyp kann durch Morpholino-vermittelten Funktionsverlust von β-Parvin kopiert werden. Der Morpholino-vermittelte Verlust von α-Parvin führt hingegen zu einem wesentlich schwächeren Kontraktionsdefekt (W. Rottbauer, persönliche Kommunikation). Hier zeigt sich, anders als in der Maus eine funktionelle Dominanz von β-Parvin, das

kompensatorische Potential von α-Parvin gewährleistet in *D. rerio* damit keine normale Entwicklung bzw. Homöostase.

Eine Zunahme von γ-Parvin-Protein in Milz oder Thymus ähnlich der α-Parvin-Zunahme in Herz und Skelettmuskel wurde nicht festgestellt. Die Möglichkeit von Redundanz zwischen β- und γ-Parvin bei der Bildung von IPP-Komplexen wird in Abschnitt 4.4 diskutiert.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass β-Parvin für die bisher beschriebenen Funktionen von ILK in Embryonalentwicklung und adulter Homöostase nicht der essentielle Vermittler ist. Das Fehlen eines Phänotypen unter β-Parvin-Defizienz, die zumindest in Herz und Skelettmuskel redundante IPP-Komplex-Bildung sowie der offenbar unveränderte Stress- und Akt/GSK-3β-Signalstatus in β-Parvin-defizienten Herzen machen eine relativ gewebeunspezifische und funktionell weitreichende Kompensation des β-Parvin-Verlustes durch α-Parvin sehr wahrscheinlich. Die in *D. rerio* beobachtete funktionelle Dominanz von β-Parvin konnte in der Maus somit nicht bestätigt werden. Denkbar ist weiterhin, dass spezifische Funktionen von β-Parvin in der Embryonalentwicklung bzw. der adulten Homöostase eher subtil und unter Haltungsbedingungen eventuell verzichtbar sind. Antagonistische oder zumindest divergente Funktionen von α- und β-Parvin können nicht ausgeschlossen werden, dennoch stützen die gezeigten Befunde die durch Zellkulturstudien nahe gelegte Annahme einer grundsätzlichen funktionellen Divergenz von α-und β-Parvin nicht.

Plausibel erscheint ein hohes kompensatorisches Potential von α-Parvin, wenn Parvin-Funktionen grundsätzlich weniger in der Signaltransduktion bzw. der Rekrutierung von Signalproteinen liegen würden, sondern eher in der strukturellen Verbindung von F-Aktin und Integrinen. Mögliche Funktionen der ILK-Parvin-Bindung könnten dabei in der mechanischen Kraftübertragung zwischen F-Aktin und Integrinen liegen, etwa wie es für Talin beschrieben wurde (Tadokoro et al., 2003). Dahingehend wurde eine hohe Detergenz-Resistenz bzw. Stabilität der ILK/α-Parvin- sowie der ILK/β-Parvin-Bindung beobachtet (Abb. 3.3.4.2). Weiterhin liegt die bisher nur für α-Parvin gemessene F-Aktin-Affinität mit einem K_D von 8,4 µM im Bereich anderer F-Aktin-bindender Proteine mit Strukturfunktion (Olski et al., 2001). Auch scheinen die muskulären Funktionsverlustphänotypen von ILK in der Maus, *D. rerio*, *D. melanogaster* und in *C. elegans* primär mechanisch induziert zu sein, anders als Phänotypen beispielsweise von PI-3-K oder Akt (Chang et al., Manuskript in Vorbereitung; White et al., 2006; Bendig et al., 2006; Zervas et al., 2001; Mackinnon et al., 2002; Condorelli et al., 2002; Staveley et al., 1998; Shioi et al., 2000; vgl. 1.3.4, 1.4.3). Gleiches gilt für den Verlust von pat6/Parvin in *C. elegans* (Lin et al., 2003). So vermittelt pat-6/Parvin in *C.*

elegans die Rekrutierung von Myofilamenten in die sich entwickelnden „dense-bodies“ (Lin et al., 2003). Ähnlich der von Zervas et al. (2001) unter ILK-Verlust in der Muskulatur von *D. melanogaster* Embryos beschriebenen Ablösung der Aktinfilamente von der Plasmamembran, haben Chang et al. (Manuskript in Vorbereitung) auch in der Maus unter konditionaler ILK-Defizienz im Skelettmuskel im Bereich von Kostameren einen Verlust der Myofibrillen-Struktur beobachtet. Die Destabilisierung der Muskel-Sehnen-Verbindung ist zudem stark belastungsabhängig. Zudem könnte die Prominenz mechanisch induzierter Muskelphänotypen in den IPP-Verlustmutanten von Invertebraten auf strukturell-mechanische Funktionen als ursprüngliche Parvin-Funktionen hinweisen. Weitere Versuche dahingehend, etwa vergleichende Stabilitätsmessungen von β-Parvin- und ILK-defizienten Muskelfasern könnten hier weiteren Einblick ermöglichen. Auch mit dem im folgenden Abschnitt diskutierten Belastungstraining für Herz und Skelettmuskel sollte unter anderem dieser Frage nachgegangen werden.

4.3.2 Herz- und Skelettmuskelanalysen nach Belastungstraining

Hintergrund der Belastungsversuche an Herz und Skelettmuskel war die Frage, wie weit das kompensatorische Potential von α-Parvin reicht. Über mögliche Belastungs-abhängige Phänotypen sollten subtilere, spezifische Funktionen von β-Parvin untersucht werden, die Zellkulturstudien entsprechend in der Regulierung des Überlebens bzw. der Stabilisierung von Zellen liegen könnten. Nach vierwöchigem Laufbandtraining von 1 h pro Tag bei 20 m/min wurden Herzparameter der Tiere per Ultraschall gemessen, sowie Herz- und Muskelproben histologisch bzw. biochemisch analysiert.

β-Parvin-defiziente Tiere zeigten einen leicht reduzierten Herz-Körper-Index nach Training (Abb. 3.3.5.2). Dies kann grundsätzlich eine fehlende, hypertrophe Anpassung an die Belastung darstellen oder aber eine tatsächliche Verringerung des relativen Herzgewichtes, also eine fehlende Stabilisierung des Herzgewebes. Da aber der Herz-Körper-Index der Wildtypen im Bereich der Werte vor Training lag (Abb. 3.3.2.2), ist bei den gewählten Trainingsbedingungen nicht von einer Hypertrophierung der Wildtyp-Herzen auszugehen, so dass der verringerte Herz-Körper-Index der β-Parvin-defizienten Tiere eher eine mangelnde Stabilisierung des Herzens darstellen könnte. Die mittels Ultraschall gemessene Reduktion der linksventrikulären Masse β-Parvin-defizienter Herzen erreichte jedoch nicht das zugrundegelegte Signifikanzniveau von 5%. Konsistent mit einer verringerten Herzmasse zeigte sich wiederum ein reduzierter Kardiomyozytendurchmesser. Möglicherweise war also die Stabilität β-Parvin-defizienter Kardiomyozyten durch den mechanischem Stress leicht

beeinträchtigt, ein deutlicher Einfluss der β-Parvin-Defizienz konnte jedoch nicht festgestellt werden. Dementsprechend wurde auch keine funktionelle Beeinträchtigung β-Parvin-defizienter Herzen beobachtet, Herzrate und Auswurffraktion waren nicht signifikant verändert. Auch erbrachte die im Western-blot unveränderte Expression des Titin-assoziierten, Nkx2.5/ANF-regulatorischen Herz-Stressmarkers CARP (cardiac adriamycin responsive protein) keine biochemische Bestätigung eines erhöhten mechanischen Stresses in den β-Parvin-defizienten Herzen (Abb. 3.3.5.3) (Miller et al., 2003a; Jeyaseelan et al., 1997). Jedoch war die CARP-Expression bei allen Tieren, vor sowie nach dem Training nicht konsistent verändert. Dies wirft die Frage auf in wieweit die mechanische Belastung durch das Training tatsächlich zu Stress in den Herzen geführt hatte. Der unveränderte Phosphorylierungszustand der mechanoresponsiven Kinasen Erk1/2 vor und nach Training wies ebenfalls nicht auf starke Stressinduktion durch das Training hin. Lediglich die Phosphorylierung von Akt und GSK-3β war trotz hoher individueller Varianz in den Tieren nach Training tendenziell ein wenig erhöht. Da beide Kinasen für die Stabilität von Kardiomyozyten unter Stress wichtig sind (vgl. 1.3.4), deutete dies zumindest leichten Stress an. Zudem gibt der Western-blot den Status nicht nur der Kardiomyozyten, sondern aller weiterer im Herzgewebe enthaltenen Zellen wieder. Jedoch wurde auch hier keine konsistente Veränderung zwischen Wildtyp- und β-Parvin-defizienten Herzen beobachtet, so dass die eventuelle Destabilisierung der Kardiomyozyten unter β-Parvin-Defizienz wahrscheinlich nicht primär Akt/GSK-3β-abhängig war. Jedoch verfälscht der Nicht-Kardiomyozytenanteil den Western-blot wiederum und macht eine Interpretation schwierig. In Anbetracht eines reduzierten Kardiomyozytendurchmessers überraschte das leicht reduzierte Verhältnis von Kapillargefäßen zu Kardiomyozyten. Dies müsste zu einer entsprechend stärkeren Reduzierung der absoluten Kapillarisierung führen. Weiterhin müsste dem eine beeinträchtigte parakrine Signalübermittlung von Kardiomyozyten zu Endothelzellen zugrunde liegen. Ein möglicher Mediator hier ist V-EGF (vascular endothelial growth factor), für den Bendig et al. (2006) im Herzen von *D. rerio* eine Funktion als ILK-Signalvermittler nahe gelegt haben. Eine im Western-blot unveränderte Expression von V-EGF lieferte jedoch auch hier keine biochemische Bestätigung des histologischen Befundes.

Eine erste biochemische Analyse von Skelettmuskelproben nach Training weist möglicherweise auf eine stärkere Stressinduktion durch das Lauftraining in der Skelettmuskulatur hin. *EDL*- (*Extensor digitorum longus*) Proben nach Training zeigten eine deutlich stärkere Erk1/2-Phosphorylierung als VL- (*Vastus latrealis*) Proben ohne Training (Abb. 3.3.5.4). Der Vergleich von *EDL*-Proben nach Training mit *VL*-Proben vor Training ist

aber nur bedingt interpretierbar, da der *EDL* ein Muskel mit hohem Anteil schnell kontrahierender Fasern ist, während der *VL* ein gemischt-faseriger Muskel ist. Jedoch haben Csukly et al. (2002) bei einem Vergleich von *EDL*, *SOL* (*Soleus*) und *PLN* (*Plantaris*), Skelettmuskel mit sehr unterschiedlicher Faserzusammensetzung keine Differenzen in der Erk1/2-Aktivierung durch passive Dehnung beobachtet. So ist es wahrscheinlich, dass die stärkere Erk1/2-Phosphorylierung in den *EDL*-Proben nach Training zumindest teilweise durch das Training bedingt ist und nicht ausschließlich durch die unterschiedliche Faserzusammensetzung. Jedoch zeigte sich wiederum kein Unterschied zwischen Wildtyp- und β-Parvin-defizienten *EDL*-Proben, was eine Beeinträchtigung der mechanoresponsiven Erk1/2-Aktivierung unter β-Parvin-Verlust bzw. einen regulatorischen Einfluss von β-Parvin unwahrscheinlich macht. Die histologische Untersuchung β-Parvin-defizienten *EDL*-Gewebes sowie anderer Muskel auf eine eventuelle belastungsinduzierte Dystrophierung ähnlich wie unter ILK-Verlust könnten hier weitere Erkenntnis bringen.

Durch das Laufbandtraining konnte also offenbar nur milder Stress in den Herzen induziert werden. Dementsprechend zeigt sich der morphologische/histologische Befund einer Destabilisierung des Herzgewebes, bzw. von Kardiomyozyten und Gefäßen unter β-Parvin-Defizienz inkonsistent. Eine funktionale Beeinträchtigung β-Parvin-defizienter Herzen in Folge dieses leichten Stresses wurde nicht beobachtet. Wenngleich dieser Phänotyp inkonsistent scheint, so stellt sich in Anbetracht des relativ schwachen Stimulus die Frage, ob β-Parvin-defiziente Herzen unter stärkerer mechanischer Beanspruchung deutlichere Veränderungen zeigen würden. Die beobachtete Tendenz zu einer Destabilisierung von Kardiomyozyten zeigt dahingehend funktionelle Ähnlichkeit zu der von White et al. (2006) unter ILK-Defizienz im Herzen beschriebenen dilatativen Kardiomyopathie sowie zu der von Chang et al. (Manuskript in Vorbereitung) beobachteten Dystrophie unter ILK-Defizienz im Skelettmuskel, jedoch auch zu der von Cheng et al. (2005) dokumentierten Funktion des ILK/PINCH/α-Parvin-Komplexes für die Hypertrophierung von Kardiomyozyten *in vitro*. Grundsätzliche funktionale Divergenz zwischen α- und β-Parvin deutet sich damit auch hier nicht an. Die eventuell teils Muskel-spezifische, wahrscheinlich aber eher Trainings-induzierte Erk1/2-Aktivierung im *EDL*-Muskel deutet eine stärkere Stressinduktion im Skelettmuskel an als im Herzen. Die unveränderte Antwort unter β-Parvin-Defizienz deutet jedoch auf eine funktionelle mechanoresponsive Erk1/2-Aktivierung unter β-Parvin-Verlust hin. was auch hier wieder das kompensatorische Potential von α-Parvin zeigt. Weitere Erkenntnis sollte hier die histologische Untersuchung des *EDL*- und anderer Muskel auf eine

belastungsinduzierte Dystrophie bringen. Läge eine solche vor, könnte die hier β-Parvin/Dysferlin-Interaktion von Bedeutung sein (Matsuda et al., 2005).

4.3.3 β-Parvin-defiziente MEF

In einem weiteren Ansatz zur Untersuchung möglicher β-Parvin-spezifischer Funktionen wurden Adhäsion, Morphologie und Migration von β-Parvin-defizienten primären embryonalen Fibroblasten (MEF) analysiert. Dies erfolgte im Hinblick auf möglicherweise spezifische Funktionen von β-Parvin bei diesen Prozessen über die Bindung an α-PIX. Für die Rac/Cdc42-spezifischen GEF der PIX-Familie wurden Funktionen bei Zellspreiten, Fokalkontakt-Organisation, Polarisierung und Migration bzw. Chemotaxis gezeigt (Mishima et al., 2004; Cau und Hall, 2005; Rosenberger und Kutsche; 2006; Nishiya et al., 2005; Li et al., 2003c). Somit stellen sie potentielle Mediatoren regulatorischer Einflüsse von IPP-Komplexen auf das Zytoskelett und Fokalkontakte dar. So haben Filipenko et al. (2005) die Abhängigkeit der durch ILK-Überexpression induzierten Rac-Aktivität in Epithelzellen von α-PIX gezeigt. Rosenberger et al. (2003) haben die Bindung von β-Parvin an α-PIX dokumentiert. Eine Bindung an α-Parvin wurde nicht beschrieben. Daher wurde zunächst die Isoform-Spezifität der PIX/Parvin-Bindung analysiert.

Hierbei stellte sich heraus, dass β-Parvin nicht nur mit α-PIX, sondern auch mit dem Dimerisierungspartner β-PIX interagiert, während α-Parvin weder mit α-PIX noch mit β-PIX interagiert (Abb. 3.3.6.1). Neben der publizierten Bindung von β-Parvin an α-PIX zeigt die β-Parvin/β-PIX Bindung Konsistenz im Hinblick auf die β-Parvin/PIX-Bindung. Bemerkenswert ist das Ausbleiben von α-Parvin/PIX-Interaktionen vor dem Hintergrund, dass die Versuche unter Überexpression durchgeführt wurden. Wenngleich eine Bindung von α-Parvin an PIX-Proteine nicht völlig ausgeschlossen werden kann, sie könnten etwa Zelltyp-spezifisch, sehr kurzzeitig oder anders reguliert sein, zeigt dies doch zumindest grundlegende Unterschiede zwischen der β-Parvin/PIX- und einer möglichen α-Parvin/PIX-Interaktion. Daher wurden Wildtyp und β-Parvin-defiziente MEF im Hinblick auf mögliche PIX-regulierte Prozesse analysiert. Die Morphologie β-Parvin-defizienter MEF zeigte keine Veränderungen zu den Wildtypen (Abb. 3.3.6.2). Anders als ILK-defiziente Fibroblasten zeigten β-Parvin-defiziente MEF auch keine Anzeichen einer gestörten Organisation des Aktin-Zytoskeletts oder der Fokalkontakte (Abb. 3.3.6.3) (Sakai et al., 2003). Und auch die Adhäsion auf verschiedenen Substraten sowie die gerichtete Migration im *in vitro*-Wundheilungsversuch zeigten keine Defekte der β-Parvin-defizienten MEF (Abb. 3.3.6.4).

Dies zeigt, dass die vielfach *in vitro* beschriebenen essentiellen Funktionen von ILK für die β1 oder β3 Integrin abhängige Aktin-Reorganisation, Fokalkontaktorganisation oder Adhäsion zumindest in MEF nicht zwingend von β-Parvin vermittelt werden. Möglicherweise ist α-Parvin, wie in der Embryonalentwicklung auch hier funktionell dominant. Vergleichbare Analysen von MEF unter Defizienz von α-Parvin erscheinen hier sinnvoll. Unter dem Ausschluss von α-Parvin/PIX-Interaktionen deutet dies ferner an, dass die β-Parvin/PIX-Interaktion in MEF für diese Prozesse ebenfalls nicht essentiell ist. Die Verzichtbarkeit der β-Parvin/PIX-Interaktion zeigt, dass Kompensation von IPP-Funktionen offenbar nicht nur innerhalb des Komplexes, sondern auch durch redundante regulatorische Verbindungen ausserhalb des Komplexes vermittelt werden kann. So könnten die für Adhäsion, Zellspreiten oder Migration β-Parvin-defizienter MEF notwendigen Aktin-Reorganisationsprozesse durch PINCH/Nck-2/DOCK180-Interaktion vermittelt werden (vgl. 1.4.2). Dies weist auch auf eine hohe Adaptationsfähigkeit des Komplexes an den Expressionsstatus potentieller Interaktoren in verschiedenen Geweben bzw. Zellen hin. Eine Frage ist hier, in wieweit die in Zellkulturstudien beobachteten funktionellen Unterschiede von α- und β-Parvin Reaktionen des IPP-Komplexes in Anpassung an Zelltyp und Versuchsbedingungen wiederspiegeln und nicht zwingend eine grundsätzliche funktionelle Tendenz. Interessant wären hier vergleichende Experimente unter α-, β- und α-/β-Parvin-Defizienz im gleichen Zelltyp.

4.4 Adhäsion und Migration β-, γ- und β-/γ-Parvin-defizienter Leukozyten

Adhäsion und Migration von Leukozyten wurden aus verschiedenen Gründen untersucht. Grundsätzlich zeichnen sich Leukozyten durch besondere migratorische Fähigkeiten aus. So sind sie etwa fähig zur Extravasation und zeichnen sich durch hohe Migrationsgeschwindigkeiten von bis zu 25 μm/min in dreidimensionalen Matrizes aus (Friedl et al., 1998, 1994). Während die Notwendigkeit von Integrinen für die Extravasation unbestritten ist, erscheint es fraglich, in wieweit eine schnelle interstitielle Migration von Leukozyten Integrin-vermittelt ist, da die Regulation von Integrinen über Affinität und Avidität hier vergleichsweise langsam erscheint. Auch zeigen Leukozyten in zweidimensionaler Zellkultur keine Fokalkontakte, sondern Podosomen, deren Adhäsionsfunktion nicht klar ist (Linder und Kopp, 2005). Daher sind die adhäsiven und migratorischen Eigenschaften von Leukozyten unter Funktionsverlust von Integrin-assoziierten Proteinen interessant. Weitere Gründe für die Analyse speziell β-Parvin-defizienter Leukozyten waren die Abwesenheit von α-Parvin sowie die unter anderem von Li et al. (2003c) gezeigte Rolle von α-PIX/PAK/Cdc42 für die chemotaktische Migration von

Leukozyten. Liu et al. (2005) haben weiterhin eine Bedeutung von ILK für die Chemotaxis von Lymphozyten beschrieben.

Die Generierung γ-Parvin-defizienter Mäuse wurde von Chu et al. (2006) beschrieben. Hier wurden Migrationsstudien von γ-Parvin-defizienten Lymphozyten durchgeführt, da γ-Parvin das einzige in T- und B-Zellen exprimierte Parvin ist, das eine mögliche Funktion von ILK bei der Chemotaxis vermitteln könnte. Die Generierung β-/γ-Parvin-doppeldefizienter Mäuse erfolgte im Hinblick auf die Expression von β- und γ-Parvin in Makrophagen und Dendritischen Zellen zur Umgehung möglicher Redundanz bzw. zur Generierung von vollständig Parvin-defizienten Zellen. Sie wurde durch sequenzielle homologe Rekombination von *Parvg* und *Parvb* durchgeführt, da die beiden Gene durch nur 12 kb getrennt, direkt benachbart auf Chromosom 15E3 liegen und daher eine meiotische Seggregation nicht stattfindet. Die in den Abbildungen 3.5.1.1-3 wiedergegebene erfolgreiche Keimbahninsertion der modifizierten *Parvb* und *Parvg*-Allele auf demselben Chromosom führte, wie in Abbildung 3.5.2 zu sehen zum vollständigen Verlust beider Proteine. Die Tiere waren vital und zeigten keinen offensichtlichen Phänotyp. Dies wäre jedoch auch überraschend gewesen in Anbetracht der rein hämatopoetischen Expression von γ-Parvin sowie des Fehlens von Phänotypen unter β- bzw. γ-Parvin-Defizienz. Auffällig bei der homologen Rekombination von p*Parvb*$^{\Delta}$ im Rahmen der Generierung der doppeldefizienten Mäuse war eine extrem schlechte Rekombinationseffizienz von 0,125% (1/800 Klonen). Bei der Generierung der Parvb-Einzelmutante betrug sie 3,3%. Denkbar ist, dass die vorherige Rekombination im *Parvg*-Lokus die Chromatinstruktur derart verändert hat, dass eine effektive homologe Rekombination im *Parvb*-Lokus anschließend erschwert wurde.

4.4.1 Makrophagen

Die Morphologie sowie der zeitliche Verlauf des Spreitens von β-Parvin-defizienten Makrophagen auf Fibronektin zeigte keine Beeinträchtigung (Abb. 3.3.6.5). Auch hier zeigt sich somit keine essentielle Bedeutung von β-Parvin, wenngleich eine Kompensation durch α-Parvin ausgeschlossen ist. Die Western-blot Analyse zeigte keine Induktion der α-Parvin-Expression unter β-Parvin-Verlust. Zunächst zeigte sich damit ähnlich wie unter β-Parvin-Defizienz in Herz und Skelettmuskel keine veränderte Transkriptionsaktivität von *Parva*/α-Parvin unter β-Parvin-Verlust. Weiterhin zeigt dies, dass β-Parvin-Funktionen wahrscheinlich verzichtbar sind für das Spreiten von Makrophagen. Alternativ könnte hier aber auch γ-Parvin kompensieren, da es in Makrophagen exprimiert ist. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da zum einen keine Zunahme von γ-Parvin-Protein in β-Parvin-defizienten Makrophagen beobachtet

wurde. Zudem zeigten die Zellen einen Rückgang des ILK-Proteins. Hier scheint also eine grundlegend andere Situation als unter β-Parvin-Defizienz etwa in Herz oder Skelettmuskel vorzuliegen. γ-Parvin ist nicht in der Lage, die unter Verlust von β-Parvin freiwerdenden ILK-Bindungsstellen zu besetzen und den Komplex zu stabilisieren. Dies kann verschiedene Gründe haben. Zum einen kann die spezifische Bildung von ILK/β-Parvin- und die von ILK/γ-Parvin-Komplexen durch die Präsenz weiterer Komplex-externer Faktoren determiniert werden. Dies würde jedoch verlangen, dass das entsprechende ILK-Protein den determinierenden Faktor bereits vor β-Parvin bindet. Alternativ oder zusätzlich könnten β- und γ-Parvin unterschiedliche subzelluläre Lokalisation haben, so dass es nicht zur Interaktion von γ-Parvin mit dem ILK-Protein des β-Parvin-Komplexes kommt. Theoretisch denkbar wäre auch eine höhere ILK-Affinität von γ-Parvin als von β-Parvin, so dass bereits unter β-Parvin Wildtyp-Bedingungen der größte Teil des γ-Parvin-Proteins in IPP-Komplexen gebunden ist und durch den β-Parvin-Verlust freiwerdende ILK-Bindungsstellen aufgrund eines „Mangels“ an γ-Parvin-Protein nicht besetzt werden können. Dies ist jedoch fast auszuschließen, da eine analoge Situation unter γ-Parvin-Defizienz in Makrophagen beobachtet wurde (Chu et al., 2006). Hier zeigt β-Parvin keine Zunahme des Proteins, ebenfalls aber ist weniger ILK-Protein in γ-Parvin-defizienten Makrophagen. Dies schließt eine wie zwischen α- und β-Parvin zumindest einseitig beobachtete Redundanz in der IPP-Komplexbildung zwischen β- und γ-Parvin aus. Damit erscheint auch die Wahrscheinlichkeit einer funktionellen Redundanz oder Kompensation zwischen β- und γ-Parvin extrem unwahrscheinlich. Somit scheint β-Parvin für das Spreiten von Makrophagen auf Fibronektin, ähnlich wie in MEF verzichtbar, mit dem Unterschied, dass hier die Funktion des ILK/β-Parvin-Komplexes wahrscheinlich prinzipiell verzichtbar ist, da es destabilisiert wird. Um eine mögliche Funktion des ILK/γ-Parvin-Komplexes beim Spreiten zu testen bzw. eine Kompensation von β- durch γ-Parvin auszuschließen wurden die Morphologie und der zeitliche Verlauf des Spreitens von β-/γ-doppeldefizienten Makrophagen analysiert. Jedoch zeigte sich hier das gleiche Bild. Die Morphologie der Zellen zeigte keine konsistente Veränderung und auch der Zeitverlauf des Spreitens war unverändert (Abb. 3.5.3.1). Die gleichzeitige drastische Reduzierung des ILK-Proteins zeigt dabei, dass weder ILK/β-, noch ILK/γ-Parvin-Komplexe für das Spreiten von Makrophagen eine essentielle Funktion haben, anders als in fibroblastoiden Zellen. Möglicherweise ist das Spreiten von Makrophagen hier nicht oder nicht primär β1 Integrin-abhängig, sondern eher durch das Leukozyten-spezifische β2 Integrin vermittelt.

Interessanterweise wurde α-Parvin selbst unter β-/γ-Parvin-Doppeldefizienz in Makrophagen nicht induziert. Die transkriptionelle Regulation von α-Parvin scheint somit gänzlich unabhängig von der Präsenz von ILK/β- und ILK/γ-Parvin-Komplexen zu sein, zumindest in Makrophagen. Ähnlich erscheint eine transkriptionelle Aktivierung von β- oder γ-Parvin in Makrophagen unter Verlust der jeweils anderen Isoform aufgrund der fehlenden Zunahme der Proteine unwahrscheinlich. Dies deutet eine generelle transkriptionelle Unabhängigkeit der Parvine vom IPP-Status der Zelle an.

Da keine essentielle Bedeutung von ILK für das Spreiten von Makrophagen *in vitro* festgestellt werden konnte, wurde im nächsten Schritt die Adhäsion von Makrophagen *in vivo* unter β-, γ- und β/γ-Parvin-Defizienz untersucht. Da Lu et al. (2002) für β1 Integrin Funktion bei der Adhäsion von B-Lymphozyten in der Marginalzone der Milz beschrieben haben, und da β1 Integrin-defiziente Marginalzonenmakrophagen eine abgerundete Morphologie und eine Delokalisation gezeigt haben (T. Lämmermann, persönliche Kommunikation), wurde die Lokalisation von verschiedenen Populationen β- und β/γ-Parvin-defizienter Makrophagen in der Marginalzone der Milz untersucht (Abb. 3.5.3.2-5). Jedoch zeigte keine der Makrophagen-Populationen eine konsistente Delokalisation der Zellen oder erkennbare morphologische Veränderungen. Somit zeigte sich die Adhäsion verschiedener Makrophagen *in vivo* ebenfalls unverändert unter vollständigem Parvin-Verlust. Eventuell ist ILK hier nicht essentieller Vermittler der β1 Integrin-abhängigen Adhäsion. Möglicherweise kompensiert hier β2 Integrin, wie es Lu et al. (2002) für B-Zellen der Marginalzone beschrieben haben.

4.4.2 Dendritische Zellen

Mögliche Funktionen von Parvinen für die interstitielle Migration von Dendritischen Zellen (DC) wurden ebenfalls *in vivo* untersucht. Hierfür wurden Versuchstieren Fluoreszenz-markierte Wildtyp- und β- bzw γ-Parvin-defiziente DC in die Fußsohlen injiziert und die Migration in die poplietalen Lymphknoten untersucht.

β-Parvin-defiziente DC migrierten wie auch Wildtyp-DC in den T-Zell-Kortex der poplietalen Lymphknoten ein und zeigten in der nichtquantitativen mirkoskopischen Analyse ein den Wildtypen sehr ähnliches Bild (Abb. 3.3.6.6). Auch die Morphologie der Zellen wirkte nicht verändert. Gleiches gilt für γ-Parvin-defiziente DC (Abb. 3.4.1) (Chu et al., 2006). Die quantitative Analyse der Migration γ-Parvin-defizienter DC lieferte darüber hinaus keine Hinweise auf eine beeinträchtigte interstitielle Migration. Dies ist nicht konsistent mit der von Yoshimi et al. (2005) beschriebenen Funktion von γ-Parvin für die Chemotaxis von U937-Zellen, einer von Monozyten abgeleiteten Zelllinie. Jedoch zeigt diese Zelllinie nur relativ

geringe Verwandschaft zu primären Monozyten, so zeigen die Zellen die Bildung von Fokalkontakten, was für myeloide Zellen ungewöhnlich ist. Grundsätzlich denkbar ist eine gegenseitige funktionelle Kompensation von β- und γ-Parvin in DC. Jedoch ist dies auch hier wieder sehr unwahrscheinlich, da der Expressionsstatus der IPP-Komponenten in β- bzw. γ-Parvin-defizienten DC prinzipiell das gleiche Bild zeigt wie in Makrophagen. Eine eindeutige Zunahme von β- oder γ-Parvin-Protein unter Defizienz der anderen Isoform zeigte sich nicht (Abb. 3.3.6.6.) (Chu et al., 2006). Ebenso wurde keine Induktion von α-Parvin beobachtet, aber eine Reduktion von ILK-Protein. Damit bestätigen die DC die bereits in den Makrophagen beobachtete biochemische Inkompatibilität von ILK/β-Parvin- und ILK/γ-Parvin-Komplexen, sowie die transkriptionelle Unabhängigkeit der Parvine vom IPP-Status der Zelle. Damit ist auch für ILK eine wichtige Funktion für die interstitielle Migration von DC nahezu auszuschließen. Wenngleich dadurch wichtige Funktionen von β1 Integrin für die interstitielle Migration von DC nicht ausgeschlossen werden, unterstützen die Befunde diese Möglichkeit nicht. Der Negativ-Befund für die DC ist weniger überraschend als der für die Makrophagen, da eine Entbehrlichkeit der IPP-Funktion bei der Migration von DC eine weniger ausgeprägte Integrin-Abhängigkeit dieser schnellen Migration prinzipiell favorisiert als dass sie ihr widerspricht.

4.4.3 T- und B-Lymphozyten

Die Einwanderung von T- und B-Lymphozyten in Milz und Lymphknoten wurde vor dem Hintergrund der von Liu et al. (2005) beschriebenen Rolle von ILK bei der Chemotaxis von T-Lymphozyten durchgeführt. Es wurde sowohl die Kurzzeit- (1,5 h) wie auch die Langzeit- (24 h) Einwanderung untersucht. Hierbei erfordert das Einwandern in Lymphknoten Extravasation, was für die Einwanderung in die rote Pulpa der Milz durch die Marginalzone nicht notwendig ist.

Eine Beeinträchtigung wurde zu keinem Zeitpunkt, weder für γ-Parvin-defiziente T-, noch B-Zellen und weder für die Einwanderung in Lymphknoten, noch die Milz beobachtet. Dies erscheint zunächst überraschend, da γ-Parvin die einzige in Lymphozyten exprimierte Parvin-Isoform ist (Chu et al., 2006). Auch ist Kompensation durch β-Parvin auszuschließen, da RT-PCR-Analysen in T- und B-Zellen unter γ-Parvin-Verlust keine Induktion von β-Parvin gezeigt haben. Jedoch haben sowohl α4β1 und α4β7 Integrin, als auch αLβ2 Integrin Funktionen bei der Einwanderung in Milz und Lymphknoten, die, ähnlich der B-Zell-Retention in der Marginalzone, teilweise redundant vermittelt werden (Sixt et al., 2006; Berlin-Rufenach et al., 1999; Lo et al., 2003). Eine mögliche Rolle von ILK/γ-Parvin-

Komplexen bei der Extravasation bzw. Gewebeeinwanderung von Lymphozyten könnte somit vor β7 und β2 Integrin-defizientem Hintergrund eingehender untersucht werden. Dies könnte zum Verständnis der nicht klaren Redundanzverhältnisse von α4β1 und α4β7 Integrin bei der Extravasation beitragen (vgl. 1.3.5).

4.5 α-Parvin in der Embryonalentwicklung

Die Generierung der Mauslinie mit konstitutiver α-Parvin-Defizienz erfolgte über homologe Rekombination, durchgeführt von Frau Dr. Haiyan Chu im Rahmen ihrer Doktorarbeit in der Abteilung für Molekulare Medizin. In Zusammenarbeit mit Dr. Eloi Montanez erfolgte ein erste Analyse unter α-Parvin-Defizienz in der Embryonalentwicklung. Weiterhin wurde im Rahmen dieser Arbeit mit der Generierung einer Mauslinie mit konditional modifiziertem α-Parvin-Gen begonnen.

4.5.1 Konstitutive Defizienz von α-Parvin in der Embryonalentwicklung

Wie in Tabelle 3.6.1 gezeigt, führt die konstitutive Defizienz von α-Parvin zu Letalität in der fortgeschrittenen Embryonalentwicklung. Dies zeigt zunächst, dass α-Parvin, anders als β-Parvin essentielle Funktionen während der Embryonalentwicklung hat, die β-Parvin nicht kompensieren kann. α-Parvin-defiziente Embryonen zeigen dabei ein ab E8.5-E9.5 sichtbares, zunehmend verlangsamtes Wachstum bis an E11.5 alle der bisher untersuchten α-Parvin-defizienten Embryonen tot bzw. bereits degeneriert waren. Damit sterben α-Parvin-defiziente Embryonen jedoch wesentlich später als ILK- oder PINCH1-defiziente Embryonen. Diese sterben zwischen E5.5-E6.5 (ILK) bzw. E6.5-E7.5 (PINCH1) (Sakai et al., 2003; Li et al., 2005). Dies ist aufgrund der Abhängigkeit innerhalb des IPP-Komplexes überraschend. Eine grundsätzliche Verzichtbarkeit von Parvin-Funktionen in der frühen Embryonalentwicklung ist damit zwar nicht auszuschließen, jedoch eher unwahrscheinlich. Dies würde auf essentielle Funktionen von ILK und PINCH hinweisen, die unabhängig von der Einbindung in einen IPP-Komplex wären. Da zumindest ab E7.5 neben α-Parvin auch β-Parvin exprimiert wird, ist die logischere Erklärung für den vergleichsweise späten Tod unter α-Parvin-Defizienz eine Funktionsübernahme durch β-Parvin (Olski et al., 2001; Korenbaum et al., 2001). Diese wäre, anders als im umgekehrten Fall jedoch nur partiell, was die durch das Ausbleiben von Phänotypen unter β-Parvin-Defizienz bereits nahe gelegte funktionelle Dominanz von α-Parvin bestätigt. Diese könnte verschiedene Ursachen haben. Denkbar wäre grundsätzlich eine wie zwischen β- und γ-Parvin in myeloiden Zellen beidseitig beobachtete

Inkompatibilität bei der IPP-Komplexbildung, eventuell determiniert durch Komplex-externe Faktoren. Dagegen spräche jedoch die zwingende Forderung, dass diese Inkompatibilität einseitig wäre, was zumindest von Zhang et al. (2004) in HeLa-Zellen nicht bestätigt wird. Hier führte die Überexpression von β-Parvin zu einer verminderten Bildung von ILK/α-Parvin-Komplexen. Dafür spräche aber ein fehlender Anstieg von β-Parvin-Protein und die gleichzeitige Reduktion von ILK-Protein in α-Parvin-defizienten Embryonen an E9.5 (Montanez, Thievessen und Fässler, unpubliziert). β-Parvin substituiert α-Parvin in IPP-Komplexen also nicht global. Neben einer Inkompatibilität bei der IPP-Bildung kann dies jedoch auch weitere Gründe haben. Die denkbaren Möglichkeiten unterschiedlicher subzellulärer Lokalisation oder Zelltyp-spezifischer Expression von α- und β-Parvin sind nicht sehr wahrscheinlich, da Koexpression von α- und β-Parvin in Zelllinien oder auch in Kardiomyozyten *in vivo* beobachtet wurde, beide Isoformen mit Paxillin *in vitro* kolokalisieren (Abb. 3.2.3) und die Isoformen embryonal und besonders adult redundante Expressionsmuster zeigen (Abb. 3.2.1.1-2 und 3.2.2) (Zhang et al., 2004). Auch wäre eine höhere ILK-Affinität zu β-Parvin als zu α-Parvin denkbar, so dass unter Wildtyp-Bedingungen bereits der Großteil von β-Parvin mit ILK gesättigt ist und durch α-Parvin-Verlust freiwerdende ILK-Bindungsstellen nicht besetzt werden. Dem würde die mehrfach beobachtete transkriptionelle Unabhängigkeit der Parvine vom IPP-Status Vorschub geben, sowie auch die generell spezifischere embryonale Expression von β-Parvin. Jedoch haben Zhang et al. (2004) den umgekehrten Versuch, β-Parvin durch α-Parvin-Überexpression aus dem IPP-Komplex zu verdrängen nicht beschrieben. Neben den Möglichkeiten von unterschiedlicher ILK-Affinität, biochemischer Inkompatibilität oder subzellulärer sowie zellulärer Lokalisationsunterschiede besteht auch die Möglichkeit, dass eine Stabilisierung von ILK in α-Parvin-defizienten Embryonen durch β-Parvin tatsächlich stattfindet und dass der Komplex auch funktionell kompensiert. Möglicherweise ist ein Anstieg von β-Parvin-Protein dabei sehr schwach bzw. nicht sichtbar weil die embryonale Expression von β-Parvin recht spezifisch ist. Die Annahme, dass *Parvb* auf den Verlust von α-Parvin nicht mit verstärkter Transkriptionsaktivität reagiert, würde die Destabilisierung von ILK durch fehlende Zunahme der β-Parvin-Expression erklären. Diese Möglichkeit erscheint am plausibelsten, zum einen in Anbetracht der embryonalen Expressionsmuster beider Isoformen, zum anderen stützt die für *Parva* (Abb. 3.3.4.2) und von Chu et al. (2006) für *Parvg* bereits gezeigte und auch für *Parvb* in myeloiden Zellen nahe liegende, transkriptionelle Unabhängigkeit vom IPP-Status diese Möglichkeit. Dies würde jedoch wahrscheinlich

bedeuten, dass β-Parvin rein funktionell ähnlich weitreichend für α-Parvin- kompensieren kann wie umgekehrt, so dass verstärkt die Menge von IPP-Komplex entscheidend für die.Entwicklung des Embryos wäre. Die Bestimmung des Todeszeitpunktes von α-/β-Parvin-doppeldefizienten Embryonen würde dahingehend Klärung bringen, da man unter Annahme kompensatorischer Aktivität von β-Parvin dann einen wesentlich früheren Tod erwarten würde, ähnlich wie unter PINCH- oder ILK-Verlust.

Der Zeitraum, in dem α-Parvin-defiziente Embryonen sterben, das Auftreten von Blutungen, besonders im Herzen, sowie das zunehmend verlangsamte Wachstum sind Phänotypen, wie sie bei vaskulären Defekten häufig beobachtet werden (Yang et al., 1995; Bader et al., 1998; Zhu et al., 2002). Plausibel erscheint dies, da das Herz ab etwa E8.5 zu schlagen beginnt, um den schnell wachsenden Embryo über ein funktionierendes vaskuläres System zu versorgen. Die Vaskulogenese wird relativ unabhängig voneinander im Embryo und im Dottersack initiiert. So zeigen Fibronektin-, α5-Integrin und auch ILK-defiziente Embryonen eine starke Beeinträchtigung der Vaskulogenese bzw. Angiogenese im Dottersack (George et al., 1993, 1997; Yang et al., 1993; Friedrich et al., 2004) (vgl. 1.3.3). Der enge funktionale Zusammenhang zwischen Fibronektin, β1 Integrin und ILK deutete vor dem Hintergrund des Phänotyps α-Parvin-defizienter Embryonen, sowie des Ausbleibens eines entsprechenden β-Parvin-Phänotyps, auf α-Parvin als wichtigen Mediator der β1 Integrin/Fibronektin-Interaktion bei der Gefäßentwicklung hin. Daher wurde die Dottersack-Vaskulatur α-Parvin-defizienter Embryonen an E10.5 untersucht. Diese war stark fehlgebildet. Makroskopisch zeigten die Dottersäcke α-Parvin-defizienten Embryonen, ähnlich wie die unter konditionaler Defizienz von ILK im vaskulären System keine erkennbaren, großen Gefäße (Abb. 3.6.2). Die mikroskopische Untersuchung von „whole-mount"-gefärbtem Dottersackgewebe zeigte die Präsenz eines primitiven Netzwerkes von Gefäßen, was die Entwicklung eines primären Plexus anzeigte. Jedoch fehlten Zeichen der Größen-Differenzierung der Gefäße. Dies deutet einen fehlenden oder verlangsamten Umbau des primären Plexus an, was auf einen Angiogenese-Defekt schließen lässt. Dies zeigt, dass α-Parvin tatsächlich wichtige Funktionen der α5β1 Integrin/Fibronektin-Interaktion bei der Gefäßentwicklung vermittelt. Jedoch ist der Phänotyp schwächer als der unter α5 Integrin-Verlust. Diese initiieren zwar die Dottersackvaskulogenese, sind jedoch nicht in der Lage, einen primären Plexus zu bilden, da es nach der Bildung von Blutinseln und Hämatopoese zur Ablösung von Mesoderm und Endoderm kommt, so dass die Gefäße nicht geschlossen werden können (Yang et al., 1993). Hier zeigt sich also bereits ein Vaskulogenese-Defekt, während α-Parvin-Defizienz scheinbar

zu einem Angiogenese-Defekt führt. Stärker noch ist der Fibronektin-Phänotyp, bei dem keine Dottersackgefäße gebildet werden (George et al., 1993, 1997). Die Entwicklung der Dottersackgefäße unter konditionaler Defizienz von ILK ist nicht so detailliert untersucht, jedoch weist der Verlust makroskopisch sichtbarer großer Gefäße auf eine mindestens so starken Phänotyp wie unter α-Parvin hin (Friedrich et al., 2004). Ähnlich zeigt sich die Herzentwicklung. Während unter Fibronektin je nach genetischem Hintergrund starke Fehlbildungen bis hin zum Fehlen des Herzen beschrieben sind, sind die Herzen α5 Integrin-defizienter Embryonen angeschwollen und undicht. Einige der bisher untersuchten Herzen zeigen zumindest Blutungen. Die vergleichsweise normale Entwicklung von Herzen unter konditionalem Verlust von ILK in Kardiomyozyten weist auf das Gefäßsystem bzw. das Endokard als mögliche Ursache des α-Parvin-Defektes hin. Somit zeigt sich eine deutliche Ähnlichkeit der Phänotypen, mit abnehmender Stärke von Fibronektin über α5β1 Integrin bis hin zum IPP-Komplex. Diese enge funktionale Verwandschaft zeigt deutliche Parallelen zu der Bedeutung des ILK/PINCH/Parvin-Komplexes für die Assemblierung fibrillärer Adhäsionen *in vitro*. Dies unterstreicht zunächst die physiologische Relevanz des Modells der Assemblierung fibrillärer Adhäsionen und bietet zudem prinzipiell die Möglichkeit, diese *in vivo* zu überprüfen. Zudem weist die Abhängigkeit der Fibrillogenese von IPP-Komplexen und β1-Integrin auf wichtige Funktionen dieses Adhäsionskomplexes bei der Organisation von Fibronektin-Matrix, was über die Gefäßentwicklung hinaus für die Funktionen weiterer β1 Integrin-basierter Fibronektin-Rezeptoren interessant sein kann.

4.5.2 Konditionale Modifikation von *Parva*

Aufgrund der embryonalen Letalität der konstitutiven Defizienz von α-Parvin wurde mit der Generierung einer Linie konditionaler *Parva*-Modifikation begonnen. Wie auch bei der konstitutiven Strategie war Ziel dieser Strategie der N-terminale Teil von Parva bzw. Exon3 (Abb. 3.7.1). Die frt-Flankierung der Selektionskassette ermöglicht eine Deletion der Kassette durch Einkreuzen einer frt-Linie für den Fall, dass die Kassette mit der Expression des Proteins interferieren sollte.

Die Insertion des p*Parva*^{fl}-Konstruktes über homologe Rekombination in ES-Zellen konnte bereits erfolgreich durchgeführt werden (Abb. 3.7.2). Auch lässt der hohe Grad von Chimärismus bei sehr vielen der geborenen Chimären auf eine erfolgreiche Keimbahninsertion des konditionalen Allels hoffen. Eine offensichtliche Einsatzmöglichkeit, vorausgesetzt die Modifikation führt unter Cre-Expression tatsächlich zum Verlust von α-

Parvin-Protein, ist das vaskuläre System. Das Einkreuzen von Cre-Linien mit Expression spezifisch in Endothelzellen oder vaskulären glatten Muskelzellen bzw. Perizyten sollte bei der Differenzierung des vaskulären Phänotyps unter konstitutiver Defizienz von α-Parvin helfen. Auch ermöglicht die konditionale Defizienz von α-Parvin in Kombination mit der konstitutiven β-Parvin-Defizienz eine differenziertere Analyse Isoform-spezifischer Funktionen. So könnte die Defizienz von α-Parvin sowie eine Doppeldefizienz von α- und β-Parvin in Kardiomyozyten helfen, die Funktionen von ILK in der Herz-Homöostase zu analysieren.

4.6 Die Parvin-Familie

Wie viele Fokalkontaktproteine, etwa Talin, Tensin oder PINCH, ist auch Parvin in Invertebraten mit nur einem Ortholog vertreten, während Vertebraten mehrere Paraloge besitzen. Die Entwicklung von zwei, oft drei Paralogen mit der Evolution von Vertebraten spiegelt die funktionelle Vielfalt der Integrin-vermittelten Zell-Matrix-Adhäsion höherer Organismen wieder. Daher stellt sich die Frage, welche gewebespezifischen Funktionen einzelne Isoformen von Fokalkontaktproteinen haben. Im Fall der Parvine weisen Zellkulturstudien einstimmig auf Funktionen bei der adhäsionsabhängigen Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts hin und zeigen teilweise sehr unterschiedliche Funktionen der Paraloge. Jedoch gibt die mechanistische Untersuchung in Zellkultur nur bedingt Aufschluss über den physiologischen Charakter, zumal α- und β-Parvin redundante Expression zeigen. Eine genauere Charakterisierung der gewebespezifischen Expression, der Vergleich von Sequenzhomologien sowie die genomische Organisation können hier helfen, die verschiedenen Parvin-Isoformen physiologisch-funktionell zu charakterisieren.

So zeigen die Parvine in Anbetracht ihrer Verwandschaftsverhältnisse eine interessante genomische Lokalisation. *Parva*, lokalisiert auf Chromosom 7, und *Parvb*, lokalisiert auf Chromosom 15, zeigen 73% identische und 85% ähnliche Reste in den Proteinen, während sie zu γ-Parvin nur 42%/67% (α-Parvin) und 43%/66% (β-Parvin) zeigen. Jedoch ist *Parvg* gruppiert mit *Parvb* auf Chromosom 15 lokalisiert. Letzteres deutet an, dass *Parvb* und *Parvg* aus einem gemeinsamen Vorläufer durch Genduplikation entstanden sind, nachdem dieser und *Parva* bereits vorher durch Duplikation aus einem gemeinsamen Vorläufer hervorgegangen sind. Jedoch würde man dann prinzipiell ein engeres Verwandschaftsverhältnis zwischen β-Parvin und γ-Parvin, als zu α-Parvin erwarten. Dies ist jedoch nicht der Fall. In dem Fall, dass *Parvb* und *Parvg* aus einem gemeinsamen Vorläufer der Parvine entstanden sind, wäre *Parva* aus *Parvb* hervorgegangen. Dann jedoch würde man

von α-Parvin nicht erwarten, dass es das funktionell wichtigste Parvin ist. Zudem zeigt ein Vergleich der humanen mit den murinen Orthologen, dass α-Parvin mit 98%/99% Homologie die höchste Konservierung zeigt, während β-Parvin mit 92%/96% weniger und γ-Parvin mit 79%/88% am wenigsten konserviert ist. Der von α- über β- nach γ-Parvin abnehmende Grad der Konservierung bestätigt das Bild, das die phänotypischen Analysen zeigen. Das hoch konservierte α-Parvin hat essentielle Funktionen, während der Verlust des höher variablen β-Parvin durch α-Parvin kompensiert werden kann. Das vergleichseise hoch variable γ-Parvin zeigt keinen Phänotyp, wobei zudem keine Hinweise auf Kompensation vorliegen. Dieses Bild wird auch durch die Expressionsmuster, besonders in der Embryonalentwicklung bestätigt.

In einem möglichen Szenario der phylogenetischen Entwicklung der Parvine könnte *Parva* der direkte Nachfahr eines gemeinsamen Parvin-Vorläufers sein, von dem sich mit der Entwicklung von Vertebraten ein *Parvb*-Zweig abgespaltet hat. Wenn die essentiellen IPP-Funktionen weiterhin durch die *Parva*-Linie vermittelt wurden, hätte sich der *Parvb*-Vorläufer unter geringerem Selektionsdruck variabler entwickeln können, was durch die spezifischere Expression in quergestreiften Muskelgeweben, peripheren Neuronen und myeloiden Zellen gestützt wird. Funktionen von essentieller physiologischer Relevanz, die α-Parvin nicht kompensieren kann würde β-Parvin bis heute möglicherweise nicht übernommen haben, da es eventuell die hohe Variabilität ist, aufgrund derer es sich während der Diversifizierung der Vertebraten gehalten hat. Von dieser Linie spaltete sich mit der Entwicklung des Immunsystems dann eventuell der *Parvg*-Vorläufer ab, womit die niedrige Konservierung von γ-Parvin nicht auf hohes phylogenetisches Alter bzw. niedrige phylogenetische Verwandschaft hinweisen würde, sondern auf eine schnelle Adaptation an die Diversität des sich entwickelnden Immunsystems. Die völlige Abwesenheit von α-Parvin in Immunzellen würde sich so durch sein phylogenetisches Alter erklären.

Das unter β-Parvin-Verlust und eventuell unter α-Parvin-Verlust beobachtete kompensatorische Potential zwischen den beiden ubiquitär exprimierten Parvinen scheint weitreichend zu sein, zumindest weitreichender als es der Literaturstand andeutet. Jedoch spiegeln sich in der β-Parvin-spezifischen Bindung von PIX-Proteinen auch distinkte Funktionen der Parvine. Es erscheint plausibel, dass funktionelle Analysen beider Isoformen durch redundante aber auch spezifische Funktionen der anderen Isoform beeinflusst werden. Für ein genaueres Verständnis der Parvine und damit der gewebespezifischen Funktionen von IPP-Komplexen sind neben zellbiologischen auch biochemische und *in vivo*-Studien notwendig, die zwischen einzelnen Parvin-Isoformen vergleichen.

5. Zusammenfassung

Parvine sind essentielle Komponenten des ILK/PINCH/Parvin- (IPP) Komplexes, der als zytoplasmatischer Interaktionspartner von β1 Integrin unter anderem die adhäsionsabhängige Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts steuert. Parvine sind aufgrund der Bindung von F-Aktin und Aktin-regulatorischen Proteinen potentielle Vermittler dieser Funktionen, wobei ihre gewebespezifische Expression die Zusammensetzung und Funktion von IPP-Komplexen bestimmt. Auf der Basis einer vergleichenden Expressionsanalyse wurde eine Gewebe- bzw. Isoform-spezifische Funktionsanalyse der Parvine durchgeführt. Die hierfür verwendeten Funktionsverlustmutanten der Maus wurden durch homologe Rekombination generiert.

α-Parvin zeigte die ausgeprägteste Expression und als einzige Isoform essentielle Funktion. α-Parvin-defiziente Embryonen starben in der fortgeschrittenen Embryonalentwicklung, wobei der vaskuläre Phänotyp α-Parvin als wichtigen Vermittler der α5β1 Integrin/Fibronektin-Interaktion in der Gefäßentwicklung identifiziert. α-Parvin zeigte hohes kompensatorisches Potential unter β-Parvin-Verlust und ist die Isoform mit der höchsten Konservierung zwischen humanem und murinem Ortholog, so dass es als wichtigste Isoform wahrscheinlich eine grosse Zahl von IPP-Funktionen in verschiedenen Geweben vermittelt. Es könnte der direkte Abkömmling eines gemeinsamen Vorläufers der Parvine sein, der essentielle Funktionen beibehalten hat. Ein hohes phylogenetisches Alter von α-Parvin könnte sein Fehlen in hämatopoetischen Zellen erklären.

β-Parvin zeigte tendenziell spezifischere Expression, auffällig stark in Muskelgeweben. Für die Entwicklung und adulte Homöostase ist es nicht essentiell, wenngleich die dominante Expression im Herzen auf β-Parvin als primären Vermittler essentieller ILK-Funktionen im Herzen hindeutet. Die unter β-Parvin-Verlust beobachtete kompensatorische Rekrutierung von α-Parvin in IPP-Komplexe, ohne deutliche Konsequenzen sogar unter milder Belastung, verdeutlicht somit die hohe funktionelle Redundanz zwischen α- und β-Parvin *in vivo*. Möglicherweise dienen Parvine in Muskelgeweben eher der strukturellen Verbindung von Integrinen und F-Aktin, als der Rekrutierung von Signalproteinen. Konsistent mit einer spezifischeren Expression und subtilerer funktioneller Bedeutung zeigt β-Parvin geringere Konservierung zwischen murinem und humanem Ortholog. Ein β-Parvin-Vorläufer könnte sich von der gemeinsamen Parvin-Linie mit der Entwicklung von Vertebraten abgespaltet und unter geringerem Selektionsdruck spezialisiert haben.

γ-Parvin ist mit rein hämatopoetischer Expression und biochemisch distinkter IPP-Komplexbildung die spezifischste Isoform und zeigt auch die geringste Sequenzkonservierung zwischen humanem und murinem Ortholog. Es könnte sich mit dem hämatopoetischen System von Vertebraten entwickelt haben, wobei die geringe Konservierung hier nicht auf phylogenetisches Alter, sondern auf eine rasche Adaptation an das sich entwickelnde hämatopoetische System von Vertebraten hindeuten würde.

Summary

Parvins are essential components of the ILK/PINCH/parvin- (IPP) complex, an important intracellular mediator of β1 integrin dependent cell-matrix adhesion, crucial for the reorganisation of the actin-cytoskeleton. Parvins bind F-actin and actin-regulatory proteins and hence could mediate actin-reorganising functions of IPP-complexes. Their tissue-specific expression determines composition and function of IPP-complexes *in vivo*. The present study describes the tissue-specific, functional analysis of different parvin-isoforms in mice using loss-of-function mutants generated by homologous recombination.

α-parvin showed the widest expression and is the sole parvin exerting essential functions *in vivo*. α-parvin-deficient embryos died during midgestation from vascular defects, partially resembling fibronectin-, α5 integrin- and conditional ILK-deficiency in the vascular system. High compensatory potential of α-parvin was observed in β-parvin-deficient mice. In addition, α-parvin shows the highest conservation between human and murine orthologue within the parvin family. As the essential parvin it likely mediates numerous, tissue-specific IPP-functions. It may have directly evolved from a common ancestral parvin, having kept essential functions during evolution. A high phylogenetic age could explain its absence in hematopoietic cells.

β-parvin was found to be more specifically expressed, particularly strong in muscle tissues. It was not essential for development and homeostasis, though its dominant expression in the heart implicates β-parvin as important mediator of essential ILK-functions in the heart. Increased α-parvin-recruitment into IPP-complexes could compensate the loss of β-parvin. Even under mild stress-conditions no overt phenotype was observed demonstrating a high degree of redundancy between α- and β-parvin *in vivo*. In muscles parvins could also serve as structural linkers of IPP-complexes to F-actin rather than recruit signaling proteins. In line with a more specific expression and comparably subtle *in vivo* functions β-parvin shows less sequence homology between human and murine orthologue. It may have diverged from a common parvin-ancestor with vertebrate evolution and specified under lower selection pressure than α-parvin.

γ-parvin shows the most specific expression, biochemically distinct IPP-complex formation and the lowest conservation between human and murine orthologue. It might have branched off from the β-parvin ancestor with evolution of the vertebrate hematopoietic system. The low

sequence conservation could reflect continuous adaptation to the rapidly evolving hematopoietic system.

6. Literatur

Alatortsev, V. E., Kramerova, I. A., Frolov, M. V., Lavrov, S. A. and Westphal, E. D. (1997). Vinculin gene is non-essential in Drosophila melanogaster. *FEBS Lett* **413**, 197-201.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J.D. (2002). Molecular biology of the cell. 4th edition, Garland Publishing Inc. New York and London.

Antos, C. L., McKinsey, T. A., Frey, N., Kutschke, W., McAnally, J., Shelton, J. M., Richardson, J. A., Hill, J. A. and Olson, E. N. (2002). Activated glycogen synthase-3 beta suppresses cardiac hypertrophy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 907-12.

Arroyo, A. G., Yang, J. T., Rayburn, H. and Hynes, R. O. (1996). Differential requirements for alpha4 integrins during fetal and adult hematopoiesis. *Cell* **85**, 997-1008.

Aszodi, A., Hunziker, E. B., Brakebusch, C. and Fassler, R. (2003). Beta1 integrins regulate chondrocyte rotation, G1 progression, and cytokinesis. *Genes Dev* **17**, 2465-79.

Attwell, S., Mills, J., Troussard, A., Wu, C. and Dedhar, S. (2003). Integration of cell attachment, cytoskeletal localization, and signaling by integrin-linked kinase (ILK), CH-ILKBP, and the tumor suppressor PTEN. *Mol Biol Cell* **14**, 4813-25.

Attwell, S., Roskelley, C. and Dedhar, S. (2000). The integrin-linked kinase (ILK) suppresses anoikis. *Oncogene* **19**, 3811-5.

Aumailley, M., Pesch, M., Tunggal, L., Gaill, F. and Fassler, R. (2000). Altered synthesis of laminin 1 and absence of basement membrane component deposition in (beta)1 integrin-deficient embryoid bodies. *J Cell Sci* **113 Pt 2**, 259-68.

Bader, B. L., Rayburn, H., Crowley, D. and Hynes, R. O. (1998). Extensive vasculogenesis, angiogenesis, and organogenesis precede lethality in mice lacking all alpha v integrins. *Cell* **95**, 507-19.

Bakolitsa, C., Cohen, D. M., Bankston, L. A., Bobkov, A. A., Cadwell, G. W., Jennings, L., Critchley, D. R., Craig, S. W. and Liddington, R. C. (2004). Structural basis for vinculin activation at sites of cell adhesion. *Nature* **430**, 583-6.

Balaban, N. Q., Schwarz, U. S., Riveline, D., Goichberg, P., Tzur, G., Sabanay, I., Mahalu, D., Safran, S., Bershadsky, A., Addadi, L. et al. (2001). Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nat Cell Biol* **3**, 466-72.

Bansal, D. and Campbell, K. P. (2004). Dysferlin and the plasma membrane repair in muscular dystrophy. *Trends Cell Biol* **14**, 206-13.

Bansal, D., Miyake, K., Vogel, S. S., Groh, S., Chen, C. C., Williamson, R., McNeil, P. L. and Campbell, K. P. (2003). Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature* **423**, 168-72.

Barstead, R. J. and Waterston, R. H. (1991). Vinculin is essential for muscle function in the nematode. *J Cell Biol* **114**, 715-24.

Baudoin, C., Goumans, M. J., Mummery, C. and Sonnenberg, A. (1998). Knockout and knockin of the beta1 exon D define distinct roles for integrin splice variants in heart function and embryonic development. *Genes Dev* **12**, 1202-16.

Belkin, A. M., Zhidkova, N. I., Balzac, F., Altruda, F., Tomatis, D., Maier, A., Tarone, G., Koteliansky, V. E. and Burridge, K. (1996). Beta 1D integrin displaces the beta 1A isoform in striated muscles: localization at junctional structures and signaling potential in nonmuscle cells. *J Cell Biol* **132**, 211-26.

Bendig, G., Grimmler, M., Huttner, I. G., Wessels, G., Dahme, T., Just, S., Trano, N., Katus, H. A., Fishman, M. C. and Rottbauer, W. (2006). Integrin-linked kinase, a novel component of the cardiac mechanical stretch sensor, controls contractility in the zebrafish heart. *Genes Dev* **20**, 2361-72.

Berlin-Rufenach, C., Otto, F., Mathies, M., Westermann, J., Owen, M. J., Hamann, A. and Hogg, N. (1999). Lymphocyte migration in lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1-deficient mice. *J Exp Med* **189**, 1467-78.

Berthier, C. and Blaineau, S. (1997). Supramolecular organization of the subsarcolemmal cytoskeleton of adult skeletal muscle fibers. A review. *Biol Cell* **89**, 413-34.

Birge, R. B., Fajardo, J. E., Reichman, C., Shoelson, S. E., Songyang, Z., Cantley, L. C. and Hanafusa, H. (1993). Identification and characterization of a high-affinity interaction between v-Crk and tyrosine-phosphorylated paxillin in CT10-transformed fibroblasts. *Mol Cell Biol* **13**, 4648-56.

Bladt, F., Aippersbach, E., Gelkop, S., Strasser, G. A., Nash, P., Tafuri, A., Gertler, F. B. and Pawson, T. (2003). The murine Nck SH2/SH3 adaptors are important for the development of mesoderm-derived embryonic structures and for regulating the cellular actin network. *Mol Cell Biol* **23**, 4586-97.

Bloch, W., Forsberg, E., Lentini, S., Brakebusch, C., Martin, K., Krell, H. W., Weidle, U. H., Addicks, K. and Fassler, R. (1997). Beta 1 integrin is essential for teratoma growth and angiogenesis. *J Cell Biol* **139**, 265-78.

Bloor, J. W. and Brown, N. H. (1998). Genetic analysis of the Drosophila alphaPS2 integrin subunit reveals discrete adhesive, morphogenetic and sarcomeric functions. *Genetics* **148**, 1127-42.

Bock-Marquette, I., Saxena, A., White, M. D., Dimaio, J. M. and Srivastava, D. (2004). Thymosin beta4 activates integrin-linked kinase and promotes cardiac cell migration, survival and cardiac repair. *Nature* **432**, 466-72.

Bois, P. R., O'Hara, B. P., Nietlispach, D., Kirkpatrick, J. and Izard, T. (2006). The vinculin binding sites of talin and alpha-actinin are sufficient to activate vinculin. *J Biol Chem* **281**, 7228-36.

Bokel, C. and Brown, N. H. (2002). Integrins in development: moving on, responding to, and sticking to the extracellular matrix. *Dev Cell* **3**, 311-21.

Bouvard, D., Brakebusch, C., Gustafsson, E., Aszodi, A., Bengtsson, T., Berna, A. and Fässler, R. (2001). Functional consequences of integrin gene mutations in mice, *Circ Res* **89**, 211-223.

Brakebusch, C. and Fassler, R. (2003). The integrin-actin connection, an eternal love affair. *Embo J* **22**, 2324-33.

Brancaccio, M., Hirsch, E., Notte, A., Selvetella, G., Lembo, G. and Tarone, G. (2006). Integrin signalling: the tug-of-war in heart hypertrophy. *Cardiovasc Res* **70**, 422-33.

Braun, A., Bordoy, R., Stanchi, F., Moser, M., Kostka, G. G., Ehler, E., Brandau, O. and Fassler, R. (2003). PINCH2 is a new five LIM domain protein, homologous to PINCHand localized to focal adhesions. *Exp Cell Res* **284**, 239-50.

Brown, N. H., Gregory, S. L., Rickoll, W. L., Fessler, L. I., Prout, M., White, R. A. and Fristrom, J. W. (2002). Talin is essential for integrin function in Drosophila. *Dev Cell* **3**, 569-79.

Brown, N. H. (2000). Cell-cell adhesion via the ECM: integrin genetics in fly and worm. *Matrix Biol* **19**, 191-201.

Brown, N.H. (1994). Null mutations in the drosophila alpha PS2 and beta PS integrin subunits genes have distinct phenotypes**.** *Development* **120**, 1221-31.

Brown, N. H. (1993). Integrins hold Drosophila together. *Bioessays* **15**, 383-90.

Buccione, R., Orth, J. D. and McNiven, M. A. (2004). Foot and mouth: podosomes, invadopodia and circular dorsal ruffles. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 647-57.

Bungartz, G., Stiller, S., Bauer, M., Muller, W., Schippers, A., Wagner, N., Fassler, R. and Brakebusch, C. (2006). Adult murine hematopoiesis can proceed without beta1 and beta7 integrins. *Blood* **108**, 1857-64.

Burgstaller, G. and Gimona, M. (2005). Podosome-mediated matrix resorption and cell motility in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288**, H3001-5.

Calderwood, D. A. (2004). Integrin activation. *J Cell Sci* **117**, 657-66.

Calvete, J. J. (2004). Structures of integrin domains and concerted conformational changes in the bidirectional signaling mechanism of alphaIIbbeta3. *Exp Biol Med (Maywood)* **229**, 732-44.

Campana, W. M., Myers, R. R. and Rearden, A. (2003). Identification of PINCH in Schwann cells and DRG neurons: shuttling and signaling after nerve injury. *Glia* **41**, 213-23.

Cau,. J. and Hall, A. (2005). Cdc42 controls the polarity of the actin and microtubule cytoskeletons through two distinct signaltransduction pathways. *J Cell Sci* **118**, 2579-87.

Chandrasekar, I., Stradal, T. E., Holt, M. R., Entschladen, F., Jockusch, B. M. and Ziegler, W. H. (2005). Vinculin acts as a sensor in lipid regulation of adhesion-site turnover. *J Cell Sci* **118**, 1461-72.

Chang, L.W., Wang H.V., Brixius, K., Montanez, Thievessen, I., E., Bloch, W., Müller, U., Mayer, U. and Fässler, R. Integrin-linked kinase stabilizes myotendinous junctions and protects muscle from stress-induced damage. Manuskript in Vorbereitung.

Chen, H., Huang, X. N., Yan, W., Chen, K., Guo, L., Tummalapali, L., Dedhar, S., St-Arnaud, R., Wu, C. and Sepulveda, J. L. (2005). Role of the integrin-linked kinase/PINCH1/alpha-parvin complex in cardiac myocyte hypertrophy. *Lab Invest* **85**, 1342-56.

Chu, H. (2005). *In vivo* analysis of parvins, a family of focal adhesion proteins. Inaugural-Dissertation, Universität Köln.

Chu, H., Thievessen, I., Sixt, M., Lammermann, T., Waisman, A., Braun, A., Noegel, A. A. and Fassler, R. (2006). gamma-Parvin is dispensable for hematopoiesis, leukocyte trafficking, and T-cell-dependent antibody response. *Mol Cell Biol* **26**, 1817-25.

Clark, K. A., McGrail, M. and Beckerle, M. C. (2003). Analysis of PINCH function in Drosophila demonstrates its requirement in integrin-dependent cellular processes. *Development* **130**, 2611-21.

Clarke, D. M., Brown, M. C., LaLonde, D. P. and Turner, C. E. (2004). Phosphorylation of actopaxin regulates cell spreading and migration. *J Cell Biol* **166**, 901-12.

Cohen, D. M., Kutscher, B., Chen, H., Murphy, D. B. and Craig, S. W. (2006). A conformational switch in vinculin drives formation and dynamics of a talin-vinculin complex at focal adhesions. *J Biol Chem* **281**, 16006-15.

Condorelli, G., Drusco, A., Stassi, G., Bellacosa, A., Roncarati, R., Iaccarino, G., Russo, M. A., Gu, Y., Dalton, N., Chung, C. et al. (2002). Akt induces enhanced myocardial contractility and cell size in vivo in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 12333-8.

Coucouvanis, E. and Martin, G. R. (1995). Signals for death and survival: a two-step mechanism for cavitation in the vertebrate embryo. *Cell* **83**, 279-87.

Craig, S. W. and Pardo, J. V. (1983). Gamma actin, spectrin, and intermediate filament proteins colocalize with vinculin at costameres, myofibril-to-sarcolemma attachment sites. *Cell Motil* **3**, 449-62.

Csukly, K.J., Martineau, L.C. and Gardiner, P.F. (2002). Inter- and intra-muscle comparisons of MAPK mechanosensitivity: evidence for the absence of fibre-type dependency. *Pflugers Arch* **444**, 732-7.

Curtis, M., Nikolopoulos, S. N. and Turner, C. E. (2002). Actopaxin is phosphorylated during mitosis and is a substrate for cyclin B1/cdc2 kinase. *Biochem J* **363**, 233-42.

Dai, D. L., Makretsov, N., Campos, E. I., Huang, C., Zhou, Y., Huntsman, D., Martinka, M. and Li, G. (2003). Increased expression of integrin-linked kinase is correlated with melanoma progression and poor patient survival. *Clin Cancer Res* **9**, 4409-14.

Danen, E. H., Sonneveld, P., Brakebusch, C., Fassler, R. and Sonnenberg, A. (2002). The fibronectin-binding integrins alpha5beta1 and alphavbeta3 differentially modulate RhoA-GTP loading, organization of cell matrix adhesions, and fibronectin fibrillogenesis. *J Cell Biol* **159**, 1071-86.

Danowski, B. A., Imanaka-Yoshida, K., Sanger, J. M. and Sanger, J. W. (1992). Costameres are sites of force transmission to the substratum in adult rat cardiomyocytes. *J Cell Biol* **118**, 1411-20.

Davies, K.E. and Nowak, K.J. (2006). Molecular mechanisms of muscular dstrophies: old and new players. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 762-73

Delaisse, J. M., Engsig, M. T., Everts, V., del Carmen Ovejero, M., Ferreras, M., Lund, L., Vu, T. H., Werb, Z., Winding, B., Lochter, A. et al. (2000). Proteinases in bone resorption: obvious and less obvious roles. *Clin Chim Acta* **291**, 223-34.

Delcommenne, M., Tan, C., Gray, V., Rue, L., Woodgett, J. and Dedhar, S. (1998). Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 11211-6.

Demali, K. A. (2004). Vinculin--a dynamic regulator of cell adhesion. *Trends Biochem Sci* **29**, 565-7.

DeMali, K. A., Barlow, C. A. and Burridge, K. (2002). Recruitment of the Arp2/3 complex to vinculin: coupling membrane protrusion to matrix adhesion. *J Cell Biol* **159**, 881-91.

DeMali, K. A., Wennerberg, K. and Burridge, K. (2003). Integrin signaling to the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 572-82.

Ding, Z. M., Babensee, J. E., Simon, S. I., Lu, H., Perrard, J. L., Bullard, D. C., Dai, X. Y., Bromley, S. K., Dustin, M. L., Entman, M. L. et al. (1999). Relative contribution of LFA-1 and Mac-1 to neutrophil adhesion and migration. *J Immunol* **163**, 5029-38.

Dougherty, G. W., Chopp, T., Qi, S. M. and Cutler, M. L. (2005). The Ras suppressor Rsu-1 binds to the LIM 5 domain of the adaptor protein PINCH1 and participates in adhesion-related functions. *Exp Cell Res* **306**, 168-79.

Ervasti, J. M. (2003). Costameres: the Achilles' heel of Herculean muscle. *J Biol Chem* **278**, 13591-4.

Etienne-Manneville, S., Manneville, J.B., Nicholls, S., Ferenczi, M.A. and Hall, A. (2005). Cdc42 and Par6-PKCzeta regulate the spatially localized association of Dlg1 and APC to control cell polarization. *J Cell Biol* **170**, 895-901.

Etienne-Manneville, S. and Hall, A. (2003). Cdc42 regulates GSK-3beta and adenomatous polyposis coli to control cell polarity. *Nature* **421**, 753-6.

Fassler, R. and Meyer, M. (1995). Consequences of lack of beta 1 integrin gene expression in mice. *Genes Dev* **9**, 1896-908.

Feng, J., Park, J., Cron, P., Hess, D. and Hemmings, B. A. (2004). Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **279**, 41189-96.

Filipenko, N. R., Attwell, S., Roskelley, C. and Dedhar, S. (2005). Integrin-linked kinase activity regulates Rac- and Cdc42-mediated actin cytoskeleton reorganization via alpha-PIX. *Oncogene* **24**, 5837-49.

Fong, G. H., Rossant, J., Gertsenstein, M. and Breitman, M. L. (1995). Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* **376**, 66-70.

Francis, G. R. and Waterston, R. H. (1985). Muscle organization in Caenorhabditis elegans: localization of proteins implicated in thin filament attachment and I-band organization. *J Cell Biol* **101**, 1532-49.

Francis, S. E., Goh, K. L., Hodivala-Dilke, K., Bader, B. L., Stark, M., Davidson, D. and Hynes, R. O. (2002). Central roles of alpha5beta1 integrin and fibronectin in vascular development in mouse embryos and embryoid bodies. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**, 927-33.

Franco, S. J., Rodgers, M. A., Perrin, B. J., Han, J., Bennin, D. A., Critchley, D. R. and Huttenlocher, A. (2004). Calpain-mediated proteolysis of talin regulates adhesion dynamics. *Nat Cell Biol* **6**, 977-83.

Frias, M. A., Thoreen, C. C., Jaffe, J. D., Schroder, W., Sculley, T., Carr, S. A. and Sabatini, D. M. (2006). mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s. *Curr Biol* **16**, 1865-70.

Friedl, P., Brocker, E.B. and Zänker, K.S. (1998). Integrins, cell matrix interactions and cell migration strategies: fundamental differences in leukocytes and tumor cells. *Cell Adhes Commun* **6**, 225-36.

Friedl, P., Noble, P.B., Shields, E.D. and Zänker, K.S. (1994). Locomotor phenotypes of unstimulated CD45RAhigh and CD45Rohigh CD4+ and CD8+ lymphocytes in three-dimensional colagen lattices. *Immunology* **82**, 617-24

Friedrich, E. B., Liu, E., Sinha, S., Cook, S., Milstone, D. S., MacRae, C. A., Mariotti, M., Kuhlencordt, P. J., Force, T., Rosenzweig, A. et al. (2004). Integrin-linked kinase regulates endothelial cell survival and vascular development. *Mol Cell Biol* **24**, 8134-44.

Friedrich, E. B., Sinha, S., Li, L., Dedhar, S., Force, T., Rosenzweig, A. and Gerszten, R. E. (2002). Role of integrin-linked kinase in leukocyte recruitment. *J Biol Chem* **277**, 16371-5.

Frisch, S. M. and Screaton, R. A. (2001). Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 555-62.

Fuchs, E., Dowling, J., Segre, J.,Lo, S.H. and Yu, Q.C. (1997). Integrators of epidermal growth and differentiation: different functions for beta 1 and beta 4 integrins. *Curr Opin Genet Dev* **7**, 672-682

Fukuda, T., Chen, K., Shi, X. and Wu, C. (2003a). PINCH-1 is an obligate partner of integrin-linked kinase (ILK) functioning in cell shape modulation, motility, and survival. *J Biol Chem* **278**, 51324-33.

Fukuda, T., Guo, L., Shi, X. and Wu, C. (2003b). CH-ILKBP regulates cell survival by facilitating the membrane translocation of protein kinase B/Akt. *J Cell Biol* **160**, 1001-8.

Galbraith, C. G., Yamada, K. M. and Sheetz, M. P. (2002). The relationship between force and focal complex development. *J Cell Biol* **159**, 695-705.

George, E. L., Baldwin, H. S. and Hynes, R. O. (1997). Fibronectins are essential for heart and blood vessel morphogenesis but are dispensable for initial specification of precursor cells. *Blood* **90**, 3073-81.

George, E. L., Georges-Labouesse, E. N., Patel-King, R. S., Rayburn, H. and Hynes, R. O. (1993). Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development* **119**, 1079-91.

Ghosh, M., Song, X., Mouneimne, G., Sidani, M., Lawrence, D. S. and Condeelis, J. S. (2004). Cofilin promotes actin polymerization and defines the direction of cell motility. *Science* **304**, 743-6.

Giannone, G., Jiang, G., Sutton, D. H., Critchley, D. R. and Sheetz, M. P. (2003). Talin1 is critical for force-dependent reinforcement of initial integrin-cytoskeleton bonds but not tyrosine kinase activation. *J Cell Biol* **163**, 409-19.

Gilbert, S.F. (edit.). (2000). Developmental Biology. 6th edition, Sinauer, Sunderland MA, USA.

Gilmore, A. P. and Burridge, K. (1996). Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidyl-inositol-4-5-bisphosphate. *Nature* **381**, 531-5.

Gimona, M., Djinovic-Carugo, K., Kranewitter, W. J. and Winder, S. J. (2002). Functional plasticity of CH domains. *FEBS Lett* **513**, 98-106.

Gimona, M., Kaverina, I., Resch, G. P., Vignal, E. and Burgstaller, G. (2003). Calponin repeats regulate actin filament stability and formation of podosomes in smooth muscle cells. *Mol Biol Cell* **14**, 2482-91.

Goh, K. L., Yang, J. T. and Hynes, R. O. (1997). Mesodermal defects and cranial neural crest apoptosis in alpha5 integrin-null embryos. *Development* **124**, 4309-19.

Graff, J. R., Deddens, J. A., Konicek, B. W., Colligan, B. M., Hurst, B. M., Carter, H. W. and Carter, J. H. (2001). Integrin-linked kinase expression increases with prostate tumor grade. *Clin Cancer Res* **7**, 1987-91.

Grashoff, C., Aszodi, A., Sakai, T., Hunziker, E. B. and Fassler, R. (2003). Integrin-linked kinase regulates chondrocyte shape and proliferation. *EMBO Rep* **4**, 432-8.

Guo, L. and Wu, C. (2002). Regulation of fibronectin matrix deposition and cell proliferation by the PINCH-ILK-CH-ILKBP complex. *Faseb J* **16**, 1298-300.

Hanks, S. K., Quinn, A. M. and Hunter, T. (1988). The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* **241**, 42-52.

Hannigan, G. E., Leung-Hagesteijn, C., Fitz-Gibbon, L., Coppolino, M. G., Radeva, G., Filmus, J., Bell, J. C. and Dedhar, S. (1996). Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. *Nature* **379**, 91-6.

Heidenhain, M. (1915). Über die Mallory´sche Bindegewebsfärbung mit Karmin und Azokarmin als Vorfarben. *Z Wiss Mikr* **32**, 361-273.

Heineke, J. and Molkentin, J. D. (2006). Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 589-600.

Hill, M. M., Feng, J. and Hemmings, B. A. (2002). Identification of a plasma membrane Raft-associated PKB Ser473 kinase activity that is distinct from ILK and PDK1. *Curr Biol* **12**, 1251-5.

Hirsch, E., Iglesias, A., Potocnik, A. J., Hartmann, U. and Fassler, R. (1996). Impaired migration but not differentiation of haematopoietic stem cells in the absence of beta1 integrins. *Nature* **380**, 171-5.

Hirsch, E., Lohikangas, L., Gullberg, D., Johansson, S. and Fassler, R. (1998). Mouse myoblasts can fuse and form a normal sarcomere in the absence of beta1 integrin expression. *J Cell Sci* **111 (Pt 16)**, 2397-409.

Hobert, O., Moerman, D. G., Clark, K. A., Beckerle, M. C. and Ruvkun, G. (1999). A conserved LIM protein that affects muscular adherens junction integrity and mechanosensory function in Caenorhabditis elegans. *J Cell Biol* **144**, 45-57.

Hodivala-Dilke, K. M., McHugh, K. P., Tsakiris, D. A., Rayburn, H., Crowley, D., Ullman-Cullere, M., Ross, F. P., Coller, B. S., Teitelbaum, S. and Hynes, R. O. (1999). Beta3-integrin-deficient mice are a model for Glanzmann thrombasthenia showing placental defects and reduced survival. *J Clin Invest* **103**, 229-38.

Hresko, M. C., Williams, B. D. and Waterston, R. H. (1994). Assembly of body wall muscle and muscle cell attachment structures in Caenorhabditis elegans. *J Cell Biol* **124**, 491-506.

Huang, Y., Li, J., Zhang, Y. and Wu, C. (2000). The roles of integrin-linked kinase in the regulation of myogenic differentiation. *J Cell Biol* **150**, 861-72.

Hynes, R. O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**, 673-87.

Jacinto, E., Facchinetti, V., Liu, D., Soto, N., Wei, S., Jung, S. Y., Huang, Q., Qin, J. and Su, B. (2006). SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell* **127**, 125-37.

Jeyaseelan, R., Poizat, C., Baker, R.K., Absishoo, S., Isterabadi, L.B., Lyons, G.E. and Kedes, L. (1997). A novel cardiac-restricted target for doxorubicin. CARP, a nuclear modulator of gene expression in cardiac progenitor cells and cardiomyocytes. *J Biol Chem* **272**, 22800-8.

Jiang, G., Giannone, G., Critchley, D. R., Fukumoto, E. and Sheetz, M. P. (2003). Two-piconewton slip bond between fibronectin and the cytoskeleton depends on talin. *Nature* **424**, 334-7.

Johnston, B. and Kubes, P. (1999). The alpha4-integrin: an alternative pathway for neutrophil recruitment? *Immunol Today* **20**, 545-50.

Jurdic, P., Saltel, F., Chabadel, A. and Destaing, O. (2006). Podosome and sealing zone: specificity of the osteoclast model. *Eur J Cell Biol* **85**, 195-202.

Kadrmas, J. L., Smith, M. A., Clark, K. A., Pronovost, S. M., Muster, N., Yates, J. R., 3rd and Beckerle, M. C. (2004). The integrin effector PINCH regulates JNK activity and epithelial migration in concert with Ras suppressor 1. *J Cell Biol* **167**, 1019-24.

Katz, B. Z., Zamir, E., Bershadsky, A., Kam, Z., Yamada, K. M. and Geiger, B. (2000). Physical state of the extracellular matrix regulates the structure and molecular composition of cell-matrix adhesions. *Mol Biol Cell* **11**, 1047-60.

Keller, R. S., Shai, S. Y., Babbitt, C. J., Pham, C. G., Solaro, R. J., Valencik, M. L., Loftus, J. C. and Ross, R. S. (2001). Disruption of integrin function in the murine myocardium leads to perinatal lethality, fibrosis, and abnormal cardiac performance. *Am J Pathol* **158**, 1079-90.

Kloeker, S., Major, M. B., Calderwood, D. A., Ginsberg, M. H., Jones, D. A. and Beckerle, M. C. (2004). The Kindler syndrome protein is regulated by transforming growth factor-beta and involved in integrin-mediated adhesion. *J Biol Chem* **279**, 6824-33.

Korenbaum, E., Olski, T. M. and Noegel, A. A. (2001). Genomic organization and expression profile of the parvin family of focal adhesion proteins in mice and humans. *Gene* **279**, 69-79.

LaLonde, D. P., Brown, M. C., Bouverat, B. P. and Turner, C. E. (2005). Actopaxin interacts with TESK1 to regulate cell spreading on fibronectin. *J Biol Chem* **280**, 21680-8.

LaLonde, D. P., Grubinger, M., Lamarche-Vane, N. and Turner, C. E. (2006). CdGAP associates with actopaxin to regulate integrin-dependent changes in cell morphology and motility. *Curr Biol* **16**, 1375-85.

Lawlor, M. A. and Alessi, D. R. (2001). PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J Cell Sci* **114**, 2903-10.

Lee, G., Abdi, K., Jiang, Y., Michaely, P., Bennett, V. and Marszalek, P. E. (2006). Nanospring behaviour of ankyrin repeats. *Nature* **440**, 246-9.

Legate, K. R., Montanez, E., Kudlacek, O. and Fassler, R. (2006). ILK, PINCH and parvin: the tIPP of integrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 20-31.

Li, J., Mahajan, A. and Tsai, M. D. (2006). Ankyrin repeat: a unique motif mediating protein-protein interactions. *Biochemistry* **45**, 15168-78.

Li, R., Mitra, N., Gratkowski, H., Vilaire, G., Litvinov, R., Nagasami, C., Weisel, J. W., Lear, J. D., DeGrado, W. F. and Bennett, J. S. (2003a). Activation of integrin alphaIIbbeta3 by modulation of transmembrane helix associations. *Science* **300**, 795-8.

Li, S., Bordoy, R., Stanchi, F., Moser, M., Braun, A., Kudlacek, O., Wewer, U. M., Yurchenco, P. D. and Fassler, R. (2005). PINCH1 regulates cell-matrix and cell-cell adhesions, cell polarity and cell survival during the peri-implantation stage. *J Cell Sci* **118**, 2913-21.

Li, S., Edgar, D., Fassler, R., Wadsworth, W. and Yurchenco, P. D. (2003b). The role of laminin in embryonic cell polarization and tissue organization. *Dev Cell* **4**, 613-24.

Li, Z., Hannigan, M., Mo, Z., Liu, B., Lu, W., Wu, Y., Smrcka, A. V., Wu, G., Li, L., Liu, M. et al. (2003c). Directional sensing requires G beta gamma-mediated PAK1 and PIX alpha-dependent activation of Cdc42. *Cell* **114**, 215-27.

Liang, X., Zhou, Q., Li, X., Sun, Y., Lu, M., Dalton, N., Ross, J., Jr. and Chen, J. (2005). PINCH1 plays an essential role in early murine embryonic development but is dispensable in ventricular cardiomyocytes. *Mol Cell Biol* **25**, 3056-62.

Lin, X., Qadota, H., Moerman, D. G. and Williams, B. D. (2003). C. elegans PAT-6/actopaxin plays a critical role in the assembly of integrin adhesion complexes in vivo. *Curr Biol* **13**, 922-32.

Linder, S. and Aepfelbacher, M. (2003). Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells. *Trends Cell Biol* **13**, 376-85.

Linder, S. and Kopp, P. (2005). Podosomes at a glance. *J Cell Sci* **118**, 2079-82.

Ling, K., Doughman, R. L., Firestone, A. J., Bunce, M. W. and Anderson, R. A. (2002). Type I gamma phosphatidylinositol phosphate kinase targets and regulates focal adhesions. *Nature* **420**, 89-93.

Ling, K., Doughman, R. L., Iyer, V. V., Firestone, A. J., Bairstow, S. F., Mosher, D. F., Schaller, M. D. and Anderson, R. A. (2003). Tyrosine phosphorylation of type Igamma phosphatidylinositol phosphate kinase by Src regulates an integrin-talin switch. *J Cell Biol* **163**, 1339-49.

Liu, E., Sinha, S., Williams, C., Cyrille, M., Heller, E., Snapper, S. B., Georgopoulos, K., St-Arnaud, R., Force, T., Dedhar, S. et al. (2005). Targeted deletion of integrin-linked kinase reveals a role in T-cell chemotaxis and survival. *Mol Cell Biol* **25**, 11145-55.

Lo, C.G., Lu, T.T. and Cyster, J.G. (2003). Integrin-dependency of lymphocyte entry into the spleenic white pulp. *J Exp Med* **197**, 353-61.

Lo, S. H. (2006). Focal adhesions: what's new inside. *Dev Biol* **294**, 280-91.

Lu, C., Shimaoka, M., Ferzly, M., Oxvig, C., Takagi, J. and Springer, T. A. (2001). An isolated, surface-expressed I domain of the integrin alphaLbeta2 is sufficient for strong adhesive function when locked in the open conformation with a disulfide bond. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 2387-92.

Lu, H., Fedak, P. W., Dai, X., Du, C., Zhou, Y. Q., Henkelman, M., Mongroo, P. S., Lau, A., Yamabi, H., Hinek, A. et al. (2006). Integrin-linked kinase expression is elevated in human cardiac hypertrophy and induces hypertrophy in transgenic mice. *Circulation* **114**, 2271-9.

Lu, T. T. and Cyster, J. G. (2002). Integrin-mediated long-term B cell retention in the splenic marginal zone. *Science* **297**, 409-12.

Lutz, M.B., Kukutsch, N., Ogilvie, A.L., Rossner, S., Koch, F., Romani, N. and Schuler, G. (1999). An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bonde marrow. *J Immunol Methods* **223**, 77-92.

Mackinnon, A. C., Qadota, H., Norman, K. R., Moerman, D. G. and Williams, B. D. (2002). C. elegans PAT-4/ILK functions as an adaptor protein within integrin adhesion complexes. *Curr Biol* **12**, 787-97.

Manabe, R., Kovalenko, M., Webb, D. J. and Horwitz, A. R. (2002). GIT1 functions in a motile, multi-molecular signaling complex that regulates protrusive activity and cell migration. *J Cell Sci* **115**, 1497-510.

Marotta, A., Parhar, K., Owen, D., Dedhar, S. and Salh, B. (2003). Characterisation of integrin-linked kinase signalling in sporadic human colon cancer. *Br J Cancer* **88**, 1755-62.

Matsuda, C., Kameyama, K., Tagawa, K., Ogawa, M., Suzuki, A., Yamaji, S., Okamoto, H., Nishino, I. and Hayashi, Y. K. (2005). Dysferlin interacts with affixin (beta-parvin) at the sarcolemma. *J Neuropathol Exp Neurol* **64**, 334-40.

Mayer, U. (2003). Integrins: redundant or important players in skeletal muscle? *J Biol Chem* **278**, 14587-90.

Mayer, U., Saher, G., Fassler, R., Bornemann, A., Echtermeyer, F., von der Mark, H., Miosge, N., Poschl, E. and von der Mark, K. (1997). Absence of integrin alpha 7 causes a novel form of muscular dystrophy. *Nat Genet* **17**, 318-23.

McCarty, J. H., Monahan-Earley, R. A., Brown, L. F., Keller, M., Gerhardt, H., Rubin, K., Shani, M., Dvorak, H. F., Wolburg, H., Bader, B. L. et al. (2002). Defective associations between blood vessels and brain parenchyma lead to cerebral hemorrhage in mice lacking alphav integrins. *Mol Cell Biol* **22**, 7667-77.

McHugh, K. P., Hodivala-Dilke, K., Zheng, M. H., Namba, N., Lam, J., Novack, D., Feng, X., Ross, F. P., Hynes, R. O. and Teitelbaum, S. L. (2000). Mice lacking beta3 integrins are osteosclerotic because of dysfunctional osteoclasts. *J Clin Invest* **105**, 433-40.

Miller, M.K., Bang, M-L., Witt, C.C., Labeit, D., Trombitas, C., Watanabe, K., Granzier, H., McElhinny, A.S., Gregorio, C.C. and Labeit, S. (2003a). The muscle ankyrin repeatproteins: CARP, ankrd2/Arpp and DARP as a family of titn filament-based stress response molecules. *J Mol Biol* **333**, 951-964.

Miller, M. G., Naruszewicz, I., Kumar, A. S., Ramlal, T. and Hannigan, G. E. (2003b). Integrin-linked kinase is a positive mediator of L6 myoblast differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* **310**, 796-803.

Miosge, N., Klenczar, C., Herken, R., Willem, M. and Mayer, U. (1999). Organization of the myotendinous junction is dependent on the presence of alpha7beta1 integrin. *Lab Invest* **79**, 1591-9.

Mishima, W., Suzuki, A., Yamaji, S., Yoshimi, R., Ueda, A., Kaneko, T., Tanaka, J., Miwa, Y., Ohno, S. and Ishigatsubo, Y. (2004). The first CH domain of affixin activates Cdc42 and Rac1 through alphaPIX, a Cdc42/Rac1-specific guanine nucleotide exchanging factor. *Genes Cells* **9**, 193-204.

Molkentin, J. D., Lu, J. R., Antos, C. L., Markham, B., Richardson, J., Robbins, J., Grant, S. R. and Olson, E. N. (1998). A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* **93**, 215-28.

Mongroo, P. S., Johnstone, C. N., Naruszewicz, I., Leung-Hagesteijn, C., Sung, R. K., Carnio, L., Rustgi, A. K. and Hannigan, G. E. (2004). Beta-parvin inhibits integrin-linked kinase signaling and is downregulated in breast cancer. *Oncogene* **23**, 8959-70.

Moreau, V., Tatin, F., Varon, C. and Genot, E. (2003). Actin can reorganize into podosomes in aortic endothelial cells, a process controlled by Cdc42 and RhoA. *Mol Cell Biol* **23**, 6809-22.

Moulder, G. L., Huang, M. M., Waterston, R. H. and Barstead, R. J. (1996). Talin requires beta-integrin, but not vinculin, for its assembly into focal adhesion-like structures in the nematode Caenorhabditis elegans. *Mol Biol Cell* **7**, 1181-93.

Murray, P. and Edgar, D. (2000). Regulation of programmed cell death by basement membranes in embryonic development. *J Cell Biol* **150**, 1215-21.

Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W. and Roder, J. C. (1993). Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8424-8.

Nieswandt, B., Brakebusch, C., Bergmeier, W., Schulte, V., Bouvard, D., Mokhtari-Nejad, R., Lindhout, T., Heemskerk, J. W., Zirngibl, H. and Fassler, R. (2001). Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen. *Embo J* **20**, 2120-30.

Nikolopoulos, S. N. and Turner, C. E. (2000). Actopaxin, a new focal adhesion protein that binds paxillin LD motifs and actin and regulates cell adhesion. *J Cell Biol* **151**, 1435-48.

Nikolopoulos, S. N. and Turner, C. E. (2001). Integrin-linked kinase (ILK) binding to paxillin LD1 motif regulates ILK localization to focal adhesions. *J Biol Chem* **276**, 23499-505.

Nikolopoulos, S. N. and Turner, C. E. (2002). Molecular dissection of actopaxin-integrin-linked kinase-Paxillin interactions and their role in subcellular localization. *J Biol Chem* **277**, 1568-75.

Nishiya, N., Kiosses, W.B., Han, J. and Ginsberg, M.H. (2005). An alpha4 integrin-paxillin-Arf-GAP complex restricts Rac-activation to the leading edge of migrating cells. *Nat Cell Biol* **7**, 343-52.

Novak, A., Hsu, S. C., Leung-Hagesteijn, C., Radeva, G., Papkoff, J., Montesano, R., Roskelley, C., Grosschedl, R. and Dedhar, S. (1998). Cell adhesion and the integrin-linked kinase regulate the LEF-1 and beta-catenin signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 4374-9.

Olski, T. M., Noegel, A. A. and Korenbaum, E. (2001). Parvin, a 42 kDa focal adhesion protein, related to the alpha-actinin superfamily. *J Cell Sci* **114**, 525-38.

Osiak, A. E., Zenner, G. and Linder, S. (2005). Subconfluent endothelial cells form podosomes downstream of cytokine and RhoGTPase signaling. *Exp Cell Res* **307**, 342-53.

Otey, C. A. and Carpen, O. (2004). Alpha-actinin revisited: a fresh look at an old player. *Cell Motil Cytoskeleton* **58**, 104-11.

Oudit, G. Y., Crackower, M. A., Eriksson, U., Sarao, R., Kozieradzki, I., Sasaki, T., Irie-Sasaki, J., Gidrewicz, D., Rybin, V. O., Wada, T. et al. (2003). Phosphoinositide 3-kinase gamma-deficient mice are protected from isoproterenol-induced heart failure. *Circulation* **108**, 2147-52.

Pankov, R., Cukierman, E., Katz, B. Z., Matsumoto, K., Lin, D. C., Lin, S., Hahn, C. and Yamada, K. M. (2000). Integrin dynamics and matrix assembly: tensin-dependent translocation of alpha(5)beta(1) integrins promotes early fibronectin fibrillogenesis. *J Cell Biol* **148**, 1075-90.

Pardo, J. V., Siliciano, J. D. and Craig, S. W. (1983). A vinculin-containing cortical lattice in skeletal muscle: transverse lattice elements ("costameres") mark sites of attachment between myofibrils and sarcolemma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 1008-12.

Pasquet, J. M., Noury, M. and Nurden, A. T. (2002). Evidence that the platelet integrin alphaIIb beta3 is regulated by the integrin-linked kinase, ILK, in a PI3-kinase dependent pathway. *Thromb Haemost* **88**, 115-22.

Perriard, J. C., Hirschy, A. and Ehler, E. (2003). Dilated cardiomyopathy: a disease of the intercalated disc? *Trends Cardiovasc Med* **13**, 30-8.

Persad, S., Attwell, S., Gray, V., Delcommenne, M., Troussard, A., Sanghera, J. and Dedhar, S. (2000). Inhibition of integrin-linked kinase (ILK) suppresses activation of protein kinase B/Akt and induces cell cycle arrest and apoptosis of PTEN-mutant prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3207-12.

Persad, S., Attwell, S., Gray, V., Mawji, N., Deng, J. T., Leung, D., Yan, J., Sanghera, J., Walsh, M. P. and Dedhar, S. (2001). Regulation of protein kinase B/Akt-serine 473 phosphorylation by integrin-linked kinase: critical roles for kinase activity and amino acids arginine 211 and serine 343. *J Biol Chem* **276**, 27462-9.

Pollard, T. D. and Borisy, G. G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* **112**, 453-65.

Potocnik, A. J., Brakebusch, C. and Fassler, R. (2000). Fetal and adult hematopoietic stem cells require beta1 integrin function for colonizing fetal liver, spleen, and bone marrow. *Immunity* **12**, 653-63.

Pyle, W. G. and Solaro, R. J. (2004). At the crossroads of myocardial signaling: the role of Z-discs in intracellular signaling and cardiac function. *Circ Res* **94**, 296-305.

Radeva, G., Petrocelli, T., Behrend, E., Leung-Hagesteijn, C., Filmus, J., Slingerland, J. and Dedhar, S. (1997). Overexpression of the integrin-linked kinase promotes anchorage-independent cell cycle progression. *J Biol Chem* **272**, 13937-44.

Riveline, D., Zamir, E., Balaban, N. Q., Schwarz, U. S., Ishizaki, T., Narumiya, S., Kam, Z., Geiger, B. and Bershadsky, A. D. (2001). Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *J Cell Biol* **153**, 1175-86.

Rodriguez, O. C., Schaefer, A. W., Mandato, C. A., Forscher, P., Bement, W. M. and Waterman-Storer, C. M. (2003). Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis. *Nat Cell Biol* **5**, 599-609.

Rogalski, T. M., Gilchrist, E. J., Mullen, G. P. and Moerman, D. G. (1995). Mutations in the unc-52 gene responsible for body wall muscle defects in adult Caenorhabditis elegans are located in alternatively spliced exons. *Genetics* **139**, 159-69.

Rogalski, T. M., Mullen, G. P., Gilbert, M. M., Williams, B. D. and Moerman, D. G. (2000). The UNC-112 gene in Caenorhabditis elegans encodes a novel component of cell-matrix adhesion structures required for integrin localization in the muscle cell membrane. *J Cell Biol* **150**, 253-64.

Rohwedel, J., Guan, K., Zuschratter, W., Jin, S., Ahnert-Hilger, G., Furst, D., Fassler, R. and Wobus, A. M. (1998). Loss of beta1 integrin function results in a retardation of myogenic, but an acceleration of neuronal, differentiation of embryonic stem cells in vitro. *Dev Biol* **201**, 167-84.

Rosenberger, G. and Kutsche, K. (2006). AlphaPIX and betaPIX and their role in focal adhesion formation. *Eur J Cell Biol* **85**, 265-74.

Rosenberger, G., Gal, A. and Kutsche, K. (2005). AlphaPIX associates with calpain 4, the small subunit of calpain, and has a dual role in integrin-mediated cell spreading. *J Biol Chem* **280**, 6879-89.

Rosenberger, G., Jantke, I., Gal, A. and Kutsche, K. (2003). Interaction of alphaPIX (ARHGEF6) with beta-parvin (PARVB) suggests an involvement of alphaPIX in integrin-mediated signaling. *Hum Mol Genet* **12**, 155-67.

Rutherford, M.S., and Schook, L.B. (1992). Macrophage function in response to PGE2, L-arginine deprivation, and activation by colony-stimulating factors is dependent on hematopoietic stimulus. *J Leukoc Biol* **52**, 228-35

Sakai, T., Li, S., Docheva, D., Grashoff, C., Sakai, K., Kostka, G., Braun, A., Pfeifer, A., Yurchenco, P. D. and Fassler, R. (2003). Integrin-linked kinase (ILK) is required for polarizing the epiblast, cell adhesion, and controlling actin accumulation. *Genes Dev* **17**, 926-40.

Sato, T., del Carmen Ovejero, M., Hou, P., Heegaard, A. M., Kumegawa, M., Foged, N. T. and Delaisse, J. M. (1997). Identification of the membrane-type matrix metalloproteinase MT1-MMP in osteoclasts. *J Cell Sci* **110 (Pt 5)**, 589-96.

Sato, T. N., Tozawa, Y., Deutsch, U., Wolburg-Buchholz, K., Fujiwara, Y., Gendron-Maguire, M., Gridley, T., Wolburg, H., Risau, W. and Qin, Y. (1995). Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* **376**, 70-4.

Saunders, R. M., Holt, M. R., Jennings, L., Sutton, D. H., Barsukov, I. L., Bobkov, A., Liddington, R. C., Adamson, E. A., Dunn, G. A. and Critchley, D. R. (2006). Role of vinculin in regulating focal adhesion turnover. *Eur J Cell Biol* **85**, 487-500.

Schaller, M. D. (2001). Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein. *Oncogene* **20**, 6459-72.

Schaller, M. D. and Parsons, J. T. (1995). pp125FAK-dependent tyrosine phosphorylation of paxillin creates a high-affinity binding site for Crk. *Mol Cell Biol* **15**, 2635-45.

Schaller, M. D. and Schaefer, E. M. (2001). Multiple stimuli induce tyrosine phosphorylation of the Crk-binding sites of paxillin. *Biochem J* **360**, 57-66.

Schlaepfer, D. D., Hauck, C. R. and Sieg, D. J. (1999). Signaling through focal adhesion kinase. *Prog Biophys Mol Biol* **71**, 435-78.

Schröder, R., Pacholski, D., Reimann, J., Matten, J., Wiche, G. and Fürst, D.O. (2002). Primary lopngitudinal adhesion structures: Plectin-containing precursors of costameres in differentiating human skeletal muscle cells. *Histochem Cell Biol* **118**, 301-10.

Shai, S. Y., Harpf, A. E., Babbitt, C. J., Jordan, M. C., Fishbein, M. C., Chen, J., Omura, M., Leil, T. A., Becker, K. D., Jiang, M. et al. (2002). Cardiac myocyte-specific excision of the beta1 integrin gene results in myocardial fibrosis and cardiac failure. *Circ Res* **90**, 458-64.

Shattil, S. J., Kashiwagi, H. and Pampori, N. (1998). Integrin signaling: the platelet paradigm. *Blood* **91**, 2645-57.

Shioi, T., Kang, P. M., Douglas, P. S., Hampe, J., Yballe, C. M., Lawitts, J., Cantley, L. C. and Izumo, S. (2000). The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice. *Embo J* **19**, 2537-48.

Shiota, C., Woo, J. T., Lindner, J., Shelton, K. D. and Magnuson, M. A. (2006). Multiallelic disruption of the rictor gene in mice reveals that mTOR complex 2 is essential for fetal growth and viability. *Dev Cell* **11**, 583-9.

Sixt, M., Bauer, M., Lämmermann, T. and Fässler, R. (2006). Beta1 integrins: zip codes and signaling relay for blood cells. *Curr Opin Cell Biol* **18**, 482-90

Stanchi, F., Bordoy, R., Kudlacek, O., Braun, A., Pfeifer, A., Moser, M. and Fassler, R. (2005). Consequences of loss of PINCH2 expression in mice. *J Cell Sci* **118**, 5899-910.

Staveley, B. E., Ruel, L., Jin, J., Stambolic, V., Mastronardi, F. G., Heitzler, P., Woodgett, J. R. and Manoukian, A. S. (1998). Genetic analysis of protein kinase B (AKT) in Drosophila. *Curr Biol* **8**, 599-602.

Stevens, J. M., Jordan, P. A., Sage, T. and Gibbins, J. M. (2004). The regulation of integrin-linked kinase in human platelets: evidence for involvement in the regulation of integrin alpha 2 beta 1. *J Thromb Haemost* **2**, 1443-52.

Subauste, M. C., Pertz, O., Adamson, E. D., Turner, C. E., Junger, S. and Hahn, K. M. (2004). Vinculin modulation of paxillin-FAK interactions regulates ERK to control survival and motility. *J Cell Biol* **165**, 371-81.

Suri, C., Jones, P. F., Patan, S., Bartunkova, S., Maisonpierre, P. C., Davis, S., Sato, T. N. and Yancopoulos, G. D. (1996). Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* **87**, 1171-80.

Tadokoro, S., Shattil, S. J., Eto, K., Tai, V., Liddington, R. C., de Pereda, J. M., Ginsberg, M. H. and Calderwood, D. A. (2003). Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. *Science* **302**, 103-6.

Takagi, J., Erickson, H. P. and Springer, T. A. (2001). C-terminal opening mimics 'inside-out' activation of integrin alpha5beta1. *Nat Struct Biol* **8**, 412-6.

Takagi, J. and Springer, T. A. (2002). Integrin activation and structural rearrangement. *Immunol Rev* **186**, 141-63.

Tan, C., Costello, P., Sanghera, J., Dominguez, D., Baulida, J., de Herreros, A. G. and Dedhar, S. (2001). Inhibition of integrin linked kinase (ILK) suppresses beta-catenin-Lef/Tcf-dependent transcription and expression of the E-cadherin repressor, snail, in APC-/- human colon carcinoma cells. *Oncogene* **20**, 133-40.

Tan, C., Cruet-Hennequart, S., Troussard, A., Fazli, L., Costello, P., Sutton, K., Wheeler, J., Gleave, M., Sanghera, J. and Dedhar, S. (2004). Regulation of tumor angiogenesis by integrin-linked kinase (ILK). *Cancer Cell* **5**, 79-90.

Taooka, Y., Chen, J., Yednock, T. and Sheppard, D. (1999). The integrin alpha9beta1 mediates adhesion to activated endothelial cells and transendothelial neutrophil migration through interaction with vascular cell adhesion molecule-1. *J Cell Biol* **145**, 413-20.

Taverna, D., Disatnik, M. H., Rayburn, H., Bronson, R. T., Yang, J., Rando, T. A. and Hynes, R. O. (1998). Dystrophic muscle in mice chimeric for expression of alpha5 integrin. *J Cell Biol* **143**, 849-59.

Tronik-Le Roux, D., Roullot, V., Poujol, C., Kortulewski, T., Nurden, P. and Marguerie, G. (2000). Thrombasthenic mice generated by replacement of the integrin alpha(IIb) gene: demonstration that transcriptional activation of this megakaryocytic locus precedes lineage commitment. *Blood* **96**, 1399-408.

Trotter, J.A. (2002). Structure-function considerations of muscle-tendon junctions. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **133**, 1127-33.

Troussard, A. A., Mawji, N. M., Ong, C., Mui, A., St -Arnaud, R. and Dedhar, S. (2003). Conditional knock-out of integrin-linked kinase demonstrates an essential role in protein kinase B/Akt activation. *J Biol Chem* **278**, 22374-8.

Tu, Y., Huang, Y., Zhang, Y., Hua, Y. and Wu, C. (2001). A new focal adhesion protein that interacts with integrin-linked kinase and regulates cell adhesion and spreading. *J Cell Biol* **153**, 585-98.

Tu, Y., Li, F., Goicoechea, S. and Wu, C. (1999). The LIM-only protein PINCH directly interacts with integrin-linked kinase and is recruited to integrin-rich sites in spreading cells. *Mol Cell Biol* **19**, 2425-34.

Tu, Y., Li, F. and Wu, C. (1998). Nck-2, a novel Src homology2/3-containing adaptor protein that interacts with the LIM-only protein PINCH and components of growth factor receptor kinase-signaling pathways. *Mol Biol Cell* **9**, 3367-82.

Tu, Y., Wu, S., Shi, X., Chen, K. and Wu, C. (2003). Migfilin and Mig-2 link focal adhesions to filamin and the actin cytoskeleton and function in cell shape modulation. *Cell* **113**, 37-47.

Turner, C. E. (2000). Paxillin and focal adhesion signalling. *Nat Cell Biol* **2**, E231-6.

Valencik, M. L. and McDonald, J. A. (2001). Cardiac expression of a gain-of-function alpha(5)-integrin results in perinatal lethality. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**, H361-7.

van der Flier, A. and Sonnenberg, A. (2001). Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res* **305**, 285-98.

Vouret-Craviari, V., Boulter, E., Grall, D., Matthews, C. and Van Obberghen-Schilling, E. (2004). ILK is required for the assembly of matrix-forming adhesions and capillary morphogenesis in endothelial cells. *J Cell Sci* **117**, 4559-69.

Wagner, N., Lohler, J., Kunkel, E. J., Ley, K., Leung, E., Krissansen, G., Rajewsky, K. and Muller, W. (1996). Critical role for beta7 integrins in formation of the gut-associated lymphoid tissue. *Nature* **382**, 366-70.

Weekes, J., Barry, S. T. and Critchley, D. R. (1996). Acidic phospholipids inhibit the intramolecular association between the N- and C-terminal regions of vinculin, exposing actin-binding and protein kinase C phosphorylation sites. *Biochem J* **314 (Pt 3)**, 827-32.

Wennerberg, K., Lohikangas, L., Gullberg, D., Pfaff, M., Johansson, S. and Fassler, R. (1996). Beta 1 integrin-dependent and -independent polymerization of fibronectin. *J Cell Biol* **132**, 227-38.

White, D. E., Cardiff, R. D., Dedhar, S. and Muller, W. J. (2001). Mammary epithelial-specific expression of the integrin-linked kinase (ILK) results in the induction of mammary gland hyperplasias and tumors in transgenic mice. *Oncogene* **20**, 7064-72.

White, D. E., Coutu, P., Shi, Y. F., Tardif, J. C., Nattel, S., St Arnaud, R., Dedhar, S. and Muller, W. J. (2006). Targeted ablation of ILK from the murine heart results in dilated cardiomyopathy and spontaneous heart failure. *Genes Dev* **20**, 2355-60.

Wood, C. K., Turner, C. E., Jackson, P. and Critchley, D. R. (1994). Characterisation of the paxillin-binding site and the C-terminal focal adhesion targeting sequence in vinculin. *J Cell Sci* **107 (Pt 2)**, 709-17.

Wright, T. R. (1960). The phenogenetics of the embryonic mutant, lethal myospheroid, in Drosophila melanogaster. *J Exp Zool* **143**, 77-99.

Wu, C., Keightley, S. Y., Leung-Hagesteijn, C., Radeva, G., Coppolino, M., Goicoechea, S., McDonald, J. A. and Dedhar, S. (1998). Integrin-linked protein kinase regulates fibronectin matrix assembly, E-cadherin expression, and tumorigenicity. *J Biol Chem* **273**, 528-36.

Wu, X., Quondamatteo, F., Lefever, T., Czuchra, A., Meyer, H., Chrostek, A., Paus, R., Langbein, L. and Brakebusch, C. (2006). Cdc42 controls progenitor cell differentiation and beta-catenin turnover in skin. *Genes Dev* **20**, 571-85.

Xu, Z., Fukuda, T., Li, Y., Zha, X., Qin, J. and Wu, C. (2005). Molecular dissection of PINCH-1 reveals a mechanism of coupling and uncoupling of cell shape modulation and survival. *J Biol Chem* **280**, 27631-7.

Yamaji, S., Suzuki, A., Kanamori, H., Mishima, W., Yoshimi, R., Takasaki, H., Takabayashi, M., Fujimaki, K., Fujisawa, S., Ohno, S. et al. (2004). Affixin interacts with alpha-actinin and mediates integrin signaling for reorganization of F-actin induced by initial cell-substrate interaction. *J Cell Biol* **165**, 539-51.

Yamaji, S., Suzuki, A., Sugiyama, Y., Koide, Y., Yoshida, M., Kanamori, H., Mohri, H., Ohno, S. and Ishigatsubo, Y. (2001). A novel integrin-linked kinase-binding protein, affixin, is involved in the early stage of cell-substrate interaction. *J Cell Biol* **153**, 1251-64.

Yang, J. T., Bader, B. L., Kreidberg, J. A., Ullman-Cullere, M., Trevithick, J. E. and Hynes, R. O. (1999). Overlapping and independent functions of fibronectin receptor integrins in early mesodermal development. *Dev Biol* **215**, 264-77.

Yang, J. T., Rayburn, H. and Hynes, R. O. (1993). Embryonic mesodermal defects in alpha 5 integrin-deficient mice. *Development* **119**, 1093-105.

Yang, J. T., Rayburn, H. and Hynes, R. O. (1995). Cell adhesion events mediated by alpha 4 integrins are essential in placental and cardiac development. *Development* **121**, 549-60.

Yoshimi, R., Yamaji, S., Suzuki, A., Mishima, W., Okamura, M., Obana, T., Matsuda, C., Miwa, Y., Ohno, S. and Ishigatsubo, Y. (2006). The gamma-parvin-integrin-linked kinase complex is critically involved in leukocyte-substrate interaction. *J Immunol* **176**, 3611-24.

Zaidel-Bar, R., Ballestrem, C., Kam, Z. and Geiger, B. (2003). Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells. *J Cell Sci* **116**, 4605-13.

Zaidel-Bar, R., Cohen, M., Addadi, L. and Geiger, B. (2004). Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes. *Biochem Soc Trans* **32**, 416-20.

Zaidel-Bar, R., Kam, Z. and Geiger, B. (2005). Polarized downregulation of the paxillin-p130CAS-Rac1 pathway induced by shear flow. *J Cell Sci* **118**, 3997-4007.

Zamir, E. and Geiger, B. (2001). Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci* **114**, 3583-90.

Zamir, E., Katz, B. Z., Aota, S., Yamada, K. M., Geiger, B. and Kam, Z. (1999). Molecular diversity of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci* **112 (Pt 11)**, 1655-69.

Zamir, E., Katz, M., Posen, Y., Erez, N., Yamada, K. M., Katz, B. Z., Lin, S., Lin, D. C., Bershadsky, A., Kam, Z. et al. (2000). Dynamics and segregation of cell-matrix adhesions in cultured fibroblasts. *Nat Cell Biol* **2**, 191-6.

Zervas, C. G. and Brown, N. H. (2002). Integrin adhesion: when is a kinase a kinase? *Curr Biol* **12**, R350-1.

Zervas, C. G., Gregory, S. L. and Brown, N. H. (2001). Drosophila integrin-linked kinase is required at sites of integrin adhesion to link the cytoskeleton to the plasma membrane. *J Cell Biol* **152**, 1007-18.

Zhang, Y., Chen, K., Guo, L. and Wu, C. (2002a). Characterization of PINCH-2, a new focal adhesion protein that regulates the PINCH-1-ILK interaction, cell spreading, and migration. *J Biol Chem* **277**, 38328-38.

Zhang, Y., Chen, K., Tu, Y., Velyvis, A., Yang, Y., Qin, J. and Wu, C. (2002b). Assembly of the PINCH-ILK-CH-ILKBP complex precedes and is essential for localization of each component to cell-matrix adhesion sites. *J Cell Sci* **115**, 4777-86.

Zhang, Y., Chen, K., Tu, Y. and Wu, C. (2004). Distinct roles of two structurally closely related focal adhesion proteins, alpha-parvins and beta-parvins, in regulation of cell morphology and survival. *J Biol Chem* **279**, 41695-705.

Zhang, Y., Guo, L., Chen, K. and Wu, C. (2002c). A critical role of the PINCH-integrin-linked kinase interaction in the regulation of cell shape change and migration. *J Biol Chem* **277**, 318-26.

Zhu, J., Motejlek, K., Wang, D., Zang, K., Schmidt, A. and Reichardt, L.F. (2002). Beta8 integrins are required for vascular morphogenesis in mouse embryos. *Development* **129**, 2891-903.

Ziegler, W. H., Tigges, U., Zieseniss, A. and Jockusch, B. M. (2002). A lipid-regulated docking site on vinculin for protein kinase C. *J Biol Chem* **277**, 7396-404.

7. Abbkürzungen

APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-triphosphat
bp	Basenpaar
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serum Albumin
cDNA	complementary DNA
CMV	Cytomegalovirus
DC	Dendritische Zelle
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco´s modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
Erk	extracellular signal-regulated kinase
ES-Zelle	embryonale Stammzelle
EST	expressed sequence tag
FA	focal adhesion
F-Aktin	filamentöses Aktin
FAK	focal adhesion kinase
FCS	fetal calf serum
FITC	fluoresceine isothiocyanate
g	Gramm
GAP-DH	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GSK-3β	Glykogen-Synthase Kinase-3β
h	hour
HRP	Horseradish peroxidase
Ig	Immunglobulin
ILK	Integrin-linked kinase

IPP	ILK/PINCH/Parvin
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
KLH	keyhole limpet hemocyanin
LB	Luria Broth
LIM	lin-11, isl-1, mec-3
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
OD	optische Dichte
PAC	P1 artifical chromosome
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAK	p21 activated kinase
pat	paralyzed and arrested at the twofold-stage
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PGK	Phosphoglyzerat Kinase
PI-3-K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP_2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP_3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
α-PIX	PAK-interacting exchange factor
PKB	Protein Kinase B
PINCH	particularly interesting new cystein/histidin-rich protein
RIPA	radio immunoprecipitation assay
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	sodium dodecyl sulfate
TAE	Trisacetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N´,N´-tetramethyl-ethylendiamin
TK	Thymidin-Kinase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

8. Erklärung

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 07.02.2007

Ingo Thievessen

9. Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Reinhard Fässler für die Vergabe des interessanten Promotionsthemas, für seine stete Unterstützung in den vergangenen 4 Jahren sowie seine außergewöhnliche wissenschaftliche Anregung danken.

Frau Prof. Dr. Elisabeth Knust möchte ich für ihre engagierte Betreuung danken.

Herrn Prof. Dr. Jochen D´Haese möchte ich für die stets anregende Begleitung durch meine Promotionszeit sowie für seine Unterstützung danken.

Herrn Prof.. Dr. Wolfgang Schulz danke ich für seine stete und kompetente Hilfsbereitschaft

Herrn Prof. Dr. Wilhelm Bloch, Frau Dr. Klara Brixius, Frau Dr. Kerstin Kutsche, Herrn Dr. Georg Rosenberger sowie Herrn Prof. Dr. Bernhard Nieswandt möchte ich für ihre Zusammenarbeit danken.

Herrn Dr. Attila Braun möchte ich für seine kompetente Hilfe zu Beginn meiner Promotionszeit sowie für seine Freundschaft danken.

Frau Dr. Haiyan Chu danke ich für die anregende Diskussion über die Parvine und für eine fruchtbare und herzliche Zusammenarbeit

Herrn Dr. Markus Moser danke ich für seine Hilfe bei den Expressionsanalysen und in der ES-Zellkultur, sowie für seinen stets kompetenten Rat.

Herrn Dr. Michael Sixt möchte ich für eine Reihe interessanter Unterhaltungen über Zellmigration und andere wissenschaftliche Diskurse danken.

Herrn Dr. Eloi Montanez möchte ich für die interessante und herzliche Zusammenarbeit danken.

Meinen Doktoranden-Kollegen, sowie Post-docs und technischen Assistenten in der Abteilung für Molekulare Medizin möchte ich für ihre Hilfe und den herzlichen Umgang im Labor, sowie außerhalb danken.

Herrn Dr. Andreas Schmidt, Frau Julia Mummenhoff und Frau Margit Miesbauer und besonders den jungen Familien Falagan und Galle danke ich ganz herzlich für Rat und Tat als Freunde.

Mein besonderer Dank gilt Frau Angelika Rambold, für ihre liebevolle, grenzenlose Unterstützung und für ihr unerschütterliches Vertrauen in mich, sowie auch ihrer Familie für die herzliche Unterstützung.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern und meinen Brüdern, für den Beistand in schweren Stunden, sowie für Vertrauen, Verständnis und Förderung.

Anhang zur Dissertation

„Funktionsanalyse von Fokalkontaktproteinen der Parvin-Familie
durch Knockout in der Maus“

von
Ingo Thievessen

Aus der Arbeit hervorgegangene Publikationen bzw. Manuskripte:

Grashoff, C., Thievessen, I., Lorenz, K., Ussar, S. and Faessler, R. (2004). Integrin-linked kinase: integrin´s mysterious partner. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 565-571.

Chu, H., Thievessen, I., Sixt, M., Lammermann, T., Waisman, A., Braun, A., Noegel, A. A. and Faessler, R. (2006). gamma-Parvin is dispensable for hematopoiesis, leukocyte trafficking, and T-cell-dependent antibody response. *Mol Cell Biol* **26**, 1817-25.

Chang, L.W., Wang H.V., Brixius, K., Montanez, Thievessen, I., E., Bloch, W., Müller, U., Mayer, U. and Faessler, R. Integrin-linked kinase stabilizes myotendinous junctions and protects muscle from stress-induced damage. (Manuskript)

Thievessen, I., Chu, H., Braun, A., Rosenberger, G., Bloch, W. and Faessler, R. β-parvin is not essential for mouse development and cardiac homeostasis. (Abstract)

Full text provided by www.sciencedirect.com
SCIENCE DIRECT®

Integrin-linked kinase: integrin's mysterious partner

Carsten Grashoff, Ingo Thievessen, Katrin Lorenz, Siegfried Ussar and Reinhard Fässler[1]

Integrin-mediated cell adhesion regulates a vast number of biological processes including migration, survival and proliferation of cells. It is therefore not surprising that defects in integrin function are often rate-limiting for development and profoundly affect the progression of several diseases. The functions of integrins are mediated through the recruitment of cytoplasmic plaque proteins. One of these is integrin-linked kinase, which connects integrins to the actin cytoskeleton and transduces signals through integrins to the extracellular matrix and from integrins to various subcellular compartments.

Addresses
Department of Molecular Medicine, Max Planck Institute of Biochemistry, Am Klopferspitz 18, 82152 Martinsried, Germany
[1]e-mail: Faessler@biochem.mpg.de

Current Opinion in Cell Biology 2004, **16**:565–571

This review comes from a themed issue on
Cell-to-cell contact and extracellular matrix
Edited by Kathleen Green and Fiona Watt

Available online 21st July 2004

0955-0674/$ – see front matter
© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

DOI 10.1016/j.ceb.2004.07.004

Abbreviations

αPIX	PAK-interactive exchange factor-α
BM	basement membrane
CH	calponin homology
CPI-17	protein-kinase-C-dependent phosphatase inhibitor of 17 kDa
Dock180	180-kDa protein downstream of CRK
EB	embryoid body
ECM	extracellular matrix
EMT	epithelial-to-mesenchymal transition
FA	focal adhesions
GSK-3	glycogen synthase kinase 3
ILK	integrin-linked kinase
ILKAP	ILK-associated phosphatase
Mig-2	mitogen inducible gene-2
MLC	myosin light chain
PAK	p21-activated serine/threonine kinase
PDK	3-phosphoinositide-dependent kinase
PH	pleckstrin homology
PHI-1	phosphatase holoenzyme inhibitor 1
PI3K	phosphatidylinositol-3-kinase
PINCH	particularly interesting new cysteine-histidine-rich protein
PIP3	phosphoinositol trisphosphate
PTEN	protein tyrosine phosphatase and tensin homolog

Introduction

Cell adhesion is mediated by multiprotein complexes composed of adhesion receptors, extracellular matrix (ECM) proteins and cytoplasmic plaque proteins. The cell adhesion receptors determine the specificity of the cell–cell or the cell–ECM interaction and recruit cytoplasmic plaque proteins to the cell adhesion site. The cytoplasmic plaque proteins transduce signals initiated by the adhesion receptor, link the adhesion receptors to the cytoskeleton and regulate the functional properties of the adhesion receptors themselves.

Integrins are a large family of adhesion receptors comprising >20 members that mediate highly dynamic cell–cell and cell–ECM interactions. The association and the release of integrin–ligand interactions are achieved by the ability of integrins to adopt different conformations. The active conformation is triggered by intracellular signals and cytoskeleton assembly and results in ligand binding, integrin clustering and recruitment of cytoplasmic plaque proteins into integrin attachment sites called focal adhesions (FAs) [1,2]. One protein that plays a central role in integrin activation and signaling is integrin-linked kinase (ILK) [3]. ILK is composed of three structurally distinct domains: three ankyrin repeats near the N terminus (a fourth ankyrin repeat was identified in human ILK but lacks well-conserved residues), a short linker sequence, and a kinase domain at the C terminus. The linker domain, together with sequences from the N terminus of the kinase domain, shares some similarities with pleckstrin homology (PH) domains (Figure 1).

In the present review we will discuss the functional properties of ILK, which are governed by ILK's interaction partners and kinase activity. The first part of this review summarizes biochemical and cell biological studies of ILK and the second part deals with *in vivo* experiments from invertebrates and mice.

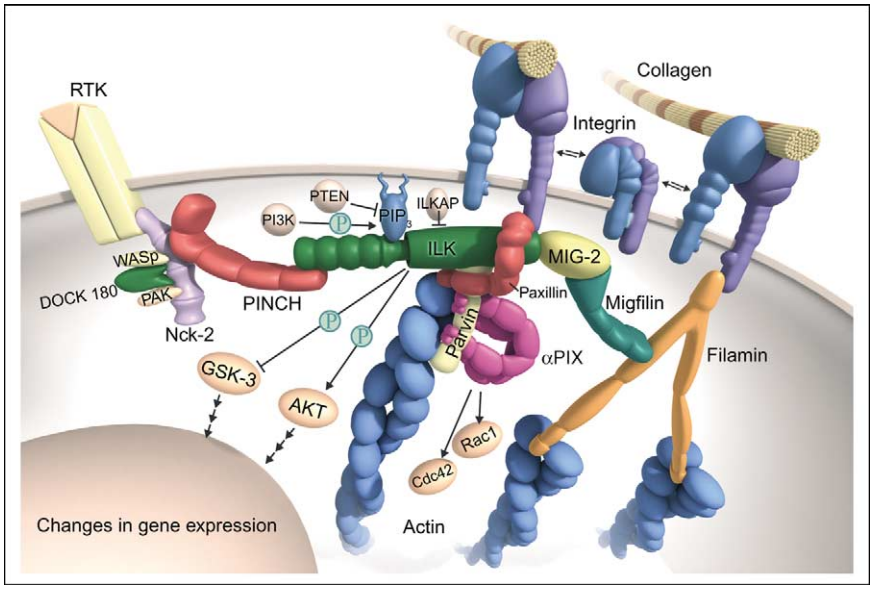
Cell biology and biochemistry of ILK

Overexpression of ILK as well as loss or reduction of ILK expression in cells profoundly affects their morphology and function. The most striking changes are impaired cell spreading, abnormal cell adhesion to and assembly of ECM proteins, delayed formation of FAs and altered cell proliferation [3–6,7••]. How can these defects be explained? Important hints have come from the identification of ILK binding partners (Table 1), from their mode of interaction with ILK and from the identification of substrates for the ILK kinase domain (Table 2).

ILK — a platform for actin regulatory proteins

Almost all adaptor proteins that bind either directly or indirectly to ILK regulate the actin cytoskeleton and

Figure 1



ILK binds Pinch and parvin and this ternary complex subsequently locates to the plasma membrane through the interaction with the cytoplasmic domain of activated β1 and β3 integrin subunits as well as unknown FAs component(s). Binding to phospholipids results in the activation of the kinase function of ILK, which in turn leads to the phosphorylation of GSK3β and PKB/Akt. Finally, ILK can recruit several adaptor proteins, which are able to regulate actin dynamics or actin attachment to FAs. The molecules presented in Figure 1 are not drawn to scale. AKT, protein kinase B/Akt; RTK, receptor tyrosine kinase; WASP, Wiskott-Aldrich syndrome protein.

hence could be responsible for the shape change and FA dysfunction associated with altered ILK expression (Figure 1). Pinch ('particularly interesting new cysteine-histidine-rich protein') was the first interactor to be identified [8]. Pinch-2, a Pinch homologue, was subsequently identified in mice and humans [9,10]. They are both composed of five LIM domains and a nuclear localization signal (NLS) at the C terminus. The first LIM domain binds the first ankyrin repeat of ILK. The interaction has been well-characterized using structural [11], biochemical and cell biological approaches [8,9]. The fourth LIM domain of Pinch-1 was shown to bind with very low affinity to the SH2/SH3 adaptor protein Nck2, which in turn interacts with growth factor receptors and recruits a large number of proteins, including actin modulators such as Dock180 (180-kDa protein downstream of CRK) and the p21-activated serine/threonine kinase (PAK) [8,12,13]. Whether Pinch-1 interacts with Nck2 *in vivo* is not clear. Since mice and cells lacking Nck2 are normal [14] but mice lacking Pinch-1 die during implantation (F Stanchi and R Fässler, unpublished) this interaction does not seem to be crucial for Pinch-1 function. It has been shown that Pinch-2 can translocate into the nucleus [9]. Its role there, however, is unclear.

Table 1

ILK interacting proteins, the location of their binding site on ILK and the method(s) used to confirm their interaction.

Interactor	Domain	Detection	Reference
β1 integrin	C terminus	Y2H/IP	[3]
β3 integrin	C terminus	IP	[3,61]
ILKAP	N terminus	Y2H/IP	[62]
Mig-2/Kindlin-2	C terminus	Y2H	[21••]
α-parvin	C terminus	Y2H/IP	[18]
β-parvin	C terminus	Y2H/IP	[19]
paxillin	C terminus	IP	[15]
Pinch-1	N terminus	Y2H/IP/CC	[8,11]
Pinch-2	N terminus	IP	[9]
PIP3	PH	—	[26]

CC, co-crystallization; IP, co-immunopreciptiation; Y2H, yeast-two-hybrid assay

Table 2

Putative targets of the ILK kinase activity and the amino acid residue(s) phosphorylated by ILK.

Target	Phosphorylation site	Reference
ILK	(Ser343)	[35,40]
β1 integrin	(Ser785)	[3]
β3 integrin	—	[61]
β-parvin	—	[19]
GSK-3β	(Ser9)	[26,62]
PKB/Akt	(Ser473)	[26]
MLC-20	(Thr18/Ser19)	[42]
MYPT-1	(Thr695, Thr495/Thr709)	[43,44]
CPI-17	(Thr38)	[45]
PHI-1	(Thr57)	[45]

MYPT1, myosin phosphatase target subunit isoform 1.

A search for paxillin binding proteins showed that the kinase domain of ILK contains sequences resembling a paxillin binding subdomain (PBS) motif, which firmly binds paxillin [15]. The ILK–paxillin interaction is necessary but not sufficient to recruit ILK into FAs, where the complex may modulate the function of other paxillin binding proteins such as vinculin, α-actinin, talin and FAK.

Several laboratories have simultaneously shown that parvins, a new family of F-actin binding proteins, bind the kinase domain of ILK [16–19]. The parvins comprise three members (α-parvin or actopaxin or CH-ILK binding protein; β-parvin or affixin; and γ-parvin) and are composed of two calponin homology (CH) domains that bind ILK, paxillin and F-actin. β-parvin was shown to interact with the guanine nucleotide exchange factor α-PIX (PAK-interactive exchange factor-α), which may activate Rac1 and Cdc42 [20]. Parvins are found in FAs and apparently do not colocalize to stress fibers [16,17]. An important future task will be to map the binding sites of ILK, paxillin and F-actin on the CH domains and to test whether their binding occurs simultaneously or is mutually exclusive.

A recent paper identified an additional ILK binding partner in *Caenorhabditis elegans*, termed UNC-112 [21••]. UNC-112 contains a FERM domain [22] and is important for the recruitment of the ILK orthologue, Pat-4, to muscle attachment sites. The mammalian orthologue of UNC-112, Mig-2/Kindlin-2, was shown to bind the LIM-domain-containing adaptor protein migfilin, which in turn binds filamin [23•]. It will be interesting to see whether Mig-2/Kindlin-2 also binds ILK in mammalian cells and whether this interaction modulates the function of filamin, which is mutated in a variety of human diseases.

ILK, Pinch and parvin — a ternary complex required for stability and focal adhesion localization

The association of ILK, Pinch and parvin into a ternary protein complex happens before their recruitment into FAs [24•] and serves at least two purposes: it stabilizes the individual proteins and targets the individual components into FAs [24•,25•]. Loss of ILK expression in cells leads to the degradation of Pinch and parvin and, conversely, loss of Pinch expression diminishes ILK and parvin levels [25•]. The degradation can be prevented either by inhibiting the proteasome [25•] or by expressing short N-terminal fragments of ILK (the ankyrin repeats) in ILK-deficient cells (C Grashoff, R Fässler, unpublished data) or Pinch (the first LIM domain) in Pinch-deficient cells (F Stanchi, R Fässler, unpublished data). Their recruitment into FAs, however, cannot be rescued with these fragments. These results support the notion that ILK and Pinch must have binding partner(s) that facilitate FA targeting. Possible candidates for ILK targeting partners are integrins, paxillin and Mig-2/Kindlin-2. It has been shown that nematodes lacking β integrin fail to localize ILK to cell attachment sites [21••]. Mammalian cells may have a similar requirement for β integrin to localize ILK, but this has not been shown yet with cell lines lacking either β1 or β3 or both integrin subunits. Paxillin binds ILK via its N-terminal leucine-rich motifs and targets to FAs via the C-terminal LIM domains. Mutation in the paxillin binding site of ILK prevents ILK/Pinch/parvin recruitment to FAs [15]. Mig-2/Kindlin-2 could also play a role since the worm orthologue UNC-112 is essential for localization of Pat-4/ILK to integrin-containing attachment sites [21••]. No candidate binding partners are currently known that could promote recruitment of Pinch into FAs.

The dependence of ILK, Pinch and parvin stability on the formation of a ternary complex has implications for the interpretation of overexpression experiments. Accumulation of ILK in the cytoplasm of ILK-overexpressing cells may cause a partial depletion of Pinch and parvin from FAs, resulting in an impaired FA function. This could explain why cells either lacking [7••] or overexpressing ILK [3] have similar phenotypes: they both show a rounded morphology and have decreased adhesive properties.

The kinase activity of ILK

Despite the sequence differences between the ILK kinase domain and other protein kinases (important residues in the activation loop of the kinase are not conserved) the similarity was immediately recognized and investigated [3]. Initial studies showed that GST-tagged ILK purified from bacteria or mammalian cells could phosphorylate serine and threonine residues in peptides representing the β1 integrin tail, and model substrates such as myelin basic protein [3].

ILK kinase activity took center stage when it was suggested to be directly associated with cell proliferation, tumor growth and metastasis [4,26–29]. On the one hand, overexpression of ILK in cells results in anchorage-independent cell cycle progression [5] and epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) of non-tumorigenic as well as tumorigenic epithelial cells [4,29]. Inhibition of ILK kinase activity, on the other hand, suppresses cell growth in culture as well as growth of human colon carcinoma cells in SCID mice [30]. Several lines of experimental evidence suggest that these phenotypes are largely attributed to enhanced ILK kinase activity and phosphorylation of GSK3β and PKB/Akt [26], two key enzymes involved in a diverse array of cell functions including cell proliferation, survival and insulin responses [31,32]. ILK-dependent phosphorylation of GSK3β in epithelial cells downregulates GSK3β kinase activity [26]. This in turn is associated with reduced E-cadherin expression, enhanced AP1 activity and increased β-catenin–Lef/Tcf activity [4,33], which induces the expression

of cell-cycle-promoting genes such as cyclins and c-myc [5,34]. The reduced E-cadherin expression could be due to a direct effect of the β-catenin-Lef/Tcf complex on E-cadherin gene expression [4]. Alternatively, ILK can reduce E-cadherin levels indirectly by triggering snail expression, which in turn represses E-cadherin gene expression [30].

Full activation of PKB/Akt requires PIP3-dependent phosphorylation of two residues: Thr308 and Ser473 [32]. Whereas PDK-1 (3-phosphoinositide-dependent kinase 1) phosphorylates Thr308, ILK has been identified as 'PDK-2', which phosphorylates Ser473 via a direct interaction at the plasma membrane [26,35]. Besides possessing a kinase activity, ILK fulfils other requirements of a PDK2, including PIP3 binding and regulation of its activity by PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase) or PTEN (protein tyrosine phosphatase and tensin homolog) [26,27]. However, some doubts about ILK's kinase activity arose when it was reported that it has no Ser473 phosphorylation activity [36,37•]. These doubts were reinforced by genetic studies in invertebrates and mice that demonstrated normal Ser473 phosphorylation in the absence of ILK [7••,21••,38]. Loss-of-function mutations of ILK in worms and flies show no defects that can be explained by impaired PKB/Akt activity, but develop severe muscle defects that are fully rescued when different kinase-dead versions of ILK are expressed [21••,38]. Similarly, fibroblasts with or without the ILK gene phosphorylate Ser473 to a similar extent following insulin or PDGF stimulation [7••], and neither chondrocytes nor keratinoyctes change their steady-state Ser473 phosphorylation after ILK gene ablation *in vivo* [39] (T Sakai and R Fässler, unpublished). These findings convincingly demonstrate that ILK — even if it has Ser473 phosphorylation activity — is not the only PDK2. These findings, however, do not exclude the possibility that ILK mediates the phosphorylation of PKB/Akt and other target proteins in an indirect manner, for example by recruiting a kinase or inhibiting a phosphatase [37•,40]. Support for such a notion also comes from gene ablation experiments. Monocytes lacking ILK expression show reduced Ser473 phosphorylation [41•]. Similarly, ILK-null fibroblasts, which respond normally to insulin treatment, fail to maintain Ser473 phosphorylation levels to the same extent as normal cells upon PDGF treatment [7••]. Furthermore, they display a slightly reduced steady state level of Ser473 phosphorylation under normal culture conditions (T Sakai and R Fässler, unpublished).

Other targets of the ILK kinase activity (Table 2) are β-parvin [19], the regulatory myosin light chain (MLC) [42], and MLC phosphatase [43,44] and its regulators CPI-17 (protein-kinase-C-dependent phosphatase inhibitor of 17 kDa) and PHI-1 (phosphatase holoenzyme inhibitor 1) [45]. The significance of their phosphorylation, however, is not clear.

Since ILK regulates so many essential cellular functions it is important to settle the debate on ILK's kinase activity. Solving the structure of the ILK kinase domain will be very informative, as will the analysis of mice carrying 'kinase-dead' versions of the ILK gene and the identification of PDK2(s). In addition to these new experimental approaches, new reagents to probe ILK's function will be useful. The E359K mutation in ILK, for example, was originally found to lack kinase activity and was therefore used in many studies as a 'kinase-dead' version of ILK. It turns out, however, that the mutation does not affect kinase activity but rather impairs paxillin binding and FA targeting [46•]. Furthermore, a polyclonal anti-ILK antiserum that recognizes a 59 kDa band of unknown origin instead of the 52 kDa sized ILK has been used in a large number of studies and could potentially have given misleading results [3,6,47].

Studies of ILK/Pinch/parvin in invertebrates and mice

The attachment sites of the body wall muscle to the hypodermis of *C. elegans* are called dense bodies and resemble FA-like structures. They contain β-*pat*-3 integrin (the only β integrin subunit in *C. elegans*), pat-4/ILK, UNC-97/Pinch, pat-6/parvin and UNC-112/Mig-2 and loss-of-function alleles of these proteins lead to severe adhesion defects manifesting as muscle detachment and embryonic lethality [21••,22,48,49•]. The loss-of-function studies also reveal that β-pat-3 integrin is required to recruit ILK to the plasma membrane [21••] and that integrins are partially mislocalized in the absence of pat-4/ILK [21••] or UNC-112/Mig-2/Kindlin-2 [22]. A recent report showed that the Zn^{2+}-finger-containing transcription factor UNC-98 can bind UNC-97/Pinch and is also required for muscle attachment to the body wall [50•]. UNC-98 shuttles between dense bodies and the nucleus where it binds DNA and probably regulates gene transcription. So far an ortholog of the UNC-98 gene has not been identified in flies or mammals.

Drosophila melanogaster has a similar requirement for βPS integrins, ILK and Pinch in muscle cell attachment [38,51••]. Interestingly, loss of βPS integrin function in flies leads to detachment of ECM from the cell membrane, while loss of ILK function leads to detachment of F-actin from the plasma membrane, indicating an important role for ILK in actin stabilization at integrin attachment sites [38]. The severe muscle defect in worms or flies lacking ILK can be fully rescued by the expression of different kinase-dead ILK transgenes, supporting the idea that ILK functions as an important adaptor protein, independent of its kinase activity [21••,38].

The loss of ILK expression in mice leads to peri-implantation lethality similar to what is seen upon loss of β1 integrin expression [7••,52]. The cause of the developmental arrest was studied in embryoid bodies (EBs)

[7••,53,54]; these studies showed that β1-integrin-mutant EBs are unable to deposit a basement membrane (BM), while ILK-null EBs produce a BM but fail to polarize the epiblast (a primitive tissue that will give rise to all three germ layers). Since addition of laminin to β1-integrin-null EBs rescues the BM assembly phenotype and allows epiblast development it is likely that β1 integrin and ILK function independently during the peri-implantation period [54].

Conditional loss of ILK in chondrocytes leads to skeletal growth retardations characterized by abnormal chondrocyte shape and decreased proliferation *in vivo* [39,55], and diminished chondrocyte spreading on ECM and reduced stress fiber formation *in vitro* [39]. Similar, albeit more severe, defects are also observed in mice with a chondrocyte-specific deletion of the β1 integrin gene [56], indicating that β1 integrins and ILK are both required for normal chondrocyte function. The mechanism leading to reduced chondrocyte proliferation in the absence of ILK expression is not understood; altered phosphorylation of PKB/Akt or GSK-3β was excluded [39]. A conditional deletion or reduction of ILK gene expression in macrophages, on the other hand, results in a strong inhibition of the PKB/Akt-Ser473 phosphorylation associated with apoptosis [41•], indicating that ILK kinase activity might differ depending on the cell type.

Overexpression of ILK in mammary glands of transgenic mice leads to tumor formation [29]. Similarly, pharmacological inhibition of ILK in prostate carcinoma cells causes them to proliferate much less rapidly *in vivo* [57••]. These findings can principally be explained by the oncogenic activities of ILK (activation of PKB/Akt, inhibition of GSK-3β, and stimulation of AP-1, NF-κB and β-catenin–Lef/Tcf transcription factors) and its ability to promote tumor angiogenesis. ILK promotes blood vessel invasion into tumors in two ways: ILK induces HIF1α-dependent VEGF expression in tumor cells, which in turn regulates endothelial cell migration and proliferation in an ILK kinase-dependent manner [57••]. The importance of ILK for tumor pathology is underscored by the fact that a large number of malignant tumors display increased ILK levels and kinase activity [58], and in some tumor types ILK levels correlate with tumor grade [59,60].

Outlook

ILK has many interesting functional facets and work in both invertebrates and mice has revealed an essential role for ILK in development. There is a general consensus that ILK plays a central role in the reorganization of the F-actin cytoskeleton and its attachment to FAs. The role of ILK as a kinase is more controversial. Since a large number of ILK functions rely on kinase activity, including EMT, proliferation and VEGF expression, this controversy should urgently be settled. This can be assisted by solving the structure of the ILK kinase domain, using continued genetic approaches or the well-defined antibodies that have become available over the past few years. As has already been done in flies and worms, it should be tested in mice whether point mutations in the kinase domain of ILK impair the function of the molecule.

An important future task will be to identify the signals that trigger assembly of the ILK/Pinch/parvin complex, to identify the proteins that recruit the core complex into FAs, and to establish how the core complex modulates integrin functions and regulates actin dynamics. The availability of cell lines and mice that lack ILK and the progress in proteomics and live cell imaging should together help to dissect these mechanisms and to clarify ILK's role in integrin-mediated cell adhesion.

Acknowledgements

We thank Drs. Kyle Legate, Cord Brakebusch and Haiyan Chu for discussion, comments and critical reading of the manuscript. The integrin/ILK work is supported by the DFG (SFB413), the Fonds der Chemischen Industrie and the Max Planck Society.

References and recommended reading

Papers of particular interest, published within the annual period of review, have been highlighted as:

- • of special interest
- •• of outstanding interest

1. Hynes RO: **Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines**. *Cell* 2002, **110**:673-687.

2. Brakebusch C, Fässler R: **The integrin–actin connection, an eternal love affair**. *EMBO J* 2003, **22**:2324-2333.

3. Hannigan GE, Leung-Hagesteijn C, Fitz-Gibbon L, Coppolino MG, Radeva G, Filmus J, Bell JC, Dedhar S: **Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new β1-integrin-linked protein kinase**. *Nature* 1996, **379**:91-96.

4. Novak A, Hsu SC, Leung-Hagesteijn C, Radeva G, Papkoff J, Montesano R, Roskelley C, Grosschedl R, Dedhar S: **Cell adhesion and the integrin-linked kinase regulate the LEF-1 and β-catenin signaling pathways**. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, **95**:4374-4379.

5. Radeva G, Petrocelli T, Behrend E, Leung-Hagesteijn C, Filmus J, Slingerland J, Dedhar S: **Overexpression of the integrin-linked kinase promotes anchorage-independent cell cycle progression**. *J Biol Chem* 1997, **272**:13937-13944.

6. Wu C, Keightley SY, Leung-Hagesteijn C, Radeva G, Coppolino M, Goicoechea S, McDonald JA, Dedhar S: **Integrin-linked protein kinase regulates fibronectin matrix assembly, E-cadherin expression, and tumorigenicity**. *J Biol Chem* 1998, **273**:528-536.

7. •• Sakai T, Li S, Docheva D, Grashoff C, Sakai K, Kostka G, Braun A, Pfeifer A, Yurchenco PD, Fässler R: **Integrin-linked kinase (ILK) is required for polarizing the epiblast, cell adhesion, and controlling actin accumulation**. *Genes Dev* 2003, **17**:926-940.
This paper analyzes the role of ILK during mouse development and in fibroblast cells. It demonstrates that ILK is required for F-actin reorganization, epiblast polarity and cavitation. Fibroblasts lacking ILK expression display reduced adhesion, spreading, F-actin distribution and proliferation but normal GSK3b and PKB/Akt phosphorylation.

8. Tu Y, Li F, Goicoechea S, Wu C: **The LIM-only protein PINCH directly interacts with integrin-linked kinase and is recruited to integrin-rich sites in spreading cells**. *Mol Cell Biol* 1999, **19**:2425-2434.

9. Zhang Y, Chen K, Guo L, Wu C: **Characterization of PINCH-2, a new focal adhesion protein that regulates the PINCH-1-ILK**

interaction, cell spreading, and migration. *J Biol Chem* 2002, **277**:38328-38338.

10. Braun A, Bordoy R, Stanchi F, Moser M, Kostka G, Ehler E, Brandau O, Fässler R: **PINCH-2 is a new five LIM domain protein, homologous to PINCH and localized to focal adhesions**. *Exp Cell Res* 2003, **284**:239-250.

11. Velyvis A, Yang Y, Wu C, Qin J: **Solution structure of the focal adhesion adaptor PINCH LIM1 domain and characterization of its interaction with the integrin-linked kinase ankyrin repeat domain**. *J Biol Chem* 2001, **276**:4932-4939.

12. Tu Y, Li F, Wu C: **Nck-2, a novel Src homology2/3-containing adaptor protein that interacts with the LIM-only protein PINCH and components of growth factor receptor kinase-signaling pathways**. *Mol Biol Cell* 1998, **9**:3367-3382.

13. Velyvis A, Vaynberg J, Yang Y, Vinogradova O, Zhang Y, Wu C, Qin J: **Structural and functional insights into PINCH LIM4 domain-mediated integrin signaling**. *Nat Struct Biol* 2003, **10**:558-564.

14. Bladt F, Aippersbach E, Gelkop S, Strasser GA, Nash P, Tafuri A, Gertler FB, Pawson T: **The murine Nck SH2/SH3 adaptors are important for the development of mesoderm-derived embryonic structures and for regulating the cellular actin network**. *Mol Cell Biol* 2003, **23**:4586-4597.

15. Nikolopoulos SN, Turner CE: **Integrin-linked kinase (ILK) binding to paxillin LD1 motif regulates ILK localization to focal adhesions**. *J Biol Chem* 2001, **276**:23499-23505.

16. Nikolopoulos SN, Turner CE: **Actopaxin, a new focal adhesion protein that binds paxillin LD motifs and actin and regulates cell adhesion**. *J Cell Biol* 2000, **151**:1435-1448.

17. Olski TM, Noegel AA, Korenbaum E: **Parvin, a 42 kDa focal adhesion protein, related to the α-actinin superfamily**. *J Cell Sci* 2001, **114**:525-538.

18. Tu Y, Huang Y, Zhang Y, Hua Y, Wu C: **A new focal adhesion protein that interacts with integrin-linked kinase and regulates cell adhesion and spreading**. *J Cell Biol* 2001, **153**:585-598.

19. Yamaji S, Suzuki A, Sugiyama Y, Koide Y, Yoshida M, Kanamori H, Mohri H, Ohno S, Ishigatsubo Y: **A novel integrin-linked kinase-binding protein, affixin, is involved in the early stage of cell–substrate interaction**. *J Cell Biol* 2001, **153**:1251-1264.

20. Rosenberger G, Jantke I, Gal A, Kutsche K: **Interaction of αPIX (ARHGEF6) with β-parvin (PARVB) suggests an involvement of αPIX in integrin-mediated signaling**. *Hum Mol Genet* 2003, **12**:155-167.

21. •• Mackinnon AC, Qadota H, Norman KR, Moerman DG, Williams BD: ***C.elegans* PAT-4/ILK functions as an adaptor protein within integrin adhesion complexes**. *Curr Biol* 2002, **12**:787-797.
Loss of PAT-4/ILK leads to muscle detachment. Genetic studies place PAT-4/ILK downstream of b-PAT-3/intgerin and upstream of UNC-97/Pinch.

22. Rogalski TM, Mullen GP, Gilbert MM, Williams BD, Moerman DG: **The *UNC-112* gene in *Caenorhabditis elegans* encodes a novel component of cell–matrix adhesion structures required for integrin localization in the muscle cell membrane**. *J Cell Biol* 2000, **150**:253-264.

23. • Tu Y, Wu S, Shi X, Chen K, Wu C: **Migfilin and Mig-2 link focal adhesions to filamin and the actin cytoskeleton and function in cell shape modulation**. *Cell* 2003, **113**:37-47.
This paper describes a new ILK adaptor protein termed migfilin, which links Mig-2/ILK to filamin. Knockdown of migfilin leads to altered cell shape, reduced migration and abnormal F-actin distribution. These defects resemble the phenotype of ILK-deficient cells.

24. • Zhang Y, Chen K, Tu Y, Velyvis A, Yang Y, Qin J, Wu C: **Assembly of the PINCH–ILK–CH–ILKBP complex precedes and is essential for localization of each component to cell–matrix adhesion sites**. *J Cell Sci* 2002, **115**:4777-4786.
This paper shows that ILK/Pinch/parvin have formed a ternary complex already prior to recruitment into FAs.

25. • Fukuda T, Chen K, Shi X, Wu C: **PINCH-1 is an obligate partner of integrin-linked kinase (ILK) functioning in cell shape modulation, motility, and survival**. *J Biol Chem* 2003, **278**:51324-51333.
Knockdown experiments show that Pinch and ILK are obligate partners and if not associated will be degraded by the proteasome.

26. Delcommenne M, Tan C, Gray V, Rue L, Woodgett J, Dedhar S: **Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase**. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, **95**:11211-11216.

27. Persad S, Attwell S, Gray V, Delcommenne M, Troussard A, Sanghera J, Dedhar S: **Inhibition of integrin-linked kinase (ILK) suppresses activation of protein kinase B/Akt and induces cell cycle arrest and apoptosis of PTEN-mutant prostate cancer cells**. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, **97**:3207-3212.

28. Attwell S, Roskelley C, Dedhar S: **The integrin-linked kinase (ILK) suppresses anoikis**. *Oncogene* 2000, **19**:3811-3815.

29. White DE, Cardiff RD, Dedhar S, Muller WJ: **Mammary epithelial-specific expression of the integrin-linked kinase (ILK) results in the induction of mammary gland hyperplasias and tumors in transgenic mice**. *Oncogene* 2001, **20**:7064-7072.

30. Tan C, Costello P, Sanghera J, Dominguez D, Baulida J, de Herreros AG, Dedhar S: **Inhibition of integrin linked kinase (ILK) suppresses β-catenin-Lef/Tcf-dependent transcription and expression of the E-cadherin repressor, snail, in APC$^{-/-}$ human colon carcinoma cells**. *Oncogene* 2001, **20**:133-140.

31. Cohen P, Frame S: **The renaissance of GSK3**. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001, **2**:769-776.

32. Lawlor MA, Alessi DR: **PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses?** *J Cell Sci* 2001, **114**:2903-2910.

33. Troussard AA, Tan C, Yoganathan TN, Dedhar S: **Cell–extracellular matrix interactions stimulate the AP-1 transcription factor in an integrin-linked kinase- and glycogen synthase kinase 3-dependent manner**. *Mol Cell Biol* 1999, **19**:7420-7427.

34. Novak A, Dedhar S: **Signaling through β-catenin and Lef/Tcf**. *Cell Mol Life Sci* 1999, **56**:523-537.

35. Persad S, Attwell S, Gray V, Mawji N, Deng JT, Leung D, Yan J, Sanghera J, Walsh MP, Dedhar S: **Regulation of protein kinase B/Akt-serine 473 phosphorylation by integrin-linked kinase: critical roles for kinase activity and amino acids arginine 211 and serine 343**. *J Biol Chem* 2001, **276**:27462-27469.

36. Balendran A, Casamayor A, Deak M, Paterson A, Gaffney P, Currie R, Downes CP, Alessi DR: **PDK1 acquires PDK2 activity in the presence of a synthetic peptide derived from the carboxyl terminus of PRK2**. *Curr Biol* 1999, **9**:393-404.

37. • Hill MM, Feng J, Hemmings BA: **Identification of a plasma membrane Raft-associated PKB Ser473 kinase activity that is distinct from ILK and PDK1**. *Curr Biol* 2002, **12**:1251-1255.
This paper shows that ILK is part of a protein complex with PKB/Akt Ser473 activity. Interestingly, however, the kinase activity is distinct from ILK.

38. Zervas CG, Gregory SL, Brown NH: ***Drosophila* integrin-linked kinase is required at sites of integrin adhesion to link the cytoskeleton to the plasma membrane**. *J Cell Biol* 2001, **152**:1007-1018.

39. Grashoff C, Aszodi A, Sakai T, Hunziker EB, Fässler R: **Integrin-linked kinase regulates chondrocyte shape and proliferation**. *EMBO Rep* 2003, **4**:432-438.

40. Lynch DK, Ellis CA, Edwards PA, Hiles ID: **Integrin-linked kinase regulates phosphorylation of serine 473 of protein kinase B by an indirect mechanism**. *Oncogene* 1999, **18**:8024-8032.

41. • Troussard AA, Mawji NM, Ong C, Mui A, St -Arnaud R, Dedhar S: **Conditional knock-out of integrin-linked kinase demonstrates an essential role in protein kinase B/Akt activation**. *J Biol Chem* 2003, **278**:22374-22378.
Conditional deletion of ILK in monocytes/macrophages results in reduced phosphorylation of Ser473 of PKB/Akt, indicating that the Ser473 activity of ILK may occur in a cell-type-dependent manner.

42. Deng JT, Van Lierop JE, Sutherland C, Walsh MP: **Ca^{2+}-independent smooth muscle contraction. A novel function for integrin-linked kinase**. *J Biol Chem* 2001, **276**:16365-16373.

43. Kiss E, Muranyi A, Csortos C, Gergely P, Ito M, Hartshorne DJ, Erdodi F: **Integrin-linked kinase phosphorylates the myosin phosphatase target subunit at the inhibitory site in platelet cytoskeleton**. *Biochem J* 2002, **365**:79-87.

44. Muranyi A, MacDonald JA, Deng JT, Wilson DP, Haystead TA, Walsh MP, Erdodi F, Kiss E, Wu Y, Hartshorne DJ: **Phosphorylation of the myosin phosphatase target subunit by integrin-linked kinase**. *Biochem J* 2002, **366**:211-216.

45. Deng JT, Sutherland C, Brautigan DL, Eto M, Walsh MP: **Phosphorylation of the myosin phosphatase inhibitors, CPI-17 and PHI-1, by integrin-linked kinase**. *Biochem J* 2002, **367**:517-524.

46. • Nikolopoulos SN, Turner CE: **Molecular dissection of actopaxin-integrin-linked kinase–paxillin interactions and their role in subcellular localization**. *J Biol Chem* 2002, **277**:1568-1575.
This report identifies a paxillin binding site in the ILK kinase domain. The interaction of ILK with paxillin is essential for the recruitment of ILK into FAs. Furthermore, the paper provides evidence that the E359K mutation in ILK affects paxillin binding but not the kinase activity.

47. Ahmed N, Oliva K, Rice GE, Quinn MA: **Cell-free 59 kDa immunoreactive integrin-linked kinase: a novel marker for ovarian carcinoma**. *Clin Cancer Res* 2004, **10**:2415-2420.

48. Hobert O, Moerman DG, Clark KA, Beckerle MC, Ruvkun G: **A conserved LIM protein that affects muscular adherens junction integrity and mechanosensory function in *Caenorhabditis elegans***. *J Cell Biol* 1999, **144**:45-57.

49. • Lin X, Qadota H, Moerman DG, Williams BD: ***C. elegans* PAT-6/actopaxin plays a critical role in the assembly of integrin adhesion complexes *in vivo***. *Curr Biol* 2003, **13**:922-932.
A phenotype analysis of PAT-6/parvin-deficient nematodes. Genetic experiments place PAT-6/parvin downstream of PAT-4/ILK and UNC97/Pinch.

50. • Mercer KB, Flaherty DB, Miller RK, Qadota H, Tinley TL, Moerman DG, Benian GM: ***Caenorhabditis elegans* UNC-98, a C2H2 Zn finger protein, is a novel partner of UNC-97/PINCH in muscle adhesion complexes**. *Mol Biol Cell* 2003, **14**:2492-2507.
A Zn^{2+} finger protein called UNC-98 shuttles between FAs and nucleus and interacts with UNC-97/Pinch in dense bodies. The nuclear function of UNC-98 is unknown.

51. •• Clark KA, McGrail M, Beckerle MC: **Analysis of PINCH function in *Drosophila* demonstrates its requirement in integrin-dependent cellular processes**. *Development* 2003, **130**:2611-2621.
Analysis of Pinch-deficient flies demonstrates muscle detachment and wing blisters. Pinch localization to muscle attachment sites is integrin-dependent, whereas ILK localization to integrin attachment sites is not Pinch-dependent. This indicates that in *Drosophila*, ILK and Pinch are not obligate binding partners.

52. Fässler R, Meyer M: **Consequences of lack of β1 integrin gene expression in mice**. *Genes Dev* 1995, **9**:1896-1908.

53. Aumailley M, Pesch M, Tunggal L, Gaill F, Fässler R: **Altered synthesis of laminin 1 and absence of basement membrane component deposition in b1 integrin-deficient embryoid bodies**. *J Cell Sci* 2000, **113**:259-268.

54. Li S, Harrison D, Carbonetto S, Fässler R, Smyth N, Edgar D, Yurchenco PD: **Matrix assembly, regulation, and survival functions of laminin and its receptors in embryonic stem cell differentiation**. *J Cell Biol* 2002, **157**:1279-1290.

55. Terpstra L, Prud'homme J, Arabian A, Takeda S, Karsenty G, Dedhar S, St-Arnaud R: **Reduced chondrocyte proliferation and chondrodysplasia in mice lacking the integrin-linked kinase in chondrocytes**. *J Cell Biol* 2003, **162**:139-148.

56. Aszodi A, Hunziker EB, Brakebusch C, Fässler R: **β1 integrins regulate chondrocyte rotation, G1 progression, and cytokinesis**. *Genes Dev* 2003, **17**:2465-2479.

57. •• Tan C, Cruet-Hennequart S, Troussard A, Fazli L, Costello P, Sutton K, Wheeler J, Gleave M, Sanghera J, Dedhar S: **Regulation of tumor angiogenesis by integrin-linked kinase (ILK)**. *Cancer Cell* 2004, **5**:79-90.
This paper demonstrates a dual role for ILK in tumor growth. ILK in tumor cells promotes VEGF release leading to the recruitment of endothelial cells, and ILK in endothelial cells supports their migration and proliferation in a PKB/Akt-dependent manner.

58. Marotta A, Parhar K, Owen D, Dedhar S, Salh B: **Characterisation of integrin-linked kinase signalling in sporadic human colon cancer**. *Br J Cancer* 2003, **88**:1755-1762.

59. Graff JR, Deddens JA, Konicek BW, Colligan BM, Hurst BM, Carter HW, Carter JH: **Integrin-linked kinase expression increases with prostate tumor grade**. *Clin Cancer Res* 2001, **7**:1987-1991.

60. Dai DL, Makretsov N, Campos EI, Huang C, Zhou Y, Huntsman D, Martinka M, Li G: **Increased expression of integrin-linked kinase is correlated with melanoma progression and poor patient survival**. *Clin Cancer Res* 2003, **9**:4409-4414.

61. Pasquet JM, Noury M, Nurden AT: **Evidence that the platelet integrin αIIbβ3 is regulated by the integrin-linked kinase, ILK, in a PI3-kinase dependent pathway**. *Thromb Haemost* 2002, **88**:115-122.

62. Leung-Hagesteijn C, Mahendra A, Naruszewicz I, Hannigan GE: **Modulation of integrin signal transduction by ILKAP, a protein phosphatase 2C associating with the integrin-linked kinase ILK1**. *EMBO J* 2001, **20**:2160-2170.

MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, Mar. 2006, p. 1817–1825 Vol. 26, No. 5
0270-7306/06/$08.00+0 doi:10.1128/MCB.26.5.1817–1825.2006
Copyright © 2006, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

γ-Parvin Is Dispensable for Hematopoiesis, Leukocyte Trafficking, and T-Cell-Dependent Antibody Response†

Haiyan Chu,[1] Ingo Thievessen,[1] Michael Sixt,[1] Tim Lämmermann,[1] Ari Waisman,[2]‡ Attila Braun,[1] Angelika A. Noegel,[3] and Reinhard Fässler[1]*

Department of Molecular Medicine, Max Planck Institute for Biochemistry, Am Klopferspitz 18, 82152 Martinsried, Germany[1]; Laboratory of Molecular Immunology, Institute for Genetics, University of Cologne, Zülpicher Str. 47, 50674 Cologne, Germany[2]; and Center for Biochemistry, Medical Faculty, University of Cologne, Joseph-Stelzmann-Str. 52, 50931 Cologne, Germany[3]

Received 12 August 2005/Returned for modification 21 September 2005/Accepted 30 November 2005

Integrins regulate cell behavior through the assembly of multiprotein complexes at the site of cell adhesion. Parvins are components of such a multiprotein complex. They consist of three members (α-, β-, and γ-parvin), form a functional complex with integrin-linked kinase (ILK) and PINCH, and link integrins to the actin cytoskeleton. Whereas α- and β-parvins are widely expressed, γ-parvin has been reported to be expressed in hematopoietic organs. In the present study, we report the expression pattern of the parvins in hematopoietic cells and the phenotypic analysis of γ-parvin-deficient mice. Whereas α-parvin is not expressed in hematopoietic cells, β-parvin is only found in myeloid cells and γ-parvin is present in both cells of the myeloid and lymphoid lineages, where it binds ILK. Surprisingly, loss of γ-parvin expression had no effect on blood cell differentiation, proliferation, and survival and no consequence for the T-cell-dependent antibody response and lymphocyte and dendritic cell migration. These data indicate that despite the high expression of γ-parvin in hematopoietic cells it must play a more subtle role for blood cell homeostasis.

Cell extracellular matrix (ECM) adhesions are crucial for various biological processes, including cell migration, proliferation, and cell survival (12, 15, 17). Integrins connect the ECM to the actin cytoskeleton at cellular attachment plaques that contain focal adhesion (FA)-associated proteins (8). A family of proteins consisting of actopaxin/CH-ILKBP/α-parvin, affixin/β-parvin, and γ-parvin, collectively called the parvins, has been recently identified in humans and mice (22, 23, 31, 34). In lower organisms such as *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*, there is only a single parvin protein (19, 23). Parvins are composed of an N-terminal polypeptide stretch, followed by a single actin-binding domain, which consists of two in tandem arranged calponin homology domains. α- and β-parvin share a high homology (23), and both bind to integrin-linked kinase (ILK), paxillin, and F-actin at FAs (1, 9, 22, 23, 31, 34). In addition, β-parvin also binds α-PIX, a guanine exchange factor for Rac and Cdc42 (21, 25), and α-actinin (35). Both α- and β-parvin associate with ILK and PINCH to form the ILK-PINCH-parvin complexes (37, 39, 40). Disruption of the complex in mammalian cells alters cell shape and impairs cell motility and survival (7, 36, 38, 39). In *C. elegans* disruption of the complex causes muscle detachment and a PAT (paralyzed at the four-cell stage) phenotype (19).

γ-Parvin consists of 331 amino acids and shares the same protein structure as α- and β-parvin. The mouse γ-parvin only shows 40% identity and 60% similarity to the α- or β-parvin at the amino acid level. No γ-parvin binding partners have been identified thus far. In contrast to the wide expression pattern of α- and β-parvin, γ-parvin mRNA is predominantly found in hematopoietic and lymphoid tissues (16, 22, 23, 34). These features of the γ-parvin raise the question of whether γ-parvin mediates integrin signaling via association with ILK and thereby regulates events, including cell differentiation, migration, and positioning in the hematopoietic system. In the present study, we described the expression pattern of the parvin protein family in hematopoietic organs and hematopoietic cells. To directly test the function of γ-parvin in vivo, we generated γ-parvin-deficient mice. Our study shows that γ-parvin is highly expressed in myeloid and lymphoid cells and that neither hematopoiesis nor T-cell-dependent antibody response, nor lymphocyte or dendritic cell (DC) migration is abnormal in the absence of γ-parvin.

MATERIALS AND METHODS

Antibodies. Rabbit anti-PINCH1 and PINCH2 polyclonal antibodies were described (18). Monoclonal anti-ILK antibody was from BD Transduction Laboratory, rabbit anti-α-actin and mouse antitalin antibodies were from Sigma Aldrich, rat anti-B220 (RA3-6B2), rat anti-Thy1.2, anti-rabbit or -mouse immunoglobulin G (IgG) (H+L)–horseradish peroxidase, anti-IgM (R6-60.2), rat anti-IgD (11-26c.2a), rat anti-CD19 (1D3), anti-CD4 (H129.19), anti-CD8 (53-6.2), rat anti-CD3 (17A2), anti-Gr-1 (RB6-8C5), anti-Mac-1 (M1-70), anti-Ter-119, hamster anti-CD11c (HL3), CD86 (GL1), and major histocompatibility complex (MHC) II (M5/114.15.2) were from BD Pharmingen (San Jose, CA). Alexa 488 phalloidin was from Molecular Probes (Leiden, The Netherlands).

Antibodies were conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE), or biotin and used at a 1:200 dilution. FITC-conjugated goat anti-rat or -mouse IgGs and streptavidin Cy-5 were from Jackson Immunoresearch (West Grove, PA). Rabbit pan-laminin antibody was described in Sorokin et al. (28). Annexin V-FITC was a gift from Ernst Pöschl (University of Erlangen-Nürnberg, Erlangen-Nürnberg, Germany) and was used at a 1:1,000 dilution.

* Corresponding author. Mailing address: Department of Molecular Medicine, Max Planck Institute for Biochemistry, Am Klopferspitz 18, 82152 Martinsried, Germany. Phone: (49) 89-8578-2424. Fax: (49) 89-8578-2422. E-mail: faessler@biochem.mpg.de.

† Supplemental material for this article may be found at http://mcb.asm.org/.

‡ Present address: Medizinsche Klinik und Poliklinik, Johannes Gutenberg-Universitat Mainz, 55131 Mainz, Germany.

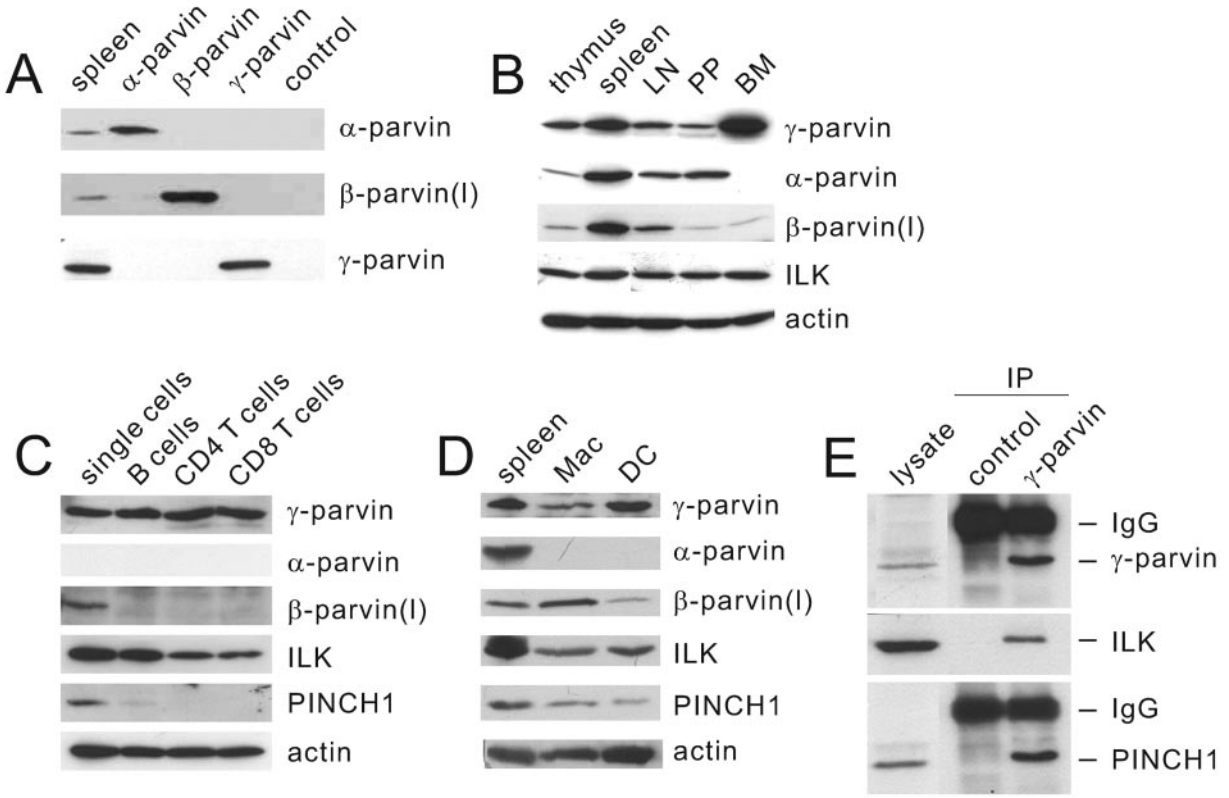


FIG. 1. Expression of parvins in the hematopoietic system (A) Peptide antisera were generated against α-parvin, the long isoform of β- and γ-parvin. Spleen lysate and in vitro-translated α-, β-, and γ-parvin proteins were subjected to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and probed with the antisera. (B) Thymus, spleen, lymph nodes (LN), Peyer's (PP), and bone marrow (BM) were isolated, lysed, and immunoblotted with anti-γ-, α-, and β-parvin and anti-ILK antibodies. (C) B220-, CD4-, and CD8-positive cells were sorted from adult mouse splenic single cell suspensions and analyzed by Western blotting with antiparvin, anti-ILK, and anti-PINCH1 antibodies. (D) BM-derived macrophages (Mac) and dendritic cells (DCs) were lysed and immunoblotted with antiparvin, -ILK, and -PINCH1 antibodies. (E) BM-derived DC lysate was immunoprecipitated with anti-γ-parvin antibody and with control preimmune serum. The immunoprecipitates were immunoblotted with γ-parvin, ILK and PINCH1 antibodies, respectively.

Generation of parvin peptide antibodies. To generate specific antibodies, N-terminal peptides corresponding to α-parvin amino acid residues 5 to 19 (PQKSPLVPKSPTPKS), β-parvin residues 3 to 16 (SAPPRSPTPRAPKM), and γ-parvin residues 2 to 17 (ELEFLYDLLQLPKEVA) were synthesized, coupled to the carrier protein KLH (Imject Maleimide Activated mc KLH; Pierce), and used to immunize rabbits. The antisera were further purified by using the SulfoLink kit (Pierce) and tested on in vitro translated α-, β-, and γ-parvin proteins, respectively (Fig. 1A).

Generation of γ-parvin-deficient mice. A γ-parvin cDNA fragment derived from EST clone AA981356 was used to screen a 129/Sv mouse P1-derived artificial chromosome library (27). P1-derived artificial chromosome 656L16 (from the Human Genome Mapping Project Center, Cambridge, United Kingdom) was used to generate the targeting vector. A 5.5-kb fragment was used as 5′ flanking arm and a 2.3-kb fragment as a 3′ flanking arm (Fig. 2A). An internal ribosome entry site-*lacZ* reporter cassette, followed by a PKG-driven *neo* gene (27), was inserted between the two arms. The targeting vector was electroporated into passage 15 R1 embryonic stem (ES) cells and selected with G418 (3). Southern blots from 360 EcoRV-digested ES cell clones were hybridized with an external 700-bp SphI-HindIII fragment derived from intron 10 (Fig. 2A). Nine recombinant ES clones were identified by detection of a 4.9-kb recombinant band, in addition to the 5.7-kb wild-type band. Three targeted ES clones were injected into blastocysts to generate germ line chimeras, which were then mated with C57BL/6 females. Genotyping of γ-parvin mutant mice was performed by Southern blot or by PCR using a wild-type allele primer pair (forward, GTTTGAAGAACTGCA GAAGG; reverse, GTTGATCCATTCCATCAGCA) and a recombinant allele-specific primer pair derived from the *lacZ* gene (forward, CTGGGTAATAAG CGTTGGCAAT; reverse, CCAACTGGTAATGGTAGCGAC).

In vitro translation. α-, β-, and γ-parvin cDNAs (16) were amplified with Vent DNA polymerase (New England Biolabs, United Kingdom) and cloned into a modified $pCS2^+$ mammalian SP6 promoter driven expression vector. In vitro translation reactions were performed with TNT Coupled Transcription/Translation Systems (Promega, Mannheim, Germany) using rabbit reticulocyte lysate and subsequently analyzed by Western assay.

Western analysis and immunoprecipitation. Cells were lysed in 150 mM NaCl–5 mM EDTA–1% Triton X-100 (pH 7.4) in the presence of protease inhibitors (Roche, Mannheim, Germany). Alternatively, tissues were homogenized in radioimmunoprecipitation assay buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl [pH 7.4], 5 mM EDTA, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 1% sodium deoxycholate, 1% Triton X-100) containing protease inhibitors. For Western analysis, 30 to 50 μg of protein were gel separated, blotted, and probed with the primary and the secondary horseradish peroxidase-conjugated antibodies.

For immunoprecipitation, cells were lysed in ice-cold buffer (150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 100 mM NaF, 10% glycerol, 50 mM HEPES [pH 7.5], 10 mM $Na_4P_2O_7$) supplemented with protease inhibitors. Then, 500 μg of protein was incubated with 0.8 mg of protein A (Sigma) in 50 μl of lysis buffer and with 1 μg of purified γ-parvin antibody or 1 μg of preimmune serum as a negative control at 4°C overnight. The protein-antibody-containing pellet was washed with lysis buffer and subjected to immunoblotting.

Northern blot assay, reverse transcription-PCR (RT-PCR), and immunostaining. Preparation, gel separation, blotting, and hybridization of total RNA from spleen and thymus was performed as previously described (3). γ-Parvin cDNA (nucleotides 269 to 865) was used as probes.

For RT-PCR, total RNA was reverse-transcribed with iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Germany) and amplified with a β-parvin forward primer located in exon 5 (GGAAGCCGTGCAAGACCTGC) and a reverse primer located in exon 6 (CCCTGAAGTGCATGGCCAGG). An HPRT1 primer pair was used as a control (forward, TCAGTCAACGGGGGACATAAA; reverse, GGGGCT GTACTGCTTAACCAG).

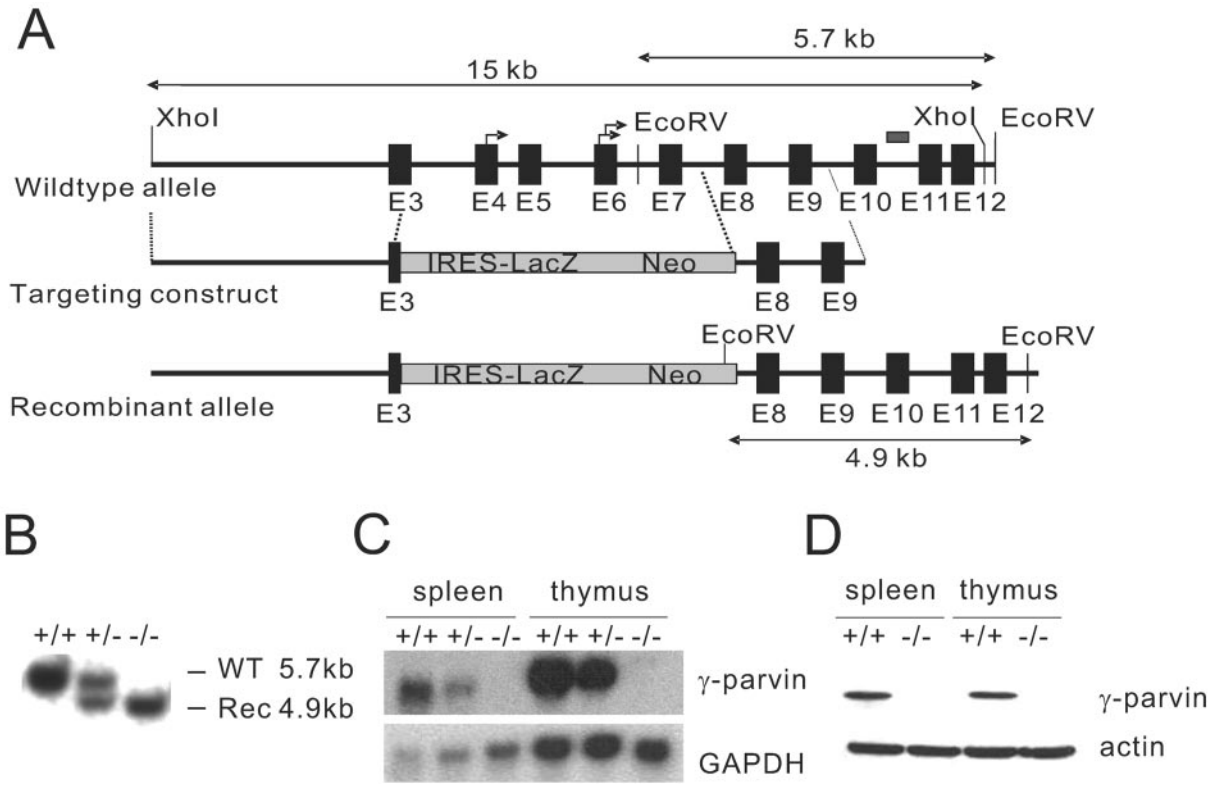


FIG. 2. Generation of γ-parvin-deficient mice. (A) An internal ribosome entry site (IRES)-LacZ neomycin cassette was inserted into the γ-parvin gene by replacing a 5.4-kb genomic fragment spanning exon 3 to intron 7, including both ATG-containing exons. The arrow indicates ATG triplets. (B) Homozygous mice were genotyped by Southern blot. (C) Loss of γ-parvin mRNA was shown by Northern blot in mouse thymus and spleen tissues. GAPDH cDNA probe was used to control mRNA loading. (D) Loss of γ-parvin expression was determined by Western blotting. The blots were reprobed with antiactin as loading control. Single cells, spleen single-cell suspension; WT, wild type; Rec, recombinant.

Immunofluorescence studies of tissue sections and cells were performed as described previously (3).

Flow cytometry analysis (FACS) and magnetic cell sorting. Single-cell suspensions were prepared by gently pushing the dissected organs through 70-mm cell strainers (BD). Fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis was performed as described previously (24). For magnetic cell sorting, 10^7 spleen cells were mixed with FITC-conjugated anti-B220, CD4, CD8, or CD3 antibodies (BD Biosciences), respectively; incubated with anti-FITC microbeads; and sorted out according to the instructions of the manufacturer (Miltenyi Biotech, Inc.). Sorted cells were analyzed by FACS to test purities and analyzed by Western blotting or RT-PCR.

Generation of bone marrow (BM)-derived DC and macrophages were carried out as described previously (20, 26). Cells were immunostained (DCs for CD11c and Gr-1, macrophages for Mac-1) and analyzed by FACS.

For apoptosis assay, macrophages were harvested on day 8, stained with annexin V-FITC, and analyzed by FACS to determine the percentage of the apoptotic cells.

DC migration in vivo. On days 8 to 10 of DC culture, the medium was supplemented with 200 ng of lipopolysaccharide (LPS; Sigma)/ml to induce maturation. For fluorescence labeling, cells in phosphate-buffered saline were incubated for 10 min with 3 mM CFSE or 10 μM TAMRA (Molecular Probes) at room temperature. A 1:1 mixture of each 10^6 CFSE- and TAMRA-labeled DC was injected into the hind footpad of recipient mice in a volume of 30 ml of phosphate-buffered saline. After 48 h, the popliteal lymph nodes (LN) were dissected and immunostained with pan-laminin antibody, or single-cell suspensions were prepared and analyzed by flow cytometry.

Lymphocyte homing in vivo. Spleen single-cell suspensions of knockout and control animals were prepared and erythrocytes were lysed. For fluorescence labeling, cells were incubated for 10 min with 1 mM CFSE or 20 μM TAMRA (Molecular Probes) at room temperature. A 1:1 mixture of each 2×10^7 CFSE- and TAMRA-labeled cells was injected intravenously. After 90 min and 24 h, lymphocytes were isolated from spleen and peripheral LN (inguinal, axial), and the ratio of control to mutant cells in these organs was determined by FACS using simultaneous staining with antibodies to B220 or CD3.

Immunization. Mice were immunized via the intraperitoneal route with 100 μg of alum-precipitated NP_{23}-CG) and boosted with 10 mg/mouse 6 weeks after the first immunization. A total of 50 μl of blood was collected from each mouse at the indicated time points. Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) were carried out as described previously (10).

Statistics. The statistical analyzes of FACS and ELISA data were performed by using the Student *t* test. The *P* value for significance was set at 0.05.

RESULTS

Expression of the parvin family members in the hematopoietic system. To determine the expression of the individual parvin family members, we generated peptide antisera that exclusively recognized the corresponding in vitro translated protein (Fig. 1A). The β-parvin mRNA can generate three isoforms depending on which translation initiation codon is used for protein translation (34). The peptide we used to generate our anti-β-parvin antibody is not present in the two shorter isoforms called β-parvin(s) and β-parvin(ss). Hence, the anti-β-parvin antibody exclusively recognizes the long β-parvin(l) isoform.

Western blot analysis of lysates derived from thymus, spleen, LN and Peyer's patch (PP) revealed that α-parvin, β-parvin, and γ-parvin are expressed at the expected molecular masses (around 42 kDa for α- and β-parvin and 37 kDa for γ-parvin) (Fig. 1B). BM lysates showed high expression levels of γ-par-

vin, low levels of β-parvin and no detectable α-parvin (Fig. 1B). In addition to the BM, we detected the γ-parvin protein in thymus, spleen, LN, and PP on Western blot (Fig. 1B). In addition to these hematopoietic organs, we found very weak γ-parvin signal in lung and hardly detectable signal in testis lysates (data not shown). To further determine the cell-type-specific expression of the parvin family members, we sorted B cells and CD4- and CD8-positive T cells from adult mouse spleen by using magnetic microbeads. The purities of the sorted cells ranged between 92 and 99% as analyzed with cell-type-specific antibodies by FACS (data not shown). γ-Parvin was expressed at similar levels in all three cell populations (Fig. 1C). α- and β-parvin(l) were absent from B and T cells (Fig. 1C). Lysates from a splenic single-cell suspension showed γ- and β-parvin(l) expression but no detectable α-parvin. BM-derived macrophages and DCs expressed γ- and β-parvin but no detectable α-parvin protein (Fig. 1D).

α- and β-parvin can bind ILK and together with PINCH1 form an ILK-PINCH-parvin complex (39, 40). To test whether γ-parvin has similar properties, lysates from DCs were immunoprecipitated with anti-γ-parvin antibody or preimmune serum. Subsequent Western blotting detected ILK, PINCH1, and γ-parvin in the anti-γ-parvin immunoprecipitates but not in the preimmune serum control (Fig. 1E), indicating that γ-parvin can also bind ILK and form a ternary complex with ILK and PINCH1.

Mice lacking γ-parvin expression are viable and fertile. To directly analyze γ-parvin in vivo, we introduced a constitutive null mutation into the γ-parvin gene of mice (Fig. 2A). Southern blot or PCR based genotyping of tail biopsies from 159 3-month-old mice revealed the presence of homozygous mice at the expected Mendelian ratio (Fig. 2B and data not shown). Northern and Western blot analysis confirmed the absence of γ-parvin in homozygous mutant mice (Fig. 2C and D). Both heterozygous and homozygous γ-parvin mutant mice were indistinguishable from their wild-type littermate controls. They were fertile and had a normal life span.

Normal hematopoiesis in γ-parvin-deficient mice. α- and β-parvin have been shown to modulate cell migration and cell survival (6, 31, 34, 40). To test whether γ-parvin has a similar function in vivo, we first determined the cellularity and the population sizes of different cell lineages in BM, thymus, spleen, LN, and PP of 5-month-old control and γ-parvin-null mice. The average cell numbers were similar between control and γ-parvin-deficient BM, thymus, and spleen. They were $(29.8 \pm 8.1) \times 10^6$ in control BM and $(35.1 \pm 11.1) \times 10^6$ in γ-parvin-null BM, $(37.1 \pm 10.6) \times 10^6$ in control thymus and $(40.2 \pm 12.1) \times 10^6$ in γ-parvin-null thymus and $(104.0 \pm 33.5) \times 10^6$ in control spleen and $(107.6 \pm 30.8) \times 10^6$ in γ-parvin-null spleen.

To determine the population sizes of different cell lineages we prepared single cell suspensions from lymphoid organs, immunostained them with different lineage markers (B-cell markers B220, IgM, IgD, and CD19; T-cell markers CD4, CD8, and CD3; erythrocyte marker Ter119; granulocyte marker Gr-1; macrophage marker Mac-1; natural killer cell markers Dx5 and NK1.1) and analyzed them by FACS. The relative numbers of the different cell types were similar in BM, thymus, spleen, LN, and PP between control and γ-parvin-null mice of 4, 8, and 20 weeks of age (Fig. 3A to C and data not shown).

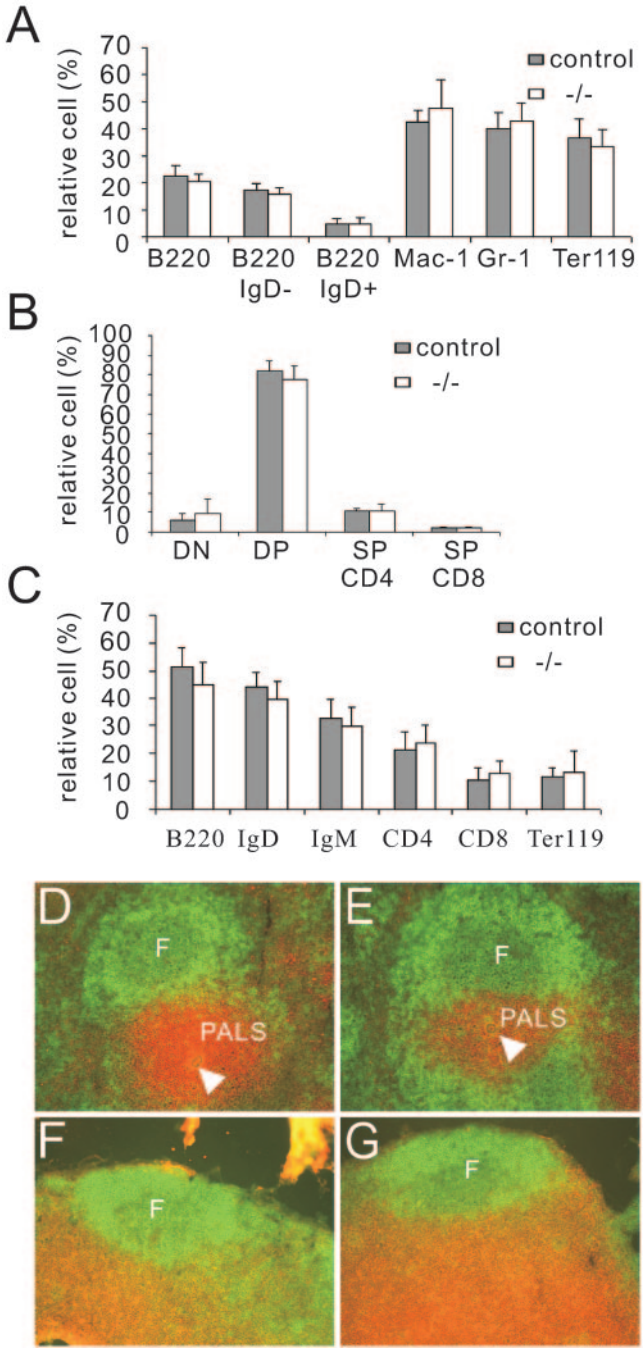


FIG. 3. Composition and architecture of lymphoid organs in γ-parvin-deficient mice. (A to C) Single-cell suspensions derived from primary and secondary lymphoid tissues (BM [A], thymus [B], spleen [C]) were immunostained with different hematopoietic lineage makers and analyzed by FACS. The relative cell numbers are shown (n = 5/5, 5-month-old mice). (D to G) Immunostaining of spleen (D and E) and LN (F and G) with anti-B220 (FITC) and anti-Thy1.2 (Cy3) antibodies showed normal distribution of B and T cells. F, B-cell follicle; PALS, periarteriolar lymphoid sheath. Magnification, ×200.

To test whether γ-parvin-null hematopoietic organs have a normal architecture and distribution of the different cell populations, we performed histochemistry and immunostainings of tissue sections derived from hematopoietic organs. Hematox-

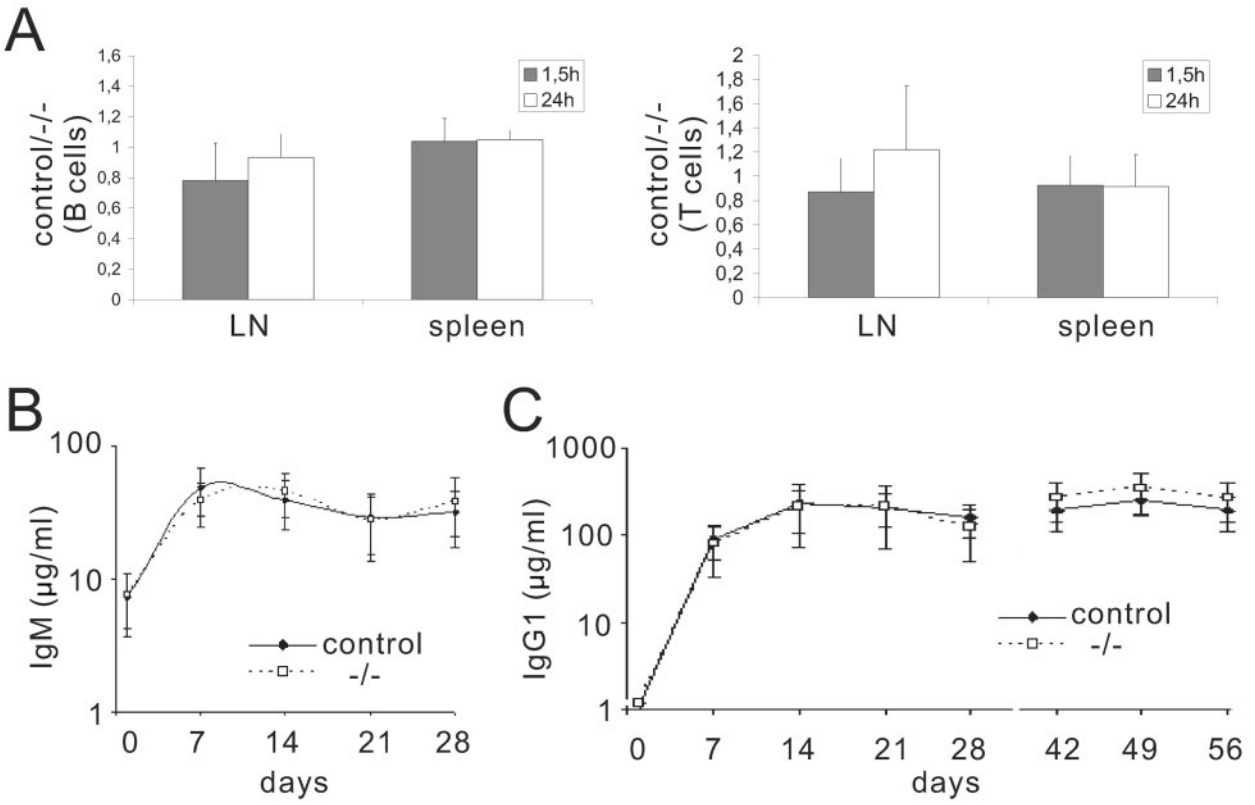


FIG. 4. Lymphocyte homing and T-cell-dependent antibody responses in γ-parvin-deficient mice. (A and B) Spleen single cell suspensions of γ-parvin-deficient and control mice were labeled with TAMRA and CFSE, mixed 1:1, and injected intravenously into wild-type mice. Half of the experiments were performed with inverted labeling. The ratio of knockout to control B and T cells in LN and spleen was determined by FACS. Values are the means of three independent experiments with three to six animals ± the standard error of the mean. (B and C) Mice were immunized with the T-cell-dependent antigen NP-CG, and the anti-NP IgM (B) and IgG1 (C) responses were measured by ELISA. (n = 7).

ylin-eosin staining revealed a normal architecture of thymus, spleen, LN, and PP derived from γ-parvin-null mice (data not shown). Immunostaining of spleen, LN, and PP with the B-cell marker B220 and the T-cell marker Thy1.2 showed normal T- and B-cell distribution in the mutant tissues (Fig. 3D and data not shown).

Normal lymphocyte homing and T-cell-dependent antibody response in γ-parvin-deficient mice. The association of γ-parvin with integrins and the actin cytoskeleton in hematopoietic cells suggested a potential role of γ-parvin in leukocyte trafficking. We therefore tested whether short and long-term homing of B and T cells was altered in the absence of γ-parvin. Single cell suspensions of spleens from knockout and control mice were labeled with different fluorescent dyes and a 1:1 mixture of both genotypes was injected intravenously into wild-type recipients. After 90 min and 24 h the ratio of fluorescent cells that homed into spleen and peripheral lymph nodes was determined for B220 positive B cells and CD3 positive T cells, respectively. No significant difference in homing frequency could be observed between mutant and control cells (Fig. 4A).

To more generally test for a role of γ-parvin in adaptive immune responses, we first measured the levels of total immunoglobulins (IgM, IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b, and IgG3) and found that they were similar between γ-parvin-null and control animals (data not shown). Next, we investigated whether the T-cell-dependent antibody response differs between control and γ-parvin-null mice. Mice were immunized with the T-cell-specific antigen NP-CG and the anti-NP antibody heavy chain isotypes (IgM and IgG1), as well as light-chain isotypes (Igκ and Igλ) were measured 1, 2, 3, and 4 weeks later by ELISA. No significant differences were found in any of these anti-NP isotypes between γ-parvin-null and control mice (Fig. 4B and C; see Fig. S1 in the supplemental material). Moreover, when mice were boosted with NP-CG antigens 6 weeks after the immunization, γ-parvin-null mice showed a similar memory antibody response as control mice (Fig. 4C and Fig. S1 in the supplemental material; data for IgG2a and IgG3 are not shown).

Differentiation of macrophages and maturation and migration of DCs are normal in γ-parvin-deficient mice. To test for a possible role of γ-parvin in the myeloid lineage, we differentiated DCs from BM precursors in vitro and induced maturation by adding LPS to the culture medium. Efficiency of DC generation was identical in γ-parvin-deficient and control cultures (Fig. 5A). Morphology as determined by bright-field microscopy was unchanged in this cell type (data not shown). To more specifically address possible cytoskeletal alterations, we performed immunostaining of adherent immature DC for F-actin and the integrin-associated proteins talin (Fig. 5B) and vinculin (not shown). Independent of the genotype, we found the typical podosome structure containing an actin core surrounded by a ring of talin and vinculin.

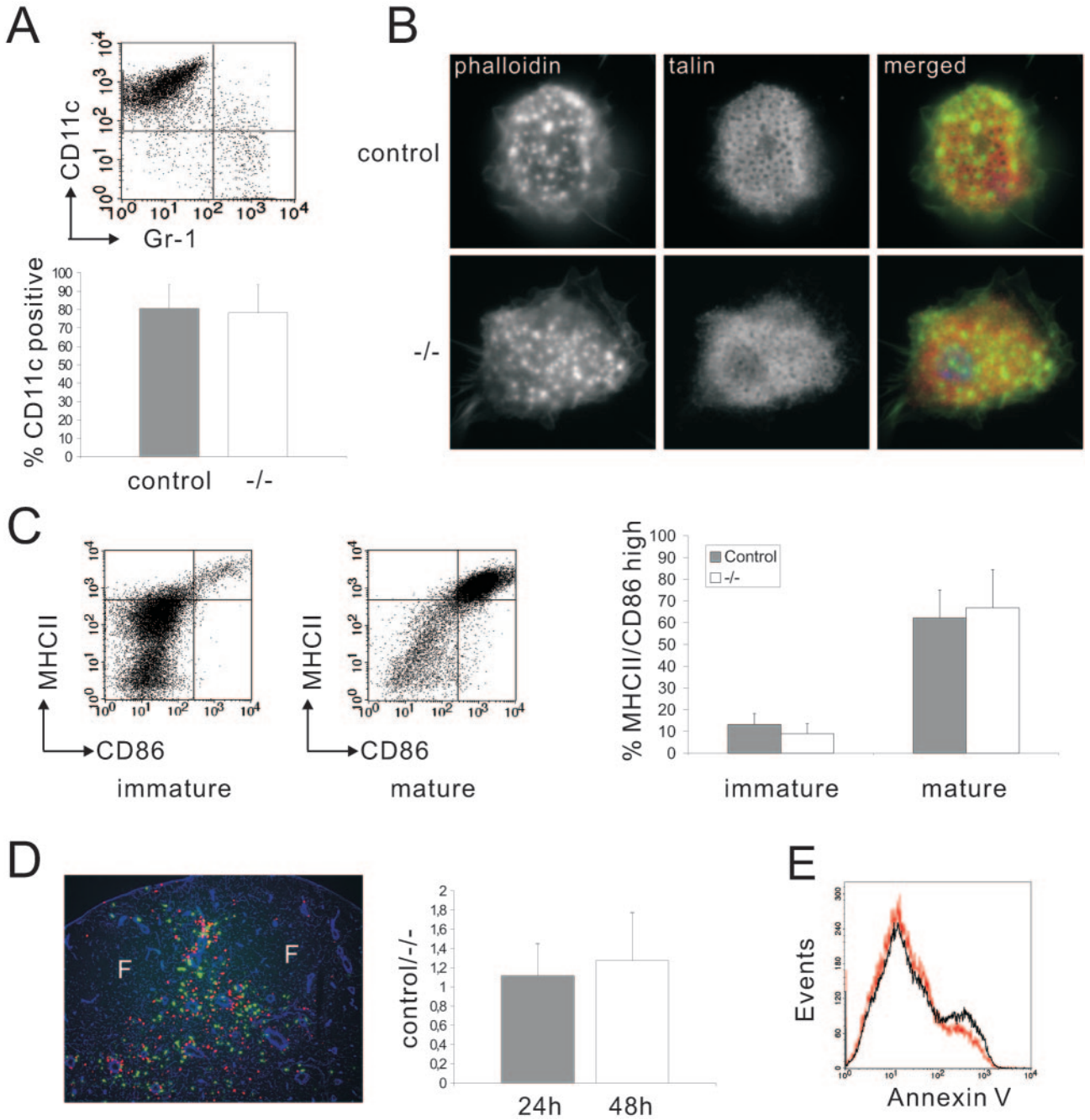


FIG. 5. Differentiation, maturation, and migration of BM-derived DCs. (A) γ-Parvin control and null BM-derived DCs were analyzed by FACS with CD11c and Gr-1 antibodies. Quantification shows mean values of three independent experiments. (B) Immature DC were plated on coverslips, fixed, and immunostained. (C) FACS analysis of MHCII and CD86 on the BM-derived DCs (upper panel) and mature DCs stimulated with LPS overnight (lower panel). The quantification shows mean values of three independent experiments ± the SD. (D) BM-derived DCs from both control and γ-parvin-deficient mice were stimulated with LPS overnight, labeled with TAMRA and CFSE, respectively, mixed in a 1:1 ratio, and subsequently injected into the hind footpad of mice. After 48 h, the popliteal LNs were dissected and immunostained with pan-laminin antibody. F, B-cell follicle. Magnification, ×200. Quantitative data were obtained by FACS analysis of popliteal lymph nodes. Values are means of five independent experiments with three to six mice each ± the standard error of the mean. (E) BM-derived macrophages were harvested (including the cells in suspension) on day 8 and stained with FITC-conjugated annexin V. Data for control cells are shown in black line; those for γ-parvin-null cells are shown in red.

After maturation, γ-parvin-deficient DCs upregulated MHC II and the costimulatory molecules CD86 and CD40 to a similar extent as control DCs (Fig. 5C and data not shown). In vivo, these mature DCs actively migrate via the afferent lymphatics into the draining LNs where they encounter and activate naive T cells. To test migration and positioning of DC in vivo, we performed competitive migration experiments. In vitro generated γ-parvin-deficient, and control DCs were la-

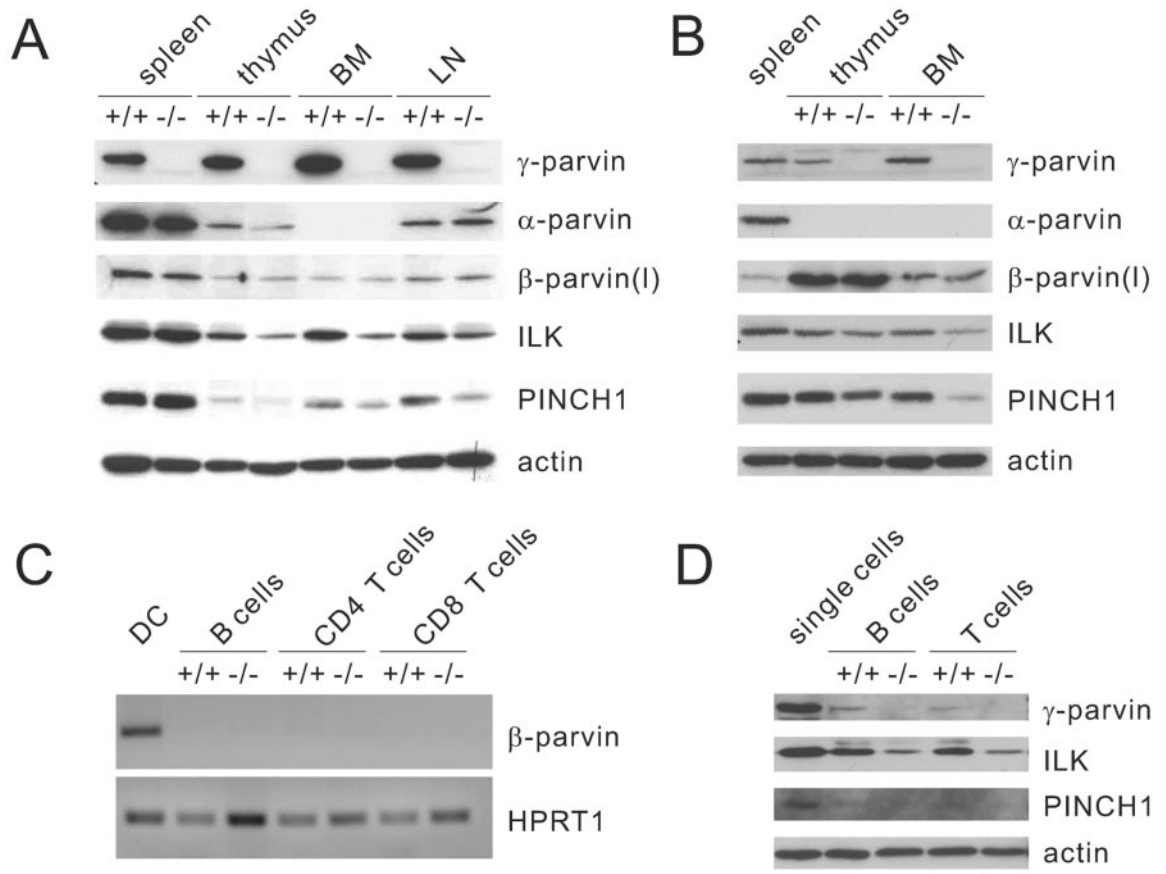


FIG. 6. Levels of α- or β-parvin in γ-parvin-deficient mice. (A) The lysates derived from spleen, thymus, BM, and LN from both control and γ-parvin-deficient mice were immunoblotted with anti-parvin, ILK, and PINCH1 antibodies. (B) BM-derived macrophages and DCs from both control and γ-parvin-deficient mice were immunoblotted with antiparvin, anti-ILK, and anti-PINCH1 antibodies. (C) B220-, CD4-, and CD8-positive cells were sorted from adult splenic single cells and analyzed by RT-PCR for β-parvin mRNA. HPRT1 was used as a control. (D) B220- and CD3-positive cells were sorted from adult splenic single cells and analyzed by Western blotting with anti-γ-parvin, -ILK, and -PINCH1 antibodies. BM, bone marrow; LN, lymph nodes; Mac, macrophages; DC, dendritic cells.

beled with different fluorescent dyes, mixed at a 1:1 ratio, and injected into the footpads of wild-type mice. Histological examination of the draining LNs 24 and 48 h after injection revealed that both γ-parvin-null and control DCs migrated into the T-cell cortex where they located in the same areas (Fig. 5D and data not shown). For quantification, LN suspensions were analyzed by flow cytometry revealing no significant differences between knockout and control cells. These data indicate that myelopoiesis, terminal maturation, and migration of DCs are unaltered in the absence of γ-parvin.

It has been shown that deletion of ILK in a macrophage cell line resulted in increased apoptosis due to decreased levels of PKB/Akt phosphorylation (29). To test whether this effect could be due to the absence of the ILK-PINCH-γ-parvin complex, we differentiated primary macrophages from BM precursor cells in vitro and stained for annexin V to determine the percentage of apoptotic cells in the cultures. Our data showed that γ-parvin-null BM precursors could differentiate into macrophages, as well as heterozygous control cells, and both purities were more than 98% (FACS data not shown). No difference in apoptosis could be observed between γ-parvin-null and heterozygous control cells (data not shown and Fig. 5E).

Loss of γ-parvin is not compensated by an upregulation of α- or β-parvin expression. It is possible that the lack of an obvious phenotype in the hematopoietic organs and in T and B cells, and DCs of mutant mice is due to compensation by other parvin family members. To test this hypothesis, we determined the expression of all parvins in hematopoietic organs and myeloid and lymphoid lineages. The level of the β-parvin(l) isoform (that is detected by our antibody) was unchanged in the γ-parvin-deficient BM, thymus, spleen, and LN (Fig. 6A), as well as in macrophages and DCs (Fig. 6B). To exclude expression of the shorter isoforms in T and B cells, we performed RT-PCR and found that β-parvin mRNA was not detectable in both control and γ-parvin-deficient cells (Fig. 6C), indicating that also the smaller isoforms are not compensating for the loss of γ-parvin. The level of α-parvin protein was neither increased in lysates from mutant thymus nor mutant LN nor spleen (Fig. 6A), and undetectable in γ-parvin-deficient, as well as wild-type BM, DCs, and macrophages (Fig. 6B).

Next we tested whether the absence of γ-parvin had an impact on the ternary protein complex with ILK and PINCH1. Western blot analyzes showed that ILK and PINCH1 proteins were reduced in the γ-parvin-deficient BM, thymus, spleen, and LN (Fig. 6A), as well as in γ-parvin-deficient macrophages and DCs (Fig. 6B). In B and T lymphocytes, ILK protein was also reduced, while PINCH1 was undetectable in B and T cells in the absence of γ-parvin (Fig. 6D).

DISCUSSION

In the present study we report the hematopoietic expression pattern of the parvin family members, show that γ-parvin can form a ternary complex with ILK and PINCH1, and describe the first analysis of γ-parvin-deficient mice.

To determine the expression of the individual parvin members in hematopoietic organs and cells, we used peptides to generate highly specific antibodies against α-, β-, and γ-parvin. Western analysis with these antibodies showed that γ-parvin was the only parvin family member that was expressed in all hematopoietic organs and cells tested. γ-Parvin is highly expressed in B and T lymphocytes, DCs, and, to a lesser extent, in macrophages. β-Parvin was expressed in all hematopoietic organs, in myeloid cells but not in lymphocytes. Finally, our Western blot studies showed that α-parvin was present in whole organ lysates derived from spleen, thymus and LN but absent in splenic single cells, BM-derived cells, and myeloid (DCs and macrophages) and lymphoid cells (T and B lymphocytes). These findings suggest that α-parvin is likely expressed in stromal and/or endothelial cells of hematopoietic organs and may have, if at all, a rather indirect role on the development and function of hematopoietic cells.

It has been shown in several studies that α- and β-parvins localize to focal adhesion sites and tensin-rich fibrillar adhesions (11, 23, 31, 34). A central player for recruiting α- and β-parvin to focal adhesions is ILK, which binds with its kinase domain to the second calponin homology domain of the α- or β-parvins and with its N-terminal ankyrin repeat to the LIM only protein PINCH (30, 31, 34). The ternary protein complex of ILK, PINCH, and α- or β-parvin forms prior to cell adhesion and is anchored through ILK to the cytoplasmic domain of the β1 integrin upon adhesion (33, 34, 39, 40). γ-Parvin shares approximately 40% identity and 60% similarity with the paralogous α- and β-parvins, and it was not known whether γ-parvin is also capable of binding ILK and forming a complex with PINCH. To resolve this question, we performed coimmunoprecipitation experiments with lysates from DCs, which express high levels of ILK, PINCH1, and γ-parvin. The results revealed that immunoprecipitation of γ-parvin efficiently pulled down ILK and PINCH1, indicating that γ-parvin can, like the other parvins, form and stabilize a ternary complex with ILK and PINCH1.

The specific expression of γ-parvin in hematopoietic cells suggests a potential role in hematopoiesis and/or the immune response. Furthermore, the ability to associate with ILK and PINCH1 makes γ-parvin and the entire ternary protein complex a candidate for transducing β1 and β3 integrin functions in hematopoietic cells. β1 integrins are expressed on almost all hematopoietic cells and perform functions during the embryonic and adult hematopoiesis. During embryogenesis β1 integrins control trafficking of embryonic and extra-embryonic hematopoietic stem cells into the fetal liver (13, 24) and induce the formation of PPs by enabling the interaction of a unique subset of hematopoietic cells that is expressing CD4 and lacking CD3 with stromal cells in the gut (4). Postnatally, β1 integrins are essential for the homing of adult hematopoietic stem cells into the BM and the regulation of the T-cell-dependent antibody response (1, 2, 24). β3 integrins have an essential role for platelet aggregation (14) and play a more subtle role during monocyte migration (32). The role of ILK and PINCH1 in blood cells is less well studied. In one report it has been demonstrated that ILK plays an important role for monocyte/macrophage survival by regulating the activation of PKB/Akt (29), and another study suggested that ILK may regulate transendothelial migration of monocytes (5). To test whether γ-parvin contributes, at least in part, to the transduction of the β1 and/or β3 integrin function(s) in the hematopoietic system, we disrupted the γ-parvin gene in mice. Surprisingly, the γ-parvin-deficient mice were born at the expected Mendelian distribution, were fertile, and displayed no obvious phenotype. Moreover, the cell numbers and the proportion of different myeloid and lymphoid cells in BM, thymus, spleen, LN, and PP were normal in mice lacking γ-parvin expression. Similarly, differentiation of BM precursors to macrophages occurred normally and without signs of increased apoptosis. This indicates that γ-parvin has no rate-limiting function for the homing of hematopoietic stem cells during development, as well as for their potential to give rise to the different blood cell lineages. Furthermore, the recirculation through lymphatic organs is also normal in the absence of γ-parvin. Finally, functional assays such as T-cell-dependent antibody response and the in vivo migration of BM-derived DCs to LN are also independent of the expression of γ-parvin.

An explanation for the lack of phenotype in γ-parvin-deficient mice is compensation or redundancy by other parvin family members. Although this could explain the normal migration of DCs and the absence of apoptosis in macrophages, which both express in addition to γ-parvin significant levels of β-parvin, it does not explain the normal T-cell-dependent antibody response, since both T and B cells express γ-parvin only and neither upregulate α- nor β-parvin expression in the absence of γ-parvin. In line with previous studies on the stability of the ILK/PINCH/parvin complex, the loss of γ-parvin expression reduced the levels of ILK and PINCH in T cells (33). Interestingly, the reduction of ILK and PINCH1 in γ-parvin-deficient T and B cells suggests that the ILK/PINCH1/γ-parvin complex plays most likely a more subtle role for regulating the T-cell-dependent antibody response and that β1 integrins use another signaling complex to fulfill this task. Such functions can be tested by deleting individual members of the ILK/PINCH/parvin complex specifically in T cells using the Cre/loxP system.

In summary, our study shows that mouse development and postnatal aging can proceed normally when the γ-parvin gene is disrupted. Although the γ-parvin gene seems to be dispensable in vivo, we cannot rule out that γ-parvin serves specific tasks that we have not been investigated here. It is also possible that there is a certain degree of compensation between γ-parvin and β-parvin. This possibility will be difficult to analyze, since the γ-parvin and β-parvin genes are separated by only

around 12 kb and the generation of compound mutant mice is only possible by targeting both genes in the same ES cell line.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Claudia Uthoff-Hachenberg for the help with ELISA and Kyle Legate and Ralf Paus for careful reading of the manuscript.

This study was supported by the DFG (SFB413), the Fonds der Chemischen Industrie, and the Max Planck Society.

REFERENCES

1. **Brakebusch, C., and R. Fässler.** 2003. The integrin-actin connection, an eternal love affair. EMBO J. **22:**2324–2333.
2. **Brakebusch, C., S. Fillatreau, A. J. Potocnik, G. Bungartz, P. Wilhelm, M. Svensson, P. Kearney, H. Korner, D. Gray, and R. Fässler.** 2002. β1 integrin is not essential for hematopoiesis but is necessary for the T cell-dependent IgM antibody response. Immunity **16:**465–477.
3. **Fässler, R., M. Pfaff, J. Murphy, A. A. Noegel, S. Johansson, R. Timpl, and R. Albrecht.** 1995. Lack of β1 integrin gene in embryonic stem cells affects morphology, adhesion, and migration but not integration into the inner cell mass of blastocysts. J. Cell Biol. **128:**979–988.
4. **Finke, D., H. Acha-Orbea, A. Mattis, M. Lipp, and J. Kraehenbuhl.** 2002. $CD4^+$ $CD3^-$ cells induce Peyer's patch development: role of alpha4beta1 integrin activation by CXCR5. Immunity **17:**363–373.
5. **Friedrich, E. B., S. Sinha, L. Li, S. Dedhar, T. Force, A. Rosenzweig, and R. E. Gerszten.** 2002. Role of integrin-linked kinase in leukocyte recruitment. J. Biol. Chem. **277:**16371–16375.
6. **Fukuda, T., L. Guo, X. Shi, and C. Wu.** 2003. CH-ILKBP regulates cell survival by facilitating the membrane translocation of protein kinase B/Akt. J. Cell Biol. **160:**1001–1008.
7. **Fukuda, T., K. Chen, X. Shi, and C. Wu.** 2003. PINCH-1 is an obligate partner of integrin-linked kinase (ILK) functioning in cell shape modulation, motility, and survival. J. Biol. Chem. **278:**51324–51333.
8. **Geiger, B., A. Bershadsky, R. Pankov, and K. M. Yamada.** 2001. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. **2:**793–805.
9. **Grashoff, C., I. Thievessen, K. Lorenz, S. Ussar, and R. Fässler.** 2004. Integrin-linked kinase: integrin's mysterious partner. Curr. Opin. Cell Biol. **16:**565–571.
10. **Gray, D., P. Dullforce, and S. Jainandunsing.** 1994. Memory B-cell development but not germinal center formation is impaired by in vivo blockade of CD40-CD40 ligand interaction. J. Exp. Med. **180:**141–155.
11. **Guo, L., and C. Wu.** 2002. Regulation of fibronectin matrix deposition and cell proliferation by the PINCH-ILK-CH-ILKBP complex. FASEB J. **16:** 1298–1300.
12. **Guo, W., and F. G. Giancotti.** 2004. Integrin signalling during tumour progression. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. **5:**816–826.
13. **Hirsch, E., A. Iglesias, A. J. Potocnik, U. Hartmann, and R. Fässler.** 1996. Impaired migration but not differentiation of hematopoietic stem cells in the absence of β1 integrins. Nature **380:**171–175.
14. **Hodiva-Dilke, K. M., K. P. McHugh, D. A. Tsakiris, H. Rayburn, D. Crowley, M. Ullman-Cullere, F. P. Ross, B. S. Coller, S. Teitelbaum, and R. O. Hynes.** 1999. β3-Integrin-deficient mice are a model for Glanzmann thrombasthenia showing placental defects and reduced survival. J. Clin. Investig. **103:**229–238.
15. **Hynes, R. O.** 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. Cell **110:**673–687.
16. **Korenbaum, E., T. M. Olski, and A. A. Noegel.** 2001. Genomic organization and expression profile of the parvin family of focal adhesion proteins in mice and humans. Gene **279:**69–79.
17. **Lee, J. W., and R. Juliano.** 2004. Mitogenic signal transduction by integrin- and growth factor receptor-mediated pathways. Mol. Cells **17:**188–202.
18. **Li, S., R. Bordoy, F. Stanchi, M. Moser, A. Braun, O. Kudlacek, U. M. Wewer, P. D. Yurchenco, and R. Fässler.** 2005. PINCH1 regulates cell-matrix and cell-cell adhesions, cell polarity and cell survival during the peri-implantation stage. J. Cell Sci. **118:**2913–2921.
19. **Lin, X., H. Qadota, D. G. Moerman, and B. D. Williams.** 2003. *Caenorhabditis elegans* PAT-6/actopaxin plays a critical role in the assembly of integrin adhesion complexes in vivo. Curr. Biol. **13:**922–932.
20. **Lutz, M. B., N. Kukutsch, A. L. Ogilvie, S. Rossner, F. Koch, N. Romani, and G. Schuler.** 1999. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. J. Immun. Methods **223:**77–92.
21. **Mishima, W., A. Suzuki, S. Yamaji, R. Yoshimi, A. Ueda, T. Kaneko, J. Tanaka, Y. Miwa, S. Ohno, and Y. Ishigatsubo.** 2004. The first CH domain of affixin activates Cdc42 and Rac1 through αPIX, a Cdc42/Rac1-specific guanine nucleotide exchanging factor. Genes Cells **9:**193–204.
22. **Nikolopoulos, S. N., and C. E. Turner.** 2000. Actopaxin, a new focal adhesion protein that binds paxillin LD motifs and actin and regulates cell adhesion. J. Cell Biol. **151:**1435–1448.
23. **Olski, T. M., A. A. Noegel, and E. Korenbaum.** 2001. Parvin, a 42 kDa focal adhesion protein, related to the α-actinin superfamily J. Cell Sci. **114:**525–538.
24. **Potocnik, A. J., C. Brakebusch, and R. Fässler.** 2000. Fetal and adult hematopoietic stem cells require β1 integrin function for colonizing fetal liver, spleen, and bone marrow. Immunity **12:**653–663.
25. **Rosenberger, G., I. Jantke, A. Gal, and K. Kutsche.** 2003. Interaction of alphaPIX (ARHGEF6) with beta-parvin (PARVB) suggests an involvement of alphaPIX in integrin-mediated signaling. Hum. Mol. Genet. **12:**155–167.
26. **Rutherford, M. S., and L. B. Schook.** 1992. Differential immunocompetence of macrophages derived using macrophage or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. J. Leukoc. Biol. **51:**69–76.
27. **Sakai, T., S. Li, D. Docheva, C. Grashoff, K. Sakai, K. Kostka, A. Braun, A. Pfeifer, P. D. Yurchenco, and R. Fässler.** 2003. Integrin-linked kinase (ILK) is required for polarizing the epiblast, cell adhesion, and controlling actin accumulation. Genes Dev. **17:**926–940.
28. **Sorokin, L., A. Sonnenberg, M. Aumailley, R. Timpl, and P. Ekblom.** 1990. Recognition of the laminin E8 cell-binding site by an integrin possessing the alpha 6 subunit is essential for epithelial polarization in developing kidney tubules. J. Cell Biol. **111:**1265–1273.
29. **Troussard, A. A., N. M. Mawji, C. Ong, A. Mui, R. St. Arnaud, and S. Dedhar.** 2003. Conditional knockout of integrin-linked kinase demonstrates an essential role in protein kinase B/Akt activation. J. Biol. Chem. **278:** 22374–22378.
30. **Tu, Y., F. Li, S. Goicoechea, and C. Wu.** 1999. The LIM-only protein PINCH directly interacts with integrin-linked kinase and is recruited to integrin-rich sites in spreading cells. Mol. Cell. Biol. **19:**2425–2434.
31. **Tu, Y., Y. Huang, Y. Zhang, Y. Hua, and C. Wu.** 2001. A new focal adhesion protein that interacts with integrin-linked kinase and regulates cell adhesion and spreading. J. Cell Biol. **153:**585–598.
32. **Weerasinghe, D., K. P. McHugh, F. P. Ross, E. J. Brown, R. H. Gisler, and B. A. Imhof.** 1998. A role for the αvβ3 integrin in the transmigration of monocytes. J. Cell Biol. **142:**595–607.
33. **Wu, C.** 2004. The PINCH-ILK-parvin complexes: assembly, functions, and regulation. Biochim. Biophys. Acta **1692:**55–62.
34. **Yamaji, S., A. Suzuki, Y. Sugiyama, Y. Koide, M. Yoshida, H. Kanamori, H. Mohri, S. Ohno, and Y. Ishigatsubo.** 2001. A novel integrin-linked kinase-binding protein, affixin, is involved in the early stage of cell-substrate interaction. J. Cell Biol. **153:**1251–1264.
35. **Yamaji, S., A. Suzuki, H. Kanamori, W. Mishima, R. Yoshimi, H. Takasaki, M. Takabayashi, K. Fujimaki, S. Fujisawa, S. Ohno, and Y. Ishigatsubo.** 2004. Affixin interacts with α-actinin and mediates integrin signaling for reorganization of F-actin induced by initial cell-substrate interaction. J. Cell Biol. **165:**539–551.
36. **Yang, Y., L. Guo, S. M. Blattner, P. Mundel, M. Kretzler, and C. Wu.** 2005. Formation and phosphorylation of the PINCH-1-integrin linked kinase–α-parvin complex are important for regulation of renal glomerular podocyte adhesion, architecture, and survival. J. Am. Soc. Nephrol. **16:**1966–1976.
37. **Zhang, Y., K. Chen, L. Guo, and C. Wu.** 2002. Characterization of PINCH-2, a new focal adhesion protein that regulates the PINCH-1-ILK interaction, cell spreading, and migration. J. Biol. Chem. **277:**38328–38338.
38. **Zhang, Y., L. Guo, K. Chen, and C. Wu.** 2002. A critical role of the PINCH-integrin-linked kinase interaction in the regulation of cell shape change and migration. J. Biol. Chem. **277:**318–326.
39. **Zhang, Y., K. Chen, Y. Tu, A. Velyvis, Y. Yang, J. Qin, and C. Wu.** 2002. Assembly of the PINCH-ILK-CH-ILKBP complex precedes and is essential for localization of each component to cell-matrix adhesion sites. J. Cell Sci. **115:**4777–4786.
40. **Zhang, Y., K. Chen, Y. Tu, and C. Wu.** 2004. Distinct roles of two structurally closely related focal adhesion proteins, α-parvins and β-parvins, in regulation of cell morphology and survival. J. Biol. Chem. **279:**41695–41705.

Integrin-linked kinase stabilizes myotendinous junctions and protects muscle from stress-induced damage

Ling-Wei Chang[1], Hao-Ven Wang[1], Klara Brixius[2], Eloi Montanez[1], Ingo Thievessen[1], Wilhelm Bloch[2], Ulrich Müller[3], Ulrike Mayer[4], Reinhard Fässler[1*]

[1]Max Planck Institute of Biochemistry, Department of Molecular Medicine, 82152 Martinsried, Germany; [2]Department of Molecular and Cellular Sport Medicine, 50933 Cologne, Germany; [3]Biomedical Research Centre, School of Biological Sciences, University of East Anglia, Norwich, NR14 7TJ, UK; [4]The Scripps Research Institute, Department of Cell Biology, 10550 North Torrey Pines Road, ICND 222, La Jolla, CA 92037.

[*]Corresponding author:
Faessler@biochem.mpg.de

Abstract

Integrin-linked kinase (ILK) is a central component of cell-matrix adhesions, where it links integrins to the actin cytoskeleton and is thought to mediate cell survival signaling via phosphorylation of PKB/Akt. In skeletal muscle, ILK is located at myotendinous junctions (MTJs) and costameres.

Here we show, that mice with skeletal muscle restricted deletion of ILK develop a mild, but progressive muscular dystrophy characterized by disruption of MTJs. Ultrastructural analysis revealed, that detachment of the BM at MTJ-interdigitations caused the disruption. Forced treadmilling led to a disturbed subsarcolemmal myofiber architecture close to costameres, whereas terminal actin-detachment from MTJs was apparently not affected.

In addition, impaired IGF-1R-activation accompanied the reduced induction of S473/T308-phosphorylation of PKB/Akt after training indicating that ILK mediates PKB/Akt-activation via integrin cross-activation of IGF-1R .

These data suggest, that ILK mechanically links sarcomeres to the muscle cell membrane at MTJs and identify ILK as important mediator of integrin-dependent IGF-1R- and PKB/Akt-activation during mechanical stress.

Introduction

Mammalian adult skeletal muscle is derived from progenitor cells that originate in somites. After somites develop into dermomyotomes and sclerotomes, the myoblast progenitors delaminate from the dermomyotome and migrate to the periphery, where they express myogenic determination genes and extensively proliferate before they become postmitotic and fuse into elongated syncytia called primary myofibers. At the time when the myofibers become innervated, a second wave of myoblast proliferation resumes, which gives rise to a population of secondary myofibers. Both types of myofibers form a typical cytoarchitecture by organizing sarcomeres into stacks called myofibrils, which - depending on the expression of the myosin isoform - exert fast or slow contractions.

Extensive research over the last decades has identified essential roles for β1 integrins during myogenesis. Integrins are α/β heterodimeres. The β1 subunit can associate with 12 α subunits to form 12 integrins with distinct expression pattern, binding properties and function (Hynes, 2002; Bouvard et al., 2001). Almost all these integrins are expressed either constitutively or during specific time points during myogenesis (Mayer, 2003). Antibody perturbation studies and β1 integrin gene ablations in flies and mice demonstrated that β1 integrins play important roles for the proliferation and fusion of myoblasts, and the assembly and maintenance of sarcomeres (Menko and Boettiger, 1987; Volk et al., 1990; Sastry et al., 1996; Hirsch et al., 1998; Schwander et al., 2003). The α7β1 and, to a lesser extent, the α5β1 integrins are expressed at the myotendinous junctions (MTJs) where they implement and maintain the linkage of the myofiber to the tendon matrix (Mayer et al., 1997; Taverna et al., 1998; Mayer, 2003). An important and still largely unanswered question is how integrins execute their functions in myoblasts and adult skeletal muscle. Integrin cytoplasmic domains lack actin binding sites and enzymatic activities. Therefore, integrin signals are transduced through accessory molecules such as talin, α-actinin, and integrin-linked kinase (ILK) (Brakebusch and Fässler, 2003).

ILK is composed of ankyrin repeats at the N-terminus, a pleckstrin homology (PH)-like domain and a putative kinase domain at the C-terminus, which binds the cytoplasmic tail of β1 and β3 integrins (Hannigan et al, 1996; Grashoff et al, 2004, Legate et al, 2006). A major function of ILK is to organize the actin cytoskeleton by recruiting actin-binding and actin-regulatory proteins such as PINCH, parvin, paxillin and Kindlin (Zervas et al, 2001; Mackinnon et al, 2002; Sakai et al, 2003; Grashoff et al, 2003). Additionally, ILK was shown to phosphorylate several proteins including GSK-3β and PKB/Akt (Delcommenne et al, 1998; Novak et al, 1998; Persad et al, 2000).

ILK is ubiquitously expressed and essential for the development of vertebrates and invertebrates. Mice lacking ILK die during the peri-implantation stage due to abnormal F-actin reorganisation and polarity of the epiblast (Sakai et al., 2003). In *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* the deletion of ILK leads to muscle detachment resembling the β integrin loss-of-function phenotype (Zervas et al., 2000; Mackinnon et al., 2002). Interestingly,

the severe phenotypes both in flies and nematodes can be fully rescued with kinase-dead versions of ILK suggesting that in invertebrates the kinase activity is dispensable for development and physiology (Zervas et al., 2000; Mackinnon et al., 2002).

Similarly like in flies and nematodes the expression of ILK in mammalian myofibers and myoblasts is very high. In myofibers ILK is found at costameres, focal adhesion (FA) like structures that connect the sarcomeric Z-bands with the sarcolemma. The costameric location makes ILK perfectly suited to transduce contractile forces from the sarcomeres across the sarcolemma to the extracellular matrix. Recently, the involvement of ILK in mechanotransduction was impressively documented in mice and zebrafish lacking ILK-function in cardiomyocytes (White et al., 2006; Bendig et al., 2006). Defects such as heart-dilation, fibrosis, disaggregation of cardiomyocytes and reduced PKB/Akt-phospohrylation suggest important functions of ILK in cardiomyocytes. Since the defects appear after onset of heart-beating, contractile forces are likely to be involved. Such force related functions of ILK in the heart could also be relevant in skeletal muscle.

ILK-functions in myoblasts are not entirely clear. Overexpression of ILK in C2C12 myoblasts was shown to inhibit myoblast fusion by sustained p44/42 MAP-kinase activation, thus preventing cell cycle exit and myogenic determination (Huang et al., 2000). However, ILK overexpression in L6 myoblasts was shown to promote fusion and myogenin expression (Miller et al., 2003). Deletion studies are not reported yet.

To test ILK functions in skeletal muscle of mice we conditionally ablated the ILK gene by cre-recombinase expression under the human skeletal α-actin (HSA) promoter in floxed ILK mice. We show that ILK is required for maintaining MTJs, as HSAcre-ILK mice develop a mild, progessive muscle dystrophy restricted to MTJ areas. BM detachment at the base of MTJ interdigitations, increased expression of ECM-proteins and infiltration of inflammatory cells are accompanied by changes in α7β1 and α5β1 integrin. MTJ disruption increases dramatically with enhanced mechanical load. Myoblast fusion and sarcomere assembly occurred normally in the absence ILK. These data demonstrate functions of ILK in mechanical force transduction at MTJs and cross-activation of IGF-1R required for PKB/Akt-activation in skeletal muscle.

Material and Methods

Mouse strains

To obtain mice with a skeletal muscle-restricted deletion of the *ILK* gene, floxed *ILK* mice (Grashoff *et al.*, 2003) were crossed with transgenic mice expressing the *Cre* gene under the control of the human skeletal α-actin (HSA) promoter (Schwander *et al.*, 2003). Offspring were genotyped by PCR or Southern blot assays (Grashoff *et al.*, 2003; Sakai *et al.* 2003). The degree of *Cre*-mediated recombination of the *ILK* gene was determined by Southern blot assays, in which genomic DNA derived from muscle biopsies was digested with *Bgl* II and hybridization with a genomic probe binding to the promoter region of the *ILK* gene. The sizes of control and floxed bands are 4.5 kb and the *Cre*-deleted band is 3.5 kb. All animals were bred, fed ad libitum and housed according to the guidelines of the Society of Laboratory Animal Science.

Western Blotting

Muscle tissue was homogenized in modified RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH7.4, 150 mM NaCl, 5mM EDTA, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 1% deoxycholate) and protease inhibitors (Roche). Equal amounts of total protein (20 μg) per lane were separated by SDS-PAGE under reducing condition and transferred to PVDF membranes (Millipore). Immunoblots were developed using the ECL detection system (Amersham).

Antibodies

All antibodies have been described previously (Sakai *et al.*, 2003; Nawrotzki *et al.*, 2003; Stanchi *et al.*, 2005; Chu *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2006) except mouse anti-GAPDH (Chemicon), mouse anti-sarcomeric α-actinin (Sigma), rabbit anti-Ki67 (Novocastra), rabbit anti-caveolin3 (Abcam) and rabbit anti-fibronectin (Chemicon).

Histological analysis and immunohistochemistry

Mice were sacrificed and the hindlimbs of embryos or newborn mice, or different groups of muscles from adult mice were excised and either frozen in liquid nitrogen-cooled isopentane or embedded in paraffin. Transverse sections (8 μm) were cut and collected onto SuperFrost®Plus (Menzel-Gläser) slides.

Muscle diameter were determined on haematoxylin and eosin (H&E) stained paraffin sections using ImageJ Version 1.33 from NIH (free shareware, http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html). The diameter of cross-sectioned muscle fibers was defined as the smallest distance vertical to the longest distance of the muscle cell.

Cryosections were air dried then fixed with either acetone for 10 min at -20°C or 10 min with 1% paraformaldehyde (PFA) in phosphate buffered saline (PBS) at RT followed by 8 min in methanol at -20°C. After blocking with 5% normal goat serum (NGS)/1% BSA/0.1% Tween-20

in PBS for 1 h at 37°C, sections were incubated with appropriate primary antibodies in PBS supplemented with 2% NGS/0.1% Tween-20 overnight at 4°C. After incubation with respective Cy3- or FITC-conjugated secondary antibodies, sections were analyzed with a Leica confocal microscope.

Electron Microscopy

Small muscle biopsies were fixed in 4% buffered PFA, rinsed in cacodylate buffer three times and then treated with 1% uranyl acetate in 70% ethanol for 8h to enhance the contrast. The biopsies were subsequently dehydrated in a graded series of ethanol and then embedded in Araldite (Serva). Semithin sections (500µm) were cut with a glass knife on an ultramicrotome (Reichert, Bensheim, Germany) and stained with methylene blue. Ultrathin sections (30 to 60 nm) for electron microscopic observation were processed on the same microtome with a diamond knife and placed on copper grids. Transmission electron microscopy (TEM) was performed using a 902A electron microscope from Zeiss (Oberkochen, Germany).

Isolation and differentiation of primary myoblasts

Primary myoblasts were isolated as described by Rando and Blau (1997). Briefly, hindlimbs were dissected from 1 to 2-day-old mice and placed in PBS where they were minced with a razor blade. Tissues were enzymatically dissociated with a mixture of collagenase II (0.1%, Worthington, Freehold, NJ) and dispase (grade II, 2.4U/ml, Roche). The slurry, maintained at 37°C for 30-45 min, was triturated every 15 min with a 5-ml plastic pipette. After centrifugation at 350xg for 10 min, the pellet was resuspended in growth medium (20% FCS, 2 mM Glutamin, 1% Pen/Strep with DMEM, all Invitrogen) and preplated into non-coated tissue culture dishes for 20 min for attaching fibroblasts to the dish surface. The non-adherent cell in the supernatant were then transferred into 0.2% gelatine-coated 6-well-plates (about 2 limbs for 1 well). Differentiation was induced with 5% horse serum (Invitrogen) in DMEM for 2-4 days. A myotube was defined as having three or more nuclei.

Endurance Exercise Training

Experiments were performed with 5-mo-old control (7 mice; weight: 27.0±0.7 g) and HSACre-ILK (6 mice; weight: 25.1±0.9 g) mice. The treadmill (Exer3/6, Columbus Instruments, Columbus, USA) endurance training consisted of a 60 min-treadmill exercise five days a week at a velocity of 18 m/min at an angle of 10°. Mice were elicited to run by touching their back with a pencil. Mice were accommodated to the situation for 1 week before starting the experiments. The velocity of 18 m/min was chosen because in these pre-experiments control and HSACre-ILK mice were able to constantly run for 1 hour at this velocity. An angle of 10° was chosen to increase the muscle load during the training. The training was performed for four weeks. At the end of this period, animals were sacrificed, the vastus lateralis muscle and

gastrocnemius muscle were isolated, fixed in a 4% buffered PFA for 6 hours and prepared for ultrastructural analysis. An additional experiment was performed with 9-mo-old control (4 mice) and *HSACre-ILK* (9 mice) under the conditions described above. The local Animal Care Committee approved all experimental procedures.

Results

Skeletal muscle-specific deletion of the *ILK* gene

Since ILK-null ($ILK^{lacZ/lacZ}$) mice die shortly after implantation (Sakai *et al*., 2003) we used the Cre/loxP system to delete the *ILK* gene specifically in skeletal muscle. To obtain mice with the genotype $HSACre^{+}/ILK^{flox/flox}$ (called HSACre-ILK), $ILK^{flox/flox}$ mice (Grashoff *et al*., 2003) were intercrossed with a transgenic mouse strain expressing the Cre recombinase under the control of the human skeletal α-actin (HSA) promoter (Schwander *et al*., 2003).

The efficiency of the Cre-mediated deletion of the ILK gene *in vivo* was tested by Southern blotting using genomic DNA and Western blotting using protein extracts from gastrocnemius muscle of 3-month old control and *HSACre-ILK* mice. The Southern blots revealed a recombination efficiency of ≈80% (Fig. 1A) and the Western blots a ≈70% reduction of ILK protein level (Fig. 1B). Similar experiments with muscle tissue from 4-week, 3-month, and 1-year old *HSACre-IL*K mice revealed that the ILK gene deletion and ILK protein reduction remained stable (Fig.1C and data not shown).

It has been reported that the *HSA-Cre* transgene induces DNA recombination as early as embryonic day 9.5 (E9.5; Schwander *et al*., 2003). Despite this early Cre activity we observed robust ILK immunostaining in all hindlimb muscle of E14.5 and E16.5 *HSACre-ILK* embryos (Fig.1D and data not shown). The intensity and the distribution of the ILK immunostaining were similar like in muscle tissue from control mice with a strong signal at the myotendinous junctions (MTJs) and a weaker staining at costameres (Fig. 1D). Perinatally the ILK protein level was reduced by 82% and the ILK immunosignal absent from muscle tissue (Fig.1C). These results suggest that ILK gene is efficiently deleted by the *HSA-Cre* transgene and that the ILK protein has a long half-life in skeletal muscle cell precursors and muscle fibers.

HSACre–ILK mice develop a muscular dystrophy

Intercrosses of $HSAcre^{+}/ILK^{+/-}$ males with $ILK^{fl/fl}$ females revealed a normal Mendelian distribution of the 4 possible genotypes among 231 offspring tested: $HSAcre^{+}/ILK^{fl/-}$: $HSAcre^{+}/ILK^{fl/+}$: $HSAcre^{-}/ILK^{fl/-}$: $HSAcre^{-}/ILK^{fl/+}$= 24.4%: 23.7%: 25.2%: 26.8%. *HSACre-ILK* mice did not show an overt phenotype at birth. They were viable, fertile and showed normal growth rates with normal weight and body length. At 3 weeks of age when control mice began to securely walk *HSACre-ILK* mice still shambled and showed an abnormal walking pattern. To visualize the footprint pattern we painted the front pad of control and *HSACre-ILK* mice with red ink and the hind pad with blue ink and led them walk on blotting paper. *HSACre-ILK* mice had an abnormal footprint pattern (Fig. 2A) with a significantly shorter stride length, and this abnormality was maintained with age (Fig. 2B).

Adult mammalian skeletal muscle is differentiated into distinct fibre types, which are characterized by a unique combination of functional, biochemical, and metabolic properties. To exclude that loss of ILK affected only muscle groups with a specific fiber type we analyzed the

histology of muscle with fast fibers (tibialis anterior muscle), slow fibers (soleus muscle) and a mixture of slow and fast fibers (gastrocnemius muscle) from control and *HSACre-ILK* mice. At all ages analyzed the muscles derived from control mice exhibited myofibers with regular diameter and peripherally located nuclei. In sharp contrast, the muscles analyzed from *HSACre-ILK* mice contained many myofibers with variable diameter and centralized nuclei (Fig. 3). The irregular fiber size with centralized nuclei could be observed as early as 10 days after birth and aggravated with age (Fig. 3 and suppl. Fig. 1). The number of myofibers with central nuclei increased from 11.6±2.9 in 3-mo-old mice to 22.2±5.1 in 12-mo-old mice, while the number in control mice was around 2% at all ages analyzed. Furthermore, we frequently observed myofibers of variable size, loosened intercellular space filled with fibrotic material and mononuclear cell infiltrates, which were particularly prominent at myotendinous junctions (MTJs) and in regions near to tendons (Fig. 3).

The extent of the fibrotic reaction was further tested by immunostaining muscle tissue for fibronectin (FN) and tenascin-C (TN-C). In gastrocnemius muscle from 3-mo-old control mice, FN was observed around myofibers, around small capillaries and at the MTJ (Fig. 4A, C). In *HSACre-ILK* littermates the FN staining intensity was elevated around myofibers (Fig, 4B) and in tendon areas (Fig. 4D). TN-C expression is restricted in normal muscle tissue to MTJs and absent from intramuscular connective tissue (Fig. 4E). In *HSACre-ILK* muscle, however, TN-C staining was sometimes observed in fibrotic regions adjacent to the MTJ and myofibers (Fig. 4F).

Since ILK-deficient MTJs displayed clear abnormalities we further analyzed them at the ultrastructural level. The MTJs from control mice were extensively folded forming digit-like protuberances of regular size and width that were covered with a well structured basement membrane (BM) and extended from the muscle cells into the collagen-rich tendon matrix (Fig. 5A, C). The MTJs of 12-mo-old *HSACre-ILK* mice had less folds, or folds with irregular size and width (Fig. 5B, D). Interestingly, we frequently observed that the BM was detached from the sarcolemma at the base of the digit-like protrusions (Fig. 5D; see arrowhead). Taken together, these results suggest that the deletion of the ILK gene from skeletal muscles leads to a muscular dystrophy characterized by abnormalities at MTJs, degeneration of myofibers and fibrosis.

Loss of ILK alters integrin expression at MTJs

ILK forms a ternary complex with PINCH and parvin (IPP complex), which is important for the stability of the individual components and the recruitment into focal adhesions (FAs; Grashoff *et al*., 2004; Legate *et al.*, 2006). Similarly like reported for other cell types and tissues, HSACre-mediated loss of ILK was associated with reduced PINCH1 and β-parvin levels, which are both highly expressed in skeletal muscle (Fig. 6A). The IPP complex is thought to regulate integrin function and actin re-organisation. Interestingly, however, ultrastructural analysis

revealed no signs of F-actin detachment from the sarcolemma, both at the MTJs as well as in central areas of the muscle tissue (data not shown). This indicates that - differently from flies and nematodes - ILK is not essential for attaching the actin cytoskeleton to the muscle cell membrane.

The predominant integrin of skeletal muscle is the α7β1D integrin. The α7 integrin gene is alternatively spliced producing the α7b splice variant (α7bβ1), which is mainly found at the sarcolemma, and the α7a splice variant (α7aβ1), which is expressed at MTJ (Nawrotzki *et al.*, 2003). Both α7 subunits associate with a splice variant of the β1 integrin subunit called β1D integrin, which is found at the MTJs and costameres (Belkin *et al*., 1996; van der Flier *et al*., 1997). Western blotting and immunostaining revealed strong β1D integrin expression at MTJs and lower expression around myofibers both in control and HSACre-ILK muscle (Fig. 6A and supplementary Fig. 3). Contrary to control muscle, however, the immunosignals of α7aβ1 and α7bβ1 integrins were reduced. The α7a signals at MTJs were almost abolished in *HSACre-ILK* muscle and replaced by α7b and α5 integrins (Fig. 6A, B). The α7b variant, which was found evenly distributed on the sarcolemma of control myofibers, showed an irregular expression on *HSACre-ILK* myofibers (Fig. 6B).

The BM around myofibers is assembled by integrins and the dystrophin-associated protein complex (DPC). Immunostaining revealed normal expression of laminin α2 and β-dystroglycan (suppl. Fig. 3). Taken together, we conclude that ILK deficiency in muscle apparently does not affect F-actin anchorage and BM assembly but alters the integrin expression pattern.

Normal myoblast fusion *in vitro*

Due to the long half-life of the ILK mRNA and/or protein *HSACre-ILK* embryos (Fig. 1D) contained still significant ILK in skeletal muscle tissue around the time of myoblast migration and fusion. Therefore, we isolated primary myoblasts from hindlimbs of 2-day old control and *HSACre-ILK* mice and compared their ability to form myotubes *in vitro*. Western blotting of freshly isolated myoblasts revealed faint ILK expression, which was likely due to contaminating fibroblasts (Fig. 7A). The PINCH1 levels decreased concomitantly with ILK, while the levels of integrin β1D, phosphorylated Erk1/Erk2 and phosphorylated PKB/Akt were similar between control and *HSACre-ILK* myoblasts (Fig. 7A). The primary myoblasts were cultured and induced to form myotubes. The results showed that *HSACre-ILK* myoblasts were able to efficiently form multinucleated myotubes after induction of differentiation (Fig. 7B, C). Neither the number of myotubes nor the kinetic of their formation differed between the cultures with control and HSACre-ILK myoblasts (Fig. 7C). These data indicate that ILK plays no obvious role for myoblast proliferation, differentiation and fusion into multinucleated myotubes.

Abnormal mechanical stress response

To test how mechanical stress affects the integrity of skeletal muscles in *HSACre-ILK* mice, we subjected 5-mo-old control and HSACre-ILK mice, respectively, to a daily treadmill exercise with an upward inclination of 10° at 18 m/min for 60 min, 5 days per week. In the first 3 weeks both control and *HSACre-ILK* mice maintained the required speed of 18m/min at 10° inclination during the whole training sessions. Since *HSACre-ILK* mice were unable to run at this speed without breaks after the 3-w training period we terminated the treadmill exercise and analyzed the muscle tissue.

The weight of the musculus gastrocnemius did not significantly differ between control and HSACre-ILK mice after exercise (control mice: 119.14 ± 20.32 mg; *HSACre-ILK* mice: 141.33 ± 34.05 mg). Despite the normal muscle weight we observed profound abnormalities in MTJs and sarcomeres of *HSACre-ILK* muscles at the ultrastructural level. While control mice had normal MTJs after the exercise program (Fig. 8A, C,) the MTJs from HSACre-ILK mice almost completely lost their digit-like interdigitations and instead formed irregular membrane protrusions and invaginations (Fig. 8B, D). Concomitantly with these defects the BM became also much more detached from the sarcolemma (Fig. 8D) than in untrained muscle (Fig. 5D). Furthermore, in some areas the BM was replaced by an electron dense material (Fig. 8D). However, the anchorage of actin filaments at the MTJ was not visibly affected (data not shown). The sarcomeres of control mice displayed the typical metameric structure throughout the whole muscle fiber, both before as well as after training (Fig. 8E, G). *HSACre-ILK* muscle displayed also normal sarcomeres before the training experiments (Fig. 8F). After training, however, the sarcomeric structure repeatedly became completely disrupted in the subsarcolemmal myofibrils but was retained in the central areas of the muscle fibers (Fig. 8F, H).

We also performed training experiments 9-mo-old mice, which revealed that only 1 out of 6 *HSACre-ILK* mice was able to run at a speed of 18m/min while control mice managed the exercise at this speed with ease. This finding suggests that the HSACre-ILK mice show an age-dependent decline in their running capacity, which made it impossible to perform a training intervention comparable to the 5-month old mice.

These data demonstrate that ILK-deficient skeletal muscle is highly susceptible to mechanical stress and that ILK is important for the transduction of mechanical forces at costameres.

ILK modulates IGF signalling

Regeneration of skeletal muscle critically depends on the activation of mTOR kinase by PKB/Akt (Pallafacchina et al., 2002). ILK on the other hand, was shown to phosphorylate Ser437 of PKB/Akt, which together with the phosphorylation of Thr308 is required for full activation of PKB/Akt (ref). To test PKB/Akt activity we isolated muscle tissue and performed Western blotting using phospho-specific antibodies. Untrained *HSACre-ILK* muscle displayed comparable levels of Ser473 and Thr308 phosphorylation as control muscle (Fig. 9A). Upon

training, however, we observed a significant increase in the phosphorylation of the Ser473 as well as the Thr308 residues of PKB/Akt in control muscle, which was completely absent in muscle tissue derived from *HSACre-ILK* mice (Fig. 9B).

In muscle PKB/Akt can be activated by an intracellular signalling cascade that is triggered through the activation of insulin-like growth factor 1 receptor (IGF-1R) (Mourkioti and Rosenthal, 2005). Therefore, we tested whether IGF-1R levels and/or activation were altered in exercised *HSACre-ILK* muscle. Western blotting of muscle tissue from control mice revealed that the IGF-1R levels were similarly high before and after exercise whereas the phosphorylation of the cytoplasmic tyrosine-nr (pYNR) slightly increased (Fig. 9A, B; n=3/3). While the total IGF-1R protein levels were similar between control and *HSACre-ILK* muscle before the exercise (n=3) the IGF-1R protein levels significantly dropped in the *HSACre-ILK* muscle after the training experiments (Fig. 9; A: n=3/3; B: n=4/5). Importantly, the levels of phosphorylated IGF-R1 decreased concomitantly with IGF-1R protein levels (Fig. 9C). To exclude transcriptional control of IGF-1R by ILK signals we compared the IGF-R1 mRNA levels in control and *HSACre-ILK* muscle and found that the mRNA levels were not significantly changed by the loss of ILK expression (Fig. 9D; n=3/4). Similarly, the expression of other membrane proteins such as integrins was also unaffected between control and *HSACre-ILK* muscle (supplementary Fig. 3). Altogether these findings indicate that ILK promotes growth factor-dependent muscle regeneration by stabilizing IGF-1R on myofibers.

Discussion

ILK maintains MTJs of untrained muscle

The ILK protein is present at MTJs and costameres of mature myofibers (Huang et al., 2000; and this paper) where it could fulfil two major functions. On one hand, ILK may provide structural stability to both locations by regulating force transduction from sarcomeres to the ECM during contraction. On the other hand, costameres and adhesion plaques at MTJs represent muscle-specific elaborations of FAs, in which ILK could play a crucial signalling role by connecting integrin and growth factor receptor signalling pathways (Moro et al., 1998; Soldi et al., 1999; Schneller et al., 1997, 2002). To test the functional properties of ILK in mammalian myofibers *in vivo*, we disrupted the ILK gene selectively in skeletal muscle of mice using the Cre/loxP system. Surprisingly, loss of ILK resulted in a very mild phenotype characterized by a persistent shamble, which was neither associated with weight loss nor shortened life span. Histological alterations were restricted to the MTJs and included increased expression of ECM proteins (FN and TN-C), infiltration of a few inflammatory cells, detachment of BMs at the base of the interdigitations and reduced $\alpha 7\beta 1$ and increased $\alpha 5\beta 1$ integrin expression. Since we observed normal MAP kinase activation and normal levels of activated PKB/Akt in ILK-deficient muscle it is likely that the muscle damage resulted from increased degeneration rather than diminished regeneration. Furthermore, our findings allow us to draw the important conclusion that ILK is required for the stability of adhesion sites that are exposed to very high mechanical forces such as MTJs and not for the stability of costameres where less force is transmitted.

Ultrastructural analysis revealed that the destabilisation of MTJs is caused by the detachment of the BM indicating that ILK affects ligand binding of integrins. Interestingly, loss-of-function studies of ILK in flies and nematodes revealed a similar phenotype with defects at muscle attachment sites leading to muscle detachment (Zervas et al., 2001; Mackinnon et al., 2002). Contrary to our results, however, flies primarily require ILK to attach the actin cytoskeleton at the plasma membrane and to a lesser extent for integrins to bind ECM. ILK-deficient fly embryos show severe actin-detachment from the tendon matrix, accompanied by filament-aggregation, whereas integrins are still bound to the ECM. Actin-detachment from the sarcolemma was not seen in skeletal muscle, indicating that ILK is not nessecary to link actin-filaments to the sarcolemma at MTJs. However, subtle defects in the actin-membrane linkage cannot be excluded. ILK could mediate actin-attachment, but also reorganize and thereby strengthen the cytoskeleton at MTJs, as F-actin regulatory functions of ILK and its associated proteins have been shown in several studies *in vivo* (Sakai et al., 2003; Grashoff et al., 2003). Nevertheless, these results indicate, that ILK-functions may differ in vertebrate and invertebrate muscle.

Another important finding was an increased expression of α5β1 integrin and a slightly reduced expression of α7β1 integrin at MTJs. This change might be a consequence of increased

regeneration at MTJs of HSAcre-ILK muscle. α5β1 promotes myoblast proliferation and is downregulated during myoblast differentiation (Sastry et al., 1999; Boettiger et al., 1995). Ongoing fusion of $\alpha 5\beta 1$-expressing satellite cells into myotubes could increase the relative amounts of $\alpha 5\beta 1$, which could be stabilized by increased FN-recruitment to the BM and maybe secondarily affect $\alpha 7\beta 1$ integrin expression. In addition, ILK may modulate the switch from embryonic $\alpha 5\beta 1$ to postnatal $\alpha 7\beta 1$ integrin expression.

ILK serves as a mechanical link to sarcomeres

The mild defects upon loss of ILK in skeletal muscle came as a surprise, since ILK-deficiency in the heart of mice and zebrafish was shown to be lethal (White et al., 2006; Bendig et al., 2006). Thus, we challenged the mice, to further analyse ILK-function in mechanical stabilization of MTJs.

Forced treadmilling revealed, that HSAcre-ILK mice, compared to control mice, were only able to take on a restricted load demonstrating that the performance of HSAcre-ILK muscle was severely affected by the mechanical stress. Furthermore, we observed a dramatically increased destabilization of MTJs in HSAcre-ILK muscle compared to resting HSAcre-ILK muscle, with strongly impaired structure of interdigitations and extensive BM detachment. In trained ILK-deficient muscle, treadmilling triggered a severe disruption of subsarcolemmal myofiber, while centrally located myofibrils were not affected. This indicates, that ILK-loss affects the stability of the membrane proximal cytoskeleton, suggesting that in costameres ILK mechanically connects Z-discs with the sarcolemma.

In contrast, the terminal insertion of actin filaments at MTJs was not affected by the training indicating that either ILK is not mechanically linking the terminal sarcomeres to MTJs or that loss of ILK is compensated by the dystrophin-glycoprotein-complex. Favouring compensation by the dystrophin-glycoprotein-complex mdx/$\alpha 7$ integrin$^{-/-}$ double mutant mice develop a more severe muscle dystrophy than dystrophin or $\alpha 7$ integrin single mutants (Rooney et al., 2006). These results indicate an important role of ILK for the mechanical connection of sarcomeres to the muscle cell membrane at MTJs.

ILK is required for PKB/Akt-activation upon mechanical stress

PKB/Akt is crucial for promoting skeletal muscle hypertrophy and preventing atrophy (Bodine et al., 2001; Rommel et al., 2001). Phosphorylation of PKB/Akt was previously shown to be dependent on ILK (Persad et al., 2001). Recently, the requirement of ILK for S473-phosphorylation of PKB/Akt in hearts of mice was demonstrated (White et al., 2006). Therefore we wanted to know, whether ILK similarly regulates PKB/Akt in skeletal muscle.

HSAcre-ILK muscle displayed reduced induction of PKB/Akt-phosphorylation upon training, indicating, that appropriate PKB/Akt-activation upon enhanced mechanical load requires ILK. Reduced PKB/Akt-phosphorylation in trained HSAcre-ILK muscle was not restricted to the

reported ILK-kinase-target S473, but also observed on T308, indicating that the activity of an additional regulator of PKB/Akt, such as PDK-1 was altered in ILK-deficient, trained muscle. The recent identification of mTor as a potent kinase for PKB/Akt S473 suggested, that reduced S473-phosphorylation of PKB/Akt could also be due to impaired mTor-activity in HSAcre-ILK muscle (Jacinto et al., 2006; Shiota et al., 2006). This indicated, that a common upstream regulator of PDK-1, PKB/Akt and mTor could be affected by loss of ILK in skeletal muscle. Since integrins have been shown to cross-activate growthfactor receptors, such as epithelial growth factor, vascular-endothelial growth factor or platelet-derived growth factor, we tested, whether the activation of IGF-1R, which activates PDK-1, PKB/Akt and mTor was impaired in trained HSAcre-ILK muscle (Moro et al., 1998; Soldi et al., 1999; Schneller et al., 1997, 2002; Mourkioti and Rosenthal, 2005). We observed significantly reduced IGF-1R-phosphorylation with normal IGF-1R expression indicating, that activation of IGF-1R at the cell membrane was impaired in mechanically challenged HSAcre-ILK muscle. These results indicate, that ILK may mediate integrin/IGF-1R-crosstalk in muscle to facilitate PKB/Akt-activation and myoprotective signaling under mechanical stress.

ILK is not required for myoblast fusion and sarcomere assembly

β1 integrins have important functions in myoblast fusion and sarcomere assembly, where they recruit costamere components such as talin and vinculin (Schwander et al., 2003). Proper recruitment of ILK into nascent dense-bodies and M-lines is crucial in *C. elegans* myogenesis (Mackinnon et al., 2002). However, overexpression of ILK in mammalian muscle cell lines demonstrated stimulating as well as inihibitory function of ILK in myoblast fusion and myogenic differentiation (Huang et al., 2000; Miller et al., 2003).

In contrary to these reports, we found that primary ILK-deficient myoblasts derived from mutant newborn mice exhibit normal fusion and sarcomere assembly indicating that ILK plays no essential role in myogenic differentiation. Although subtle functions of ILK cannot be excluded, β1 integrin functions in myoblast fusion and sarcomere assembly seem to be primarily mediated by other interactors.

References

Bao ZZ, Lakonishok M, Kaufman S, Horwitz AF. 1993. Alpha 7 beta 1 integrin is a component of the myotendinous junction on skeletal muscle. *J.Cell Sci.* 106: 579-589.

Bendig G, Grimmler M, Huttner IG, Wessels G, Dahme T, Just S, Trano N, Katus HA, Fishman MC, Rottbauer W. 2006. Integrin-linked kinase, a novel component of the cardiac mechanical stretch sensor, controls contractility in the zebrafish heart. *Genes Dev.* 20:2361-72.

Boettiger D, Enomoto-Iwamoto M, Yoon HY, Hofer U, Menko AS, Chiquet-Ehrismann R. 1995. Regulation of integrin alpha 5 beta 1 affinity during myogenic differentiation. Dev Biol.169:261-72.

Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, Zlotchenko E, Scrimgeour A, Lawrence JC, Glass DJ, Yancopoulos GD. 2001. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. Nat Cell Biol. 3:1014-9.

Bouvard D, Brakebusch C, Gustafsson E, Aszodi A, Bengtsson T, Berna A, Fässler R. 2001. Functional consequences of integrin gene mutations in mice. *Circ Res.* 89:211-23.

Brakebusch C, Fässler R. 2003. The integrin-actin connection, an eternal love affair. *EMBO J.* 22:2324-33.

Chu H, Thievessen I, Sixt M, Lammermann T, Waisman A, Braun A, Noegel AA, Fässler R. 2006. gamma-Parvin is dispensable for hematopoiesis, leukocyte trafficking, and T-cell-dependent antibody response. *Mol Cell Biol.* 26:1817-25.

Delcommenne M, Tan C, Gray V, Rue L, Woodgett J, Dedhar S. 1998. Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 95:11211-6.

Fukuda T, Guo L, Shi X, Wu C. 2000. CH-ILKBP regulates cell survival by facilitating the membrane translocation of protein kinase B/Akt. *J Cell Biol.* 160:1001-8.

Fukuda T, Chen K, Shi X, Wu C. 2003. PINCH-1 is an obligate partner of integrin-linked kinase (ILK) functioning in cell shape modulation, motility, and survival. *J Biol Chem.* 278:51324-33.

Grashoff C, Aszodi A, Sakai T, Hunziker EB, Fässler R. 2003. Integrin-linked kinase regulates chondrocyte shape and proliferation. *EMBO Rep.* 4:432-8.

Grashoff C, Thievessen I, Lorenz K, Ussar S, Fässler R. 2004. Integrin-linked kinase: integrin's mysterious partner. *Curr Opin Cell Biol.* 16:565-71.

Guo C, Willem M, Werner A, Raivich G, Emerson M, Neyses L, Mayer U. 2006. Absence of alpha7 integrin in dystrophin-deficient mice causes a myopathy similar to Duchenne muscular dystrophy. *Hum Mol Genet.* 15:989-98.

Hannigan GE, Leung-Hagesteijn C, Fitz-Gibbon L, Coppolino MG, Radeva G, Filmus J, Bell JC, Dedhar S. 1996. Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. *Nature.* 379:91-6.

Hannigan G, Troussard AA, Dedhar S. 2005. Integrin-linked kinase: a cancer therapeutic target unique among its ILK. *Nat Rev Cancer.* 5:51-63.

Hirsch E, Lohikangas L, Gullberg D, Johansson S, Fässler R. 1998. Mouse myoblasts can fuse and form a normal sarcomere in the absence of beta1 integrin expression. *J Cell Sci.* 111:2397-409.

Huang Y, Li J, Zhang Y, Wu C. 2000. The roles of integrin-linked kinase in the regulation of myogenic differentiation. *J Cell Biol.* 150:861-72.

Hynes RO. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 110:673-87.

Ibraghimov-Beskrovnaya O, Ervasti JM, Leveille CJ, Slaughter CA, Sernett SW, Campbell KP. 1992. Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature.* 355:696-702.

Jacinto E, Facchinetti V, Liu D, Soto N, Wei S, Jung SY, Huang Q, Qin J, Su B. 2006. SIN1/MIP1 maintains rictor-mTor complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. Cell. 127, 125-37.

Legate KR, Montanez E, Kudlacek O, Fässler R. 2006. ILK, PINCH and parvin: the tIPP of integrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7:20-31.

Mackinnon AC, Qadota H, Norman KR, Moerman DG, Williams BD. 2002. C. elegans PAT-4/ILK functions as an adaptor protein within integrin adhesion complexes. *Curr Biol*. 12:787-97.

Mayer U, Saher G, Fässler R, Bornemann A, Echtermeyer F, von der Mark H, Miosge N, Poschl E, von der Mark K. 1997. Absence of integrin alpha 7 causes a novel form of muscular dystrophy. *Nat Genet.* 17:318-23.

Mayer U. 2003. Integrins: redundant or important players in skeletal muscle? *J Biol Chem.* 278:14587-90.

Menko AS, Boettiger D. 1987. Occupation of the extracellular matrix receptor, integrin, is a control point for myogenic differentiation. *Cell.* 51:51-7.

Miller MG, Naruszewicz I, Kumar AS, Ramlal T, Hannigan GE. 2003. Integrin-linked kinase is a positive mediator of L6 myoblast differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*. 310:796-803.

Moro L, Venturino M, Bozzo C, Silengo L, Altruda F, Beguinot L, Tarone G, Defilippi P. 1998. Integrins induce activation of the EGF receptor:role in MAP kinase induction and adhesion-dependent cell survival. EMBO J. 17, 6622-32.

Moro L, Dolce L, Cabodi L, Bergatto E, Erba EB, Smeriglio M, Turco E, Retta SF, Giuffrida MG, Venturino M, et al.. 2002. Integrin induced epidermal growth factor (EGF) receptor activation requires c-src and p130Cas and leads to phosphorylation of specific EGF receptor tyrosines. J Biol Chem. 277, 9405-14

Nawrotzki R, Willem M, Miosge N, Brinkmeier H, Mayer U. 2003. Defective integrin switch and matrix composition at alpha 7-deficient myotendinous junctions precede the onset of muscular dystrophy in mice. *Hum Mol Genet.* 12:483-95.

Nikolopoulos SN, Turner CE. 2001. Integrin-linked kinase (ILK) binding to paxillin LD1 motif regulates ILK localization to focal adhesions. *J Biol Chem*. 276:23499-505.

Novak A, Hsu SC, Leung-Hagesteijn C, Radeva G, Papkoff J, Montesano R, Roskelley C, Grosschedl R, Dedhar S. 1998. Cell adhesion and the integrin-linked kinase regulate the LEF-1 and beta-catenin signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95:4374-9.

Pallafacchina G, Calabria E, Serrano AL, Kalhovde JM, Schiaffino S. 2002. A protein kinase B-dependent and rapamycin-sensitive pathway controls skeletal muscle growth but not fiber type specification. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99:9213-8.

Persad S, Attwell S, Gray V, Delcommenne M, Troussard A, Sanghera J, Dedhar S. 2000. Inhibition of integrin-linked kinase (ILK) suppresses activation of protein kinase B/Akt and induces cell cycle arrest and apoptosis of PTEN-mutant prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97:3207-12.

Persad S, Attwell S, Gray V, Mawji N, Deng JT, Leung D, Yan J, Sanghera J, Walsh MP, Dedhar S. (2001). Regulation of proteinkinase B/Akt-serine 473 phosphorylation by integrin-linked kinase: critical roles for kinase activity and amino acids arginine 211 and serine 343. J Biol Chem. 276, 27462-9.

Rando TA, Blau HM. 1994. Primary mouse myoblast purification, characterization, and transplantation for cell-mediated gene therapy. *J Cell Biol.* 125:1275-87.

Rommel C, Bodine SC, Clarke BA, Rossman R, Nunez L, Stitt TN, Yancopoulos GD, Glass DJ. 2001. Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. Nat Cell Biol. 3,1009-13.

Sakai T, Li S, Docheva D, Grashoff C, Sakai K, Kostka G, Braun A, Pfeifer A, Yurchenco PD, Fässler R. 2003. Integrin-linked kinase (ILK) is required for polarizing the epiblast, cell adhesion, and controlling actin accumulation. *Genes Dev.* 17:926-40.

Sastry SK, Lakonishok M, Thomas DA, Muschler J, Horwitz AF. 1996. Integrin alpha subunit ratios, cytoplasmic domains, and growth factor synergy regulate muscle proliferation and differentiation. *J Cell Biol.* 133:169-84.

Sastry SK, Lakonishok M, Wu S, Truong TQ, Huttenlocher A, Turner CE, Horwitz AF. 1999. Quantitative changes in integrin and focal adhesion signaling regulate myoblast cell cycle withdrawal. J Cell Biol. 144:1295-309.

Schneller M, Vuori K, Ruoslahti E. 1997. Alphavbeta3 integrin associates with activated insulin and PDGFbeta receptors and potentiates the biological activity of PDGF. EMBO J. 16, 5600-07.

Schwander M, Leu M, Stumm M, Dorchies OM, Ruegg UT, Schittny J, Muller U. 2003. Beta1 integrins regulate myoblast fusion and sarcomere assembly. *Dev Cell.* 4:673-85.

Shiota C, Woo JT, Lindner J, Shelton KD, Magnuson MA 2006. Multiallelic disruption of the rictor gene in mice reveals that mTOR complex 2 is essential for fetal growth and viability. Dev Cell. 11:583-9.

Soldi R, Mitola S, Strasly M, Defilippi P, Tarone G, Bussolino F. 1999. Role of alphavbeta3 integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. EMBO J. 18:882-92.

Stanchi F, Bordoy R, Kudlacek O, Braun A, Pfeifer A, Moser M, Fässler R. 2005. Consequences of loss of PINCH2 expression in mice. *J Cell Sci.* 118:5899-910.

Taverna D, Disatnik MH, Rayburn H, Bronson RT, Yang J, Rando TA, Hynes RO. 1998. Dystrophic muscle in mice chimeric for expression of alpha5 integrin. *J Cell Biol.* 143:849-59.

Volk T, Fessler LI, Fessler JH. 1990. A role for integrin in the formation of sarcomeric cytoarchitecture. *Cell.* 63:525-36.

White DE, Coutu P, Shi YF, Tardif JC, Nattel S, St Arnaud R, Dedhar S, Muller WJ. 2006. Targeted ablation of ILK from the murine heart results in dilated cardiomyopathy and spontaneous heart failure. *Genes Dev*. 20:2355-60.

Zervas CG, Gregory SL, Brown NH. 2001. Drosophila integrin-linked kinase is required at sites of integrin adhesion to link the cytoskeleton to the plasma membrane. *J Cell Biol.* 152:1007-18.

Figure legend

Figure 1 - DNA, protein and histology analysis of conditional knock-out of *ILK* gene

(A) Southern blot of gastrocnemius muscle group DNA from two 4-week-old mice with different genotypes: control (*HSAcre*$^{-}$*/ILK*$^{fl/+}$) and *HSACre-ILK* (*HSAcre*$^{+}$*/ILK*$^{fl/-}$). fl, flox; wt, wild type; rec. recombined allele.

(B) Western blot analysis of ILK expression in the same muscle as that for Southern blot. GAPDH antibody was used as loading control.

(C) Quantification of the ILK protein content between control and *HSACre-ILK* by using densitometry for the Western blot signals. Data are expressed as the Mean ± S.D.

(D) Cryosections of control and *HSACre-ILK* E16.5-day-old forelimbs and 3-month-old gastrocnemius muscles stained with DAPI (blue) and antibody to ILK (red). ILK expresses dominantly at myotendinous junction (MTJ). Dense immunoactivity was detected at MTJ (arrowheads) in addition to the sarcolemma in the control section, but no immunoactivity was detectable in the *HSACre-ILK* MTJ.

Figure 2 - Footprint analysis

Footprints of control and *HSACre-ILK* mice at 4-week- and 3-month-old. This is done by creating a relatively narrow route about 40cm in length to ensure the mice walking forward. (A) Front and back pads were inked in red and blue colours respectively. (B) The distances between each two footprints were measured by pixel, and to diminish the influence of body length, we divided the distances by body length, than the statistic result showed a significant decrease in stride length in both front and back feet, and in both 4-week- and 3-month-old mutant mice. **, $P<0.001$.

Figure 3 - Histology of skeletal muscles

Cross sections of paraffin-fixed gastrocnemius muscle from control and *HSACre-ILK* mice at 10-day-old (10-d), 5-month-old (5-mo) and 12-month-old (12-mo), stained with hematoxylin and eosin.

The myofibers from control mice showed the regular diameter and peripherally located nuclei at all ages. In *HSACre-ILK* mice, centralized nuclei could be easily found (arrowheads). Besides, the myofibers lost their polygonal cross-cut cell shape, and the diameter of myofibers were getting irregular and the intercellular space became loose. Severe fibrosis can also be easily seen in 12-mo-old mutant muscle .

Figure 4 - Pathological changes in *HSACre-ILK* muscles

Immunofluorescence analysis of 3-month-old control and *HSACre-ILK* gastrocnemius muscle serial sections stained with fibronectin (FN) on non-MTJ regions (A, B) and MTJ regions (C, D)

or tenascin-C (TN-C) (E, F) antibodies. Increased fibrosis was demonstrated by increased FN signals (arrowheads) in the endomysial spaces compare to the control section. Only tendon was stained with TN-C antibody in the control section, but immunopositive signals (arrows) for TN-C were also observed in the endomysial space away from MTJ in the *HSACre-ILK* muscle.

Figure 5 - Electron micrographs of MTJs

Alteration of MTJs in *HSACre-ILK* mice. Electron micrographs of MTJ of control (A,C) and *HSACre-ILK* (B,D) mice. (A) Normal MTJs are charaterized by multiple finger like interdigitations with a regular organization and less differences of the length and wide of the single finger like foldings. (B) MTJ of *HSACre-ILK* mice showed more irregular organization of the interdigitations and more principal foldings of the myofiber surface at the junctions. (C) At higher magnification, the regular organized finger like folds of muscle fiber covered by a well organized and closely attached basement membrane interdigitation with collagen fibrils in control mice. (D) *HSACre-ILK* mice showed folds of different length and wide with a partial detachment of the basement membrane (arrowheads). Bar A,B = 2.2μm, C,D = 500nm

Figure 6 - Alteration of the ILK-associated proteins by Western blot and histological analysis

(A) The Western blot. The proteins were extracted from the control and *HSACre-ILK* muscles, and were immunoblotted with ILK, PINCH1, β-parvin, β1 integrin, β1D integrin, α5 integrin, α7b integrin and caveolin-3 antibodies. ILK/pinch/parvin complex proteins and α7b integrin protein were decreased, especially the ILK and β-parvin levels decreased more dramatically in the *HSACre-ILK* muscle. GAPDH antibody was used as the loading control.

(B) Immunofluorescence staining of α7a integrin, α7b integrin, α5 integrins and β1D integrin. Note the dominant α7a integrin signals (red) localized on MTJ in the control muscles, and the signals dramatically decreased in the *HSACre-ILK* muscles. α7b integrin (red) expressed homogeneously on the sarcolemma over the whole regions on the control muscles, but in the *HSACre-ILK* muscles, some muscle cells lack the positive signals, and the expression shifted to MTJ area. α5 integrin signals increased in the *HSACre-ILK* muscles, compare to the control muscles. β1D integrin signals were similar between control and *HSACre-ILK* muscles.

Figure 7 - Analysis of myoblasts and myoblast fusion experiments

(A) Western blot of the control and *HSACre-ILK* proteins by using ILK, PINCH1 and β1D integrin, p-Erk1/2, Erk1/2, pSer473-Akt and Akt antibodies. The protein levels of ILK and PINCH1 were dramatically decreased. There is no change of β1D integrin, p-Erk1/2, Erk1/2, pSer473-Akt and Akt protein level between control and *HSACre-ILK*. GAPDH antibody was used as the loading control.

(B) Myoblast cells were isolated from postnatal day2 control and *HSACre-ILK* hindlimbs. Phase contrast pictures taken after changed to differentiation medium for 2 days, showed that myotubes were formed in both control and *HSACre-ILK* primary myoblast cultures. Differentiating myoblasts and myotubes were stained with sarcomeric -actinin antibody (red) and DAPI (blue).

(C) Quantification of the number of myotubes that formed when cells from the control and *HSACre-ILK* hindlimbs were plated at different cell densities (n=3; 200 cells/mm^2 and 400 cells/mm^2).

Figure 8 - Exercise induced disarrangement of MTJ and subsarcolemmal myofibrils in *HSACre-ILK* mice.

Electron micrographs of MTJ of control (A,C) and *HSACre-ILK* (B,D) mice. (A) A typical MTJ with finger like interdigitations was visible in a control mouse. (B) In *HSACre-ILK* the MTJ surrounded by collagen fibrils lost nearly completely the typical foldings. The MTJ showed cytoplasma processes and invaginations with great variety of size and shape, which do not remember to finger like structures. (C) At higher magnification the regular attachment of the basement membrane followed by collagen fibrils can be seen in the control. (D) In *HSACre-ILK* the basement membrane was only partial preserved and more unstructured electron dense extracellular material (asterisk). Only less collagen fibrils were found in the invaginations of the MTJ.

A well recognizable sarcomeric structure of subsarcolemmal and more central myofibrils was visible in muscle fibers of untrained control (E) and *HSACre-ILK* (F) mice as well as in muscle fibers of control mice after the four week training period (G). The subsarcolemmal myofibrils of the *HSACre-ILK* lost the typical sarcomeric structure (asterisk) in a small part of the myofibers , as a first sign of myocytolysis, whereas those of more central localized myofibrils are further well organized (H). The basement membrane at the lateral side of the muscle fibers was preserved in control (G) as well as in *HSACre-ILK* (H) mice after the four week training period. Z = Z-line; M = M-line; Bar A,B = 4µm; C ,D ,E ,F ,G ,H = 900nm

Figure 9 - Alteration of IGF signalling after endurance exercise training

Western blot analysis of untrained (A) or endurance exercise trained (B) proteins by using ILK, pSer473-Akt, pThr308-Akt, Akt, pTyr-IGF-1R, IGF-1R, pTyr397-FAK and FAK antibodies. GAPDH antibody was used as the loading control.

(C) Quantification of pTyr-IGF-1R protein expression level from control and *HSACre-ILK* muscles. It showed that *HSACre-ILK* muscles expressed around 60% of pTyr-IGF-1R compared with control muscles. (Control: n= 4; *HSACre-ILK*: n= 5; $p < 0.01$).

(D) Real-Time-PCR analysis of pTyr-IGF-1R mRNA expression level from control and *HSACre-ILK* muscles. There is no significant change between control and *HSACre-ILK* mice. (Control: n= 3; *HSACre-ILK*: n= 4; p=0.199).

Figure 1

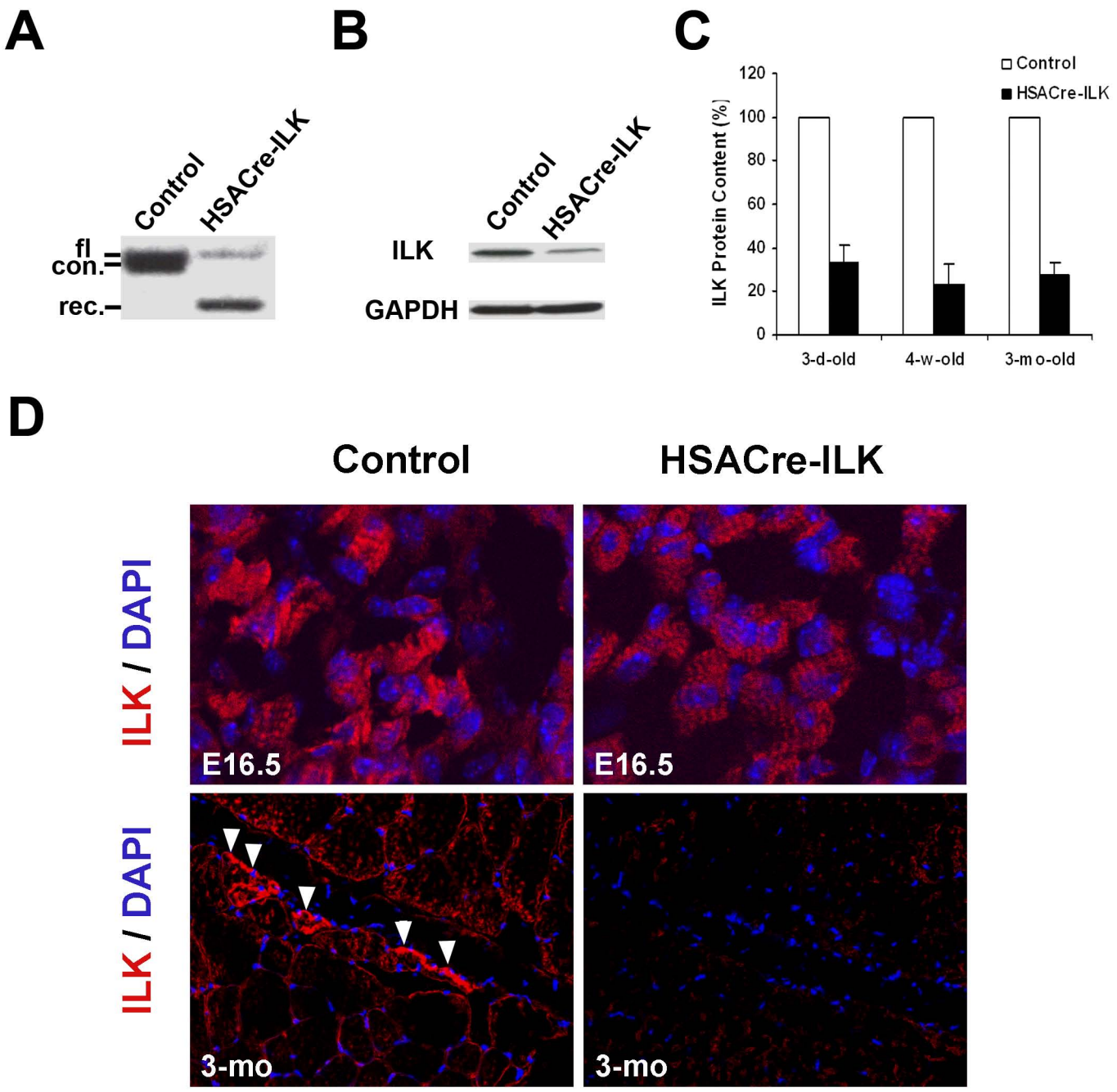
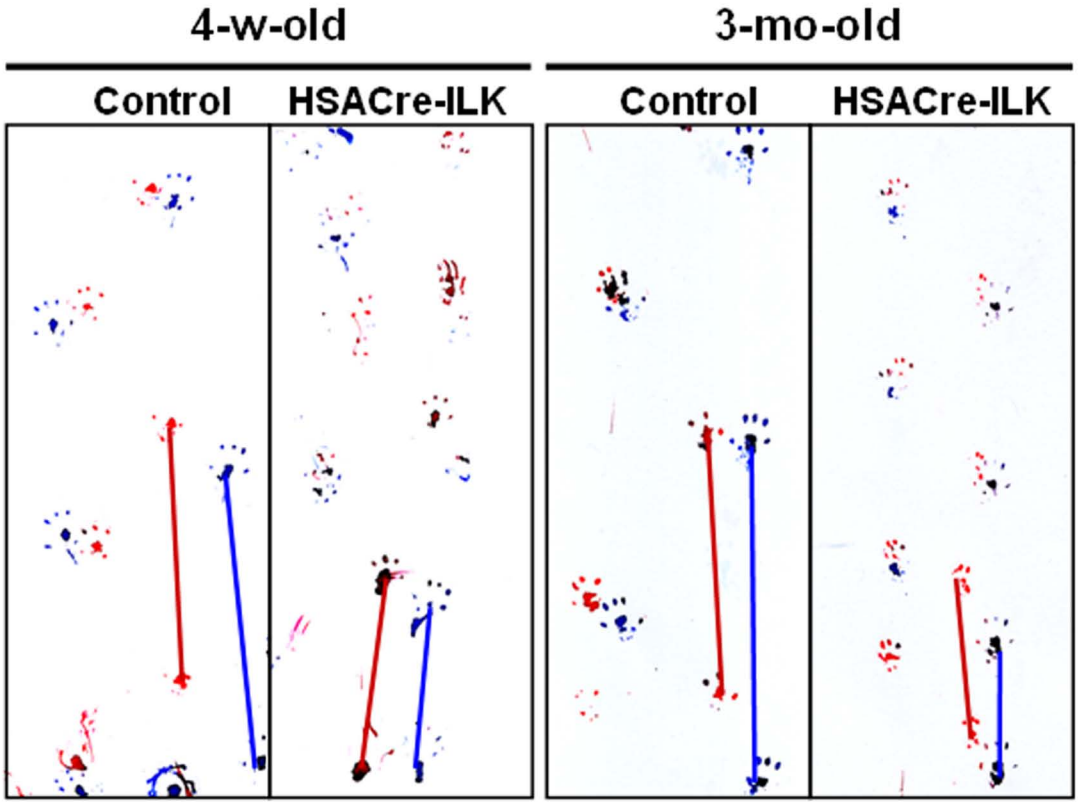

A
Control
HSACre-ILK
fl
con.
rec.
B
Control
HSACre-ILK
ILK
GAPDH
C
Control
HSACre-ILK
ILK Protein Content (%)
120
100
80
60
40
20
0
3-d-old
4-w-old
3-m o-old
D
Control
HSACre-ILK
ILK / DAPI
ILK / DAPI
E16.5
E16.5
3-mo
3-mo

Figure 2

A


4-w-old
3-mo-old
Control
HSACre-ILK
Control
HSACre-ILK

B

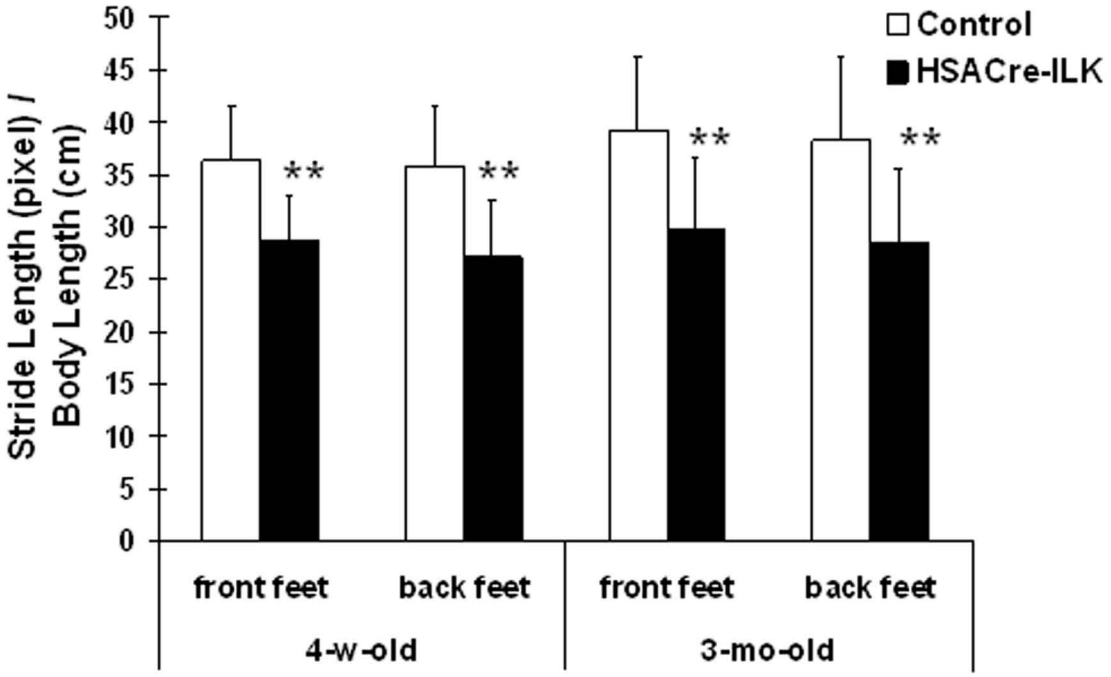

Control
HSACre-ILK
Stride Length (pixel) / Body Length (cm)
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
**
**
**
**
front feet
back feet
front feet
back feet
4-w-old
3-mo-old

Figure 3

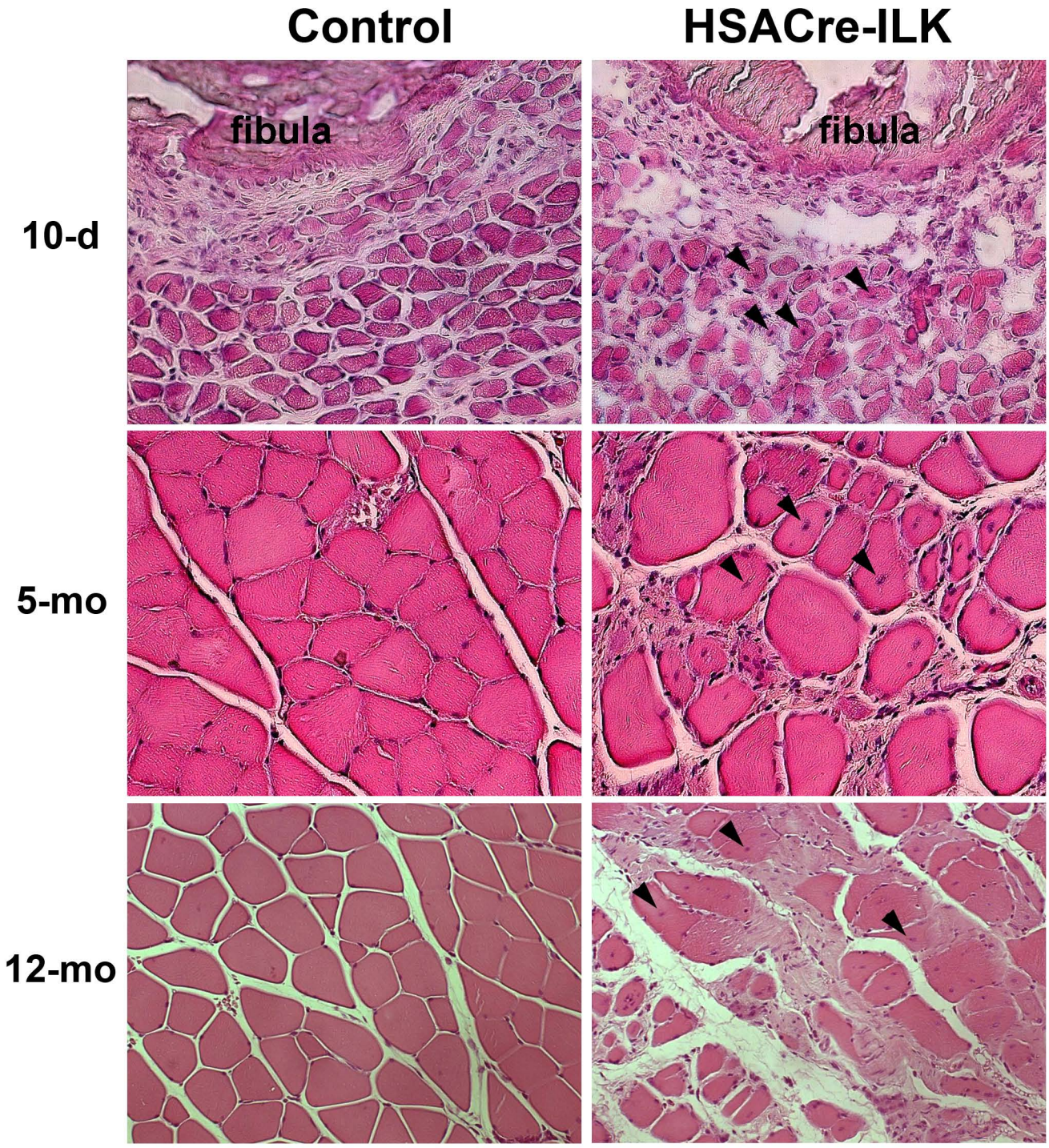


Figure 4

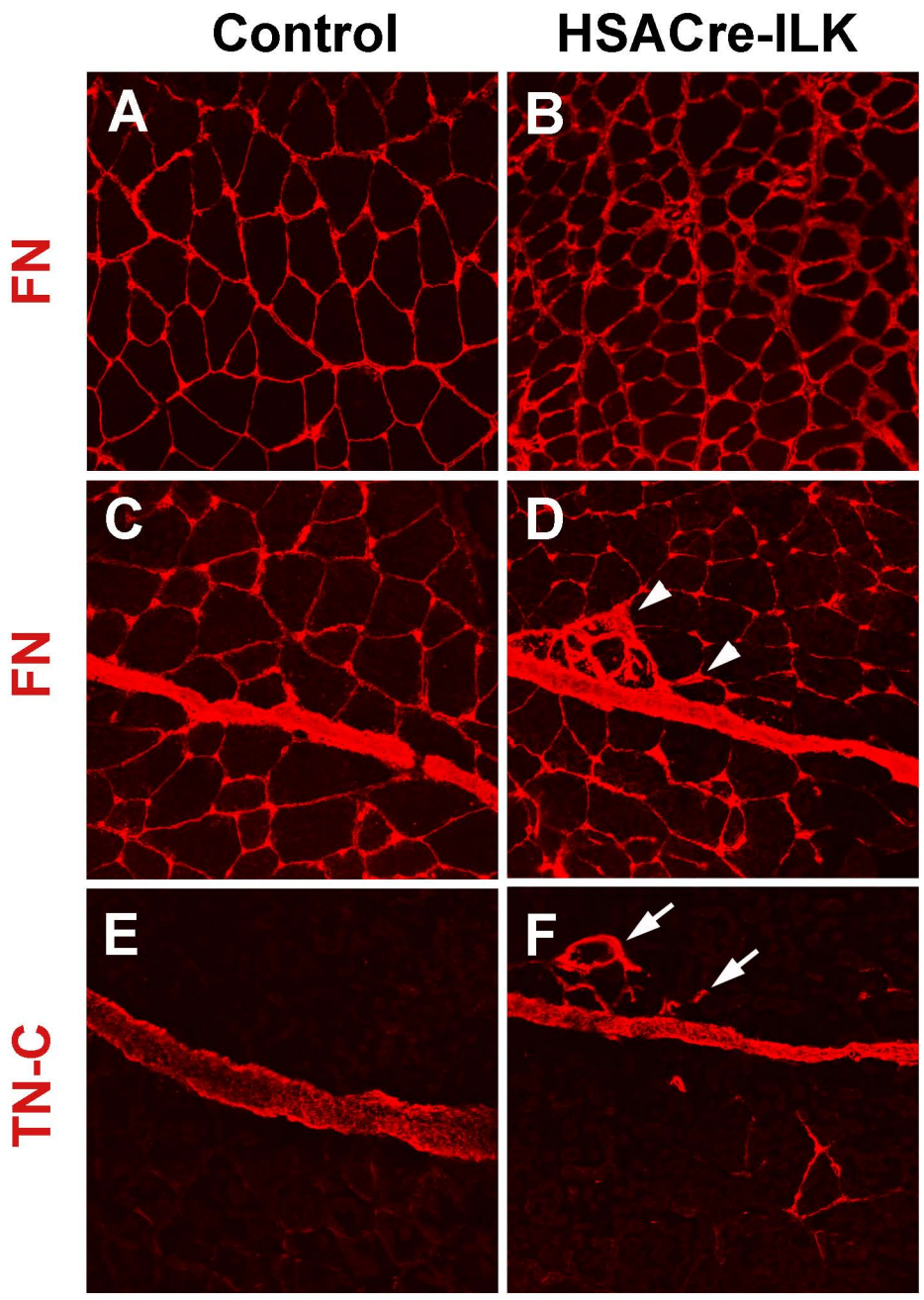


Figure 5

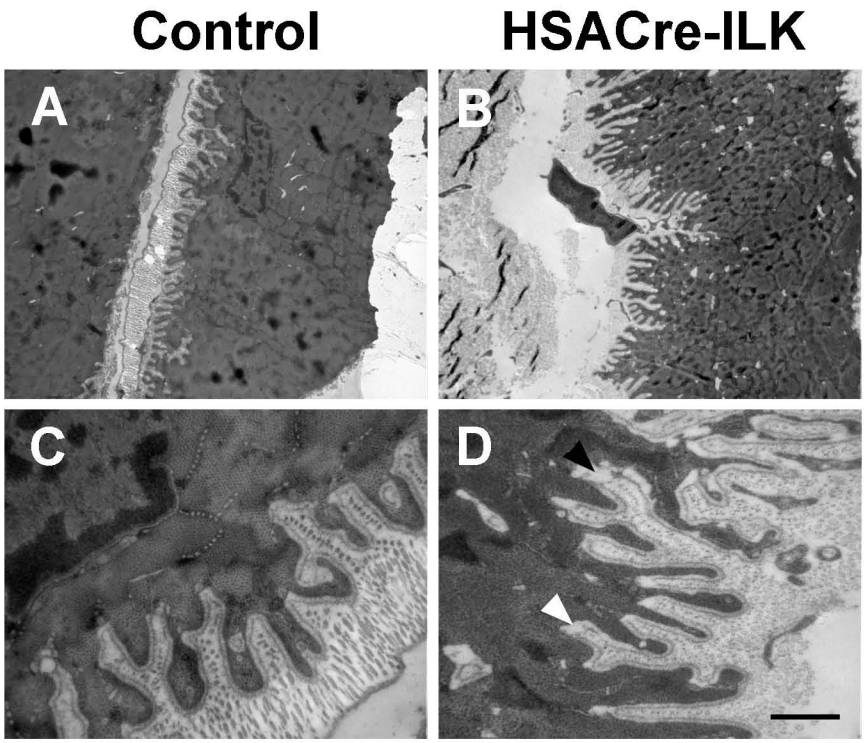


Figure 6

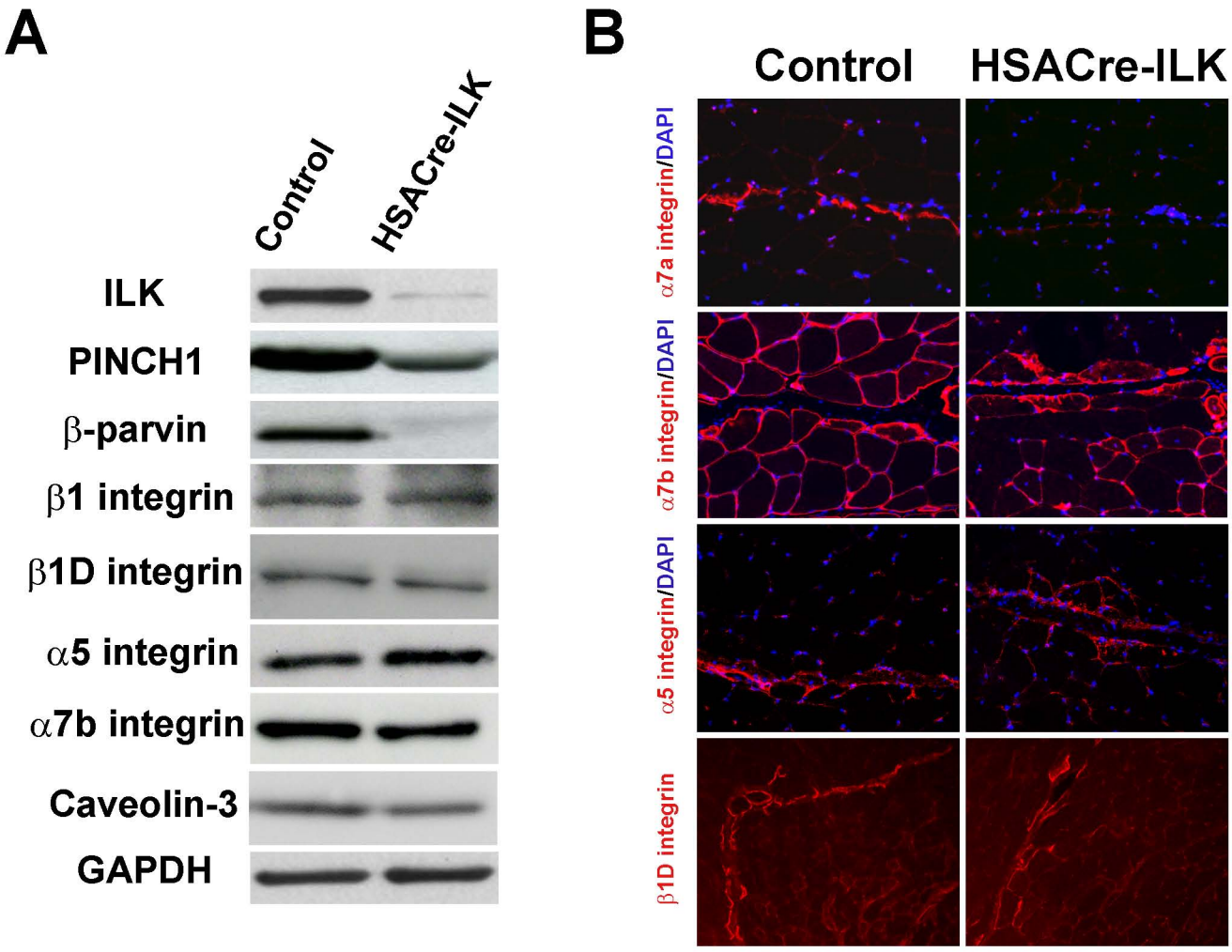

A
Control
HSACre-ILK
ILK
PINCH1
β-parvin
β1 integrin
β1D integrin
α5 integrin
α7b integrin
Caveolin-3
GAPDH
B
Control
HSACre-ILK
α7a integrin/DAPI
α7b integrin/DAPI
α5 integrin/DAPI
β1D integrin

Figure 7

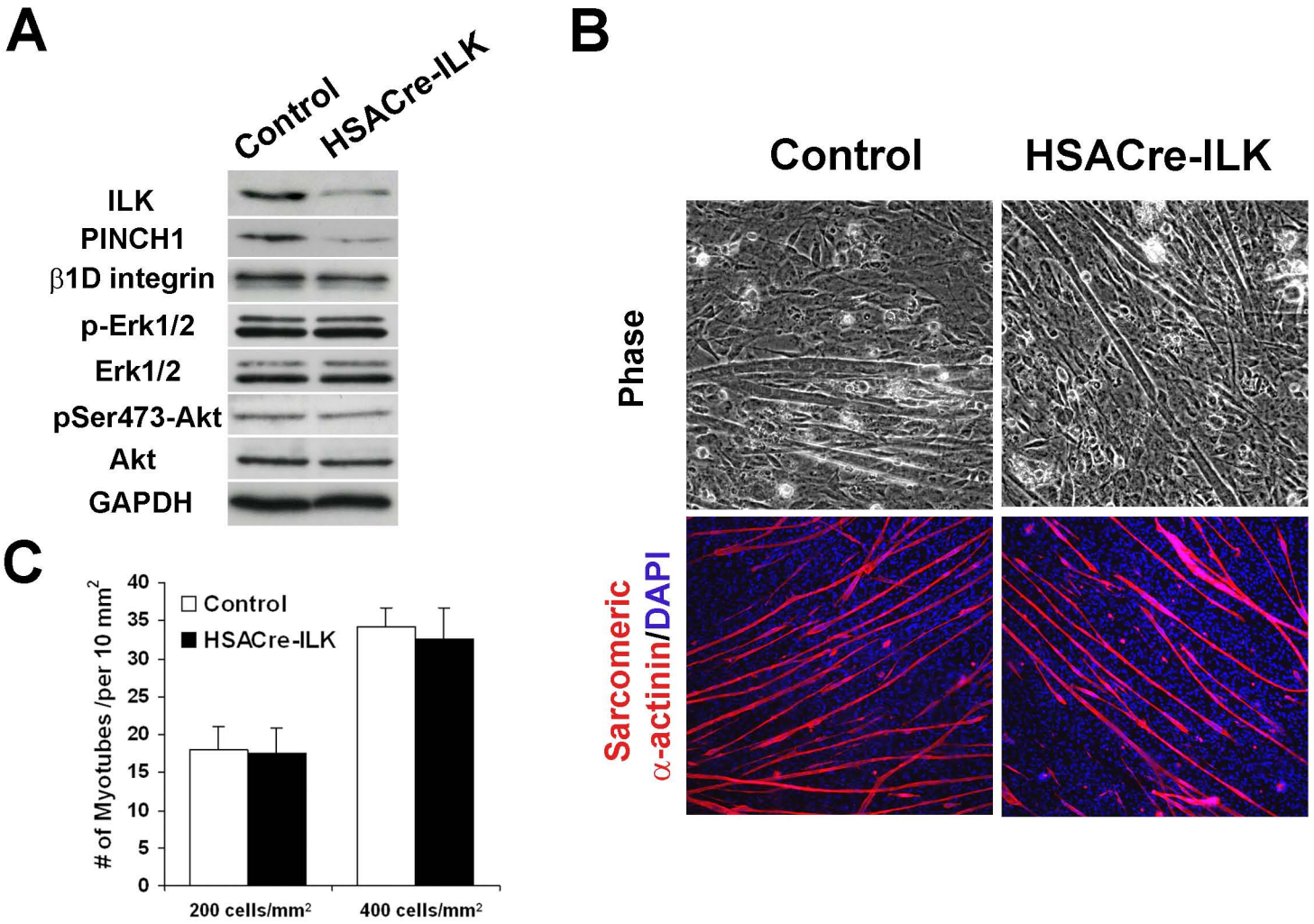

A
Control
HSACre-ILK
ILK
PINCH1
β1D integrin
p-Erk1/2
Erk1/2
pSer473-Akt
Akt
GAPDH
B
Control
HSACre-ILK
Phase
Sarcomeric α-actinin/DAPI
C
Control
HSACre-ILK
of Myotubes /per 10 mm2
0
5
10
15
20
25
30
35
40
200 cells/mm2
400 cells/mm2

Figure 8

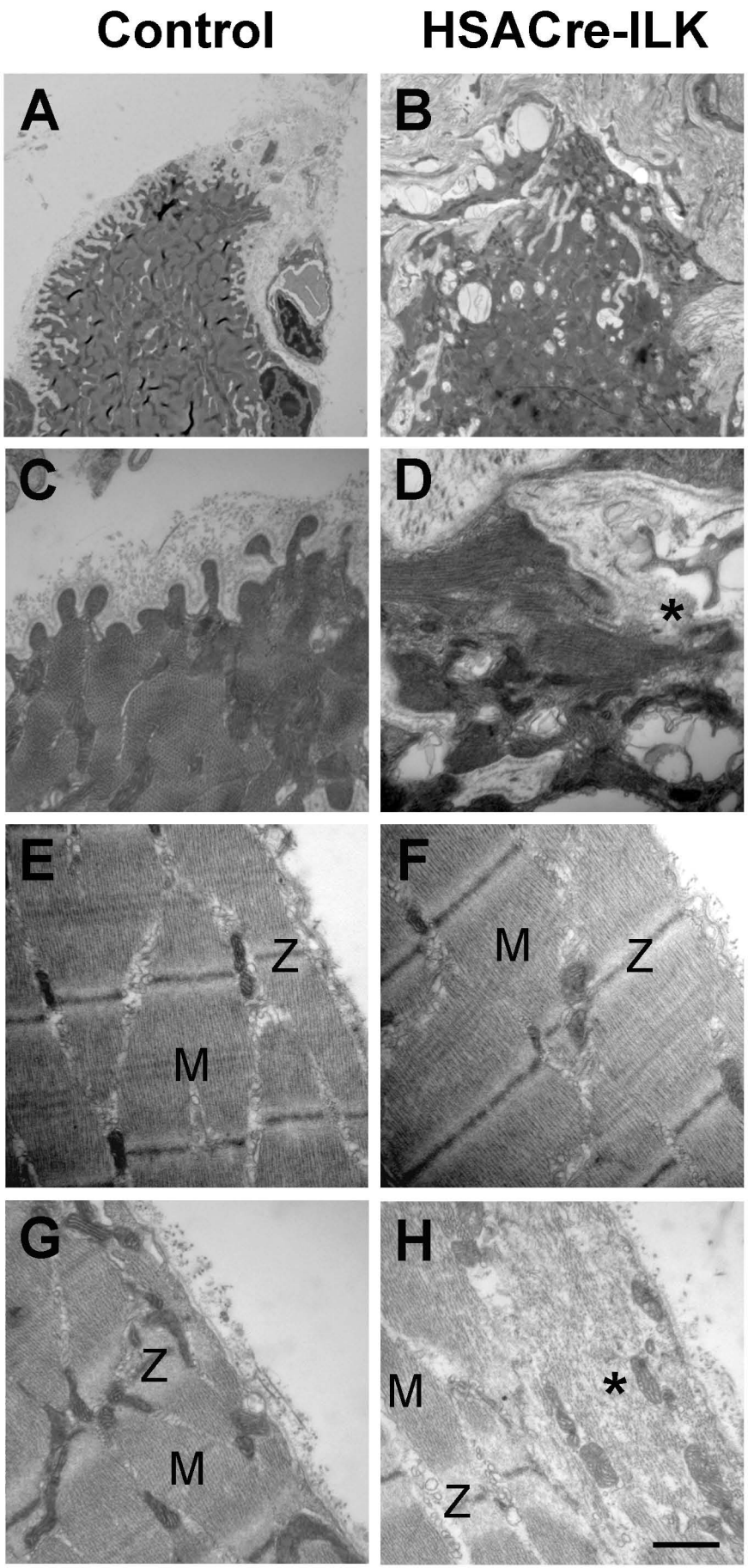
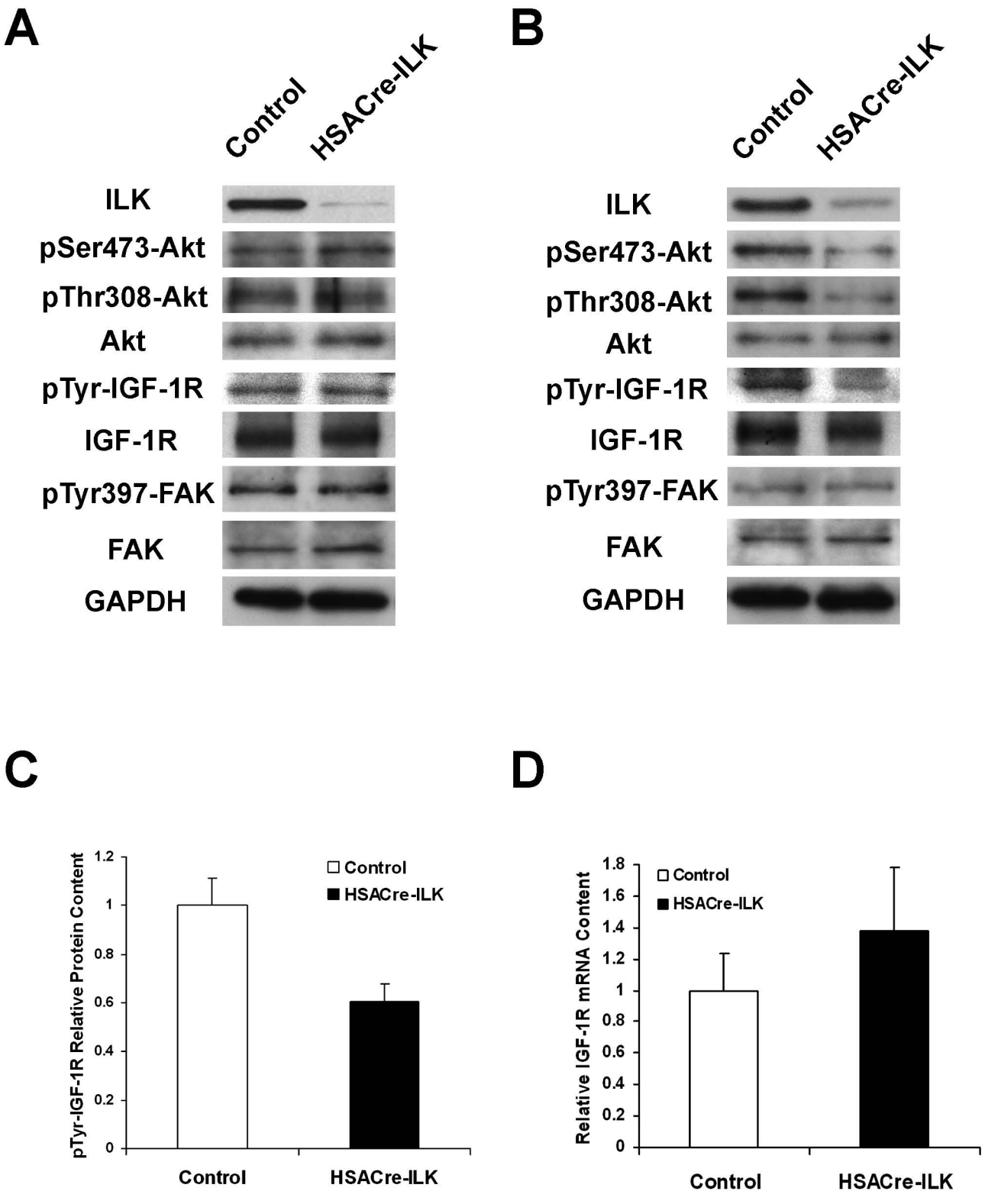
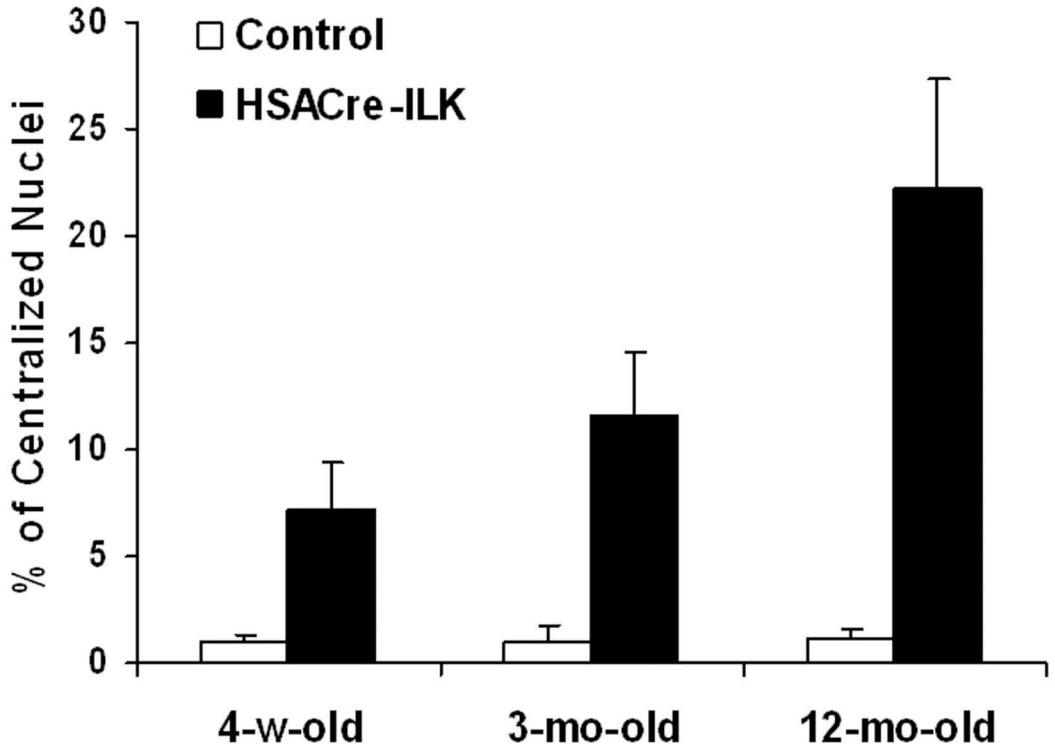


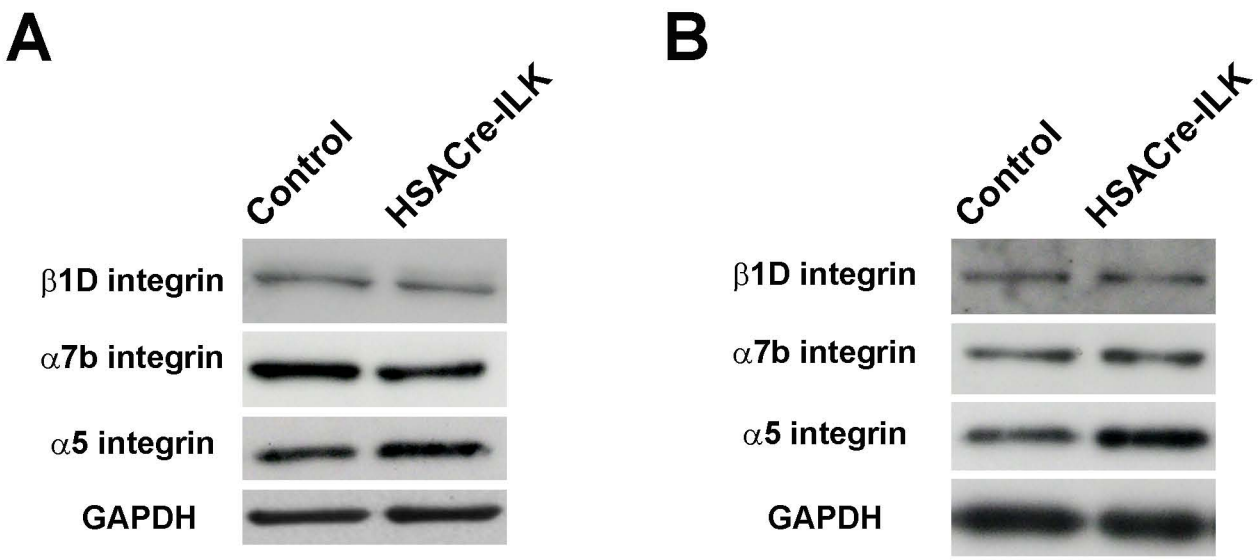
Figure 9


A
Control
HSACre-ILK
ILK
pSer473-Akt
pThr308-Akt
Akt
pTyr-IGF-1R
IGF-1R
pTyr397-FAK
FAK
GAPDH
B
Control
HSACre-ILK
ILK
pSer473-Akt
pThr308-Akt
Akt
pTyr-IGF-1R
IGF-1R
pTyr397-FAK
FAK
GAPDH
C
pTyr-IGF-1R Relative Protein Content
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Control
HSACre-ILK
Control
HSACre-ILK
D
Relative IGF-1R mRNA Content
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Control
HSACre-ILK
Control
HSACre-ILK

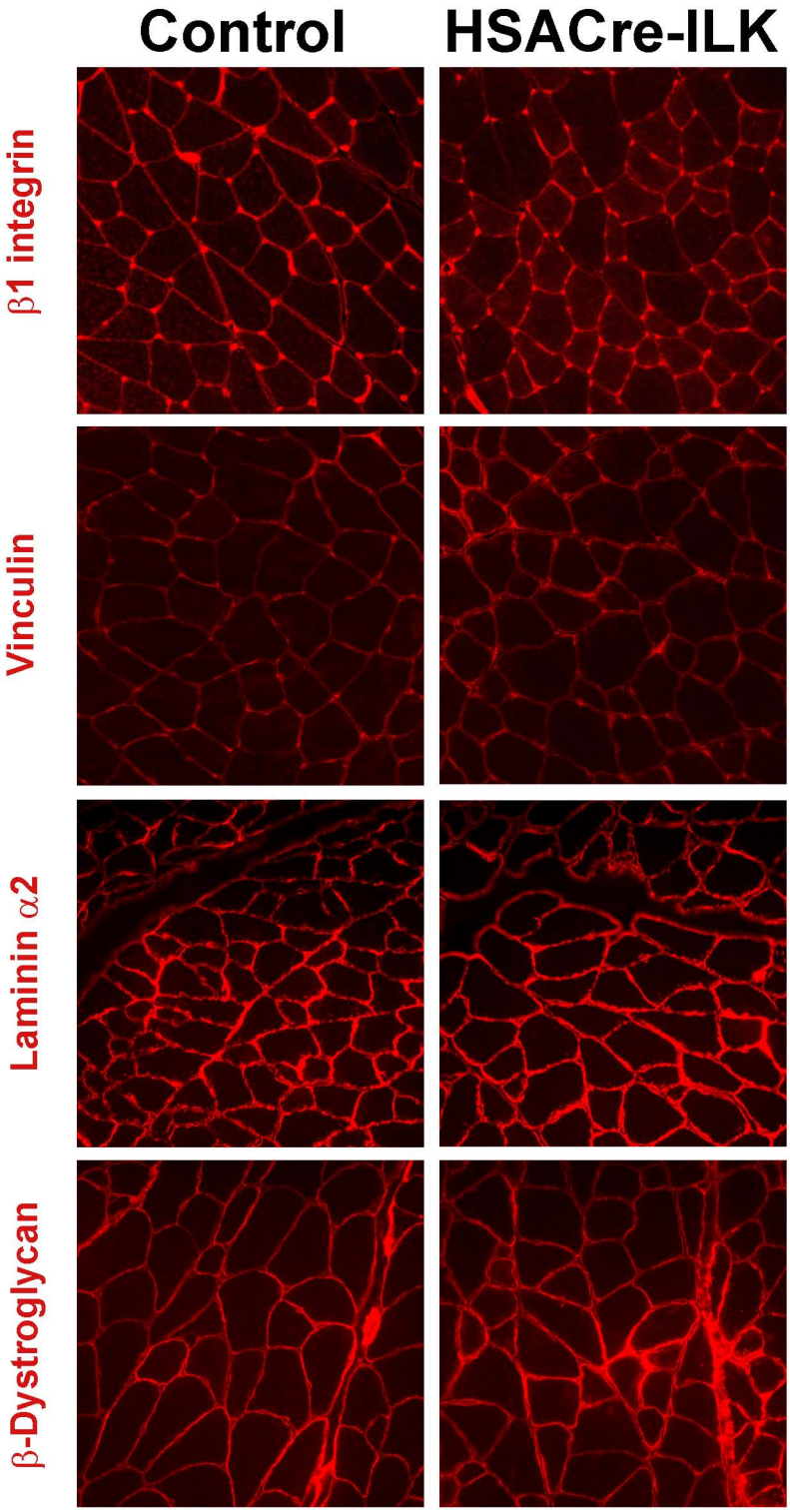
Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 3



β-parvin ist not essential for mouse development and cardiac homeostasis

Ingo Thievessen[1], Haiyan Chu[1], Attila Braun[2], Georg Rosenberger[3], Wilhelm Bloch[4] and Reinhard Faessler[1]

[1]Department of Molecular Medicine, Max-Planck-Institute of Biochemistry, Martinsried, Germany; [2]Rudolf-Virchow-Zentrum, DFG-Forschungszentrum für Experimentelle Biomedizin, Bayerische Julius-Maximilians-Universität, Würzburg, Germany; [3]Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Germany; [4]Department of Molecular and Cellular Sport Medicine, German Sport University, Cologne

Abstract

The parvins belong to the α-actinin-superfamily of CH- (calponin-homology) domain proteins, which show F-actin binding as a common feature. They form a complex with integrin-linked kinase (ILK) and PINCH, linking the actin cytoskeleton to integrins. Although highly similar, the widely expressed α- and β-parvins were shown to have distinct functions during cell spreading and cell survival *in vitro*.

Here we report the phenotypic analysis of mice with a constitutive deletion of β-parvin. β-parvin-deficient mice were viable, fertile and did not show an obvious phenotype. Histological analyses of β-parvin-deficient hearts, skeletal muscle and other β-parvin-expressing tissues, did not reveal apparent changes. Heart and skeletal muscle, showing a notably high ratio of β-parvin/α-parvin-expression, displayed substantial upregulation of α-parvin-protein upon loss of β-parvin, indicating stabilization of the ILK/PINCH/parvin-complex by increased α-parvin-recruitment. The lack of a phenotype as observed in ILK-deficient hearts suggests that putative β-parvin-functions in cardiac homeostasis are compensated by α-parvin.

Binding of Rac/Cdc42-guanine-nucleotide exchange factors of the PIX-family was found to be specific for β-parvin, indicating distinct β-parvin-functions in cell spreading. β-parvin-deficient primary murine embryonic fibroblasts (MEFs) showed a normal morphology, adhesion, F-actin- and focal adhesion-organisation as well as migration in a scratch assay, suggesting that the β-parvin/PIX-interaction is not required for proper adhesion and actin-reorganisation in MEFs. These results demonstrate, that distinct functions of β-parvin are of subtle relevance *in vivo*.