4 Diskussion

Mit dem Ziel, die funktionelle Bedeutung der Transmembrandomäne von L-Selektin zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit eine neuartige L-Selektinmutante (L-Selektin/tmCD44) konstruiert, bei der die originäre Transmembransequenz von L-Selektin durch diejenige des Zelladhäsionsmoleküls CD44 ersetzt wurde.

Durch FACS-Analyse konnte gezeigt werden, dass die mit dem Konstrukt transfizierten Zelllinien K562 und Nalm6 L-Selektin/tmCD44 wie ein normales Membranprotein exprimieren, d.h. es wird zur Zelloberfläche transportiert und dort in die Zellmembran eingefügt. Hier kann es, ähnlich der Wildtyp-Form, gesheddet werden, was durch den Nachweis von sL-Selektin im Zellüberstand von K562-Zellen mittels ELISA überprüfbar war. Das L-Selektin/tmCD44-Konstrukt stellt somit ein ausgezeichnetes Instrument dar, den Einfluss der Transmembrandomäne auf die Zelloberflächenlokalisation zu untersuchen.

4.1 Konstruktion der L-Selektin/tmCD44-Chimäre

Es wurde erstmals eine L-Selektinmutante generiert, bei der selektiv die Transmembrandomäne modifiziert wurde, während die extrazelluläre und die zytoplasmatische Domäne unverändert blieben.

Hierzu wurde ein chimäres Gen aus Sequenzabschnitten der Zelladhäsionsmoleküle L-Selektin und CD44 konstruiert und in Nalm6- sowie K562-Zellen exprimiert. Von N- nach C-terminal besteht dieses Fusionsprotein aus der extrazellulären Domäne von L-Selektin (346 AS), der Transmembrandomäne von CD44 (23 AS) sowie der zytoplasmatischen Domäne von L-Selektin (17 AS).

Als Grundlage wurde aus humanen Leukozyten mRNA isoliert und mittels PCR (Polymerase Ketten Reaktion) ein DNA-Fragment generiert, das aus Exon 15-17 des CD44-Gens besteht. Exon 17 codiert für die stark konservierte Transmembrandomäne von CD44. Als Ausgangsmaterial zur Gewinnung der L-Selektinabschnitte diente der Klon Lam TA 4 (freundlicherweise durch Frau Dr. C. Fieger zur Verfügung gestellt), der die gesamte Gensequenz von humanem L-Selektin enthält.

Die Verknüpfung einzelner Genabschnitte („Gene engineering“) erfolgte mit Hilfe der PCR-basierten Methode „Splicing by overlap extension“ (SOE), die erstmals von Horton et al.

1991 zur Konstruktion eines rekombinanten Gens eingesetzt wurde. Die Methode wird auch als PCR-Fusionstechnik oder rekombinierte PCR bezeichnet (Yon et al. 1989). Das von Horton et al. konstruierte Hybridgen codierte für ein Fusionprotein, in dem die α-Helices eines murinen Klasse-I MHC (Major histocompatibility complex)-Gens durch diejenigen eines anderen MHC-I Gens ersetzt wurden (Horton et al. 1989; Warrens et al. 1997).
Das allgemeine Prinzip einer SOE ist ausführlich in Kapitel 3.3/Abbildung 8 dargestellt. Zur L-Selektin/tmCD44-Chimärenkonstruktion wurden durch überhängende Primer die Fragmente, die den extra- bzw. intrazellulären Abschnitt von L-Selektin bzw. den transmembranären Abschnitt von CD44-cDNA kodieren, mittels PCR gewonnen und in den Vektor pCR 2.1 kloniert. Die Primer wurden so konstruiert, dass, in Bezug auf zwei zu fusionierende Fragmente, der 5´-Überhang des einen modifizierten Fragmentes komplementär zum 3´-Überhang des anderen war. Die Längen der zur Modifikation verwendeten Primer betrugen, ähnlich wie bei Horton et al., 33-36 Basen, die Überhänge der modifizierenden Fragmente jeweils 15-16 Basen. Die derart veränderten, über einen Bereich von 33-36 Basen komplementären Fragmente wurden in zwei SOE-Reaktionen zur L-Selektin/tmCD44-Chimäre fusioniert.

Der entscheidende Vorteil der SOE gegenüber anderen Methoden der Genfusion liegt in der Möglichkeit der beliebigen basengenauen Genrekombination, ohne Rücksicht auf die DNA-Sequenz an den Verbindungsstellen nehmen zu müssen. Dies ist mit alternativen Methoden, wenn überhaupt, nur mit Einschränkungen möglich. So generierten Kim und Weaver ein hybrides Molekül aus dem aktiven Teil des Toxins Ricin und Protein A aus Staphylokokken als Grundlage zur Entwicklung eines Immuntoxins durch die Verwendung von Sequenzen einer „multiple cloning site“ (Kim et al. 1988). Hierdurch enthielt das Fusionsprotein am Übergang zusätzliche irrelevante Aminosäuren. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, Genfragmente über synthetische Doppelstrang-Oligonukleotide zu verbinden. Feng et al. fusionierten auf diese Weise Interferon-γ (IFN- γ) mit Tumornekrosefaktor-β (TNF-β), um die Eigenschaften beider Zytokine in einem Fusionsprotein zu vereinen. *In vitro* blieben die zytotoxische und antivirale Aktivität erhalten, während der antiproliferative Effekt stark anstieg (Feng et al. 1988). Auch bei diesem Ansatz war das Vorhandensein einer Restriktionsschnittstelle in der Nähe der Verbindungsstelle notwendig. Demgegenüber erlaubt die SOE-Methode höchst flexibel, nämlich *sequenzunabhängig*, die Konstruktion

rekombinanter Gene, ohne Verwendung von Restriktionsenzymen und Ligasen. Zudem erlaubt sie zusätzlich das gezielte Einfügen von Mutationen durch Veränderungen der Basensequenz der überlappenden Primer („site-directed mutagenesis“). Ho et al. mutierten auf diese Weise Maus-MHC-I-Komplex-Gene und fanden eine Erfolgsrate von 98% (Ho et al. 1989). Die Methode der SOE-PCR zum „Gene engeneering“ hat sich in den letzten Jahren gegenüber alternativen Methoden durchgesetzt. Beispiele für ihre Anwendung in jüngerer Zeit sind die Konstruktion des bifunktionellen Proteins HLS-2, das die Sequenzen des Thrombininhibitors Hirudin und des Plasminogenaktivators Staphylokinase trägt. Es stellt einen Plasminogenaktivator mit verbesserten thrombolytischen Eigenschaften dar (Wirsching et al. 2002).
Dass die Konstruktion chimärer Gene auch klinische Relevanz erlangen kann, zeigen Untersuchungen mit einer ebenfalls mittels SOE generierten E/L-Selektinchimäre (Extrazellulärdomäne von E-Selektin, Transmembranär- und Intrazellulärdomäne von L-Selektin), die in Dendritischen Zellen (DC) stabil exprimiert werden konnte. Derart veränderte DC migrieren sowohl *in vitro* als auch *in vivo* effizient in T-Zellareale peripherer Lymphknoten. Solche chimären Zelladhäsionsmoleküle könnten in Zukunft in der Gentherapie (Tumorvakzination) maligner Erkrankungen eine Rolle spielen (Robert et al. 2003).

Ein Nachteil jeder PCR-basierten Methode sind mögliche Fehler in der Basenabfolge des PCR-Produkts. Diese resultieren aus dem Einbau falscher Nukleotide durch die Polymerase. Bei Verwendung der Taq-Polymerase passiert dies mit einer statistischen Wahrscheinlichkeit von 1 pro 10^7 Nukleotiden. Für die mittels SOE konstruierten Chimären wird in der Literatur die Fehlerrate mit einem falschen Nukleotid innerhalb einer Abfolge von 1700-4000 Nukleotiden (0,025 %-0,06 %) angegeben (Ho et al. 1989; Horton et al. 1989). Diese Zahlen beziehen sich auf die Verwendung von Taq-Polymerase und die Hintereinanderschaltung von drei SOE-Reaktionen, jeweils nach vorheriger modifizierender PCR.
Bei der Konstruktion der L-Selektin/CD44-Chimärensequenz waren zwei SOE-Ansätze notwendig. Zunächst wurde die intrazelluläre L-Selektinsequenz mit der transmembranären CD44-Sequenz verknüpft, anschließend wurde die extrazelluläre L-Selektinsequenz angehängt. Um die Fehlerrate von vornherein zu minimieren, wurden alle modifizierenden PCR-Ansätze sowie alle Fusionsreaktionen mit der Proofreadingpolymerase PWO

durchgeführt. Durch ihre 5´→3´-Exonukleaseaktivität liegt ihre Fehlerrate um mindestens den Faktor zehn niedriger als die der Taq-Polymerase (Herstellerinformation Boehringer Mannheim). Zudem wurde bei jeder Reaktion die geringst mögliche Zyklenanzahl, die zu einer ausreichenden Bildung an Reaktionsprodukt führte, gewählt. Um eventuell doch aufgetretene Nukleotidfehler zu erkennen, wurde jedes Reaktionsprodukt zwischenkloniert und Fehler durch Sequenzierung ausgeschlossen. Es zeigten sich in den analysierten Klonen der insgesamt vier PCR- und zwei SOE-Ansätze keine Mutationen der Basenfolge.
Das klonierte L-Selektin/tmCD44-Gen wurde sowohl in Nalm6- als auch in K562-Zellen exprimiert. Dies eröffnete die Möglichkeit, Eigenschaften der L-Selektin/tmCD44-Chimäre in Zellen mit hoher Sheddingaktivität (K562) und in Zellen ohne „Shedding“ (Nalm6) studieren zu können.

4.2 Oberflächenexpression von Zelladhäsionsmolekülen in Leukozyten

Die Auswanderung von Leukozyten aus den Gefäßen der Mikrozirkulation bzw. der lymphatischen Organe ist für die Immunabwehr und Homöostase des Organismus unerlässlich. Sie wird über eine mehrstufige, differenziert regulierte Kaskade von Interaktionen zwischen Zelladhäsionsmolekülen und ihren Liganden auf Leukozyten bzw. Endothelzellen vermittelt (Springer 1994). Die klinische Relevanz zeigt sich bei genetischen Defekten innerhalb dieses Prozesses (Leukocyte adhesion deficiency syndrom; LAD-I/II), die zu schweren Defekten der Immunsystems mit rekurrenten bakteriellen Infektionen führen (von Andrian et al. 1993).
Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Leukozytenmorphologie zeigen eine hochdifferenzierte Oberflächenstruktur mit zahlreichen Protrusionen der Zellmembran (Van Ewijk et al. 1980). Einen Hinweis darauf, dass diese Microvilli spezialisierte Domänen mit wichtiger funktioneller Bedeutung sein könnten, erhielt man durch die elektronenmikroskopische Beobachtung, dass nicht alle Zelladhäsionsmoleküle homogen auf der Zellmembran des Leukozyten präsentiert werden. Vielmehr zeigen einige von ihnen ein spezialisiertes, auf bestimmte Mikrodomänen beschränktes Lokalisationsmuster. Erlandsen et al. untersuchten mittels Immunogoldmarkierung die leukozytäre Oberflächenverteilung von L-Selektin und dem β_2-Integrin Mac-1. Auf unaktivierten Zellen konnte L-Selektin fast ausschließlich auf den Spitzen der Microvilli detektiert werden; es lag zudem in Clustern

formiert vor. Mac-1 fand sich hingegen hauptsächlich auf dem Zellkörper, entweder einzeln oder wenig geclustert. Demgegenüber wird Mac-1 auf aktivierten neutrophilen Leukozyten hochreguliert und findet sich dann auf der gesamten Zelloberfläche, also auch auf den Microvilli, in Clustern. Hasslen et al. bestätigten diese L-Selektinlokalisation für mononukleäre Zellen (Erlandsen et al. 1993; Hasslen et al. 1995). Flowzytometrisch schätzten Simon et al. und Spertini et al. die durchschnittlich exprimierten L-Selektinmoleküle auf 65.000 pro Leukozyt (Simon et al. 1992) und 50.000 – 100.000 pro Lymphozyt (Spertini et al. 1992).

Neben L-Selektin wurde bisher nur für die α4-Integrine $\alpha_4\beta_1$ und $\alpha_4\beta_7$ (Berlin et al. 1995) und für P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (PSGL-1) (Moore et al. 1995) eine selektive Expression auf den Spitzen der Microvilli gezeigt. E-Selektin-Ligand-1 (ESL-1) wird ebenfalls bevorzugt microvillär präsentiert, jedoch nicht auf den Spitzen konzentriert (Steegmaier et al. 1997).

PSGL-1 ist ein stark glykosyliertes Sialomucin, das über Bindung von P- oder E-Selektin den initialen Kontakt zwischen Leukozyt und Endothel vermitteln kann (Asa et al. 1995). Die α4-Integrine $\alpha_4\beta_1$ (Very late antigen-4; VLA-4) und $\alpha_4\beta_7$ initialisieren unter Scherstress *in vitro* und an Lamina propria-Venolen *in vivo* L-Selektin-unabhängig über ihre Liganden Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) bzw. Mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) Bindung und Rollen von Lymphozyten (Berlin et al. 1995), sind darüber hinaus jedoch zusätzlich an dem nachfolgenden Schritt der festen Adhäsion beteiligt (Abitorabi et al. 1997). Durch Bindung an E-Selektin auf zytokinaktiviertem Endothel kann auch ESL-1 Leukozytenrollen einleiten.

Demgegenüber sind die von den Microvilli ausgeschlossenen β2-Integrine unter physiologischen Scherstressraten *in vivo* alleine nicht in der Lage, die Adhäsion von Leukozyten an entzündlich verändertem Endothel zu induzieren (Von Andrian et al. 1992). Eine Reihe weiterer Integrine, z.B. der Lamininrezeptor $\alpha_6A\beta_1$, der Vitronectinrezeptor $\alpha v\beta_3$ und der Fibronektinrezeptor $\alpha_5\beta_1$ werden auf K562-Zellen konstitutiv microvillär exprimiert. Sie haben jedoch keine etablierte Rolle in den frühen Phasen der Leukozytenadhäsion, sondern vermitteln nach erfolgter Extravasation die Migration sowie die Bindung an Proteine der Extrazellulärmatrix (Abitorabi et al. 1997). Eine Übersicht über das leukozytäre Expressionmuster der für die Extravasation wichtigen Zelladhäsionsmoleküle gibt Tabelle 1.

Zelladhäsionsmolekül	Vorkommen	Oberflächenverteilung		Funktionen
		Microvilli	Zellkörper	(bei Zelladhäsion)
L-Selektin	Gr, Mo, Lym	+		Capture, Rolling
PSGL-1	Gr, Mo, Lym	+		Capture, Rolling
$\alpha_4\beta_1$-Integrin (VLA-4)	Mo, Lym	+		Capture, Rolling, feste Adhäsion
$\alpha_4\beta_7$-Integrin	Lym	+		Capture,Rolling, feste Adhäsion, Homing
ESL-1	Gr, Mo, Lym	+		Rolling
$\alpha_L\beta_2$-Integrine	Gr, Mo, Lym		+	Feste Adhäsion, Transmigration
$\alpha_M\beta_2$-Integrine	Gr, Mo		+	Feste Adhäsion, Transmigration
CD44	Gr, Mo, Lym, epitheliale Zellen Fibroblasten		+	Feste Adhäsion, Rolling (aktivierte Lymphozyten)
CD31 (PECAM-1)	Gr, Mo, Lym	+	+	Transmigration

Tabelle 1: Oberflächenverteilung wichtiger Zelladhäsionsmoleküle auf Leukozyten. Gr = Granulozyten; Mo = Monozyten; Lym = Lymphozyten; PSGL-1 = P-Selectin-Glykoprotein-Ligand-1; VLA-4 = Very Late Antigene-4; ESL-1 = E-Selektin-Ligand-1; PECAM-1 = Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule; während L-Selektin, PSGL-1, VLA-4 und $\alpha_4\beta_7$-Integrin auf den Spitzen der Microvilli konzentriert sind, wird ESL-1 auf dem gesamten Microvillus verteilt exprimiert. PECAM-1 ist ohne Präferenz gleichmäßig über die gesamte Zelloberfläche verteilt.

Zusammengenommen unterstreichen diese Ergebnisse, dass der initiale Kontakt zwischen dem Endothel und Leukozyten im Rahmen der Zelladhäsionskaskade nur durch Bindung von L-, P- und E-Selektin oder den α_4-Integrinen an ihre Liganden vermittelt werden kann. Man bezeichnet sie als *primäre* Adhäsionsmoleküle. Sowohl L-Selektin als auch der P-/E-Selektinligand PSGL-1 und die α4-Integrine sind selektiv auf den Spitzen leukozytärer Microvilli lokalisiert, auch der E-Selektinligand ESL-1 befindet sich auf Membranprotrusionen. Auf der anderen Seite sind die auf den Microvilli nicht vorhandenen β2-Integrine alleine nicht in der Lage, eine Adhäsion unter Flussbedingungen zu etablieren.

Die vom Endothel aus in das Gefäßlumen ragenden Glykosaminoglykane tragen negative Ladungen und bilden für die durch ihre Glykokalix ebenfalls negativ geladenen Leukozyten eine sterische sowie elektrostatische Barriere, die durch vorhandene Membranprotrusionen besser überwunden werden könnte. Microvillär positionierten Zelladhäsionsmolekülen würde

es hierdurch leichter ermöglicht, eine Bindung mit ihren endothelialen Liganden einzugehen (Lichtman et al. 1970; Pelikan et al. 1979; Zhao et al. 2001; Truskey et al. 2002).
Zusammenfassend legen diese Befunde den Schluss nahe, dass die topographisch differenzierte Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Leukozytenoberfläche für eine effiziente Zelladhäsion und damit letztlich für eine funktionierende Immunabwehr notwendig ist.

4.2.1 Funktionelle Relevanz der differenzierten Lokalisation leukozytärer Adhäsionsmoleküle

Um den Einfluss der Rezeptortopographie von L-Selektin auf das Bindungsverhalten *in vitro* zu testen, transfizierten von Andrian et al. Lymphoidzellen (murine L 1-2 Prä-B-Zellen) mit durch SOE generierten L-Selektin/CD44-Chimären. Im Gegensatz zu der in der vorliegenden Arbeit konstruierten Chimäre bestanden diese entweder aus dem extrazellulären Abschnitt von L-Selektin, gekoppelt an den transmembranären und intrazellulären Teil von CD44 (L-CD44), oder umgekehrt aus dem extrazellulären Abschnitt von CD44, gekoppelt an die transmembranäre und die intrazelluläre Domäne von L-Selektin (CD44-L). CD44 wurde gewählt, da dieses Protein eine dem L-Selektin konträre Oberflächenverteilung besitzt: Es findet sich auf dem planen Zellkörper, nicht jedoch auf den Microvilli und zeigt nur selten Clustering. Mittels Immunogoldfärbung zeigten die Autoren, dass die L-CD44-Chimäre eine dem Wildtyp-CD44 ähnliche Expression auf dem planen Zellkörper aufweist, mit variabler Tendenz zur Clusterbildung. Demgegenüber entspricht die CD44-L-Chimärenexpression der Wildtyp-L-Selektin-Verteilung mit Clustering auf den distalen Enden der Microvilli. Die Lokalisation von L-Selektin und CD44 ist somit *unabhängig* von ihren Ektodomänen.
Mit beiden Chimären und den Wildtypzellen wurden Bindungsassays mittels immobilisierter monoklonaler Antikörper (DREG-200 für L-Selektin und Hermes-1 für CD44) sowohl unter statischen Bedingungen als auch unter Flussbedingungen durchgeführt. Während sich das Bindungsverhalten zwischen den Chimären bzw. den Wildtypzellen unter statischen Bedingungen nicht unterschied, adhärierten unter Flussbedingungen Zellen, die ihre Rezeptoren in geclusterter Form auf den Spitzen der Microvilli präsentierten (CD44-L; WT-L-Selektin), hochsignifikant effektiver gegenüber denjenigen mit nicht-microvillärer Rezeptorposition (L-CD44; WT-CD44). Der Effekt verstärkte sich mit steigenden

Scherstress-/Flussraten noch. Dieses Ergebnis wurde in einem Bindungsassay mit dem physiologischen Liganden Peripheral lymph node addressine (PNAd) bestätigt (von Andrian et al. 1995).

In diesen Studien konnte erstmals gezeigt werden, dass die Gruppierung von Zelladhäsionsmolekülen auf den am meisten distal gelegenen Bereichen der Leukozyten, den Spitzen der Microvilli, für eine effiziente Kontaktinitialisierung mit endothelialen Liganden funktionell wichtig ist.

Dieses allgemeine Funktionsprinzip konnte durch Untersuchungen an Integrinchimären bestätigt werden. Die Integrine $\alpha L\beta_2$ (LFA-1; CD11a/CD18) und $\alpha M\beta_2$ (Mac-1; CD11b/CD18) werden normalerweise ausschließlich nicht-microvillär exprimiert und vermitteln die feste Adhäsion, nicht jedoch initiale Adhäsionsschritte. Nach Austausch ihrer Extrazellulärdomäne (EZD) und Transmembrandomäne (bei LFA-1) bzw. nur der EZD (bei Mac-1) durch die homologen Domänen des Integrins $\alpha_4\beta_7$ kommt es in K562-Zellen zu einer Änderung ihrer Oberflächenverteilung vom Zellkörper auf die Microvilli. Dieser Shift befähigte die Integrinmutanten zur effizienten Initialisierung der Adhäsion auf ihrem Liganden MAdCam-1 unter Flussbedingungen *in vitro* (Abitorabi et al. 1997). Tabelle 2 (Seite 45) fasst die leukozytäre Lokalisation bislang untersuchter chimärer Zelladhäsionsmoleküle zusammen.

Die Adhäsionsbedingungen in der Flusskammer unterscheiden sich in mehreren Punkten deutlich von denen *in vivo*. Die Scherraten in der Endstrombahn sind höher (Firrell et al. 1989), elektrostatische Abstoßungsphänomene zwischen der negativ geladenen Glykokalix von Leukozyten und Endothel treten auf (Lichtman et al. 1970; Pelikan et al. 1979), und die Gravitationskraft, die auf Zellen in Flusskammern stets orthogonal zur Strömungsrichtung einwirkt, spielt keine Rolle.

Chimäres Konstrukt	Schematische Struktur (EZD) (IC)	Oberflächenverteilung Microvilli	Oberflächenverteilung Zellkörper	Adhäsionseigenschaften
L/tmCD44		???	???	???
L/CD44			+	Kontaktinitiierung/ Rollen auf Liganden / EC ↓ (bzgl. WT- L-Selektin)
CD44/L		+		Kontaktinitiierung/ Rollen *in vitro* auf Liganden ↑ (bzgl. WT-CD44)
E/L		+		Fraktion rollender Zellen > WT-E-Selektintransfektanten; v_{ROLL}< WT-L
L/CD31		+	+	Kontaktinitiierung/ Rollen auf EC < WT-L, aber > L/CD44
$\alpha_4\beta_7$(αL β2 c)		+		Unveränderte Positionierung auf Microvilli → erhaltene effiziente Adhäsion
$\alpha_4\beta_7$(αM β2 tc)		+		Unveränderte Positionierung auf Microvilli → erhaltene effiziente Adhäsion

Tabelle 2: Übersicht zur Oberflächenverteilung chimärer Zelladhäsionsmoleküle. Bezeichnungen der Chimären entsprechen den in der Literatur verwendeten. L/tmCD44: TM von CD44, EZD/IC von L-Selektin; L/CD44: EZD von L-Selektin, TM/IC von CD44; CD44/L: EZD von CD44, TM/IC von L-Selektin; E/L: EZD von E-Selektin, TM/IC von L-Selektin; L/CD31: EZD von L-Selektin, TM/IC von CD31 (PECAM-1); $\alpha_4\beta_7$(αL β2 c): EZD/TM von $\alpha_4\beta_7$, IC von αL und β_2; $\alpha_4\beta_7$(αM β2 tc): EZD von $\alpha_4\beta_7$, TM/IC von αM und β_2. v_{ROLL}: Rollgeschwindigkeit

Dass die microvilläre Positionierung von Zelladhäsionsmolekülen für die Kontaktinitiierung unter *in vivo*-Bedingungen relevant ist, belegten Stein et al. . Sie führten mit den oben genannten Chimären sowie mit analog konstruierten L/E-Selektin- und L/CD31-Chimären (Ektodomäne von E-Selektin + TM/IC-Domäne von L-Selektin bzw. Ektodomäne von L-Selektin + TM/IC-Domäne von CD31) Intravitalmikroskopie-Studien an peripheren Lymphknoten der Maus durch. Leukozyten adhärieren und rollen hier im Bereich der HEV im Rahmen des Homings durch Bindung von L-Selektin an den Liganden PNAd (von Andrian 1996). E-Selektin und CD31 (PECAM-1) sind ohne Präferenz für eine bestimmte Mikrodomäne über die gesamte Leukozytenoberfläche gleichmäßig verteilt. Wie bei den oben beschriebenen L-CD44-Chimären wurde auch in diesen Untersuchungen die Verteilung der Fusionsproteine durch deren TM/IC-Segment bestimmt: E-L wird analog WT-L-Selektin bzw. CD44-L auf den Spitzen der Microvilli exprimiert, L-CD31 analog WT-CD31 bzw. WT-E-Selektin ohne Präferenz gleichmäßig über den Leukozyten verteilt (siehe Tabelle 2).
Bezüglich der Fraktion rollender Zellen zeigte sich eine starke Abhängigkeit von der Topographie der Ektodomänen von L- bzw. E-Selektin. Die Fähigkeit der Transfektanten, Rollen zu initiieren, war bei microvillärem Verteilungsmuster am größten, gefolgt von gleichmäßiger Verteilung, während bei Lokalisation auf dem planaren Zellkörper die Fraktion rollender Zellen am geringsten war. Dieser Effekt war in Venolen mit einem größeren Durchmesser (20-40 µm) signifikant ausgeprägter als in schmaleren (10-20 µm). Die mittlere Rollgeschwindigkeit war bei E-Selektin-vermitteltem Rollen signifikant langsamer als das Rollen über L-Selektin bei vergleichbarer Expressionsmenge der Ektodomänen und vergleichbaren Flussraten, vielleicht aufgrund unterschiedlicher Bindungsstellen an PNAd (Berg et al. 1992; Mebius et al. 1993) mit entsprechend rascherer Bindungsformierung und -dissoziation von L-Selektin im Vergleich zu E-Selektin (Puri et al. 1997). Zudem war die Rollgeschwindigkeit einer Chimäre *nach* der Kontaktinitiierung nur abhängig von der Art der vorhandenen Ektodomäne, nicht jedoch von dessen Oberflächenlokalisation.
Im Gegensatz zum Verhalten *in vitro* war der Anteil rollender Zellen von WT-L-Selektin- und L-CD44-Transfektanten *in vivo* unabhängig von der Scherrate (Stein et al. 1999). Diese Diskrepanz erklärt sich möglicherweise daraus, dass Flusskammern normalerweise mit zellfreien Flüssigkeiten durchströmt werden, während in Venolen die Annäherung der Leukozyten an das Endothel durch Kollision mit Erythrozyten in Abhängigkeit von der Scherrate erleichtert bzw. verstärkt wird (Schmid-Schonbein et al. 1980; Melder et al. 1995;

Munn et al. 1996; Melder et al. 2000). Die *in vivo* auftretenden Scherraten übersteigen die in Flusskammern möglichen deutlich (Firrell et al. 1989). Bei höheren Scherraten ergeben sich einerseits kürzere Kontaktzeiten mit dem Endothel, andererseits werden die Kollisionen mit Erythrozyten häufiger und führen zu einer stärkeren Margination der Leukozyten. Hierdurch könnten Microvilli stärker abgeschert und der Leukozyt stärker deformiert werden mit der Folge, dass weitere auf dem Zellkörper lokalisierte Adhäsionmoleküle effizienter mit ihren endothelialen Liganden interagieren. Diese beiden entgegengesetzt wirkenden Mechanismen heben sich über einen weiten Scherratenbereich gegenseitig auf (Stein et al. 1999). Mit diesem Konzept könnte darüber hinaus die Beobachtung, dass nach Einleitung des Rollvorgangs die Rollgeschwindigkeit für ein Rezeptorpaar unabhängig von der Lokalisation der Ektodomäne ist, erklärt werden.

Auch für den ausgeprägteren Vorteil, den die microvilläre Lokalisation der Rezeptoren in postkapillären Venolen mit einem Durchmesser von >20 µm im Vergleich zu solchen mit <20 µm hat, könnten die in kleineren Venolen verstärkt auftretenden Leukozyt-Erythrozyt-Kollisionen verantwortlich sein. Aufgrund seines Durchmessers wird ein Leukozyt vom Plasmastrom durch die Kapillaren gezwängt. Hierbei wird er von Plasma umströmt, so dass sich vor ihm eine zellfreie Plasmasäule befindet, während sich hinter ihm Erythrozyten aufgereiht ansammeln (Schmid-Schonbein et al. 1980). Gelangt der Leukozyt in eine postkapilläre Kapillare (<20µm), besitzen die akkumulierten flexiblen Erythrozyten genügend Platz, den relativ steifen und massenträgen Leukozyten zu passieren. Hierbei bekommt er einen Impuls in Richtung Gefäßwand, und das Abscheren der Microvilli könnte die Verfügbarkeit von auf dem Zellkörper lokalisierten Ektodomänen für die Kontaktinitiierung mit dem Endothel erhöhen. Sobald der Leukozyt in größerkalibrige Venolen (>20 µm) gelangt, fällt dieser Effekt aufgrund weniger heftiger Erythrozytenkollisionen geringer aus. (Stein et al. 1999). Zusätzlich unterscheidet sich das Oberflächenrelief des Endothels von Venolen unterschiedlichen Kalibers. Während es in das Lumen der direkt postkapillär angeordneten Venolen (IV. und V. Ordnung) unregelmäßig hineinragt, sind diese Oberflächenerhebungen in weiteren Venolen (II. und III. Ordnung) weniger ausgeprägt (De Bruyn et al. 1990), was zusätzlich zur Bedeutung der Microvilli in diesen Gefäßabschnitten beitragen könnte.

Auch nach artifizieller Veränderung der Zelloberflächenstruktur wurde das Bindungsverhalten von Leukozyten auf Oberflächen, die mit P- und E-Selektin gecoatet waren, untersucht. Die Leukozyten wurden entweder mit Cytochalasin B behandelt, wodurch das Aktinzytoskelett der Zelle zerstört wird, oder in hypoosmolarem Medium inkubiert, was zu einer Zellschwellung führt. Die Anzahl der Microvilli verringerte sich um 47% (Cytochalasin B) bzw. 80 % (hypotone Schwellung). Während Cytochalasin B die Länge der verbliebenen Microvilli nicht veränderte, waren sie bei hypoton geschwollenen Zellen um ca. 33 % verkürzt. Die so veränderten Zellen zeigten auf E- und P-Selektin *in vitro* eine deutlich verminderte Fähigkeit zur Kontaktinitiierung, die Stärke des nachfolgenden Rollens wurde entweder erhöht (Cytochalasin B, hypotone Zellen bei Rollen auf E-Selektin) oder blieb unverändert erhalten (hypotone Zellen bei Rollen auf P-Selektin). Offenbar sind Tethering und Rolling unabhängig voneinander regulierbar und Microvilli sind in der Lage, selektiv Tethering zu verbessern. Da bei Cytochalasin B-behandelten Zellen noch eine nicht unerhebliche Anzahl an restlicher Microvilli vorhanden waren, diese Zellen jedoch trotzdem stark vermindertes Tethering zeigen, scheint die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Microvilli bzw. auf deren Spitzen nicht ausreichend für effektives Tethering zu sein (Finger et al. 1996). Dies bestätigen Untersuchungen mit einer L-Selektinmutante, bei der elf Aminosäuren C-terminal deletiert sind (LΔcyto). Diese Mutante wird unverändert microvillär exprimiert, besitzt jedoch keinen Kontakt zum Zytoskelett und vermittelt nur insuffizient Tethering (Kansas et al. 1993; Pavalko et al. 1995). Offenbar sind Microvilli eine Mikrodomäne, in der eine stabile Verankerung von Oberflächenrezeptoren in der Zellmembran ermöglicht wird (Dwir et al. 2001). Bei der Ligand-Rezeptor-Interaktion *in vivo* treten hydrodynamische Zugkräfte auf, die hydrophobe Anker aus einer Phospholipdmembran reißen können (Leckband et al. 1995). Durch im Microvillibereich gebündelte und mit der Zellmembran eng vernetzte Aktinfilamente des Zytoskeletts können Rezeptoren in diesem Bereich besonders effektiv stabilisiert werden, damit sie den auftretenden Zugkräften und lateralen Verschiebungen während des Adhäsionsvorgangs widerstehen (Finger et al. 1996). Als Antwort auf die Zugkräfte kommt es darüber hinaus zu einer Dehnung mit Längenzunahme des Microvillus. In Abhängigkeit von der Größe der Zugkraft kommt es zunächst zu einer Elongation, später zur Bildung eines langen dünnen fadenförmigen Membranzylinders („Tether“). Im Gegensatz zu einem rigiden, nicht dehnbaren Microvillus können sowohl Microvillusextension als auch Membranzylinderbildung die auf die adhäsive

Bindung wirkenden Zugkräfte reduzieren, die Bindungszeit bei hohen physiologischen Scherraten verlängern und somit die Ligand-Rezeptor-Interaktion microvillär lokalisierter Zelladhäsionsmoleküle stabilisieren (Shao et al. 1996; Shao et al. 1998; Park et al. 2002). Interessanterweise konnten ähnliche Untersuchungen mit einer auf die membrannahen vier Aminosäuren gekürzte PSGL-1-Mutante (PSGL-1Δcyto) zeigen, dass auch für das ebenfalls auf den Spitzen der Microvilli konzentrierte PSGL-1 die Anbindung der zytoplasmatischen Domäne an das Aktinzytoskelett für effektives Rollen notwendig ist. Dementsprechend führte auch die pharmakologische Hemmung der Aktin-PSGL-1-Bindung zu einer Reduktion des Leukozytenrollens auf P-Selektin (Snapp et al. 2002).
Tabelle 3 fasst die Einflüsse morphologischer Faktoren auf die Leukozytenadhäsion zusammen.

Strukturelle/Morphologische Determinanten der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion:	
+	▪ Lokalisation primärer CAM auf Microvilli
	▪ Elongation/ „Tetherbildung“ von Microvilli durch Zugkräfte
	▪ Erythrozyten-Leukozyten-Kollisionen postkapillär
	▪ Oligomerisation („Clustering“) von CAM
	▪ Anbindung von Teilen der CAM mit dem Zytoskelett
–	▪ Elektrostatische Abstoßungsphänomene (Glykokalix)
	▪ „Shedding“ von CAM
	▪ niedrige Ligandendichte
	▪ glattes Oberflächenrelief der Endothelzellen

Tabelle 3: Übersicht über die Zelladhäsion beeinflussende morphologische Faktoren. (Einzelheiten siehe Text; +: begünstigende Faktoren; - : hemmende Faktoren; CAM: Zelladhäsionsmoleküle)

Interessanterweise ist das Adhäsionsmolekül CD44 in der Lage, sowohl bei aktivierten Lymphozyten als auch bei murinen klonalen B- und T-Lymphoidzellen als *primäres* Adhäsionsmolekül zu agieren, d.h. Rollen über seinen Liganden Hyaluronsäure zu vermitteln (siehe Tabelle 1). Dies wurde sowohl in Flusskammerexperimenten mit Endothelzell-Monolayern als auch *in vivo* an zu einem entzündlichen Areal drainierenden Lymphknoten bzw. dem Peritoneum demonstriert. Durch lösliche Hyaluronsäure (HA) oder monoklonale Antikörper gegen CD44 konnte das Rolling verhindert werden (DeGrendele et al. 1996;

DeGrendele et al. 1997). Kürzlich wurde auch CD44-vermitteltes Rollen aktivierter T-Lymphozyten auf dem Glykosaminoglykan Chondroitinsulfat (CS) *in vitro* sowie im Bereich hepatischer Sinusoidalzellen *in vivo* nachgewiesen (Murai et al. 2004). Dies ist deshalb bemerkenswert, weil CD44, zumindest bei ruhenden Zellen, *nicht* auf den Microvilli exprimiert wird, sondern lediglich auf dem planen Zellkörper nachweisbar ist (von Andrian et al. 1995). Wie es durch Aktivierung von Lymphozyten zur Ausbildung einer für HA bzw. CS hochaffinen CD44-Form kommt, ist nicht bekannt. Eine hypothetische Erklärung könnte jedoch sein, dass es durch die Aktivierung von Lymphozyten zu einer Umverteilung des CD44 vom glatten Zellkörper auf die Microvilli kommt. Hier würde es in geclusterter Form exponiert und für HA bzw. CS präsentiert werden können. Da durch CD44-Antikörper das lymphozytäre Homing nichtaktivierter Zellen weitgehend unbeeinflusst bleibt, die Extravasation aktivierter T- und B-Zellen in entzündlich veränderte Regionen jedoch abgeschwächt werden kann, stellen Hemmstoffe gegen CD44 vielleicht neuartige antientzündliche Wirkstoffe mit nur geringem immunsupressivem Nebenwirkungspotential dar (DeGrendele et al. 1996; Pure et al. 2001).

4.2.2 Mechanismen der microvillären Lokalisation von L-Selektin

Die Mechanismen, die für die dynamische Ausbildung der komplexen Oberfläche von Leukozyten, für die selektive Lokalisation von L-Selektin auf den Spitzen der Microvilli sowie für die differenzierte Oberflächenexpression anderer Adhäsionsmoleküle in bestimmten Mikrokompartimenten der Zelloberfläche verantwortlich sind, sind kaum bekannt.

Durch Analyse des Expressionsmusters der Chimären L/CD44 und CD44/L konnte eine Rolle der extrazellulären Domäne von L-Selektin in Bezug auf sein Expressionsmuster ausgeschlossen werden. CD44/L wird fast ausschließlich microvillär exprimiert, L/CD44 hingegen ganz überwiegend auf dem planen Zellkörper (von Andrian et al. 1995). Die Oberflächenverteilung von L-Selektin wird somit durch die transmembranäre und/oder die zytoplasmatische Domäne determiniert. Demgegenüber konnten Abitorabi et al. zeigen, dass die microvilläre Lokalisation des Integrins $\alpha_4\beta_7$ unabhängig von dessen zytoplasmatischem und transmembranärem Anteils ist, sondern vielmehr durch die Extrazellulärdomäne determiniert wird (Abitorabi et al. 1997).

Die zytoplasmatische Domäne von L-Selektin besteht aus 17 Aminosäuren. Da sie speziesspezifisch hochkonserviert ist, während im Vergleich zu E- und P-Selektin keine Sequenzhomologie besteht, scheint ihr eine funktionell wichtige Bedeutung zuzukommen (Bevilacqua et al. 1993). Für P-Selektin ist bekannt, dass durch dessen zytoplasmatische Domäne das „Sorting“, d.h. der gezielte Transport in die Weibel-Palade-Körper der Endothelzellen und in α-Granula der Thrombozyten, reguliert wird (Disdier et al. 1992). Bei der zytoplasmatischen Domäne von L-Selektin kann man eine membranproximale von einer membrandistalen Region unterscheiden. Die membrandistale Region interagiert direkt mit dem aktinbindenden Protein α-Actinin und bildet einen Komplex mit zwei weiteren Proteinen des Zytoskeletts, Vinculin und Talin (Pavalko et al. 1995). Bindung an α-Actinin ist für β_2-Integrine nach Aktivierung von neutrophilen Granulozyten bzw. T-Lymphozyten beschrieben, demgegenüber ist die Interaktion von L-Selektin mit α-Actinin konstitutiv (Pavalko et al. 1993). Die Bindung von L-Selektin an das detergenzunlösliche Zytoskelett dagegen ist nicht konstitutiv, sondern wird durch Quervernetzung der Lektindomäne mit monoklonalen Antikörpern, Bindung an den natürlichen HEV-Liganden GlyCAM-1 (Glykoproteine cell adhesion molecule-1) oder durch Hyperthermie induziert (Wang et al. 1998; Evans et al. 1999). Der LΔcyto-Mutante fehlen die elf membrandistalsten Aminosäuren und Bindung an α-Actinin oder Vinculin ist nicht nachweisbar. Dennoch wird LΔcyto wie WT-L-Selektin microvillär lokalisiert (siehe Tabelle 4). Dies spricht gegen eine Bedeutung der membrandistalen zytoplasmatischen Region für die Lokalisation des Rezeptors (Pavalko et al. 1995).

Für die sechs Aminosäuren umfassende membranproximale zytoplasmatische Domäne von L-Selektin konnten erstmals Ivetic et al. eine Interaktion mit den Proteinen Ezrin und Moesin der ERM (Ezrin/Radixin/Moesin)–Familie nachweisen. Während Ezrin konstitutiv bindet, ist für die Moesinbindung die Aktivierung von Leukozyten durch PMA (Phorbolmyristatacetat) nötig. Diese Interaktion wird wahrscheinlich über die Proteinkinase C (PKC) vermittelt, da sie durch einen PKC-Inhibitor verhindert werden kann. Basische Aminosäuren im zytoplasmatischen membranproximalen Bereich scheinen generell für die Bindung von ERM-Proteinen an einige Zelladhäsionsmoleküle kritisch zu sein. Untersuchungen, bei denen diese basischen Aminosäuren durch Alanin ersetzt wurden, zeigten, dass alle acht basischen Aminosäuren im zytoplasmatischen Schwanz von L-Selektin zur Moesinbindung beitragen. Hierbei kommen dem Arginin an Position 357 und dem Serin an Position 362 offenbar die

größte Bedeutung zu, sie wurden als essentiell für die Interaktion mit Moesin identifiziert (Ivetic et al. 2002; Ivetic et al. 2004). Arg357-Mutation verhindert darüber hinaus die Bindung von Ezrin (Ivetic et al. 2002). Auch die Bindung von PSGL-1 an Moesin und die von CD44 an Ezrin erfolgen an zytoplasmatische Bindungsmotive aus basischen Aminosäuren (Legg et al. 1998; Serrador et al. 2002).

Die Proteine der ERM-Gruppe liegen überwiegend in einer inaktiven Form vor, bei der sie durch Aneinanderlagerung ihrer N- und C-Termini gefaltete Monomere oder Di- bis Oligomere bilden. Sie können u.a. durch Phosphorylierung eines konservierten Threonins entfaltet und dadurch aktiviert werden (Gary et al. 1993; Gautreau et al. 2000). In dieser Form können sie als Ankerproteine zwischen dem F-Aktin des kortikalen Zytoskelettes und Molekülen der Plasmamembran dienen und sind daher prädestiniert, die sehr raschen dynamischen Änderungen in Zellmorphologie und Rezeptorverteilung während der Zelladhäsionskaskade mitzubedingen (Bretscher et al. 2002). So werden ERM-Proteine bei der Migration an den vom chemotaktischen Gradienten weg gerichteten Pol des Leukozyten, dem sogenannten Uropod, lokalisiert (Serrador et al. 1999). Hier führen sie zu einer Umverteilung der Zelladhäsionsmoleküle PSGL-1 (Lorant et al. 1995; Bruehl et al. 1997), CD44, CD43 und ICAM-3 in den Uropodbereich, wodurch die transendotheliale Migration des Leukozyten unterstützt werden kann (Alonso-Lebrero et al. 2000).

ERM-Proteine scheinen auch für die Positionierung von L-Selektin in der Zellmembran wichtig zu sein. Elektronenmikroskopische Untersuchungen mit den o.g. L-Selektin-Alaninmutanten R357A und K362A zeigten eine im Vergleich zum WT-L-Selektin *reduzierte* microvilläre Expression auf Lymphozyten (siehe Tabelle 4). Da die Interaktion zwischen Moesin und L-Selektin an die Zellaktivierung (z.B. durch PMA) gebunden ist, das microvilläre Expressionsmuster von L-Selektin jedoch unabhängig vom Aktivierungszustand der Zelle besteht, wird angenommen, dass hierfür die konstitutive Bindung von Ezrin, und nicht die induzierbare Bindung von Moesin an L-Selektin verantwortlich ist. Vergleicht man das Oberflächenverteilungsmuster der beiden L-Selektinmutanten quantitativ, so zeigt sich das L-Selektinverteilungsmuster bei der R357-Mutante ausgeprägter beeinflusst/verschoben als bei der K362-Mutante (Ivetic et al. 2002; Ivetic et al. 2004). Dies spricht dafür, dass Arg357 für die Bildung eines stabilen Ezrin/L-Selektinkomplexes wichtiger ist als Ser362.

L-Selektin-mutanten	Struktur des modifizierten zytoplasmatischen Abschnitts	Oberflächenverteilung / Merkmale
LΔcyto	R R L K K G	▪ erhaltene Positionierung auf Microvilli ▪ kein Kontakt zum Zytoskelett ▪ nur insuffizientes „Tethering“
R357A / K362A	R357A K362A R R L K K G K K S K R S M N D P Y –COOH	▪ reduzierte microvilläre Expression ▪ „Tethering“/Rollen ↓ (auf PSGL-1 *in vitro*) ▪ PMA-induziertes „Shedding“ ↓

Tabelle 4: Übersicht über die Merkmale der L-Selektinmutanten LΔcyto (Pavalko et al. 1995) und R357A bzw. K362A (Ivetic et al. 2004). Unter „Adhäsionseigenschaften/Merkmale“ sind die Hauptcharakteristika der veränderten L-Selektinformen aufgeführt. Die Abbildungen zeigen die intrazelluläre AS-Sequenz im Detail. LΔcyto ist eine um C-terminal elf AS verkürzte L-Selektinmodifikation. Bei R357A und K362A wurde eine AS gegen Alanin ausgetauscht (Einzelheiten siehe Abbildung und Text).

Diese Ergebnisse schließen nicht aus, dass noch weitere Proteine außerhalb der ERM-Gruppe an der Positionierung von L-Selektin auf den Microvilli beteiligt sind, indem sie an Ser362 und/oder andere Motive von L-Selektin binden.

Weiterhin ist unklar, ob die zytoplasmatische Domäne allein für die Lokalisation in Microvilli verantwortlich ist. Welche Rolle die hochkonservierte Transmembrandomäne von L-Selektin spielt, wurde bisher nicht untersucht. Dies ist durch die in dieser Arbeit konstruierte L-Selektin/tmCD44-Chimäre nun in Folgeuntersuchungen möglich.

Komplizierend kommt hinzu, dass das Oberflächenexpressionsmuster für einige an ERM-Proteine gekoppelte Adhäsionsmoleküle zelltypspezifisch ist. So wird CD44 unabhängig von seiner Interaktion mit ERM-Proteinen in Melanomzellen microvillär exprimiert, und das üblicherweise microvillär lokalisierte PSGL-1 zeigt in K562-Zellen unabhängig von seiner Moesinbindung eine gleichmäßige Verteilung über die Zelloberfläche (Legg et al. 1998; Snapp et al. 2002).

Auch für Adhäsionsmoleküle aus der Gruppe der Integrine ist der Mechanismus der Positionierung auf der Zelloberfläche nicht bekannt. Zumindest bei α_4-Integrinen kommt der, bei L-Selektin irrelevanten, EZD eine entscheidende Rolle zu, während Transmembran- und

zytoplasmatische Domäne keine Bedeutung haben. Welche Abschnitte der EZD beteiligt sind, wurde nicht untersucht. Man nimmt an, dass die Integrin-EZD mit weiteren vorwiegend microvillär lokalisierten Proteinen interagieren und dass hierüber ihre Verteilung auf der Zelloberfläche determiniert wird. So können CD47 mit der EZD von $\alpha v\beta 3$ (Lindberg et al. 1996) und die Proteine CD53, CD63, CD81 und CD82 der Tetraspan-Transmembrandomänen-Familie mit den EZD der microvillär lokalisierten α_4-Integrine und von $\alpha_6\beta_1$ (Lamininrezeptor) assoziieren, nicht jedoch mit auf dem Zellkörper exprimiertem $\alpha_L\beta_2$ (LFA-1). Mutationen der α_4-Untereinheit im Extrazellulärbereich verhindern diese Assoziationen, während Mutationen im zytoplasmatischen Abschnitt keinen Einfluss haben (Mannion et al. 1996; Abitorabi et al. 1997; Berditchevski et al. 1997). Andere microvilläre Integrine wie der Fibronektinrezeptor $\alpha_5\beta_1$ assoziieren nicht mit den oben genannten Proteinen, so dass noch weitere Mechanismen an der Membranpositionierung von Integrinen beteiligt sein müssen.

Ein weiteres Merkmal der Oberflächentopographie von L-Selektin besteht darin, das viele L-Selektinmoleküle eng gruppiert als „Adhäsionskomplex“ in der Membran verankert sind. Es wird postuliert, dass dieses so genannte „Clustering“ die Verfügbarkeit von L-Selektin für seine Liganden verbessert sowie die initiale Bindung an und das Rollen auf Endothelzellen durch Verstärkung der L-Selektin/Rezeptor-Interaktion stabilisiert (von Andrian et al. 1995). Clustering ist auch für β2-Integrine bekannt, allerdings erst nach Leukozytenaktivierung, während es bei L-Selektin konstitutiv nachweisbar ist (Erlandsen et al. 1993). Ebenso liegt PSGL-1 auf den Spitzen der Microvilli in Clustern vor, es wird allerdings im Verlauf der Zelladhäsionskaskade in den Uropodbereich umverteilt (Lorant et al. 1995; Moore et al. 1995). Dagegen weist CD44 kein Clustering aufweist. Clustering ist ein insgesamt kaum untersuchtes Phänomen. Durch welche Molekülabschnitte es bei L-Selektin vermittelt wird und ob hierfür weitere Linkerproteine notwendig sind, ist nicht untersucht.
Da die CD44/L-Chimäre Clustering weiterhin aufweist (s.o.), wohingegen es bei der L/CD44-Chimäre nur schwach oder gar nicht nachweisbar ist (von Andrian et al. 1995), scheint insbesondere dem TM- und/oder dem IC-Teil von L-Selektin eine Bedeutung zuzukommen. Die L-Selektin/tmCD44-Chimäre stellt ein geeignetes Werkzeug dar, eine mögliche Rolle der Transmembrandomäne für Clustering von L-Selektin zu überprüfen.

4.3 Shedding von L-Selektin und der L/tmCD44-Chimäre

Die Abspaltung („Shedding“) der Extrazellulärdomäne von L-Selektin kann durch Aktivierung von Leukozyten ausgelöst werden und besitzt wahrscheinlich physiologische bzw. pathophysiologische Bedeutung. Die abgespaltete sL-Selektin-Form ist funktionell aktiv, kann kompetitiv L-Selektinliganden besetzen und erlangt dadurch immunmodulatorische Bedeutung (siehe Einleitung Kapitel 2.5.3). So sind erniedrigte sL-Selektinspiegel ein Prädiktor für die Entwicklung eines ARDS (Acute respiratory distress syndrom) (Donnelly et al. 1994; Stengel et al. 2004), erhöhte Spiegel sind mit verschiedenen autoimmunologischen, entzündlichen oder infektiologischen Krankheitsbildern assoziiert (Lampeter et al. 1992; Spertini et al. 1992; Spertini et al. 1994).
Die L-Selektin-Sheddingproteasen sind bisher nicht zweifelsfrei identifiziert. Sie gehören zur Gruppe der Matrixmetalloproteasen, sind Zink-abhängig und durch einen Hydroxamat-Proteaseinhibitor (Ro 31-9790) hemmbar (Feehan et al. 1996; Preece et al. 1996). Experimentelle Daten deuten auf das Enzym TACE (TNF-α converting enzyme) als Kandidat hin. In fetalen Thymozyten wird L-Selektin durch TACE aktivierungsabhängig gespalten (Kahn et al. 1994). Da das punktförmige Verteilungsmuster von TACE in THP-1 und Jurkat-Zellen dem von L-Selektin ähnelt, wurde postuliert, dass die extrem schnelle Kinetik des L-Selektinsheddings durch Co-Lokalisation von Sheddase und Substrat auf den Spitzen der Microvilli bedingt ist (Doedens et al. 2000). Andererseits konnte durch Untersuchungen der Chimären L/CD44 und L/CD31 gezeigt werden, dass L-Selektinshedding in diesen Fällen unabhängig von der Oberflächenverteilung der L-Selektinektodomäne möglich ist (Fors et al. 2001). Dies wird durch eigene Untersuchungen zum Shedding der L-Selektin/tmCD44-Chimäre unterstützt. In K562-Transfektanten konnte Shedding der Chimäre unverändert nachgewiesen werden, d.h. ein isolierter Austausch der Transmembrandomäne von L-Selektin gegen diejenige von CD44 führt nicht zu einem Verlust der Sheddingfähigkeit. Dies schließt jedoch quantitative Veränderungen des Sheddingprozesses durch die veränderte Transmembrandomäne nicht aus.

Die Regulation des L-Selektinsheddings ist komplex und in weiten Teilen noch ungeklärt. Aktivierung der Proteinkinase C durch PMA induziert rasch, d.h. innerhalb weniger Minuten, nahezu komplettes L-Selektinshedding (Jung et al. 1990). Verschiedene Arbeiten zeigen übereinstimmend, dass die membranproximale Sequenz der EZD von L-Selektin kritisch für

aktivierungsinduziertes Shedding ist, die proteolytische Schnittstelle wurde zwischen den Aminosäuren Lys321 und Ser322 lokalisiert (Kahn et al. 1994; Chen et al. 1995; Migaki et al. 1995; Stoddart et al. 1996). Weiterhin ist am raschen PMA-induzierten Shedding die EGF-Domäne von L-Selektin beteiligt. EGF-Domänen vermitteln häufig Protein-Protein-Interaktionen und sind in vielen anderen Membranproteinen, die Shedding aufweisen, z.B. Transforming growth factor-α (TGF-α), vorhanden. Die Deletion der EGF-Domäne von L-Selektin verhindert PMA-induziertes Shedding vollständig, ohne das konstitutive Shedding zu beeinflussen (Zhao et al. 2001).

Ein zweiter wichtiger Regulator des Sheddings von L-Selektin ist Calmodulin, das in ruhenden Leukozyten konstitutiv an den zytoplasmatischen Teil von L-Selektin bindet. Mutationen mindestens einer von zwei Aminosäuren innerhalb der Calmodulinbindungsstelle von L-Selektin (Leucin 358 und Lysin 359, siehe Abbildung 26), die in der membranproximalen Region liegt, verhindert die Calmodulinbindung. Behandlung von Leukozyten mit dem Calmodulininhibitor Trifluperazin induziert L-Selektinshedding. Bindung von Calmodulin an L-Selektin schützt vor Shedding, während Calmodulindissoziation es induziert, wahrscheinlich indem es eine Konformationsänderung innerhalb der L-Selektinstruktur bewirkt und so die Erreichbarkeit der Schnittstelle für die Protease(n) verbessert (Kahn et al. 1998; Diaz-Rodriguez et al. 2000). Interessanterweise sind viele calmodulinbindenden Proteine gleichzeitig Substrate für PKC-Isoenzyme; ihre Bindungsstellen überlappen sich häufig. Man nimmt an, dass Calmodulinbindung die PKC-L-Selektin-Interaktion verhindert. Erst nach Dissoziation von Calmodulin können die Isoenzyme PKC θ und ι an Serinreste der zytoplasmatischen L-Selektindomäne binden, was zu einer Erhöhung der Affinität für die konventionelle PKC α führt. Ein weiteres Zielprotein von PKC θ ist Moesin, welches durch Phosphorylierung von Threonin 558 aktiviert wird. Aktiviertes Moesin kann an die zwei Aminosäuren Arg357 und Lys362 von L-Selektin binden, die in direkter Nachbarschaft zur Bindungsstelle von Calmodulin liegen, binden. Diese Interaktion ist offenbar für PKC-vermitteltes Shedding wichtig, da die beiden L-Selektinmutanten R357A und K362A (siehe Tabelle 4) ein reduziertes Shedding zeigen (Haribabu et al. 1997; Ivetic et al. 2004; Kilian et al. 2004). Inwieweit an den oben beschriebenen Regulationsmechanismen die Transmembrandomäne von L-Selektin eine Rolle spielt, ist unklar. Durch Untersuchungen der Sheddingkinetik der L-Selektin/tmCD44-

Chimäre eröffnet sich in Folgeuntersuchungen die Möglichkeit, ein tieferes Verständnis der Regulation des Sheddings zu erlangen.

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass auch über Annexin-1 Shedding von L-Selektin ausgelöst wird. Annexin-1 (ANXA1, Lipocortin) ist ein Ca^{2+}- und Phospholipid-bindendes Protein im Zytosol u.a. von myeloischen Zellen. Glukokortikoide können die Synthese von ANXA1 stimulieren und führen zu ANXA1-Externalisierung auf die Zelloberfläche. Dort induziert ANXA1 das Shedding von L-Selektin, worüber die verminderte Leukozytenakkumulation in Entzündungsfoci unter der Einwirkung von Dexamethason oder Prednisolon erklärt wird. Konfokale Elektronenmikroskopiestudien zeigten eine Kolokalisation von ANXA1 und L-Selektin auf der Zelloberfläche (de Coupade et al. 2003). Der Mechaninsmus der ANXA1-Externalisierung auf die Zelloberfläche ist unverstanden, ebenso ist nicht vollständig geklärt, über welche Interaktionsmechanismen L-Selektin und ANXA1 kolokalisiert werden und wie ANXA1 Shedding auslöst. An all diesen Vorgängen könnte die Transmembrandomäne von L-Selektin mitbeteiligt sein, was durch Untersuchungen mit der L-Selektin/tmCD44-Chimäre überprüfbar ist.

4.4 Funktionelle Bedeutung der Transmembrandomäne von L-Selektin

Die Transmembrandomäne von L-Selektin umfasst 22 Aminosäuren und ist hochkonserviert. Während, bezogen auf das gesamte L-Selektinmolekül, auf Proteinebene eine Sequenzhomologie von ca. 68% zwischen Maus, Rind und Mensch besteht (Kansas 1996), zeigt sich im transmembranären Abschnitt von Maus und Mensch eine Übereinstimmung von >95% (ein Aminosäureaustausch in Position 351 Isoleucin→ Leucin), zwischen Rind und Mensch ist die Sequenz identisch (siehe Abbildung 26).

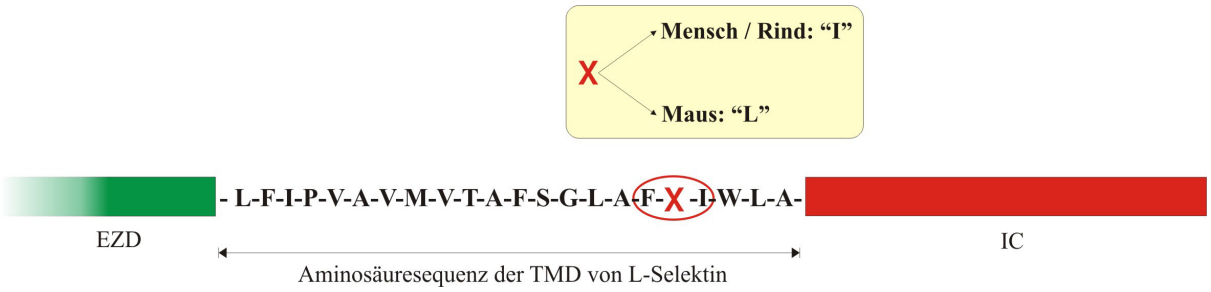

Abbildung 26: Aminosäuresequenz der TMD von humanem L-Selektin. Vergleich der Aminosäuresequenz von Rind und Maus. Zwischen den Spezies besteht eine große Homologie, die TMD von L-Selektin ist hochkonserviert. An Position 351 (rotes „X") befindet sich bei Mensch und Rind Isoleucin, bei der Maus Leucin.

Je stärker ein Proteinbereich im Rahmen der Evolution konserviert bleibt, desto größere funktionelle Relevanz wird ihm zugeschrieben. Im Gegensatz zu zahlreichen Untersuchungen zur Relevanz der zytoplasmatischen Domäne und der Extrazellulärdomäne, liegen in der wissenschaftlichen Literatur keine Daten über die funktionelle Bedeutung der hochkonservierten Transmembrandomäne von L-Selektin vor. Somit ist bislang unklar, ob dieser Region über ihre reine „zellmembrandurchspannende Funktion“ hinaus weitere Aufgaben, insbesondere in Bezug auf die Lokalisation in Microvilli, das „Clustering“, oder die Regulation des Sheddings zukommen (zusammengefasst in Abbildung 27).

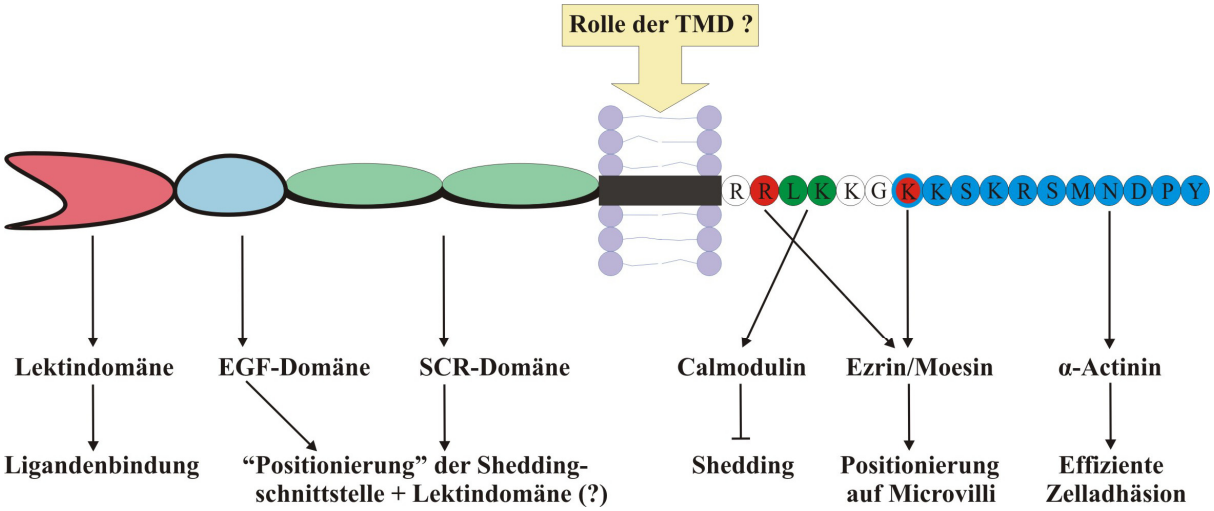

Abbildung 27: Funktionen verschiedener Abschnitte von L-Selektin. Die Aminosäuresequenz der Intrazellulärdomäne mit ihren potentiellen Bindungpartnern ist detailliert dargestellt. Calmodulinbindung an die beiden grün markierten AS kann „Shedding“ verhindern, Bindung der ERM-Proteine Ezrin und/oder Moesin an die beiden rot dargestellten AS ist mitbeteiligt an der microvillären Lokalisation von L-Selektin, während die C-terminalen, blau markierten AS via α-Actinin den Kontakt zum Zytoskelett herstellen. Deletion dieses Abschnitts (sog. LΔcyto-Mutante) verhindert effiziente Zelladhäsion, ohne die microvilläre Lokalisation zu verändern. Bei der EZD ist die Rolle der Lektindomäne als Ligandenbindungsstelle gut etabliert, wohingegen die Bedeutung der SCR-Domäne weniger gut gesichert ist. Möglicherweise dient sie zur Exponierung der Lektindomäne für eine effektive Ligandenbindung und der Positionierung der Scheddingsequenz in adäquatem Abstand bzw. in korrekter dreidimensionaler Ausrichtung zur Zelloberfläche. Die EGF-Domäne dient vielleicht als Bindungsmotiv für die Sheddingprotease, da sie für PMA-induzierbares Shedding notwendig ist. Die Rolle der hochkonservierten, 22 AS umfassenden, TMD ist bislang unbekannt. Sie kann mit Hilfe der in der vorliegenden Arbeit konstruierten Chimäre *L/tmCD44* näher charakterisiert werden.

4.4.1 Experimentelle Einsatzmöglichkeiten der L/tmCD44-Chimäre

Zum tieferen Verständnis der Rolle der TMD stehen nun die in der vorliegenden Arbeit etablierten Zelllinien K562 und Nalm6 zur Verfügung. Beide sind stabil mit der L-Selektin/tmCD44-Chimäre transfiziert, bei der *ausschließlich* die Transmembrandomäne durch die eines anderen Zelladhäsionsmolekül, CD44, ersetzt wurde. Während die K562-

Zelllinie eine hohe Sheddingproteaseaktivität besitzt, fehlt sie bei der Nalm6-Zelllinie vollständig.

Hieraus eröffnet sich für weiterführende Untersuchungen ein weites Spektrum an experimentellen Einsatzmöglichkeiten für die L-Selektin/tmCD44-Chimäre:

- Die ***Oberflächenverteilung*** der L/tmCD44-Chimäre auf den transfizierten Zellen kann mittels Elektronenmikroskopie und Immunogold-Färbung (Methodik siehe Bruehl et al. 1996) bestimmt werden. Hierdurch kann geklärt werden, inwieweit die transmembranäre L-Selektindomäne an der Positionierung des Moleküls auf den Microvilli der Leukozyten mitbeteiligt ist. Würde die Chimäre unverändert microvillär lokalisiert, wäre die TM-Domäne von L-Selektin hierfür unwichtig. Käme es zu einer Änderung der Oberflächenverteilung, beispielsweise entsprechend der von CD 44, also auf dem planen Zellkörper, der von CD 31 (gleichmäßige Verteilung ohne Präferenz für Microvilli oder planen Zellkörper) oder zumindest zu einer präferentiellen Lokalisierung auf dem planen Zellkörper, spräche dies für eine Rolle der transmembranären L-Selektindomäne bei der microvillären Positionierung von L-Selektin auf Leukozyten.

- Das ***„Clustering“*** könnte durch laterale Wechselwirkungen von L-Selektin untereinander oder mit weiteren Proteinen zustande kommen. Ob die L-Selektin/tmCD44-Chimäre, trotz seiner Transmembrandomäne von CD44, weiterhin „Clustering“ aufweist, kann ebenfalls mittels Immunogoldfärbung und Elektronenmikroskopie untersucht werden und kann die Bedeutung der L-Selektin-TMD für dieses kaum verstandene Phänomen zeigen.

- Die funktionelle Relevanz der Transmembrandomäne für die ***Adhäsionseigenschaften*** von L-Selektin kann durch statische und dynamische Bindungsassays untersucht werden. Schlechtere Adhäsionseigenschaften könnten zum einen durch die oben diskutierten veränderten Expressionsmuster bzw. Cluster-Bildungen hervorgerufen werden, andererseits könnte bei weiterhin vorhandener microvillärer Expression die Bindungsaffinität der Zellen durch fehlende outside-in Signaltransduktion (z.B. keine β_2-Integrinaktivierung) beeinträchtigt werden. Auch andere Aspekte der Rolle der TMD für die ***Signaltransduktion*** könnten in weiterführenden Experimenten erforscht werden.

- Das ***„Shedding“*** der Chimäre kann näher charakterisiert werden. Dies kann mit den transfizierten K562-Zellen erfolgen, da sie, im Gegensatz zu den Nalm6-Transfektanten, die Sheddingprotease in hoher Aktivität exprimieren. Hierdurch können Erkenntnisse über eine mögliche Bedeutung der TMD für die Regulation des Sheddings von L-Selektin gewonnen werden. Es könnte PMA-induziertes, durch Annexin-1 induziertes (z.B. durch Dexamethason) und durch Calmodulinhemmung, z.B. mittels Trifluoperazin, ausgelöstes Shedding qualitativ und quantitativ untersucht werden.

- Die ***Bedeutung der TMD für die Sekundär- und Tertiärstruktur*** des L-Selektinmoleküls und seine dreidimensionale Ausrichtung bei Sitz innerhalb der Zellmembran kann untersucht werden, z.B. nach Einbringen des isolierten Proteins in künstliche Membranen und NMR-Spektroskopie. Die L-Selektin/tmCD44-Chimäre besitzt möglicherweise eine im Vergleich zum originären L-Selektin veränderte räumliche Konfiguration einzelner Domänen, die funktionelle Konsequenzen haben könnte.