

1. Einleitung

1.1 Sialinsäuren

1.1.1 Struktur und Vorkommen

Sialinsäuren sind seit den 30er Jahren bekannt. Ihre chemische Struktur wurde 1962 von Kuhn und Brossmer entschlüsselt (1962). Es handelt sich um Monosaccharide, die als terminale Komponenten von Glycoproteinen und Glycosphingolipiden vorkommen. Der Sammelbegriff Sialinsäure (sialos, gr.: Schleim) umfasst eine Stoffgruppe von über 40 Derivaten der Neuraminsäure (Neu5Ac). Als Grundgerüst dient eine C9-Kohlenhydratkette mit folgenden funktionellen Gruppen: In C1-Position eine Carboxylgruppe, in C5-Position eine Aminogruppe, in C4-, C6-, C7-, C8-, C9-Positionen Hydroxylgruppen und in C2-Position eine Ketogruppe, die unter physiologischen Bedingungen durch Reaktion mit der C7-Hydroxylgruppe einen pyranoiden Halbacetalring bildet (Abb. 1).

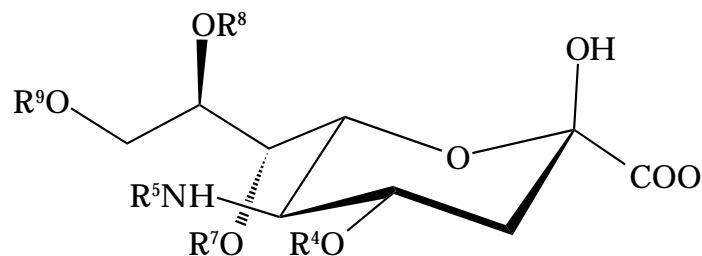


Abb. 1: Struktur von Sialinsäuren.

Sialinsäuren sind N-acylierte (R^5 = Acetyl- und Glycolylgruppen) Derivate der Neuraminsäure mit Acetyl-, Lactoyl-, Methyl-, Sulfonyl-, Phosphonylgruppen als mögliche O-Substituenten (R^4 , R^7 , R^8 , R^9). Bei Neu5Ac liegen alle Hydroxylfunktionen unmodifiziert vor.

Die Strukturvielfalt entsteht durch N-Substituenten (z.B. Acetyl, Glycolyl) und O-Substituenten (Acetyl, Lactoyl, Methyl, Sulfonyl, Phosphonyl), wobei dieselbe Modifikation wie z.B. die 9-O-Acetylierung gewebes- und entwicklungsabhängig vorkommt und verschiedenen Aufgaben dienen kann (Varki, 1993). Die N-Acetylneuraminsäure und die 9-O-Acetyl-N-Acetylneuraminsäure kommen beim Menschen am häufigsten vor (Corfield et al., 1993). Brust-, Darm- und Leberkarzinome sowie maligne Lymphome haben im Gegensatz zu gesundem Gewebe N-Glycolylneuraminsäuren in geringen Konzentrationen (Kawai et al., 1991).

1.1.2 Sialinsäuremetabolismus und Regulation der Membransialylierung

Die de novo-Biosynthese der Neuraminsäure (Abb. 2) beginnt wie die aller Aminozucker mit der Isomerisierung von Glucose-6-Phosphat zu Fructose-6-Phosphat. Zur N-Acetylierung am C2-Atom wird zunächst Glutamin als Aminogruppendonor benötigt, um dann das entstandene Glucosamin-6-Phosphat mittels Acetyl-CoA in das N-Acetylglucosamin-6-Phosphat umzuwandeln. Eine weitere Möglichkeit zur Gewinnung von Glucosamin-6-Phosphat ist die Phosphorylierung von Glucosamin.

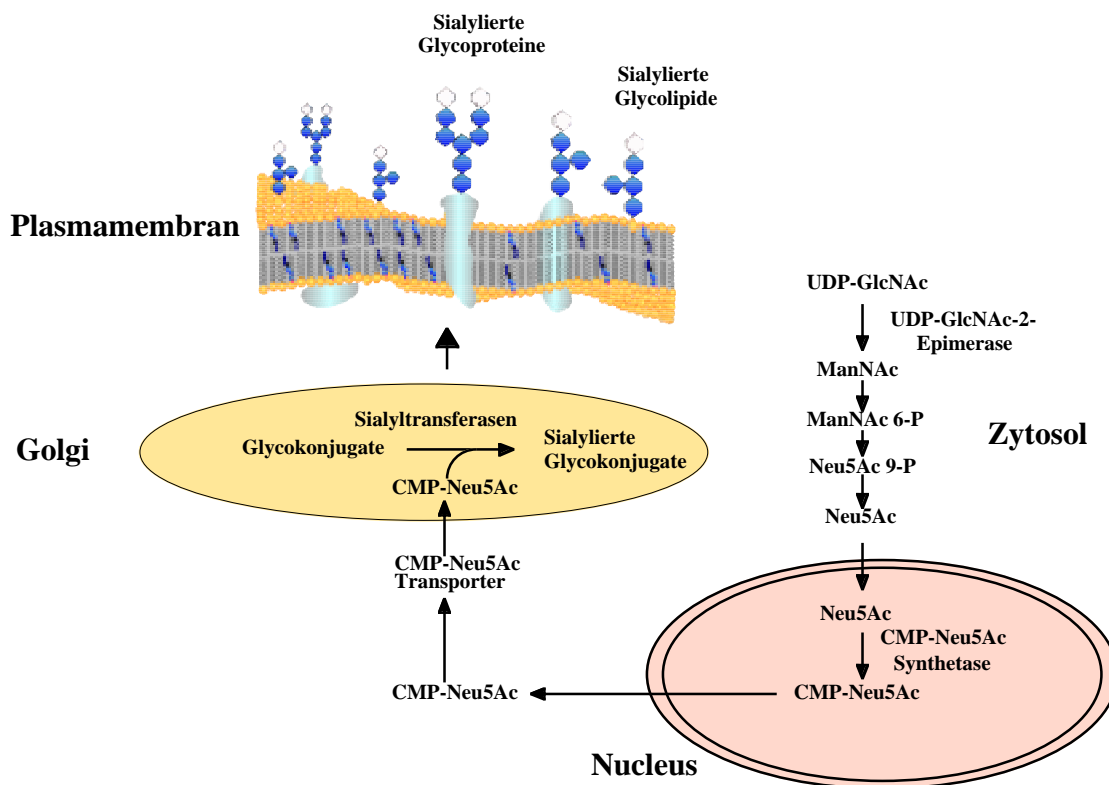


Abb. 2: Sialinsäurebiosynthese und Transfer der Sialinsäuren auf Glykokonjugate. Die Biosynthese wird über das Schlüsselenzym UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase reguliert. Die Aktivierung findet im Nucleus statt. Der Transfer der aktivierten Sialinsäuren auf Glykokonjugate, die für den Extrazellulärraum bestimmt sind, erfolgt im Trans-Golgi-Netzwerk (offene Sechsecke = Sialinsäuren).

Nach Umlagerung der Phosphatgruppe auf das C1-Atom entsteht mittels UTP das UDP-N-Acetylglucosamin. Die Umwandlung von UDP-N-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc) in N-Acetylmannosamin (ManNAc) unter UDP-Abspaltung und die ATP-abhängige

Phosphorylierung in ManNAc-6-Phosphat wird durch das bifunktionelle Schlüsselenzym UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase katalysiert (Hinderlich, 1997). Nach Phosphat-
abspaltung vom Phosphoenolpyruvat addiert sich das Enolation des Pyruvats an das Carbonyl-C-Atom des ManNAc-6-Phosphats, so daß N-Acetylneuraminat-9-Phosphat (Neu5Ac 9P) entsteht. Die darauffolgende Aktivierung mittels CTP zu CMP-Neu5Ac erfolgt im Zellkern (Kean, 1970), während die Aktivierung aller anderen Monosaccharide mittels GTP im Zytosol stattfindet.

Sialyltransferasen, die für $\alpha(2,3)$ -, $\alpha(2,6)$ - und $\alpha(2,8)$ -glycosidische Bindungen spezifisch sind, übertragen aktivierte Sialinsäuren im Trans-Golgi-Netzwerk auf Glykokonjugate und regulieren dadurch die Sialylierung auf der Zelloberfläche (Paulson and Colley, 1989).

Die Expression des Schlüsselenzyms der Sialinsäurebiosynthese, UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase, variiert in Abhängigkeit vom Gewebetyp (Horstkorte et al., 1999). Analog dazu wurden HL-60-Zellen mit unterschiedlichen Sialylierungsgraden identifiziert, die durch Expression der bifunktionellen UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase erklärt werden konnten (Keppler et al., 1999): Die Transkription der DNA für UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase ist bei HL-60- (minus) aufgrund epigenetischer DNA-Methylierung blockiert (Oetke et al., 2003), dementsprechend ist ihre Zelloberfläche niedrigsialyliert. HL-60+ hingegen exprimiert UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase und ist auf der Zelloberfläche hochsialyliert. Freie CMP-Neu5Ac – als Parameter für die intrazelluläre Konzentration aktivierter Neuraminsäuren – ist analog zu der Schlüsselenzymexpression und Oberflächensialylierung in HL-60+ höher konzentriert als in HL-60-. Jedoch konnte die Oberflächensialylierung von HL-60- durch 72h Inkubation mit dem physiologischen Sialinsäurevorläufer ManNAc rekompensiert werden (Keppler et al., 1999; Mantey et al., 2001).

Die Abspaltung der Sialinsäuren aus Glykokonjugaten durch Sialidasen ist ebenfalls spezifisch. Der endogene Abbau von Sialoverbindungen in Lysosomen kann aufgrund eines Defekts lysosomaler Sialidasen und weiterer Enzyme gestört sein und Krankheiten hervorrufen (Tab. 1). Lysosomal abgespaltene Sialinsäuren werden nach Beseitigung der O-Acetylreste durch die Neu5Ac-Lyase zu Pyruvat und ManNAc verstoffwechselt. ManNAc kann dann wieder in Sialinsäure umgewandelt und PEP in der Glycolyse oder Gluconeogenese verwertet werden.

Krankheit	Pathologische Manifestation	Angestaute Verbindung	Defekt
„Salla“-Krankheit	<ul style="list-style-type: none"> • Psychomotoische Retardation • Ataxie • Hohe Konzentration an freier Sialinsäure im Urin 	Freie Sialinsäuren (Urin, Organe)	Sialinsäure-Transporter
Sialidose	<p><u>Frühe Form:</u> (<u>Mucopolidose I</u>)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Knochenabnormalitäten • Organomegalie • Neurologische Manifestation <p><u>Späte Form:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Leichte Form • Sogenannte “Macular Cherry Red Spots“ 	Glycopeptide und Oligosaccharide mit endständiger Sialinsäure im Urin	Lysosomale Sialidase
Gangliosidose G _{M1} G _{M2} a) Tay-Sachs-Erkrankung b) Sandhoff-Erkrankung c) AB-Variante	<ul style="list-style-type: none"> • Langsames Wachstum • Motorische Schwäche • Knochenabnormalitäten • Organomegalie • Vergrößerte Neuronen <ul style="list-style-type: none"> • Langsames Wachstum • Motorische Schwäche • Hyperakusis • Vergrößerte Neuronen • Sogenannte “Cherry Red Spots“ 	G _{M1} -Gangliosidose und galaktosereiche Glycoproteinfragmente C-Ganglioside b) außerdem Asialo- G _{M2} -Ganglioside und Glycoproteine mit terminalen β-Hexosaminen	G _{M1} -Gangliosid-β-Galaktosidase a) β-Hexosaminidase A b) β-Hexosaminidase A/B c) G _{M1} -Aktivatorprotein
Galaktosidose	<ul style="list-style-type: none"> • Ähnlich der frühen Form der Sialidose 	Unbekannt	Schutzprotein

Tab. 1: Lysosomale Sialinsäurespeicherkrankheiten

1.1.3 Biologische Funktionen von Sialinsäuren

Die terminal an N- oder O-Glycanketten gebundenen Sialinsäuren sind physikochemische Stabilisatoren von Glycoproteinen und -lipiden sowohl in membranär-gebundener als auch löslicher Form. Muzine beispielsweise erhalten durch ihre starke Sialylierung eine erhöhte negative Ladung, die ihnen thermische und proteolytische Stabilität vermittelt (Kelm and Schauer, 1997). Sie sind dadurch in der Lage im Magen eine visköse Schleimschicht zu bilden, die die Schleimhaut vor der Magensäure schützt (Bhaskar et al., 1992). Sialinsäuren erhöhen außerdem die negative Ladung auf Zelloberflächen und erzeugen durch interzelluläre Abstoßungskräfte einen Antiagglutinationseffekt bei Erythrozyten (Kelm and Schauer, 1997).

Sialinsäuren besitzen Maskierungsfunktion. Durch Maskierung der Galactosen von Serumglycoproteinen verhindern Sialinsäuren ihre Clearance mittels des Asialoglycoprotein-Rezeptors (ASGP-R), einem Galactose-spezifischen Rezeptor auf Hepatozyten (Hudgin and Ashwell, 1974). Sie regulieren somit die Überlebensdauer der Serumglycoproteine (Morell et al., 1971). Lipoproteine mit galactosyliertem Cholesterin werden hingegen vermehrt ASGP-R-vermittelt von Hepatozyten endozytiert (Biessen et al., 1994; Biessen et al., 1995; Bijsterbosch et al., 1992). Der ASGP-Rezeptor reguliert seine Bindungsaktivität durch Maskierung und Demaskierung eigener Galactosen, die die Ligandenbindungsstellen besetzen können. Die Affinität des ASGP-Rezeptors ist von der Glycanantennarität (Schwartz, 1984) und der exakten geometrischen Ausrichtung der Rezeptoruntereinheiten zu den Galactosen des Liganden abhängig (Lodish, 1991).

Weiterhin gibt es den Galactose-Partikel-Rezeptor (GP-R) für die Sequestration von Erythrozyten und Lymphozyten durch Leber- und Milzmakrophagen (Janicik et al., 1978; Kaufmann et al., 1981). Dieser entspricht dem in der Klinikpraxis als Entzündungsmarker gemessenen C-reaktiven Protein (CRP).

Schließlich gibt es den Peritonealmakrophagen-Rezeptor (PMG-R), der desialylierte lösliche Moleküle, desialylierte Partikel und Zellen (Nagamura and Kolb, 1980; Kuster and Schauer, 1981; Schauer et al., 1990) bindet. Freie Sialinsäuren können die Galactose-spezifische Bindungsaktivität des PMG-Rezeptors reduzieren (Lee et al., 1990). Dies führte zu der Annahme, daß der PMG-Rezeptor Sialinsäure-spezifische Bindungsstellen besitzt, die die Rezeptorallosterie regulieren.

Sialinsäuren haben außerdem die Funktion als Erkennungsdeterminanten.

a) Interaktionen mit Mikroorganismen

Interaktionen der wirtseigenen Sialinsäuren mit Proteinrezeptoren auf Oberflächen von Viren, Bakterien oder Protozoen bieten neue Ansatzmöglichkeiten zur Prophylaxe von Infektionen. Bereits in den 40er Jahren sind Interaktionen des Influenzavirus-A mit wirtseigenen Sialinsäuren beschrieben worden (Hirst, 1941, Hirst, 1942, McClelland and Hare 1941). Das Influenzavirus-A bindet dabei mittels Hämagglutinin an Sialinsäuren und gelangt mit Hilfe einer Sialidase und einem Fusionsprotein in die Wirtszelle.

b) Interaktionen mit Rezeptoren der Selektinfamilie

Selektine sind Kohlenhydrat-bindende Adhäsionsproteine, die nach Stimulation durch TNF α , Interleukin 1 oder Thrombin auf Endothelien, Blutplättchen und Leukozyten als E-, P- und L-Selektine exprimiert werden und deren Bindungsaktivität Ca²⁺-abhängig ist (Bevilacqua et al., 1985, Bevilacqua et al., 1987). Aufgrund ihrer wichtigen Rolle beim Homing zirkulierender Lymphozyten sind Selektine medizinisch von großem Interesse. Man erhofft sich durch Modifikation von sLe^x und sLe^a neue entzündungsregulierende Selektinliganden zu finden. Der Austausch der Sialinsäuren durch Sulfate brachte nicht nur hochaffine sLe^x-/sLe^a-Analoga hervor, sondern auch Glycosaminoglycane, die der nachfolgenden Integrinaktivierung dienen sollen (Green et al., 1992, Green et al., 1995).

c) Interaktionen mit Siglecs (sialic acid binding immunoglobulin like lectins)

Siglecs repräsentieren eine Untergruppe der Immunglobulinsuperfamilie mit Glycanbindungsaktivität (Powell and Varki, 1995). Das Makrophagen-Subtyp-spezifische Siglec1 (Sn) und das myeloische Vorläuferzell-spezifische CD33 dient der Myelopoese, das B-Zell-spezifische CD22 der Immunabwehr und das Myelinmembran-spezifische Siglec4 (MAG) von Oligodendrozyten und Schwann-Zellen der neuronalen Entwicklung. Die Erkennung ihrer Liganden ist streng von den Sialinsäure-Seitenketten abhängig (Kelm et al., 1994). CD22 und CD33, ein wichtiger diagnostischer Marker für AML, regulieren durch cis-Interaktionen mit eigenen Sialoglycanen und anderen zelleigenen oder extrazellulären löslichen Glycokonjugaten Zell-Zell-Interaktionen (Freeman et al., 1995). Aufgrund der hohen Anzahl eigener Liganden wird angenommen, daß cis-Interaktionen für CD22 und CD33 eine größere Rolle spielen als Zell-Zell-Interaktionen (Kelm and Schauer, 1997).

1.1.4 Biochemical-Engineering mittels neuer Sialinsäurevorläufer-Analoga

Die Modifikation zellulärer Sialinsäuren mittels Vorläuferanaloga wird Biochemical-Engineering genannt. Sie ermöglicht die funktionelle Untersuchung spezifischer Molekülanteile – wie die N-Acyl-Seitenkette in dieser Arbeit – im Hinblick auf das Expressions-, Adhäsions-, Proliferations- und Differenzierungsverhalten der Zelle.

Erstmals wurde in dieser Arbeitsgruppe gezeigt, daß N-substituierte Glucosamin- und D-Mannosamin-Analoga von Zellen aufgenommen und metabolisiert werden. Denn die Enzyme der Sialinsäuresynthese sind hinsichtlich Änderungen der N-Acyl-Seitenkette von ManNAc bzw. GlcNAc unspezifisch (Kayser et al., 1992). Es wurden bereits N-substituierte Analoga mit unterschiedlicher Acylgruppenlänge wie N-Propanoyl-, N-Butanoyl-, N-Pentanoyl-, N-Hexanoyl- und N-Crotonoylmannosamine untersucht. In jedem Fall entstand im Sialinsäuremetabolismus die entsprechende N-Acylneuraminsäure, die schließlich auf der Zelloberfläche exprimiert wurde. Der enzymatische Transfer der C5-modifizierten Sialinsäuren auf Glycoproteine war bei der Erprobung vier verschiedener Sialyltransferasen ebenso gut wie der Transfer des physiologischen Neu5Ac (Gross and Brossmer, 1995). Weiterhin konnte *in vitro* und *in vivo* gemessen werden, daß die Peracetylierung von Mannosamin-Analoga ihre Bioverfügbarkeit erhöht (Collins et al., 2000).

Die Zellvitalität wird durch die Langzeitinkubation mit Mannosamin-Analoga nicht beeinträchtigt. Sowohl Jurkat-Zellen (Wieser et al., 1996; Yarema et al., 1998), humane Lymphoid- bzw. Fibroblasten-Zelllinien verschiedener Spezies (Keppler et al., 1995; Keppler et al., 1998; Herrmann et al., 1997) als auch Rattenneuronen und -gliazellen in Form primärer Zellkulturen bleiben nach ManNProp-Inkubation vital. Bei ManNBut und ManNPent jedoch weist das Wachstum bestimmter Zellkulturen eine Reduktion um 40% auf. Die *in vivo* modulierte N-Acyl-Seitenkette der Neu5Ac hebt das Zell-Kontakt-kontrollierte Zellwachstum auf (Wieser et al., 1996). In Ratten, die drei Wochen lang täglich mit 200 mg/kg KG ManNProp behandelt wurden, reichert sich N-Propanoylneuraminsäure in der Leber, Lunge und Niere an. Es traten dabei keine Nebenwirkungen auf.

Biochemical-Engineering beeinflusst die Sialinsäure-abhängige Infektion von Mäusen und Primaten durch Influenzavirus-A und -C, Newcastle-disease-virus, Cardioviren und Polyomaviren. Sialinsäurevorläufer-Analoga wie N-Propanoyl-, N-Butanoyl-, oder N-Pentanoyl-D-mannosamine reduzieren *in vitro* die Influenzavirus-A-Infektiosität um bis zu 80%. Es konnte gezeigt werden, daß modifizierte Sialinsäuren von Glykokonjugaten der Zelloberfläche ein sterisches Hindernis für die Hämagglutinin-vermittelte Bindung von Influenzavirus A darstellen (Kepler et al., 1998; von Itzstein et al., 1993; Monto et al., 1999). Während ManNPent die Infektiosität von humanem Polyomavirus BK nahezu verhindert, denn die Affinität von murinen 3T6-Zellrezeptoren zu Polyomaviren wird um 30% reduziert (Herrmann et al., 1997), verstärkt ManNProp hingegen ihre Infektiosität um das Siebenfache. Weiterhin reduziert ManNProp die Infektiosität von African-green-monkey-B-lymphotropischen Papovaviren auf 1/10 der Kontrolle.

Biochemical-Engineering von Sialinsäuren beeinflusst das Wachstum neuraler Zellen. ManNProp induziert dabei die Proliferation von Astrozyten und Mikrogliazellen, während Oligodendrozyten-Vorläuferzellen bei ManNProp-Gabe nicht proliferieren, sich jedoch ihre Anzahl aus sich regenerierenden Kleinhirn-Neuronen erhöht (Schmidt et al., 1998). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die Inkorporation von N-Propanoylneuraminsäuren bei gleichzeitigem GABA-Zusatz den intrazellulären Calciumgehalt von Oligodendrozyten steuert (Schmidt et al., 2000). Ein *in vitro* bereits durch ManNAc-Gabe angeregtes Axonwachstum von Neuronen – was bislang hinsichtlich des Wirkungsmechanismus ungeklärt ist – konnte durch ManNProp-vermittelten Einbau von N-Propanoylneuraminsäure in die Neuronenoberfläche spezifisch gesteigert werden (Büttner et al., 2002). Dies hat zur Folge, daß die neuronale Regeneration effizienter wird. Für das unphysiologische N-Glycolylmannosamin-Pentacetat konnte gezeigt werden, daß es nach Umbau zu N-Glycolylneuraminsäure die Bindung von MAG an neurale Zellen inhibiert (Collins et al., 2000) – was ebenfalls für die posttraumatische neuronale Regeneration von großer Bedeutung ist.

Die N-Acetylneuraminsäure spielt in der Differenzierung und Reifung von Lymphozyten eine wichtige Rolle (Varki, 1993). Durch ManNProp-induzierte Modifikation konnten humane T-Lymphozyten ebenso gut wie mit dem pflanzlichen Lektin Concanavalin, welches im Gegensatz zu ManNProp zelltoxisch ist, zur Proliferation stimuliert werden. Dabei konnten erhöhte IL-2-Sekretion und gesteigerte Expression der IL-2-Rezeptor- α -Kette gemessen werden (Schüler, 1997).

Die Modifikation von Tumorzellen, die bereits mittels kovalenter Bindung von N-Acetylneuraminsäuren an die Zelloberfläche durchgeführt wurde (Brossmer et al., 1977), ist durch Sialinsäurevorläufer-Analoga erweitert worden. Das Einschleusen funktioneller Molekülgruppen wie Ketone über den biosynthetischen Sialinsäureweg ist mittels N-Levulinoyl-D-mannosamin gelungen (Mahal et al., 1997; Yarema et al., 1998; Lee et al., 1999). Ketongruppen, die normalerweise auf der Zelloberfläche fehlen, können zur Bindung mit anderen funktionellen Molekülgruppen wie Hydrazine, Hydroxylamine und Thiosemicarbazide genutzt werden. Auf diese Weise kann die Immunogenität von Tumorzellen durch Bildung von Neoantigenen wie das Konjugat von N-Levulinoylneuraminsäure mit einem immunogenen Carrier-Protein gesteigert werden (Lemieux and Bertozzi 2001). Außerdem konnte die Immunmarkierung von Tumorzellen mit N-Propanoylpolysialinsäuren durch spezifische Antikörperbindung zur Komplement-vermittelten Lyse genutzt werden (Liu et al., 2000).

1.2 Integrine

1.2.1 Biologische Bedeutung von Integrinen

Integrine sind Zelladhäsionsmoleküle. Sie vermitteln Zell-Matrix- bzw. Zell-Zell-Interaktionen und ermöglichen der Zelle zu adhären, in gerichteter Weise zu migrieren und mit anderen Zellen zu kommunizieren. Außer der mechanischen Funktion besitzen sie Inside-Out- und Outside-In-Signalcharakter und sorgen für Differenzierung, Zellwachstum, eine regelrechte Organentwicklung und beim ausgebildeten Organismus für Prozesse wie Blutstillung, Wundheilung und Infektabwehr (Horwitz, 1998). Pathologische Prozesse wie Fehlbildungen, Autoimmunerkrankungen, Durchblutungsstörungen und Neoplasien können durch Abweichungen von der normalen Adhäsion, Migration und Kommunikation der Zelle erklärt werden.

1.2.2 Integrinstruktur und Integrintypen

Integrine sind heterodimere Transmembranglycoproteine mit einer α - und einer β -Kette (Abb. 3). Es gibt 8 β -Untereinheiten zwischen 90-110 kDa und 16 α -Untereinheiten zwischen 120-180 kDa (Ruoslahti, 1991). Die Bildung der mehr als 20 bekannten $\alpha\beta$ -Heterodimere erfolgt im endoplasmatischen Retikulum durch nonkovalente Assoziation der Domänen, die für den extrazellulären Rezeptoranteil bestimmt sind. Das Integrin wird mit Disulfidbrücken kompakt und Proteolyse-resistent gefaltet auf die Zelloberfläche transportiert (Rosa and McEver, 1989).

Alle α -Untereinheiten enthalten 7 homologe Segmente, wobei die Segmente 5 bis 7 zur Kationenbindung beitragen sollen. Einige α -Untereinheiten besitzen extrazellulär noch eine I-Domäne, die eine Nukleotidbindungs- bzw. Koordinierungsstelle für Mg^{2+} , Mn^{2+} und Liganden ist, die vermutlich die Integrinaffinität reguliert (Hynes, 1992).

Die extrazelluläre Komponente der β -Untereinheit ist durch vierfache Wiederholung eines cysteinreichen Segments charakterisiert (Calvete et al., 1991). Ihr N-Terminus ist mit internen Disulfidschleifen Teil der Ligandenbindungsdomäne. Eine I-Domänen-ähnliche Struktur hat vermutlich ähnliche Funktionen wie die I-Domäne.

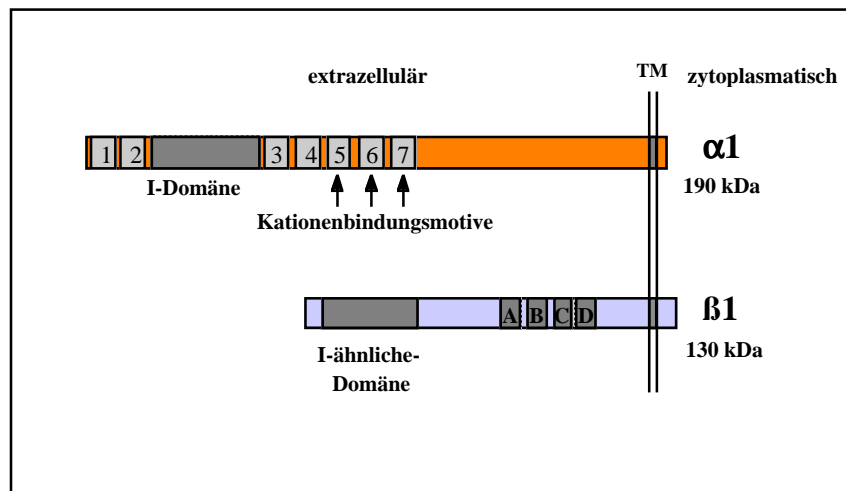


Abb. 3: Struktur der Integrine.

Jeder Zelltyp setzt 2 - 10 Integrinheterodimere aus seinem intrazellulären α - und β -Reservoir zur spezifischen Ligandenbindung zusammen. Nur wenige Integrine sind zellspezifisch. So wird $\alpha IIb\beta 3$ (gp IIb/IIIa) typischerweise auf Megakaryozyten und Thrombozyten exprimiert. $\alpha L\beta 2$ (LFA-1), $\alpha M\beta 2$ (Mac1/Mo-1/CR3) und $\alpha X\beta 2$ (p150,95) sind leukozytenspezifisch. $\alpha 6\beta 4$ kommt spezifisch auf Epithelien und auf epithelialen Tumorzellen vor (Ruoslahti, 1991). Während unassoziertes $\beta 1$ -Integrin in fast allen humanen Zelltypen vorkommt (Hemler et al., 1987), ist assoziiertes $\beta 1$ -Integrin, das die Gruppe der VLA-Proteine (very late after activation) bildet, häufig in hämatopoetischen Zellen und Neuroblastomzellen zu finden (Hemler et al., 1984; Pischel et al., 1987). Auf der Zelloberfläche ist die $\beta 1$ -Untereinheit, nicht reduziert mit Mr 110 k und reduziert mit Mr 130 k, an eine α -Untereinheit aus der Gruppe $\alpha 1$ - $\alpha 5$ (Mr 110-200 k, nicht reduziert) nonkovalent assoziiert. Die VLA-Proteine werden ihrer α -Untereinheit entsprechend in VLA-1 bis VLA-5 numeriert. VLA-1 und VLA-2 weisen in der Gelelektrophorese sowohl reduziert als auch nicht reduziert getrennte α - und β -Banden auf, während man bei reduziertem VLA-3 und VLA-5 jeweils eine $\alpha\beta$ -Bande und bei nicht reduziertem VLA-3 und VLA-5 getrennte α - und β -Banden erkennt. Die $\alpha 4\beta 1$ -Assoziation (VLA-4) wird bei zunehmend basischem Milieu instabil. Die Bezeichnung „very late after activation“ soll verdeutlichen, daß T-Zellen *in vitro* nach Aktivierung erst spät (2 bis 4 Wochen) VLA-1 und VLA-2 exprimieren (Hemler et al., 1987). Die Integrinheterodimere VLA-3, VLA-4 und VLA-5 werden deutlich früher exprimiert, dennoch wird die Bezeichnung als Ausdruck der Zugehörigkeit zu der VLA-Gruppe beibehalten.

1.2.3 Ligandeninteraktion und Integrinsignalfunktion

Die Ligandenbindungsstellen der Integrine werden von der α - und β -Kette kationenabhängig gebildet (Loftus et al., 1990), wobei die α -Untereinheit die Ligandenspezifität reguliert (Vogel et al., 1990, Koivisto et al., 1994). Integrinliganden sind extrazelluläre Matrixkomponenten wie Fibronectin, Fibrinogen, Laminin, Kollagene, Entaktin, Tenascin, Thrombospondin, von-Willebrand-Faktor und Vitronectin aber auch Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulinsuperfamilie wie ICAM-1, ICAM-2 oder VCAM-1 (Ruoslahti, 1991). Die Erkennungsdeterminante mit passender Tertiärstruktur ist für die Ligandenbindung entscheidend. Die Erkennungsdeterminante RGD, welche auf Fibronectin, Vitronectin und anderen Matrixproteinen vorkommt, wird auf diese Weise von $\alpha 5\beta 1$ und $\alpha IIb\beta 3$ erkannt (Hynes, 1992). Liganden können auch zwei Erkennungsdeterminanten besitzen und somit mit zwei unterschiedlichen Integrinheterodimeren interagieren. Manche Erkennungsdeterminanten wie im Fibronectin sind erst durch Zytoskelett-vermittelte Spannung zugänglich (Zhong et al., 1998).

Die zytoplasmatischen Komponenten der Integrine dienen intrazellulären Proteininteraktionen. Für die β -Untereinheiten sind bisher mehrere Proteininteraktionen bekannt wie mit Paxillin, α -Actinin, Talin, Filamin, focal-adhesion-kinase, integrin-linked-kinase, integrin-cytoplasmic-domain-associated-protein-1 und RACK1. Für die α -Untereinheit ist dagegen nur eine Interaktion mit Calretikulin bekannt (Vossmeier, 1999).

Integrin-vermittelte Signale verlaufen bidirektional transmembranär und in lateraler Richtung. Die transmembranäre Signalweiterleitung beruht auf der Rekrutierung zytoskelettaler Proteine und hierarchisch geordneter Signalmoleküle in fokalen Adhäsionskontakten (Miyamoto et al., 1995). Auslösende Faktoren für die zytosolische Proteinakkumulation sind die Ligandeninduzierte Integrinkonformation, die laterale Aggregation und Phosphorylierungen. Neben den zwei Hauptsignalwegen über Fyn-Shc und FAK, die Zellzyklus und Proliferation regulieren und die Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase (MAPK) Kaskaden beinhalten, sind weitere Signalwege wie Phosphoinositid-Turnover, die Rho-GTPase-induzierte Aktinfaserbildung, Ca^{2+} -Signale und PKC-Aktivierung für die Zelle lebensnotwendig (Abb. 4). Der Fyn-Shc Signalweg dient der initialen intensiven Transkriptionsfaktoraktivierung nach Zelladhäsion, während der FAK-Signalweg für die langsame und

langanhaltende Transkriptionsfaktoraktivierung benötigt wird (Giancotti and Rouslahti, 1999). Beide Signalwege können positiv und negativ reguliert werden.

Die laterale Signalweiterleitung wird durch Assoziation mit transmembranären und GPI-verankerten Proteinen in Sphingolipid-/Cholesterin-reichen Plasmamembranbereichen, sogenannten Rafts, möglich.

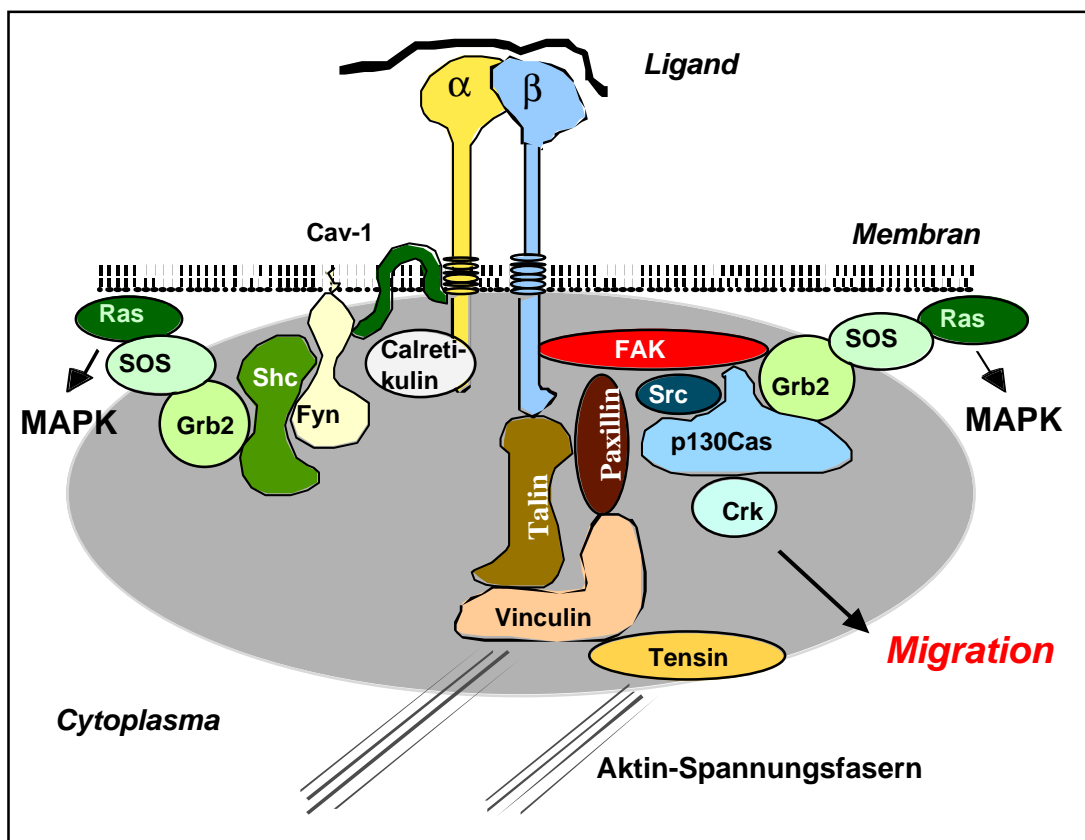


Abb. 4 : Integrinsignalwege. Die FAK- und Shc-Signalwege regulieren Zellzyklus und Proliferation.

1.2.4 Integrinaktivität

Die Integrinaktivität wird extra- und intrazellulär durch Affinitäts- und Aviditätsänderungen reguliert. Die Ligandenbindungsstellen der Integrine können konformationsabhängig offen (aktiv) oder verdeckt (inaktiv) vorliegen. Zweiwertige Kationen sind durch ihr Mitwirken an der nonkovalenten Assoziation von α - und β -Kette nicht nur für die Integrinspezifität, sondern auch für die konformationsabhängige Affinitätssteuerung notwendig (Gailit and Rouslahti, 1988; Kirchhofer et al., 1990; Kirchhofer et al., 1991). Bei einer Kationen-Integrin-Stöchiometrie von 5:1 sind die einzelnen Kationenbindungsstellen entweder für ein bestimmtes oder verschiedene zweiwertige Kationen vorgesehen. Die Bindung eines Kations an eine Bindungsstelle kann die Affinität einer anderen Kationenbindungsstelle zu einem weiteren Kation modulieren. So erhöht die Bindung von Ca^{2+} an $\alpha 5\beta 1$ die Affinität einer bereits hochaffinen Mn^{2+} -Bindungsstelle nur noch leicht und die Affinität einer niedrigaffinen Mg^{2+} -Bindungsstelle besonders stark. Ebenso kann ein zweiwertiges Kation die Ligandenbindung verstärken. Nach dem Konformationsmodell (Humphries, 1996) versetzt Ca^{2+} Integrine in einen inaktiven Zustand, bei dem Epitope für den inhibitorischen mAk 13 exponiert werden. Dagegen ermöglichen Mg^{2+} und Mn^{2+} durch Induktion der aktiven Integrinkonformation die Bindung der stimulatorischen mAk 12G10 und 9EG7. Die Epitope, die sich für 12G10 in der I-ähnlichen-Domäne und für 9EG7 in der Disulfid-Region der $\beta 1$ -Untereinheit befinden, können durch Ligandenbindung exponiert werden. Integrine besitzen in aktiver Konformation auch ein freiliegendes Epitop für den inhibitorischen mAk 13 und können hierüber wieder inaktiviert werden. Sobald aber ein aktives Integrin einen Liganden gebunden hat, werden nur noch Epitope für stimulatorische Antikörper freigelegt – sogenannte Liganden-induzierte Bindungsstellen (Abb. 5). Zusätzlich werden durch Ligandenbindung Outside-In-Signale über zyttoplasmatische Integrinkomponenten in die Zelle weitergeleitet (Hynes, 1992). Unter physiologischen Bedingungen jedoch steuert die Zelle vermutlich über Inside-Out-Signale die Ligandenbindungsaffinität mittels Konformation zytoplasmatischer Integrinanteile. Die intrazellulär vermittelte Adhäsion ist auch durch Aktivierung der Proteinkinase-C-Familie möglich, die durch Clustern von Integrinen ohne erhöhte Ligandenbindungsaffinität erfolgt (Sanchez-Mateos, 1996).

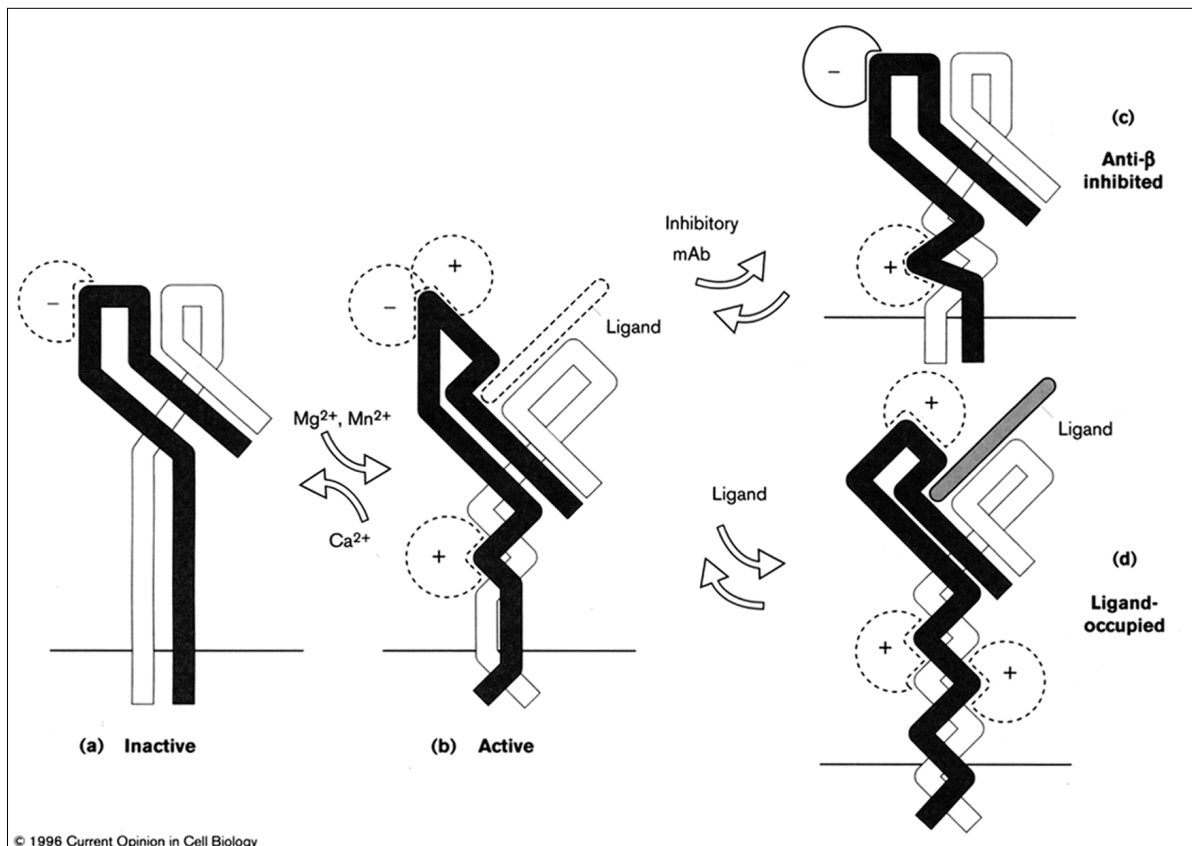


Abb. 5: Konformationsmodell. Das Modell veranschaulicht die Wirkung zweiwertiger Kationen und der Ligandenbindung auf die Integrinkonformation. Durch Formveränderung der α - (weiß) und der β - (schwarz) Untereinheit ändert sich die Epitopexpression für inhibitorische (-) und stimulatorische/anti-LIBS (ligandeninduzierte Bindungsstellen) Antikörper (gestrichelte Linie = nicht besetzt; durchgezogene Linie = besetzt) (Humphries, 1996).

- Ca^{2+} -besetzte inaktive Integrine exprimieren Epitope für inhibitorische Antikörper (mAk 13).
- Mg^{2+} und Mn^{2+} bringen eine aktive Konformation hervor. Ligandenbindung und Bindung stimulatorischer Antikörper (mAk 12G10) sind jetzt auch möglich.
- Die Bindung des inhibitorischen Antikörpers verschließt die Ligandenbindungsstelle.
- Die Ligandenbindung bringt LIBS für stimulatorische Antikörper hervor. Beachte weiterhin die zytoplasmatische Konformationsänderung unterhalb der durchgezogenen Linie.

1.2.5 Integrin-vermittelte Adhäsion bei der Hämatopoese

Im Knochenmark findet die Reifung hämatopoetischer Zellen, die zwischen Gefäßen, Stromazellen und extrazellulären Matrixproteinen wie Fibronectin, Kollagen I, III und IV u.a. eingebettet sind, statt. Nach Ausdifferenzierung passieren Blutzellen die Knochenmark-Blut-Schranke, die aus Adventitiazelle, Basalmembran und Endothelzelle besteht. β 1-Integrine spielen bei der notwendigen Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion zur kontrollierten Adhäsion, Differenzierung und Migration hämatopoetischer Zellen eine wichtige Rolle (Löffler und Petrides, 1997). α 4 β 1- (VLA-4) und α 5 β 1-Integrine (VLA-5) sind die wichtigsten Fibronectinrezeptoren für CD34⁺-myeloetische Vorläuferzellen (Kerst et al., 1993). VLA-4 bindet das CS-1-Segment im Fibronectin und VCAM-1 auf Endothelzellen, während VLA-5 das RGD-Peptid im Fibronectin erkennt (Verfaillie et al., 1994; Sanchez Aparicio et al., 1994). *In vitro* und *in vivo* ändert sich das VLA-4/VLA-5-Expressionsmuster auf der Zelloberfläche von Myelozyten in Abhängigkeit ihres Reifegrades. Die schon im frühen Differenzierungsstadium (myelozytisch-metamyelozytisch) reduzierte VLA-5/Fibronectin-Interaktion durch VLA-5-Expressionsabnahme und die allmählich stärkere Interaktion von VCAM-1 aktivierter Endothel- und Stromazellen mit VLA-4 dient vermutlich der Passage reifer Zellen ins periphere Blut (Kerst et al., 1993, van der Velde-Zimmermann et al., 1996).

Die aus dem Knochenmark stammende myeloische HL-60-Zelllinie adhärirt VLA-4-/VLA-5-abhängig auf Fibronectin und kann durch Spreizung Zellkontakte zu Stromazellen aufbauen (van der Velde-Zimmerman et al., 1996). In geringer Zahl differenzieren sie zu migrierenden Zellen (Gallagher et al., 1979). Ihre spontane Differenzierung ist möglicherweise durch autokrine TNF α -Sekretion erklärbar (Xie et al., 1998). *In vitro* können HL-60-Zellen durch langfristige DMSO-Inkubation (3 bis 4 d) granulozytär differenzieren. Sie exprimieren weniger VLA-5 auf der Zelloberfläche, behalten aber das VLA-4 im Gegensatz zu peripheren Granulozyten. Ihre herabgesetzte Adhäsion auf Fibronectin korreliert mit der VLA-5-Abnahme (Yamamoto et al., 1993). Die β 1-Integrin-vermittelte Adhäsion auf Fibronectin kann jedoch bei DMSO-differenzierten HL-60-Zellen durch den Phorbolster PMA besonders stark induziert werden. Ein Inside-Out-Signal-Mechanismus über PMA-induzierte PKC-Aktivierung wird hierfür verantwortlich gemacht (Bohnsack and Chang, 1994).