

## Zusammenfassung

Ruhende Leukozyten zirkulieren mit dem Blutstrom durch den Körper, müssen die Gefäße jedoch verlassen, um ihre immunologische Funktion auszuüben. Die gezielte Auswanderung aus den Gefäßen während Entzündungsreaktionen und Lymphocyten-Rezirkulation wird durch das Zusammenspiel verschiedener leukozytärer und endothelialer Adhäsionsmoleküle sowie proinflammatorischer Aktivatoren reguliert, die eine mehrstufige Adhäsionskaskade bilden. L-Selektin, ein Kohlehydrat-bindendes Adhäsions-molekül auf Leukozyten, vermittelt den ersten Schritt dieser Kaskade durch transienter Kontakt mit vaskulären Mucin-ähnlichen Adhäsionsmolekülen. Diese Interaktion führt zum langsamen Rollen der Leukozyten entlang der Gefäßwand, das die Voraussetzung für die feste Anheftung der Blutzellen an das Endothel ist. Neben der Rolle bei der initialen Adhäsion aktiviert L-Selektin intrazelluläre Signalwege in Leukozyten und wird selbst durch Signale aus dem Inneren der Zelle in seiner Bindungsaktivität moduliert. Verstärkte Bindung kann nach Chemokin-Behandlung oder zelluläre Aktivierung durch den T-Zell-Rezeptor beobachtet werden. Es wird vermutet, dass diese Aktivierung durch eine Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne des Rezeptors an Serin-Resten verursacht wird. Obwohl zahlreiche zelluläre Signalwege bekannt sind, die von L-Selektin beeinflusst werden, sind die Vorgänge auf der Ebene des Rezeptors unbekannt. Das Ziel dieser Arbeit war daher die Isolation intrazellulärer Interaktionspartner von L-Selektin, die eine Rolle in der Signalübermittlung spielen. Des weiteren sollten Kinasen identifiziert werden, die die Phosphorylierung des Rezeptors vermitteln.

Zu diesem Zweck wurde die Fähigkeit verschiedener Serin/Threonin Kinasen zur Phosphorylierung der cytoplasmatischen Domäne von L-Selektin getestet. Sowohl Protein Kinase C (PKC) als cGMP-abhängige Protein Kinase (PKG) sind in der Lage, diese Sequenz als Substrat zu verwenden, während Protein Kinase A keine Aktivität gegenüber diesem Protein besitzt.

Durch Affinitätsreinigung wurde eine Kinase-Aktivität aus Zellysaten isoliert, die fest an die zytoplasmatische Domäne von L-Selektin bindet und diese an Serin-Resten phosphoryliert. Inhibitorstudien zeigten, dass diese Kinase durch spezifische PKC-Antagonisten hemmbar ist. Durch Immunodetektion konnten zwei PKC-Isozyme nachgewiesen werden, die mit einem Lscyto Fusionsprotein assoziierten: neuartige PKC $\theta$  und atypische PKC $\lambda$ .

Die Suche nach Interaktionspartnern, die spezifisch an die Serin-phosphorylierte Form von L-Selektin binden, führte zu Isolation zweier Proteine, die als konventionelle PKC $\alpha$  und wiederum PKC $\theta$  identifiziert wurden. PKC $\theta$  bindet phosphoryliertes L-Selektin in stärkerem Ausmaß als das nicht-modifizierte Protein. Sowohl PKC $\alpha$  als auch PKC $\theta$  co-immunpräzipitieren mit L-Selektin aus PMA-behandelten T-Zell-Lysaten, was zeigt, daß diese Interaktion in intakten Zellen stattfindet.

Diese Untersuchung zeigt, daß eine Isozym-spezifische Assoziation von PKC mit L-Selektin stattfindet und daß diese Interaktion durch Serin-Phosphorylierung des Rezeptors reguliert wird. Dies deutet darauf hin, daß PKC die zelluläre L-Selektin-Kinase ist und dass diese Kinase eine zentrale Rolle in Signal-übertragungsvorgängen des Rezeptors spielt.