

Medizinische Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin  
Aus dem „Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie“  
Direktor: Prof. Dr. med. R. Tauber

**Konstruktion und Expression einer L-Selektin/CD44-Chimäre zur  
funktionellen Charakterisierung der Transmembrandomäne von  
L-Selektin**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der  
medizinischen Doktorwürde  
der Charité – Universitätsmedizin Berlin

vorgelegt von: Christian-Alexander Reich  
aus Berlin

Referent: Prof. Dr. med. R. Tauber

Koreferent: Prof. Dr. med. M. Schaefer

Gedruckt mit Genehmigung der Charité – Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 17.03.2006

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>3</b>
2.1	Die Plasmamembran: Schnittstelle zwischen Zelle und Umgebung.....	3
2.2	Infektion und Entzündung: Rolle der Zelladhäsion.....	4
2.3	Die leukozytäre Adhäsionskaskade .....	4
2.4	Oberflächentopographie des Leukozyten.....	7
2.4.1	Microvilli: Spezialisierte Domänen der Plasmamembran.....	8
2.4.2	Lokalisation von Zelladhäsionsmolekülen auf Leukozyten.....	9
2.5	<b>L-Selektin.....</b>	<b>10</b>
2.5.1	Struktur der Selektine.....	10
2.5.2	Funktionen von L-Selektin.....	11
2.5.3	Shedding von L-Selektin .....	12
2.5.4	Beteiligung von L-Selektin an pathophysiologischen Prozessen.....	14
2.6	<b>CD44.....</b>	<b>15</b>
2.6.1	Struktur von CD44.....	15
2.6.2	Funktionen von CD44.....	16
2.7	<b>Zielsetzung.....</b>	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>19</b>
3.1	<b>Isolierung von leukozytärer Gesamt-RNA.....</b>	<b>19</b>
3.2	<b>Isolierung der den transmembranären Abschnitt codierenden CD44-cDNA.....</b>	<b>20</b>
3.3	<b>Konstruktion der L-Selektin/tmCD44-Chimäre .....</b>	<b>21</b>
3.3.1	Übersicht: L-Selektin/tmCD44-Chimärenkonstruktion.....	23
3.3.2	Modifizierende PCR zur Fragmentgewinnung.....	24
3.3.3	SOE I: Herstellung von Fragment BC.....	26
3.3.4	Verkürzung von Fragment BC.....	28
3.3.5	SOE II: Herstellung von Fragment „ABC“.....	28
3.4	<b>Klonierung der L-Selektin/tmCD44-Chimäre in einen eukaryontischen Expressionsvektor.....</b>	<b>30</b>
3.5	<b>Transfektion von Nalm6-Zellen und K562-Zellen mit der L-Selektin/tmCD 44-Chimäre.....</b>	<b>33</b>
3.6	<b>Shedding der L-Selektin/tmCD44-Chimäre .....</b>	<b>35</b>
3.7	<b>Nachweis des L-Selektin/tmCD44-Proteins mittels Western-Blot.....</b>	<b>35</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>37</b>
4.1	<b>Konstruktion der L-Selektin/tmCD44-Chimäre .....</b>	<b>37</b>
4.2	<b>Oberflächenexpression von Zelladhäsionsmolekülen in Leukozyten.....</b>	<b>40</b>
4.2.1	Funktionelle Relevanz der differenzierten Lokalisation leukozytärer Adhäsionsmoleküle.....	43
4.2.2	Mechanismen der microvillären Lokalisation von L-Selektin.....	50
4.3	<b>Shedding von L-Selektin und der L/tmCD44-Chimäre.....</b>	<b>55</b>

<b>4.4 Funktionelle Bedeutung der Transmembrandomäne von L-Selektin.....</b>	<b>57</b>
4.4.1 Experimentelle Einsatzmöglichkeiten der L/tmCD44-Chimäre.....	58
<b>5 MATERIALIEN UND METHODEN.....</b>	<b>61</b>
<b>5.1 Materialien.....</b>	<b>61</b>
5.1.1 Vektoren.....	61
5.1.2 Bakterienstämme.....	61
5.1.3 Zelllinien.....	61
5.1.4 Primärkulturen.....	61
5.1.5 Antikörper.....	61
5.1.6 Kits.....	62
5.1.7 Enzyme.....	62
5.1.8 Nukleotide und Primer.....	62
5.1.9 Größengewichtsstandard für DNA.....	63
5.1.10 Pufferlösungen.....	63
5.1.11 Substanzen.....	64
5.1.12 Verbrauchsmaterialien.....	65
5.1.13 Geräte.....	65
<b>5.2 Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>66</b>
5.2.1 mRNA-Isolierung aus Leukozyten.....	66
5.2.2 Präparation von Plasmid-DNA.....	66
5.2.3 Reinigung von DNA durch Phenolextraktion und Ethanolpräzipitation.....	67
5.2.4 Konzentrationsbestimmung von DNA.....	67
5.2.5 Elektrophoretische Auf trennung von DNA.....	68
5.2.6 Reinigung und Isolierung von DNA-Fragmenten.....	68
5.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten.....	69
5.2.8 Transformation von Plasmid-DNA in E. coli.....	69
5.2.9 Kompetente Zellen für die Transformation.....	70
5.2.10 Gefrierkulturen von E. coli.....	70
5.2.11 PCR-Amplifikation ("Polymerase-Chain-Reaction").....	70
5.2.12 Reverse Transkription (RT-PCR).....	72
5.2.13 Klonierung von PCR-Produkten/SOE-Produkten.....	73
5.2.14 Proteinnachweis mittels Western-Blot.....	73
5.2.15 Sequenzierung von DNA durch fluoreszenzmarkierte Didesoxy-Nukleotide (Kettenabbruchverfahren nach Saenger).....	75
<b>5.3 Zellbiologische Methoden.....</b>	<b>75</b>
5.3.1 Isolierung von Leukozyten aus humanem Blut.....	75
5.3.2 Zellkultur von humanen Leukozyten und Lymphomzelllinien.....	77
5.3.3 Anlegen von Gefrierkulturen.....	77
5.3.4 Transfektion der humanen Lymphom-Zelllinien Nalm6 und K562.....	77
5.3.5 Selektion transfizierter Zellen durch Antibiotika.....	79
5.3.6 Anreicherung transfizierter Zellen durch Magnetpartikel.....	80
5.3.7 FACS-Analysen (Fluorescence-activated cell scan).....	80
5.3.8 Qualitativer und quantitativer Nachweis von sL-Selektin durch ELISA.....	81
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>83</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ANXA1	Annexin-1
ARDS	Acute respiratory distress syndrome
Arg	Arginin
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbulin (Bovine serum albumin)
CAM	Cell adhesion molecule
cDNA	copy-DANN (siehe DNA)
CIP	Calf intestine phosphatase
CMV	Cytomegalievirus
CS	Chondroitinsulfat
C-terminal	Carboxy-terminal
CTP	Cytosintriphosphat
Da	Dalton
DC	Dendritische Zellen
ddH <sub>2</sub> O	Zweifach destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
(d)NTP	(Desoxy-) Nukleotidtriphosphat
EcoR I	Escherichia coli Restriktionsnuclease I
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ERM	Ezrin/ Radixin/ Moesin
ESL-1	E-Selektin-Ligand-1
EZD	Extrazellulärdomäne
f.c.	Endkonzentration („final concentration“)
FACS	Fluorescence activated cell scan
FGF	Fibroblast growth factor
FKS	Fötales Kälberserum
G 418	Genitcin
g	Erdbeschleunigung
GAG	Glykosaminoglykan
GlyCAM-1	Glycosylation dependent cell adhesion molecule-1
GTP	Guanintriphosphat
HA	Hyaluronsäure
HEV	High endothelial venules
HIV	Human immunodeficiency virus
IC	Intrazellulär (-Domäne)
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IFN-γ	Interferon- γ
Ig-CAM	Immunglobulin-cell adhesion molecule
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IZD	Intrazellulärdomäne
KHK	Koronare Herzkrankheit
LAD	Leukocyte adhesion deficiency
LFA-1	Leukocyte function associated molecule-1

LPS	Lipopolysaccharid
LTB <sub>4</sub>	Leukotrien B <sub>4</sub>
Lys	Lysin
M	1 mol/l
MAdCAM-1	Mucosal addressin cell adhesion molecule-1
mer	Primerlänge; entspricht Basenpaaren
MHC	Major histocompatibility complex
mRNA	<i>messanger-RNA</i> (siehe RNA)
NMR-Spektroskopie	„Nuclear magnetic resonance“-Spektroskopie
N-terminal	Amino-terminal
NTS	Nicht translatierte Sequenz
PAF	Plättchen aktivierender Faktor
PAGE	Polyacrylamidgelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase chain reaction
PECAM-1	Platelet endothelial cell adhesion molecule (CD31)
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PNAd	Peripheral lymph node addressin
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1
PWO-Polymerase	<i>Pyrococcus woesei</i> -Polymerase
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rounds per minute
RPMI	Ross park memorial institute
rRNA	<i>ribosomale</i> -RNA (siehe RNA)
RT	Raumtemperatur
SCR	Short consensus repeat
SDS	Sodium dodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
Ser	Serin
Sgp	Sulphated glycoproteins
SL-Selektin	<i>soluble</i> L-Selektin
SOE	Splicing by overlap extension
TACE	TNF-α converting enzyme
TAE	Tris-Aacetat-EDTA
Taq-Polymerase	<i>Thermophilus aquaticus</i> -Polymerase
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBS	Tris buffered saline (Tris-gepufferte Salzlösung)
TE	Tris-EDTA
TGF-α	Transforming growth factor-α
TMD	Transmembrandomäne
TNF-α/-β	Tumor-Nekrose-Faktor-α/-β
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TPP	Thymidintriphosphat
UDP	Uridindiphosphat
UV	Ultraviolett
V/E-Cadherin	Vascular/Endothelial-Cadherin
VCAM	Vasculare cell adhesion molecule
VLA-4	Very late antigen-4
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indoyl-β-D-Galaktosid