

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

1	ZUSAMMENFASSUNG.....	1
2	EINLEITUNG.....	3
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	L-Selektin.....	10
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	CD44.....	15
2.6.1	Struktur von CD44.....	15
2.6.2	Funktionen von CD44.....	16
2.7	Zielsetzung.....	17
3	ERGEBNISSE.....	19
3.1	Isolierung von leukozytärer Gesamt-RNA.....	19
3.2	Isolierung der den transmembranären Abschnitt codierenden CD44-cDNA.....	20
3.3	Konstruktion der L-Selektin/tmCD44-Chimäre.....	21
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	Klonierung der L-Selektin/tmCD44-Chimäre in einen eukaryontischen Expressionsvektor.....	30
3.5	Transfektion von Nalm6-Zellen und K562-Zellen mit der L-Selektin/tmCD 44-Chimäre.....	33
3.6	Shedding der L-Selektin/tmCD44-Chimäre	35
3.7	Nachweis des L-Selektin/tmCD44-Proteins mittels Western-Blot.....	35
4	DISKUSSION.....	37
4.1	Konstruktion der L-Selektin/tmCD44-Chimäre.....	37
4.2	Oberflächenexpression von Zelladhäsionsmolekülen in Leukozyten.....	40
4.2.1	Funktionelle Relevanz der differenzierten Lokalisation leukozytärer Adhäsionsmoleküle.....	43
4.2.2	Mechanismen der microvillären Lokalisation von L-Selektin.....	50
4.3	Shedding von L-Selektin und der L/tmCD44-Chimäre.....	55

4.4 Funktionelle Bedeutung der Transmembrandomäne von L-Selektin.....	57
4.4.1 Experimentelle Einsatzmöglichkeiten der L/tmCD44-Chimäre.....	58
5 MATERIALIEN UND METHODEN.....	61
5.1 Materialien.....	61
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
5.2 Molekularbiologische Methoden.....	66
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
5.3 Zellbiologische Methoden.....	75
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
6 LITERATURVERZEICHNIS.....	83

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 ₂ 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 ₄	Leukotrien B ₄
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