

# 1 Zusammenfassung

Die gezielte Auswanderung der im Gefäßsystem zirkulierenden Leukozyten bei Entzündungsreaktionen sowie die Lymphozytenrezirkulation in lymphatische Gewebe („Homing“) sind für ein intaktes Immunsystem unerlässlich. Das Auswandern der Leukozyten aus den Gefäßen wird durch ein mehrstufiges, differenziert reguliertes Zusammenspiel verschiedener leukozytärer und endothelialer Adhäsionsmoleküle sowie proinflammatorischer Mediatoren vermittelt bzw. reguliert.

L-Selektin, ein kohlenhydratbindendes Adhäsionsmolekül auf Leukozyten, leitet den ersten Schritt dieser Kaskade ein, indem es den initialen adhäsiven Kontakt mit dem Endothel und das sich anschließende langsame Rollen der Leukozyten auf dem Endothel vermittelt. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen, dass L-Selektin auf der komplex strukturierten leukozytären Zelloberfläche ausschließlich auf den Spitzen der Microvilli, häufig in Clustern formiert, lokalisiert ist. Diese exponierte Lage verbessert unter Strömungsbedingungen *in vitro* und *in vivo* die Interaktion mit endothelialen Liganden und erhöht die Anzahl rollender Leukozyten. Welche Regionen des L-Selektinmoleküls bzw. welche Mechanismen an dieser funktionell sinnvollen Positionierung beteiligt sind, ist nur teilweise verstanden. Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen hatten auf eine Rolle des membrannahen zytoplasmatischen Abschnitts von L-Selektin hingewiesen.

Die hochgradige Konservierung des 22 Aminosäuren umfassenden, transmembranären Abschnitts legen darüber hinaus eine Mitwirkung dieser Molekülregion nahe. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch Konstruktion und Expression einer neuartigen L-Selektinmutante (L-Selektin/tmCD44), bei der die Transmembransequenz von L-Selektin durch diejenige von CD44 ersetzt ist, die Grundlage für Untersuchungen dieser Frage zu schaffen.

Hierzu wurde eine cDNA, bestehend aus den Sequenzen der extrazellulären L-Selektindomäne, des transmembranären CD44-Abschnitts und der intrazellulären L-Selektindomäne erzeugt. Während für die Gewinnung der L-Selektinabschnitte durch Vorarbeiten der Arbeitsgruppe die cDNA von L-Selektin zur Verfügung stand, musste die der Transmembrandomäne von CD44 zunächst isoliert werden. Als Grundlage wurde aus

humanen Leukozyten mRNA gewonnen und mittels PCR ein cDNA-Fragment generiert, das den entsprechenden CD44-Abschnitt enthielt. Die Verknüpfung der drei cDNA-Abschnitte erfolgte basengenau mit Hilfe der PCR-basierten Methode „Splicing by overlap extension“ („SOE“); Mutationen der Basenabfolge wurden durch Sequenzierung ausgeschlossen. Nach Klonierung des rekombinanten Gens wurde es in den Zelllinien Nalm6 und K562 zur Expression gebracht. Das Fusionsprotein konnte in beiden Zelllinien mittels Western-Blot nachgewiesen werden, die Expression auf der Zelloberfläche wurde durch FACS-Analyse gezeigt. Durch Nachweis von löslichem L-Selektin (sL-Selektin) im Zellüberstand transfizierter K562-Zellen mittels ELISA konnte gezeigt werden, dass die L-Selektin/tmCD44-Chimäre, ähnlich der Wildtyp-Form, proteolytisch von der Zelloberfläche abgespalten wird. Die Ergebnisse zeigen, dass die L-Selektinchimäre korrekt aus dem endoplasmatischen Retikulum zur Zelloberfläche transportiert und hier in die Plasmamembran insertiert wird.

Damit ist das L-Selektin/tmCD44-Konstrukt hervorragend geeignet, in weiterführenden Untersuchungen den Einfluss der Transmembrandomäne auf die Zelloberflächenlokalisierung zu untersuchen.

Darüber hinaus sollte sie bei künftigen Untersuchungen eine Charakterisierung der Rolle der Transmembrandomäne in Hinblick auf weitere funktionelle Merkmale von L-Selektin, wie die Signaltransduktion, die Regulation des Shedding, die effiziente Vermittlung von Zelladhäsion unter Flussbedingungen sowie die räumliche Konfiguration einzelner L-Selektindomänen, ermöglichen.

Somit steht mit der neuartigen L-Selektinmutante ein vielseitiges Instrument zur umfassenden funktionellen Charakterisierung der Transmembrandomäne von L-Selektin zur Verfügung.