2 Einleitung

2.1 Die Plasmamembran: Schnittstelle zwischen Zelle und Umgebung

Innerhalb des menschlichen Organismus interagieren die einzelnen Zellen ständig mit ihrem Umgebungsmilieu und treten untereinander in Kontakt. Der Plasmamembran kommt hierbei die zentrale Rolle einer Schnittstelle zu. Sie vermittelt und reguliert vielfältige, für Homöostase, Zellfunktion, -interaktion und -kommunikation essentielle Aufgaben wie gerichteten Elektrolyt- und Nährstofftransport, die Bindung von Transmittern, Zytokinen und anderen Signalmolekülen sowie die Adhäsion an benachbarte Zellen oder an die extrazelluläre Matrix. Um diese Funktionen auszuüben, muss die Zelloberfläche dynamisch an die wechselnden Umgebungsbedingungen adaptiert werden. Dies kann durch regulierte Expression von Zelloberflächenproteinen, durch Internalisierung in Endosomen/Lysosomen bzw. Recycling aus diesen Kompartimenten oder durch proteolytische Abspaltung der funktionell wichtigen Ektodomäne von membranständigen Adhäsionsmolekülen, das sogenannte „Shedding“, erreicht werden. Morphologisch wird die Plasmamembran vieler hochdifferenzierter Zellen zudem in Domänen unterteilt, denen jeweils spezifische Aufgaben zukommen. Beispiele hierfür sind die Gliederung einer Nervenzelle in Dendriten, Zellkörper, Axon und Synapsen oder die Polarisierung einer Darmepithelzelle in eine, mit Microvilli besetzte, luminale und eine basolaterale Domäne.

Auch bei primär nicht polarisierten Zellen wie Leukozyten und Lymphozyten findet man elektronenmikroskopisch eine komplizierte Oberflächenstruktur mit zahlreichen Protrusionen (Van Ewijk et al. 1980), die bei der Etablierung von Zell-Zell-Kontakten eine wichtige Rolle spielen (von Andrian et al. 1995).

Die dynamische Organisation in einzelne, morphologisch und funktionell unterschiedliche Kompartimente erfolgt maßgeblich durch das direkt unter der Plasmamembran befindliche kortikale Aktin-Zytoskelett in Kooperation mit spezialisierten Ankerproteinen (Greicius et al. 2004). Kompartimentierung innerhalb der Domänen resultiert daraus, dass Proteine reguliert nur in bestimmten Teilbereichen der Zelloberfläche lokalisiert werden. So wird zum Beispiel auf Leukozyten das Zelladhäsionsmolekül L-Selektin nur auf den Spitzen der

Membranprotrusionen („Microvilli“) präsentiert, während ein anderes Adhäsionsmolekül, CD44, lediglich auf dem planen Zellkörper vorkommt (Picker et al. 1991; von Andrian et al. 1995). Desweiteren wird die Oberflächenexpression von L-Selektin durch mindestens eine Protease („Sheddase“) moduliert (Jung et al. 1990).

Sowohl die kompartimentbezogene selektive Proteinexpression als auch Endozytose, Recycling und Shedding von Zelladhäsionsmolekülen stellen Schlüsselprozesse der Zelloberflächenregulation dar. Welche Mechanismen ihnen zugrunde liegen bzw. welche molekularen Regionen von Zelloberflächenproteinen hieran beteiligt sind, ist bislang nur zum Teil bekannt (Abitorabi et al. 1997; Stein et al. 1999; Greicius et al. 2004).

2.2 Infektion und Entzündung: Rolle der Zelladhäsion

Unabhängig von der zugrunde liegenden Ursache bzw. Noxe reagiert der menschliche Organismus auf eine Gewebeschädigung uniform mit einer komplexen Reaktion, an der humorale Faktoren, wie das Komplementsystem, das Gerinnungssystem und Zytokine sowie Immunzellen, insbesondere neutrophile Granulozyten und Monozyten, beteiligt sind. Sie hat das Ziel, die schädigenden Noxen lokal zu begrenzen und zu eliminieren. Diesen für die Aufrechterhaltung von Homöostase und Körperintegrität essentiellen Schutzmechanismus bezeichnet man als *Entzündung*.

Um an den Ort der Schädigung zu gelangen müssen die zirkulierenden Leukozyten das Blutgefäß verlassen. Dieser Vorgang, der für ein funktionsfähiges Immunsystem entscheidend ist, wird als *Extravasation* bezeichnet. Hierfür sind komplexe Interaktionen zwischen Immunzelle und Endothel, die durch eine Vielzahl von Zelladhäsionsmolekülen und ihren Liganden vermittelt werden, notwendig. Die Summe dieser Ereignisse bezeichnet man als *leukozytäre Adhäsionskaskade* (Springer 1994).

2.3 Die leukozytäre Adhäsionskaskade

Die Extravasation von Leukozyten findet aufgrund der niedrigen Flussgeschwindigkeiten und dem im Vergleich zu anderen Stromgebieten geringen Scherstress hauptsächlich im Stromgebiet der postkapillären Venolen statt. Dies geschieht zum einen im Rahmen des

Lymphozyten-„Homings“ an Venolen der lymphatischen Organe, die mit spezialisiertem „hoch aufgebautem“ Epithel ausgekleidet sind (High Endothelial Venules =HEV) und zum anderen in Bereichen des Organismus, in denen entzündliche Prozesse ablaufen (Girard et al. 1995). Durch die koordinierte Interaktion von verschiedenen Adhäsionsmolekülen mit ihren Liganden auf Gefäßwand und Leukozyt gelangen Immunzellen an ihren Zielort, d.h. in das entzündete Gewebe bzw. die lymphatischen Organe. Die Extravasation ist ein mehrstufig ablaufender Prozess, den man formal in die sich überlappenden Phasen „initialer Kontakt“, „Leukozytenrollen“ („Rolling“), „feste Adhäsion“ und „Diapedese“ einteilen kann. Ihre sequentielle Abfolge ist schematisch in Abbildung 1 dargestellt (Springer 1994; Butcher et al. 1996).

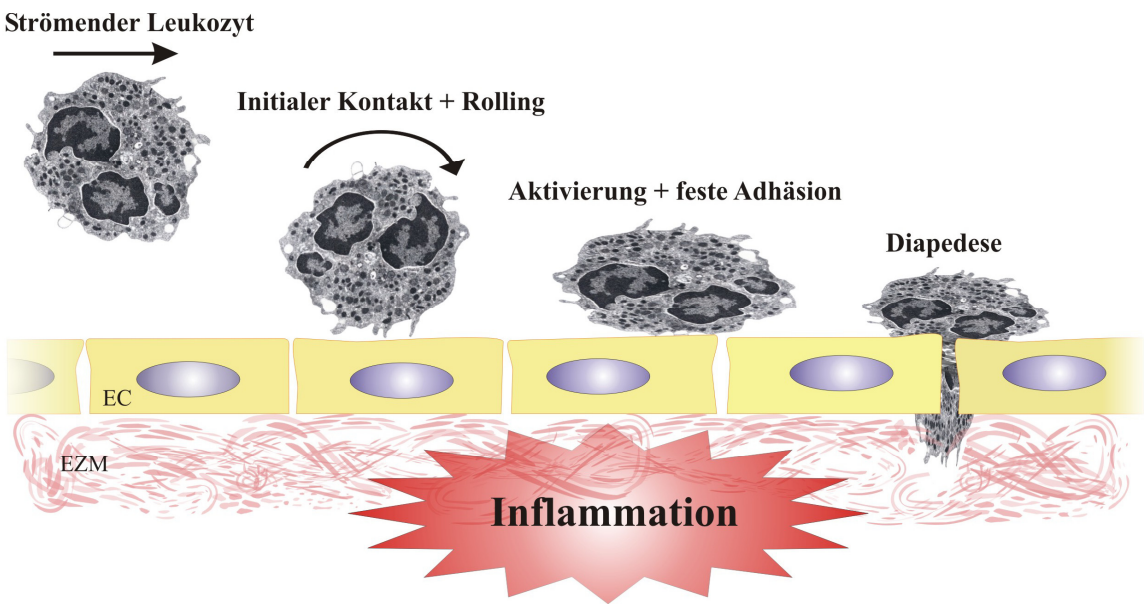


Abbildung 1: Die leukozytäre Zelladhäsionskaskade. In Entzündungsgebieten und in den HEV der Lymphknoten erfolgt die Extravasation der Leukozyten in mehreren aufeinander folgenden Schritten. Der initiale Kontakt („Capture“, „Tethering“) mit dem Endothel führt zu einer langsamen Rollbewegung („Rolling“) entlang der Gefäßinnenwand. Aktivierung der rollenden Zellen induziert die feste Adhäsion und eine Abflachung des Leukozyten. Anschließend kommt es zur Migration des Leukozyten durch die Endothelspalten in das extravasale subendotheliale Gewebe (Diapedese). EC: Endothelzelle; EZM: Extrazellulärmatrix

Verschiedene rheologische und hydrodynamische Effekte erhöhen die Wahrscheinlichkeit einer räumlichen Annäherung von „freischwimmendem“ Leukozyt und Endothel. Hierzu gehören die verlangsamte Blutströmungsgeschwindigkeit im vasodilatierten Entzündungsgebiet, die Kollisionen von Leukozyten mit den im Gefäßquerschnitt mittig strömenden Erythrozyten (Schmid-Schonbein et al. 1980) sowie die turbulente Blutströmung an Gefäßaufzweigungen. Das Einfangen des Leukozyten (sogenanntes „Capture“) und das

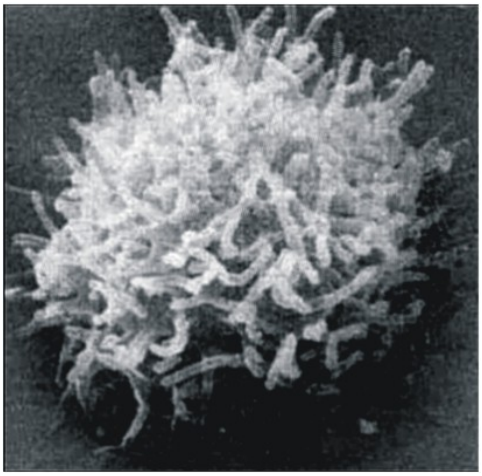
sich daran anschließende Rollen auf dem Endothel werden überwiegend durch L-Selektin vermittelt (Ley 1996), in Lymphoyten auch durch α4β7-Integrin (Berlin et al. 1995) und α4β1-Integrin (Alon et al. 1995). Auch vermittelt durch PSGL-1 (P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1), dessen Bindungspartner P-Selektin durch proinflammatorische Zytokine, wie Interleukin-1 (IL-1) und Tumor-Nekrose-Faktor-α (TNF-α), aus den Weibel-Palade-Körperchen rasch auf die Endotheloberfläche transportiert wird, kann Rollen erfolgen (Moore et al. 1995). Zudem können bereits am Endothel adhärierte Neutrophile über Interaktionen zwischen PSGL-1 und L-Selektin weitere Neutrophile aus dem Blutstrom binden, wodurch die Zahl an adhärierenden Leukozyten zusätzlich erhöht wird (Walcheck et al. 1996). Außerdem findet Rollen via E-Selektin über den Liganden ESL-1 (E-Selektin-Ligand-1) statt (Steegmaier et al. 1997). Bemerkenswert hierbei erscheint die Tatsache, dass sowohl L-Selektin (Bruehl et al. 1996) als auch α4-Integrine (Berlin et al. 1995), PSGL-1 und ESL-1 (Steegmaier et al. 1997) auf leukozytären Membranprojektionen, den Microvilli, lokalisiert sind. Diese Membranproteine sind alle an der Etablierung einer Bindung an das Endothel beteiligt. Für L-Selektin konnte gezeigt werden, dass diese Oberflächenverteilung die Kontaktinitiierung unter Flussbedingungen dramatisch verbessert (von Andrian et al. 1995). Das Rollen ist dabei durch niedrigaffine transiente Wechselwirkungen zwischen Adhäsionsmolekülen mit repetitivem Wechsel von Aufbau und Lösen der Bindungen charakterisiert. Hierdurch wird der Leukozyt abgebremst und aktiviert (von Andrian et al. 1991). Die L-Selektinektodomäne wird während des Rollvorgangs rasch proteolytisch abgespalten („Shedding“) und β2-Integrine werden hochreguliert (Mobley et al. 1992). Die Aktivierung findet über sezernierte und oberflächengebundene Chemokine und Zytokine (z.B. Leukotrien B4, Plättchenaktivierter Faktor, Interleukin-8) der aktivierten Endothelzellen statt (Dunon et al. 1996). Die aktivierten Integrine binden hochaffin an Adhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie (Ig-CAM). Während ICAM-2 (ICAM: intercellular adhesion molecule) konstitutiv exprimiert wird, kommt es durch inflammatorische Stimuli zur vermehrten Expression von ICAM-1 (CD54) und VCAM-1 (VCAM: vascular cell adhesion molecule) auf dem Endothel (Dustin et al. 1989). Über diese Wechselwirkung wird die feste Adhäsion des Leukozyten an die Endothelzellen vermittelt sowie die Migration entlang eines chemotaktischen Gradienten durch den Interzellularspalt zwischen Endothelzellen eingeleitet. Durch L-Selektinshedding, Microvilliverlust und Formänderung im Sinne einer Abflachung liegt der Leukozyt breitbasig dem aktivierten Endothel auf, was Interaktionen mit Ig-CAM

auf einer großen Fläche ermöglicht. Signaltransduktionswege in den aktivierten Endothelzellen führen zur Lockerung interendothelialer Zell-Zell-Kontakte, die v.a. durch VE-Cadherin (Vascular/Endothelial-Cadherin) im Bereich der „Adherens junctions“ reguliert werden (Dustin et al. 1989). Für den nachfolgenden Durchtritt durch die Endothelspalten ist neben Integrinen insbesondere das Adhäsionsmolekül PECAM-1 (Platelet-endothelial-cell-adhesion-molecule; CD31) essentiell (Muller et al. 1993). Es finden homophile Bindungen zwischen den auf der Leukozytenoberfläche befindlichen und auf den lateralen Endothelwänden konzentriert exprimierten PECAM-1-Molekülen statt (Vaporciyan et al. 1993). Zusätzlich sind heterophile Interaktionen zwischen PECAM-1 und Komponenten der Extrazellulärmatrix zum Durchdringen der Basalmembran notwendig (Wakelin et al. 1996).

Zwei beim Menschen beschriebene Krankheiten, die auf Störungen der Leukozytenadhäsion beruhen („Leukocyte Adhesion Deficiency“: LAD-1 und LAD-2), verdeutlichen die Wichtigkeit der Funktion von Selektinen und β2-Integrinen für eine suffiziente Leukozytenrekrutierung. Bei LAD-1 wird die β2-Untereinheit (CD18) der leukozytären Integrine nicht exprimiert. Hierdurch kommt es zu einer Hemmung der integrinvermittelten festen Adhäsion der Leukozyten am Endothel (Muller et al. 1993; von Andrian et al. 1993; Hogg et al. 2000). Ursache von LAD-2 ist eine Mutation des UDP-Fucosetransporters im Golgi-Apparat (Luhn et al. 2001; Wild et al. 2002). Diese führt zu einer gestörten Bildung fukosylierter Selektinliganden und dadurch zu einem Defekt des Leukozytenrollens. Die klinische Symptomatik besteht bei beiden Erkrankungen in einem reduzierten Immunstatus mit rezidivierenden oder chronisch persistierenden bakteriellen Infektionen. Bei LAD-2 besteht zusätzlich eine schwere physische und psychische Entwicklungsverzögerung (Etzioni et al. 1992).

2.4 Oberflächentopographie des Leukozyten

Lange Zeit wurde die Plasmamembran von nicht aktivierten Leukozyten als eine funktionelle Einheit angesehen, auf der Adhäsionsmoleküle gleichmäßig verteilt sind, und die weder eine morphologische noch eine funktionelle Differenzierung aufweist. Elektronenmikroskopisch zeigt sich hingegen eine komplexe Oberflächenarchitektur mit fingerförmig hervortretenden Zellmembranausläufern, den Microvilli (siehe Abbildung 2) (Beesley et al. 1979; van Ewijk et al. 1980; von Andrian et al. 1995).



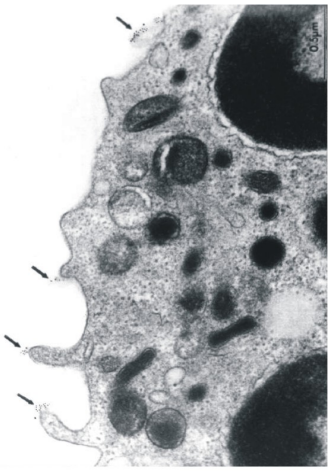


Abbildung 2: **Oberflächenstruktur eines humanen Leukozyten.** Elektronenmikroskopische Aufnahmen (links: Vergrößerung ca. 1:10000; entnommen aus: www.mybloodyourblood.org (9/2004); rechts: Kryoschnitt, Pfeile: Microvilli; entnommen aus: Bruehl et al. 1996)

2.4.1 Microvilli: Spezialisierte Domänen der Plasmamembran

Microvilli auf Granulozyten und Lymphozyten besetzen etwa ein Drittel der gesamten Zelloberfläche. Ihre anhand von elektronenmikroskopischen Schnitten gemessene mittlere Länge beträgt je nach Zelltyp zwischen 290 nm (Neutrophile Granulozyten) und 390 nm (Monozyten) (Bruehl et al. 1996). Die Zellmembran bildet somit die zwei topographisch abgegrenzten Mikrokompartimente „planer Zellkörper“ und „microvilläre Protrusionen“.

Für die Entstehung und die Regulation dieser hochdifferenzierten Oberflächenstruktur sind das Aktin-Zytoskelett sowie, neben anderen, auch Proteine der Ezrin-Radixin-Moesin-Gruppe (ERM-Proteine) verantwortlich. Diese drei strukturell eng verwandten Proteine sind Mitglieder der Bande 4.1-Superfamilie. Sie vernetzen als „Crosslinker“ kortikale Aktinfilamente mit der Plasmamembran und sind an der dynamischen Organisation der Zellform, z.B. im Rahmen der Extravasation, an der Bildung spezialisierter Plasmamembrandomänen wie der Microvilli (Bretscher 1983; Takeuchi et al. 1994; Bretscher et al. 2002) und Zelladhäsionskontaktstellen (Tsukita et al. 1999), oder an der Ausbildung von Filopodien beteiligt.

In menschlichen Leukozyten werden Ezrin und Moesin koexprimiert, während Radixin nicht nachweisbar ist. Moesin ist quantitativ am bedeutsamsten (Shcherbina et al. 1999). Die Relevanz für die Ausbildung von Microvilli wurde an Lymphoidzellen gezeigt. Nach

Behandlung mit Antisense-Oligonukleotiden gegen alle drei ERM-Proteine oder mit einem Antisense-Oligonukleotid gegen Moesin kommt es zu einem kompletten Verlust der Microvilli (Takeuchi et al. 1994).

Während der leukozytären Zelladhäsionskaskade kommt es nach dem initialen Rollen physiologischerweise zu einer Rückbildung der Microvilli. Dies erleichtert die Interaktion von nicht microvillär lokalisierten Adhäsionsmolekülen mit dem Endothel und verstärkt hierüber die feste Zelladhäsion an die Gefäßwand.

2.4.2 Lokalisation von Zelladhäsionsmolekülen auf Leukozyten

Granulozyten und Lymphozyten sind mit einer Vielzahl verschiedener Zelladhäsionsmoleküle ausgestattet. Mehrere von ihnen sind nicht gleichmäßig über die Zelloberfläche verteilt, sondern werden vielmehr auf diskreten Domänen der Zellmembran exprimiert (Picker et al. 1991; Erlandsen et al. 1993; Berlin et al. 1995). Neben L-Selektin ist auch für PSGL-1 (Moore et al. 1995), α4-Integrine (Berlin et al. 1995) und ESL-1 (Steegmaier et al. 1997) eine microvillusassoziierte Lokalisation nachgewiesen. L-Selektin, PSGL-1 und die α4-Integrine sind auf den Spitzen („Tips“) der Microvilli konzentriert, während ESL-1 gleichmäßig über den Microvillus verteilt ist. Für L-Selektin und PSGL-1 ist zudem die Bildung von „Clustern“, d.h. die konzentrierte Expression mehrerer Moleküle auf einen engen Bereich der Zellmembran, gezeigt.

Diese Zelladhäsionsmoleküle sind aufgrund ihrer exponierten Lage somit prädestiniert für die Initiierung von Zellkontakten sowie Leukozytenrollen unter Flussbedingungen. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass ein auf dem planen Teil der Zellmembran exprimiertes chimäres L-Selektin/CD44-Fusionsprotein, bestehend aus dem extrazellulären L-Selektinabschnitt und der transmembranären sowie der zytoplasmatischen CD44-Domäne, zwar in statischen Bindungsassays eine unveränderte Lektin-Bindungsaktivität aufwies, jedoch unter Flussbedingungen eine dramatisch geringere Fähigkeit zur Kontaktinitiierung mit monoklonalen Antikörpern und einem nativen Liganden (Peripheral lymph node addressin: PNAd) besaß (von Andrian et al. 1995).

Demgegenüber exprimieren Leukozyten eine weitere Gruppe von Adhäsionsmolekülen, deren Oberflächenverteilung die Microvilli ausspart, d.h. die sich lediglich auf dem flachen

Zellkörper finden. Hierzu gehören CD44 und die β2-Integrine αLβ2 (LFA-1) und αMβ2 (Mac-1). β2-Integrine vermitteln die feste Adhäsion an das Endothel (von Andrian et al. 1991; Von Andrian et al. 1992; Tohya et al. 1998). Eine dritte Gruppe von Zelloberflächenproteinen wird ohne Präferenz gleichmässig über die gesamte Zelle verteilt, beispielsweise PECAM-1 (CD31), das bei der interendothelialen Transmigration, nicht jedoch an den vorangehenden Adhäsionsschritten, beteiligt ist.

Die morphologische Kompartimentierung der Zelloberflächenmembran von Granulozyten wie von Lymphozyten stellt zusammen mit der differenzierten Expression von Adhäsionsmolekülen einen wichtigen regulatorischen Mechanismus dar, die Effektivität der Zelladhäsionskaskade unter Flussbedingungen zu optimieren (Stein et al 1995).

2.5 L-Selektin

Die Selektinfamilie besteht aus den drei eng verwandten, stark glykosylierten Zelladhäsionsmolekülen L-Selektin, P-Selektin und E-Selektin. E-Selektin wird auf aktivierten Endothelzellen exprimiert (Bevilacqua et al. 1993), P-Selektin findet sich sowohl auf Thrombozyten als auch auf aktiviertem Endothel (Hsu-Lin et al. 1984), während L-Selektin ausschließlich auf der Oberfläche von Leukozyten exprimiert wird (Gallatin et al. 1983).

2.5.1 Struktur der Selektine

L-Selektin stellt - wie alle Selektine - ein Calcium-bindendes transmembranäres Typ I-Glykoprotein dar, das an sialylierte Kohlenhydratgruppen bindet (Bevilacqua et al. 1987; Tedder et al. 1995). Sein struktureller Aufbau ist dem der anderen Selektine sehr ähnlich. N-terminal befindet sich eine C-Lektin-Domäne, die eine zentrale Bedeutung für die Bindungseigenschaften des Moleküls hat. Dieser folgt eine EGF-Domäne, eine bei den einzelnen Selektinen unterschiedliche Anzahl an kurzen „Consensus repeats“ (CR; zwei bei L-Selektin), eine transmembranäre sowie eine kurze zytoplasmatische Domäne (siehe Abbildung 3). L-Selektin wird auf allen Formen der Granulozyten, der Monozyten und der Lymphozyten konstitutiv exprimiert, mit Ausnahme einer Subpopoulation von Gedächtniszellen (Kansas 1992).

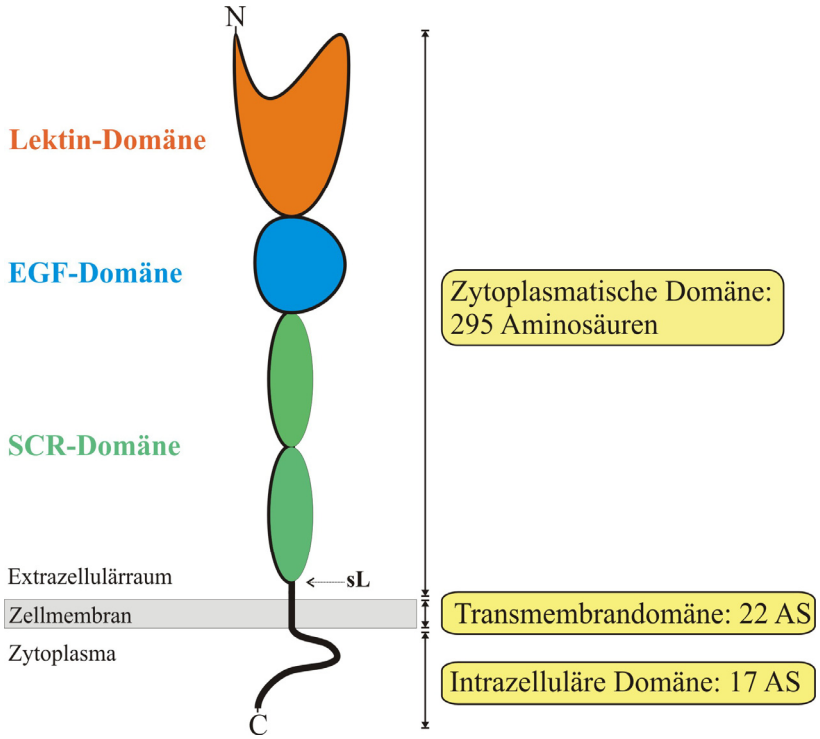


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von L-Selektin. EGF: epidermal growth factor; SCR: short consensus repeats; sL: Schnittstelle der Sheddingprotease, die abgespaltene Extrazellulärdomäne wird als sL-Selektin („soluble" L-Selektin) bezeichnet.

2.5.2 Funktionen von L-Selektin

L-Selektin initiiert den Zell-Zell-Kontakt, das sogenannte „Tethering", und die nachfolgende Rollbewegung von Leukozyten auf vaskulären Endothelien in Entzündungsgebieten sowie die Auswanderung von Lymphozyten in lymphatische Organe (Springer 1994; Butcher et al. 1996). Die Bindungen finden zwischen der Lektindomäne von L-Selektin und einem bisher auf molekularer Ebene nicht identifizierten Liganden auf aktiviertem Endothel statt. Als Liganden auf den HEV der Lymphknoten wurden GlyCAM-1 (Glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1), MAdCAM-1 (Mucosal addressin cell adhesion molecule-1), Sialomuzine der CD34-Familie (Endoglycan, Podocalyxin, CD34) und Sgp 200 (Sulphated glycoproteins 200) identifiziert (Patel et al. 2002; Fieger et al. 2003; Rosen 2004). Durch Bindungen von weiteren Leukozyten an schon adhärierte Zellen über eine Interaktion von L-Selektin mit PSGL-1 und Nucleolin kann die Akkumulation von Entzündungszellen lokal verstärkt werden (Walcheck et al. 1996; Harms et al. 2001). Durch Antikörper gegen L-Selektin kann die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten an aktivierte Endothelzellen inhibiert werden (Kishimoto et al. 1991). In ähnlicher Weise konnte eine lösliche L-Selektin-

IgG-Chimäre die Extravasation von Neutrophilen verhindern (Watson 1993). Nach initialer Bindung an die Endothelzellen vermittelt L-Selektin das Rollen der Leukozyten entlang des Endothels über schwachaffine transiente Ligandeninteraktionen (Ley et al. 1993). Für eine funktionell stabile Rollbewegung muss, im Gegensatz zur Funktion aller anderen am Rollen beteiligten Adhäsionsproteinen, bei Selektinen eine hydrodynamische Scherkraftschwelle überschritten werden (Alon et al. 1997). Nach Überschreiten dieser bleibt die Rollgeschwindigkeit über einen weiten Bereich steigender Scherkräfte konstant, wodurch zum einen unter physiologischen Bedingungen eine effektive Initialisierung weiterer Schritte der Adhäsionskaskade erleichtert wird, während zum anderen bei verlangsamtem Blutfluss eine inadäquate Leukozytenadhäsion erschwert wird (Finger et al. 1996; Yago et al. 2004).

In jüngster Zeit zeichnet sich auch eine Rolle von L-Selektin bei der Hämatopoese ab. L-Selektin bestimmt die interzelluläre Adhäsion von Vorläuferzellen und nimmt so Einfluss auf ihre Lokalisation, Proliferation und Differenzierung (Harms et al. 2001).

2.5.3 Shedding von L-Selektin

Durch eine Vielzahl verschiedener Stimuli kommt es während des „Tethering“ und Rollens zur proteolytischen Abspaltung fast der gesamten Extrazellulärdomäne von L-Selektin (Kishimoto et al. 1990). Dieser als „Shedding“ bezeichnete Prozess findet sich auch bei zahlreichen anderen membranständigen Adhäsionsmolekülen, Wachstumsfaktoren, Zytokinen oder Rezeptoren, z.B. bei TNF-α, IL-1R (Interleukin-1-Rezeptor), IL-6 und TGF-α (Transforming growth factor-α) (Arribas et al. 1996). Typische Auslöser für L-Selektinshedding können der Proteinkinase C-Aktivator PMA (Phorbol-12-myristat 13-acetat) (Jung et al. 1990), die Quervernetzung von L-Selektin (Palecanda et al. 1992), eine Zellaktivierung durch Chemoattraktantien (Kishimoto et al. 1989) oder eine leukozytäre Aktivierung über CD3 sein. Interessanterweise können auch bestimmte Medikamente, wie einige Vertreter aus der Gruppe der nicht steroidalen Antiphlogistika (Acetylsalicylsäure, Aceclofenac) (Diaz-Gonzalez et al. 1995), sowie Glucocorticoide (Dexamethason) (de Coupade et al. 2003) Shedding von L-Selektin induzieren.

Die Sheddingschnittstelle wurde im membranproximalen Teil zwischen den Aminosäureresten Lysin in Position 321 (Lys321) und Serin in Position 322 (Ser322) der

extrazellulären L-Selektindomäne, elf Aminosäurereste distal der transmembranären Domäne, lokalisiert (siehe Abbildung 3) (Kahn et al. 1994).

Die Sheddingprotease bzw. die Sheddingproteasen sind bis heute nicht eindeutig identifizert. Ein wahrscheinlicher Kandidat ist das TNF-α-converting-enzyme (TACE), für das L-Selektinshedding auf fetalen Thymozyten nachgewiesen werden konnte (Peschon et al. 1998). In TACE-defizienten Zellen findet kein durch Proteinkinase C (PKC) induziertes rasches Shedding von L-Selektin mehr statt, jedoch lässt sich weiterhin ein langsames, „basales“ oder „konstitutives“ Shedding nachweisen. Es scheint ebenfalls im Bereich der bekannten Sheddingschnittstelle stattzufinden. Beide Scheddingformen sind durch Hydroxamat-basierte Inhibitoren von Metalloproteinasen hemmbar (Walcheck et al. 2003).

Die physiologische Bedeutung des Sheddings liegt unter anderem in der Regulation der Rollgeschwindigkeit und somit der Extravasation von Leukozyten. Hierdurch wird eine überschießende Akkumulation von Leukozyten im Entzündungsbereich verhindert und somit die Inflammation auf ein umschriebenes Areal begrenzt (Walcheck et al. 1996). Auf zellulärer Ebene ist die komplexe Regulation des L-Selektinsheddings bislang schlecht verstanden. Während PKC L-Selektinshedding induziert, kommt dem Calmodulin eine wichtige Rolle als Inhibitor zu (Kahn et al. 1998). Verschiedene pathophysiologische Zustände, wie Diabetes mellitus Typ 1, Rheumatoide Arthrtitis, Leukämie, HIV-Infektion und Sepsis, gehen, bedingt durch eine gesteigerte Sheddingaktivität, mit erhöhten Plasmakonzentrationen des löslichen extrazellulären Fragments von L-Selektin (sL-Selektin) einher. Ein Akutes Lungenversagen (ARDS) hingegen ist bemerkenswerterweise mit signifikant erniedrigten sL-Selektinspiegeln assoziiert (Lampeter et al. 1992; Spertini et al. 1992; Donnelly et al. 1994; Humbria et al. 1994; Spertini et al. 1994). Bei Patienten mit Polytrauma zeigt eine erniedrigte Plasmakonzentration von sL-Selektin ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer schwerwiegenden pulmonalen Komplikation (ARDS, nosokomiale Pneumonie) an (Stengel et al. 2001; Stengel et al. 2004).

2.5.4 Beteiligung von L-Selektin an pathophysiologischen Prozessen

Ergebnisse sowohl aus Tierstudien als auch Beobachtungen am Menschen belegen die zentrale Bedeutung von L-Selektin für die frühe Phase der Leukozyten-Endothel-Interaktion im Rahmen von entzündlichen Prozessen.

Konsistent hiermit entfalten einige antiinflammatorische Medikamente wie Aceclofenac, Indometacin und Dexamethason ihre antiphlogistischen Effekte teilweise durch eine Aktivierung des Sheddings von L-Selektin auf Leukozyten (Diaz-Gonzalez et al. 1995; de Coupade et al. 2003). Vor diesem Hintergrund entstand in den letzten Jahren ein zunehmendes klinisches Interesse um die Rolle von L-Selektin bei zahlreichen pathophysiologischen Zuständen, bei denen Entzündungsprozesse eine zentrale Rolle einnehmen.

Gut untersucht sind bisher Erkrankungen, bei denen es in Folge einer überschießenden Immunreaktion zu einer übermässigen Infiltration des Gewebes mit Granulozyten kommt. Ein Beispiel hierfür ist der Reperfusionsschaden nach Myokardinfarkt. Spezifische L-Selektin-blockierende Antikörper können das Ausmaß der entstehenden Myokardnekrose nach Myokardinfarkt bei der Katze um über 50% reduzieren (Buerke et al. 1994). Ebenso konnte durch Vorbehandlung eines Herztransplantats mit einem kombinierten Antikörper gegen L- und E-Selektin vor Reperfusion das Ausmaß der frühen Infiltration mit neutrophilen Granulozyten nach Reperfusion signifikant gesenkt werden (Chen et al. 1995). Darüber hinaus kommt L-Selektin eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung endorphinhaltiger Entzündungszellen im Rahmen der endogenen Schmerzkontrolle entzündlicher Erkrankungen zu. So konnte nachgewiesen werden, dass L-Selektin auf opioidhaltigen Lymphozyten und Monozyten/Makrophagen exprimiert wird, die in entzündetes Subkutangewebe der Rattenpfote einwandern (Mousa et al. 2000).

In einer kürzlich erschienenen Publikation konnte gezeigt werden, dass L-Selektin an Lewis-Antigen-ähnlichen Kohlenhydratkomponenten des Bakteriums *Helicobacter pylori* bindet. Möglicherweise spielt dies *in vivo* eine pathogenetisch entscheidende Rolle bei der durch *H. pylori* induzierten chronischen Gastritis, bei Magen- und Duodenalulzera und bei der Entwicklung von Magenkarzinomen (Galustian et al. 2003). In jüngster Zeit zeichnet sich ab, dass L-Selektin und andere Zelladhäsionsmoleküle wie CD44 und P-Selektin auch bei malignen Erkrankungen beteiligt sind. Hierbei erleichtert L-Selektin synergistisch mit P-

Selektin durch Bildung von Tumorzell-Thrombozyten-Leukozyten-Mikroembolie die Metastasierung (Borsig et al. 2002). Ein möglicher Pathomechanismus beim paraneoplastischen Trousseau-Syndrom ist die Interaktion von L-Selektin mit abnormal glykosylierten Muzinen auf Adenokarzinomzellen; klinisch zeigt sich eine disseminierte „wandernde“ Thrombophlebitis (Wahrenbrock et al. 2003).

2.6 CD44

2.6.1 Struktur von CD44

CD44 ist ein im Organismus weit verbreitetes transmembranäres Glykoprotein. Es wird auf einer Vielzahl von Zelltypen, u.a. Leukozyten, epithelialen Zellen, Fibroblasten, Keratinozyten und einigen Endothelien exprimiert (Isacke et al. 2002). Obwohl es von einem einzigen Gen codiert wird, existiert eine Vielzahl von Isoformen, die durch alternatives Spleißen der mRNA und posttranslationale Modifikation über extensive N- und O-Glykosylierung, Anbindung von Glykosaminoglykanen und Sulfatierung entstehen. Das Molekulargewicht reicht je nach Variante von 80 bis zu 250 kDa (Bartolazzi et al. 1996; Esford et al. 1998). Das CD44-Gen enthält 20 Exons, von denen 12 bei dem am weitesten verbreiteten „hämatopoetischen CD44“ exprimiert werden. Diese sogenannte Standardform (CD44s) besitzt ein Molekulargewicht von 80 – 100 kDa und enthält keine varianten Exons. Alle Spleißvarianten entstehen durch Einfügen der alternativen Exons V1 – V10 an einer einzelnen Stelle des zellmembrannahen Bereichs der extrazellulären Domäne. Zusätzlich kann statt der aus 72 Aminosäuren bestehenden zytoplasmatischen Domäne durch alternatives Spleißen eine kürzere exprimiert werden (Naor et al. 1997). Sie besitzt mehrere Phosphorylierungsstellen, denen eine Bedeutung bei der Regulation der Interaktion mit dem Zytoskelett zugesprochen wird. Allen CD44-Isoformen ist eine hoch konservierte, durch Exon 17 kodierte Transmembrandomäne aus 21 Aminosäuren gemeinsam. Funktionell bedeutsam ist das Vorhandensein von drei proximal gelegenen Bindungsmotiven in unmittelbarer Nähe von Sequenzen basischer Aminosäureresten. Durch sie wird die Interaktion von CD44 mit Hyaluronsäure vermittelt.

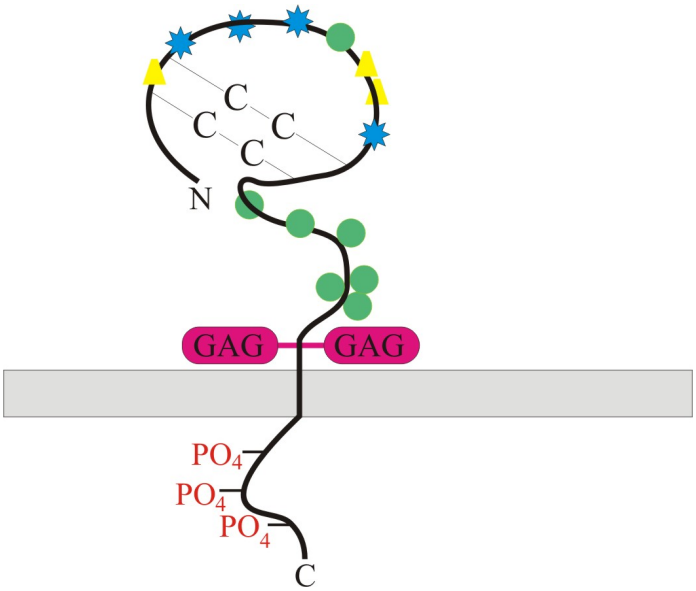


Abbildung 4: Schematische Struktur von CD44. Die Grundstruktur von CD44 wird nach der Translation umfassend modifiziert. Gelbe Dreiecke: N-Glykosylierungen; grüne Kreise: O-Glykosylierungen; blaue Sterne: Sulfatreste; GAG: Glykosaminoglykane; PO_4: potentielle Phosphorylierungsstellen; Art, Ort und Anzahl der Modifikationen unterscheiden sich je nach CD44-Variante erheblich voneinander.

2.6.2 Funktionen von CD44

CD44 wurde 1990 als der Hauptbindungspartner von Hyaluronsäure (HA), einem ubiquitär in der Extrazellulärmatrix vorkommenden, nicht sulfatierten Glykosaminoglykan, identifiziert (Aruffo et al. 1990). Daneben zeigen verschiedene Proteoglykanformen von CD44 Affinität zu weiteren Matrixkomponenten, wie Kollagen, Fibronektin, Osteopontin und Metalloproteinasen (Jalkanen et al. 1992; Ehnis et al. 1996; Weber et al. 1996). Aufgrund des weitverbreiteten Vorkommens von HA im Organismus und der gleichzeitig konstitutiven CD44-Expression auf einer Vielzahl von Zelltypen muss ihre Interaktion streng reguliert sein. Primär besitzt CD44 nur eine niedrige, nicht relevante Affinität für HA. Kommt es jedoch zur Zellaktivierung, z.B. durch Antigenbindung oder durch inflammatorische Zytokine wie IL-2, IL-8, TNF-α oder Interferon-γ (Levesque et al. 1997; Brown et al. 2001), bindet CD44 an HA mit hoher Affinität. Für die Ausbildung dieser hochaffinen, aktiven Form des CD44-Rezeptors sind neben vermehrter Expression verschiedene Strukturänderungen, wie Einbeziehen varianter Exons, Rezeptoroligomerisierung („Clustering“), Glykosylierung, Anbindung von Glykosaminoglykanen und Sulfatierung, beschrieben (Lesley et al. 1995; Pure et al. 1995; Maiti et al. 1998).

CD44 ist mitbeteiligt am Aufbau einer stabilen dreidimensionalen Extrazellulärmatrix, u.a. durch Bindung von Wachstumsfaktoren, wie FGF (Fibroblast growth factor), und besitzt Funktionen bei weiteren Zelladhäsionsmechanismen, unter anderem beim Homing von T-Lymphozyten. Bei der entzündungsbedingten Extravasation vermittelt CD44 zum einen Rollen, zum anderen kann es ICAM-1 und VCAM-1 auf dem Endothel hochregulieren (Bennett et al. 1995; DeGrendele et al. 1996). Darüberhinaus wird auch das Migrationsverhalten von Zellen, wie Fibroblasten und Melanomzellen, durch Bindung und Aktivierung von Metalloproteasen über CD44 beeinflusst, was bei der Invasion und Metastasierung von Tumoren eine wichtige Rolle spielt (Yu et al. 2000). CD44 scheint weiterhin an der Angiogenese bedeutsam zu sein. Bei Patienten mit Eingefäß-KHK (Koronare Herzkrankheit) mit schlechter Kollateralisierung der Koronarien konnte kürzlich eine verminderte CD44-Expression auf Monozyten nachgewiesen werden (van Royen et al. 2004).

Neben zellmembranständigem CD44 wurde eine lösliche 70 kDa-Form (sCD44) in Serum, Lymphe, Synovialflüssigkeit und bronchoalveolärer Lavage nachgewiesen (Katoh et al. 1994; Shi et al. 2001). Sie wird über proteolytische Abspaltung (Shedding) der extrazellulären Domäne durch eine transmembranäre Matrixmetalloproteinase und eine unbekannte Serinprotease freigesetzt (Okamoto et al. 1999; Kajita et al. 2001). Aktivierter Immunstatus, Entzündung und maligne Erkrankungen sind assoziiert mit erhöhten Plasmakonzentrationen von sCD44, während Immundefizienzen mit erniedrigten Konzentrationen korrelieren. Eine zweite Quelle für sCD44 ist die *de novo* Synthese einer Splicevariante ohne transmembranäre und cytoplasmatische Domäne (Katoh et al. 1994; Okamoto et al. 1999). sCD44 kann mit zellgebundenem CD44 um die Bindung an HA konkurrieren und besitzt hierdurch möglicherweise regulatorische Funktionen (Peterson et al. 2000).

2.7 Zielsetzung

Das Zelladhäsionsmolekül L-Selektin wird in geclusterter Form selektiv auf den Spitzen der Microvilli von Leukozyten exprimiert. Es ist bisher weitgehend unbekannt, welche Regionen des Moleküls für diese funktionell sinnvolle Rezeptorpositionierung verantwortlich sind, und vorangehende Untersuchungen waren zum Teil widersprüchlich.

Studien mit einer L-Selektin/CD44-Chimäre, bei der die zytoplasmatische und die transmembranäre Domäne von L-Selektin bzw. CD44 an die jeweilige extrazelluäre Domäne des anderen Adhäsionsmoleküls gekoppelt waren, sprachen gegen eine Beteiligung der extrazellulären Domäne an der Steuerung der Zelloberflächenlokalisation. Ebenso hatte die Deletion der letzten elf Aminosäuren der zytoplasmatischen Domäne (LΔcyto-Konstrukt), durch die der Kontakt mit dem Zytoskelett hergestellt wird, keinen Verlust der physiologischen distal-microvillären Position sowie des „Clusterings“ der L-Selektinmutante zur Folge. Andererseits führten Mutationen von zwei Aminosäuren der zytoplasmatischen Domäne, von denen eine nicht innerhalb des beim LΔcyto-Konstrukt deletierten Abschnitts lag, zu einer reduzierten microvillären Expression. Somit kommen als verantwortliche Molekülabschnitte für die besondere Topographie von L-Selektin noch Anteile der membranproximalen zytoplasmatischen Region oder/und die Transmembrandomäne in Betracht.

Die Rolle der Transmembrandomäne für die Zelloberflächenverteilung von L-Selektin ist bislang noch nicht isoliert untersucht worden. Für eine wichtige physiologische Funktion dieser Molekülregion spricht die Tatsache, dass dieser Abschnitt zwischen unterschiedlichen Spezies hoch konserviert ist. Unter der Hypothese, dass diese Region die lokale Verteilung auf die Spitzen der leukozytären Microvilli und/oder das „Clustering“ steuert, sollte in der vorliegenden Arbeit eine L-Selektin/CD44-Chimäre (L/tmCD44) mittels der PCR-Methode SOE („Splicing by overlap extension“) konstruiert werden, bei der innerhalb des L-Selektinmoleküls *isoliert* die Transmembrandomäne durch diejenige von CD44 ersetzt wurde.

Über Untersuchungen zur Lokalisation von L-Selektin hinaus kann das L-Selektin/tmCD44-Konstrukt künftig eine Charakterisierung der Rolle der Transmembrandomäne bei weiteren funktionellen Merkmalen von L-Selektin, wie dem „Clustering“, dem Shedding, der Vermittlung von Zelladhäsion („Tethering“/Rollen) und der Signaltransduktion, ermöglichen.

Um die Grundlagen hierfür zu schaffen, sollten die Zelllinien Nalm6 und K562 stabil mit dem L-Selektin/tmCD44-Konstrukt transfiziert werden.