

4. Diskussion

4.1 β 1-Integrinexpression hoch- und niedrigsialylierter HL-60-Zellen

4.1.1 Differenz des Molekulargewichts von β 1-Integrinen hoch- und niedrigsialylierter HL-60-Zellen

β 1-Integrine niedrig- und hochsialylierter HL-60-Zellen weisen eine Molekulargewichtsdifferenz von 10 kDa auf. Das in der Westernblot-Analyse detektierte β 1-Integrin aus dem Solubilisat hochsialylierter HL-60-Zellen hat ein Mr von 130 k (Abb. 6) und entspricht der in der Literatur beschriebenen reifen Form der β 1-Integrinuntereinheit (Hemler et al., 1987). Dabei bezieht sich der Begriff „reife Form“ auf ein vollständig glycosyliertes β 1-Integrin, welches mittels Westernblot-Analyse in elektrochemisch reduzierter Form gemessen werden kann. Das β 1-Integrin niedrigsialylierter HL-60-Zellen ist trotz des niedrigeren Mr von 120 k nicht das unreife Korrelat. Denn es konnte durch Lektinbindungsanalysen gezeigt werden, daß eine fehlende bzw. unvollständige Glycosylierung zu einem intrazellulär lokalisierten β 1-Polypeptid mit einem Mr von 90 k führt (Hemler et al., 1987). Dies konnte durch enzymatische Entfernung der Asparagin-gebundenen Oligosaccharide der β 1-Integrine von kultivierten humanen Fibroblasten bestätigt werden (Akiyama and Yamada, 1987). Daher ist anzunehmen, daß es sich bei der in der Westernblot-Analyse gemessenen Proteinbande mit 80 kDa eher um das unreife β 1-Integrin handelt (Abb. 6).

Ein Zusammenhang zwischen Asparagin-gebundener Glycosylierung von β 1-Integrinen und dem Transport an die Zelloberfläche ist bereits untersucht worden. Dabei wurde zunächst angenommen, daß unreife β 1-Integrine nicht an die Zelloberfläche gelangen (Akiyama and Yamada, 1987), was aber später widerlegt wurde. Denn es konnte durch spezifische Hemmung der Ankopplung von Oligosacchariden an Asparagine gemessen werden, daß die gestörte Reifung des β 1-Integrins nicht die $\alpha\beta$ -Heterodimerenbildung oder die Einfügung in die Plasmamembran hemmt, sondern vielmehr die Ligandenbindung beeinträchtigt (Akiyama et al., 1989). Die FACS-Analyse niedrigsialylierter HL-60-Zellen ergab, daß sie für den Transport an die Oberfläche jedenfalls ausreichend ausgereifte β 1-Integrine exprimieren (Abb. 9).

Es handelt sich also bei dem 120 kDa Protein niedrigsialylierter HL-60-Zellen weder um das reife noch um das unreife, sondern vermutlich um ein nicht-sialyliertes β 1-Integrin. Denn niedrigsialylierte HL-60-Zellen sind aufgrund des Fehlens der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase, dem Schlüsselenzym der Sialinsäuresynthese, nicht in der Lage, Oberflächenproteine zu sialylieren (Keppler et al., 1999). Die niedrige Sialylierung ist nur noch durch den sogenannten Salvage-Pathway, die Rekrutierung der im Medium befindlichen Sialinsäuren, möglich.

Beim Vergleich der β 1-Proteinbanden aus den Solubilisaten beider Subtypen fällt außerdem auf, daß hochsialylierte HL-60-Zellen insgesamt eine höhere β 1-Integrinexpressionsrate als niedrigsialylierte HL-60-Zellen haben (Abb. 6). Ob die Expression der β 1-Integrinuntereinheit von der Sialylierung abhängt, läßt sich mit dem einfachen Vergleich der HL-60-Subtypen nicht beantworten. Beide Subtypen haben zwar die gleiche Herkunft und unterscheiden sich in ihrem Sialylierungsgrad, ungewiss bleibt aber, in welchen weiteren Eigenschaften sie sich noch unterscheiden. So kann die β -Integrinklasse und die quantitative β 1-Integrinexpression in myeloischen Zellen vom Differenzierungsstadium abhängen (Kerst et al., 1993). Die HL-60-Subtypen könnten sich auch im Differenzierungsstadium unterscheiden, da der granulozytische Differenzierungsmarker CD15 von den niedrigsialylierten HL-60-Zellen absolut stärker exprimiert wird, während der relative sialylierte CD15-Anteil in hochsialylierten HL-60-Zellen größer ist (Keppler et al., 1999). Ein Zusammenhang zwischen Sialylierung und Differenzierung bleibt jedoch bislang ungeklärt.

4.1.2 Einfluß der Modifikation der N-Acyl-Seitenkette von Sialinsäuren mittels ManNProp auf die β 1-Integrinexpression

Die zeitabhängige Bestimmung der β 1-Integrinexpression mittels Westernblot-Analyse zeigt, daß die langfristige Inkubation mit ManNAc bzw. ManNProp die β 1-Integrin Gesamtkonzentration steigert. Im Vergleich ist der von ManNProp induzierte Effekt stärker als der von ManNAc (Abb. 7).

Die erhöhte β 1-Integrinkonzentration kann dabei durch gesteigerte Proteinbiosynthese und/oder durch reduzierten Proteinabbau entstanden sein. Weiterhin kann die Proteinbiosynthesesteigerung auf Transkriptions- oder Translationsebene reguliert sein.

Für den Einfluß der biochemisch modifizierten N-Acyl-Seitenkette von Neuraminsäuren auf die Transkription spricht die ManNProp-induzierte Erhöhung wichtiger Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B, NFAT und c-fos in humanen Lymphozyten (Baliktay, 2000). Weiterhin konnte gemessen werden, daß ManNProp die Proliferation von HL-60-Zellen transkriptionsabhängig leicht reduziert (Schüler, 1997). In dieser Arbeit jedoch zeigten Untersuchungen auf Transkriptionsebene mittels cDNA-Arrays, daß sich die mRNA-Konzentrationen von β 1-Integrinen durch langfristige ManNAc- bzw. ManNProp-Inkubation nicht ändern und die erhöhte β 1-Integrinkonzentration prima vista nicht erklären. Der ManNProp-Einfluß auf die Transkription in HL-60-Zellen ist dennoch nicht gänzlich ausgeschlossen. Eine ManNProp-vermittelte Regulation des Transkriptionsfaktors STAT-1 zeichnet sich im Rahmen weiterer cDNA-Arrays ab (persönliche Mitteilung von PD Dr. R. Horstkorte). cDNA-Arrays sind außerdem semiquantitative punktuelle Messungen, die keine Verlaufsanalyse zulassen. So könnte ein möglicher mRNA-Konzentrationsgipfel dem langfristigen β 1-Integrinkonzentrationszuwachs vorausgegangen sein und sich bereits dem Ausgangszustand angeglichen haben. Denn mRNA-Konzentrationen hängen wie Proteinkonzentrationen von Auf- und Abbauprozessen ab. Simultan beschleunigte Auf- und Abbauvorgänge würden zu einem konstanten Konzentrationsspiegel, der nichts über die Umbaugeschwindigkeit aussagt, führen.

Die Proteinbiosynthese kann wie oben erwähnt auch auf Translationsebene reguliert werden. Die Translationsrate hängt dabei von den mRNA-Halbwertszeiten, die zwischen Stunden und Tagen betragen, ab. Eine mRNA mit verlängerter Halbwertszeit wird so mehrmals abgelesen. Eine mRNA-Halbwertszeitverlängerung ließe sich nicht in den cDNA-Arrays zur Bestimmung der β 1-mRNA-Konzentrationen messen, auch wenn die β 1-Integrinkonzentrationen durch gesteigerte Translationsrate zunehmen würden (Abb. 11). Zusätzlich gibt es Kontrollmechanismen, die die Translation durch On-Off-Regulation Organismusansprüchen anpassen. Beispielsweise wird die Hämoglobinbiosynthese so reguliert. Bei Anstieg des Häm-Spiegels wird ein translationshemmender Regulationskreis, der die Hämoglobinbiosynthese blockiert, aufgehoben. Dabei verhindert das Häm die Aktivierung einer cAMP-abhängigen Kinase, die wiederum eine eIF-2-Faktor-Kinase aktivieren würde. Durch Phosphorylierung des Translationsfaktors eIF-2 mittels der eIF-2-Faktor-Kinase wäre die Translation nicht möglich und die Hämoglobinbiosynthese wäre unterbrochen. Ein solcher Wirkungsmechanismus wäre für eine erhöhte β 1-Integrinexpression durch langfristige

ManNAc- bzw. ManNProp-Inkubation ebenfalls möglich. Dabei wäre die Entstehung von CMP-N-Acetylneuraminsäure bzw. CMP-N-Propanoylneuraminsäure im genannten Modell wie Häm der limitierende Faktor und könnte eine auf Translationsebene blockierte β 1-Integrinexpression durch Aufhebung eines Negativ-Regulationskreises neu aktivieren. Dabei wäre die verstärkte β 1-Integrinexpression nach langfristiger ManNProp Inkubation auf die biochemisch modifizierte N-Acyl-Seitenkettenverlängerung von N-Acetylneuraminsäure zu N-Propanoylneuraminsäure zurückzuführen.

Die β 1-Integrinkonzentrationszunahme hoch- und niedrigsialylierter HL-60-Zellen nach langfristiger ManNAc- bzw. ManNProp-Inkubation könnte aber auch statt einer gesteigerten Proteinbiosynthese Folge einer verlängerten Halbwertszeit der β 1-Integrine sein. Die nach ManNProp-Inkubation beobachtete geminderte CEACAM-1-Degradation in PC12-Zellen stützt diese Annahme (Horstkorte et al., 2001). Die β 1-Integrinkonzentrationsabnahme hochsialylierter HL-60-Zellen nach kurzfristiger ManProp-Inkubation jedoch spräche eher für eine verkürzte Halbwertszeit der β 1-Integrine (Abb. 7).

4.1.3 Beschleunigung des β 1-Integrin-Turnovers durch Modifikation der N-Acyl-Seitenkette von Sialinsäuren mittels ManNProp

Der Vergleich der β 1-Integrinfraktionen der Zelloberfläche und des Zellinneren mittels Biotinylierungsversuchen zeigt, daß nur das intrazelluläre β 1-Integrinreservoir den bisher gemessenen β 1-Integrinkonzentrationszuwachs nach langfristiger ManNAc- bzw. ManNProp-Inkubation bewirkt (Abb. 10). Der unphysiologische Neuraminsäurevorläufer ManNProp induziert dabei den doppelten Effekt vom physiologischen Neuraminsäurevorläufer ManNAc. Andererseits zeigt sich, daß die β 1-Integrinkonzentration hochsialylierter HL-60-Zellen nach kurzfristiger ManNAc- bzw. ManNProp-Inkubation leicht abnimmt, was auf einen β 1-Integrinverlust der Zelloberfläche zurückzuführen ist, wie mittels FACS-Analysen und Biotinylierungsversuchen gemessen werden konnte (Abb. 10). Die Betrachtung kurzfristiger und langfristiger ManNAc- bzw. ManNProp-Effekte könnte hinweisend auf einen beschleunigten β 1-Integrin-Turnover sein. Die Zelle reagiert dabei auf die kurzfristige ManNAc- bzw. ManNProp-Inkubation entweder mit verstärkter Internalisierung oder beschleunigter Degradation der β 1-Integrine der Zelloberfläche. Eine Internalisierung würde

langfristig die Vermehrung des intrazellulären $\beta 1$ -Integrinreservoirs erklären. Hierfür spräche eine Aktivierung der PKC α , die bekannterweise den $\beta 1$ -Integrinverkehr durch endocytotisches Recycling reguliert (Ng et al., 1999). ManNProp ist möglicherweise in der Lage, die PKC zu aktivieren – wie später diskutiert wird (Abb. 16). Eine beschleunigte $\beta 1$ -Integrindegredation nach kurzfristiger ManNAc- bzw. ManNProp-Inkubation könnte auf kompensatorische Weise eine langfristige $\beta 1$ -Integrinexpression mit Zuwachs des intrazellulären $\beta 1$ -Integrinreservoirs stimulieren. Die Beobachtung, daß hochsialylierte HL-60-Zellen bereits im unstimulierten Zustand intrazellulär ein Vielfaches ihrer an die Zelloberfläche gebundenen $\beta 1$ -Integrine lagern (Abb. 10), spräche dafür. Das große intrazelluläre $\beta 1$ -Integrinreservoir dient wohl dazu, möglichst schnell auf Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Interaktionen mit erhöhtem $\beta 1$ -Integrin-Turnover zu reagieren. In Anbetracht der enormen Bedeutung der Integrine für bidirektionale transmembranäre Signalwege ist die biochemische Modifikation ihrer extrazellulär gebundenen Neuraminsäuren ein möglicherweise wichtiger neuer Modulator ihrer signalvermittelnden Funktion. So könnte die N-Acyl-Seitenkette der Neuraminsäure ein sterisch wichtiger Interaktionsort für Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Interaktionen sein. Die zentrale Bedeutung der $\beta 1$ -Integrine für die Zellkommunikation mit ihrer Umgebung ist zusätzlich aus einer beobachteten zelldichteabhängigen $\beta 1$ -Integrinexpression auf der Zelloberfläche unstimulierter hoch- und niedrigsialylierter HL-60-Zellen ersichtlich (vgl. Abb. 8 und Abb. 9). Der Zusammenhang zwischen Zelldichte und Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen konnte bereits für epitheliales CEACAM von Prostata- und Harnblasenkarzinomen der Ratte gezeigt werden (Singer et al., 2000). Dabei ist sowohl der CEACAM-Expressionslevel als auch das Konzentrationsverhältnis zwischen kurzer und langer Isoform für einen ruhenden oder proliferierenden Zellzustand charakteristisch. Bei hoher Zelldichte vermittelt CEACAM einen kontakthinhibitorischen Effekt auf die Zellproliferation.

4.2 Adhäsion hochsialylierter HL-60-Zellen

Die β 1-Integrin-vermittelte Adhäsion von HL-60-Zellen auf Fibronectin ist aufgrund ihrer hämatopoetischen Herkunft (CFU-GM) von besonderem Interesse für das Verständnis von Differenzierung und Migration bei der Knochenmark-Blut-Passage reifender hämatopoetischer Zellen. Denn die Abfolge von Fibronectin/VLA-5-, CS-1-Peptid/VLA-4- und VCAM-1/VLA-4-Interaktionen reguliert die Adhäsion (Kerst et al., 1993). Die Oberflächenexpression, Affinitäts- und Aviditätsänderungen der β 1-Integrine VLA-4 und VLA-5 spielen dabei eine zentrale Rolle.

4.2.1 Biochemical-Engineering der N-Acyl-Seitenkette von Sialinsäuren als Induktionsmechanismus der β 1-Integrin-vermittelten Adhäsion

Bei der Untersuchung des Adhäsionsverhaltens hochsialylierter HL-60-Zellen konnte gezeigt werden, daß diese in unstimulierter Form und nach kurzfristiger ManNAc- bzw. ManNProp-Inkubation nur schwach auf Fibronectin adhären, obwohl sie bei kurzfristiger PMA-Gabe eine besonders sensible Adhäsionsbereitschaft aufweisen (Abb. 12 und Abb. 13).

Die langfristige ManNAc- bzw. ManNProp-Inkubation hochsialylierter HL-60-Zellen hingegen führt zur β 1-Integrin-vermittelten Adhäsionssteigerung auf Fibronectin. Während ManNProp im Mittel die Adhäsion um das 2- bis 3-fache der Kontrolle steigert und 50 bis 75% des PMA-induzierten Effekts erreicht (Abb. 13 und Abb. 16), bewirkt ManNAc eine 1,5-fache Adhäsionssteigerung im Vergleich zur Kontrolle. Die benötigte Langzeitstimulation zur Adhäsionsverstärkung durch ManNAc bzw. ManNProp korreliert mit der Zunahme der β 1-Integrinkonzentration. Dies erklärt jedoch nicht die Adhäsionssteigerung. Denn nur das intrazelluläre β 1-Integrinreservoir nimmt zu, während die Oberflächenexpression von β 1-Integrinen im Vergleich zur Kontrolle unverändert bleibt. Einschränkend muß angemerkt werden, daß die β 1-Integrinkonzentration der Zellmembran in Zellsuspension gemessen wurde. Die oben gemachte Aussage gilt also nur dann, wenn beim Kontakt der Zelle mit Fibronectinmatrix nicht vermehrt β 1-Integrine auf die Plasmamembran transportiert werden. Dies wäre bei beschleunigtem β 1-Integrin-Turnover nach ManNProp-Inkubation ebenfalls vorstellbar.

Die Zeitabhängigkeit der adhäsionssteigernden Wirkung von ManNProp spricht dafür, daß das Biochemical-Engineering der N-Acyl-Seitenkette von Sialinsäuren auf der Zelloberfläche als indirekter Induktionsmechanismus der Adhäsionsverstärkung gesehen werden kann. Denn es ist bekannt, daß der maximale Einbau von N-Propanoylneuraminsäure in Glycokonjugate der Zellmembran ebenfalls 72 h benötigt (Mantey et al., 2001). Die Modifikation Glycokonjugat-gebundener Sialinsäuren auf der Zellmembran könnte einen direkten Einfluß auf die Affinität und/oder Avidität der β 1-Integrine haben. Allerdings konnte eine Untersuchung mit differenzierten HL-60-Zellen zeigen, daß Sialinsäuren aktive Ligandenbindungsstellen des β 1-Integrins maskieren. Erst nach Sialidaseverdau konnte die Adhäsion dieser Zellen auf Fibronectin gesteigert werden (Pretzlaff et al., 2000).

Eine andere Erklärung für die langfristig ManNProp-induzierte Adhäsionssteigerung ist eine indirekte Stimulation der β 1-Integrin-abhängigen Inside-Out-Signalkaskade hochsialylierter HL-60-Zellen. So wird auch bei ManNProp-induziertem Axonwachstum von Neuronen angenommen, daß die β 1-Integrin-abhängige Adhäsion mit der Expressionsregulation von Proteinen, die die Signalkaskade für das Axonwachstum regulieren, zusammenhängt (Büttner et al., 2002).

Die adhäsionssteigernde Wirkung nach langfristiger ManNAc-Gabe ist bislang ungeklärt, trotzdem, daß sie wie ManNProp mit einer Zunahme der β 1-Integringesamtkonzentration korreliert. Eine Erklärung könnte sein, daß bei diesen Zellen andere natürlich vorkommende Sialinsäuren an Glycokonjugaten gebunden sind, die nach ManNAc-Inkubation durch neu entstandene N-Acetylneuraminsäuren ersetzt werden. Der Einbau von N-Acetylneuraminsäuren könnte dabei die Funktion oberflächlicher Zellrezeptoren beeinflussen. Die in dieser Arbeit durchgeführte β 1-Integrinexpressions- und die β 1-Integrin-abhängige Adhäsionsanalyse hochsialylierter HL-60-Zellen unterstreicht die Rolle der N-Acyl-Seitenketten-Modifikation durch ManNProp. Denn beide Vorgänge konnten durch Austausch der N-Acyl-Seitenketten mit einem N-Propanoyl-Rest verstärkt werden.

4.2.2 Einfluß von Biochemical-Engineering der N-Acyl-Seitenkette von Sialinsäuren auf die Affinitätsregulation von β 1-Integrinen

Affinität und Avidität sind wichtige aktivationsabhängige Bestandteile der β 1-Integrin-vermittelten Adhäsion. Sie können durch extra- und intrazelluläre Stimuli sequentiell oder simultan aktiviert werden. Die maximale Zelladhäsion wird dabei durch volle Aktivierung von Affinität und Avidität erreicht (Sanchez-Mateos et al., 1996).

Die Integrinaffinität bezieht sich auf die konformationsabhängige Ligandenbindungsbereitschaft von jedem einzelnen Rezeptor auf der Zelloberfläche. Sie kann dabei durch zweiwertige Kationen, stimulatorische oder inhibitorische monoklonale Antikörper und initiale Ligandeninteraktion in ihrer Affinitätsstärke moduliert werden (Humphries, 1996).

In dieser Arbeit wurde der Einfluß von Biochemical-Engineering der N-Acyl-Seitenkette von Sialinsäuren auf die β 1-Integrinaffinitätsregulation hochsialylierter HL-60-Zellen untersucht. Es konnte gemessen werden, daß Mn^{2+} die Adhäsion hochsialylierter HL-60-Zellen auf Fibronectin erhöht und die PMA-induzierte Adhäsionszunahme übertrifft (Abb. 15). Dies hängt damit zusammen, daß Mn^{2+} das β 1-Integrin durch Bindung an kationenspezifische Motive in eine hochaffine Konformationsstellung versetzt. Durch ausgelöste Inside-Out-Signale über zytoplasmatische Konformationsänderungen wird zusätzlich die Avidität erhöht. PMA hingegen hat vermutlich eine rein aviditätssteigernde Wirkung (Sanchez-Mateos et al., 1996). Unter der Annahme, daß bei der biochemischen Modifikation der zellmembranären Sialinsäuren auch β 1-Integrin-gebundene Sialinsäuren betroffen sind, kam die Frage nach möglichen adhäsionsrelevanten Wirkungssynergismen bzw. -interferenzen mit Mn^{2+} auf. Die Messungen zeigten jedoch weder synergistische noch interferierende adhäsionssteigernde Wirkungen bei Gabe von ManNProp und Mn^{2+} (Abb. 15). Die Mn^{2+} -induzierte Adhäsion hochsialylierter HL-60-Zellen blieb auf gleich hohem Niveau. Dies könnte einerseits damit zusammenhängen, daß Mn^{2+} -spezifische Kationenbindungsstellen der β 1-Integrine nicht sialyliert sind, oder andererseits, daß die verlängerte N-Acyl-Seitenkette der N-Propanoylneuraminsäure die Interaktion zwischen Kationmotiv und Mn^{2+} nicht beeinflusst. Gleichzeitig wird deutlich, daß eine unspezifische Adhäsionszunahme nach langfristiger ManNProp-Inkubation durch Änderung der Oberflächenladung bei verlängerten N-Acyl-Seitenketten der Sialinsäuren sehr unwahrscheinlich ist. Denn ein unspezifischer ManNProp-

induzierter Adhäsionseffekt müßte sich gerade beim kombinierten Einsatz mit anderen Adhäsionsstimulatoren konstant hinzuaddieren.

Der stimulatorische mAk 12G10 erkennt Liganden-induzierte Bindungsstellen von $\beta 1$ -Integrinen, die sich in hochaffiner Konformationsstellung befinden. Er ist somit gleichzeitig ein Affinitätsmarker für das $\beta 1$ -Integrin in der FACS-Analyse. Zunächst wurde untersucht, ob der zellmembranäre Einbau von N-Propanoylneuraminsäure $\beta 1$ -Integrine in eine hochaffine durch mAk 12G10 messbare Konformation versetzt. Es konnte jedoch gemessen werden, daß die langfristige ManNProp-Inkubation nur eine geringe Affinitätsverstärkung der $\beta 1$ -Integrine hochsialylierter HL-60-Zellen erzeugt (Abb. 17). Diese Affinitätssteigerung ist jedoch für die ManNProp-induzierte Adhäsionszunahme zu schwach.

Dann wurde untersucht, ob der zellmembranäre Einbau von N-Propanoylneuraminsäure die initiale Interaktion zwischen $\beta 1$ -Integrinen und dem VLA-5-Liganden RGD direkt verstärkt und eine durch mAk 12G10 messbare Affinitätszunahme ergibt. Auch hier zeigen die FACS-Analysen keinen Zusammenhang zwischen Rezeptoraffinität zum Liganden und vermehrter Adhäsion nach langfristiger ManNProp Inkubation. Eine durch initiale Ligandeninteraktion verstärkte Integrinaffinität ist bislang nur für das $\alpha IIb\beta 3$ -Integrin bekannt. Die Inkubation des $\alpha IIb\beta 3$ -Integrins mit Peptiden, die die Erkennungsdeterminante RGD enthalten, soll das $\alpha IIb\beta 3$ -Integrin stimulieren, das lösliche Fibrinogen zu binden (Du et al., 1991). Es wird angenommen, daß die initiale Interaktion des Integrins mit einem mono- oder multivalenten Liganden Konformationsänderungen hervorrufen, die zur Exposition weiterer Ligandenbindungsstellen führen (Sanchez-Mateos et al., 1996). Die somit erreichte hochaffine Ligandenbindung entsteht vermutlich durch Induktion der Inside-Out-Signalkaskade mittels extrazellulär getriggelter Rezeptor-Liganden-Interaktion.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die ManNProp-induzierte Adhäsionszunahme hochsialylierter HL-60-Zellen auf Fibronectin ohne Anzeichen einer Affinitätsverstärkung des $\beta 1$ -Integrins einhergeht. Folgende Schlußfolgerungen sind dadurch möglich:

Zum Einen hat die N-Acyl-spezifische Modifikation von Sialinsäuren, die direkt an Glycokonjugate der $\beta 1$ -Integrine gebunden sind, keinen relevanten Einfluß auf die Konformationsstellung der $\beta 1$ -Integrine. Dies gilt jedoch nur dann, wenn alle physiologischen Sialinsäuren der $\beta 1$ -Integrine, die möglicherweise die $\beta 1$ -Integrinkonformation beeinflussen, tatsächlich durch N-Propanoylneuraminsäuren substituiert werden. Dies ist nicht unbedingt

gewährleistet, da insgesamt nur ein Teil der Sialinsäuren auf der Zellmembran hochsialylierter HL-60-Zellen durch N-Propanoylneuraminsäuren ersetzt werden (Mantey et al., 2001).

Zum Anderen muß es sich beim Großteil der β 1-Integrine hochsialylierter HL-60-Zellen um solche mit niedrigaffiner Konformationsstellung handeln. Interessanterweise wurde bei der β 1-Integrin-abhängigen Adhäsion von T-lymphoiden Zellen und Monozyten herausgefunden, daß hochaffine β 1-Integrine außer der Zelladhäsion eine alternative Funktion besitzen (Faull, 1994). In Untersuchungen auf Fibronectinmatrix mit gleichzeitig vorhandenem löslichen Fibronectin nimmt die Zelladhäsion durch Antikörper-vermittelte Induktion hochaffiner β 1-Integrine ab, da das lösliche Fibronectin alle Ligandenbindungsstellen blockiert. Die Adhäsion kann dagegen unter gleichen Bedingungen PMA-vermittelt gesteigert werden, was – wie nachfolgend diskutiert – nicht durch Affinitätszunahme bewirkt wird. Durch induzierte Differenzierung erhalten o.g. Zelllinien ein Muster mit einer geringen Anzahl hochaffiner und einer großen Anzahl niedrigaffiner β 1-Integrine. Dadurch sind differenzierte T-lymphoide Zellen und Monozyten in der Lage das lösliche Fibronectin mit Hilfe ihrer hochaffinen β 1-Integrine zu neutralisieren, um gleichzeitig mit den niedrigaffinen β 1-Integrinen adhären zu können. Das gleiche könnte wegen des ähnlichen zellmembranären β 1-Integrinmusters (Abb. 17) für das Adhäsionsverhalten hochsialylierter HL-60-Zellen zutreffen. Sie sind möglicherweise in einem fortgeschrittenen Differenzierungsstadium, der spontan (Gallagher et al., 1979) oder durch inhibierte O-Glycosylierung (Shibuya et al., 1998) eingetreten sein kann. Es ermöglicht ihnen offensichtlich durch aktivationsabhängige VLA-4- und VLA-5-Integrine (Kerst et al., 1993) die Knochenmark-Blut-Schranke entweder im Rahmen ihrer normalen Zellreifung oder ihrer neoplastischen Invasionsfähigkeit zu passieren.

4.2.3 Einfluß von Biochemical-Engineering der N-Acyl-Seitenkette von Sialinsäuren auf die Aviditätsregulation von β 1-Integrinen

Die Avidität nimmt mit räumlicher Ballung (Cluster) niedrigaffiner Integrine an fokalen Adhäsionskontakten der Zellmembran, mit Organisation des Zytoskeletts und mit Vergrößerung der Kontaktfläche durch Zellspreizung zu. PMA-induzierbare Regulationsmechanismen auf Postrezeptorebene werden für die Aviditätszunahme von β 1-Integrinen, die die Zelladhäsion ohne erhöhte Affinität verstärken, verantwortlich gemacht (Faull et al., 1994; Danilov and Juliano, 1989; Haverstick et al., 1992). Der Phorbolester PMA aktiviert intrazellulär Mitglieder der PKC-Familie, die im Rahmen der Integrinmodulation neben der β 1-Integrin-Aviditätszunahme, die Glycosylierung von α - und β -Integrinuntereinheiten von erythroleukämischen Zellen (Symington et al., 1989), den intrazellulären β 1-Integrinverkehr (Ng et al., 1999) und das mRNA-Turnover der α -Integrinuntereinheiten von monozytisch differenzierten HL-60-Zellen steuern sollen. Weiterhin beeinflusst die PKC über Phosphorylierung von MARCKS-Proteinen die Zellmobilität, Sekretionsvorgänge, Membrantransport und die Regulation des Zellzyklus.

Bevor hier auf die Aviditätsregulation durch Modifikation zellmembranärer Sialinsäuren hochsialylierter HL-60-Zellen eingegangen wird, soll zunächst die Aviditätsregulierbarkeit ihrer β 1-Integrine zur Adhäsionssteigerung geprüft werden. Der gemessene PMA-induzierte Adhäsionsanstieg hochsialylierter HL-60-Zellen auf Fibronectin (Abb. 13) erlaubt folgende Schlußfolgerungen:

Erstens induziert die PKC-Aktivierung vermutlich die Aggregation von VLA-4-/VLA-5-Integrinen der Zellmembran in fokalen Adhäsionskontakten an der Spitze von organisierten Aktin-Stressfasern (Burrige et al., 1988; Turner and Burrige, 1991) oder in für die Migration bestimmten dynamischen Aggregaten, die lockerer als fokale Adhäsionskontakte an die Matrix binden (Regen and Horwitz, 1992).

Zweitens bleiben die Zelloberflächenexpression und die Ligandenbindungsaffinität von VLA-4- und VLA-5-Integrinen unverändert (Vuori and Rouslahti, 1993; Faull et al., 1994). Allerdings konnte für DMSO-differenzierte HL-60-Zellen gezeigt werden, daß ihre Adhäsion PKC-spezifisch auf Fibronectin nicht nur durch VLA-4-/VLA-5-Cluster, sondern auch durch leichte Zunahme ihrer Affinität gesteigert werden kann (Bohnsack et al., 1995).

Drittens entsprechen die in dieser Arbeit verwendeten hochsialylierten HL-60-Zellen nicht nur mit ihrem VLA-4/VLA-5-Integrinexpressionsmuster (Abb. 17), sondern auch mit ihrem aktivationsabhängigem Adhäsionsverhalten differenzierten HL-60-Zellen.

Die biochemische Modifikation Glykokonjugat-gebundener Sialinsäuren hochsialylierter HL-60-Zellen mittels langfristiger ManNProp-Inkubation könnte ähnlich wie PMA über PKC-Aktivierung zu einer adhäsionssteigernden Aviditätserhöhung von β 1-Integrinen beitragen. Dies läßt sich an folgenden Punkten festmachen:

Erstens zeigen die Immunfluoreszenz-Untersuchungen, daß sich ManNProp-stimulierte adhärente hochsialylierte HL-60-Zellen ähnlich wie PMA-Stimulierte auf Fibronektinmatrix breitflächig spreizen (Abb. 19). Unbehandelte und ManNAc-behandelte Zellen nehmen hingegen eine runde Form mit kleiner Fläche ein. Die Zellspreizung der ManNProp- und PMA-behandelten Zellen ist vermutlich Folge der intrazellulär gesteuerten Bildung von β 1-Integrin-Clustern an fokalen Adhäsionskontakten.

Zweitens ist die ManNProp-induzierte Adhäsionssteigerung unabhängig von der β 1-Integrin-expressionszunahme und der β 1-Integrinaffinität. Jedoch können beide Substanzen das β 1-Integrin-Turnover und somit den β 1-Integrintransport beeinflussen.

Drittens konnten Inhibitionsversuche mittels Calphostin C, einem spezifischen PKC-Inhibitor zeigen, daß die ManNProp-induzierte Adhäsionssteigerung über die Aktivierung der PKC-Familie funktioniert. Denn die adhäsionssteigernde Wirkung der ManNProp-vermittelten Modifikation zellmembranärer Sialinsäuren wird durch PKC-Inhibition aufgehoben. Dies läßt sich durch Verringerung fokaler Adhäsionskontakte, Bildungshemmung von Stressfasern und gefügelose Zerstreung wichtiger Zytoskelettbausteine wie Talin und Vinculin, die nach PKC-Hemmung auftreten, erklären (Woods and Couchman, 1992). Die dabei auf der Zellmembran verbleibenden β 1-Integrine sind nicht in der Lage die Adhäsion der Zelle aufrechtzuerhalten. Während die adhäsionsstimulierende Wirkung von ManNProp reversibel ist, bleibt die PMA-induzierte Adhäsionssteigerung trotz Inkubation mit dem PKC-Inhibitor Calphostin C erhalten. Dies läßt sich dadurch erklären, daß die PMA-vermittelte PKC-Aktivierung bekannterweise konstitutiv ist (Stryer, 1996).

Die ManNProp-vermittelte Modifikation zellmembranärer Sialinsäuren muß sich also indirekt über PKC-Aktivierung und nachfolgender Inside-Out-Signalweiterleitung durch β 1-Integrine stimulierend auf die β 1-Integrin-vermittelte Adhäsion auswirken. Denn es gibt anhand der Untersuchungen dieser Arbeit keinen Hinweis auf direkte Erhöhung der Liganden-

bindungsbereitschaft von $\beta 1$ -Integrinen. Die zellmembranären $\beta 1$ -Integrine hochsialylierter HL-60-Zellen verharren in niedrigaffinem Zustand. Selbst die Vorinkubation mit monovalentem RGD-Liganden (Abb. 18), die $\beta 1$ -Integrine in hochaffine Konformationsstellung versetzen soll (Du et al., 1991), erhöhte nicht die Anzahl hochaffiner Rezeptoren. Vielmehr benötigt die ManNProp-vermittelte Adhäsionsteigerung polymerisierte Fibronectinmatrix, die Voraussetzung für das Clustern von $\beta 1$ -Integrinen in fokalen Adhäsionskontakten sein soll (Singer et al., 1988; Fath et al., 1989). Wie das Biochemical-Engineering Glykokonjugat-gebundener Sialinsäuren der Zelloberfläche mittels ManNProp die Aktivierung der PKC-Familie induziert, bleibt Ziel weiterer Untersuchungen. Bisher bekannte Aktivatoren der PKC-Familie sind intrazelluläres Ca^{2+} , Diacylglycerol (DAG) und Phospholipide wie Phosphatidylcholin, die im Rahmen zweier Signalwege frei werden, zum Einen nach Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen Phospholipase C γ -vermittelt, zum Anderen nach Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren Phospholipase C β -vermittelt (Krauss, 1997). Wie mittels Phorbolster herausgefunden worden ist, werden PKC-Mitglieder durch Pseudosubstratverdrängung und durch Förderung ihrer Membranassoziation und damit einhergehender Verlagerung des dynamischen Gleichgewichts der PKC-Konzentrationen vom Zytosol zur Membran aktiviert. Die Membranbindung der PKC wird dann mit Hilfe der hydrophoben Cofaktoren wie Phosphatidylserin, DAG und der unphysiologischen Phorbolster wie PMA möglich. Während die kurzfristige Aktivierung der PKC mit dem sekundenschnellen Konzentrationsanstieg von Inositoltriphosphat (InsP_3) und DAG korreliert, ist eine Langzeitaktivierung der PKC durch einen zweiten Konzentrationsgipfel des DAG erklärbar. Bislang ist der Bildungsweg des langfristigen DAG-Konzentrationszuwachses unbekannt (Liscovitch, 1992). Man vermutet, daß Phosphatidylcholin in diesem Fall als DAG-Quelle dient, die Phospholipase C- und Phospholipase B-vermittelt gewonnen wird. Die hierfür benötigte Phospholipase-Aktivierung wird dabei entweder durch intrazelluläres Ca^{2+} oder durch freie Fettsäuren v.a. Arachidonsäuren induziert. Der Anstieg intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentrationen durch modifizierte Sialylierung von Ionenkanälen oder Glykokonjugatrezeptoren, wie es bei GABA-Rezeptoren von Oligodendrozyten mittels ManNProp beschrieben ist (Schmidt et al., 2000), wäre ein möglicher Weg zur PKC-Langzeitaktivierung. Diese Hypothese wird durch Adhäsionsuntersuchungen mit differenzierten HL-60-Zellen gestützt, die mittels Ca^{2+} -Ionophore und gleichzeitiger PKC-Aktivierung in ihrer $\beta 1$ -Integrin-vermittelten Adhäsion stimuliert werden konnten (Rowin et al., 1998). Auch diese Autoren

gehen von einer Inside-Out-Signalkaskade zur Kontrolle der β 1-Integrin-vermittelten Adhäsion, die Ca^{2+} -abhängig ist, aus.

Diese Ergebnisse beleuchten die besondere Rolle der Sialinsäuren mit ihren funktionellen Molekülkomponenten insbesondere ihrer N-Acyl-Seitenkette bei der Regulation von β 1-Integrin-vermittelten Zelladhäsionsmechanismen. Der Einsatz von Sialinsäurevorläufer-Analoga wie ManNProp ermöglicht nicht nur die gezielte Untersuchung der Funktion der einzelnen Molekülkomponenten im zellbiologischen Kontext, sondern öffnet neue Möglichkeiten der Adhäsionsmodulation und mit ihr verbundener Proliferations-Differenzierungs- und Migrationsänderungen der Zelle im Rahmen physiologischer und pathologischer Prozesse.