

**Das L1 Adhäsionsmolekül als Substrat für die $\alpha V\beta 3$ vermittelte
Migration humaner Tumorzellen und aktivierter Lymphozyten**

Vom Fachbereich Biologie
der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
Dr. rer.nat.
genehmigte Dissertation

von
Dipl.-Biologe Andreas Duczmal
geboren am 22.09.1963 in Hannover
1998

Referent: PD. Dr. Müller

Koreferent: PD Dr. Altevogt

Tag der Promotion: 6.2.1998

Abstract

The L1 adhesion molecule is a member of the immunoglobulin (Ig) superfamily initially identified in the nervous system which contains six Ig-like domains. L1 is primarily a cell surface molecule but in its released form it becomes embedded in the extracellular matrix. Here it is shown that human CD4⁺ peripheral blood T lymphocytes, monocytes, but not CD8⁺ T-lymphocytes, express L1. Expression of L1 was also detected on the surface of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC).

In addition to the established L1-L1 homotypic interaction, L1 can bind to $\alpha V\beta 3$ in the human. The 6th Ig-like domain is critical for this function. Here it is demonstrated that a fusion protein containing the 6th Ig-like domain of L1 (6.L1-Fc) can support the migration of human MED-B1 ($\alpha V\beta 3^+$) but not of Nalm 6 cells ($\alpha 5\beta 1^+$). The migration was blocked in the presence of a monoclonal antibody to $\alpha V\beta 3$ and was not seen on 6.L1-Fc in which the RGD site was mutated. Activation of human T lymphocytes in the presence of PHA and PMA led to the induction of $\alpha V\beta 3$ and $\alpha V\beta 5$ expression and concomitantly induced migration of the cells on 6.L1-Fc. The migration was blocked by a monoclonal antibody to $\alpha V\beta 3$ but not to $\alpha V\beta 5$. These results suggest that L1 exposed at the cell surface or as a matrix constituent can serve as a potent substrate for $\alpha V\beta 3$ mediated cell migration.

Keywords: L1, Integrin, Migration

Zusammenfassung

Das L1 Adhäsionsmolekül ist ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie, das extrazellulär über sechs immunglobulin-ähnliche Domänen verfügt und zunächst im Nervensystem identifiziert wurde. L1 ist ein Membranprotein, das aber auch von der Oberfläche abgegeben werden kann und dann in der extrazellulären Matrix eingebettet wird. In dieser Arbeit wird gezeigt, daß CD4⁺ periphere Lymphozyten, Monozyten, aber nicht CD8⁺ Lymphozyten L1 exprimieren. Die L1 Expression konnte weiterhin auf humanen Endothelzellen (HUVEC) nachgewiesen werden.

Neben der gut charakterisierten homotypischen L1-L1-Bindung kann L1 auch heterotypisch das humane Integrin $\alpha V\beta 3$ binden. Die sechste Immunglobulin-ähnliche Domäne ist kritisch für diese Funktion. Hier wird gezeigt, daß ein Fusionsprotein (6.L1-Fc), das diese sechste Domäne enthält, die Migration von humanen MED-B1 ($\alpha V\beta 3^+$), aber nicht von Nalm 6 ($\alpha 5\beta 1^+$) Zellen induziert. Diese Migration wird in Gegenwart eines monoklonalen Antikörpers gegen $\alpha V\beta 3$ blockiert und ist auch nicht nachweisbar, wenn ein Fusionsprotein als Substrat verwendet wird, beim dem in der sechsten Immunglobulin-ähnlichen Domäne die RGD-Sequenz mutiert wurde. Eine Aktivierung humaner T-Lymphozyten führt zur Expression von $\alpha V\beta 3$ und $\alpha V\beta 5$ und weiterhin wird die Migration auf dem 6.L1-Fc-Fusionsprotein induziert. Diese Migration wird durch monoklonale Antikörper gegen $\alpha V\beta 3$, nicht aber durch Antikörper gegen $\alpha V\beta 5$ inhibiert.

Diese Ergebnisse führen zu dem Schluß, daß L1 auf der Oberfläche von Zellen oder in der extrazellulären Matrix eingebettet als Substrat für die $\alpha V\beta 3$ vermittelte Zellmigration fungiert.

Stichworte: L1, Integrin, Migration

Inhaltsverzeichnis

1	PROBLEMSTELLUNG.....	1
2	EINLEITUNG	3
2.1	Funktionelle und strukturelle Komplexität des Immunsystems	3
2.2	Homing Spezifität der Immunzellen	6
2.2.1	Migration in die peripheren Lymphknoten.....	7
2.2.2	Migration in die Peyer'sche Plaques.....	8
2.2.3	Migration in die Gewebe der Haut	9
2.2.4	Migration in den Thymus.....	10
2.2.5	Migration an Orte der Entzündung.....	10
2.3	Adhäsion und Extravasation.....	11
2.3.1	Einleitung.....	11
2.3.2	Die erste Phase: Anheftung und Rolling	11
2.3.3	Die zweite Phase:Aktivierung	14
2.3.4	Die dritte Phase: feste Bindung	15
2.3.5	Die vierte Phase: Transmigration	16
2.4	Integrin vermittelte Migration im Thymus.....	17
2.5	Adhäsionsmoleküle.....	19
2.5.1	Integrine.....	19
2.5.2	Das L1 Adhäsionsmolekül	23

3	MATERIAL UND METHODEN	27
3.1	Material.....	27
3.1.1	Puffer und Lösungen.....	27
3.1.2	Antikörper	33
3.1.3	Zellkulturmedien	33
3.1.4	Zelllinien	35
3.1.5	Oligonukleotide	36
3.2	Methoden	37
3.2.1	Zellkulturtechniken.....	37
3.2.1.1	Kultivierung von Suspensionszellen	37
3.2.1.1.1	Kultivierung von Tumorzelllinien.....	37
3.2.1.1.2	Kultivierung von peripheren T-Zellen nach der Stimulierung.....	37
3.2.1.2	Kultivierung von adhärennten Zellen	37
3.2.1.2.1	ALAB.....	37
3.2.1.2.2	HUVEC.....	38
3.2.1.3	Isolierung und Stimulierung von Zellen aus dem peripheren Blut.....	39
3.2.1.3.1	Isolierung von peripheren, zirkulierenden Leukozyten.....	39
3.2.1.3.2	Isolierung von T-Zellen durch Rosettierung.....	40
3.2.1.3.3	Erythrozyten-Lyse.....	41
3.2.1.3.4	Stimulierung von peripheren T-Zellen.....	41
3.2.1.3.5	Isolierung von T-Blasten aus einer Permanentkultur	42
3.2.1.3.6	Abreicherung toter Zellen aus der T-Blastenkultur	42
3.2.2	Molekularbiologische Methoden	45
3.2.2.1	Isolierung der Gesamt-RNA.....	45
3.2.2.2	cDNA-Synthese.....	46
3.2.2.3	Polymerase Chain Reaction	46
3.2.3	Immunologische und biochemische Methoden	48
3.2.3.1	Markierung von Oberflächenproteinen mit ¹²⁵ Jod.....	48
3.2.3.2	Immunpräzipitation.....	48
3.2.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	49
3.2.3.4	Westernblot.....	50
3.2.3.5	Durchflußzytometrie	52
3.2.3.6	Migrationsassay.....	53
3.2.3.6.1	Durchführung.....	53
3.2.3.6.2	Messung und Auswertung	55
3.2.3.7	Durchflußzytometrische Messung der Fusionsproteinbindung an Zellen	56
3.2.3.8	Konstruktbindungsassay (immobil)	57

3.2.3.9	Herstellung und Aufreinigung des 6.L1-Fc-Fusionsproteins.....	58
3.2.3.9.1	Transfektion	58
3.2.3.9.2	Isolierung des 6.L1-Fc-Fusionsproteins aus dem Kulturüberstand und Anreicherung	59
4	ERGEBNISSE	61
4.1	Expression der Adhäsionsmoleküle L1, αVβ3 und αVβ5.....	61
4.1.1	L1-Expression	61
4.1.1.1	Expression auf peripheren Blutleukozyten	62
4.1.1.2	L1 Expression auf Tumorzelllinien.....	68
4.1.1.3	Expression auf Endothelzellen und epithelialen Zellen	68
4.1.2	α V-Integrinexpression	70
4.1.2.1	Integrinexpression auf Endothelzellen und epithelialen Zellen	71
4.1.2.2	Expression auf T-Lymphozyten	72
4.1.3	Bestimmung der Integrinexpression auf MED-B1 und Nalm6	74
4.2	Interaktion zwischen αV-Integrin exprimierenden Zellen und dem Adhäsionsmolekül L1.....	77
4.3	Untersuchungen zum Migrationsverhalten von αV-Integrin exprimierenden Zellen.....	83
4.3.1	Migration der Tumorzellen auf Vitronektin	84
4.3.2	Migration der Tumorzellen auf Fibronektin	86
4.3.3	Migration der Tumorzellen auf dem 6.L1-Fc-Fusions-protein.....	89
4.3.4	Migration der Tumorzellen auf Kontrollfusions-proteinen	91
4.3.5	Migration von aktivierten T-Zellen auf L1-Fc-Konstrukt	93

5	DISKUSSION	97
5.1	Expression des humanen L1 Moleküles	98
5.2	Integrinexpression auf humanen Zellen	101
5.3	Interaktion des 6.L1-Fc-Fusionsproteinens mit Endothelzellen	102
5.4	Migrationsexperimente.....	104
5.4.1	Auswahl des Migrationsassys	104
5.4.2	Etablierungs des Migrationsassays mit Vitronektin als Substrat.....	105
5.4.3	Die Rolle der RGD-Sequenz bei der α V β 3 Integrin vermittelten Migration.....	106
5.4.4	α V β 3-vermittelte Migration von Tumorzellen auf L1 als Substrat.....	107
5.4.5	α V β 3-vermittelte Migration aktivierten T-Zellen auf L1 als Substrat.....	107
5.5	Schlußfolgerungen.....	108
6	LITERATURVERZEICHNIS	112

Abbildungsverzeichnis

Einleitung

2-1	Funktionelles Organisationsprinzip des Immunsystems.....	5
2-2	Schematischer Ablauf der Extravasation.....	14
2-3	Schematische Struktur des L1 Moleküles.....	24

Material und Methoden

3-1	Schematischer Ablauf der Leukozytenisolierung.....	44
3-2	Das 6.L1-Fc-Fusionsprotein	58

Ergebnisse

4-1	L1 Expression auf peripheren Lymphozyten	63
4-2	Reinheit der Aufreinigung des peripheren Blutes	64
4-3	L1 Expression auf Granulozyten des peripheren Blutes	65
4-4	Reinheit der T-Zellen nach der Rosettierung	66
4-5	Expression des L1 Moleküles auf T-Zellen.....	66
4-6	L1 und CD31 Expression auf peripheren T-Zellen	67
4-7	Expression von L1 auf Tumorzelllinien.....	68
4-8	Nachweis der L1 mRNA in Endothelzellen	69
4-9	L1 Expression auf Endothelzellen und epithelialen Tumorzellen	70
4-10	α V Integrinexpression auf HUVEC und ALAB	71
4-11	α V β 3 und α V β 5 Interginexpression auf peripheren T-Zellen	73
4-12	Immunpräzipitation von aktivierten T-Zellen.....	74
4-13	Expression der Integrine α V β 3 und α V β 5 auf den lymphozytären Tumorzellen Nalm 6 und MED-B1	75
4-14	Expression der Integrinuntereinheiten α 4 und α 5 auf Nalm 6 und MED-B1	76
4-15	Immunpräzipitation von Nalm 6 und MED-B1.....	77
4-16	Western-Blot zur Kontrolle des 6.L1-Fc-Fusionsproteins.....	78
4-17	Bindung von Tumorzellen an immobilisierte Substrate.....	79
4-18	Bindung des 6.L1-Fc-Fusionsproteins an Tumorzellenl	80
4-19	Bindung des 6.L1-Fc-Fusionsproteins an HUVEC und ALAB	81
4-20	Inhibition der 6.L1-Fc-Fusionsproteinsbindung durch Antikörper.....	83
4-21	Migration von Nalm 6 und MED-B1 auf Vitronektin (Streckenmessung).....	85

4-22	Migration von Nalm 6 und MED-B1 auf Vitronektin (Wegdiagramm) .86	.86
4-23	Migration von MED-B1 auf Fibronektin (Streckenmessung).....87	87
4-24	Migration von MED-B1 auf Fibronektin (Wegdiagramm).....88	88
4-25	Migration von Nalm 6 und MED-B1 auf dem 6.L1-Fc-Fusionsprotein (Streckenmessung).....90	90
4-26	Migration von MED-B1 auf dem 6.L1-Fc-Fusionsprotein (Wegdiagramm).....91	91
4-27	Migration von MED-B1 auf Kontrollkonstrukten (Streckenmessung)..92	92
4-28	Migration von MED-B1 auf Kontrollkonstrukten: (Wegdiagramm).....93	93
4-29	Migration von T-Blasten auf 6.L1-Fc-Fusionsprotein (Streckenmessung):.....95	95
4-30	Migration von T-Blasten auf 6.L1-Fc-Fusionsprotein (Wegdiagramm).....96	96

Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
Akk	Antikörper
CLA	Cutaneous lymphocyte-associated antigen
Da	Dalton
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorter
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FKS	Fetales Kälberserum
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HeBS	Hepes Buffered Saline
HEV	High Endothelium Venules
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
k	kilo
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat Buffered Saline
PE	Phycoerythrin
PHA	Phytohämagglutinin
PI	Propidiumjodid
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PSGL	P-Selectin Glycoprotein Ligand
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TGF	Transforming Growth Factor
UpM	Umdrehungen pro Minute

1 Problemstellung

Die evolutionäre Entwicklung vom Einzeller zum Vielzeller hat nicht zum Verlust der Bewegungsfähigkeit der einzelner Zellen geführt, aus denen ein multizellulärer Organismus aufgebaut ist. Die Bewegungsfähigkeit dieser einzelnen Zellen -ein Prozeß, der als Zellmigration bezeichnet wird- stellt eine wichtige Errungenschaft dar, die zur Erhaltung der biologischen Funktionalität von Vielzellern essentiell ist.

Die Beweglichkeit von Zellen bei der Embryonalentwicklung, der Gefäßbildung der Gehirndifferenzierung und nicht zuletzt die Rolle der Zellmigration zur Aufrechterhaltung der immunologischen Funktionalität sind nicht nur prägnante Beispiele dieses Phänomens, sondern sind auch Gegenstand intensiver Untersuchungen in den letzten Jahren.

Immunzellen verharren im Laufe ihres Lebens nicht in einem Gewebe oder einem Organ, sondern zirkulieren durch den Organismus, um auf eindringende Keime zu reagieren und um ihren Differenzierungsprozeß in verschiedenen Kompartimenten des Immunsystems durchlaufen zu können. Ebenso ist die Beweglichkeit innerhalb verschiedener lymphoider Organe ein essentieller Schritt, da auch innerhalb dieser Gewebe und Organe verschiedene Funktionalitäten in Form von Kompartimenten lokal abgegrenzt sind.

Ebenso korreliert der Grad der Malignität von Tumoren mit dem Vermögen einzelner Tumorzellen den primären Tumor zu verlassen und in anderen Geweben zu proliferieren. Dieses als Metastasierung bezeichnete Phänomen würde ohne die Fähigkeit einzelner Zellen zur Migration nicht in Erscheinung treten.

Die Untersuchungen der letzten Jahre führten nicht nur zur Entdeckung eines Spektrums von Molekülen, die in den Prozeß der Adhäsion und Zellmigration involviert sind, sondern es konnte auch ein Bild gezeichnet werden, daß die komplexe Interaktion dieser Moleküle untereinander darstellt.

Weder Migration, noch Adhäsion sind nur das Resultat einer eindimensionalen Interaktion zwischen zwei Molekülen. Vielmehr kann es mittlerweile als gesichert angesehen werden, daß unter physiologischen Bedingungen ein komplexes Spektrum an Interaktionen und Regulationmechanismen zwischen

zellständiger Molekülen bzw. Matrixkomponenten in Kombination mit löslichen Mediatoren diesen Vorgang initiiert und kontrolliert.

Integrine stellen dabei eine wichtige Molekülgruppe dar, die sowohl Zelladhäsion als auch Zellmigration vermitteln kann. Zelluläre Liganden für Integrine sind Mitglieder der Immunglobulinfamilie (z.B. CD31), aber auch Moleküle der extrazellulären Matrix, wie z.B. Fibronectin, Vitronectin u. v. m.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind das Adhäsionsmolekül L1 und das $\alpha V\beta 3$ Integrin, dessen Expression auf vielen Zellen und dessen Rolle bei der Migration von Tumorzellen beschrieben wurde. Im Mittelpunkt sollen dabei Untersuchungen stehen, die Hinweise für die Interaktion beider Moleküle geben und welche biologische Funktion diese Interaktion vermittelt. Als Basis für diese Untersuchungen dienen Analysen über die Expression dieser Moleküle auf Immunzellen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden einem Vergleich der L1 Expression zwischen humanen und murinem System dienen, da im letzteren die genaue Verteilung des L1 Moleküls schon untersucht worden ist. Außerdem werden Daten vorgestellt, die L1 als weiteren Liganden für die $\alpha V\beta 3$ vermittelte Zellmigration beschreiben.

2 Einleitung

2.1 Funktionelle und strukturelle Komplexität des Immunsystems

Die Fähigkeit des Immunsystems externe Eindringlinge zu erkennen und zu eliminieren beruht prinzipiell auf drei essentiellen Schritten, die sukzessiv ablaufen. Erstens muß der Organismus eine große Zahl verschiedener Lymphozytenklone bereitstellen. Diese Immunzellen tragen Antigenrezeptoren, die spezifisch an ein bestimmtes Antigen binden können. Innerhalb eines Klones besitzen diese Antigenrezeptoren die selbe Spezifität. Der Organismus muß so viele verschiedene Klone bereitstellen, daß jedes fremde und potentiell pathogene Antigen erkannt und anschließend eliminiert werden kann. Gleichzeitig dürfen diese Antigenrezeptoren nicht mit körpereigenen Molekülstrukturen reagieren, um eine Immunantwort gegen sich selbst zu vermeiden [Anderson1982, von Boehmer1992, von Boehmer1993].

Zweitens müssen die wenigen Lymphozyten, die den Antigenrezeptor für die Antigene eines eindringenden Keimes tragen, mit diesen Antigenstrukturen in Kontakt treten können. Am Ort dieses Kontaktes müssen die Umgebungsbedingungen derart beschaffen sein, daß sie eine rasche Expansion des spezifischen Klones ermöglichen und die weitere Differenzierung der Zellen in Effektor- und Gedächtniszellen unterstützen [Butcher1996, Picker1993, Mackay1990, van Ewijk1991].

Drittens müssen die aus dem vorherigen Schritt resultierenden Effektorzellen in die Regionen des Organismus gelangen, in denen sich das Pathogen befindet, das die spezifischen Antigenstrukturen trägt. Idealerweise eliminieren diese Effektorzellen das in den Organismus eindringende Pathogen. Die ebenfalls vom Immunsystem generierten Gedächtniszellen müssen im Organismus zirkulieren, um auf ein zukünftiges Eindringen des Pathogens schnell reagieren zu können. [Butcher1991, Dunon1993, Springer1994]

Damit ein Organismus diese Abläufe gewährleisten kann, wäre es denkbar die gesamte immunologische Funktionalität an den potentiellen Eintrittspforten für

Pathogene bereitzustellen. Da diese Redundanz aber im höchsten Maße unökonomisch wäre, hat die Evolution eine andere Lösung entstehen lassen. Die gesamte Funktionalität des Immunsystems ist in verschiedenen Organen und Geweben kompartmentalisiert. Die funktionelle Kaskade der Immunantwort wird in diesen unterschiedlichen Organen bzw. Geweben ausgeführt, wobei die Lymphozyten zwischen den diversen Kompartimenten zirkulieren bzw. innerhalb der Gewebe migrieren müssen. [Janeway1988, Butcher1996, Picker1993]

Das Immunsystem läßt sich in drei grundlegende Kompartimente unterteilen. In den sog. primären lymphoiden Geweben findet die Differenzierung von unreifen Vorläuferzellen in funktionsfähige Lymphozyten statt. Das Knochenmark und der Thymus sind bei Säugern typische Beispiele für diese Kompartimente. Da die hier generierten Zellen noch keinen Kontakt mit einem Antigen hatten, werden sie als naive Lymphozyten bezeichnet. [Kantor1993, Butcher1996, Adkins1987]

In den sekundären lymphoiden Geweben (z.B. Milz, periphere Lymphknoten) kommt es zur weiteren Differenzierung der Lymphozyten. Über die Lymphgefäße der Haut und das Blut werden hier fremde Antigene gesammelt und durch spezielle antigen präsentierende Zellen den naiven Lymphozyten präsentiert. Diese Präsentation in einem spezifischen Mikroumfeld ermöglicht die Proliferation und Differenzierung antigen-spezifischer B- und T-Zellen [Picker1993, Mackay1993].

In den tertiären lymphoiden Geweben kommt es schließlich zur terminalen Antwort der T- und B-Zellen. Traditionellerweise werden diese Gewebe auch als extralymphoide Gewebe bezeichnet, da es sich hier um Gewebe bzw. Organe handelt, die ontogenetisch nicht zum Immunsystem gehören. Die hier dargestellte Einteilung wird aber nach funktionellen Gesichtspunkten vorgenommen und läßt ontogenetische Charakteristika konsequent außer Acht. Damit lassen sich zu den tertiären lymphoiden Geweben alle Bereiche zusammenfassen, die nicht zu den ersten beiden Kompartimenten gehören und die einen potentiellen Effektorort für die Lymphozyten darstellen könnten. Diese terminale Antwort soll zur Beseitigung des Pathogens führen und kann sich in

Immunglobulin-Sekretion, zytotoxischen Effekten oder immunregulatorischen Prozessen manifestieren. Unter normalen Umständen enthalten die tertiären lymphoiden Organe keine oder nur wenige Lymphozyten. Wahrscheinlich patrouilliert eine geringe Anzahl von Gedächtniszellen in diesem Gewebe [Mackay1993]. Erst unter pathologischen Bedingungen kommt es nach Stimuli zur Infiltration in diese Gewebe.

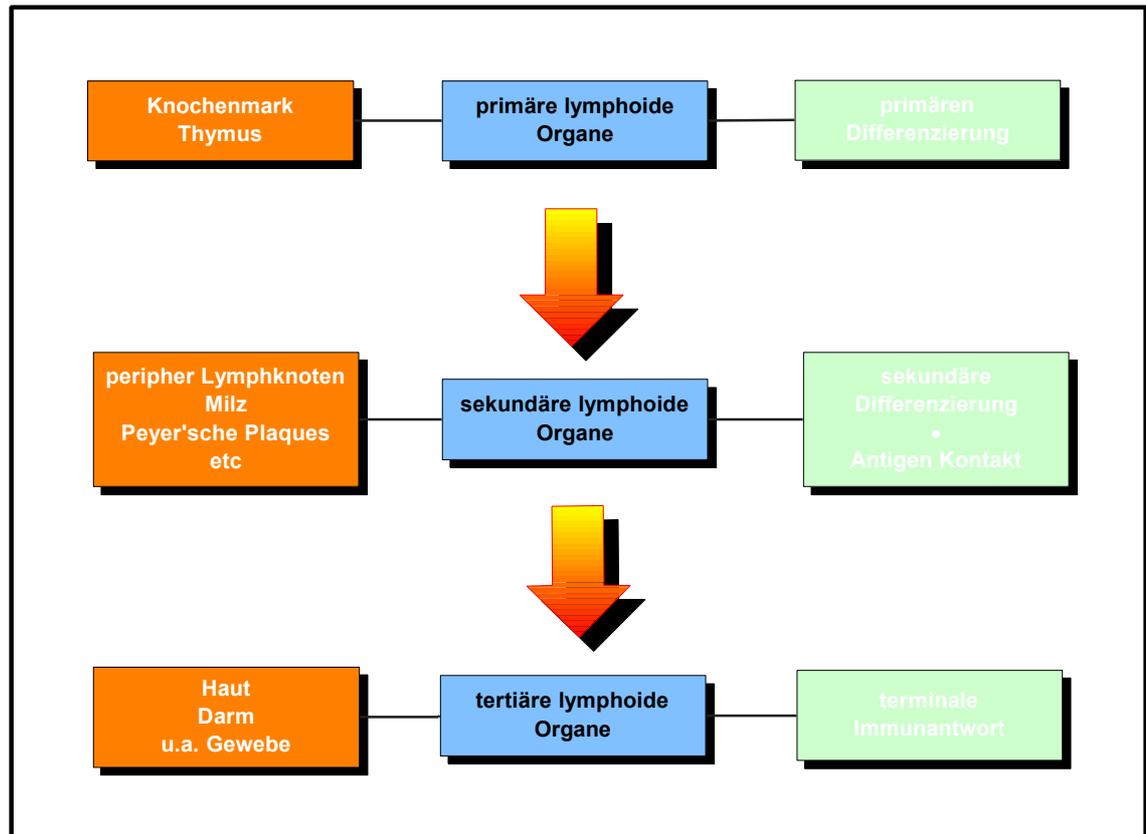


Abbildung 2-1: Funktionelles Organisationsprinzip des Immunsystems: Hier wird schematisch vereinfachend die prinzipielle Organisation des Immunsystems wiedergegeben.

Diese Einteilung stellt natürlich kein starres Schema dar – es würde der funktionellen Komplexität des Immunsystems kaum gerecht werden. So sind beispielsweise Effektorzellen auch unter bestimmten Bedingungen in den primären oder sekundären lymphoiden Kompartimenten zu finden. Diese Schematisierung spiegelt aber die prinzipielle Organisation des Immunsystems wieder. [Butcher1986, Butcher1996, Picker1992, Picker1993]

2.2 Homing Spezifität der Immunzellen

Das im vorherigen Abschnitt beschriebene funktionelle Modell impliziert eine koordinierte Mobilität der Immunzellen. Alle an einer Immunantwort beteiligten Zellen müssen sich zum entscheidenden Zeitpunkt in den jeweiligen Kompartimenten befinden. Die im Organismus zirkulierenden Immunzellen dürfen die entsprechenden Gewebe nicht zufällig infiltrieren, sondern müssen zielgerichtet in die Kompartimente einwandern. Dieses Phänomen der zielgerichteten Einwanderung von Immunzellen in Gewebe wird als *Homing* bezeichnet. Dieses Homing stellt einen kritischen Mechanismus zur Aufrechterhaltung der immunologischen Funktionalität dar. [Butcher1996, Picker1993]

Grundlegende Untersuchungen zum Homing-Mechanismus hatten zunächst zum Ziel auf den Immunzellen und in den Geweben spezifische Adhäsionsmoleküle zu identifizieren, die für diesen Mechanismus verantwortlich sind und beispielsweise dafür sorgen, daß naive B-Zellen in die peripheren Lymphknoten transmigrieren. In diesem Zusammenhang werden Strukturen, die auf Lymphozyten lokalisiert sind, als Homing-Rezeptoren bezeichnet und deren Gegenstrukturen in den lymphoiden Organen als Adressine.

Als die ersten Adhäsionsmoleküle identifiziert worden waren, wurde jedoch klar, daß das Repertoire an spezifischen Homing-Rezeptoren und Adressinen begrenzt ist. Als spezifische Adressine sind bisher die Moleküle GlyCAM-1 [Rosen1993] und MADCAM-1 [Streeter1988] auf den Endothelzellen der peripheren bzw. den Darm-assoziierten Lymphknoten zu nennen. L-Selectin [Hamann1993] und das Integrin $\alpha 4\beta 7$ [Berlin1993] auf Seite der Lymphozyten vermitteln den spezifischen Eintritt naiver Lymphozyten in die peripheren bzw. die Darm-assoziierten Lymphknoten; L-Selektin wird jedoch auch von vielen anderen Lymphozyten expremiert, ohne dabei das Homing dieser Zellen in die Lymphknoten zu vermitteln. Dies und weitere Befunde legen offen dar, daß dem spezifische Homing ein komplexer, multikausaler Mechanismus zugrunde liegt, der zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht vollkommen aufgeklärt werden konnte.

Es kann als Tatsache vorausgesetzt werden, daß am Homing und zur erfolgreichen Migration von Lymphozyten in die Gewebe nicht ein einzelnes Molekül beteiligt ist, sondern daß die Kombination verschiedener Adhäsionsmoleküle in Verbindung mit Zytokinen und löslichen Faktoren die Grundlage des spezifischen Homings bilden [Butcher1996, Springer1990]. In den nächsten Abschnitten sollen daher anhand einiger Beispiele die bisher angenommenen Mechanismen aufgezeigt werden.

2.2.1 Migration in die peripheren Lymphknoten

Für Lymphozyten bestehen zwei Eintrittswege, um vom Blut in die peripheren Lymphknoten zu gelangen. Die Zellen können die Blutbahn über das flache Endothelium verlassen und gelangen dann über afferente, lymphatische Gefäße direkt in das Parenchym der Lymphknoten. Der zweite Eintrittsweg der Lymphozyten geht über die postkapillaren Venen in den sekundären lymphoiden Organen [Springer1990, Butcher1990]. Die Endothelzellen dieser Gefäße haben eine kubische Gestalt und werden daher im immunologischen Sprachgebrauch als *high endothelial venules* (HEV) bezeichnet. Da diese Bezeichnung in der Immunologie allgemein üblich ist, werden im Weiteren diese Gefäße als HEV bezeichnet werden. Es gibt Hinweise bei Schafen darauf, daß naive T-Zellen die peripheren Lymphknoten über die HEVs infiltrieren, wogegen aktivierte T-Zellen und Gedächtniszellen über die lymphatischen Gefäße einwandern [Mackay1990]. Ob allerdings diese Befunde allgemeinen Charakter haben ist im Augenblick nicht geklärt. Westerman et al. konnten diese Ergebnisse in der Ratte nicht bestätigen. [Westermann1992, Westermann1994]

Am Eintritt der Lymphozyten über die HEV ist das Molekül *L-Selektin* beteiligt. Zwei Untersuchungen stützen diese Hypothese. Antikörper gegen L-Selektin blockieren komplett den Eintritt naiver, L-Selektin exprimierender Lymphozyten in die peripheren Lymphknoten [Gallatin1983, Hamann1993]. In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis sind aktivierte T-Zellen und ein großer Anteil CD45RO positiver Gedächtniszellen L-Selektin negativ [Mackay1993]. Im Model konnte auch gezeigt werden, daß Lymphozyten von L-Selektin defizienten Mäusen nicht an HEVs der peripheren Lymphknoten binden können

[Arbones1994]. Komplettiert wird dieses Bild durch die Tatsache, daß die Rezeptoren für L-Selektin GlyCAM-1 und CD34 auf den Zellen der HEVs in den peripheren Lymphknoten expremiert werden. [Rosen1993, Lasky1992, Baumhueter1993].

Ein weiteres Molekül, daß das spezifische Homing von Lymphozyten in periphere Lymphknoten unterstützt, ist das von diesen Zellen expremierte Integrin $\alpha_L\beta_2$. Antikörper gegen $\alpha_L\beta_2$ reduzieren signifikant die Einwanderung von Lymphozyten in die Lymphknoten [Hamann1988].

2.2.2 Migration in die Peyer'sche Plaques

Die am stärksten organisierten lymphoiden Strukturen in der Darmwand sind die Peyer'schen Plaques. Zellen dieser Gewebe sind darauf spezialisiert Antigen zu sammeln und den Lymphozyten zu präsentieren. Außerdem befinden sich Lymphozyten diffus verteilt in der Lamina propria und intraepitheliale Lymphozyten liegen zwischen den Enterozyten oberhalb der Basalmembran [Imhof1995].

Antikörper gegen MADCAM-1 und gegen die α_4 - oder β_7 -Integrinuntereinheiten reduzieren die Infiltration von Lymphozyten in die Peyer'schen Plaques bzw. in das übrige Darmgewebe um etwa fünfzig Prozent [Hamann1991, Hamann1993, Hamann1994, Picker1992]. Gleichzeitig wird aber durch diese Antikörper nicht die Rezirkulation der Lymphozyten in die peripheren Lymphknoten inhibiert. Dies legt die Vermutung nahe, daß die Interaktion des Integrins $\alpha_4\beta_7$ mit dem Adressin MADCAM-1 eine entscheidende Bedeutung in bezug auf die spezifische Rezirkulation von Lymphozyten in die Areale des Darmes besitzt [Streeter1988, Hamann1993, Hamann1994, Issekutz1991]. L-Selektin wird hauptsächlich von naiven Lymphozyten expremiert, wogen $\alpha_4\beta_7$ -Integrin im Wesentlichen auf Gedächtniszellen nachgewiesen worden ist. Dies deutet darauf hin, daß die Interaktion zwischen Gedächtniszellen (die kein L-Selektin expremieren) und HEVs über die Bindung zwischen $\alpha_4\beta_7$ und MADCAM-1 vermittelt wird [Mackay1993A, Mackay1992, Hamann1994]. Auch $\alpha_L\beta_2$ ist in die Rezirkulation von naiven Lymphozyten in die Peyer'schen Plaques involviert, da Antikörper

gegen dieses Integrin den Eintritt der T-Zellen in dieses lymphoide Gewebe unterbinden – die Infiltration der Lymphozyten in das übrige Darmgewebe aber nicht beeinflussen [Hamann1988].

Ein Teil der Lymphozyten durchdringen die Basalmembran des Darmepithels und siedeln sich zwischen den Enterozyten an. Diese intraepithelialen Lymphozyten exprimieren alle das Integrin $\alpha_E\beta_7$ und Antikörper gegen dieses Protein können die Besiedlung des Epithels unterbinden [Cepek1993]. Als Bindungspartner für $\alpha_E\beta_7$ konnte auf epithelialer Seite das Adhäsionsmolekül E-Cadherin nachgewiesen werden [Cepek1994]. Bei den $\alpha_E\beta_7$ positiven Lymphozyten handelt es sich um Gedächtniszellen, die kein L-Selektin exprimieren [Cerf-Bensussan1987, Picker1990].

2.2.3 Migration in die Gewebe der Haut

Neben dem Darm stellt die Haut die Haupteintrittspforte für Pathogene dar. Bei T-Zellen, die in den Bereichen der Haut zu finden sind, handelt es sich in erster Linie um Gedächtniszellen [Mackay1992, Mackay1993]. Im Gegensatz zu den Gedächtniszellen im Darm exprimieren diese Zellen beim Menschen alle CLA (cutaneous lymphocyte antigen), welches an E-Selektin bindet [Picker1990A]. E-Selektin wird von dermalen Endothelzellen bei Allergiereaktion vom verzögerndem Typ und chronischen Entzündungen exprimiert [Cotran1986]. Ein weiterer Hinweis auf die Rolle von E-Selektin beim Homing wurde wiederum durch Inhibitionsexperimente erbracht. Antikörper gegen E-Selektin verhindern die Migration von T-Zellen in die Haut [Graber1990, Picker1991]. CLA positive Lymphozyten exprimieren ebenfalls $\alpha_4\beta_1$, dessen Ligand VCAM-1 auf Endothelzellen exprimiert wird [Hemler1990]. Auch hier können Antikörper gegen VCAM-1 die Besiedelung der Haut durch Lymphozyten inhibieren, was darauf hindeutet, daß die $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1-Bindung bei der Infiltration von Lymphozyten in die Haut von Bedeutung ist [Carlos1990, Oppenheimer-Marks1991].

Obwohl der genaue Mechanismus noch nicht geklärt ist, scheint auch das $\alpha_3\beta_1$ -Integrin eine Rolle beim Eintritt von aktivierten T-Zellen in die Haut zu

spielen, indem dieses Integrin an die extrazelluläre Matrixkomponente Epiligrin bindet [Wayner1993].

2.2.4 Migration in den Thymus

Die finale Differenzierung der T-Zellen findet im Thymus statt. Die Pro-T-Zellen müssen, nachdem sie das Knochenmark verlassen haben, in dieses Organ gelangen, um weiter reifen zu können [von Boehmer1992]. Im Model konnte gezeigt werden, daß ein Antikörper gegen die $\alpha 6$ -Integrinuntereinheit die Bindung von Pro-T-Zellen an gefrorenes Endothel, das aus dem Thymus stammt, unterbindet [Imhof1991]. Antikörper gegen $\alpha_L\beta 2$ hemmen die Bindung nicht vollständig, reduzieren diese aber signifikant, was darauf hindeutet, daß auch $\alpha_L\beta 2$ beim spezifischen Homing in den Thymus eine akzessorische Rolle spielt [Ruiz1993]. Möglicherweise ist auch CD44 in diesen Homing-Prozeß involviert [O'Neill1987, O'Neill1989, O'Neill1992, Horst1990].

2.2.5 Migration an Orte der Entzündung

Unter nicht-pathologischen Bedingungen binden Leukozyten nur sehr schwach an die Endothelzellen der Gefäße. Während einer Entzündung ändert sich dies allerdings sehr schnell. Dieser schnelle Wechsel der Proteinexpression wird durch verschiedene Zytokine und Faktoren induziert [Imhof1995]. Während des Entzündungsprozessen wird als ersten Molekül P-Selektin von den Endothelzellen expremiert, das als Rezeptor für neutrophile Granulozyten und Monozyten dient [Larsen1990]. P-Selektin vermittelt die erste Phase der Extravasation von Immunzellen in das darunterliegende Gewebe: die Anheftung und das Rolling der Leukozyten. [McEver1992, Lorant1993, Jones1993]. Die konstitutive Produktion und Speicherung von P-Selektin in speziellen Vesikeln ermöglicht es den Zellen nach einer Stimulierung das Molekül innerhalb weniger Sekunden an der Oberfläche zu expremieren. Diese Expression kann durch Histamin, Thrombin, den Komplementfaktor C5q, sowie durch TNF- α induziert werden [Weller1992, Geng1990, Smith1993, Sugama1992]. Innerhalb weniger Minuten wird P-Selektin wieder internalisiert [Green1995], um eine permanente Anheftung von Leukozyten zu verhindern. Diese würde eine chronische Entzündung induzieren.

Für die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und T-Zellen an Endothelzellen ist E-Selektin verantwortlich [Bevilacqua1989, Shimizu1991], dessen Oberflächenexpression ca. eine Stunde nach einer Stimulierung durch Zytokine beginnt und etwa nach sechs Stunden den maximalen Expressionslevel erreicht [Weller1992, Fries1993]. Die Transkription des E-Selektin Gens wird durch IL-1 oder TNF- α induziert [Weller1992, Smith1993,]. Interessanterweise wird die Expression von E-Selektin auch durch Nickel- und Cobaltionen induziert; beides Metalle, die eine Kontaktallergie auslösen können [Goebeler1993].

2.3 Adhäsion und Extravasation

2.3.1 Einleitung

Die Identifizierung der Adhäsionsmoleküle wurde zunächst in statischen Bindungsassays durchgeführt. Unter physiologischen Bedingungen stellt sich aber ein zusätzliches Problem ein. Wenn Zellen des Immunsystems mit Endothelzellen interagieren, unterliegen sie aufgrund der Strömung des fließenden Blutes Scherkräften [Firrel1989]. Basierend auf diesen Beobachtungen postulierte Butcher ein Mehrphasenmodell, das die Leukozytenbindung an das Endothel und die anschließende Extravasation beschreibt [Butcher1991]. Zeitgleich entwickelten Lawrence und Springer [Lawrence1991] einen in vitro Assay, der es ermöglichte, das Bindungsverhalten von Zellen unter dynamischen Flußbedingungen zu untersuchen. Dieses mittlerweile allgemein anerkannte Modell soll hier nun kurz vorgestellt werden.

2.3.2 Die erste Phase: Anheftung und Rolling

Unter normalen, physiologischen Bedingungen findet sich in den postkapillaren Venulen die geringste Strömungsgeschwindigkeit. Diese Areale bieten somit aus physikalischer Sicht ideale Bedingungen für die Leukozyteninteraktion mit dem Endothel [Chien1982]. Unter pathologischen Bedingungen erweitern sich die Gefäße am Ort der Entzündung, so daß auf die Leukozyten verminderte

Scherkräfte einwirken und die Bindung an die Endothelzellen erleichtert wird [Chien1982, Atherton1973, Cohnheim1889].

Die erste Phase ist durch einen dynamischen Adhäsionsprozeß charakterisiert. Zirkulierende Leukozyten binden über Rezeptoren an das Endothel und lösen gleichzeitig wieder Bindungsstellen, so daß als Ergebnis eine lockere Bindung zwischen Endothel und Leukozyten resultiert. Das Wechselspiel zwischen Bindung und Aufhebung dieser Bindung in Kombination mit den oben angesprochenen Scherkräften induziert ein Phänomen, das als *Rolling* bezeichnet wird. Die Leukozyten rollen in Flußrichtung des Blutes über das Endothel entlang der Gefäßwand [Cohnheim1889, Atherton1972].

Auf molekularer Ebene wird diese erste Phase durch Moleküle vermittelt die der Selektin-Familie angehören [Bevilacqua1991]. Zu dieser Familie gehören drei Moleküle. Das bereits genannte L-Selektin [Lasky1989, Camerini1989], Platelets und Endothelzellen tragen das P-Selektin [Johnston1989, Weller1992] und E-Selektin wird ausschließlich auf Endothelzellen expremiert [Weller1992, Bevilacqua1989]. Die Zusammenfassung dieser Moleküle in eine Familie beruht auf strukturellen Eigenschaften, die von allen geteilt werden. Am aminoterminalen Ende tragen alle drei Moleküle ein Lektin-ähnliche Domäne, die für die spezifische Erkennung von Kohlenhydraten von Bedeutung ist [Lasky1992]. Ferner ist allen eine Domäne gemein, die strukturell dem epidermalen Wachstumsfaktor ähnelt [Carlos1994]. Letztlich findet sich bei allen Selektinen eine Region, die aus sog. *short consensus repeats* (SCR) zusammengesetzt ist. Die einzelnen Selektine besitzen aber eine unterschiedliche Anzahl SCRs: L-Selektin zwei, P-Selektin acht oder neun und E-Selektin 6 *short consensus repeats*. [Bevilacqua1993]

Mit Ausnahme von Gedächtniszellen expremieren alle Leukozyten L-Selektin. Es vermittelt sowohl für Leukozyten als auch für neutrophile Granulozyten die Extravasation aus der Blutbahn in die entzündeten Gewebe und wie oben erwähnt, das Homing von naiven Lymphozyten in die peripheren Lymphknoten [Kishimoto1989, Lewinsohn1987]. Das von Platelets und Endothelzellen expremierte P-Selektin interagiert mit neutrophilen Granulozyten und Monozyten [Larsen1990, McEver1992, Lorant1993]. Im Gegensatz zum L-

Selektin, das seine Liganden nur über die Lectin-ähnliche Domäne bindet, vermittelt beim P-Selektin auch die EGF-ähnliche Domäne vermutlich Bindungsaktivität [Kansas1994]. E-Selektin wird ausschließlich auf Endothelzellen expremiert und ist in die Bindung von Neutrophilen, Monozyten und bestimmten T-Zellen involviert [Bevilacqua1985, Gamble1985].

Für L-Selektin sind drei Liganden identifiziert worden. Das hauptsächlich auf den HEVs peripherer Lymphknoten expremierte GlyCAM-1 [Lasky1992], CD34, das sowohl auf Endothelzellen als auch auf hämapoetischen Vorläuferzellen und einigen T-Zellen nachgewiesen werden kann [Baumhueter1993, Fina1990] und als letzter Ligand MADCAM-1. Dieses Molekül wird auf HEV von Peyer'schen Plaques und auf Endothelzellen der Venulen in der Lamina propria des Dünndarmes expremiert [Berg1993, Briskin1993]. Ebenfalls drei Liganden sind bisher für P-Selektin gefunden worden. Das 220kDa große Sialomucin PSGL-1 [Sako1993], das von neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten, vielen Tumorzellen und CD34 positiven Vorläuferzellen expremiert wird [Moore1995, Zanetti1995] und ein bisher nicht näher charakterisiertes Molekül mit einem Molekulargewicht von 180 kDa, das P-Selektin calcium-abhängig bindet [Norgard1993]. Nachdem in der Maus HSA (heat stable antigen) als Ligand für P-Selektin identifiziert werden konnte [Sammar1994, Aigner1995], konnte auch im humanen System für das HSA-Homolog CD24 eine Bindung nachgewiesen werden [Aigner1997].

Ebenfalls wenig charakterisiert sind die Liganden für E-Selektin; neben CLA (Cutaneous Leukocyte Antigen) und einem Rezeptor mit einem Molekulargewicht von 250 kDa wurde eine Molekül namens SSEA-1 (Sialyl Stage Specific Embryonic Antigen) als Bindungspartner identifiziert [Berg1991, Picker1990, Ohmori1993]. Im murinen System ist aus myeloischen Zellen ein 150kDa großes Glykoprotein isoliert und kloniert werden, das als ESL-1 (E-Selektin Ligand-1) bezeichnet wird und Sequenzhomolien zum FGF-Rezeptor aufweist. [Steegmeier1994]

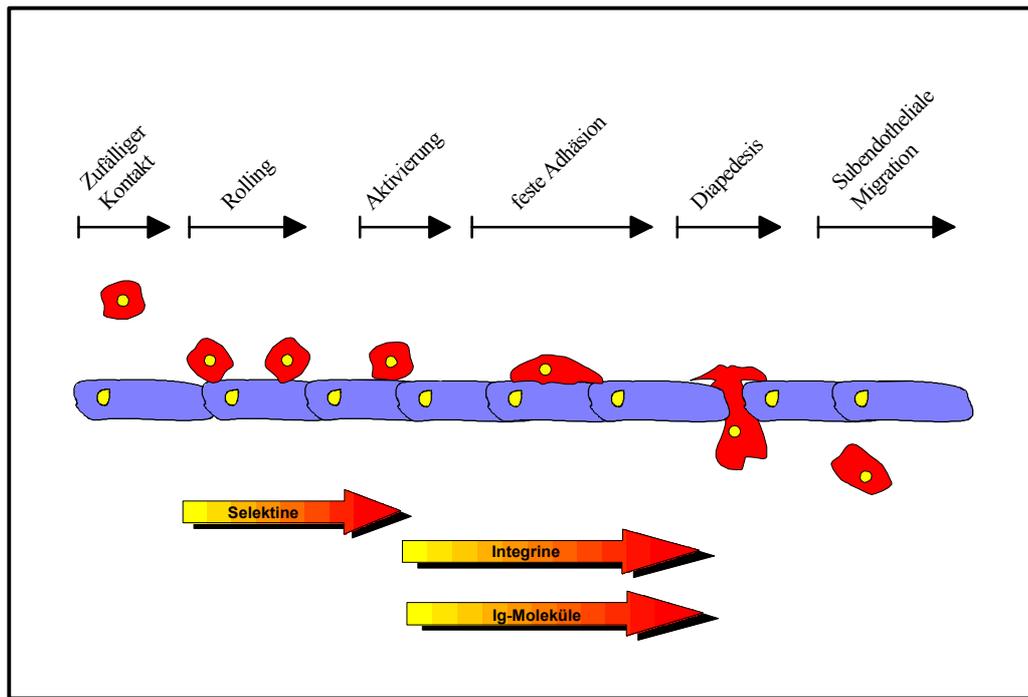


Abbildung: 2-2 Schematischer Ablauf der Extravasation: Hier werden vereinfacht die einzelnen Abschnitte der Leukozytentransmigration durch das Endothel wiedergegeben. Die Pfeile zeigen an, in welchen Abschnitten die benannten Moleküle aktiv werden.

2.3.3 Die zweite Phase:Aktivierung

Während dieser zweiten Phase kommt es zur Aktivierung der Integrine, deren Interaktion mit Rezeptoren auf den Endothelzellen zu einer festen Bindung zwischen Leukozyten und Endothel führt [Butcher1996, Hynes1992]. Obwohl auch zirkulierende Leukozyten Integrine exprimieren, besitzen deren Integrine jedoch nur eine geringe Affinität für ihre Liganden und erst die lokale Aktivierung läßt sie physiologisch aktiv werden [Carlos1994]. Es ist wichtig hervorzuheben, daß der Aktivierung die erste Phase der lockeren Bindung vorausgehen muß. Verschiedene Faktoren induzieren die Integrinaktivierung: IL-8, MCP-1, MIP-1 β , IL-5, C5a und bakterielle Toxine wie z.B. LPS. Diese Mediatoren werden vom lokalen Gewebe, den Leukozyten oder von Mikroorganismen und nicht zuletzt vom Endothel selbst sezerniert [Picker1992, Issekutz1991, Mackay1992]. Die Aktivierung kann aber auch von Adhäsionsmolekülen induziert werden. So vermittelt CD31 die Affinitätssteigerung von β 1-Integrinen. CD31 wird von Endothelzellen, Monozyten, neutrophilen Granulozyten und einigen T-Zellen exprimiert und

möglicherweise löst eine homophile Bindung zwischen zwei CD31 Molekülen diese Aktivierung aus [Osborne1989].

2.3.4 Die dritte Phase: feste Bindung

Nachdem die Integrine aktiviert worden sind, stellen sie in dieser Phase die Schlüsselmoleküle für die feste Bindung der Leukozyten an das Endothel dar. Mehrere Liganden sind für die Integrine im Zusammenhang mit der Extravasation identifiziert worden. Das Integrin $\alpha_4\beta_1$ bindet an endotheliales VCAM-1 [Elices1990], $\alpha_L\beta_2$ kann sowohl mit ICAM-1 als auch ICAM-2 interagieren [Staunton1989, Martin1987, Makgabe1988]. ICAM-1 kann aber auch das Integrin $\alpha_M\beta_2$ binden [Diamond1990]. Ferner bindet $\alpha_4\beta_7$ an MADCAM-1 und spielt damit eine entscheidende Rolle bei der spezifischen Migration von Leukozyten in das Immunsystem und die Gewebe des Darmes [Berlin1993, Hamann1993].

ICAM-1, ICAM-2 und VCAM-1 werden biochemisch in die Superfamilie der Immunglobuline eingeordnet, da sie extrazellulär aus mehreren immunglobulin-ähnlichen Domänen zusammengesetzt sind. Während ICAM-1 fünf Ig-Domänen aufweist, trägt der extrazelluläre Teil von ICAM-2 lediglich zwei dieser Domänen [Staunton1989, Marlin1987]. ICAM-1 bindet $\alpha_L\beta_2$ über die erste Ig-Domäne und $\alpha_M\beta_2$ über die Dritte [Diamond1990, Staunton1989].

Auf ruhenden Endothelzellen ist ICAM-1 nur schwach expremiert; nach einer Stimulierung mit IL-1, TNF, oder IFN- γ kommt es nach einigen Stunden zu einem Anstieg der ICAM-1 Expression [Staunton1989, Dustin1986, Pohlman1987, Lo1992]. Im Gegensatz dazu wird ICAM-2 konstitutiv auf dem Endothel expremiert und kann nicht durch Stimulierung hochreguliert werden [Nortamo1991]. Das $\alpha_L\beta_2$ -Integrin hat eine wesentlich stärkere Affinität zu ICAM-1 als zu ICAM-2. Dies legt die Vermutung nahe, daß ICAM-2 eine ständige, aber geringe Transmigration von Leukozyten vermittelt, wogegen ICAM-1 an der quantitativ stärkeren Transmigration im Entzündungsfall beteiligt ist [Sligh1993].

VCAM-1 wurde originär als durch Zytokine induzierbares Adhäsionsmolekül auf humanen Endothelzellen identifiziert, das die Bindung von Leukozyten und

Melanomzellen vermittelt [Osborne1989, Hession1992, Hession1991]. Ligand für VCAM-1 ist $\alpha 4\beta 1$; eine schwache Bindung konnte aber auch für $\alpha 4\beta 7$ nachgewiesen werden [Strauch1994, Elices1990, Ruegg1992, Chan1992].

Die hauptsächliche Variante von VCAM-1 weist sieben Ig-Domänen auf, wobei die Domänen 1-3 den Domänen 4-7 homolog sind [Hession1991]. Die Bindung an das $\alpha 4\beta 7$ -Integrin wird über die Domänen eins und vier vermittelt [Osborne1992, Pepinsky1992].

Wie oben erwähnt, stellen die Integrine $\alpha 4\beta 1$, $\alpha_L\beta 2$, $\alpha_M\beta 2$ und $\alpha 4\beta 7$ die entscheidenden Moleküle auf Seiten der Leukozyten dar, die die feste Bindung an das Endothel vermitteln. Sie werden auf den meisten Leukozyten expremiert, wobei $\alpha_m\beta 2$ allerdings nur auf Granulozyten, Monozyten und Makrophagen nachgewiesen werden kann. Das Integrin $\alpha 4\beta 7$ kann sowohl MADCAM-1, als auch VCAM-1 binden [Berlin1993, Strauch1994, Schweighoffer1993]. Während die Interaktion MADCAM-1 in die Lymphozytenzirkulation unter normalen physiologischen Bedingungen involviert ist, spielt die Bindung an VCAM-1 bei entzündlichen Prozessen eine wichtige Rolle, da es nur in dieser pathologischen Situation expremiert wird [Imhof1995].

2.3.5 Die vierte Phase: Transmigration

Die letzte Phase –die transendotheliale Migration- ist ein schnelles Ereignis. Nur wenige Minuten nachdem die Leukozyten an der luminalen Seite des Endothel gebunden haben, erreichen sie die subendotheliale Basalmembran. Diese Transmigration ist unidirektional, da die Leukozyten quasi von der extrazellulären Matrix der Basalmembran gefangen werden [Hourihan1993].

Der Vorgang der Transmigration beginnt mit einer Bewegung der adhärennten Leukozyten in Richtung der Kontaktstellen zwischen den Endothelzellen. Während dieser Bewegung bilden die Zellen ständig neue Adhäsionskontakte aus bzw. lösen sie rückwärtig. Insgesamt muß die Adhäsion eines Leukozyten an das Endothel so stark sein, daß sie sich nicht vom Endothel ablösen, sie darf aber auch nicht so fest sein, daß die Zellen immobilisiert werden [Butcher1996]. Mehrere Faktoren können die Stärke der Adhäsion modulieren.

Erstens können durch CD31 oder Mediatoren ausgelösten Affinitätssteigerungen der Adhäsionsmoleküle schnell wieder nachlassen [Muller1993]. Ein weiterer Faktor ist das proteolytische Abwerfen von Adhäsionsmolekülen (Shedding). So wird die das Abschneiden membranständigen L-Selektins in Zusammenhang mit dem Beginn der Transmigration gebracht [Kishimoto1989]. Dieses Shedding scheint von wichtiger regulatorischer Bedeutung zu sein, da einige Adhäsionsmoleküle im Blut nachgewiesen werden können, wobei sie möglicherweise auch als kompetitive Inhibitoren in Funktion treten können und somit die weitere Adhäsion von Leukozyten möglicherweise regulieren [Schleffenbaum1992, Gearing1993].

In vitro Migrationsassays haben gezeigt, daß Antikörper gegen die Integrine $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$ und $\alpha_L\beta_2$, sowie gegen CD44 und CD31 die Transmigration von Leukozyten durch das Endothel unterbinden können. Die genaue Funktion dieser Moleküle bei diesem Prozeß ist allerdings noch nicht vollkommen aufgeklärt [Hourihan1993, Muller1993, Vaporciyan1993, Oppenheimer-Marks1994]. T-Zellen, die während oder kurz nach der Transmigration in Modellsystemen gesammelt wurden, binden mit hoher Affinität an das extrazelluläre Matrixprotein Fibronectin, wogegen zirkulierende T-Zellen keine Bindung zeigen. Es wird hypothetisiert, daß die Integrine $\alpha_4\beta_1$ und $\alpha_5\beta_1$ in diesen Prozeß involviert sind und somit eine entscheidende Bedeutung bei der Transmigration haben [Muller1993, Vaporciyan1993]. Auf eine Funktion von $\alpha_L\beta_2$ in diesen Prozeß weist die Tatsache hin, daß $\alpha_L\beta_2$ negative T-Zellklone eine verminderte Transmigration in Laborversuchen zeigen [Oppenheimer-Marks1994].

2.4 Integrin vermittelte Migration im Thymus

Die Migration von Zellen spielt im immunologischen System nicht nur eine Rolle bei der Extravasation aus den Gefäßen, sondern auch bei der Entwicklung von T-Zellen im Thymus. Die Entwicklung der Thymozyten benötigt zunächst eine selektive Interaktion mit epithelialen Zellen im Kortex und eine anschließende, regulierte Migration der selektierten Vorläuferzelle in

die Medulla. [Jameson1995, Huesmann1991, Merckenschlager1994]. Während es im corticalen Bereich zu einer positiven Selektion kommt [Jameson1995], ist die Medulla der Ort der negativen Selektion [Rothenberg1992]. Diese beiden Ereignisse stellen zwei elementare Eckpunkte des Reifungsprozesses im Thymus dar. Auch hier ist wieder die Kompartimentalisierung verschiedener Funktionalitäten als biologisches Grundprinzip erkennbar und dies ist ebenso mit der Konsequenz verbunden, daß die Immunzellen mobil sein müssen, um an verschiedenen Lokalisationen an unterschiedlichen Prozessen teilhaben zu können.

Eine der extrazellulären Hauptkomponenten im Thymus ist Fibronectin [Berrih1985, Boyd1993], dessen Funktion bei der Vermittlung von Zellmigration und Zellakkumulation während entzündlicher Prozesse nachgewiesen werden konnte [Springer1990, Molossi1995]. Fibronectin verfügt über zwei Regionen, die von Integrinen erkannt werden können: zentral eine Sequenz, die aus den Aminosäuren Arginin, Glycin und Asparaginsäure besteht (RGD-Sequenz) und am carboxyterminalen Ende eine sog. CS1-Region mit der wichtigen LDV-Sequenz [Rouslathi1981, Komoriya1991, Yamada1991]. Zwei Integrine, die diese Regionen erkennen können, sind auf Thymozyten nachgewiesen worden. Die RGD-Sequenz wird vom $\alpha 5\beta 1$ -Integrin erkannt und das $\alpha 4\beta 1$ -Integrin interagiert mit der LDV-Sequenz [Guan1990, Wayner1989, Humphries1995]. Diese Interaktionen können entweder die feste Bindung zwischen den Zellen und Fibronectin oder Zellmigration induzieren [Crisa1996].

Ob eine feste Bindung an Fibronectin oder ob die Migration eingeleitet wird, hängt von verschiedenen Faktoren ab. Aufgrund unterschiedlichen Splicings existieren beispielsweise verschiedene Isoformen von Fibronectin [Kornblihtt1985, French-Constant1995]. So wird während der Embryonalentwicklung eine Fibronectinisoform gebildet, die über mehrere CS1-Regionen verfügt und die Mobilität von Zellen vermittelt [Boucaut1984]. Komplementär dazu induzieren Fibronectinmoleküle ohne die CS1-Region keine $\beta 1$ -Integrin vermittelte Migration von Melanomzellen [Mould1994].

Sowohl reife als auch undifferenzierte Thymozyten exprimieren das $\alpha4\beta1$ -Integrin, aber nur die reifen Thymozyten binden fest an Fibronectin, wogegen bei Unreifen die Induktion der Zellmigration durch Fibronectin im Vordergrund steht [Solomon1994, Crisa1996]. Wie unten erläutert werden wird, liegen hier wahrscheinlich zwei unterschiedliche funktionelle Zustände dieses Adhäsionsmoleküles vor. Ob die Thymozyten-Fibronectin-Bindung feste Adhäsion oder Zellmigration induziert, wird durch eine multifaktorielle Interaktion zwischen den Zellen und der extrazellulären Matrixkomponente bestimmt. Sicher ist, daß nicht nur das Integrin $\alpha4\beta1$ benötigt wird, sondern, daß auch das $\alpha5\beta1$ -Integrin involviert ist. Gleichfalls scheint nicht allein die CS1-Region für die Vermittlung der Zellmigration benötigt zu werden, sondern es kann mittlerweile auch als gesichert angenommen werden, daß der RGD-Sequenz des Fibronectins eine entscheidende Bedeutung bei der Migration von Thymozyten zukommt [Crisa1996].

2.5 Adhäsionsmoleküle

2.5.1 Integrine

Integrine sind Adhäsionsmoleküle, die in verschiedenen biologischen Prozessen involviert sind. Sie sind an der Aufrechterhaltung der Gewebeintegrität beteiligt, spielen eine Rolle bei der Embryonalentwicklung und sind –wie oben erwähnt- involviert in Homing und transendothelialer Migration [Hynes1992, Albelda1990, Sonnenberg1993].

Strukturell sind Integrine Heterodimere, die aus einer α - und einer β -Kette bestehen, welche nicht-kovalent miteinander verbunden sind. Die Größe der α -Kette variiert zwischen 120 und 180 kDa und die der β -Kette zwischen 90 und 110 kDa. Im Augenblick sind 15 verschiedene α - und 8 β -Ketten bekannt, die 21 unterschiedliche Heterodimere bilden können. Auf Leukozyten konnten bisher 13 verschiedene Integrine nachgewiesen werden, von denen sechs an der Interaktion mit dem Endothel beteiligt sind und alle sechs gehören zu den $\beta1$ -, $\beta2$ - oder $\beta7$ -Integrinen [Hynes1992].

Sowohl die α - als auch die β -Untereinheiten sind die Membran durchspannende Glykoproteine. Einige zytoplasmatische Domänen der β 1-Integrine interagieren mit zytoskeletalen Actinfilamenten über die Proteine *Talin* und α -*Actinin*.

Untersuchungen über die Struktur der α -Untereinheit haben ergeben, daß sich N-terminal sieben weitgehend homologe Domänen befinden, die jeweils aus etwa sechzig Aminosäuren bestehen [Loftus1994]. Diese Domänen enthalten wiederholend die Aminosäuresequenzen FG (Phenylalanin-Glycin) und GAP (Glycin-Alanin-Prolin) und werden daher auch als FG-GAP-*repeats* bezeichnet (Springer1997). Wenigstens drei dieser FG-GAP-Domänen enthalten Kalziumbindungsstellen (Tuckwell1992). Innerhalb der dritten Domäne befindet sich bei einigen Integrinen eine 200 Aminosäuren große Insertion, die als I-Domäne bezeichnet wird (Lee1995). Diese I-Domäne enthält eine Region, die als MIDAS (metal ion dependent adhesion site) bezeichnet wird. Zwei Serin- und ein Threoninrest dieser Region vermitteln über ein Mn^{2+} -Ion die Bindung an saure Aminosäurereste der Liganden. Die Spezifität der Ligandenbindung wird durch die flankierenden Aminosäurereste determiniert (Huang1995A). Eine ähnliche MIDAS-Region konnte auch in der β -Kette von Integrinen identifiziert werden (Lee1995).

Die FG-GAP-Strukturen liegen wahrscheinlich nicht als sieben einzelne Domänen vor, sondern bilden möglicherweise zusammen eine einzige globuläre Domäne. Innerhalb dieser globulären Domäne sind die FG-GAP-Einheiten pseudosymmetrisch um eine zentrale Achse angeordnet.(Springer1997). Charakteristisches Merkmal jeder FG-GAP-Einheit sind vier anti-parallel verlaufende β -Faltblatt-Strukturen. Es wird hypothetisiert, daß die dreidimensionale Struktur des N-Terminus einer sog. β -Propellerstruktur ähnelt (Springer1997, Murzin1992). Diese β -Propellerstruktur ist u.a. auch in dem Enzymen Neuramidase (Crennel1993) und Galaktoseoxidase gefunden worden (Ito1991).

Für die Integrinfunktionalität ist eine Bindung von zweiwertigen Kationen (Kalzium-, Magnesium- und z.T. Manganionen) essentiell, da dadurch die Bindungsaffinität und Spezifität für die Liganden beeinflusst wird. An der

Ligandenbindung ist sowohl die α - als auch die β -Untereinheit beteiligt [Masumoto1993, van Kooyk1991, Dransfield1992, Kirchhofer1990].

Die Zellen können ihre Bindungseigenschaften durch die selektive Expression der Integrine modulieren [Smyth1993]. Auch wenn ein Integrin verschiedene Liganden binden kann, zeigen Integrine auf einer Zelle nicht zwangsläufig alle Bindungseigenschaften zugleich. Das auf Platelets exprimierte $\alpha_2\beta_1$ -Integrin bindet z.B. ausschließlich Kollagen und nicht Laminin, wogegen es auf anderen Zellen beide Liganden binden kann [Staatz1989, Elices1989, Kirchhofer1990].

Weiterhin ist die Spezifität und die Affinität von Integrinen auf einer Zelle nicht ständig konstant: bezüglich ihres Zustandes können Integrine aktiviert oder nicht aktiviert sein. Das auf ruhenden, zirkulierende Platelets exprimierte $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin bindet beispielsweise nicht an seine löslichen Liganden, was letztlich zu einer permanenten Thrombose führen würde, sondern lediglich an immobilisiertes Fibrinogen. Nach Aktivierung der Platelets durch Thrombin oder Kollagen kann das $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin auch das lösliche Fibrinogen binden [Kiefer1991, Phillips1991]. Diese Aktivierung ist verbunden mit Konformationsänderungen des Integrinmoleküls, die immunologisch und biophysikalisch nachgewiesen werden können [Shattil1985, Gulino1990, Kouns1990, O'Tool1991, Parise1987]. Diese Aktivierung geht einher mit der Aktivierung verschiedener G-Proteine, einem intrazellulären pH-Anstieg, der Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Ionenkonzentration und der Aktivierung diverser Proteinkinasen [Manning1991, Hillery1991, O'Toole1991]. Bereits oben wurde erwähnt, daß eine Aktivierung der Integrine notwendig ist, damit zirkulierende Leukozyten fest an das Endothel binden, wobei Entzündungsmediatoren (z.B. TNF, C5a, PAF) die erhöhte Affinität der Integrine induzieren [Hynes1992, Smyth1993].

Integrine sind auch an einigen Effektorfunktionen von T-Zellen beteiligt. Die Spezifität der Bindung zwischen T-Zellen und ihren Zielzellen wird durch den T-Zell-Rezeptor und MHC-Molekülen gewährleistet. Das Integrin $\alpha_L\beta_2$ verstärkt diese Bindung, indem es ICAM-1 auf der Zielzelle bindet. Die dazu notwendige Aktivierung der Integrinmoleküle wird durch CD3 und CD2 vermittelt [Hermanowski1992, Dustin1991].

Es existieren immer stärkere Hinweise darauf, daß Integrine auch an der Informationsvermittlung von außen nach innen beteiligt sind. Die Tyrosinphosphorylierung bei der Aktivierung von Platelets durch Noradrenalin benötigt die gleichzeitige Stimulierung der Zellen durch Fibrinogen, indem dieses vom $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin gebunden wird [Ferrel1989, Golden1990]. Es konnte auch gezeigt werden, daß die Kreuzvernetzung von $\alpha_3\beta_1$ auf KB Karzinomzellen zu einer Phosphorylierung von bisher nicht näher charakterisierten Proteinen führt [Kornberg1991].

Das in dieser Arbeit untersuchte $\alpha V\beta_3$ -Integrin wird allgemein in die Gruppe der αV -Integrine eingeordnet. Die αV -Untereinheit besitzt die höchste Variabilität bezüglich der möglichen, assoziierten β -Untereinheiten. So konnten neben $\alpha V\beta_3$ bisher folgende αV -Integrine identifiziert werden: $\alpha V\beta_1$, $\alpha V\beta_5$, $\alpha V\beta_6$, $\alpha V\beta_8$ [Wada1996]. Das $\alpha V\beta_3$ -Integrin wird auf den verschiedensten Zelltypen exprimiert: Endothelzellen [Cheresh1987], epidermalen T-Zellen [Kikuchi1992], aktivierten T-Zellen [Moulder1991], lymphoblastoiden B-Zellen [Salcedo1995], Mastzellen [Yasuda1995] und auf natürlichen Killerzellen [Rabinovich1995]. Dieses Adhäsionsmolekül wurde ursprünglich als Bindungspartner für Vitronektin identifiziert. Mittlerweile ist allerdings bekannt, daß es ein weites Spektrum von extrazellulären Matrixproteinen; darunter Fibronektin, Fibrinogen von Willebrand Faktor und Thrombospondin zu binden vermag [Charo1990, Cheresh1987, Smith1990]. Das notwendige Erkennungsmotiv auf diesen Proteinen ist die Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Asparaginsäure (RGD-Sequenz) [Charo1990, Smith1990, Cheresh1987]. Das $\alpha V\beta_3$ -Integrin bindet aber nicht nur Proteine, die in die extrazelluläre Matrix eingebunden sind, sondern auch Liganden auf der Oberfläche von Zellen. So konnte eine Bindung von $\alpha V\beta_3$ an CD31 nachgewiesen werden, die nicht über die RGD-Sequenz vermittelt wird [Piali1995].

Neben Adhäsion ist die Vermittlung der Zellmigration eine entscheidende Funktionalität des $\alpha V\beta_3$ -Integrins. An Tumorzellen konnte gezeigt werden, daß $\alpha V\beta_3$ -Integrine die Migration auf Vitronektin und Fibronektin vermitteln können [Bauer1992, Wayner1991A]. Diese Eigenschaft der Migrationsvermittlung teilt

$\alpha V\beta 3$ mit den Integrinen $\alpha 4\beta 1$ und $\alpha 5\beta 1$, die ursächlich mit der Migration von Thymozyten auf Fibronectin in Verbindung stehen [Crisa1996].

2.5.2 Das L1 Adhäsionsmolekül

Das L1 Glykoprotein ist ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie, das extrazellulär aus sechs Immunglobulin-Domänen und fünf Fibronectin- Typ III-ähnlichen Domänen. [Moos1988, Rathjen1984, Faissner1984]. Die intrazellulären Abschnitte des Moleküls sind im zwischenartigen Vergleich hoch konservativ [Moos1988] und sind mit Ankyrin verbunden [Davis1994]. Diese Verbindung zwischen beiden Molekülen wird durch eine Tyrosinphosphorylierung in der Sequenz FIGQY aufgehoben [Garver1997].

Das 200 bis 240kDa große L1 Molekül ist als neuronales Adhäsionsmolekül gut charakterisiert worden [Lindner1983, Fischer1986, Rathjen1984, Sadoul1988]. Es wird aber auch auf reifen Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten der Maus [Kowitz1992] und auf Tumorzellen neuronalen Ursprungs exprimiert. Im Nervensystem vermittelt L1 die Bindung und Erkennung von Neuronen [Lemmon1992], die Interaktion von Axonen mit Schwann'schen Zellen [Seilheimer1989], das Auswachsen der Neuriten [Chang1987, Igelzi1994, Doherty1995] und möglicherweise die Migration von Nervenzellen und Tumorzellen [Lindner1983, Montgomery1996]. Zunächst wurde angenommen, daß diese Funktionalität auf einer homophilen Interaktion zwischen zwei L1-Molekülen beruht, die unabhängig von zweiwertigen Kationen abläuft [Kadmon1990, Holm1995]. Das L1-Molekül bindet jedoch auch an mindestens zwei Integrine. So konnte die Bindung zwischen $\alpha 5\beta 1$ und gereinigten murinen L1, das aus einer Neuroblastomlinie bzw. aus einer Lymphomlinie isoliert wurde, nachgewiesen werden [Ruppert1995]. Diese Bindung benötigt zweiwertige Kationen und vermittelt die Zellbindung von Thymozyten und Tumorzellen an immobilisierten L1.

Das humane Integrin $\alpha V\beta 3$ ist das zweite Molekül dieser Familie, das an L1 binden kann [Montgomery1996]. Humane Melanomzellen binden an immobilisierten L1. Obwohl auch Melanomzellen L1 exprimieren, liegt dieser Bindung keine homophile Interaktion zugrunde, da sie im Gegensatz zur L1-L1-

Bindung Ca^{2+} -Ionen benötigt und auch eine Bindung mit hitzebehandeltem, denaturiertem L1 zu beobachten ist - eine Behandlung, die die homophile Interaktion beeinträchtigen würde [Montgomery1996].

Die kritische Aminosäuresequenz für die Bindung von L1 an Integrine ist, wie bei der Bindung an Fibronectin oder Vitronectin die RGD-Sequenz, die in der sechsten Domäne des L1-Moleküles liegt.

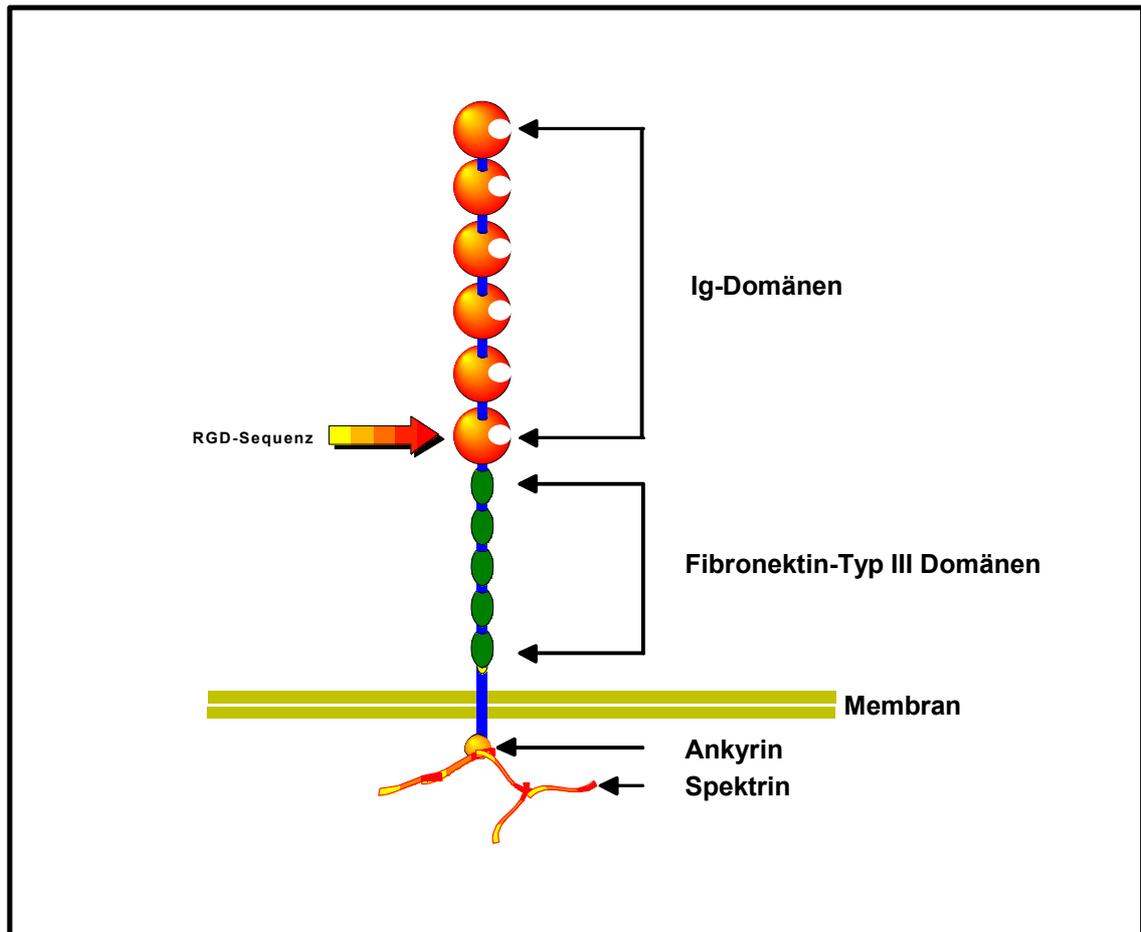


Abbildung 2-3: Schematischer Aufbau des L1 Moleküles: Die Komponenten, die das L1 Molekül aufbauen sind hier schematisch dargestellt.

Diese Sequenz liegt in einem hydrophilen Bereich, der wahrscheinlich exponiert wird. Mäuse und Ratten besitzen in dieser Region zwei RGD-Sequenzen. Bei Menschen konnte nur eine nachgewiesen werden. Ein Austausch der Aminosäure Arginin durch Leucin zerstört eine dieser Sequenzen. Interessanterweise wird im humanen L1 Molekül aber durch eine weitere Mutation eine inverse RGD-Sequenz (DGR) generiert. Sowohl die Bindung von $\alpha 5\beta 1$ als auch von $\alpha V\beta 3$ durch L1 wird über diese RGD-Sequenzen vermittelt. Ob allerdings beide RGD-Sequenzen benötigt werden

bzw. welche von beiden die entscheidende Rolle spielt, bleibt ungeklärt [Kadmon1997, Brümmendorf1993]. Im Gegensatz zur heterophilen L1-Bindung an Integrine, wird die homophile L1 Bindung über mehrerer Regionen vermittelt, wobei allerdings noch nicht zweifelsfrei geklärt werden konnte, welche Regionen in welcher Weise involviert sind [Holm1995].

Die Auswahl des L1-Liganden kann –in vitro- durch Hitzebehandlung, Kationen und Antikörper beeinflusst werden. L1, das durch Hitze denaturiert worden ist, kann nicht mehr die Zelladhäsion über homophile Bindungen vermitteln, ist aber ein guter Ligand für die $\alpha V\beta 3$ -vermittelte Zelladhäsion [Montgomery1996]. Die Zellaggregation, die durch eine homophile L1-L1-Bindung entsteht, benötigt keine zweiwertigen Kationen [Faissner1984, Kadmon1990]. Im Gegensatz dazu setzt die L1-Bindung an $\alpha V\beta 3$ Kalzium und Manganionen voraus [Montgomery1996]. Die Bindung an $\alpha 5\beta 1$ benötigt ebenfalls diese Ionen und kann zusätzlich eine durch CD24 vermittelte Aktivierung der Zellen hervorgerufen werden [Ruppert1995]. In Gegenwart von Manganionen ist diese Bindung auch ohne vorherige PMA-Aktivierung der Zellen nachweisbar [Ruppert1995]. Die Frage, ob eine L1 exprimierende Zelle eine homophile oder heterophile L1-Bindung eingeht, hängt also sowohl vom Aktivierungsstatus des Integrin-Liganden als auch vom L1-Molekül selbst ab. Mehrere Faktoren könnten möglicherweise die Bindungsspezifität des L1-Moleküls beeinflussen. Mittlerweile sind zwei unterschiedliche Exons beschrieben worden, die nach der Transkription unterschiedlich geschnitten werden können und zu mindestens drei verschiedenen Isoformen führen [Kobayashi1991, Miura1991, Jouet1995]. Ferner ist das Glykosilierungsmuster sehr variabel und dies könnte die Bindungseigenschaften von L1 beeinflussen [Stallcup1985, Kowitz1993]. Die Tatsache, daß die Inhibition der Glykosylierung des L1-Moleküls in N2A Zellen die Bindung dieser Zellen an Esb-MP Zellen unterbindet, unterstützt diese Hypothese [Kadmon1990]. Es verdichten sich auch immer stärker die Hinweise darauf, daß L1 seine Liganden nicht nur auf anderen Zellen zu binden vermag, sondern auch mit Molekülen auf der selben Zelle interagiert. Die Bindung von NCAM und CD24 auf der selben Zelle dürfte gleichzeitige die Bindungsfähigkeit von Liganden auf anderen Zellen modulieren [Kadmon1990, Kadmon1990A, Simon1991, Horstkorte1993, Kadmon1995].

Interessanterweise verfügen Zellen auch über die Möglichkeit membranständiges L1 in die Umgebung abzugeben. Dieses bei verschiedenen Zellen beobachtete Phänomen kann durch Aktivierung dieser Zellen noch verstärkt werden. So induziert die Koinkubation von Neuronen mit NGF (nerve growth factor) diesen als Shedding bezeichneten Vorgang [Richter-Landsberg1984, Poltorak1993]. Auch murine Leukozyten geben L1 in die Umgebung ab, wenn sie aktiviert werden [Hubbe1993]. Obwohl dieses Shedding auch in vivo beobachtet wurde und die Einlagerung in der extrazellulären Matrix nachgewiesen werden konnte [Martini1986, Montgomery1986], bleibt die Funktion dieses Vorganges im Augenblick noch im Unklaren. Möglicherweise unterstützt das in die Matrix eingelagerte L1 die Bindung bzw. die Migration von Zellen auf diesem Substrat.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Puffer und Lösungen

Acrylamidstammlösung

- Acrylamid 30g;
- Bisacrylamid 0,8g;
- in 100ml H₂O lösen;
- die fertige Lösung wurde entgast;

AET-Lösung

- AET (Sigma) 45,4 mg;
- in 40 ml H₂O lösen;
- mit 10M Natriumhydroxid wurde pH-Wert von 9 einstellen;
- mit H₂O auf ein Volumen von 46 ml auffüllen;
- die fertige Lösung wurde steril filtrieren;

Blockierungslösung für Migrationsassay

- Ovalalbumin 1%
- in PBS

2.5 M Calciumchlorid-Lösung für Transfektion

- Calciumchlorid 277,47g;
- auf 1000 ml mit H₂O anfüllen;

Elutionspuffer

- Glycin 100mM;
- Natriumchlorid 500mM
- pH-Wert von 2,3 einstellen;

FACS/PI-Puffer

- 44,5 ml PBS;
- 5 ml fetales Kälberserum;
- 50 µl Propidiumjodid;
- 0,5 ml 10%ige Natriumazidlösung;
- pH-Wert von 7,4 einstellen;

FACS-Puffer

- 445 ml PBS;
- 50 ml fetales Kälberserum;
- 5 ml 10%ige Natriumazidlösung;
- pH-Wert von 7,4 einstellen;

Glycerinlösung für Transfektion

- 450 ml DMEM-Medium;
- 50 ml Glycerin

HBSS-Puffer

- Kaliumchlorid 400mg;
- Kaliumdihydrogenphosphat 60mg;
- Natriumchlorid 8000mg;
- Natriumhydrogencarbonat 350mg;
- Natriumhydrogenphosphat 90mg;
- Glukose 1000mg;
- Phenolrot 10mg;
- in 1000ml H₂O lösen
- in Versuchen mit einem pH Wert von 7,4 eingesetzt und dieser wurde mit 10mM HEPES gepuffert;

HeBS-Puffer

- HEPES 5,000g;
- Natriumchlorid 8,000g;
- Kaliumchlorid 0,370g;
- Dinatriumhydrogenphosphat 0,125g;
- Dextrose 1,000g;
- in 800 ml H₂O lösen;
- pH-Wert von 7,05 einstellen;
- auf 1000ml H₂O anfüllen;
- Aliquots des Puffer wurden bei -20°C gelagert;

Laufpuffer für SDS-PAGE

- Tris 150g;
- Glycin 720g;
- SDS 25g
- in 5 Litern H₂O lösen;

Lithiumchlorid-Lösung

- 2,2 g Lithiumchlorid;
- 0,9g Natriumchlorid;
- in 100ml H₂O lösen;

NaCl(0,9%/Dextran(3%))

- Natriumchlorid 0,9g;
- Dextran 3,0g;
- in 100ml H₂O Lösen;

NaCl(1,6%)

- 1,6g Natriumchlorid in 100ml lösen

Natriumacetatlösung (3M)

- Natriumacetat 40,8g;
- mit H₂O auf 80ml anfüllen und lösen;
- mit 3M Essigsäure pH-Wert von 4,8 einstellen;
- mit H₂O auf 100ml anfüllen

PBS

- Natriumchlorid 8,00g;
- Kaliumchlorid 0,20g;
- Kaliumdihydrogenphosphat 0,20g;
- Natriumdihydrogenphosphat 2,85g;
- in 800ml H₂O lösen;
- pH-Wert von 7,2 einstellen;
- mit H₂O auf 1000ml anfüllen;
- steril filtrieren;

Percoll-Lösungen

- 10ml 10fach PBS;
- 90 ml Percoll;
- von dieser Stammlösung wurden alle weiteren Percoll-Lösungen durch verdünnen mit PBS hergestellt;

Probenpuffer für SDS-Page

- Bromphenolblau 5%;
- Sucrose 30%;
- Tris/HCl pH 6,8 80mM;
- SDS 2%;

Sammelgel-Lösung für SDS-PAGE

- Acrylamidstammlösung 1,35ml;
- 0,5 M Tris/HCl-Lösung pH 6,8 2,50ml;
- H₂O 6,00ml;
- SDS-Lösung (10%) 0,10ml;
- Lösung entgasen;
- APS-Lösung (10%) 20µl;
- Temed 10µl;

TBS

- Tris 10mM;
- Natriumchlorid 150mM;
- ph-Wert von 8.0 einstellen;

Trenngel-Lösung für SDS-PAGE

- Acrylamidstammlösung 13,3ml;
- 3 M Tris/HCl-Lösung, pH 8,8 5,3ml;
- H₂O 20,9ml
- SDS-Lösung (10%) 0,40ml;
- entgasen;
- APS-Lösung (10%) 70µl;
- Temed 15µl;

TSE-Puffer

- Tris-Puffer, pH 7,6 10mM;
- Natriumchlorid-Lösung 150mM;
- EDTA 5mM;

TSM-Puffer

- Tris-Puffer, pH 7,6 10mM;
- Natriumchlorid-Lösung 150mM;
- Magnesiumchlorid 2mM;

WB-Blockierungs-Puffer

- Trockenmilch (Fa. Glücksklee) 5g;
- NP40 250µl;
- auf 100ml mit PBS anfüllen;

WB-Blot-Puffer 1

- Aminocarbonsäure 2,62g;
- Tris 1,5g;
- in 400ml H₂O lösen;
- pH-Wert von 9,4 einstellen;
- auf 500ml mit H₂O anfüllen;

WB-Blot-Puffer 2

- Tris 18,15g;
- in 400ml H₂O lösen;
- pH-Wert von 10,4 einstellen;
- auf 500ml mit H₂O anfüllen;

WB-Blot-Puffer 3

- Tris 1,5g;
- in 400ml H₂O lösen;
- pH-Wert von 10,4 einstellen;
- auf 500ml mit H₂O anfüllen;

Zellysepuffer

- TBS;
- NP-40 0,5%;
- wenn Integrine isoliert werden sollten, enthielt der Lysepuffer zusätzlich 2mM Ca²⁺ und 2mM Mg²⁺;

3.1.2 Antikörper

Antikörper Klon	Antigen	Hersteller	Labeling
Sam-1	Intergrinuntereinheit $\alpha 5$	Dianova	
UJ127	Adhäsionsmolekül L1	J.T.Kenshead	
AMF-7	Interginuntereinheit αV (CD51)	Immunotech	
LM609	Integrin $\alpha V\beta 3$	Chemicon	
P1F6	Integrin $\alpha V\beta 5$	Chemicon	
SK7	CD3	Becton Dickinson	PE
M \emptyset P9	CD14	Becton Dickinson	PE
SK3	CD4	Becton Dickinson	PE
SK1	CD8	Becton Dickinson	PE
Zweitantikörper gegen Immunglobuline			
Ziege-Anti-Maus-Ig-Antikörper		Dianova	Peroxidase
Ziege-Anti-Maus-Ig-Fab-Fragment		Dianova	FITC
Ziege-Anti-human-Ig-Fab-Fragment		Dianova	FITC

Mit Ausnahme der Zweitantikörper gegen Immunglobuline richten sich alle Antikörper gegen humane Antigene.

3.1.3 Zellkulturmedien

Mit Ausnahme des HUVEC-Medium und dessen Zusätze, die von PromoCell bezogen wurden, stammen alle Medien und Zusätze von der Firma Gibco. PMA und PHA wurden von der Firma Sigma bezogen.

RPMI-Medium/FKS(10%)

- RPMi-Grundmedium 440ml
- 100mM HEPES-Lösung 5ml
- 20mM Glutamin-Lösung 5ml
- fetales Kälberserum 50ml

RPMI-Medium für die Dauerkultur von T-Zellen

- RPMi-Grundmedium 440ml
- 100mM HEPES-Lösung 5ml
- 20mM Glutamin-Lösung 5ml
- fetales Kälberserum 50ml
- Interleukin 2 50U/ml

RPMI-Medium zur Stimulierung von T-Zellen

- RPMi-Grundmedium 440ml
- 100mM HEPES-Lösung 5ml
- 20mM Glutamin-Lösung 5ml
- fetales Kälberserum 50ml
- PMA 10, 50 oder 100ng/ml
- PHA 5µg/ml

Die Menge an PMA bzw. PHA wurde je nach Versuchansatz zugegeben. Ebenfalls abhängig vom experimentellen Ansatz wurde jeweils nur eines oder beide dieser Agenzien zugegeben.

DMEM-Medium für Transfektanten

- DPMI-Grundmedium 485ml
- 100mM HEPES-Lösung 5ml
- 20mM Glutamin-Lösung 5ml
- fetales Kälberserum 5ml

Die im fetalen Kälberserum enthaltenen Immunglobuline wurden vor der Verwendung in der Affinitätschromatographie depletiert.

HUVEC-Medium

– HUVEC-Grundmedium	90ml
– HEPES	28mM
– fetales Kälberserum	10ml
– epidermaler Wachstumsfaktor	0,1ng/ml
– basischer Fibroblasten Wachstumsfaktor	1,0ng/ml
– Hydrokortison	1,0ng/ml
– Gentamicin	50µg/ml
– Amphotecirin B	2,5µg/ml

3.1.4 Zelllinien

ALAB

Mammakarzinomlinie, ATCC Nummer: CRL-7715

HUVEC

Endothelzellen aus der Nabelschnur isoliert (Fa. PromoCell);

Akronym: **H**uman **u**mbilical **v**ein **e**ndothelial **c**ells

COS-7

Affennierenzelllinie (DKFZ)

HL60

Promyelozytische Leukämie-Zelllinie (DKFZ)

Jurkat

T-Zellen-Leukämie Zelllinie (DKFZ)

Kelly

Neuroblastomzelllinie (DKFZ)

MED-B1

Lymphoblastoide B-Zelllinie (P. Möller, unveröffentlicht)

Molt 3

T-Zellen-Leukämie -Zelllinie (DKFZ)

Nalm 6

Prä-B-Zelllinie aus ALL Patienten isoliert (DKFZ)

Raji

Burkitt-Lymphom-Zelllinie (DKFZ)

U266

Myelomzelllinie (DKFZ)

U937

– Promonozytäre Zelllinie (DKFZ)

3.1.5 Oligonukleotide

P74: 5' AATCGAGAAGAAAGGTTCCAGGGTGA 3'

P82: 5' ACCTGCACCTGCTGACGCA 3'

P90: 5' TCGCTGACAATCTGCTCCTG 3'

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkulturtechniken

3.2.1.1 Kultivierung von Suspensionszellen

3.2.1.1.1 Kultivierung von Tumorzelllinien

Alle Suspensionszellen wurden in RPMI-Medium/FKS(10%) bis zu einer Zelldichte von $7,5 \times 10^5$ Zellen pro Milliliter bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂-Gehalt der Luft kultiviert. Für Experimente wurden Zellsuspensionen mit dieser Zelldichte verwendet. Zur Kultivierung wurden 25% der Zellsuspension entnommen und die Kultur mit frischem Medium aufgefüllt.

Chemikalien und Lösungen

- RPMI-Medium/FKS(10%)

3.2.1.1.2 Kultivierung von peripheren T-Zellen nach der Stimulierung

Nachdem die peripheren Lymphozyten isoliert und stimuliert worden waren, konnten sie vierzehn Tage in Kultur gehalten werden, wobei dem RPMI-Medium/FKS(10%) Interleukin-2 (50 U/ml) zugegeben wurde. Dazu wurden die T-Lymphozyten in einer Zelldichte von 6×10^5 Zellen/ml kultiviert, alle drei Tage geteilt und frisches Medium zugegeben.

Chemikalien und Lösungen

- Interleukin-2
- RPMI-Medium/FKS(10%)

3.2.1.2 Kultivierung von adhärennten Zellen

3.2.1.2.1 ALAB

Die Zelllinie ALAB wurde unter den gleichen Bedingungen wie die Suspensionszellen kultiviert. Zum Ablösen der Zellen vom Kulturgefäß wurden die Zellen, nachdem das Medium vollständig abgenommen worden war, mit 20ml 37°C warmen PBS gespült und anschließend fünf Minuten mit PBS/EDTA(0,25%) bei 37°C inkubiert. Nachdem durch leichtes seitliches

Klopfen an das Kulturgefäß die Zellen in Suspension gebracht worden waren, wurde durch mehrmaliges Pipettieren eine Einzelzellsuspension erzeugt.

Nach einmaligen Zentrifugieren (250g/5 Minuten/RT) wurden die Zellen in Experimenten verwendet bzw. in gewünschter Zelldichte weiterkultiviert.

Chemikalien und Lösungen

- RPMI-Medium/FKS(10%)
- PBS/EDTA(0,25%)

3.2.1.2.2 HUVEC

Wenn der Zellrasen ca. 80% des Boden bedeckte, wurden die Zellen in Experimenten verwendet oder zur weiteren Kultivierung passagiert. Zur Passage wurde zunächst das neue Medium (200µl/cm² Kulturfläche) für dreißig Minuten in den jeweiligen Kulturgefäßen im Brutschrank vorinkubiert. Zum Ablösen der Zellen wurde, nachdem das alte Medium abgenommen worden war, die Zellschicht dreißig Sekunden mit HBSS gewaschen. Nach Abnahme der HBSS-Lösung wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA(0,25%) bei 37°C inkubiert (100µl/cm² Kulturfläche). Als die Zellen begannen sich abzurunden, wurde das Trypsin/EDTA-0,25% bis auf 500µl abgenommen. Nachdem ca. 50% der Zellen in Suspension gegangen waren, wurden die restlichen Zellen durch leichtes seitliches Klopfen abgelöst und es wurde anschließend die Neutralisierungslösung (50µl/cm²) zugegeben. Im Anschluß an eine folgende Zentrifugation (250g/5 Minuten/RT), konnten sie in Experimenten verwendet werden oder zur weiteren Kultur in das vorinkubierte Medium überführt werden.

Chemikalien und Lösungen

- HUVEC-Medium
- Trypsin/EDTA-0,25%
- Neutralisierungslösung (PromoCell, Heidelberg)
- HBSS

3.2.1.3 Isolierung und Stimulierung von Zellen aus dem peripheren Blut

3.2.1.3.1 Isolierung von peripheren, zirkulierenden Leukozyten

Zur Isolierung der Zellen wurde gesunden Spendern Blut entnommen, das direkt bei der Abnahme mit Heparin (50µl Heparin/20ml Blut) vermischt wurde. Um die Erythrozyten abzureichern wurde das Blut mit der gleichen Menge NaCl(0,9%)/Dextran(3%) vermischt und die Suspension in 50ml-Falcon-Röhrchen für dreißig Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei bildeten sich zwei Phasen: während die untere Phase den größten Teil der Erythrozyten enthielt, befanden sich in der oberen Schicht die polymorphkernigen Lymphozyten, Monozyten, sowie die B- und T-Zellen. Nachdem sich eine scharfe Phasengrenze eingestellt hatte, wurde die obere Schicht abgenommen und zentrifugiert (250g/10 Minuten/RT).

Das Pellet wurde in NaCl(0,9%) aufgenommen und mit Ficoll-Paque (Pharmacia) unterschichtet (1 Teil Ficoll-Paque, 4 Teile Zellsuspension). Anschließend wurde der Gradient zentrifugiert (400g/20°C/20 Minuten/ohne Bremse). Sowohl die pelletierten polymorphkernigen Lymphozyten, als auch die sich in der Interphase befindlichen mononukleären Zellen wurden abgenommen und einmal in PBS gewaschen. Befanden sich im Pellet nach der Ficoll-Zentrifugation trotz Dextransedimentation noch Erythrozyten, so wurden sie im Anschluß an das Waschen lysiert. Die polymorphkernigen Lymphozyten, sowie die Monozyten, B-Zellen und T-Zellen konnten nun in der Durchflußzytometrie untersucht werden. Für eine durchflußzytometrische Diskriminierung von CD4 positiven und CD8 positiven T-Zellen, sowie zur Untersuchung der CD31 positiven T-Zellen wurde vorher noch eine Rosettierung mit Schafserythrozyten durchgeführt.

Chemikalien und Lösungen

- Heparin
- NaCl(0,9%)/Dextran((3%)
- NaCl(0,9%)
- Ficoll-Hypaque
- PBS

3.2.1.3.2 Isolierung von T-Zellen durch Rosettierung

Zur Rosettierung der T-Zellen wurden Schaferythrozyten (Unipath, Wedel) verwendet, die in folgender Weise vorbehandelt waren. Zunächst wurden fünf Milliliter der Schaferythrozytensuspension entnommen und mit PBS auf 50ml angefüllt. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (1000g/10 Minuten/RT). Die Zellen wurden dann in gleicher Weise noch zweimal gewaschen. Im Anschluß daran wurden die Schaferythrozyten 15 Minuten bei 37°C mit AET-Lösung (1 Volumenteil Zellen/4 Volumenteile AET-Lösung) inkubiert, wobei alle fünf Minuten die Suspension leicht geschüttelt wurde. Anschließend wurde die Suspension mit PBS auf 50ml angefüllt und zentrifugiert (1000g/10 Minuten/RT). Nach zweimaligen Waschen wurde eine fünfprozentige Schaferythrozytensuspension hergestellt, indem zu einem Volumenteil Zellen 19 Volumenteile PBS gegeben wurden. Diese in der Art behandelten Schaferythrozyten konnten innerhalb der nächsten vierzehn Tagen zur Rosettierung verwendet werden.

Zur Rosettierung wurde die Zellsuspension verwendet, die sich in der Interphase nach der Ficoll-Zentrifugation befand (siehe: 3.2.1.3.1). Nachdem diese Zellen einmal mit PBS gewaschen worden waren, wurde im gleichen Puffer eine Zellzahl von $2,3 \times 10^7$ Zellen eingestellt. Diese Suspension wurde anschließend mit der 5%igen Schaferythrozytenlösung vermischt (pro 1×10^8 Zellen 1,8ml Schaferythrozytenlösung). Nachdem diese Zellsuspension zentrifugiert worden war (200g/4°C/10 Minuten/ ohne Bremse) wurde das Pellet vorsichtig in PBS resuspendiert und auf 35 Milliliter angefüllt. Anschließend wurden 15 Milliliter Ficoll-Hypaque unterschichtet und der Gradient zentrifugiert (400g/20°C/20 Minuten/ohne Bremse). Die Interphase wurde abgenommen und zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurde mit PBS eine Zellzahl von 2×10^7 Zellen pro Milliliter eingestellt und mit dem gleichen Volumen der 5%igen Schaferythrozytenlösung vermischt. Nach einer Zentrifugation (200g/4°C/10 Minuten/ ohne Bremse) wurde das Pellet eine Stunde bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde dieses Pellet wieder in 35 Milliliter PBS resuspendiert und mit 15 Milliliter Ficoll-Hypaque unterschichtet. Wie oben beschrieben, wurde der Gradient wieder zentrifugiert, die Interphase abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Die verbliebenen Schaferythrozyten wurden

lysiert und die T-Zellen konnten nun in der Durchflußzytometrie untersucht werden.

Chemikalien und Lösungen

- PBS
- AET-Lösung
- Ficoll-Hypaque (Pharmacia)

3.2.1.3.3 Erythrozyten-Lyse

Um die restlichen Erythrozyten zu beseitigen, die bei der Isolierung von polymorphkernigen Lymphozyten noch bis zum letzten Schritt vorhanden waren, wurden die Zellen zentrifugiert (250g/5 Minuten/ RT) und das Pellet in 20ml einer 4°C kalten und hypotonischen Natriumchloridlösung (0,2%) aufgenommen und dreißig Sekunden inkubiert. Dann wurde der isotonische Zustand durch Zugabe von NaCl(1,6%) wieder hergestellt. Wenn nach erneutem Zentrifugieren (250g/5 Minuten/RT) noch Erythrozyten im Pellet erkennbar waren, wurde die Lyse wiederholt; andernfalls konnten die polymorphkernigen Lymphozyten für die durchflußzytometrische Messung verwendet werden.

Chemikalien und Lösungen

- PBS
- NaCl(0,2%), 4°C kalt
- NaCl(1,6%), 4°C kalt

3.2.1.3.4 Stimulierung von peripheren T-Zellen

Zur Stimulierung von T-Zellen des peripheren Blutes wurden diejenigen mononuklearen Zellen verwendet, die sich bei der Isolierung aus dem peripheren Blut nach der Ficoll-Zentrifugation in der Interphase befanden (siehe: 3.2.1.3.1). Diese wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend in konditionierten Medium mit einer Zellzahl von 3×10^6 Zellen pro Milliliter kultiviert. Zur Stimulierung wurde dem Medium -je nach Versuchsansatz- entweder PHA, Tetanustoxoid, PMA oder eine Kombination aus PHA und PMA zugegeben. Nach der Stimulation wurden die T-Blasten mittels Percoll-Gradient isoliert und in RPMI-Medium unter Zusatz von Interleukin 2 kultiviert .

3.2.1.3.5 Isolierung von T-Blasten aus einer Permanentkultur

Um die nach der Stimulation entstandenen T-Blasten zu isolieren wurden diese über einen Percoll-Gradienten abgetrennt [Kurnick1979].

Zunächst wurde eine isotonische Percoll-Lösung (Percoll 100%) hergestellt, indem ein Teil 10-fach PBS mit neun Teilen Percoll gemischt wurden. Die Dichte dieser Stammlösung betrug 1,1294g/ml. Von dieser 100%igen Percoll-Lösung wurde durch Verdünnung mit PBS drei weitere Lösungen hergestellt, die folgende Dichten aufwiesen: Percoll 70% mit einer Dichte von 1,090g/ml, Percoll 50% (Dichte = 1,067g/ml) und schließlich Percoll 30% mit einer Dichte von 1,043g/ml.

In einem 15-ml-Zentrifugenröhrchen wurden diese drei Percoll-Lösungen übereinander geschichtet, wobei die 70%ige Percoll-Lösung die untere Phase bildete und die obere Schicht von der 30%igen Percoll-Lösung gebildet wurde. Auf diese obere Phase wurden die Zellen in einem Milliliter PBS geschichtet. Pro Gradient konnten maximal 1×10^8 Zellen aufgetrennt werden. Damit dieser Gradient bei der anschließenden Zentrifugation nicht abriß, wurden die 15-ml-Zentrifugenröhrchen vor der Schichtung des Gradienten mit 10 ml fetalem Kälberserum gefüllt, das nach fünf Minuten wieder entfernt wurde.

Nachdem der Gradient zentrifugiert worden war (450g/20°C/15 Minuten, ohne Bremse), befanden sich die T-Blasten zwischen der 50%igen und der 30%igen Percoll-Phase. Diese wurden mit einer Pasteurpipette abgenommen und das Volumen mit PBS auf 50ml angefüllt. Nach anschließender Zentrifugation (250g/5 Minuten/RT) konnten die Zellen in Experimenten verwendet werden.

Chemikalien und Lösungen

- PBS
- PBS (10-fach)
- Percoll (Pharmacia, Freiburg)
- Fetales Kälberserum

3.2.1.3.6 Abreicherung toter Zellen aus der T-Blastenkultur

Wenn T-Blasten aus der Permanentkultur für Experimente verwendet wurden, sind vorher die toten Zellen abgereichert worden. Dafür wurden drei Milliliter

einer 30%igen Percoll-Lösung in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen gefüllt und die Zellen in einem Volumen von 200µl auf diese Percoll-Lösung geschichtet. Nach einer Zentrifugation (450g/20°C/15 Minuten, ohne Bremse) befanden sich die lebenden, intakten T-Blasten im Pellet, während die toten Zellen auf der Percoll-Lösung schwammen. Nachdem die lebenden Blasten in PBS gewaschen worden waren, konnten sie in Experimenten verwendet werden.

Chemikalien und Lösungen

- PBS
- Percoll-Lösung 30%

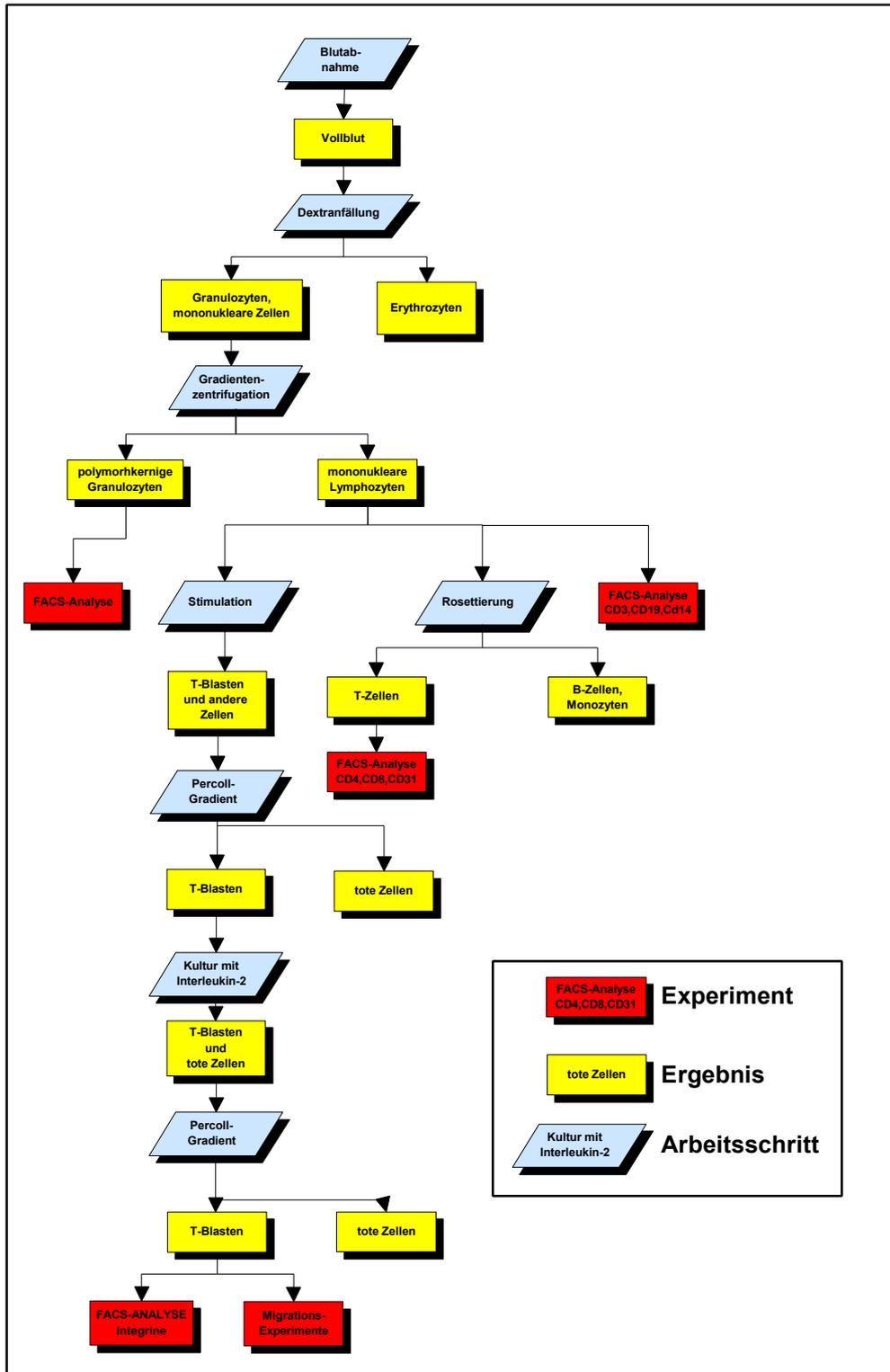


Abbildung 3-1: Schematischer Ablauf der Lymphozytenisolierung: Hier sind die im Text beschriebenen Abläufe zur Isolierung einzelner Zellpopulationen aus dem peripheren Blut aufgezeigt, sowie deren Verwendung in Experimenten

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1 Isolierung der Gesamt-RNA

Zur Isolierung der Gesamt-RNA wurden 1×10^7 Zellen abzentrifugiert (250g/10 Minuten/RT) und zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Das Pellet wurde anschließend in 362,5µl eiskaltem TSM-Puffer aufgenommen. Nach Zugabe von 18,75µl 10mM VRC-Komplexes wurde die Suspension gevortext und fünf Minuten auf Eis inkubiert. Nachdem die Zellen so lysiert worden waren, wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert (13.000UpM/4°C Heraeus-Tischzentrifuge).

Der Überstand wurde abgenommen und 375µl TSE-Puffer zugegeben. Um die verbliebenen Proteine abzureichern, wurden 750µl Phenol (mit H₂O gesättigt) zugegeben. Nach Durchmischung ist der Ansatz fünf Minuten bei 55°C inkubiert worden. Dann wurde die Probe wieder zentrifugiert (13.000UpM/4°C Heraeus-Tischzentrifuge) und anschließend ist die obere Phase abgenommen worden. Nach erneuter Zugabe von 500µl Phenol wurde diese Phenolextraktion ein zweites Mal wie oben beschrieben durchgeführt.

Die obere Phase ist wieder abgenommen worden und es wurden 500µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 v/v) zugegeben, um das restliche Phenol zu entfernen. Nach Durchmischung und Zentrifugation (13.000UpM/4°C Heraeus-Tischzentrifuge) wurde die obere Phase abgenommen und 50µl 3M Natriumacetat, sowie 1000µl eiskaltes Ethanol zugegeben. Um die RNA zu fällen, wurde dieser Ansatz über Nacht bei -80°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Probe 20 Minuten zentrifugiert (13.000UpM/4°C Heraeus-Tischzentrifuge) und das Pellet mit Ethanol(70%) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation ist das Pellet in der Speed-Vac getrocknet worden. Dieses Pellet ist in 100µl H₂O (plus RNAsin 1:200) aufgenommen worden. Anschließend wurde der RNA-Gehalt durch Messung der optischen Dichte bei 260nm bestimmt.

Chemikalien und Lösungen

- PBS
- TSM-Puffer
- TSE-Puffer
- Phenol (wassergesättigt)
- Phenol/Isoamylalkohol (24:1, v/v)
- 3M Natriumacetat
- RNAsin (Promega)
- VRC-Komplex

3.2.2.2 cDNA-Synthese

Von der Gesamt-RNA wurden 7µg für einen Ansatz verwendet, um cDNA zu synthetisieren. In einem gesamten Reaktionsvolumen von 30µl wurde diese RNA mit 2µg Oligo (dT)-Primer, 750ng Random Primer, 16 Units RNAsin, 300 Units reverse Transkriptase und 1mM Deoxinukleotidgemisch für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für fünf Minuten bei 95°C und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Um die RNA abzubauen, wurde die Lösung letztlich noch zwanzig Minuten bei 37°C mit 1,5 Units RNase H inkubiert.

Chemikalien und Lösungen

- Oligo (dT)-Primer
- Random Primer
- RNAsin (Promega)
- Reverse Transkriptase (Promega)
- RNase H (Promega)
- Deoxinukleotidgemisch

3.2.2.3 Polymerase Chain Reaction

Die Polymerase Chain Reaction (PCR) wurde eingesetzt, um die Produktion von L1-mRNA in Zellen spezifisch nachzuweisen. Dazu wurde folgender Reaktionsansatz hergestellt: 150ng cDNA, 10µl 10x PCR-Reaktionspuffer, 10 µl 10x PCR-Nukleotidgemisch (dies entspricht jeweils 200µM der vier verschiedenen

Deoxynukleotide), jeweils 30pM Oligonukleotidprimer, die den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt am 3'- bzw. am 5'-Ende flankieren, 0,5µl BSA und 0,5µl Taq-Polymerase (2Units) wurden zusammenpipetiert und anschließend mit H₂O auf 100µl aufgefüllt. Um eine Verdunstung bei der anschließenden Amplifizierungsreaktion zu verhindern, wurde die Lösung mit einen Tropfen Mineralöl beschichtet. Die Amplifizierungszyklen wurde wie folgt durchgeführt. Zunächst wurde die DNA für achtzig Sekunden bei 95°C denaturiert. Die Anlagerung der Primer erfolgte bei 58°C für 120 Sekunden. Abgeschlossen wurde die Reaktionssequenz durch die Aktivität der Taq-Polymerase, die für 260 Sekunden bei 72°C erfolgte. Diese Reaktionssequenz wurde zyklisch vierzig Mal durchgeführt.

Chemikalien und Lösungen

- 10x PCR-Reaktionspuffer
- 10x Nucleotidgemisch
- Oligonukleotidpirmer
- BSA
- Taq-Polymerase
- Mineralöl

3.2.3 Immunologische und biochemische Methoden

3.2.3.1 Markierung von Oberflächenproteinen mit ^{125}J od

Um die Oberflächenproteine von Zellen mit ^{125}J od zu markieren, wurde die Lactoperoxidase-Methode angewandt. Dazu wurden 2×10^7 Zellen in 500 μl PBS aufgenommen und nach der Zugabe von 10 μl Na^{125}J -Lösung, 10 μl Lactoperoxidase und 10 μl H_2O_2 für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden erneut gleiche Volumina Lactoperoxidase und H_2O_2 zugegeben. Nach erneuter Inkubation (3 Minuten bei Raumtemperatur) wurden abermals 10 μl H_2O_2 zupipettiert und für weitere drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nicht eingebautes, freies ^{125}J od wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Das Pellet konnte nun bei -20°C eingefroren werden oder die Zellen wurden lysiert und die Lysate anschließend immunpräzipitiert.

Chemikalien und Lösungen

- PBS
- H_2O_2 (0,03%)
- Lactoperoxidase (1mg/ml in PBS), Sigma, Deisenhofen)
- Na^{125}J od, Amersham Buchler, Braunschweig

3.2.3.2 Immunpräzipitation

Um die Expression von Antigenen auf der Oberfläche von Zellen nachzuweisen, wurde die Immunpräzipitation mit spezifischen Antikörpern eingesetzt. Dazu wurden die Oberflächenproteine zunächst wie beschrieben mit einem Jodisotop (^{125}J) markiert.

Im ersten Schritt wurden 2×10^7 Zellen in 200 μl Lysepuffer aufgenommen und für 30 Minuten auf Eis lysiert. Um die Zellrümmen von den in Lösung gegangenen Antigen abzutrennen, wurde das Lysat anschließend 15 Minuten bei 4°C in der Tischzentrifuge (10.000 UpM) zentrifugiert. Das Lysat wurde abgenommen und es wurden -zur Reduzierung unspezifischer Banden im SDS-Gel- 50 μl Protein A-Sepharose zugeben. Diese Suspension wurde für dreißig Minuten in einem Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert. Im Anschluß daran wurde die Protein A-Sepharose für eine Minute in einer Tischzentrifuge pelletiert

(10.000UpM/4°C) und der Überstand abgenommen. Dieser Überstand wurde nun aliquotiert, so daß jede Probe den Überstand von 3×10^6 Zellen enthielt. Nachdem der Überstand dieser Probe auf 500µl mit TBS/ Ca^{2+} , Mg^{2+} angefüllt worden war, wurden 2-3µg des spezifischen Antikörpers zugegeben. Diese Suspension ist dreißig Minuten auf Eis inkubiert worden. Nach dieser Inkubationszeit wurden 50µl Protein A-Sepharose zugegeben und die Suspension wurde weitere dreißig Minuten bei 4°C in einem Überkopfschüttler inkubiert. Danach wurde die Sepharose erneut pelletiert und der Überstand verworfen. Das Protein A-Sepharose Pellet, das die spezifischen Antikörper mit den gebundenen Antigen enthielt, wurde nun dreimal mit jeweils 1000µl Lysepuffer, zweimal 0,5M LiCl und letztlich einmal mit TBS gewaschen. Das Protein A-Sepharose Pellet wurde dann in 50µl nicht reduzierenden Probenpuffer aufgenommen und fünf Minuten bei 95°C erhitzt. Nachdem die Probe auf Eis abgekühlt worden war, wurde die Protein-A-Sepharose zehn Minuten in einer Tischzentrifuge (10.000UpM/4°C) pelletiert. Der die radioaktiv markierten Antigene enthaltene Überstand konnte nun bei -20°C eingelagert werden oder in einem SDS-Gel aufgetrennt werden.

Chemikalien und Lösungen

- Lysepuffer (im Fall einer Integrinpräzipitation mit 2mM Ca^{2+} und 2mM Mg^{2+})
- Protein-A-Sepharose
- TBS (im Fall einer Integrinpräzipitation mit 2mM Ca^{2+} und 2mM Mg^{2+})
- Litiumchlorid 0,5M
- Probenpuffer (nicht reduzierend)

3.2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde eingesetzt, um die mit spezifischen Antikörpern gebundenen Antigene in der Immunpräzipitation zu visualisieren oder um Proteine aufzutrennen, um diese anschließend mittels Westernblot-Technik zu detektieren. In beiden Fällen wurden ausschließlich Minigele verwendet.

Zunächst wurde das Trenngel mit der entsprechenden Polyacrylamidkonzentration gegossen und mit Butanol (wassergesättigt) überschichtet. Nach einer

Polymerisationsdauer von ca. 45 Minuten wurde das Butanol abgenommen und die Oberfläche mit Wasser mehrmals gespült. Anschließend wurde das Sammelgel gegossen. Nach weiteren dreißig Minuten konnte der Kamm entnommen werden. Bevor die Proben aufgetragen wurden, sind die Taschen mehrmals mit Laufpuffer ausgespült worden, um Acrylamidreste zu entfernen.

Die Elektrophorese erfolgte mit einer Stromstärke von 15mA bis die Bromphenolblaufront die Grenze zum Trenngel erreicht hatte. Anschließend wurde die Elektrophorese mit 30mA Stromstärke weitergeführt. Wenn die Bromphenolblaufront die untere Grenze zum Probenpuffer erreicht hatte, wurde die Elektrophorese beendet.

Das Gel wurde nun anschließend im Westernblot weiterverwendet oder im Rahmen einer Immunpräzipitation getrocknet und einem Film (Biomax Ms, Kodak) exponiert.

Chemikalien und Lösungen

- Trenngel-Lösung
- Sammelgel-Lösung
- Butanol
- Probenpuffer

3.2.3.4 Westernblot

Wie die Immunpräzipitation diente der Westernblot dem Nachweis von Proteinen mit Hilfe spezifischer Antikörper. Nachdem die Proteine in einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt worden waren, wurden diese mittels einer Elektroblottiapparatur auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Dazu wurden sechs Filter, die in WB-Puffer-2 getränkt waren, auf die Anodenplatte der Apparatur gelegt. Darauf wurden zwei Filterpapiere, die Nitrozellulosemembran und das Gel aus der SDS-Gelelektrophorese gelegt, nachdem diese vorher in WB-Puffer-3 getränkt worden waren. Zuletzt wurden oben neun Filterpapiere, die vorher in WB-Puffer-1 gelegt worden waren, geschichtet. Anschließend wurden mit einer Pippette die Luftblasen zwischen den Filterpapieren herausgerollt. Nachdem die Katodenplatte aufgelegt worden war, wurde der

Blot durchgeführt. Dafür wurde für eine Stunde eine Stromstärke von 0,8mA/cm² angelegt.

Nach dem Transfer der Proteine auf die Nitrozellulose wurde diese in Ponceau S-Lösung gelegt, um die geblotteten Proteine zu visualisieren. Dadurch konnte die Effizienz des Transfers überprüft werden und die einzelnen Banden bzw. die Laufspuren der Proteine im Gel markiert werden.

Nachdem die Ponceau S-Lösung mit Leitungswasser entfernt worden war, wurden die freien Bindungsstellen auf der Membran blockiert. Dazu wurde die Nitrozellulosemembran über Nacht bei 4°C in PBS/Magermilch-5% unter Schütteln inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper, der in WB-Inkubations-Puffer verdünnt worden war. Dazu wurde der Blot in Gefrierfolie eingeschweißt und drei Milliliter Antikörperlösung zugegeben. Nach einer Inkubation von einer Stunde bei RT und unter Schütteln wurde der Blot dreimal fünfzehn Minuten in jeweils 30 ml WB-Wasch-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Nitrozellulose mit dem Zweitantikörper inkubiert (anti-Maus-Ig, Peroxidase gekoppelt), der 1:30.000 in der in WB-Inkubations-Puffer verdünnt worden war. Nach einer weiteren Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Blot wie oben beschrieben abermals gewaschen und für genau eine Minute in der WB-Entwickler-Lösung inkubiert. Danach wurde die Membran zweimal durch destilliertes Wasser gezogen, um Reste der WB-Entwickler-Lösung abzuspülen und zwischen zwei Plastikfolien gelegt. Der Blot wurde nun für jeweils zehn, dreißig und sechzig Sekunden einem Film exponiert, der anschließend entwickelt werden konnte.

Chemikalien und Lösungen

- WB-Blot-Puffer-1
- WB-Blot-Puffer-2
- WB-Wasch-Puffer-3
- WB-Inkubations-Puffer-1
- WB-Entwickler-Lösung (Amersham)

3.2.3.5 Durchflußzytometrie

Für die durchflußzytometrische Analyse von Oberflächenantigenen wurden die zu untersuchenden Zellen zunächst zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und anschließend die entsprechende Zellzahl eingestellt. Es wurden ausschließlich Zellkulturen verwendet, die über einen Lebendzellenanteil von mindestens 98% verfügten. Pro Probe wurden 1×10^6 Zellen in einem Volumen von 50 μ l gefärbt. Diese Inkubationslösung enthielt den antigen-spezifischen monoklonalen Antikörper und 5% Pentaglobin, um die Fc-Rezeptoren abzusättigen und somit unspezifische Antikörperbindungen über den Fc-Teil des spezifischen Antikörpers zu verhindern. Nach einer Inkubationsdauer von 15 Minuten wurden die Zellen zweimal mit 500 μ l FACS-Puffer gewaschen. Auf die pelletierten Zellen wurde der zweite, mit FITC- oder PE-markierte anti-Mausimmunglobulin Antikörper gegeben. Diese Lösung enthielt wiederum 5% Pentaglobin. Nach weiteren 15 Minuten Inkubation auf Eis und im Dunkeln wurden die Zellen abermals zweimal mit je 500 μ l FACS-Puffer gewaschen. Zuletzt wurden die Zellen in 500 μ l FACS-Puffer/PI aufgenommen und bis zur Messung der Probe im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt.

Im Fall einer Zweifachfärbung wurde obiges Protokoll wie folgt ergänzt. Nach der Inkubation der Zellen mit dem zweiten fluoreszierenden Antikörper und nach dem anschließenden Waschschrift wurden die pelletierten Zellen in 45 μ l FACS-Puffer aufgenommen. Anschließend wurden 5 μ l Mausserum zugegeben und die Zellen für fünf Minuten auf Eis und im Dunkeln inkubiert. Danach wurde der zweite, spezifische Antikörper, der mit Phycoerythrin gekoppelt war, zugegeben und nach weiteren zehn Minuten Inkubation konnten die Zellen -wie oben beschrieben- gewaschen werden und in FACS/PI-Puffer aufgenommen werden.

Alle Antikörper, die eingesetzt worden sind, wurden in Vorexperimenten auf ihre Färbungsaktivität überprüft. Es wurden immer so hohe Antikörperkonzentrationen eingesetzt, daß die Antikörper-Antigen-Bindung im Sättigungsbereich lag.

Chemikalien und Lösungen

- FACS-Buffer
- FACS/PI-Puffer
- Pentaglobin

3.2.3.6 Migrationsassay

3.2.3.6.1 Durchführung

Die Migrationsexperimente wurden auf speziellen Objektträgern (Nunc) durchgeführt, welche über 16 Kammern verfügten, die auf einem Objektträger befestigt waren. Für die Experimente wurde das Substrat über Nacht bei 4°C vorbeschichtet. Anschließend wurden die Kammer dreimal mit 200µl HBSS gewaschen. Freie Stellen auf den Glasflächen wurden dann mit der Blockierungslösung abgesättigt. Nach einer Inkubationszeit von einer halben Stunde bei 37°C wurden die Kammer abermals dreimal gewaschen. Dann wurden 5×10^4 Zellen in 100µl zugegeben und der gekammerte Objektträger bei 37°C auf den Tisch des Mikroskopes gestellt. Nachdem sich die Zellen abgesetzt hatten –dies war in der Regel nach ca. zwanzig Minuten der Fall– wurde mit der Messung der Migration begonnen.

Zur Messung der Zellmigration wurde das Okular des Mikroskopes mit einer Videokamera verbunden, die direkt an einen Computer angeschlossen war. Alle sechzig Sekunden wurde eine Aufnahme gemacht, die vom Computer als Datei abgespeichert worden ist. Diese einzelnen Bilder konnten später als Filme angesehen werden. Die Speicherung der Bilder und die spätere Auswertung erfolge mit der Bildverarbeitungssoftware *NIH Image V1.56* für Apple Betriebssysteme. Es ist wichtig zu bemerken, daß alle Aufnahme mit der gleichen Objektivvergrößerung aufgenommen wurden und immer ein gleich großer Bildausschnitt abgespeichert worden ist, so daß sich die verschiedenen Experimente vergleichen ließen. Desweiteren befand sich der gekammerte Objektträger auf einer Wärmeplatte, so daß eine konstante Mediumtemperatur von 37°C gehalten wurde.

Chemikalien und Lösungen

- HBSS
- PBS
- Blockierungslösung
- spezifisches Substrat in PBS gelöst und verdünnt;

3.2.3.6.2 Messung und Auswertung

Die Auswertung des Migrationsverhaltens erfolgte mit dem Programm *NIH Image V1.56*, das es ermöglichte die relative Lage einer Zelle in einem Bildausschnitt exakt zu vermessen und die Wanderungsgeschwindigkeit bzw. die absolut zurückgelegte Weglänge in konkreten Meßwerten darzustellen und auszuwerten. Die so generierten Rohdaten konnten dann in konventionelle Graphikprogramme übertragen und anschließend visualisiert werden. Im Einzelnen wurde die Messung und die Berechnung der Zellmigration wie folgt durchgeführt.

Zunächst wurden die x- und y-Koordinaten der Zelle im Bildausschnitt für den ersten Zeitpunkt (t-1) bestimmt. Dann wurde diese Messung für den nächsten Zeitpunkt (t) wiederholt. Die Distanz (m_t) zwischen beiden Zellpositionen läßt sich nun mit Hilfe des Satzes des Pythagoras berechnen:

$$c^2 = a^2 + b^2$$

Wendet man diese Gleichung hier an, repräsentiert die Variable a die Wanderung der Zelle entlang der x-Achse ($x_t - x_{t-1}$) und die Variable b die Migration der Zelle entlang der y-Achse ($y_t - y_{t-1}$) des Bildausschnittes. Für das Quadrat der zurückgelegten Strecke einer Zelle zwischen zwei Zeitpunkten ergibt sich somit durch Einsetzen in obige Gleichung:

$$m_t^2 = (x_t - x_{t-1})^2 + (y_t - y_{t-1})^2$$

Basierend auf dieser Gleichung ergibt sich für die tatsächlich zurückgelegte Wegstrecke:

$$m_t = \sqrt{(x_t - x_{t-1})^2 + (y_t - y_{t-1})^2}$$

Um diese Methode zur Kalkulation der Migrationslänge anwenden zu können, müssen zwei Voraussetzungen eingehalten werden. Der Bildausschnitt im Analyseprogramm und die eingestellte Vergrößerung am Mikroskop müssen bei jeder Aufnahme und bei jeder Auswertung exakt gleich sein. Zweitens muß die zeitliche Differenz zwischen zwei Meßpunkten so klein sein, daß die Zelle während diese Zeitspanne nur einen linearen Weg zurücklegt, um Meßungenauigkeiten auszuschließen. Um diesen zweiten Punkt zu erfüllen wurde alle sechzig

Sekunden eine Aufnahme gemacht. Die Berechnung des Migrationsweges einer Zelle über einen längeren Zeitraum ergab sich dann aus der Summation der Wegstrecken, die eine Zelle nach sechzig Sekunden zurückgelegt hat. Die Gesamtwegstrecke (m_{Gesamt}) ergibt sich dann aus folgender Berechnung:

$$m_{\text{Gesamt}} = \sum_{i=1}^n \sqrt{(x_i - x_{i-1})^2 + (y_i - y_{i-1})^2}$$

wobei n die Anzahl der gemessenen Zeitpunkte repräsentiert. Zur graphischen Auswertung wurde ein Zeitraum von hundertzwanzig Minuten herangezogen.

Durch die Koordinatenbestimmung der Zellposition war es nicht nur möglich die zurückgelegte Wegstrecke zu berechnen, sondern es konnte auch der Migrationsweg der Zellen mit einfachen Graphikprogrammen nachgezeichnet werden, ohne Ressourcenintensive Bildanalysprogramme einzusetzen.

Da bei der Monitorierung der Zellmigration in den verschiedenen Experimenten immer die gleiche Mikroskopvergrößerung eingesetzt worden war und immer ein gleich großer Bildausschnitt ausgewertet wurde, konnten verschiedene Experimente miteinander verglichen werden.

3.2.3.7 Durchflußzytometrische Messung der Fusionsproteinbindung an Zellen

Dieser Bindungsassay wurde dazu verwendet die Bindung des 6.L1-Fc-Fusionsproteins an Zellen nachzuweisen. Neben der schnellen Durchführung dieses methodischen Ansatzes zeichnet sich dieser Nachweis durch einen geringen Verbrauch an 6.L1-Fc-Fusionsprotein aus, da der Nachweis mit fluoreszierenden Antikörper eine sehr empfindliche Methode darstellt.

Zunächst wurde das 6.L1-Fc-Fusionsprotein mit einem FITC-markiertes Fab₂-Fragment, das spezifisch den Fc-Teil humaner Immunglobuline erkennt, komplexiert. Dazu wurde das 6.L1-Fc-Fusionsprotein und 2µl des Fab₂-Fragments in einem Gesamtvolumen von 100µl HBSS-Puffer aufgenommen und für dreißig Minuten bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Je nach experimentellen Ansatz enthielt dieser HBSS-Puffer auch zweiwertige Ionen (siehe Ergebnisteil).

Anschließend wurden 5×10^4 Zellen, die vorher zweimal mit HBSS-Puffer gewaschen wurden, mit dem Fusionsprotein-Fab₂-Fragment-Komplex inkubiert.

Diese Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur und im Dunkeln. Nach einer Inkubationsdauer von zwanzig Minuten wurden die Zellen zweimal mit je 500µl HBSS-Puffer gewaschen. Die pelletierten Zellen wurden letztlich in 500µl PBS/PI-Puffer aufgenommen und durchflußzytometrisch untersucht.

Bei Inhibitionsexperimenten wurden die Zellen –bevor sie mit dem L1-Fc-6.L1-Fc-Fusionsprotein inkubiert worden waren- zwanzig Minuten mit dem blockierenden Antikörper inkubiert und anschließend zweimal mit jeweils 500µl HBSS-Puffer gewaschen.

Wie bei der durchflußzytometrischen Färbung mit Antikörpern wurde die Bindungskurve des 6.L1-Fc-Fusionsproteins in Vorexperimenten austitriert. Bei allen Experimenten wurde eine so hohe Fusionsproteinkonzentration gewählt, daß die Bindung sicher im Sättigungsbereich lag. Ebenfalls mußte jede neue Charge des für humane Immunglobuline spezifische FITC-markiertes Fab₂-Fragment neu titriert werden, um die Bindungskurve und damit den Sättigungsbereich zu bestimmen.

Chemikalien und Lösungen

- HBSS-Puffer
- PBS/PI-Puffer

3.2.3.8 Konstruktbindungsassay (immobil)

Um die Bindung von Zellen am immobilisierten 6.L1-Fc-Fusionsprotein zu messen, wurden gekammerte Objektträger (Nunc) über Nacht bei 4°C mit den entsprechenden Konzentrationen dieses Fusionsproteins inkubiert, das in PBS verdünnt worden war. Das Inkubationsvolumen betrug 100µl. Nachdem der Überstand verworfen worden war, wurden die Objektträger zweimal mit je 200µl HBSS-Puffer gewaschen. Danach wurden 5×10^4 Zellen in 100µl HBSS-Puffer (plus 2mM Ca²⁺, 2mM Mg²⁺) in die Kammern des Objektträgers gegeben und für dreißig Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden die Kammern entfernt und der Objektträger in eiskaltes PBS getaucht, um die ungebundenen Zellen zu entfernen. Zuletzt wurde der Objektträger in PBS/Glutaraldehyd-2% getaucht, um die Zellen zu fixieren. Im Fall von Inhibitionsexperimenten wurden die Zellen, bevor sie auf die gekammerten Objektträger gegeben wurden, mit dem entsprechenden Antikörpern inkubiert. Dies

geschah für fünfzehn Minuten bei Raumtemperatur in einen Inkubationsvolumen von 100µl.

Die Auszählung der gebundenen Zellen erfolgte mittels eines Mikroskops und unter Zuhilfenahme des Bildanalyseprogrammes *NIH Image 1.56*, das in der Lage war, die gebundenen Zellen automatisch zu zählen.

Chemikalien und Lösungen

- HBSS-Puffer (inkl. 2mM Ca²⁺, 2mM Mg²⁺)
- PBS/Glutaraldehyd-2%
- PBS

3.2.3.9 Herstellung und Aufreinigung des 6.L1-Fc-Fusionsproteins

3.2.3.9.1 Transfektion

Für die Transfektion wurde die entsprechende DNA-Sequenz in den pIg Expressionsvektor kloniert [Simmons1993]. Das von den COS Zellen sezernierte Fusionsprotein bestand aus der 6. Domäne des humanen L1 Moleküls, sowie aus der Hinge-Region, der C_H2- und der C_H3-Domäne des humanen IgG-Antikörpers. Die Vektoren mit der spezifischen DNA wurden von O.Ebeling (6.L1-Fc-Fusionsprotein) und St. Katich (mut-6.L1-Fc-Fusionsprotein) produziert und zur Verfügung gestellt.

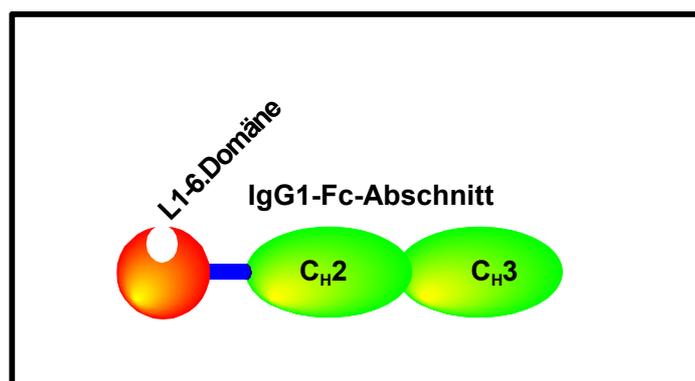


Abbildung 3-2: Das 6.L1-Fc-Fusionsprotein: Das Fusionsprotein besteht aus der 6. Domäne des humanen L1 Moleküls und Anteilen eines humanen IgG Antikörpers. Die Immunglobulinanteile sind die C_H2 und C_H3 Domäne, sowie die Hinge-Region der schweren Kette eines Immunglobulins.

Die Transfektion von Zellen mit der 6.L1-Fc-Fusionsprotein-DNA wurde mit der Kalziumphosphatmethode durchgeführt. COS Zellen wurden in 250ml-Kulturflaschen so ausplattiert, daß sie am Tag der Transfektion zu 80% konfluent wa-

ren. Für die transiente Transfektion wurden pro Flasche 40µg DNA in 450µl H₂O aufgenommen und anschließend wurden noch 50µl 2,5M CaCl₂ zugegeben. Diese Lösung wurde mit einer Pasteurpipette tropfenweise in 500µl HeBS-Puffer überführt, wobei mit einer zweiten Pipette ständig Luftblasen im HeBS-Puffer erzeugt wurden. Nach diesem Transfer wurde die Lösung unverzüglich gevortext und dreißig Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die DNA auf die Zellen gegeben und das Volumen auf 5ml mit dem alten Zellkulturmedium angefüllt.

Nach sechs Stunden wurde das Medium abgenommen und die Zellen für drei Minuten mit einer Glycerinlösung(10%) inkubiert. Um das Glycerin wieder vollständig zu entfernen wurden die Zellen dreimal mit jeweils 20ml PBS gewaschen, bevor sie für zehn Tage in 20ml des DMEM-Mediums kultiviert wurden.

Chemikalien Und Lösungen

2,5M CaCl₂-Lösung

HeBS-Puffer

DMEM-Medium

Glycerinlösung(10%)

PBS

3.2.3.9.2 Isolierung des 6.L1-Fc-Fusionsproteins aus dem Kulturüberstand und Anreicherung

Zur Aufreinigung der Fusionsproteine wurde der Zellkulturüberstand der COS-Transfektanten für zwölf Stunden zyklisch über eine Protein-A-Sepharosesäule gegeben (5ml totales Säulenvolumen). Anschließend wurde die Säule mit 100ml PBS gewaschen. Danach ist das Fusionsprotein mit dem Elutionspuffer (pH-Wert 2,3) eluiert worden, wobei jeweils Fraktionen von 500µl gesammelt wurden. Von den eluierten Fraktionen wurde ständig der pH-Wert bestimmt. Sobald ein pH-Sprung in den sauren Bereich festgestellt worden war, wurden die Fraktionen mit 1M Tris, pH 8.0 neutralisiert.

Nachdem mittels ELISA die Fraktionen bestimmt worden waren, die die Fusionsproteine enthielten, wurden diese vereinigt und konzentriert. Zur Anreicherung der Fusionsproteine wurden Amicon centricon 10-Mikrokonzentratoren verwendet. Die vereinigten Fraktionen wurden in die Amicon-Röhrchen über-

führt in einem SS34-Rotor für zwei Stunden bei 7000UpM bei 6°C zentrifugiert. Danach wurde das Konzentrat mit PBS aufgefüllt und die Zentrifugation wie oben erneut durchgeführt. Das resultierende Konzentrat wurde letztlich aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Chemikalien und Lösungen

PBS

Protein-A-Sepharose

Elutionspuffer

1M Tris, pH 8.0

4 Ergebnisse

Die aus den verschiedenen Experimenten resultierenden Ergebnisse lassen sich in drei Bereiche gliedern. Zunächst wurde untersucht, welche Lymphozytenpopulationen die Adhäsionsmoleküle L1, $\alpha V\beta 3$ und $\alpha V\beta 5$ exprimieren. Diese Untersuchung wurde auf Zellen endothelialen Ursprunges ausgedehnt, da diese unter physiologischen Bedingungen mit den Leukozyten interagieren. Der zweite Bereich umfaßt Untersuchungen zur Interaktion des L1 Moleküls mit αV -Integrin exprimierenden Zellen. An dieses deskriptiven Untersuchungen schließt der Bereich an, der die funktionellen Daten enthält. In diesem letzten Abschnitt wird untersucht, inwieweit die Interaktion zwischen den Adhäsionsmolekülen L1 und $\alpha V\beta 3$ -Integrin für die Vermittlung der Zellmigration notwendig ist.

4.1 Expression der Adhäsionsmoleküle L1, $\alpha V\beta 3$ und $\alpha V\beta 5$

4.1.1 L1-Expression

Im humanen System ist das L1-Molekül bisher nur im Nervensystem beschrieben worden. Zwar konnte aus peripheren B-Zellen die mRNA für dieses Molekül isoliert werden, aber der Nachweis für die Oberflächenexpression fehlte bisher. Da das L1-Molekül im hämopoetischen System der Maus jedoch bereits als Oberflächenprotein identifiziert werden konnte und erste, unbestätigte Hinweise dafür vorlagen, daß auch periphere, humane Monozyten L1 exprimieren (Montgomery, pers. Mitteilung), erschien es erfolgversprechend periphere humane Lymphozyten bezüglich der L1-Expression systematisch zu untersuchen. Durch die Verfügbarkeit eines monoklonalen Antikörpers (UJ 127.11), der in der Arbeitsgruppe von J.T. Kemshead produziert wurde [Patel1991], war es möglich die einzelnen Populationen in der Durchflußzytometrie zu untersuchen.

Aufgrund der Expression von Fc-Rezeptoren auf peripheren Lymphozyten ist es zwingend notwendig die experimentellen Bedingungen dieser Situation anzupassen, um fälschlicherweise positive Resultate auszuschließen. Damit

der L1 Antikörper nicht unspezifisch an die Fc-Rezeptoren bindet, wurden diese während der Färbung mit Pentaglobin abgesättigt. Zusätzlich wurden nur FITC-gekoppelte Fab-Fragmente zur Detektion des Erstantikörpers eingesetzt. Außerdem diente als Negativ-Kontrolle ein irrelevanter Antikörper der gleichen Immunglobulinklasse (IgG1).

4.1.1.1 Expression auf peripheren Blutleukozyten

Zur Unterscheidung der einzelnen Zellpopulationen während der durchflußzytometrischen Messung wurden drei Kriterien verwendet. Da jede Zellpopulation eindeutig durch CD-Marker zu identifizieren ist, wurde jeweils eine Doppelfärbung durchgeführt, wobei zusätzlich zum L1 Antikörper ein direkt mit Phycoerythrin (PE) gekoppelter Antikörper gegen CD3 (spezifisch für T-Zellen), CD19 (B-Zellen) bzw. CD14 (Monozyten und Granulozyten) eingesetzt wurde. Da CD14 ein Marker sowohl für Granulozyten als auch für Makrophagen ist, wurden beide Zelltypen schon während der Isolierung getrennt. Letztlich können alle Leukozytenpopulationen noch durch ihre unterschiedliche Größe und Granularität während der durchflußzytometrischen Messung unterschieden werden. Alle Kriterien zusammen ermöglichten eine eindeutige Identifizierung der Population während der Messung.

Die in *Abbildung 4-1* dargestellten Meßergebnisse zeigen, daß alle peripheren Monozyten (CD14 positiv, Bild B) das L1 Adhäsionsmolekül exprimieren. Eine wesentlich schwächere Expression ist auf peripheren B-Zellen (CD19 positiv, Bild D) nachzuweisen. Im Vergleich zur Färbung mit dem irrelevanten Antikörper als Negativkontrolle (Bild C) ist die Verschiebung entlang der x-Achse eindeutig signifikant. Abweichend von den Ergebnissen, die bei den B-Zellen und Monozyten gefunden wurden, wird nicht die gesamte Population der peripheren T-Zellen (CD3 positiv, Bild F) vom L1-Antikörper angefärbt. Lediglich ein Teil dieser Zellen exprimiert das L1 Molekül. Mehrere durchflußzytometrische Messungen, bei denen die peripheren Lymphozyten von verschiedenen Spendern beiderlei Geschlechts untersucht wurden, haben gezeigt, daß konstant zwischen 40 und 50% der T-Zellen L1 exprimieren.

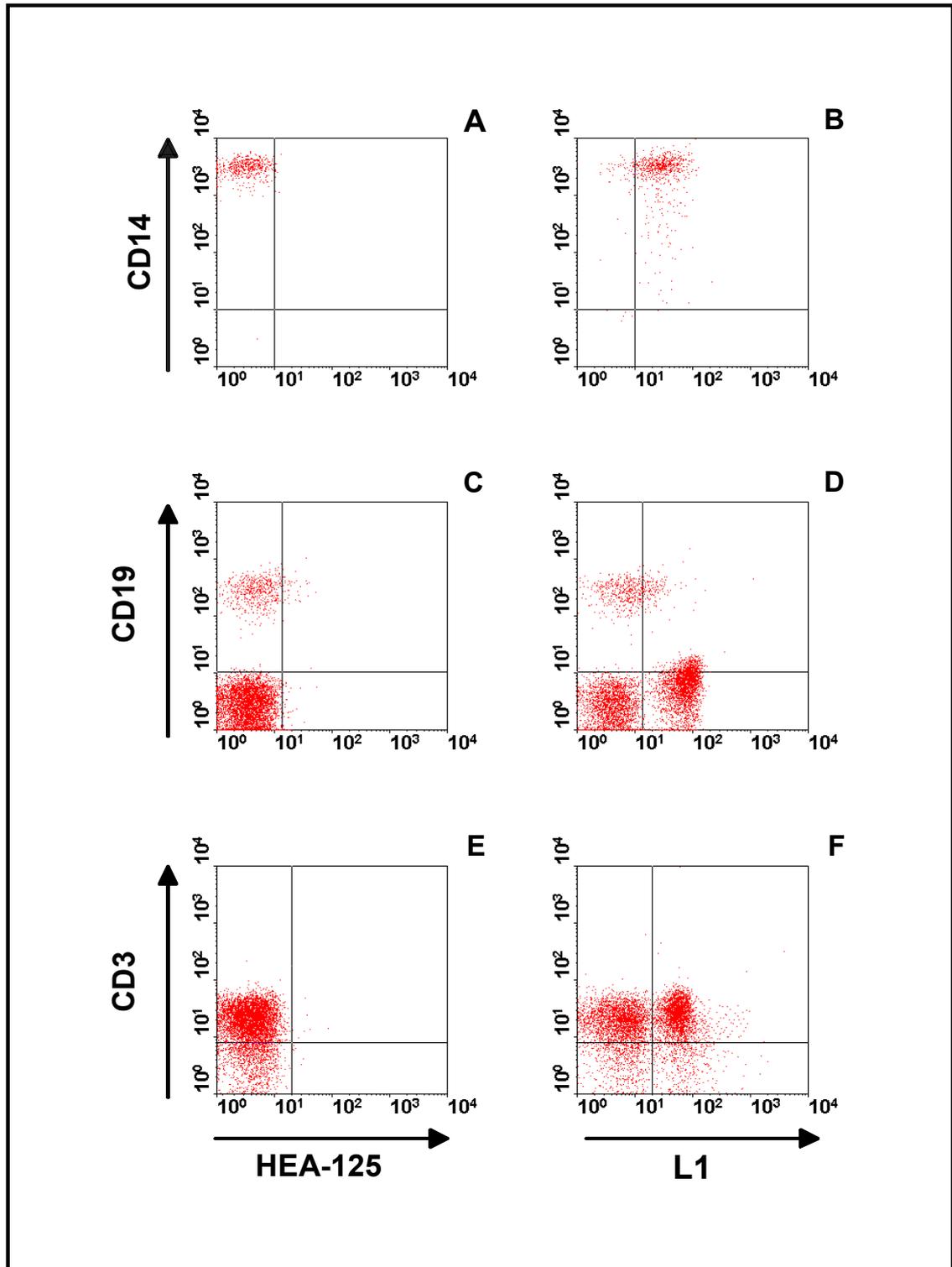


Abbildung 4-1: L1 Expression auf peripheren Lymphozyten; Nach Reinigung aus dem Vollblut sind Zellen mit dem L1 Antikörper (B,D,F) bzw. mit dem irrelevanten Antikörper HEA-125 (A,C,D) angefärbt worden (10µg/ml). Um die einzelnen Zellpopulationen in der Durchflußzytometrie unterscheiden zu können, wurde eine Doppelfärbung mit einem CD-Antikörper (5µg/ml) durchgeführt, der die Subpopulationen eindeutig charakterisiert: CD14→ Monozyten, CD3 → T-Zellen, CD19→ B-Zellen. Die Intensität der Färbung mit dem L1 bzw. dem irrelevanten Antikörper ist an der x-Achse abzulesen, die Reaktion mit dem spezifischen CD-Antikörper auf der y-Achse.

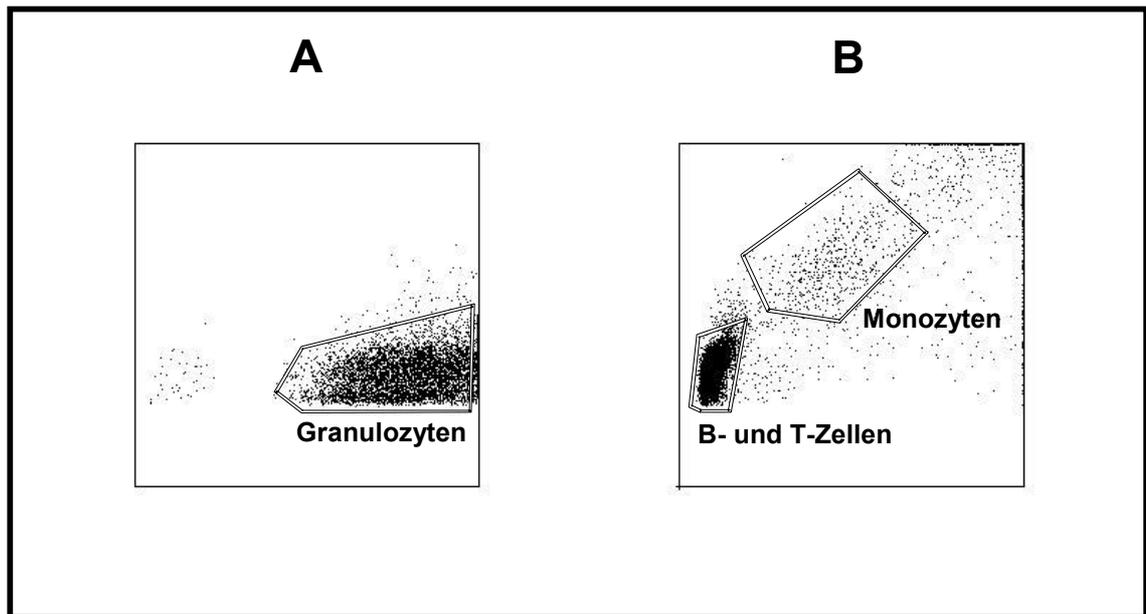


Abbildung 4-2 Reinheit der Aufreinigung des peripheren Bluts; Die Abbildung zeigt, die Identifizierung der verschiedenen Zellpopulationen mittels der morphologischen Merkmale Größe (y-Achse) und Granularität (x-Achse) im FACScan ©. Bild A zeigt eine Probe der Zellsuspension, die zur Untersuchung der L1 Expression auf Granulozyten verwendet wurde, während auf Bild B die Zellpopulationen zu sehen sind, deren L1-Expression in Abbildung 4-1 wiedergegeben wurde

Wie oben schon erwähnt lassen sich periphere Monozyten und Granulozyten über den gleichen CD Marker identifizieren. Die Granulozyten konnten also nicht gleichzeitig mit den Monozyten gefärbt werden. Daher wurden sie bei der Aufreinigung des peripheren Blutes von den anderen Zellen abgetrennt und gesondert gefärbt. Die Effizienz dieser Abtrennung ist in *Abbildung 4-2* zu sehen. Durch die Anordnung der entsprechenden Meßregion während der Messung und durch die Art der Zellisolierung war es möglich, die L1 Expression populationsspezifisch zu untersuchen.

Im Gegensatz zu den anderen Subpopulationen im peripheren Blut konnte auf Granulozyten keine L1 Expression nachgewiesen werden. Die *Abbildung 4-3* zeigt, daß sich keine signifikante Verschiebung entlang der x-Achse ergibt.

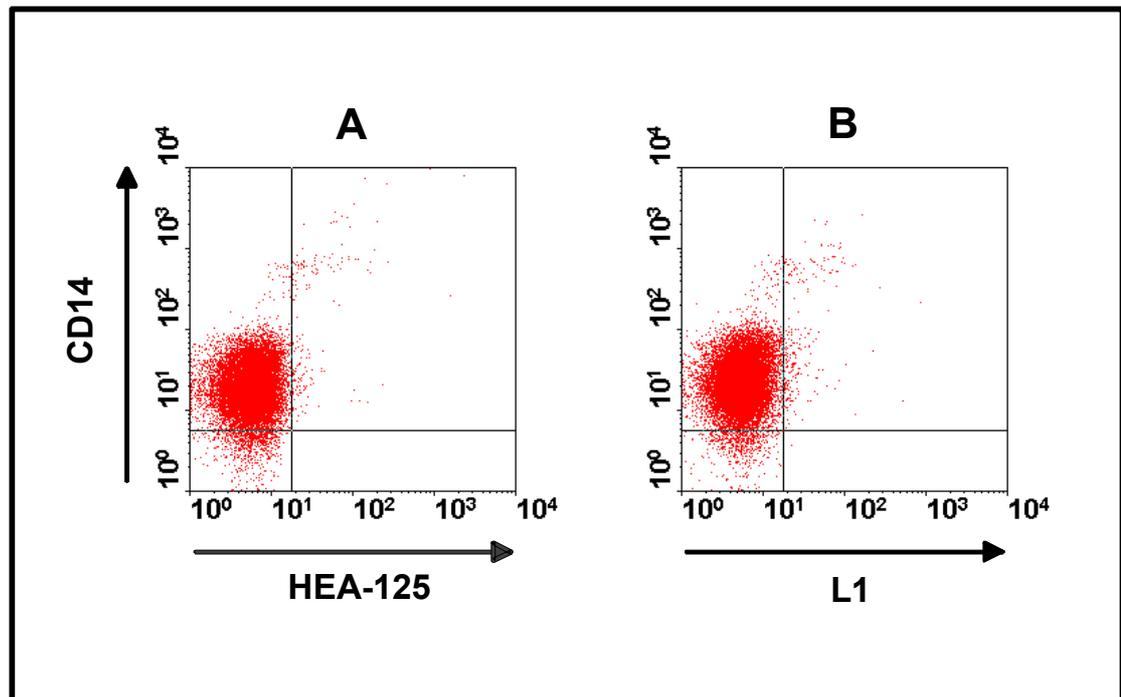


Abbildung 4-3: L1 Expression auf Granulozyten des peripheren Blutes; Die peripheren Lymphozyten wurden wie im Text beschrieben aufgereinigt und sowohl mit dem L1 Antikörper (10µg/ml) als auch mit einem Antikörper gegen CD14 (5µg/ml) angefärbt. Es ist keine signifikante Anfärbung der Zellen mit dem L1-Antikörper nachweisbar.

Bei der Färbung der mononuklearen Zellen (*Abbildung 4-1*) zeigte sich, daß es innerhalb der T-Zellen zwei Population bezüglich der Anfärbbarkeit mit dem L1 Antikörper gab. Um diese beiden Populationen näher zu charakterisieren, wurde weitere Färbungen durchgeführt. Zunächst wurde untersucht, ob die L1 Expression spezifisch für zytotoxische T-Zellen oder für T-Helfer-Zellen ist. Diese Subpopulationen von T-Zellen lassen sich über die Marker CD4 (für T-Helferzellen) bzw. CD8 (für zytotoxische T-Zellen) diskriminieren. Da CD4 allerdings auch von Monozyten oder Makrophagen exprimiert werden kann, war es notwendig die Aufreinigungsmethodik für die peripheren Lymphozyten noch um einen weiteren Schritt zu ergänzen. Nachdem die mononuklearen Zellen aus dem Blut isoliert worden waren, wurden die T-Zellen durch einen Rosettierungsschritt angereichert. Diese so gewonnene Zellpopulation bestand zu 100% aus T-Zellen (*Abbildung 4-4*), die dann sowohl mit dem L1-Antikörper, als auch mit einem Antikörper gegen CD4 bzw. CD8 angefärbt wurden.

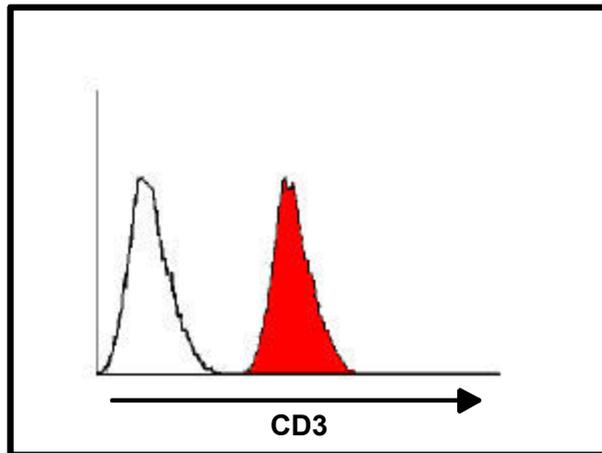


Abbildung 4-4: Reinheit der T-Zellen nach der Rosettierung: Die Zellen, die nach der Rosettierung erhalten wurden, sind auf ihre T-Zellenreinheit überprüft worden, indem ein Aliquot der Zellen mit einem CD3 spezifischen Antikörper angefärbt wurde (5µg/ml). Wie in der Abbildung zu sehen, reagieren alle Zellen mit diesem Antikörper; die Zellfraktion besteht also zu 100% aus T-Zellen. Als Negativkontrolle wurde wieder der irrelevante Antikörper HEA-125 verwendet. L1-Antikörper: rote Kurve; HEA-125 ungefüllte Kurve

In *Abbildung 4-5* ist zu sehen, daß nur CD4 positive T-Zellen mit dem L1 Antikörper angefärbt werden können. Zytotoxische T-Zellen exprimieren dieses Adhäsionsmolekül nicht.

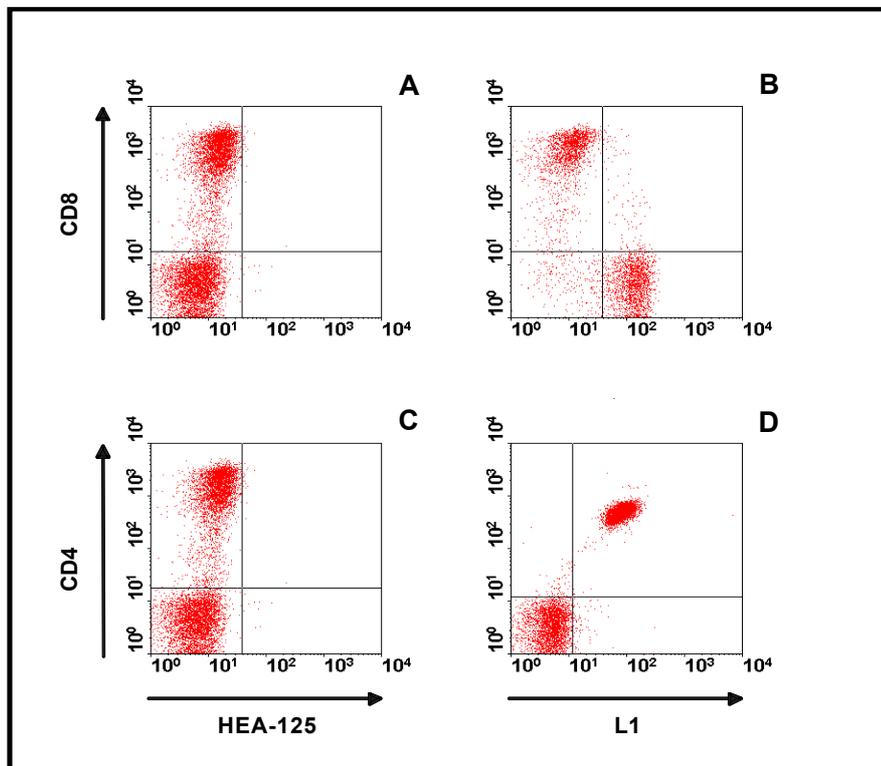


Abbildung 4-5: Expression des L1 Moleküls auf T-Zellen; Nach einer Rosettierung der Lymphozyten wurden die erhaltenen T-Zellen sowohl mit dem L1-Antikörper (10µg/ml), als auch gleichzeitig mit einem spezifischen Marker für die Subpopulationen angefärbt; CD4 → T-Helferzellen, CD8 → zytotoxische T-Zellen (jeweils 5µg/ml). A, C: Negativkontrolle mit dem irrelevanten Antikörper HEA-125; B, D Färbung mit L1 Antikörper; Alle T-Helferzellen exprimieren das L1 Adhäsionsmolekül, wogegen es auf zytotoxischen T-Zellen nicht nachgewiesen werden konnte.

Das CD31 Molekül teilt einige Eigenschaften mit dem L1 Adhäsionsmolekül. Wie in der Einleitung bereits erwähnt, gehören beide Moleküle zur Klasse der Immunglobuline und sind als Liganden für das Integrin $\alpha V\beta 3$ identifiziert worden. Des Weiteren wird CD31 ebenfalls auf etwa 50% der peripheren T-Zellen expremiert und es spielt eine wichtige Rolle bei der Zellmigration. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob beide Moleküle auf der gleichen Subpopulation von T-Zellen expremiert werden. Zu diesem Zweck wurden Aliquots rosettierter T-Zellen gleichzeitig mit einem Antikörper gegen CD31 und mit dem monoklonalen Antikörper gegen das L1 Molekül angefärbt und durchflußzytometrisch gemessen.

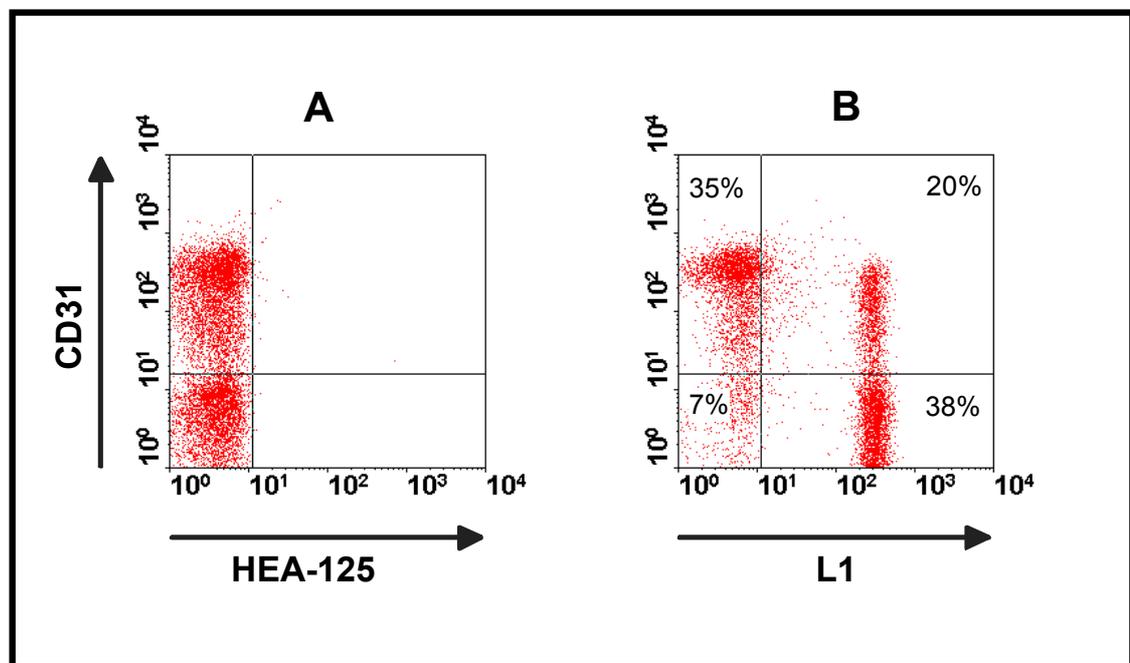


Abbildung 4-6: L1 und CD31 Expression auf peripheren T-Zellen; Um zu untersuchen, ob es eine Korrelation zwischen der Expression von CD31 und der L1 Expression gibt, wurde eine Doppelfärbung mit Antikörpern gegen beide Proteine durchgeführt (CD31-Antikörper: 5 μ g/ml). Als Negativkontrolle wurde wieder der irrelevante Antikörper HEA-125 verwendet.

Das Ergebnis der Färbung (*Abbildung 4-6*) ist nicht so eindeutig, wie die Zuordnung der L1 Expression zur Koexpression von CD4. Wie zu erwarten, reagieren etwas mehr als fünfzig Prozent der T-Zellen mit dem CD31 Antikörper. CD31 positive Zellen können aber sowohl L1 expremieren, als auch L1 negativ sein. Interessanterweise expremieren lediglich sieben Prozent der Zellen weder das L1 Adhäsionsmolekül noch CD31.

4.1.1.2 L1 Expression auf Tumorzelllinien

Nachdem das Verteilungsmuster der L1 Expression auf naiven, peripheren Lymphozyten untersucht worden war, wurden einige Tumorzelllinien auf die Expression dieses Adhäsionsmoleküles hin durchflußzytometrisch untersucht. Die Neuroblastomzelllinie *Kelly* wurde dabei als Positivkontrolle eingesetzt. Wie in *Abbildung 4-7* zu sehen ist, sind die monozytären Zelllinien *HL60* und *U937* eindeutig positiv für L1.

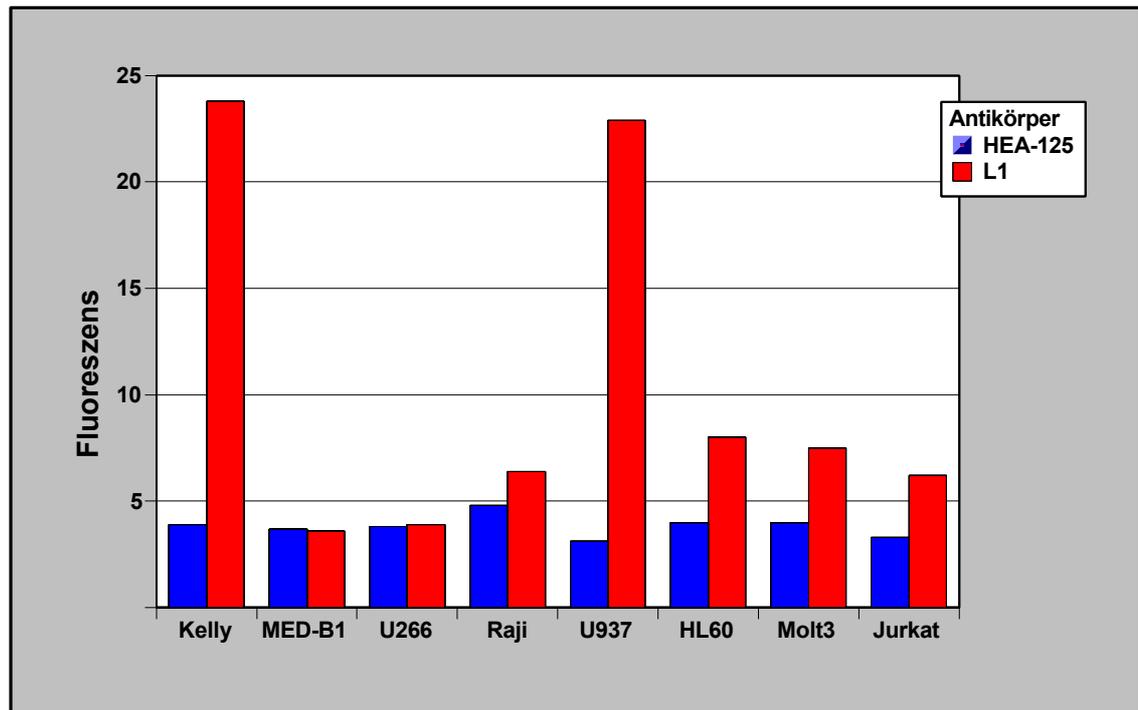


Abbildung 4-7: Expression von L1 auf Tumorzelllinien; Die Expression auf den Tumorzelllinien wurde wie bei den peripheren Lymphozyten durchflußzytometrisch untersucht. Der L1 Antikörper wurde wieder in einer Konzentration von 10µg/ml eingesetzt. Auf der y-Achse ist mittlere Fluoreszenz der Färbung abzulesen.

Eine schwächere Anfärbung mit dem L1 Antikörper konnte noch bei den T-Zellen *Jurkat* und *Molt3* nachgewiesen werden. Auf B-Zelllinien konnte keine (*U266* und *MED-B1*) oder fast keine (*Raji*) L1 Expression detektiert werden.

4.1.1.3 Expression auf Endothelzellen und epithelialen Zellen

In der Einleitung wurde ausführlich geschildert, daß der Interaktion zwischen Lymphozyten und Endothelzellen eine entscheidende Bedeutung bei der Aufrechterhaltung immunologischer Funktionalität zukommt. Transmigration in die Gewebe oder T-Zellenadhäsion an Epithelzellen im Thymus sind gekoppelt an die Expression von Adhäsionsmolekülen auf beiden Zelltypen. Daher wurde nicht nur die Expression von L1 auf Lymphozyten untersucht, sondern es

wurden auch Endothelzellen bzw. Zellen epithelialen Ursprungs auf ihre L1 Expression hin getestet.

Zunächst wurden von beiden Zelltypen die Gesamt-RNA isoliert und versucht mit dem PCR Verfahren die mRNA für L1 nachzuweisen.

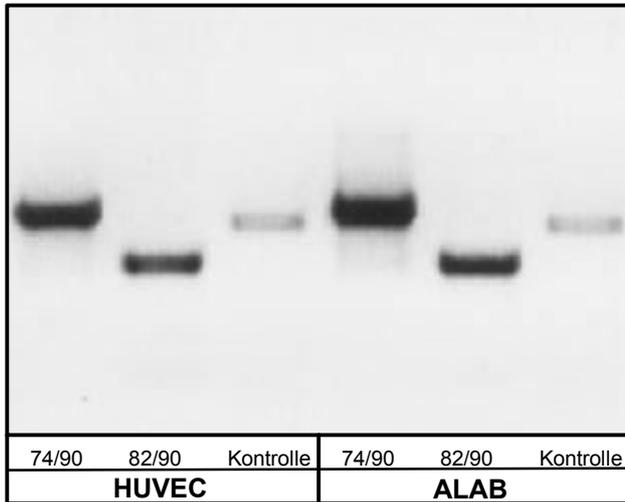


Abbildung 4-8: Nachweis der L1 mRNA in Endothelzellen: Für den Nachweis der L1 mRNA in Endothelzellen wurden die Primerpaare 74 und 90 bzw. 82 und 90 verwendet. Die Abbildung zeigt die erwarteten Banden in einer Höhe von 740 Basenpaaren (74/90) bzw. 445 Basenpaaren (82/90). Als Kontrolle wurde ein Primer verwendet, der die mRNA von β -Actin nachweist.

Wie aus *Abbildung 4-8* ersichtlich, konnte mit zwei unterschiedlichen Primerpaaren spezifisch für L1 in der RT-PCR ein positives Signal erhalten werden.

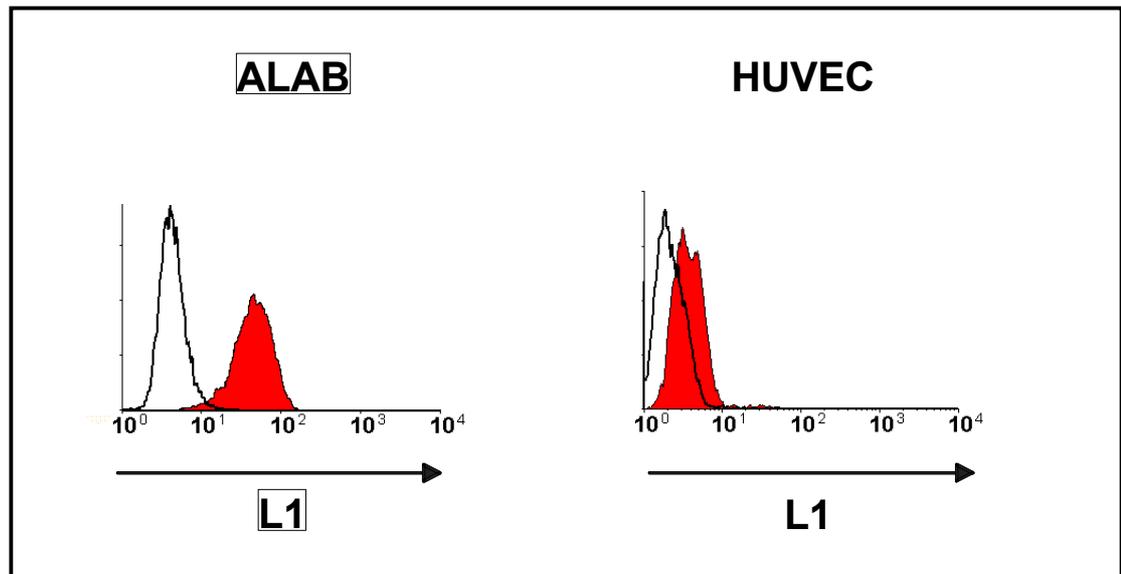


Abbildung 4-9: L1 Expression auf Endothelzellen- und epithelialen Tumorzellen; Die Expression von L1 auf Endothelzellen wurde wieder durchflußzytometrisch untersucht. Im Vergleich zur Färbung mit dem irrelevanten Antikörper HEA-125 zeigte sich, daß beide Zelllinien das Adhäsionsmolekül L1 exprimieren. L1-Antikörper: rote Kurve, HEA-125: ungefüllte Kurve

Zur Bestätigung der PCR Daten wurden anschließend beide Zellen durchflußzytometrisch auf ihre L1 Expression hin untersucht. Die Färbung mit dem L1 Antikörper zeigte, daß sowohl *HUVEC* Zellen und noch stärker *ALAB* das L1 Molekül exprimieren. In beiden Fällen wurde als Negativkontrolle wieder ein irrelevanter Antikörper mit identischem Isotyp verwendet, so daß von der Eindeutigkeit dieser Färbung, die in Übereinstimmung mit dem mRNA Nachweis mittels PCR steht, ausgegangen werden kann.

4.1.2 α V-Integrinexpression

Der Molekülfamilie der Integrine kommt bei der Zelladhäsion eine Schlüsselfunktion zu und es liegen Ergebnisse darüber vor, daß das Integrin α V β 3 über das Adhäsionsmolekül L1 eine haptotaktische Zellmigration vermitteln kann [Montgomery1996]. Um der Frage nachzugehen, ob diese bei Melanomzellen beobachtete Bindung auch bei der Interaktion zwischen Endothelzellen und Lymphozyten eine Rolle spielt, mußte zunächst untersucht werden, ob die hier verwendeten Zellen α V-Integrine exprimieren. Da oben gezeigt worden ist, daß das L1 Molekül sowohl auf Lymphozyten als auch auf En-

dothelzellen expremiert wird, würde eine αV -Expression auf einen der beiden Zelltypen Adhäsion vermitteln können.

4.1.2.1 Integrinexpression auf Endothelzellen und epithelialen Zellen

Die Endothelzellen *HUVEC* und die Mammakarzinomlinie *ALAB* wurden auf die Expression zweier αV -Integrine hin untersucht: $\alpha V\beta 3$ und $\alpha V\beta 5$. Beide Zelllinien wurden mit monoklonalen Antikörpern, die spezifisch die Integrin-Heterodimere erkennen gefärbt und anschließend durchflußzytometrisch gemessen. Zur Detektion dieser Integrine wurden der Antikörper P1F6 zur Färbung von $\alpha V\beta 5$ verwendet [Wayner1991] und mit dem Antikörper LM609 wurde das $\alpha V\beta 3$ Integrin gefärbt [Cheresh1987A].

Die aus der Nabelschnur isolierten Endothelzellen *HUVEC* expremierten stark beide αV -Integrine. Auf der Zelloberfläche der Mammakarzinomzelline *ALAB* dagegen läßt sich nur $\alpha V\beta 3$ nachweisen, das Integrin $\alpha V\beta 5$ wird von diesen Zellen nicht expremiert.

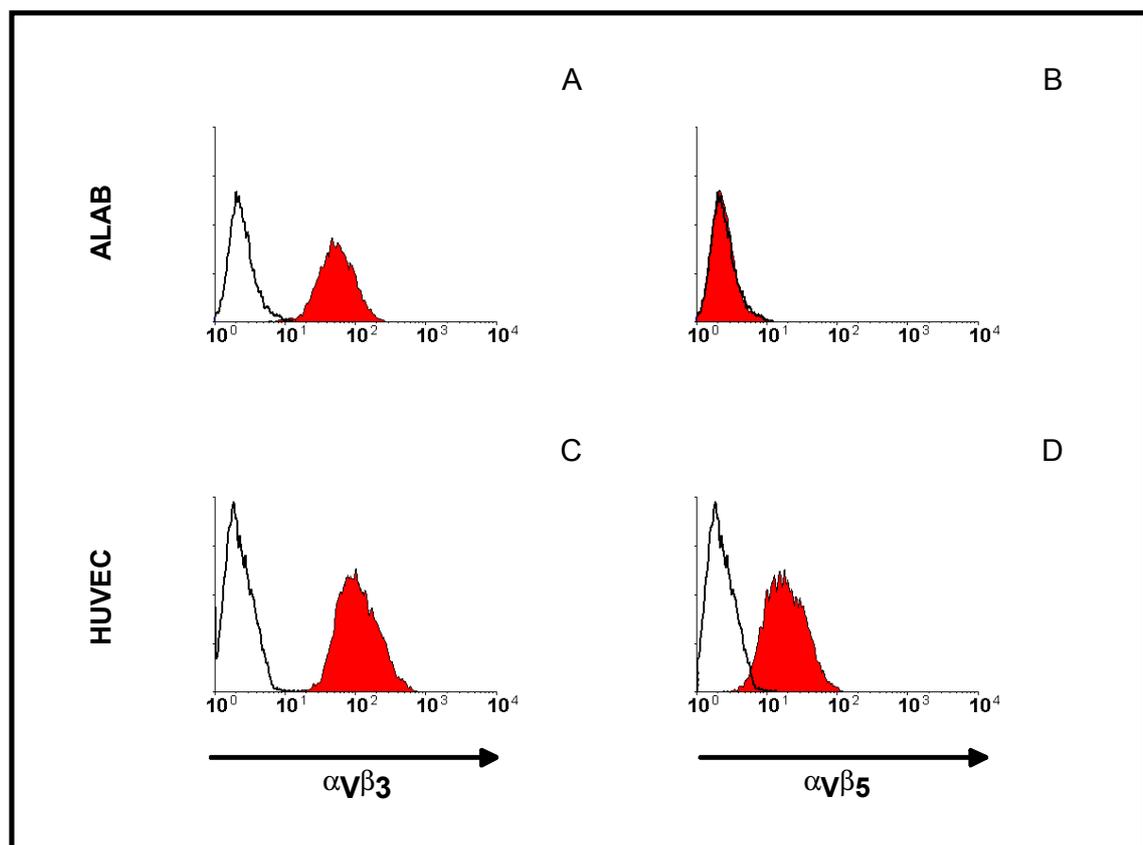


Abbildung 4-10: αV -Integrinexpression auf HUVEC und ALAB: Beide Zelllinien wurde durchflußzytometrisch auf ihre Integrinexpression hin untersucht; rote Kurve Integrin-Antikörper (10 μ g/ml); ungefärbte Kurve irrelevanter Antikörper als Negativ-Kontrolle (10 μ g/ml).

4.1.2.2 Expression auf T-Lymphozyten

Da das L1 Molekül sowohl auf Endothelzellen als auch auf verschiedenen Lymphozyten expremiert wird, lag es nahe, auch die α V-Integrin Expression auf Lymphozyten zu untersuchen. Es ist bekannt, daß frisch isolierte periphere Lymphozyten keines der hier untersuchten α V-Integrine expremieren, daß die Oberflächenexpression aber reguliert werden kann [Huang1995, Horvath1988]. Die Zellen wurden bei diesen Versuchen drei Tage in einer Zelldichte von 3×10^6 Zellen/ml kultiviert. Zur Aktivierung der T-Zellen wurde dem Zellkulturmedium PMA (100ng/ml), PHA (5 μ g/ml) oder beide Substanzen in eben dieser Konzentration zugegeben. Parallel dazu wurden als Negativkontrolle T-Zellen kultiviert, die keinen Zusatz zum Medium erhielten. Abweichend von der Stimulation durch PHA bzw PMA wurden in einem weiteren Versuchsansatz T-Zellen sieben Tage mit Tetanustoxid (1 μ g/ml) stimuliert.

Nach der Stimulierung wurden die Zellen, deren Vitalität vorher durch Trypan-Blaufärbung bestimmt worden war und nachdem die toten Zellen durch einen Percoll-Gradienten abgetrennt worden waren, mit den spezifischen Antikörpern gefärbt und durchflußzytometrisch analysiert.

Erwartungsgemäß zeigen die T-Zellen ohne Stimulierung keine Expression der α V-Integrine (*Abbildung 4-11*). Auch nach einer dreitägigen Stimulierung mit PMA allein kann weder α V β 3 noch α V β 5 nachgewiesen werden. Die Stimulierung der Zellen mit PHA über drei Tage hinweg läßt bestensfalls eine sehr geringe Bindung des α V β 5-Antikörpers erkennen. Erst die Aktivierung mit beiden Agenzien zusammen führt zu einer klaren Expression von α V β 3 und α V β 5. Bemerkenswert aber, daß auch der Zusatz eines spezifischen Antigens -in diesem Fall Tetanustoxid- die Expression sowohl des α V β 3-, als auch das α V β 5-Integrins stimulieren kann.

Um die Ergebnisse, die in der Durchflußzytometrie erzielt worden sind, zu verifizieren, wurde anschließend noch eine Immunpräzipitation durchgeführt. Die T-Zellen wurden mit der gleichen Methodik wie für die durchflußzytometrische Messung isoliert und unter den gleichen Bedingungen kultiviert. Die Oberflä-

chenproteine dieser Zellen wurden dann mit radioaktiven Jod markiert und anschließend mit den gleichen Integrinantikörpern präzipitiert.

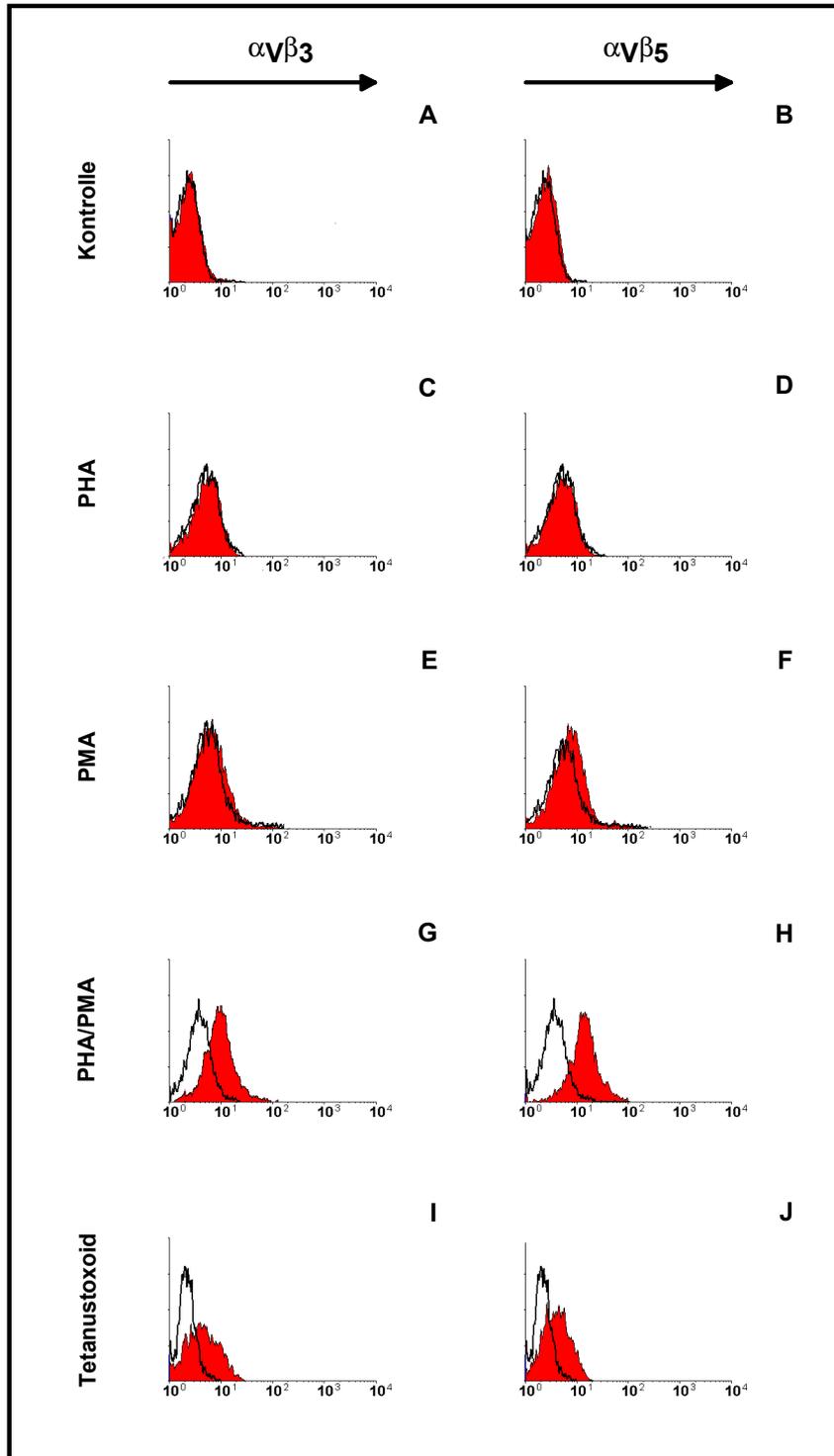


Abbildung 4-11: $\alpha V\beta 3$ - und $\alpha V\beta 5$ -Integrinexpression auf peripheren T-Zellen; Die Abbildung zeigt die Expression der Integrine $\alpha V\beta 3$ und $\alpha V\beta 5$, nachdem T-Zellen drei Tage mit den angegebenen Zusätzen (Beschriftung Y-Achse) kultiviert worden sind. ; rote Kurve: Integrin-Antikörper (10 $\mu\text{g/ml}$), ungefärbte Kurve: irrelevanter Antikörper als Negativ-Kontrolle (10 $\mu\text{g/ml}$).

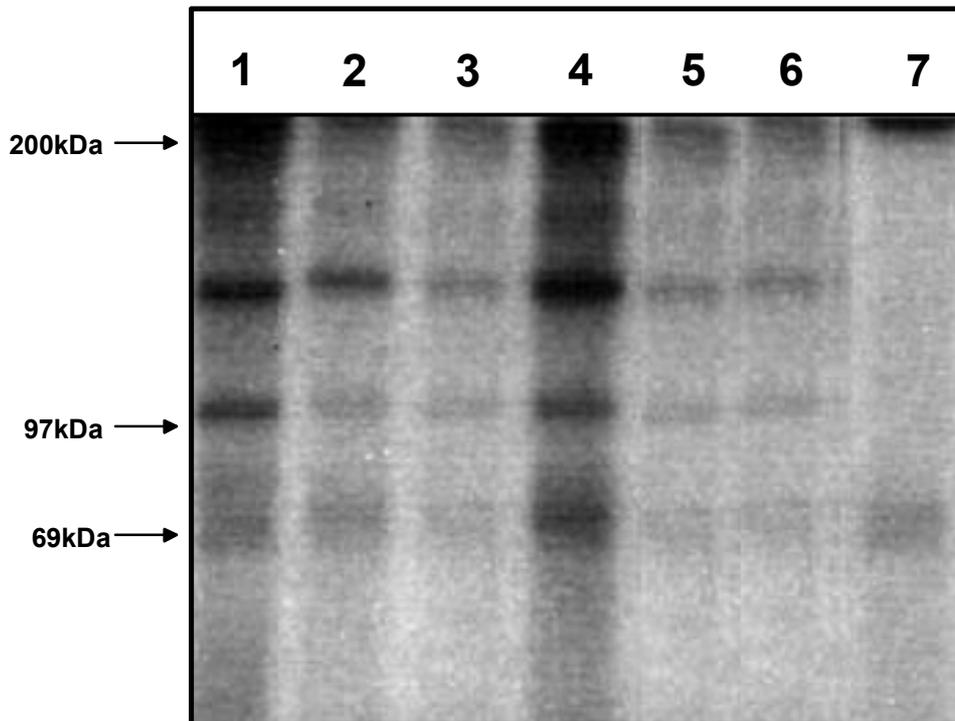


Abbildung 4-12: Immunpräzipitation von aktivierten T-Zellen: Die T-Zellen wurden im Anschluß an die Immunpräzipitation in einem 8%igen SDS-Gel aufgetrennt. Spur 1 bis 3 T-Zellen (mit PHA/PMA inkubiert; Spur 4, 5 und 6 T-Zellen (mit Tetanustoxoid inkubiert); Spur 7: T-Zellen (mit PHA inkubiert); Antikörper: 1, 4 und 7 α - α V; 2 und 5 α - α V β 3, 3 und 6 α - α V β 5; Die 200kDa Banden befinden sich an der Übergangsstelle vom Sammelgel zum Trenngel; Alle Antikörper wurden in einer Konzentration von 10 μ g/ml eingesetzt; Die Spuren 1 bis 3 und 4 bis 7 stammen von unterschiedlichen Gelen, die Zellen aber aus der selben T-Zellenaufreinigung.

4.1.3 Bestimmung der Integrinexpression auf MED-B1 und Nalm6

In der ersten Phase wurden die Migrationsexperimente mit den lymphozytären Tumorzellen Nalm 6 und MED-B1 durchgeführt. Dies machte es nötig, zu Beginn die Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle auf der Oberfläche dieser Zellen zu untersuchen. Die vorher durchgeführten Experimente (*Abbildung 4-7*) zeigten schon, daß weder Nalm 6 noch MED-B1 das Adhäsionsmolekül L1 exprimieren.

In einer ersten Färbung wurde durchflußzytometrisch untersucht, ob diese Zellen die Integrine α V β 3 bzw. α V β 5 exprimieren. Dazu wurden Aliquots dieser Zellen wieder mit Antikörpern inkubiert, die das jeweilige Gesamtmolekül erkennen.

Die Meßprofile der *Abbildung 4-13* zeigen, daß die Zelllinie Nalm 6 weder das $\alpha V\beta 3$ -, noch das $\alpha V\beta 5$ -Integrin expremiert (A und B). Im Gegensatz dazu konnte auf der Oberfläche von MED-B1 das Integrin $\alpha V\beta 3$ nachgewiesen werden (C). Die Färbung mit dem $\alpha V\beta 5$ -Antikörper war aber auch bei diesen Zellen negativ.

Im Einleitungsteil wurde schon erwähnt, daß die Integrine $\alpha 4\beta 1$ und $\alpha 5\beta 1$ bei Thymozyten Zellmigration vermitteln können. Es ist also notwendig zu wissen, ob diese Integrine auf Nalm 6 und MED-B1 expremiert werden, da mit diesen Zellen die Migrationsveruche unternommen werden sollen. Um die mögliche Expression von $\alpha 4\beta 1$ bzw. $\alpha 5\beta 1$ zu detektieren, wurden die Zellen mit Antikörpern gegen die $\alpha 4$ bzw. Die $\alpha 5$ -Untereinheit humaner Integrine inkubiert (*Abbildung-4-14*)

Beide Antikörper zeigten keine Reaktion mit den MED-B1 Lymphozyten. Sowohl die $\alpha 4$ - als auch die $\alpha 5$ -Untereinheit konnten aber auf Nalm 6 Zellen nachgewiesen werden.

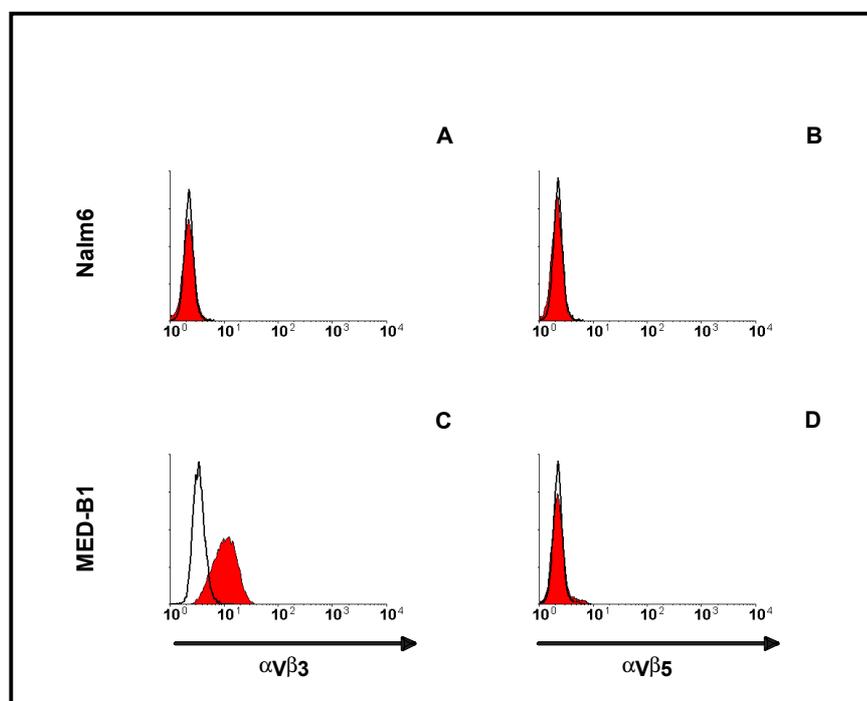


Abbildung 4-13 Expression der Integrine $\alpha V\beta 3$ und $\alpha V\beta 5$ auf den lymphozytären Tumorzellen Nalm 6 und MED-B1; Aliquots der Zellen wurden entweder mit einem Antikörper gegen $\alpha V\beta 3$ (A,C) oder mit einem Antikörper gegen $\alpha V\beta 5$ (B,D) inkubiert (rote Kurve) . Als Negativkontrolle fungierte wieder der Antikörper HEA-125 (ungefärbte Kurve). Alle Antikörper wurden in einer Konzentration von $10\mu\text{g/ml}$ eingesetzt.

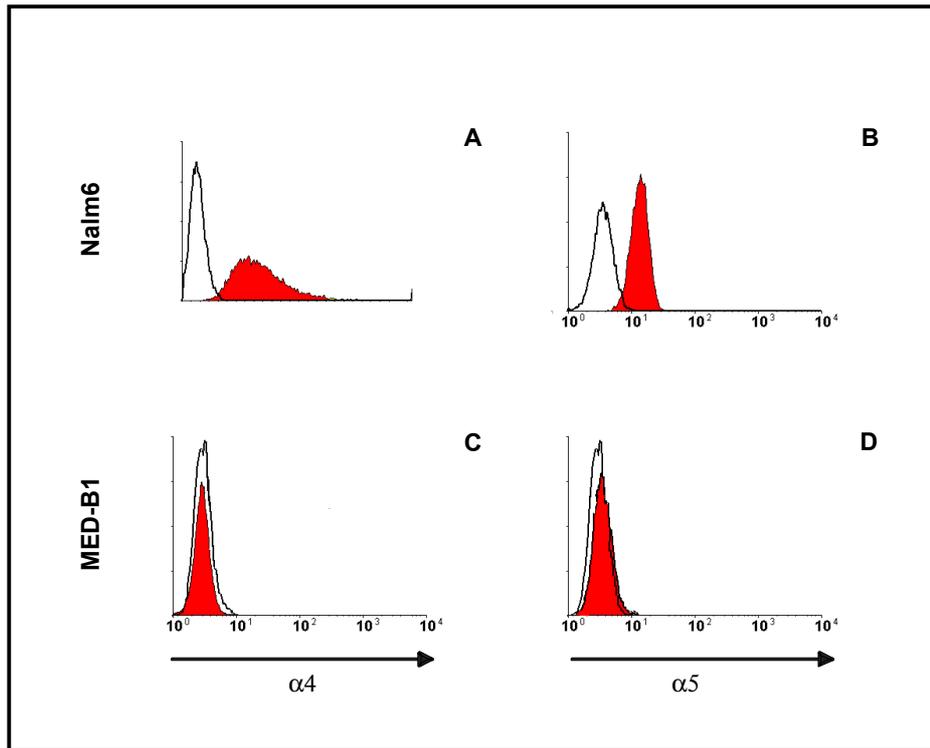


Abbildung 4-14: Expression der Integrinuntereinheiten $\alpha 4$ und $\alpha 5$ auf Nalm 6 und MED-B1; Die Zellen wurden mit einem Antikörper gegen die $\alpha 4$ - bzw. gegen die $\alpha 5$ -Untereinheit gefärbt (rote Kurve) Beide Antikörper und der Antikörper HEA-125 als Negativ-Kontrolle (ungefärbte Kurve) wurden in einer Konzentration von 10 μ g/ml eingesetzt.

Um dieses Ergebnis zu untermauern, wurden die Oberflächenproteine dieser Zellen noch mittels einer Immunpräzipitation untersucht. Die Aliquots der Zellysate von Nalm 6 und MED-B1 wurden mit Antikörpern gegen die αV - bzw $\alpha 5$ -Untereinheit, sowie mit einem Antikörper gegen humanes L1 inkubiert.

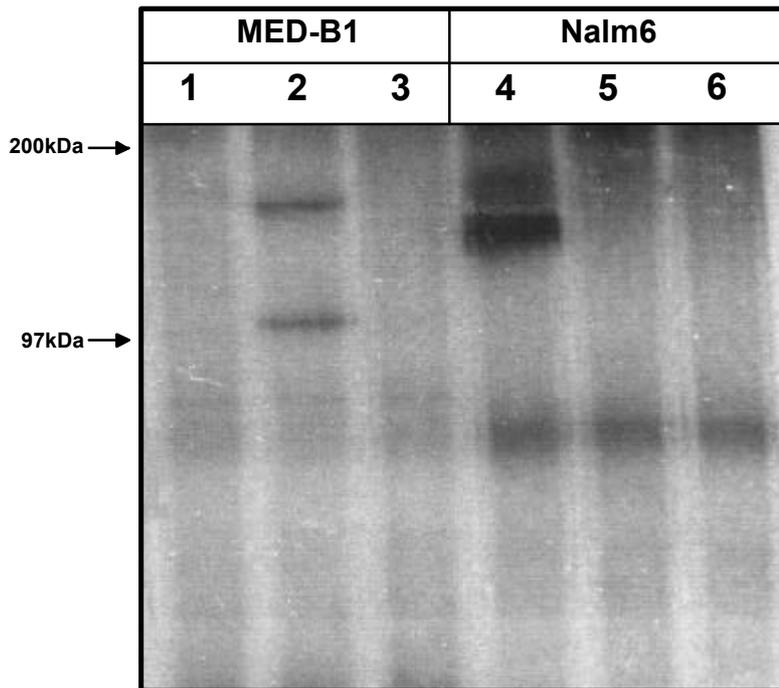


Abbildung 4-15: Immunpräzipitation von Nalm 6 und MED-B1: Alle Antikörper wurden in einer Konzentration von 10µg/ml eingesetzt. Während der L1 Antikörper weder bei Nalm 6, noch bei MED-B1 eine Proteinbande präzipitierte, konnte das Integrin $\alpha\beta3$ bei MED-B1 bzw. $\alpha4$ bei Nalm nachgewiesen werden. $\alpha4$ -Akk: Spur 1 und 4; $\alpha\beta3$ -Akk, Spur 2 und 5; L1-Akk Spur 3 und 6

Wie erwartet wird vom L1 Antikörper weder bei Nalm 6 noch bei MED-B1 eine Bande präzipitiert (Abbildung 4-15: Bahn3 und 5). Die durchflußzytometrischen Messungen bestätigend konnte aber das $\alpha\beta3$ Integrin bei MED-B1 Zellen präzipitiert (Spur 2) und die $\alpha4$ -Kette konnte bei Nalm 6 Zellen nachgewiesen werden (Spur(4)).

4.2 Interaktion zwischen αV -Integrin exprimierenden Zellen und dem Adhäsionsmolekül L1

Oben konnte gezeigt werden, daß die Endothelzellen *HUVEC* und die epidermale Zelllinie *ALAB* konstitutiv αV -Integrine exprimieren. Auf der anderen Seite konnte das humane L1-Moleküle auf einer Reihe von Leukozyten nachgewiesen werden. Um nun zu untersuchen, ob die von den Endothelzellen exprimierten αV -Integrine das L1 Molekül binden und damit eine eventuelle L1- αV -Integrin vermittelte Adhäsion unterstützen können, wurde die Bindung eines L1-Fusionsproteins an Endothelzellen bzw. epitheliale Zellen untersucht. Dabei wurden die Zellen mit dem 6.L1-Fc-Fusionsprotein inkubiert, das aus der sechsten Domäne eines humanen L1 Moleküles und aus dem Fc-Teil eines humanen Antikörpers besteht. Dieses Fusionsprotein war vorher mit FITC-

markierten Antikörpern gegen den Fc-Teil von Immunglobulinen inkubiert worden, so daß die Bindung des Fusionsproteins an die Zellen durchflußzytometrisch gemessen werden konnte. Da die Endothelzellen neben $\alpha V\beta 3$ und $\alpha V\beta 5$ auch das L1 Adhäsionsmolekül exprimieren, mußte eine homotypische L1-L1-Bindung ausgeschlossen werden. Daher bestand das verwendete Fusionsprotein nur aus der sechsten Domäne des L1 Moleküles, welche die RGD-Sequenz enthält, der bei der Bindung an Integrinen eine entscheidende Rolle zukommt. Die homotypische L1-Bindung wird über mehrere andere Sequenzen des L1 Moleküles vermittelt und wird durch dieses Vorgehen ausgeschlossen.

Bevor die 6.L1-Fc-Fusionsproteine in den Bindungsexperimenten eingesetzt wurden, wurde die strukturelle Integrität jeder aufgereinigten Fusionsproteincharge im Westernblot getestet (*Abbildung 4-16*). Dadurch konnte ausgeschlossen werden, daß proteolytische Prozesse das Fusionsprotein fragmentieren.

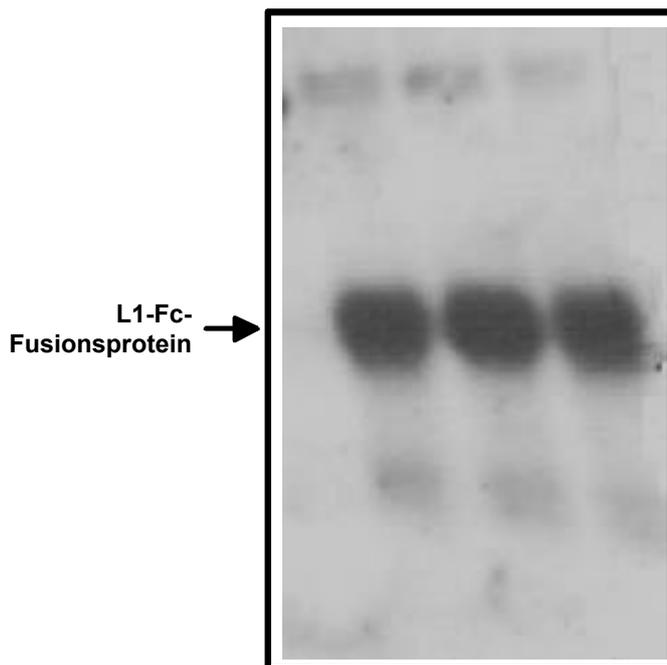


Abbildung 4-16: Westernblot 6.L1-Fc-Fusionsproteins: Diese Abbildung zeigt das repräsentative Ergebnis eines Western-Blotes mit drei verschiedenen Aliquot von Aufreinigungen des 6.L1-Fc-Fusionsproteins zur Kontrolle der Chargen. In jeder Probe wird nur eine Bande von ca. 68 kDa gefärbet, was die Intaktheit des Konstruktes anzeigt. Zur Detektion wurde ein monoklonaler Antikörper gegen den Fc-Teil humaner Immunglobuline eingesetzt (Verdünnung: 1:1000)

In einem weiteren Versuch wurde die Bindung von Nalm 6 und MED-B1 Zellen an das immobilisierte 6.L1-Fc-Fusionsprotein getestet (*Abbildung (4-17)*). Für die Migrationsexperimente war es wichtig zu wissen, ob Zellen auch an das Konstrukt binden, wenn dieses an einer Glasoberfläche immobilisiert wurde. *Abbildung 4-17* zeigt deutlich, daß MED-B1 Zellen an das immobilisierte 6.L1-Fc-Fusionsprotein binden können, wogegen Nalm 6 Zellen nicht mit diesem Fusionsprotein interagieren. Diese Bindung kann aber vollständig aufgehoben werden, wenn die RGD-Sequenz des Konstruktes durch Mutation ausgeschaltet wird. An P-Selektin, das über Karbohydratstrukturen mit Zellen interagiert, binden sowohl Nalm 6 als auch MED-B1 Zellen.

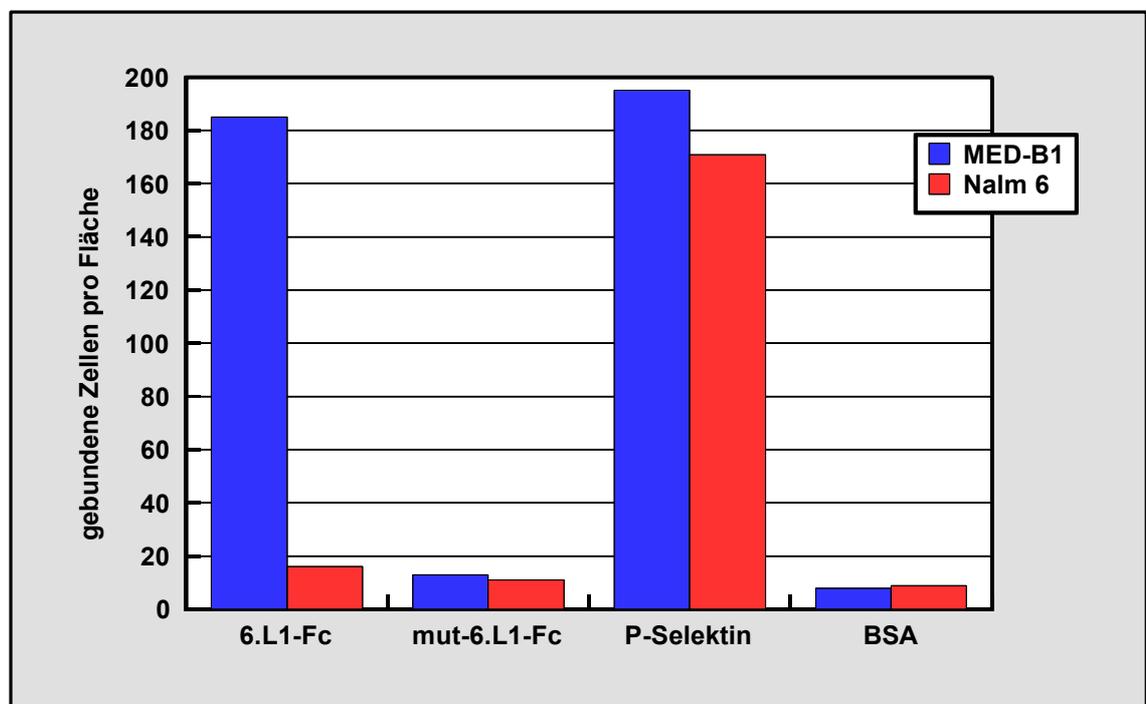


Abbildung 4-17: Bindung von Tumorzellen an immobilisierte Substrate: Alle Substrate wurden in einer Konzentration von 20µg/ml auf die Objektträger geschichtet. mut-6.L1-Fc: mutiertes 6.L1-Fc-Fusionsprotein ohne die RGD bzw DGR-Sequenz; P-Selektin: Positivkontrolle; BSA: Negativ-Kontrolle

Im Anschluß an diese Experimente wurde untersucht, ob das 6.L1-Fc-Fusionsprotein in Lösung an lymphozytären Zellen binden kann. Dazu wurden MED-B1 Zellen in steigender Konzentration mit dem 6.L1-Fc-Fusionsprotein inkubiert. Parallel dazu wurde die Zelllinie Nalm 6, die keine α V-Integrine exprimiert, mit den gleichen Konzentrationen dieses Fusionsprotein gefärbt, um als Negativkontrolle zu fungieren.

Der in *Abbildung 4-18* gezeigte Kurvenverlauf zeigt eindeutig, daß die Bindung an MED-B1 Zellen eindeutig spezifisch ist. Die Menge an gebundenen Fusionsprotein, hier gemessen durch die Fluoreszenzstärke der einzelnen Zellen, steigt mit der Konzentration des eingesetzten Fusionsproteins. Ein weiterer Hinweis für die Spezifität ist das Erreichen eines Sättigungsbereiches, der bei mehr als 1500ng/ml 6.L1-Fc-Fusionsprotein erreicht wurde. Der Kurvenverlauf der Kontrollzellen zeigt eindeutig, daß keine signifikante Bindung an diese Zelle nachgewiesen werden kann. Auch bei hohen Konzentrationen des 6.L1-Fc-Fusionsproteins zeigen Nalm 6 Zellen keine Fluoreszenz. Das Resultat zeigt, daß durch diesen Versuchsansatz die Interaktion zwischen Zellen und dem 6.L1-Fc-Fusionsprotein experimentel untersucht werden kann. Der Assay wurde auch eingesetzt, um die funktionelle Integrität verschiedener Chargen des 6.L1-Fc-Fusionsproteins zu untersuchen.

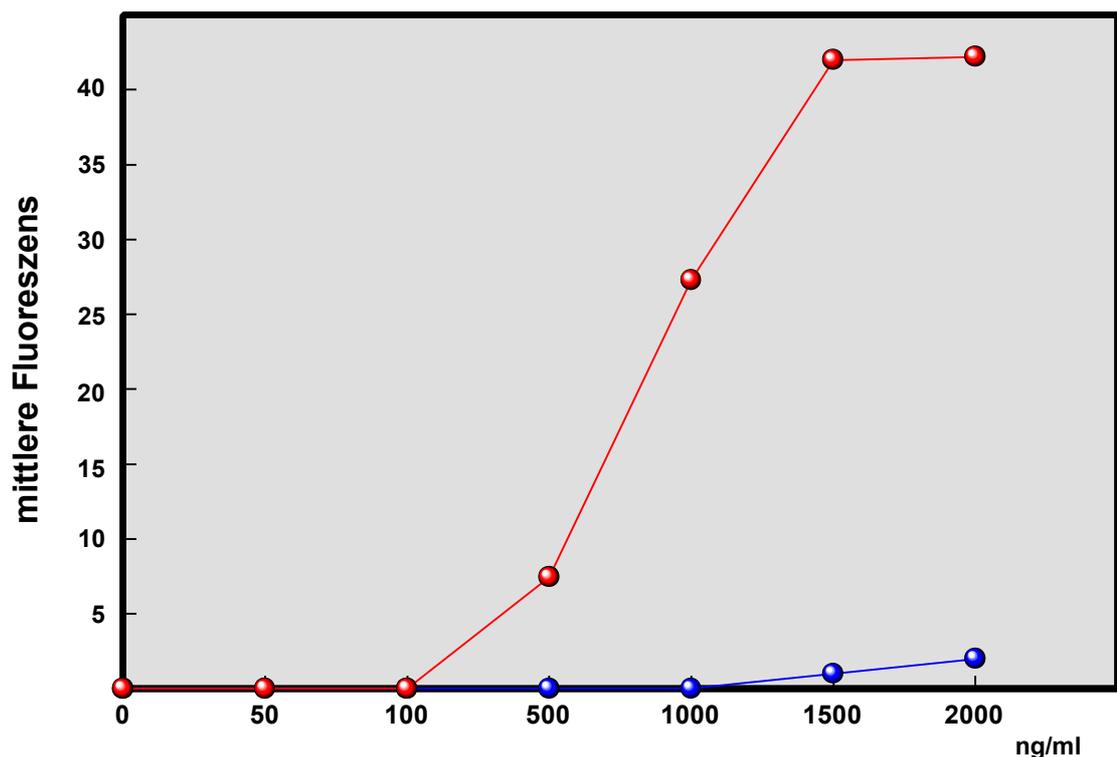


Abbildung 4-18: Bindung des 6.L1-Fc-Fusionsproteins an Tumorzellen ; MED-B1 ($\alpha V\beta 3$ -positiv) und Nalm 6 Zellen ($\alpha V\beta 3$ -negativ) wurden in steigender Konzentration (x-Achse) mit dem 6.L1-Fc-Fusionsprotein inkubiert, um die Sättigungskonzentration zu ermitteln. Der Grad der Bindung ist an der y-Achse abzulesen (blaue Linie: Nalm 6, rote Linie: MED-B1)

Die Beobachtung, daß nur αV -Integrin exprimierenden Zellen (MED-B1) aber nicht Nalm 6 Zellen mit dem Fusionsprotein interagieren, weist darauf hin, daß

die Bindung des 6.L1-Fc-Fusionsproteins über diese Integrine vermittelt werden könnte.

Wie schon erwähnt, ist die Bindung von Liganden an Integrine abhängig von verschiedenen zweiwertigen Ionen. Daher wurde diese Fusionsproteinbindung differentiell unter verschiedenen Bedingungen mit den Zelllinien *ALAB* und *HUVEC* durchgeführt. Dem Inkubationspuffer wurden Manganionen oder Kalzium- und Magnesiumionen zugegeben. In einem dritten Ansatz wurde die Färbung ohne Anwesenheit dieser Ionen durchgeführt.

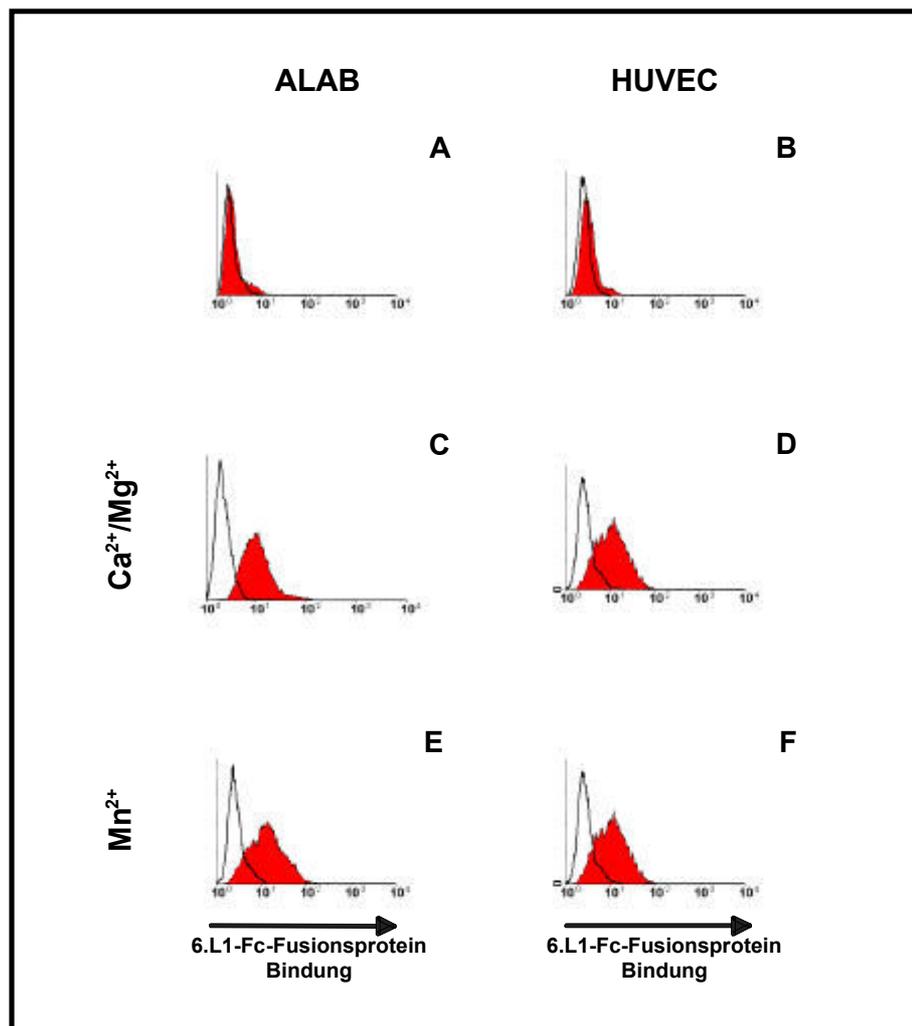


Abbildung 4-19: Bindung des 6.L1-Fc-Fusionsprotein an HUVEC und ALAB; In verschiedenen Ansätzen wurden Zellen mit dem 6.L1-Fc-Fusionsprotein inkubiert und die Bindung mittels eines zweiten FITC-markierten Antikörpers gemessen. Dem Inkubationsmedium wurden entweder Kalzium- und Magnesiumionen (2mM) oder Manganionen (0,5mM) zugesetzt. In A und B wurden überhaupt keine zweiwertigen Ionen zugegeben. Als Neagtivkontrolle wurden die Zellen nur mit dem FITC-markierten Zweitantikörper inkubiert. rote Kurve: L1-Fc-Konstrukt, ungefärbte Kurve: Negativ-Kontrolle mit irrelevanten Konstrukt

Das Ergebnis dieser Versuche zeigt die Voraussetzungen, die erfüllt sein müssen damit das 6.L1-Fc-Fusionsprotein an die α V-Integrin exprimierenden Zel-

len binden kann (*Abbildung 4-19*). Wurden dem Inkubationsmedium keine Ionen zugesetzt konnte das Fusionsprotein nicht an die Zellen binden. Erst die Zugabe von Magnesium- und Kalziumionen ermöglichte eine Bindung an die Zellen. Alternativ zur Zugabe dieser Ionen kann auch eine Aktivierung der Zellen durch Manganionen eine 6.L1-Fc-Fusionsproteinbindung induzieren.

Um die Spezifität der Bindung weiter zu untersuchen, wurden Inhibitionsexperimente durchgeführt. Vor der Inkubation mit dem Fusionsprotein, wurden die Zellen mit einem monoklonalen Antikörper gegen humane αV -Integrine inkubiert (AMF7), um die Bindungsfähigkeit dieser Integrine auszuschalten. Nach dieser Inkubation wurden die Zellen mit dem 6.L1-Fc-Fusionsprotein gefärbt. Wie im methodische Teil dargestellt, wird das Konstrukt vorher mit einem FITC-konjugierten Zweitantikörper komplexiert. Um auszuschließen, daß in der durchflußzytometrischen Messung Kreuzreaktionen mit αV -spezifischen monoklonalen Antikörper gemessen werden, wurde Kontrollen durchgeführt. Der Antikörper HEA-125, ein epithelialer Marker, der sowohl an *HUVEC* als auch an *ALAB* bindet, wurde als Kontrolle eingesetzt. Die Abnahme der Färbung durch Blockierung mittels αV -spezifischer Antikörper wurde relativ zu dieser Färbung bewertet. Als Negativkontrolle wurde ein irrelevantes Fusionsprotein eingesetzt.

Es konnte gezeigt werden, daß durch die Präinkubation der Zellen mit einem αV -Integrin spezifischen Antikörper die Bindung des 6.L1-Fc-Fusionsproteins an *HUVEC* Zellen inhibiert werden kann (*Abbildung 4-20*). Dies gilt sowohl für eine Inkubation mit Kalzium- und Manganionen, als auch nach einer Stimulierung der Zellen durch Manganionen. Darüber hinaus konnten diese Daten bei Wiederholung der Versuche mit der Zelllinie *ALAB* ebenfalls beobachtet werden (*Abbildung 4-20*).

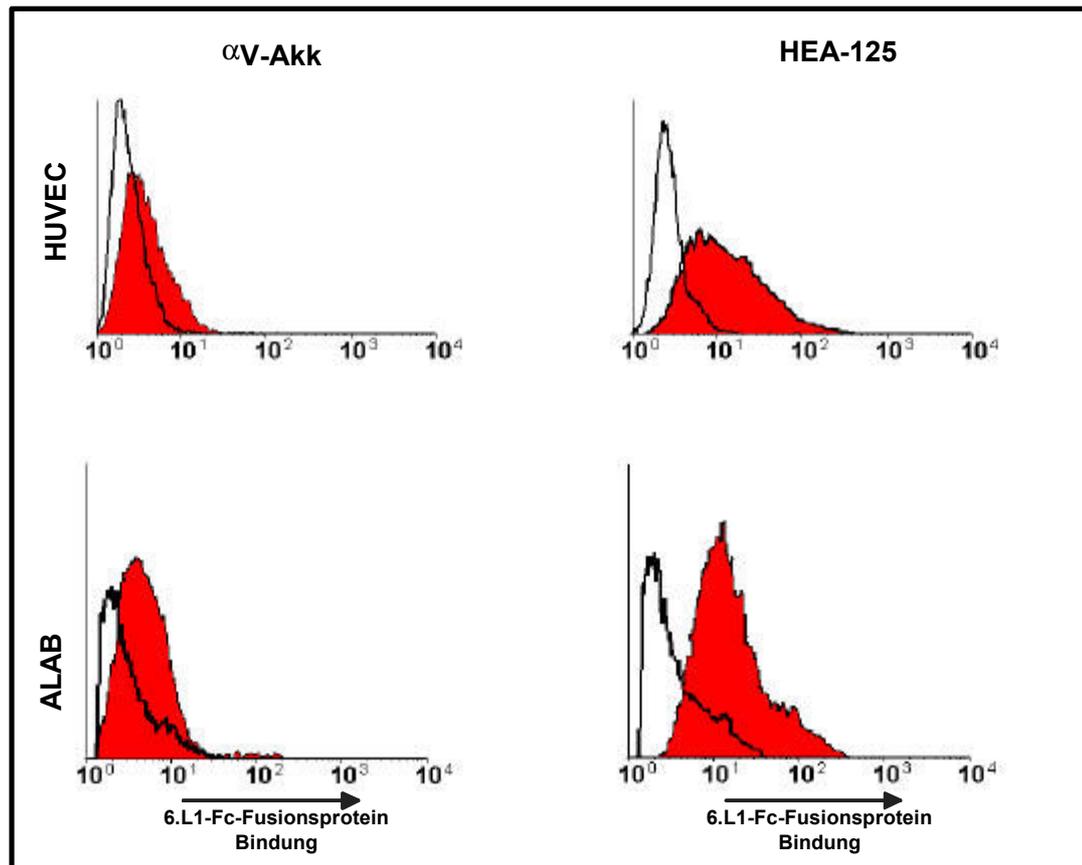


Abbildung 4-20: Inhibition der L1-Fc-Konstruktbindung durch Antikörper: Um die Spezifität der Fusionsproteinbindung an αV -Integrine zu untersuchen, wurden die Zellen vor der Inkubation mit dem 6.L1-Fc-Fusionsprotein mit einem Antikörper gegen die αV -Kette (10 μ g/ml) inkubiert (rote Kurve). Als Negativkontrolle fungierte der Antikörper HEA-125 (ungefärbte Kurve).

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß die αV -Integrin exprimierenden Zellen *HUVEC* und *ALAB* das 6.L1-Fc-Fusionsprotein binden können. Diese Bindung erfolgt nur bei Inkubationsbedingungen, die typisch für eine Integrinbindung sind: in Gegenwart von Kalzium- und Magnesiumionen bzw. durch Integrinaktivierung durch Manganionen. Diese Bindung ist spezifisch durch αV -spezifische Antikörper reduzierbar.

4.3 Untersuchungen zum Migrationsverhalten von αV -Integrin exprimierenden Zellen

Nachdem die obigen Experimente die inhaltliche und experimentelle Grundlage geschaffen hatten, konnte der funktionellen Fragestellung nachgegangen werden. In den folgenden Experimenten galt es zu untersuchen, inwieweit das L1 Molekül bzw. αV -Integrine eine Zellmigration vermitteln können. Ferner wurde

untersucht, welche strukturellen Komponenten kritisch für diese Migration sind und letztlich, ob die Migration naiver T-Zellen unter bestimmten Bedingungen durch diese Moleküle vermittelt wird.

Aufgrund der im vorhergerigem Abschnitt dargestellten Ergebnisse wurden MED-B1 und Nalm 6 herangezogen, um die Funktion von $\alpha V\beta 3$ bei der Vermittlung der Zellmigration zu untersuchen. Insbesondere sollte dabei die Funktion der die RGD-Sequenz enthaltenden Domäne des humanen L1 Moleküles als Substrat untersucht werden. Im Einleitungsteil wurde besprochen, daß die Migration einer Zelle auf einen Substrat eine ganz bestimmte Bindungsstärke voraussetzt, die nicht so stark sein darf, daß eine starke Adhäsion jegliche Migration verhindert, die aber auch nicht so schwach ausgebildet werden darf, daß die Zellen nicht mit dem Substrat interagieren können. Im experimentellen Modell wird die Bindungsstärke auch durch die Konzentration des Substrates reguliert. Daher wurde bei allen Migrationsexperimenten in Vorversuchen die optimale Substratkonzentration ermittelt. In Fällen, in denen keine Migration nachgewiesen werden konnte, bedeutet dies, daß die Zellen dieses Verhalten weder bei höheren noch bei niedrigeren Konzentration als in der Graphik angegeben zeigten.

4.3.1 Migration der Tumorzellen auf Vitronektin

Um die Funktionalität des hier gewählten Migrationsassays zu überprüfen, wurde zunächst das Migrationsverhalten von Nalm 6 und MED-B1 auf Vitronektin als Substrat untersucht. Das Integrin $\alpha V\beta 3$ ist ein Ligand für Vitronektin und es ist bekannt, daß die Interaktion zwischen beiden Molekülen bei Melanomzellen Zellmigration induzieren kann [Bauer1992, Wayner1991].

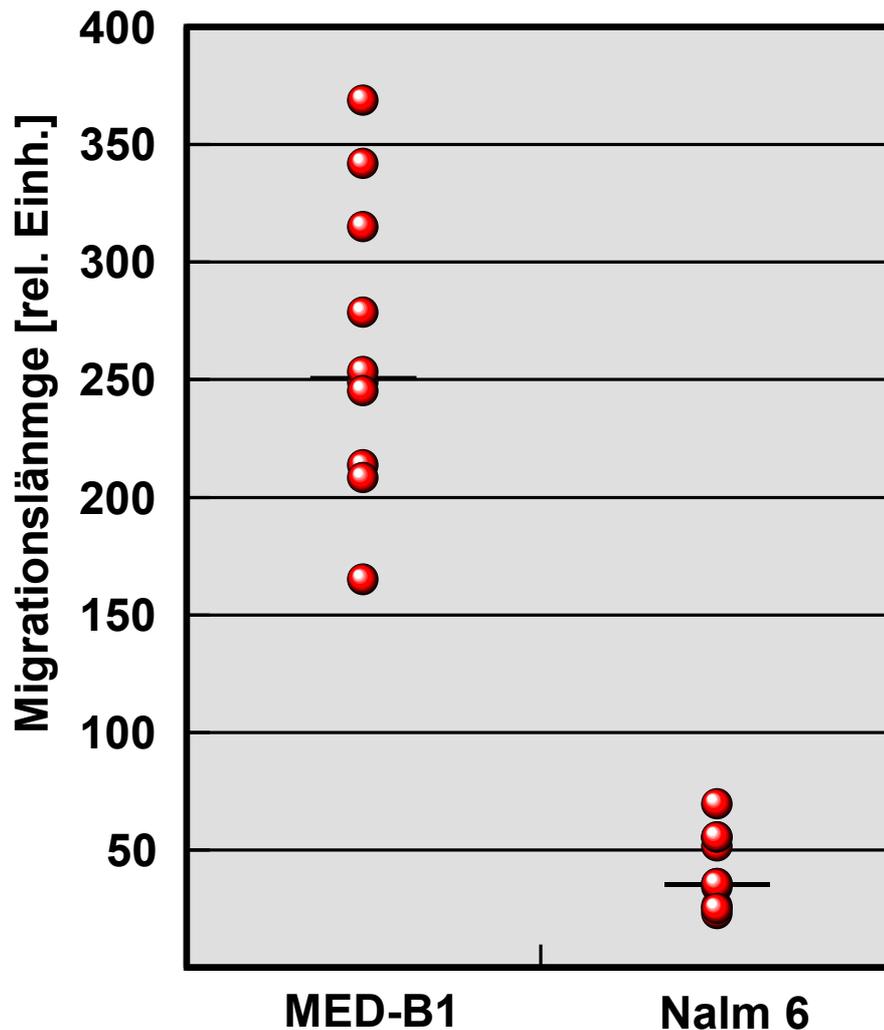


Abbildung 4-21: Migration von Nalm 6 und MED-B1 auf Vitronektin (Streckenmessung): Hier wird die von den Zellen innerhalb von zwei Stunden zurückgelegte Wegstrecke dargestellt. Die Objektträger wurden über Nacht mit Vitronektin beschichtet (10µg/ml). Der Zelldurchmesser beider Zelllinien beträgt ca. 10 rel. Einheiten.

Die Auswertung von zehn repräsentativen Zellen über einen Zeitraum von zwei Stunden ergab, daß Zellen der Linie MED-B1 innerhalb dieses Zeitraumes eine Strecke zurücklegen, die bis zu zwanzig Mal größer ist als ihr eigener Zelldurchmesser (*Abbildung 4-21*). Die Auswertung des Experimentes ergab, daß nicht alle MED-B1 Zellen migrieren. Reproduzierbar migrierten etwa 30 bis 40% der Zellen. Die für $\alpha V\beta 3$ negativen Zellen Nalm 6 zeigen demgegenüber kein Wanderungsverhalten.

Noch deutlicher wird dieses unterschiedliche Migrationsverhalten der Zellen, wenn man die tatsächlich zurückgelegten Wege innerhalb eines festgelegten Areal visualisiert (*Abbildung 4-22*).

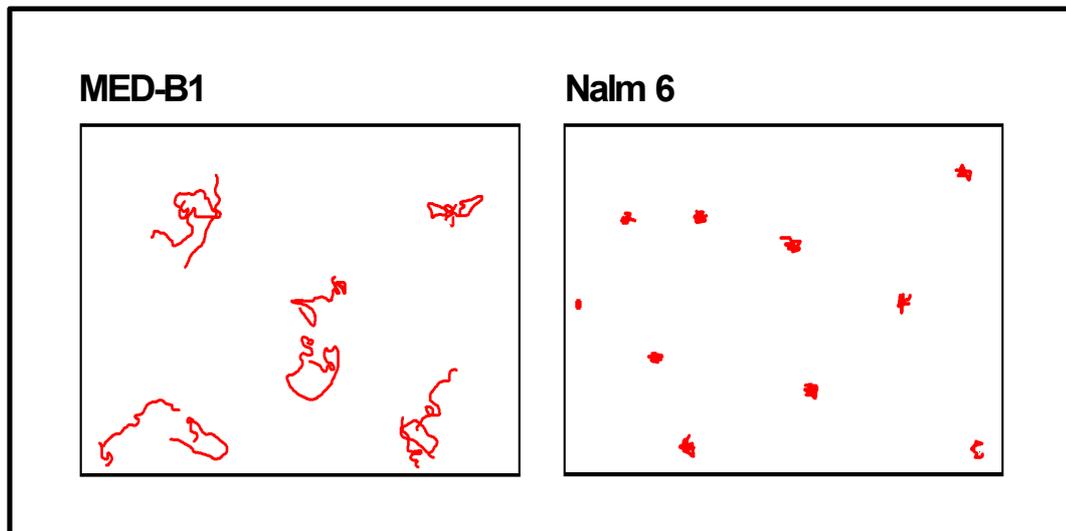


Abbildung 4-22: Migration von Nalm 6 und MED-B1 auf Vitronektin (Wegdiagramm): Diese Abbildung zeigt die Wanderungen der Zellen in einer zweidimensionalen Darstellung. Während die Nalm 6 Zellen auf einem Punkt fixiert bleiben, wandern die MED-B1 Zellen auf Vitronektin ungerichtet über das Substrat

Während die MED-B1 Zellen ungerichtet auf dem Substrat migrieren, verbleiben die Nalm 6 Zellen am selben Ort liegen und rotieren lediglich um ihre eigenen Achse.

4.3.2 Migration der Tumorzellen auf Fibronektin

Die Integrine $\alpha 4\beta 1$ und $\alpha 5\beta 1$ vermitteln die Migration von Thymozyten auf Fibronektin. Die RGD-Sequenz des Fibronektins wird dabei von $\alpha 5\beta 1$ erkannt, wogegen das Integrin $\alpha 4\beta 1$ mit der in der CS-1 Region enthaltenen LDV-Sequenz interagiert. Um zu untersuchen, ob die Migration von Zellen auch durch die Interaktion von $\alpha V\beta 3$ -Integrinen mit Fibronektin induziert werden kann, wurde der gekammerten Objektträger mit Fibronektin (20 μ g/ml) beschichtet und die Migration von MED-B1 Zellen gemessen.

Wie bei der Verwendung von Vitronektin als Substrat zeigen die MED-B1 Zellen Migration auf humanen Fibronektin (Abbildung 4-23). Die Migrationsrichtung dieser Zellen ist wie bei den vorherigen Experimenten zufällig und nicht gerichtet.

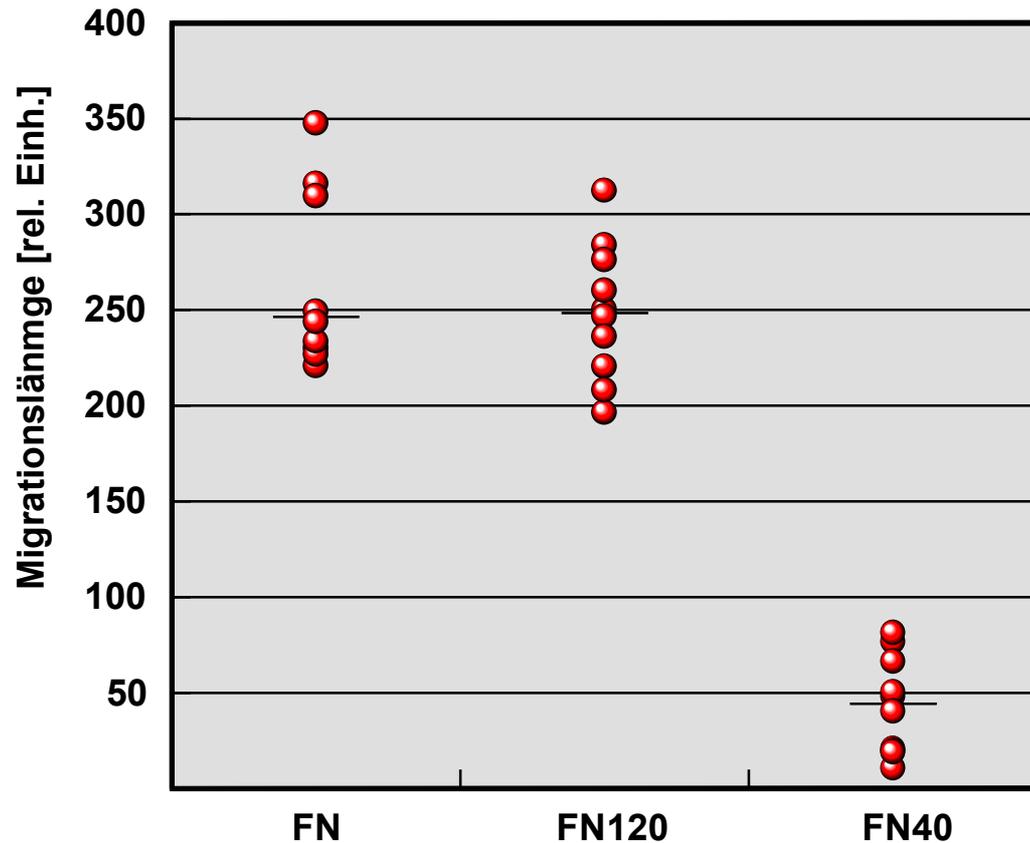


Abbildung 4-23: Migration von MED-B1 auf Fibronectin (Streckenmessung): Um zu untersuchen, ob $\alpha V\beta 3$ auch die Migration von Zellen auf Fibronectin vermittelt, wurden Migrationsexperimente mit diesem Matrixprotein durchgeführt, das in einer Konzentration von $20\mu\text{g/ml}$ auf die Objektträger geschichtet wurde. In der gleichen Konzentration wurden Objektträger in einem zweiten Ansatz mit dem Fibronectinfragment FN120 inkubiert, das nur die RGD-Sequenz enthält. Das Fragment FN40 enthält dagegen nur die LDV-Sequenz und wurde in einer Konzentration von $40\mu\text{g/ml}$ beschichtet.

Wie erwähnt, wird bei der Migration von Thymozyten und embryonalen Zellen auf Fibronectin diskutiert, ob die Integrininteraktion mit der RGD-Sequenz oder mit der LDV-Sequenz die entscheidende Rolle spielt. Möglicherweise ist aber auch ein Zusammenspiel mehrerer Integrine bzw. mehrerer Fibronectinregionen nötig, um eine Zellmigration zu induzieren. Um die Frage zu beantworten, ob die Bindung des $\alpha V\beta 3$ -Integrins an die RGD oder ob die LDV-Sequenz die entscheidende Rolle spielt, wurde die Objektträger mit zwei verschiedenen Fibronectinfragmenten beschichtet. Das erste, sog. FN120 Fragment enthält die RGD-Sequenz, aber nicht die die LDV-Sequenz. Das FN40 Fragment weist demgegenüber keine RGD-Sequenz, aber die LDV-Sequenz auf. Das Migrationsverhalten der MED-B1 Zellen auf diesen Fragmenten ist ebenfalls in *Abbildung 4-23* dargestellt. Die Migrationsfähigkeit

der MED-B1 Zellen ist auf dem FN120 Fragment genauso groß wie auf dem gesamten Fibronectinmolekül. Wird allerdings das FN40 Fragment als Substrat für die Migration verwendet, geht die Beweglichkeit der Zellen auf diesem Substrat vollkommen zurück. Die in *Abbildung 4-23* dargestellte Weglänge ergibt sich aus rotierenden Bewegungen des Zellkörpers. Dies wird in *Abbildung 4-24* deutlich.

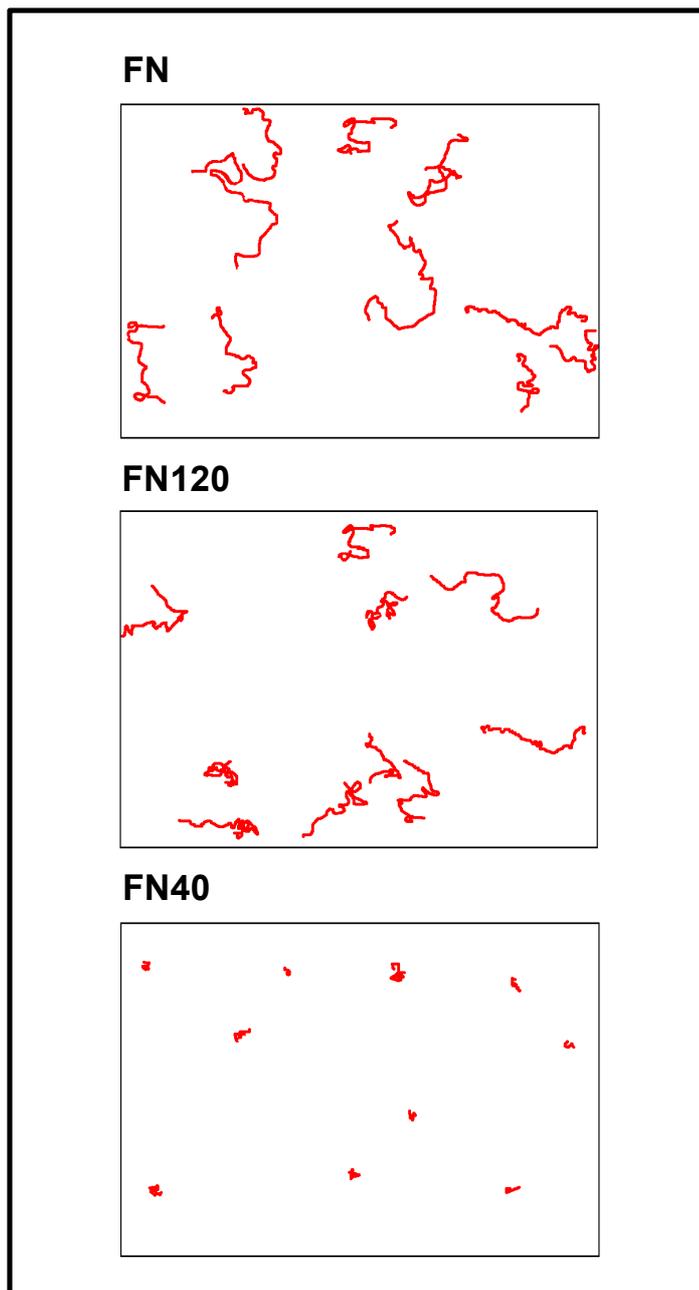


Abbildung 4-24 Migration von MED-B1 auf Fibronectin (Wegdiagramm): Während die Zellen auf dem FN40 Fragment fixiert bleiben, kommt es auf den die RGD-Sequenz enthaltenen Fibronectinmolekül und dem FN120 Fragment zu einer eindeutigen, ungerichteten Bewegung der Zellen.

4.3.3 Migration der Tumorzellen auf dem 6.L1-Fc-Fusionsprotein

Die beiden vorherigen Versuchsansätze haben gezeigt, daß der hier etablierte Migrationsassay funktionfähig ist und daß der RGD-Sequenz des Substratmoleküles eine entscheidende Bedeutung bei der Induzierung der Migration von MED-B1 Zellen zukommt. Wie erwähnt, verfügt das Adhäsionsmolekül L1 in der sechsten Domäne ebenfalls über diese RGD-Sequenz. Um zu untersuchen, ob diese sechste Domäne eine $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ -vermittelte Zellmigration induzieren kann, wurde das 6.L1-Fc-Fusionsprotein in den nächsten Versuchen als Substrat verwendet.

Nachdem die MED-B1 Zellen zwei Stunden auf dem L1-Fc-Konstrukt (10 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert wurden und die Migrationwege ausgewertet worden waren, ergaben sich für zehn repräsentativ ausgewählte Zellen die in *Abbildung 4-25* dargestellten Migrationsstrecken. Wie bei der Migration auf Vitronektin und Fibronektin zeigen die MED-B1 Zellen ein relativ gutes Migrationverhalten. Zellen der Linie Nalm 6 verharren dagegen mehr oder weniger stark an einen Ort.

Um die wichtige Funktion des $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ -Integrins bei der Vermittlung der Migrations noch weiter zu untermauern, wurde in einem weiteren Experiment die Funktionalität dieses Integrins durch einen monoklonalen Antikörper gegen dieses Integrin ausgeschaltet. Der Antikörper (LM609), der das Gesamtintegrin $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ erkennt, blockiert die Bindung an die RGD-Sequenz des Trägermoleküls. Dazu wurden die Zellen zwanzig Minuten mit diesem Antikörper vorinkubiert, bevor sie auf die Objektträger gegeben wurden. Um eine unspezifische Blockierung der Migrationseigenschaften durch die bloße Bindung des Antikörpers an die Zellen zu erkennen, wurden in einem Parallelexperiment MED-B1 Zellen mit einem irrelevanten Antikörper (anti-HLA Antikörper, WG/32) in der gleichen Konzentration inkubiert, der ebenfalls an die Zellen bindet.

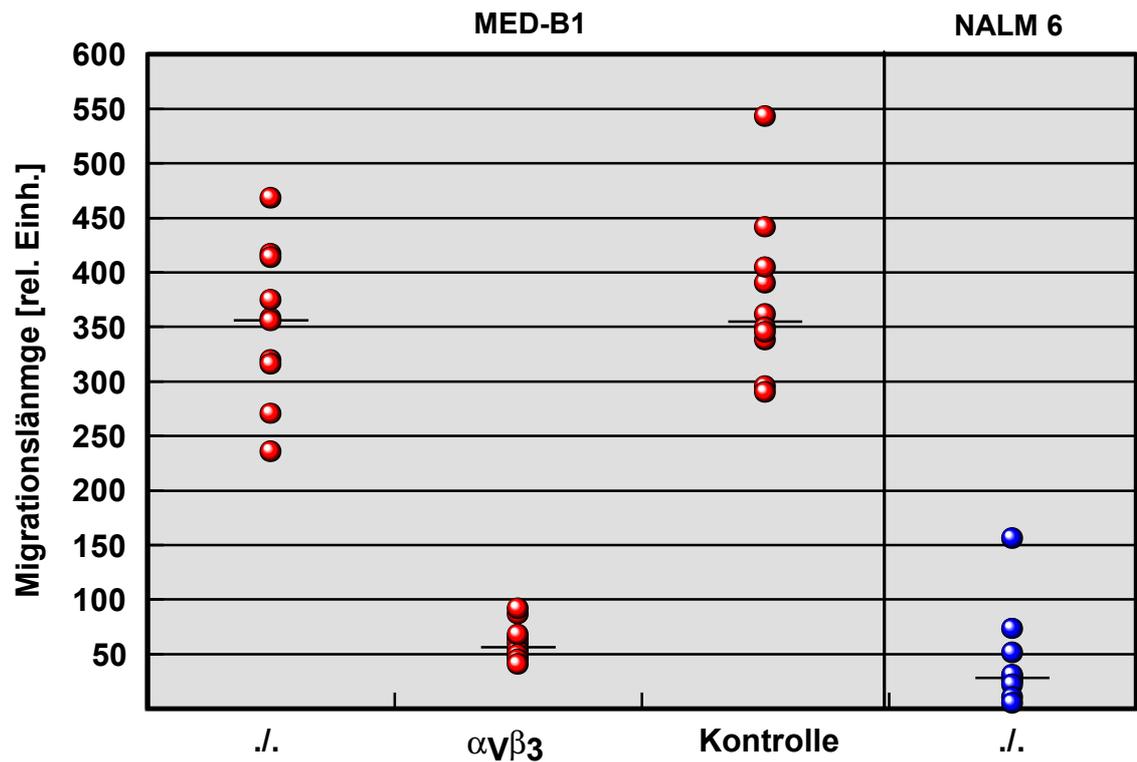


Abbildung 4-25: Migration von Nalm 6 und MED-B1 auf dem L1-Fc-Konstrukt (Streckenmessung): Die Graphik zeigt die zurückgelegten Wegstrecken der MED-B1 Zellen (rot) auf dem 6.L1-Fc-Fusionsprotein, wobei die Zellen vorher entweder ohne oder mit verschiedenen Antikörper präinkubiert worden sind (siehe Beschriftung an der x-Achse) Die Konzentration der eingesetzten Antikörper betrug 20 μ g/ml. Zum Vergleich wurde als Kontrolle die Migration von Nalm 6 Zellen (blau) auf dem 6.L1-Fc-Fusionsprotein ./.'kein Antikörper; $\alpha V\beta 3$ -Akk; Kontrolle anti-HLA-Akk

Abbildung 4-25 zeigt deutlich eine Abnahme der zurückgelegten Migrationsstrecke, nachdem die Zellen zuvor mit einem $\alpha V\beta 3$ -Antikörper inkubiert worden sind. Die Zellen aus dem Versuchsansatz mit dem irrelevanten Antikörper sind dagegen in ihrer Migrationsfähigkeit nicht beeinträchtigt.

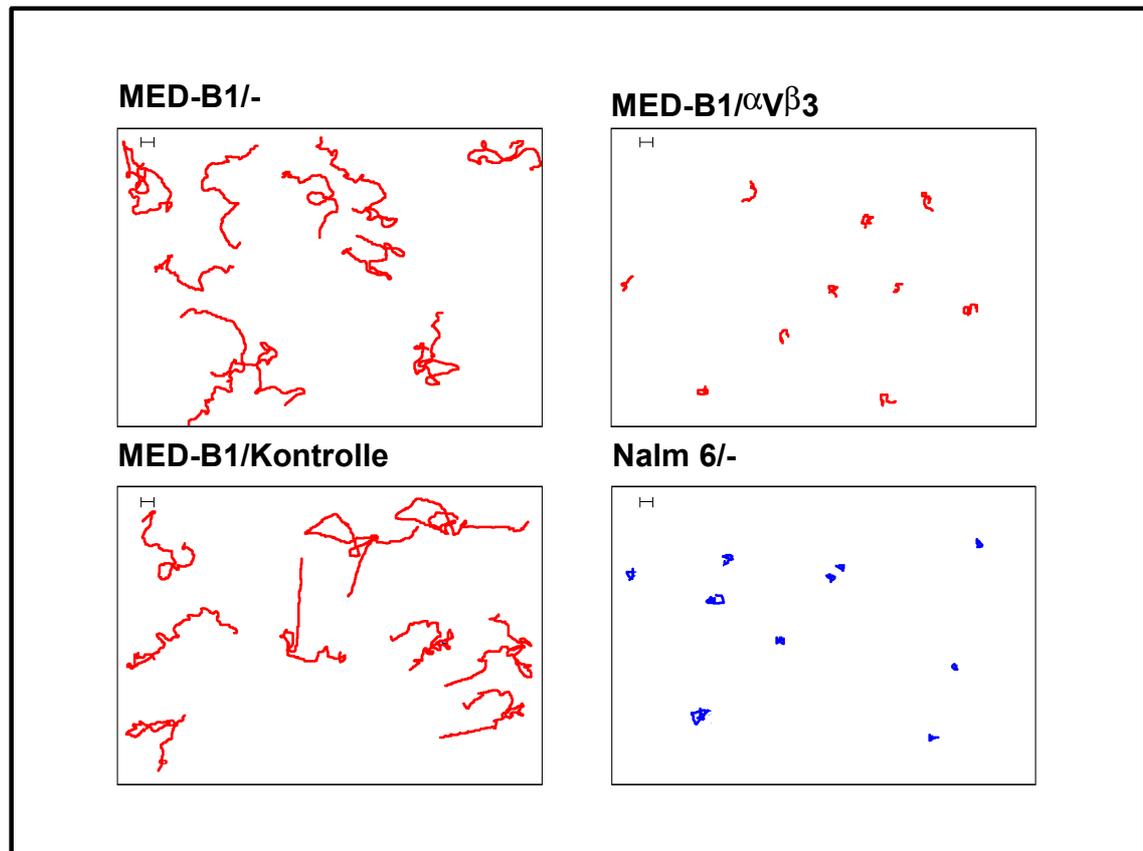


Abbildung 4-26 Migration von MED-B1 auf dem L1-Fc-Konstrukt (Wegdiagramm): Hier wird die zurückgelegte Wegstrecke der Zellen MED-B1 (rot) und Nalm 6 (blau) auf dem 6.L1-Fc-Fusionsprotein gezeigt

Die *Abbildung 4-26* verdeutlicht noch einmal den Einfluß des $\alpha V\beta 3$ -Antikörpers auf das Migrationsverhalten, indem wieder die lokalen Veränderungen der Zellen über einen Zeitraum zweidimensional dargestellt worden sind.

4.3.4 Migration der Tumorzellen auf Kontrollfusions-proteinen

Wenn die hier beobachtete Migration auf der Interaktion zwischen dem $\alpha V\beta 3$ -Integrin und der RGD-Sequenz des Substratmoleküles beruht, sollte die Migration auch unterbunden werden, wenn diese Aminosäuresequenz ausgeschaltet würde. Um dies zu untersuchen, wurden zwei weitere Fusionsproteine als Substrat für den Migrationsassay mit MED-B1 Zellen verwendet. Zunächst wurden die Objekträger mit einem P-Selektin-Fc-Fusionsprotein beschichtet. Dieses P-Selektin-Fc-Fusionsprotein bindet MED-B1 Zellen (*Abbildung 4-17*), verfügt aber selbst nicht über eine RGD-Sequenz. Dieses Fusionsprotein stellt auch gleichzeitig eine Kontrolle für den Fc-Anteil dar. Außerdem wurde ein Fusionsprotein (mut-6.-L1-Fc-Fusionsprotein) verwendet, das mit dem vorher

verwendet Fusionsprotein identisch ist, jedoch Mutationen an den Aminosäurepositionen 554 und 575 aufwies. Durch diese selektive Mutation und den dadurch verursachten Verlust der Aminosäure Arginin wies dieses Fusionsprotein weder die RGD-Sequenz, noch die DGR-Sequenz auf.

Die in diesem Versuchsansatz erzielten Resultate (*Abbildung 4-27*) stehen in vollem Konsens zu den vorherrigen Experimenten. Die MED-B1 Zellen können weder auf dem P-Selektin-Fc-Fusionsprotein, noch auf dem mutierten mut-6.L1-Fc-Fusionsprotein migrieren.

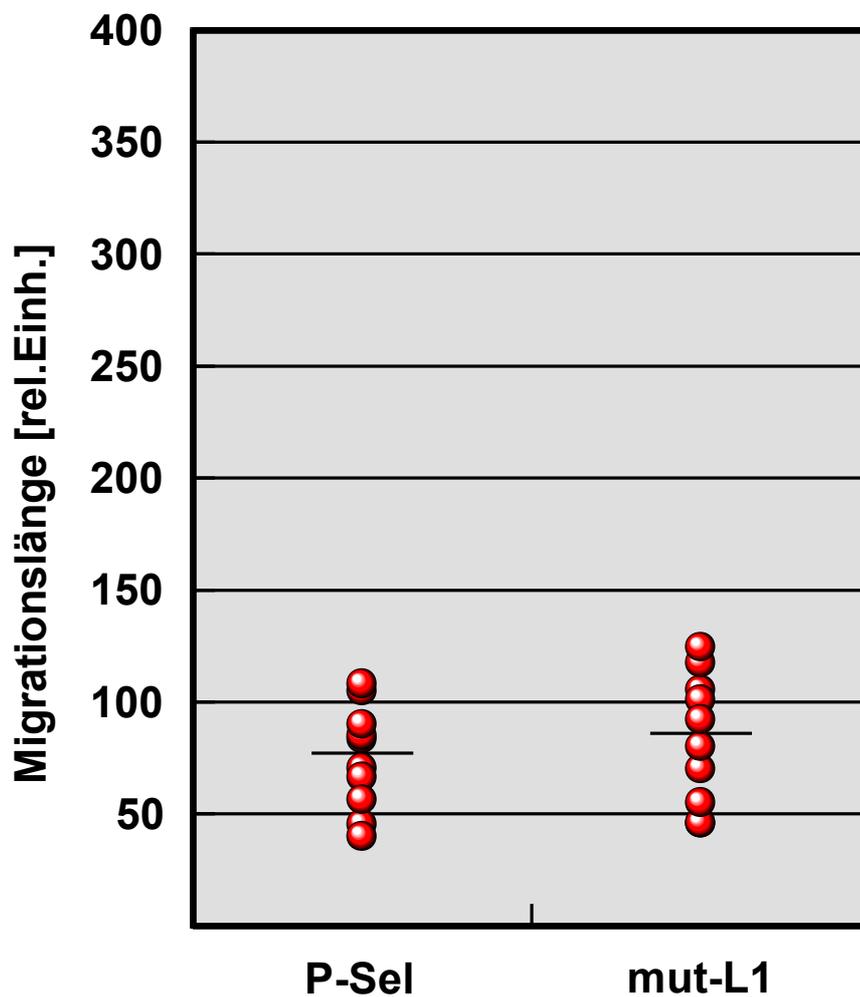


Abbildung 4-27: Migration von MED-B1 auf Kontrollkonstrukten (Streckenmessung): Das Migrationsverhalten der Tumorzellen wurde auf zwei Kontrollkonstrukten untersucht; Da beiden Fusionsproteinen die RGD-Sequenz fehlt, sollte keine oder nur eine minimale Migration zu beobachten sein. Die Beschichtung der Objektträger erfolgte in einer Konzentration von 20µg/ml.

Der Verlust der RGD-Sequenz führt zu einer vollständigen Einbuße der Mobilität. *Abbildung 4-28* zeigt, daß die Zellen praktisch nicht den ursprünglichen Ort verlassen.

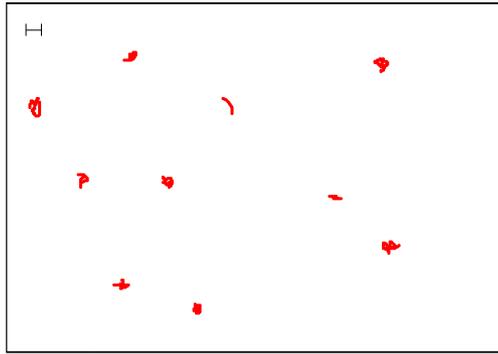
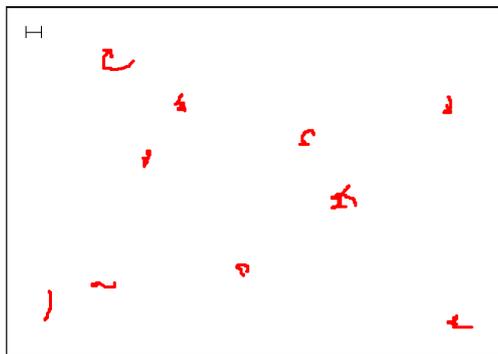
mut-L1**P-Selektin**

Abbildung 4-28: Migratin von MED-B1 auf Kontrollkonstrukten: (Wegdiagramm): Das Wegdiagramm zeigt noch einmal, daß die in Abbildung 4-27 gezeigten Strecken auf Bewegungen um die eigene Achse der Zellen beruhen und sich diese nicht oder nur kaum im Raum bewegen

4.3.5 Migration von aktivierten T-Zellen auf L1-Fc-Konstrukt

Zwei aus den vorherigen Experimenten resultierende Ergebnisse waren Anlaß für weitere Migrationsuntersuchungen. Es konnte gezeigt werden, daß bei Tumorzellen die Interaktion zwischen $\alpha\text{V}\beta 3$ -Integrinen und der sechsten Domäne des humanen L1 Moleküles die Zellmigration induziert. Außerdem wurde nachgewiesen, daß naive periphere T-Zellen unter bestimmten Umständen in der Lage sind $\alpha\text{V}\beta 3$ - und $\alpha\text{V}\beta 5$ Integrine auf ihrer Oberfläche zu exprimieren. Aus diesem Grund wurde nun untersucht, ob auch T-Zellen in der Lage sind, unter Vermittlung des $\alpha\text{V}\beta 3$ -Integrins auf dem 6.L1-Fc-Fusionsprotein zu migrieren.

Für die nächsten Experimente wurden humane T-Zellen isoliert. Diese wurden anschließend in Kultur gehalten und mit PHA (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) oder mit einer Kombination aus PHA (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und PMA (100ng/ml) stimuliert. Nach Abtrennung der

Blasten über einen Percoll-Gradienten, wurden diese aktivierten T-Zellen in Migrationsexperimenten eingesetzt.

Wie bereits oben gezeigt, exprimieren T-Zellen, die mit einer Kombination aus PMA und PHA stimuliert worden sind, sowohl das $\alpha V\beta 3$ - als auch das $\alpha V\beta 5$ -Integrin, wogegen T-Zellen, die nur mit PHA stimuliert worden sind, keines dieser Integrine exprimieren.

Abbildung 4-29 zeigt, daß ohne eine Expression von αV -Integrinen für T-Blasten keine Migration auf L1 als Substrat nachgewiesen werden kann. T-Zellen, die mit PHA und PMA stimuliert worden sind, legen in einem Zeitraum von zwei Stunden etwa das zwanzig- bis dreißigfache ihres Zelldurchmessers an Wegstrecke zurück. Sie sind damit -relativ zu ihrer Zellgröße- mobiler als die vorher untersuchten Tumorzelllinien. Die nur mit PHA stimulierten T-Blasten zeigen demgegenüber kaum Migrationsbewegungen. Allerdings ist auch hier die Grundbeweglichkeit höher als bei MED-B1 Zellen. Dies ist wieder im Wegdiagramm (*Abbildung 4-30*) gut zu erkennen.

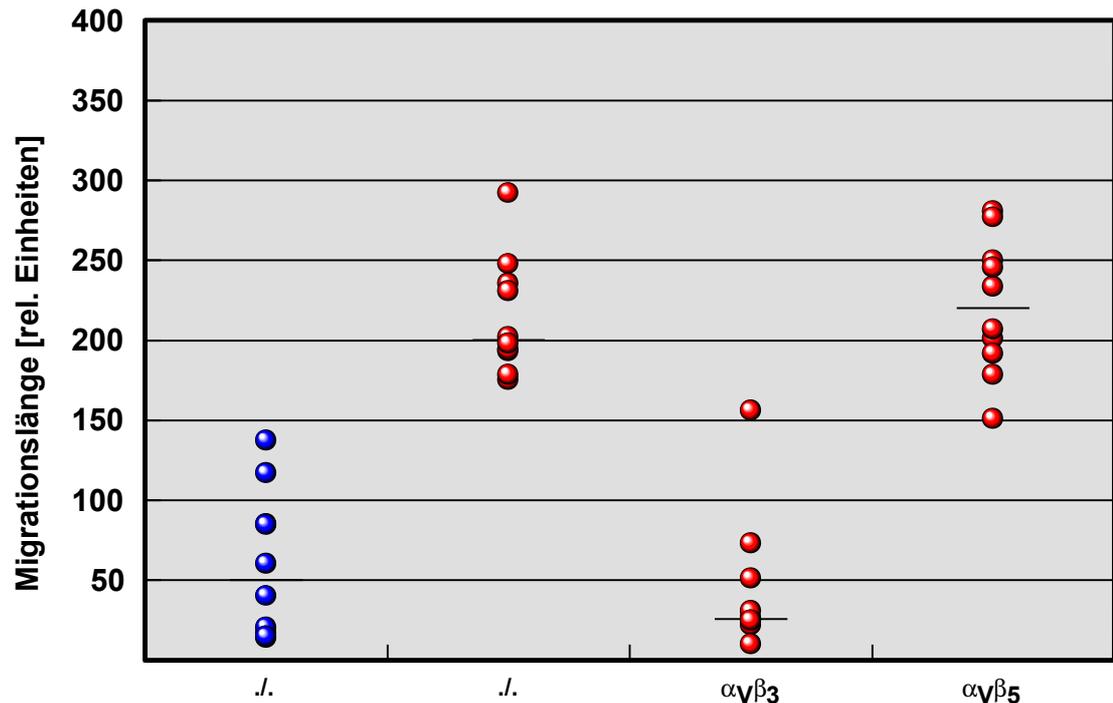


Abbildung 4-29: Migration von T-Blasten auf L1-Fc-Konstrukt (Streckenmessung): Nachdem Tumorzellen auf ihr Migrationsverhalten hin untersucht worden sind, wurde die Migration von nativen T-Zellen untersucht. T-Zellen, die keine αV -Integrine exprimieren (blaue Kreise) zeigen kein Wanderungsverhalten, wogegen αV -Integrin exprimierende Zellen (Inkubation mit PMA und PHA) deutlich mobil sind. Eine Präinkubation dieser Zellen mit einem spezifischen $\alpha V\beta 3$ -Antikörper reduziert deutlich diese Mobilität, wogegen ein Antikörper gegen $\alpha V\beta 5$ keinen hemmenden Effekt zeigt. Beide Antikörper wurden in einer Konzentration von $20\mu\text{g/ml}$ eingesetzt. Die Beschriftung der x-Achse zeigt die jeweilige Verwendung des Antikörpers an.

Da die PHA/PMA aktivierten T-Zellen sowohl $\alpha V\beta 3$ als auch $\alpha V\beta 5$ exprimieren, ist nicht auszuschließen, daß neben dem $\alpha V\beta 3$ -Integrin auch das zweite αV -Integrin eine direkte Rolle bei der Migration spielt. Um dies näher zu untersuchen, wurden in zwei parallelen Versuchansätzen die T-Blasten, bevor der eigentliche Migrationsassay durchgeführt wurde, entweder mit einem Antikörper gegen $\alpha V\beta 3$ oder mit einem Antikörper gegen $\alpha V\beta 5$ (beide $20\mu\text{g/ml}$) inkubiert. Wie schon bei den Experimenten mit den Tumorzelllinien wird durch eine Präinkubation der Zellen mit einem $\alpha V\beta 3$ spezifischen Antikörper die Migrationsfähigkeit praktisch vollkommen herabgesetzt.

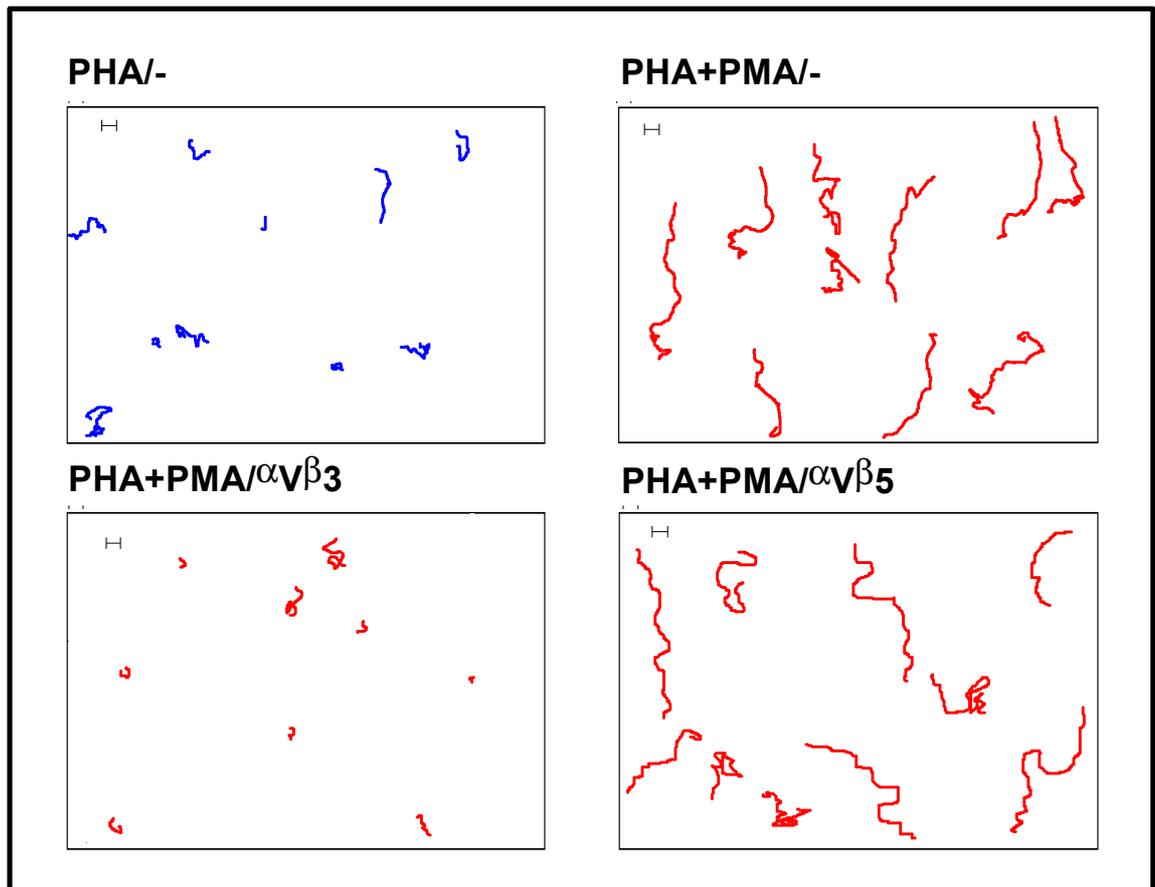


Abbildung 4-30: Migration von T-Blasten auf L1-Fc-Konstrukt (Wegdiagramm): Das Wegdiagramm zeigt deutlich in Ergänzung zur Abbildung 4-29, dass T-Blasten nur auf dem L1-Fc-Konstrukt migrieren können, wenn sie das $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ -Integrin exprimieren. Das Integrin $\alpha\text{V}\beta\text{5}$ spielt bei der Migration auf diesem Substrat keine Rolle – ein blockierender Antikörper gegen dieses Integrin inhibiert die Bewegung nicht.

Das Integrin $\alpha\text{V}\beta\text{5}$ scheint dagegen keine direkte Funktion bei der Vermittlung der Zellmigration von T-Zellen zu haben, da ein Antikörper gegen dieses Integrin keinerlei negativen Einfluß auf die Migrationsfähigkeit der T-Zellen hat (Abbildung 4-30).

5 Diskussion

In immunologischer Hinsicht spielt die Migration von Zellen mindestens in zwei wichtigen Prozessen eine entscheidende Rolle. Bei der Extravasation von Leukozyten aus den Gefäßen in die darunter liegenden Gewebe wandern die Immunzellen auf dem Endothel zu den Verbindungsstellen zwischen zwei Endothelzellen, um dort die Gefäßwand zu durchdringen. Die Fähigkeit zur Migration stellt hier also einen Schlüsselschritt dar, um die immunologische Funktionalität in einem Organismus zu gewährleisten [Picker1992, Picker1993, Butcher1996].

Außerdem müssen Immunzellen, nachdem sie die endotheliale Barriere durchdrungen haben, an ihren Effektorort gelangen. Dabei kann es sich um den Ort der terminalen Immunantwort handeln, wo das eindringende Pathogen bekämpft wird oder um bestimmte Kompartimente in immunologischen Geweben, in denen ein Differenzierungs- oder Selektionsprozeß erfolgen muß. Im Gegensatz zur Migration auf Endothelzellen, die durch einen Zell-Zell-Kontakt geprägt ist, spielt hier die Interaktion zwischen Immunzellen und extrazellulärer Matrix die entscheidende Rolle. Beiden Migrationsformen ist aber letztlich gemein, daß eine Wechselwirkung zwischen spezifischen Molekülen diese Vorgänge induziert und steuert [Butcher1991].

Ein charakteristisches Kennzeichen biologischer Prozesse ist deren komplexe und differenzierte Regulierbarkeit, die sich auf molekularer Ebene durch ein vernetztes Zusammenspiel zellständiger Moleküle bzw. löslicher Mediatoren widerspiegelt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Experimente durchgeführt, deren Ziel es war, Informationen darüber zu gewinnen, inwieweit die Adhäsionsmoleküle L1 und $\alpha V\beta 3$ -Integrin am Prozeß der Migration beteiligt sind. Basis für diese Experimente waren zunächst Untersuchungen, die die Expression dieser Moleküle auf Zellen des Immunsystems untersuchten. Diese Untersuchungen wurden dann auf Endothelzellen ausgedehnt. Diese werden zwar nicht direkt dem Immunsystem zugeordnet, die Interaktion zwischen Endothelzellen und Lymphozyten spielt aber -wie im Einleitungsteil ausführlich geschildert- eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der immunologischen Funktionalität

5.1 Expression des humanen L1 Moleküles

Die durchflußzytometrischen Untersuchungen peripherer, zirkulierender Lymphozyten auf ihre L1 Expression unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers UJ127 haben ein differenziertes Bild geschaffen. Auf der Oberfläche von Granulozyten konnte kein L1 nachgewiesen werden, wogegen bei zirkulierenden B-Zellen zumindest eine schwache Expression nachweisbar war. Im Vergleich dazu kommt es bei ca. fünfzig Prozent der peripheren T-Zellen zu einer starken L1 Expression. Eine Differenzierung dieser T-Zellen in zytotoxische T-Zellen und T-Helferzellen ergab weiterhin, daß nur die T-Helferzellen dieses Adhäsionsmolekül exprimieren, wogegen zytotoxische T-Zellen nicht durch den L1 Antikörper angefärbt werden konnten.

Die Expression des L1 Adhäsionsmoleküles auf Zellen des Immunsystems ist nicht überraschend. Im murinen System konnte dieses Molekül schon nachgewiesen werden [Kowitz1992]. Dort wurde die Expression von L1 auf reifen T-Zellen und den meisten peripheren B-Zellen deektiert. Ebenso konnte L1 auf granulozytären Vorläuferzellen im Knochenmark gefunden werden. In der Maus exprimieren allerdings sowohl zytotoxische T-Zellen als auch T-Helferzellen das L1 Adhäsionsmolekül. Im murinen System konnte auch nachgewiesen, daß nach einer Stimulierung mit PMA bzw. durch Aktivierung der Zellen die Anfärbbarkeit mit einem Maus L1 spezifischen Antikörper geringer war [Hubbe1993], wogegen diese Aktivierung humaner Leukozyten mit PMA oder dem Tetanustoxoid keinen Effekt zeigt (Daten nicht gezeigt). Dieser Vergleich zeigt, daß bezüglich der L1 Expression artspezifische Unterschiede zwischen murinen und humanen Leukozyten existieren. Einschränkend muß allerdings erwähnt werden, daß in dieser Arbeit zirkulierende Leukozyten untersucht wurden, wogegen bei der Maus die Untersuchungen über die L1 Expression an Immunzellen durchgeführt wurden, die aus Organen (Milz, Lymphknoten, Knochenmark) entnommen worden sind. Es ist nicht vollkommen auszuschließen, daß diese verschiedenen Quellen der Leukozyten für die unterschiedlichen Ergebnisse verantwortlich sind. Bezüglich der L1 Expression auf humanen Immunzellen wäre daher der nächste Schritt die Isolierung von humanen Leukozyten aus dem Knochenmark bzw.

peripherer lymphoider Organe und deren Analyse, die im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden konnten.

In der Zwischenzeit ist eine weitere Arbeit publiziert worden, die sich mit der Expression des L1 Moleküles auf humanen Immunzellen beschäftigt [Pancook1997]. Unter Verwendung eines anderen monoklonalen Antikörpers (5G3), konnte das L1 Molekül sowohl auf peripheren Monozyten, als auch auf myeloischen Tumorzelllinien (U937, HL60 und THP-1) nachgewiesen. Im Gegensatz zu den hier durchgeführten Experimenten exprimieren aber nur etwa 2-3% der von Pancook untersuchten peripheren B-Zellen L1 und auf peripheren T-Zellen konnte dieses Antigen überhaupt nicht nachgewiesen werden. Im Augenblick steht eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse noch aus. Denkbar ist aber, daß monoklonale Antikörper mit unterschiedlichen Spezifitäten eingesetzt wurden. Möglicherweise liegen auch unterschiedlicher Splicevarianten des L1 Moleküls vor. Die Existenz solcher Varianten kann als gesichert angesehen werden [Reid1992, Jouet1995]. Der hier durchgeführte durchflußzytometrische Nachweis der L1 Expression auf peripheren B- und T-Zellen wird auch durch Befunde unterstützt, die die mRNA in beiden Zelltypen nachweisen [Jouet1995, Ebeling1996]

In weiteren Versuchen wurden HUVEC und die Zelllinie ALAB auf ihre L1 Expression hin untersucht, da diese Endothelzellen einen physiologischen, zellulären Interaktionspartner für Leukozyten darstellen. Sowohl die Analyse der messenger RNA als auch durchflußzytometrische Messungen der Zellen zeigten in beiden Fällen eine klare Expression des L1 Adhäsionsmoleküles. Frühere Untersuchungen zur L1 Expression auf murinen Gehirndotheliumzellen zeigten dagegen keine Expression auf diesen Zellen [Hubbe1993], so daß hier ebenfalls art- oder gewebsspezifische Unterschiede vorliegen könnten. Humane Endothelzellen stellen somit neben neuronalen Zellen, Immunzellen und proliferierenden Epithelzellen in intestinalen Krypten einen weiteren Zelltyp dar, auf dem die Expression des Adhäsionsmoleküls L1 nachgewiesen werden konnte.

Das L1 Adhäsionsmolekül konnte auch auf diversen humanen Karzinomen unterschiedlichen Ursprungs, wie z.B. Neuroblastomzellen, Melanomzellen und Retinoblastomzellen detektiert werden [Mujoo1986, Linnemann1989, Reid1992]. Aus diesem Grund wurde im weiteren auch untersucht, ob Tumorzellen, die sich von verschiedenen Immunzellen ableiten, ebenfalls das L1 Molekül exprimieren. Sowohl die T-Zellen (Molt3 und Jurkat), als auch die monozytären Zellen U937 und HL60 lassen sich mit dem monoklonalen Antikörper UJ127 anfärben. Allerdings exprimieren weder U266, noch MED-B1 (beides B-Zellen) L1 und nur auf Raji (Zellen eines Burkitt-Lymphomes) konnte eine schwache L1 Expression nachgewiesen werden. Die Tumorzellen spiegeln somit in der Tendenz die Situation der nativen Immunzellen wider.

Linnemann konnte zeigen, daß auf metastasierende Melanomzellen (K1735) das L1 Molekül exprimiert wird, wogegen Varianten dieser Zellen ohne eine L1 Expression nicht zur Metastasierung neigen [Linnemann1989]. Basierend auf diesem Ergebnis wurde postuliert, daß für diese Metastasierung L1 eine entscheidene Rolle spielt. Demgegenüber fanden Kowitz et al. eine genau umgekehrte Korrelation zwischen L1 Expression und Metastasierungspotential. Lymphomazellen, die eine starke L1 Expression zeigten, waren weniger metastasierend als Zellen des gleichen Types mit geringer L1 Expression [Kowitz1993]. Diese scheinbar widersprüchlichen Resultate zeigen prägnant, daß ein so komplexer Vorgang wie die Metastasierung mit Sicherheit nicht durch die Interaktion allein zweier Moleküle initiiert wird, sondern wohl eher das Ergebnis eines komplexen Zusammenwirkens verschiedener Molekülinteraktionen darstellt. Wenn L1 möglicherweise in solch einem pathologischen Prozeß eine entscheidene Rolle spielt, so erscheint es möglich und plausibel, daß unter normalen physiologischen Bedingungen lymphozytäres L1 für den Eintritt von Leukozyten in die Gewebe mit verantwortlich ist. Daß endotheliales $\alpha V\beta 3$ Integrin L1 zu binden vermag, unterstützt diese Annahme.

5.2 Integrinexpression auf humanen Zellen

Das zweite Adhäsionsmolekül, das im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde, war das Integrin $\alpha V\beta 3$. Die weite Expression dieses Integrins auf verschiedensten Zelltypen, sowie auf diversen Tumorzellen ist zweifelsfrei nachgewiesen worden (siehe Einleitungsteil). Die hier gefundene Expression dieses Adhäsionsmoleküles auf den Endothelzellen HUVEC steht somit in Konsenz zu vorangegangenen Studien [Cheresh1987]. Ebenso steht der Nachweis von $\alpha V\beta 3$ auf den Tumorzellen ALAB mit diesen Untersuchungen in Einklang.

Wesentlich unsicherer ist die Datenlage bezüglich der αV -Integrin Expression auf T-Zellen. Einige Untersuchungen haben gezeigt, daß weder $\alpha V\beta 3$ noch $\alpha V\beta 5$ auf peripheren T-Zellen expremiert wird [Maxfield1989, Takahashi1990]. Etwas weiter gehen in diesem Zusammenhang die von Huang durchgeführten Experimente [Huang1995]. Auch in diesen Untersuchungen kann auf der Oberfläche von frisch isolierten Lymphozyten keines dieser Integrine nachgewiesen werden; nach einer gleichzeitigen Aktivierung der isolierten T-Zellen mit PHA und PMA können aber beide Integrine detektiert werden. Demgegenüber stehen die von Gerber 1996 publizierten Ergebnisse [Gerber1996]. Mittels durchflußzytometrischer Messungen mit selbst hergestellten Antikörpern zeigte er, daß auf peripheren T-Zellen in der Maus - entgegen der bisher vorherrschenden Meinung- doch das $\alpha V\beta 3$ Integrin expremiert werden kann, wobei die untersuchten T-Zellen dem Thymus, der Milz bzw. dem Knochenmark entstammten.

In dieser Arbeit wurden zirkulierende, periphere T-Zellen auf ihre αV -Integriexpression hin untersucht. Die durchflußzytometrische Analyse fand keine Expression auf diesen Zellen; erst nach Aktivierung durch PMA und PHA wurden die αV -Integrine nachgewiesen. Die Induktion der αV -Expression durch die mitogenen bzw. aktivierenden Agenzien PMA und PHA impliziert die Regulierbarkeit dieser Expression unter spezifischen Umgebungsbedingungen. Möglicherweise spielen hier lösliche Mediatoren eine Rolle. Die oben erwähnte Tatsache, daß diese Integrine eventuell auch auf T-Zellen in der Milz nachgewiesen werden können, läßt es möglich erscheinen, daß der Kontakt mit

einem Antigen ein Stimulus für die α V-Integrin Expression darstellt. Um dies zu untersuchen, wurden isolierte periphere T-Zellen mit dem Tetanustoxoid inkubiert. Die anschließende durchflußzytometrische Messung zeigte eindeutig, daß die α v β 3- und α V β 5-Expression durch dieses Antigen stimuliert werden konnte. Wenn Antigene in vitro diese Integrine hochregulieren können, ist es allerdings auch plausibel, daß dies am physiologischen Ort der Antigenexposition geschieht. Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, daß die α V-Integrine an einer antigen-abhängigen Funktionalität der T-Zellen beteiligt sind.

5.3 Interaktion des 6.L1-Fc-Fusionsproteinens mit Endothelzellen

Die Tatsache, daß sowohl Endothelzellen als auch die T-Zellen L1, α V β 3 und α V β 5 exprimieren können, macht natürlich alle möglichen Interaktion zwischen diesen Molekülen denkbar. Endotheliales L1 kann sowohl in homotypischer Weise mit lymphozytären L1 interagieren oder eines der beiden α V-Integrine kann an das L1 Molekül der T-Zellen binden. Genauso gut besteht in umgekehrter Richtung die Möglichkeit jede diese Interaktionen einzugehen. Die weiteren Experimente dieser Arbeit zielten nun darauf ab, welche Funktion der Interaktion von lymphozytären α V β 3-Integrin mit dem L1 Adhäsionsmolekül zukommt. Final sollte geklärt werden, welche Rolle diese Interaktion bei der Vermittlung der Zellmigration von Tumorzellen und naiven T-Zellen hat.

Im Einleitungsteil ist darauf hingewiesen worden, daß das Adhäsionsmolekül L1 sowohl die Möglichkeit zur homotypische Bindung [Holm1995] als auch zur heterotypischen Interaktion mit α V-Integrinen über die RGD-Sequenz besitzt [Montgomery1996]. Da aber T-Zellen nicht nur das α v β 3-Integrin, dessen Funktionseigenschaften hier untersucht werden sollen, exprimieren, sondern auch das L1 Adhäsionsmolekül, mußte bei den weiteren Experimenten eine homotypische Interaktion ausgeschlossen werden. Diese Problematik der homotypischen L1-Interaktion wurde dadurch umgangen, daß in den weiteren Experimenten die Funktionalität α V-Integrin exprimierenden Zellen nicht mit einem Gesamt-L1 Molekül getestet wurde, sondern es wurde ein

Fusionsprotein eingesetzt, daß aus dem Fc-Teil eines humanen Antikörpers und der sechsten Domäne des humanen L1 Moleküles bestand. Diese sechste Domäne enthält die RGD-Sequenz, die für die heterotypische Bindung verantwortlich ist [Montgomery1996], wogegen die homotypische Interaktion hauptsächlich auf Sequenzen beruht, die in anderen Regionen liegen [Holm1995].

Um die Funktionalität dieses 6.L1-Fc-Fusionsproteins zu testen, wurden zunächst $\alpha V\beta 3$ -expremierende Zellen (MED-B1) inkubiert und durchflußzytometrisch untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß dies hier eingesetzte 6.L1-Fc-Fusionsprotein spezifisch mit diesen Zellen reagiert, da die gemessene Bindung mit der eingesetzten Konzentration korreliert. Desweiteren wird ab 1500ng/ml eine Sättigung der Bindung erreicht. Wäre die Fusionsproteinbindung unspezifisch, käme es zu keiner Abflachung der Bindungskurve (Abbildung 4-18). Nalm 6 Zellen, die weder $\alpha V\beta 3$ noch $\alpha V\beta 5$ expremieren reagieren bei keiner der eingesetzten Konzentration mit dem 6.L1-Fc-Fusionsprotein. Weitere Hinweise auf die Spezifität der Fusionsproteinbindung und deren Interaktion mit dem $\alpha V\beta 3$ -Integrin erbrachten die Bindungsexperimente des Fusionsproteins mit den Endothelzellen. Eine Bindung an ALAB bzw. an die Endothelzelllinie HUVEV war nur zu detektieren, wenn die Inkubation in Gegenwart von Kalzium- und Magnesium stattfand bzw. wenn die Zellen durch Manganionen aktiviert worden sind. Dies sind eindeutige Charakteristika für eine Integrin vermittelte Bindung [Smith1993]. Desweiteren wird diese Bindung inhibiert, wenn die Zellen vorher mit einem αV -spezifischen Antikörper inkubiert wurden, der blockierende Wirkung auf die Bindungen der αV -Integrine hat (Abbildung 4-20).

Basierend auf diesen Experimenten lassen sich zwei Ergebnisse formulieren. Das auf Endothelzellen expremierte Integrin $\alpha V\beta 3$ ist in der Lage spezifisch das Adhäsionsmolekül L1 zu binden. Dies steht in Konsens mit Untersuchungen, die eine Bindung des L1 Moleküles an humane Melanomzellen aufzeigen, die über dieses Integrin vermittelt wird [Montgomery1996]. Hubbe et al. zeigten im murinen System anhand von L1 positiven und L1 negativen Esb-MP Zellen, daß diese Lymphomazellen mittels L1 an Endotheliazellen binden können. Die Abhängigkeit dieser Bindung

von Kalzium- und Magnesiumionen, sowie die Sensitivität gegenüber niedrigen Reaktionstemperaturen, legen die Vermutung nahe, daß es sich beim korrespondierenden Adressin um ein Integrin handelt [Hubbe1993]. Die Blockierung dieser Zellbindung durch monoklonale Antikörper gegen die α V-Untereinheit bestätigen dies und lassen es wahrscheinlich erscheinen, daß ein endotheliales α V-Integrin an dieser Wechselwirkung beteiligt ist [P. Altevogt, pers. Mitteilung]. Damit ist eine Interaktion zwischen Lymphozyten, die L1 exprimieren und Endothelzellen denkbar und ein Zusammenhang zwischen dieser Interaktion und der Extravasation von zirkulierenden Lymphozyten möglich. Im Weiteren zeigen diese Experimente, daß dies hier verwendete Fusionsprotein funktionell intakt ist und in weiteren Experimenten verwendet werden kann, die vor allem die Rolle der Adhäsionsmoleküle L1 und α V β 3 bei der Zellmigration untersuchen sollen.

5.4 Migrationsexperimente

5.4.1 Auswahl des Migrationsassays

Migrationsexperimente werden in der Regel in speziellen Zellkulturplatten durchgeführt [Klemke1994, Leavesly1992, Montgomery1996]. Die Löcher dieser Zellkulturplatten werden durch einen Einsatz in eine obere und eine untere Kammer geteilt. Beide Kammern sind durch eine perforierte Wand getrennt, die entweder an beiden Seiten oder nur an der Unterseite mit einem spezifischen Substrat beschichtet wird. Die Migration von Zellen, die zu Beginn in die obere Kammer gegeben wurden, wird am Ende des Versuches durch Zählen der Zellen bestimmt. Entweder wird gezählt, wieviel Zellen am Ende des Versuches sich in der unteren Kammer befinden oder es wird mikroskopisch ausgewertet, wie viele Zellen sich an der Unterseite dieser perforierten Wand befinden.

Ein Vorteil dieses Assays ist, daß verschiedene Versuchsansätze parallel durchgeführt werden können. Dieser Methode stehen aber auch Nachteile gegenüber. Berechnet man den relativen Anteil migrierenden Zellen an der insgesamt eingesetzten Zellzahl, erhält man oft nur einen sehr geringen

Prozentsatz migrierender Zellen. In derartigen Versuchsansätzen kann die Migration nur für etwa 10%-20% der Zellen nachgewiesen werden, sofern die entsprechenden Daten angegeben wurden. Ferner wird bei der Auswertung nur ein Endergebnis bewertet. Aussagen über die Migration selbst entziehen sich jeglicher Beobachtung und Quantifizierung.

Aus diesen Gründen wurde hier ein anderer experimenteller Ansatz gewählt. Objektträger wurden mit dem jeweiligen Substrat beschichtet und die Migration der darauf adhätierenden Zellen über einen gewissen Zeitraum mit einer Videokamera aufgezeichnet. Dieses Verfahren machte es möglich, daß die Wanderung einzelner Zellen beobachtet werden konnte. Diese Migrationsmessung einzelner Zellen, konnte dann graphisch dargestellt werden. Zum Einen war es möglich die zurückgelegte Wegstrecke zu messen, -also eine rein quantitative Auswertung- und zum Anderen konnte die Richtung des zurückgelegte Weges dargestellt werden. Darüber hinaus ermöglicht es dieser Ansatz die Morphologie der Zellen während der Migration zu beobachten.

5.4.2 Etablierungs des Migrationsassays mit Vitronektin als Substrat

Im ersten experimentellen Ansatz mußte getestet werden, ob der hier gewählte Migrationsassay reproduzierbare Ergebnisse hervorbringen kann. Als Untersuchungsobjekt wurde die Zelllinie MED-B1 verwendet, deren $\alpha V\beta 3$ Expression nachgewiesen werden konnte (Abbildungen 4-13 und 4-15). Als Substrat wurde Vitronektin zunächst Vitronektin, da eine $\alpha V\beta 3$ vermittelte Migration von Zellen auf diesem Substrat nachgewiesen worden ist. [Wayner1991, Filardo1995]. Die Abbildungen 4-21 und 4-22 zeigen deutlich, daß durch diesen Assay die Migrationsergebnisse von Wayner und Filardo reproduziert werden konnten. Dieser Migrationsassay kann also in weiteren Experimenten eingesetzt werden. Es konnte aber eine von Bauer et al. [Bauer1992] aufgestellte Hypothese nicht bestätigt werden. Dieser postulierte, daß die Migration auf Vitronektin das Ergebnis eines Zusammenwirkens von $\alpha V\beta 3$ und $\alpha 5\beta 1$ ist. Die durchflußzytometrischen Messungen und die

Immunpräzipitation haben eindeutig gezeigt, daß MED-B1 Zellen kein $\alpha 5\beta 1$ Integrin exprimieren. Bauer selbst konnte kein Erklärungsmodell für diese interessante Beobachtung liefern und es bleibt daher spekulativ, warum dieses Phänomen bisher nur bei den von Bauer verwendeten CHO Zellen auftritt. Möglicherweise spielt eine unterschiedliche Struktur des Zytoskelettes bei diesen adhärennten CHO Zellen dabei eine Rolle oder es lag ein unterschiedlicher Aktivierungszustand der Integrine vor.

Bei diesen und allen später durchgeführten Experimenten migrierten etwa dreißig bis vierzig Prozent der Zellen, also deutlich mehr als in anderen Migrationsexperimenten [Crisa1996]. Ferner konnte bei allen migrierenden Zellen eine morphologische Veränderung beobachtet werden. Der glatte Zellrand ruhender Zellen geht durch die Bildung von zellulären Ausläufern bei migrierenden Zellen verloren. Dieses als „Spreading“ bezeichnete Phänomen gilt als charakteristisch für die Migration [Klemke1994, Wayner1991].

5.4.3 Die Rolle der RGD-Sequenz bei der $\alpha V\beta 3$ Integrin vermittelten Migration

Die nächste Frage, die beantwortet werden sollte, war, ob die $\alpha V\beta 3$ vermittelte Migration durch eine RGD-Sequenz im Substratmolekül vermittelt wird. In diesem Ansatz wurden Migrationsexperimente mit Fibronectin, dem Fibronectinfragment FN120 und dem Fragment FN40 als Substrat durchgeführt. Während das Fragment FN120 die RGD-Sequenz des Fibronectinmoleküles enthält und nicht die in der CS-1 Region enthaltene LDV-Sequenz, ist dies beim FN120-Fragment genau umgekehrt.

Bei der $\alpha 4\beta 1$ und $\alpha 5\beta 1$ vermittelten Migration von Zellen auf Fibronectin wird u.U. der RGD-Sequenz, vor allem aber der LDV-Sequenz des Fibronectinmoleküls eine zentrale Funktionalität zugeordnet [Crisa1996, Mould1994]. Die hier erzielten Ergebnisse zeigen eindeutig, daß die $\alpha V\beta 3$ vermittelte Migration von MED-B1 auf Fibronectin zwingend die RGD-Sequenz dieses Matrixproteins benötigt. Das Nicht-Vorhandensein der LDV-Sequenz vermindert in keiner Weise die Migration der Zellen.

5.4.4 α V β 3-vermittelte Migration von Tumorzellen auf L1 als Substrat

Wenn demnach, wie im vorhergerigen Experiment gezeigt, die Migration von MED-B1 über eine RGD-Sequenz im Substratmolekül vermittelt wird, erscheint es plausibel, daß auch das L1 Molekül als Substrat die α V β 3 vermittelte Migration induzieren kann. Dies konnte dann auch in den folgenden Experimenten gezeigt werden. MED-B1 Zellen migrieren eindeutig auf dem 6.L1-Fc-Fusionsprotein. Die Tatsache, daß Nalm 6 Zellen, die kein α V β 3 Integrin exprimieren, immobil auf diesem Substrat sind und die Inhibierung der Migration von MED-B1 Zellen durch einen anti- α V β 3 Antikörper festigen die Hypothese, daß die L1- α V β 3-Interaktion die Migration von Zellen induzieren kann. Da der L1 Anteil des als Substrat verwendeten Fusionsproteins nur aus der sechsten Ig-Domäne bestand, konnte so auch gezeigt werden, daß diese Domäne die entscheidene Sequenz für die α V β 3 vermittelte Migration enthält. Die Experimente mit Fibronektin als Substrat zeigten, daß die RGD-Sequenz für die Induzierung der Migration verantwortlich ist. Diese Sequenz befindet sich im L1 Molekül in der sechsten Domäne und ist auch bei der Migration auf dem 6.L1-Fc-Fusionsprotein von entscheidener Bedeutung. Die Ausschaltung dieser Sequenz durch punktuelle Mutation führt, wie die weiteren Experimente zeigten, zur Inhibierung der Migration. Diese RGD Sequenz vermittelt also nicht nur die Bindung von α V β 3 Integrinmolekülen, sondern induziert zusätzlich die Zellmigration. Daß diese Migration durch diese spezifische Bindung vermittelt wird, zeigt auch die Unfähigkeit der MED-B1 Zellen auf einem P-Selektinfusionsprotein zu wandern. Dieses Fusionsprotein bindet MED-B1 Zellen spezifisch über Zuckerreste. Diese Adhäsion kann aber keine Migration auslösen.

5.4.5 α V β 3-vermittelte Migration aktivierten T-Zellen auf L1 als Substrat

Wenn das von Tumorzellen exprimierte α V β 3 die Migration auf L1 als Substrat induziert, liegt es nahe, daß auch Lymphozyten mittels dieses Integrin migrieren. Eine Hypothese, die in weiteren Experimenten bestätigt werden

konnte. Wird PHA/PMA Stimulierung die α V-Integrinexpression induziert, migrieren T-Zellen auf dem 6.L1-Fc-Fusionsprotein. Wieder wird diese Migration durch einen α V β 3-Antikörper inhibiert. Ein Antikörper gegen α V β 5, das ebenfalls auf diesen T-Zellen expremiert wird, zeigt dagegen keinen inhibitorischen Effekt. Wayner konnte schon 1991 zeigen, daß für die Migration auf Vitronektin nur α V β 3, nicht aber α V β 5 entscheidend ist, obwohl Letzteres ebenfalls dieses Substrat binden kann [Wayner1991]. Es wurde in einer Arbeit hypothetisiert [Klemke1994], daß eine Aktivierung der Proteinkinase C durch den epidermalen Wachstumsfaktor oder durch PMA eine α V β 5 vermittelte Migration auf Vitronektin induzieren kann. Dies scheint aber nicht der Fall zu sein. Die Inkubation von T-Zellen mit Proteinkinase C Aktivatoren, die ja die Voraussetzung für die de novo Expression der α V-Integrine auf T-Zellen ist, induziert hier keine α V β 5 vermittelte Zellmigration. Es erscheint plausibler, daß die fehlende Verbindung dieses Integrins mit dem Zytoskelett eine Migrationsinduzierung verhindert. Für die Bedeutung der Assoziation von Integrinen mit dem Zytoskellet bei der Vermittlung der Migration gibt es eindeutige Hinweise [Wayner1991].

Diese Experimente zeigen eindeutig, daß T-Zellen mittels α V β 3 auf L1 als Substrat migrieren können - genauer, die sechste Domäne mit der darin enthaltenen RGD-Sequenz induziert diese Migration.

5.5 Schlußfolgerungen

Unter physiologischen Bedingungen könnte das L1 Molekül zellgebunden oder in der Matrix eingebettet den α V β 3 expremierenden Zellen als Substrat präsentiert werden. Es konnte gezeigt werden, daß Endothelzellen das L1 Molekül expremieren. Daß die α V β 3-L1 Interaktion den Migrationsprozeß bei der Extravasation von Lymphozyten unterstützt, ist allerdings nicht wahrscheinlich. Dagegen spricht vor allem, daß periphere, zirkulierende Lymphozyten, die unmittelbar nach ihrer Isolierung untersucht wurden, keine α V-Integrine expremieren. Eine weitere Voraussetzung wäre es, daß das L1 Molekül auf der luminalen Seite der Endothelzellen expremiert wird. Dies konnte hier allerdings nicht untersucht werden. Die durchflußzytometrische

Analyse von HUVEC Zellen läßt nur den sicheren Schluß zu, daß diese Zellen L1 exprimieren - Aussagen über die Oberflächenverteilung lassen sich nicht treffen. Es ist daher nicht auszuschließen, daß L1 lediglich an der basalen Seite der Endothelzellen exprimiert wird und beispielsweise die Verankerung dieser Zellen an der extrazellulären Matrix vermittelt. Die Interaktion zwischen zirkulierenden, peripheren Lymphozyten und Endothelzellen könnte allerdings auch über lymphozytäres L1 und das endotheliales $\alpha V\beta 3$ Integrin vermittelt werden. Die durchflußzytometrischen Bindungsassays mit dem 6.L1-Fc-Fusionsprotein haben gezeigt, daß Endothelzellen dieses Fusionsprotein über das $\alpha V\beta 3$ Integrin binden können. Das Vorhandensein nur einer RGD-Sequenz in der sechsten Domäne des humanen L1 Moleküles unterbindet demnach nicht die Bindung an $\alpha V\beta 3$. Daß L1 exprimierende Esb-MP-Zellen heterotypisch an Endothelzellen binden können, ist im murinen System gezeigt worden [Hubbe1993] und es erscheint durchaus möglich, daß diese Interaktion -ähnlich wie die Interaktion zwischen CD31 (ebenfalls ein Molekül der Immunglobulinklasse) und $\alpha V\beta 3$ - eine Schlüsselfunktion bei der Initialisierung zellulärer Migration auf Endothelzellen einnimmt [Imhof1995].

In der Einleitung ist bereits dargestellt worden, daß die zelluläre Migration nicht nur ein wichtiger Teilprozeß bei der Extravasation ist, sondern daß diese Migration von Zellen auch in immunologischen Kompartimenten eine wichtige Rolle einnimmt, um die immunologische Funktionalität aufrecht zu erhalten. Die $\alpha 4\beta 1$ bzw. $\alpha 5\beta 1$ vermittelte Migration von T-Zellen im Thymus ist beispielsweise ein Schlüsselschritt in der Differenzierung der Thymozyten [Crisa1996]. In dieser Arbeit ist der experimentelle Ansatz derart angelegt worden, daß die Migration von Zellen auf einem Fusionsprotein untersucht wurde, dessen L1-Anteil nur die sechste Domäne umfaßt. Dies hatte zunächst den Grund darin, daß eine homotypische Bindung zwischen zwei L1 Molekülen ausgeschlossen werden sollte, um die Interaktion zwischen L1 und dem $\alpha V\beta 3$ Integrin zu untersuchen. Daß sowohl $\alpha V\beta 3$ exprimierende Tumorzellen als auch T-Zellen auf diesem Fusionsprotein migrieren können, zeigt darüber hinaus auch, daß nicht das gesamte L1 Molekül notwendig ist, um eine Zellmigration zu induzieren. Die in der sechsten Domäne des L1 Moleküls befindliche RGD-Sequenz reicht aus um diesen Prozeß auszulösen. Dies ist

von besonderem Interesse, da bekannt ist, daß L1 Fragmente unter bestimmten Bedingungen von der Zelloberfläche abgespalten werden. Im Weiteren konnte L1 immunologisch in der extrazellulären Matrix nachgewiesen werden [Kadmon1997, Martini1986, Poltorak1990]. Diese Daten lassen es möglich erscheinen, daß in die extrazelluläre Matrix eingelagertes L1 als Substrat für die Zellmigration dienen könnte. Die Tatsache, daß in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, daß Tetanustoxid die α V-Integrin Expression induziert bzw. die Existenz von Hinweisen, daß im murinen System Lymphozyten in sekundären lymphoiden Organen α V β 3 exprimieren können, bildet einen physiologischen Hintergrund für diese Hypothese [Gerber1996], der durch immunhistologische Untersuchungen untermauert wird, die L1 in der Matrix von Lymphknoten nachweisen [P. Möller, pers. Mitteilung]. Ferner würde damit auch im Einklang stehen, daß die Expression von α V β 3 mit dem Metastasierungspotential von Tumorzellen korreliert [Filardo1995]. Möglicherweise benutzen diese Tumorzellen die migrationsinduzierende Interaktion zwischen α V β 3 und in der Matrix eingelagertem L1, um durch Gewebe zu transmigrieren. Diese Hypothese wird durch die Tatsache unterstützt, daß in der Umgebung von Melanomzellen verstärkt extrazelluläres L1 nachgewiesen werden konnte [Montgomery1996] und würde letztlich bedeuten, daß Tumorzellen ihre Umgebung derart durch die Abspaltung von L1 konditionieren, daß es als Folge davon zu einer verstärkten lokalen Mobilität dieser Tumorzellen kommt und damit die pathologische Situation einer Metastasierung vorbereitet wird.

Die hier durchgeführten Versuche waren in ihrem experimentellen Ansatz derart angelegt, daß die Interaktion zwischen den Adhäsionsmolekülen L1 und α V β 3 Integrin und die daraus resultierende Effekte in einem vereinfachendem in vitro System durchgeführt wurden, um Informationen auf molekularer Ebene generieren zu können bzw. um Effekte auf einzelne Zellen nachweisen zu können. Basierend auf den hier generierten Daten wären die nächsten Versuche in einem komplexeren experimentellen System durchzuführen. So bleibt die Frage zu beantworten, ob eine Migration von L1 exprimierenden Zellen auf Endothelzellen tatsächlich über die die L1- α V β 3-Interaktion erfolgt. Unter Beibehaltung des hier verwendeten Migrationsassays könnten diese

Experimente durchgeführt werden, indem anstatt eines molekularen Substrates Endothelzellen verwendet werden.

Wenn -wie anzunehmen ist- die physiologische Migration nicht nur durch die Interaktion zweier Moleküle induziert wird, sondern eine geregeltes Zusammenspiel verschiedener Substanzen erfordert, wäre es weiterhin interessant zu Untersuchen, welche Substratkombinationen bzw. Molekülkombination Zellmigration induzieren können. Da hypothetisiert wurde, daß ber der $\alpha V\beta 3$ -L1 vermittelte Zellmigration eine Interaktion mit der extrazellulären Matrix von Bedeutung ist, wäre es auch konsequent, die Migration von $\alpha V\beta 3$ expremierenden Zellen auf L1 in Kombination mit anderen Matrixproteinen zu untersuchen.

6 Literaturverzeichnis

- Adkins B, Mueller C, Okada C, Y., Reichert RA, Weissman I, L., and Spangrude G, J. *Early events in T-cell maturation*. Annu Rev Immunol (1987);**5**: 325-57.
- Aigner S, Ruppert M, Hubbe M, Samamr M, Sthoeger Z, Butcher E, C., Vestweber D, and Altevogt P. *Heat-stable antigen (mouse CD24) supports myeloid cell binding to endothelial and platelets P-selectin*. Int Immunol (1995);**7**: 1557-66.
- Aigner S, Sthoeger Z, M, Fogel M, Weber E, Zarn J, Ruppert M, Zeller Y, Vestweber D, Stahel R, Sammar M et al. *CD24, a mucin-type glycoprotein, is a ligand for P-selectin on human tumor cells*. Blood (1997);**89**: 3385-95.
- Albelda S, M. and Buck C, A. Integrins and other cell adhesion molecules. FASEB J (1990);**4**: 2868-80.
- Anderson A, O., Anderson N, D., White J, D. ; *Animal models of immunological processes*. New York: (1982); *Lymphocyte locomotion, lymphatic tissues and lymphocyte circulation*.
- Arbonés M, L., Ord D, C., Ley K, Ratech H, Maynard-Curry C, Otten G, Capon D, J. und Tedder T, F. *Lymphocyte homing and leucyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice*. Immunity (1994);**1**: 247-60.
- Atherton A and Born G, V. *Quantitative investigation of the adhesiveness of circulating polymorphonuclear leucocytes to blood vessel wall*. J Physiol (1972);**222**: 447-74.
- Bauer J, S., Schreiner C, L., Giancotti F, G., Rouslahti E und Juliano R, L. *Motility of fibronectin receptor-deficient cells on fibronectin and vitronectin: collaborative interaction among integrins*. J Cell Biol (1992);**116**: 477-87.
- Baumhueter S, Singer M, S., Henzel W, Hemmerich S, Renz M, Rosen S, D. und Lasky L, A. *Binding of L-selectin to the vascular sialomucin, CD34*. Science (1993);**262**: 436-8.
- Berg E, L., Yoshino T, Rott L, S., Robinson M, K., Warnock R, A. Kishimoto, Picker L, J. und Butcher EC. *The cutaneous lymphocyte antigen is a skin lymphocyte homing receptor for the vascular lectin endothelial cell-leukocyte adhesion molecule 1*. J Exp Med (1991);**174**: 1461-6.
- Berg E, L., McEvoy L, M., Berlin C, Bargatze R, F. und Butcher E, C. *L-selectin-mediated lymphocyte rolling on MADCAM-1*. Nature (1993);**366**: 695-8.
- Berlin C, Berg E, L., Briskin M, J. undrew D, P., Kilshaw P, J., Holzman B, Weissman I, L., Hamann A und Butcher E, C. *$\alpha 4\beta 7$ integrin mediates lymphocyte binding to mucosal vascular addressin*. Cell (1993);**74**: 185-95.
- Berrih S, Savino W und Cohen S. *Extracellular matrix of the human thymus: Immunofluorescence studies on frozen sections and cultured epithelial cells*. J Histochem Cytochem (1985);**33**: 655-64.
- Bevilacqua M, P., Pober J, S., Wheeler M, E., Cotran R, S., and Gombone M, A. *Interleukin 1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leucocytes, monocytes, reated leucocyte cell lines*. J Clin Invest (1985);**76**: 2003-11.
- Bevilacqua M, P., Stengelin S, Gimbrone M, A. und Seed B. *Endothelial leucocyte adhesion molecule 1: An inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins*. Science (1989);**243**: 1160-5.
- Bevilacqua M, P., Butcher E, C., Furie B, Gallatin M, Gimbrone M, Harlan J, Kishimoto K, Lasky L, McEver R, Paulson J et al. *Selectins: A family of adhesion receptors*. Cell (1991);**67**: 233
- Bevilacqua M, P. and Nelson R, M. *Selectins*. J Clin Invest (1993);**91**: 379
- Boucaut J, Darribere T, Poole T, J., Aoyama H, Yamada K, M. und Thiery J. *Biologically active synthetic peptides as probes of embryonic development: a competitive peptide inhibitor of fibronectin inhibits*

- gastrulation in amphibian embryos and neural crest migration in avian embryos.* J Cell Biol (1984);**99**: 1822-30.
- Boyd R, L., Tucek C, L., Godfrey D, I., Izon D, J., Wilson T, J., Davidson N, J., Bean A, G., Ladyman H, M., Ritter M, A. und Hugo P. *Thy thymic microenvironment.* Immunol Today (1993);**14**: 445-59.
- Briskin M, G., McEvoy L, M. und Butcher E, C. *MADCAM-1 has homology to immunoglobulin and mucin-like adhesion receptors and to IgA-1.* Nature (1993);**363**: 461-4.
- Brümmendorf T und Rathjen F, G. *Axonal glycoproteins with immunoglobulin- and fibronectin type III-related domains in vertebrates: structural features, binding activities, and signal transduction.* J Neurochem (1993);**61**: 1207-19.
- Butcher E, C., Scollay R, G., and Weissmann L. *Organ specificity of lymphocyte migration: mediation by highly selective lymphocyte interaction with organ-specific determinants on high endothelial venules.* Eur J Immunol (1980);**10**: 556-561
- Butcher E, C. *The Regulation of Lymphocyte Traffic.* Curr Top Microbiol Immunol (1986);**128**: 85-122.
- Butcher E, C. *Warner-Lambert/Parke-Davis Award lecture. Cellular and molecular mechanisms that direct leukocyte traffic.* Am J Pathol (1990);**136**: 3
- Butcher E, C. *Leukocyte-endothelial cell recognition: Three (or more) steps to specificity and diversity.* Cell (1991);**67**: 1033-6.
- Butcher E, C. and Picker L, J. *Lymphocyte Homing and Homeostasis.* Science (1996);**272**: 60-6.
- Camerini D, James S, P., Stamencovic I und Seed B. *Leu8/TQ1 is the human equivalent of the Mel14 lymph node homing receptor.* Nature (1989);**342**: 78-82.
- Carlos T, M., Schwarz B, R., Kovach N, L., Yee E, Rosso M, Osborne L, Chi-Rosso G, Newman B, Lobb R, and Harlan J, M. *Vascular cell adhesion molecule-1 lymphocyte adherence to cytokine-activated cultured human endothelial cells.* Blood (1990);**76**: 965-70.
- Cepek K, L., Parker C, M., Madara G, L. und Brenner M, B. *Integrin $\alpha E\beta 7$ mediates adhesion of T lymphocytes to epithelial cells.* J Immunol (1993);**150**: 3459-70.
- Cepek K, L, Shaw S, K, Parker CM, Russell G, J, Morrow J, S, Rimm D, L, Brenner M,B. *Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the alpha E beta 7 integrin.* Nature (1994); **372**:190-3.
- Cerf-Bensussan N, Jarry A, Brousse N, Lisowska-Groszpiette B, Guy-Grand D und Griscelli C. *A monoclonal antibody (HML-1) defining a novel molecule present on human intestinal lymphocytes.* Eur J Immunol (1987);**17**: 1279-85.
- Chan B, M., Elices M, J., Murphy E und Hemler M, E. *Adhesion to vascular cell adhesion molecule 1 and fibronectin: Comparison of $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha 4\beta 5$ on human B cell line JY.* J Biol Chem (1992);**267**: 8366-70.
- Chang S, Rathjen FG, Raper JA. *Extension of neurites on axons is impaired by antibodies against specific neural cell surface glycoproteins.* J Cell Biol (1987); **104**:355-62.
- Charo I, F., Nannizzi L, Smith J, W. und Cheresh D, A. *The vitronectin receptor $\alpha V\beta 3$ binds fibronectin and act in concert with $\alpha 5\beta 1$ in promoting cellular attachment and spreading on fibronectin.* J Cell Biol (1990);**111**: 2795-800.
- Cheresh D, A. *Human endothelial cells synthesize and express an Arg-Gly-Asp-directed adhesion receptor involved in attachment to fibrinogen and von Willebrand factor.* Proc Natl Acad Sci U S A (1987);**84**: 6471-5.

- Cheresh D, A. and Spiro R, C. Biosynthetic and functional properties of an Arg-Gly-Asp-directed receptor involved in human melanoma cell attachment to vitronectin, fibrinogen and von Willebrand factor. *J Biol Chem* (1987);**262**: 17703-11.
- Chien S. *Rheology in the microcirculation in normal and low flow states*. *Adv Shock Res* (1982);**8**: 71-80.
- Cohnheim S. *Lectures on general Pathology: a handbook for practitioners and students*. London: (1889);
- Cotran R, S., Gimbrone M, J., Bevilacqua M, P., Mendrick D, L. und Pober J, S. *Induction and detection of a human endothelial activation antigen in vivo*. *J Exp Med* (1986);**164**: 661-6.
- Crennel S, J., Garman E, F, Laver W, G., Vimr E, R., and Taylor D, S. *Crystal structure of a bacterial sialidase (from Salmonella typhimurium LT2) shows the same fold as an influenza virus neuraminidase*. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1993);**90**: 9852-6.
- Crisa L, Cirulli V, Ellisman MH, Ishii JK, Elices MJ, Salomon DR. *Cell adhesion and migration are regulated at distinct stages of thymic T cell development: the roles of fibronectin, VLA4 und VLA5*. *J Exp Med* (1996); **184**:215-28.
- Davis J, Q, Bennett V. *Ankyrin binding activity shared by the neurofascin/L1/NrCAM family of nervous system cell adhesion molecules*. *J Biol Chem* (1994); **269**:27163-6.
- Diamond M, S., Staunton D, E., Stacker S, A., Garcia A, J., Hibbs M, L. und Springer T, A. *ICAM-1 (CD54): a counter-receptor for Mac-1 (CD11b/CD18)*. *J Cell Biol* (1990);**111**: 3129-39.
- Doherty P, Williams E, Walsh F, S. *A soluble chimeric form of the L1 glycoprotein stimulates neurite outgrowth*. *Neuron* (1995); **14**:57-66.
- Dransfield I, Cabanas C, Craig A und Hogg N. *Divalent cation regulation of the function of the leukocyte integrin LFA-1*. *J Cell Biol* (1992);**116**: 219-26.
- Dunon D, Mackay C, R., Imhof B, A. *Adhesion in leukocyte homing and differentiation*. (1993); New York:
- Dustin M, L., Rothlein R, Bhan A, K., Dinarello C, A. und Springer T, A. *Induction by IL-1 and interferon-gamma: Tissue distribution, biochemistry and function of a natural adherence molecule (ICAM-1)*. *J Immunol* (1986);**137**: 245-54.
- Dustin M, L. and Springer T, A. *Role of lymphocyte adhesion receptors in transient interactions and cell locomotion*. *Annu Rev Immunol* (1991);**9**: 2-66.
- Ebeling O, Duczmal A, Aigner S, Schöllhammer S, Kemshead J, T., Möller P, Schwartz-Albiez R, Altevogt P. *L1 adhesion molecule on human lymphocytes and monocytes: expression and involvement in binding to $\alpha V\beta 3$ integrin*. *Eur J Immunol* (1997); **26**:2508-16.
- Elices M, J. and Hemler M, E. *The human integrin VLA-2 is a collagen receptor on some cells and a collagen/laminin receptor on others*. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1989);**86**: 9906-10.
- Elices M, J., Osborne L, Takada Y, Crouse C, Luhowskyi S, Hemler ME und Lobb R, R. *VCAM on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site*. *Cell* (1990);**60**: 577-84.
- Faissner A, Teplow D, B, Kübler D, Keilhauer G, Kinzel V, Schachner M. *Biosynthesis and membrane topography of neural cell adhesion molecule L1*. *EMBO* (1984); **4**:3105-13.
- Ferrell J, E. and Martin G, S. *Tyrosine-specific protein phosphorylation is regulated by glycoprotein IIb-IIIa in platelets*. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1989);**86**: 2234-8.
- Filardo E, J., Brooks P, C., Deming S, L., Damsky C, and Chers D, A. *Requirement of the NPXY motif in the integrin $\beta 3$ subunit cytoplasmic tail for melanoma cell migration in vitro and in vivo*. *J Cell Biol* (1995);**130**: 441-50.
- Fina L, Molgaard H, V., Robertson D, Bradley N, J., Monaghan P, Delia D, Sutherland D, R., Baker M, A.

- und Greaves M, F. *Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells*. Blood (1990);**75**: 2417-26.
- Firrel J, C. and Lipowsky H, H. *Leukocyte margination and deformation in mesenteric venules of rat*. Am J Physiol (1989);**256**: 1667
- Fischer G, Künemund V, and Schachner M. *Neurite outgrowth patterns in cerebellar microexplant cultures are affected by antibodies to the cell surface glycoprotein L1*. J Neurosci (1986);**6**: 605-12.
- French-Constant C. *Many different proteins but few different functions*. Exp Cell Res (1995);**221**: 261-71.
- Fries J, W, Williams A, J., Atkins R, C., Newman W, Lipscomb M, F. und Collins T. *Expression of VCAM-1 and E-selectin in an in vivo model of endothelial activation*. Am J Pathol (1993);**143**: 725-37.
- Gallatin W, M., Weissman I, L. und Butcher E, C. *A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes*. Nature (1983);**304**: 300-4.
- Gamble J, R., Harlan J, M., Klebanoff S, J., and Vadas M, A. *Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor*. Proc Natl Acad Sci U S A (1985);**82**: 8667-71.
- Garver T, D., Ren Q, Tuvia S, and Bennett V. *Tyrosine phosphorylation at a site highly conserved in the L1 family of cell adhesion molecules abolishes ankyrin binding and increases lateral mobility of neurofascin*. J Cell Biol (1997);**137**: 703-14.
- Gearing J, H. and Newman W. *Circulating adhesion molecules in disease*. Immunol Today (1993);**14**: 506-12.
- Geng J, G., Bevilacqua M, P., Moore K, L., McIntyre K, M., Prescott S, M., Kim J, M., Bliss G, A., Zimmermann G, A. und McEver R, P. *Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140*. Nature (1990);**343**: 757-60.
- Gerber D, J, Pereira P, Huang S, Y., Pelletier C., Tonegawa S; *Expression of αV and $\beta 3$ integrin chains on murine lymphocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A (1996); **93**:14698-703.
- Goebeler M, Meinardus-Hager G, Roth J, Goerd S und Sorg C. *Nickel chloride and cobalt chloride, two common contact sensitizers, directly induce expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and endothelial leukocyte adhesion molecule (ELAM-1) by endothelial cells*. J Invest Dermatol (1993);**100**: 759-65.
- Golden A, Brugge J, S. und Shattil S, J. *Role of platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa in antagonist-induced tyrosine phosphorylation of platelet protein*. J Cell Biol (1990);**111**: 3117-27.
- Graber N, Gopal T, V., Wilson D, Beall L, D., Polte T, and Newman W. *T cells bind to cytokine-activated endothelial cells via a novel, inducible sialoglycoprotein and endothelial leukocyte adhesion molecule*. Proc Natl Acad Sci U S A (1990);**145**: 817-30.
- Green P, J, Yuen C, T, Childs R, A, Chai W, Miyasaka M, Lemoine R, Lubineau A, Smith B, Ueno H, Nicolaou K, C, et al. *Further studies of the binding specificity of the leukocyte adhesion molecule, L-selectin, towards sulphated oligosaccharides--suggestion of a link between the selectin- and the integrin-mediated lymphocyte adhesion systems*. Glycobiology (1995); **5**:29-38.
- Guan J and Hynes R, O. *Lymphoid cells recognize an alternatively spliced segment of fibronectin via the integrin receptor $\alpha 4 \beta 1$* . Cell (1990);**60**: 53-61.
- Gulino D, Rykewaert J, J. Undrieux A, Rabiet M, J. und Marguerie G. *Identification of a monoclonal antibody against platelet GPIIb that's interacts with a calcium-binding site and induces aggregation*. J Biol Chem (1990);**265**: 9575-81.
- Hamann A, Jablonski-Westrich D, Duijvestijn A, Butcher E, C., Baisch H, Harder R und Thiele H, G.

- Evidence for an accessory role of LFA-1 in lymphocyte-high endothelium interaction during homing.* J Immunol (1988);**140**: 693-9.
- Hamann A, Jablonski W, D., Jonas P und Thiele H, G. *Homing receptors reexamined: Mouse LECAM-1 (MEL-14 antigen) is involved in lymphocyte migration into gut associated lymphoid tissues.* Eur J Immunol (1991);**21**: 2925-9.
- Hamann A and Rebstock S. *Migration of activated lymphocytes.* Curr Topics Microbiol Immunol (1993);**184**: 109-24.
- Hamann A undrew D, P, Jablonski Westrich D, Holzmann B, Butcher EC. *Role of alpha 4-integrins in lymphocyte homing to mucosal tissues in vivo.* J Immunol (1994); **152**:3282-93.
- Hemler M, E. *VLA proteins in the integrin family: Structures, functions, and their role on leukocytes.* Annu Rev Immunol (1990);**8**: 365-78.
- Hermanowski A, Van Strijp J, A., Swiggard W, J. und Wrigh S, D. *Integrin modulating factor-1: a lipid that alters the function of leukocyte integrins.* Cell (1992);**68**: 341-52.
- Hession C, Tizard R, Vassallo C, Schiffer S, B, Goff D, Moy P, Chi-Rosso G, Luhowskyi S, Lobb R und Osborn L. *Cloning of an alternate form of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1).* J Biol Chem (1991);**266**: 6682-5.
- Hession C, Moy P, Tizard R, Chrisholm P, Williams C, Wysk M, Burkly L, Miyake K, Kincade P und Lobb R. *Cloning of murine and rat vascular cell adhesion molecule-1.* Biochim Biophys Acta (1992);**183**: 163-9.
- Hillery C, A., Smyth S, S. und Parise L, V. *Phosphorylation human platelet glycoprotein IIIa (GPIIIa). Dissociation from fibrinogen receptor activation and phosphorylation of GPIIIa in vitro.* J Biol Chem (1991);**266**: 14663-9.
- Holm J, Appel F, Schachner M. *Several extracellular domains of the neural cell adhesion molecule L1 are involved in homophilic interactions.* J Neurosci Res (1995); **42**:9-20.
- Horst E, Meijer, J., Duijvestijn A, M., Hartwig N, Van der Harten H, J. und Pals S. *The ontogeny of human lymphocyte recirculation: High endothelial antigen (HECA-452) and CD44 homing receptor expression in the development of the immune system.* Eur J Immunol (1990);**20**: 1483-9.
- Horstkorte R, Schachner M, Magyar J, P, Vorherr T, Schmitz B. *The fourth immunoglobulin-like domain of NCAM contains a carbohydrate recognition domain for oligomannosidic glycans implicated in association with L1 and neurite outgrowth.* J Cell Biol (1993); **121**:1409-21.
- Hourihan H, Allen TD, Ager A. *Lymphocyte migration across high endothelium is associated with increases in alpha 4 beta 1 integrin (VLA-4) affinity.* J Cell Sci (1993); **104**:1049-59.
- Huang S, Endo R, I., and Nemerow G, R. *Upregulation of integrin $\alpha V\beta 3$ and $\alpha V\beta 5$ on human monocytes and T lymphocytes facilitates Adenovirus-mediated gene delivery.* J Virol (1995);**69**: 2257-63.
- Huang C and Springer T, A. *A binding interface on the I domain of lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) required for specific interaction with intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1).* J Biol Chem (1995);**270**: 19008-16.
- Hubbe M, Kowitz A, Schirmacher V, Schachner M, Altevogt P. *L1 adhesion molecule on mouse leukocytes: regulation and involvement in endothelial cell binding.* Eur J Immunol (1993); **23**:2927-31.
- Huesmann M, Scott B, Kieselow P und Boehmer von H. *Kinetics and efficacy of positive selection in the thymus of normal and T cell receptor transgenic mice.* Cell (1991);**66**: 533-40.
- Humphries M, J., Sheridan J, Mould A, P., and Newham P. *Mechanisms of VCAM-1 and fibronectin binding to integrin alpha 4 beta 1: implications for integrin function and rational drug design.* Ciba

- Found Symp (1995);**189**: 177-91.
- Hynes R, O. *Integrins: Versatility, modulation und signaling in cell adhesion*. Cell (1992); **69**:11-25.
- Ignelzi M, A, Jr., Miller D, R, Soriano P, Maness P, F. *Impaired neurite outgrowth of src-minus cerebellar neurons on the cell adhesion molecule L1*. Neuron (1994); **12**:873-84.
- Imhof B, A., Ruiz P, Hesse B, Palacios R, and Dunon D. *EA-1, a novel adhesion molecule involved in the homing of progenitor T lymphocytes to the thymus*. J Cell Biol (1991);**114**: 1069-59.
- Imhof B, A, Dunon D. *Leukocyte migration and adhesion*. Adv in Immunology (1995); **58**:345-416.
- Issekutz T, B. *Inhibition of in vivo migration to inflammation and homing to lymphoid tissues by TA-2 monoclonal antibody*. J Immunol (1991);**147**: 4178-84.
- Ito N, Phillips S, E., Stevens C, Ogel Z, B., McPherson J, M., Keen J, N, Yadav KD, S., and Knowles PF. *Novel thioether bond revealed by a 1.7 Å crystal structure of galactose oxidase*. Nature (1991);**250**: 87-90.
- Jameson SC., Hoquist KA. und Bevan MJ. *Positive selection of thymocytes*. Ann Rev Immunol (1995);**13**: 93-126.
- Janeway C, A. *Frontiers of the immune system*. Nature (1988);**333**: 804
- Johnston G, I., Cook R, G. und McEver R, P. *Cloning of GMP-140, a granule membrane proteine of platelets and endothelium: sequebe semillarity to proteins involved in cell adhesin and inflammation*. Cell (1989);**56**: 1033-44.
- Jones D, A., Abassi O, McIntire L, V., McEver R, P. und Smith C, W. *P-selectin mediates neutrophil rolling on histamin-stimulated endothelial cells*. Biophys J (1993);**65**: 1560-9.
- Jouet M, Rosenthal A, Kenwick S. *Exon 2 of the gene for neural cell adhesion molecule L1 is alternatively spliced in B cells*. Brain Res Mol Brain Res (1995); **30**:378-80.
- Kadmon G, Kowitz A, Altevogt P und Schachner M. *Functional Cooperation between the neural adhesion molecules L1 and N-CAM is carbohydrate Dependent*. J Cell Biol (1990);**110**: 209-18.
- Kadmon G, Kowitz A, Altevogt P und Schachner M. *The neural adhesion molecule N-CAM enhances L1-dependent cell-cell interactions*. J Cell Biol (1990);**110**: 193-208.
- Kadmon G, Imhof B, A, Altevogt P, Schachner M. *Adhesive hierarchy involving the cell adhesion molecules L1, CD24 und alpha 6 integrin in murine neuroblastoma N2A cells*. Biochem Biophys Res Commun (1995); **214**:94-101.
- Kadmon G, Altevogt P. *The cell adhesion molecule L1: species- and cell-tpe-dependent multiple binding mechanisms*. (1997); **61**: 143-50.
- Kansas G, S., Saunders K, B., Ley K, Zakrewicz A, Gibson R, M., Furie B, C. und Tedder T, F. *A role of the epidermal growth factor like domain of P-selectin in ligand recognition and cell adhesion*. J Cell Biol (1994);**124**: 609-18.
- Kantor A, B. und Herzenberg L, A. *Origin of murine B-cell lineage*. Annu Rev Immunol (1993);**11**: 501-38.
- Kiefer N, Fitzgerald L, A., Wolf D, Cheresch D, A. und Phillips D, R. *Adhesive properties of the $\beta 3$ integrins: comparison of GPIIb-IIIa and the vitronectin receptor individually expressed in human melanoma cells*. J Cell Biol (1991);**113**: 451-61.
- Kikuchi G, E., Roberts K, Shevach E, M. und Colligan J, E. *Gene transfer demonstrates that Vg1.1C 4V δ 6C δ T cell receptor is essential for autoreactivity*. J Immunol (1992);**148**: 1302-7.
- Kirchhofer D, Gailit J, Ruoslathi E, Grzesiak J und Pierschbacher M, D. *Cation-dependent changes in the binding specificity of the platelet receptor GPIIb/IIIa*. J Biol Chem (1990);**265**: 18525-30.

- Kishimoto T, K., Jutila M, A., Berg E, L. und Butcher E, C. *Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors*. Science (1989);**245**: 1238-41.
- Klemke R, L., Yebra M, Bayna E, M., Cheresh D, A. *Receptor tyrosin kinase signaling required for Integrin α V β 5-directed cell motility but not adhesion on Vitronectin*. J Cell Biol (1994); **127**:859-66.
- Kobayashi M, Miura M, Asou H, Uyemura K. *Molecular cloning of cell adhesion molecule L1 from human nervous tissue: a comparison of the primary sequences of L1 molecules of different origin*. Biochim Biophys Acta (1991); **1090**:238-40.
- Komoriya A, Green L, J., Mervic M, Yamada S, S., and Humphries M, J. The minimal essential sequence for a major cell type-specific adhesion site (CS1) within the alternatively spliced type III connecting segment domain of fibronectin is leucine-aspartic acid-valine. J Biol Chem (1991);**266**: 15075-9.
- Kornberg L, J., Earp H, S., Turner C, E., Prockop C und Juliano R, L. *Signal transduction by integrins: increased protein tyrosine phosphorylation caused by clustering of β 1 integrins*. Proc Natl Acad Sci U S A (1991);**88**: 8392-6.
- Kornblihtt A, R., Umezawa K, Vibe-Pederson K und Baralle F, E. *Primary structure of human fibronectin differential splicing may generate at least 10 polypeptides from a single gene*. EMBO (1985);**4**: 1755-9.
- Kouns W, C., Wall C, D., White M, M., Fox C, F. und Jennings L, K. *A conformation-dependent epitope of human platelet glycoprotein IIIa*. J Biol Chem (1990);**265**: 20594-601.
- Kowitz A, Kadmon G, Eckert M, Schirmmacher V, Schachner M, Altevogt P. *Expression and function of the neural cell adhesion molecule L1 in mouse leukocytes*. Eur J Immunol (1992); **22**:1199-205.
- Kowitz A, Kadmon G, Verschueren H, Remels L, De Baetselier P, Hubbe M, Schachner M, Schirmmacher V, Altevogt P. *Expression of L1 cell adhesion molecule is associated with lymphoma growth and metastasis*. Clin Exp Metastasis (1993); **11**:419-29.
- Larsen E, Palabrica T, Sajer S, Gilbert G, E., Wagner D, D., Furie B, C. und Furie B. *PADGEM-dependent adhesion of platelets to monocytes and neutrophils is mediated by lineage-specific carbohydrate, LNF III (CD15)*. Cell (1990);**63**: 467-74.
- Larson R, S., Corbi A, L., Berman L und Springer T. *Primary structure of the leukocyte function-associated molecule- α subunit: An integrin with an embedded domain defining a protein superfamily*. J Cell Biol (1989);**108**: 703-12.
- Lasky L, A, Singer M, S., Yednock T, A., Dowbenko B, Rodriguez H, Nguyen T, Stachel S und Rosen S, D. *Cloning of a lymphocyte homing receptor reveals a lectin domain*. Cell (1989);**56**: 1045-55.
- Lasky L, E., Singer, S., Dowbenko D, Imai Y, Henzel W, J., Grimley C, Fennie C, Gillet N, Watson S, R. und Rosen S, D. *An endothelial ligand for L-selectin is a novel mucin-like molecule*. Cell (1992);**69**: 927-38.
- Lasky L, A. *Selectins: Interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation*. J Clin Invest (1992);**258**: 964-71.
- Lawrence M, B. and Springer T, A. *Leukocyte roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins*. Cell (1991);**65**: 859-73.
- Leavesley D, I, Ferguson G, D, Wayner E, A, Cheresh D, A. *Requirement of intergrin β 3 subunit for carcinoma cell spreading or migration on vitronectin and fibrinogen*. J Biol Chem (1992); **117**:1101-7.
- Lee J, O., Rieu P, Arnaout M, A., and Liddington R. *Crystal structure of the A domain from the alpha subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18)*. Cell (1996);**271**: 18610-5.
- Lemmon V, Burden S, M, Payne H, R, Elmslie G, J, Hlavin M, L. *Neurite growth on different substrates: permissive versus instructive influences and the role of adhesive strength*. J Neurosci (1992); **12**:818-26.

- Lewinsohn D, M., Bargatze R, F. und Butcher E, C. *Leukocyte-endothelial cell recognition: Evidence of a common molecular mechanism shared by neutrophils, lymphocytes and other leukocytes.* J Immunol (1987);**138**: 4313-21.
- Lindner J, Rathjen F, G, Schachner M. *L1 mono- and polyclonal antibodies modify cell migration in early postnatal mouse cerebellum.* Nature (1983); **305**:427-30.
- Linnemann D, Raz A, and Bock E. Differential expression of cell adhesion molecules in variants of the K1735 melanoma cells differing in metastatic capacity. Int J Cancer (1989);**43**: 709-12.
- Lo S, K., Everitt J, Gu J und Malik A, B. *Tumor necrosis factor mediates experimental pulmonary edema by ICAM-1 and Cd18-dependent mechanisms.* J Clin Invest (1992);**89**: 981-8.
- Lorant D, E, Topham M, K., Whatley R, E., McEver R, P., McIntyre T, M., Prescott S, M. und Zimmerman G, A. *Inflammatory roles of P-Selektin.* J Clin Invest (1993);**92**: 559-70.
- Loftus J, C., Smith J, W., and Ginsberg M, H. *Examination of the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex and its interaction with fibrinogen and other ligands by electron microscopy.* J Biol Chem (1994);**269**: 25235-8.
- Mackay C, R, Marston W, L. und Dudler L. *Naive and memory T Cells show distinct pathways of lymphocyte recirculation.* J Exp Med (1990);**171**: 801-17.
- Mackay C, R., Marston W und Dudler L. *Altered patterns of T-cell migration through lymph nodes and skin following antigen challenge.* Eur J Immunol (1992);**22**: 2205-10.
- Mackay C, R. *Immunological memory.* Adv Immunol (1993);217-65.
- Makgoba M, W., Sanders M, E., Luce G, Dustin M, L., Springer T, A., Clark E, A., Mannoni P, and Shaw S. *ICAM-1 is a ligand for LFA-1-dependent adhesion of B, T and myeloid cells.* Nature (1988);**331**: 86-8.
- Manning D, R. and Brass L, S. *The role of GTP-binding proteins in platelets activation.* Thromb Haemost (1991);**66**: 393-9.
- Martin S, D. and Springer T. A. *Purified intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1).* Cell (1987);**51**: 813-9.
- Martini R and Schachner M. *Immunoelectron microscopic localization of neural cell adhesion molecules (L1, N-CAM und MAG) and their shared carbohydrate epitope and myelin basic protein in developing sciatic nerve.* J Cell Biol (1986);**103**: 2439-48.
- Masumoto A and Hemler M, E. *Mutation of putative divalent cation sites in the $\alpha 4$ subunit of the intergrin VLA-4: Distinct effects on adhesion to CS1/fibronectin, VCAM-1 und invasin.* J Cell Biol (1993);**123**: 245-53.
- Maxfield S, R., Moulder K, Koning F, Elbe A, Stingle G, Colligan J, E., Schevach E, M., and Yokoyama W, M. *Murine T cells express a cell surface receptor for multiple extracellular matrix proteins. Identification and characterization with monoclonal antibodies.* J Exp Med (1989);**169**: 2173-90.
- McEver R, P. *Leucocyte-endothelial cell interaction.* Curr Opin Cell Biol (1992);**4**: 840-9.
- Merkenschlager M, Benoist C und Mathis D. *Evidence for single-niche model of positive selection.* Proc Natl Acad Sci U S A (1994);**91**: 11694-8.
- Miura M, Kobayashi M, Asou H, Uyemura K. *Molecular cloning of cDNA encoding the rat neural cell adhesion molecule L1. Two L1 isoforms in the cytoplasmic region are produced by differential splicing.* FEBS Lett (1991); **289**:91-5.
- Molossi S, Elices M, Arrhenius T, Rabinovitch M. *Lymphocyte transendothelial migration toward smooth muscle cells in interleukin-1 beta-stimulated co-cultures is related to fibronectin interactions with alpha 4 beta 1 and alpha 5 beta 1 integrins.* J Cell Physiol (1995); **164**:620-33.

- Montgomery A, M., Becker J, C., Chi-Hung Siu, Lemmon V, P., Cheresch D, A., Pancook J, D, Xiaoning Zhao, Reisfeld R, A.; *Human neural cell adhesion molecule L1 and rat homologue NILE are ligands for integrin $\alpha V\beta 3$* . J Cell Biol (1996); **132**:475-85.
- Moore K, L., Patel K, D., Bruehl R, E., Fugang L, Johnson D, A., Lichtenstein H, S., Cummings R, D., Bainton D, F., and McEver R, P. *P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin*. J Cell Biol (1995);**128**: 661-70.
- Moos M, Tacke R, Scherer H, Teplow D, Früh K, Schachner M. Neural adhesion molecule L1 as a member of the immunoglobulin superfamily with binding domains similar to fibronectin. Nature (1988); **334**:701-3.
- Mould A, P., Askaris J, A., Craig S, E., Garratt A, N., Clements J und Humphries M, J. *Integrin $\alpha 4\beta 1$ -mediated melanoma cell adhesion and migration on vascular cell adhesion molecule-1 and the alternatively spliced IIIICS region of fibronectin*. J Biol Chem (1994);**269**: 27224-30.
- Moulder K, Roberts K, Shevach E, M. und Coligan JE. *The mouse vitronectin receptor is a T cell activation antigen*. J Exp Med (1991);**173**: 343-7.
- Mujoo K, R., Spiro C, and Reisfeld R, A. Characterization of a unique glycoprotein antigen expressed on the surface of human neuroblastoma cells. J Biol Chem (1986);**261**: 10299-309.
- Muller W, A, Weigl S, A, Deng X, Phillips D, M. *PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes*. J Exp Med (1993); **178**:449-60.
- Murzin A, G. *Structural principles for the propeller assembly of beta-sheets: the preference for seven-fold symmetry*. Proteins (1992);**14**: 191-201.
- Norgard K, E., Moore K, L., Diaz S, Stults N, L., Ushiyama S, McEver R, P., Cummings R, D. und Varki A. *Characterization of specific ligand for P-selectin on myeloid cells*. J Biol Chem (1993);**268**: 12764-74.
- Nortamo P, Li R, Renkonen R, Timonen T, Prieto J, Patarroyo M und Gahmberg C, G. *The expression of human intercellular adhesion molecule-2 is refractory to inflammatory cytokines*. Eur J Immunol (1991);**21**: 2629-32.
- Ohmori K, Takada A, Yoneda T, Buma Y, Hirashima K, Tsyuoka K, Hasekwa A und Kannagi R. *Differentiation-dependent expression of sialyl stage-specific embryonic antigen-1 and I-antigens on human lymphoid cells and its implication for carbohydrate-mediated adhesion to vascular endothelium*. Blood (1993);**81**: 101-11.
- O'Neill H, C. *Isolation of thymus homing lyt-2-,L3T4-T-cell line from mouse spleen*. Cell Immunol (1987);**109**: 222-30.
- O'Neill H, C. *Antibody which defines a subset of bone marrow cells that can migrate to the thymus*. Immunology (1989);**109**: 59-65.
- O'Neill H, C., Ni K und Neill T, J. *Lymphoid precursor cell lines have capacity to migrate to multiple lymphoid sites*. Immunology (1992);**76**: 631-5.
- Oppenheimer-Marks N, Davis L, S., Tompkin D, Ramberg J, and Lipsky P, E. *Differential utilization of ICAM-1 and VCAM-1 during the adhesion and transendothelial migration of human T-lymphocytes*. J Immunol (1991);**147**: 2913-21.
- Oppenheimer-Marks N and Lipsky P, E. *Transendothelial migration of T cells in chronic inflammation*. Immunologist (1994);**2**: 58-64.
- Osborne L, Hession C, Tizard R, Vasollos C, Lühowskyj S, Chi R, G. und Lobb R. *Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes*. Cell (1989);**56**: 1203-11.

- Osborne L, Vassallo C und Benjamin C, D. *Activated endothelium binds lymphocytes through novel binding site in the alternatively spliced domain on vascular cell adhesion molecule-1*. J Exp Med (1992);**176**: 99-107.
- O'Tool T, E., Loftus J, C., Du X, P., Glass A, A., Ruggeri Z, M., Shattil S, J., Plow E, F. und Ginsberg M, H. *Affinity modulation of the $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin is an intrinsic property of the receptor*. Cell Regul (1991);**1**: 883-93.
- Pancock J, D., Reisfeld RA, Varki N, Vitiello A, Fox R, I., and Montgomery A, M. *Expression and regulation of the neural cell adhesion molecule L1 on human cells of myelomonocytic and lymphoid origin*. J Immunol (1997);**158**: 4413-21.
- Parise L, V., Helgerson S, L., Steiner B, Nannizzi L und Phillips D, R. *Synthetic peptides derived from fibrinogen and fibronectin change the conformation of purified platelet glycoprotein IIb-IIIa*. J Biol Chem (1987);**262**: 12597-602.
- Pepinsky B, Hession C, Chen L, L., Moy P, Burkly L, Jakubowski A, Chow E, P., Benjamin C, Chi-Rosso G, Luhowskyi S et al. *Structure and function studies on vascular cell adhesion molecule-1*. J Biol Chem (1992);**267**: 17820-6.
- Phillips D, R., Charo I, F. und Scarborough R, M. *GP1Ib-IIIa: the responsive integrin*. Cell (1991);**65**: 359-62.
- Piali L, Hammel P, Uherek C, Bachmann F, Gisler R, H., Dunon D und Imhof B, A. *CD31/PECAM-1 is a ligand for $\alpha V\beta_3$ integrin involved in adhesion of leukocytes to endothelium*. J Cell Biol (1995);**130**: 451-60.
- Picker L, J., Terstappen L, W., Rott L, S., Streeter P, R., Stein H und Butcher E, C. *Differential expression of homing-associated adhesion molecules by T cell subsets in man*. J Immunol (1990);**145**: 3247-55.
- Picker L, J., Michie S, A., Rott L, S. und Butcher E, C. *A unique phenotype of skin associated lymphocytes in humans. Preferential expression of HECA-452 epitope by benign and malignant T-cells at cutaneous sites*. J Pathol (1990);**136**: 1053-68.
- Picker L, J., Kishimoto, Smith C, W., Warnock R, A., and Butcher E, C. *ELAM-1 is an adhesion molecule for skin-homing T- cells*. Nature (1991);**349**: 796-9.
- Picker L, J. *Mechanisms of Lymphocyte homing*. Curr Opin Biol (1992);**4**: 277-86.
- Picker L, J. and Butcher E, C. *Physiological and molecular mechanisms of lymphocyte homing*. Annu Rev Immunol (1993);**10**: 561-91.
- Pohlman T, H., Munford R, S. und Harlan J, M. *Deacylated lipopolysaccharide inhibits neutrophil adherence to endothelium induced by lipopolysaccharide in vitro*. J Exp Med (1987);**165**: 1393-402.
- Poltorak M, Shimoda K, and Freed W, J. *Cell adhesion molecules (CAMs) in adreanal medulla in situ and in vitro: enhancement of chromaffin cell L1/Ng-CAM expression by NGF*. Exp Neurology (1990);**110**: 52-72.
- Poltorak M, Herranz A, S, Williams J, Lauretti L, Freed W, J. *Effects of frontal cortical lesions on mouse striatum: reorganization of cell recognition molecule, glial fiber und synaptic protein expression in the dorsomedial striatum*. J Neurosci (1993); **13**:2217-29.
- Rabinovich H, Lin W, Amoscato A, Heberman R, B. und Whitside T, L. *Expression of vitronectin receptor on human NK cells and its role in protein phosphorylation*. J Immunol (1995);**154**: 1124-35.
- Rathjen F, G, Schachner M. *Immunocytological and biochemical characterization of a new neuronal cell surface component (L1 antigen) which is involved in cell adhesion*. EMBO (1984); **3**:1-10.
- Reid RA, Hemperly JJ. *Variants of human L1 cell adhesion molecule arise through alternate splicing of*

- RNA. *J Mol Neurosci* (1992); **3**:127-35.
- Richter-Landsberg C, Lee V, M., Salton, S, R, J., Shelanski M, L., Greene L, A. *Release of NILE and other glycoproteins from cultured PC12 rat pheochromocytoma cells and sympathetic neurons.* *J Neurochem* (1984);**43**: 841-8.
- Rosen S. *L-selectin and its biological ligands.* *Histochemistry* (1993);**100**: 185-91.
- Rothenberg E. *The development of functionally responsive T cells.* *Adv Immunol* (1992);**51**: 85-215.
- Rouslathi E, Hayman E, G., Engvall E, Cothran W, C. und Butler W, T. *Alignment of biologically active domains in the fibronectin molecules.* *J Biol Chem* (1981);**256**: 7277-81.
- Ruegg C, Postigo A, A., Sikorski E, E., Butcher E, C., Pytela R und Erle D, J. *Role of the intergin alpha 4 beta P in lymphocyte adherence to fibronectin and VCAM-1 and in homotypic cell clustering.* *J Cell Biol* (1992);**117**: 179-89.
- Ruiz P, Dunon D, Sonnenberg A und Imhof B, A. *Suppression of mouse melanoma metastasis by EA-1, a monoclonal antibody specific for alpha 6 integrin.* *Cell Adhesion Commun* (1993);**1**: 67-81.
- Ruppert M, Aigner S, Hubbe M, Yagita H, Altevogt P. *The L1 adhesion molecule is a cellular ligand for VLA-5.* *J Cell Biol* (1995); **131**:1881-91.
- Sadoul K, R., Sadoul A, Faissner A, and Schachner M. *Biochemical characterization of different molecular forms of neural cell adhesion molecule L1.* *J neurochem* (1988);**50**: 510-21.
- Sako D, Chang X, L., Barone K, M., Vachino G, White H, M., Shaw G, Veldman G, M., Bean K, M., Ahern T, J., Furie B et al. *Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin.* *Cell* (1993);**75**: 1179-86.
- Salcedo R, Patarroyo M. *Constitutive alpha V beta 3 integrin-mediated adhesion of human lymphoid B cells to vitronectin substrate.* *Cell Immunol* (1995); **160**:165-72.
- Sammar M, Aigner S, Hubbe M, Schirmacher V, Schachner M, Vetsweber D, and Altevogt P. *Heat-stable antigen (CD24) as ligand for mouse P-selectin.* *Int Immunol* (1994);**6**: 1027-32.
- Schleffenbaum B, Spertini O und Tedder T, F. *Soluble L-selectin is present in human plasma at high levels and retains functional activity.* *J Cell Biol* (1992);**119**: 229-38.
- Schweighoffer, Tanaka Y, Tidwell M, Erle D, J., Horgan K, J., Luce G, E., Lazarovits A, Buck D und Shaw S. *Selective expression of integrin $\alpha 4 \beta 7$ on a subset of human CD4⁺ memory T cells with hallmarks of gut-trophism.* *J Immunol* (1993);**151**: 717-29.
- Seilheimer B, Persohn E und Schachner M. *Antibodies to the L1 adhesion molecule inhibit Schwann cell ensheathment of neurons in vitro.* *J Cell Biol* (1989);**109**: 3095-103.
- Shattil S, J., Hoxie J, A., Cunningham und Brass L, F: *Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex during activation.* *J Biol Chem* (1985);**260**: 11107-14.
- Shimizu Y, Shaw S, Graber N, Gopal TV, Horgan KJ, Van Seventer GA, Newman W. *Activation-independent binding of human memory T cells to adhesion molecule ELAM-1.* *Nature* (1991); **349**:799-802.
- Simmons D, L. *Cellular Interactions in development. A practical approach.* (1993), Oxford; IRL press
- Simon H, Klinz S, Fahrig T, Schachner, M. *Molecular association of the neural adhesion molecules L1 and N-CAM in the surface membrane of neural of neuroblastoma cells is shown by chemical cross-linking.* *Eur J Neurosci* (1991);**3**: 634-40.
- Sligh J, E., Ballantyne C, M., Rich S, Hawkins H, K., Smith C, W., Bradley A und Beaudet A, L. *Inflammatory and immune response are impaired in mice deficient intercellular adhesion molecules.* *Proc Natl Acad Sci U S A* (1993);**90**: 8529-33.

- Smith J, W and Cheresh D, A. *Integrin ($\alpha V\beta 3$)-ligand interaction. Identification of a heterodimeric RGD binding site on the vitronectin receptor.* J Biol Chem (1990);**265**: 2168-72.
- Smith C, H., Barjker J, N., Morris R, W., MacDonald D, M. und Lee T, H. *Neuropptides induce rapid expression of endothelial cell adhesion molecules and elicit granulocyte infiltration in human skin.* J Immunol (1993);**151**: 3274-782.
- Smyth S, S., Joneckis C, C., and Parise L, V. *Regulation of vascular integrins.* Blood (1993);**81**: 2827-32.
- Solomon D, R., Mojcik C, F., Chang A, C. und Shevach E, M. *Constitutive activation of integrin $\alpha 4\beta 1$ defines a unique stage of human thymocytes development.* J Exp Med (1994);**179**: 1573-84.
- Sonnenberg A. *Integrins and their ligands.* Curr Topics Microbiol Immunol (1993);**184**: 7-35.
- Springer T, A. *Adhesion receptors of the immunsystem.* Nature (1990);**346**: 425-34.
- Springer T, A. *Traffic signals for lymphocytes recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm.* Cell (1994);**76**: 301-14.
- Springer T, A. *Folding of the N-terminal, ligand-binding region of integrin α -subunits into a β -propeller domain.* Proc Natl Acad Sci U S A (1997);**94**: 65-72.
- Staatz W, D, Rajpara S, M., Wayner E, A., Carter W, G. und Santoro S, A. *The membrane glycoprotein Ia-IIa (VLA-2) complex mediates the Mg^{2+} -dependent adhesion of platelets to collagen.* J Cell Biol (1989);**108**: 1917-24.
- Stallcup W, B. and Beasley L. Brain Res (1985);**346**: 287-93.
- Stanley P, Bates P, A., Harvey J, Bennett R, I. und Hogg N. *Integrin LFA-1 a subunit contains an ICAM-1 binding site in domain V and Vi.* EMBO (1994);**13**: 1790-8.
- Staunton D, E., Dustin M, L. und Springer T, A. *Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1.* Nature (1989);**331**: 61-4.
- Steegeimer M, Levinovitz A, Isenmann S, Borges E, Lenter M, Hocher H, P., Kleuser B, and Vestweber D. *The E-selectin-ligand ESL-1 is a variant of a receptor for fibroblast growth factor.* Nature (1995);**373**: 615-20.
- Strauch U, G., Lifka A, Gosslar U, Kilshaw P, J., Clements J und Holzmann B. *Distinct binding specificities of integrin $\alpha 4\beta 7$, $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha IEL\beta 7$.* Int Immunol (1994);**6**: 263-75.
- Streeter P, R., Berg E, L., Rouse B, T., Bargatze R, F. und Butcher E, C. *A tissue-specific endothelial cell molecule involved in lymphocyte homing.* Nature (1988);**331**: 41-6.
- Sugama Y, Tiruppathi C, Janakividi K undersen T, T., Fenton II J, W. und Malik A, B. *Thrombin-induced expression of endothelial P-selectin and intercellular adhesion molecule 1: A mechanism for stabilizing neutrophil adhesion.* J Cell Biol (1992);**119**: 935-44.
- Takahashi K, Nakamura T, Koyanagi M, Kato K, Hashimoto Y, Yagita H, and Okamura K. *A murine very late antigen-like extracellular matrix receptor involved in CD2- and lymphocyte function-associated antigen 1-independent killer-target cell interaction.* J Immunol (1990);**145**: 4371-9.
- Tukwell D, S., Brass A, and Humphries M, J. *Homology modelling of integrin EF-hands. Evidence for widespread use of a conserved cation-binding site.* Biochem J (1992);**285**: 325-31.
- van Ewijk W. *T-cell differentiation is influenced by thymic microenvironments.* Annu Rev Immunol (1991);**183**: 1-15.
- van Kook Y, Weder P, Hogervorst F, V, A., van Seventer G, te Velde A, A., Borst J, Keiser G, D. und Figdor C, C. *Activation of LFA-1 through a Ca^{2+} -dependent epitope stimulates lymphocyte adhesion.* J Cell Biol (1991);**112**: 345-54.
- Vaporciyan A, A, DeLisser HM, Yan HC, Mendiguren II, Thom SR, Jones ML, Ward PA, Albelda SM.

- Involvement of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 in neutrophil recruitment in vivo.* Science (1993); **262**:1580-2.
- von Boehmer H. Thymic selection: a matter of life and death. Immunol Today (1992);**13**: 742-4.
- von Boehmer H. *The developmental biology of T lymphocytes.* Ann Rev Immunol (1993);**6**: 309-26.
- Wada J, Kumar A, Liu Z, Rouslahti E, Reichardt L, Marvaldi J und Kanvar Y, S. *Cloning of mouse integrin αV cDNA and role of αV -related matrix receptors in metanephric development.* J Cell Biol (1996);**132**: 1161-76.
- Wayner E, A., Garcia-Pardo A, Humphries M, J., McDonald J, A. und Carter W, G. *Identification and characterization of the T lymphocyte adhesion receptor for an alternative cell attachment domain CS1 in plasma fibronectin.* J Cell Biol (1989);**109**: 1321-30.
- Wayner E, A., Orlando R, A., Cheresh DA. *Integrins $\alpha V\beta 3$ and $\alpha V\beta 5$ contribute to cell attachment to Vitronectin but differentially distribute on the cell surface.* J Cell Biol (1991); **113**:919-29.
- Wayner EA, Gil SG, Murphy GF, Wilke MS, Carter WG. *Epiligrin, a component of epithelial basement membranes, is an adhesive ligand for alpha 3 beta 1 positive T lymphocytes.* J Cell Biol (1993); **121**:1141-52.
- Weller A, Isenmann S und Vestweber D. *Cloning of the mouse endothelial selectins: Expression of both E- and P-selectin is inducible by tumor necrosis factor- α .* J Biol Chem (1992);**267**: 15176-83.
- Westermann J, Blaschke V, Zimmermann G, Hirschfeld U, and Pabst R. *Random entry of circulating lymphocyte subsets into peripheral lymph nodes and Peyer's patches: no evidence in vivo of tissue-specific migration of B and T lymphocytes at the level of high endothelial venules.* Eur J Immunol (1992);**22**: 2223
- Westermann J, Nagahori Y, Walter S, Heerwagen C, Miyasaka M, and Pabst R. B. *T lymphocyte subsets enter peripheral lymph nodes and Peyer'sche patches without preference in vivo: no correlation occurs between their localization in different types of high endothelial venules and the expression of CD44, VLA-4, LFA-1, ICAM-1, CD2 or L-selectin.* Eur J Immunol (1994);**24**: 2312-6.
- Yamada K, M. *Adhesive recognition sequence.* J Biol Chem (1991);**266**: 12809-12.
- Yasuda M, Hasunuma Y, Adachi H, Sekine C, Sakanichi T, Hashimoto C, Ra C, Yagita H und Okumura K. *Expression and function of fibronectin binding integrins on rat mast cells.* Int Immunol (1995);**7**: 251-6.
- Zanettio A, C., Berndt M, C., Butcher C, Butcher E, C., Vadas M, and Simmons P, J. *Primitive human hematopoietic progenitors adhere to P-selectin (CD62P).* Blood (1995);**85**: 3466-71.

Wissenschaftlicher Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Duczmal, Andreas
Geburtsdatum:	22.09.63
Geburtsort:	Hannover
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Wissenschaftlicher Werdegang

1985

Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

1986 bis 1993

Studium der Biologie an der Universität Hannover

Diplomprüfungsfächer:

Zoologie
Mikrobiologie
Biochemie
Virologie

Diplomarbeit:

Thema: Herstellung und Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern gegen *Campylobacter jejuni*;

Bei: Prof. Bitter-Suermann, Medizinische Hochschule Hannover, Institut für medizinische Mikrobiologie;

Gesamtnote: sehr gut

Februar 1993 bis August 1993

Wissenschaftliche Arbeit am *Max-Planck-Institut für Immunbiologie*, Freiburg;
Gegenstand der Arbeit: Escape Mechanismen von Adenoviren;

September 1993 bis Dezember 1996

Wissenschaftliche Arbeit am *Deutschen Krebsforschungszentrum*, Heidelberg;
Abt. Tumorimmunologie, Prof. Schirmacher
Gegenstand der Arbeit: Untersuchungen zur Funktion des humanen L1 Moleküls;

Publikationen:

Ebeling O, Duczmal A, Aigner S, Schöllhammer S, Kemshead JT., Möller P, Schwartz-Albiez R, Altevogt P. *L1 adhesion molecule on human lymphocytes and monocytes: expression and involvement in binding to $\alpha V\beta 3$ integrin*. Eur J Immunol (1996); **26**:2508-16.

Duczmal A, Schöllhammer S, Katich S, Ebeling O, Schwartz-Albiez R, Altevogt P. *The L1 adhesion molecule supports $\alpha V\beta 3$ -mediated migration of human tumor cells and activated T lymphocytes*. Biochem Biophys Res Comm (1997)

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich (Andreas Duczmal, geb am 22-09-1963) eidesstattlich,

- 1) daß ich die Dissertation selbständig verfaßt habe und alle verwendeten Hilfsmittel und Hilfeleistungen angegeben habe;
- 2) daß die Dissertation weder als Diplomarbeit, noch als ähnliche Prüfungsarbeit verwendet habe.

Solingen, den 01-12-97

(Andreas Duczmal)