

Jens Lohr
Dr. med.

Funktionelle Untersuchung des VLA-4 Integrins der Maus - Mutagenese und Herstellung transfizierter Zell-Klone

Geboren am 18.6.1970 in Ziegenhain
Reifeprüfung am 18.5.89 in Homberg/Efze
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1990/91 bis WS 1996/97
Physikum am 7.9.1992 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in New Orleans und Heidelberg
Staatsexamen am 27.5.1997 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach (Institut): Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)
Doktorvater: PD Dr. rer. nat. Hans-Peter Altevogt

Das Integrin VLA-4 besitzt als Adhäsionsmolekül eine Vielzahl pathologischer und physiologischer Aufgaben und ist wesentlicher Bestandteil der sogenannten Adhäsionskaskade, die die Extravasation von Leukozyten aus der Blutbahn in umliegende Gewebe veranlaßt. Die Gruppe der Integrine besteht aus Heterodimeren zweier nicht kovalent miteinander verbundener Ketten. Die Ketten alpha-4 und beta-1 bilden das VLA-4. In verschiedenen Arbeiten wurde gezeigt, daß kurze Peptidabschnitte der VLA-4-Liganden VCAM-1 und CS-1-Peptid, ein Fragment des Fibronectins, für Adhäsionsvermittlung verantwortlich sind. Durch Vergleich homologer Sequenzabschnitte von VLA-4 und seinen Liganden ließ sich ein drei Aminosäuren langer Molekülabschnitt postulieren, der eine essentielle Rolle für die Bindungsvermittlung spielt: die Sequenz Leucin-Asparaginsäure-Valin, die auch in der alpha-4-Kette dreimal vorkommt.

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels „site directed mutagenesis“ die potentiell Kation-komplexierende Asparaginsäure an diesen Stellen jeweils gegen Asparagin ausgetauscht und die mutierten alpha-4 DNAs in ein eukaryontisches Expressionssystem kloniert. Die T-Lymphom Zelllinie BW 5147 wurde mit diesen DNA-Konstrukten transfiziert und einzelne Klone durchflußzytometrisch und biochemisch etabliert. Die Ergebnisse zeigen, daß sich die Mutationen an den Stellen 489, 698 der Aminosäuresequenz nicht auf das Bindungsverhalten der BW-Zellen an die 7 Domänen-Form des VCAM-1 auswirken und sowohl mutierte als auch nicht mutierte Formen stark binden. Homotypische Aggregation der transfizierten BW-Zellen nach Inkubation mit stimulierendem anti-alpha-4 Antikörper hingegen ließ sich nicht auslösen, ebensowenig wie Koaggregation mit alpha-4/beta-7-tragenden Tk-1-Zellen, hinweisend darauf, daß homotypische Bindung an anderer Stelle vermittelt wird als VCAM-1-vermittelte Bindung. In Weiterführung der Experimente in unserer Arbeitsgruppe konnte von Y. Zeller nach Transfektion der in der vorliegenden Arbeit erzeugten Konstrukte in eine Fibroblasten-Zelllinie, die in nativer Form eine vielfach höhere Expression der beta-1-Kette aufweist als BW-Zellen, gezeigt werden, daß Mutationen der Stellen 698 und 811 eine signifikante Verringerung des Bindungsvermögens von VLA-4 an das Fibronectin-Fragment FN40 und an eine VCAM-1 Deletionsmutante bewirken.

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit die Grundlagen für die Etablierung der Leucin-Asparaginsäure-Valin-Sequenzabschnitte an den Stellen 698 und 811 der Peptidkette als wesentlich für die Funktion von alpha-4/beta-1 gelegt werden, dessen Funktion außerdem von der gleichzeitigen Oberflächenexpression der beta-1-Kette abhängt. Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß die Bindung an den Liganden VCAM-1 zumindest teilweise an anderer Stelle des alpha-4-Moleküls vermittelt wird als homotypische Bindung. Ferner wurde ein Konstrukt zur Herstellung eines löslichen alpha-4-Fragmentes generiert als Basis für neue Assaysysteme.