

Charité – Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin  
Aus dem Institut für Physiologie  
Direktor Prof. Dr. med. A. R. Pries

# Hemmung von Leukozytenrollen durch Selektin-Peptide in vivo

**Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der  
Medizinischen Doktorwürde  
der Charité - Universitätsmedizin Berlin**

vorgelegt von Christoph Scheduling  
aus Herford

Referent: Prof. Dr. A. R. Pries

Korreferent: Prof. Dr. W. Reutter

Gedruckt mit Genehmigung der Charité - Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 17.12.2004

## **0 Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>S.5</b>
1.1	Adhäsionsmoleküle	S.7
1.1.1	Integrine	S.7
1.1.2	Immunglobulin-Superfamilie	S.8
1.2	Selektine und deren Liganden	S.9
1.2.1	P-Selektin	S.10
1.2.2	L-Selektin	S.11
1.2.3	E-Selektin	S.12
1.2.4	Selektin-Liganden	S.13
1.2.4.1	P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1	S.14
1.2.5	Zusätzliche Funktionen der Selektine	S.15
1.3	Klinische Bedeutung der Selektine	S.16
1.4	Inhibitoren der Selektinfunktion	S.17
1.4.1	Selektin-Peptide	S.17
1.5.	Fragestellung	S.18
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>S.20</b>
2.1	Versuchsvorbereitung	S.20
2.1.1	Versuchstiere	S.20
2.1.1.1	Vorbereitung der Versuchstiere	S.20
2.1.1.2	Narkose	S.20
2.1.1.3	Präparation	S.20
2.1.2	Reagentien	S.21
2.1.2.1	Selektin-Peptide	S.21
2.1.2.2	Kontrollösung	S.22
2.1.3	Mikroinjektionspipetten	S.23
2.1.4	Intravitalmikroskopie	S.23
2.1.5	Aufzeichnung	S.24
2.2.	Versuchsdurchführung	S.24
2.2.1	Rahmenbedingungen	S.24

2.2.2	Mikroinjektionsversuch	S.25
2.3	Versuchsauswertung	S.27
2.3.1	Flux rollender Leukozyten	S.27
2.3.2	Weitere Ergebnisse	S.28
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>S.31</b>
3.1	Zählung rollender Leukozyten im Durchlicht	S.32
3.2	Selektin-Peptide	S.36
3.2.1	Peptide aus der Lektin-Domäne des P-Selektin	S.37
3.2.2	Peptide aus der Lektin-Domäne des L-Selektin	S.39
3.2.3	Peptide aus der Lektin-Domäne des E-Selektin	S.40
3.3	Wirkungsveränderung aktiver Peptide über die Zeit	S.41
3.4	Außergewöhnliche Peptideffekte	S.42
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>S.44</b>
4.1	Zur Methodik	S.44
4.1.1	Beurteilung von Faktoren, die die Meßergebnisse beeinflussen	S.46
4.2	Oligopeptide und Leukozytenadhäsion	S.47
4.2.1	Schlußfolgerungen über den Wirkungsmechanismus der Selektinpeptide	S.51
4.2.2	Wirkung des E-Selektin-Peptides E109-118	S.52
4.3	Selektin-Peptide in der Behandlung von entzündlichen Erkrankungen	S.53
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>S.55</b>
<b>6</b>	<b>Anhang</b>	<b>S.57</b>
6.1	Literatur	S.57
6.2	Abkürzungsverzeichnis	S.66
6.3	Ein-Buchstaben-Code der Aminosäuren	S.67
6.4	Publikation	S.67
6.5	Tierversuchsgenehmigung	S.67

6.6	Danksagung	S.68
6.7	Lebenslauf	S.69

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Bevor Leukozyten aus dem Gefäßsystem emigrieren, rollen sie an der Venolenwand entlang und können erst danach fest am Endothel haften. Das Leukozytenrollen wird hauptsächlich durch die kohlenhydratbindenden, lektinartigen Domänen einer Familie von Adhäsionsmolekülen, der Selektine, vermittelt.

Mehrere Klassen von Wirkstoffen sind in der Lage, Leukozytenrollen durch Interaktion mit der Selektin-vermittelten leukozytären Adhäsion *in vitro* zu reduzieren. Dazu gehören auch Oligopeptide, deren Sequenz einzelner Abschnitte der Lektin-Domänen von P-, L- und E-Selektin entspricht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Effekt von fünfzehn verschiedenen Selektin-Peptiden auf das Leukozytenrollen *in vivo* zu untersuchen. Dazu wurden diese Peptide in verschiedenen Konzentrationen mit Hilfe von Mikropipetten in Venolen des ausgelagerten Mesenteriums anästhesierter Ratten injiziert. Die Zahl rollender Leukozyten pro Zeiteinheit (Flux rollender Leukozyten) unter den Injektionen wurde bestimmt und mit denen in den Kontrollperioden verglichen.

Die vorliegende Arbeit konnte erstmals zeigen, daß Selektin-Peptide Leukozytenrollen *in vivo* inhibieren. Sechs Selektin-Peptide (P54-63, P70-79, P109-118, L11-20, L54-63 und E23-30) führten zu einer signifikanten Reduktion des Leukozytenrollens um 50 bis 80% des Ausgangswertes. Die beiden wirksamsten Peptide L11-20 und P70-79 lagen mit halbeffektiven Konzentrationen von ca. 10µg/ml bzw. ca. 100µg/ml etwa in dem Dosiswirkungsbereich der Oligosaccharide Dextransulfat und Fucoidin.

In unseren Versuchen inhibierten weniger Selektin-Peptide die leukozytäre Adhäsion als in vorangegangenen *in vitro*-Untersuchungen (Heavner et al., 1993, Geng et al., 1992). Es bestanden zudem deutliche Diskrepanzen zu den *in vitro*-Daten in Bezug auf die Wirksamkeit der Peptide je nach Abschnitt der Lektin-Domäne. Diese Beobachtungen illustrieren die Wichtigkeit der Testung von Wirksubstanzen in komplexen *in vivo*-Systemen.

Die Tatsache, daß die Selektin-Oligopeptide in unseren Untersuchungen keine zeitliche Wirkpräferenz aufweisen, unterstützt die aus den in vitro-Versuchen hervorgegangene Vermutung, daß sie P-, L- und E-Selektin-Liganden-Interaktionen inhibieren können.

Die Abschnitte der Lektin-Domänen, aus denen in unseren und in den vorangegangenen in vitro-Versuchen wirksame Peptide hervorgegangen sind, unterscheiden sich deutlich von dem durch Kristallstrukturanalysen und Punktmutationsstudien vorgeschlagenen Hauptbereichen der Ligandenbindung der Lektin-Domäne.

Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, daß Selektin-Peptide nicht durch einen kompetitiven Antagonismus der Selektin-Liganden-Interaktion wirken.

Weitere Untersuchungen sind notwendig um die Selektin-Liganden-Interaktion besser zu verstehen und die Hemmung der Selektinfunktion zu optimieren.

Da nach dem derzeitigen Erkenntnisstand Leukozytenemigration nicht ohne das vorgeschaltete Rollen entlang der Endothelwand stattfinden kann, böten Inhibitoren der Selektin-Funktion, zum Beispiel Oligopeptide analog der Lektin-Domäne der Selektine einen interessanten Ansatz zur Behandlung zahlreicher Erkrankungen, die mit pathologischer Leukozytenemigration einhergehen.