

1. EINLEITUNG

"Calor, Rubor, Dolor, Tumor, Functio laesa". Das sind die seit dem klassischen Altertum bekannten Kardinalsymptome der Entzündungsreaktion. Sie sind im klinischen Alltag regelmäßig zu beobachten.

Die Entzündungsreaktion ist ein grundlegendes Antwortmuster des Organismus auf exogene und endogene Stressoren. Als solche können eindringende Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten sowie physikalische oder chemische Noxen wirken. Die Entzündung kann in lokalisierter oder generalisierter Form auftreten. (Metchnikoff, 1893; Spector und Willoughby, 1963). Beispiele hierfür sind Erkrankungen wie akute Meningitis, rheumatoide Arthritis oder Morbus Crohn. Auch eine Minderung der Energiezufuhr wie sie z.B. durch lokale Durchblutungsstörungen hervorgerufen werden kann, führt, insbesondere in der Phase der Reperfusion, zu Entzündungsreaktionen (Grisham et al., 1986; Thiagarajan et al., 1997).

Als Antwort auf das Einwirken einer Noxe kommt es zur Aussendung von Mediatorstoffen durch körpereigene und körperfremde Zellen. So wird durch verschiedene Stoffe eine Erweiterung und Permeabilitätssteigerung von Gefäßen hervorgerufen (Histamin, Serotonin, Arachidonsäureabkömmlinge, Kinine, etc.). Andere Substanzen wiederum ziehen Granulo- oder Monozyten chemotaktisch an, wie z.B. Leukotrien B₄, bakterielle Peptide wie fMLP (Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin), Komplementfaktor C5a oder auch der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) (Springer, 1994).

Bei den meisten akuten, bakteriellen Entzündungen, aber auch bei chronischen Entzündungsprozessen emigrieren Granulozyten aus der Blutbahn ins umliegende Gewebe zum Ort der Schädigung. Dort phagozytieren sie Bakterien oder andere schädigende Noxen, bauen sie in Lysosomen ab und setzen freie Radikale und lysosomale Enzyme wie z.B. Proteasen frei (Smolen und Boxer, 1990). Dieser Vorgang kann neben der Beseitigung bzw. Schädigung der eindringenden Noxe auch zu einer Schädigung des umliegenden Gewebes führen (Grisham et al. 1986; Weiss, 1989) und dadurch einen Krankheitsprozeß antreiben.

Die Emigration der Granulozyten verläuft in mehreren Teilschritten (Springer, 1994). An diesem Prozeß sind mehrere Klassen von Adhäsionsmolekülen beteiligt. Deren Expression

unterliegt einer komplexen Regulation, die die zeitliche und räumliche Ausdehnung sowie die Intensität des Entzündungsvorganges beeinflusst.

- In einem ersten Schritt kommt es zur *Marginalisation* der Leukozyten im Stromgebiet postkapillärer Venolen. Dieses geschieht vorrangig in Venolen ab 10µm aufwärts, in denen die Leukozyten von Erythrozyten, die sich aufgrund ihrer größeren Verformbarkeit in der Strommitte aufhalten (Axialmigration), an den Gefäßrand verdrängt werden (Schmidt-Schönbein et al., 1980). Zudem kann bei gesteigerter Aggregation der Erythrozyten diese hydrodynamische Marginalisation noch verstärkt werden (Nobis et al., 1985). Die Fließgeschwindigkeit des Leukozyten nimmt bei der Annäherung an die Gefäßwand aufgrund des paraboloiden Geschwindigkeitsprofils der Blutströmung weiter ab (Goldmann et al., 1967).

- Die Leukozyten können nun in einem zweiten Schritt mit dem Endothel der Venolen interagieren. Es kommt zur initialen Bindung an das Endothel („capture“)(Ley et al., 1995b). Daraufhin bewegen sie sich mit stark verminderter Geschwindigkeit am Endothel entlang. Dabei rotieren sie und bewegen sich gleichzeitig stromabwärts. Dieses Phänomen wird als „Rollen“ bezeichnet. Leukozytenrollen wird nur unter Bedingungen von fließendem Blut beobachtet, es ist das Ergebnis der Wechselwirkung von auf den Leukozyten einwirkenden Scherkräften und der Adhäsion zwischen Leukozyten und Endothelium.

„Capture“ und Leukozytenrollen sind die frühesten Formen einer molekularen Interaktion zwischen Leukozyten und Endotheloberfläche (Atherton und Born, 1972; Atherton und Born, 1973; Firrel und Lipowski, 1989; Ley et al., 1991a). Als Vermittler dieser Interaktionen fungieren vor allem die Selektine und ihre Liganden (Ley et al., 1991b; von Andrian et al., 1991), auf die im Verlauf der Einleitung noch detaillierter eingegangen wird. Das langsame Rollen der Leukozyten entlang der Gefäßwand erleichtert die Interaktion mit Botenstoffen aus dem entzündeten Gewebe, da die Passagedauer des Leukozyten durch den entzündeten Bereich drastisch verlängert wird.

Es erfolgt in einem weiteren Schritt die

- *Aktivierung* der Leukozyten durch Stoffe wie N-formyl-Peptide (z.B. FMLP), IL-5, C5a oder Chemokine wie IL-8, MCP-1 oder MIP-1β (Springer, 1994).

- Dadurch kommt es zu einer verstärkten de-novo Expression und Konformationsänderungen von bestimmten Molekülen auf der Leukozytenoberfläche, was zu einer *festen Adhäsion* dieser Zellen an der Endotheloberfläche führt.
- Im Anschluß daran können die Zellen durch Zelllücken und die Basalmembran hindurchwandern (*Transmigration*).

Die beiden letzteren Schritte werden von den Integrinen und deren Liganden aus der Immunglobulin-Superfamilie vermittelt (Scharfetter- Kochanek et al., 1998).

Dieser mehrschrittige Prozeß ist nicht nur typisch für die Emigration von Granulozyten und Monozyten in umliegendes Gewebe; auch im Rahmen der Zirkulation von Lymphozyten von der Blutbahn durch lymphatisches Gewebe in die Lymphgefäße und zurück ins Blut sind ausgeprägte Ähnlichkeiten auf der Ebene der molekularen Interaktionen zu obigen Vorgängen auffällig (Springer, 1994).

Durch die spezifische Hemmung der Funktion einzelner, an der leukozytären Emigration beteiligter Adhäsionsmolekülklassen (s.u.) und dadurch einzelner Teilschritte der Emigration, kann ein drastischer Rückgang der Zahl ins entzündete Gewebe emigrierter Zellen erreicht werden. Ähnliche Ergebnisse ließen sich bei fehlender Expression dieser Adhäsionsmoleküle beobachten. (Bosse et al., 1994; Pizcueta et al., 1994; Arfors et al., 1987; Arbones et al., 1994; Bullard et al., 1996; Frenette et al., 1996; Mayadas et al., 1993). Diese Ergebnisse unterstützen die Vorstellung, daß es sich bei den Einzelschritten um aufeinander aufbauende, kausal verknüpfte Schritte handelt.

1.1 Adhäsionsmoleküle

1.1.1 Integrine

Integrine sind transmembranäre Heterodimere, die aus je einer nichtkovalent verbundenen α - und β -Kette bestehen (Arnaut, 1990). Es sind bislang mindestens 8 β -Untereinheiten und 15 α -Untereinheiten bekannt. Integrine werden je nach ihren β -Untereinheiten in Gruppen unterteilt (Carlos et al., 1994). Für die feste Adhäsion als auch die Transmigration von Leukozyten sind vor allem die β_2 -Integrine LFA-1 (i.e. CD11a/CD18) und Mac-1 (i.e.

CD11b/CD18) sowie CD11c/CD18 (i.e. p150/95) verantwortlich, ebenso wie das β_1 -Integrin VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$, CD49d/CD29) sowie $\alpha_4\beta_7$ (Hynes, 1992; Lo et al., 1989; Carlos et al., 1994). Die meisten Integrine müssen zur Erlangung ihrer optimalen adhäsiven Funktion eine Konformationsänderung eingehen (Hynes, 1992). Durch monoklonale Antikörper, die gegen CD11b/CD18 (Mac-1) gerichtet sind, wird die feste Adhäsion von Granulozyten an das Endothel verhindert; deren Rollen bleibt hingegen unbeeinflusst (Arfors et al., 1987).

Die klinische Bedeutung leukozytärer Integrine zeigt sich an dem LAD (leukocyte-adhesion-deficiency)-1 Syndrom. Bei diesem angeborenen, autosomal-rezessiv vererbten Defekt fehlt die Expression von CD18, der gemeinsamen Kette der β_2 -Integrine (z.B. LFA-1, Mac-1) teilweise oder völlig (Anderson et al., 1987). Im intravitalmikroskopischen Versuch ließ sich zeigen, daß CD18-defiziente Leukozyten von LAD-1 Patienten noch ein normales Rollverhalten zeigen, es aber nicht mehr zu einer festen Adhäsion an das Endothel und somit auch nicht zu einer Emigration dieser Zellen in das umliegende, entzündete Gewebe kam (von Andrian, 1993). Das führt bei den Betroffenen zu einem schweren Krankheitsbild mit rezidivierenden, schweren bakteriellen Infektionen vor allem der Haut und Schleimhaut ohne Eiterbildung trotz ausgesprochen hoher systemischer Leukozytenzahlen (Belvilacqua, 1994).

1.1.2 Immunglobulin-Superfamilie

Bei den Molekülen der IgG-Superfamilie (IgSF-Adhäsionsmoleküle) handelt es sich um transmembranäre Proteine der Zelloberfläche, die neben Antigenerkennung, Komplementbindung und Signalübertragung auch Funktionen zellulärer Adhäsion vermitteln (Carlos et al., 1994).

ICAM-1 und ICAM-2 (intercellular-adhesion-molecule) sowie VCAM-1 (vascular-cell-adhesion-molecule) dienen als zelluläre Liganden von β_2 - und β_1 -Integrinen. PECAM-1 (platelet-endothelial-cell-adhesion-molecule) und β_2 - und β_1 - Integrine sind an der Transmigration beteiligt (Carlos et al., 1994).

Bei ICAM-1 defizienten Mäusen findet sich keine Reduktion der Fraktion rollender Leukozyten, allerdings eine deutlich erhöhte Rollgeschwindigkeit (Kunkel et al., 1996; Steeber et al., 1998). Dieser Befund deutet darauf hin, daß IgSF-Adhäsionsmoleküle synergistisch an optimalem Leukozytenrollen mitbeteiligt sind.

1.2 Selektine und deren Liganden

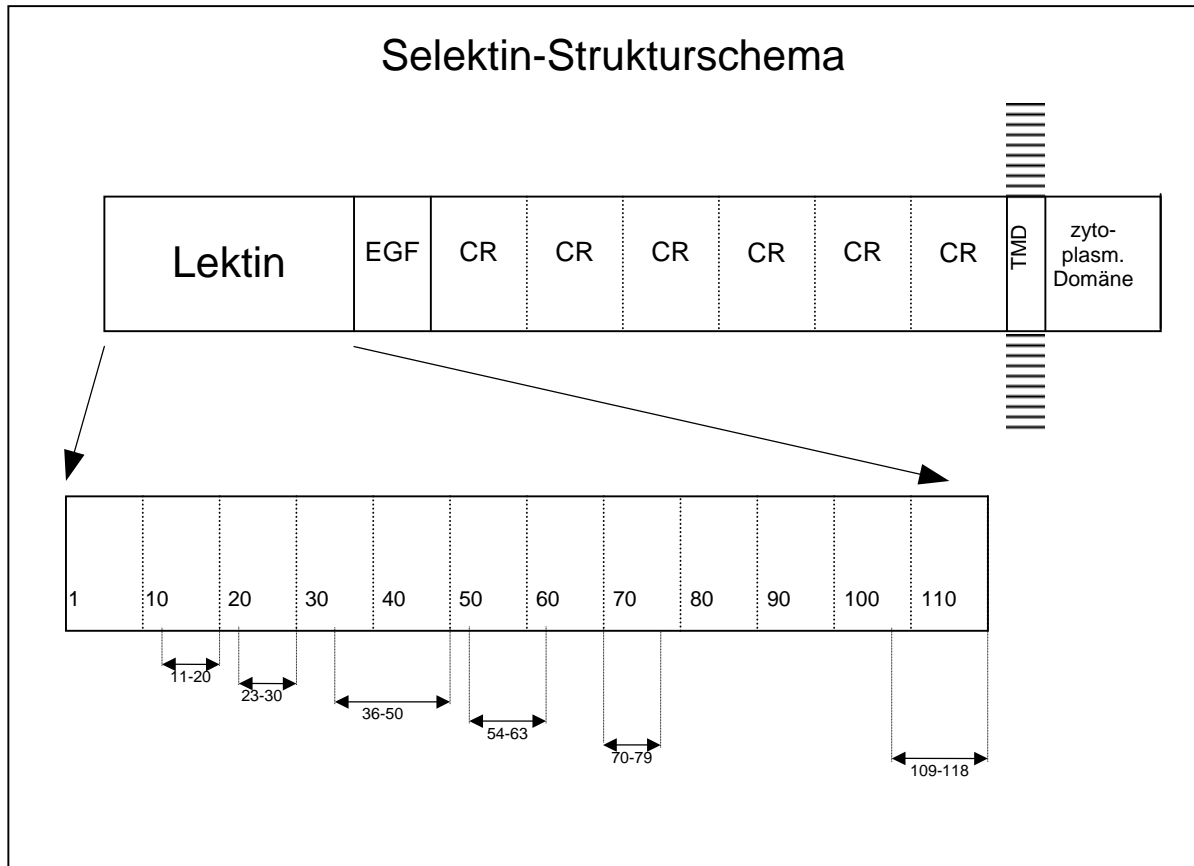


Abb. 1: Schematische Darstellung der Struktur eines Selektin-Moleküls am Beispiel von E-Selektin. Die Anzahl der CR-Domänen unterscheidet sich zwischen den Selektinen: Humanes E-Selektin besitzt 6, L-Selektin 2 und P-Selektin 9 CR-Domänen. Die Lektin-Domäne wurde vergrößert um die Position der in dieser Arbeit untersuchten Selektin-Peptide darzustellen (Doppelfeile). (TMD: Transmembranäre Domäne).

Leukozytenrollen ist Ca^{2+} -abhängig; es wird durch EDTA gehemmt (Thompson et al., 1967; Atherton und Born, 1972). Auch verschiedene Polysaccharide wie z.B. Dextran- und Xylansulfat (Tangelder und Arfors, 1989) sowie Heparin und Chondroitinsulfat (Ley et al., 1991a) können es hemmen. Diese frühen Befunde führten zu der Hypothese, daß Lektine, Rezeptoren mit Ca^{2+} -abhängig kohlenhydratbindenden Domänen, entscheidend am Leukozytenrollen beteiligt sind (Drickamer, 1988). In Frage kommen die Selektine (alte Bez. LECAMs, lectin-EGF-complement binding cell adhesion molecules; Belvilaqua et al., 1989). Die Gruppe der Selektine besteht aus drei monomeren transmembranären Glykoproteinen der Zelloberfläche: P(platelet)-, L(leucocyte)- und E(endothelial)-Selektin. Am extrazellulär

gelegenen N-Terminus befindet sich die Lektin-Domäne mit einer Länge von 117-120 Aminosäuren. Daran schließt sich ein Abschnitt, dessen 32-37 Aminosäuren in ihrer Sequenz der des EGF (epidermal growth factor) analog sind. Es folgt eine Domäne mit zwei bis neun sogenannten CR-(consensus repeat) Abschnitten, deren Sequenzen homolog zu Domänen in Komplement-regulatorischen Proteinen sind. An den transmembranären Abschnitt schließt sich der kurze, C-terminale zytoplasmatische Schwanz an. (s. Abb.1; Lasky, 1992).

In einer Reihe von Studien *in vitro* sowie *in vivo* konnte mit monoklonalen Antikörpern gegen Abschnitte der Lektin-Domäne der Selektine Leukozytenrollen unterbunden werden (Ley, 1996). Dies illustriert die Bedeutung der Lektin-Domäne als kritischen Bereich im Molekül für die Vermittlung der Ligandenbindung. Die Funktion der EGF- und der CR-Domänen ist noch nicht eindeutig geklärt. Es gibt Hinweise auf eine Beteiligung an der zellulären Adhäsion für beide Bereiche (Kansas et al., 1994; Watson et al., 1991a). Allerdings scheinen beide Domänen nur als Kofaktor für die Lektin-vermittelte Bindung zu dienen (Tedder et al., 1995). Mehta et al. konnten zeigen, dass die Lektin- und die EGF-Domäne alleine eine hochaffine Bindung an PSGL-1, den wichtigsten bisher bekannten Selektin-Rezeptor (s.u.)- vermitteln können (Mehta et al., 1997). Zwischen den Lektin- und den EGF-Domänen der verschiedenen Selektine besteht eine ca. 60-70-prozentige Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz. Die CR- Abschnitte zeigen eine über 40-60-prozentige Sequenzhomologie. Die Aminosäuresequenz der Selektine ist innerhalb verschiedener Säugetierarten ausgeprägt konserviert; so liegt die Übereinstimmung zwischen humanen Selektinen und denen von Mäusen bei 70-80 Prozent (Kansas, 1996).

Die Selektine unterscheiden sich in ihrer Lokalisation und Funktion:

1.2.1 P-Selektin

P-Selektin (GMP-140, CD62P) findet sich auf Endothelzellen, Thrombozyten und Megakaryozyten. Das Polypeptidrückgrat des humanen Moleküls hat eine molekulare Masse von 86kD, es weist neun CR-Domänen auf. An 12 Stellen kann eine posttranslationale Glykosylierung über Stickstoffbrücken erfolgen. 65 Cysteinreste ermöglichen eine komplexe dreidimensionale Vernetzung über Disulfidbrücken (Carlos et al., 1994). P-Selektin wird in Weibel-Palade-Körperchen von Endothelzellen und α -Granulosomen von Thrombozyten

gespeichert (McEver et al., 1989). Nach entsprechender Aktivierung der Zellen durch Stoffe wie Histamin, Thrombin oder C5a (Lorant et al., 1991) wird es nach Fusionierung der Speicher mit der Zellmembran innerhalb von wenigen Minuten an die Zelloberfläche befördert (Carlos et al., 1994). Dadurch handelt es sich bei P-Selektin um einen idealen Kandidaten für die Vermittlung der frühen Phase des Leukozytenrollens. Diese Vermutung ließ sich durch Beobachtungen in *in-vivo* Modellen bestätigen: Ein zu erwartender deutlicher Anstieg im Vergleich zum basalen Flux rollender Leukozyten in der Frühphase nach einem Stimulus (z.B. Gewebstrauma nach Auslagerung des untersuchten Mesenteriums im Rattenmodell oder Injektion von Xanthinoxidase/Hypoxanthin) blieb dann aus, wenn vorher ein P-Selektin spezifischer Antikörper appliziert wurde (Gaboury et al., 1994). Mäuse, deren Fähigkeit, P-Selektin zu exprimieren, genetisch beseitigt wurde, zeigen kein initiales Leukozytenrollen im Mesenterium (Mayadas et al., 1993) oder im M. Cremaster (Ley et al., 1995c), wohl aber mäßiges Rollen nach 60-120 min, für das folglich die Vermittlung durch einen oder mehrere andere Rezeptoren angenommen werden muß.

1.2.2 L-Selektin

L-Selektin (CD62L, gp90MEL-14, LAM-1, LECAM-1) wurde ursprünglich als Rezeptor beschrieben, der die Rezirkulation von Lymphozyten („homing“) an hochkubischen Epithelien (HEV = high endothelial venules) vermittelt (Gallatin et al., 1983). Es wird auf den meisten zirkulierenden Leukozyten exprimiert, allerdings im Gegensatz zu P- und E-Selektin nicht auf vaskulärem Endothel. Humanes L-Selektin besitzt 2 CR-Domänen. Das Proteingerüst verfügt über 8 mögliche Orte zur Glykosylierung über Stickstoffbrücken. Es zeigt keine Threonin- oder Serin-reiche Regionen, dazu passend finden sich keine über Sauerstoffbrücken verbundene Zucker. Das unglykosylierte Polypeptid hat eine Molekülmasse von 37kD. 19 von 22 Cystein-Reste finden sich in der EGF-Domäne (Carlos et al., 1994).

L-Selektin Antikörper können Leukozytenrollen in vielen *in-vivo* Modellen teilweise oder komplett blockieren, in denen aber auch eine P-Selektin-Abhängigkeit für das Rollen gezeigt wurde (Ley, 1996). Bei L-Selektin abhängigem Rollen in Mäusen ohne P-Selektin Expression wird eine geringere Fluxrate rollender Leukozyten sowie eine höhere Rollgeschwindigkeit beobachtet (Jung et al., 1996). *In vitro* ließ sich zeigen, daß bereits auf E-Selektin rollende Neutrophile durch Gabe eines L-Selektin Antikörpers nicht im Rollverhalten beeinflusst

wurden, die initiale Bindung an E-Selektin wurde bei frei fließenden Zellen allerdings durch den selben Antikörper verhindert (Lawrence et al., 1994). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, daß L-Selektin die initiale Bindung von Leukozyten aus dem Blutfluß an das Endothel („capture“) durch schnelle Ligandenbindung initiieren kann. Die L-Selektin-Bindung dissoziiert allerdings auch leichter als z.B. bei P-Selektin. Dafür spricht zudem, daß sich L-Selektin vor allem auf den Mikrovilli - Spitzen von Neutrophilen findet (von Andrian et al., 1995), eine räumliche Anordnung, die eine Bindung aus dem Blutfluß heraus möglicherweise erleichtert.

Diese Funktion des „capture“ und der Vermittlung eines instabilen Leukozytenrollens mit hoher Geschwindigkeit findet sich auch zu einem späteren Zeitpunkt nach Einwirkung eines Entzündungsreizes. Es ist vermutlich verantwortlich für das basale, konstitutionelle Leukozytenrollen, daß sich bei Mäusen ohne P-Selektin-Expression findet und auch nicht durch Gabe von E-Selektin Antikörpern zu blockieren ist (Ley et al., 1995c; Mayadas et al., 1993).

Nach dem jetzigen Erkenntnisstand läßt sich also annehmen, daß L- und P-Selektin bei der Vermittlung des Leukozytenrollens in postkapillären Venolen synergistisch zusammenwirken: L-Selektin ermöglicht die primäre Bindung an das Endothel, endotheliales P-Selektin sorgt dann für einen raschen Anstieg des Flux rollender Leukozyten, da die stärkere Bindung des P-Selektin an die Liganden eine Ablösung vom Endothel der durch L-Selektin eingefangenen Leukozyten verhindert (Ley, 1996). P-Selektin ermöglicht zudem auch langsamere Rollgeschwindigkeiten, bewirkt so eine längere Kontaktzeit der Zelle mit aktivierenden Molekülen und ebnet dergestalt den Weg für die feste Adhäsion der Zelle an das Endothel.

1.2.3 E-Selektin

E-Selektin (CD62E, ELAM-1) ist auf vaskulären Endothelzellen zu finden. Es wird nicht wie P-Selektin granulär gespeichert, sondern nach zellulärer Aktivierung durch eine Reihe von Mediatoren (z.B. IL-1 β , TNF- α , IFN γ , LPS) rasch transkribiert und exprimiert (Belvilaqua et al., 1989). Das Proteingerüst hat eine Molekülmasse von 64 kD, an 11 Stellen ist eine N-Glykosylierung möglich. Humanes P-Selektin besitzt 6 CR-Domänen (Carlos et al., 1994).

E-Selektin Antikörper bewirken im mesenterialen Tiermodell des Kaninchens nur eine kurzfristige, geringfügige Absenkung des Flux rollender Leukozyten (Olofsson et al., 1994). Auch zeigen E-Selektin defiziente Mäuse normale leukozytäre Infiltration in die Peritonealhöhle nach Thioglykollat-Instillation. Diese Reaktion wird allerdings nach Gabe von P-Selektin Antikörpern fast völlig unterbunden, während die Applikation von P-Selektin Antikörpern bei Wildtyp-Mäusen keinen derartigen Effekt hat. (Labow et al., 1994). Bei P-Selektin defizienten Mäusen ließ sich hingegen zeigen, daß die Gabe eines gegen E-Selektin gerichteten Antikörpers Leukozytenrollen komplett blockierte (Kunkel et al., 1996). Aus diesen Befunden läßt sich die Redundanz in der Funktion beider endothelialer Selektine ableiten; P- und E-Selektin können sich gegenseitig als Vermittler von Leukozytenrollen ersetzen. Allerdings vermittelt E-Selektin ein wesentlich langsames Leukozytenrollen (<10µm/s) als P-Selektin (20-50µm/s) (Kunkel et al., 1996, Circ.Res.)

1.2.4 Selektin-Liganden

Wie bereits erwähnt, wird der Lektin-Domäne der Selektine die entscheidende Bedeutung bei der Vermittlung der Selektin-Ligandenbindung zugesprochen. Lektine vom C-Typ binden in Ca^{2+} -abhängiger Weise an bestimmte Kohlenhydrat-Liganden. Diese Eigenschaft trifft auch auf die Lektin-Domäne der Selektine zu: So konnte die durch L-Selektin vermittelte Bindung von Lymphozyten an HEV-Zellen durch Behandlung der Zellen mit Sialidase gehemmt werden. Durch dieses Enzym werden Neuraminsäurereste von Glykoproteinen der HEV-Zellen entfernt (Yednock et al., 1989).

Leukozytenrollen wird durch die Gabe von sulfatierten Oligosacchariden wie Dextransulfat, Heparin und Fucoidin inhibiert (Ley et al., 1991a; Ley et al., 1993d). Als kritisch wichtige Bestandteile von Selektin-Liganden erwiesen sich fucosylierte, sialysierte Lactosamine (Foxall et al., 1992). Typische Vertreter dieser Gruppe sind die Tetrasaccharide sLe^x (Sialyl-Lewis-x) und dessen Isomer sLe^a (Sialyl-Lewis-a). Sie setzen sich aus über Sauerstoffbrücken verbundene Sialinsäure, Fucose, Galactose und N-acetyl-Galactosamin zusammen ($sLe^x = [NeuAc\alpha 2,3Gal\beta 1,4-(Fuc\alpha 1,3)-GlcNAc]$) (Fukuda et al., 1984) und finden sich an der Oberfläche fast aller zirkulierenden Leukozyten (Foxall et al., 1992; Polley et al., 1991).

Die Wichtigkeit solcher fucosylierten, sialysierten Oligosaccharide als Bestandteil der Selektin-Liganden zeigt sich klinisch am Beispiel des LAD („leukocyte adhesion deficiency“)

- Syndroms vom Typ II. Dabei kommt es, ähnlich wie beim bereits beschriebenen LAD-I-Syndrom, zu einer schweren Dysfunktion der leukozytären Adhäsion und daher zu rezidivierenden bakteriellen Infekten trotz ausgeprägter Leukozytose. Bedingt ist die LAD-II-Dysfunktion durch einen angeborenen Defekt des Fucose-Metabolismus und die daher rührende Unfähigkeit zur Bildung von fucosylierten Kohlenhydratmolekülen wie sLe^x und ähnlichen (Etzioni et al., 1993). Leukozyten von Patienten mit LAD-II-Syndrom rollten fast nicht auf dem Endothel postkapillärer Venolen und konnten nur unter Ausschaltung der Blutströmung fest an das Endothel anhaften und in das umliegende Gewebe emigrieren (von Andrian et al., 1993).

sLe^x und sLe^a selbst zeigen eine nur geringe Affinität zu Selektinen. Außerdem finden sie sich ubiquitär auf fast allen Leukozyten, von denen aber nicht alle in der Lage sind, zu rollen (Varki, 1997). Es liegt daher nahe, daß diese und ähnliche Kohlenhydrate Bestandteile von Glykoproteinen und Glykolipiden mit einer für Selektine höheren Affinität sein könnten. Eine Reihe solcher Moleküle konnte bislang identifiziert werden:

GlyCAM-1, CD34 und MadCAM-1 sind sulfatierte Glykoproteine, die in vitro mit hoher Spezifität an L-Selektin binden (Vestweber und Blanks, 1999). Ihre Bedeutung für die Vermittlung leukozytären Rollens in vivo ist unsicher (Varki, 1997).

Ein E-Selektin bindendes Glykoprotein, dessen Zuckerketten im Gegensatz zu den über Sauerstoffbrücken verbundenen von GlyCAM-1, CD 34 und MadCAM-1 über Stickstoffbrücken mit dem Peptid verbunden sind, ist der E-Selektin Ligand-1 (ESL-1). In vitro Studien haben gezeigt, daß auch humanes L-Selektin, wenn es in einem ausreichenden Maße syalisierte und fucosylierte Oligosaccharide präsentiert, als Ligand für E-Selektin fungieren kann (Zöllner et al., 1997).

1.2.4.1 P-Selektin-Glykoprotein-Ligand 1

Von den Glykoprotein-Selektin-Liganden ist der P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1 (PSGL-1) in seiner Struktur und Funktion am besten charakterisiert. PSGL-1 ist ein homodimeres Glykoprotein mit einer Molekülmasse von 240kD, bestehend aus zwei Untereinheiten von je 120kD. Es wird auf zirkulierenden Neutrophilen, Monozyten und Lymphozyten exprimiert. Es findet sich dort besonders an den Spitzen der membranären Mikrovilli (Tedder et al., 1995). PSGL-1 bindet Ca²⁺-abhängig an P-Selektin, wird aber auch von L- und E-Selektin

erkannt. Neben der sLe^x-Struktur werden von den Selektinen noch sulfatierte Tyrosinreste am N-Terminus des PSGL-1 erkannt (Somers et al., 2000). Ein Glykosulfopeptid bestehend aus 19 N-terminalen Aminosäurenresten des PSGL-1 mit nur einer O-Glykosilierungsstelle reicht zur Bindung an P-Selektin aus, was die Wichtigkeit des N-terminalen Abschnittes für die PSGL-1-Funktion illustriert (Leppänen et al., 1999). Obwohl PSGL-1 nur weniger als 1% des oberflächlichen sLe^x präsentiert (Norgard et al., 1993), führt eine selektive Blockade durch spezifische Antikörper zu einem fast kompletten Erliegen des Leukozytenrollens in vivo (Norman et al., 1995). Es erweist sich in zahlreichen Untersuchungen als der wichtigste (bisher bekannte) Ligand für Selektin-vermitteltes Leukozytenrollen in vivo (Norman et al., 2000; Sperandio et al., 2003; Hicks et al. 2003).

1.2.5 Zusätzliche Funktionen der Selektine

Neben der Rolle als Vermittler des Leukozytenrollens (und somit als wichtigem Bestandteil an dem mehrschrittigen Prozeß der leukozytären Emigration) sind inzwischen auch andere Funktionen von Selektinen und deren Liganden entdeckt worden:

Unter Verhältnissen von hydrodynamischem Fluß kommt es zum Beispiel neben leukozytär-endothelialer Interaktion auch zu Selektin-vermittelter Bindung zwischen Neutrophilen untereinander und zwischen Neutrophilen und Thrombozyten (Bird et al., 1997). Auch können Thrombozyten, die im Bereich eines endothelialen Defektes kumulieren, nach Aktivierung P-Selektin exprimieren und so Neutrophile oder Monozyten binden. (Kuijper et al., 1996).

Aktivierte Neutrophile können über durch L-Selektin-vermittelte Adhäsion untereinander Aggregate bilden, die in der Lage sind, Kapillaren oder Arteriolen/Venolen geringen Durchmessers (6-10µm) zu verschließen (Bargatzte et al., 1994). Möglicherweise ist dieser Mechanismus an der Entwicklung von Durchblutungsstörungen beim septischen Schock beteiligt (Yodice et al., 1997).

Eine weitere Funktion der Selektine ist die der Signalübertragung und Aktivierung zellulärer Stoffwechselforgänge: So kann Interaktion von L-Selektin mit bestimmten Liganden oder Antikörpern zur Mobilisierung von intrazellulärem Ca²⁺, gesteigerter Expression von TNF-α und IL-8 in Neutrophilen führen (Laudanna et al., 1994); Selektin-Interaktion mit GlyCAM-1 kann bei Lymphozyten die Aktivierung von β₂-Integrinen bewirken (Hwang et al., 1996).

1.3 Klinische Bedeutung der Selektine

Die Selektin-vermittelte, überschießende oder chronifizierte Emigration von Leukozyten in spezifische Gewebe ist eine zentrale Komponente vieler Autoimmunerkrankungen und anderer Formen von pathologischen Entzündungsreaktionen. Dieser Sachverhalt wird möglicherweise durch einen erhöhten P- u. E-Selektin-Umsatz, der sich in erhöhten Serumkonzentrationen widerspiegelt, illustriert. Er findet sich bei einer großen Anzahl von humanmedizinisch relevanten Erkrankungen. Beispiele dafür sind Reperfusionischämie bei Herzinfarkt, Atherosklerose, Psoriasis, atopische Dermatitis, Asthma, Sarkoidose, septischer Schock, Immunoneuropathien und Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantation (Belvilaqua et al., 1994; Gearing et al., 1993). Bei der rheumatoiden Arthritis besteht eine signifikante Korrelation zwischen P-Selektin-Spiegel im Serum und der Schwere der Erkrankung (Littler et al., 1997). Das oben bereits vorgestellte seltene LAD-II-Syndrom illustriert die Wichtigkeit selektinvermittelter leukozytärer Adhäsion für die Aufrechterhaltung einer physiologischen Entzündungsreaktion.

Die medizinische Bedeutung der Funktion der Selektine ließ sich an mehreren Tiermodellen zeigen: So wurden in einem Modell eines durch neutrophile Granulozyten vermittelten Lungenversagens bei Ratten P- und L-Selektin Antikörper appliziert. Beide bewirkten eine deutliche Verringerung der Hämorrhagie durch Endothelschäden sowie einem Rückgang der leukozytären Infiltration ins Gewebe (gemessen am Myeloperoxidasegehalt) (Mulligan et al., 1992; Mulligan et al., 1994). Bei einem Ischämie- und Reperfusionsschadensmodell des Kaninchenohres führte die Blockierung der L-Selektin-Funktion durch monoklonale Antikörper zu einer deutlichen Abschwächung der Schäden (Winn et al., 1993), einen ähnlichen Effekt (Reduktion des Größe nekrotisierten Myokardareals) zeigten sowohl L-, als auch E- und P-Selektin-Antikörper am Ischämiemodell des Katzenherzes. (Weyrich et al., 1993; Ma et al., 1993). Auch in Tiermodellen für Typ-II Diabetes, Abwehrreaktionen nach Nierentransplantation, Typ-IV Hypersensitivitätsreaktionen der Haut und Hirninfarkt ließen sich typische Gewebsschädigungen durch Antagonisierung der Selektinfunktion minimieren (Belvilaqua et al., 1994; Morikava et al., 1996).

1.4 Inhibitoren der Selektinfunktion

Die oben ausgeführten Effekte zeigen deutlich das therapeutische Potential, das Inhibitoren der Selektin-vermittelten leukozytären Adhäsion, also vornehmlich des Leukozytenrollens, für eine große Zahl entzündlicher Erkrankungen innewohnt.

Mehrere mögliche Ansätze zur Inhibition der Selektinfunktion lassen sich verfolgen: Monoklonale Antikörper binden mit hoher Affinität an verschiedene Abschnitte der Selektine oder ihrer Liganden. Ihre Wirksamkeit ist durch eine große Zahl von *in vitro* und *in vivo* Studien hinlänglich gezeigt (s. oben). Auch haben sich Selektin-IgG-Chimären als wirksame kompetitive Inhibitoren der Selektinfunktion erwiesen. Sie haben gegenüber den Selektin-Antikörpern den Vorteil einer längeren Halbwertszeit bei systemischer Applikation (Watson et al., 1991). Mögliche Nachteile beider Substanzklassen sind in ihrer Antigenität für den Menschen zu sehen, da es sich um Antikörper tierischen Ursprungs handelt. Eine Humanisierung dieser Substanzen ist allerdings möglich. Ebenso erfordert eine therapeutisch wirksame Unterdrückung der Selektinfunktion womöglich die Blockierung sowohl von L-, P- als auch E-Selektin, da, wie bereits gezeigt, eine partielle Redundanz in der Funktion der einzelnen Selektine untereinander anzunehmen ist.

Eine breitere Wirkspezifität kann von Oligosacchariden wie Sialyl-Lewis-x oder ähnlichen, für die Ligandenbindung von Selektinen wichtigen sialysierten und fucosylierten Kohlenhydraten, erwartet werden. Auch sulfatierte Kohlenhydrate wie Dextransulfat oder Heparinabkömmlinge zeigen einen deutlichen inhibitorischen Effekt in Entzündungsmodellen (Mulligan et al., 1995; Nelson et al., 1993).

1.4.1 Selektin-Peptide

Das Interesse gilt also einem Inhibitor des Selektin-vermittelten Leukozytenrollens, der mehrere Eigenschaften vereint: Möglichst wirkungsvolle Hemmung des Leukozytenrollens bei kleiner Molekülmasse und geringer Antigenität für den Menschen. Die zwei letzteren Eigenschaften können von Oligopeptiden erfüllt werden.

Daher wurden unter der Annahme, daß einzelne Abschnitte der Lektin-Domäne von Selektinen kritisch für deren adhäsiven Funktionen sind, Oligopeptide mit Sequenzen dieser

Abschnitte von G.A. Heavner (Centocor, USA) synthetisiert. In darauf folgenden *in vitro* Studien konnte gezeigt werden, daß diese Peptide die Adhäsion von polymorphkernigen Granulozyten an immobilisiertes P-Selektin inhibierten. Auch adhärirten Leukozyten mit der Fähigkeit zur Expression von sialysierten, fucosylierten Oligosacchariden auf immobilisierten Albumin-Peptid-Konjugaten (Geng et al., 1992; Heavner et al., 1993). Tam et al. konnten zeigen, dass die Adhäsion von P-Selektin-IgG-Chimären an immobilisiertes sLe^x durch bestimmte Oligopeptide aus Abschnitten der Lektin-Domäne von E- und P-Selektin gehemmt wurde (Tam et al., 1996). Diese Oligopeptide bilden somit eine andere Gruppe möglicher potenter Inhibitoren der Selektinfunktion *in vitro*. Zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung lagen nur wenige Daten über die Wirkung solcher Peptide im lebenden Organismus vor. In einer Untersuchung von Rodzdzinski et al. hatten Oligopeptide zweier Untereinheiten von Pertussis-Toxin (PT) und das E-Selektin-Peptid E24-28 in einem Meningitis-Tiermodell die Zahl in den zerebrospinalen Liquor transmigrierter Zellen reduzieren können (Rodzdzinski et al., 1993a). Der Mechanismus dieser *in vivo*-Wirkung war unklar.

1.5 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen von Selektinpeptiden auf das durch Selektine vermittelte Leukozytenrollen *in vivo* zu untersuchen. So sollte die Vermutung überprüft werden, dass diese Oligopeptide, die unter statischen Bedingungen *in vitro* leukozytäre Adhäsion an P-Selektin unterbinden können, auch in der Lage sind, Leukozytenrollen *in vivo* effektiv zu inhibieren. Es galt zudem, zu vergleichen, ob eine mögliche zu erwartende Wirksamkeit der Peptide *in vivo* durch dieselben Peptide hervorgerufen wurde, die in den *in vitro*-Versuchen wirksam waren.

Die Arbeit sollte auf diesem Weg auch zeigen, ob eine Applikation von Selektin-Peptiden als mögliche Strategie zur Behandlung von entzündlichen Erkrankungen in Frage kommt.

Weiterhin sollte durch diese Untersuchung der Frage nachgegangen werden, ob die mögliche Wirksamkeit einzelner Selektin-Peptide, Leukozytenrollen zu unterdrücken, Rückschlüsse auf

die für die Ligandenbindung kritischen Abschnitte der Lektin-Domäne sowie den Wirkungsmechanismus der Selektinpeptide zuläßt.

Neben der Beurteilung der Funktion der Selektin-Peptide sollte diese Arbeit helfen, grundlegende Fragen zu Mechanismen des Leukozytenrollens wie die Zusammenhänge zwischen dem Flux rollender Leukozyten und der Blutflussgeschwindigkeit, dem Gefäßdurchmesser und dem Schergrad sowie der Leukozytenkonzentration zu beleuchten. Von Interesse war auch, die Abhängigkeit des Leukozytenrollens von der Zeit nach der Auslagerung des Mesenteriums, d.h. der Zeit nach Beginn des proinflammatorischen Stimulus, zu untersuchen. Es galt außerdem der Frage nachzugehen, ob Selektin-Peptide bei möglicher Wirksamkeit eine „bevorzugte“ Zeit nach Auslagerung des Mesenteriums aufwiesen. So wurde versucht, Rückschlüsse auf die Spezifität der Peptide in Bezug auf ihre Bindung an einzelne Selektine und eventuell auf den zeitlichen Verlauf der Selektinfunktion zu ziehen.

Zur Klärung dieser Fragestellung wurde die Methode der Mikroinjektion der Peptide in Venolen des ausgelagerten Rattenmesenteriums gewählt, da sich in diesem Ansatz der mögliche Effekt der Peptide direkt beobachten und aufzeichnen läßt. Die Parameter, die das Leukozytenrollen in vivo beeinflussen, können zeitgleich mit der Applikation aufgezeichnet werden. So läßt sich im in vivo-System ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit erreichen.