

4. DISKUSSION

Diese Arbeit untersuchte die Effekte von Oligopeptiden, deren Aminosäuresequenzen verschiedenen Abschnitten der Lektin-Domäne von P-, L- und E-Selektin entsprechen, auf die initiale Adhäsion (Rollen) von Leukozyten in mesenterialen Venolen von Ratten.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß die lokale Mikroinjektion spezifischer Selektin-Peptide das Leukozytenrollen in unterschiedlicher Ausprägung zu reduzieren vermag. Diese Befunde bestätigten die Vermutung, daß solche Oligopeptide nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* wirksam sind. Zudem zeigen sie einen möglichen therapeutischen Ansatz für die Behandlung von entzündlichen Erkrankungen auf.

4.1 Zur Methodik

Die Versuche wurden am ausgelagerten Mesenterium der Ratte durchgeführt. Infolge der sehr geringen Dicke des Mesenteriums ist das Stroma der Mikroskopie nicht hinderlich, die Gefäße sind optimal sichtbar. Die Umlagerung der mesenterialen Segmente ermöglicht die Beobachtung mehrerer Gefäßareale in einem Versuchsdurchgang.

Durch das Gewebstrauma bei Auslagerung des Rattenmesenteriums wird eine milde, unspezifische Entzündung gesetzt, in Folge davon stellt sich Leukozytenrollen ein. Im ungestörten Zustand finden sich keine oder nur sehr wenige rollenden Zellen in Mesenterialgefäßen (Fiebig et al., 1991; Ley, 1994).

In den vorliegenden Untersuchungen wurde die Wirkung der mikroinjizierten Peptide im Durchlicht untersucht. Dazu wurden rollende Leukozyten, die in einem definierten Zeitabschnitt eine fiktive Linie in dem beobachteten Gefäßareal passierten, während der Applikation und in den Kontrollperioden gezählt (=Flux rollender Leukozyten) und die Werte verglichen. Zur derartigen Quantifizierung des Leukozytenrollens ist es wichtig, verlässliche Kriterien zu formulieren, nach denen ein Leukozyt als frei fließend oder rollend eingestuft wird: Geht man von der vereinfachenden Grundannahme aus, daß in Venolen fließendes Blut eine laminar strömende Newtonsche Flüssigkeit darstellt, lassen sich aufgrund des dabei bestehenden parabolischen Geschwindigkeitsprofils Flußgeschwindigkeiten in Abhängigkeit

von der Gefäßwand errechnen. So hätte ein am Rand fließender Leukozyt annähernd eine Geschwindigkeit, die eine Kugel hätte, welche in dem Abstand vom Endothel fließen würde, der dem Leukozytenradius entspricht. Die Gefäßwand übt auf den Leukozyten jedoch eine zusätzliche Bremswirkung aus, auch ohne daß eine adhäsive Interaktion vorliegt. Daher kann man die minimale Geschwindigkeit eines frei fließenden Leukozyten als etwa die Hälfte der Geschwindigkeit eines im Abstand des Leukozytenradius befindlichen Teilchens schätzen (Ley und Gaethgens, 1991c). Hierbei handelt es sich um eine konservative Abschätzung dieser kritischen Geschwindigkeit: Alle Leukozyten, die sich langsamer fortbewegen, interagieren mit dem Endothel (d.h. rollen); die meisten Leukozyten, die schneller fließen, fließen frei. Das Geschwindigkeitsprofil fließenden Blutes verläuft in Mikrogefäßen aber nicht ideal parabolisch, sondern abgeflacht (Gaethgens et al., 1985; Tangelder et al., 1986). Daraus folgt, daß Leukozyten am Gefäßrand schneller entlangfließen als angenommen. Also wird die kritische Geschwindigkeit eher zu niedrig angenommen. Es ist daher nicht auszuschließen, daß einige Leukozyten, die sich schneller als mit der kritischen Geschwindigkeit fortbewegen, dennoch mit dem Endothel interagieren. Untersuchungen zur Geschwindigkeitsverteilung fluoreszenzmarkierter Leukozyten (Ley et al., 1993d) konnten allerdings zeigen, daß eine deutliche Aufteilung der ein Gefäß passierenden Leukozyten in zwei Geschwindigkeitsklassen besteht. Eine Klasse von Leukozyten passierte dabei das Gefäß deutlich langsamer als die kritische Geschwindigkeit, d.h. sie rollte, die andere war deutlich schneller. Im Bereich um die kritische Geschwindigkeit herum wurden sehr wenige Leukozyten beobachtet. Dies zeigt, daß mit dem Kriterium der kritischen Geschwindigkeit die Unterteilung der Leukozyten in rollende und frei fließende sehr gut möglich ist. Im Durchlichtversuch ohne Fluoreszenzmarkierung der Leukozyten können diese bei den hier verwendeten Vergrößerungen bis zu einer Geschwindigkeit von ca. 0,2mm/s identifiziert werden. Die Geschwindigkeitsmessungen fluoreszenzmarkierter Leukozyten ergaben auch, daß sich der größte Anteil rollender Leukozyten bei Blutflußgeschwindigkeiten zwischen 0,5 und 12mm/s mit einer Geschwindigkeit von weniger als 0,2mm/s fortbewegt (Ley et al., 1993d). Die durchschnittliche Geschwindigkeit rollender Leukozyten liegt unter diesen experimentellen Bedingungen bei 20-50µm/s (Atherton et al., 1973, Ley et al. 1991c).

In den hier vorgelegten Versuchen wurden rollende Leukozyten als sämtliche Leukozyten definiert, die sichtbar langsamer als der Blutstrom die Gefäße passierten (s.a. Abb. 4). Diese

Vereinfachung führt nach den oben aufgeführten Überlegungen zu keiner bedeutenden Verfälschung der Ergebnisse.

4.1.1 Beurteilung von Faktoren, die die Meßergebnisse beeinflussen

Wie bereits beschrieben, wurden die Selektin-Peptide in meinen Versuchen mit Hilfe der Mikroinjektionstechnik direkt ins beobachtete Gefäßareal appliziert. Systemische Nebeneffekte der injizierten Substanz oder der Trägerlösung wie Reduktion der zirkulierenden Leukozytenzahl, massive Schwankungen der Herz- Kreislaufparameter oder Wirkung über den Injektionszeitraum hinaus sind mit dieser Methodik nicht zu erwarten, da jeweils nur wenige Nanoliter der Peptidlösung injiziert werden. Es erfolgt somit eine Verdünnung im Kreislauf, die sich im Bereich eines Faktors um 10^6 bewegt. Zudem fließen sofort nach der Injektion der Peptidlösung Leukozyten ins beobachtete Gefäßstromgebiet ein, die nicht mit Peptiden (in relevanten Dosen) in Kontakt gekommen sind.

Während der Mikroinjektion wurde die Erythrozytenflußgeschwindigkeit im beobachteten, stromabwärts gelegenen Gefäßabschnitt in etwa verdoppelt (s.a. Abb. 5). Untersuchungen des Verdünnungseffektes fluoreszenzmarkierter Leukozyten durch Mikroinjektion von Flüssigkeit ergaben, daß eine Verdoppelung der Flußgeschwindigkeit durch die Mikroinjektion in etwa auch mit einer Verdoppelung der Durchblutung einhergeht. In Abhängigkeit von der Zahl der Zuflüsse in die Venole unterhalb des Ortes der Mikroinjektion kommt es dabei etwa zu einer fünfzigprozentigen Verdünnung der Wirksubstanz am Zielort (Ley et al., 1993d).

Leukozytenrollen an den Gefäßwänden ist nur innerhalb bestimmter Schergrade zu beobachten (Ley und Gaethgens, 1991c). Der Schergrad an der Gefäßwand wird von der Blutflußgeschwindigkeit und vom Gefäßdurchmesser beeinflusst. Innerhalb der vorliegenden Messungen hatten die Erhöhung der Blutflußgeschwindigkeit unter der Mikroinjektion und der dadurch ebenfalls erhöhte Schergrad an der Gefäßwand keine signifikanten Auswirkungen auf den durchschnittlichen Flux rollender Leukozyten (s. Abb.4). Auch die Injektion der Trägerlösung (NaCl) erniedrigte den Flux rollender Leukozyten nicht signifikant. Dadurch kann damit gerechnet werden, daß Ergebnisverfälschungen durch

Unterschiede in der durchschnittlichen Injektionsgeschwindigkeit und damit der Schergrade an dem Endothel während der Mikroapplikation (s. Abb. 5) einzelner Peptide vernachlässigbar gering ausfallen.

Bei gleichbleibender Flußgeschwindigkeit führt die Zunahme des Gefäßdurchmessers nach der Abhängigkeit [$\gamma_w = 8 \times v_{med}/D$] zu einer Abnahme des Schergrades und umgekehrt. In dem von uns gewählten Bereich von Gefäßdurchmessern kam es zu einer statistisch relevanten Abnahme des prozentualen Anteils rollender Leukozyten an der Gesamtheit das Gefäß passierenden Leukozyten bei Zunahme des Gefäßdurchmessers (s. Abb. 11). Dies beruht wahrscheinlich auf dem abnehmenden Oberflächen – zu – Volumen – Verhältnis mit zunehmendem Gefäßdurchmesser. In größeren Venolen steht relativ weniger Wandfläche zur Verfügung als in kleinen. Dieser Effekt hatte keinen Einfluß auf die Ergebnisse, da alle Peptidwirkungen mit einer Kontrollperiode im gleichen Gefäß verglichen wurden.

4.2 Oligopeptide und Leukozytenadhäsion

Von fünfzehn getesteten Oligopeptiden führten sechs zu einer signifikanten Hemmung des Leukozytenrollens in vivo. Dazu gehörten die L-Selektin-Peptide 11-20 und 54-63, die P-Selektin-Peptide 54-63, 70-79 und 109-118 sowie das E-Selektin-Peptid 23-30. Die anderen Peptide hatten keinen oder nur einen geringen, statistisch nicht signifikanten Effekt.

Heavner et al. untersuchten die Lektin- und EGF-Domäne von humanem P-Selektin, indem sie zwanzig sich zum Teil überschneidende Peptide synthetisierten, die den gesamten Bereich abdeckten. Sie testeten die Fähigkeit der Peptide, die Adhäsion von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) an immobilisiertes P-Selektin zu hemmen (Heavner et al., 1993). Aktive Peptide befanden sich nur innerhalb der Sequenzen 6-89 und 109-118, nicht im Bereich der EGF-Domäne (120-160). Die uns zur Verfügung gestellten Peptide stammen aus diesen zwei Bereichen der Lektin-Domäne. P-Selektin-Peptid 36-50 war in obigem in vitro-Ansatz hoch wirksam, in unseren Rollversuchen zeigen aber weder P36-50 noch L36-50, das sich in sechs Aminosäurenresten von P36-50 unterscheidet, eine Aktivität.

Den ausgeprägtesten inhibitorischen Effekt auf das Leukozytenrollen im Rattenmesenterium

hatte in unseren Versuchen das P-Selektin-Peptid P70-79. Dieser Befund deckt sich nicht vollständig mit Ergebnissen einer anderen in vitro Untersuchung (Geng et al., 1992). In dieser Arbeit wurde zwar gezeigt, daß das P-Selektin-Peptid 70-79 die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten an immobilisiertes P-Selektin inhibierte; Peptide, die den Abschnitten 23-30 und 54-63 der Lektin-Domänen von P- und L-Selektin entsprachen, zeigten allerdings eine deutlicher ausgeprägte Inhibition dieser Adhäsion. In unseren Versuchen hingegen führten L,P23-30 und E54-63 zu keiner und P54-63 nur zu einer mittelgradigen, statistisch nur einfach signifikanten ($p \leq 0,05$) Inhibition des Leukozytenrollens. In der in vitro Arbeit wurde auch versucht, die Adhäsion von HL-60 Zellen an immobilisiertes E-Selektin mit Selektin-Peptiden zu hemmen. L,P23-30 sowie P54-63 waren dazu in der Lage, P70-79 zeigte keine inhibitorische Wirkung.

Übereinstimmung zeigen unsere Ergebnisse mit den in vitro-Daten im Hinblick auf die antiadhäsive Wirksamkeit der Peptide E23-30 und L54-63. Auch in Bezug auf das Fehlen inhibitorischer Wirksamkeit der Peptide E70-79 und L70-79 decken sich unsere Daten mit den in vitro erhobenen.

In einer weiteren in vitro Studie wurden Peptide 109-118 der Lektin-Domäne von E-,L- und P-Selektin untersucht (Tam et al., 1996). Sowohl E- als auch P- und L109-118 inhibierten die Adhäsion von P-Selektin-IgG-Chimären an immobilisiertes sLe^x, zeigten aber keine Wirkung in Bezug auf die Inhibition der Adhäsion von PMN an P- und E-Selektin-beschichtete Platten. Leukozytenrollen wird hingegen in meinen Versuchen nur durch P109-118, nicht durch L- oder E108-119 inhibiert.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß alle Peptide, die sich in unseren Versuchen als wirksam erwiesen, auch in mindestens einem in vitro-Ansatz eine Wirkung zeigen, hingegen nicht alle in vitro wirksamen Peptide ebenso das Leukozytenrollen im Rattenmesenterium hemmen.

Die deutlichen Diskrepanzen zwischen den früheren in vitro-Untersuchungen und meinen Daten zur Inhibition des Leukozytenrollens werfen die Frage nach der Vergleichbarkeit zwischen in vivo-Systemen und Adhäsionsstudien von Zellen an protein- oder kohlenhydratbeschichteten Oberflächen auf. Im Rattenmesenterium befindet sich ein

komplexes Netzwerk von Arteriolen, Kapillargefäßen und Venolen. Physiologische Blutflußgeschwindigkeiten üben Scherkräfte auf verschiedene, an das Endothel adhärierende Zelltypen, wie Granulozyten, Lymphozyten oder Monozyten aus. Sowohl adhärierende Zellen als auch Endothelzellen exprimieren eine große Zahl verschiedener Adhäsionsmoleküle und deren Liganden. Komplex interagierende Mediatoren beeinflussen die Aktivierung von diesen Zellen und deren Rezeptoren. Der Vergleich zwischen beiden Versuchssystemen ist schwierig, da nur wenige dieser Parameter in *in vitro* Modellen imitiert werden können. Dadurch erklärt sich die Bedeutung der *in vivo*-Versuche für die Beurteilung einzelner Komponenten des Systems im physiologischen oder pathologischen Zusammenhang.

In meinen Versuchen zeigte sich, daß innerhalb kurzer Zeit ($< 1s$) nach Beendigung der Infusion der effektiven Peptide keine inhibitorische Wirkung mehr zu beobachten war. Dieses schnelle Abklingen der Peptidwirkung könnte dadurch erklärt werden, daß die Peptide vorrangig an Selektin-Liganden auf der Leukozytenoberfläche (z.B. PSGL-1) binden, da diese schon kurz nach Beendigung der Mikroinjektion das beobachtete Gefäßareal frei fließend oder rollend verlassen. Würden die Peptide primär an endotheliale Strukturen binden, müßte ihre Wirkung nach Beendigung der Applikation länger anhalten. Diese Vermutung ist aber nur schlüssig, wenn gezeigt wird, daß Selektin-Peptide nicht in kurzer Zeit von ihrem Liganden abdissoziieren. Zu den Dissoziationskonstanten der Selektin-Peptide liegen derzeit keine Daten vor. Allerdings unterliegt die Bindung Peptid – Ligand im Gegensatz zur physiologischen Bindung von Selektinen und ihren Liganden keinen Scherkräften. Daher kann vermutet werden, dass sie von längerer Dauer als die zwischen Selektinen und ihren Liganden sein wird.

Sulfatierte Polysaccharide wie Fucoidin, Dextransulfat und Heparin inhibieren das Leukozytenrollen im Rattenmesenterium in halbeffektiven Konzentrationen (IC_{50}) in der Größenordnung von $10\mu g/ml$ (Ley et al., 1993d, Ley et al., 1991a). Selektin-Peptide L11-20 und P70-79, die in unseren Versuchen am effektivsten waren, inhibierten das Leukozytenrollen zu etwa 50% bei Dosierungen um $10\mu g/ml$ beziehungsweise um $100\mu g/ml$, also in ähnlichen Dosisbereichen wie die Saccharide.

Humane IgG-Moleküle verbunden mit den extrazellulären Domänen von L-Selektin von

Mäusen, sogenannte L-Selektin-Chimären (Watson et al., 1991), inhibierten im Mikroinjektionsversuch Leukozytenrollen im Rattenmesenterium in Konzentrationen von 100µg/ml (Ley et al., 1991b). Selektin-IgG-Chimären und die Selektin-Peptide L11-20 und P70-79 erzielen also bei ähnlichen infundierten Massekonzentrationen Wirkungen in ähnlicher Größenordnung. Molare Konzentrationen zur Erlangung derselben inhibitorischen Wirkung sind bei den Selektin-Peptiden aufgrund ihrer im Vergleich zu den Selektin-IgG-Chimären weitaus kleineren Molekülmassen allerdings deutlich höher. Daher kann angenommen werden, daß die Affinität zwischen den Selektin-Peptiden und ihren Liganden geringer ist als die zwischen der intakten Lektin Domäne und dem Ligand. Genaue Affinitätsmessungen müßten unter Äquilibrium – Bedingungen *in vitro* durchgeführt werden. Solche Daten liegen bisher nicht vor.

Durch *in vivo*-Studien mit P- und L-Selektin defizienten Mäusen sowie durch Rollversuche mit unterschiedlichen Zelltypen, die sich in ihrer Besetzung mit L-Selektin oder sialisierten O-Glykanen (wie z.B. PSGL-1) unterschieden, konnte gezeigt werden, daß P- und L-Selektin das Trauma-induzierte Leukozytenrollen, wie es zum Beispiel durch Auslagerung von Rattenmesenterium entstehen kann, nicht gleichzeitig, sondern nacheinander versetzt vermitteln (Ley et al., 1995a; Ley et al., 1995c). Dabei ist vor allem P-Selektin in den ersten 30 min nach Auslagerung des Mesenteriums für das Rollen verantwortlich. Später übernimmt L-Selektin Teile dieser Funktion. Inhibierende P- und L-Selektin-Peptide zeigten keinen signifikanten Wirkungsunterschied abhängig von dem Zeitraum nach Auslagerung des Mesenteriums. Aus dieser Beobachtung kann vermutet werden, daß wirksame P- und L-Selektin-Peptide sowohl an P- als auch an L-Selektin-Liganden oder an diesen Liganden gemeinsamen molekularen Bestandteilen binden. Auch *in vitro* inhibierten sowohl E-, L- als auch P-Selektin-Peptide die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten an P-Selektin und von HL60-Zellen an E-Selektin-transfizierte Zellen (Geng et al., 1992). E-, L- und P-Selektin-Peptide des Abschnittes 109-118 inhibieren die Adhäsion von P-Selektin an sLe^x (Tam et al., 1996). Diese Wirkungsüberschneidung läßt sich durch den hohen Grad der Sequenzhomologie der Peptide untereinander erklären (Kansas, 1996).

In unseren Versuchen reduzierte das E-Selektin-Peptid E23-30 den Flux rollender Leukozyten deutlich. L,P23-30 unterscheiden sich nur in einem Aminosäurenrest (Histidin statt

Asparaginsäure an Position 25) von dem entsprechenden E-Selektin-Peptid, hatten aber keine Wirkung. Diese Beobachtung zeigt, daß trotz der Sequenzhomologie und der dadurch bedingten Wirkungsüberschneidung der Peptide einzelne Aminosäurenreste für deren Funktion entscheidend sein können.

4.2.1 Schlußfolgerungen über den Wirkungsmechanismus der Selektinpeptide

Wie bereits erwähnt, inhibieren einige Selektin-Peptide die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten an P- und E-Selektin und sLe^x in vitro. Granulozyten adhäreren zudem an immobilisierte Selektin-Peptide (Geng et al., 1992, Tam et al., 1996). Die vorliegende Untersuchung zeigt, daß Selektin-Peptide Leukozytenrollen in vivo hemmen können. Zwei mögliche Mechanismen dieser Wirkung lassen sich postulieren:

- Kompetitiver Antagonismus der Selektin-Ligandenbindung durch strukturelle Ähnlichkeit mit bindungsrelevanten Abschnitten der Lektin-Domäne der Selektine.
- Unspezifische Hemmung durch Anlagerung u. evtl. Strukturveränderung an Selektinen oder deren Liganden.

Durch die Kristallstruktur-Analyse einer löslichen Form der Lektin- und EGF-Domäne von E-Selektin konnten dessen mögliche ligandenbindenden Abschnitte identifiziert werden (Graves et al., 1994). Diese lagen in Nachbarschaft zur Ca²⁺-Bindungsstelle an der Oberseite der Lektin-Domäne. Eine Reihe von „konservativen“ - d.h. die Tertiärstruktur des Moleküls nicht verändernden - Punktmutationen waren in der Lage, die Adhäsion von E-Selektin an neutrophile Granulozyten zu hemmen oder komplett zu inhibieren. Dazu zählten Mutationen an den Positionen Tyr48, Asn82, Asn83, Glu92, Tyr94, Lys111 und Lys113. Bei Punktmutationsstudien an P-Selektin zeigte sich ebenfalls, daß die Aminosäurenreste der Positionen 48, 94, 111 und 113 eine kritische Rolle für die Adhäsion an Granulozyten innehaben (Erbe et al., 1992; Erbe et al., 1993). Diese Aminosäurenreste sind unter den drei Vertretern der Selektin-Familie beim Menschen konserviert, was ihre wahrscheinliche Bedeutung für Struktur und Funktion der Lektin-Domäne unterstreicht.

Durch die Daten der Kristallstruktur-Analyse, aber auch durch die Ähnlichkeit der Lektin-Domäne des MBP (Mannose-bindende-Protein) von Ratten mit der von Selektinen war eine

dreidimensionale Rekonstruktion der Lektin-Domäne von Selektinen möglich (Graves et al., 1994; Erbe et al., 1992). Dabei zeigte sich, daß der durch Punktmutationen spezifizierte Abschnitt der Lektin-Domäne eine Bindungsstelle für sLe^x darstellen könnte. Somers et al. untersuchten die Kristallstrukturen von Komplexen aus P- bzw. E-Selektin mit sLe^x sowie mit dem (bindungsrelevanten (s.o.)) N-Terminus von PSGL-1. Es konnte gezeigt werden, dass einige der von Erbe und Graves postulierten Aminosäurenreste auch in dieser Untersuchung Bindungsstellen zu sLe^x und PSGL-1 darstellen (Somers et al., 2000): Als Bindungsstelle für sLe^x zeigten sich Tyr48, Glu80, Asn82, Asn83, Tyr94, Glu92, Arg97, Asn105, Asp106 und Glu107. Entscheidend für die Bindung an den N-Terminus von PSGL-1 waren Ser46, Ser47, Arg85, Glu88, Lys112 und His114.

In meinen Versuchen bewirkte das Peptid P109-118 eine deutliche Reduktion des Leukozytenrollens. Es beinhaltet die von Somers als wichtig für die Bindung an PSGL-1 postulierten Reste Lys112 und His114. Das Selektin-Peptid L109-118 enthält diese Reste nicht, es war in meinen Versuchen, ebenfalls, nicht wirksam. Die Selektin-Peptide L- und P36-50 zeigten aber keinen Effekt. Alle anderen, in meinen Versuchen aktiven Peptide, entsprachen interessanterweise Abschnitten der Lektin-Domäne, die keine der Aminosäurenreste enthielten, die in den Kristallstrukturanalysen und Punktmutationsstudien als kritisch für die Ligandenbindung von E- und P-Selektin eingestuft worden waren. Die Untersuchungen von Graves et al. sowie Somers et al. zeigten zudem, dass durch die komplexe Tertiärstruktur der Lektin-Domäne der Selektine bindungsrelevante Aminosäurenreste nicht sequentiell angeordnet sind. Die oben genannten Beobachtungen lassen es wahrscheinlich erscheinen, dass die Selektin-Peptide *nicht* als kompetitive Antagonisten der Selektine – z.B. an PSGL-1 – wirken. Möglicherweise erzielen sie ihre Wirkung durch Strukturveränderung der Lektin-Domäne der Selektine oder der Bindungsdomäne von PSGL-1. Dafür lassen sich in oben genannten Untersuchungen allerdings keine direkten Hinweise finden.

4.2.2 Wirkung des E-Selektin-Peptides E109-118

Die ausgeprägte Aggregation von festen Blutbestandteilen, die in unseren Versuchen unter der Mikroinjektion dieses Peptides beobachtet wurde (s. Abb.18), läßt sich nicht durch das Modell der kompetitiven Inhibition der Selektin-Liganden-Bindung erklären. Die verwendete

Lösung unterschied sich nicht im pH-Wert, der Ca^{2+} -Konzentration und der Konzentration des Peptides von den übrigen Peptidlösungen. Es ist bekannt, daß Selektine durch Aktivierung von Leukozyten Aggregatbildung fördern und somit zu Mikrozirkulationsstörungen beitragen können (Yodice et al., 1997). So zeigten in vitro-Messungen, daß Oligopeptide von Pertussis-Toxin-Abschnitten, die Lektin-Domänen von Selektinen ähnelten, die Expression von dem Integrin CD11b/CD18 verstärkten und dadurch feste Adhäsion der Leukozyten an das Endothel ermöglichten (Rozdzinski et al., 1993a).

Eine Aktivierung von Endothelzellen oder Leukozyten durch das Peptid ist in meinen Versuchen aufgrund des schnellen Auftretens des Effektes und der kurzen Expositionszeit der fließenden oder rollenden Zellen aber unwahrscheinlich.

Eine Erklärung für den beobachteten Effekt böte die Annahme, daß E109-118 die Bindungsstärke adhäsiver Kontakte zwischen frei fließenden Blutbestandteilen erhöht. Möglich wäre dies durch allosterische Effekte an Selektin-Domänen oder an deren Liganden. Mit den zur Zeit vorliegenden Daten bleibt eine solche Hypothese aber spekulativ. Allerdings können Punktmutationen in den Lektin-Domänen von P- und E-Selektin zum Teil auch zur Verstärkung der Bindung von Granulozyten an immobilisierte Selektine führen. Auch bei veränderten Oligopeptiden wurden derartige Effekte beobachtet (Tam et al., 1996; Graves et al., 1994).

4.3 Selektin-Peptide in der Behandlung von entzündlichen Erkrankungen

Wie in der Einleitung bereits ausgeführt, besteht ein breites Spektrum von klinischen Einsatzmöglichkeiten für Inhibitoren der selektinvermittelten Leukozytenadhäsion. Meine Untersuchungen haben gezeigt, daß einzelne Selektin-Peptide Leukozytenrollen im Rattenmodell ähnlich effektiv inhibieren können wie sulfatierte Oligosaccharide (z. B. Dextransulfat), Heparinabkömmlinge oder fucosylierte Oligosaccharide wie sLe^x . Aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Mengen der Peptide war es in diesen Versuchen nicht möglich, deren Wirksamkeit bei systemischer Applikation zu bestimmen (mit zu erwartenden wirksamen Dosierungen um 10-100mg Peptid/kgKG).

In einem Meningitis-Tiermodell bei Kaninchen wurden Oligopeptide zweier Untereinheiten

von Pertussis-Toxin (PT), S2 und S3, sowie das E-Selektin-Peptid E24-38 intravenös appliziert (Rozdzinski et al., 1993a). Diese Wirkstoffe hatten eine deutliche antiadhäsive Wirkung in vitro (Blockierung leukozytärer Adhäsion an humanen Umbilikalvenenzellen) gezeigt. PT-Peptide S2 und S3 führten zu einer Halbierung der Zahl in den zerebrospinalen Liquor transmigrierter Leukozyten im Vergleich zur Kontrolle (PBS) fünf Stunden nach Exposition des Meningitis-Reizes. Dieser Effekt wurde bei Dosierungen von 0,05 bzw. 5µg/kg erzielt und liegt damit in Konzentrationsbereichen weit unterhalb von unseren Daten aus zu erwartenden systemisch wirksamen Dosen. Interessanterweise bewirkte die intravenöse Gabe von höheren Dosen ($\approx 0,5$ mg/kg) dieser Peptide eine signifikante Zunahme der Zahl transmigrierter Leukozyten im Liquor.

Eine weitere Studie untersuchte die Auswirkung von systemisch appliziertem E-Selektin-Peptid E23-30 auf das Volumen geschädigten Hirnareals nach permanenter fokaler Ischämie, oder kurzzeitiger Ischämie mit anschließender Reperfusion (Morikawa et al., 1996). Das auch in unseren Versuchen wirksame E23-30 führte zu einer signifikanten Verringerung der Größe ischämischen Hirnareals nach transienter, nicht aber nach permanenter Ischämie, verringerte also den durch Reperfusion entstehenden Schaden. Dieser Effekt war dosisabhängig schon bei 2mg/kg, besonders bei 10mg/kg zu beobachten, liegt also von der Dosiswirkungsrelation in dem auch von uns erwarteten Bereich.

Meine Untersuchungen und beide oben aufgeführten Studien legen nahe, daß Selektin-Oligopeptide in der Lage sind, in vivo Selektin-vermitteltes Leukozytenrollen zu inhibieren und dadurch durch Transmigration von Leukozyten hervorgerufene Schäden bei Meningitis und Reperfusionischämie zu verringern.

Diese Eigenschaft macht sie zu potentiell einsetzbaren Therapeutika bei einer großen Anzahl Erkrankungen, bei denen die Leukozytenemigration Schaden anrichtet. Dazu gehören neben den oben genannten auch Krankheiten wie Psoriasis, rheumatoide Erkrankungen, Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, bestimmte Formen der Glomerulonephritis und andere. Selektin-Peptide würden zwar nicht die unterschiedlichen Ursachen dieser Erkrankungen beseitigen, könnten möglicherweise aber die den Organismus schädigende Immunantwort auf den Entzündungsreiz wirksam eindämmen.