

1 Einleitung

1.1 Die Biologie und Bedeutung von Zellkontakten

Die Fähigkeit der Ausbildung von Zell-Zell- und Zell-Matrixkontakten ist bei der Entstehung von Geweben und Organen während der Embryogenese von zentraler Bedeutung. Im adulten Organismus sorgen sie für die Aufrechterhaltung von Strukturen. Vermittelt werden die Zellkontakte, beispielsweise die epithelialen und endothelialen Zell-Zellkontakte, über Adhäsionsmoleküle. Epitheliale Zellen bilden das Hautorgan und bedecken alle Oberflächen innerhalb eines Körpers, welche in Kontakt mit der Außenwelt stehen, z. B. den Darm, Drüsen und die Lunge. Das aus einer einzigen Zellschicht bestehende Endothel bedeckt die luminale Oberfläche von Blut- und Lymphgefäßen. Zellkontakte innerhalb des Endothels und solche mit der darunterliegenden extrazellulären Matrix erfolgen durch eine Vielzahl von Zelladhäsionsmolekülen, die in großen Molekülkomplexen organisiert sind. Epithel- wie auch Endothelgewebe sind jedoch mehr als nur eine feste Grenze zwischen unterschiedlichen Umgebungen. Sie sind in der Lage durch transient losen Kontakt Makromoleküle oder sogar ganze Zellen kontrolliert passieren zu lassen.

Eine weitaus größere zelluläre Plastizität bei Zellinteraktionen ist während der Ontogenese und Regenerationsprozessen erforderlich – Zellen müssen sich lösen, ihre ursprüngliche Umgebung verlassen und vielfach neue Interaktionsvorgänge nutzen, um an neue Positionen zu gelangen, wo sie erneut Verbindung mit benachbarten Zellen aufnehmen, um neues Gewebe und Organe auszubilden. Um die Anforderungen an Stabilität und Plastizität zu erfüllen, müssen die Adhäsionsmoleküle auf der einen Seite in der Lage sein, starke Verbindungen auszubilden, damit sie die Gewebsarchitektur auch unter Einflüssen der Umgebung aufrecht erhalten können. Auf der anderen Seite müssen sie mit Anforderungen umgehen, die der Organismus bei Veränderungen von existierenden Strukturen an sie stellt [Buckley *et al.*, 1998]. Solch eine Flexibilität wird durch wechselnde Bindungen der einzelnen Adhäsionsmoleküle wie durch die strikte Regulation zeitlicher und räumlicher Expressionsmuster von Zelloberflächenmolekülen erreicht. Eine besonders schnelle Abfolge dieser Schritte erfolgt durch die Zellen des Immunsystems, die stetig durch den Körper zirkulieren. Zelladhäsion spielt daher eine zentrale Rolle während der zellulären Immunantwort.

1.2 Zelladhäsion im Immunsystem

Im Gegensatz zu vielen anderen Zelltypen bilden die Zellen des Immunsystems, die Leukocyten, keine multizellulären Aggregate, sondern „patrouillieren“ als Einzelzellen durch das Blut- und Lymphsystem. Zelladhäsionsereignisse dieser Zellen sind notwendig, um miteinander zu kommunizieren, und um bei der Immunabwehr von Pathogenen zu kooperieren. Aus diesem Grund müssen sie die Blut- oder Lymphbahn verlassen und durch das Endothel hindurch in das darunterliegende Zellgewebe einwandern können. Dieser als Extravasation bezeichnete Vorgang ist ein essentieller Schritt der Immunantwort. Verschiedene Populationen von Blutzellen wandern in unterschiedliche extravaskuläre Gewebe ein, um ihre Immunabwehr zu entfalten. Die für die unspezifische Immunantwort verantwortlichen Mono- und Granulocyten migrieren an Orte mit Gewebsschädigung und Entzündungsreaktionen, um Bakterien und andere Pathogene zu eliminieren [Jutila, 1992]. Lymphocyten, welche die antigenspezifische Immunantwort vermitteln, migrieren ebenfalls an Orte mit Entzündungsreaktionen. Zusätzlich werden Lymphocyten aber auch in lymphatisches Gewebe rekrutiert. Dieser Vorgang wird als *Homing* bezeichnet [Butcher *et al.*, 1996]. Naive T- und B-Zellen, die zuvor nicht über Antigenkontakt aktiviert wurden, migrieren in sekundäres Lymphgewebe, wie z. B. periphere Lymphknoten, Peyersche Platten (*Peyer's Patches*) im Dünndarm oder Tonsillen. Antigene der benachbarten Umgebung werden in diesen Organen gesammelt, wo sie von antigenpräsentierenden Zellen verarbeitet und präsentiert werden. Bei Kontakt mit Lymphocyten erfolgt deren Aktivierung mit selektiver Antigenpezifität. Ein kleiner Teil von Lymphocyten differenziert zu Gedächtniszellen mit langer Lebensdauer. Diese Zellen zeigen ein anderes Migrationsverhalten wie naive Lymphocyten – sie wandern vor allem zurück an Orte des primären Kontaktes.

1.3 Die Adhäsionskaskade der Leukocyten

Die Extravasation von Leukocyten erfolgt an Entzündungsorten hauptsächlich in den postkapillaren Venolen bzw. während des *Homings* von Lymphocyten in spezialisierten Gefäßabschnitten des lymphatischen Gewebes, den sog. *High Endothelial Venules* (HEV) [Girard *et al.*, 1995]. Der allgemeine Adhäsionsmechanismus von Leukocyten am Entzündungsort ist dem von Lymphocyten während der Rezirkulation in lymphatisches Gewebe sehr ähnlich. Die Extravasation erfolgt durch die Abfolge eines koordinierten Zusammenspiels einer Vielzahl von Adhäsionsmolekülen auf der

Zelloberfläche von Leukocyten bzw. Lymphocyten und Endothelzellen [Springer, 1994]. Die Interaktionen zwischen diesen Molekülen erzeugen eine Adhäsionskaskade, die in mehrere überlappende Phasen unterteilt werden kann (Abb. 1):

- „Initialer Kontakt“ zwischen den Spitzen der Leukocytenmikrovilli und den Endothelzellen. Durch die zumeist schwach und transient wirkenden Interaktionen der Adhäsionsmoleküle werden die Leukocyten zunehmend abgebremst und „rollen“ entlang der Gefäßwand.
- Es folgt eine „Aktivierung“ der Leukocyten durch Mediatoren, die auf der Oberfläche der Endothelzellen präsentiert werden und zu einer Verstärkung der Bindung führen.
- Der Aktivierung folgt die „feste Adhäsion“ der Leukocyten auf dem Endothel. Sobald die Rollbewegung gestoppt ist, flachen die Zellen ab und breiten sich auf ihrer Auflagefläche aus.
- Nach der festen Adhäsion beginnt die Migration der Leukocyten hin zu endothelialen Zellgrenzen, gefolgt von der Transmigration (Diapedese) durch das Endothel in das darunterliegende Gewebe.

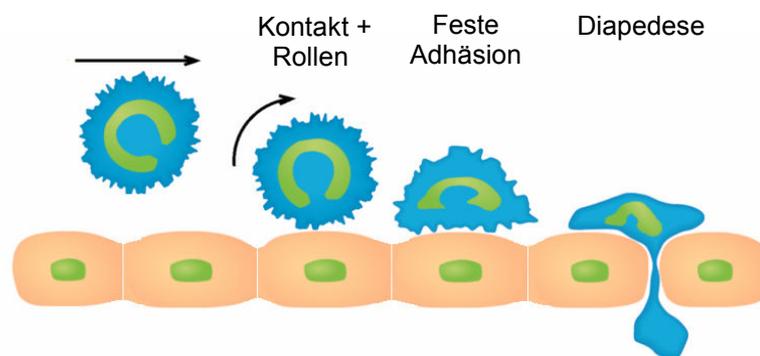


Abb. 1: Die Adhäsionskaskade der Leukocyten.

Auf dem Endothel postkapillarer Venolen eines Entzündungsherdes oder auf Endothelzellen hochendothelialer Venolen eines sekundären Lymphgewebes erfolgt die Extravasation der Leukocyten in mehreren konsekutiven Schritten. Durch den initialen Kontakt der im Blut zirkulierenden Zellen erfolgt ein Abbremsen und Rollen entlang der Gefäßwand. Die Aktivierung rollender Zellen induziert eine verstärkte Bindung, die letztendlich mit einer festen Adhäsion endet, gefolgt von der Migration zu endothelialen Zellgrenzen und der Diapedese in darunterliegendes Gewebe.

Die Spezifität der Extravasation verschiedener Leukocytengruppen erfolgt durch die kombinatorische Abfolge von Interaktionen zwischen Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche von Blut- und endothelialen Zellen. Daraus folgt, dass Leukocyten nur

dorthin auswandern können, wo sie Adhäsionsmoleküle antreffen, die als Liganden zu denen auf ihrer Oberfläche passen. Diese Spezifität erlaubt die präzise Rekrutierung an solche Orte innerhalb des Körpers, wo eine immunologische Reaktion erforderlich ist.

Mehrere Familien von Adhäsionsmolekülen sind an der Adhäsionskaskade beteiligt. Im Folgenden werden diese Familien der Adhäsionsmoleküle und ihre wichtigsten Vertreter kurz vorgestellt.

1.3.1 Die Adhäsionsmoleküle der leukocytären Adhäsionskaskade

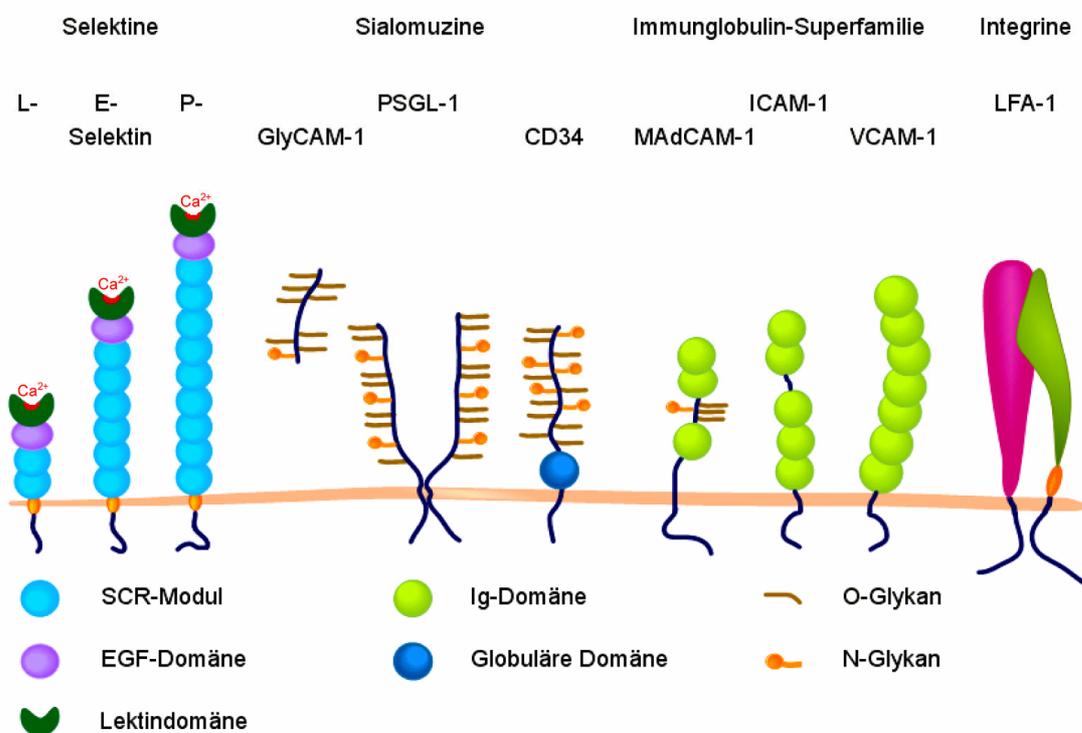


Abb. 2: An der Leukocytenextravasation beteiligte Adhäsionsmoleküle.

Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Mitgliedern der verschiedenen, an der Extravasation von Leukocyten beteiligten Adhäsionsmolekülfamilien.

Die zur Zeit bekannten Zelladhäsionsmoleküle sind überwiegend transmembranäre Zelloberflächenglykoproteine, die mit wenigen Ausnahmen aufgrund ihrer Primärstruktur in sieben Familien eingeteilt werden können [Petruzzelli *et al.*, 1999; Lasky, 1995; Rosen, 2004; Yamamoto *et al.*, 1999; Woods *et al.*, 1998]: ADAM's (*A Disintegrin and Metalloprotease*), Mitglieder der Immunglobulin- und Cadherin-Superfamilien, Sialomuzine, Integrine, Selektine und Syndecane. Wegen ihrer

Bedeutung für die Adhäsionskaskade und für die vorliegende Arbeit werden nachfolgend die Immunglobulin-Superfamilie, Integrine und Sialomuzine kurz zusammengefasst und den Selektinen ein ausführlicherer Abschnitt gewidmet (Abb. 2).

1.3.1.1 Immunglobulin-Superfamilie

Die Immunglobulin-Superfamilie ist die mit über 70 Mitgliedern größte Familie von Zelladhäsionsmolekülen. Die extrazelluläre Domäne der Mitglieder dieser Proteinfamilie ist charakterisiert durch eine unterschiedliche Anzahl an Immunglobulin-ähnlichen Subdomänen. Deren Wechselwirkungen erfolgen Ca^{2+} -unabhängig [Aplin *et al.*, 1998]. Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie sind auf Leukocyten, Endothelzellen, Epithelzellen und Fibroblasten anzutreffen. Die Interaktion erfolgt sowohl über homotypische wie auch heterotypische Wechselwirkungen mit Vertretern der eigenen Familie, mit Integrinen oder mit Proteinen der extrazellulären Matrix [Petruzzelli *et al.*, 1999]. Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie spielen eine wichtige Rolle während der Embryonalentwicklung, der Entwicklung des Nervensystems und der Antwort bei Immun- und Entzündungsreaktionen.

Wichtige Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie, die an der Extravasation beteiligt sind, sind VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1), MAdCAM-1 (Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule 1), PECAM-1 (Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule 1) und vor allem Vertreter der ICAM (Intercellular Adhesion Molecule) Subfamilie. ICAM-1 [Simmons *et al.*, 1988] und ICAM-2 [Staunton *et al.*, 1989] werden von aktivierten Endothelzellen exprimiert und binden an die leukocytären β_2 -Integrine LFA-1 (ICAM-1, -2) und Mac-1 (ICAM-1).

1.3.1.2 Integrine

Integrine sind heterodimere Glykoproteine, die aus einer α - und β -Untereinheit bestehen, die nicht kovalent miteinander verknüpft sind. Bis heute sind vierzehn α - und acht β -Untereinheiten bekannt, durch deren Kombination eine Vielzahl verschiedener Integrine entstehen [Petruzzelli *et al.*, 1999]. Integrine stellen beispielsweise den Kontakt zwischen Molekülen der extrazellulären Matrix und den Mikrofilamenten des Cytoskeletts der sie exprimierenden Zellen her und fungieren dabei als spezifische Rezeptoren für unterschiedliche Matrixproteine [Hynes, 1992].

Während die überwiegende Zahl der Integrine auf nicht-immunologischen Zellen an Moleküle der extrazellulären Matrix wie Kollagen oder Fibronectin binden, vermitteln

Leukocyten-assoziierte Integrine neben Zell-Matrixkontakten insbesondere auch Zell-Zellkontakte. Die Klassifikation der Integrine erfolgt anhand ihrer β -Untereinheit. Folgende Integrinklassen sind am Extravasationsprozess der Leukocyten beteiligt [Springer, 1994]:

- β_1 -Integrine:
Sie gehören zu einer großen Klasse von Integrinen, die hauptsächlich mit Molekülen der extrazellulären Matrix interagieren. Eine Ausnahme ist das $\alpha_4\beta_1$ -Integrin (Very Late Antigen-4, VLA-4), welches auf Lymphocyten und Monocyten exprimiert wird und bei der Adhäsion an Gefäßwände beteiligt ist.
- β_2 -Integrine:
Diese Integrinklasse ist nur auf Leukocyten anzutreffen. Die β_2 -Untereinheit (CD18) kann mit verschiedenen α -Untereinheiten assoziieren. Die am besten charakterisierten Kombinationen sind $\alpha_L\beta_2$ (Lymphocyte Function Associated-1, LFA-1) auf Lymphocyten, Granulocyten und Monocyten und $\alpha_M\beta_2$ (Mac-1), welches auf Granulocyten und Monocyten exprimiert wird.
- β_7 -Integrine:
Die β_7 -Untereinheit kann u. a. mit der α_4 -Untereinheit assoziiert sein, und ist als $\alpha_4\beta_7$ -Integrin auf einem Teil von Lymphocyten bei deren Wechselwirkung mit endothelialen Zellen beteiligt.

Die genannten Integrine werden zwar konstitutiv auf der Zelloberfläche unterschiedlicher Leukocyten exprimiert, benötigen aber – wie im Fall von β_2 -Integrinen – für ihre adhäsive Funktion eine konformationsverändernde Aktivierung durch proinflammatorische Mediatoren [Hynes, 1992]. Alle an der Extravasation von Leukocyten beteiligten Integrine binden endotheliale Oberflächenrezeptoren, die der Immunglobulin-Superfamilie angehören.

1.3.1.3 Sialomuzine

Sialomuzine bilden eine relative heterogene Glykoproteingruppe. Sie enthalten charakteristische Serin-Threonin-reiche Sequenzabschnitte und sind über diese mit einer Vielzahl von O-Glykanen ausgestattet. Zu den Sialomuzinen gehört die CD34-Proteinfamilie (CD34, Podocalyxin, Endoglykan), GlyCAM-1 (Glycosylation Dependent Cell Adhesion Molecule-1), MAdCAM-1 und PSGL-1 (P-Selectin Glycoprotein Ligand-1). Diese sind an Wechselwirkungen mit Oberflächenrezeptoren beteiligt, die vor allem zu den Selektinen gehören.

1.4 Selektine

Die Selektine sind eine aus drei Mitgliedern bestehende Familie von Zelladhäsionsrezeptoren, die durch eine Lektinfunktion gekennzeichnet sind und durch die Bindung, insbesondere an sialylierte Glykane, überwiegend heterotypische Zellkontakte vermitteln. Sie werden auf Leukocyten, Blutplättchen/Thrombocyten und Endothelzellen exprimiert. Davon abgeleitet besitzen sie die Namen E- (Endothelial; Endothel), P- (Platelet; Blutplättchen/Thrombocyten) und L-Selektin (Leukocyte; Leukocyten) [Bevilacqua *et al.*, 1987; Hsu-Lin *et al.*, 1984; Gallatin *et al.*, 1983].

1.4.1 Expression der Selektine

L-Selektin wird konstitutiv auf der Zelloberfläche von Granulo-, Mono- und naiven Lymphocyten sowie einer kleinen Gruppe von Gedächtniszellen aus der Gruppe der T-Lymphocyten exprimiert. Die Expression der vaskulären Selektine (E- und P-Selektin) wird hingegen durch proinflammatorische Mediatoren und Signalgebung bei Gewebsschädigung induziert. P-Selektin wird in sekretorischen Granula gespeichert (*Weibel-Palade Bodies* in endothelialen Zellen oder α -Granula in Thrombocyten), die nach Aktivierung innerhalb von Minuten mobilisiert werden können. Dort besitzt das P-Selektin eine vergleichsweise kurze Lebensspanne, bevor es wieder internalisiert wird [McEver, 1993]. Die Regulation von E-Selektin erfolgt auf Transkriptionsebene, mit einem Expressionshöhepunkt vier bis sechs Stunden nach Induktion [McEver, 1994; Tedder *et al.*, 1995]. Die räumlich und zeitlich unterschiedliche Expression der Selektine und deren funktionelles Ineinandergreifen erlauben effiziente und fein regulierbare Leukocyten-Endothel-Wechselwirkungen. Eine Regulation der Leukocyten-Endothel-Wechselwirkung erfolgt gleichzeitig auch über eine zeitlich und räumlich unterschiedliche Expression von Selektinliganden.

Weiterhin ist mindestens für L-Selektin der Prozess des sogenannten *Ectodomain Sheddings* bekannt [Smalley *et al.*, 2005]. L-Selektin wird von der Zelloberfläche abgespalten, indem es nach Aktivierung der Leukocyten durch ADAM17 (TACE, TNF- α converting enzyme) und mindestens einer weiteren „*Sheddase*“ proteolytisch abgespalten wird [Smalley *et al.*, 2005]. Beim *Shedding* wird L-Selektin kurz oberhalb der Membran abgetrennt und es entsteht ein um 6 kDa verkleinertes sL-Selektin (*soluble* L-Selektin) [Kahn *et al.*, 1994]. Der Sequenzabschnitt von L-Selektin unmittelbar auf proximaler Seite der Zellmembran ist spezieübergreifend gut konserviert. Untersuchungen geben allerdings einen Hinweis darauf, dass für den

Vorgang des *Sheddings* die Länge des proximalen Sequenzabschnitts wichtiger zu sein scheint als die spezifische Aminosäuresequenz [Stoddart *et al.*, 1996; Migaki *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1995]. Der Prozess des *Sheddings* von L-Selektin hat u. a. bedeutende Funktion bei der Herunterregulierung des Wiedereintritts von T-Zellen in peripheres Lymphknotengewebe wie auch bei der Begrenzung der Adhäsion von Neutrophilen an Orten einer Entzündung [Smalley *et al.*, 2005]. Ein Mechanismus für das *Shedding* von E- und P-Selektin ist bis heute nicht bekannt. Es wird jedoch vermutet, dass ein solcher *Shedding*prozess existiert, da *in vivo* lösliche Formen von E- und P-Selektin gemessen werden können [Cominacini *et al.*, 1995; Fijnheer *et al.*, 1997].

1.4.2 Die Funktion der Selektinmodule

Alle drei Mitglieder der Selektinfamilie sind membranintegrale Typ I Proteine und sind strukturell sehr ähnlich aufgebaut [Bevilacqua *et al.*, 1989]. Der extrazelluläre Bereich wird gebildet von einer N-terminalen Ca^{2+} -abhängigen (C-Typ) Lektindomäne, der eine EGF- (*Epidermal Growth Factor*) Domäne und eine variable Anzahl von kurzen *Short Consensus Repeats* (SCR) folgen. Humanes L-Selektin enthält zwei, humanes E-Selektin sechs und humanes P-Selektin neun SCR-Module. In der Literatur werden sie auch als *Sushi Repeats* oder als *Complement Repeats* bezeichnet, da sie homologe Bereiche zu komplementbindenden Proteinen aufweisen [Siegelman *et al.*, 1989; Ahearn und Fearon; 1989]. Gefolgt wird der extrazelluläre Bereich von einer kurzen Transmembrandomäne, der sich eine 17-35 Aminosäuren umfassende cytoplasmatische Domäne anschließt.

Auch in einer Vielzahl anderer Proteine kommen C-Typ-Lektindomänen, EGF-Domänen und SCR-Module vor. Die Selektine kennzeichnet, dass alleinig ihre extrazellulären Abschnitte aus diesen drei Proteinmodulen in dieser charakteristischen Abfolge bestehen. Bindungsuntersuchungen mit chimären Proteinen, bei denen einzelne Domänen zwischen den Selektinen ausgetauscht wurden, zeigten, dass die Ligandenspezifität überwiegend durch die Lektindomäne vermittelt wird. Die genaue Bedeutung der EGF-Domäne und der SCR-Module ist hingegen noch nicht bekannt. Während ein Austausch der EGF-Domäne zwischen den Selektinen zu keinem signifikanten Unterschied in der Spezifität der Ligandbindung führte [Dwir *et al.*, 2000], wurde die Bindungsaffinität durch Deletion der EGF-Domäne drastisch reduziert [Kansas *et al.*, 1994]. Da bei Deletionen der EGF-Domäne Analysen mit monoklonalen Antikörpern den Verlust einzelner Epitope in der Lektindomäne anzeigten

[Pigott *et al.*, 1991], scheint die EGF-Domäne die Konformation der Lektindomäne zu beeinflussen [Gibson *et al.*, 1995]. Der bedeutsame Einfluss der EGF-Domäne auf die primär durch die Lektindomäne vermittelte Bindungsaffinität konnte durch Untersuchungen zum Einfluss von artifiziell herbeigeführten Konformationsveränderungen der Lektin-EGF-Domäne kürzlich bestätigt werden [Phan *et al.*, 2006]. Es konnte auch nachgewiesen werden, dass die EGF-Domäne für das induzierbare *Shedding* von L-Selektin essentiell ist [Zhao *et al.*, 2001]. Die globulären SCR-Module, die in ihrer Abfolge eine stabförmige Gesamtkonformation ergeben, positionieren wahrscheinlich die Lektin- und EGF-Domäne in korrektem Abstand zur Zellmembran und ermöglichen damit effektive Zell-Zell-Wechselwirkungen [Patel *et al.*, 1995]. Weder ein Austausch der SCR-Module untereinander oder zwischen den einzelnen Selektinen noch ihre Anzahl ist funktionell bedeutsam [Kansas *et al.*, 1991; Kansas *et al.*, 1994]. Jedoch sollte mindestens ein SCR-Modul der EGF-Domäne folgen, um die Ausbildung einer korrekten, ligandenaffinen Konformation der Lektindomäne zu gewährleisten [Kansas *et al.*, 1994].

1.4.3 Struktur der Selektine

Strukturuntersuchungen mit trunkierten Formen von humanem P- und E-Selektin, welche jeweils aus der Lektin- und EGF-Domäne bestanden, zeigten, dass die Gesamtkonformation beider Proteine sehr ähnlich ist [Somers *et al.*, 2000]. Ihre Kokristallisation mit dem Tetrasaccharid Sialyl Lewis x (SiaLe^x) zeigte, dass dessen Bindung bei beiden Selektinen über die Interaktion des Fucose- und Sialinsäureanteils mit einem Calciumion innerhalb der Lektindomäne sowie über Wasserstoffbrückenbindungen zu Aminosäureresten an einer vergleichsweise kleinen Kontaktfläche mit negativem bis elektroneutralem Oberflächenpotential erfolgt. Die SiaLe^x-Bindungsstelle von P-Selektin befindet sich an einem relativ großen elektropositiven Oberflächenepitop. An dieses Bindungsepitop können Proteinliganden wie PSGL-1 über elektrostatische Wechselwirkungen saurer Aminosäurereste und tyrosingebundener Sulfatgruppen gebunden werden. Durch die Bindung verändert sich gleichzeitig die Konformation. Die gesamte Kontaktfläche an der Lektindomäne des P-Selektins umfasst somit gemäß den Kristallstrukturen zwei Bindungsepitope:

- ein SiaLe^x-Bindungsepitop mit einem koordinierten Calciumion;
- ein Bindungsepitop mit elektropositivem Oberflächenpotential, an das anionische Gruppen des Liganden binden.

Für L-Selektin liegen keine veröffentlichten Kristallstrukturen vor. Aufgrund der hohen Anzahl homologer Abschnitte der Primärsequenzen, der Verteilung positiver Ladungen innerhalb der Lektindomäne sowie ähnlicher Liganden von P- und L-Selektin, dürften am L-Selektin vergleichbare Bindungsepitope vorhanden sein [Galustian *et al.*, 2002; Graves *et al.*, 1994]. Diese Annahme wird durch kürzlich veröffentlichte Daten von Lou *et al.* (2006) unterstützt. Im Rahmen dieser Veröffentlichung wird eine Kristallstruktur von L-Selektin angedeutet, die die Basis für sogenannte *Molecular Dynamics* (MD)-Simulationen darstellt, anhand derer Konformationsuntersuchungen unter Annahme physiologischer Bedingungen durchgeführt wurden. Die dort abgebildete Struktur deutet auf sehr große Ähnlichkeiten zwischen L- und P-Selektin hin und unterstützt die Hypothese vergleichbarer Bindungsepitope.

1.4.4 Glykosylierung der Selektine

Alle drei Selektine sind durch *N*-glykosidisch gebundene Kohlenhydratketten an den verschiedenen Proteinmodulen modifiziert. Beim humanen L-Selektin erhöht sich die aus der Aminosäuresequenz kalkulierte molekulare Masse von 38 kDa auf eine apparente molekulare Masse von 65-100 kDa. Humanes L-Selektin besitzt in seiner Sequenz sieben putative *N*-Glykosylierungsstellen (Konsensusmotiv NXS/T) (Abb. 3), deren Nutzung im Einzelnen nicht untersucht ist, wahrscheinlich jedoch einer gewissen Heterogenität unterliegt. Diese findet, zusammen mit einer Varianz innerhalb der Glykanstrukturen selbst, ihren stärksten Ausdruck in Unterschieden der apparenten molekularen Massen des löslichen L-Selektins von Lymphozyten (65-80 kDa) und von neutrophilen Granulozyten (80-100 kDa) [Bevilacqua *et al.*, 1993]. Welche physiologische Rolle die unterschiedliche L-Selektin-Glykosylierung beider Zelltypen spielt, ist unbekannt. Die *N*-Glykane des L-Selektins von Neutrophilen und Monocyten, nicht aber von Lymphozyten, sind teilweise mit SiaLe^x-Partialstrukturen modifiziert und könnten als Bindungsstrukturen für die beiden vaskulären Selektine dienen [Picker *et al.*, 1991a; von Andrian *et al.*, 1993; Zöllner *et al.*, 1997]. Für eine zusätzliche *O*-Glykosylierung der Selektine gibt es bislang keine experimentellen Hinweise. Auch ist die theoretische Wahrscheinlichkeit einer *O*-Glykosylierung von L- und E-Selektin sehr gering. Computergestützte Analysen [Hansen *et al.*, 1998] weisen zumindest für P-Selektin in seinem membranproximalen Sequenzabschnitt einige putativ *O*-glykosylierbare Serin- und Threoninreste auf.

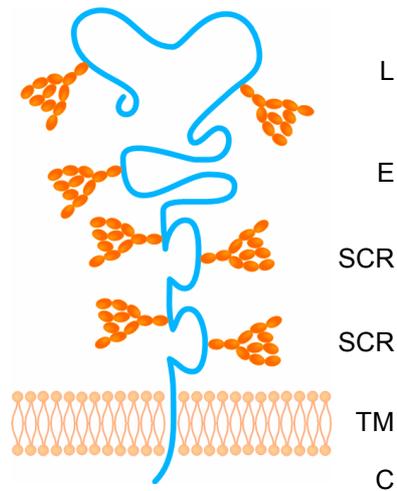


Abb. 3: Glykosylierung von L-Selektin.

Schematische Darstellung von L-Selektin und der Verteilung seiner sieben putativen N-Glykosylierungsstellen. Lektindomäne (L), EGF-Domäne (E), SCR-Module (SCR), Transmembranschnitt (TM), cytoplasmatischer Bereich (C).

1.4.5 Die homotypische Leukocytenadhäsion

Während der akuten Entzündungsantwort können zur Verstärkung der unspezifischen Immunantwort Leukocyten, insbesondere Monocyten und neutrophile Granulocyten, durch die sogenannte homotypische Leukocytenadhäsion rekrutiert werden [Eriksson *et al.*, 2001]. Hierbei erfolgt eine Bindung von Leukocyten an schon endothelial gebundene Leukocyten. Die initialen interleukocytären Bindungen sowie die anschließende Rollen werden von L-Selektin und seinen leukocytären Liganden vermittelt. Einer dieser leukocytären Liganden ist das PSGL-1, das sonst vornehmlich P-Selektin bindet [Tu *et al.*, 1996; Walcheck *et al.*, 1996; Guyer *et al.*, 1996]. Als ein weiterer L-Selektin-Ligand auf Leukocyten konnte Nucleolin identifiziert werden, welches als ansonsten nukleäres Protein auch auf der Zelloberfläche von Leukocyten zu finden ist [Harms *et al.*, 2001]. Nach dem Rollen vermitteln auch bei der homotypischen Leukocytenadhäsion β_2 -Integrine die feste Adhäsion, u. a. durch Interaktion mit dem leukocytären ICAM-3 [Neelamegham *et al.*, 2000]. Pathophysiologisch spielt die homotypische Leukocytenadhäsion eine bedeutsame Rolle bei der Ausbildung von Arteriosklerose-Plaques [Eriksson *et al.*, 2001], bei verschiedenen entzündlichen Erkrankungen, einigen Autoimmunerkrankungen und der Bildung von Ischämie-Reperfusionsschäden nach Myocardinfarkt [Simon *et al.*, 1992; Simon *et al.*, 1993].

1.4.6 Liganden der Selektine

1.4.6.1 Der Minimalligand Sialyl Lewis x

Allen drei Selektinen gemeinsam ist die Fähigkeit das sialylierte und fucosylierte Tetrasaccharid Sialyl Lewis x (SiaLe^x) zu binden. Die Affinitäten, mit denen die drei Selektine monovalentes SiaLe^x (Abb. 4) wie auch sein Isomer Sialyl Lewis a (SiaLe^a , Abb. 4) binden, sind mit Werten im millimolaren Bereich relativ niedrig [Poppe *et al.*, 1997]. Mit di- und multivalenten SiaLe^x -Derivaten konnte in weiterführenden Bindungsuntersuchungen eine erhöhte Affinität gegenüber der monovalenten Form gezeigt werden [Maaheimo *et al.*, 1995; Renkonen *et al.*, 1997; Toppila *et al.*, 1997]. Eine zusätzliche Sulfatierung am SiaLe^x kann zudem auch die Affinität gegenüber L- und P-Selektin steigern, während die zu E-Selektin allerdings unbeeinflusst bleibt [Koenig *et al.*, 1997]. Mittlerweile werden einige artifizielle SiaLe^x -Mimetika auf ihr therapeutisches Potential gegenüber chronischen Entzündungserkrankungen untersucht [Romano, 2005].

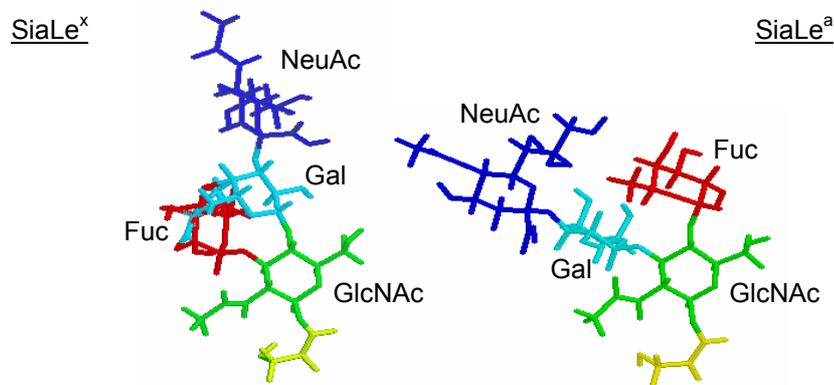


Abb. 4: Räumliche Konformation der Tetrasaccharide SiaLe^x und SiaLe^a .

Mit Hilfe des 3D-Modellierungsprogramms SWEET2 sind die Tetrasaccharide SiaLe^x (NeuAc α 2-3 Gal β 1-4 (Fuc α 1-3) GlcNAc) und SiaLe^a (NeuAc α 2-3 Gal β 1-3 (Fuc α 1-4) GlcNAc) in deren räumlicher Konformation dargestellt. N-Acetylglucosamin (GlcNAc, grün), Fucose (Fuc, rot), Galactose (Gal, türkis), N-Acetylneuraminsäure (NeuAc, blau), C₃-Linker (gelb); (SWEET2 zu finden auf <http://www.glycosciences.de>).

1.4.6.2 Proteinliganden

Der am besten charakterisierte Selektinligand ist das leukocytaire, konstitutiv exprimierte PSGL-1, ein homodimeres Sialomuzin und Hauptligand für das P-Selektin [Moore *et al.*, 1992; Sako *et al.*, 1993; Moore *et al.*, 1995]. Das Selektinbindungsepitop von PSGL-1 liegt am N-Terminus und umfasst ein für die Bindung bedeutsames Tyrosinsulfatmotiv. Mutationsuntersuchungen erbrachten den Nachweis, dass zumindest eines der drei Tyrosine in diesem Motiv für eine hochaffine Bindung an P-Selektin sulfatiert sein muss [Pouyani *et al.*, 1995; Sako *et al.*, 1995; Ramachandran *et al.*, 1999]. Weiterhin ist ein Threoninrest direkt hinter dem Tyrosinmotiv erforderlich. An ihm ist O-glykosidisch ein *core 2*-verzweigtes Glykan gebunden, welches ein terminales SiaLe^x trägt [Liu *et al.*, 1998]. Ist PSGL-1 wie auf T-Lymphozyten nicht entsprechend sulfatiert und glykosyliert, erfolgt keine Bindung von P-Selektin. Durch Kokristallisation eines N-terminalen PSGL-1-Peptids, welches die erforderlichen Modifikationen aufwies, und einer trunkierten P-Selektin-Form, bestehend aus der Lektin- und EGF-Domäne, war eine genaue Analyse der Bindung möglich [Somers *et al.*, 2000]. PSGL-1 ist auch ein Ligand für L-Selektin, wobei die gleichen posttranslationalen Modifikationen und Glykanstrukturen für eine Bindung bedeutsam sind [Leppänen *et al.*, 2003]. Diese Bindung von L-Selektin an PSGL-1 spielt bei der homotypischen Leukocytenadhäsion eine wichtige Rolle. *Core 2*-verzweigte Glykane der membrandistalen Region sind ebenfalls beteiligt an der Bindung von PSGL-1 an E-Selektin, wobei das Tyrosinsulfatmotiv für die Bindung nicht benötigt wird [Goetz *et al.*, 1997; Somers *et al.*, 2000]

Während die Liganden von E- und P-Selektin auf Zellen des hämatopoetischen Systems zu finden sind, können funktionelle Liganden für L-Selektin auf HEV sekundärer lymphatischer Organe, auf den Endothelzellen im Bereich von Entzündungsherden und auf Leukocyten detektiert werden. Auch werden einige Serumproteine als L-Selektin-Liganden diskutiert, wie der Faktor H [Malhotra *et al.*, 1999], das SiaLe^x-modifizierte Alpha₁-saure-Glykoprotein [Brinkman-van der Linden *et al.*, 1998] oder die Amyloid P-Komponente [Stibenz *et al.*, 2006].

L-Selektin-Liganden auf entzündetem Endothel werden durch Stimulation mit TNF- α , IL-1 β oder LPS über *De-novo*-Proteinsynthese induziert [Spertini *et al.*, 1991a]. Bisher konnten jedoch nur wenige Liganden auf entzündetem Endothel identifiziert werden. Ein kürzlich beschriebener Ligand ist das Heparansulfat Proteoglykan [Wang *et al.*, 2005], eine Gruppe von strukturell unterschiedlichen Glykoproteinen, die

ubiquitär auf Zelloberflächen und in der extrazellulären Matrix zu finden sind. Sie bestehen aus einem Kernprotein, das an Serinresten eine Vielzahl von Glykosaminoglykanketten kovalent gebunden hat, die zusätzlich Sulfatgruppen tragen. Ein weiterer L-Selektin-Ligand aus der Gruppe der Proteoglykane ist Versican. Es stammt aus der Gruppe der Chondroitinsulfat/Dermatansulfat Proteoglykane und konnte als extravaskulärer L-Selektin-Ligand identifiziert werden [Kawashima *et al.*, 1999; Kawashima *et al.*, 2000]. Eine Funktion als L-Selektin-Ligand auf entzündetem Endothel ist bisher nicht bekannt.

Auf HEV wurden bisher mehrere muzinartige L-Selektin-Liganden identifiziert. Diese sind sialyliert, fucosyliert und tragen zusätzlich Sulfatierungen an O-glykosidisch gebundenen Glykanen [Rosen, 2004]. Diese Modifikationen bestimmen das Bindungsepitop für L-Selektin wie auch für den monoklonalen Antikörper MECA-79 [Streeter *et al.*, 1988]. Dieser konnte erfolgreich in Inhibitionsuntersuchungen und zur Identifizierung von auf HEV exprimierten L-Selektin-Liganden eingesetzt werden. Zu diesen Liganden gehört eine spezifische Glykosylierungsvariante des ansonsten auf Endothelien weit verbreiteten CD34 [Baumheter *et al.*, 1993; Puri *et al.*, 1995]. Eine Besonderheit des CD34 ist, dass es auch auf hämatopoetischen Stammzellen vorhanden ist [McNagny *et al.*, 1997]. Ein weiterer L-Selektin-Ligand der HEV ist das ~ 160 kDa große Podocalyxin-ähnliche Protein-1 (PCLP-1) [Sasseti *et al.*, 1998]. Wie CD34 ist es ein Sialoglykoprotein und dient ebenfalls nur in der HEV-typischen Glykosylierungsvariante als L-Selektin-Ligand. Auffälligerweise haben CD34 wie PCLP-1 eine ähnliche Domänenstruktur und zeigen eine bemerkenswerte Sequenzhomologie in ihren cytoplasmatischen Bereichen. Ein weiteres zur CD34-Proteinfamilie gehörendes Sialoglykoprotein ist das Endoglykan [Sasseti *et al.*, 2000; Fieger *et al.*, 2003]. Neben PSGL-1-ähnlichen Modifikationen besitzt es zusätzlich Chondroitinsulfatketten, was auch auf eine Funktion als Proteoglykan hindeutet. Endoglykan wird u. a. auf vaskulärem Endothel, hämatopoetischen Stammzellen und auf der Oberfläche bestimmter Leukocytenpopulationen exprimiert [Sasseti *et al.*, 2000].

Besonders gut charakterisiert ist das murine GlyCAM-1 [Lasky *et al.*, 1992], ein muzinähnliches, lösliches Glykoprotein, das von den Zellen der HEV vesikulär gespeichert und im Gegensatz zu allen anderen bisher bekannten Proteinliganden sezerniert wird [Brustein *et al.*, 1992]. Das humane Homolog konnte bisher nicht identifiziert werden. GlyCAM-1 wird zum einen innerhalb der luminalen Glykocalyx zurückgehalten, zirkuliert aber auch frei löslich im Serum [Singer *et al.*, 1996]. Obwohl

Lymphozyten und neutrophile Granulozyten an immobilisiertes GlyCAM-1 binden können und unter Flussbedingungen ein typisches L-Selektin-abhängiges Rollen zeigen, ist unklar, ob GlyCAM-1 auch *in vivo* als physiologischer Ligand für L-Selektin fungiert [Nicholson *et al.*, 1998].

1.4.6.2.1 Glykosyl- und Sulfotransferasen

Selektinliganden gehören zu einer wachsenden Gruppe von Glykoproteinen, bei denen die Proteinfunktion direkt mit einer spezifischen Glykosylierung korreliert. Glykanstrukturen werden hauptsächlich im Golgi-Apparat über dort lokalisierte Glykosyltransferasen an das Proteingrundgerüst synthetisiert. Die meisten Glykosyltransferasen sind Typ II Transmembranproteine, die spezifisch die Zuckerbausteine von aktivierten Zuckernukleotid-Donoren wie UDP-*N*-Acetylgalactosamin, UDP-*N*-Acetylglucosamin, UDP-Galactose, GDP-Fucose und CMP-Sialinsäure an Glykokonjugat-Akzeptoren transferieren [Lowe *et al.*, 2002b]. Allgemein erkennt jede Glykosyltransferase nur einen Typ von Zuckernukleotiden und vermittelt dessen Transfer spezifisch auf eine bestimmte Akzeptorstruktur. Weitere Faktoren, wie die Expressionsstärke bestimmter Glykosyltransferasen und die Lokalisation entlang der verschiedenen Golgi-Kompartimente, spielen bei der komplexen Maschinerie der Synthese spezifischer Glykanstrukturen eine wichtige Rolle. Eine Charakterisierung der für die Selektinligandaktivität wichtigen Zuckerepitope zeigte, dass Selektine Rezeptoren für das SiaLe^x-Motiv in Form von α 2,3-sialylierten und α 1,3-fucosylierten *core* 2-dekorierten O-Glykanen sind [Lowe, 2002a]. Mehrere Glykosyltransferasen wurden identifiziert, wie die *core* 2 β 1,6-*N*-Acetylglucosaminyltransferase (GlcNAcT)-I [Ellies *et al.*, 1998; Sperandio *et al.*, 2001], die β 1,4-Galactosyltransferasen (Gal-T)-I und -IV [Asano *et al.*, 2003; Seko *et al.*, 2003], die Fucosyltransferasen FucT-VII und -IV [Weninger *et al.*, 2000; Maly *et al.*, 1996] und die α 2,3-Sialyltransferase (ST3Gal)-IV [Ellies *et al.*, 2002], die direkt bei der Synthese funktioneller Selektinliganden *in vivo* beteiligt sind. Zusätzlich werden Modifikationen beschrieben, die bei der Expression funktioneller Selektinliganden ebenfalls wichtig sind. Zwei Enzyme, die die Sulfatierung von Zuckerstrukturen katalysieren (*N*-Acetylglucosamin-6-O-Sulfotransferase (GlcNAc6ST)-1 und -2), sind an der Generierung von 6-sulfo SiaLe^x beteiligt, welches wichtig ist für die L-Selektin-Ligandenaktivität auf HEV [Uchimura *et al.*, 2005; Kawashima *et al.*, 2005]. Weiterhin werden zwei Tyrosylproteinsulfotransferasen (TPST-1 und -2) beschrieben, die für die Tyrosin-O-Sulfatierung verantwortlich sind

[Moore, 2003]. Tyrosin-O-Sulfatierung ist eine wichtige, P- und L-Selektin affinitätserhöhende, posttranslationale Modifikation von PSGL-1 [Ramachandran *et al.*, 1999]. Funktionelle Untersuchungen zeigten, dass beide Tyrosylproteinsulfotransferasen zu gleichen Anteilen an der Sulfatierung von Peptiden beteiligt sind, die den N-Terminus von PSGL-1 nachahmen [Ouyang *et al.*, 1998]. Es wird angenommen, dass beide Enzyme auch an der Synthese von funktionellem PSGL-1 beteiligt sind.

1.5 An der Entzündungsreaktion beteiligte Leukocyten

Eine der Schlüsseleigenschaften der Entzündungsreaktion ist die Rekrutierung von Leukocyten an Orte mit Gewebsschädigung. Es gibt drei Hauptklassen von Leukocyten mit Migrationsvermögen, die bei einer Entzündungsreaktion beteiligt sind: Neutrophile Granulocyten, Monocyten/Makrophagen und Lymphocyten.

Neutrophile Granulocyten sind kurzlebige Phagocyten, die eine wesentliche Rolle bei der körpereigenen Abwehr gegen Mikroorganismen spielen. Sie sind der am meisten vorhandene Typ von humanen Leukocyten und akkumulieren innerhalb kürzester Zeit an Orten einer Entzündungsreaktion. Sobald sie an den Entzündungsherd gelangt sind, sezernieren sie eine Reihe von zerstörenden Enzymen, z. B. Myeloperoxidase, Elastase, Matrixmetalloproteasen und Cathepsine. In Abwesenheit eines geeigneten Feedback-Mechanismus sind diese Enzyme signifikant an einer Vielzahl von Erkrankungen beteiligt, z. B. bei einer Sepsis, beim systemischen inflammatorischen *Response*-Syndrom (SIRS), beim akuten Atemnotsyndrom (ARDS) oder bei der chronisch-obstruktiven Bronchitis (COPD) (Tab. 1). Bisher sind erst wenige Substanzen bekannt und in therapeutischem Einsatz, wie z. B. Corticosteroide, die in der Lage sind, die entzündungsverstärkende Aktivität der neutrophilen Granulocyten herunter zu regulieren.

Monocyten sind langlebige Leukocyten und spielen eine kritische Rolle im Zusammenspiel der unterschiedlichen Entzündungsantworten. Sie migrieren von der Blutbahn in verschiedene Gewebe, wo sie zu Makrophagen transformieren. Makrophagen stehen in Verbindung mit mehreren Entzündungskrankheiten, besonders mit Arteriosklerose. Hier transformieren die Makrophagen zu sogenannten Schaumzellen (*foam cells*), die die arteriosklerotische Plaquebildung vermitteln. Aufgrund dessen, dass Makrophagen ein weites Spektrum an biologisch aktiven Molekülen produzieren, die sowohl entzündungshemmend wie -fördernd wirken, kann

ein therapeutisches Einwirken auf die Makrophagenaktivität ein lohnenswerter Weg sein, um chronische Entzündungsbedingungen kontrollieren zu können.

Tabelle 1: Die Beteiligung von Integrinen und Selektinen an inflammatorisch bedingten Erkrankungen. ARDS: *acute respiratory distress syndrome* (Akutes Atemnotsyndrom); CLA: *cutaneous lymphocyte-associated antigen*; COPD: *chronic obstructive pulmonary disease* (chronisch-obstruktive Lungenerkrankung); LFA-1: *lymphocyte function-associated antigen-1*; PSGL-1: *P-selectin glycoprotein-1*; SIRS: *systemic inflammatory response syndrome* (Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom); VLA-4: *very late antigen-4*

| | Vorherrschender Zelltyp | | |
|------------------------|--|--|---|
| | Neutrophile Granulozyten | Monocyten/ Makrophagen | Lymphocyten |
| Krankheit | Ischämie-Reperfusionsschäden, SIRS, COPD, ARDS, cystische Fibrose, Osteomyelitis, Goodpasture-Syndrom, Vaskulitis, Pyelonephritis, Glomerulonephritis, Gicht | Atherosklerose, rheumatoide Arthritis, Darmentzündung, Multiple Sklerose, COPD, Asthma | Multiple Sklerose, rheumatoide Arthritis, Psoriasis, Darmentzündung, Typ-1 Diabetes, Transplantatabstoßung, Lupus, Asthma, atopische Dermatitis |
| Integrine | LFA-1, Mac-1 | VLA-4 | VLA-1, VLA-2, VLA-4, LFA-1 |
| Selektine und Liganden | L-Selektin, PSGL-1 | PSGL-1 | L-Selektin, PSGL-1, CLA |

Lymphocyten unterstützen die erworbene Immunität und stellen das kollektive Gedächtnis des Immunsystems dar. Naive Lymphocyten sind überwiegend in lymphoiden Organen anzutreffen, während Effektor- und Gedächtniszellen in entzündetes Gewebe einwandern, sobald sie von einer spezifischen Kombination von Chemokinen "angelockt" werden.

Ein zentraler Aspekt der Entzündungsreaktion ist der Eintritt zirkulierender Leukocyten in die Adhäsionskaskade, die zur Migration durch das Endothel und der darunterliegenden Basalmembran in das betroffene Gewebe führt. Verstärkte, unregulierte und fortwährende Aktivierung des Endothels während des Entzündungsprozesses kann zu endothelialer Dysfunktion und Schädigung führen. Aktuelle Therapiestrategien versuchen die Entzündungsreaktion an verschiedenen Punkten der leukocytären Adhäsionskaskade zu kontrollieren bzw. zu unterbinden. Die Funktion inflammatorischer Adhäsionsmoleküle kann beispielsweise moduliert werden durch kompetitive Blockade, durch veränderte Oberflächenexpression von Liganden und Adhäsionsmolekülen oder durch Inhibition von Signalwegen, wie der Signaltransduktion von G-gekoppelten Chemokinrezeptoren [Ulbrich *et al.*, 2003].

1.6 Die Entwicklung therapeutischer Selektinantagonisten

Aufgrund der Beteiligung an einer Vielzahl inflammatorischer Erkrankungen bieten die Selektine einen aussichtsreichen Angriffspunkt für die therapeutische Intervention. Im Rahmen der Entwicklung Selektin-spezifischer Inhibitoren fokussierten sich erste Untersuchungen vor allem auf die Herstellung und Wirkungsweise monoklonaler Antikörper, die den Vorteil einer hochgradigen Spezifität besitzen. So konnte der monoklonale Antikörper PB1.3 (Cytel Corporation, USA) als P-Selektin-spezifischer Antikörper identifiziert werden, der neben seiner neutralisierenden Funktion auch in der Immunhistochemie und Immunlokalisation einsetzbar ist, da er selektiv oberflächenexprimiertes P-Selektin erkennt. Präklinische Untersuchungen in den 1990ern verliefen sehr vielversprechend [Lefer, 2000].

Monoklonale, L-Selektin-spezifische Antikörper wurden ebenfalls hergestellt und getestet. Einer dieser Antikörper war DREG-200, der in der Lage ist, L-Selektin auf Leukocyten zu blockieren [Kishimoto *et al.*, 1990]. Präklinische Untersuchungen mit einer humanisierten Form des DREG-200 Antikörpers waren in den 1990ern ebenfalls sehr vielversprechend [Buerke *et al.*, 1994].

Die Testung eines E-Selektin-spezifischen Antikörpers erfolgte bis in klinische Studien der Phase II. Dort verfehlte der Antikörper CDP850 allerdings den Nachweis einer antiinflammatorischen Wirkung [Bhushan *et al.*, 2002]. Einzig über den humanisierten monoklonalen Antikörper HuEP5C7 sind in einem Ischämie-Reperfusionsschadensmodell im Affen positive Testergebnisse berichtet [Mocco *et al.*, 2002], seit 2002 sind jedoch keine weiteren Daten veröffentlicht worden. Während präklinische Untersuchungen mit E-, P- bzw. L-Selektin-spezifischen Antikörpern vielversprechend verliefen, sind über die Ergebnisse von klinischen Studien kaum Daten veröffentlicht. Seit 2000 (bzgl. L-Selektin) bzw. 2001 (bzgl. P-Selektin) gibt es zu Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern in der klinischen Phase keine veröffentlichten Daten [Ulbrich *et al.*, 2003]. Veröffentlichungen zu klinischen Untersuchungen mit E-Selektin-spezifischen Antikörpern enden 2002 [Ulbrich *et al.*, 2003].

Mit der Kenntnis, dass Selektine das Tetrasaccharid SiaLe^x erkennen und binden [Foxall *et al.*, 1992], fokussierte sich die Entwicklung potenter Selektininhibitoren seitdem vermehrt auf die Grundstruktur von SiaLe^x als panselektinwirkendes Therapeutikum [Xia *et al.*, 2002]. Aufgrund seiner niedrigaffinen Bindungseigenschaften ist SiaLe^x in seiner monovalenten Form für eine inhibitorische Anwendung ungeeignet. Daher richtete sich die Suche und Entwicklung

panselektin-wirkender Arzneistoffe auf hochaffine SiaLe^x-Mimetika, welche aufgrund ihres geringen Molekulargewichts als sogenannte *Small Molecules* klassifiziert werden. Sie haben den Vorteil, sich schnell und gleichmäßig im Körper zu verteilen und damit in geringen Konzentrationen ihren Wirkungsort zu erreichen. Ein Beispiel für panselektin-wirkende Substanzen aus der Klasse der *Small Molecules* sind Efomycine. Sie konnten aus dem Fermentationsmaterial des Bakterienstamms *Streptomyces BS1261* isoliert werden und wurden als E- und P-Selektin-spezifische Inhibitoren identifiziert [Schön *et al.*, 2002]. Strukturell sind die Efomycine mit einem zentralen Ringsystem ausgestattet, an welches sich in symmetrischer Anordnung zwei azyklische Seitenketten anschließen. In *in vitro* Untersuchungen inhibierte besonders Efomycin M die Selektin-vermittelte Leukocytenadhäsion auf endothelialen Zellen sehr effizient. Weiterführende *in vivo* Untersuchungen bestätigten eine inhibitorische Wirkung auf die Bindungsfunktion von E- und P-Selektin. Ein Einfluss auf die Bindungsfunktion von L-Selektin wurde seinerzeit allerdings nicht untersucht.

Eine alternative Möglichkeit der Findung von Selektinantagonisten besteht im definierten Moleküldesign. Über die rationale Wirkstoffentwicklung (*Rational Drug Design*) können am Computer Pharmaka entwickelt werden, die auf einer genauen Kenntnis von Zielstrukturen basieren. Deren Entwicklung ist vergleichsweise kostengünstig. Im Fall von E- und P-Selektin existieren Daten aus hochauflösenden Röntgen-Kryokristallstrukturen mit und ohne natürlichen Liganden, die einen tiefen Einblick in die Details der Interaktionen auf atomarer Ebene bieten. Mit Hilfe der Strukturdaten konnte auf diese Weise der panselektinwirkende Antagonist *Bimosiamose* entwickelt werden. Er ist u. a. in der Lage, mit einem natürlichen Liganden wie PSGL-1 bei der P-Selektin-Bindung zu konkurrieren [Kogan *et al.*, 1995; Kogan *et al.*, 1998] und wurde daraufhin in mehreren präklinischen Modellen (Ischämie-Reperfusionsschäden, Psoriasis, Asthma) untersucht. Im Kontext von Asthma scheint *Bimosiamose* sogar der derzeit vielversprechendste Wirkstoffkandidat in der Entwicklung [Romano *et al.*, 2001]. *Bimosiamose* befindet sich für die Anwendung bei Asthma und Psoriasis in klinischen Untersuchungen der Phase II [Kaneider *et al.*, 2006] und die Erfolgsaussichten scheinen zum jetzigen Zeitpunkt vielversprechend.

Eine andere Möglichkeit des gezielten Wirkstoffdesigns ist die Synthese von polyvalenten Makromolekülen. Diese werden aufgrund ihres Molekulargewichts als *Macromolecule Drugs* klassifiziert und tragen Wirkstoffe, oft Proteine oder Polysaccharide, in multivalenter Form, die kovalent über *Spacermoleküle* an das oft

polymere Trägermolekül gekoppelt sind. Die Trägermoleküle sollten idealerweise wasserlöslich, nicht-toxisch und nicht-immunogen sein und vom Organismus abgebaut und ausgeschieden werden können. Bisherige präklinische Untersuchungen mit *Macromolecule Drugs* gaben vielversprechende Hinweise auf eine antiinflammatorische Wirkung. Ein Beispiel ist die Herstellung und Testung polyvalenter Konjugate, bei denen miteinander verbundene *N*-Acetyllactosamineinheiten als Trägermolekül für die multiple Präsentation von SiaLe^x fungieren und in *in vitro* Assays als hochaffine L-Selektin-Inhibitoren identifiziert werden konnten [Seppo *et al.*, 1996; Renkonen *et al.*, 1997].

Eine andere Untersuchung testete den Einsatz von Polyacrylamid-Trägermolekülen. In statischen Bindungsassays wurde auf diese Weise eine inhibitorische Wirkung auf die Bindungsfunktion von E- und P-Selektin gezeigt [Weitz-Schmidt *et al.*, 1996; Game *et al.*, 1998; Pochechueva *et al.*, 2002; Pochechueva *et al.*, 2003; Ushakova *et al.*, 2005]. Bei der Herstellung von *Macromolecule Drugs* fokussieren sich die Forschungsanstrengungen vor allem auf die Findung geeigneter Strukturen und Architekturen der Trägermoleküle. Als Trägermolekül können polymere Strukturen mit mono- oder polyfunktional linearer, sternförmiger oder dendritischer Architektur dienen [Haag und Kratz, 2006].

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen einer physiologischen Immunabwehr leitet L-Selektin durch die Bindung endothelialer Liganden eine Adhäsionskaskade ein, mittels derer Leukocyten aus dem Blutstrom durch das Endothel in periphere Lymphknoten oder entzündetes Gewebe auswandern. Im Rahmen einer pathologischen Entzündungsreaktion ist die Auswanderung der Leukocyten dysreguliert, was weitreichende Schädigungen des umliegenden Gewebes zur Folge hat. L-Selektin besitzt beim Vorgang der Auswanderung von Leukocyten eine Schlüsselfunktion, so dass L-Selektin eine vielversprechende Zielstruktur für eine therapeutische Intervention darstellt.

Die einzelne Rezeptor-Ligand Interaktion von L-Selektin ist im Detail recht gut verstanden. Weniger gut verstanden sind, auch in Hinblick auf die Entwicklung effizienter Inhibitoren, Wechselwirkungen multivalenter Strukturen, die Wirkung einzelner, glykannachahmender Moleküle und die Interaktion mit weiteren, noch nicht identifizierten Liganden, die für die Entwicklung weiterer Inhibitoren relevant sein könnten.

Vor diesem Hintergrund erfolgte die vorliegende Arbeit mit den folgenden Zielsetzungen:

- Analyse der Bedeutung von Multivalenz im Kontext von L-Selektin-Ligand Interaktionen,
- Identifizierung neuartiger Glykomimetika,
- Herstellung und Charakterisierung neuartiger rekombinanter Glykoproteine als L-Selektin-Liganden,
- Etablierung und Standardisierung neuer Methoden zur Analyse der Bindungsfunktion von L-Selektin unter annähernd physiologischen Bedingungen,
- weiterführende Analysen der L-Selektin - Inhibitor Interaktionen.

Die Identifizierung neuartiger mono- und multivalenter Liganden hatte zum Ziel vor allem das Spektrum an bisher einsetzbaren Inhibitoren zu erweitern und für das Design therapeutisch wirksamer Inhibitoren der L-Selektin-vermittelten Adhäsion neue Möglichkeiten aufzuzeigen.