

5 Zusammenfassung

L-Selektin vermittelt zusammen mit seinen endothelialen Liganden das Rollen von Leukozyten auf dem Gefäßendothel und leitet hiermit den ersten Schritt einer Adhäsionskaskade ein, die zum Auswandern der Leukozyten in das perivaskuläre Gewebe führt. L-Selektin ist daher einerseits essentiell für die physiologische Immunabwehr. Andererseits ist L-Selektin an pathologischen Entzündungsreaktionen, beispielsweise an der Transplantatabstoßung oder an Autoimmunkrankheiten beteiligt. Es stellt somit eine Zielstruktur für antiinflammatorische Wirkstoffe dar, die durch Blockade von L-Selektin die Rekrutierung von Leukozyten in entzündetes Gewebe hemmen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Hemmung der Bindung von L-Selektin an seine Liganden durch synthetische multivalente Liganden auf der Basis von Sialyl Lewis x, Glykomimetika und rekombinanten Glykoproteinen zu untersuchen. Diese Untersuchungen sollten auf der Ebene einzelner Moleküle und auf der Ebene intakter Zellen unter Flussbedingungen erfolgen und somit der Scherstressabhängigkeit der Bindungsfunktion von L-Selektin Rechnung tragen.

Für die Untersuchung unterschiedlicher Inhibitoren wurde ein standardisiertes Testsystem entwickelt, bei dem die Bindung von rekombinantem divalentem L-Selektin-IgG an den synthetischen Liganden SiaLe^x-PAA-sTyr mittels Oberflächenplasmonenresonanz gemessen wurde. Weiterhin wurde ein Flusskammer-Assay für die Untersuchungen von Inhibitoren adaptiert, bei dem das Rollen und die Adhäsion transfizierter NALM-6-Zellen, die L-Selektin auf ihrer Oberfläche exprimieren, an aktivierte HUVECs gemessen wurde.

Mit beiden Verfahren wurde die inhibitorische Aktivität von multivalenten Formen von Sialyl Lewis x, Sialyl Lewis a und Tyrosinsulfat – kovalent gebunden an den Träger Polyacrylamid – im Vergleich zu den monovalenten Formen dieser Liganden gemessen. Die Untersuchungen zeigten, dass Multivalenz zu einer außerordentlichen Steigerung der inhibitorischen Aktivität führt und die Hemmwirkung der multivalenten Inhibitoren mit zunehmendem Scherstress zunimmt.

Mit Polyglycerolsulfat-Dendrimern wurde eine zweite Klasse multivalenter Inhibitoren untersucht. Die Ergebnisse zeigten eine außerordentlich starke Hemmwirkung dieser multivalenten Inhibitoren. Polyglycerolsulfat-Dendrimere hemmten spezifisch L- und P-Selektin, dagegen nicht die Funktion von E-Selektin.

Mit dem Makrolid Efomycin M wurde drittens ein Glykomimetikum auf seine inhibitorische Aktivität untersucht. Efomycin M hemmte selektiv die Bindungsfunktion von L-Selektin, jedoch nicht die von E- und P-Selektin. Diese Untersuchungen zeigten, dass auch monovalente Inhibitoren starke Hemmwirkung besitzen können.

Auf der Basis des physiologischen Liganden PSGL-1 und von Hsc70, von dem kürzlich eine Zelloberflächenform, die L-Selektin bindet, beschrieben wurde, wurden zwei potentielle inhibitorische Glykoproteine als Fusionsproteine konstruiert: PSGL-1-IgG als Fusionsprotein des N-Terminus von PSGL-1 mit drei Tyrosinresten und einem O-Glykan, welche das L-Selektin-Bindungsmotiv von PSGL-1 darstellen, und Hsc70-IgG als Fusionsprotein des Sequenzabschnitts 279-299 von Hsc70, welcher Ähnlichkeit zum PSGL-1-Bindungsmotiv aufweist. Die Expression erfolgte in der für Glykosylierung und Sulfatierung geeigneten humanen Zelllinie KG1a. Untersuchungen mittels Oberflächenplasmonenresonanz zeigten eine vergleichbar starke Bindung von PSGL-1-IgG und Hsc70-IgG an L-Selektin. Dieses Ergebnis wies darauf hin, dass die rekombinanten Glykoproteine PSGL-1-IgG und Hsc70-IgG zumindest in ihrer divalenten Form potente Inhibitoren der L-Selektin-Funktion sind.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass für die Hemmung der Bindungsfunktion von L-Selektin multi- und monovalente Inhibitoren zur Verfügung stehen, die die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien der medikamentösen antiinflammatorischen Therapie eröffnen.