

2. Theoretischer Teil

2.1. Adhäsionskaskade der Leukozyten im Entzündungsprozeß

Eine Entzündung ist eine lokale Veränderung der Mikrozirkulation des Blutes. Sie ist durch den Transport von Flüssigkeit und Leukozyten in extrazelluläres Gewebe charakterisiert. Die Migration phagozytosefähiger Leukozyten aus dem Blut in benachbartes Gewebe ist für die zelluläre Immunabwehr essentiell und findet hauptsächlich in den kleinsten venösen Gefäßen, den postkapillaren Venolen statt. Ausgelöst durch pathologische Prozesse, wie zum Beispiel Gewebeschädigungen oder Befall durch Mikroorganismen, hat die rezeptorvermittelte Extravasation von Leukozyten in betroffenes Gewebe eine zentrale Bedeutung im Entzündungsprozeß. Um mit der Gefäßwand eine feste Bindung eingehen zu können, müssen die Leukozyten aus dem Blutstrom heraus abgebremst werden, was durch einen Komplex stufenweiser molekularer Wechselwirkungen realisiert wird [1, 2]. Dieser Prozeß wird als Adhäsionskaskade bezeichnet und durch Zell-Adhäsionsmoleküle und verschiedene Aktivierungsfaktoren vermittelt [Abbildung 1].

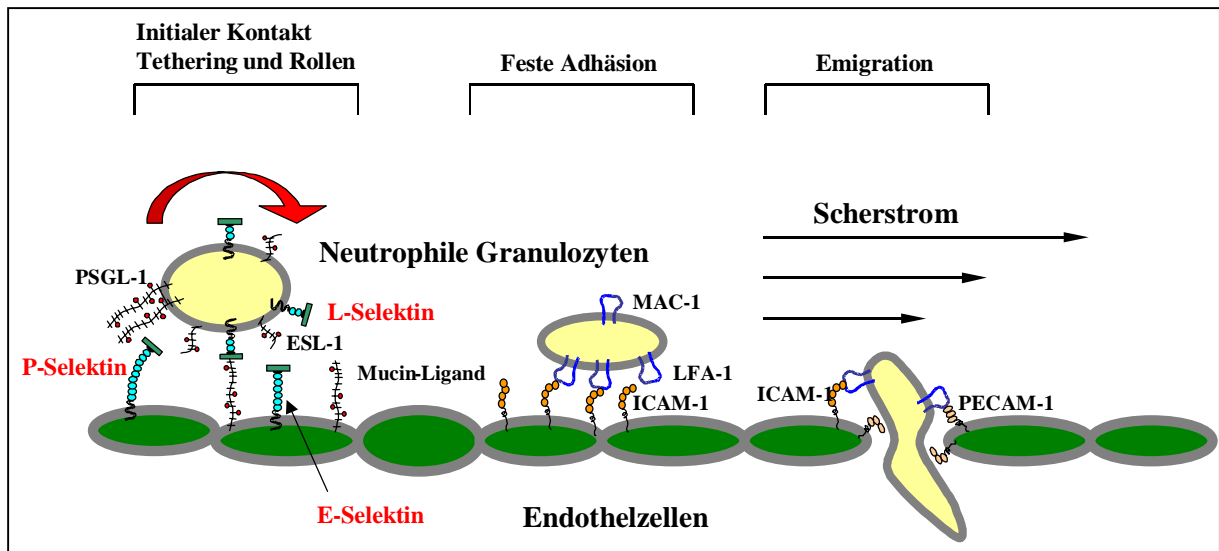


Abbildung 1 Adhäsionskaskade der Leukozyten im Blutgefäß nach einer entzündlichen Stimulierung.

Diese Kaskade wird mit der Freisetzung von Histamin und Thrombin im Gewebe eingeleitet, was eine Gefäßdilataion und damit eine Verlangsamung des Blutstromes bewirkt

[3]. Zusätzlich wird durch die Mediatoren Tumornekrosefaktor (TNF α) und Interleukin (IL-1) die Expression von bestimmten Adhäsionsmolekülen ausgelöst, die über schwach affine Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen einen ersten Kontakt zwischen Gefäßendothel und den fließenden Leukozyten verursachen. Diese initialen Bindungsereignisse sind als sogenanntes Tethering (kurzzeitiges und ruckartiges Abbremsen der Leukozyten) und später als ein Rollen der Leukozyten entlang der Gefäßwand zu beobachten [4]. Dieses Zellrollen wurde bereits 1839 mittels Intravitalmikroskopie beobachtet und von Wagner in Leipzig beschrieben [5]. Zunächst glaubte man, die beobachtete Migration von Leukozyten stehe mit der Nährstoffversorgung der Gewebe in Verbindung [6]. Die Funktion des Leukozytenrollens bei Entzündungen wurde erst 1889 von Cohnheim entdeckt [7]. Die bei diesen Prozessen beteiligten Adhäsionsmoleküle gehören zur Familie der Selektine, sie ermöglichen den ersten, kurzzeitigen Kontakt zwischen Leukozyt und Endothelzelle.

Als Folge dieser rollenden Verlangsamung und räumlichen Konzentrierung von Leukozyten werden nun endotheliale Mediatoren wie zum Beispiel der Plättchen-aktivierende Faktor (PAF) freigesetzt bzw. aktiviert, welche zur Expression von weiteren Adhäsionsmolekülen auf den Leukozyten, den Integrinen, führen. Integrine sind Membranproteine und binden an Proteine der Immunglobulin-Superfamilie, die sich am Endothel befinden. Es kommt zu einer festen Bindung der Abwehrzelle an der Gefäßwandung. Erst dadurch sind die Voraussetzungen für eine Extravasation durch interzelluläre Zwischenräume geschaffen.

2.2. Selektine: Struktur und Funktion

Die Selektine gehören der großen, in der Natur ubiquitär vorkommenden Substanzklasse der Lektine an. Lektine sind kohlenhydratbindende Membranproteine, die weder Antikörper noch Enzym sind [8]. Im Gegensatz zu anderen Protein-Protein-Wechselwirkungen binden Selektine kalziumabhängig an Kohlenhydratstrukturen, die an einem Proteingerüst oder Lipidträger fixiert sind. Das Vorkommen der Selektine beschränkt sich auf das Leukozyten-vaskuläre System. Sie bilden eine Familie von drei langgestreckten, membrangebundenen Glykoproteinen und werden nach den Zellen ihres Vorkommens benannt: L-Selektin findet man auf Leukozyten, E-Selektin auf Endothelzellen und P-Selektin hauptsächlich auf Plättchen aber auch auf dem Endothel. Alle drei Selektine haben homologe Strukturen, die in fünf Domänen und eine membrannaher Spaltungsregion eingeteilt werden.

Im extrazellulären Teil aller Selektine findet man drei Typen von Proteindomänen, die bereits von verschiedenen anderen Proteinen bekannt sind:

- Die äußere, N-terminale Domäne ist die Lektindomäne, sie besteht aus 120 Aminosäuren und ist der Lektindomäne von kalziumabhängigen Säugerlektinen ähnlich [9].

- Ihr schließt sich eine 35-40 Aminosäuren lange Domäne an, die erstmals im epidermalen Wachstumsfaktor gefunden wurde (EGF-Domäne). Diese Sequenz enthält die sogenannten „EGF-Repeats“, die in verschiedenen Proteinen vorkommen und von sechs Cysteineinheiten gebildet werden.

- Dem einzigen „EGF-Repeat“ der Selektine folgt eine veränderliche Anzahl von wiederkehrenden Elementen, den sogenannten Short Consensus Repeats (SCR), jedes besteht aus ca. 60 Aminosäuren. Diese Elemente gleichen jenen Einheiten, die in Komplement-regulatorischen Proteinen vorhanden sind und werden daher auch „Komplement-bindende“ CB-Elemente genannt. Deren spezifische Funktion konnte noch nicht geklärt werden. Die Anzahl der CB Elemente bedingt die Größe und Flexibilität der Selektine und ist artspezifisch. So besitzt L-Selektin von Mensch, Maus und Ratte zwei solcher Elemente. E-Selektin von Mensch, Maus und Hund besitzt sechs, von der Ratte und vom Kaninchen fünf, vom Rind und vom Schwein vier CB-Elemente. P-Selektin vom Mensch hat neun, von Maus, Ratte und Schaf acht, und P-Selektin vom Rind sechs dieser Elemente.

Den drei extrazellulären Proteinabschnitten folgt eine transmembranäre Region, dem sich dann ein zytoplasmatisches Segment von 17 Aminosäuren (humanes L-Selektin), 32 Aminosäuren (humanes E-Selektin) bzw. 35 Aminosäuren (humanes P-Selektin) anschließt [10] [Abbildung 2].

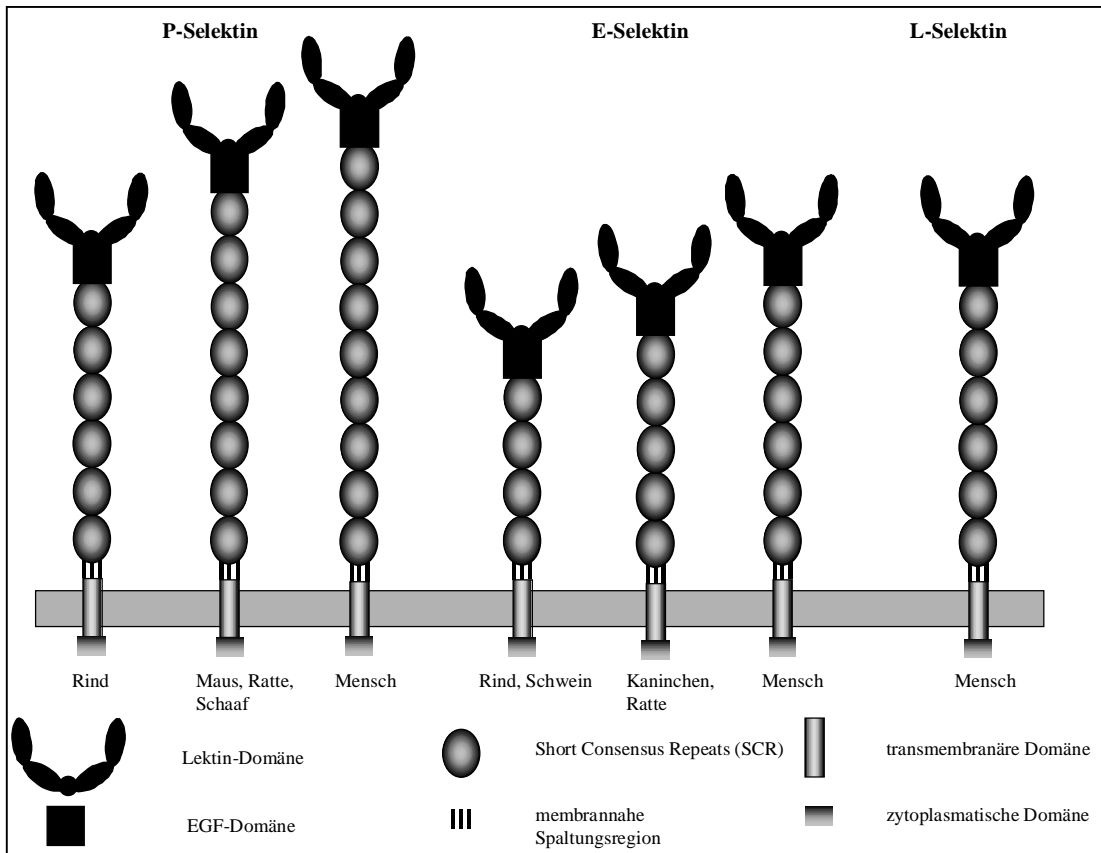


Abbildung 2 Schematische Darstellung der Selektinmoleküle.

2.2.1. L-Selektin

L-Selektin wurde erstmals 1983 als Antigen für zelladhäsionsblockierende Antikörper beschrieben. Es wurde gefunden, daß der monoklonale Antikörper (MAb) MEL14 in den Lymphknoten von Mäusen die Bindung von Lymphozyten an den endothelialen Venolen (HEV) blockiert [11]. Gleichzeitig wurde die Beteiligung von kohlenhydratbindenden Molekülen auf Zelloberflächen beim Lymphozyten-Homing^(a) bewiesen [12]. Schließlich konnten Affinitäten der dabei beteiligten Kohlenhydrate (Phosphatmannose) [13] und dem MEL14 Antigen nachgewiesen werden, welches daraufhin L-Selektin genannt wurde.

^a

Das Lymphozyten-Homing beschreibt einen Rezirkulationsprozeß der Lymphozyten. Dabei werden die Lymphozyten sowohl in intravaskuläres Gewebe als auch in das lymphatische System geleitet. Die meisten Lymphozyten verlassen das Blutgefäßsystem innerhalb der Lymphknoten oder anderer Lymphorgane zum Beispiel der Peyer-Platten. Dieser Rezirkulationsprozeß dehnt den Wirkungsbereich der Lymphozyten vom Blut auf das Lymphgefäßsystem aus und spielt damit eine wichtige Rolle in der normalen Immunabwehr.

Tatsächlich erbrachte die Klonierung des L-Selektin-Gens den Beweis einer N-terminalen Lektin-Domäne mit Homologie zu C-Typ Lektinen der Säugetiere [9].

Auf der Grundlage der antigenen Affinität von L-Selektin zum MAb MEL14 konnte wiederum erstmals dieses Selektin für die Migration von neutrophilen Granulozyten in entzündetes Gewebe verantwortlich gemacht werden [14]. L-Selektin wird im Gegensatz zu E- und P-Selektin konstitutiv exprimiert, was seine besondere Bedeutung bei dem erwähnten Lymphozyten-Homing deutlich macht. Bereits wenige Minuten nach der Präsentation von L-Selektin auf der Zelloberfläche wird es an der membrannahen Spaltungsregion proteolytisch abgetrennt, was einen regulatorischen Hintergrund vermuten läßt [15]. Diese Art der Downregulation des L-Selektins ist wegen ihrer schnellen Kinetik und der Resistenz gegen die meisten Proteaseinhibitoren sehr ungewöhnlich. Die Modulation der L-Selektin-Funktion im Entzündungsprozeß wird, im Gegensatz zu den anderen beiden Selektinen, zusätzlich durch die entsprechende Ligandenexpression kontrolliert.

Nach erfolgter Bindung von Neutrophilen an einen Entzündungsherd kommt es sofort zur Downregulation des L-Selektins und zur Upregulation einer weiteren Gruppe von Adhäsionsmolekülen: den Integrinen [16, 17]. Leukozytenintegrine $\alpha_M\beta_2$ oder Mac-1 verursachen eine feste Bindung der Blutzellen an der Gefäßwand, nachdem L-Selektin eine rollende Bewegung vermittelt hat. Diese chronologischen und kausalen Zusammenhänge konnten in mehreren in-vivo Versuchen bewiesen werden: MAb DREG 200 gegen L-Selektin inhibiert das Leukozytenrollen [18], während ein anti- β_2 -Integrin Antikörper das Zellrollen nicht beeinflusst, ein festes Anhaften der Leukozyten jedoch unterdrückt [19].

Nach diesen ersten Arbeiten gab es eine Reihe von Veröffentlichungen, die klar demonstrierten, daß alle drei Selektine den initialen Kontakt zwischen Leukozyten und Gefäßendothel in Form einer Zellrollbewegung vermitteln. Bei entzündungsbedingten Selektinbindungen kommt es darüber hinaus zu synergistischen Effekten von L-, P- und E-Selektinen. Außerdem konnte gezeigt werden, daß alpha/beta und gamma/delta T-Lymphozyten neben L-Selektin ebenfalls E- und P-Selektin exprimieren. [20, 21].

2.2.2. P-Selektin

P-Selektin wurde 1984 ursprünglich als ein Membranprotein in den Speichergranula von Blutplättchen entdeckt [22, 23]. Es vermittelt die Bindungen zwischen Neutrophilen und Thrombozyten [24, 25] bzw. Neutrophilen an Endothelzellen [26]. Die Präsentation von P-Selektin an der Zelloberfläche kann über zwei verschiedene Mechanismen ausgelöst werden: P-Selektin ist einerseits in den Granula (α -Granula der Thrombozyten bzw. Weibel-Palade-

Körper der Endothelzellen) gespeichert und wird nach Stimulierung durch Histamin oder Thrombin innerhalb weniger Minuten bzw. Sekunden im Falle der Thrombozyten an die Zelloberfläche transportiert. Eine ähnlich stimulierende Wirkung zeigen auch andere Pharmakophore wie Ca^{2+} -Ionophore oder Phorbol ester [26, 27]. Andererseits kann durch die Zytokine Interleukin-1 (IL-1), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) oder durch Lipopolysaccharid (LPS) der P-selektin codierende mRNA-Level erhöht und somit eine Neusynthese des Proteins initiiert werden.

Exprimiertes P-Selektin wird innerhalb von 30-60 Minuten durch Endozytose wieder von der Zelloberfläche entfernt. Im Gegensatz zu den anderen Selektinen wird P-Selektin teilweise in den Endosomen des Golgi-Apparat zurückgewonnen und in die Weibel-Palade-Körper transportiert [28]. Damit steht dieses P-Selektin sofort wieder zur Verfügung. Der größere Anteil des Proteins gelangt jedoch aus den Endosomen in die Lysosomen, wo es abgebaut wird.

2.2.3. E-Selektin

E-Selektin wurde 1987 erstmals als zytokininduzierbarer Adhäsionsrezeptor von Myeloblasten auf humanen Nabelschnurvenenzellen (HUVEC) beschrieben [29]. Heute ist bekannt, daß dieses Selektin auf Endothelzellen aller postkapillaren Venolen exprimiert werden kann. Unaktiviert präsentieren diese Zellen kein oder nur sehr wenig E-Selektin. Die Stimulierung der endothelialen Zellen durch Zytokine oder LPS führt direkt zu einem Anstieg der E-Selektin-kodierenden mRNA und damit zur Synthese des Glykoproteins. Das neu synthetisierte Selektin gerüst gelangt in das endoplasmatische Retikulum, in dem sich reich Mannose-N-verknüpfte Oligosaccharide befinden. Die Selektine werden posttranslational im Golgi-Apparat glykosyliert und danach in dieser Form an der Zelloberfläche exprimiert [32]. Da E-Selektin nach Aktivierung immer neu synthetisiert wird, werden die höchsten Proteinwerte erst nach 4-8 Stunden erreicht. E-Selektin besitzt zudem eine relativ geringe Halbwertszeit von wenigen Stunden, da es wesentlich schneller als die meisten anderen Membranproteine internalisiert wird, über Endosomen in Lysosomen gelangt und abgebaut wird [30, 31]. Nach 16-24 Stunden verringert sich die Proteinsynthese, und es werden selbst in Gegenwart der genannten Zytokine wieder die niedrigen Ausgangswerte erreicht [32].

2.2.4. Signaltransduktion durch Selektine

Zusätzlich zur eigentlichen Funktion des Leukozytenbindens sind die Selektine in Signaltransduktionen involviert. Zur Zeit geht man davon aus, daß die Signale, die von den Selektin-Selektinligandbindungen erzeugt werden, gemeinsam mit den Signalen weiterer Chemokinstimulationen zu einer Leukozytenaktivierung, -migration und -extravasation führen. Dazu führte die Entdeckung, daß eine Bindung von Sulfatiden an L-Selektin zur Erhöhung des zytosolischen Ca^{2+} -Spiegels und zur Expression von TNF- α - und IL-8-mRNA führt [33]. Zudem wurde beobachtet, daß ein Anbinden von verschiedenen Antikörpern an L-Selektin eine verstärkte Phosphorylierung und damit Aktivierung einiger Proteine wie zum Beispiel der MAP-Kinase auslöst [34]. Falls bei dieser Signalkaskade die Tyrosinkinase p56^{lck} nicht zur Verfügung steht, kann das L-Selektin ein Zellrollen nicht mehr vermitteln. Deshalb wird eine wesentliche Beteiligung der zytoplasmatischen Selektindomäne im Zellrollprozeß angenommen [35].

Weitere Studien über Bindungen zwischen L-Selektin und dessen Antikörper zeigten als Folgesignal eine erhöhte Expression von Integrinen an der Zelloberfläche [36]. Dagegen kommt es bei einer Bindung von LPS am L-Selektin zu einer verstärkten Produktion von Peroxiden, was wiederum mit L-Selektin-Antikörpern unterdrückt werden kann [37, 38].

Die Untersuchungen der Signalfunktionen von E- und P-Selektin sind weit weniger fortgeschritten. Lediglich die Beeinflussung des Zytoskeletts der Zellen durch die Bindungen von Selektin-Antikörpern konnte beobachtet werden. So kommt es bei derartigen Wechselwirkungen zu Verformungen der Endothelzellen [39]. Dieser Effekt ist wiederum auf eine Beeinflussung des Zytoskeletts zurückzuführen, da bei einem Crosslinking von E-Selektin mit Antikörpern eine Copräzipitation von Zytoskelettproteinen wie Vinculin, Filamin und FAK mit E-Selektin während einer Immunopräzipitation stattfindet. Diese Mitfällung ist bei einfach bindenden Antikörpern nicht zu beobachten [40].

Eine ähnliche Formveränderung der Zellen wurde für aktivierte Blutplättchen beschrieben, verbunden mit einer starken selektiven Phosphorylierung von Threonin, Serin und Tyrosin der zytoplasmatischen Domäne des P-Selektins [41, 42].

Wesentlich intensiver wurden Signaltransduktionswege untersucht, die indirekt durch eine Selektinbindung initiiert werden. In einer Reihe von Arbeiten wurde gezeigt, über welche Signalmechanismen P-Selektin die Aktivierung von β_2 -Integrinen auslöst bzw. beeinflusst: Mit Hilfe des P-Selektins gelangen Leukozyten in direkte räumliche Nähe zur aktivierten Gefäßwand. Auf den Zelloberflächen des Endothelgewebes befindet sich der membrangebundene Plättchen-aktivierende Faktor PAF, dessen Bindung zu seinen Rezeptoren

an den Leukozyten nun extrem erleichtert wird. Das aus Sicht der Leukozyten immobilisierte Chemoattraktant PAF kann somit die Integrinaktivierung stimulieren [43, 44].

Derartige Untersuchungen, insbesondere von indirekten Signalmechanismen der Selektine, beschreiben meist die Wechselwirkungen zwischen Leukozyten und aktiviertem Endothelgewebe *in-vivo* oder *in-vitro* (konfluente Zellmonolayer). Unter solch komplexen Bedingungen kann die Mitwirkung anderer Stimuli wie zum Beispiel endotheliale Zytokine nicht ausgeschlossen werden. Einen gewissen Vorteil brachte dann der Einsatz von immobilisiertem, rekombinantem E-Selektin.

Wie in Kapitel 2.4 beschrieben, bezieht sich die physiologische Funktion der Selektine immer auf Bedingungen eines Scherstromes des Blutes bzw. einer dynamischen Zellrollbewegung. Die funktionierenden Selektine stehen immer unter einer mechanischen Beanspruchung, deshalb sollten noch weitere umfangreiche Signaltransduktionen zu erwarten sein, insbesondere vor dem Hintergrund, daß die Selektine über ihren zytoplasmatischen Teil direkt mit dem Zytoskelett verbunden sind. Die Aufklärung dieser Phänomene steht noch weitestgehend aus, da sich die genannten Untersuchungen meist auf statische Bindungen zwischen Selektin und Antikörper bzw. zwischen Antikörper und selektinexprimierenden Zellen beziehen oder aber statische Zell-Zell-Wechselwirkungen beschreiben.

2.3. Selektinliganden

Die Selektinliganden umfassen eine heterogene Gruppe von transmembranären Glykoproteinen und Glykolipiden, die den Selektinen bestimmte Kohlenhydratstrukturen präsentieren.

Fast alle Zelladhäsionsmoleküle im lebenden Organismus binden auf der Basis von Protein-Protein-Wechselwirkungen. Deshalb erscheint es ungewöhnlich, daß die Selektine an Strukturen binden, die aus einem Proteingrundgerüst oder einem Lipidträgermolekül bestehen, welche mit bestimmten Kohlenhydratverbindungen modifiziert sind. Das Proteingerüst ist dabei alleine nicht in der Lage, für die Selektine als erkennbare Liganden zu fungieren. Es stellt lediglich eine Grundstruktur dar, die erst durch enzymatische Glykosylierung ihre Lektinaffinität verliehen bekommt. Aus diesem Grund werden Lektinerkennungssysteme auch als eine funktionale Triade aus Rezeptor, Ligand (oder Bindungsepitop) und Trägermolekül beschrieben, wobei das Bindungsepitop und das Trägermolekül zum klassischen Begriff „Ligand“ zusammengefaßt werden.

Prinzipiell sind Selektinliganden rutenartige, saure Glykoproteine. Sie sind langgestreckt und tragen an ihren NH₂- bzw. OH-gruppenreichen Seitenketten über Asparagin N-verknüpfte bzw. über Threonin und Serin O-verknüpfte Oligosaccharide. Die O-glykosidreichen

Ligandstrukturen werden Mucine genannt. Diese Glykokonjugate stellen die eigentlichen Bindungsepitope dar und werden vom Protein in ihrer Gesamtheit als ein hochaffiner Selektinligand präsentiert [Abbildung 3]. Eine Strukturaufklärung der Mucine konnte trotz bekannter Aminosäuresequenz nicht erfolgen, da eine exakte Lokalisation der Saccharide am Proteingrundgerüst noch nicht gelungen ist.

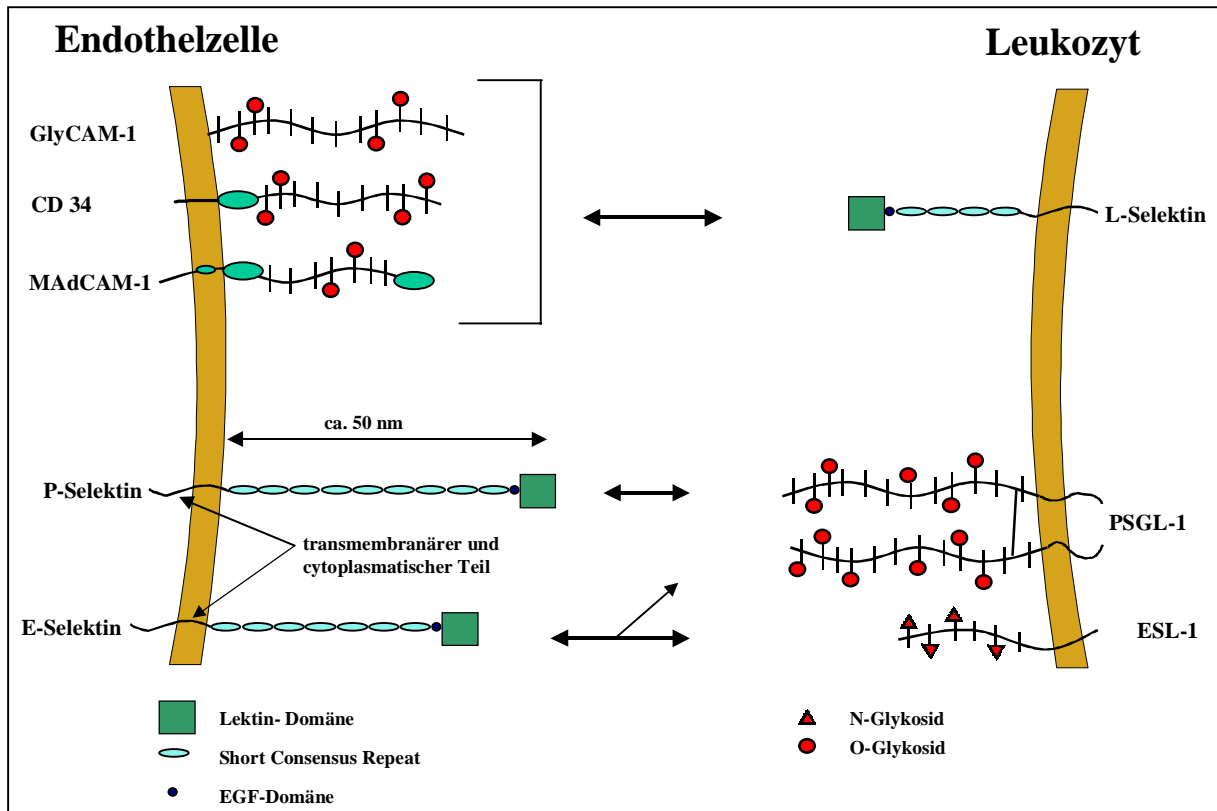


Abbildung 3 Schematische Darstellung von Struktur und Lokalisation der Selektine und ihrer entsprechenden Liganden.

Obwohl die Struktur dieser Oligosaccharideinheiten nicht für einzelne Arten spezifisch ist, geht man bei den übergeordneten Seitenkettenstrukturen aber auch bei endständigen Modifikationen der Oligosaccharide von einer zelltypischen Art- und Gewebespezifität aus. Zusätzlich werden die Ligandenstrukturen durch die Abstammung der Zellen und den Entwicklungszustand eines Individuums reguliert. Membranständige Oligosaccharide besitzen neben ihrer Sonderstellung bei Zelladhäsionsvorgängen eine große Bedeutung bei den Wechselwirkungen einer Zelle mit ihrer Umgebung. Insbesondere der schnelle Wechsel von verschiedenen Oberflächensacchariden während der gesamten Embryogenese von Säugern ist bemerkenswert [45]. Solche Untersuchungen deuten an, welche bedeutende Rolle die oberflächlichen Oligosaccharide im komplizierten Zusammenspiel aller regulatorischen

Mechanismen im menschlichen Organismus während dieser Phase umfassender Strukturveränderungen spielen.

Oligosaccharidkonstrukte besitzen ein riesiges Potential zur Kodierung von Informationen, da sie zusätzlich zur Sequenzkodierung durch die anomere Konfiguration der Monomeren α - oder β -verknüpft sein können. Hinzu kommt die Möglichkeit von Verzweigungen oder Substitutionen durch Sulfat-, Phosphat- oder Acetylgruppen. Zieht man nun noch die unterschiedlichen Anordnungen der Glykokonjugate an wiederum verschiedenen Trägerproteinen hinzu, ergibt sich eine immense Zahl von Variationsmöglichkeiten, die es von Rezeptormolekülen zu dekodieren gilt.

Von Protein-Protein-Wechselwirkungen ist bekannt, daß sie nur unter einer sehr hohen Spezifität und Selektivität zustande kommen. Bei den Selektinliganden läßt sich dagegen eine solche ausgeprägte Spezifität zu ihren Rezeptoren nicht erkennen. So können selektinbindende Oligosaccharide ihre Bindungsaffinität auf verschiedene Trägermoleküle übertragen [46]. Selbst saccharidmodifiziertes BSA ist in der Lage, an Selektine zu binden [47, 48].

Ein weiterer Punkt, in dem sich Kohlenhydrat- von Proteinwechselwirkungen unterscheiden, ist in der schwachen Bindungsstärke von Lektinen und Selektinen zu einzelnen Glykokonjugaten zu finden. Es gibt nur eine geringe Anzahl von Glykoproteinen, die wiederum mit einer begrenzten Anzahl von Oligosacchariden modifiziert sind, die zu den hochaffinen Bindungspartnern der Selektine gezählt werden können. Nur sie werden als die eigentlichen physiologischen Selektinliganden betrachtet.

Essentielle Kohlenhydrat-Grundstrukturen an den bisher gefundenen Selektinliganden sind die Sialinsäure^(b) und die Fukose. O-verknüpfte fukosylierte Sialinsäurederivate mit dem Protein werden auch Sialomucine genannt. Die Kohlenhydrat-Bindungsepitope am PSGL-1 wie auch an den anderen physiologischen Selektinliganden sind hauptsächlich das O-verknüpfte Tetrasaccharid Sialyl Lewis^x (sLe^x) oder Sialyl Lewis^a (sLe^a). Diese Leitstrukturen der Selektinliganden bestehen aus N-Acetyllaktosamin, welches mit einer Fukose α 1-3 (für sLe^x) oder α 1-4 (für sLe^a) verknüpft ist. Endständig befindet sich eine N-Acetyl-Neuraminsäure (Sialinsäure) [Abbildung 4].

^b Als Sialinsäuren werden alle N-Acyl-Neuraminsäuren bezeichnet

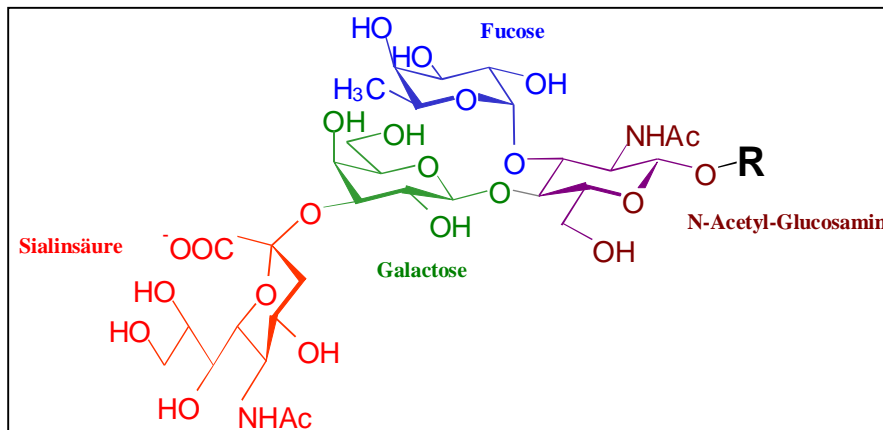


Abbildung 4 Struktur des Sialyl Lewis^x: Neu5Acα2-3Galβ1-4[Fucα1-3]GlcNAc.

Die Bedeutung der Fukose wird bei Patienten deutlich, die unter einem Fukosestoffwechseldefekt leiden: Beim Fehlen der Fukosyltransferase können die Granulozyten kein fukosehaltiges sLe^x exprimieren, dadurch können die Zellen an Entzündungsherden nicht aus dem Blutstrom heraus abgebremst werden, was ständige bakterielle Infektionen zu Folge hat [49].

2.3.1. P-Selektin Glykoprotein-1

Der P-Selektin Ligand PSGL-1 (P-Selektin-Glykoprotein-1) ist ein über Disulfidbrücken verknüpftes dimeres 250-kDa Protein und wurde 1992 bei einer Affinitätschromatographie mit gereinigtem P-Selektin entdeckt und ein Jahr später durch Expressionsklonierung von HL60 Zellen auf COS Zellen transfiziert [50, 51]. PSGL-1 wird von einer Reihe von Zellen mit myeloblastischer, lymphoider oder dendritischer Abstammung exprimiert. Es wird als wichtigster, wenn nicht gar einziger Ligand für P-Selektin auf menschlichen Neutrophilen und stimulierten T-Zellen präsentiert [52]. Darüber hinaus wird eine nicht unerhebliche Affinität zu E-Selektin [53, 54, 55, 66, 56] und L-Selektin (teilweise kontrovers) [57, 58] diskutiert.

PSGL-1 ist der derzeit am besten untersuchte Selektinligand. So verhindert der monoklonale Antikörper MAb-PL-1 ein Zellrollen menschlicher Neutrophiler auf isoliertem P-Selektin [59]. Durch die Blockade der PSGL-1 Bindungen mit MAb PL-1 wird das Zellrollen von menschlichen Neutrophilen auf Mesenterialzellen der Ratte unterdrückt [60]. MAb gegen PSGL-1 der Maus ist sogar umfassend in der Lage, die Migration von Neutrophilen in entzündetes Mäuseperitoneum zu verhindern [61]. Dieser Antikörper

unterdrückt *in-vitro* auch dann das Zellrollen, wenn noch andere sLe^x-tragende Glykoproteine vorhanden sind [62].

Bei der Glykosylierung des PSGL-1 spielt die Fukosyltransferase eine entscheidende Rolle, da eine Co-Transfektion des Enzyms in COS-Zellen eine Bindung an P-Selektin ermöglicht. Für eine hochaffine Selektinbindung benötigt das Protein keine N-verknüpften Seitenketten [67], muß aber zusätzlich zur exakten Anordnung der Oligosaccharide am N-Terminus sulfatiert sein [63, 64, 65]. All diese Untersuchungen unterstreichen, daß PSGL-1 den bedeutendsten Liganden für P- aber auch für die anderen Selektine darstellt, um ein Zellrollen zu ermöglichen. Es wird daher auch als Leitstruktur für die Erforschung der physiologischen Relevanz aller Selektinliganden betrachtet [66, 67, 68].

2.3.2. E-Selektin Liganden

E-Selektin bindet früheren Studien zufolge sowohl an Oligosaccharide, Glykolipide und Glykoproteine [69, 70, 71]. Allerdings hat sich in der letzten Zeit herausgestellt, daß alle hochaffinen Bindungen zum E-Selektin durch Proteasebehandlung der ligandentragenden Myeloid-Zellen aufgehoben werden können. Das läßt den Schluß zu, daß ausschließlich Glykoproteine zu starken Wechselwirkungen mit E-Selektin in Frage kommen.

E-Selektin bindet wie oben erwähnt ebenfalls an PSGL-1, jedoch mit wesentlich geringerer Affinität. 1995 konnte mit Hilfe von E-Selektin-IgG in einer Affinitätschromatografie der hochaffine E-Selektin-Ligand-1 (ESL-1) aus Myeloidzellextrakt identifiziert werden [72]. Dabei handelt es sich um N-verknüpfte Glykoproteine. ESL-1 findet man auf einer Vielzahl von Zellen, die Expression ist jedoch wie beim PSGL-1 auch von der myeloblasten-spezifischen Fukosyltransferase abhängig. Eine Kreuzreaktivität von ESL-1 zu den anderen Selektinen ist noch weitgehend ungeklärt.

E-Selektin zeigt eine gewisse Affinität zu L-Selektin, allerdings nur, wenn das L-Selektin von Neutrophilen exprimiert und glykosyliert wird. Dagegen zeigt das L-Selektin von Lymphozyten keine Bindungsaffinität [73]. Außerdem kann neutrophiles L-Selektin nicht über eine E-Selektin-Affinitätschromatographie isoliert werden [72]. Aus diesen Gründen wird das L-Selektin nicht als funktionaler Ligand für das E-Selektin betrachtet.

2.3.3. L-Selektin Liganden

Über die Bindungen der L-Selektinliganden an Selektinen bzw. deren Funktionalität ist derzeit relativ wenig bekannt. In den HEV wurden 1992 das lösliche Molekül GlyCAM-1 (Glycosylation-Dependent Cell Adhesion Molecule-1) und ein Jahr darauf das

membranständige CD34 als potentielle L-Selektinliganden erkannt. Ähnlich dem PSGL-1 handelt es sich dabei um O-verknüpfte Sialomucine mit einem hohen Sulfatierungsgrad [74, 75]. Eine direkte Bindung von Neutrophilen oder Lymphozyten an CD34 oder GlyCAM-1 ist jedoch nicht klar bewiesen.

Das Mucosal Adressin Cell Adhesion Molecule-1 (MAdCAM-1) ist in der Lage, L-selektinabhängiges Zellrollen und -binden zu vermitteln. Es wird in den intestinalen Peyer-Platten^(c) exprimiert und besteht aus einer mucinartigen und einer Immunglobulin-domäne [76, 77, 78].

Als weiterer möglicher Ligand für L-Selektin wird das endotheliale Tetrasaccharid Heparansulfat vermutet [79].

Keiner der bis jetzt gefundenen L-Selektinliganden ist bei der extralymphatischen Leukozytenadhäsion am entzündeten Gewebe direkt beteiligt. Allerdings sind Neutrophile fähig, L-selektinabhängig über immobilisierte Leukozyten zu rollen [80]. Das legt die Expression eines L-Selektinliganden auf Neutrophilen nahe.

2.3.4. Bindungseigenschaften/Multivalenzhypothese

Selektinvermittelte Bindungsereignisse von Leukozyten an Gefäßwandungen sind, bedingt durch den Scherstrom des Blutes und die Größe der weißen Blutzellen, starken mechanischen Beanspruchungen ausgesetzt. Deshalb scheint es verwunderlich, daß gerade Kohlenhydratwechselwirkungen für diese Aufgabe verantwortlich sind. Im Vergleich zu Protein-Protein-Wechselwirkungen besitzen einzelne Oligosaccharide eine auffallend geringe Affinität von ca. 1mM zu ihren Rezeptoren, so auch sLe^x zu den Selektinen [81]. Auch durch einfache Summierung der Bindungskräfte vieler Saccharidstrukturen erreicht man nicht die ca. 10⁵-fach höhere Affinität zu den Selektinen, wie sie physiologische Sialomucine aufweisen können. Auf der Suche nach stärker selektinbindenden Substanzen erbrachten strukturelle Modifikationen der Oligosaccharide ebenfalls keine vergleichbaren Bindungsaffinitäten. Trotzdem besteht in Forschung und Industrie ein großes Interesse an Verbindungen, die in Anlehnung an das lösliche sLe^x Selektinbindungen verdrängen, und somit Entzündungserscheinungen kontrollieren können. Einige dieser inhibitorischen Substanzen, die von einer japanischen Arbeitsgruppe synthetisiert wurden, sind in Kapitel 4.3 beschrieben. Erst kürzlich wurde von Novartis Pharma AG ein 30-fach Selektin-affineres sLe^x-Mimetikum vorgestellt [82].

^c Die Peyer-Platten sind eine Ansammlung von 15-20 Lymphknötchen am unteren Dünndarm. Sie wurden im 17. Jh von dem Arzt Johann Konrad Peyer entdeckt.

Dennoch spielt die Beteiligung einer großen Anzahl von Bindungsepitopen eine entscheidende Rolle. Auf der einen Seite ist bekannt, daß L-Selektin [83] und die Liganden ESL-1 und PSGL-1 [84, 85] auf den Zelloberflächen nicht homogen verteilt sind, sondern auf Microvilli^d räumlich konzentriert präsentiert werden. Zum anderen ist eine Vielzahl von Glykokonjugaten an einem hochaffinen Selektinligandmolekül essentiell (vgl. Struktur des Sialomucins; Kapitel 2.3). So ist z.B. das mucinspezifische Enzym O-Sialoglykoprotease in der Lage, alle Mucine von der Zelloberfläche zu entfernen, wohingegen die Oberflächenexpression von sLe^x nicht beeinflusst wird [86]. Das übrige, auf den Zelloberflächen homogen verteilte sLe^x, ist nicht in der Lage, *in-vivo* ein Zellrollen zu vermitteln.

Um eine ausreichend hohe Affinität zu den Selektinen vorweisen zu können, müssen die physiologischen Selektinliganden in ihrer Funktion als Rollrezeptor-Liganden folgende Bedingungen erfüllen:

- a) exakte Zusammensetzung und Sequenz der Oligosaccharidstruktur,
- b) räumliche Konzentrierung der Oligosaccharide durch die Anordnung auf den Sialomucinen,
- c) exakte sterische Anordnung und Präsentation der Oligosaccharide durch das Mucingrundgerüst,
- d) räumliche Konzentrierung der Sialomucine in Clusterarealen der Zelloberfläche, wie z.B. den Microvilli,

Nur durch die Summe all dieser Voraussetzungen sollte es den Selektinliganden möglich sein, eine entsprechend hohe Bindungskraft dem Scherstrom des Blutes entgegensetzen zu können und ein Leukozytenrollen zu vermitteln. Weil es sich bei diesem Prozeß um das Miteinander einer Vielzahl einzelner Bindungsereignisse handelt, spricht man auch von der Multivalenzhypothese.

Ausgehend von dieser Hypothese stellt sich die Frage nach Bedeutung und Funktion von sLe^x Glykolipiden. Es ist nicht bekannt, ob das Zellrollen an mucinartige Proteinstrukturen gebunden ist oder ob Glykolipide unter bestimmten Voraussetzungen ebenfalls ein Rollen vermitteln können. Der Multivalenzhypothese zufolge müßte eine räumliche Konzentrierung der Bindungsepitope die dafür notwendigen Bindungskräfte aufbringen können. Dagegen spricht allerdings die wesentlich geringere Flexibilität und Erkennbarkeit der Glykolipid-Kopfgruppen durch den geringen Abstand zur Zellmembran.

^d Microvilli sind 0,5 bis 1,5 µm über die Zelloberfläche hinausragende Zytoplasmafortsätze, die ein Lumen begrenzen.

Auch die Bedeutung des gelösten sLe^x von 10⁻³ mM im Zytosol ist bisher ungeklärt. Eine Beteiligung der Tetrasaccharide an der Modulation des Zellrollprozesses wäre nur unter den besonderen kinetischen Bindungseigenschaften und einer lokalen Konzentration des sLe^x vorstellbar.

2.4. Der Zellrollprozeß

Der Zellrollprozeß stellt eine Sonderform der Zelladhäsion dar und wird seit nunmehr über 150 Jahren phänomenologisch untersucht. Das Rollen ist eine abbremsende Bewegung von Leukozyten aus dem Blut, während sie, getrieben vom Scherstrom, an der Gefäßwand entlangrollen. Ein selektinvermitteltes Zellrollen steht immer am Anfang der Adhäsionskaskade einer Leukozytenmigration aus dem Blut (Rollen→Adhäsion→Transmigration) (Kapitel 2.1). Wird innerhalb dieser Kaskade ein einziger Schritt unterdrückt, wird der gesamte Migrationsprozeß von Leukozyten in entzündetes Gewebe verhindert. Auch die Blockade von Selektinwechselwirkungen hat ein Ausbleiben einer entzündlichen Immunantwort oder des Lymphozyten-Homing zur Folge [1, 87, 88]. Aus dieser großen Bedeutung wird ersichtlich, weshalb die Selektine, ihre Liganden und der Rollvorgang an sich, in den letzten Jahren Gegenstand intensivster Forschungen geworden sind.

2.4.1. Flußbedingungen in Blutgefäßen

Die Leukozytenmigration und somit das Zellrollen findet ausschließlich in den kleinsten venösen Gefäßen, nicht aber in arteriellen Gefäßen statt, was auf einen Einfluß sowohl der Strömungscharakteristik als auch den strukturellen Eigenschaften der Endotheloberfläche schließen läßt. Die Venolen könnten idealerweise als zylindrische Rohre betrachtet werden, durch die im laminaren Strom eine Newtonsche Flüssigkeit fließt. Eine solche Flüssigkeit ist nicht komprimierbar und die Viskosität gleich und konstant. Die Verhältnisse in einer solchen idealen Röhre lassen sich durch die Poiseuillesche Gleichung beschreiben. Aus ihr geht hervor, daß die Durchflußmenge proportional zur Kraftdifferenz zwischen Anfang und Ende des Rohres, proportional zur vierten Potenz des Durchmessers und indirekt proportional zur Rohrlänge und Viskosität der Flüssigkeit ist^(e):

$$I = \pi r^4 \frac{\Delta p}{8\eta l}$$

^e Δp : Druckdifferenz zwischen Rohranfang und -ende, r: Rohrradius. η : dynamische Viskosität der Flüssigkeit und l: Rohrlänge

Daß die Strömungsstärke mit der 4. Potenz des Radius wächst bedeutet, daß sich bei einer Vergrößerung des Gefäßdurchmessers um nur 20% (z.B. bei einer Vasodilatation) die Durchflußmenge verdoppelt. Verringert sich dagegen der Gefäßdurchmesser um 30% (z.B. durch Cholesterinablagerungen), steigt bei gleichem Blutstrom der Druck auf das Vierfache.

Diese Gleichung auf Blut angewendet, würde aber auch einen ungeheuren Reibungswiderstand in den Kapillaren voraussagen. Daß dieser Widerstand tatsächlich nicht vorhanden ist liegt daran, daß die Viskosität des Blutes weder einheitlich noch konstant ist. Verantwortlich dafür sind hauptsächlich die Erythrozyten. Sie fließen zusammen mit den anderen zellulären Blutbestandteilen konzentriert im Zentrum des Gefäßes wie durch einen noch dünneren Schlauch und schaffen dabei einen zellfreien äußeren Rand. Durch diesen Effekt ist die effektive Blutviskosität in der Gefäßmitte relativ hoch, wohingegen sie in unmittelbarer Nähe der Wandung stark erniedrigt ist [89]. Daraus ergibt sich ein abgestumpftes Geschwindigkeitsprofil [Abbildung 5].

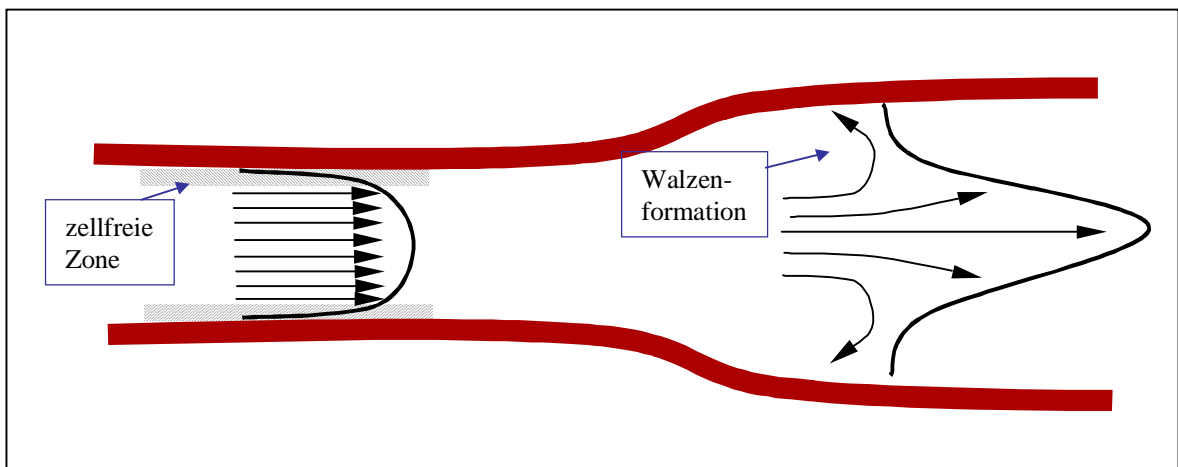


Abbildung 5 Geschwindigkeitsprofil des Blutes in einer Kapillare; schematisch. Übergang vom gesunden zum entzündeten Abschnitt.

Die Flußgeschwindigkeit nimmt bei diesem Profil am zellfreien äußeren Rand ca. 2,1-fach stärker zu als bei einer Newtonschen Flüssigkeit [90].

Unter diesen physiologisch gesunden Bedingungen in den Kapillaren ist ein Zellrollen kaum möglich, da sich:

- a) gerade die schwereren Leukozyten im Zentrum des Gefäßes bewegen und sich der Zellwand nicht nähern können und

b) die durch das steile Geschwindigkeitsprofil bedingten Kräfte auf eine Zelle in Gefäßwandnähe viel zu groß sind, um irgendeine Bindung zustande kommen zu lassen [91].

Unter bestimmten Voraussetzungen wird es den Leukozyten allerdings doch ermöglicht, mit der Gefäßwand in Kontakt zu kommen. In sehr kleinen Venolen von ca. 10-30 μm werden die Leukozyten durch deformierbare Erythrozyten an die Gefäßbegrenzungen gedrückt [92]. In den größeren Gefäßen mit einem Durchmesser zwischen 30 und 100 μm dagegen neigen die Erythrozyten, bedingt durch die geringere Fließgeschwindigkeit, teilweise zur Aggregation. Diese relativ massereichen Zellaggregate nehmen nun die zentrale Position im Strömungsprofil der Kapillare ein und verdrängen die Leukozyten in Randbereiche [93].

Diese Bedingungen in den Venolen ändern sich dramatisch im Falle einer Entzündung: es kommt zu einer Gefäßaufweitung und dadurch zu einer durchschnittlichen Verringerung der Flußgeschwindigkeit. Außerdem erhöht sich die Gefäßpermeabilität, wodurch verstärkt Plasma aus dem Lumen austritt und sich das Zellpackungsvolumen erhöht (erhöhter Hämatokrit). Zusätzlich steigt die Aggregationstendenz der Erythrozyten durch verstärkte Interleukin-6-Wirkung. All diese Faktoren bewirken eine Art „Walzenformation“ des Geschwindigkeitsprofils der Blutflüssigkeit. Das bedeutet, daß die Fließgeschwindigkeit von der Gefäßwand aus wesentlich schwächer ansteigt und erst in der „Rohrmitte“ hohe Werte annimmt [Abbildung 5]. Auf diese Art und Weise können bedingt durch ihre Größe und ihr Gewicht besonders die Leukozyten unter verminderten mechanischen Belastungen mit dem Endothelgewebe in Kontakt kommen [94].

Bewegen sich Leukozyten in unmittelbarer Nähe einer Gefäßwand, sind sie in jedem Falle einer gewissen Scherrate ausgesetzt. Die Scherrate ist der Gradient der axialen Flußgeschwindigkeit und hat die Dimension einer Geschwindigkeit pro Längeneinheit (auf den Radius bezogen) oder s^{-1} . Der Scherstreß τ_w beschreibt die gleichen Bedingungen und gibt die Scherkraft an, welche pro Flächeneinheit Gefäßwand wirkt. Ihre Dimension ist eine Kraft pro Fläche (z.B. dyn/cm^2).

Für die Berechnung des Gradienten der Flußgeschwindigkeit in axialer Richtung wird der Schergrad herangezogen. Er stellt eine Geschwindigkeit pro Längeneinheit dar und wird in s^{-1} angegeben. Der Schergrad ergibt sich aus

$$\frac{dv}{dr} \gamma_w = 2,1(8v_b / D)$$

wobei v_b die mittlere Blutflußgeschwindigkeit und D der Durchmesser der Gefäße ist. Zur Berechnung des Schergrades in Durchflußkammern wird auch die Gleichung

$$G = 6 Q / b h^2$$

benutzt, wobei Q die Durchflußrate (Volumen Flüssigkeit pro Zeiteinheit), b die Breite und h die Höhe der Flußkammer darstellt. Der Schergrad in postkapillaren Venolen liegt in Abhängigkeit der verschiedenen Gewebe und Organe zwischen 150 und 500 s^{-1} .

Das durch diese Beziehungen beschriebene Phänomen hat zur Folge, daß die Kräfte, die auf eine Zelle nahe des Gefäßrandes wirken, sehr inhomogen sind. Direkt an der Wandung ist die Fließgeschwindigkeit des Blutplasmas sehr gering, dadurch liegen auch nur geringfügige Kräfte in diesem Bereich an. Dagegen ist die Zelle, die sich mehr in der Gefäßmitte befindet, wesentlich größeren flußbedingten Schubkräften ausgesetzt. Durch dieses Kräfteungleichgewicht wird eine Zelle im Randbereich eines fließenden Systems ein gewisses Drehmoment erfahren, was in einer rotierenden Zellbewegung resultiert; auch ohne jeglichen Kontakt mit der Gefäßwandung. Diese Zellrotation kann bei bis zu 40% der Leukozyten bei einer Intravitalmikroskopie beobachtet werden, wird jedoch nicht als Zellrollen betrachtet. Sie ist weder rezeptorvermittelt noch ist die Vorwärtsbewegung durch Zell-Zell-Wechselwirkungen beeinflusst und soll deshalb auch nicht Gegenstand dieser Arbeit sein.

2.4.2. Beobachtungen *in-vivo*

Der Zellrollprozeß kann *in-vivo* mit Hilfe der sogenannten Intravitalmikroskopie beobachtet werden. Bei dieser Methode wird relativ gut durchsichtiges Gewebe direkt mit einem Mikroskop betrachtet. Dafür eignen sich besonders die Gewebe des Mesenteriums [95], bestimmte Bereiche in der Backentasche [96] oder die Milz [97]. Weiterhin wird die Intravitalmikroskopie an Cornea-Gefäßen, Mäuseohren und dem Cremaster-Muskel durchgeführt. Allerdings setzen solche Untersuchungen eine Sektion voraus. Mit einem dauerhaft implantierten Beobachtungsfenster in der Haut lassen sich auch Beobachtungen über einen längeren Zeitraum durchführen [98, 99].

Es gibt jedoch auch bestimmte Gewebe, die ohne eine Verletzung die Intravitalmikroskopie zulassen. Dazu zählen die Haut von Fledermausflügeln [100] und die rasierte Ohrmuschel von Mäusen [101]. Aber auch am menschlichen Ohr oder oberhalb des Halbmondes des Fingernagelbettes lassen sich unter dem Mikroskop Venolen finden, die über eine ausreichende Entfernung parallel zur Oberfläche verlaufen, um mittels einer Intravitalmikroskopie Leukozytenrollen beobachten zu können.

Das Zellrollen beginnt mit einem initialen Kontakt des Leukozyten mit dem Endothel, dem sogenannten Tethering. Sobald sich eine erste molekulare Bindung ausgebildet hat, kommt es bedingt durch den Scherstrom zu einer Abflachung der Zelle und folglich zu einer Vergrößerung der Kontaktfläche mit einem Durchmesser von ca. 4 μm [102, 103]. Die Fähigkeit der Leukozyten zur Verformung unter Scherstromeinfluß stellt eine wesentliche Grundvoraussetzung für das Zellrollen dar und zwingt die Rollgeschwindigkeit in bestimmte physiologische Grenzen. Je stärker die Scherkraft des Blutes auf eine rollende Zelle wirkt, desto stärker flacht sie ab, um so größer bildet sich die Kontaktfläche zum Endothel aus und um so kleiner wird die Angriffsfläche, die die Zelle der Flüssigkeit entgegenstellt. Andererseits ist ein gewisses Maß von Zellabflachung für eine rollende Bewegung essentiell. Unterschreitet der Schergrad des Blutes einen bestimmten Wert, flachen die Leukozyten so wenig ab, daß die Kontaktfläche für ein Rollen zu klein ist. Dieses sogenannte „threshold phenomenon“ verhindert ein zufälliges Auslösen der Adhäsionskaskade, insbesondere in größeren venösen Gefäßen mit geringer Fließgeschwindigkeit.

Die Zellrollgeschwindigkeit liegt unter physiologischen Bedingungen und bei unterschiedlichem Schergrad zwischen 15 und 40 $\mu\text{m/s}$ [104]. Unter besonderen Bedingungen wie zum Beispiel bei einer Entzündung oder bei übermäßiger Vasokonstriktion bzw. -dilatation oder starken Abweichungen des Schergrades kann die Rollgeschwindigkeit zwischen 5 und 100 $\mu\text{m/s}$ schwanken [105, 106, 107, 108]. In diesen Studien konnte ebenfalls gezeigt werden, daß im Falle eines Entzündungsprozesses alle drei Selektine am Leukozytenrollen bzw. der Zellextravasation beteiligt sind, während das Lymphozyten-Homing ausschließlich durch L-Selektin vermittelt wird [109, 110].

Untersuchungen an Selektin-defizienten Mäusen geben einen weiteren vergleichenden Einblick in die Bedeutung der Selektine. Bei L-Selektin-defizienten Mäusen wird sowohl die Emigration als auch das Rollen der Neutrophilen stark unterdrückt [111]. Während bei den P-Selektin-Mutanten diese beiden Kriterien nur in einer frühen Phase zu beobachten sind, kommt es beim Fehlen von E-Selektin zu keinerlei Auswirkungen. Das legt die Vermutung nahe, daß die Bedeutung des E-Selektins zu einem späteren Zeitpunkt des Zellrollvorganges, in der Überleitung zur festen Adhäsion liegt [112, 113, 114]. Ein synergistischer Effekt von E- und P-Selektin wird bei doppelt mutierten Mäusen ersichtlich. All diese Daten wurden 1997 von Bullard und Beaudet in folgender Tabelle zusammengefaßt:

Mutation	Gesundheitszustand	Leukozytenzahl	Neutrophil-Emigration 0-4 Stunden	Neutrophil-Emigration 24 Stunden	Leukozytenrollen
P-Selektin	normal	erhöht	reduziert	normal	stark erniedrigt
E-Selektin	normal	normal	normal	normal	normal
L-Selektin	normal	normal	reduziert	reduziert	stark erniedrigt
P- und E-Selektin	spontane Infektionen	sehr stark erhöht	keine	normal	sehr stark erniedrigt

Tabelle 1 Veränderung von Entzündungsparametern Selektin-defizienter Mäuse nach Bullard [115].

2.4.3. Beobachtungen *in-vitro*

Aufgrund der Vielfalt der beeinflussenden Faktoren auf die Zelladhäsionskaskade im Entzündungsprozeß läßt sich die Bedeutung und Funktion einzelner Selektine anhand von *in-vivo* Untersuchungen nur sehr oberflächlich beschreiben. Seit ca. 10 Jahren wird deshalb versucht, den Zellrollprozeß als solchen aus dem lebenden Organismus zu abstrahieren. In diesen *in-vitro* Versuchen ist man bestrebt, alle Adhäsionsereignisse möglichst ausschließlich auf die Selektine und ihre Liganden zu beschränken. Dadurch sollte es möglich sein, die molekularen Mechanismen des Rollvorganges aufzuklären und Fragestellungen nach dem Zellrollen als Sonderform einer Zelladhäsion oder dem empfindlichen Gleichgewicht zwischen Festhalten und Loslassen der Bindungspartner zu beantworten.

Lawrence und Springer konnten 1991 erstmals ein Rollen von Neutrophilen auf isoliertem und immobilisiertem P- und später auch E-Selektin aufzeigen. Im Gegensatz dazu kam es auf immobilisierten Integrinen stets zur festen Adhäsion, nicht jedoch zum Zellrollen [116, 117]. Vergleichende Untersuchungen ergaben, daß die L-Selektin vermittelte Rollgeschwindigkeit von 50-100 $\mu\text{m s}^{-1}$ um das zehnfache höher ist als bei P- und E-Selektin [118]. Durch ein extremes Ausdünnen des immobilisierten Selektins und der Variation der angelegten Scherkraft konnte rechnerisch auf die Bindungscharakteristika einzelner Selektinbindungskomplexe geschlossen werden: die relevanten Assoziations- und Dissoziationskonstanten ($k_{\text{on}}=1,5 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ und $k_{\text{off}} 0,95 \text{ s}^{-1}$) lassen, verglichen mit anderen

makromolekularen Interaktionen, auf eine sehr schnelle Bindungskinetik schließen [119]. Allerdings kann die Fähigkeit der Zellrollvermittlung nicht nur auf diese Interaktionskonstanten beschränkt werden. So besitzen bestimmte zellmembrangebundene Antikörper bei Wechselwirkungen mit Dinitrophenol ähnlich dimensionierte Konstanten, sie können jedoch kein Zellrollen induzieren sondern nur eine feste Adhäsion [119]. Es wird vermutet, daß die vorwiegend hydrophoben Bindungskräfte der Antikörper eine zu geringe elastische Dehnbarkeit besitzen, um einen dynamischen Rollprozeß zu unterstützen.

Mittels AFM wurde unter Vermessung eines einzelnen Selektinmoleküls an der Mikroskopspitze gefunden, daß sich die Dissoziationskonstante nicht linear mit der Scherbelastung ändert. Das deutet darauf hin, daß ein Bindungsbruch nicht entweder durch die Bindungsstärke oder die Dissoziationskonstante beschrieben werden kann, vielmehr sind beide Parameter über den Zeitfaktor miteinander verknüpft, der die Schnelligkeit der Bindungslösung angibt. Je schneller an einer Selektinbindung gezogen wird, um so weniger erhöht sich die Bindungskraft. Wird also eine rollende Zelle einem extrem hohen Scherstrom ausgesetzt, sind die Kräfte, die dem Bindungsbruch entgegenwirken relativ klein, sodaß eine übermäßige Beanspruchung der Verankerung der Moleküle in der Zellmembran und am Zytoskelett ausbleibt. Die Lebenszeit eines Rezeptor-Ligand-Komplexes ist demnach bei kleinen Kräften länger und bei großen Kräften kürzer [120].

Die Anforderungen an die Bindungseigenschaften der Selektine bestehen also nicht nur in schnellen on- off- Raten, sondern auch in einer überdurchschnittlichen Dehnbarkeit der Bindungen, ohne dabei einen Bindungspartner aus seiner Verankerung und Verknüpfung mit dem Zytoskelett herauszureißen. Zusätzlich besitzen bei Selektininteraktionen die Flexibilität und Länge sowohl der Selektinmoleküle als auch der entsprechenden Ligandenstrukturen eine außerordentliche Bedeutung. Die Short Consensus Repeats der Selektine sind nicht direkt an der Bindung zum Saccharidmolekül beteiligt. Eine Veränderung der Anzahl der SCR sollte also nur einen Einfluß auf die mechanischen Eigenschaften wie Dehnbarkeit und Beweglichkeit des Adhäsionsproteins haben. Patel et al. untersuchten die Bindungseigenschaften von verkürztem P-Selektin [121]. In einem statischen Assay zeigten im Vergleich zum Wildtyp (Selektin mit 9 SCRs) die Mutanten mit nur 2 oder mehr SCRs keine Unterschiede im Adhäsionsverhalten. Im dynamischen Rollassay dagegen können die kurzen P-Selektine mit weniger als 4 SCRs kein Rollen mehr vermitteln. Im Fall von genau 4 SCR-Einheiten sind nur wenige Zellen in der Lage, in eine Rollbewegung überzugehen, zeigen sich dabei aber extrem intolerant gegenüber Scherkraftveränderungen.

Obwohl viele dieser Studien mit immobilisierten Adhäsionsmolekülen auf einer artifiziellen Oberfläche durchgeführt wurden, kann man daraus auf die physiologische

Bedeutung der Selektine im Zellrollprozeß schließen. Neben den physikalischen Parametern der Leukozyten und Gefäße sind die intrinsischen molekularen Eigenschaften der Selektinbindungskomplexe eine weitere Grundlage für das Zellrollen.

2.5. Ziel dieser Arbeit

Die Selektine nehmen durch die Besonderheiten ihrer Adhäsionseigenschaften eine Schlüsselrolle im Entzündungsprozeß ein. Eine Blockierung bzw. Modifizierung der Selektinbindungen stellt einen Ansatzpunkt für die Entwicklung neuartiger antiinflammatorischer Arzneimittel dar.

Ziel dieser Arbeit waren deshalb Untersuchungen der Bindungsmechanismen der Selektine im Zellrollprozeß. Die Selektine und deren Liganden sollten dabei in einem abstrakten System untersucht werden, um Wechselwirkungen anderer Adhäsionsmoleküle und störende Parameter ausschließen zu können. Gleichzeitig wird eine selektive Beeinflussung einzelner Parameter möglich. Da die Beweglichkeit und Anordnung der Selektinliganden von entscheidender Bedeutung zu sein scheint, wurden statt der natürlichen Mucine synthetische Glykolipide verwendet, die sich in einer künstlichen festkörpergestützten Modellbiomembran befinden. Über diese Modellmembran wurden E-Selektin-transfizierte CHO-Zellen (CHO-E) in einem laminaren Fluß gespült und alle Wechselwirkungen der Zellen mit der Biomembran mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie verfolgt. Mit dieser Anordnung sollten Fragestellungen zur Multivalenzhypothese, zu Minimalanforderungen an Selektinliganden und zur Inhibierung oder Modifizierung der Selektinbindungen unter Entzündungsbedingungen beantwortet werden.

Der erste Teil dieser Arbeit bestand in der Etablierung eines Modellsystems. Bei der Konstruktion der Durchflußapparatur (Kapitel 3.12.1) standen die Gewährleistung eines laminaren Flüssigkeitsstromes, die Voraussetzungen für eine auswechselbaren transparenten Träger für die Modellmembran und die Installation der Apparatur am Mikroskop im Vordergrund.

Für die Erzeugung, Übertragung und Charakterisierung von Modellmembranen (Kapitel 3.8) gab es in unserer Arbeitsgruppe beste Voraussetzungen. Unbekannt war jedoch das Verhalten der synthetischen Glykolipide in der Lipidmatrix in Hinblick auf Stabilität und laterale Beweglichkeit und Anordnung der einzelnen Modellmembranlipide. Die Funktion der Kammer sollte zunächst mit isolierten, natürlichen Glykolipidgemischen getestet werden, um dann mittels der reinen synthetischen Liganden ein Zellrollen zu erzeugen.

Die abschließende Aufgabe stellte die Suche nach potentiellen Selektininhibitoren und deren Testung dar.

Für die Bereitstellung der Glykolipide, der Inhibitorsubstanzen und die Charakterisierung der Modellmembranen waren zahlreiche Kooperationen mit anderen Arbeitsgruppen notwendig.