

## 4. Ergebnisse und Diskussion

### 4.1. Entwicklung eines dynamischen Modellsystems

#### 4.1.1. Simulierung der Entzündungsbedingungen

Die Grundlage dieser Arbeit stellt die Abstraktion des Leukozytenrollprozesses unter Entzündungsbedingungen *in-vitro* dar. Um Zell-Zell-Wechselwirkungen auf die Selektine mit ihren Liganden einschränken zu können, müssen beide Bindungspartner aus ihrem nativen Umfeld herausgelöst werden. Diese Notwendigkeit ergibt sich einerseits aus dem synergistischen Zusammenspiel vieler Adhäsionsmoleküle auf den natürlichen Zellen, andererseits sollten die Entzündungsbedingungen in einem *in-vitro* Modell stabil vorhanden sein, ohne eine vorherige Aktivierung durch Entzündungsmediatoren.

Als rollende Zellen wurden CHO-E Zellen und als Kontrolle die nicht transfizierten CHO (Chinese Hamster Ovarial) Zellen verwendet. Diese Zellen entsprechen mit einem Durchmesser von ca. 10 µm den Dimensionen von Granulozyten und Lymphozyten. Sie lassen sich ausgesprochen gut handhaben, da sie im Gegensatz zu Leukozyten nicht unspezifisch mit den meisten Oberflächen interagieren. Die CHO-E Zelllinie wurde mit dem Maus-E-Selektin transfiziert, was zu einer konstitutiven Proteinexpression auf der Zelloberfläche führt. Eine ähnliche E-Selektinpräsentation wird auf dem Endothelgewebe nach einer entzündlichen Stimulierung beobachtet. In einer elektronenmikroskopischen Aufnahme können die Proteine mit E-Selektin-mAb markierten Goldpartikeln (Immunogold-Labeling) sichtbar gemacht werden (Abbildung 7).

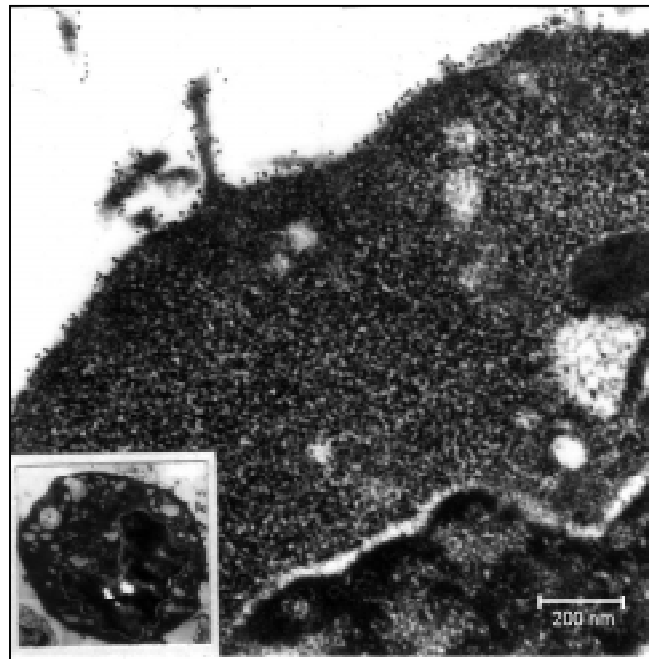


Abbildung 7 Elektronenmikroskopische Aufnahmen einer CHO-E Zelle (unten links) und der vergrößerte Ausschnitt der Zelloberfläche. Die Zelle wurde mit Immunogold-markierten Antikörpern behandelt, die als dunkle Punkte an der Zellmembran zu erkennen sind.

Aus dem Bild geht hervor, daß die Zellen nahezu rund sind und die Selektinmoleküle homogen auf der Oberfläche verteilt sind. Das Fehlen von Mikrovilli und lokaler Anhäufungen der Adhäsionsmoleküle ist eine Voraussetzung für Untersuchungen im Hinblick auf die Multivalenzhypothese, da Manipulationen der lateralen Molekülverteilung ausschließlich an der korrespondierenden liganddotierten Modellmembran durchgeführt werden können. Eine vorgegebene Strukturierung der Selektine auf den CHO-E Zellen würde dagegen keinen Versuchsaufbau mit homogener Verteilung aller Adhäsionsmoleküle zulassen. Die Zellen lassen sich gut kultivieren, mit Fluoreszenzfarbstoff markieren und in flüssigem Stickstoff lagern. Sie können sofort nach dem Auftauen in Nährmedium für Zellrolluntersuchungen verwendet werden. Das eröffnet die Möglichkeit, eine Vielzahl von Versuchen mit Zellen der gleichen Passage durchzuführen. Auf diese Weise lassen sich statistische Abweichungen minimieren, die ihren Ursprung in der Variabilität von biologischem Material haben.

#### 4.1.2. Die Durchflußapparatur

Das nächste Ziel dieser Arbeit bestand in der Entwicklung, Konstruktion und Testung eines *in-vitro* Versuchsaufbaus. Die für das Zellrollen relevanten Parameter sollten in einer entsprechenden Durchflußkammer möglichst genau den Bedingungen in den natürlichen Blutgefäßen entsprechen. Im Vordergrund standen dabei die Fließeigenschaften der strömenden Flüssigkeit.

Um laminare Flußbedingungen zu erreichen, wurden in der Vergangenheit eine Vielzahl von Flußkammern beschrieben [129, 130, 131, 132, 133]. Meist wurde dabei auf planare Kammern zurückgegriffen, um eine bessere und genauere Berechnung der physikalischen Bedingungen im Strömungsprofil gewährleisten zu können. Um laminare Fließeigenschaften zu erhalten, müssen jedoch keine bestimmten geometrischen Voraussetzungen erfüllt werden. Allerdings dürfen sich im Bereich der Laminarität keine wirbelerzeugenden Unebenheiten befinden, alle Kammerwände müssen ausgesprochen glatt sein.

In einen transparenten Kunststoffblock wurde die Flußkammer mit den Abmessungen 11x6x0,45 mm herausgefräst. Die untere Gefäßwand der Durchflußkammer bildet ein runder Objektträger aus Glas, der mit einem Metallring und einer Gummidichtung an der Apparatur befestigt wird. Zu- und Abfluß der Kammer bilden quer durch den Kunststoff eingebrachte Bohrungen. Die notwendige Druckdifferenz des Fließmediums zwischen Ein- und Ausfluß wurde hydrostatisch erzeugt, das heißt, ein Flüssigkeitsreservoir befindet sich in einer gewissen Höhe gegenüber dem Ausfluß. Da kleine Luftbläschen eine Modellbiomembran zerstören könnten, befindet sich kurz vor dem Einfluß des Fließmediums in die Kammer eine Blasenfalle, die mit einem Septum verschlossen ist. Durch dieses Septum lassen sich sehr kleine Mengen Flüssigkeit, zum Beispiel eine Zellsuspension, direkt in den Flüssigkeitsstrom injizieren, ohne dabei wesentlich verdünnt zu werden.

Die Eigenschaften dieser Konstruktion verleihen der Durchflußkammer folgende Vorteile:

- Durch die Fixierung der Kammer im Mikroskopisch ist eine Bewegung des Beobachtungsfeldes in x-y-Richtung möglich, außerdem kann die ganze Apparatur mit Hilfe der Mikroskopischheizung temperiert werden.
- Der planare Glasträger als untere Gefäßbegrenzung erlaubt eine direkte mikroskopische Beobachtung aller Ereignisse auf der Glasoberfläche, bei der Verwendung von Glasplättchen mit einer Dicke von höchstens 200 µm sogar mit Immersionsobjektiven.
- Der planare Glasträger erlaubt eine chemische und physikalische Modifizierung der Oberfläche, um eine Biomembran zu simulieren.

- Die geometrischen Abmessungen der Kammer gewährleisten einen planar-laminaren Flüssigkeitsstrom, der mit dem radial-laminaren Blutstrom vergleichbar ist.
- Der fein regulierbare hydrostatische Druck erzeugt einen gleichmäßigen und pulsfreien Flüssigkeitsstrom, wie er auch in den kleinsten Blutgefäßen vorhanden ist [Abbildung 8].

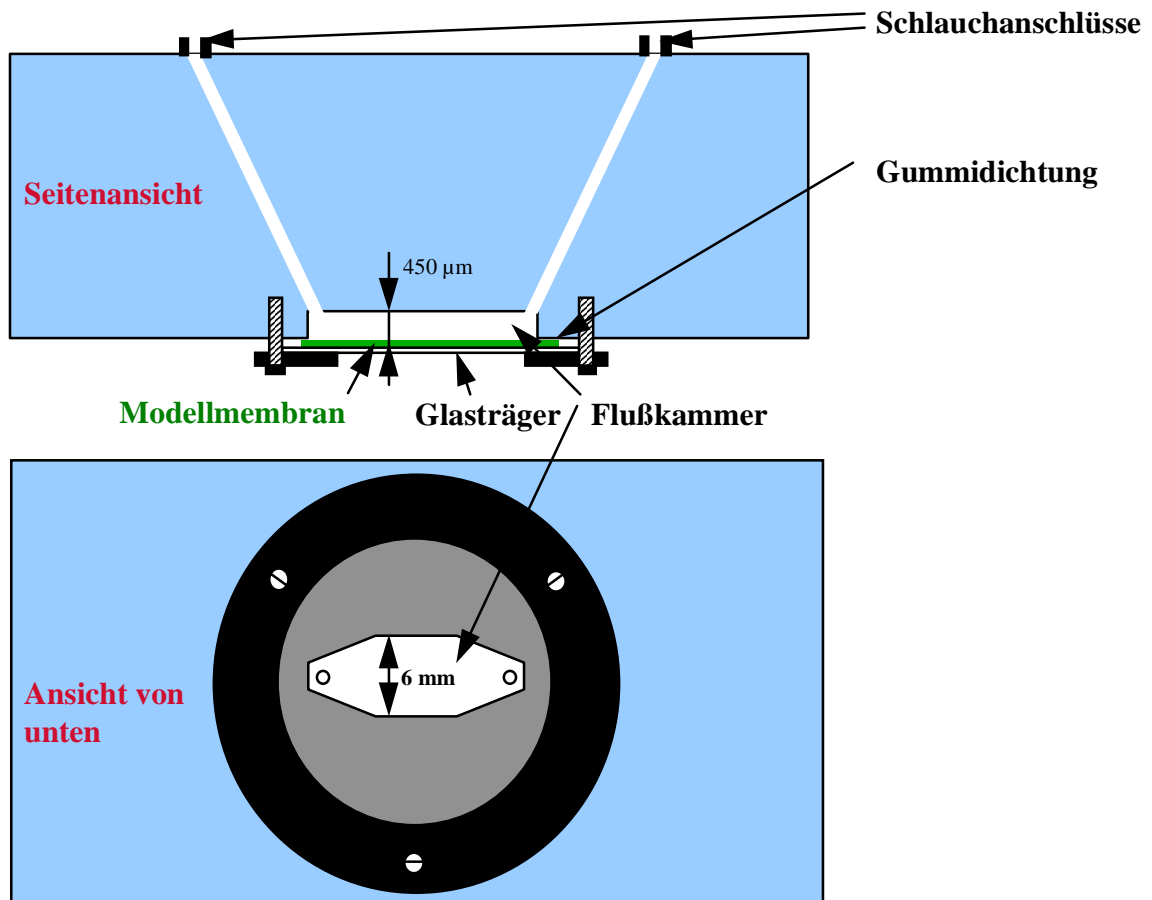


Abbildung 8 Schematische Darstellung der Durchflußapparatur.

Das Kernstück dieser Apparatur stellt jedoch das Glasplättchen als Träger für die Modellmembran dar. Die Herausforderung bestand in der Modifizierung und Beschichtung des Glases. Es galt, eine Oberfläche zu schaffen, die den empfindlichen Zellrollprozeß vermitteln kann und durch Manipulationen an ihrer Struktur Rückschlüsse auf die Adhäsionsmechanismen zuläßt. Wie im Kapitel 2.4.3 beschrieben, konnten bereits mehrere Arbeitsgruppen ein Zellrollen außerhalb eines Organismus beobachten, dabei wurden jedoch die Adhäsionsmoleküle auf einer festen Unterlage meist durch Eintrocknen fixiert [116, 117]. Da aber eine laterale Beweglichkeit einzelner Moleküle innerhalb einer Biomembran gerade

bei Selektinbindungen von außerordentlicher Bedeutung ist, sollte in unserer Flußkammer eine festkörpergestützte Biomodellmembran (engl.: supportfixed bilayer) verwendet werden. In dieser Lipid-Doppelschicht sollten die korrespondierenden Liganden zum E-Selektin der CHO-E Zellen, wie zum Beispiel natürliche, isolierte Glykolipide oder synthetische Oligosaccharide mit einem Lipidanker inkorporiert und dabei gezielt lateral strukturiert werden. In der folgenden Abbildung sind die Modellmembran und die Verhältnisse in der Durchflußkammer schematisch dargestellt [Abbildung 9].

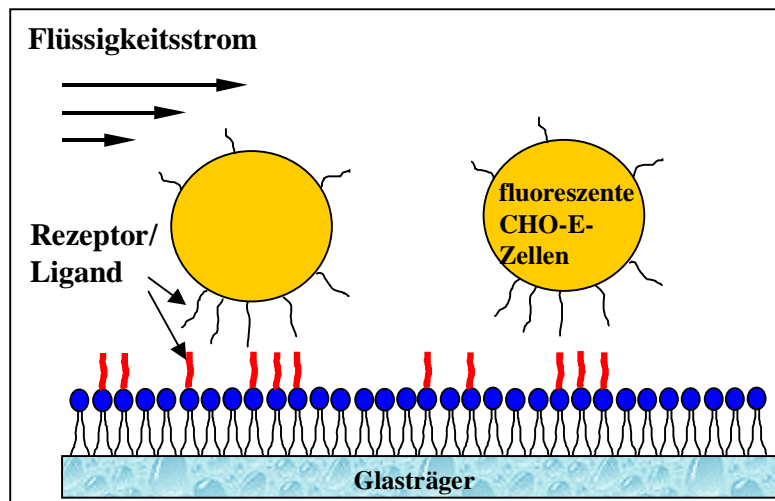


Abbildung 9 Schema der Adhäsionsereignisse selektinexprimierender CHO-E-Zellen und der Modellmembran in der Flußkammer.

Die natürlichen Zellmembranen bestehen aus einer Doppelschicht amphiphiler Membranlipide wie Phospholipide (Phosphatidylcholine, Phosphatidylglycerole aber auch Etherphospholipide), Sphingolipide (Ceramide, Sphingomyelin, Cerebroside und Ganglioside) und Cholesterol. Aufgrund umfangreicher Erfahrungen aus der Literatur und der Arbeitsgruppe bezüglich Herstellung und Fixierung von Modellmembranen wurden Phospholipide als Matrixlipide verwendet.

#### 4.1.3. Herstellung der Modellmembranen

##### 4.1.3.1. Self-Assembling-Technik

Der wesentliche Teil dieser Arbeit bestand in der Entwicklung und Modifizierung einer geeigneten Methode, die Glasträger mit einer ligandtragenden Modellmembran zu

beschichten. Um den Eigenschaften einer natürlichen Zellmembran gerecht zu werden, sollte eine artifizielle Bilayer möglichst von dichter und homogener Struktur sein, vor allem darf sie keine Löcher aufweisen. Das würde zu Artefakten bei Bindungsereignissen mit Zellen führen.

Die Self-Assembling-Technik ist eine Chemisorption, das heißt eine Anordnung von Molekülen an einer Oberfläche zu einem Monolayer unter Ausbildung kovalenter Bindungen .

Diese Methode stellte einen Vorbereitungsschritt in der Erstellung von Biomodellmembranen dar, da sich durch Self-Assembling nur eine einfache Monoschicht erzeugen läßt. Außerdem sind die an Glas gebundenen Lipidmoleküle durch die kovalente Bindung in ihrer lateralen Beweglichkeit behindert und unterscheiden sich somit grundsätzlich von den natürlichen Membranlipiden.

Mit der Self-Assembling-Technik erzeugten wir sehr dicht gepackte hydrophobe Schichten von Hexadecylchlorosilan auf gereinigtem Glas, dabei reagieren die Hydroxygruppen des Glases mit dem Chlorsilan unter Abspaltung von HCl. Der Oberfläche wird auf diese Weise eine ausgeprägte Lipophilie verliehen [Abbildung 10].

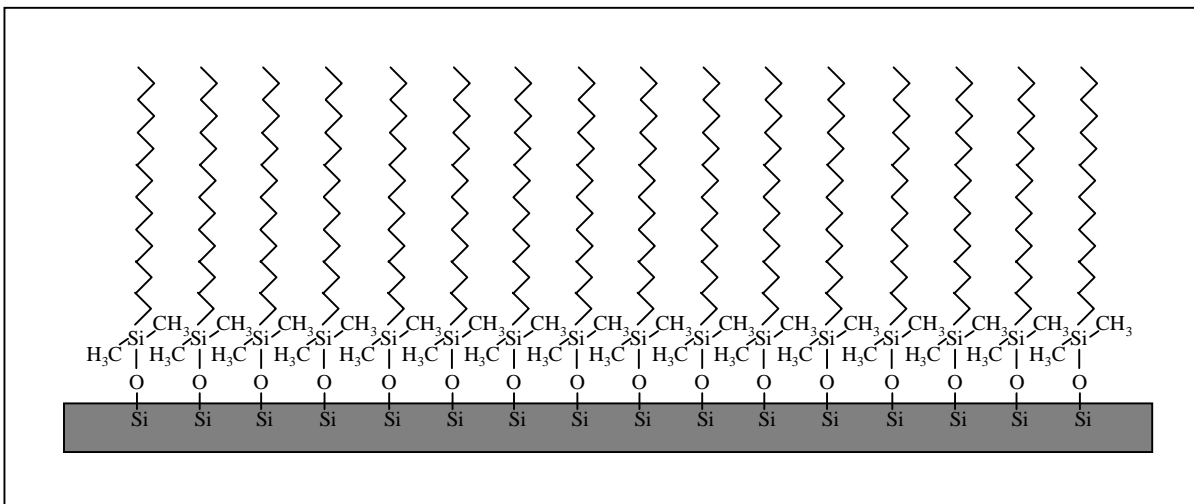


Abbildung 10 Schematische Darstellung eines hydrophobisierten Glsträgers mit Hexadecylsilan.

Zusammen mit den stark hydrophilen Oberflächen der unbeschichteten Glasplättchen standen uns somit zwei unterschiedliche Träger für weiterführende Beschichtungsmethoden zur Verfügung.

#### 4.1.3.2. Vesikelfusionstechnik

Aufgrund früherer Forschungsarbeiten über liposomale Formulierungen in unserer Arbeitsgruppe konzentrierten wir uns bei der Erzeugung der supportfixed bilayer zunächst auf die Vesikelfusionstechnik. Kleine Liposomen von 100-200 nm Durchmesser neigen generell zu einem Verschmelzen untereinander und zum Aufspreiten an Feststoffoberflächen nach einem ähnlichen Mechanismus [Abbildung 11].

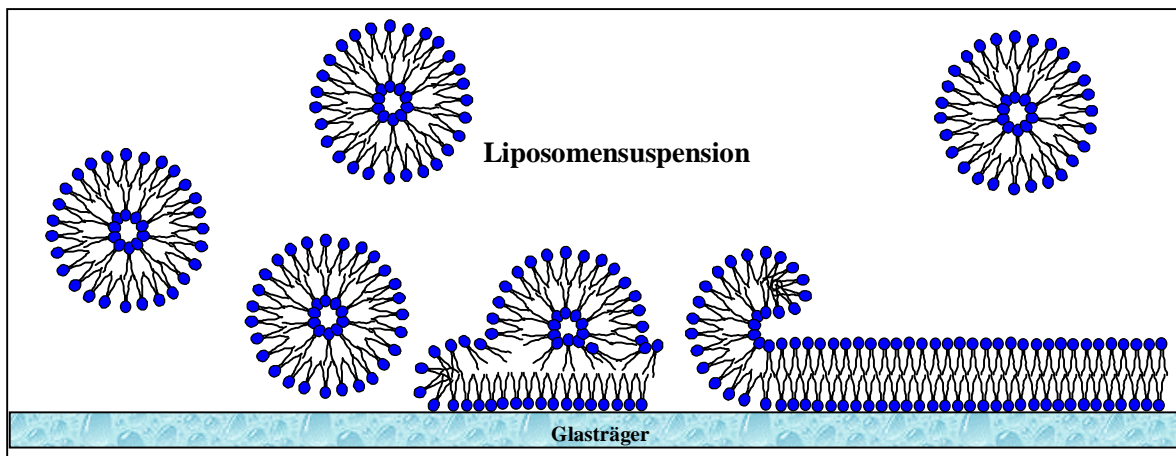


Abbildung 11 Schema der Vesikelfusionstechnik durch das spontane Aufspreiten von Liposomen auf einem Glasträger.

Dieses Aufspreiten erfolgt erfahrungsgemäß spontan und läßt sich durch lösliche Ionen, Krümmungsradius der Vesikel und die Oberflächen- bzw. Lipideigenschaften beeinflussen [134]. Dabei wird in der Literatur über den Vorteil einer stark hydrophilen gegenüber einer stark lipophilen Oberfläche kontrovers diskutiert. Auch der Temperatureinfluß wird nicht einheitlich beschrieben [135]. Hier nicht weiter aufgeführte Experimente zeigten, daß das Aufspreiten oberhalb der Phasenübergangstemperatur der verwendeten Lipide die besten Resultate erbrachte. Die entstandenen Modellmembranen wurden mittels Ellipsometrie auf die Schichtdicke überprüft, und zeigten relativ inhomogene Multilayer. Eine zykovoltammetrische Auswertung der durch Vesikelfusion entstandenen Membranen zeigte auch das Vorhandensein von relativ großen Fehlstellen.

Es wurden mehrere Versuche unternommen, die Qualität der Modellmembran unseren Ansprüchen anzugleichen. Veränderungen der Lipidzusammensetzung der Liposomen, Veränderungen der Hydrophilie/Lipophilie der Substratoberfläche, der Temperatur und

schließlich der Einsatz von entgegengesetzt geladenen Oberflächen und fusiogenen Ionen wie Kalzium führten zu keinen befriedigenden Ergebnissen. In nachstehender Abbildung 12 ist eine Modellmembran dargestellt, die unter Verwendung von negativ geladenen Liposomen und einer positiv geladenen Glasoberfläche entstand.

Das Glasplättchen wurde dazu mit einem Aminopropylsilan beschichtet und ist damit in Abhängigkeit vom pH-Wert des Fließmediums neutral oder positiv geladen. Die Liposomen bestanden aus DSPC:DPPG:NBD-PE (88:10:2), sie sind damit negativ geladen, was ein Verschmelzen untereinander verhindern und die Attraktivität zur positiven Glasoberfläche erhöhen soll. Die dunklen Bereiche stellen Löcher in der Membran bzw. unbeschichtete Flächen dar [Abbildung 12].

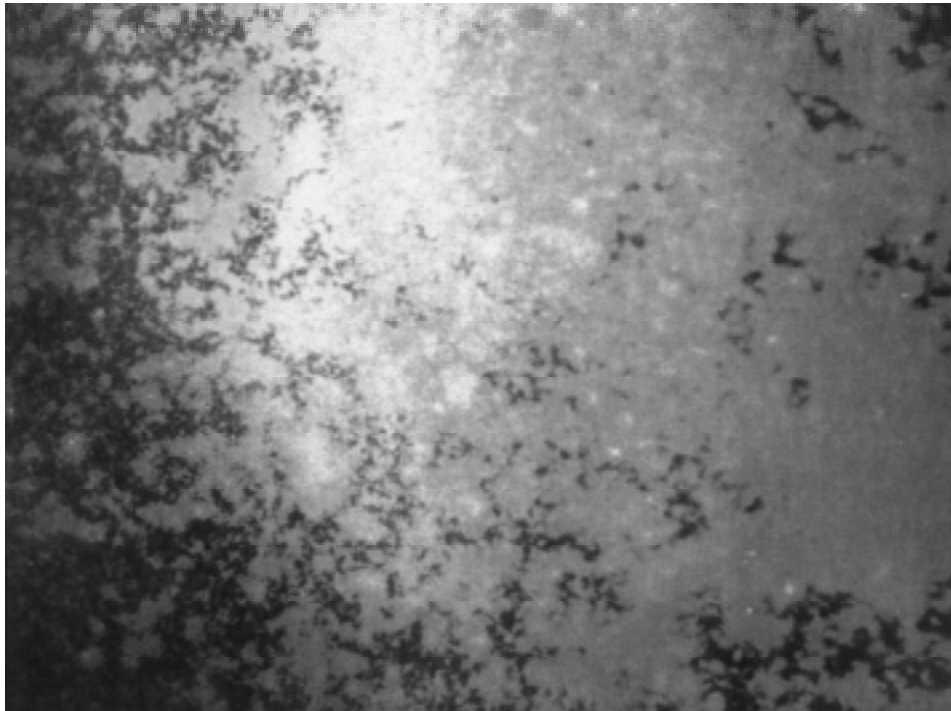


Abbildung 12 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines durch Vesikelfusion beschichteten Glasträgers.

Zyklovoltammetrische Untersuchungen bestätigten das Vorhandensein großer Löcher in der Membran. Außerdem verdeutlichten Untersuchungen mittels Ellipsometer die außerordentlich hohe Schichtdicke bestimmter Bereiche, was auf ein Übereinanderliegen mehrerer Lipidschichten (Multilayer) deutet.



Da selbst unter optimierten Bedingungen keine homogenen Modellmembranen erhalten werden konnten, wurde auf alternative Beschichtungsmethoden, die Self-Assembling- und Langmuir-Blodgett-Methode zurückgegriffen.

#### 4.1.3.3. Langmuir-Blodgett-Technik

Für den größten Teil dieser Arbeit kamen feststofffixierte Modellbiomembranen für die Zellrollexperimente zum Einsatz, die mittels einer Kombination aus Self-Assembling und Langmuir-Blodgett-Technik hergestellt wurden. Bei der Langmuir-Technik wird die Tendenz der Lipide ausgenutzt, sich aufgrund ihrer amphiphilen Struktur an einer Wasser/Luft Grenzfläche spontan zu einem monomolekularen Oberflächenfilm zu organisieren [136]. Durch diese vermittelnden Eigenschaften der Lipide wird die Oberflächenspannung des Wassers gegenüber Luft ( $\gamma_0 = 72,5 \text{ mN/m}$  bei  $20^\circ\text{C}$ ) erniedrigt. Mit Zunahme der molekularen Dichte des Lipids an der Grenzfläche kann die Oberflächenspannung theoretisch bis auf 0 sinken, was einem Lateraldruck von  $72,5 \text{ mN/m}$  entspricht.

Mit Hilfe einer sogenannten Filmwaage wurde durch eine bewegliche Barriere ein Lipidfilm an der Wasser/Luft Grenzfläche in einem Langmuir-Trog stetig zusammengeschoben und dabei über ein Wilhelmi-Element die Oberflächenspannung gemessen. Das resultierende isotherme Phasendiagramm ist für jedes Lipid charakteristisch und gibt Auskunft über den Phasenzustand, die Organisation und die Beweglichkeit der einzelnen Lipidmoleküle [Abbildung 13].

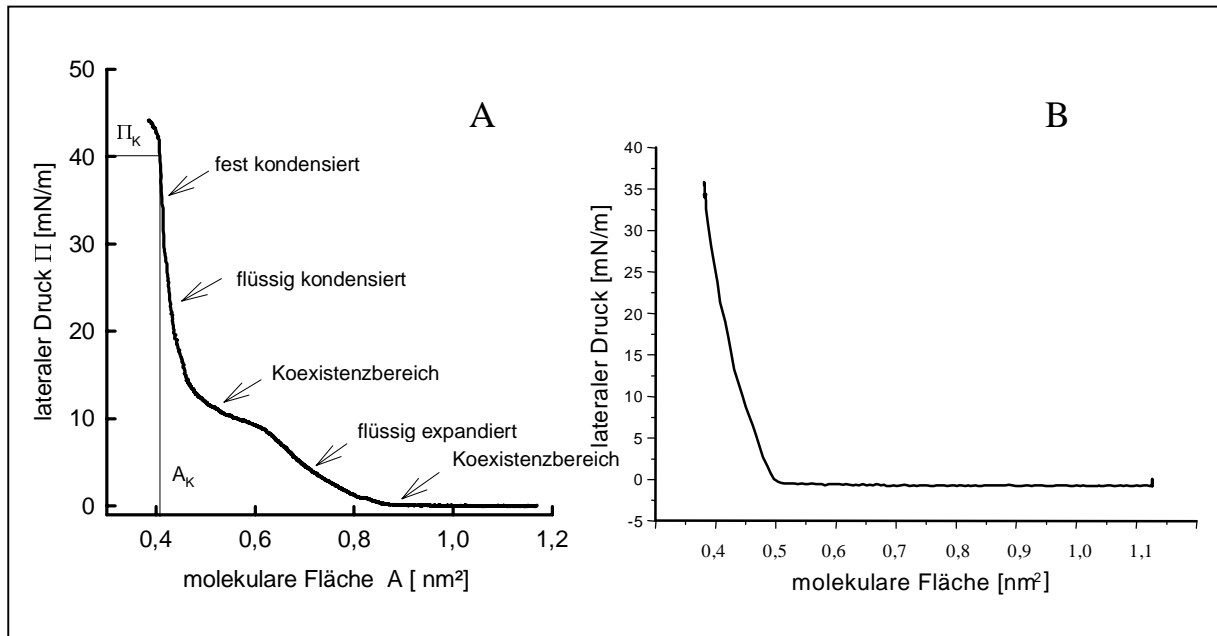


Abbildung 13 A: Druck/Flächen Diagramm von DMPE bei 20°C als Beispiel für das Durchlaufen mehrerer Phasenzustände: Darstellung des Kompressionsverhaltens und Bezeichnung der Phasenzustände  $\Pi_K$ =Kollapsdruck,  $A_K$ =Kollapsfläche.

B: Kompressionsverhalten von DSPC bei 20°C als verwendetes Matrixlipid.

Weiterhin haben die Ionenstärke und der pH-Wert der wässrigen Phase sowie Zumischungen von Proteinen oder anderen Lipiden zum Monolayer einen Einfluß auf das Phasenverhalten des Lipidfilms, was intensiv von U. Bakowsky in unserer Arbeitsgruppe untersucht wurde [137].

Der auf der Wasseroberfläche vororganisierte Monolayer wird in einem zweiten Arbeitsgang auf einen Festkörper übertragen (Blodgett-Technik). Die mittels der Self-Assembling-Technik hydrophobisierten Glasplättchen werden dafür aus der Luft durch die Lipidschicht in die Wasserphase hindurchgetaucht. Durch hydrophobe Wechselwirkungen der Festkörperoberfläche mit den Lipiden legt sich bei diesem Vorgang der zweite monomolekulare Lipidfilm auf das Substrat (oberer Layer) [Abbildung 14].

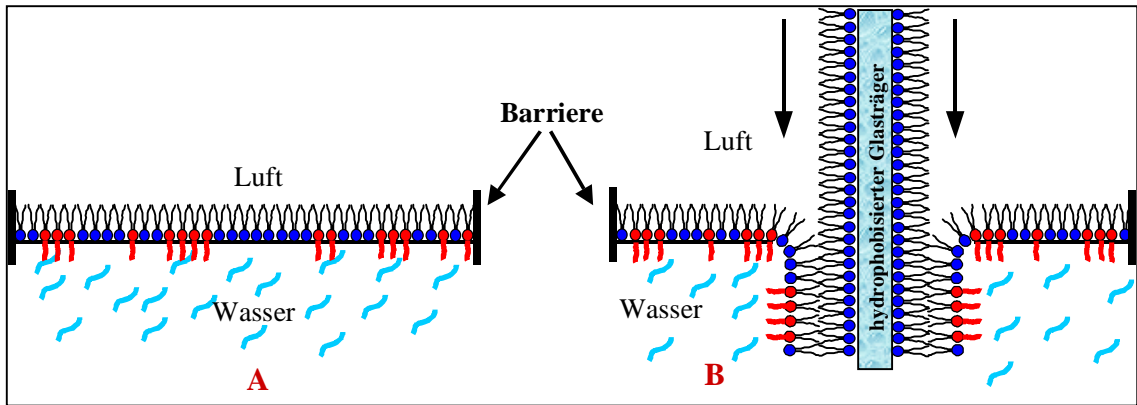


Abbildung 14 Schema der Langmuir-Blodgett-Technik. Im Teil A werden die rot dargestellten Glykolipide mittels einer Barriere in der Lipidmatrix vororganisiert. Dieser Film wird in Teil B auf einen hydrophoben Glasträger übertragen.

Der so entstandene Bilayer besteht aus einem kovalent fixierten und einem adsorptiv gebundenen Monolayer und entspricht somit nicht vollständig einer natürlichen Zellmembran, bei der beide Membranseiten unfixiert sind. Befürchtungen um eine Behinderung der lateralen Beweglichkeit der nach der Langmuir-Blodgett-Technik übertragenen Lipidmoleküle wurden mit der sogenannten FRAP-Methode (Fluorescence Recovery After Photobleaching) aufgeklärt. In den oberen Layer wird ein fluoreszenzmarkiertes Lipid inkorporiert, welches sich mit dem Matrixlipid gut mischt. Mit dem Matrixlipid DSPC und dem Fluoreszenzlabel NBD-PE erhielten wir eine relativ homogen fluoreszierende Modellmembran. Mit Hilfe des hochenergetischen Laserstrahles des Laser-Scanning-Mikroskopes wurde in der Mitte des Beobachtungsfeldes eine kleine quadratische Fläche so stark bestrahlt, bis die Fluoreszenz ausgeblüht war. Das Beobachtungsfeld wurde daraufhin mit abgeschwächtem Laserlicht gescannt und dabei das Wiederauftreten der Fluoreszenz im gelöschten Areal durch laterale Diffusion der Membranlipide beobachtet [Abbildung 15].

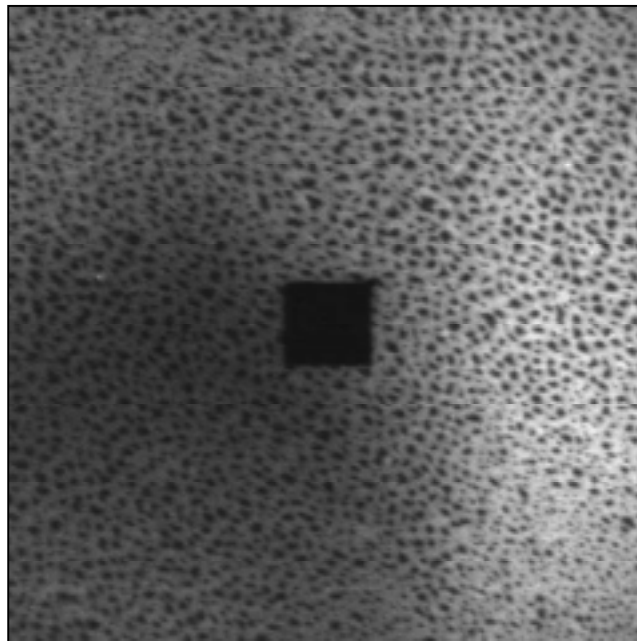


Abbildung 15 Fluoreszenzmikroskopisches Bild einer Modellmembran. In der Mitte befindet sich das ausgebleichte Quadrat. Das Bild hat eine Diagonale von 400  $\mu\text{m}$ .

Das ausgebleichte Quadrat von ca. 40x40  $\mu\text{m}$  fluoreszierte nach 120 Minuten wieder vollständig; das heißt, es hat durch Lateraldiffusion ein vollständiger Austausch der Membranlipide des gebleichten Quadrates mit den ungebleichten äußeren Bereichen stattgefunden [Abbildung 16].

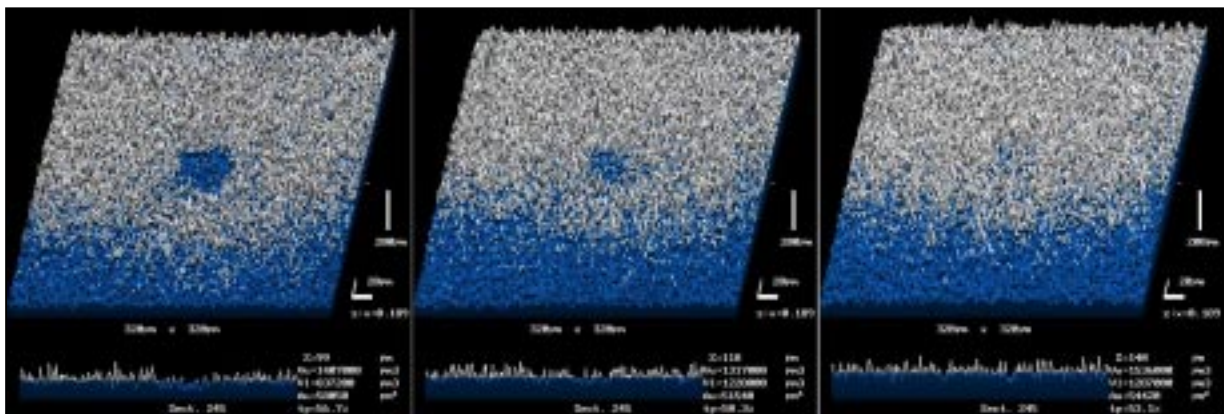


Abbildung 16 Zeitlicher Verlauf der Wiederherstellung der Fluoreszenz durch Lateraldiffusion nach Ausbleichen eines Quadrates in der Mitte. Die Bilder wurden im Abstand von 60 Minuten aufgenommen und in einer topografischen Darstellung abgebildet.

Diese physikalischen Eigenschaften ähneln denen in natürlichen Membranen, auch dort ist durch das Vorhandensein von transmembranären Proteinen und die teilweise Fixierung der Biomembran am Zytoskelett die Lateraldiffusion gebremst. Diese partielle Behinderung übernimmt in unserer festkörpergestützten Modellmembran der kovalent fixierte Monolayer.

Ein wesentlicher Vorteil der Langmuir-Blodgett-Technik besteht in der Möglichkeit, den zu übertragenden Monolayer lateral strukturieren zu können. Unterschiedliche Lipide sind aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften selten miteinander ideal mischbar. Die Ursachen dafür sind zum Beispiel eine unterschiedliche Kopfgruppengröße und deren elektrische Ladung, unterschiedlich lange oder verzweigte Acyl- bzw. Alkylketten und das sich daraus ergebende Phasenverhalten der einzelnen Lipide. Mischt man fluide mit rigiden Lipiden, kommt es zu Entmischungserscheinungen, die bereits auf der Wasseroberfläche mit einer speziellen Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden können. Versetzt man das Lipidgemisch mit einem Fluoreszenzlabel, so reichert er sich, je nach dessen physikalischen Eigenschaften, in fluiden oder rigiden Bereichen bzw. an deren Grenzflächen an. Nachteilig an dieser Charakterisierungsmethode ist jedoch der notwendige hohe Anteil des Fluoreszenzmarkers von 1%. Will man ein Entmischungsverhalten von sehr kleinen zugemischten Lipidkonzentrationen bestimmen, würde eine hohe Fluoreszenzmarkerkonzentration die laterale Struktur der Membran stärker beeinflussen als das zu untersuchende Lipid. In diesen Fällen wurde auf die Rasterkraftmikroskopie zurückgegriffen, die ohne Markermoleküle auskommt.

Da die beschriebenen Entmischungen thermodynamisch getrieben sind, bleiben sie auch nach Übertragung der Monolayer auf einen Festkörper erhalten, eine laterale Diffusion findet nur innerhalb der einzelnen Phasen statt. Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen an der Wasser/Luft Grenzfläche und am Rasterelektronenmikroskop wurden von Dr. U. Bakowsky in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt [137].

#### 4.1.4. Das Adhäsionsverhalten von Modellzellen in der Durchflußkammer

Für die mikroskopische Detektion von Ereignissen, die sich unter Fließbedingungen an einer Oberfläche ereignen, ist eine geeignete optische Methode von außerordentlicher Bedeutung, da das Erfassen von sich bewegenden Objekten außerhalb der Fokusebene durch Überstrahlung vermieden werden muß. Deshalb entschieden wir uns für die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM), eine spezielle Fluoreszenzmikroskopie. Der große Vorteil der konfokalen Lichtmikroskopie besteht in der Möglichkeit, das von einer Probe reflektierte oder emittierte Licht aus einer einzigen Ebene zu sammeln. Eine Lochblende (Pinhole), die zur Fokusebene konjugiert (konfokal) angeordnet ist, sorgt dafür, daß sämtliches Licht, das nicht

aus dieser Ebene stammt, die Lochblende nicht passieren kann und deshalb vom Detektor nicht erfaßt wird. Mit diesem Mikroskop läßt sich exakt auf den Bereich knapp über der Modellmembran fokussieren. Dadurch werden nur Objekte erfaßt, die in unmittelbarer Nähe zur Oberfläche stehen, alle frei in der Durchflußkammer strömenden Objekte werden nicht detektiert. Beim Laser-Scanning-Mikroskop wird das Bild aus einer Menge von Lichtemissionsdaten zusammengesetzt, wobei die Probe Punkt für Punkt und Zeile für Zeile sequentiell abgetastet wird. Indem man die Fokusebene verschiebt, lassen sich einzelne Bilder (optische Schnitte) zu einem dreidimensionalen Bildstapel zusammensetzen. Zusätzlich lassen sich durch dieses Punkt für Punkt Abrastern der Probe, ähnlich der Nahfeld Mikroskopie, fluoreszierende Objekte auflösen, die gleichgroß oder etwas kleiner als die Lichtwellenlänge sind, so zum Beispiel fluoreszenzmarkierte Liposomen mit einem Durchmesser von ca. 200 nm [Abbildung 17].

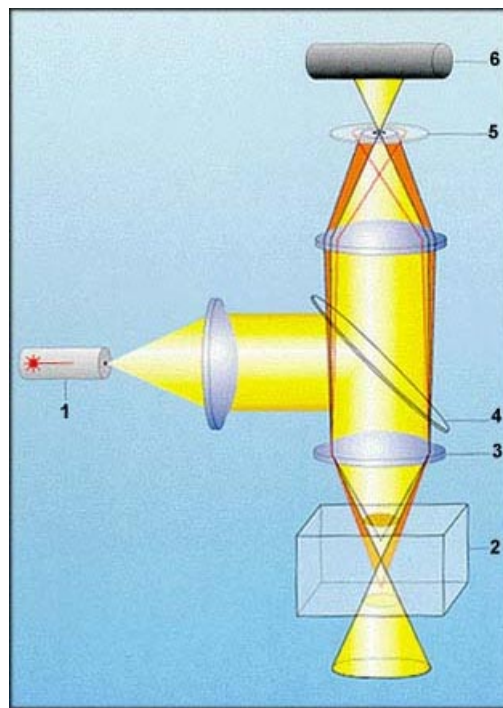


Abbildung 17 Strahlengang in einem Konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop. 1: Laserquelle; 2: Probe; 3: Objektiv; 4: dichroischer Strahlenteiler; 5: Lochblende (Pinhole); 6: Photomultiplier.

Zunächst sollte unser Modellaufbau auf seine Funktionalität und Eignung für selektinabhängige Adhäsionsvorgänge im Scherstrom überprüft werden. Dabei sollte geklärt

werden, ob die schwach affinen Wechselwirkungen in der Durchflußkammer sichtbar gemacht werden können. Als Bindungspartner wählten wir das mannosebindende Lektin Concanavalin A (ConA). ConA besitzt eine analoge Bindungsaffinität zu seinen Saccharidliganden wie die Selektine zum sLe<sup>x</sup>, außerdem stand es uns in ausreichenden Mengen zur Verfügung [138]. Erste Untersuchungen führten wir mit liposomalen Formulierungen und beschichteten Mikropartikeln als Modellzellen durch, an die das ConA über einen Lipidanker inkorporiert wurde. In die Modellmembran wurden die entsprechenden Mannoselipide inkorporiert. Die Verwendung von Modellzellen sollte einerseits Erkenntnisse über das Bindungsverhalten von Selektinen im Scherstrom und deren Detektierbarkeit in der Durchflußkammer erbringen, andererseits werden so nicht-pektinspezifische Interaktionen von natürlichen Zellen mit der mannosehaltigen Zellmembran unterdrückt.

Als Modellzellen stellten wir unilamellare Liposomen mit einem Durchmesser von ca. 300-350 nm her. Als kovalenter Bindungspartner für das ConA wurde der Lipidanker N-Glutaryl-PE in die Lipidmatrix (DSPC:Chol:N-Glutaryl-PE:NBD-PE 59:30:10:1) inkorporiert. Nach der Kopplung des ConA an die Liposomen wurde die Funktionalität des ConA mit mannosyliertem Albumin nachgewiesen. Binden mehrere Vesikel an eine glykosyliertes Albuminmolekül, kommt es zu einer Liposomenagglutination, die mittels einer Trübungsmessung nachgewiesen wurde.

Die eigentlichen Bindungspartner für die funktionalisierten Liposomen in der Durchflußkammer waren Alkylmannoside, die in die Modellmembran eingebaut wurden. Die monosaccharidischen Kopfgruppen der Liganden besitzen einen unterschiedlich langen Abstandshalter (Spacer) aus 0, 3 oder 8 Ethoxyeinheiten zum lipophilen Molekülteil. Dadurch ragen die Zuckerreste unterschiedlich weit aus der Modellmembran heraus. Die Mannoside wurden zu 10% mit der DSPC Matrix der Modellmembran gemischt und bei einem Lateraldruck von 38 mN/m übertragen. Unter diesen Bedingungen liegt das Mannosid in entmischter Form in der Lipidmatrix vor, da sich DSPC in einem rigiden Phasenzustand befindet. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden helle Areale von 5-10 µm sichtbar, dabei handelte es sich um die fluiden Glykolipide, in denen sich der ebenfalls fluide Fluoreszenzmarker verteilt hatte.

Ein ähnliches Bild ergab sich nach der Übertragung des Filmes auf den Glasträger. Um die Bindungsfähigkeit der Liganden zu beweisen, wurde die Modellmembran in der Durchflußkammer mit FITC markiertem ConA inkubiert, es waren ähnlich große Mannosidcluster wie auf der Wasseroberfläche zu erkennen [Abbildung 18].

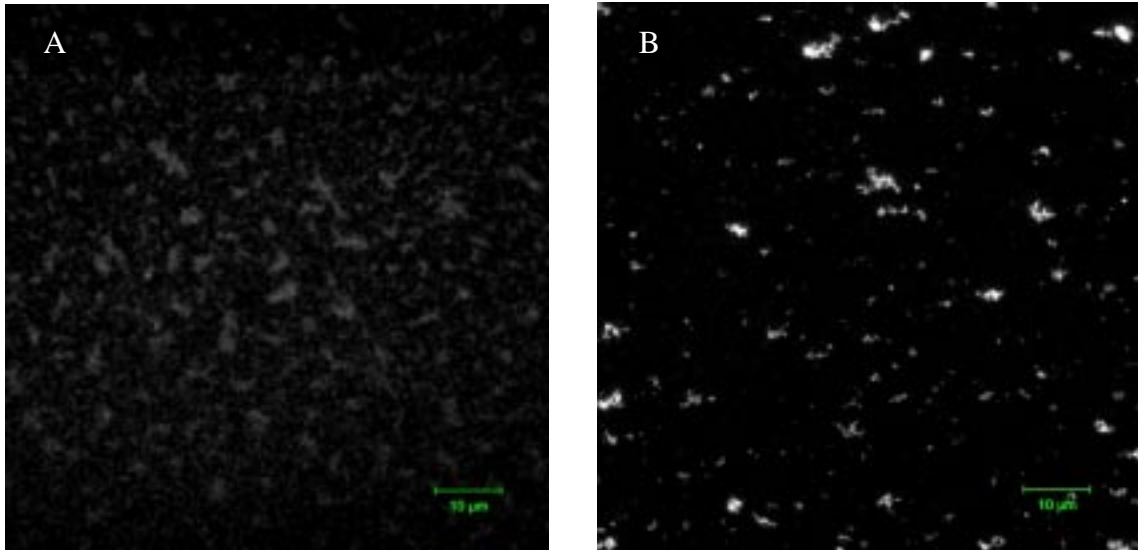


Abbildung 18 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Monolayers mit 10% eines Mannosids: Bild A auf Wasser/Luft Grenzfläche (Fluoreszenzmarkierung mittels NBD-PE) und in Bild B nach der Übertragung auf Glas (nach Inkubation mit FITC-markiertem ConA).

Die Liposomen-Adhäsionsexperimente unter Flußbedingungen wurden mit NBD-PE gelabelten Vesikeln durchgeführt, die Modellmembran war nicht markiert. Bereits nach kurzem Spülen der Flußkammer waren die hellen Punkte der adhärennten ConA-Liposomen zu erkennen. Nach 30 minütigem Spülen mit vesikelfreiem Puffer waren die vorher punktförmigen Fluoreszenzen als helle Flächen zu erkennen. Selbst längeres Spülen mit 0,1 M  $\alpha$ -Methylmannosid, welches die Mannosidbindung zum ConA verdrängt, vermochte die Adhäsion der Liposomen nicht wieder zu inhibieren. Das legt die Vermutung nahe, daß es sich hierbei um ein Aufspreiten der Liposomen handelt, wie es bereits in Kapitel 4.1.3.2 beschrieben wurde.

Um diese unspezifischen Wechselwirkungen auszuschließen, wurden mehrere Modifikationen bei der Membran- und Liposomenherstellung vorgenommen. Elektrostatische Abstoßungskräfte durch den Einbau von 10 mol% des negativ geladenen DPPG können ein Aufspreiten der Vesikel nur unwesentlich unterbinden. Werden bei der Herstellung der Vesikel Lipide mit Polyethylenglycol-Kopfgruppen verwendet, erhält man sogenannte Stealth<sup>®</sup>-Liposomen. Die Polyethylenglykolketten verschaffen den Liposomen eine Abschirmung gegen Wechselwirkungen mit der Umgebung ähnlich der Glykokalix bei



natürlichen Zellen. Wir verwendeten PEG-PE 2000 mit einer Länge von ca. 5 nm, was ungefähr der Ausdehnung von ConA entspricht. Die so sterisch stabilisierten Vesikel zeigten bei optimierten 4 mol% PEG-PE 2000 eine deutlich geringere Bindungstendenz, jedoch war die Adhäsion der Liposomen teilweise inhibierbar.

Diese Arbeiten (Herstellung und Charakterisierung einer Modellmembran und ihre Verwendung in einem dynamischen Adhäsionsassay mit modifizierten Liposomen als Modellzellen) konnten 1997 in *Biochim. Biophys. Acta* veröffentlicht werden [139].

Eine weiterführende, neuartige Optimierung der Liposomen wurde mit der Ausbildung eines starren Kerns im Innenraum der Vesikel angestrebt. Dabei sollte ein Polymer teilweise mit Anker molekülen in der inneren Membran verbunden sein und somit, ähnlich einem Zytoskelett natürlicher Zellen, die Liposomen stabilisieren und ein Aufspreiten verhindern. Die Wechselwirkungen des Polymers mit dem inneren, negativ geladenen Monolayer wurde durch die Verwendung eines kationischen Monomers erreicht. Im Hinblick auf die Verformbarkeit einer natürlichen Zelle im Rollprozeß wurde das Polymer durch Zugabe unterschiedlicher Mengen des Vernetzers (N,N'-Methylenbisacrylamid) in seiner Elastizität beeinflusst. Diese Liposomen wurden zunächst konventionell, wie in Kapitel 3.5 beschrieben hergestellt, allerdings unter Zugabe des Monomers und des Vernetzers. Anschließend wurden die löslichen Substanzen außerhalb der Vesikel gelchromatographisch entfernt. Nach der UV-induzierten Polymerisation wurde das ConA wie oben beschrieben an den äußeren Monolayer gekoppelt. Dieser Polymerkern im Inneren der Liposomen konnte bei den Adhäsionsexperimenten ein sichtbares Aufspreiten weitgehend verhindern, die Bindungen waren jedoch wiederum nicht inhibierbar. Dies deutet auf unspezifische Wechselwirkungen der Lipide von Vesikel- und Modellmembran hin, die sich durch den festen Kern allerdings auf die Kontaktfläche der Kugel beschränkten. Ähnliche Ergebnisse erzielten wir bei der Verwendung von Melamin-Feststoffpartikeln als Modellzellen. Diese Partikel wurden nach der Vesikelfusionstechnik (Kapitel 3.6) durch ConA-haltige Liposomen mit einer Modellmembran überzogen [140].

Die Summe dieser einführenden Experimente brachte uns grundlegende Erkenntnisse über unsere Durchflußkammer und Adhäsionsvorgänge im Scherstrom. Die Arbeiten wurden von einer ständigen Verbesserung und Optimierung des Modellsystems begleitet. Durch die Erfahrungen im Umgang mit einer Modellmembran und deren Empfindlichkeit wurde die bereits erwähnte Blasenfalle entwickelt und die Temperierbarkeit der Kammer durch ein spezielles Gebläse im Mikoskoptisch verbessert. Der frühere Gebrauch einer Peristaltikpumpe für die Erzeugung des Scherstromes führte zu einem pulsartigen Druckverlauf in der Flußkammer, was in einer leichten Auf- und Abbewegung des Glasplättchens samt

Modellmembran resultierte. Durch die konfokalen Eigenschaften des Mikroskopes genügen jedoch einige Nanometer Verschiebung in der z-Achse, und das Objekt befindet sich außerhalb der Fokusebene und ist damit nicht mehr detektierbar. Nachdem auch die Verwendung von langen weichen Schläuchen und verschiedenen Peristaltikpumpen keine Verbesserung brachte, wurde der für den Scherstrom notwendige Druck hydrostatisch erzeugt. Durch Höhenverstellung des Flüssigkeitsreservoirs war es auch möglich, den Scherstrom sehr fein zu regulieren. Außerdem war es im Gegensatz zu Kolbenpumpen möglich, durch ständiges Auffüllen des Fließmediums einen kontinuierlichen Flüssigkeitsstrom zu gewährleisten.

Mit dieser optimierten Apparatur war es uns möglich, eine lektinspezifische Adhäsion von Modellzellen an einer Modellmembran unter Scherbedingungen reproduzierbar zu realisieren. Der komplizierte Zellrollprozeß konnte unter diesen Bedingungen dagegen nicht erzeugt werden. Die Ursachen dafür sind in einer schlecht zu steuernden Elastizität, der Instabilität der Modellzellen und der abweichenden Bindungskinetik des Systems ConA-Mannosid zu Selektin-Selektinligand zu suchen. Diese Tatsachen bekräftigen die Annahme, daß das Zellrollen als Sonderform der Adhäsion die spezifische Bindungskinetik der Selektine und ihrer Liganden voraussetzt und nicht durch andere Rezeptor-Ligand-Systeme ersetzt werden kann. Der Einsatz lebender Zellen mit ihren Eigenschaften einer extremen, reversiblen Verformbarkeit scheint zudem unumgänglich.

#### 4.2. Zellrollexperimente

Um ein Zellrollen zu induzieren, wurden die bereits gewonnenen Erfahrungen der beschriebenen Adhäsionsexperimente auf ein System mit selektinexprimierenden Zellen und sLe<sup>x</sup>-Lipide als Selektinliganden in der Modellmembran übertragen. Die Verwendung von Glykolipiden statt der natürlichen Mucinliganden ist eine Voraussetzung, um Aussagen über die Notwendigkeit einer lokalen Konzentrierung der Adhäsionsmoleküle für das Zellrollen treffen zu können. Das Ziel bestand zunächst in der Schaffung von Modellmembranen, die mittels inkorporierter Glykolipide ein Zellrollen vermitteln können.

Zunächst standen uns durch eine Zusammenarbeit mit der Universität Bielefeld aus Granulozyten extrahierte sLe<sup>x</sup>-Glykosphingolipid-Mischungen zur Verfügung, die mittels einer sLe<sup>x</sup>-affinen Chromatographie aufgereinigt wurden [122, 123]. Diese wurden in unterschiedlichen Konzentrationen mit DSPC gemischt und als Modellmembran auf Glasplättchen übertragen. Die Sphingolipide befinden sich bei der Übertragung bei 38 mN/m im Gegensatz zum DSPC in einem fluiden Phasenzustand und sind deshalb im Fluoreszenzmikroskop als Entmischungsareale zu erkennen. Die fluoreszierenden CHO-E

Zellen wurden in den Flüssigkeitsstrom mit einem Schergrad von  $200 \text{ s}^{-1}$  injiziert, was einem unteren Wert des kapillaren Blutstromes entspricht. Um möglichst viele Zellen im Beobachtungsfeld mit der Modellmembran in Interaktion treten zu lassen, wurde der Scherstrom für fünf Minuten unterbrochen, sobald die Zellen die Flußkammer erreicht hatten. Nach erfolgter Sedimentation der Zellen wurde das Spülen fortgesetzt.

Bei einer Konzentration der Glykosphingolipide von 5-15 % in DSPC gingen die CHO-E Zellen in eine rollende Bewegung über. Das Zellrollen ist dabei nicht als eine gleichförmige Bewegung sondern als ein unstetes Rucken erkennbar, das auch nicht immer exakt in Strömungsrichtung verläuft, da die Bindungen immer nur an den Ligandenclustern stattfinden.

Bei höheren Konzentrationen blieben die meisten Zellen fest adhärirt, während bei niedrigen Konzentrationen keine Wechselwirkungen zu beobachten waren. Die nichttransfizierten CHO Zellen interagierten in keinem Fall mit der Modellmembran. Da sich CHO und CHO-E Zellen bis auf die Expression von E-Selektin gleichen, konnten wir erstmals ein selektinvermitteltes Zellrollen in unserer Durchflußapparatur aufzeigen.

Um den Zellrollvorgang charakterisieren zu können, mußte eine Möglichkeit der Dokumentation gefunden werden. Dazu wurden die mikroskopischen Bilder alle zwei Sekunden über einen Zeitraum von mindestens 40 Sekunden auf einem Computer abgespeichert. Diese Methode ist ein Kompromiß aus Bildqualität und Leistungsfähigkeit der Rechentechnik, je schneller man scannt, um so kleiner müssen die abzuspeichernden Bilddateien sein. Außerdem verschlechtert sich die Bildauflösung bei einer Scandauer unterhalb von 2 Sekunden drastisch, da der Laser dann ein größeres Abtastraster benutzt. Ein einzelnes mikroskopisches Bild während des Zellrollexperimentes ist in [Abbildung 19] dargestellt.

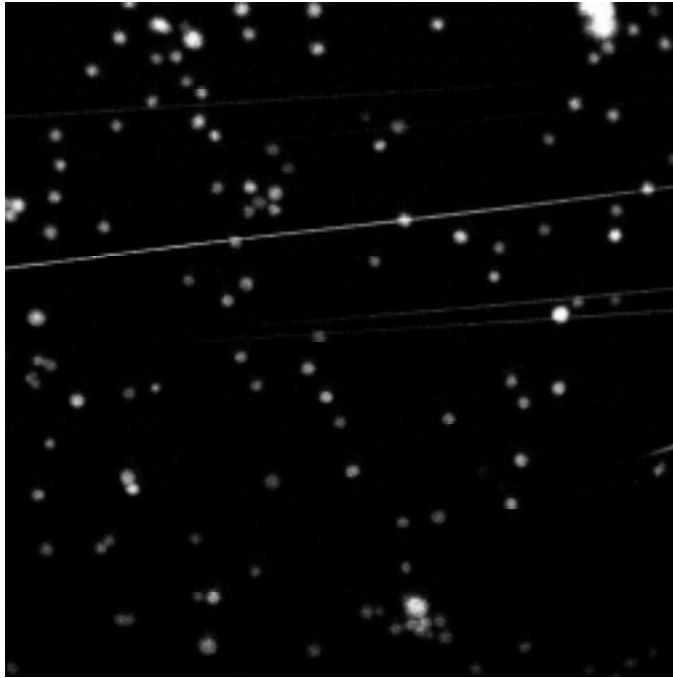


Abbildung 19 Fluoreszenzmikroskopisches Bild des Zellrollvorganges. Alle mit der Zellmembran in Wechselwirkung stehende Zellen erscheinen als helle Flächen. Die frei im Medium fließenden Zellen erscheinen als helle Streifen. Die Bilddiagonale beträgt 900  $\mu\text{m}$ .

Die fest adhären und die rollenden Zellen sind als runde Flächen zu erkennen. Ob sich eine Zelle rollend bewegt oder nicht, ist aus einem einzigen Scan nicht abzulesen, da die Zellrollgeschwindigkeit viel zu gering gegenüber der Scangeschwindigkeit ist, um das Abbild der rollenden Zelle als langgezogene Ellipse oder gar einen langen Streifen darstellen zu können. Die erkennbaren langgezogenen hellen Streifen repräsentieren diejenigen Zellen, die sich in unmittelbarer Nähe der Membranoberfläche im freien Fluß bewegen. Sie treten in keinerlei Wechselwirkungen mit der Modellmembran, ihre Geschwindigkeit entspricht der des fließenden Mediums.

Die aufgezeichneten Bildsequenzen wurden hauptsächlich unter zwei Gesichtspunkten ausgewertet:

a) Die einfache Auszählung der hellen runden Flächen nach einem bestimmten Zeitpunkt des Spülens gibt Auskunft über den Anteil der Zellen, die in irgendeiner Weise mit der Modellmembran in Wechselwirkung stehen. Dabei wird nicht erfaßt, ob sich die Zelle rollend fortbewegt oder fest adhären. Diese Auswertungsmethode entspricht einem klassischen Zelladhäsionsassay unter statischen Bedingungen, bei dem eine bestimmte Anzahl von Zellen

mit einem Substrat inkubiert und nach einem Spülvorgang wieder ausgezählt wird. Mit dieser Methode lassen sich jedoch keine Aussagen über den Zellrollvorgang selbst treffen.

b) Um das Rollen der Zellen nachzuweisen und zu charakterisieren, mußten die einzelnen Bilder der gesamten Sequenz untereinander verglichen werden. Am effizientesten erwies sich dabei die Arbeitsweise, immer drei aufeinanderfolgende Bilder gleichzeitig zu bearbeiten. Durch das Mikroskop wurden Schwarz-Weiß-Dokumente erstellt, das heißt, die schwarzen Bereiche besitzen den Farbwert 0 und die weißen Bereiche der fluoreszierenden Zellen den Wert 1. Mit Hilfe eines Bildverarbeitungsprogramms wurde den drei Bildern dann jeweils eine der drei Grundfarben Rot, Grün oder Blau aufgeprägt. Die Werte 0 für Schwarz bleiben in jedem Bild erhalten und repräsentieren weiterhin Schwarz. Die weißen Bereiche werden jedoch eingefärbt. Die Zellen im ersten detektierten Bild erscheinen dann rot, im zwei Sekunden später aufgenommenen Bild grün, und im letzten Bild sind sie als blaue Flecken zu erkennen. Legt man die so gefärbten Bilder übereinander, läßt sich der Weg, den eine Zelle über die Modellmembran zurücklegt sehr gut verfolgen. Mittels einer Abstandsmessung der farbigen Flecken gleicher Zellen und der Zeitdifferenz zwischen den Einzelbildern kann dann auf die Zellrollgeschwindigkeit geschlossen werden. Bei den fest adhärenierten Zellen mit der Geschwindigkeit 0 befinden sich alle drei Grundfarben am selben Ort und ergeben Weiß [Abbildung 20].

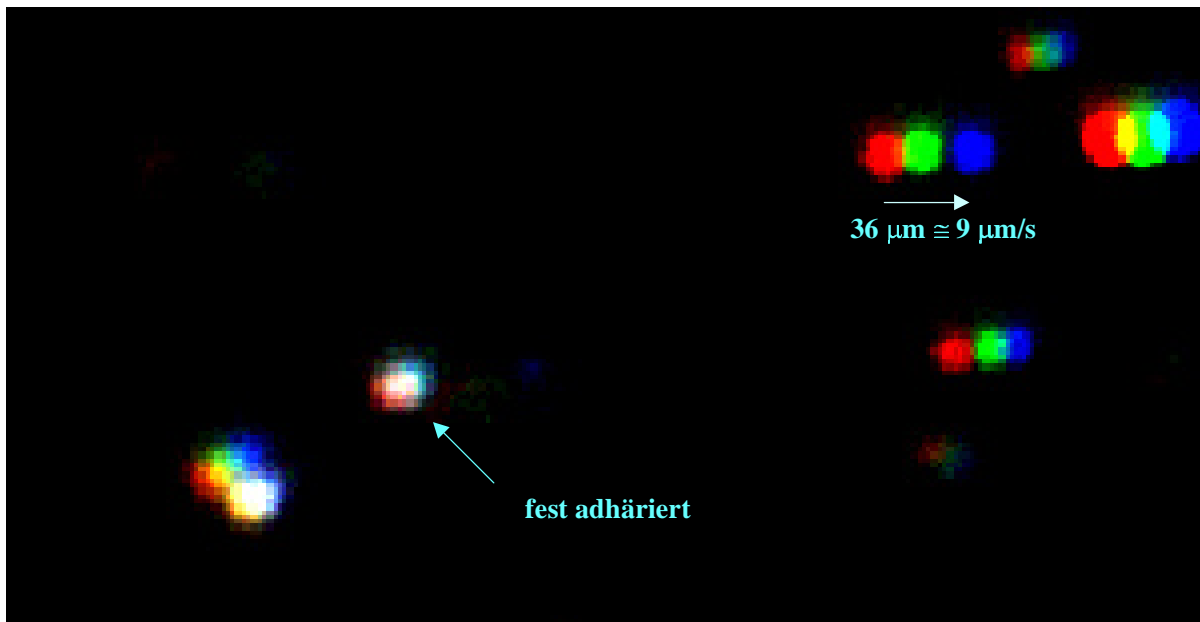


Abbildung 20 Überlagerung von drei zeitlich aufeinanderfolgenden Falschfarbenbildern während eines Zellrollexperimentes.

Aus dieser Darstellung geht ebenfalls hervor, daß die Zellen in ihrer Rollbewegung der Fließrichtung nicht exakt folgen, sondern ungeradlinig und ruckartig fortbewegt werden.

Diese beiden Methoden zur Auswertung der Rollexperimente ergänzten sich und wurden generell parallel durchgeführt. Generell konnte festgestellt werden, daß eine Verringerung der Ligandenkonzentration in der Modellmembran einen Anstieg der Rollgeschwindigkeit bewirkt, was aber auch eine Erniedrigung der insgesamt interagierenden Zellen zur Folge hatte.

Leider ist eine quantitative Aussage mit diesen Experimenten nicht möglich, da die absolute Konzentration der saccharidischen Bindungsseptide in dem Glykolipidextrakt nicht bekannt ist.

#### 4.2.1. Einfluß der Ligandenverteilung und -konzentration

Die bisher verwendeten Sphingolipide wurden mittels einer sLe<sup>x</sup>-affinen Chromatographie aus einem Granulozytenextrakt aufgereinigt [122]. Dennoch besitzen wir keine Kenntnis über die exakten Strukturen der Kopfgruppen und Anker-Molekülteile. Auch die Anwesenheit anderer, Nicht-sLe<sup>x</sup>-Strukturen kann nicht ausgeschlossen werden, da Bindungsspezifitäten an Oligosacchariden wesentlich geringer sind als bei Protein-Protein-Wechselwirkungen (siehe auch Kapitel 2.3.4). Deshalb muß davon ausgegangen werden, daß es sich bei den Extrakten um ein Gemisch von Lipiden handelt, bei denen sLe<sup>x</sup> oder aber auch leicht modifizierte sLe<sup>x</sup>-Derivate in der Affinitätschromatografie zu einer Separation geführt haben.

Präzise Aussagen über den Einfluß einzelner Selektinliganden auf den Rollprozeß lassen sich nur mit einem chemisch genau definierten System treffen. Deshalb wurden im weiteren Verlauf der Arbeiten unsere bisherigen Erfahrungen in der Modellanordnung auf ein System mit synthetischen Selektinliganden übertragen. In einer Zusammenarbeit mit der Universität Konstanz konnten wir zunächst auf ein Ceramid zurückgreifen, dessen sLe<sup>x</sup>-Kopfgruppe über einen Laktosespacer mit dem Ankermolekül verbunden ist, bei einer Vergleichssubstanz, die als Kontrolle dienen sollte, besteht die Kopfgruppe nur aus der Neuraminsäure [125] [Abbildung 21].

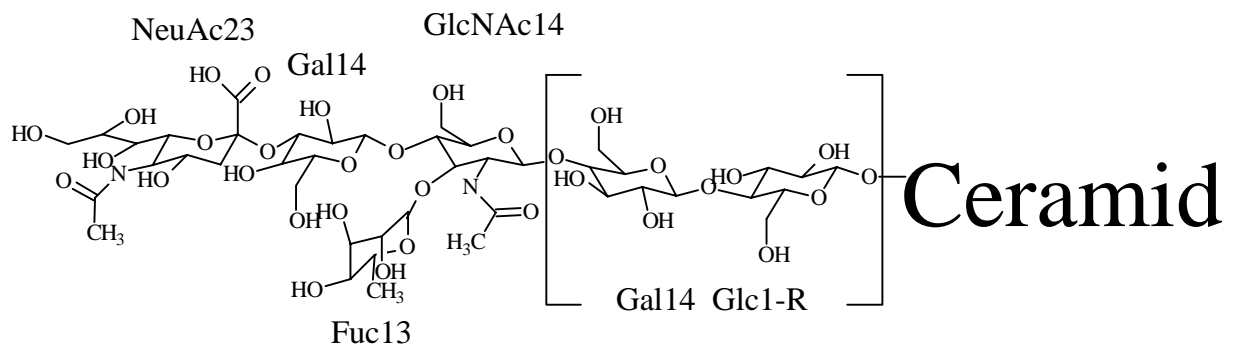


Abbildung 21 Sialyl Lewis<sup>X</sup>-Lipid mit Laktosespacer und Ceramidanker;[(2S,3R,4E)-2-amino-3-hydroxy-2-(N-palmitoyl)-octadec-4-en-1-yl]-D (Kalium-5-acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero- $\alpha$ -D-galakto-2-nonulopyranosylat)-(2 $\rightarrow$ 3)-( $\beta$ -D-galaktopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-[ $\alpha$ -L-fucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 3)]-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-( $\beta$ -D-galaktopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopyranosid.

Mit diesen Verbindungen sollte überprüft werden, inwieweit der komplizierte Zellrollprozeß auch mit einfachen und definierten synthetischen Liganden simuliert werden kann, um daraus Rückschlüsse auf die molekularen Mechanismen zu ziehen.

Für die Beantwortung unserer ursprünglichen Fragestellung nach dem Einfluß von absoluter Konzentration und einer lateralen Strukturierung der Ligandenmoleküle in einer Modellmembran wurde das physikochemische Verhalten des Ceramids in verschiedenen Lipidmatrices untersucht. Das Ziel dabei bestand darin, verschiedene Modellmembranen zu schaffen, in der das Glykolipid bei gleicher Konzentration unterschiedlich lateral strukturiert vorliegt. Einer homogenen Verteilung des Glykolipids sollten Membranen mit kleinen und großflächigen Clustern gegenüberstehen.

Um die Vergleichbarkeit der Membranen untereinander zu erhöhen, wurde zunächst versucht, in einem einzigen Matrixlipid durch unterschiedliche physikalische Parameter, wie Druck und Temperatur die Glykolipide in die gewünschten Lateralmuster zu zwingen. Das gewählte DMPC ist bei Raumtemperatur und einem Lateraldruck von 38.40 mN/m an der Wasser/Luft Grenzfläche nicht mit dem Ceramid mischbar, da sich das Matrixlipid im Gegensatz zum Ceramid in einem rigiden Phasenzustand befindet. Die Ursache dafür liegt wahrscheinlich in der wesentlich größeren Kopfgruppe des Ceramids. Durch eine Temperaturerhöhung auf 40°C wurde DMPC in einen fluiden Phasenzustand überführt und

damit eine vollständige Mischbarkeit mit dem Ceramid erreicht. Der so vorgefertigte Film ließ sich allerdings sehr schlecht, mit einem Übertragungsverhältnis von unter 0,3 auf das Glas übertragen. Ein zweiter Ansatz bestand in der Blodgett-Übertragung eines rigiden, geclusterten Monolayers bei Raumtemperatur, es folgte ein nachträgliches Aufschmelzen der Modellmembran bei 40°C und eine Homogenisierung der Ceramidstrukturen durch Lateraldiffusion. Auf diese Weise erhielten wir zwei verschieden strukturierte Modellmembranen. Allerdings benötigte die Lateraldiffusion der Lipide nach Aufschmelzen der Membran mindestens drei Stunden. Bei für Mikroorganismen günstigen Lebensbedingungen von 40°C reichten in dieser Zeit oft wenige Keime für eine teilweise Zerstörung des Lipidmonolayers. Außerdem wurden die Zellrollexperimente bei einer Temperatur von 37°C durchgeführt, was zu einer teilweisen Schmelze des rigiden, geclusterten Systems und zur einsetzenden homogenisierenden Lateraldiffusion führte. Ein Bindungsassay bei unterschiedlichen Temperaturen wäre als Alternative nicht aussagekräftig.

Für die Erzeugung stabiler und reproduzierbar strukturierter Modellmembranen entschieden wir uns schließlich für den Einsatz von unterschiedlichen Matrixlipiden mit verschiedenen physikochemischen Eigenschaften. Für das System mit einer homogenen Ligandenverteilung wählten wir als Matrixlipid POPC. Bei einer Zumischung von 1mol% Ceramid zum fluiden POPC findet man erwartungsgemäß sowohl an der Wasser/Luft-Grenzfläche als auch auf dem übertragenen Monolayer fluoreszenzmikroskopisch keine Entmischungserscheinungen (die Menge von 1% ergibt sich aus unten beschriebenen Konzentrationsfindungen für ein funktionierendes Zellrollen).

Mischt man die gleiche Menge Glykolipid DSPC zu, so sind deutliche Clusterbildungen zu beobachten. Die Entmischungen sind als winzige helle Punkte unter dem Fluoreszenzmikroskop zu erkennen. Da der Fluoreszenzmarker die Clusterbildung selbst verursachen könnte, wurde der DSPC-Film mit 1% Ceramid mittels AFM untersucht [Abbildung 22].



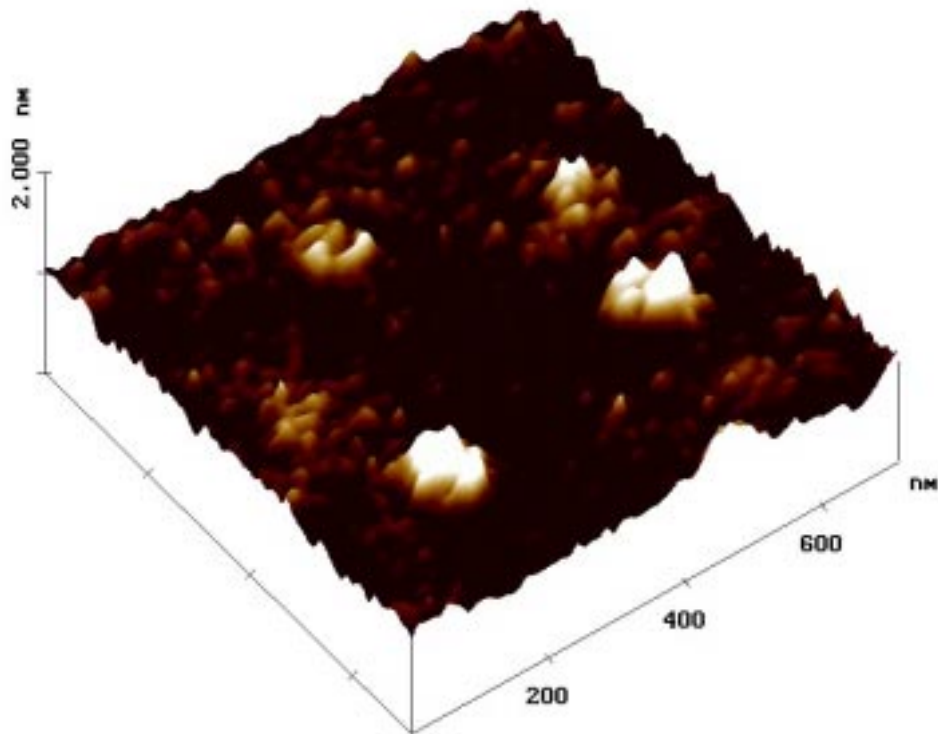


Abbildung 22 AFM-Aufnahme eines DSPC Modellmembran mit 1% sLe<sup>x</sup>-Cer. Die Glykolipidcluster sind als helle Erhebungen erkennbar.

Die in der AFM-Aufnahme erhobenen Bereiche stellen die Ceramidcluster mit einer Fläche von ca. 300 nm<sup>2</sup> dar. Der Flächenbedarf eines Ceramidmoleküls beträgt ca. 0,6 nm<sup>2</sup>, theoretisch besteht dieses Cluster also aus ca. 500 Glykolipidmolekülen. Da aber die detektierten Clusterareale weit mehr als 1% der Gesamtoberfläche einnehmen, geht man davon aus, daß es sich hierbei um Mischflüssigkristalle aus 1 Molekülteil Ceramid und ca. 10 Teilen DSPC handelt (unterschiedlicher Platzbedarf der Moleküle berücksichtigt). Ein interessanter Effekt dieser Membranen äußert sich in konstanter Größe der Cluster bei unterschiedlicher Ceramidkonzentration; es ändert sich nicht die Größe, sondern die Anzahl der Entmischungen.

Um einen Einfluß auf die Größe der Cluster bei gleicher Ceramidkonzentration zu bekommen, verwendeten wir DSPC als Matrixlipid und POPC als Hilfslipid. In einem Lipidmix aus DSPC:POPC:sLe<sup>x</sup>-Cer zum Beispiel (94:5:1) separiert sich POPC in relativ großen fluiden Bereichen. Das Ceramid reichert sich gemäß seinen physikochemischen

Eigenschaften im POPC an. Die Größe der Ceramidanreicherungen kann somit über die Menge des verwendeten Hilfslipids POPC gesteuert werden.

Die so erzeugten Modellmembranen sind leicht reproduzierbar herstellbar, selbst das fluide System POPC-Ceramid legt sich mit einem Übertragungsverhältnis von nahezu 1 auf den Glasträger. In den folgenden Abbildungen sind die drei Möglichkeiten einer lateralen Ligandenstrukturierung gegenübergestellt, die gleichmäßige Verteilung der Glykolipide in der POPC-Membran ist dabei nur schematisch dargestellt [Abbildung 23].

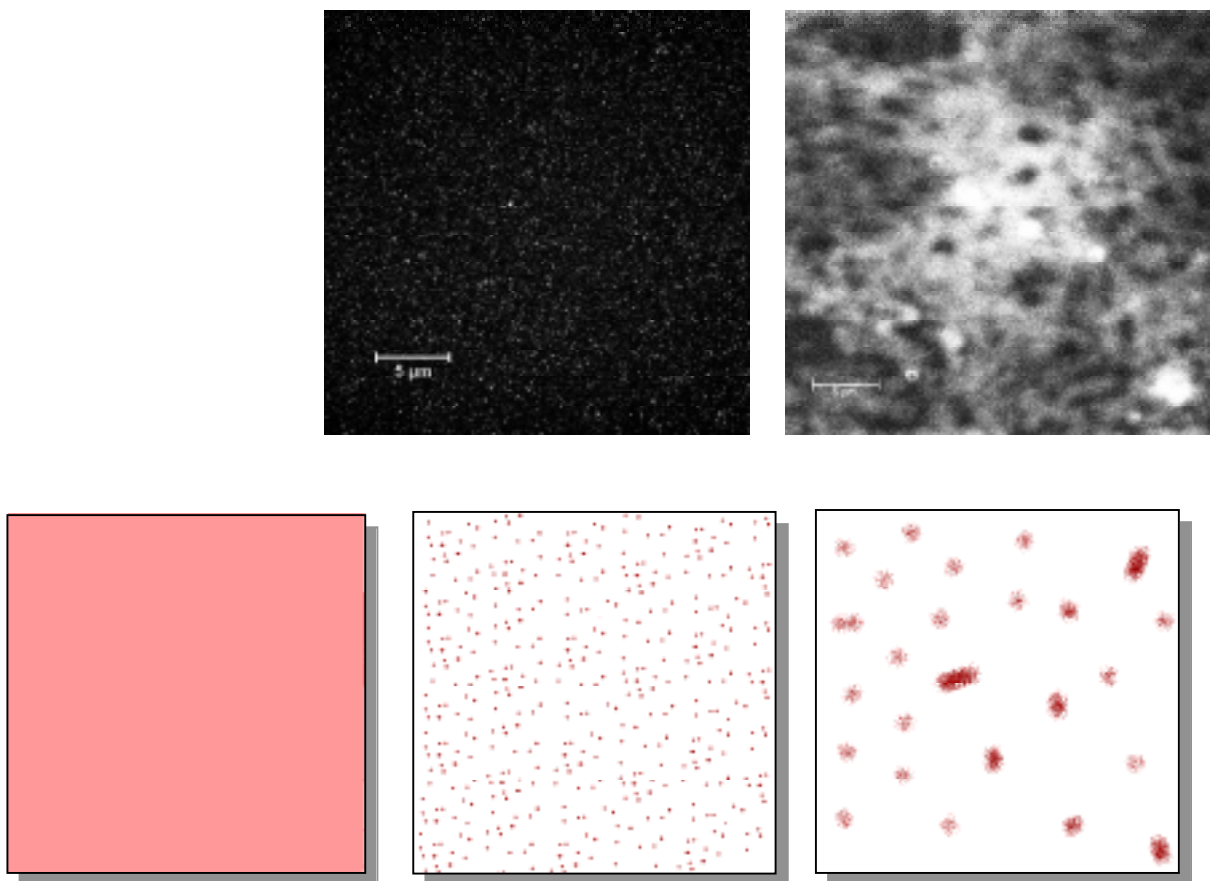


Abbildung 23 Oben: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Verteilung von 1% Glykolipid in der Modellmembran mit dem Matrixlipid DSPC (links) und DSPC/POPC 95:5 (rechts).

Unten: Schematische Darstellung verschieden strukturierter glykolipidhaltiger Modellmembranen.

Die ersten Untersuchungen wurden unter Verwendung des reinen DSPC als Matrixlipid für das Ceramid durchgeführt. Über eine absolute Konzentration der Selektinliganden bzw. des saccharidischen Bindungs epitops sLe<sup>x</sup> pro Oberflächeneinheit von Neutrophilen gibt es in der Literatur Schätzungen von 50.000/μm<sup>2</sup> [141]. Darauf beziehend und in Anlehnung an die Versuche unter Verwendung der natürlichen Sphingolipide wurde deshalb mit 10% sLe<sup>x</sup>-Cer in der DSPC-Matrix ein Rollen der CHO-E Zellen versucht zu induzieren. Dieses Experiment führte zu einer sehr festen und nahezu vollständigen Adhäsion der Zellen auf der Modellmembran. In einer Reihe weiterer Versuche zur Konzentrationsfindung wurde der sLe<sup>x</sup>-Cer Anteil Schritt für Schritt verringert. Überraschenderweise wurde ein Zellrollen erst ab einer Glykolipidkonzentration von 0,05% beobachtet. Eine Gegenüberstellung all dieser Experimente ist in folgender Tabelle dargestellt [Tabelle 2].

Glykolipid-Konzentration [%]	Zellrollgeschwindigkeiten [μm/s] von CHO-E-Zellen auf folgenden Modellmembranen				
	POPC-Matrix	DSPC-Matrix	DSPC/POPC-Matrix (1% POPC)	DSPC/POPC-Matrix (5% POPC)	DSPC/POPC-Matrix (10% POPC)
10	0	0	0	0	0
5	0	0	0,12 ± 0,15	0,12 ± 0,16	0,12 ± 0,17
2	0	0,14 ± 0,24	0,13 ± 0,14	0,1 ± 0,13	0,1 ± 0,13
1	0	0,19 ± 0,21	0,14 ± 0,12	0,13 ± 0,11	0,13 ± 0,15
0,5	0	0,21 ± 0,18	0,16 ± 0,11	0,17 ± 0,09	0,17 ± 0,13
0,2	0,35 ± 0,26	0,48 ± 0,19	0,22 ± 0,12	0,24 ± 0,13	0,24 ± 0,16
0,1	0,44 ± 0,21	0,78 ± 0,2	0,3 ± 0,09	0,33 ± 0,08	0,33 ± 0,27
0,05	2,4 ± 0,77	4,9 ± 0,44	1,3 ± 0,21	1,4 ± 0,32	1,4 ± 0,52
0,02	5,7 ± 0,51	8,1 ± 1,13	9,7 ± 1,3	10,4 ± 1,28	10,4 ± 1,62
0,01	5,2 ± 1,37	15,4 ± 1,77	16,1 ± 2,8	16,2 ± 2,75	16,2 ± 3,14
0,005	5 ± 1,83			17,4 ± 3,12	
0,002	5,1 ± 2,74				

Tabelle 2 Rollgeschwindigkeiten in μm/s der CHO-E-Zellen über unterschiedliche Modellmembranen in Abhängigkeit von der Glykolipidkonzentration.

Die Zahlenwerte ergeben sich aus mindestens 4 analogen Einzelbestimmungen und einer Anzahl von 100-400 registrierten Zellen pro Experiment. Ein Zellrollen wird demnach von sLe<sup>x</sup>-Cer in einem Konzentrationsbereich von 0,1 bis 0,05 % in einer DSPC- Matrix vermittelt.

Für entsprechende quantitative Aussagen wurde der Platzbedarf der verwendeten Lipide im Langmuir-Trog bei einem Lateraldruck von 38 mN/m bestimmt (entspricht Lateraldruck während der Filmübertragung). Bei einem Platzbedarf von  $60 \text{ \AA}^2$  für sLex-Cer und  $45 \text{ \AA}^2$  für DSPC ergeben sich entsprechend der Konzentrationen 0,1 bis 0,05% durchschnittliche Mengen von 300 bis 60 sLex-Cer Moleküle pro  $\mu\text{m}^2$  Membranfläche. Vergleicht man diese Mengen Glykolipid mit den angenommenen 1000 Selektinmolekülen pro  $\mu\text{m}^2$  CHO-E Zelloberfläche, so ergibt sich ein Ligand:Selektinverhältnis von 1:3 bis 1:17. Das macht deutlich, daß unabhängig von dem großen Selektinüberschuß der CHO-E Zellen der Rollprozeß ausschließlich durch eine Variation der Konzentration der Selektinliganden zu steuern ist. Diese Tatsache erhöht die Vergleichbarkeit der Experimente mit CHO-E Zellen zu natürlichen selektinexprimierenden Zellen, da die Selektinkonzentration in unserem System als fixe Größe betrachtet werden muß, das Zellrollen jedoch explizit durch die Liganden gesteuert werden kann. Allerdings stellt dieses Ungleichgewicht der Konzentration der Adhäsionsmoleküle nur einen theoretischen Mittelwert dar, der besonders bei einer Ligandenclustering in der Modellmembran nur noch wenig Aussagekraft besitzt. Werden die Liganden in kleinen Bereichen konzentriert, kann es zu einer Angleichung oder sogar einem Überschuß von Liganden gegenüber Selektinmolekülen kommen. Da die Zellen bei hohen Ligandenkonzentrationen nicht rollen sondern fest adhäreren, scheint eine lokale gegenüber einer generellen Konzentrierung der Liganden als eine Notwendigkeit für das Zellrollen.

Um zu beweisen, daß die Ursachen für diese Wechselwirkungen ausschließlich auf den Molekülkomplex Selektin-sLe<sup>x</sup>-Ceramid zurückzuführen sind, wurden jeweils vier Kontrollversuche durchgeführt. Analoge Experimente, jedoch:

- 1) Verwendung von CHO Zellen (fehlendes Selektin)
- 2) vorherige Inkubation der CHO-E Zellen mit anti-E-Selektin IgG (blockiertes Selektin)
- 3) kein sLe<sup>x</sup>-Cer in die Membran inkorporiert (fehlender Selektinligand)
- 4) Einbau eines Neuraminsäureceramids statt sLe<sup>x</sup>-Cer in die Modellmembran (um elektrostatische Wechselwirkungen und das alleinige Vorhandensein einer Sialinsäure als Ursache für das Zellrollen auszuschließen).

In keinem dieser Kontrollexperimente konnte ein Zellrollen oder eine verstärkte Zelladhäsion an der Modellmembran beobachtet werden; in allen Versuchen adhärerten jedoch ca. 5% der Zellen mit allen Unterlagen, egal ob Glas, modifizierte oder unmodifizierte Modellmembran. Dieser Effekt war sowohl bei CHO als auch bei CHO-E Zellen zu beobachten. Da CHO eine konfluent auswachsende Zelllinie ist, könnte dieses Phänomen mit einem besonders schnellen Anwachsen einiger Zellen an der Unterlage innerhalb der Sedimentationszeit erklärt werden.

Als Schlußfolgerung aus den vorangegangenen Untersuchungen ergibt sich die Erkenntnis, daß gerichtet eingebaute synthetische sLe<sup>x</sup>-Lipide in einer Modellmembran in der Lage sind, einen Zellrollprozeß selektinhaltiger Zellen in unserer Durchflußkammer zu vermitteln. Die Rollgeschwindigkeit beträgt dabei zwischen 8-15 µm/s, was einen unteren bis mittleren Wert im Vergleich zu *in-vivo* Beobachtungen darstellt.

Um das Zellrollen weiter zu optimieren, wurde die Größe der Ligandencluster in einem DSPC/POPC Gemisch wie oben beschrieben variiert. Durch die Zumischung von 1-20% POPC wurden die glykolipidreichen Areale gegenüber wenigen Nanometern der reinen DSPC-Matrix auf über 2 µm ausgedehnt. Um eine gute Vergleichbarkeit der Rollexperimente zu erreichen, wurden die gleichen Ligandenkonzentrationsschritte von 10-0,0001% verwendet. Bei POPC-Konzentrationen von 1-2,5% im DSPC konnte dabei jeweils eine leichte, allerdings nicht signifikante Erhöhung der Rollgeschwindigkeit beobachtet werden (nicht grafisch dargestellt). Bei einem 5%igen POPC-Anteil in der Matrix war die erhöhte Rollgeschwindigkeit am ausgeprägtesten. Zusätzlich ließ sich ein Zellrollen bei einer noch ligandenärmeren Membran nachweisen. Bei einem sLe<sup>x</sup>-Cer-Molekülanteil von 0,002% in der Matrix vermittelte die Membran ein Zellrollen mit einer bis dahin nicht erreichten Geschwindigkeit von 18 µm/s. Bei einer weiteren Vergrößerung der Ligandencluster ging sowohl die Rollgeschwindigkeit als auch die Konzentrationstoleranz gegenüber den Liganden zurück. Bei einem POPC-Anteil von über 15% veränderte sich die Struktur der Membran derart, daß sich völlig ligandenfreie Bereiche mit riesigen POPC/Ligandeninseln von mehreren Millimetern abwechselten. Die Fähigkeit der Membranen für eine selektinspezifische Rollvermittlung glich bei diesen hohen POPC-Zumischungen den Beobachtungen unter Verwendung der reinen POPC-Membranen, die im folgenden Absatz ausgeführt sind.

Über die Notwendigkeit einer Ligandenclusterung kann allerdings erst durch den Vergleich der Experimente von geclusterten Membranen gegenüber homogen verteilten Modellmembranen aus Abbildung 23 geschlußfolgert werden. In analogen Experimenten wurde deshalb das Verhalten der CHO-E Zellen an den homogen verteilten POPC-Modellmembranen im Scherstrom untersucht. Bei Glykolipidkonzentrationen von 10 bis 0,1% kommt es ebenfalls zu einer festen Adhäsion der Zellen. Wird die Konzentration von 0,1% sLe<sup>x</sup>-Cer unterschritten, lösen sich bei beginnendem Spülen die meisten Zellen von der Membran ab. Nur ein Anteil von ca. 5% der Zellen geht unterhalb der genannten Glykolipidkonzentration in eine langsame Bewegung mit ca. 5 µm/s über. Diese Bewegung wird von uns allerdings nicht als ein Zellrollen betrachtet, da abgesehen von der niedrigen Geschwindigkeit auch die sonst im Lichtmikroskop zu beobachtende charakteristische

Rotationsbewegung der Zellen während der Vorwärtsbewegung fehlt. Vielmehr werden die Zellen langsam über die fluide POPC-Membran geschoben. Dieser Effekt ist ebenfalls zu beobachten, wenn sich kein Glykolipid in der Membran befindet. Warum dieses „Schwimmen“ der Zellen nicht bei hohen Glykolipidkonzentrationen stattfindet, könnte mit den physikochemischen Eigenschaften der Lipide in Zusammenhang stehen. Die experimentell ermittelte homogene Verteilung des sLe<sup>x</sup>-Cer im fluiden POPC kann mit der Fluidität des Glykolipids erklärt werden, welche durch das Tetrasaccharid als voluminöse Kopfgruppe verursacht wird. Der Lipidanker des Ceramids besitzt allerdings rigide Eigenschaften, da er unverzweigt, ohne Doppelbindungen und sehr langkettig ist. Diese rigiden Eigenschaften werden im idealen Mischungsverhalten mit POPC zwar durch die Kopfgruppen überdeckt, könnten aber durch Wechselwirkungen mit dem unteren, fixierten Monolayer einer durch Scherstreß verstärkten Lateraldiffusion der POPC-Moleküle entgegenwirken. Unspezifisch an der Modellmembran haftende Zellen könnten so bei Unterschreitung einer bestimmten Ligandenkonzentration mit den Membranlipiden lateral diffundieren.

Zusammenfassend sind die Ergebnisse des Rollverhaltens in Abhängigkeit von Konzentration und lateraler Verteilung der Selektinliganden in einer Modellmembran in der folgenden Abbildung dargestellt [Abbildung 24].

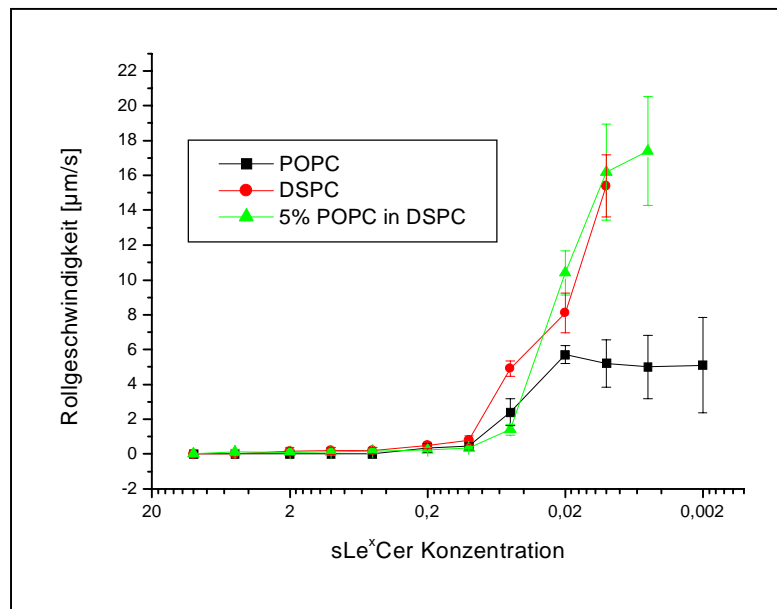


Abbildung 24 Grafische Darstellung der Zellrollgeschwindigkeiten in Abhängigkeit von Glykolipidkonzentration und Ligandenstrukturierung in der Modellmembran. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist nur der Verlauf auf der effizientesten 5 % igen POPC Mischmatrix abgebildet.

Aus dieser grafischen Darstellung läßt sich die Abhängigkeit der Zellrollgeschwindigkeit gegenüber der Ligandenkonzentrationen auf den in Abbildung 23 dargestellten drei Modellmembranen miteinander vergleichen. Bei sehr hohen Ligandenkonzentrationen kommt es zu keinem Rollvorgang, und die Geschwindigkeit ist nahe 0. Wird diese Konzentration erniedrigt, beginnen die Zellen bis zu einer Minimalkonzentration zu rollen, danach sind keine Wechselwirkungen mehr zu beobachten.

An dieser Stelle läßt sich resümieren, daß eine Clusterbildung der Selektinliganden eine funktionelle Grundvoraussetzung des Zellrollens im Scherstrom ist. Ähnlich wie bei den natürlichen mucinartigen Strukturen mit einer Vielzahl von Bindungssepitopen am Proteingrundgerüst werden die einzelnen schwach affinen Bindungskräfte des sLe<sup>x</sup> bei einer lokalen Konzentration potenziert. Erst dadurch sind sie in der Lage, auch relativ großen Zellen in einem Flüssigkeitsstrom den nötigen Widerstand in einem dynamischen Adhäsionsvorgang zu verleihen.

In unserer abstrakten Modellanordnung konnte anhand von Glykolipiden der Zellrollprozeß prinzipiell simuliert und dabei die Multivalenzhypothese untermauert werden. Eine quantitative Übertragbarkeit der Ergebnisse auf das natürliche Leukozytenrollen ist

jedoch nur bedingt möglich. Besonders bemerkenswert ist dabei die relativ niedrige Rollgeschwindigkeit, die ihre Ursachen in der langsameren Bindungskinetik des E-Selektins und dem Fehlen von Mikrovillien hat. Zudem sollten die flexiblen, langgestreckten und weit aus der Membran herausragenden natürlichen Mucine zu einem noch wesentlich effizienteren Rollvorgang beitragen.

#### 4.2.2. Einfluß des Schergrades

Die *in-vivo* beobachteten Zellrollgeschwindigkeiten halten sich trotz extremer Schergradunterschiede in den verschiedenen Organen und Geweben in relativ engen Grenzen. Wie bereits in Kapitel 2.4.2 beschrieben, wird für einen entsprechenden Regelmechanismus hauptsächlich die elastische Verformbarkeit der Zelle in Abhängigkeit des auf die Zelle wirkenden Schergrades verantwortlich gemacht. Um dieses Phänomen in unserer Durchflußkammer zu simulieren, führten wir Zellrollexperimente bei unterschiedlichem Scherstreß durch.

Als Standardversuchsbedingungen wählten wir eine DSPC-Lipidmatrix mit 0,025% sLe<sup>x</sup>-Cer. Diese Membran hatte sich als besonders stabil hinsichtlich ihrer Herstellung und Übertragung herausgestellt. Im Gegensatz zu Membranen mit POPC-Anteilen bleibt ein DSPC-Layer bis zu einem Schergrad von 2000 s<sup>-1</sup> stabil. Ein Herausreißen von sLe<sup>x</sup>-Cer Molekülen durch die Beanspruchung einer bindenden Zelle im Scherfluß konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden, da eine Vielzahl von Zellen nacheinander über die gleiche Membranfläche rollen kann, ohne daß sich dadurch die Rollcharakteristik ändert. Außerdem sind die Standardabweichungen der Zellrollgeschwindigkeit und der Anzahl der rollenden Zellen am günstigsten zu werten.

Die bisherigen Versuche wurden alle bei einem Schergrad von 200 s<sup>-1</sup> durchgeführt, was einem relativ niedrigen physiologischen Wert entspricht. In einer Reihe von Versuchen wurden die Zellen nach der üblichen Sedimentationszeit von 5 min einem ständig wachsenden Scherstrom ausgesetzt. Der Schergrad wurde dabei alle 10 Sekunden schrittweise erhöht und die Zellrollgeschwindigkeit ausgewertet [Abbildung 25].



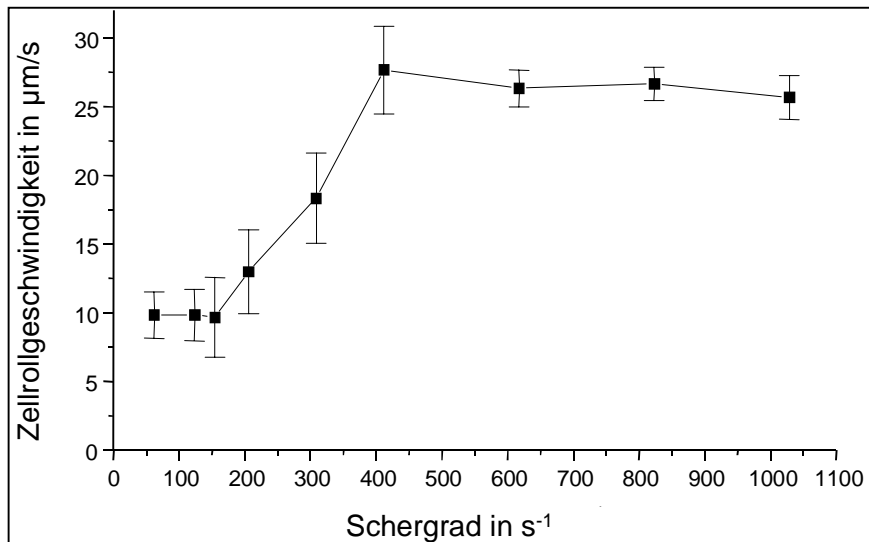


Abbildung 25 Abhängigkeit der Zellrollgeschwindigkeit vom Schergrad.

Bis zu einem Schergrad unterhalb  $50 s^{-1}$  konnte kein Zellrollen beobachtet werden, die Zellen blieben unbeweglich auf der Modellmembran liegen. Wurde der Schergrad weiter erhöht, setzten sich die Zellen mit einer Geschwindigkeit von zunächst ca.  $10 \mu m/s$  in Bewegung. Erst bei einem Schergrad von  $170 s^{-1}$  stieg die Rollgeschwindigkeit weiter an, um bei ca.  $400 s^{-1}$  ein Maximum zu erreichen und schließlich in ein Plateau überzugehen.

Obwohl die Verformung einer Zelle mit den vorhandenen mikroskopischen Mitteln leider nicht direkt dargestellt werden konnte, ist sie wahrscheinlich trotzdem die Ursache für dieses ausbalancierte Plateau. Unter stärkerem Scherstreß flachen die Zellen immer stärker ab, damit erhöht sich die Kontaktfläche zur Modellmembran, gleichzeitig verringert sich die Angriffsfläche für die strömende Flüssigkeit (siehe Kapitel 2.4.2).

Das ebenfalls dort beschriebene „threshold phenomenon“, wobei es unterhalb eines bestimmten Schergrades weder zu einer Zelladhäsion noch zu einem Rollen kommt, konnte in diesem Versuchsaufbau nicht beobachtet werden. Dieser Schutzmechanismus im Organismus verhindert ein zufälliges Einleiten der Adhäsionskaskade und ist wahrscheinlich dadurch begründet, daß ein Mindestmaß an Zellabflachung für ein Rollen vorhanden sein muß [102, 103]. Kommt es nach einzelnen Tetherereignissen durch mangelnden Scherstrom zu keiner nennenswerten Abflachung, wird der Rollvorgang nicht ausgelöst. Unter unseren experimentellen Bedingungen sind die Zellen jedoch nach ihrer Sedimentation infolge der Schwerkraft bereits zu einem gewissen Grad abgeflacht, was einen entsprechend hohen

Schergrad voraussetzt, um in ein Rollen überzugehen. Deshalb adhären die Zellen auf der Modellmembran unterhalb von  $50 \text{ s}^{-1}$ . Um das „threshold phenomenon“ in unserer Modellanordnung zu simulieren, müßte der Rollprozeß ohne eine Sedimentation der Zellen, direkt aus der strömenden Flüssigkeit heraus beobachtet werden. Derartige Adhäsionsereignisse sind allerdings im begrenzten mikroskopischen Blickfeld sehr selten und sind bei der Anzahl von  $10^6$  Zellen statistisch nicht auswertbar; es wäre ein Vielfaches an Zellmaterial notwendig.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß das Zellrollen bei unterschiedlicher Scherbelastung in unserem Modellsystem (in Übereinstimmung mit früheren *in-vivo* und *in-vitro* Beobachtungen) simuliert werden konnte. Das auch von anderen Arbeitsgruppen gefundene Geschwindigkeitsplateau durch eine Abflachung der Zellen bei hohen Strömungsgeschwindigkeiten konnte bestätigt werden.

#### 4.2.3. Einfluß der Ligandenmolekülstruktur und -flexibilität

Eine Verstärkung der einzelnen Bindungskräfte durch eine lokale Konzentrierung von Glykolipiden konnte den natürlichen Selektinliganden nachempfunden werden. Die mucinartigen Strukturen zeichnen sich jedoch nicht nur durch eine räumliche Anhäufung einzelner Bindungs epitope aus, sie besitzen durch ihr langgestrecktes Peptidgerüst eine große Flexibilität. Durch das weite Herausreichen der Mucine aus einer Zellmembran sind sie zudem für adhärende Zellen sehr gut erkennbar. Um den Einfluß und die Bedeutung der Ligandenflexibilität auf das Rollverhalten der Zellen zu untersuchen, setzten wir Glykolipide mit unterschiedlich beweglichen Kopfgruppen ein. Die Flexibilität der Kopfgruppe wird dabei durch einen unterschiedlich langen Abstandshalter zwischen Tetrasaccharid und Lipidanker erreicht.

Die bisherigen Untersuchungen wurden mit sLe<sup>x</sup>-Cer durchgeführt, dessen relative Unbeweglichkeit der Kopfgruppe durch einen vergleichsweise rigiden Laktosespacer verursacht wird. Durch den Ersatz der Laktose durch unterschiedlich lange Ethoxyeinheiten wird eine schrittweise veränderte Länge und Flexibilität der Glykolipide erreicht. In Zusammenarbeit mit der AG Schmidt, Universität Konstanz untersuchten wir die in folgender Abbildung dargestellten Glykolipide [Abbildung 26].

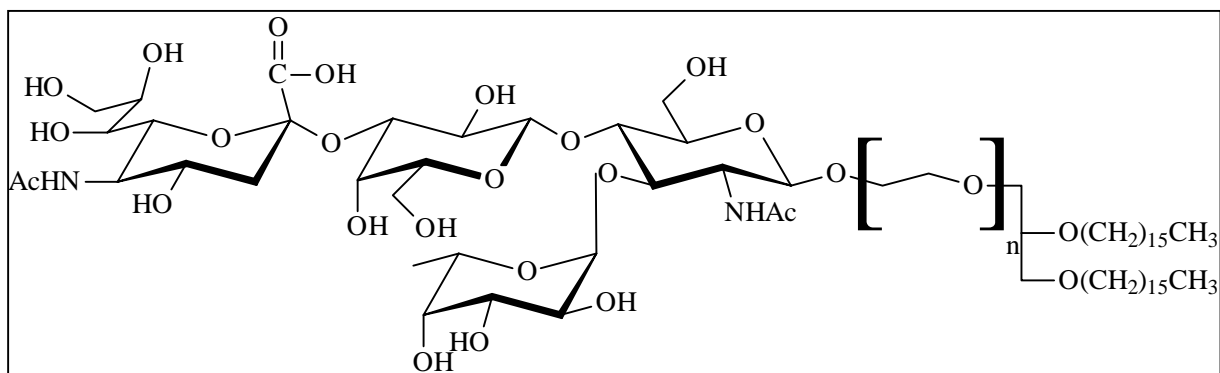


Abbildung 26 Glykolipidstrukturen mit  $n=0$ :  $sLe^x-L0$ ,  $n=3$ :  $sLe^x-L3$ ,  $n=6$ :  $sLe^x-L6$ ,  
 $n=9$ :  $sLe^x-L9$ .

Die letzte Zahl im Namen der Verbindungen gibt jeweils die Anzahl der Ethoxyeinheiten zwischen  $sLe^x$  und einem Dialkylglycerol als Lipidanker an. Obwohl die Länge einzelner Ethoxyeinheiten bekannt ist, läßt sich die Gesamtlänge eines Ethoxyspacers in wäßriger Umgebung nicht errechnen, da der hydrophile Molekülteil nicht unbedingt langgestreckt vorliegt, sondern auch eine verknäulte Struktur annehmen kann. Der Einfluß der Spacerlänge wird demnach vordergründig nicht auf die lineare Ausdehnung sondern auf die Beweglichkeit der Moleküle zurückzuführen sein.

Die vier unterschiedlichen Strukturen wurden in Zellrollexperimenten untersucht und mit den Ergebnissen der  $sLe^x$ -Cer Versuche verglichen. Die Glykolipide wurden wiederum zu unterschiedlichen Konzentrationen mit DSPC in einem Monolayer gemischt, wobei fluoreszenzmikroskopisch bei 1-10% analoge Entmischungserscheinungen zum  $sLe^x$ -Cer zu beobachten waren. Das Zellrollverhalten wurde bei einem Schergrad von  $200\text{ s}^{-1}$  analysiert und ist im nachstehenden Diagramm im Vergleich zu  $sLe^x$ -Cer zusammengefaßt [Abbildung 27].

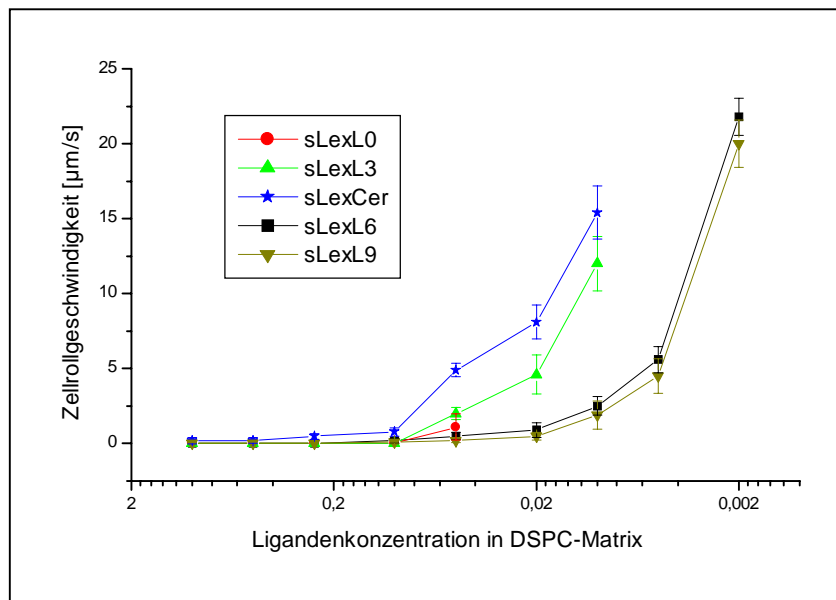


Abbildung 27 Abhängigkeit der Rollgeschwindigkeit von der Ligandenflexibilität.

Bei Glykolipidkonzentrationen von 1 bis 0,1% ist in jedem Falle nur eine feste Adhäsion zu verzeichnen. Reduziert man die Ligandenzumischung weiter, so sind die Glykolipide teilweise in der Lage, ein Zellrollen zu vermitteln. Im Falle des sLe<sup>x</sup>-L0 reißen bei einer Konzentration von 0,05% fast alle Zellen ab, nur sehr wenige bewegen sich sehr langsam und kurzzeitig über die Modellmembran, bei weiterer Reduzierung bleibt jede Wechselwirkung aus. Das sLe<sup>x</sup>-L0 wird zwar bei hohen Konzentrationen von den Zellen erkannt, was zur festen Adhäsion führt, durch das Fehlen eines Spacers und die daraus resultierende Starre ist dieses Molekül nicht zur Vermittlung eines Zellrollens befähigt. Daraus geht hervor, daß ein Mindestmaß an Flexibilität der Selektinliganden für ein Zellrollen notwendig ist.

Die Resultate des sLe<sup>x</sup>-L3 zeigen große Nähe zu den sLe<sup>x</sup>-Cer Werten. Der Abstand der Kopfgruppe von der Membranoberfläche ist bei beiden Molekülen sehr ähnlich, da die Länge eines Laktosemoleküls mit drei Ethoxyeinheiten vergleichbar und ein Abknicken noch nicht zu erwarten ist. Das langsamere Rollen bei gleichen Konzentrationen ist demnach offensichtlich auf die größere Bindungseffizienz des flexibleren sLe<sup>x</sup>-L3 zurückzuführen.

Noch geringere Unterschiede im Rollverhalten sind bei der Gegenüberstellung von sLe<sup>x</sup>-L6 und sLe<sup>x</sup>-L9 zu finden. Im Vergleich zu sLe<sup>x</sup>-L3 sind diese längsten Liganden noch effizienter, was nicht nur in einer niedrigeren Rollgeschwindigkeit bei gleicher Konzentration

zum Ausdruck kommt. Zusätzlich sind sie in der Lage, das Zellrollen bis zu einer Konzentration von 0,0025% zu vermitteln. Da man bei einer rollenden Zelle eine Kontaktfläche von ca. 10% des Zelldurchmessers annimmt, steht die Zelle bei diesen niedrigen Konzentrationen rein rechnerisch nur noch mit ca. 50 Glykolipidmolekülen in Kontakt.

Die Ergebnisse dieser Versuche lassen die Schlußfolgerung zu, daß eine Vergrößerung der Ligandenflexibilität eine Erhöhung der Bindungseffizienz zur Folge hat. Das äußert sich in niedrigeren Rollgeschwindigkeiten und niedrigeren minimalen Ligandenkonzentrationen. Der Konzentrationsbereich, in dem ein Zellrollen stattfindet, bleibt jedoch mit ca. dem zehnfachen der Minimalkonzentration unbeeinflusst. Eine weitere Verlängerung der Spacer über neun Ethoxyeinheiten läßt keine weitere Effizienzerhöhung erwarten, da bereits bei sLe<sup>x</sup>-L6 ein Optimum erreicht zu sein scheint. Analog zur großen Beweglichkeit der langgestreckten natürlichen Selektinliganden beeinflusst eine hohe Flexibilität der Glykolipide das Rollverhalten positiv. Damit ist eine funktionelle Annäherung langgestreckter Glykolipide an die Eigenschaften der Mucine gegeben. Diese Ergebnisse wurden 1998 zusammengefaßt und veröffentlicht [142].

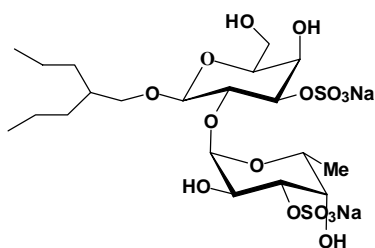
#### 4.3. Inhibierung des Zellrollens

Das selektininduzierte Zellrollen stellt den initialen Schritt in der Adhäsionskaskade der Leukozyten sowohl bei akuten als auch chronischen Entzündungserscheinungen dar. Eine Blockierung der Selektinbindungen unterbricht die gesamte Kaskade und verhindert letztendlich die Leukozytenmigration in das Gewebe. Aus diesem Grund stellt die Inhibierung von Selektinen einen neuartigen pharmakologischen Ansatzpunkt für eine antiinflammatorische Therapie dar. Seit Bekanntwerden dieser Bedeutung der Selektine wird von einer Vielzahl von Arbeitsgruppen ausgehend vom sLe<sup>x</sup> als Standardligand nach potentiellen Selektininhibitoren gesucht.

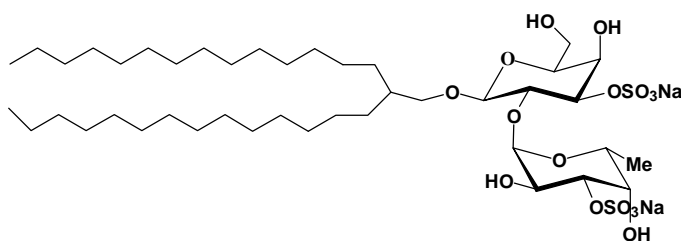
Diese Substanzen sind meist glykosidischer Struktur und wurden in statischen Zellbindungsassays auf ihre Wirksamkeit hin untersucht. Aufgrund der Sonderstellung der Selektinbindung hinsichtlich ihrer Bindungskinetik und dem daraus resultierenden Adhäsionsverhalten der Zellen in einer Rollbewegung sollte die Untersuchung der Selektininhibitoren in einem dynamischen Assay jedoch aussagekräftiger sein als unter statischen Bedingungen.

Aufbauend auf unseren bisherigen Untersuchungen zum selektinabhängigen Zellrollen untersuchten wir potentielle antiinflammatorische Substanzen auf ihre selektininhibitorische Effizienz unter dynamischen Bedingungen. Die japanische Arbeitsgruppe um Ikami stellte uns

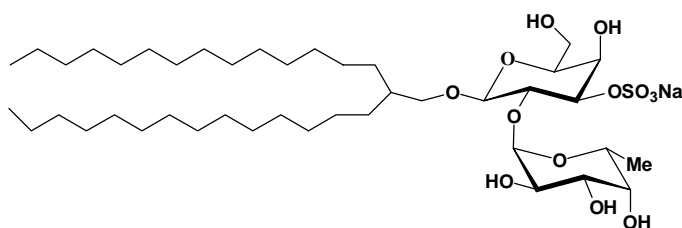
eine große Anzahl potentieller Inhibitoren für eine Untersuchung unter dynamischen Bedingungen zur Verfügung. Diese Verbindungen sind ausgehend vom sLe<sup>x</sup> stark strukturvereinfacht. Es handelt sich dabei um sulfatierte und phosphorylierte Laktose-, Galaktose- und Fucose-Galaktose-Derivate mit zusätzlichen unterschiedlich stark lipophilen Molekülanteilen [143, 144, 145] [Abbildung 28].



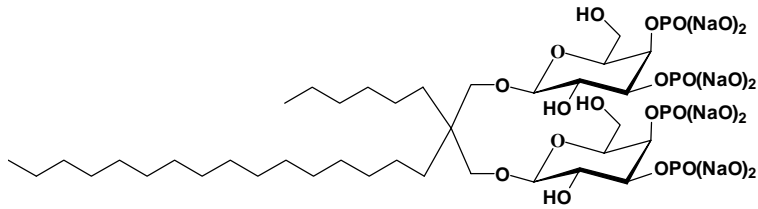
1. Dinatrium [2-(Propyl)pentyl-O-( $\alpha$ -L-fucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-galaktopyranosyl)-3O,3O'-disulfonat]



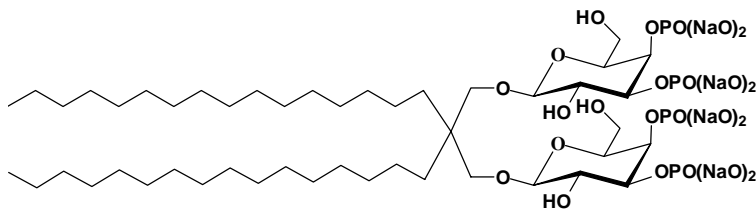
2. Dinatrium [2-(Tetradecyl)hexadecyl-O-( $\alpha$ -L-fucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-galaktopyranosyl)-3O,3O'-disulfonat]



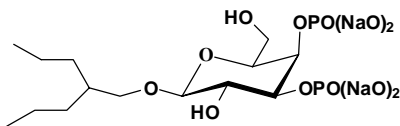
3. Natrium [2-(Tetradecyl)hexadecyl-O-( $\alpha$ -L-Fucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-galaktopyranosyl)-3O-sulfonat]



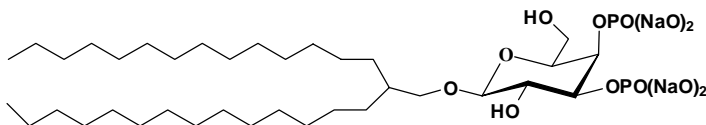
4. Octanatrium [2-Hexadecyl-2-hexyl-propan-1,3-O,O'-bis-(β-D-galaktopyranosyl)-3O,4O,3'O,4'O-tetraphosphonat]



5. Octanatrium [2,2-Dihexadecyl-propan-1,3-O,O'-bis-(β-D-galaktopyranosyl)-3O,4O,3'O,4'O-tetraphosphonat]



6. Tetranatrium [2-(Propyl)pentyl-β-D-galaktopyranosyl-3O,4O-diphosphonat]



7. Tetranatrium [2-(Tetradecyl)hexadecyl-β-D-galaktopyranosyl-3O,4O-diphosphonat]

Abbildung 28 Strukturen der potentiell antiinflammatorischen Verbindungen.

Grundsätzlich wurde versucht, durch Modifikationen am Ligandenmolekül zu synthetisch leicht zugänglichen Verbindungen zu gelangen, die die Bindungsaffinität von  $sLe^x$

zu Selektinen übertreffen. Nachdem entdeckt wurde, daß ein Desoxyderivat des sLe<sup>x</sup> eine wesentlich höhere Bindungsaffinität besitzt [146], wurden von Ikami et al. verschiedene hydrophobe Reste zur Bindungsverstärkung eingebaut. Zusätzlich sollten negative Ladungen oder bestimmte Sulfatierungsmuster den Substanzen positive Effekte auf eine inhibitorische Potenz verleihen.

In einem statischen Bindungsassay wurden diese Verbindungen auf ihre blockierende Wirkung bei der Bindung von HL-60 Zellen auf immobilisiertem Selektin-IgG-Fusionsprotein untersucht [Tabelle 3].

Substanz	Triviale Beschreibung	% Hemmung des P-Selektins	% Hemmung des L-Selektins	% Hemmung des E-Selektins
sLe <sup>x</sup>	Standard	3±6	0±5	0±4
1	kurzkett.disulfat. Fukose-Galaktose	16	33	2
2	langkett.disulfat. Fukose-Galaktose	76	69	8
3	langk.monosulf. Fukose-Galaktose	100	100	0
4	gemischkett. dimere diphosph.Galaktose	0	0	5
5	langkett.dimere diphosph. Galaktose	0	0	11
6	kurzkett.diphos. Galaktose	13	0	20
7	langkett.diphos. Galaktose	24	0	20

Tabelle 3 Inhibierungswerte der verwendeten Glykolipide im statischen Bindungsassay nach Ikami.

Diese Hemmwerte wurden bei einer Konzentration von 0,3 mM mit dem Standard sLe<sup>x</sup> verglichen. Die Anzahl und Art der Ladungen zeigen keinen Zusammenhang, hingegen besitzen die langkettigen Derivate eine deutliche Bindungsverbesserung.

Um diese Substanzen in unserer Durchflußkammer untersuchen zu können, mußte der Versuchsaufbau verändert werden, da durch die oberflächenaktiven Eigenschaften der Inhibitoren der Monolayer vom Glasträger abgelöst wurde. Im Vordergrund stand also eine vollständige Umgestaltung der Modellmembran, in dem jetzt aus Blutplättchen isoliertes P-Selektin [147] kovalent an den Glasträger gebunden wurde. Dazu wurde über das trivalente Cyanurchlorid als Kopplungsreagens das Protein in einer Self-Assembling-Technik zu einer homogenen Membran fixiert [Abbildung 29].



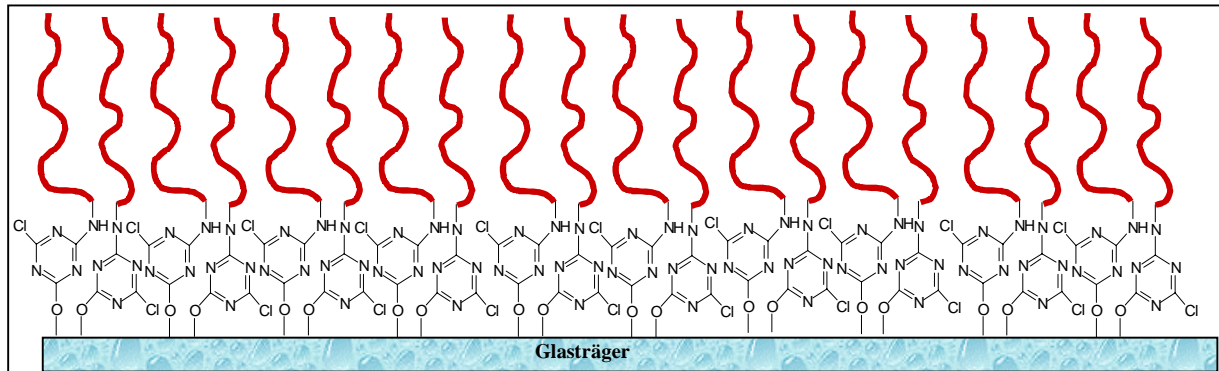


Abbildung 29 Nach Self-Assembling über Cyanurchlorid kovalent fixiertes P-Selektin (rot).

Cyanurchlorid reagiert in einem ersten Arbeitsgang mit den OH-Gruppen der Glasoberfläche. Nach Entfernen des überschüssigen Kopplungsreagens erfolgte die Umsetzung einer Aminogruppe des Selektins mit der zweiten Valenz des bereits fixierten Cyanurchlorid bei pH=8,8. Als Blindprobe dienten mit Albumin gekoppelte Träger.

Als Rollzellen wurden die ebenfalls von Ikami benutzten PSGL-1-tragenden HL-60 Zellen benutzt. Durch Interaktionen von P-Selektin mit seinem natürlichen Liganden PSGL-1 ist dieser Versuchsaufbau nicht mehr so abstrakt wie unter Verwendung der sLe<sup>x</sup>-Glykolipide.

Auf den P-Selektin-beschichteten Oberflächen kommt es im Scherstrom zu einer festen Adhäsion der HL-60 Zellen. Durch schrittweises Zumischen von Albumin zum P-Selektin vor der Kopplungsreaktion konnte schließlich eine Schicht mit 50% Selektin erhalten werden, über die die PSGL-1-tragenden HL-60 Zellen rollen.

Vor den Rollexperimenten wurden  $10^5$  Zellen zusammen mit 30 nmol der jeweiligen Inhibitorsubstanz gemischt und mit einer speziellen Einspritztechnik direkt und unverdünnt in die Durchflußkammer injiziert. Auf der Glasplatte befand sich ca. 0,1 nmol Selektin, daraus ergibt sich ein ca. 300facher Überschuß des Inhibitors. Während der folgenden Inkubation steht den Inhibitormolekülen und den PSGL-1-Oberflächenstrukturen die gleiche Zeit von 2 min zur Verfügung, in der sie um die immobilisierten Selektinmoleküle auf dem Glasträger konkurrieren. Beim folgenden Strömungsprozeß mit einem Schergrad von  $200 \text{ s}^{-1}$  wurde in Analogie zu den Rollexperimenten die Anzahl der adhärierenden Zellen und die Zellrollgeschwindigkeit ausgewertet und gegenübergestellt [Abbildung 30].

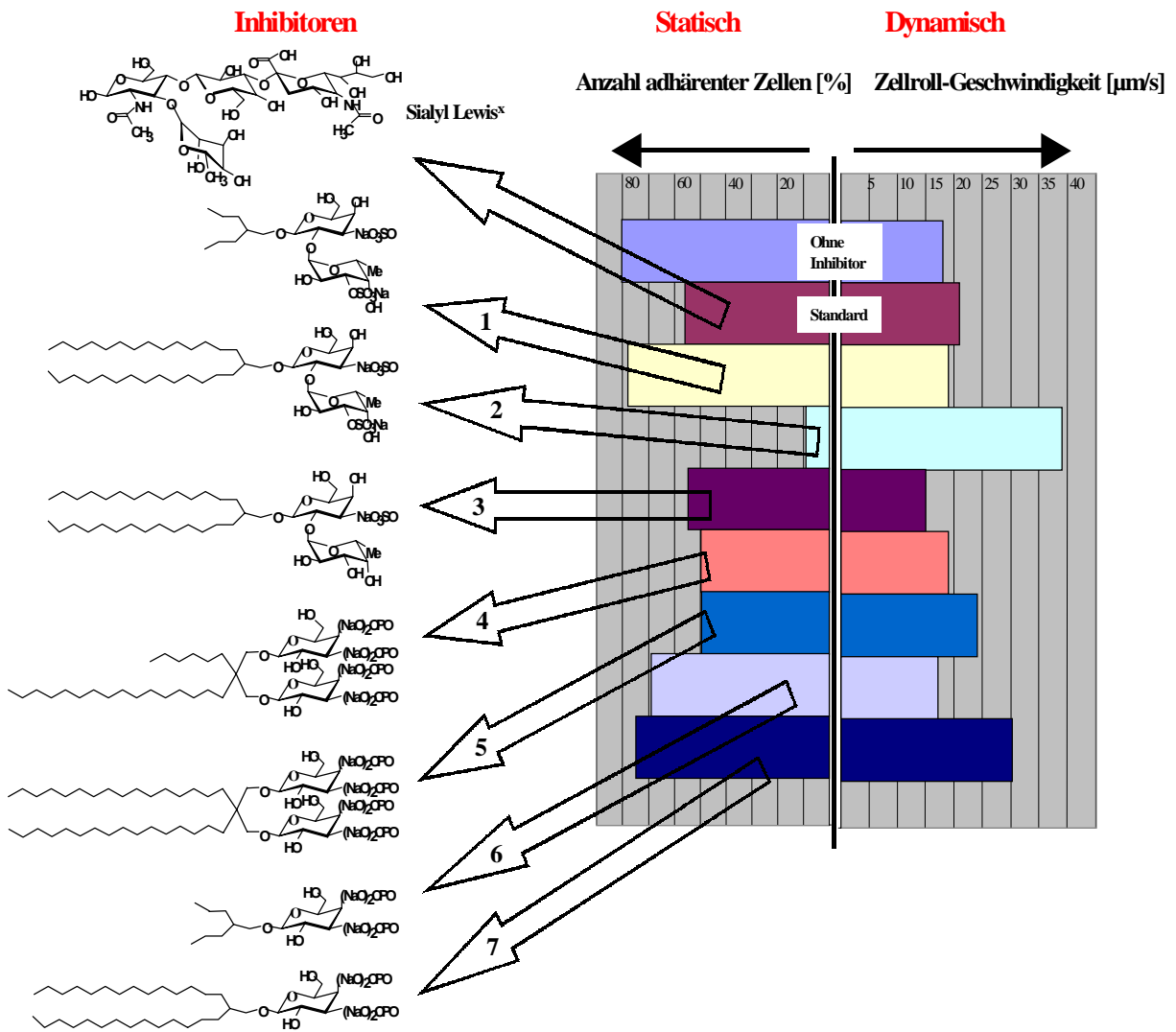


Abbildung 30 Einfluß selektininhibitorischer Substanzen auf das statische und dynamische Bindungsverhalten von HL-60 Zellen an einer P-Selektinmembran.

In dieser Darstellung sind inhibitorische Effekte auf das statische und dynamische Bindungsverhalten der HL-60 Zellen gegenübergestellt. Als Standardinhibitor wurde lösliches sLe<sup>x</sup> verwendet.

Der prozentuale Anteil der adhärirten Zellen auf der Selektinschicht ist auf der linken Hälfte des Diagramms abgebildet. Ist eine geringere Anzahl adhärirender Zellen festgestellt, so wird von einer höheren inhibitorischen Potenz der gelösten Substanz ausgegangen. Diese Werte sind einem statischen Assay zuzuordnen und sollten mit den Untersuchungen von Ikami vergleichbar sein. Die Abweichungen der Ergebnisse, besonders bei Substanz 2, ist offensichtlich auf die für Selektinbindungen funktionellen Versuchsbedingungen in der Durchflußkammer zurückzuführen. Durch die physiologischen Flußbedingungen in der Modellapparatur wirkt sich ein inhibitorischer Effekt der  $sLe^x$ -Analoge während des Zellrollvorganges auf die dynamischen Selektinbindungen aus. Im klassischen Zellbindungsassay werden die Zellen jedoch unter statischen Bedingungen mit einem Substrat inkubiert und danach mit einem unphysiologischen Schergrad abgespült. Die unterschiedlichen Ergebnisse bei diesen Modellanordnungen verdeutlichen die Bedeutung der natürlichen Fließbedingungen des Blutes bei der Untersuchung von Selektinwechselwirkungen. Da die löslichen Substanzen unter Flußbedingungen auch gewissen Scherkräften ausgesetzt sind, unterscheidet sich offensichtlich deren dynamisches Bindungsverhalten ebenfalls von der Kinetik und Affinität in einem statischen Versuchsaufbau. Das erklärt die Unterschiede zu Ikamis Untersuchungen und unterstreicht den Vorteil einer Durchflußkammer.

Betrachtet man neben den fest adhärirten Zellen zusätzlich den Einfluß der  $sLe^x$ -Konkurrenten auf den Zellrollvorgang, so sollten sich die inhibitorischen Effizienzen noch deutlicher differenzieren lassen. Deshalb sind auf der rechten Seite der Darstellung den statischen Werten die Zellrollgeschwindigkeiten zugeordnet. Eine höhere Bindungsaffinität des Inhibitors zum Selektin sollte sich hierbei in einer erhöhten Rollgeschwindigkeit wiederfinden. Bei den meisten Substanzen sind innerhalb der Experimente Übereinstimmungen zu finden. Den stärksten inhibitorischen Effekt gegenüber  $sLe^x$  zeigt Substanz 2 unter beiden Auswertungsvarianten. Das Rollverhalten wird von dieser Substanz derart moduliert, daß die Zellen eine außerordentlich hohe Geschwindigkeit von ca.  $40 \mu\text{m/s}$  erreichen. Das läßt darauf schließen, daß im Gegensatz zu Substanz 1 der langkettige Molekülteil zu einer wesentlichen Affinitätssteigerung zum P-Selektin führt.

Aber auch die höhere Anzahl der Sulfatgruppen der Substanz 2 hat einen bindungsverstärkenden Einfluß im Vergleich zu Substanz 3. Dieser läßt sich damit erklären, daß Selektinbindungen hauptsächlich über Wasserstoffbrücken an Kohlenhydratstrukturen stattfinden, die zwar von einer schnellen Kinetik, aber auch von einer sehr kurzen Reichweite und ständiger Konkurrenz zu Wassermolekülen geprägt sind. Erhöht sich der weitreichende elektrostatische Bindungsanteil bei der Ausbildung eines Bindungskomplexes unter

dynamischen Bedingungen, sollte sich dies positiv auf die inhibitorische Effizienz der Substanzen, besonders im Rollverhalten der Zellen äußern. Dieser Effekt muß nicht zwangsweise in einer höheren Affinität des Liganden resultieren und im statischen Assay wiedergefunden werden.

Zwischen den Effizienzen der Substanzen 4 und 5 ist durch alleiniges Auszählen der haftenden Zellen keine Differenzierung möglich. Erst beim Betrachten der Rollgeschwindigkeit wird die größere inhibitorische Potenz von Substanz 5 deutlich. Dies kann wiederum auf den größeren lipophilen Molekülteil zurückgeführt werden.

Lediglich die Rollgeschwindigkeit der Substanz 7 zeigt keine Korrelation zur Anzahl der adhärenierten Zellen. Die Betrachtung der Rollgeschwindigkeiten als Maß inhibitorischer Potenz scheint allerdings durch die größere Lipophilie gegenüber Substanz 6 realistischer.

Diese Ergebnisse beweisen einheitlich, daß sich ein hydrophober Substituent am Inhibitormolekül positiv auf seine inhibitorische Potenz auswirkt. 1997 konnten mittels Molecular Modeling zwei hydrophobe Bereiche an der Lektindomäne des E-Selektins nachgewiesen werden, die bei der Existenz von lipophilen Resten an den Liganden bindungsverstärkend wirken können [148].

Die Auswertung dieser Versuche macht die generelle Eignung unseres Modellsystems für die Suche nach potentiellen Selektininhibitoren deutlich. Trotz des großen Aufwandes der einzelnen Versuche stehen aber zwei Möglichkeiten der Auswertung zur Verfügung. Das läßt eine noch feinere Differenzierung der inhibitorischen Effekte zu. Zudem werden in der Durchflußkammer die physiologischen Bedingungen simuliert, unter denen die Selektine natürlicherweise agieren. Die Betrachtungen der dynamischen Werte sollte daher zuverlässiger und aussagekräftiger sein.