

Dynamisches Testsystem zur Untersuchung der Bindungseigenschaften im Selektin-vermittelten Zellrollprozess und zum Screening potentieller Wirkstoffe

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau Gabriele Schumacher
geb. am: 26.06.1973 in Hannover

Gutachter:

1. Prof. Dr. rer. nat. Bendas
2. Prof. Dr. rer. nat. Nuhn
3. Prof. Dr. med. Tauber

Halle (Saale), 04.07.2003

urn:nbn:de:gbv:3-000005308

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000005308>]

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
2	Theoretischer Teil	6
2.1	Die Adhäsionskaskade der Leukozyten im Prozess der Entzündung	6
2.2	Selektine	8
2.2.1	Struktur und Expression	8
2.2.2	Liganden	10
2.3	Physiologische Funktion im Rollprozess	14
2.4	Rheologische, zelluläre und molekulare Betrachtung des Rollprozesses	15
2.4.1	Strömungsbedingungen in Blutgefäßen	16
2.4.2	Funktionelle Eigenschaften der Selektine im Rollprozess	17
2.5	Die Bedeutung der Selektine bei der Hämatopoese	21
2.6	Pathologie der Selektine	24
2.6.1	Pathologie der Entzündung	24
2.6.2	Beteiligung der Selektine an der Angiogenese	28
2.6.3	Beteiligung der Selektine an der Metastasierung	30
2.7	Kompetitive Selektin-Inhibitoren als potentielle Wirkstoffe	40
2.8	Ziel der vorliegenden Arbeit	45
3	Materialien und Methoden	46
3.1	Modellmembranen	46
3.1.1	Präparation der Deckgläschen	46
3.1.2	Lipidmembranen	46
3.1.2.1	Matrixlipide	46
3.1.2.2	Glykolipide	47
3.1.2.3	Langmuir-Blodgett-Technik	47
3.1.3	Selektin-haltige Schichten	47
3.1.3.1	P-Selektin	47
3.1.3.2	L-Selektin	48
3.2	Zellkultivierung	48
3.3	Statische Zelladhäsionsexperimente	49
3.4	Potentielle Roll-Inhibitoren	50
3.4.1	sLe ^x -Mimetika	50
3.4.2	Heparinoide Verbindungen	50
3.4.3	Oligosaccharide, Proteine und Lipide aus humaner Milch	50
3.5	Zellrollexperimente	50
3.5.1	Aufbau der Durchflussapparatur	50
3.5.2	Durchführung der Rollexperimente	51
3.5.3	Laser-Scanning-Mikroskopie	52
3.5.4	Aufzeichnung mit CMOS-Kamera	52
3.5.5	Auswertung	53
4	Ergebnisse und Diskussion	56
4.1	Ligandenpräsentation	56
4.1.1	Visualisierung der Ligandenverteilung	56
4.1.2	Einfluss der Ligandenmolekülstruktur und –flexibilität	60
4.1.3	Versuch der Clusterung durch Dimerisierung der sLe ^x -Liganden	66

4.1.4	Self-Assembling der Ligandencluster durch partielle Fluorierung der Alkylketten.....	67
4.2	Inhibitionsuntersuchungen.....	72
4.2.1	Charakterisierung des Screening-Systems.....	72
4.2.2	sLe ^x -Mimetika.....	75
4.2.3	Sulfatierte Polysaccharide.....	78
4.2.4	Oligosaccharide aus humaner Milch.....	84
4.3	Adhäsion von humanen Krebszellen an Selektine.....	93
5	Zusammenfassung.....	96
6	Literaturverzeichnis	99

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AS	Aminosäure
AFM	Atomic Force Microscopy
BSA	Bovine Serum Albumin
CHO(-Zellen)	Chinesische Hamster Ovarial(-Zellen)
CMOS	Complementary Metal-Oxide Semiconductor
DHPE	1,2-Dihexadecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin
DMPC	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DS	Sulfatierungsgrad
DSPC	1,2 Distearoyl- <i>sn</i> -glycero-phosphocholin
dyn	Einheit für Kraft (1 dyne = 10^{-5} N)
E-CHO(-Zellen)	E-Selektin-exprimierende Chinesische Hamster Ovarial(-Zellen)
EGF	Epidermal growth factor
ESL-1	E-selectin-ligand-1
fps	frames per second
GalNAc	2-N-Acetyl-Galaktose
GlcNAc	2-N-Acetyl-Glukose
GlyCAM-1	Glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
Fab	F(ab') ₂ Fragment aus der Ziege (Fab), gerichtet gegen humanes IgG-Fc
FKS	fötales Kälberserum
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HepG2(-Zellen)	humane aus der Leber isolierte Karzinomzelllinie
HEV	High endothelial venules
HL-60	humane, promyeloide PSGL-1-exprimierende Zelllinie
HT-29	humane aus dem Kolon isolierte Karzinomzelllinie
HS	hämorrhagischer Schock
HSVZ	hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
HVZ	hämatopoetische Vorläuferzellen
ICAM	Intercellular adhesion molecules
Ig/IgG	Immunglobulin/ImmunglobulinG
IL	Interleukin
KG1a(-Zellen)	humane, promyeloide PSGL-1-exprimierende Zelllinie
KM	Knochenmark
k _{off}	Dissoziationskonstante
k _{on}	Assoziationskonstante
LacFl88	Glykolipid/1 Laktoseeinheit mit partiell fluoriertem Lipidanker
Le/Le ^x	Lewis/Lewis ^x
LFA-1	Lymphocyte function associated antigen-1
LL(-Zellen)	humane aus Lungengewebe isolierte Karzinomzelllinie
LPS	Lipopolysaccharid
L-Sel-Fc	rekombinante, humane L-Selektin/Fc-Chimäre
Mac-1	β2-Integrin
MadCAM	Mucosal addressin cell adhesion molecule
mAK	monoklonaler Antikörper
MW	Molekulargewicht

N/pN	Einheit für Kraft: Newton/Piko-Newton
NBD	7-Nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl
NFκB	Nuclear factor kappa B
NK-Zellen	Natural-killer-Zellen
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PBS	Phosphate buffered saline/ Phosphatpuffer
PECAM-1	Platelet endothelial cell adhesion molecule-1
PMN	polymorphkernige Neutrophile
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-phosphocholin
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1
rPSGL-1	rekombinante Form von PSGL-1
rPSGL-1-Ig	rekombinante, trunkierte Form von PSGL-1 (extrazelluläre Domäne), fusioniert mit IgG
P-Sel-Fc	rekombinante humane P-Selektin/Fc-Chimäre
SCR	short consensus repeat
sLe ^a	Sialyl Lewis ^a
sLe ^x	Sialyl Lewis ^x
sLex0	Sialyl Lewis ^x -Lipid/0 Ethoxyeinheiten
sLexEO3	Sialyl Lewis ^x -Lipid/3 Ethoxyeinheiten
sLexEO6	Sialyl Lewis ^x -Lipid/6 Ethoxyeinheiten
sLexEO9	Sialyl Lewis ^x -Lipid/9 Ethoxyeinheiten
sLe ^x -Cer	Sialyl Lewis ^x -Lipid mit Laktospacer und Ceramidanker
sLe ^x -NBDCer	sLe ^x -Cer mit NBD-markiertem Lipidanker
sLexLacCer	s. sLe ^x -Cer
sLexLac1	Sialyl Lewis ^x -Lipid/1 Laktoseeinheit
sLexLac2	Sialyl Lewis ^x -Lipid/2 Laktoseeinheiten
sLexLac3	Sialyl Lewis ^x -Lipid/3 Laktoseeinheiten
sLexFl88	Sialyl Lewis ^x -Lipid/1 Laktoseeinheit mit partiell fluoriertem Lipidanker
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
U937(-Zellen)	humane, myeloide PSGL-1-exprimierende Zelllinie
VLA-4	α4-Integrin
VCAM-1	Vascular adhesion molecule-1

1 Einleitung

Selektine bilden eine Familie von drei Kohlenhydrat-bindenden Adhäsionsmolekülen, die bei verschiedenen körpereigenen Prozessen, wie akuten und chronischen Entzündungen, dem „Homing“ von Lymphozyten ins lymphatische System, sowie Migrationsvorgängen im Zusammenhang der Hämatopoese, zur Adhäsion der myeloiden Zellen an das vaskuläre Endothel beitragen. Im Zuge einer Entzündungsreaktion sind die Akkumulation von Leukozyten auf dem Endothel am Entzündungsort und ihre nachfolgende Migration aus dem Gefäßsystem in das lokale Gewebe entscheidende Vorgänge für die Immunabwehr des Körpers. Die Selektine lösen dabei eine Kaskade von Adhäsionsereignissen aus, indem sie die fließenden Leukozyten aus dem kapillaren Blutstrom „abfangen“ und über eine rollende Verlangsamung entlang des Endothels lokal anreichern. Daran anschließend können andere Adhäsionsmoleküle die feste Adhäsion und den Austritt aus dem Gefäßsystem vermitteln.

Seit ihrer Entdeckung 1990 sind die Selektine Gegenstand intensiver Forschung. Ihre Schlüsselstellung in der zellulären Immunabwehr und die weitgehend örtliche und zeitliche Begrenzung ihrer Expression auf entzündetes Gewebe machen sie zu äußerst attraktiven Zielstrukturen für pharmazeutische Anwendungen, da sich daraus die Möglichkeit einer spezifischen und kausalen Einflussnahme auf pathologische Entzündungserscheinungen, wie rheumatoide Arthritis, zu einem frühen Zeitpunkt im Krankheitsverlauf ableiten lässt. Eine gezielte Blockade der Selektinfunktion erscheint daher eine aussichtsreiche Strategie für sowohl die systematische Therapie pathologischer Entzündungen als auch anderer Krankheiten mit Selektinbeteiligung (z. B. Tumormetastasierung).

Für eine pharmazeutisch relevante Beeinflussung der Selektinfunktion bzw. des Rollprozesses müssen die molekularen Bindungseigenschaften charakterisiert werden. Obwohl bisher viele Informationen über die molekularen Bindungsanforderungen gewonnen werden konnten, sind die Struktur-Wirkungs-Beziehungen der natürlichen Selektin-Liganden noch nicht vollständig verstanden. Aufgrund der Komplexität der an der Leukozytenadhäsion beteiligten Bindungsereignisse muss für die Aufklärung der molekularen Grundlagen der Selektin-Bindung ein vereinfachendes, abstrahierendes Modell verwendet werden, welches auf die Selektin-Wechselwirkungen fokussiert. Ein solches dynamisches Testsystem war in unserer Arbeitsgruppe etabliert worden [1]. Es berücksichtigt auch die für die Selektin-Funktionalität essentiellen Flussbedingungen.

In der vorliegenden Arbeit werden die strukturellen Voraussetzungen für die Ligandenfunktionalität mit Hinsicht auf die Präsentation der Bindungs epitope untersucht. Dabei werden Aspekte wie Beweglichkeit und Clusterbildung bzw. Multivalenz berücksichtigt. Aufbauend auf diesen molekularmechanistischen Untersuchungen wird das Anwendungsgebiet der Durchflusskammer auf die Testung verschiedener Substanzgruppen mit potentiell Selektin-inhibierenden Eigenschaften ausgedehnt. Durch die Verwendung von Krebszellen kann zusätzlich die Inhibierungspotenz der untersuchten Substanzen auf die Wechselwirkung zwischen Krebszellen und Selektinen analysiert werden.

2 Theoretischer Teil

Im theoretischen Teil der Arbeit werden die Adhäsionskaskade der Leukozyten im Prozess der Entzündung (2.1), die Selektine (2.2), ihre physiologische Funktion im Rollprozess (2.3), der Rollprozess in rheologischer, zellulärer und molekularer Hinsicht (2.4), die Bedeutung der Selektine für die Hämatopoese (2.5), die Pathologie der Selektine (2.6), kompetitive Selektin-Inhibitoren (2.7) sowie das Ziel der vorliegenden Arbeit (2.8) erläutert.

2.1 Die Adhäsionskaskade der Leukozyten im Prozess der Entzündung

Eine Entzündung ist die Abwehrreaktion des Organismus und seiner Gewebe gegen verschiedenartige, schädigende Reize. Als Folge einer Gewebsschädigung kommt es dabei zur Freisetzung von Mediatorstoffen (Histamin, Prostaglandine etc.). Diese verursachen die Erweiterung von Blutgefäßen (Vasodilatation) und damit eine Verlangsamung des Blutstromes in den betroffenen Gebieten, den Austritt von Blutplasma (Exsudation) infolge einer Erhöhung der Kapillarpermeabilität und die Erregung von Schmerzrezeptoren. Die geregelte Wanderung von Leukozyten aus dem vaskulären System in Geweberegionen, die Pathogenen ausgesetzt sind, ist einer der wichtigsten Vorgänge der (zellulären) Immunabwehr. Phagozytosefähige Leukozyten (neutrophile Granulozyten) werden chemotaktisch zum Ort der Entzündung gelockt und fallen aus dem Blutstrom in das betroffene Gewebe ein. Dies geschieht hauptsächlich in den kleinsten venösen Gefäßen, den postkapillaren Venolen. Voraussetzung für die Extravasation ist die Rezeptor-vermittelte Adhäsion an der Gefäßwand, die wegen ihrer ineinandergreifenden unterschiedlichen Bindungsschritte als Adhäsionskaskade bezeichnet wird [2]. Dieser vielstufige Prozess führt vom Rollen entlang der Gefäßwand über die feste Adhäsion zur Emigration der Leukozyten in subendotheliales Gewebe (Abb. 1).

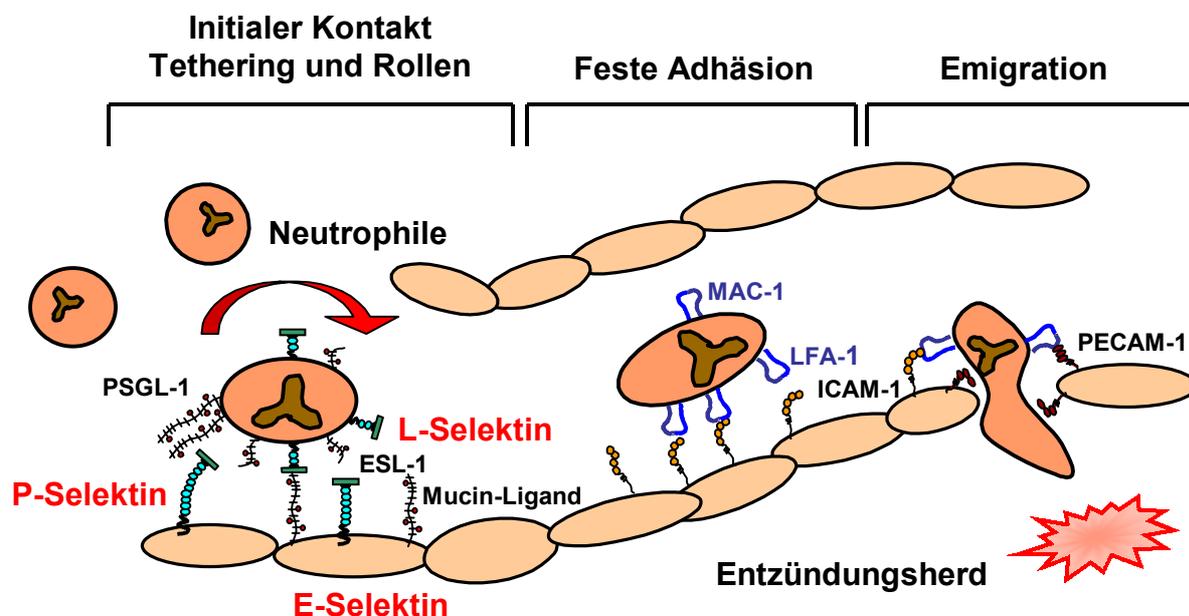


Abb.1: Schematische Darstellung der Adhäsionskaskade der Leukozyten unter Entzündungsbedingungen

Schon vor über 100 Jahren konnte mit intravitraler Mikroskopie beobachtet werden, dass Leukozyten bei Verletzung anliegenden Gewebes entlang der Gefäßwand rollen [3]. Freigesetzte Zytokine (z.B. IL-1 oder TNF- α) bewirken die Ausbildung von spezifischen Adhäsionsrezeptoren auf den Endothelzellen. Daraufhin können transiente Kontakte zwischen den mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von 2 mm/s strömenden Leukozyten und dem Endothel als erster Teilprozess der Adhäsionskaskade stattfinden. Diese initialen Bindungsereignisse, die noch durch Phasen freier Strömung der Zellen unterbrochen sind, werden als „Tethering“ bezeichnet. Darauf aufbauend erhöht sich die Anzahl schnell assoziierender und dissoziierender Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen, was im Scherstrom des Blutes zu einer rollenden Bewegung entlang des Gefäßendothels und zu einer Verlangsamung der Leukozyten auf ca. 20 μ m/s führt. Die Selektine (Kohlenhydrat-bindende Membranproteine) sind die molekulare Grundlage für die Unterstützung des Tethering und der Rollbewegung. Entsprechend ihres Vorkommens werden sie L-(Leukozyten), E-(Endothel) und P-(Plättchen und Endothel)Selektin genannt. Die Verlangsamung durch Tethering und Rollen führt zu einer lokalen Konzentrierung der Leukozyten an der Gefäßwand und erlaubt die Übermittlung von sezernierten Mediatoren aus dem Endothel (hauptsächlich Chemokine), wodurch die Exprimierung und Aviditätserhöhung von leukozytären Rezeptoren der Integrinfamilie ausgelöst wird [4]. Indem die Integrine an ihre korrespondierenden Liganden aus der Immunglobulin(Ig)-Superfamilie auf dem Endothel binden, führen sie zur festen Adhäsion der Leukozyten auf dem Endothel und vermitteln deren Emigration durch interzelluläre Zwischenräume in das entzündete Gewebe [5].

Integrine sind langgestreckte, heterodimere Adhäsionsrezeptoren, die aus einer α - und einer β -Untereinheit aufgebaut sind. Sie binden neben den Proteinen der Ig-Superfamilie auf der Endotheloberfläche auch eine Vielzahl von extrazellulären Matrixliganden, wie Fibronectin oder Laminin. Ihre Affinität wird über schnelle Konformationsänderungen gesteuert. Für aktivierte Leukozyten sind β 2-Integrine (CD11/CD18-Komplexe) spezifisch. LFA-1 (CD11a/CD18, Lymphocyte function associated antigen-1) und Mac-1 (CD11b/CD18) auf Neutrophilen binden an ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-1) auf dem Endothel, welches zur Ig-Superfamilie gehört [5, 6], und vermitteln die feste Adhäsion. Teilweise scheinen bestimmte Integrine auch ein Rollen vermitteln zu können. VLA-4 (α 4-Integrin) wird auf Lymphozyten exprimiert und kann dort Tethering, Rollen sowie feste Adhäsion auf VCAM-1 (Vascular adhesion molecule-1) unterstützen [7].

Die Endothelzellen werden durch homogene Bindung von PECAM-1 (Platelet endothelial cell adhesion molecule-1, CD31), das ebenfalls ein Integrin-Ligand der Ig-Superfamilie ist, miteinander verknüpft [8, 9]. Durch Bindung der leukozytären Integrine an PECAM-1 werden die homogenen Bindungen gelöst, so dass die Leukozyten in die entstehenden Zwischenräume eindringen können.

Die Selektine leiten die Adhäsionskaskade ein und nehmen daher eine Schlüsselposition im Prozess der Leukozytenextravasation ein. Im Gegensatz zu den ubiquitär vorkommenden Integrinen werden die endothelialen Selektine erst als Folge einer Entzündung exprimiert, so dass ihr Vorkommen zeitlich und räumlich auf das entzündete Gewebe beschränkt ist. Ihre Blockade könnte also pathologische Entzündungen zu einem frühen Zeitpunkt, ohne mögliche unerwünschte Wirkungen in anderen Geweben, verhindern. Da sie sich als Angriffspunkte für eine neue Entzündungstherapie anbieten, waren sie schon kurz nach ihrer Entdeckung 1990

Gegenstand von intensiven Forschungen über die molekulare Aufklärung der Entzündungsreaktion.

2.2 Selektine

In den folgenden Kapiteln (2.2.1 und 2.2.2) wird auf die Struktur und Expression sowie die Liganden der Selektine eingegangen.

2.2.1 Struktur und Expression

Im Gegensatz zur Mehrheit der Zelladhäsionsmoleküle gehören die Selektine zur Gruppe der C-Typ-Lektine. Lektine sind Glykoproteine, deren charakteristische Eigenschaft in einem spezifischen Bindungsvermögen gegenüber Kohlenhydraten besteht. Die Bezeichnung C-Typ deutet auf die Abhängigkeit der Kohlenhydrat-Bindung von der Anwesenheit von Calciumionen hin. Im Unterschied zu anderen Lektinen dieser Gruppe binden Selektine spezifisch das Tetrasaccharid Sialyl Lewis^x (sLe^x), besitzen nur ein einziges Kohlenhydrat-Bindungssepitop und nur eine Ca²⁺-bindende Position.

Das Vorkommen der drei Vertreter der Selektinfamilie, E-, P- und L-Selektin (CD 62-E, -P, -L), ist auf die Oberfläche von Zellen des Leukozyten-vaskulären Systems beschränkt. Sie weisen eine charakteristische, langgestreckte Form auf und sind strukturell homolog aus fünf verschiedenen Proteinteilen aufgebaut (s. Abb. 2): C-terminal befindet sich der zytoplasmatische Rest, der mit dem Zytoskelett in Verbindung steht. Ihm wird deshalb eine noch unvollständig geklärte Rolle bei der Signaltransduktion zugeschrieben. Er ist verglichen mit der Größe des Gesamtmoleküls eher klein (17 Aminosäuren (AS) beim L-Selektin, 32 bzw. 35 bei E- und P-Selektin). Es folgt eine einzelne transmembranäre Domäne. Die weite Ausdehnung in den extrazellulären Raum und die Flexibilität der Selektine wird hauptsächlich durch eine Aneinanderreihung von sogenannten „short consensus repeats“ (SCR) verursacht. Sie gleichen Einheiten aus Komplement-regulatorischen Proteinen. Jedes SCR besteht aus ca. 60 AS. Die eigentliche Funktion dieser sich wiederholenden Elemente ist bisher unbekannt. Es wurde gezeigt, dass die Reduktion der Anzahl dieser Domänen die Effizienz von P-Selektin beeinträchtigt, das Rollen von Leukozyten zu unterstützen [10]. Sie scheinen daher wichtig für einen genügend großen Abstand zwischen der P-Selektin-Bindungsdomäne und der Plasmamembran zu sein. Ihre Anzahl ist bei den einzelnen Selektinen unterschiedlich und artspezifisch. Humanes L-Selektin hat zwei SCR, während humanes P- und E-Selektin durch neun bzw. sechs SCR deutlich länger sind. P-Selektin aus Maus, Ratte und Schaf besitzt z. B. nur acht SCR und bovines P-Selektin nur sechs SCR. Auf eine 35 bis 40 AS lange EGF-Domäne, die erstmals im epidermalen Wachstumsfaktor gefunden wurde, folgt schließlich N-terminal die eigentliche Lektin-Bindungsdomäne. Sie besteht aus 120 AS und weist innerhalb der drei Selektine eine ca. 65-prozentige Sequenzhomologie auf [11]. Der Einbau von Sequenzen aus E-Selektin in die Kohlenhydrat-Bindungsdomäne des Mannose-bindenden Proteins zeigt, dass der Ersatz eines einzelnen Segmentes von drei AS die Fähigkeit, HL-60-Zellen und sLe^x-BSA zu binden, überträgt. Dies deutet auf große Ähnlichkeiten der Kohlenhydrat-Erkennungsepitope innerhalb der C-Typ-Lektine hin [12]. Die EGF-Domäne soll durch eine räumliche Beeinflussung der Lektin-Domäne eine aktive Rolle im Bindungsprozess haben [13-17].

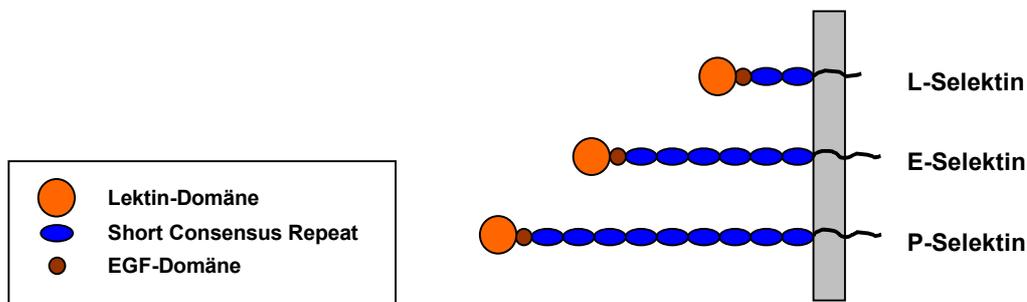


Abb. 2: Schematische Darstellung der Selektine

Die Kristallstruktur eines Konstruktes aus EGF- und Lektin-Domäne von E-Selektin wurde röntgenographisch mit einer Auflösung von zwei Å räumlich dargestellt [18]. Die Lektindomäne bildet eine globuläre Struktur mit einer flachen und oberflächlichen Bindungstasche für den Zuckerliganden. Diese Ergebnisse korrelieren mit der aus der AS-Sequenz ermittelten räumlichen Struktur dieser Bereiche [19]. Die entsprechende Kristallstruktur für das P-Selektin-Konstrukt (P-LE) nimmt eine ähnliche Konformation an, was mit der ca. 60-prozentigen Sequenzidentität in diesen Domänen der beiden Selektine übereinstimmt. Die Bewegung verschiedener Schleifen in der EGF-Domäne und eine kleine Veränderung des Interdomänenwinkels in P-LE verursachen kleine Unterschiede in der Struktur. Auch die Bindungstaschen weisen Positionen mit unterschiedlichen Oberflächenladungen durch verschiedene AS auf [16].

Die drei Selektine unterscheiden sich in ihrer Aktivierung und Expression, so dass sie unterschiedliche Funktionen im Prozess des Leukozytentethering und -rollens wahrnehmen.

L-Selektin ist als einziges Selektin an der Rezirkulation bzw. Bewegung der Lymphozyten aus dem Blut- in das Lymphsystem beteiligt („lymphocyte homing“). Es wurde 1983 zunächst durch einen mAK (MEL-14) definiert und als „homing receptor“ beschrieben [20], da es auf Lymphozyten die Bindung an spezielle „high endothelial venules“ (HEV) in peripheren Lymphknoten vermittelt. Zur gleichen Zeit gab es erste Hinweise darauf, dass an diesem Adhäsionsprozess Kohlenhydrate beteiligt sind [21]. Das Binden der Lymphozyten kann durch eine Anzahl monomerer, anionisch geladener Zucker, z. B. Mannose-6-phosphat, blockiert werden [22]. In späteren Untersuchungen wurde unter Verwendung des mAK MEL-14 festgestellt, dass L-Selektin auch auf anderen Leukozyten, d. h. auf Neutrophilen, Monozyten und Eosinophilen, vorhanden und an der Interaktion von Neutrophilen mit dem Endothel beteiligt ist [23]. Durch die Klonierung von L-Selektin [24], sowie P- und E-Selektin [25, 26], wurde 1989 die enge strukturelle Verwandtschaft deutlich.

L-Selektin wird im Gegensatz zu E- und P-Selektin konstitutiv exprimiert [23]. Es ist auf den Spitzen der Mikrovilli von allen Granulozyten, Monozyten und auf den meisten zirkulierenden Lymphozyten lokalisiert, so dass es trotz seiner relativ geringen Größe für die Erkennung und Bindung gut zugänglich ist [27-29]. Die Aktivierung von Neutrophilen durch eine Reihe von chemotaktischen Faktoren verursacht eine proteolytische Abspaltung des L-Selektins von der Zelloberfläche innerhalb von vier Minuten (Shedding) [30]. Gleichzeitig nimmt die Expression und Aktivität des Integrins Mac-1 zu [31]. Die Abspaltung findet membrannah wahrscheinlich durch eine Metalloproteinase statt [30]. Auch eine laterale Clusterung des L-Selektins im Bindungsprozess wird als Auslöser für das Shedding beschrieben

[32]. Auf die Bedeutung und die Relevanz des Sheddings für den Rollprozess soll später eingegangen werden.

E-Selektin wurde 1987 als induzierbares „endothelial-leukocyte adhesion molecule-1“ (ELAM-1) auf kultivierten humanen Endothelzellen gefunden [33]. Heute ist bekannt, dass E-Selektin auf allen Endothelzellen postkapillarer Venolen induzierbar ist. Dort wird es nach vorübergehender Aktivierung mit Zytokinen (IL-1, TNF- α) oder mit Lipopolysacchariden exprimiert [26]. Die Expression wird auf Transkriptionsebene durch den Transkriptionsfaktor κ B (NF κ B) gesteuert [34] und erfordert eine de novo-Synthese. Deshalb erreicht sie ihr Maximum erst nach zwei bis vier Stunden und fällt innerhalb von 24 Stunden auf ihren Ausgangswert zurück [35]. E-Selektin wird durch Endozytose von der Zelloberfläche entfernt und in Lysosomen abgebaut [36, 37].

P-Selektin wurde als Membranprotein in den Speichergranula (α -Granula) von Blutplättchen entdeckt [38, 39]. In funktionsfähiger Form gespeichert wird es auch in den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen [40]. Seine Präsentation an der Zelloberfläche wird über zwei verschiedene Mechanismen kontrolliert. Nach Stimulation der Zellen mit Histamin, Thrombin oder Phorbol ester wird es aus den Speichergranula mobilisiert und erreicht innerhalb von zehn Minuten seine maximale Expression an der Zelloberfläche [41, 42]. Daneben wird P-Selektin ähnlich wie E-Selektin durch Aktivierung der Transkription, z. B. mit TNF- α , neu synthetisiert [35, 43]. Innerhalb von 30 bis 60 Minuten wird P-Selektin durch Endozytose (mittels „clathrin coated pits“) wieder internalisiert. Es wird dann, kontrolliert durch den zytoplasmatischen Rest, entweder in die Speicher zurück überführt oder im Lysosom abgebaut [37, 44, 45].

Gereinigtes P-Selektin liegt oligomer in Lösung vor. Wahrscheinlich assoziiert es in der Transmembranregion mit anderen P-Selektin-Molekülen. Es verfügt in dieser Form über eine erhöhte Avidität gegenüber seinen Liganden verglichen mit der monomeren Form [46]. In intakten Zellen (Plättchen und Endothelzellen) bildet P-Selektin Homodimere. Die Dimerisierung findet im endoplasmatischen Retikulum und den Golgi-Kompartimenten statt [47].

Die unterschiedliche Induktion der Selektin-Expression steuert die Dauer und Intensität des Leukozytenrollens und ordnet den einzelnen Selektinen verschiedene Funktionen innerhalb des Rollprozesses zu. Während die räumlich exponierten Selektine (P- und L-) in der Frühphase der Entzündung zusammenwirken und das Zellrollen auf dem Endothel vermitteln, ist E-Selektin durch seine spätere Exprimierung für die Überleitung zur festen Adhäsion der Leukozyten verantwortlich. Diese Befunde konnten in einer Vielzahl von Modelluntersuchungen in vitro oder mit Selektin-defizienten (knock-out) Mäusen in vivo gewonnen werden.

2.2.2 Liganden

Anders als die meisten Zelladhäsionsmoleküle üben die Selektine ihre Funktion über eine Wechselwirkung mit Kohlenhydrat-Liganden aus. Es wurden bisher nur einzelne hochaffine Liganden charakterisiert. Dabei handelt es sich um mucinähnliche Proteine (Sialomucine). Mucine sind langgestreckte und sehr hydrophile Glykoproteine, die, O-glykosidisch über Serin- oder Threonin-Reste des Gerüstproteins gebunden, verzweigte Kohlenhydratketten tragen. Der Kohlenhydratanteil kann bis zu 75 % ausmachen.

Als Kohlenhydrat-Bindungs epitope für die Selektine dienen fukosylierte Laktosaminoglukane, denn alle drei Selektine haben eine gewisse Bindungsaffinität

zu der Blutgruppenderminante Le^x. Eine stärkere Affinität weisen sie zu deren sialylierter Form sLe^x (Neu5Acα2,3Galβ1,4[Fuca1,3]GlcNAc-O-R) und dessen Positionsisomer sLe^a (Neu5Acα2,3Galβ1,3[Fuca1,4]GlcNAc-O-R) auf [48-53]. Es sind Tetrasaccharide mit einer speziellen Verknüpfung von N-Acetylglucosamin mit Fruktose und Sialinsäure. Im Ganzen gesehen ist die Affinität der Selektine zu diesen Epitopen mit Bindungskonstanten im millimolaren Bereich [54-56] vergleichsweise gering. Besser bindende Oligosaccharid-Strukturen konnten nicht gefunden werden. Es ist jedoch nicht ungewöhnlich für Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen, dass einzelne Interaktionen durch schwache Bindungskonstanten gekennzeichnet sind. Schwierig für die Aufklärung der relevanten Bindungsbestandteile gestaltete sich auch die fehlende Korrelation zwischen dem Gehalt an Lewis-Epitopen und der Selektin-induzierten Zelladhäsion [28]. Aufgrund ihrer ubiquitären Verteilung können diese Epitope nicht die physiologisch relevanten Bindungspartner für Selektine darstellen, sondern nur in Verbindung mit spezifischen Glykoproteinen als Liganden fungieren. Es wurden Selektin-Liganden isoliert, die eine deutlich höhere Affinität zu den Selektinen als das sLe^x aufweisen. Die Affinität natürlicher Liganden liegt im nanomolaren Bereich. Das macht einen Unterschied um mehrere Zehnerpotenzen zu sLe^x aus [57]. Diese Differenz konnte weder durch besser bindende Kohlenhydrate noch durch die Summe vieler Bindungs epitope (multivalente Interaktionen) schlüssig erklärt werden.

Der am besten charakterisierte Selektin-Ligand ist der „P-selectin glykoprotein ligand-1“ (PSGL-1), der 1993 identifiziert wurde [58]. PSGL-1 ist als funktioneller Ligand auf myeloiden, lymphoiden und dendritischen Zellen vorhanden [59] und bindet alle drei Selektine. Er vermittelt die Adhäsion zwischen Leukozyten/Endothel bzw. Leukozyten/Plättchen durch Bindung an P-Selektin auf dem aktivierten Endothel bzw. Plättchen [60]. Außerdem vermittelt PSGL-1 die homotypische Adhäsion von Leukozyten durch Bindung an L-Selektin auf der Partnerzelle (s. Kap. 2.4.2).

PSGL-1 ist ein langgestrecktes, über eine Disulfidbrücke verbundenes Homodimer, mit einem Molekulargewicht von ca. 230 kD. Die Bedeutung der Homodimerbildung wird unterschiedlich beurteilt. Einerseits soll sie für die hochaffine Bindung an P-Selektin nötig sein [61]. Andererseits wird festgestellt, dass das Monomer in vitro ausreichend für die Erkennung von P-Selektin ist [62] (s. auch Kap. 2.4.2).

Detaillierte Struktur- und Bindungs-Untersuchungen zeigten, dass PSGL-1 eng benachbarte, sialylierte (u.a. sLe^x), O-gebundene Kohlenhydrate auf seiner Oberfläche präsentiert, die essentiell für die Bindung an P-Selektin sind. Es enthält jedoch nur einen geringen Bruchteil des gesamten sLe^x auf der Zellmembran [63]. Das ubiquitäre Vorkommen der Selektin-bindenden Zuckerstrukturen widerspricht der Idee, dass viele schwachaffine Einzelbindungen per se für die hohe Affinität der natürlichen Liganden verantwortlich sind. In späteren Studien wird deutlich, dass verzweigte Kohlenhydrat-Seitenketten vorherrschen („Core-2 structures“: Verzweigung durch β-1,6-Verknüpfung von GalNAc mit GlcNAc), die durch die räumliche Nähe affinitätserhöhend wirken könnten [64].

Neben der Präsentation von sLe^x auf O-gebundenen, verzweigten Glykanen stellt ein Epitop innerhalb der ersten 20 N-terminalen AS eine weitere Bindungskomponente dar. Das anionische Polypeptid-Segment enthält drei Tyrosinmoleküle, mindestens eines davon ist sulfatiert, was eine deutliche Affinitätserhöhung verursacht [65-67]. Im Zusammenwirken dieser Bindungskomponenten könnte der Grund für die hohe Affinität des PSGL-1 zum P-Selektin von ca. 100 nM [46] und für die (ca. 50fach geringere) Affinität zum E-Selektin liegen [68]. Weitere Untersuchungen zeigen, dass die Art und Anzahl der gebundenen sulfatierten Tyrosine von großer Bedeutung für

die Bindungsstärke und Dissoziation des P- und auch L-Selektins sind [69]. Die sLe^x-tragenden O-Glykane innerhalb des beschriebenen N-Terminus von 20 AS sind für hochaffines Binden ausreichend [70]. Der anionische Teil von PSGL-1 mit den sulfatierten Tyrosinmolekülen bindet P-Selektin im Bereich positiver elektrostatischer Potentiale. Diese Region unterstützt möglicherweise das Binden einer Anzahl inhibitorischer, anionischer Glykokonjugate, wie Heparinsulfat, Fukoidan, Sulfatide. Die sLe^x-Komponente bindet an einer Stelle mit neutralem und negativem elektrostatischem Potential [16]. Im Licht neuerer Untersuchungen scheinen die Wechselwirkungen durch die sulfatierten Tyrosine den Rollvorgang zu stabilisieren, indem sie die Rolladhäsion verlangsamen und den Rollvorgang auch bei höheren Scherraten unterstützen. Es zeigt sich in einem zellfreien Assay, dass monomeres sLe^x allein fähig ist, ein Rollen von Mikrobeads auf P- und E-Selektin zu erzeugen [71,72]. Die sulfatierten Tyrosinreste auf PSGL-1 sind also für die Rollvermittlung nicht notwendige Bedingung, sie wirken allerdings auf die Wechselwirkung mit P-Selektin deutlich modulierend. Die ermittelten Einflüsse der Tyrosinsulfatierung beziehen sich nur auf den Rollvorgang per se. Langreichweitige elektrostatische Wechselwirkungen könnten zusätzliche Bedeutung bei der ersten Kontaktaufnahme mit dem Endothel erhalten.

PSGL-1 bindet die Selektine mit unterschiedlicher Affinität [73, 74] und hat deshalb als Rezeptor unterschiedliche Bedeutungen. Obwohl PSGL-1 das Binden von E-Selektin unabhängig von der Tyrosinsulfatierung unterstützt [65, 66], wirkt sich sein Fehlen nicht auf die Zellhaftung und das Rollen durch E-Selektin in vivo aus [75]. Ein gemeinsames Element in der Bindung zwischen sLe^x und E- bzw. P-Selektin und im Komplex aus P-Selektin und PSGL-1 ist ein kompliziertes Netzwerk aus relativ schwachen, aber optimal positionierten Interaktionen. P-Selektin vermag zusätzlich Kontakte mit den sulfatierten Tyrosinen in PSGL-1 einzugehen, während diese Interaktionen durch die entsprechenden AS in E-Selektin vermutlich nicht gebildet werden können [16]. Auch frühere Studien haben gezeigt, dass die Sulfatierung der N-terminalen Tyrosinreste kritisch für das Binden von P-, aber nicht von E-Selektin ist [65, 66, 76]. Die Erkennung von PSGL-1 durch E-Selektin könnte daher von der alleinigen Präsentation von sLe^x-Glykanen und nicht von der sulfatierten Polypeptid-Determinante abhängen. Außerdem scheint PSGL-1 mehr als einen Bindungsort für E-Selektin zu haben: einen innerhalb der ersten 19 AS, einen oder mehrere zwischen den AS 19 und 48 [70].

Auch L-Selektin erkennt die N-terminale Region von PSGL-1 und hat ähnliche, wenn nicht dieselben, Bindungsanforderungen wie P-Selektin (zur Bedeutung dieser Interaktion s. Kap. 2.4.2) [77]. Es bindet jedoch mit geringerer Affinität, was durch das Fehlen der Interaktion mit dem zweiten sulfatierten Tyrosinrest erklärt werden könnte [16].

Elektronenmikroskopische Aufnahmen demonstrieren, dass PSGL-1 ein langgestrecktes Molekül ist, das ca. 50 nm über die Zelloberfläche hinausragt. Neben einzelnen Molekülen wurden auch Multimere in Form von Rosetten beobachtet, die wahrscheinlich an ihren Transmembransegmenten adhären [78]. Da zudem die Präsentation von PSGL-1 vorzugsweise auf den Spitzen der Mikrovilli der Leukozyten stattfindet [60, 79], ist es prädestiniert, in der Frühphase der Entzündung durch Wechselwirkung mit dem ebenfalls sehr langgestreckten P-Selektin das Tethering und Rollen der Leukozyten zu initiieren.

Ein weiterer Ligand, der P-Selektin mit hoher Affinität bindet, ist CD24. Das Molekül hat ebenfalls eine mucinähnliche Struktur, besitzt einen nur sehr kleinen Proteinkern (27 AS) und ist über GPI in der Membran verankert. Es wird beim Erwachsenen fast

ausschließlich auf Neutrophilen exprimiert. Dort ist es jedoch nicht am P-Selektin-vermittelten Rollen beteiligt [80]. PSGL-1 ist somit der dominierende Ligand auf diesen Zellen. Außerdem wird CD24 auf verschiedenen humanen Tumoren reexprimiert. Für die Vermittlung einer Rollbewegung der Tumorzellen ist eine bestimmte Glykosylierung von CD24 mit sLe^x notwendig. Ohne sLe^x kommt es nur unter statischen Bedingungen zur Adhäsion [81-83].

Es wurden verschiedene Glykoprotein-Liganden beschrieben, die für den Prozess der Lymphozytenrezirkulation auf Endothelien der Lymphknoten (HEV) als L-Selektin-Liganden gebildet werden.

GlyCAM-1 („Glycosylation dependent cell adhesion molecule-1“) ist ein Sialomucin, welches mit Clustern aus sulfatierten Glykanen bedeckt ist. Die Sulfatierungen treten besonders in Form der Kopfgruppen 6'-sulfo-sLe^x (Sulfat am C6 der Galaktose) und 6-sulfo-sLe^x (Sulfat am C6 des GlcNAc) auf [84, 85]. GlyCAM-1 besitzt keine transmembrane Region, was gegen eine Liganden-Funktion spricht. Weil es sezerniert wird, könnte es als löslicher Modulator der L-Selektin-Funktion oder als Initiator von Aktivierungsprozessen im Lymphozyt (z.B. Integrinaktivierung [86]) durch Bindung an L-Selektin wirken.

CD34 ist ein transmembranäres Sialomucin [87, 88], welches auf Endothelzellen und unreifen hämatopoetischen Zellen vorkommt. Die Glykosylierungsform ist für die Erkennung von L-Selektin wichtig [87]. Seine Bindungsepitope sind ebenfalls sulfatierte sLe^x-Strukturen [89].

Eine Sonderstellung nimmt MAdCAM-1 („mucosal addressin cell adhesion molecule-1“) ein. Das transmembranäre Glykoprotein gehört zur Ig-Superfamilie, weshalb es auch als Ligand für das Lymphozyten-Integrin $\alpha_4\beta_7$ fungieren kann [90]. Es weist jedoch außerdem einen mucinähnlichen Anteil auf. Exprimiert wird es in mesenterialen Lymphknoten und auf HEV in Peyerschen Plaques.

Während die L-Selektin-Liganden in lymphoiden Geweben hinsichtlich ihrer Struktur und funktionellen Bedeutung als endotheliale Homing-Rezeptoren gut charakterisiert sind, ist die Identität endothelialer Liganden für L-Selektin bei Entzündungen unklar. Endotheliales E- und P-Selektin wurden als mögliche Liganden für L-Selektin auf Neutrophilen diskutiert [28, 91, 92]. L-Selektin ist als Ligand für E-Selektin jedoch nur am initialen Kontakt des Leukozyten mit dem Endothel beteiligt, das Rollen hingegen wird von anderen E-Selektin-Liganden übernommen [93].

Bei der homotypischen Leukozytenbindung (s. Kap. 2.4.2) spielen neben PSGL-1 auch andere L-Selektin-Liganden eine Rolle. Es gibt Hinweise auf sialylierte und fukosylierte L-Selektin-Liganden auf Granulozyten und Monozyten, die sich deutlich von den Bindungsstrukturen auf HEV unterscheiden [94, 95]. Kürzlich (2002) wurde Nukleolin neben PSGL-1 als ein Ligand auf humanen Leukozyten und hämatopoetischen Progenitorzellen entdeckt. Bei Nukleolin handelt es sich eigentlich um ein Kernprotein, welches auf Leukozyten teilweise an der Zelloberfläche präsentiert wird. Sein Vorkommen auf Lymphozyten wurde nicht untersucht [96].

Die strukturellen Anforderungen, die für die Erkennung durch E-Selektin notwendig sind, unterscheiden sich von denen für die anderen beiden Selektine. So bringt eine Modifikation mit Sulfatgruppen keine Affinitätserhöhung mit sich. Während L-Selektin für die Rollvermittlung die 6-Sulfatierung an Kohlenhydrat-Strukturen und P-Selektin die Tyrosinsulfatierung bevorzugen, benötigt E-Selektin essentiell die $\alpha 1 \rightarrow 3$ -Fukosylierung [97]. Die E-Selektin-Bindungsfähigkeit einer Zelle kann schon durch die Einführung einer Fukosyltransferase erzeugt werden [98]. E-Selektin bindet sLe^x von allen drei Selektinen am besten [56] und sLe^x reicht als alleinige Struktur aus, um im zellfreien System ein Rollen durch E-Selektin zu vermitteln [99]. Trotz

des scheinbar geringeren Maßes an Selektivität gegenüber seinen Liganden wurde auch für E-Selektin ein hochaffiner Ligand beschrieben, der „E-selectin-ligand-1“ (ESL-1). Dieser ist ein 150 kD großes Glykoprotein auf myeloiden Zellen, welches die Kohlenhydratpitope als einziges N-glykosidisch gebunden hat [100] und nur fünf Glykosylierungsstellen besitzt [101]. ESL-1 zeigt keine Bindungsaffinität zu den anderen Selektinen [102]. Es wird im Randbereich der Mikrovilli exprimiert [103], was der späteren Aufgabe von E-Selektin im Rollprozess entgegenkommt.

Als Ganzes betrachtet besitzen die Selektin-Liganden kein einheitliches Wirkprinzip für eine hochaffine Bindung. Es kann jedoch festgehalten werden, dass (1) die Art der erkannten „Sequenz“, d.h. der Oligosaccharide, sowie (2) die konzentrierte Präsentation der Zuckerstrukturen auf den Mucinen (sogenannte Cluster), bzw. die daraus vermutlich resultierenden multivalenten Interaktionen, gemeinsam mit (3) einer speziellen räumlichen Anordnung der Bindungs epitope auf dem Gerüstprotein und (4) Modifikationen wie Sulfatierung abhängig vom Selektin mehr oder weniger stark an der Ausbildung der hochaffinen Bindungen beteiligt sind. Während zu den Punkten (1), (3) und (4) in den letzten Jahren viele neue Erkenntnisse gewonnen wurden, ist der Einfluss der Clusterbildung bzw. Multivalenz und auch der Flexibilität der Ligandenstrukturen noch wenig untersucht.

2.3 Physiologische Funktion im Rollprozess

In einer Reihe von in vivo-Studien wurde die Funktion und der Beitrag der einzelnen Selektine am Entzündungsgeschehen untersucht. Dabei werden ein oder mehrere Selektine gezielt durch Blockade mit Antikörpern oder durch Verwendung von Selektin-defizienten Mäusen „ausgeblendet“.

Jedes der Selektine leistet einen Beitrag zum Leukozytenrollen bzw. zur -emigration aus den Gefäßen unter Entzündungsbedingungen. Das Zusammenwirken ist wichtig für eine unbeeinträchtigte Extravasation [104-109]. Das Lymphozyten-Homing wird jedoch ausschließlich durch L-Selektin vermittelt [110]. Bei Fehlen von L-Selektin auf der Oberfläche von Leukozyten ist das Rollen und die peritoneale Migration deutlich beeinträchtigt [110]. Endotheliales P- und E-Selektin haben verschiedenartige, aber überlappende Funktionen. Nur das Fehlen beider Selektine führt zu einer deutlichen Abnahme der Roll-Interaktionen als Voraussetzung für die feste Adhäsion und damit zu einer Störung der Neutrophilen-Akkumulation [111-113]. P-Selektin-defiziente Mäuse haben eine erhöhte Anzahl an zirkulierenden Neutrophilen und zeigen eine verzögerte Rekrutierung in der Frühphase der Entzündung [114, 115]. E-Selektin ist verantwortlich für das langsame ($< 5 \mu\text{m/s}$) Rollen von Granulozyten und leitet in der späteren Phase der Entzündung zur stabilen Adhäsion über [116, 117]. Mäuse, denen zusätzlich zu E-Selektin auch CD18, die β_2 -Untereinheit der Integrine, fehlt, entwickeln sich nicht (maximales Körpergewicht: 10-15 g) und zeigen daher nur eine extrem begrenzte Lebensfähigkeit. Der kooperierende Einfluss von E-Selektin und CD18 auf die Viabilität ist auffallend, da die einzelnen Rezeptoren diese Wirkung nicht besitzen. Möglicherweise liegt die Ursache für die eingeschränkte Lebensdauer in der Unfähigkeit, eine ausreichende Immunreaktion auszulösen [118].

Die in vivo-Daten zu den Auswirkungen bei Fehlen eines oder mehrerer Selektine wurden von Bullard und Beaudet [119] in einer Tabelle (Tab. 1) gebündelt.

Mutation	Gesamtzustand	Leukozyten-Anzahl	Neutroph.Emi-gration 0-4 h	Neutroph.Emi-gration 24 h	Leukozyten-Rollen
P-Selektin	Normal	Erhöht	Reduziert	Normal	Reduziert
E-Selektin	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
L-Selektin	Normal	Normal	Reduziert	Reduziert	Reduziert
P-/E-Selektin	Spontane Infektionen	Sehr stark erhöht	Keine	Normal	Sehr stark reduziert

Tab. 1: Auswirkungen einer Selektin-Defizienz bei Mäusen auf entzündungsrelevante Parameter

Zusammengefasst betont die Vielfalt von in vivo-Ergebnissen die Wichtigkeit adhäsiver Interaktionen durch die Selektine im Entzündungsgeschehen. Durch die physiologische Umgebung lassen sich die Auswirkungen des Fehlens eines Proteins realitätsnah demonstrieren. Minimalanforderungen des Rollvorganges sowie zelluläre und molekulare Mechanismen lassen sich jedoch nicht eindeutig ableiten. Dafür werden in vitro-Studien mit definierten Einflussparametern benötigt.

Im nächsten Abschnitt soll auf die Funktion der Selektine bei der Signaltransduktion hingewiesen werden. Eine vollständige Übersicht zu geben, ist jedoch nicht das Ziel. Die Adhäsionskaskade der Leukozyten ist ein regulierter Prozess, in dem die Aufgaben verschiedener Adhäsionsrezeptoren ineinander übergreifen, wodurch sie miteinander in Beziehung stehen. Da die Selektine die Kaskade einleiten, sind sie prädestiniert, mit nachfolgenden Rezeptoren der β 2-Integrine und der Ig-Superfamilie zu kommunizieren und zu ihrer Aktivierung beizutragen.

Eine L-Selektin-Bindung an humane Neutrophile führt zur Erhöhung der intrazellulären freien Calcium-Konzentration [120]. Und es finden dabei Tyrosin-Phosphorylierungen an verschiedenen Proteinen statt [121]. Ebenso kann die Bindung an L-Selektin die Oberflächenexpression des β 2-Integrins Mac-1 erhöhen [122, 123]. Dieser Effekt konnte auch unter Flussbedingungen festgestellt werden. Die Bindung von L-Selektin aktiviert die Integrine LFA-1 und Mac-1 auf rollenden Neutrophilen. Dies führt zur festen Adhäsion [124]. Die Clusterung von L-Selektin scheint in der Signaltransduktion eine Rolle zu spielen [125].

Auch die Bindung von P-Selektin an PSGL-1 auf humanen Monozyten und Neutrophilen sowie Signaleffekte durch E-Selektin haben „Outside-in signaling“ zur Folge. Dies führt ebenfalls zur Modulation der Integrinfunktion und Aktivierung von intrazellulären Kinasekaskaden [126-130]. Die Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne von E-Selektin liefert zusätzliche Hinweise auf eine Signalfunktion dieses Moleküls [131].

Eine ganze Reihe von Untersuchungen haben also Hinweise auf eine Beteiligung bei der Signaltransduktion gegeben. Die bisherigen Daten ergeben allerdings kein vollständiges Bild.

2.4 Rheologische, zelluläre und molekulare Betrachtung des Rollprozesses

Bei der rheologischen, zellulären und molekularen Betrachtung des Rollprozesses werden zunächst die Strömungsbedingungen in Blutgefäßen und damit die äußeren Einflüsse auf den Rollprozess dargestellt (2.4.1). In einem weiteren Abschnitt werden

die zellulären und molekularen Einflussparameter diskutiert und die für den Rollprozess wesentlichen speziellen Eigenschaften der Selektine herausgestellt.

2.4.1 Strömungsbedingungen in Blutgefäßen

Die Rollreaktion wird außer durch spezifische molekulare Interaktionen auch durch die Rheologie des Blutes kontrolliert. Den ersten Schritt im Prozess der Leukozytenemigration stellt die Margination dar, wenn die Leukozyten den zentralen Fluss von strömenden Blutzellen in postkapillaren Venolen (Durchmesser zwischen 10 und 30 μm) verlassen [2].

Die Formel von Hagen-Poiseuille gibt die Volumenstromrate für eine laminare Flüssigkeit in einer Röhre wieder. Sie ist linear abhängig von der vierten Potenz des Radius und der Potentialdifferenz zwischen Anfang und Ende der Röhre, sowie umgekehrt proportional zur Länge der Röhre und zur Viskosität der Flüssigkeit. Daraus folgt für das Geschwindigkeitsprofil die Form einer Parabel mit einem Maximum in der Mitte der Röhre und einem annähernd linearen Bereich nahe der Wand. Das menschliche Blut ist jedoch eine Suspension von verschiedenen Blutzellen im Blutplasma und damit eine inhomogene Flüssigkeit. Zahlen- und volumenmäßig dominieren die Erythrozyten. Als nicht-laminare Flüssigkeit weist Blut deshalb Besonderheiten auf.

In Analogie zu anderen Suspensionen ist auch im Blut eine Entmischung infolge von Strömungserscheinungen zu beobachten. Wenn Suspensionen in Röhren strömen, deren Durchmesser eine ähnliche Dimension haben wie die darin enthaltenen Partikel, tritt eine Verarmung an Partikeln in den Randzonen auf. Das relative Volumen suspendierter Teilchen wird eine Funktion des Strömungsprofils (Fahraeus-Lindquist-Effekt). Die Zellverarmung in der Nähe der Gefäßwand und die damit verbundene Viskositätserniedrigung in dieser Schicht verändern das Geschwindigkeitsprofil der Strömung. Zusätzlich zeigen hydrodynamische Untersuchungen, dass größere Partikel in einer Suspension mit Zunahme des Scherstroms mehr in die Mitte gedrängt werden. Normalerweise bewegen sich größere Leukozyten (z.B. Neutrophile) also in der Mitte des Gefäßes.

Unter Entzündungsbedingungen kommt es durch Vasodilatation und erhöhte Gefäßpermeabilität zu einer Verlangsamung der Blutströmung. Durch Austreten von Plasma steigt der Hämatokritwert. Als Folge kommt es zur sogenannten Geldrollenbildung der Erythrozyten. Die Zellen lagern sich dabei flach aneinander und bilden zusammenhängende Zellstapel. Dadurch werden die Leukozyten in marginale Regionen verdrängt [132]. Der Kontakt mit dem Endothel wird wahrscheinlicher, jedoch wirken die vorhandenen Scherkräfte (s. u.) einer Adhäsion entgegen. Da die Geschwindigkeit der Strömung vom Rand zur Mitte ansteigt, bestehen Geschwindigkeitsunterschiede über die gesamte Höhe der Zelle. Auf sie wirkt ein Drehmoment und gleichzeitig eine Zugkraft ein. Die Zellen kommen ins „Straucheln“, auch wenn sie noch keinen Kontakt mit der Endotheloberfläche haben. Sie bewegen sich allerdings mit einer höheren Geschwindigkeit als rollende Zellen, so dass weitere adhäsive Interaktionen zwischen dem Endothel und den Leukozyten beteiligt sein müssen, um die sekundenbezogene Geschwindigkeit aus dem Millimeter- in den Mikrometer-Bereich abzubremsen [133].

Ein Parameter des parabolischen Geschwindigkeitsprofils ist der Schergrad oder die Scherrate. Er gibt die Veränderung der Geschwindigkeit in Abhängigkeit von der radialen Lage an und hat die Einheit $[\text{s}^{-1}]$. Für Durchflusskammern mit laminarer Strömung kann der Schergrad nach der Gleichung $G = 6 Q / (b h^2)$ annähernd

berechnet werden. Q ist die Durchflussrate (Volumen pro Zeiteinheit), b die Breite und h die Höhe der Flusskammer. Der physiologische Schergrad liegt in Abhängigkeit der Gewebe und Organe zwischen 150 und 500 s^{-1} . Er steht über die Viskosität des Mediums mit dem Scherstress in proportionaler Beziehung. Der Scherstress ist als Scherkraft definiert, die horizontal auf eine bestimmte Flächeneinheit der Gefäßwand wirkt. Sie wird in Nm^{-2} oder dyn/cm^2 ($1 \text{ dyne} = 10^{-5} \text{ N}$) angegeben. 1 bis 10 dyn/cm^2 sind in postkapillaren Venolen physiologisch [134].

Erythrozyten und ihre Aggregation können also die Margination der Leukozyten und deren Kontakt mit der Gefäßwand beeinflussen [135]. Trotzdem sind die hämatologischen und rheologischen Faktoren noch wenig untersucht.

Noch einmal zusammengefasst sind die Ausbildung und das Bestehen adhäsiver Bindungen sowie die Rollgeschwindigkeit von der Scherrate und dem Scherstress abhängig. Beide Parameter bestimmen die Geschwindigkeit fließender Zellen und die Kräfte, die beim Bindungsvorgang auf die Zellen einwirken. Sie sind selbst von der Viskosität des Blutes und damit dem Hämatokrit abhängig. Die meisten in vitro-Studien verwenden gereinigte Suspensionen einer bestimmten Leukozytenart, wodurch physikalische Eigenschaften des Blutes vernachlässigt werden. Um die physikalischen Variablen systematisch zu untersuchen, wurde die Adhäsion und das Rollen von Leukozyten in Vollblut auf immobilisiertem, gereinigtem P-Selektin fluoreszenzmikroskopisch untersucht [136]. Die Ergebnisse demonstrieren, dass die Adhäsion, wie in Studien mit isolierten Zellen, mit steigender Scherrate ($35/\text{s}$ bis $280/\text{s}$) oder steigendem Scherstress abnimmt, während die Geschwindigkeit des Rollens wenig variiert. Natürliche Variation der hämatologischen Parameter (außer der Leukozytenzahl) wirkt sich nicht auf die Adhäsion aus. Kleinere fluoreszente Zellen (Lymphozyten) adhäreren weniger effizient und rollen schneller als größere Zellen (Granulozyten). Interessanterweise wurde auch der Einfluss der Flussrichtung untersucht. Bei horizontalem Fluss adhäreren isolierte Neutrophile effizienter als solche in Vollblut. Bei vertikaler Richtung ist ihre Adhäsion vernachlässigbar gering. Vollblut verhält sich in beiden Richtungen gleich. Daher ist die Sedimentation von Leukozyten in erythrozytenfreien Suspensionen notwendig, um sie in Kontakt mit der Gefäßwand zu bringen. Im Blut wird die Sedimentation der Leukozyten durch die Erythrozyten behindert, die Erythrozyten selbst drängen sie jedoch bei horizontalem wie vertikalem Fluss effektiv an die Wandung.

Für die Adhäsion der Leukozyten ergeben sich aus den Eigenschaften des Vollblutes experimentelle Variablen. Andererseits zeigen die Ergebnisse, dass sich das Verhalten von isolierten Leukozyten, wenn sie nach dem Marginationsschritt am Endothel adhäreren, mit dem von Leukozyten in Vollblut vergleichen lässt.

2.4.2 Funktionelle Eigenschaften der Selektine im Rollprozess

Das Abfangen der Leukozyten aus dem Fluss wird durch zwei verschiedene Mechanismen vermittelt. Zum einen können Leukozyten direkt an das Endothel adhäreren und in eine Rollbewegung übergehen („**Primary Capture**“). Zum anderen können frei strömende Leukozyten vorübergehend mit einem schon rollenden zweiten Leukozyten wechselwirken, nachfolgend an das Endothel adhäreren und in Kontakt mit der zweiten Zelle (Bildung von Ketten) oder unmittelbar flussabwärts in Rollen übergehen („**Secondary Capture**“). In diesem Zusammenwirken von Leukozyten/Leukozyten- und Leukozyten/Endothel-Interaktionen wird die Leukozyten-Akkumulation am Zielgewebe eingeleitet, verstärkt und verlängert.

1994 wurde zum ersten Mal gezeigt, dass Neutrophile auch auf einem Monolayer aus akkumulierten Leukozyten, die bereits am aktivierten Endothel binden, rollen [137]. Die homotypische Adhäsion der Leukozyten findet durch die Wechselwirkung zwischen PSGL-1 und L-Selektin auf der jeweiligen Neutrophilen-Oberfläche statt [138, 139]. Es gibt Hinweise auf bisher nicht identifizierte leukozytäre L-Selektin-Liganden, die synergistisch mit PSGL-1 wirken [95]. Die physiologische Bedeutung der sekundären Adhäsion wurde jedoch unter anderem durch dynamische Versuche mit Vollblut in Frage gestellt, bei denen sich deutlich weniger sekundäre Adhäsion zeigte [140]. In vivo konnte kürzlich (2001) allerdings die Bedeutung des „Secondary Capture“ für die Amplifikation der Leukozyten-Rekrutierungsrate demonstriert werden [141].

Zellhaftung und Rollen unter dem Einfluss von hydrodynamischem Scherstress im Gefäßsystem erfordert nicht nur von den Selektinen, sondern auch von ihrer unmittelbaren zellulären Umgebung besondere Eigenschaften.

Um die Leukozytenadhäsion an die Gefäßwand zu initiieren und aufrechtzuerhalten, muss die Bindung zwischen Selektin und Ligand der Zugkraft der Strömung widerstehen, welche sich nicht nur auf die Bindung an sich, sondern auch auf die ganze Zelle auswirkt. Unter dem Einfluss von Scherstress kommt es zur zunehmenden **Deformation** der Zelle. Die Kontaktfläche mit dem Substrat nimmt zu. Dies resultiert in einer größeren Energieverteilung auf Bindungen und Zytoplasma, während die einwirkende Energie aufgrund der abgeflachten Form verringert wird [142, 143].

Die **Mikrovilli** der Leukozyten präsentieren die Bindungsstrukturen (L-Selektin, PSGL-1) exponiert. Ihr Vorhandensein ist für den Rollprozess eine notwendige Voraussetzung [144, 145]. Einerseits sind bestimmte Moleküle besser zugänglich, andererseits wird den Mikrovilli eine Rolle beim Schutz der einzelnen Bindungen vor der Krafteinwirkung zugeschrieben. In Abhängigkeit der angelegten Scherkräfte kommt es zu einer elastischen Ausdehnung der Mikrovilli, welche bei Überschreiten bestimmter Werte in „Tether“-Bildung, d.h. eine fadenförmige Verlängerung, übergeht [146]. Im Vergleich der Rollbewegungen von Mikrobeads und Neutrophilen (vermittelt durch PSGL-1/P-Selektin) wird deutlich, dass die Ausdehnung von Mikrovilli die Stabilität der Interaktion und damit die Lebensdauer der P-Selektin-Bindung erhöht [147]. Die charakteristische ruckelnde Bewegung der Neutrophilen existiert gleichzeitig mit dem Wachstum der Tether, während ein Sprung in der Rollgeschwindigkeit bei Ablösen des Tethers beobachtet wird [148].

Ein Mechanismus, der die Avidität der Interaktion von gering affinen Rezeptoren verstärkt und dabei die Dissoziationsrate verkleinert, ist die **Dimerisierung** oder Oligomerisierung. P-Selektin bildet Homodimere in intakten Plättchen und Endothelzellen [47]. Dimerisierung ist keine Voraussetzung für das Binden an P-Selektin [62]. Unter dynamischen Flussbedingungen stabilisiert die Dimerisierung von P-Selektin und PSGL-1 jedoch Tethering und Rollen (durch höhere Scherresistenz und weniger Schwankungen bei der Rollgeschwindigkeit) [149]. Die Ursache ist wahrscheinlich die erhöhte Möglichkeit von zweiten Bindungen und eine erhöhte Rate der Wiederbindung innerhalb des Bindungsareals, wenn ein Adhäsionspaar dissoziiert. Dieses Prinzip wird noch wirksamer durch das Clustern von PSGL-1 auf den Spitzen der Mikrovilli und die Lokalisierung von P-Selektin in Clustern in Mikrodomänen auf Endothelzellen und möglicherweise Thrombozyten [150].

Die Ligandenerkennung der Selektine wird durch ihre Lektindomäne vermittelt. Die Umwandlung der Ligandenbindung in funktionelle Rollinteraktionen unter den Bedingungen des Scherflusses wird jedoch sowohl durch den extrazellulären Bereich

als auch durch die zytoplasmatische Verankerung streng reguliert [151, 152]. Die Verankerung kann ein mögliches Ausreißen aus der Membran verhindern, Assoziation mit dem Zytoskelett könnte eine Clusterung modulieren oder direkt Tetherbindungen stabilisieren. Die Assoziation von L-Selektin mit dem Zytoskelett stabilisiert die Tetherbildung und erhöht ihre Lebensdauer [153]. Auch für die Funktionsfähigkeit von PSGL-1 ist die Assoziation mit dem Zytoskelett notwendige Voraussetzung [154].

Durch Untersuchung isolierter Selektine oder Liganden in simulierten Scherfeldern konnten die biophysikalischen und molekularen Hintergründe der Selektinwirkung analysiert werden. Wichtige intrinsische Eigenschaften sind die Fähigkeit zur schnellen Assoziation und Dissoziation mit ihren Liganden und eine hohe Flexibilität und Elastizität. Hinzu kommen weitere Mechanismen, wie Schwellenwerte des Scherstress und Ablösen des L-Selektins von der Membran, außerdem Parameter wie Schergrad und Ligandendichte, die auf den Rollvorgang Einfluss nehmen.

Die Rollgeschwindigkeit von Neutrophilen, die auf P-Selektin rollen, steigt mit zunehmendem **Scherstress**. Bei niedrigem Scherstress ist der Anstieg linear und geht dann in eine Plateauphase über. Diese reflektiert den Effekt der Strömung, der eine „ausweichende“ Deformation der rollenden Zelle bewirkt, was in einer größeren Kontaktfläche bzw. Zunahme der Bindungsanzahl bei gleichzeitig geringerer Krafteinwirkung resultiert [155, 156]. Man kann auch sagen, dass mit ansteigendem Scherstress die zunehmende Anzahl der Bindungen die steigende Dissoziationsrate der einzelnen Bindungen ausgleicht. Bei gleichem Scherstress nimmt die Geschwindigkeit mit zunehmender P-Selektin-**Dichte** ab. Eine höhere Anzahl an Interaktionen bildet einen größeren Widerstand für die Zugkraft [5]. Diese Rollparameter gelten auch für das Rollen von Neutrophilen auf E-Selektin [157]. Werden alle drei Selektine hinsichtlich Tethering, Rollgeschwindigkeit und Stabilität der dynamischen Adhäsion verglichen, zeigt sich, dass Neutrophile bei vergleichbarer Moleküldichte auf dem Substrat 7,5- bis 10,5fach schneller auf dem L-Selektin-Ligand CD34 als auf den endothelialen Selektinen rollen, dabei aber ähnliche Tetherereignisse und Stabilität der Adhäsion zeigen [158]. Die **Kinetiken** der Bindungsbildung und -dissoziation sollten daher für L-Selektin schneller sein. In einem zellfreien dynamischen Bindungsassay wurden die Assoziations- und Dissoziationsrate von L-Selektin zu GlyCAM-1 mit $k_{\text{on}} \geq 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ und $k_{\text{off}} \geq 10 \text{ s}^{-1}$ ermittelt [159]. In einer ähnlichen Studie mit löslichem P-Selektin und PSGL-1 wurde $k_{\text{on}} \geq 7 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ und $k_{\text{off}} \geq 1,5 \text{ s}^{-1}$ ermittelt [160]. Diese Daten bestätigen die schnellere Kinetik des L-Selektins. Durch schnelle Reaktionsraten aller drei Selektine wird Rollen als Reaktion auf den hydrodynamischen Fluss erst möglich. Alon et al. bewiesen diese These mit dynamischen in vitro-Untersuchungen [161]. Dabei wurde P-Selektin mit einer so geringen Dichte in eine Bilayerschicht inkorporiert, dass die Zellen nicht rollen, sondern nur transiente Tether (Bewegung, bei der sich kurzes Anhaften der Zellen auf dem Substrat mit Phasen des freien Fließens abwechseln) ausbilden. Dieser Ansatz beruht auf der Annahme, unter diesen Bedingungen Einzelbindungen untersuchen zu können, da transiente Tether die kleinste Einheit der Interaktion darstellen und Eigenschaften haben, die einzelne Bindungen nicht beweisen, aber darauf hindeuten. Rechnerisch erhielten sie aus der Analyse der Tether-Kinetiken einen Wert von $0,95 \pm 0,17 \text{ s}^{-1}$ für k_{off} . Die Dissoziationskonstante ändert sich nicht linear mit Zunahme der Scherbelastung, sondern nimmt im physiologischen Bereich nur moderat zu. Dies weist auf eine hohe Zugfestigkeit der P-Selektin/Kohlenhydrat-Bindung hin. Ebenso haben sie die transienten Tether durch L- und E-Selektin experimentell analysiert und mit den schon vorhandenen Daten für

P-Selektin verglichen. Dabei wurde besonders untersucht, welcher der beiden Mechanismen, intrinsische Kinetik oder „reactive compliance“, für das schnellere Rollen durch L-Selektin verantwortlich ist. „Reactive Compliance“ ist die Empfindlichkeit der Bindungsdissoziation für einwirkende Kräfte. Es wurde festgestellt, dass die intrinsischen Kinetiken von L-Selektin sieben- bis zehnfach schneller als die von E- und P-Selektin sind. Sie verhalten sich proportional zur Rollgeschwindigkeit. L-Selektin-Tetherbindungen sind weniger sensitiv für angelegte Kräfte als E- und P-Selektin-Tetherbindungen. Daher scheint die „reactive compliance“ nicht das schnellere Rollen zu verursachen [162]. Auch mit AFM wurden die intrinsischen molekularen Eigenschaften von P-Selektin/PSGL-1-Komplexen untersucht [163]. Die Dissoziationskonstante variiert hier über drei Zehnerpotenzen von $0,02 \text{ s}^{-1}$ ohne Krafteinfluss bis 15 s^{-1} bei angelegten Kräften. Die Abreißkraft und Lebensdauer der sehr stabilen Bindung ist nicht konstant, sondern abhängig von der angelegten Kraft pro Zeit. Dies wiederum ist ein Produkt der hohen intrinsischen molekularen Elastizität der Moleküle und der externen Zuggeschwindigkeit. Neuere Kraftuntersuchungen gewähren Einsichten in die Art und Weise, wie die zahlreichen H-Brücken, die metallische Ionen-Bindung des Ca^{2+} und andere Interaktionen zur mechanischen Stärke der Selektin/Ligand-Bindung beitragen [164]. Die Dissoziationsraten von PSGL-1, seinen terminalen 19 AS und von sLe^x gegenüber L-Selektin folgen der gleichen Kraftabhängigkeit, so dass die Bindungsstärke wahrscheinlich von der Bindung zwischen einer einzelnen sLe^x -Gruppe und der Lektindomäne dominiert wird. Die häufigsten Abreißkräfte aufgetragen gegen die Ladungsraten (angelegte Kraft pro Zeit) auf einer logarithmischen Skala zeigen zwei unterschiedliche Energiebarrieren, die die Dissoziation unter Krafteinwirkung steuern. Abreißkräfte über 75 pN ergeben sich aus schnellem Abreißen ($< 0,01 \text{ s}$) und könnten aus der Bindung von Ca^{2+} zwischen einem einzelnen sLe^x und der Lektindomäne resultieren. Abreißkräfte unter 75 pN treten bei langsamem Abreißen ($> 0,01 \text{ s}$) auf und werden durch eine äußere Barriere ausgelöst, die offensichtlich aus einer Anzahl schwacher (vermutlich Wasserstoff-) Bindungen gebildet wird.

Über den Einfluss des schnellen proteolytischen Ablösens des L-Selektins von aktivierten Neutrophilen („**Shedding**“) auf den Rollvorgang und die Rollgeschwindigkeit bestehen kontroverse Ansichten. So wurde „Shedding“ zunächst als Rollvoraussetzung definiert, da seine Inhibierung zur Rollverlangsamung und festen Adhäsion führte [165]. Dem widersprach die Aussage einer Neutrophilen-Rollstudie an Endothelzellen [166]. Auch das Ergebnis, dass gereinigtes L-Selektin als Substrat genauso schnelles Rollen erzeugt wie L-Selektin in der Rollzelle, argumentiert für die These, dass intrinsische Eigenschaften des L-Selektins im Gegensatz zum Shedding für die Fähigkeit, Rollen zu vermitteln, verantwortlich sind [167]. Spätere Untersuchungen können schließlich beweisen, dass eine Inhibierung des Sheddings die Leukozytenadhäsion und Transmigration erhöht. Die Kontaktmöglichkeiten der Leukozyten mit dem Endothel werden vergrößert, indem die Rollgeschwindigkeit ab- und der Rollflux zunimmt [168, 169].

Scherstress über einem kritischen Schwellenwert ist Voraussetzung für die Unterstützung und Aufrechterhaltung der rollenden Interaktionen durch L-Selektin („**Threshold phenomenon**“). Unterhalb von ca. $0,5 \text{ dyn/cm}^2$ treten nur transiente Tether auf, die jedoch in keine rollende Bewegung übergehen. Dieses Phänomen wurde zuerst bei L-Selektin in vivo und in vitro festgestellt [170]. Später zeigt sich auch bei den anderen Selektinen in vitro dieser Effekt bei geringerem Scherstress [171]. Eigentlich würde man bei einer Abnahme der Kraft auf die Zelle eine bessere,

keine schlechtere Adhäsion erwarten. Chen et al. [155] erklären das „Threshold phenomenon“ als speziellen Fall des generellen Anstiegs der Bindungszahl mit einer Zunahme der Scherkraft, bei dem die Anzahl der Bindungen unter den Wert Null fällt. Als Hypothese für die vorherrschenden molekularen Mechanismen postulieren sie, dass eine minimale Kraft oder Geschwindigkeit, mit der die Selektine mit ihren Liganden reagieren, notwendig ist, um eine abstoßende Barriere (elektrostatische oder sterische Hüllen um die mucinähnlichen Domänen der Selektin-Liganden) zu überwinden und die Bildung von Bindungen zu begünstigen. Greenberg et al. [172] können den „Threshold“-Effekt auch in einem zellfreien System mit sLe^x-bedeckten Beads wiederfinden, die auf E- oder P-Selektin rollen. Dies argumentiert dafür, dass der Effekt seine Ursache in der molekularen Bindung hat und zelluläre Merkmale wie Deformation nicht beteiligt sind, was somit im Widerspruch zur zuvor genannten Arbeit von Chen et al. steht. Greenberg et al. erklären ihre Ergebnisse mit einer Theorie, nach der die Rate der Kollision zwischen Rezeptor und Ligand mit der Scherrate ansteigt und die Länge des Zusammentreffens abnimmt. Der „shear threshold“ tritt bei Scherraten auf, bei denen diese Effekte ausgeglichen sind. Seine physiologische Bedeutung könnte das Phänomen des „shear threshold“ in dem Verhindern unerwünschter Aggregation und Interaktion mit der Gefäßwand von Leukozyten bei niedrigem Scherstress haben. Dies wäre besonders wichtig in Gefäßen mit an sich geringem Fluss, wie z. B. Sinusoide.

Die hier dargestellten Parameter wurden mit Hilfe von simulierten Scherfeldern in Durchfluskkammern untersucht. Die Vielfalt und Komplexität der dabei ermittelten Einflüsse auf den Rollprozess betont die Wichtigkeit, die Selektine isoliert, aber möglichst nah an ihren physiologischen Gegebenheiten zu untersuchen. Im Gegensatz zu in vivo-Studien berücksichtigen Durchfluskkammern die funktionelle Verbindung der Selektine mit dem Vorhandensein von Fluss und ermöglichen gleichzeitig die Untersuchung des Einflusses einzelner, definierter Parameter. Minimalanforderungen des Rollvorganges sowie zelluläre und molekulare Mechanismen lassen sich ableiten.

2.5 Die Bedeutung der Selektine bei der Hämatopoese

Hämatopoese ist die Bildung von Blutkörperchen (Erythrozyten, Granulozyten, Monozyten, Thrombozyten) aus Blutstammzellen im Knochenmark (KM). Unter normalen physiologischen Bedingungen findet die Hämatopoese in den extravaskulären Kompartimenten des KM statt, wo sich primitive hämatopoetische Stammzellen in unmittelbarer Nachbarschaft mit der Population der Stromazellen, aus denen die hämatopoetische Mikroumgebung besteht, teilen und wo sie reifen. Neben undeterminierten, pluripotenten existieren determinierte, unipotente Stammzellen, aus denen sich nur noch eine einzige Blutzelllinie entwickeln kann, und sogenannte Vorläuferzellen, die in ihrer Differenzierung fortgeschritten, aber noch nicht voll ausgereift sind. Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen (HSVZ) sind also in sich heterogen. CD34 ist ein Oberflächenantigen, das auf ein bis drei Prozent der humanen Knochenmarkszellen vorhanden ist, und als Marker für die Identifizierung und die Separation von HSVZ dient, weil es auf ausdifferenzierten oder reifen hämatopoetischen Zellen nicht vorkommt [173, 174]. Die Zellpopulation, die CD34 exprimiert, ist wiederum in sich heterogen, da die Dichte an CD34 auf frühen Vorläuferzellen am höchsten ist und allmählich bis zu undetektierbaren Werten abnimmt, wenn die Zellen reifen [175]. CD38 ist ein Oberflächenglykoprotein, das auf den meisten primitiven adulten und fetalen CD34⁺-HSVZ des KM fehlt, aber auf deren direkten Nachfolgerzellen, die schon in ihrer Differenzierung determiniert sind,

exprimiert wird [176, 177]. Die CD34⁺CD38⁻-Population umfasst ungefähr 10 bis 20 Prozent der gesamten CD34⁺-Population und ist reich an Multivorläufer- und Stammzellaktivität, daher ist sie auch gut transplantierbar [176, 178, 179].

Sowohl bei normalen physiologischen Prozessen im Zusammenhang mit der Hämatopoese als auch bei der Transplantation von KM und gereinigten HSVZ, findet eine gerichtete Bewegung von Zellen zwischen dem blutbildenden KM und dem peripheren Blutgefäßsystem statt.

Die Stammzellen müssen schon in sehr frühen Entwicklungsphasen die Fähigkeit zu wandern besitzen. Während der embryonalen Entwicklung erfolgt die Bildung der Blutkörperchen zunächst im Mesenchym des Dottersacks und Chorions. Später werden sie in der Leber und zum Teil auch in der Milz gebildet, bevor die Blutbildung schließlich vom roten KM und den lymphatischen Organen übernommen wird. Die reifen Zellen, aber auch Vorläuferzellen [180], wandern aus dem KM in die Blutzirkulation ein (Mobilisierung). Andererseits werden hämatopoetische Vorläuferzellen (HVZ) auch wieder aus dem peripheren Blut in das KM aufgenommen („Homing“). Zelluläre Interaktionen sind daher kritisch für die Regulation der Zirkulation, d. h. von Mobilisierung und „Homing“.

Das aktuelle Wissen über die Adhäsionsmoleküle und die Mechanismen, die das Ein- und Auswandern der Zellen in das KM steuern, ist noch begrenzt. Der Prozess der Extravasation von reifen Leukozyten in entzündliches Gewebe ist hingegen detailliert untersucht. Die Ähnlichkeiten dieser beiden Prozesse laden zu dem Vergleich ein, ob ihnen gemeinsame molekulare Mechanismen zugrunde liegen. Deshalb haben sich verschiedene Untersuchungen mit einer möglichen Beteiligung der Selektine im Zusammenhang mit der Hämatopoese beschäftigt. Die Ergebnisse einer in vivo-Studie weisen direkt auf die gleichzeitige Beteiligung von Selektinen an der Hämatopoese und der Immunabwehr hin: Zusätzlich zu Abnormalitäten im Rollverhalten und der Extravasation von Leukozyten weisen Mäuse, denen E- und P-Selektin fehlt, Veränderungen bei der Hämatopoese auf, die schwere Leukozytose, Granulozytose, erhöhte Werte an hämatopoetischen Zytokinen, Splenomegalie und extramedulläre Hämatopoese in der Leber einschließen [112].

Es gibt wenig Untersuchungen, die das Vorkommen von Selektinen auf Vorläuferzellen und Endothel im KM analysiert haben. E-Selektin wird neben VCAM-1 unter physiologischen Bedingungen konstitutiv und selektiv auf dem Endothel von hämatopoetischen Organen exprimiert [112, 181, 182]. Außerdem gibt es Hinweise auf die konstitutive Expression von E- und P-Selektin in Venülen des murinen KM in Abwesenheit einer Entzündung [183]. L-Selektin wird konstitutiv auf hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert [184, 185]. Asosingh et al. [186] ermitteln im Vergleich der Profile von Adhäsionsmolekülen auf mobilisierten CD34⁺-Zellen und entsprechenden Zellen im KM weniger L-Selektin im KM. Eine unterschiedliche Expression von Selektin-Liganden auf den HSVZ könnte ein Mechanismus sein, der entscheidet, welche Zellen am effektivsten in und aus dem KM wandern können. Primitive humane HVZ exprimieren PSGL-1 und binden an P-Selektin [187]. Bei der Untersuchung der P-Selektin-vermittelten Bindung Thrombin-aktivierter Plättchen an CD34⁺-Zellen in humanem Blut und KG1a-Zellen adhären ungefähr 85 bis 95 Prozent der Plättchen in beiden Fällen. Auch hier wird PSGL-1 auf CD34⁺-Zellen als Ligand für P-Selektin identifiziert. Wahrscheinlich existieren funktionale Unterschiede zwischen reifen und Vorläuferzellen in der Regulation der Oberflächenexpression von PSGL-1 [188]. PSGL-1 fungiert als einziger Rezeptor für P-Selektin auf primitiven humanen CD34⁺CD38⁻-Vorläuferzellen. Durch diese Interaktion wird die Proliferation der Vorläuferzellen unterdrückt [189]. Spertini et al.

[190] finden PSGL-1 als Ligand für L-Selektin auf CD34⁺-HVZ. Weitere Beweise für die Expression von PSGL-1 auf humanen hämatopoetischen Vorläuferzellen liefern Sackstein et al. [191]. Zusätzlich finden sie L-Selektin und einen Liganden für L-Selektin.

Es gibt bisher nur wenige Arbeiten, die Wechselwirkungen von Stamm- und Vorläuferzellen mit Selektinen unter Flussbedingungen untersuchen. Aus KG1a-Zellen isoliertes CD34 vermittelt das Rollen und Tethering von Lymphozyten durch Interaktion mit L-Selektin auf deren Oberfläche [88]. Wegen der absehbaren Unterschiede zwischen CD34⁺-Knochenmarkszellen und KG1a-Zellen, besonders in Bezug auf ihre Ausstattung mit Kohlenhydrat-Strukturen, ist es unklar, ob diese Ergebnisse auf Zellen aus dem KM zu übertragen sind. Eine andere Untersuchung zeigt, dass das Rollen von CD34⁺-Zellen aus dem peripheren Blut auf primären und transformierten humanen Endothelzellen aus dem KM abhängig von E-Selektin geschieht [192]. CD34⁺-Zellen können in einer Flusskammer auf endothelialen Selektinen rollen und Integrin-vermittelt anhaften [193]. Greenberg et al. [194] haben die Interaktion von HSVZ aus reifem KM und fetaler Leber mit immobilisiertem E-, P- und L-Selektin unter Flussbedingungen untersucht. Die untersuchten HSVZ besitzen Ca²⁺-abhängige Liganden für alle drei Selektine. CD34⁺-Zellen rollen effizienter (d. h. mehr Zellen rollen und diese mit langsamerer Geschwindigkeit) als stärker differenzierte CD34⁻-Zellen. Dieser Unterschied wird besonders auf L- und P-Selektin deutlich. Analog wird eine stärkere Rolleffizienz bei CD34⁺CD38⁻-Zellen im Vergleich mit determinierten Vorläuferzellen, die CD34 und CD38 präsentieren, beobachtet. Die Entwicklungsreife der HSVZ korreliert daher mit der Rolleffizienz auf den Selektinen. Diese Unterschiede im Selektin-vermittelten Rollen können bei der Separation und Anreicherung von HSVZ aus dem Knochenmark genutzt werden [195].

In jüngster Zeit sind die Selektine direkt mit dem „Homing“ von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen in das KM in Verbindung gebracht worden [183, 194, 196]. Der erste Schritt bei der Ansiedlung von HVZ im KM ist das „Homing“. HVZ aus dem peripheren Blut finden über Adhäsionsmoleküle Kontakt mit dem Endothel des KM, welches sie überwinden, bevor sie an die extrazelluläre stromale Matrix des KM adhären. Auf das „Homing“ folgen Proliferation und Differenzierung der Zellen in den extravaskulären Räumen des KM. Die für das „Homing“ in das KM verantwortlichen Moleküle auf der Oberfläche der HVZ sind zur Zeit noch unbekannt. Die bisherigen Daten deuten jedoch eine Beteiligung von PSGL-1 und möglicherweise CD34 an. Knock-out-Mäuse ohne E- und P-Selektin zeigen defektes „Homing“ von HVZ in das KM, was mit einer erhöhten Sterblichkeit dieser Mäuse nach Bestrahlung korreliert [196]. Der Mangel an E- und P-Selektin führt zur Elimination des Rollens von HVZ auf dem Endothel. Mazo et al. [183] zeigen in vivo, dass HVZ in den Sinusoiden und Venülen des KM, aber nicht in angrenzenden Knochengefäßen, rollen. L-Selektin war im Gegensatz zu E- und P-Selektin am Prozess des Rollens nicht beteiligt. Auch unter Verwendung von in vitro-Assays für die Adhäsion, Migration und die klonogene Kapazität von CD34⁺-Stammzellen kann eine Einflussnahme von L-Selektin auf das „Homing“ nicht bestimmt werden [197]. Endotheliale Selektine könnten die Mobilisierung von Vorläuferzellen auf zwei verschiedene Arten beeinflussen. Es ist möglich, dass im Gleichgewicht oder während einer Mobilisierung die Bewegung zwischen KM und Blut in beide Richtungen stattfindet. Da die Selektine eine Funktion beim „Homing“ von Vorläuferzellen in das KM haben [196], könnte die Blockade oder das Fehlen der endothelialen Selektine verhindern, dass die Zellen wieder in das KM gelangen, und daher das Gleichgewicht

auf die Seite der zirkulierenden Zellen verschieben. Mit dem Mechanismus der Mobilisierung, d. h. der direkten Freisetzung von reifen myeloiden Zellen aus dem KM, haben sich Frenette und Weiss [198] befasst. Sie haben in vivo die Beteiligung von Selektinen und sulfatierten Glykanen als Inhibitoren der Selektinfunktion bei der Mobilisierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen aus dem KM in das Blut untersucht. Dabei fanden sie eine Erhöhung der Zahl zirkulierender HVZ bei Fehlen von endothelialen Selektinen (P- und E-) oder bei Blockade der Selektinfunktion. Zusätzlich zu den beschriebenen dynamischen Prozessen bei der Blutbildung und –regulation sollen die Selektine neben anderen Adhäsionsmolekülen den Kontakt zwischen Vorläuferzellen, Stromazellen und Bestandteilen der extrazellulären Matrix herstellen und aufrechterhalten sowie Funktionen bei der Kontrolle des Wachstums und der Entwicklung primitiver hämatopoetischer Zellen haben [199].

2.6 Pathologie der Selektine

Eine pathologische Expression und damit Einflussnahme auf den Krankheitsverlauf durch die Selektine konnte bei verschiedenen Entzündungserkrankungen (2.6.1), der Angiogenese (2.6.2) und der Tumormetastasierung (2.6.3) festgestellt werden.

2.6.1 Pathologie der Entzündung

Eine lokal überschießende Ansammlung von Leukozyten im Gewebe kann zur Pathogenese von Entzündungen beitragen. Eine Dysregulation der Selektine wird bei entzündlichen Erkrankungen wie der Atherosklerose, der myokardialen und zerebralen Ischämie, Schock, Thrombose, diabetischen Gefäßschäden oder der rheumatoiden Arthritis beobachtet und mitverantwortlich für den Krankheitsverlauf gemacht.

Im Verlauf der Atherosklerose verursacht die Akkumulation von cholesterolreichen Lipoproteinen in der Gefäßwand eine entzündlich-fibrotische Reaktion. Monozyten wandern in das Gewebe ein, um das eingedrungene Material aus Lipiden und Cholesterol aufzunehmen und oxidativ zu zerstören. Letztendlich kommt es zur Lumeneinschränkung und zum Elastizitätsverlust der Arterien.

Die auftretende Gewebeinvasion von Monozyten wird entscheidend durch P-Selektin vermittelt, das – durch oxidiertes „Low Density Lipoprotein“ (ox. LDL) induziert – verstärkt von den Endothelzellen exprimiert wird. Die verstärkte Bildung von P-Selektin und anderen Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, VCAM-1) unter erhöhten ox. LDL-Konzentrationen und deren Korrelation mit der Entstehung von arteriosklerotischen Plaques konnte in Tierexperimenten eindeutig nachgewiesen werden [200]. Mäuse, denen Apolipoprotein E fehlt, sind bei zusätzlichem Mangel an P- und E-Selektin vor der Ausbildung einer atherosklerotischen Läsion geschützt [201]. Auch Dong et al. [202] weisen P-Selektin eine Schlüsselposition im Prozess der Rezeptor-vermittelten Einwanderung von Leukozyten in Läsionen und beim Fortschreiten der Atherosklerose in Mäusen ohne Apolipoprotein E zu.

Eine verstärkte Expression von E-Selektin auf Endothelzellen in Plaque-Herden steht ebenfalls im Zusammenhang mit der Pathogenese der Atherosklerose [203]. Zwei Mutationen im E-Selektin-Molekül, die häufig bei jungen Patienten mit schwerer koronarer Atherosklerose vorkommen, beeinträchtigen in vitro die Funktionsfähigkeit von E-Selektin [204]. Eriksson et al. [141] sehen mit Hilfe von intravitraler Mikroskopie „Secondary Capture“ von Leukozyten auf atherosklerotischen Läsionen und liefern damit Hinweise auf eine Rolle von L-Selektin bei der Akkumulation von Leukozyten im atherogenetischen Prozess.

Weitere Studien beziehen sich auf die Serumkonzentration der Selektine, weil man davon ausgeht, dass die sezernierten Formen von Adhäsionsmolekülen mengenmäßig die Expression in den atherosklerotischen Plaques widerspiegeln. Die Ergebnisse sind nicht einheitlich. Eine erhöhte Konzentration an löslichem P-Selektin im Blut gehört nicht zu den Risikofaktoren für eine Atherosklerose, kann aber als Marker für das Fortschreiten der Erkrankung bei Patienten dienen, die einen Herzinfarkt überlebt haben [205]. Die Daten von Hwang et al. [206] deuten an, dass E-Selektin ein molekularer Marker für Atherosklerose und die Progression von Koronarinsuffizienz ist. Bei Patienten mit stabiler koronarer arterieller Erkrankung scheint der Plasmaspiegel an E-Selektin die Schwere der systemischen Atherosklerose zu reflektieren [207]. Peter et al. [208] finden jedoch, dass die Menge an zirkulierendem E- und P-Selektin nicht mit dem Ausmaß der atherosklerotischen Veränderungen korreliert.

Als Schlaganfall oder Apoplexie wird eine plötzlich auftretende Unterbrechung der zerebralen Sauerstoffversorgung (Ischämie) im Gehirn, verursacht durch massive Blutung oder Verschluss atherosklerotisch veränderter Gefäße, bezeichnet. Beim Herzinfarkt kommt es aufgrund von Durchblutungsstörungen im Koronarsystem zu einer mangelhaften Sauerstoffversorgung des Myokards und irreversiblen Schaden des betroffenen Gewebeteils.

In der Folge von myokardialen und zerebralen Ischämien kann es nach Wiederherstellung der Gefäßdurchblutung (Reperfusion) zu einer pathologischen akuten Entzündung kommen, bei der Leukozyten verstärkt in das Gewebe einwandern [209].

In der Pathogenese des Gewebes Schadens nach einer Ischämie und Reperfusion ist eine schädliche Rolle von P- und E-Selektin festgestellt worden. Eine Blockade der Selektinfunktion könnte deshalb therapeutisch wirksam bei der Behandlung von Schlaganfall und Herzinfarkt Anwendung finden. Tatsächlich führten therapeutische Strategien, die auf eine Reduzierung der Akkumulation von Neutrophilen oder Beeinträchtigung ihrer Funktion zielten, im Experiment zu nützlichen Effekten [210]. Die Expression von P-Selektin steigt beim Schlaganfall in den betroffenen Gebieten an. In P-Selektin-defizienten Mäusen kommt es zu einem verminderten Einwandern von Neutrophilen in das entsprechende Gewebe bei gleichzeitig stärkerem postischämischen Fluss verglichen mit „wild-type“-Mäusen [211]. Weyrich et al. [212] stellen in vivo fest, dass die Adhäsion von Leukozyten über P-Selektin an das Endothel eine wichtige frühe Erscheinung bei Reperfusionsverletzungen am Herzen ist. Ein gegen P-Selektin gerichteter Antikörper verhindert dabei myokardiale Nekrosen deutlich.

Eine erhöhte Expression von E-Selektin tritt im ischämischen zerebralen Gefäßsystem vier Stunden nach der Reperfusion auf und hält 24 Stunden an. Antikörper gegen E-Selektin erhöhen den Durchfluss, reduzieren dosisabhängig die neurologischen Defizite, Sterblichkeit und Infarktausmaße. Außerdem verringert die Gabe von Antikörpern die Akkumulation von Neutrophilen im Gehirn [213]. E-Selektin kann durch intranasale Gabe eine immunologische Toleranz auslösen und dadurch die Entwicklung von ischämischen und hämorrhagischen Schlaganfällen bei Ratten mit unbehandeltem Bluthochdruck wirksam verhindern [214].

An Liposomen gekoppeltes sLe^x vermindert myokardiale Nekrosen in vivo und bewahrt die endotheliale Funktion der koronaren Gefäße nach Ischämie und Reperfusion. Dabei scheint die initiale Interaktion zwischen Leukozyten und Endothel und die nachfolgende Akkumulation im ischämischen Herzgewebe inhibiert zu werden [215].

Schock ist ein globales, komplexes Kreislaufversagen, das infolge eines Missverhältnisses zwischen Herzzeitvolumen und aktuellem Durchströmungsbedarf der Organe bzw. ihrer Teilkreisläufe auftritt und sich zunächst als Störung der Makrozirkulation manifestiert und dann zu Störungen der Mikrozirkulation und deren Folgen führt. Ein hämorrhagischer Schock (HS) und die nachfolgende Wiederdurchblutung können also als systemische Ischämie und Reperfusion betrachtet werden. Die Interaktion zwischen Leukozyten und Endothel spielt daher auch bei der Pathogenese des Schocks eine wichtige Rolle. Charakteristisch ist eine inflammatorische Reaktion in betroffenen Geweben, die mit erhöhter Adhäsion und Infiltration von Neutrophilen einhergeht. Die pathophysiologischen Veränderungen sind für Organschäden verantwortlich und können in multiplem Organversagen münden. Eine Fehlfunktion der Leber tritt zu einem frühen Zeitpunkt auf.

Die Untersuchung der Expression von P-Selektin *in vivo* nach der Aufhebung eines HS zeigt eine Hochregulierung in lebenswichtigen Organen [216, 217]. P-Selektindefiziente Mäuse sind vollständig vor der nachteiligen Schockwirkung durch PAF geschützt, da sie keine intestinalen Schäden aufweisen und nicht sterben [218]. Mit Hilfe von intravitale Mikroskopie wird deutlich, dass die rekombinante, lösliche Form von PSGL-1 den akuten Schockzustand verbessern kann, indem die Selektinvermittelte Interaktion zwischen Endothelzellen und Leukozyten auf funktioneller und molekularer Ebene unterdrückt wird [219]. Die Blockade von P-Selektin bei HS verhindert die Akkumulation von Leukozyten und führt im Tierexperiment zu weniger Gefäßschäden, vermindertem hepatozellulärem Schaden und erhöhter Überlebensrate [220-222].

Auch die Blockade von L-Selektin bei HS schützt vor Reperfusionsverletzungen und hat eine positive Wirkung auf die hepatozellulären Verletzungen und die Überlebensrate [223-225].

Die gleichzeitige Blockade aller Selektine mit einem Mannose-haltigen sLe^x-Mimetikum (TBC-1269) stützt die Vorstellung, dass alle Selektine für die Pathogenese des HS wichtig sind. Der durch die Inhibierung der Selektine ausgeübte Schutzmechanismus scheint sich auf die Infiltration der Leber mit Neutrophilen zu zentrieren [226].

Die Thrombose ist eine Blutpfropfbildung, bzw. intravasale Blutgerinnung, die meist in Venen, aber auch in Arterien, zur Verengung und zum Verschluss der betroffenen Blutgefäße oder auch zu einer Embolie (Verschleppung des Blutgerinnsels) führen kann.

Die Ergebnisse von Ikeda et al. [227] unterstützen die Vorstellung, dass die Interaktion zwischen P-Selektin auf Plättchen und sLe^x auf Leukozyten eine wichtige Rolle bei der Plättchen-vermittelten Bildung von Thromben spielt. Die Abschwächung des thrombotischen Verlaufs nach venöser Stase durch die Gabe einer rekombinanten, löslichen Form von PSGL-1 - bei Fehlen einer Wirkung auf den Leukozyten-vermittelten Endothelschaden - deutet auf einen antithrombotischen Wirkungsmechanismus für dieses Protein hin [228]. Die Blockade von P-Selektin durch rPSGL-1 resultiert in einer dosisabhängigen Abnahme der Thrombose und einer Zunahme der spontanen Rekanalisation [229].

Venöse Thrombosen induzieren schädliche Entzündungsreaktionen in der Venenwand. *In vivo* schwächt die kombinierte Blockade von P-Selektin und TNF das Ausmaß der Einwanderung von Neutrophilen in die Gefäßwand nach einer Okklusion ab [230]. Ein Antikörper gegen P-Selektin vermindert im Tierexperiment Entzündungsprozesse in der Venenwand und die Bildung von Thromben [231].

Bei Patienten mit tiefen Venenthrombosen werden erhöhte Spiegel an löslichem P-Selektin gefunden, die einen allgemeinen hyperkoagulatorischen Zustand reflektieren könnten. Dieser könnte die Ursache für exzessive Plättchenaktivierung sein [232]. Bei Knieoperationen könnte P-Selektin als Marker für das Risiko von tiefen Venenthrombosen dienen, da radiologisch detektierte Venenthrombosen mit einer erhöhten Anzahl an aktivierten Plättchen einhergehen [233].

Diabetische Gefäßschäden (Angiopathie) sind die häufigste Komplikation eines länger bestehenden Diabetes mellitus. Als Makroangiopathie wird eine generalisierte Arteriosklerose mit bevorzugter Beteiligung des Gehirns, des Herzens, der Nieren und der peripheren Gefäße bezeichnet. Mikroangiopathie ist ein Schaden im Bereich der Kapillargefäße mit Ablagerung von Mucopolysacchariden in der Basalmembran. Sie manifestiert sich als Retinopathia diabetica, Nephropathia diabetica, als Hautgangrän, diabetische Polyneuropathie.

Dauerhaft erhöhte Glukosekonzentration im Blut wirkt sich in Form von oxidativem Stress auf die Endothelzellen aus, die mit der Expressierung von E-Selektin und anderen Adhäsionsrezeptoren reagieren. Dies begünstigt die Bindung und Einwanderung von Monozyten. Eine besondere Rolle spielen hier „Advanced Glycation Endproducts“ (AGE). Diese entstehen als irreversible Produkte bei der Reaktion von Glukose mit Aminogruppen der Serumproteine. Durch Bindung an spezielle Oberflächenrezeptoren aktivieren sie den Transkriptionsfaktor κ B und lösen die Bildung der Selektine aus [234]. Glomerulus-spezifische Expression von E-Selektin ist in Zusammenhang mit der Entstehung einer diabetischen Nephropathie gebracht worden [235].

Zwei Studien deuten daraufhin, dass lösliches E-Selektin als Parameter für die Wirksamkeit der Therapie chronischer Hyperglykämie auf die endotheliale Aktivierung dienen könnte. Der Grad der Konzentrationsabnahme an löslichem E-Selektin korreliert mit einer Verbesserung der Insulin-Sensitivität durch therapeutische Korrektur (mit Diät, Sulfonylharnstoff oder Insulin) der Hyperglykämie [236]. Das Ausmaß der Abnahme scheint abhängig vom Grad der Glykämie-Normalisierung zu sein [237].

Die Plättchen von Patienten mit Diabetes reagieren möglicherweise empfindlicher auf eine Hyperglykämie. Bei Personen mit schwachem Diabetes mellitus Typ II kommt es beim oralen Glukosetoleranztest zu einem höheren Anstieg von löslichem P-Selektin im Plasma [238]. Auch der Basiswert an zirkulierendem P-Selektin ist bei Patienten, bei denen ein insulinabhängiger Diabetes mellitus neu diagnostiziert wurde, erhöht. Der hohe Plasmaspiegel deutet zusammen mit physiologischen Werten für E-Selektin auf eine Plättchen-Aktivierung während der Initialphase des Autoimmunprozesses hin [239]. Dies stimmt mit der gefundenen erhöhten Expression von P-Selektin auf Plättchen überein [240].

Andere Untersuchungen sehen keine Bedeutung für P- und E-Selektin als Markerproteine, da ihre Konzentration im Blut scheinbar nicht mit dem Risiko, makrovaskuläre Schäden zu erleiden, assoziiert ist [241], und da kein Unterschied in der Serumkonzentration an E-Selektin zwischen diabetischen Patienten mit oder ohne Makroangiopathie und gesunden Kontrollpersonen besteht [242].

L-Selektin könnte ein Markermolekül für die autoimmune Destruktion der Inselzellen und seine sequentielle Messung daher nützlich sein, um den Verlauf der Erkrankung zu verfolgen [243].

Fettleibigkeit verursacht möglicherweise auch eine Aktivierung des Endothels oder eine gesteigerte Ablösung von E-Selektin von der Zelloberfläche, was zu einem

Anstieg der Plasmaspiegel führt. Die Serumwerte korrelieren hier eng mit einem Anstieg des gesamten Fettvolumens im Körper [244].

Mit einer Prävalenz von ein Prozent in der Bevölkerung ist die rheumatoide Arthritis die häufigste Erkrankung des rheumatoiden Formenkreises. Kennzeichen sind vor allem entzündliche Gelenkschwellungen. Die auslösenden Ursachen sind nicht bekannt, vermutet werden jedoch pathologische Reaktionen des Immunsystems. Besser bekannt sind die pathophysiologischen Vorgänge. Es kommt zur Entzündung der Synovialmembran (Gelenkinnenhaut). Im gesunden Gelenk umfasst die Synovialmembran nur etwa ein bis zwei Zellschichten. Bei der rheumatoiden Arthritis kommt es perivaskulär zu einer starken Infiltration von phagozytierenden Leukozyten. Die Synovialmembran hyperplasiert und lagert sich an Knochen und Knorpel an. Die Synovialzellen setzen dabei eine Vielzahl von Entzündungsmediatoren (IL-1, TNF- α) frei, die zu einer nachhaltigen Störung der Bindegewebshomöostase führen und einen chronischen Entzündungsprozess unterhalten. Es kommt zum damit verbundenen Abbau von Knochen- und Knorpelgewebe (destruktive Enzyme aus Phagozyten). Letztendlich geht man davon aus, dass das Krankheitsgeschehen durch eine Störung im Gleichgewicht verschiedener Zytokine sowie deren Inhibitoren unterhalten wird. IL-1 spielt eine zentrale Rolle, da es unter anderem die Bildung von Adhäsionsmolekülen (E-Selektin) auf Endothelzellen und anderen Zellen im Gelenkspalt bewirkt. Obwohl die molekularen Mechanismen nicht so intensiv wie bei anderen Erkrankungen untersucht wurden, konnte eine starke Anreicherung von E-Selektin im rheumatoiden Gewebe und damit dessen aktive Rolle in der Pathogenese nachgewiesen werden [245, 246]. Die Expression von E-Selektin kann als Indikator für aktive Entzündung und Zellwanderung dienen, weil Antikörper gegen E-Selektin entzündliche Bereiche, z. B. Gelenke, sichtbar machen können [247]. Antirheumatische Substanzen üben möglicherweise einen Teil ihrer Wirkung auf die Adhäsion von polymorphkernigen Neutrophilen (PMN) an Endothelzellen aus. Sie verringern in vitro die Fähigkeit von HUVEC, E-Selektin zu exprimieren, reduzieren die Zytokin-gesteuerte Adhäsion und die Expression von E-Selektin [248].

2.6.2 Beteiligung der Selektine an der Angiogenese

Unter Angiogenese versteht man die Bildung neuer kapillärer Blutgefäße ausgehend von bestehenden vaskulären Strukturen. Dabei müssen sich Endothelzellen vermehren, wandern und neue röhrenförmige Strukturen ausbilden. Die Angiogenese spielt bei vielen physiologischen Prozessen eine Rolle, beispielsweise bei der Fortpflanzung, der Embryonalentwicklung oder der Wundheilung. Reguliert wird die Angiogenese sowohl räumlich als auch zeitlich durch ein koordiniertes Zusammenspiel von Aktivatoren und Inhibitoren. Zu den Aktivatoren gehören Zytokine (TNF- α , IL-8), Matrixproteine (Fibrin, Laminin) und Wachstumsfaktoren (vaskulärer Endothel-Wachstumsfaktor, Fibroblasten-Wachstumsfaktor). Gehemmt wird sie z. B. durch das Matrixprotein Thrombospondin und den Plättchenfaktor 4. Ein Ungleichgewicht zwischen Aktivatoren und Inhibitoren ist mit dem Wachstum von Tumoren und entzündlichen Erkrankungen (z. B. rheumatoide Arthritis) assoziiert. Tumore sind bei ihrem Wachstum auf die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff angewiesen. Um diese Versorgung zu erhalten, stimulieren primäre Tumorzellen die Angiogenese und bauen dadurch ein Netzwerk von kapillären Blutgefäßen um sich herum auf.

Es wird vermutet, dass E- und P-Selektin auf Endothelzellen oder als lösliche Form im Blut am Prozess der Angiogenese beteiligt sind.

In verschiedenen Studien ist die Expression der Selektine auf Endothelzellen im Zusammenhang mit angiogenetischen Prozessen analysiert worden: E-Selektin auf Endothelzellen ist unter in vitro-Bedingungen an der kapillären Röhrenbildung beteiligt [249]. Kraling et al. [250] finden eine vorzugsweise Expression von E-Selektin in der proliferativen Phase von Hämangiomen. Im Gegensatz dazu kann E-Selektin auf ruhendem Endothel nicht, aber wiederum auf sich teilenden mikrovaskulären Endothelzellen in der Plazenta und in der neonatalen Vorhaut, zwei Gewebearten mit fortwährendem Wachstum von Mikrogefäßen, detektiert werden. Unter nicht-inflammatorischen Bedingungen korreliert eine erhöhte Expression an E-Selektin mit der zellulären Proliferation und dem Entwicklungsstand der Zellen (G2/M Phasen des Zellzyklus). P-Selektin scheint hingegen nicht über den Wachstumszustand der Endothelzellen reguliert zu werden [251]. Angiostatin, ein potenter Inhibitor der Angiogenese, reguliert in vitro selektiv E-Selektin in proliferierenden Endothelzellen hoch. Die Expression von P-Selektin wird jedoch nicht beeinflusst [252]. Dasselbe Verhalten weisen Endothelzellen auf, die mit dem Angiogenese-Inhibitor AGM-1470 behandelt wurden [253]. Der Wachstumsfaktor VEGF induziert die Angiogenese, indem er die Expression von E-Selektin auf vaskulären Endothelzellen verstärkt [254].

Aktiviert polymorphkernige Leukozyten sind bei pathologischen Zuständen möglicherweise nicht nur für Gewebeschäden verantwortlich, sondern könnten auch als Regulatoren für die Angiogenese fungieren. Sie induzieren in vitro die Angiogenese, dabei scheint die Adhäsion über E-Selektin ein Teil des dazugehörigen Mechanismus zu sein [255]. E-Selektin wirkt bei der Bildung von röhrenähnlichen Strukturen in Kulturen von Endothelzellen mit [256].

Folgende Untersuchungen haben sich mit der Rolle von löslichen Selektinen im Prozess der Angiogenese beschäftigt: Hebbar et al. [257] berichten von einem negativen Verhältnis zwischen löslichem E-Selektin in der Zirkulation und der Anzahl von Blutgefäßen im Tumor bei Patienten mit primärem nicht-entzündlichem Brustkrebs. Auch Wittig et al. [258] finden eine erhöhte Serumkonzentration bei Patienten mit metastasierenden Tumoren, die unabhängig von einer Entzündung auftritt. Außerdem soll rekombinantes, humanes, lösliches E-Selektin die Chemotaxis von HUVEC und humanen mikrovaskulären Endothelzellen der Haut stimulieren. In vivo verursacht rekombinantes E-Selektin eine Neovaskularisation, wenn es in Rattenkornea implantiert wird [259]. Im Gegensatz dazu schließen Hebbar und Peyrat [260] einen Zusammenhang von löslichem E-Selektin und endothelialer Aktivierung mit dem Angiogeneseprozess aus. P-Selektin könnte auf vaskulärer Ebene beim Auftreten von Veränderungen an der extrazellulären Matrix zur Angiogenese beitragen, indem es die Wanderung von Endothelzellen dosisabhängig fördert [261]. Die Rolle von P-Selektin scheint insgesamt gesehen jedoch weniger bedeutend zu sein als die von E-Selektin.

Dem sLe^x analoge Substanzen verhindern die Wanderung und Vermehrung von Endothelzellen in vitro und in vivo (Chorionallantoismembran im Hühnchen) inhibierend [262].

Die bisher genannten Studien argumentieren für eine Beteiligung von E-Selektin und in geringerem Maße auch von P-Selektin bei der Angiogenese, insbesondere der tumorassoziierten, und die Inhibierung des angiogenetischen Prozesses durch lösliches E-Selektin oder Inhibitoren von E-Selektin. Die Rolle von E- und P-Selektin bei der Angiogenese in vivo verbleibt jedoch unklar, da defiziente Mäuse sich normal entwickeln und bei experimentell induzierter Angiogenese neue Blutgefäße in der

Kornea ausbilden können [263, 264]. Diesen Widerspruch erklären könnte ein alternativer Mechanismus, der den Mangel an E- und P-Selektin kompensiert.

2.6.3 Beteiligung der Selektine an der Metastasierung

Tumorzellen vieler maligner Erkrankungen metastasieren ausgehend vom Primärtumor über das Gefäßsystem an andere Stellen im Organismus. Die Bildung von Metastasen ist ein komplexer Vorgang, der aus mehreren Teilschritten besteht:

1. Ablösung der Tumorzellen vom Primärtumor und Einwanderung in umliegendes Gewebe über die Adhäsion an Komponenten der extrazellulären Matrix
2. Zerstörung der Matrix durch die hydrolytische Aktivität der Tumorzellen und anschließende Migration in das Gefäßsystem
3. Verbreitung über den Blut- oder Lymphfluss, Umgehen der körpereigenen Immunabwehr und Anhaften an einer geeigneten Stelle der Gefäßwand in der Mikrozirkulation
4. Invasion durch das Endothel und die extrazelluläre Matrix in das darunter liegende Parenchym [81, 265, 266].

Wesentliche Schritte in der metastatischen Kaskade sind das Verlangsamens der Tumorzellen und das anschließende Anhaften am vaskulären Endothel in der Mikrozirkulation, welche der Extravasation aus dem Blutstrom vorausgehen müssen. Die Mechanismen, die bei der Adhäsion der Zellen an das Endothel eine Rolle spielen, sind noch nicht vollkommen aufgeklärt. Zur Zeit ist es umstritten, ob Tumorzellen in kleinen Gefäßen einfach mechanisch (unspezifisch) „stecken bleiben“ oder aufgrund spezifischer Interaktion zwischen Tumorzelle und Endothel adhären [267-269]. Es wird jedoch angenommen, dass Krebszellen -zumindest in einigen Fällen- ähnlich wie Leukozyten an das Gefäßendothel adhären können [270, 271]. Unter Annahme dieser Hypothese sind bisher viele in vitro- und in vivo-Untersuchungen durchgeführt worden.

In statischen in vitro-Experimenten wurde die Adhäsion von Krebszellen an immobilisierte Selektine oder an Endothelzellen analysiert. Teilweise wurde dabei auch die Expression von möglichen Selektin-Liganden auf Tumorgewebe und Tumorzellen untersucht. Die Kohlenhydratepitope sLe^a und sLe^x, die in Clustern auf Mucin-Molekülen präsentiert werden und als Liganden für Selektine funktionieren, werden auch auf Krebszellen exprimiert [272-276].

Am häufigsten sind statische Bindungsstudien, die sich mit der Adhäsion von Karzinomen aus dem Kolon an E-Selektin beschäftigen. Hier ist auch zuerst ein Zusammenhang zwischen dem metastatischen Verhalten und der Expression von sLe^x beobachtet worden [277].

Die folgende Tabelle (Tab.2) zeigt eine Auswahl von acht Studien, in denen unter in vitro-Bedingungen die Rolle von E-Selektin bei der Metastasierung von Tumorzellen aus dem Kolon untersucht wurde.

Studie	Ergebnis
[278]	Sieben Kolonkarzinom-Zelllinien binden an E-Selektin auf aktiviertem Endothel.
[274]	Kolonkrebszellen binden über sLe ^x und sLe ^a an E-Selektin.
[275]	Epitheliale Tumorzellen aus dem Kolon binden über sLe ^a an E-Selektin.
[279]	Kolon-Tumorzellen binden über sLe ^x an E-Selektin. Mit einer verstärkten Expression von sLe ^x steigt das metastatische Potential an.

[280]	Zellen mit unterschiedlicher sLe ^a -Expression sind aus einer heterogenen humanen Kolonkrebs-Zelllinie isoliert worden. Der Expressionsgrad korreliert mit der Adhäsion an aktivierte HUVEC. Die Zellen mit erhöhtem sLe ^a -Besatz verursachen bei Inokulation in die Milz Metastasen in der Leber.
[281]	Humane Kolonkrebszellen mit erhöhter sLe ^x -Expression binden stärker an E-Selektin auf aktiviertem Endothel. Auch ihre Metastasierungsfähigkeit in die Leber ist größer. Patienten mit sLe ^x -positiven Tumoren haben eine geringere Überlebensrate.
[282]	Kolonkarzinom-Zellen (HT-29) binden E-Selektin-abhängig an aktivierte HUVEC.
[283]	Die Adhäsion von Tumorzellen an Endothel wird von E-Selektin und sLe ^x vermittelt. Die Bindung setzt Signaltransduktionswege in Gang, die möglicherweise die metastatischen Eigenschaften beeinflussen.

Tab. 2: In vitro-Studien, in denen die Rolle von E-Selektin bei der Metastasierung von Tumorzellen aus dem Kolon untersucht wurde

Es kristallisiert sich heraus, dass Tumorzellen aus dem Kolon über sLe^x oder sLe^a an E-Selektin binden können. Die Expression der Liganden auf der Tumorzelle korreliert mit dem metastatischen Verhalten der Tumorzellen.

Kolonkrebs ist jedoch nicht die einzige Tumorart, deren metastatisches Verhalten möglicherweise durch E-Selektin beeinflusst wird.

Sieben in vitro-Untersuchungen anderer Krebsarten sind in der nächsten Tabelle dargestellt (Tab. 3).

Studie	Tumorart	Ergebnis
[278]	Melanom Osteosarkom Lunge Zervix Niere	Zelllinien aus Melanomen, Osteosarkomen, Lunge, Zervix oder Niere zeigen im Gegensatz zu Kolonkarzinom-Zelllinien keine Adhäsion an E-Selektin auf aktiviertem Endothel. Dies impliziert verschiedene und spezifische Mechanismen für die Adhäsion von Tumorzellen an Endothel.
[275]	Lunge Leber Leukämie	Tumorzellen aus Lunge und Leber binden über sLe ^x an E-Selektin auf HUVEC. Von 12 humanen Leukämie-Zelllinien binden nur drei (über sLe ^a) an E-Selektin.
[284]	Leber	Leberkrebszellen (HepG2) binden via sLe ^x an ihrer Oberfläche an E-Selektin auf HUVEC.
[285]	Brust	Sechs Brustkrebs-Zelllinien exprimieren sLe ^x , zwei zusätzlich sLe ^a . Die Adhäsion an E-Selektin auf HUVEC ist abhängig vom Grad der sLe ^x -Expression.
[286]	Blase	Tumorzellen aus Blasenkrebsgewebe binden via Le an E-Selektin, nicht an P-Selektin.
[287]	Blase	Blasenkrebs mit erhöhter sLe ^x -Expression adhärirt an E-Selektin, erzeugt Infiltrationen in Muskelgewebe und bildet hämatogene und lymphogene Metastasen.

Tab. 3: In vitro-Studien, in denen die Rolle von E-Selektin bei der Metastasierung von Tumorzellen anderen Ursprungs als aus dem Kolon untersucht wurde

Obwohl ein breites Spektrum von Tumorzelllinien in vitro eine von E-Selektin abhängige Adhäsion an Endothelzellen aufweist, ist die Rolle dieses Moleküls bei der Metastasierung von anderen Tumorarten als Kolonkrebs noch nicht geklärt.

Die hier beschriebenen Interaktionen treten typischerweise im Blutstrom auf, also in der Gegenwart von Scherstress. Ergebnisse, die unter statischen Versuchsbedingungen generiert werden, können daher die komplexe Folge von Adhäsionsereignissen, die möglicherweise zwischen einer vom Blut bewegten Tumorzelle und dem Endothel unter Flussbedingungen auftreten, nicht adäquat simulieren [288]. Deshalb haben die fünf folgenden Gruppen dynamische

Untersuchungen vor dem Hintergrund einer Beteiligung von E-Selektin am Metastasierungsprozess durchgeführt.

Tözeren et al. [271] haben die Bindung von verschiedenen Brustkrebs-Zelllinien und Zellen aus normalem Brustgewebe unter laminarem Fluss an mit TNF aktivierte HUVEC-Monolayer untersucht. Zwei der Tumorzelllinien und eine Zelllinie aus normalem Gewebe weisen E-Selektin-abhängige Bindung an aktiviertes Endothel unter Flussbedingungen auf. Im Gegensatz dazu adhärieren drei Brustkrebs-Zelllinien, die hoch invasiv sind und in vivo Metastasen in Mäusen verursachen, nur unter statischen Bedingungen ohne Beteiligung von E-Selektin an aktiviertes Endothel. Giavazzi et al. [289] haben die Wechselwirkung von verschiedenen humanen Tumortypen mit HUVEC und immobilisiertem E-Selektin und VCAM-1 untersucht. Drei Tumorzelllinien (Brust, Kolon, Ovar) rollen und adhärieren stark an mit IL-1 aktivierten HUVEC. Drei weitere Zelllinien (Melanome und Osteosarkom) zeigen mit Abnahme des Scherstresses Adhäsion auf inaktivierten HUVEC, auf aktivierten HUVEC steigt die Anzahl adhärierender Zellen steil an. Ein Rollen kann auch bei hohem Scherstress nicht detektiert werden. Im Detail sind die Mechanismen für die unterschiedlichen Interaktionen an zwei Zelllinien beispielhaft untersucht worden. Das Rollen auf aktivierten HUVEC wird von E-Selektin vermittelt. Für die starke Adhäsion von nicht-rollenden Zellen ist VCAM-1 verantwortlich. Auch Goetz et al. [288] haben die Adhäsion einer humanen Kolonkarzinomzelllinie an E-Selektin und an IL-1 β -aktivierte HUVEC untersucht. Die Tumorzellen adhärieren und rollen auf beiden Substraten. Die Wechselwirkung ist abhängig von E-Selektin und sialylierten Epitopen auf den Tumorzellen. Kitayama et al. [290] haben das Adhäsionsverhalten von Tumorzellen und Leukozyten verglichen. Fünf Kolonkrebs-Zelllinien weisen weniger Tethering an einem Substrat aus E-Selektin auf als polymorphkernige Zellen. Einige der Colo201-Zellen haften jedoch aus dem Fluss fest an. Diese Zellen präsentieren sLe^x in Clustern und sLe^a gleichmäßig verteilt auf ihrer Oberfläche. Durch Behandlung der Colo201-Zellen mit Antikörper gegen sLe^a wird das Tethering verhindert, ein Antikörper gegen sLe^x reduziert die feste Adhäsion. Die Autoren folgern daraus, dass E-Selektin in diesem Fall allein ohne Beteiligung von Integrin-Molekülen die Adhäsion und nachfolgende Metastasierung vermittelt. Die unterschiedliche Verteilung von E-Selektin-Liganden könnte das Adhäsionsverhalten von Kolontumorzellen unter Flussbedingungen beeinflussen. Moss et al. [291] haben das Verhalten von zwei Brustkrebs-Zelllinien, eine nicht metastasierend und eine stark metastasierend, an Endothel in einer Flusskammer analysiert. Bei einem physiologisch relevanten Scherstress von 1 dyn/cm² adhärieren die nicht-metastasierenden Tumorzellen besser an aktiviertes Endothel. Bei niedrigerem Scherstress von 0,25 dyn/cm² binden hingegen die metastasierenden Tumorzellen besser an stimuliertes Endothel, während die nicht-metastasierende Zelllinie stärker an nicht aktiviertem Endothel haftet. Das metastatische Potential der Tumorzellen korreliert also nur bei geringem Scherstress und nach vorheriger Stimulierung der Endothelzellen mit der Adhäsion. Antikörper-Experimente weisen bei der Bindung der nicht-metastasierenden Zellen auf eine Beteiligung von E-Selektin, bei der Bindung der metastasierenden Zellen auf die Beteiligung von E-Selektin und VCAM-1 hin.

Diese Ergebnisse unterstreichen die Wichtigkeit physiologischer Flussbedingungen bei der Untersuchung der Wechselwirkung von Tumorzellen mit dem Endothel. Zusätzlich wird deutlich, dass nicht alle Krebszellen E-Selektin-abhängig an das Endothel unter Fluss adhärieren müssen, um eine hämatogene Metastasierung zu verursachen. Zellen von verschiedenen Tumortypen können unter Flussbedingungen

über unterschiedliche Mechanismen mit dem Endothel in Wechselwirkung treten. Der Mechanismus kann von den Adhäsionsmolekülen abhängig sein, die von den Tumorzellen und der endothelialen Oberfläche exprimiert werden.

In vivo wurde das Metastasierungsverhalten inokulierter Tumorzellen in Mäusen in Bezug auf die Beteiligung von E-Selektin betrachtet. Meistens ist dabei einer der Partner der Selektin/Ligand-Wechselwirkung blockiert. Außerdem ist im klinischen Rahmen die Expression von möglichen Selektin-Liganden auf Tumorgewebe, Tumorzellen und das Vorkommen von löslichen Selektinen als Tumormarker bei verschiedenen Krebsarten geprüft worden. Die folgende Tabelle (Tab. 4) listet dazu zunächst die Tierstudien auf.

Studie	Ergebnis
[292]	Ein lösliches Fusionsprotein aus E-Selektin und Immunglobulin bindet an die Oberfläche von Kolonkarzinomzellen (HT-29) und blockiert die Bildung von experimentellen Lungenmetastasen in Mäusen. Die Ausbildung von Lungenmetastasen korreliert mit der Bindung an E-Selektin.
[280]	Das metastatische Potential von drei Kolonkarzinom-Zelllinien steigt mit der Menge an sLe ^a auf der Oberfläche an. Die Lebermetastasierung wird durch Präinkubation der Tumorzellen mit einem Antikörper gegen sLe ^a verhindert.
[293]	Die Expression von E-Selektin kann Tumorzellen mit geeigneten Liganden umleiten. Melanomzellen ohne E-Selektin-Liganden führen in transgenen und „wild-type“-Mäusen zu Lungentumoren. Mit E-Selektin-Liganden erzeugen sie in transgenen Mäusen (E-Selektin konstitutiv in allen Geweben oder in gekürzter, löslicher Form in der Leber) dagegen Lebertumoren.
[294]	Exzessive Expression von sLe ^x auf Melanomzellen führt eher zur Ablehnung durch natürliche Killer-Zellen als zur erleichterten Tumorbildung über Adhäsion an das Endothel der Lunge.
[295]	Experimentelle Lebermetastasen durch eine Lungentumor-Zelllinie in Mäusen können durch einen Antikörper gegen E-Selektin abgewendet werden. Die Expression von E-Selektin nimmt nach Injektion der Tumorzellen zu und könnte somit zur Metastasierung der Zellen in der Leber beitragen.
[296]	Kolonkrebszellen adhären und metastasieren abhängig von E-Selektin in die Leber.
[297]	Die Stimulation von E-Selektin durch partielle Lebergewebeentnahme fördert die hämatogene Lebermetastasierung. Nach Injektion von Kolontumorzellen und partieller Hepatektomie ist die Anzahl an Lebermetastasen in Mäusen erhöht. Auch die Expression von E-Selektin in der Leber steigt an. Die Anzahl der Lebermetastasen kann durch Gabe eines neutralisierenden Antikörpers gegen E-Selektin nach der Operation reduziert werden.

Tab. 4: In vivo-Studien zur Bedeutung von E-Selektin bei der Metastasierung

Die Untersuchungen reflektieren die Wichtigkeit von E-Selektin-Kohlenhydrat-Interaktionen im Metastasierungsprozess, indem sie zeigen, dass das Metastasierungspotential mit der E-Selektin-Bindungsfähigkeit oder der Expression von sLe^x/sLe^a zunimmt bzw. durch unterschiedliche E-Selektin-Expression die Metastasierungsstelle beeinflusst werden können.

Auch in Studien, die Tumorgewebe und Sera von Patienten auf E-Selektin untersucht haben, wird E-Selektin durch eine detektierte Erhöhung unter pathologischen Bedingungen eine Beteiligung am Metastasierungsprozess nahegelegt (Tab. 5):

Studie	Ergebnis
[298]	Im Brustkrebsgewebe ist die Expression von E-Selektin auf tumorassoziierten Gefäßen erhöht. Das Tumorendothel könnte durch Zytokine in einen proinflammatorischen Zustand versetzt werden.
[299]	Eine erhöhte endotheliale Expression von E-Selektin während der Angiogenese scheint in

	vivo mit dem Fortschreiten von Brustkrebs einherzugehen. Dies wird wahrscheinlich direkt durch IL-1 α , das aus den Tumorzellen frei gesetzt wird, verursacht.
[276]	Die Expression von sLe ^x und sLe ^a ist auf dem Epithel von primärem Brustkrebs erhöht. Die Werte steigen noch weiter an, wenn zusätzlich metastatische Lymphknoten in den Achselhöhlen vorliegen.
[277]	Die Expression von dimerem sLe ^x in Lebermetastasen, die in Folge von humanem Kolorektalkrebs entstanden sind, ist gegenüber dem primären Kolorektalkrebs und normaler Kolonmukosa erhöht.
[281]	159 Kolorektalkarzinome sind immunohistochemisch auf die Expression von sLe ^x und sLe ^a untersucht worden. Die krankheitsfreie Überlebensrate von Patienten mit sLe ^x -positiven Tumoren ist deutlich geringer. sLe ^x ist im Gegensatz zu sLe ^a ein unabhängiger Faktor zur Vorhersage von Rückfällen, Invasionstiefe und Histologie des Tumors.
[300]	Der Grad der Expression von sLe ^x und sLe ^a korreliert mit der Häufigkeit hämatogener Metastasierung und dem prognostizierten Verlauf der Krankheit.
[301]	Magenkrebsgewebe von 137 Patienten wurde immunohistochemisch auf sLe ^x und sLe ^a untersucht. Die Expression von sLe ^a im Gegensatz zu sLe ^x korreliert mit den klinisch-pathologischen Faktoren, wie schlechte Prognose, invasives und infiltrierendes Wachstum des Tumors. Sie beeinflusst die peritoneale Dissemination und das Vorkommen von Lebermetastasen.
[302]	Die immunohistochemische Untersuchung von 97 Magenkrebsproben auf dimeres sLe ^x zeigt, dass eine hohe Expression verstärkt mit venöser Invasion und einem schlechten Verlauf einhergeht.
[303]	E-Selektin fehlt auf normalem und entzündeten Endothel des Magengewebes, während es auf Gewebe aus primärem Magentumor neu exprimiert wird. E-Selektin-positive Gefäße wurden unabhängig von der Infiltration von Leukozyten vorzugsweise in gefäßreichen Tumorteilen gefunden.
[304]	Die Expression von sLe ^a und sLe ^x auf Ösophagus-Tumorzellen deutet auf ein höheres Risiko von Rezidiven hin.
[305]	Die immunohistologische Untersuchung von 90 Kolorektalkrebs-Gewebeproben zeigt, dass Patienten mit hoher Expression an sLe ^x eine niedrigere Überlebensrate haben.
[306]	E-Selektin im Serum könnte ein nützlicher Tumormarker sein, da die Werte bei Patienten mit Kolonkrebs signifikant höher liegen. Die Werte steigern sich noch, wenn zusätzlich Metastasen vorliegen.
[307]	Die Serumwerte von E-Selektin bei Patienten mit Kolonkrebs sind signifikant erhöht, wenn Lungenmetastasen vorliegen.
[259]	Lösliches E-Selektin ist bei Patienten mit metastasierendem Brustkrebs signifikant höher. Seine endotheliale Aktivierung scheint eine Rolle bei der Entwicklung von Brustkrebs zu spielen.
[308]	Patienten mit Kolonkrebs weisen signifikant höhere Werte an löslichem E-Selektin auf. Die Serumwerte korrelieren mit dem Krankheitsstadium, dem Vorhandensein von Lymphknoten und Metastasen. Sie sinken nach radikaler Entfernung des Tumors.
[309]	Die Erhöhung der Konzentration an löslichem E-Selektin im Serum von Patienten mit Kolonkrebs ist bedeutend. SLe ^a ist in der Patientengruppe mit Metastasen zusätzlich erhöht.
[310]	In dieser Studie wurden höhere Serumkonzentrationen an E- und P-Selektin bei Patienten mit Lungenkrebs als bei Gesunden gefunden.

Tab. 5: Studien mit Fokus auf E-Selektin in Tumorgewebe und Sera von Patienten

Die ersten elf Untersuchungen betrachten das Auftreten von E-Selektin sowie sLe^x und sLe^a bei Brust-, Kolon- und Magenkrebs. Alle stellen im Zusammenhang mit malignen Veränderungen und dem Metastasierungspotential erhöhte Werte fest. Entsprechende Beobachtungen konnten auch bei den sechs Serumuntersuchungen von Patienten mit Kolon-, Brust- oder Lungenkrebs gemacht werden. Sie zeigen ebenfalls, dass die Serumwerte bei Vorliegen eines Tumors ansteigen und mit der Überlebensrate und dem Metastasierungsverhalten korrelieren. E-Selektin im Serum könnte daher ein nützlicher Tumormarker sein.

Werden die Ergebnisse der E-Selektin-vermittelten Adhäsion direkt auf den menschlichen Organismus übertragen, kann eine Metastasierung nur an aktiviertem Endothel stattfinden, da E-Selektin *in vivo* nicht konstitutiv exprimiert wird, sondern nur nach Aktivierung der Transkription durch bestimmte Stimuli. Nur chronische und akute Entzündungsherde würden daher eine geeignete Umgebung für die Metastasierung von E-Selektin-bindenden Krebszellen darstellen. Deshalb ist es von entscheidender Bedeutung, im Zusammenhang mit der Adhäsion von Tumorzellen an E-Selektin die Signaltransduktionswege zu untersuchen, die im Verlauf einer Metastasierung zu einer Expression von E-Selektin führen. Das Wissen über diese Prozesse ist heute noch sehr lückenhaft. Khatib et al. [295] haben gezeigt, dass die Expression von Zytokinen und hepatischem E-Selektin nach Inokulation von Tumorzellen zunimmt. Demnach können die Tumorzellen eine molekulare Kaskade in Gang setzen, die zur Expression von E-Selektin auf dem sinusoidalen Endothel führt, wenn sie die Leber erreicht haben. Es wurde auch postuliert, dass Tumorzellen selbst Moleküle abgeben können, die das Endothel aktivieren und dadurch zu einer Adhäsion von Tumorzellen führen. Einige Krebszellen produzieren IL-1 und andere Zytokine [311, 312]. Fox et al. [298] überlegen, ob die Zytokinstimulation das Tumorendothel von Brustkrebs in einen proinflammatorischen Zustand versetzt. Nguyen et al. [299] diskutieren, dass aus Tumorzellen frei gesetztes IL-1 α die Ursache für eine erhöhte Expression von E-Selektin bei Brustkrebs ist. Nach Hakomori [313] scheint eine Stimulation von E-Selektin durch eine Wechselwirkung zwischen Tumorzellen und Thrombozyten vermittelt zu werden, welche wiederum das Endothel aktivieren. Proteinkinasen in Plättchen und Endothelzellen sind möglicherweise am Signaltransduktionsweg beteiligt, der zur Präsentation von E-Selektin führt.

Bei postoperativen Patienten könnte eine subklinische Entzündungsreaktion zum systemischen Anstieg der Expression von Selektinen auf dem Endothel führen. Es ist bekannt, dass Metastasierung bei Entzündungsvorgängen leichter stattfindet [314, 315].

Dagegen spricht die Beobachtung, dass bestimmte Krebsarten organspezifische Metastasierung aufzeigen. Es erscheint unwahrscheinlich, dass induzierbare Adhäsionsmoleküle der Grund für ein solches Verteilungsmuster sind. organspezifische, konstitutiv auf dem Endothel exprimierte Adhäsionsmoleküle passen hier eher ins Bild [288]. Abgesehen von der ungeklärten Aktivierung des E-Selektins unterstützen die bisher dargestellten Ergebnisse der *in vitro*- und *in vivo*-Studien überwiegend die Hypothese, dass das Anhaften von metastasierenden Tumorzellen im Gefäßsystem zuerst durch E-Selektin vermittelt wird. Teilweise zeigten sich jedoch Hinweise auf die Beteiligung anderer Mechanismen. Und es gibt, wie zu Beginn schon angesprochen, Arbeiten, die mit dieser Sichtweise nicht übereinstimmen.

Einige Wissenschaftler erwägen, dass die Tumorzellen sich aufgrund ihres größeren Durchmessers verglichen mit den Kapillaren in dem Organ festsetzen, in das sie nach Ablösung vom Primärtumor zuerst gelangen. Tumorzellen würden somit unspezifisch in der Mikrozirkulation „stecken bleiben“ [316]. Thorlacius et al. [317] haben das Fließverhalten von sechs humanen Tumorzelllinien, von denen drei Selektin-Liganden präsentieren, *in vivo* untersucht. Sie demonstrierten mit intravitaler Mikroskopie, dass die Tumorzellen nicht ähnlich wie Leukozyten adhärieren. Das erste Anhaften der metastasierenden Tumorzellen in den Mikrogefäßen schien dagegen primär von mechanischen Faktoren, wie Größe der Tumorzellen und Form der Gefäße, abhängig zu sein. Die Rolle der Adhäsionsmoleküle könnte also auf spätere Schritte der

Extravasation und mögliche Signalfunktionen beschränkt sein. Auch aus Sicht der Biomechanik, die die Dynamik der Krebszellbewegung in Kapillaren berücksichtigt, findet in vivo ein Anhalten vor allem durch mechanisches „Steckenbleiben“ statt [267]. Die pathobiologische Rolle von Adhäsionsmolekülen soll daher nicht in der Vermittlung der Adhäsion, sondern eher in der Stimulation ihrer Vermehrung über Signaltransduktion zu suchen sein.

Ding et al. [318] postulieren verschiedene Adhäsionsmechanismen für unterschiedliche Krebszelllinien. Sie haben die Metastasenbildung in Mäusen mikroskopisch verfolgt und den Einfluss von P-Selektin auf diesen Prozess durch Verwendung von P-Selektin-knock-out-Mäusen und immunohistochemischen Verfahren untersucht. Die direkte Beobachtung des Verhaltens von zirkulierenden Tumorzellen deutet auf zwei verschiedene Mechanismen hin, die zum „Anhalten“ der Tumorzellen im Zielorgan, in diesem Fall die Leber, beitragen. Zum einen begünstigt das mechanische „entrapment“ von soliden Tumorzellen, welche einen größeren Durchmesser als die Lebersinusoide haben, die Metastasierung ohne detektierbare Beteiligung von Adhäsionsmolekülen. Zum anderen bilden auch Lymphomzellen, die einen kleineren Durchmesser als die Sinusoide haben, Metastasen in der Leber. Hier wurde eine Beteiligung von P-Selektin festgestellt, was für einen Adhäsionsmolekülvermittelten Mechanismus spricht. Mechanisches „entrapment“ erklärt das klinische Merkmal, dass sich die ersten hämatogenen Metastasen aus Kolonkarzinomen immer in der Leber entwickeln (die Leber ist das erste Organ, das die Tumorzellen nach dem Kolon über die Portalvene passieren). Sie können jedoch nicht alle Phänomene der Metastasierung begründen. Prostatakrebs hat z.B. die höchste Metastasierungsrate im Knochengewebe statt in der Lunge und kutane maligne Melanome metastasieren vorzugsweise ins Gehirn. Lymphomzellen wiederum verursachen in dieser Untersuchung Leber- und keine Lungenmetastasen, unabhängig davon, ob sie über die Schwanz- oder die Portalvene inokuliert werden. P-Selektin ist für diese Organspezifität nicht verantwortlich, da es in Lunge und Leber nachgewiesen werden kann. Außerdem sind nach der Injektion in die Schwanzvene auch immobilisierte Tumorzellen in der Lunge entdeckt worden. Diese Ergebnisse deuten an, dass zusätzliche Signale nach dem ersten Anhaften der Zellen notwendig sind, um den Metastasierungsprozess fortzuführen [318].

Insgesamt gesehen hat eine mögliche Beteiligung von P- und L-Selektin am Metastasierungsprozess in ähnlicher Weise wie E-Selektin weniger Aufmerksamkeit erhalten.

Dennoch unterstützen einige Arbeiten eine direkte Vermittlung der Adhäsion von Tumorzellen an das endotheliale P-Selektin. P-Selektin bindet in vitro an verschiedene humane Krebszellen und humane von Tumoren abstammende Zelllinien, z. B. kleinzelliges Bronchiolkarzinom, Brust-, Lungen- und Kolonkrebs, Melanom. Pottratz et al. [319] zeigen, dass eine erhöhte Bindung von Zellen des kleinzelligen Bronchiolkrebs an aktiviertes Endothel durch eine verstärkte Expression an P-Selektin hervorgerufen wird. Dies wiederum ist scheinbar Ergebnis der Aktivierung von spezifischen Isoformen der Proteinkinase C. Eine Brustkrebs-Zelllinie und eine Lungenkrebs-Zelllinie binden an P-Selektin [82]. Konsequenterweise gibt es auch im Zusammenhang mit P-Selektin Studien, in denen die Funktion von endotheliale P-Selektin unter Scherstress untersucht wurde: Immobilisiertes P-Selektin und P-Selektin-exprimierende CHO-Zellen vermitteln die Adhäsion und das Rollen von Kolonkarzinomzellen (KM12-L4) zwischen 1 und 2 dyn/cm². Da KM12-L4-Zellen kein PSGL-1 auf ihrer Oberfläche besitzen, muss die Adhäsion über einen von PSGL-1 unabhängigen Mechanismus stattfinden. Verglichen mit HL-60-Zellen, die PSGL-1

exprimieren, zeigen die KM12-L4 eine etwas geringere Adhäsionsrate an P-Selektin und rollen bedeutend schneller [320]. Aigner et al. [83] präsentieren Daten, dass CD24 als physiologischer Ligand für P-Selektin unter Flussbedingungen funktionieren und das Rollen von Brustkrebszellen vermitteln kann. Heparansulfat-ähnliche Proteoglykane vermitteln die Adhäsion von humanen, malignen Melanomzellen unter Flussbedingungen an P-Selektin [321]. Kaytes et al. [322] finden, dass P-Selektin an eine humane Melanomzelllinie bindet. PSGL-1 ist an diesem Vorgang nicht beteiligt. Sie folgern, dass die beteiligten Liganden zu einer neuen Gruppe von Glykoprotein-Liganden gehören. Auch in einer später durchgeführten Studie von Li et al. [323], in der P-Selektin im Gegensatz zu E-Selektin an eine Bronchialkrebs-Zelllinie bindet, müssen andere Glykoproteine als Bindungspartner für P-Selektin fungieren, da die Zelllinie kein PSGL-1 besitzt.

In einer Studie von Aruffo et al. [324] bindet eine Chimäre aus Immunglobulin und P-Selektin an Tumorzellen in humanen Krebsgewebeschnitten (Kolon, Lunge und Brust). Außerdem wird eine Bindung von P-Selektin an die Oberfläche von Zelllinien, die aus verschiedenen Karzinomen stammen, mit Ausnahme von einer Melanom-Zelllinie detektiert. E-Selektin adhärert hier nur an Kolonkarzinomgewebe und -zelllinien. In vivo wurde durch den Einsatz von P-Selektin-defizienten Mäusen gezeigt, dass P-Selektin das Wachstum und die Metastasierung von humanen Kolonkarzinomzellen bedeutend steigern kann [325]. Dies gibt Hinweise darauf, dass die Adhäsion von humanen Kolonkarzinomzellen über P-Selektin eine kritische Funktion im pathologischen Prozess dieser Krebsart hat. Friederichs et al. [326] weisen in vivo das Rollen von mit CD24 und Fukosyltransferase VII transfizierten humanen Adenokarzinomzellen auf P-Selektin nach. Die Zellen lagern sich nach Injektion abhängig von P-Selektin in der Lunge von Mäusen an. Weil dieser Prozess in normalen Mäusen, die mit LPS behandelt wurden, aber nicht in P-Selektin-knock-out-Mäusen stark erhöht war, folgern sie, dass die Anlagerung abhängig von P-Selektin geschieht.

Auch auf die Aktivierung der Endothelzellen in Bezug auf P-Selektin gibt es Hinweise. Der Serumwert von TNF- α ist bei Krebspatienten erhöht [327]. Daher sollte P-Selektin auf den Endothelzellen von Krebspatienten exprimiert sein.

Im Gegensatz zu endothelalem P-Selektin gibt es zahlreiche Arbeiten über Wechselwirkungen zwischen thrombozytärem P-Selektin und Tumorzellen. Auf diese Zusammenhänge soll jedoch später genauer eingegangen werden.

Obwohl die Expression und physiologische Funktion von L-Selektin auf Leukozyten ausführlich bearbeitet worden ist, bleibt seine Rolle auf malignen Leukämie- und Lymphomzellen bisher unklar. Eine offene Frage ist, ob L-Selektin an der Metastasierung von malignen Lymphomen in entfernt gelegene Lymphknoten beteiligt ist. Aviram et al. [328] sind in ihrer Studie von der Hypothese ausgegangen, dass L-Selektin wesentlich für die Ausbreitung von Lymphomzellen, die die pathologischen Gegenstücke zu naiven Lymphozyten darstellen, ist. Naive Lymphozyten benötigen L-Selektin, um in periphere Lymphknoten zu wandern. Natürlich vorkommendes L-Selektin auf einem B-Zell-Lymphom konnte nicht mit erhöhter Lymphknotenmetastasierung in Verbindung gebracht werden, daher scheint L-Selektin in diesem Fall nicht für den Metastasierungsprozess benötigt zu werden. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von Qian et al. [329], die zeigen konnten, dass die transgene Expression von L-Selektin in einem spontanen Mauskarzinom-Modell die Metastasierung in Lymphknoten begünstigt.

Spertini et al. [330] haben im Plasma von Patienten mit akuter Leukämie hohe Konzentrationen der abgespaltenen Form von L-Selektin gefunden. Das von der Zelle

abgespaltene L-Selektin ist noch funktionell aktiv. Es könnte daher über die Blockade von L-Selektin-Liganden eine wichtige Rolle bei der Regulation der Adhäsion von leukämischen Zellen an das Endothel haben. Außerdem könnte die kontinuierliche Beobachtung der Werte nützlich bei der Bewertung der leukämischen Aktivität sein, besonders bei der Diagnose eines Rückfalls.

Die bisher genannten Studien haben sich nur mit der Idee einzeln adhärierender Tumorzellen beschäftigt. Tumorzellen können jedoch nicht nur allein, sondern auch in kleinen Clustern oder in Form von Aggregaten mit Plättchen und Leukozyten im Gefäßsystem zirkulieren [271]. Auf aktivierten Thrombozyten könnte P-Selektin die Assoziatbildung mit Tumorzellen herbeiführen. Es ist bekannt, dass die Aktivierung des Blutgerinnungssystems, einschließlich der Thrombozyten, durch Tumorzellen zur Metastasierung beiträgt. Verschiedene Untersuchungen deuten daraufhin, dass Plättchen die hämatogene Verbreitung von Tumorzellen fördern können. Am überzeugendsten ist das Verhindern von Metastasen durch experimentelle Thrombozytopenie und die Wiederherstellung des metastatischen Potentials nach Plättcheninfusion [331, 332]. Morphologische Beobachtungen von Tumorzellen in Kapillaren haben eine Assoziation von Tumorzellen mit Thrombozyten gezeigt [333, 334]. Klinisch weisen Krebspatienten im fortgeschrittenen Stadium eine Reihe von thromboembolischen Funktionsstörungen auf, unter anderem Thrombozytosen. Einige Koagulantien haben eine inhibitorische Wirkung auf die Bindung zwischen Tumorzelle und Plättchen gezeigt sowie auf die spontane und die experimentelle Metastasierung [335-337].

Ein zugrunde liegender Mechanismus der Metastasierung könnte, wie oben schon erwähnt, die Stimulation der P-Selektin-Expression auf Thrombozyten sein. Dies würde zur Aggregatbildung aus Plättchen und Tumorzellen führen, die entweder kleine Gefäße verschließen oder am Endothel adhären. Stone und Wagner [338] zeigen die P-Selektin-abhängige Bindung von Thrombozyten an je zwei Zelllinien, die von kleinzelligem Bronchialkrebs und Neuroblastom abstammen. Dardik et al. [339] haben die Rolle von Plättchen bei der Interaktion von Melanomzellen mit Endothelzellen untersucht. Obwohl die Tumorzelladhäsion an das Endothel unter Flussbedingungen durch Plättchen gesteigert wird, zeigen Inhibierungsstudien, dass die Adhäsion der Tumorzellen an Endothel-gebundene Plättchen vor allem durch Glykoprotein IIb-IIIa (Integrin) vermittelt wird. Dagegen ist thrombozytäres P-Selektin Teil der Bindung zwischen Endothel und Plättchen. Zusätzliche Unterstützung für eine Rolle von thrombozytärem P-Selektin bei der Metastasierung bietet die Studie von Kim et al. [325], die das Verhalten von Tumorzellen in P-Selektin-defizienten Mäusen analysiert haben. Sie finden, dass Plättchen dieser Mäuse nicht an Mucine auf der Oberfläche der Tumorzellen binden und dass die Tumorzellen, die in der Lunge haften, mit weit weniger Plättchenaggregaten bedeckt sind als in Mäusen mit P-Selektin. McCarthy et al. [340] berichten über unterschiedliche Fähigkeiten von drei humanen Kolonkarzinom-Zelllinien, unter Scherstress an oberflächenverankerte Plättchen zu binden. P-Selektin ist an der Adhäsion von zwei der Zelllinien beteiligt, doch nur eine davon zeigt Tethering und Rollen auf den Plättchen. Zusätzlich können thrombozytäre $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrine die Tumorzellen direkt aus dem Fluss abfangen oder gleichzeitig vorhandene transiente Tether in eine stabile Adhäsion überführen. Borsig et al. [341] zeigen, dass die Gabe von Heparin die Tumormetastasierung in Mäusen abschwächt, indem es die P-Selektin-vermittelte Bindung von Plättchen an Mucin-Liganden auf der Oberfläche von Tumorzellen inhibiert. Selektive Entfernung der Mucin-Liganden, eine einzelne Heparindosis oder das Fehlen von P-Selektin reduzieren die Wechselwirkungen

zwischen Tumorzellen und Plättchen in vivo und in vitro. Mikroskopische Aufnahmen belegen in allen drei Fällen eine Beeinträchtigung der Bedeckung von Tumorzellen mit Plättchen. Die Fähigkeit von Tumorzellen, Metastasen zu bilden, kann mit ihrer Fähigkeit einhergehen, Thrombin zu erzeugen und dadurch eine Plättchenaggregation hervorzurufen [342]. Thrombozytopenie kann die Metastasierung von Thrombin-erzeugenden Tumorzellen einschränken, Thrombingabe zu Tumorzellen, die kein Thrombin erzeugen, fördert die Metastasierung [343].

Die Bindung der Plättchen an metastasierende Tumorzellen findet wahrscheinlich statt, wenn Tumorzellen aus dem Primärtumor in das Gefäßsystem eindringen. Aktivierte Plättchen können an die hervortretenden thrombogenen Tumorzellen binden. Dieser Vorgang erfordert die Fähigkeit der Adhäsion unter Scherstress. Das Binden der Plättchen könnte auch erst dann stattfinden, wenn sich beide Zellen im Fluss befinden.

Die Bedeckung mit Plättchen könnte über verschiedene Mechanismen zur Metastasierung beitragen. Plättchen können die Tumorzellen im Gefäßsystem stabilisieren [337]. Denn während sich die Tumorzellen in der Blutzirkulation befinden, sind sie permanent mechanischen Kräften durch den Fluss und dem Angriff durch die körpereigene Immunabwehr ausgesetzt. Durch Adhäsion an Tumorzellen können Thrombozyten einen Schutzschild um die Tumorzellen bilden. Auf diese Weise schützen sie z. B. direkt vor der Lyse durch natürliche Killer-Zellen [344]. Die Plättchen können die Tumorzelle extravasation durch Verstärkung der durch die Tumorzellen induzierten Retraktion des Endothels unterstützen [337]. Alternativ könnten Plättchen die Extravasation erleichtern, indem sie die Interaktion der Tumorzellen mit Proteinen der extrazellulären Matrix der Gefäßwand verstärken. Dadurch helfen sie den Tumorzellen, aus der Zirkulation in das Interstitium zu gelangen [337, 345, 346]. Außerdem können aktivierte Plättchen die Vermehrung der Tumorzellen stimulieren, indem sie Wachstumsfaktoren freisetzen [337].

Kim et al. [347] sehen eine zusätzliche Beteiligung von L-Selektin auf endogenen Leukozyten durch Bindung an Tumormucine am Prozess der Metastasierung. Sie gehen dabei von dem Wissen über die bekannten Wechselwirkungen zwischen Tumorzellen und E-Selektin bzw. P-Selektin aus. Ferner können alle drei Selektine an einige Kolonkarzinom-Zelllinien binden [348]. Daraus entwickeln sie die Arbeitshypothese, dass Tumormucine im Blutstrom mit Leukozyten, Thrombozyten und Endothelzellen über deren Selektine interagieren können. In ihrer Untersuchung zeigen sie, dass alle drei Selektine an Mucine auf Tumorgewebe und Kolonkarzinom-Zelllinien binden und die Bindungsorte für jedes Selektin auf den Mucinen unterschiedlich sind. Die Selektin-Liganden können deshalb mindestens vier verschiedene pathologische Interaktionen zwischen Plättchen, Leukozyten und Endothelzellen vermitteln. Zwei weitere Studien unterstützen die These, dass Leukozyten an Tumorzellen binden. Jadhav et al. [349] finden, dass L-Selektin auf polymorphkernigen Leukozyten das Tethering von sLe^x-tragenden Tumorzellen bei hohem Scherstress vermitteln. Borsig et al. [350] erkennen mit Hilfe von Mäusen, denen P- und L-Selektin fehlt, dass beide Selektine synergistisch funktionieren. Obwohl Heparin in vitro beide Selektine blockiert, scheint die in vivo-Wirkung einer einzelnen Heparindosis hauptsächlich durch die Blockade der P-Selektin-Funktion verursacht zu werden. Daher wirkt L-Selektin auf Neutrophilen, Monozyten und/oder NK-Zellen zu einem späteren Zeitpunkt als P-Selektin, das die Interaktion von Plättchen mit Tumorzellen vermittelt.

In diesem Kapitel dargestellte Möglichkeiten der Beteiligung der Selektine am Prozess der Metastasierung werden noch einmal zusammengefasst. E-Selektin kann auf Endothelzellen die Adhäsion und das Rollen von Tumorzellen vermitteln. Dies gilt besonders für Brust- und Kolonkrebs. Alle anderen Tumorarten sind hinsichtlich E-Selektin nicht ausführlich genug bearbeitet. Ebenso kann das Vorkommen von P-Selektin auf den Endothelzellen das Anhaften von Tumorzellen an die Gefäßwand fördern. Auf aktivierten Plättchen wiederum kann P-Selektin die Assoziatbildung mit Tumorzellen herbeiführen und so den Tumorzellen Schutz vor der Immunabwehr und Unterstützung bei der Extravasation bieten. Die Rolle von L-Selektin bei der Metastasierung von Lymphomen in Lymphknoten ist widersprüchlich und ungenügend bearbeitet. Es scheint jedoch auf endogenen Leukozyten eine Bedeutung für die Metastasierung zu haben. Der entsprechende Mechanismus ist bisher noch unklar.

2.7 Kompetitive Selektin-Inhibitoren als potentielle Wirkstoffe

Bei der Suche nach wirksamen Inhibitoren diente zunächst das Tetrasaccharid sLe^x als Leitsubstanz, da es an alle drei Selektine bindet. Essentielle Strukturmerkmale konnten aus Röntgenstrukturdaten des E-Selektins [18] und verschiedenen NMR-Untersuchungen des gelösten und am E-Selektin gebundenen sLe^x [351, 352] ermittelt werden. So sind an der Bindung der Lektindomäne der Selektine die negative Ladung der Sialinsäure, die 2-,3- und 4-ständige Hydroxygruppe der Fukose sowie die 6-ständige Hydroxygruppe der Galaktose direkt beteiligt (Abb. 3). Während der anionische Substituent für alle drei Selektine notwendig vorhanden sein muss, ist der Einfluss der Hydroxygruppen bei den einzelnen Selektinen unterschiedlich stark ausgeprägt.

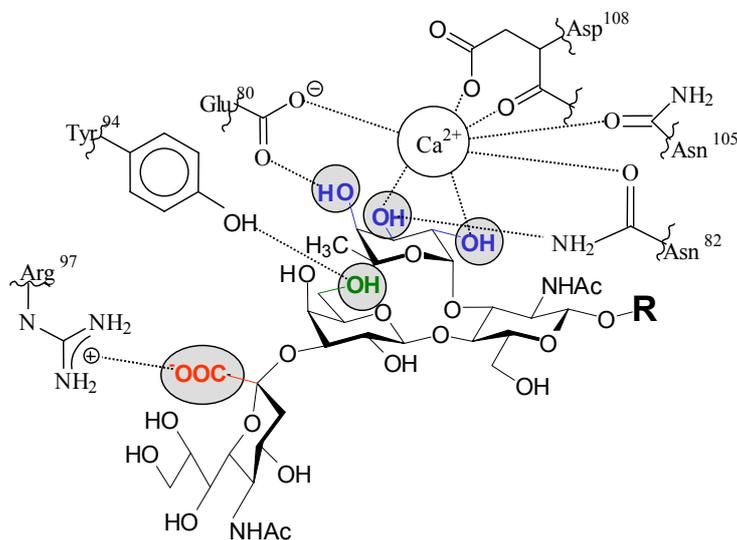


Abb. 3: Darstellung des Sialyl Lewis^x mit seinen für die Selektin-Bindung essentiellen pharmakophoren Gruppen

Das Ziel dieses klassischen Weges der Strukturabwandlung ist, unter Beibehaltung der (bekannten) wichtigen Elemente die Struktur zu modifizieren und besser bindende, stabile und leicht herzustellende Selektin-Inhibitoren zu erhalten. Schwierigkeiten ergeben sich bei glykosidischen Substanzen aus dem komplexen

Syntheseweg, der hydrolytischen Instabilität und ihrer relativ geringen Bindungsaffinität. Deshalb wurde versucht, den glykosidischen Anteil der Struktur zu reduzieren und durch Einfügen von nichtglykosidischen Seitengruppen die Bindungsaffinität zu erhöhen. Die Substitution der negativen Sialinsäure, der N-acetylierten Glukose oder von Glukose und Galaktose und die Verwendung von Monosaccharid-Verbindungen (Fukose oder Mannose) brachten nicht die erwarteten Resultate und werden an dieser Stelle nicht weiter dargestellt. Eine umfangreiche Übersicht über synthetische Selektin-Inhibitoren ist bei Simanek et al. [353] zu finden. Ausführlicher werden die Einführung hydrophober Reste und die Synthese multimerer Strukturen diskutiert.

Basierend auf der Multivalenzhypothese als Wirkprinzip der natürlichen Liganden (s. Kap. 2.2.2) wurden verschiedene oligomere Derivate des sLe^x bzw. seiner vereinfachten Analoga synthetisiert. Sie beruht auf der Annahme, dass durch die multivalente Anordnung ubiquitär vorkommender Oligosaccharide wie sLe^x die Spezifität und hohe Affinität der Ligandenerkennung erklärt werden kann. Deshalb werden eine Anzahl von Molekülen auf einem Träger (Polymere, Polypeptide, Liposomen) räumlich eng fixiert. Di- und tetravalente sLe^x -Analoga sind dem monovalenten sLe^x in der Inhibierung der L-Selektin-vermittelten Lymphozytenadhäsion an verschiedenen Endothelien überlegen [354-357]. Die Synthese eines mit Galaktose-3,6-disulfat-Einheiten bedeckten Polymers führt verglichen mit sLe^x zu einer 500fachen Steigerung der Inhibierungsaktivität gegenüber P-Selektin [358]. Die Bildung multivalenter Konjugate aus Polylysin mit einem schwachaffinen sLe^x -Analogon bringt eine 700fache Affinitätserhöhung für E-Selektin mit sich [359]. Die multivalente Anordnung von sLe^x -Derivaten in Liposomen führt zu einer Blockade der Selektin-vermittelten Zelladhäsion im nanomolaren Konzentrationsbereich [360]. Ein Polymer mit den Erkennungseptopen 3',6-disulfo Le^x inhibiert im Gegensatz zum entsprechenden Monomer das Rollen von L-Selektin-tragenden Zellen auf GlyCAM-1. Es weist dabei verglichen mit sLe^x (IC_{50} : 2,5 mM) eine Inhibierungssteigerung um ungefähr den Faktor 200 auf und liegt mit einem IC_{50} -Wert von 0,015 mM im mikromolaren Konzentrationsbereich [361]. Die durch Multimerisierung erzielten Affinitätserhöhungen demonstrieren eine effektive Strategie, um die Avidität und Wirksamkeit schwachaffiner Monosaccharide zu erhöhen. Allerdings scheint eine einfache Multivalenz, d.h. die regelmäßige starre Fixierung von sLe^x oder seiner Analoga auf einem Trägermolekül, nicht ausreichend für die Erklärung der hochaffinen Bindung zu sein, da die Affinitätssteigerungen zumeist nicht an die natürlichen Liganden heranreichen. Hochaffines Binden scheint vielmehr in Anlehnung an physiologische Liganden, wie Mucine oder Glykosphingolipide, die Erkennung eines „clustered saccharide patch“ [63] zu beinhalten, welcher durch ein Peptid oder Lipid, das mehrere Oligosaccharide trägt, gebildet wird. Dies resultiert in einer einzigartigen, nicht starr fixierten Clusterung der Oligosaccharidstrukturen.

Mit dem Ziel einer Bindungsverstärkung wurde sLe^x durch den Einbau zusätzlicher Molekülgruppen modifiziert und so nach weiteren pharmakophoren Gruppen gesucht. Bei der entsprechenden Computersimulation der Bindung der sLe^x -Derivate an die Lektindomäne stellte sich der Einbau eines hydrophoben Restes an der glykosidischen Hydroxygruppe oder am Amin des Glukosamins als bindungssteigernd heraus. Vor diesem Hintergrund wurden aromatische Ringsysteme am Amin und verzweigt-kettige Fettsäuren am glykosidischen Teil des Glukosamins eingefügt. Dies bewirkt eine ein- bis zehnfach stärkere Bindung als sLe^x [362, 363].

Trotz intensiver Forschungsbemühungen in den letzten zehn Jahren gibt es heute, gemessen an der Vielfalt der synthetisierten Substanzen, nur wenige sLe^x-Mimetika, welche eine ausreichende Affinitätssteigerung bei gleichzeitiger Strukturvereinfachung aufweisen und daher erfolversprechende Verbindungen für eine klinische Studie sind. Eine dieser Substanzen ist das Mannose-haltige TBC 1269, welches in verschiedenen Krankheitszusammenhängen getestet wird [364, 365].

Die Suche nach Selektin-Inhibitoren konzentriert sich heute nicht mehr auf den klassischen Ansatz der Strukturabwandlung, welcher sich nur am einzelnen Epitop orientiert. Neue Einblicke in die molekularen Bindungseigenschaften der Selektine gewährt eine Studie von Somers et al. [16]. Die Kristallstruktur eines P-Selektin-Konstruktes, welches nur aus Lektin- und EGF-Domäne besteht, im Komplex mit der N-terminalen Struktur von PSGL-1 enthüllt detailliertere Kenntnisse über die molekulare Basis der hochaffinen Interaktion zwischen P-Selektin und PSGL-1. Die bindungsrelevanten Elemente sind in der folgenden Abbildung schematisch (Abb. 4) dargestellt.

Bindungsrelevante Epitope

am N-Terminus von PSGL-1:

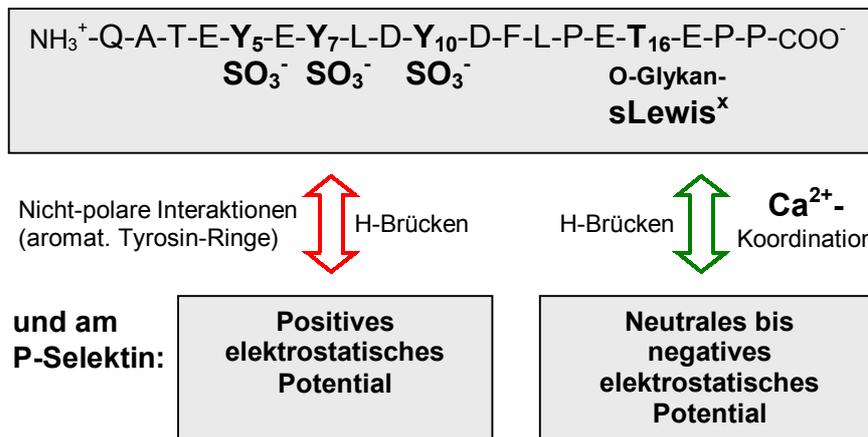


Abb. 4: Schematische Darstellung der Interaktionen zwischen P-Selektin und PSGL-1 (nach Somers et al., 2000 und Harms, 2002)

Es wird deutlich, dass elektrostatische Kräfte neben Wasserstoff-Brücken zur Bindung beitragen. Passfähige Kohlenhydrat-Epitope (sLe^x) in Nachbarschaft zu negativen Ladungscustern (sulfatierte Tyrosine) auf dem Liganden sind für die hochaffine Bindung an P-Selektin notwendig. Der Kohlenhydratanteil des PSGL-1 bindet P-Selektin via H-Brücken in einem Bereich mit neutralem bis negativem elektrostatischen Oberflächenpotential. Dabei wird auch das Ca²⁺-Ion komplexiert. Der anionische Teil des PSGL-1 mit den sulfatierten Tyrosinresten bindet P-Selektin über die Ausbildung von H-Brücken und nicht-polaren Wechselwirkungen in einem Bereich mit positivem elektrostatischen Oberflächenpotential.

Die unvollständige Aufklärung der molekularen Basis der hochaffinen Bindung hat, gemeinsam mit der Tatsache, dass die natürlichen Liganden über die Struktur des sLe^x hinausgehende essentielle Merkmale besitzen, zu einer gänzlich anderen Herangehensweise geführt. Diese stützt sich nicht auf die Modifikation des sLe^x, sondern auf die Kopie der natürlichen Liganden-Gegebenheiten. Deshalb werden, hauptsächlich mit gentechnologischen Methoden, Glykopeptide synthetisiert, die den bindungsrelevanten Bereichen der natürlichen Liganden entsprechen. Ein

Glykosulfopeptid, dem der N-Terminus von PSGL-1 als Muster diente, weist eine Affinität von ungefähr 350 nM zu löslichem P-Selektin auf [366, 367]. Seine inhibitorische Wirkung auf das P-Selektin-abhängige Leukozytenrollen konnte auch in vivo verifiziert werden [368]. rPSGL-Ig ist eine rekombinante, trunkierte Form von PSGL-1 (extrazelluläre Domäne), welche mit Immunglobulin G fusioniert ist. rPSGL-Ig wird als kompetitiver Inhibitor von PSGL-1 eingesetzt. Es gilt als eines der aussichtsreichsten Moleküle bei der Suche nach effektiven Selektin-Antagonisten. In vivo inhibiert es das von allen drei Selektinen abhängige Rollen von Leukozyten und zeigt einen deutlichen antiinflammatorischen Effekt [368-370]. Der Selektin-Antagonismus durch rPSGL-Ig resultiert in vivo auch in einer dosisabhängigen Abnahme von Thrombosen [229, 371-373]. Hinweise auf den sicheren, d.h. nebenwirkungsarmen Einsatz von rPSGL-Ig werden in einer Studie mit Sepsis-Modellen gegeben, wo eine bestehende bakterielle Infektion durch die Gabe von rPSGL-Ig nicht verschlimmert wird [374]. Mittlerweile ist rPSGL-Ig Gegenstand von klinischen Studien.

Der neueste Ansatz bei der Suche nach Selektin-Inhibitoren ist die Nutzung der „phage display“-Methode. Dabei werden aus der äußeren Proteinhülle von Phagen Peptidsequenzen, die an das zu inhibierende Zielmolekül binden, ausgewählt, kloniert und sequenziert. Der Versuch, mit dieser Methode Peptide zu finden, welche an E-Selektin binden, schlug unerwartet fehl [375]. Die Autoren vermuten als Ursache die niedrige Bindungsaffinität. Allerdings haben sie unter Verwendung von Antikörpern gegen Kohlenhydrat-Strukturen ein Screening durchgeführt und Peptide gefunden, welche an alle Selektine Ca^{2+} -abhängig binden. Dagegen war die Anwendung durch Molenaar et al. [376], mit dem Ziel, neue Liganden mit hoher Spezifität für P-Selektin zu identifizieren, erfolgreich. Es wurden Peptide mit der „Consensus Sequence“ EWVDV (Glutaminsäure-Tryptophan-Valin-Asparaginsäure-Valin) isoliert. Diese kann spezifisch Ca^{2+} -abhängig humanes P-Selektin mit hoher Selektivität gegenüber E- und L-Selektin blockieren. Durch Präsentation als Tetramer wird die Avidität der Peptide um den Faktor 200 ($2\mu\text{M}$ versus 10nM) verstärkt. Nanomolare Konzentrationen des tetrameren Peptids können die Adhäsion von HL-60-Zellen an P-Selektin in statischen Assays inhibieren und unter Flussbedingungen die Rollgeschwindigkeit erhöhen. Da die EWVDV-Peptide sulfatiertes Le^a von der Bindung verdrängen, nehmen die Autoren an, dass EWVDV an oder nahe des Kohlenhydrat-erkennenden Bereichs von P-Selektin bindet.

Das Wissen über die molekularen Bindungseigenschaften der Selektine ermöglicht die gezielte Suche nach neuen Wirkstoffgruppen. Es können konsequent Substanzen analysiert werden, die die geforderten Bedingungen für eine hochaffine Bindung erfüllen. Semisynthetische Heparine könnten die oben genannten Bindungsparameter imitieren, da sie aus spezifischen Kohlenhydraten aufgebaut sind und eine hohe Ladungsdichte aufweisen. In der Tat wurde Heparin schon 1989 als Bindungspartner für P-Selektin identifiziert [377].

Heparin gehört zur Gruppe der Glukosaminoglukane und ist ein komplexes, stark sulfatiertes Polysaccharid mit einem Molekulargewicht zwischen 3000 und 30.000. Das lineare Molekül besteht aus alternierenden L-Iduronsäure- und D-Glukosamin-Einheiten (Abb. 5). L-Iduronsäure kann teilweise durch D-Glukuronsäure ersetzt sein. Die Aminogruppen des Glukosamins sowie einzelne Hydroxygruppen sowohl der Uronsäure- als auch der Hexosamin-Bausteine liegen sulfatiert vor. Da Heparin und heparinoide Verbindungen als antithrombotisch wirksame Arzneistoffe seit über 60 Jahren appliziert werden, besteht jahrelange Erfahrung mit ihrer Anwendung am Menschen. Zusätzlich weist Heparin zahlreiche weitere biologische Wirkungen auf

[378]. Auch die leichte synthetische Zugänglichkeit macht heparinoide Verbindungen zu aussichtsreichen Kandidaten.

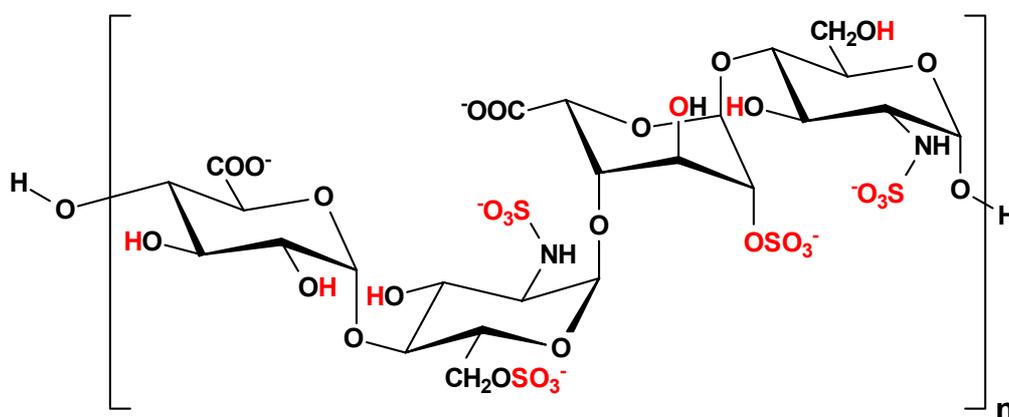


Abb. 5: Allgemeine Strukturformel von Heparin. Mögliche Sulfatierungsstellen sind die N-, 3- und 6-Position des Glukosamins sowie die 2- und 3-Position der Uronsäuren (hier rot dargestellt)

Die antithrombotischen und Selektin-bindenden Eigenschaften der Heparine scheinen sich in ihren strukturellen Anforderungen zu unterscheiden [379]. Die Bindungsstellen für sulfatierte Glykane wie Heparin, Fukoidin und Dextransulfat und die Rezeptoren für die Adhäsion der Leukozyten (PSGL-1) befinden sich auf Neutrophilen entweder in unmittelbarer Nähe oder sind identisch [380]. Neben P-Selektin wird auch L-Selektin durch Heparin und Fukoidan *in vitro* effektiv inhibiert [381, 382]. Auf Endothelzellen konnten heparinähnliche Liganden für L-Selektin identifiziert werden [383, 384]. Es handelt sich um Heparansulfate, welche auf Proteoglykanen präsentiert werden. Der Unterschied zu Heparin ist hauptsächlich der geringere Sulfatierungsgrad. Lösliches Heparansulfat kann als Inhibitor für L- und P-Selektin wirken [385].

Auch *in vivo* konnte eine antiinflammatorische Aktivität durch Heparin und heparinoide Substanzen festgestellt werden [381]. Die Wirkung eines fraktionierten Heparins, Enoxaparin, auf die Reduktion der Infarktausmaße scheint teilweise P-Selektin-abhängig zu sein [386]. Sulfatierte Polysaccharide reduzieren die Anzahl rollender Leukozyten [387]. Bei Ischämie und Reperfusionverletzungen kann Heparin schützend wirken, indem es die Akkumulation von Leukozyten verhindert [388].

Obwohl sich in einigen Untersuchungen ein Einfluss des Sulfatierungsgrades auf die Inhibierungspotenz der Polysaccharide angedeutet hat und die Heparine offensichtlich vielversprechende Substanzen sind, gibt es bisher keine detaillierten Struktur-Aktivitäts-Beziehungen. Nur in einer *in vivo*-Studie konnte kürzlich eine Korrelation zwischen dem Sulfatierungsgrad, der Selektin-Bindung und der antiinflammatorischen Aktivität festgestellt werden [389].

2.8 Ziel der vorliegenden Arbeit

Die Selektine leiten die Adhäsionskaskade der Leukozyten am Endothel ein und sind von wesentlicher Bedeutung für die physiologische Entzündungsreaktion des Organismus. Unerwünscht ist eine pathologische Entzündungsreaktion und damit die Emigration der Leukozyten infolge verschiedener Krankheiten. Aus pharmakologischer Sicht ist deshalb die Untersuchung der Bindungseigenschaften dieser Adhäsionsrezeptoren und ihre Inhibierung als neue Strategie in der Entzündungstherapie von großem Interesse.

Selektine haben die bemerkenswerte Fähigkeit, Oligosaccharid-Liganden mit sehr hoher Selektivität zu erkennen, während sie hydrodynamischen Kräften ausgesetzt sind, und in diesem Zusammenhang eine Rollbewegung der Leukozyten auszulösen. Daher ist das Ziel der vorliegenden Arbeit, Beiträge zur Aufklärung der Bindungseigenschaften der Selektine im Zellrollprozess unter physiologischen Flussbedingungen zu leisten.

In einem dynamischen Assay werden die Auswirkungen von Scherkraft und eingeschränkter Kontaktzeit auf die Selektin-Bindung berücksichtigt. Gleichzeitig ist es durch Abstraktion des Systems möglich, den Einfluss einzelner Bindungsparameter auf den Zellrollprozess zu ermitteln. Ein dynamisches Testsystem, welches die Untersuchung der Selektine und ihrer Liganden im Rollprozess zulässt, wurde im Jahr 2000 von Jan Vogel etabliert [1]. In diesem Testsystem können synthetische Glykolipide in eine Modellmembran integriert werden und als Liganden für Selektintragende Zellen wirken. In dieser Arbeit wird das bisher verwendete System durch eine computergestützte Auswertung der Rollgeschwindigkeit sowie der Anzahl adhärierter Zellen verbessert, so dass eine zeitaufgelöste Feinanalyse des Rollprozesses möglich wird und die Ergebnisse statistisch besser abgesichert werden. Darauf aufbauend sollen durch Modifikationen der Glykolipide und Verwendung verschiedener Matrixlipide tiefere Kenntnisse über die Ligandenpräsentation, insbesondere deren Flexibilität und die Bedeutung der Multivalenz, gewonnen werden.

Die Inhibierung der Selektine könnte pathologische Entzündungen zu einem frühen Zeitpunkt verhindern und bietet sich daher als Angriffspunkt für eine neue Entzündungstherapie an. Deshalb wird im zweiten Teil dieser Arbeit der Anwendungsbereich des gut funktionierenden Testsystems auf die Testung neuer potentieller Selektin-Inhibitoren ausgeweitet. Verschiedene Substanzgruppen werden analysiert und Struktur-Wirkungs-Beziehungen abgeleitet.

Um nicht nur auf die Pathologie der Entzündung zu fokussieren, sondern das Testsystem auch auf Tumorerkrankungen mit Selektinbeteiligung zu übertragen, wird im dritten Teil der vorliegenden Arbeit die Wechselwirkung zwischen Selektinen und Tumorzellen im dynamischen Testsystem untersucht. Die Betonung liegt dabei auf der Fragestellung, ob das Rollen von Tumorzellen der Initialschritt der Metastasierung sein kann. Eine Selektinblockade bietet auch in diesem Zusammenhang aus pharmazeutischer Sicht neue Perspektiven bei der Unterdrückung einer Metastasierung. Deshalb werden in einem zweiten Schritt verschiedene Substanzen auf ihre Fähigkeit, die Selektin-vermittelte Krebszelladhäsion zu unterdrücken, geprüft.

3 Materialien und Methoden

Für die Zellrollexperimente (3.5) und die statischen Zelladhäsionsuntersuchungen (3.3) sind verschiedene Komponenten wichtig: Modellmembranen (3.1), Zellen (3.2) und potentielle Roll-Inhibitoren (3.4).

3.1 Modellmembranen

Für die Herstellung der Modellmembranen müssen die Deckgläschen oxidativ gereinigt und modifiziert werden (3.1.1). Darauf aufbauend bestehen die Modellmembranen entweder aus Lipiden (3.1.2) oder Selektin-haltigen Schichten (3.1.3).

3.1.1 Präparation der Deckgläschen

Als transparente Träger für die Modellmembranen wurden Deckgläschen aus Glas (rund, Durchmesser: 18mm, Dicke: 0,35 mm) gewählt. Vor ihrer Verwendung wurden sie mit einer Mischung aus 7 Teilen konz. H_2SO_4 und 3 Teilen H_2O_2 30 % für 30 min. bei $80^\circ C$ im Ultraschallbad oxidativ gereinigt. Auf einen Spülschritt mit MilliQ[®]-Wasser (hochrein) für 10 min. folgte eine Behandlung mit einer Mischung aus einem Teil konz. NH_3 , einem Teil H_2O_2 30 % und 5 Teilen MilliQ[®]-Wasser für 30 min. bei $80^\circ C$ im Ultraschallbad, um alle Oberflächenmoleküle zum Silanol zu reduzieren. Die Deckgläschen wurden wieder 10 min. mit MilliQ[®]-Wasser gespült und dann im Trockenschrank ($60^\circ C$) getrocknet.

Für die Herstellung der Selektin-Schichten wurden die trockenen Deckgläschen in trockenem Chloroform mit ca. 2 g Cyanurchlorid (ACROS Organics, Geel, Belgien) für 30 min. bei RT im Ultraschallbad behandelt. Dabei reagiert das Cyanurchlorid mit freien OH-Gruppen auf der Glasoberfläche unter Abspaltung von Chlorwasserstoff. Nach einem Spülschritt mit trockenem Chloroform für nochmals 30 min. bei RT im Ultraschallbad wurden die Gläschen getrocknet und für die weitere Verwendung trocken aufbewahrt.

Für die Lipidmembranen wurden die frisch gereinigten Gläschen mit Monochlor-dimethyl-octadecyl-Silan (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) bei $60^\circ C$ für 10 min. inkubiert. Aufgrund der sehr hohen Hydroxylgruppensdichte an der Glasoberfläche bildet sich bei dieser Vorgehensweise ein äußerst homogener Monolayer (Self-Assembling), der dem Material hydrophobe Eigenschaften verleiht. Die so behandelten Gläser wurden mit Hilfe der Langmuir-Blodgett-Technik (s. Kap. 3.1.2.3) mit Lipidmembranen überzogen.

3.1.2 Lipidmembranen

Die Lipidmembranen bestehen aus Matrixlipiden (3.1.2.1), in die Glykolipide (3.1.2.2) als Liganden eingebettet werden. Mit Hilfe der Langmuir-Blodgett-Technik (3.1.2.3) werden die Membranen auf die präparierten Deckgläschen übertragen.

3.1.2.1 Matrixlipide

1,2-Distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DSPC), 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (POPC), 1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DMPC) wurden bei Sigma (Deisenhofen, Deutschland) gekauft. Die Reinheit der Lipide wurde mittels HPLC und HPTLC analysiert und war immer größer als 99%.

Der Fluoreszenzmarker Triethylammonium-1,2-Dihexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin (Texas-Red[®] DHPE) ist ein Produkt von Molecular Probes (Inc. Europe BV Leiden, Holland).

3.1.2.2 Glykolipide

SLe^x-Derivate mit Lipidanker wurden im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Prof. Schmidt (Universität Konstanz) von Ch. Gege und G. Hummel synthetisiert und ihre Reinheit mittels HPTLC und NMR bestimmt. Es handelt sich um Glykolipide, bei denen das Oligosaccharid ohne „Spacer“ oder über Ethoxy- [390] bzw. Laktoseeinheiten [391] mit dem Lipidanker verknüpft ist. Die Lipidanker sind teilweise mit 7-Nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl (NBD) [392] fluoreszent markiert oder durch Fluorierungen [393] modifiziert worden. Durch kovalente Bindung im Glycerolteil zwischen Lipid- und Kohlenhydratanteil wurden sie dimerisiert [394].

3.1.2.3 Langmuir-Blodgett-Technik

Lipide oder Lipidgemische (Angabe des Mischungsverhältnisses in mol%) wurden in Chloroform gelöst an der Wasser/Luft-Grenzfläche eines Langmuir-Troges (Filmwaage Typ R&K Riegler & Kirstein GmbH, Deutschland) gespreitet. Als Subphase wurde MilliQ[®]-Wasser eingesetzt. Nach Abdampfen des Lösungsmittels (15 min. bei RT) wurde der Lipidfilm bei 25°C mit einer Geschwindigkeit von 0,05 mm/min. bis 38 mN/m komprimiert. Bei diesem Lateraldruck wurde die vorgeformte Lipidmembran auf die hydrophobisierten Gläser (s. Kap. 3.1.1) übertragen, indem die Plättchen aus der Luft senkrecht durch die Lipidschicht in die Wasserphase getaucht wurden. Die frisch präparierten Modellmembranen wurden sofort für die folgenden Experimente verwendet.

3.1.3 Selektin-haltige Schichten

Die Selektin-haltigen Schichten bestehen entweder aus einer ausgewogenen Mischung aus Albumin mit P-Selektin oder L-Selektin.

3.1.3.1 P-Selektin

P-Selektin wurde aus menschlichen Thrombozyten-Konzentraten gewonnen. Zunächst wurden die Thrombozyten durch verschiedene Zentrifugationsschritte gereinigt und eventuell noch vorhandene Erythrozyten abgetrennt. Durch mehrere Frier-Tau-Zyklen wurden sie lysiert und die Membranproteine durch Triton-X100 aus den Membranstücken herausgelöst. Durch Zentrifugation wurden die nicht gelösten Membranbestandteile entfernt. Es folgte die affinitätschromatographische Isolierung des P-Selektins aus der Membranproteinfraktion. Glykosylierte Membranproteine binden auf der Säule an Concanavalin A. Durch Zusatz von 0,5 % Methylmannosid zum Elutionspuffer wird P-Selektin aus der Bindung an Concanavalin A verdrängt. Bei einer Konzentration von 0,5 % Octylglykosid im Elutionspuffer liegt es jedoch präzipitiert vor. Nur die niedermolekularen Bestandteile verlassen die Säule. Erst bei 1 % Octylglykosid als Lösungsvermittler wird P-Selektin eluiert. Die Fraktionen wurden vereinigt, dialysiert und in einer Vakuumzentrifuge 1:3 eingeeengt. Mit einem ELISA-Test (human sP-selectin Instant ELISA, MedSystems Diagnostics GmbH, Wien, Österreich) wurde die Konzentration des P-Selektins bestimmt. Sie lag je nach Charge zwischen 7 und 10 µg/ml. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Lösungen tiefgefroren.

Teilweise wurde auch käufliches P-Selektin in Form der IgG-Chimäre verwendet. Rekombinante humane P-Selektin/Fc Chimäre (P-Sel-Fc) wurde bei R&D Systems (Wiesbaden, Deutschland) gekauft. Die Konzentration der Gebrauchslösung betrug 20 ng/ml.

Um monomolekulare Schichten aus P-Selektin bzw. P-Sel-Fc kovalent zu fixieren, ist die Modifikation der Gläser mit Cyanurchlorid (s. Kap. 3.1.1) notwendig. Cyanurchlorid dient als „Crosslinker“ zwischen Glas und Protein. Um eine unspezifische Adhäsion der Rollzellen auf dem Glasträger zu verhindern, wurde dem P-Selektin Rinderserumalbumin (BSA; Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in einer Endkonzentration von 0,5 % (m/V) zugemischt. Für Schichten, welche das Rollen von PSGL-1-haltigen Zellen unterstützen, wurden absolute Mengen an isoliertem P-Selektin zwischen 100 und 300 ng und an P-Sel-Fc zwischen 100 und 400 ng pro Plättchen verarbeitet. Die zweite reaktive Gruppe des fixierten Cyanurchlorids reagiert bei pH 8,8 mit freien NH₂-Gruppen des P-Selektins und BSA unter Abspaltung von Chlorwasserstoff. Um den pH-Wert konstant zu halten, wurde Borat-Puffer (10 mM), pH 8,8, als Lösungsmittel verwendet. Die Cyanurchlorid-beschichteten Deckgläschen wurden 2 h bei Raumtemperatur mit der Reaktionslösung inkubiert. Abschließend wurde mit MilliQ[®]-Wasser gespült und sofort der Zellrollversuch durchgeführt.

3.1.3.2 L-Selektin

Rekombinante humane L-Selektin/Fc Chimäre (L-Sel-Fc) wurde bei R&D Systems (Wiesbaden, Deutschland), affinitätsgereinigtes F(ab')₂ Fragment aus der Ziege (Fab), welches gegen humanes IgG-Fc gerichtet ist, wurde bei dianova (Hamburg, Deutschland) gekauft.

L-Sel-Fc wurde auf die gleiche Art wie unter 3.1.3.1 beschrieben auf dem Glasträger immobilisiert. Es wurde dabei im Gemisch mit BSA in einer Endkonzentration 0,02 µg/µl eingesetzt. Nach 2 h Inkubation bei RT wurden die Glasträger gründlich mit MilliQ[®]-Wasser gespült und die verbliebene Flüssigkeit abgezogen. Die Gläser wurden für 30 min. mit 60 µl einer reinen Lösung des Fab (1,3 mg/ml) bedeckt, um adhäsive Wechselwirkungen zwischen zellulären Fc-Rezeptoren und freien zugänglichen Fc-Domänen auf der Chimäre auszuschließen. Unmittelbar vor dem Versuch wurde die Fab-Lösung abgezogen.

3.2 Zellkultivierung

E-Selektin-transfizierte „Chinese Hamster Ovarial“-Zellen (E-CHO-Zellen) wurden in MEM- α -Medium mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS), 2 mM L-Glutamin und 100 nM Penicillin/Streptomycin kultiviert. 5x10⁴ E-CHO-Zellen/ml wurden in Kulturflaschen ausgesät und bei 37°C in 5 % CO₂ drei bis vier Tage inkubiert, bis sie nahezu konfluent gewachsen waren. Nach einer Trypsinisierung (3 min.) mit 2 ml 0,25 % Trypsin in EDTA (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) wurden die Zellen für 3 min. bei 1200 U/min. zentrifugiert und gewaschen. Für den Versuch wurden die Zellen in einer Konzentration von 1 Mio./100µl serumfreien Medium vorgelegt. In dieser Form halten sie sich bei beständigem Schütteln für die Dauer des Versuchs in Suspension (ca. 4 h).

U937-Zellen sind eine humane, myeloide Zelllinie (Monozyten-ähnlich), welche den P-Selektin-Liganden PSGL-1 exprimiert. Sie wurden in HEPES(10-15 mM)-gepuffertem RPMI-1640-Medium mit 10 % inaktiviertem FKS, 2 mM L-Glutamin (alles c.c.pro GmbH, Neustadt, Deutschland), 100 nM Mercaptoethanol (Sigma,

Deutschland) und 30 µg/ml Refobacin® (Merck, Darmstadt, Deutschland) sowie 0,25 µg/ml Fungizone® (Gibco GmbH, Karlsruhe, Deutschland) kultiviert. Die Suspensionszellen werden unmittelbar vor der Verwendung bei 1300 U/min. 7 min. zentrifugiert und in serumfreiem Medium bis zu einer Konzentration von 1 Mio./100 µl resuspendiert. Innerhalb der folgenden vier Stunden wurden sie im Versuch eingesetzt.

KG1a-Zellen sind eine humane, promyeloide Zelllinie, die PSGL-1 exprimiert. Wegen des vorhandenen Stammzellmarkers CD34 wird sie als stammzellanalog betrachtet. HL-60-Zellen entsprechen humanen, promyeloiden Zellen, welche noch nicht sehr differenziert und eher vor den Neutrophilen einzuordnen sind. Sie tragen ebenfalls PSGL-1. KG1a- und HL-60-Zellen werden wie U937-Zellen kultiviert.

HepG2-Zellen sind eine humane Karzinomzelllinie, die aus der Leber stammt. Sie wurden in RPMI-1640-Medium mit 10 % inaktiviertem FKS, 2 mM L-Glutamin und 1 % Penicillin/Streptomycin (alles c.c.pro GmbH, Neustadt, Deutschland) kultiviert. $2-3 \times 10^5$ Zellen/ml wurden in Kulturflaschen ausgesät und bei 37°C in 5 % CO₂ drei bis vier Tage inkubiert, bis sie konfluent gewachsen waren. Nach einer Trypsinisierung (3 min.) mit 2 ml 0,25 % Trypsin in EDTA (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) wurden die Zellen für 5 min. bei 1000 U/min. zentrifugiert und gewaschen. Für den Versuch wurden die Zellen in einer Konzentration von 1 Mio./100µl serumfreien Medium vorgelegt. In dieser Form halten sie sich bei beständigem Schütteln für die Dauer des Versuchs in Suspension (ca. 4 h).

HT-29-Zellen sind eine humane Karzinomzelllinie, welche aus Kolongewebe isoliert wurde. Sie wurden in DMEM-Medium (Gibco GmbH, Karlsruhe, Deutschland) mit 10 % inaktiviertem FKS, 2 mM L-Glutamin, 1 % Penicillin-Streptomycin und 1 % nicht-essentiellen Aminosäuren (Gibco) kultiviert. Bei Konfluenz war die Weiterbehandlung wie bei HepG2-Zellen.

LL-Zellen (LewisLung) sind eine humane Karzinomzelllinie aus Lungengewebe. Sie wurden in RPMI-1640-Medium mit 10 % FKS, 2 mM L-Glutamin und 1 % Penicillin-Streptomycin kultiviert. Je nach Zellkonzentration war ein Mediumwechsel von bis zu zweimal täglich notwendig. Die weitere Aufbereitung fand wie bei HepG2-Zellen beschrieben statt.

LL-, HepG2- und HT-29-Zellen wurden von Dr. Zeisig (Max-Delbrück-Zentrum, Berlin) zur Verfügung gestellt.

Um Zellen fluoreszent zu markieren, schloss sich nach dem ersten Zentrifugations- und Waschschrift optional eine Behandlung mit Calcium GreenTM-2, AM, (Molecular Probes, Inc. Europe BV Leiden, Holland) an.

3.3 Statische Zelladhäsionsexperimente

Schwarze 96-Well-Mikrotiter-Platten wurden mit 16 µl L-Sel-Fc (0,1 mg/ml) bzw. 28 µl P-Selektin (8 µg/ml) und BSA (Endkonzentration 0,5% m/V) in 50 µl Gesamtvolumen PBS-Puffer pH 7,4 mit je 50 mg/ml Calciumchlorid und Magnesiumchlorid je well beschichtet. Die Platten wurden über Nacht bei 8°C inkubiert. Um frei liegende Fc-Teile der L-Selektin-Chimäre abzusättigen, wurden sie für 30 min. bei RT mit 30 µl Fab (s. Kap. 3.1.3.2) behandelt. Nach einem Waschschrift mit 100 µl PBS-Puffer wurden 10.000 mit Calcein markierte Zellen/100 µl PBS-Puffer in jedem Well für 2 h bei 8°C inkubiert. Nach zwei Waschschriften mit jeweils 200 µl PBS-Puffer wurde die Fluoreszenz mit dem Messgerät FLUOStar Galaxy (BMG Lab Technologies GmbH, Offenburg, Deutschland; Anregung bei 485

nm, Emission bei 520 nm) bestimmt. Die Adhäsion der jeweiligen Zellen an P- bzw. L-Selektin wurde ins Verhältnis zur Bindung an 0,5% BSA gesetzt.

3.4 Potentielle Roll-Inhibitoren

Es wurden sLe^x-nachahmende Substanzen, semisynthetische, sulfatierte Polysaccharide bzw. heparinoide Verbindungen und Oligosaccharide, Proteine und Lipide aus humaner Milch untersucht.

3.4.1 sLe^x-Mimetika

Die hier untersuchten sLe^x-Mimetika der Arbeitsgruppe um Dr. Ikami (Sanwa Kagaku Kenkyusho Co. Ltd., Hokusei-cho, Japan) waren ausgehend vom sLe^x stark strukturvereinfachte, sulfatierte Fukose-Galaktose-Derivate, die zusätzlich einen unterschiedlich großen lipophilen Molekülanteil besitzen [395].

Außerdem wurde eine Kohlenhydrat-Struktur getestet, welche aus patentrechtlichen Gründen nur als „Inhibitor 1“ bezeichnet wird.

3.4.2 Heparinoide Verbindungen

Die hier untersuchten heparinoiden Verbindungen waren neben herkömmlichen Heparinzubereitungen partialsynthetisch abgewandelte Polysaccharide, welche freundlicherweise von Prof. Alban (Universität Kiel) zur Verfügung gestellt wurden. Unfraktioniertes Heparin stammt von Sigma (Deisenhofen, Deutschland). Als niedermolekulares Heparin wurde Certoparin von Novartis (Nürnberg, Deutschland) verwendet. Pentosanpolysulfat stammt von bene-Arzneimittel (München, Deutschland). Die partialsynthetischen Derivate von Phycarin (Goemar, St. Malo, Frankreich) und Curdlan (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) entstehen durch selektive und normale Sulfatierung [396, 397].

3.4.3 Oligosaccharide, Proteine und Lipide aus humaner Milch

Bei den Oligosaccharid-Proben handelt es sich um verschiedene Gemische von neutralen und sauren Oligosacchariden aus Humanmilch. Die Lipid-Proben sind Gangliosid-Extrakte aus Buttermilch (hochrein) und auf Kuhmilch basierende Rohstoffe mit Fokus auf Polarlipide. Die Protein-Proben sind verschiedene Peptid-Isolate aus Humanmilch. Alle wurden von Dr. Beermann (Milupa Research, Friedrichsdorf, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

3.5 Zellrollexperimente

Dieser Abschnitt gliedert sich in den Aufbau der Durchflussapparatur (3.5.1), Durchführung der Rollexperimente (3.5.2), Laser-Scanning-Mikroskopie (3.5.3), Aufzeichnung mit CMOS-Kamera (3.5.4) und Auswertung (3.5.5).

3.5.1 Aufbau der Durchflussapparatur

Es wurde eine von Jan Vogel entwickelte Durchflussapparatur verwendet, welche aus einem Block transparenten Polyacryl gefräst ist, dessen Außenmaße auf einen x-y-Mikroskoptisch abgestimmt wurden. Die eigentliche Durchflusskammer befindet sich am Boden, wo eine Vertiefung mit den Maßen 11×6×0,45 mm herausgearbeitet wurde. Abgerundete Ecken verhindern Strömungswirbel. Zu- und Ablauf werden

durch das Polyacryl nach oben geführt. Dort befinden sich Schlauchanschlüsse. Die Kammer wird auf der Unterseite mit einem präparierten Deckgläschen (s. Kap. 3.1) mit einem schraubbaren Metallring und Gummidichtung verschlossen (s. Abb. 6). Als Vorratsbehälter für das Fließmedium (PBS-Puffer pH 7,4 mit 50 mg/ml Calciumchlorid- und Magnesiumchlorid) diente ein 250 ml Scheidetrichter, der an einem Stativ in variabler Höhe befestigt wurde. Die Durchflussrate wurde über den hydrostatischen Druck auf 1 ml/min. eingestellt. Zwischen Vorratsgefäß und Kammer muss das Fließmedium ein Gefäß von 2 ml Volumen, das mit einem Septum verschlossen ist und ein Luftpolster enthält, passieren. Es dient als Blasenfalle und ermöglicht die einfache Injektion von Zellen und Testsubstanzen. Alle Teile der Durchflussapparatur wurden mit Schläuchen von 1 mm Innendurchmesser verbunden. Teilweise machte die nur geringe verfügbare Menge an Testsubstanz es erforderlich, das Volumen des Kreislaufsystems zu minimieren (2 ml). Diese Experimente wurden mit einer 12-Walzen-Schlauchpumpe durchgeführt. Die Durchflussrate wurde hier über die Pumpengeschwindigkeit ebenfalls auf 1 ml/min reguliert. Zellen und Testsubstanzen wurden in diesem Fall luftblasenfrei durch einen selbstdichtenden Gummischlauch injiziert.

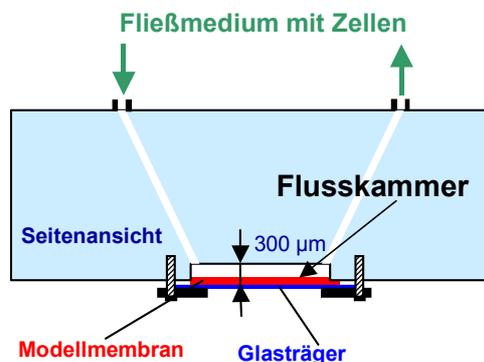


Abb. 6: Schematische Darstellung der Durchflussapparatur (Seitenansicht)

3.5.2 Durchführung der Rollexperimente

Vor Beginn des Versuches wurden Durchflusskammer und Fließmedium auf 37°C temperiert. Der Boden der Kammer wurde mit dem präparierten Glasträger verschlossen und die ganze Durchflussapparatur in den Objektisch des inversen Mikroskopes (Axiovert 135, Carl Zeiss) eingepasst. Die Durchflussrate wird durch Einstellen des Höhenunterschieds zwischen Vorrats- und Auffanggefäß auf 1 ml/min. eingestellt. Dies entspricht nach der Gleichung $G = 6 Q / (b h^2)$ für die Berechnung der Scherrate in Durchflusskammern (s. Kap. 2.4.1) einer Scherrate von ca. 200 s^{-1} . Von der vorbereiteten Zellsuspension wurden 100 µl in die Blasenfalle gegeben und der Fluss unterbrochen, sobald die Zellen die Kammer erreicht hatten. Bei den Inhibitionsversuchen wurden der Zellsuspension die Testsubstanzen in der jeweiligen Konzentration zugesetzt. Innerhalb von 5 Minuten sedimentierten alle eingespülten Zellen und befanden sich in Kontakt mit der Modellmembran. Der Fluß wurde wieder angestellt und das Roll- und Adhäsionsverhalten der Zellen über einen Zeitraum von 20 bis 30 Sekunden mit 20facher Vergrößerung verfolgt. Die Speicherung der Daten erfolgte auf zwei unterschiedliche Arten. Zum einen wurden digitale Mikroskopbilder mit dem Laser-Scanning-Mikroskop im Abstand von zwei Sekunden aufgenommen und als Bildsequenz gespeichert. Zum anderen wurden 23 Bilder pro Sekunde (23 fps)

mit einer CMOS-Kamera aufgenommen und ebenfalls als Bildsequenz im Computer festgehalten. Anhand der Bildsequenzen konnte die Bewegung der einzelnen Zellen nachvollzogen und ausgewertet werden.

3.5.3 Laser-Scanning-Mikroskopie

Ein großer Teil der Zellrollexperimente und alle fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen der Zellmembranen wurden mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop durchgeführt (LSM 410 invert, Carl Zeiss, Deutschland). Dabei wird ein quadratischer Ausschnitt der Probe ($630 \times 630 \mu\text{m}^2$ bei 20facher Vergrößerung) mit einem Laserstrahl zeilenweise gescannt. Eingesetzt wurden Objektive mit 20facher Vergrößerung, Immersionsobjektive mit 63 bzw. 100facher Vergrößerung, sowie ein 40x LD (Long Distance) Objektiv. Üblicherweise wurde für Transmissions- und Fluoreszenzaufnahmen der Calcein-markierten Zellen Laserlicht mit einer Wellenlänge von 488 nm verwendet. Für die Anregung des Fluoreszenzmarkers Texas-Red[®] war Laserlicht mit 543 nm notwendig. Ein Photomultiplier detektiert das Emissionslicht und liefert ein digitales Schwarz-Weiß-Bild.

3.5.4 Aufzeichnung mit CMOS-Kamera

Ein weiterer Teil der Zellrollexperimente wurde mit einem inversen Mikroskop (Axiovert 135, Carl Zeiss), an dem eine Kamera mit CMOS-Sensor (mc1300 von Mikrotron GmbH, Eching, Deutschland) installiert war, durchgeführt. Auch hier wurde ein Objektiv mit 20facher Vergrößerung verwendet. Die Kamera wandelt das vom Mikroskop empfangene optische Signal in elektrische Impulse um. Aus diesen erzeugt ein Framegrabber (Inspecta 4D, Mikrotron GmbH, Eching, Deutschland) ein digitales Bild und speichert es in einem für diesen Zweck reservierten Teil des Arbeitsspeichers (RAM) eines PC ab. Die Schnittstelle zwischen Framegrabber und Prozessor (CPU) ist der geschwindigkeitsbegrenzende Faktor bei der Datenübertragung von der Kamera zum Arbeitsspeicher. Die hohe Datenübertragungsrate von hier 133 MB/s ermöglicht Aufnahmen mit hohen Bildfrequenzen (s. Abb. 7). Die Software Mikrotron MotionBlitz (Version 3.0.4, Mikrotron GmbH, Eching) erlaubt, Daten aus dem Arbeitsspeicher als Bitmap-Sequenz darzustellen und auf die Festplatte zu kopieren. Außerdem lässt sich damit die Größe des Bildausschnitts, die Bildfrequenz und die zeitliche Länge der Sequenz steuern. Die hohe Bildfrequenz von 23 fps (entspricht annähernd Videofrequenz von 25 fps) ermöglicht die Anwendung einer Software und damit eine detailliertere und automatisierte Auswertung der Zellrollbewegung. Üblicherweise wurde ein Bildgröße von 800×800 Pixel gewählt, welche mit entsprechenden $520 \mu\text{m}^2$ ähnlich groß wie ein mit dem LSM aufgenommenes Bild ist.

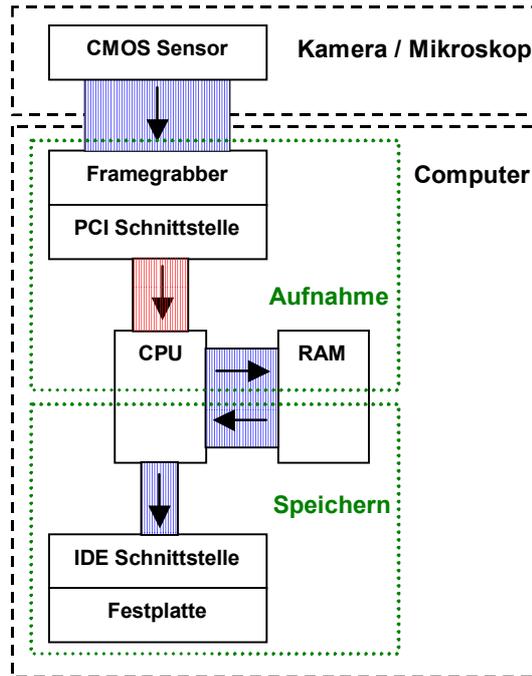


Abb. 7: Schema der Datenübertragung zwischen CMOS-Kamera und Computer (weitere Erläuterungen siehe Text)

3.5.5 Auswertung

Es wurden zwei Parameter bestimmt, um das Rollverhalten der Zellen zu charakterisieren bzw. bei Inhibierungsversuchen die Effizienz der eingesetzten Testsubstanzen zu ermitteln. Die Adhäsion entspricht der Anzahl an adhärenierten Zellen nach 20 oder 30 s Versuchszeit in Relation zum Ausgangswert bei Versuchsbeginn. Sie wird in Prozent angegeben. Die Rollgeschwindigkeit ist die Entfernung, die die Zellen im Durchschnitt in einer bestimmten Zeit zurücklegen, geteilt durch die entsprechende Zeitspanne. Eine Inhibierungspotenz drückt sich in reduzierten Zellbindungsereignissen und erhöhter Geschwindigkeit aus.

Die mit dem LSM aufgenommenen Bildsequenzen wurden manuell ausgewertet. Für die Adhäsion wurden die Zellzahlen auf dem 1. und 15. Bild gezählt und ins Verhältnis gesetzt. Für die Quantifizierung der Rollgeschwindigkeit wurden aufeinanderfolgende Bilder verschiedenen Farben zugeordnet und unter Verwendung der Software des LSM 410 übereinander gelegt. Die zurückgelegte Distanz einer Zelle ist der Abstand der Zelle zwischen dem ersten und zweiten Bild. Die Rollgeschwindigkeit ergibt sich aus der Distanz dividiert durch das Zeitintervall zwischen den Bildern.

Die Bitmap-Sequenzen wurden mit der Software Imagoquant Multitrack-2 (Mediquant GmbH, Halle, Deutschland) ausgewertet. Das Programm verfolgt die Bewegung jeder einzelnen Zelle über einen variablen Zeitraum. Dabei muss zunächst auf dem ersten Bild mit dem Cursor jede Zelle in ihrem kontrastreichsten Bereich manuell markiert werden. In einem bestimmten Bereich um die ausgewählten Koordinaten sucht das Programm automatisch den dunkelsten Punkt. Mit diesem als Bezug wird ein Rechteck konstruiert, wobei der Punkt im hinteren Drittel liegt. Beim Vergleich des ersten mit dem nachfolgenden Bild verändert sich die Lage des Rechtecks nicht, während sich die Zelle nun weiter rechts, aber immer noch teilweise

im Rechteck befindet. Der jetzt dunkelste Punkt im Rechteck wird bestimmt und ein neues Rechteck um diesen Punkt gelegt (Abb. 8).

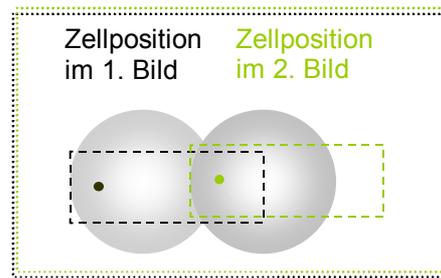
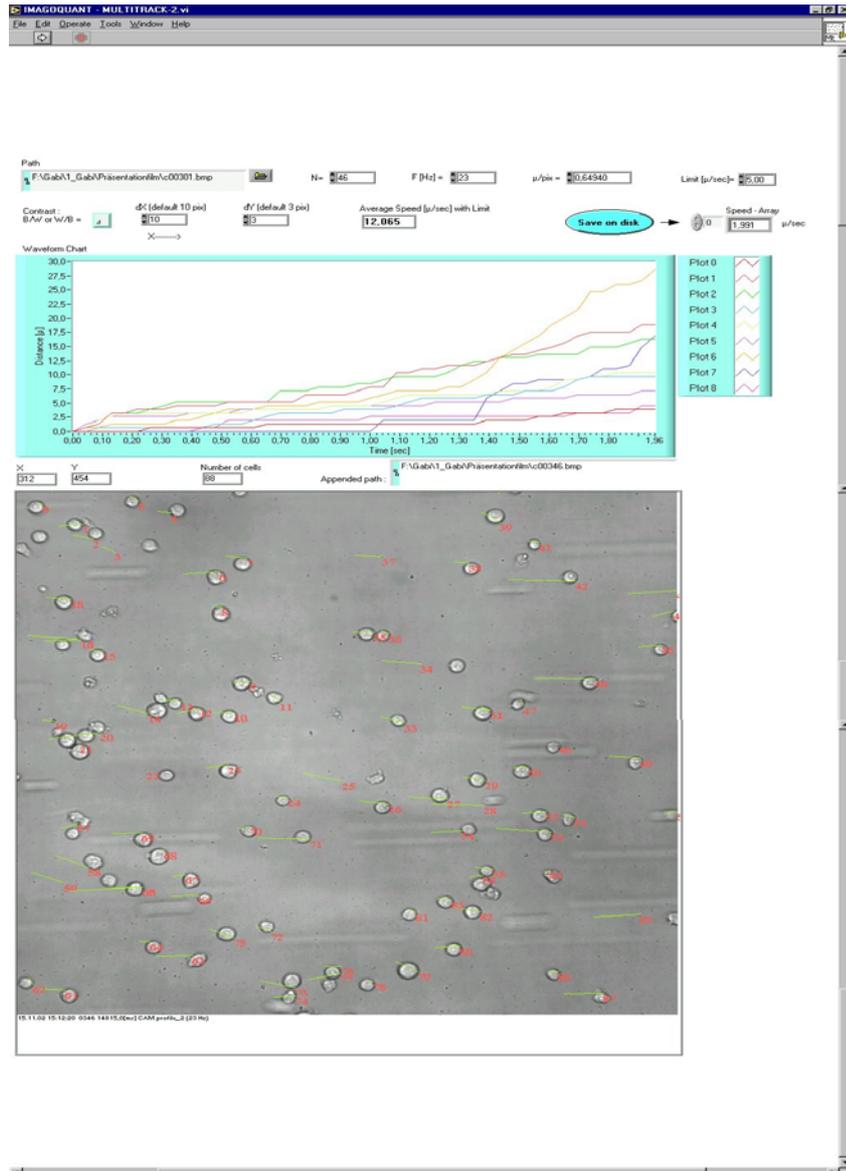


Abb. 8: Zugrunde liegende Theorie der Softwareanwendung (weitere Erläuterungen siehe Text)

Dieser Vorgang wiederholt sich über die ganze Sequenz. Die Abstände zwischen den dunkelsten Punkten ergeben zusammen mit der entsprechenden Zeitspanne die Rollgeschwindigkeit. Die Software kann auf die vollständigen Sequenzen mit bis zu 1300 Bildern angewendet werden. Dabei ist jedoch die Wahrscheinlichkeit, dass Zellen vom Programm „verloren“ werden, hoch. Deshalb wurden mehrere kürzere Sequenzen mit einer Länge von 2 s zwischen 2 und 18 s Versuchszeit für die Auswertung gewählt. Die Adhäsion wird auch hier manuell, d.h. durch Zählen der Zellzahl bestimmt.

Die folgende Abbildung (Abb. 9) zeigt beispielhaft die Auswertung einer Rollsequenz von 46 Bildern. Als unterer Grenzwert für das Rollen wurde $5 \mu\text{m/s}$ gewählt, so dass Zellen, die weniger als $5 \mu\text{m/s}$ schnell sind, nicht bewertet und Artefakte von der Analyse ausgeschlossen werden. Da der Durchmesser der Zellen selbst ca. $10 \mu\text{m}$ beträgt, kann es ohne Angabe eines Limits durch Verformung fest adhärierter Zellen im Fluss zur Berechnung einer Geschwindigkeit durch das Programm kommen.

Abb. 9: Auswertung einer Rollsequenz von 46 Bildern. Im oberen Diagramm ist der von verschiedenen einzelnen Zellen zurückgelegte Weg gegen die entsprechende Zeit aufgetragen. Im unteren Bereich ist das letzte Bild der Sequenz mit den von den einzelnen Zellen zurückgelegten Strecken als hellgrüne Striche zu sehen. Die roten Zahlen geben die Reihenfolge wieder, in der die Zellen zu Beginn markiert wurden



Vom Programm wird eine Datei (Speed-Array) erzeugt, welche die durchschnittliche Geschwindigkeit der einzelnen Zellen in der markierten Reihenfolge angibt, so dass die Werte den entsprechenden Zellen zugeordnet werden können. Durchschnittsgeschwindigkeiten unter dem Limit werden zwar auch angegeben, jedoch versetzt in der darunterliegenden Reihe. Dadurch stören sie nicht, wenn die Geschwindigkeitsdaten ausgewählt und in Statistikprogramme wie Excel kopiert werden. Auf diese Weise ist eine einfache weitere Verarbeitung der Daten möglich. Mit Ausnahme der Untersuchungen zur Inhibierungsfähigkeit der Milch-Fraktionen, bei denen verschiedene Substanz-Konzentrationen getestet wurden, wurden alle Ergebnisse mindestens dreimal repliziert und die entsprechenden Standardabweichungen berechnet. Üblicherweise konnten zwischen 100 und 300 Zellen pro Experiment ausgewertet werden. Die Inhibitionsdaten der sulfatierten Polysaccharide wurden unter Anwendung des Kruskal-Wallis-Test gefolgt vom Nemenyi-Post-Hoc-Test statistisch bewertet. Unterschiede wurden mit $p = 0,05$ als signifikant akzeptiert.

4 Ergebnisse und Diskussion

Der Ergebnisteil gliedert sich in Ligandenpräsentation (4.1), Inhibitionsuntersuchungen (4.2) und Adhäsion humaner Krebszellen an Selektine (4.3).

4.1 Ligandenpräsentation

Das Kapitel Ligandenpräsentation unterteilt sich in Visualisierung der Ligandenverteilung (4.1.1), Einfluss der Ligandenmolekülstruktur und -flexibilität (4.1.2), Versuch der Clusterung durch Dimerisierung der sLe^x-Liganden (4.1.3) und Self-Assembling der Ligandencluster durch partielle Fluorierung der Alkylkette (4.1.4).

4.1.1 Visualisierung der Ligandenverteilung

Mit dem von Jan Vogel (2000) entwickelten dynamischen Testsystem stand eine gut charakterisierte Methode für die Analyse der Selektin-vermittelten Zellrollprozesse zur Verfügung [1]. Ein Kernstück dieses Testsystems ist die auf einem Glaträger fixierte Modellmembran. Die mit Hilfe der Langmuir-Blodgett-Technik übertragenen Monolayer (s. Kap. 3.1.2.3) lassen sich durch gezielte Auswahl der Lipide lateral strukturieren. Jan Vogel hat in seiner Arbeit gezeigt, dass eine Clusterung bzw. eine Mikrodomänenbildung eines sLe^x-Ceramide (sLe^x-Cer) für das Selektin-vermittelte Rollen essentiell ist [398]. Bei sLe^x-Cer handelt es sich um ein natürlich vorkommendes Glykosphingolipid, dessen sLe^x-Kopfgruppe über einen Laktose-Spacer mit dem Ceramid verbunden ist. Wenige Studien befassen sich mit Glykolipiden in ihrer Funktion als Selektin-Liganden. Auf sLe^x basierende Ceramide sind aus Granulozyten isoliert worden [399, 400] und ihre Fähigkeit, Selektine zu binden, konnte mit Experimenten in der Flusskammer bewiesen werden [401].

Verschiedene Lipide besitzen aufgrund des strukturellen Einflusses von sowohl Kopfgruppen- wie auch Kettenbereichen unterschiedliche physikalische Eigenschaften und sind deshalb selten ideal miteinander mischbar. So zeigen insbesondere fluide und rigide Lipide deutliche Entmischungerscheinungen bei der isothermen Komprimierung auf einer Filmwaage. Dieser Effekt wurde bei der Herstellung der Ligand-haltigen Modellmembranen ausgenutzt. Durch den Einbau von sLe^x-Cer in verschiedene Lipidmatrices konnte der Einfluss der lateralen Strukturierung auf die Ligandenfunktion untersucht werden. Dabei wurde die Ligandenfunktion bei homogener Verteilung des Glykolipids in der Matrix mit der bei Existenz verschieden großer Cluster verglichen. Nur in einer DSPC-Matrix vermittelt sLe^x-Cer in einem Konzentrationsbereich von 0,01 bis 0,05 mol% ein Selektin-vermitteltes Rollen. In dieser Matrix liegt sLe^x-Cer in Clustern angeordnet vor.

Phasenseparationen können durch Zusatz eines Fluoreszenzmarkers, welcher sich seinen Eigenschaften entsprechend in der fluiden oder der rigiden Phase anreichert, auf der Fluoreszenzfilmwaage veranschaulicht werden. Der Anteil des Markers muss dabei allerdings mindestens 1 mol% betragen. Die relevanten Konzentrationen an sLe^x-Lipid liegen andererseits deutlich unter 1 mol%. Bei diesem Verhältnis beeinflusst der Marker die laterale Struktur stärker als das zu untersuchende Glykolipid.

Die Existenz von Clustern bei höheren Anteilen an sLe^x-Cer in fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen implizieren Clusterbildung als funktionelle Voraussetzung des Zellrollens, konnten aber für die eigentlichen

Rollkonzentrationen der Liganden bisher nie direkt nachgewiesen werden. Erst die Konjugation von NBD an sLe^x-Cer (sLe^x-NBDCer) ermöglicht jetzt den direkten Nachweis in der Modellmembran. Durch die Synthese dieses sLe^x-Analogons durch die Arbeitsgruppe um Prof. Schmidt [392] kann eine Glykolipidclustering in der auf dem Glasträger fixierten Modellmembran in situ nachgewiesen werden. Der Fluorophor NBD ist am äußeren Ende des Ceramids eingefügt worden (Abb. 10).

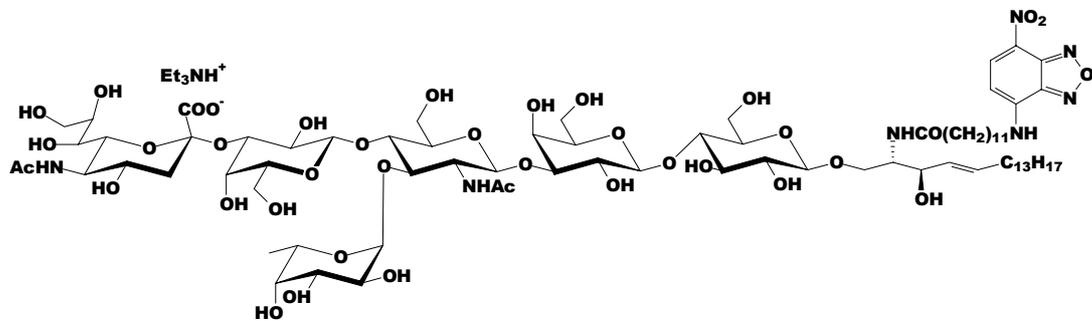


Abb. 10: Strukturformel des NBD-markierten natürlich vorkommenden sLe^x-Glykosphingolipid-Derivats

Analog zu den Rollexperimenten mit sLe^x-Cer wurde sLe^x-NBDCer in Konzentrationen zwischen 0,01 bis 0,1 mol% in Matrices aus DSPC, POPC und DSPC/POPC (95:5) eingebaut.

Im fluiden POPC finden sich bei beiden Konzentrationen erwartungsgemäß keine Entmischungserscheinungen im übertragenen Monolayer (Abb. 11).

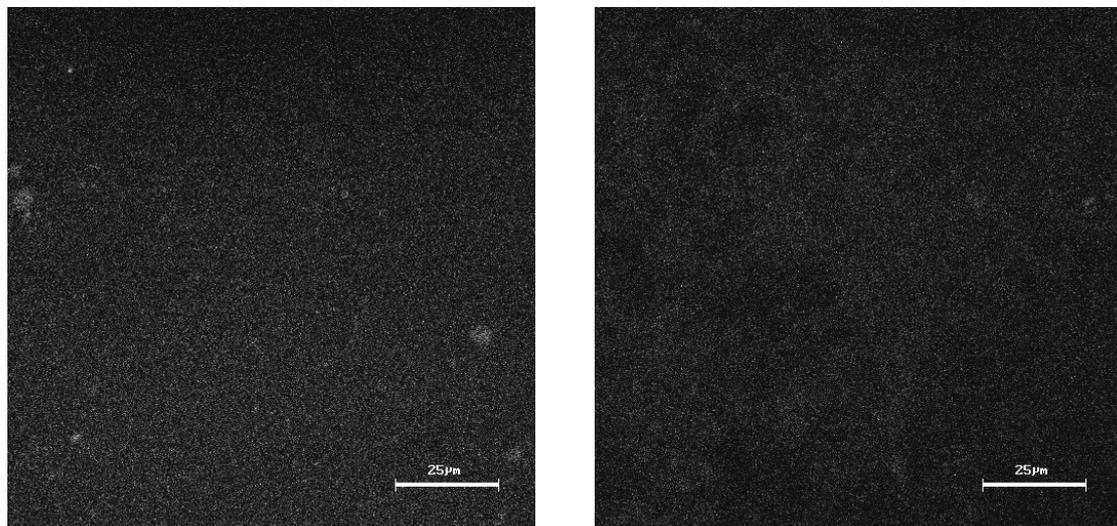


Abb. 11: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (100fache Vergrößerung) von 0,1 mol% (links) und 0,01 mol% sLe^x-NBDCer (rechts) in POPC

Die gleichen Konzentrationen an sLe^x-NBDCer führen in rigidem DSPC zu deutlichen Clusterbildungen, welche fluoreszenzmikroskopisch als winzige helle Punkte zu erkennen sind (Abb. 12).

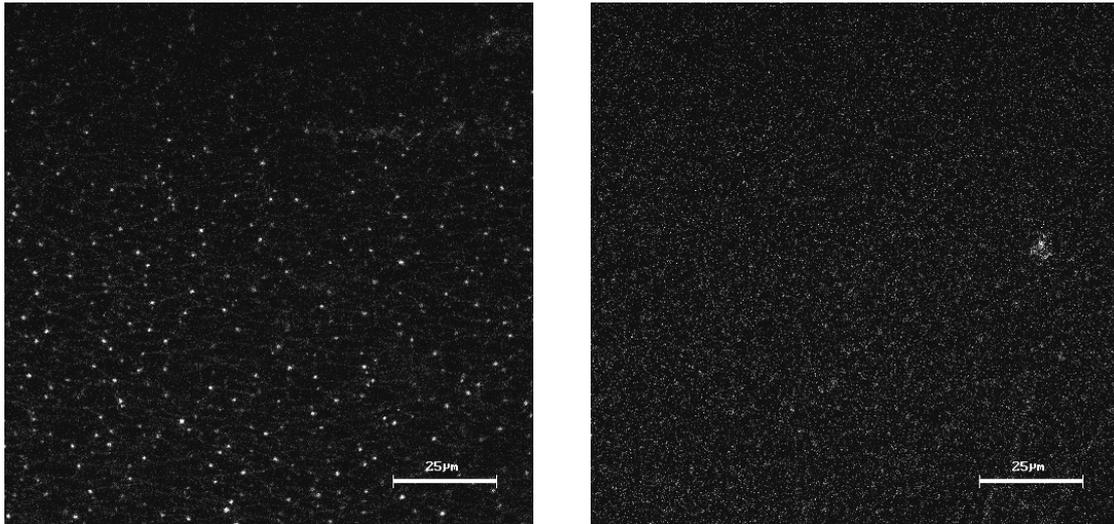


Abb. 12: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (100fache Vergrößerung) von 0,1 mol% (links) und 0,01 mol% sLex-NBDCer (rechts) in DSPC

Um die Größe der Cluster bei gleicher Ceramid-Konzentration zu variieren, wurde DSPC als Matrixlipid und POPC als Hilfslipid eingesetzt. In einer Mischung aus DSPC und POPC im Verhältnis von 95:5 kommt es zur Phasentrennung der Komponenten, so dass POPC in relativ großen fluiden Bereichen im DSPC vorliegt. sLe^x-NBDCer reichert sich entsprechend seiner physikochemischen Eigenschaften im POPC an. Im Fluoreszenzmikroskop sind diese Strukturen als helle Areale im dunklen DSPC zu beobachten (Abb. 13 und 14).

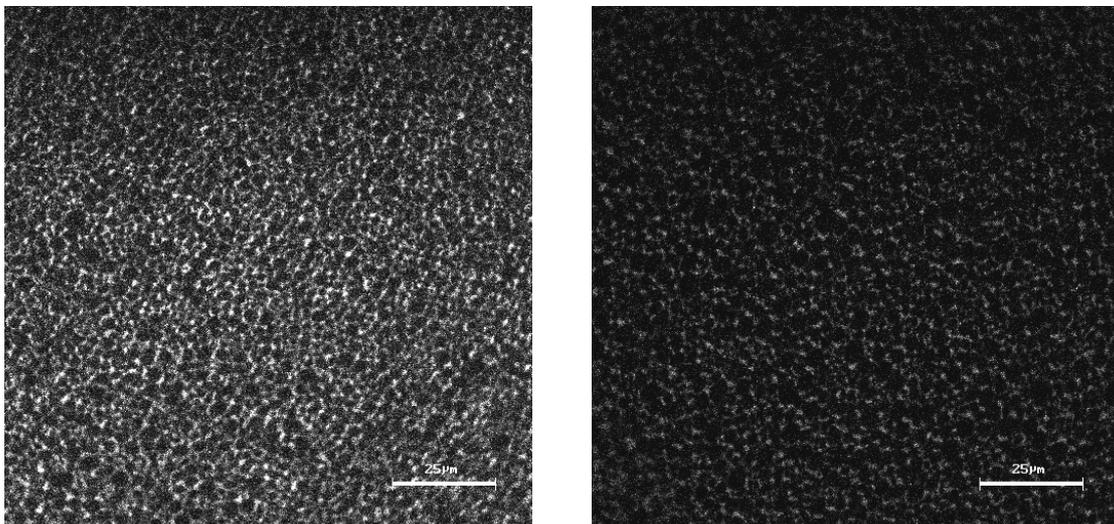


Abb. 13: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (100fache Vergrößerung) von 0,1 mol% (links) und 0,01 mol% sLe^x-NBDCer (rechts) in POPC/DSPC (95:5)

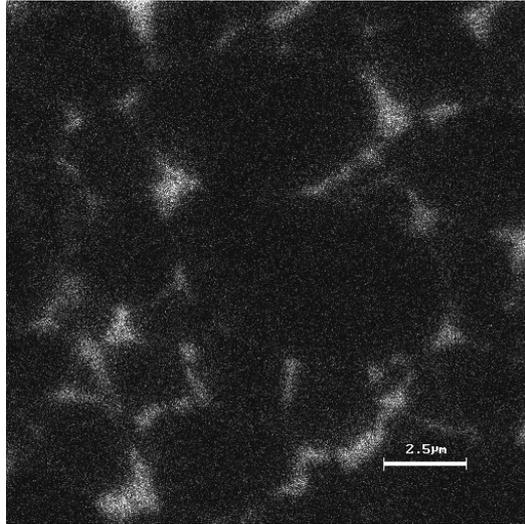
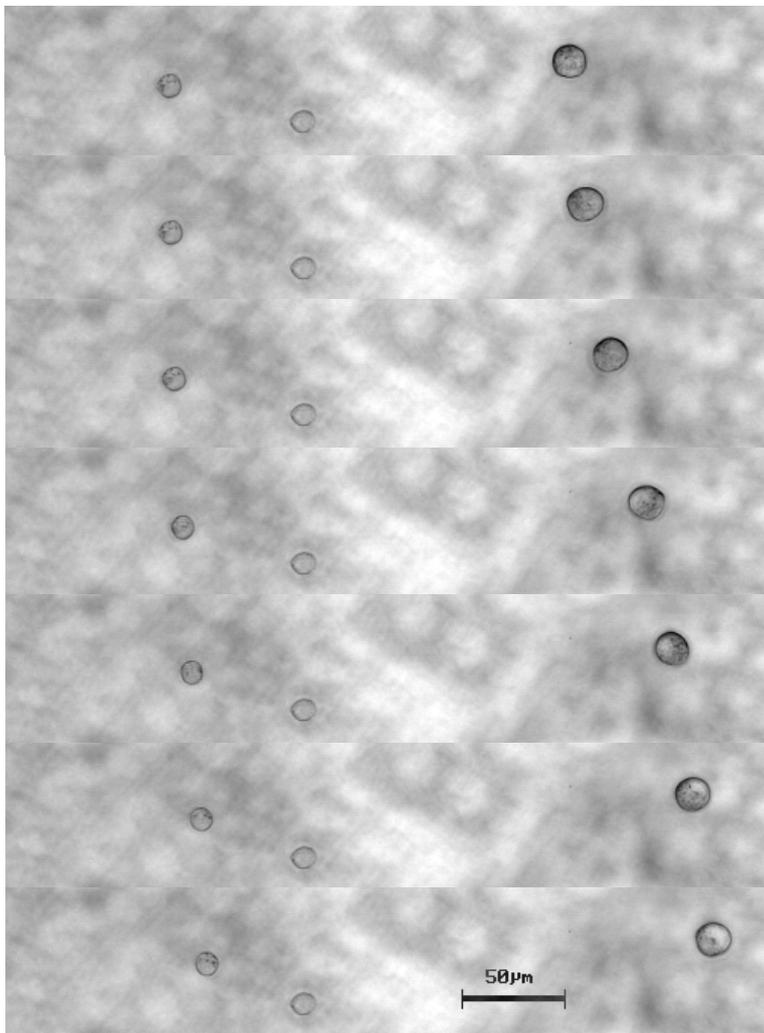


Abb. 14: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (100fache Vergrößerung, Zoom: 8) von 0,1 mol% sLe^x-NBDCer in POPC/DSPC (95:5)



Um die Funktionsfähigkeit des sLe^x-NBDCer als Ligand für E-Selektin nachzuweisen, wurde das Rollverhalten von E-CHO Zellen analysiert. Mit dem System 0,01mol% sLe^x-NBDCer in DSPC sollte, orientiert an früheren Versuchen mit sLe^x-Cer, ein Rollen nachzuweisen sein. In der nebenstehend dargestellten Sequenz (Abb. 15) ist eine Rollbewegung der Zellen gut zu erkennen. Die Zellen rollen hier mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von ca. 5 μm.

Abb. 15: Rollen von E-CHO-Zellen auf 0,01 mol% sLe^x-NBDCer in DSPC (Abstand der Bilder 12 Sekunden)

Mit diesen Untersuchungen ist es somit erstmals gelungen, eine direkte Korrelation der sichtbaren Lateralstrukturierung kleinster Mengen an Glykolipiden mit ihrer

Funktion als multivalente Rollliganden zu erreichen. Damit wird eindrucksvoll die aufgestellte Hypothese der multivalenten Bindung als Voraussetzung für das Selektin-vermittelte Zellrollen untermauert.

4.1.2 Einfluss der Ligandenmolekülstruktur und –flexibilität

Der „Aktionsradius“ von Adhäsionsrezeptoren wird durch ihre Größe bzw. ihre Ausdehnung in den extrazellulären Raum und die Flexibilität ihrer Struktur bestimmt. Die natürlich vorkommenden Selektin-Liganden sind Mucin-artige Glykoproteine, welche die Kohlenhydrat-Bindungsepitope auf Seitenketten eines hochflexiblen Proteingerüsts präsentieren. Diese Struktur verleiht ihnen neben der räumlichen Konzentration einzelner Bindungsepitope eine hohe Beweglichkeit. Zusätzlich ragen die Mucine weit in die extrazelluläre Region hinein, so dass die peripheren Erkennungsstrukturen für die Selektine gut erkennbar und zugänglich sind.

Im sLe^x-Cer (s. Kap. 4.1.1) ist die Kopfgruppe durch den vergleichsweise starren Laktose-Spacer unbeweglicher als in natürlichen Sialomucinen. Um den Einfluss der Ligandenmobilität und –flexibilität auf den Rollprozess zu bewerten, wurde eine Serie von Glykolipiden bezüglich ihrer Ligandenfunktionalität verglichen (Abb. 16).

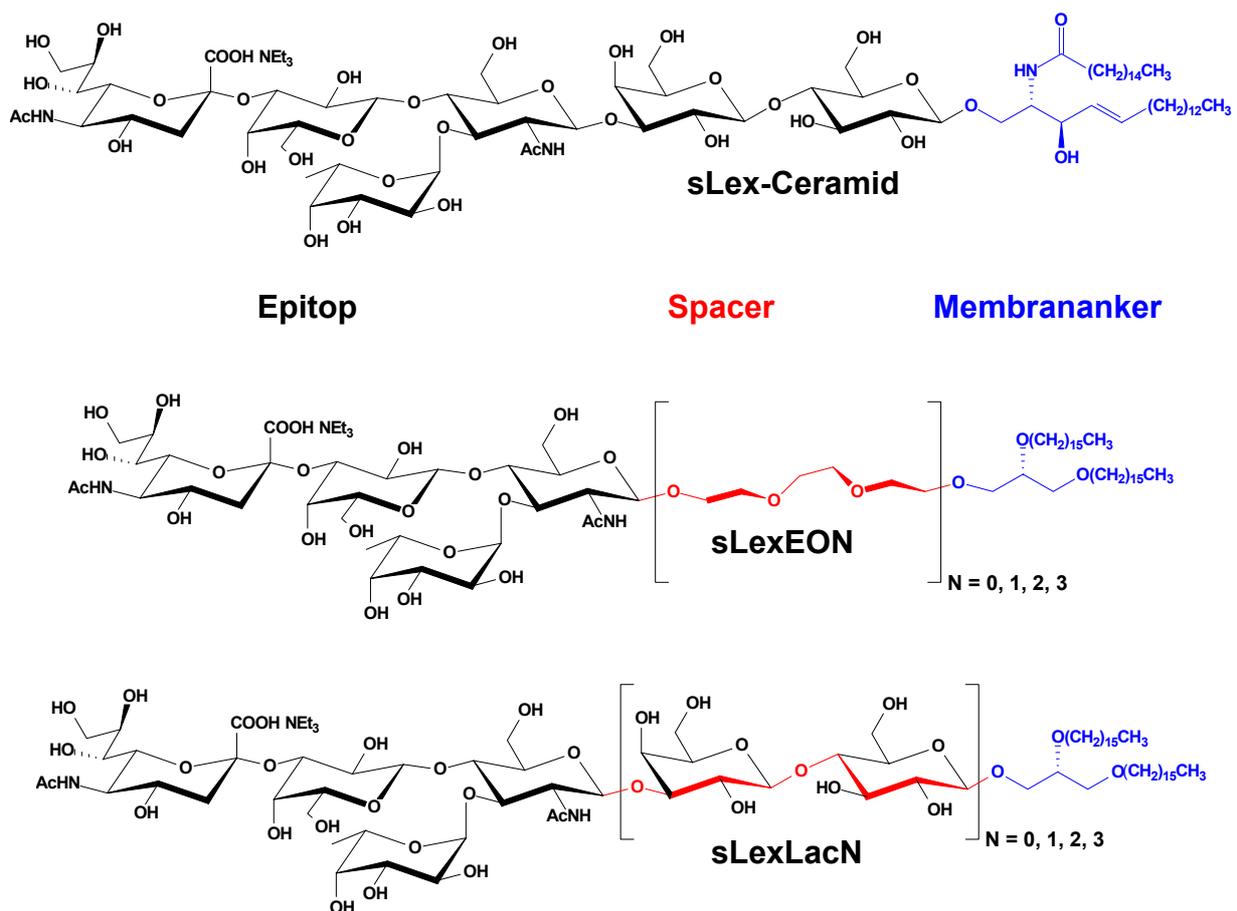


Abb. 16: Strukturen des natürlichen sLe^x-Ceramids und der synthetischen sLe^x-Neoglykolipide mit N Ethoxyethylen-Einheiten (Mitte) oder N Laktose-Einheiten (unten) als Spacer

Die Lipide unterscheiden sich in ihrer Spacerstruktur zwischen dem hydrophoben Anteil und dem terminalen sLe^x. Dies ermöglicht die stufenweise Variation der Kopfgruppenzugänglichkeit und -flexibilität an der Membranoberfläche. Alle Glykolipide haben einen Lipidanker aus 1,2-Di-O-hexadecyl-*sn*-glycerol. Segmente aus drei Ethoxy(EO)-Einheiten wurden stufenweise zwischen Lipidanker und sLe^x eingefügt. Es resultieren Verbindungen mit 3, 6 oder 9 Ethoxy-Einheiten als Spacer (sLexEO3, sLexEO6, sLexEO9) bzw. ohne Spacer (sLex0). Eine weitere Reihe bilden Substanzen mit Spacern aus 1, 2 oder 3 Laktose-Einheiten (sLexLac1, sLexLac2, sLexLac3). Berechnungen nach Molecular Modeling ergeben eine vergleichbare Länge für drei Ethoxy-Einheiten (0,93 nm) und eine Laktose (0,88 nm) (Abb. 17). Unter dieser Annahme sollten die Spacerlängen der Verbindungen sLexEO3, sLexEO6 und sLexEO9 denen von sLexLac1, sLexLac2 und sLexLac3 entsprechen. Die Laktose-Einheiten weisen jedoch im Gegensatz zu den Ethoxy-Einheiten eine ausgeprägte Fähigkeit zu intermolekularen Wechselwirkungen über H-Brückenbindungen auf, die die Kopfgruppen-Flexibilität deutlich einschränken sollte. Dies wurde auch in NMR-Untersuchungen bestätigt [402]. sLe^x-Cer wurde als interner Standard eingesetzt.

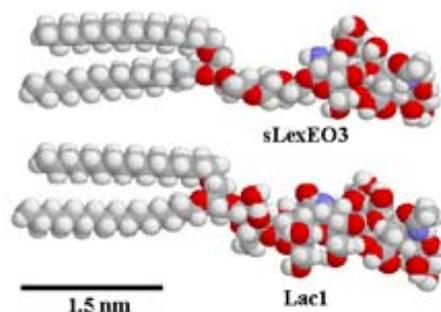


Abb. 17: Modelle der synthetischen sLe^x-Neoglykolipide sLexEO3 und sLexLac1 berechnet mit Alchemy (übernommen aus: Bakowsky et al., 2002, S. 4707)

Um einen Zusammenhang zwischen dem Rollverhalten der Zellen und den Ligandeneigenschaften zu analysieren, wurden die entsprechenden Modellmembranen zunächst physikochemisch charakterisiert. Für alle reinen Glykolipide und ihre Mischungen mit DSPC wurden bei 25°C kontinuierliche Π/A -Isothermen aufgenommen (Abb. 18).

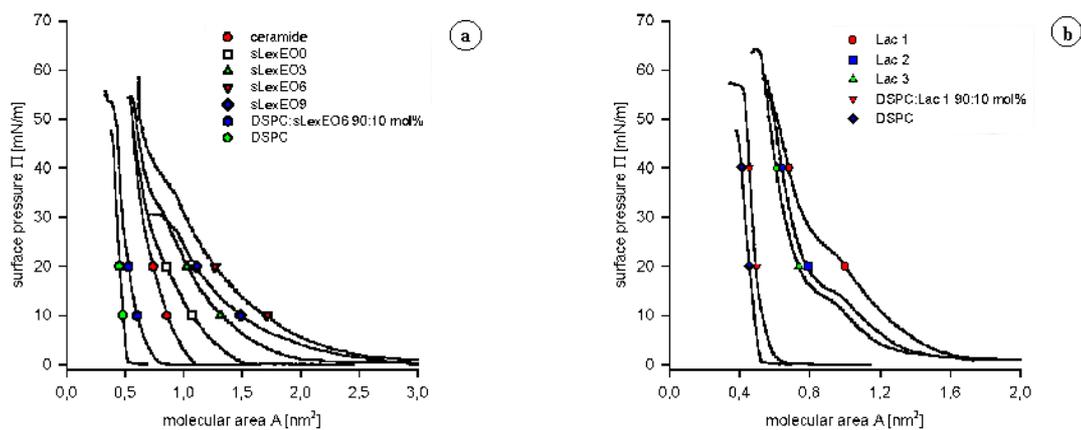


Abb. 18: Π/A -Isothermen der reinen Glykolipidfilme und ihrer Mischungen mit DSPC. a Ethoxy-Glykolipide, b Laktose-Glykolipide (übernommen aus: Bakowsky et al., 2002, S. 4708)

Der Einbau von 3 und 6 Ethoxy-Einheiten (sLexEO3, sLexEO6) verursacht gegenüber sLex0 einen Phasenübergang erster Ordnung bei Lateraldrücken zwischen 27,4 und 35,0 mN/m. Die lift-off-Fläche nimmt mit der Spacerlänge zu. Der Kollapsdruck steigt auch, während die entsprechende molekulare Fläche fast unverändert bleibt (Tab. 6).

Glykolipid	Lift-off-Fläche	Mittlere molekulare Fläche	Kollapsdruck	Molekulare Fläche beim Phasenübergang	Übergangsdruck
	A_0 (nm ²)	A_c (nm ²)	Π_c (mN/m)	A_t (nm ²)	Π_t (mN/m)
sLexLac1	1,60	0,64	53,6	1,12	22,4
sLexLac2	1,40	0,62	57,4	1,11	15,2
sLexLac3	1,34	0,57	60,8	0,92	11,7
sLex0	1,47	0,56	53,0	1,08	10,1
sLexEO3	2,15	0,58	53,4	1,02	27,3
sLexEO6	2,93	0,62	58,0	1,01	35,0
sLexEO9	2,75	0,93	30,0	-	-
sLexCer	1,09	0,55	52,0	-	-
DSPC	0,51	0,41	44,3	-	-

Tab. 6: Charakteristische Werte der Isothermen für alle Glykolipide (übernommen aus: Bakowsky et al., 2002, S. 4708)

Im kondensierten Zustand scheint daher die vom Molekül eingenommene Fläche durch die Kopfgruppe bestimmt zu werden. sLexEO9, das Glykolipid mit dem längsten EO-Spacer, ist durch ein gänzlich anderes Phasenverhalten gekennzeichnet. Der sehr komprimierbare Film lässt sich isotherm nicht aus dem flüssig-expandierten in den kondensierten Zustand bringen. Der Kollapsdruck ist überraschenderweise sehr niedrig (30 mN/m bei einer Fläche von 0,93 nm²). Es ist bekannt, dass eine steigende Zahl von Ethoxy-Einheiten an Alkanen zu einer Fluidisierung der entsprechenden Filme führt [403]. Dies spiegelt sich in einer Zunahme der Kollapsfläche und einer Verschiebung des Phasenübergangs zu höheren Drücken wider. Je länger der Spacer, umso größer ist auch die Hydrathülle um die Kopfgruppe. Bei geringem Lateraldruck

orientieren sich die Ethoxy-Einheiten willkürlich und nicht senkrecht strukturiert in der Membran. Bei höherem Lateraldruck könnten dagegen Moleküle mit kleinerem Spacer eine geordnetere Struktur bevorzugen. Dann liegen die Spacer im ausgestreckten Zustand vor und die Kopfgruppen werden an der Oberfläche präsentiert. Demgegenüber sind längere Spacer flexibler und es existieren keine anziehenden Kräfte, wenn die Spacermoleküle ungeordnet vorliegen. Zur Wirkung kommen nur abstoßende Kräfte durch die Hydrathülle und entropische Einflüsse. Die Zugänglichkeit des Kohlenhydrat-Terminus könnte daher von sLexEO3 über sLexEO6 zunehmen, um dann bei sLexEO9 wieder abzunehmen (Abb. 19).

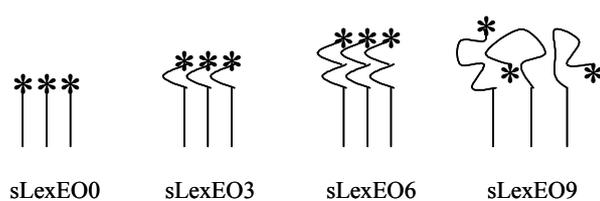


Abb. 19: Mögliche molekulare Organisation der Ethoxy-Glykolipide in der Membran

Der etwas niedrigere Wert für den Phasenübergang in der Isotherme von sLexLac1 (22,4 mN/m) als der für das entsprechende Ethoxy-Derivat (sLexEO3: 27,3 mN/m) und die kleinere lift-off-Fläche deuten auf eine höhere Dichte des sLexLac1-Films hin. Die Kollapsfläche ist nur wenig erhöht ($\Pi = 53,6$ mN/m, $A = 0,64$ nm²). Dagegen wurde für sLexLac2 und sLexLac3 eine Erniedrigung des Phasenübergangs und eine Zunahme des Kollapsdrucks detektiert. Die Interaktion zwischen ihren Laktose-Segmenten scheint daher stärker als die Interaktion der Ethoxy-Einheiten untereinander zu sein. Die Komprimierbarkeit der Filme nimmt ab, während die Tendenz eine geordnete flüssig-kondensierte Struktur zu bilden, ansteigt. Folglich besitzen die Laktose-Derivate eine geringere molekulare Flexibilität und stärkere intermolekulare Rigidität verglichen mit den Ethoxy-Derivaten.

Das Matrixlipid DSPC wird durch ein flüssig-kondensiertes Filmverhalten während der Kompression charakterisiert. Filme aus DSPC sind im Allgemeinen sehr wenig komprimierbar und kollabieren bei einer molekularen Fläche von 0,41 nm² und einem Druck von 44,3 mN/m. Das Verhalten von Mischfilmen aus Glykolipid und DSPC war abhängig von der molekularen Struktur, der Konzentration und dem Lateraldruck der Glykolipide. In den relevanten Konzentrationen zwischen 0 und 10 mol% Glykolipid sind die Abweichungen im Kompressionsverhalten allerdings vernachlässigbar (Daten nicht gezeigt).

Morphologische Untersuchungen der Schichten mit AFM und Fluoreszenzfilmwaage bestätigen die Existenz von Clustern für alle Glykolipide in der DSPC-Matrix. Die verglichen mit den Ethoxy-Derivaten ausgeprägtere Tendenz der Laktose-Derivate, dichte Cluster auszubilden, kann den stärkeren intermolekularen Kräften zwischen den Laktose-Spacern zugeschrieben werden und führt zu den genannten Unterschieden in der Mobilität und Flexibilität der sLe^x-Kopfgruppen an der Oberfläche der Modellmembran.

Die Ligandenfunktionalität der Glykolipide bzw. das Rollverhalten von E-CHO-Zellen auf den entsprechenden Modellmembranen wurde im dynamischen Testsystem untersucht. Frühere Experimente mit sLe^x-Cer haben gezeigt, dass sehr geringe Konzentrationen der Glykolipid-Liganden für den Rollvorgang ausreichend sind. Zuerst wurden die Glykolipide mit Ethoxy-Spacern untersucht (Abb. 20).

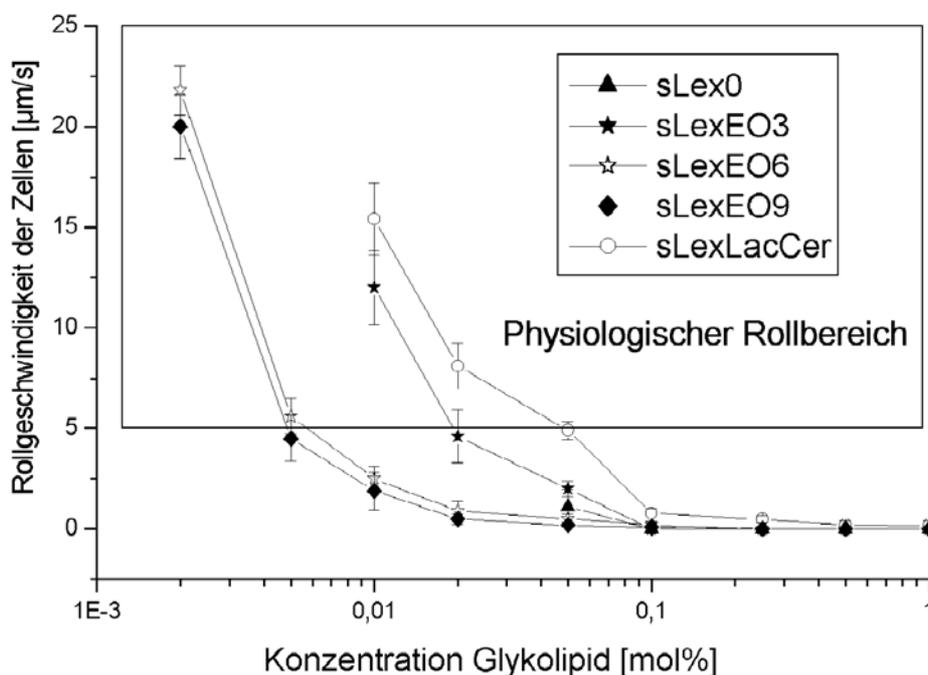


Abb. 20: Zellrollgeschwindigkeit von E-CHO-Zellen auf Modellmembranen mit variierenden Konzentrationen der Ethoxy-Glykolipide im Vergleich mit sLex^x-Cer bei einer Scherrate von 200 s⁻¹

Bei Konzentrationen zwischen 10 und 0,1 mol% adhäreren die Zellen fest. Unterhalb 0,1 mol% führen die Ethoxy-Glykolipide zu unterschiedlichem Verhalten der Zellen. An das spacerlose Lipid sLex0 binden die Zellen nicht und lösen sich sofort von der Membran ab. Dies könnte an einer fehlenden Zugänglichkeit der Kopfgruppe liegen. Die anderen Ethoxy-Glykolipide unterstützen eine ruckartige Bewegung der Zellen mit einer Geschwindigkeit zwischen 5 und 20 µm/s. Während sich die frei strömenden Zellen mit einer Geschwindigkeit von 1-2 mm/s fortbewegen, kann dies als Zellrollen angesehen werden. Es lässt sich folgern, dass ein Mindestmaß an Abstand zwischen Lipid und Kopfgruppe und damit Beweglichkeit der Selektin-Liganden für den Rollprozess notwendig ist.

Auch eine Korrelation zwischen Spacerlänge, Kopfgruppenflexibilität und der Fähigkeit, Rollen zu vermitteln, lässt sich ableiten. Während sLexEO3 mindestens in einer Konzentration von 0,01 mol% in der Membran vorhanden sein musste, um ein 5 bis 12 µm/s schnelles Rollen zu vermitteln, waren die längeren sLexEO6 und sLexEO9 noch bei Konzentrationen von 0,005 bis 0,001 mol% funktionsfähig. Zusätzlich begünstigen sie eine schnellere Geschwindigkeit der rollenden Zellen. Zunehmende Ligandenflexibilität geht also mit einer Erhöhung der Bindungseffizienz einher, welche sich bei gleichen Konzentrationen der Glykolipide in einer geringeren Rollgeschwindigkeit und niedrigeren minimalen Rollkonzentrationen ausdrückt.

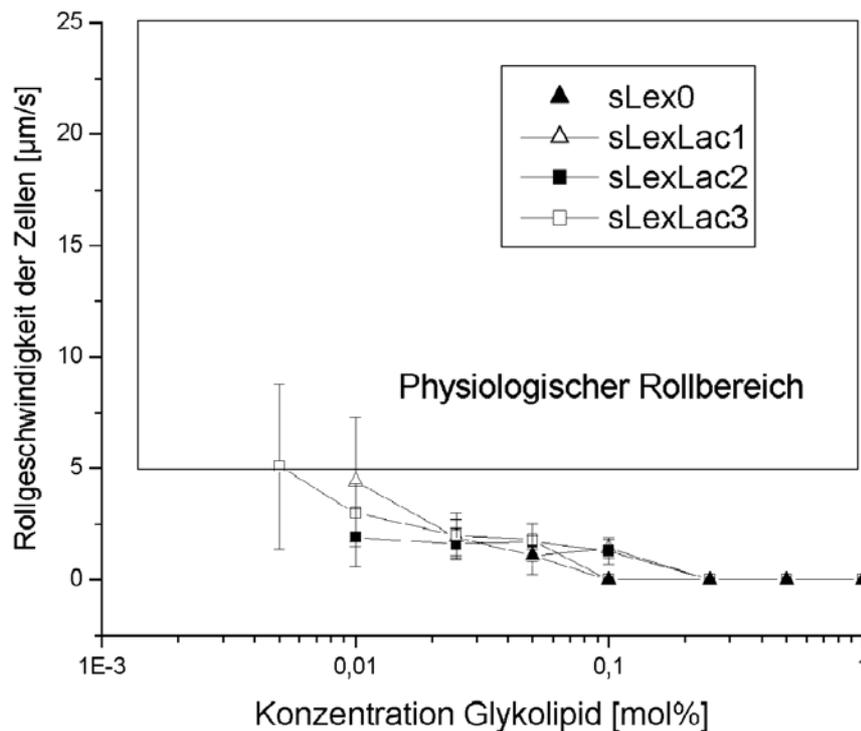


Abb. 21: Zellrollgeschwindigkeit von E-CHO-Zellen auf Modellmembranen mit variierenden Konzentrationen der Laktose-Glykolipide bei einer Scherrate von 200 s^{-1}

Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurden die Versuche mit den Laktose-Derivaten durchgeführt, die sich nur in der Steifigkeit ihrer Spacer von den Ethoxy-Derivaten unterscheiden. Sie bewirken ein völlig anderes Rollverhalten der E-CHO-Zellen (Abb. 21). Bei Konzentrationen unter $0,1 \text{ mol}\%$ bewegen sich die Zellen auf allen Laktose-Glykolipiden mit bis zu $5 \text{ }\mu\text{m/s}$. Dies kann nicht als wirkliches Rollen betrachtet werden. Trotz zunehmender Spacerlänge können keine Unterschiede zwischen den Verbindungen detektiert werden. Nur eine Änderung der Ligandenkonzentration beeinflusst die Aktivität der Membranen. Alle Zellen lösen sich bei Werten von unter $0,01 \text{ mol}\%$ an sLexLac1 und sLexLac2 von der Membran, während $0,005 \text{ mol}\%$ an sLexLac3 für eine dynamische Zellbindung noch ausreicht. Diese Daten stützen die Hypothese, dass zusätzlich zur Spacerlänge und der Zugänglichkeit der Kopfgruppe weitere Parameter für den Rollprozess von Bedeutung sind: (1) die intramolekulare Flexibilität der Liganden und (2) die molekulare Mobilität, welche durch die Interaktionen der geclusterten Moleküle bestimmt wird. Dies wird durch das unterschiedliche Erscheinungsbild von Ethoxy- und Laktoselipid-haltigen Membranen in den AFM-Untersuchungen untermauert. Dort werden für die Laktose-Derivate rigidere, hochstrukturierte Cluster in der DSPC-Matrix beobachtet, was auf eine eingeschränkte molekulare Mobilität und Flexibilität hindeutet. Dadurch werden sie als Liganden ineffektiv.

Ein Vergleich der Eigenschaften von sLexLac1 und sLex-Cer erscheint widersprüchlich, da beide sich nur in ihrem hydrophoben Anteil unterscheiden. Das Ceramid ist als Ligand gut geeignet, wohingegen sLexLac1 mit einem Dihexadecylglycerol-Anker ineffektiv ist. Dies impliziert eine aktive Rolle des Membranankers

bei der Ligandenpräsentation. Teilweise kann dies durch Unterschiede der intermolekularen Wechselwirkungen zwischen Ceramiden und Dialkylglycerolen erklärt werden. Außerdem hat das Ceramid durch seine Amidgruppe eine größere Grenzfläche zwischen dem hydrophoben Rest und der Kopfgruppe verglichen mit der Glycerolstruktur. Eine größere molekulare Fläche ermöglicht wiederum eine bessere Hydratation der Kopfgruppe, welche möglicherweise auch für eine zunehmende molekulare Mobilität innerhalb der glykolipidreichen Domänen verantwortlich ist. Folglich ist das Ceramid trotz der unterschiedlichen Spacerstruktur dem sLexEO3 in Bezug auf Spacerlänge und Flexibilität ähnlicher als dem sLexLac1.

Die Ergebnisse der Rollexperimente untermauern die Bedeutung der Flexibilität der natürlichen Mucin-artigen Liganden für das Zellrollen. Es konnte nachgewiesen werden, dass ein minimaler Abstand für die Zugänglichkeit der Kopfgruppenepitope auf der Membranoberfläche notwendig ist und eine gesteigerte Kopfgruppenbeweglichkeit die Ligandenfunktionalität verbessert. Die absolute Länge der Spacer ist weniger wichtig als ihre Flexibilität, welche durch die intrinsische Flexibilität der Glykolipide und Wechselwirkungen innerhalb der Molekül ASSOZIATE bzw. Cluster bestimmt wird.

4.1.3 Versuch der Clusterung durch Dimerisierung der sLe^x-Liganden

Die für den Rollvorgang essentielle Clusterung der sLe^x-Lipide in der Lipidmembran wurde in bisherigen Versuchen unter Ausnutzung der unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften der Lipide durch Auswahl des rigiden DSPC als Matrixlipid ausgelöst. Durch eine kovalente Verknüpfung von sLe^x-Lipiden lässt sich eine lokale Konzentrierung im Sinne einer Clusterung ohne den Einfluss des Matrixlipids erzeugen. Unabhängig von der Matrix sollte mit derartigen „Cluster-sLe^x-Lipiden“ ein Rollen von Selektin-tragenden Zellen induziert werden können.

Aus vorangegangenen Versuchen war bekannt, dass sich die Glykolipide im Gegensatz zur geclusterten Anordnung in DSPC in einer Matrix aus POPC homogen verteilen. Hier soll untersucht werden, ob eine Dimerisierung der Liganden als kleinster Baustein eines Clusters als Voraussetzung für den Rollprozess auf einer POPC-Matrix ausreichend ist. Bei dem verwendeten Geminilipid sind zwei Glykolipide (Analoge zum sLexLac1, s. Kap. 4.1.2) über eine Einfachbindung im Bereich zwischen Lipid- und Glykokomponente verbunden, so dass zwei sLe^x-Moleküle mit je einer Laktose als Spacer kovalent miteinander verknüpft sind (Abb. 22).

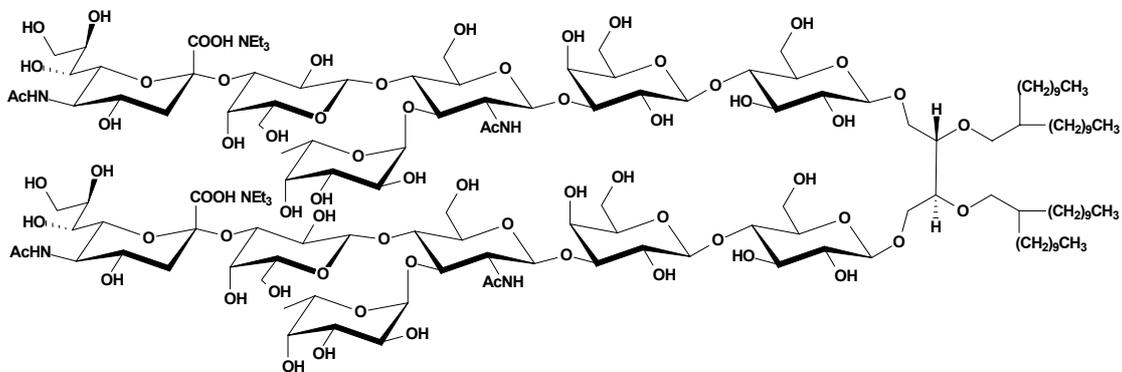


Abb. 22: Struktur des sLe^x-Geminilipids

Bei sLexLac1, welches strukturell das monomere Analogon des hier verwendeten Geminilipids darstellt, ist zwischen einer Konzentration von 0,1 und 0,01 mol% eine Bewegung der E-CHO-Zellen zu beobachten (s. Kap. 4.1.2). Da das Geminilipid auf jedem Molekül zwei sLe^x-Strukturen besitzt, entsprechen diese Konzentrationen (bezogen auf sLe^x) 0,05 und 0,005 mol% an Geminilipid.

Um zunächst die Funktionalität des Geminilipids als (Roll-)Ligand zu überprüfen, wurde es in bekannten Rollkonzentrationen in DSPC inkorporiert (0,1 bis 0,005 mol%). 0,1 mol% Geminilipid bewirken eine vollständige Adhäsion der E-CHO-Zellen. Wird die Ligandkonzentration auf die Hälfte reduziert (0,05 mol%) kann eine Bewegung mit $2,1 \pm 1,1 \mu\text{m/s}$ detektiert werden, welche allerdings aufgrund ihrer Geschwindigkeit unterhalb von $5 \mu\text{m/s}$ nicht als wirkliches Rollen angesehen werden kann. Bei 0,005 mol% zeigen die E-CHO-Zellen kaum Adhäsion (6% gegenüber 62% bei 0,05 mol%) (Tab. 7). Rollende Zellen können nur noch vereinzelt beobachtet werden.

In Konzentrationen zwischen 0,5 bis 0,005 mol% wurde das Geminilipid dem POPC zugemischt. Bei 0,5 mol% kommt es zur vollständigen Adhäsion der E-CHO-Zellen, die mit abnehmender Konzentration gegen Null geht. Ein Rollen oder eine langsame Bewegung konnte nicht beobachtet werden (Tab. 7).

Geminilipid		Adhäsion	
Konzentration [mol%]	sLe ^x -Konzentration [mol%]	Matrixlipid DSPC	Matrixlipid POPC
0,50	1,00	-	100 %
0,25	0,50	-	95 %
0,10	0,20	100 %	10 %
0,05	0,10	62 %	2 %
0,005	0,01	6 %	0 %

Tab. 7: Adhäsionswerte von E-CHO-Zellen an Geminilipid in DSPC und POPC, rot gekennzeichnet sind Adhäsionswerte, bei denen gleichzeitig eine Bewegung der Zellen detektiert wurde

Verglichen mit den Rolldaten von sLexLac1 in DSPC weist das Geminilipid ähnliche Eigenschaften auf. Eine Bindungserkennung durch das sLe^x-Epitop findet in vergleichbarem Konzentrationsbereich statt. Die unflexible Laktose-Einheit als Spacer wirkt sich jedoch auch hier einschränkend auf die Rollbewegung aus, was in der niedrigen Geschwindigkeit zum Ausdruck kommt. In POPC vermögen, verglichen mit DSPC, nur höhere Konzentrationen an Geminilipid eine vollständige Adhäsion auszulösen. Außerdem konnte keine Bewegung der Zellen festgestellt werden. Eine räumliche Konzentrierung von zwei Glykolipiden reicht also nicht aus, um effektiv als multivalenter Ligand für E-Selektin zu funktionieren und den Rollprozess zu unterstützen.

4.1.4 Self-Assembling der Ligandencluster durch partielle Fluorierung der Alkylketten

Fluorierungen führen im Allgemeinen zu einer Zunahme des Platzbedarfs des entsprechenden Moleküls, da Fluor-Atome verglichen mit Wasserstoff-Atomen ein größeres Volumen einnehmen. Wird der hydrophobe Anteil eines Glykolipids fluoriert, kann neben der „Aufweitung“ der Lipide auch eine Verdrillung des Lipidankers auftreten, weil sich die Fluoratome im größtmöglichen Abstand voneinander positionieren. Deshalb können sich fluorierte Lipide nicht in die Ordnung

eines Films aus herkömmlichen Lipiden einpassen und zerstören das vorhandene Netzwerk von van der Waals-Kräften zwischen den reinen Kohlenwasserstoffen. Die Folge ist eine Fluidisierung des Monolayers. Außerdem ist es denkbar, dass sich fluorierte Lipide, wenn sie in bestimmten Konzentrationen vorliegen, aus herkömmlichen Kohlenwasserstoff-Matrizes separieren [404]. Deshalb könnte auch die Fluorierung des Glykolipidankers, analog einer kovalenten Verknüpfung (s. Kap. 4.1.3), eine Clusterung unabhängig von der Art des Matrixlipids auslösen und damit die Rollvoraussetzung erfüllen. Vor diesem Hintergrund wurden die im Folgenden abgebildeten fluorierten Glykolipid-Derivate von der Arbeitsgruppe um Prof. Schmidt synthetisiert (Abb. 23).

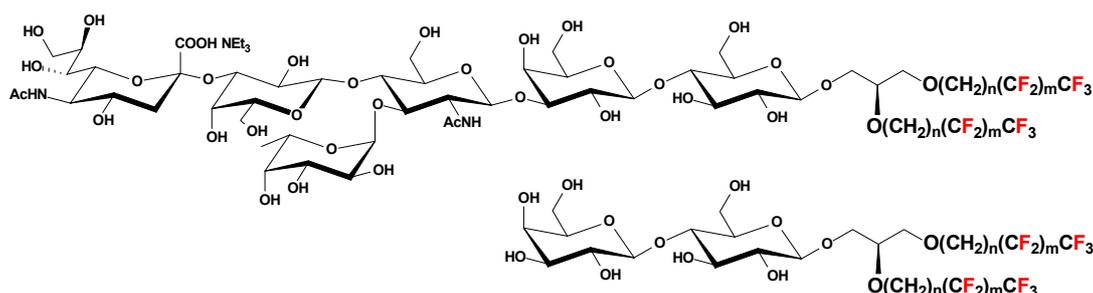


Abb. 23: Struktur der fluorierten Glykolipide, sLexFl88 (oben) und LacFl88 (unten), $m = 8$, $n = 8$

Untersuchungen mit der Fluoreszenzfilmwaage bestätigen Phasenseparationen in Monolayern aus den teilweise fluorierten Neoglykolipiden in Matrixlipiden mit Alkylketten [393]. Die Größe und die Verteilung der gebildeten Mikrodomänen lässt sich durch die starke Entmischung von Alkyl-/Fluor-Alkyl-Ketten kontrollieren. Der Einfluss der Kopfgruppe ist gegenüber dem dominanten Effekt der fluorierten Membrananker von untergeordneter Bedeutung.

Um die Unversehrtheit von Clustern auch nach der Übertragung auf den Glasträger zu prüfen, wurde den Membranen der Fluoreszenzmarker Texas-Red[®]-PE zugesetzt, welcher sich in den fluorierten Arealen anreichert (persönliche Mitteilung M. Tanaka). Die Filme wurden nach dem Transfer auf den Glasträger fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Die Ergebnisse belegen, dass die Liganden in Konzentrationen zwischen 10 und 0,01 mol% Cluster bilden (Abb. 24). Folglich bleiben die Cluster bei der Übertragung stabil und entsprechen damit den strukturellen Anforderungen für das Zellrollen.

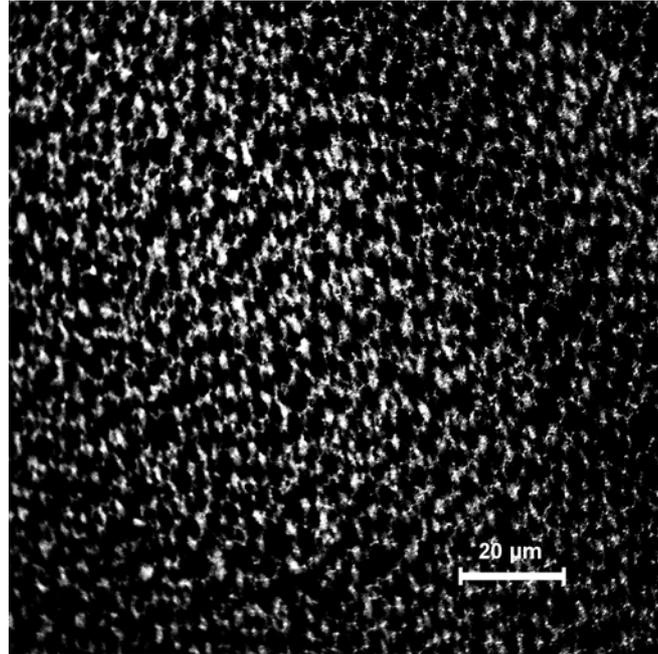


Abb. 24: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (100fache Vergrößerung) von 5 mol% sLexF188 in DSPC, Zusatz 0,1 mol% TexasRed[®]-PE

Um die Ligandenfunktionalität von Clustern aus fluorierten sLe^x-Glykolipiden zu untersuchen, wurde sLexF188 zunächst in DSPC integriert und die Adhäsion von E-CHO-Zellen dann mit dem Verhalten der Zellen auf sLexF188 in der fluideren Matrix aus POPC verglichen. In beiden Matrices bewirken übliche Ligandenkonzentrationen (10 – 0,01 mol%) weder eine Adhäsion noch eine Rollbewegung der E-CHO-Zellen (Tab. 8).

Matrix	Ligand	Ligand-Konzentration	Adhäsion	Rollgeschwindigkeit
–	sLexF188	100%	100%	kein Rollen
DSPC	–	0%	10%	kein Rollen
DSPC	sLexF188	50%	99%	kein Rollen
DSPC	sLexF188	25%	42%	kein Rollen
DSPC	sLexF188	12,5%	64%	kein Rollen
DSPC	sLexF188	10-0,01%	0%	kein Rollen
POPC	sLexF188	10-0,1%	0%	kein Rollen

Tab. 8: Adhäsion von E-CHO-Zellen an Monolayern aus reinem sLexF188, DSPC sowie DSPC und POPC mit unterschiedlichen Anteilen an sLexF188

Dies könnte entweder in der Unfähigkeit zu binden oder in der eingeschränkten Zugänglichkeit der sLe^x-Kopfgruppe der fluorierten Liganden begründet sein. Außerdem sollte eine nicht optimale Clustering als Ursache in Betracht gezogen werden. Die feste Adhäsion von E-CHO-Zellen auf Membranen mit sehr hohen Konzentrationen an sLexF188 (50 – 12,5 mol%) beweist die grundsätzliche Bindungsfähigkeit und Zugänglichkeit der Kopfgruppen und widerlegt damit die erste Erklärungsmöglichkeit. Die Affinität zwischen sLe^x und E-Selektin ist spezifisch, da weniger als 10 % der E-CHO-Zellen auf dem reinen Matrixlipid (DSPC) adhären.

Der Grund für die fehlende Rollbewegung und die niedrige Bindungseffizienz der fluorierten Ligandencluster im Vergleich mit nicht-fluorierten Ligandenclustern in DSPC muss daher in ihrer Struktur gesucht werden.

Mit Bezug auf vorangegangene Untersuchungen mit sLe^x-Glykolipiden [398] kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Cluster außer Glykolipid auch noch Matrixlipid enthalten. Die Fluorierung der Alkylketten verhindert eine Restmischbarkeit der Liganden mit reinen Kohlenwasserstoff-Matrixlipiden. Daher ist die Separierungstendenz fluorierter Glykolipide aus der Phospholipid-Matrix deutlich höher und es könnten reine Glykolipidcluster mit hoher Ligandendichte resultieren. Um den Einfluss der Fluorierung auf die Funktionalität der Cluster als Liganden genauer zu untersuchen, wurde der experimentelle Aufbau verändert. Das System „Fluor-Alkyl-Ligand in Alkyl-Lipid“ wurde durch „Alkyl-Ligand in Fluor-Alkyl-Matrix“ substituiert. sLexEO6 wurde als nicht-fluoriertes Glykolipid eingesetzt (s. Kap. 4.1.2), da es sicher eine rollende Bewegung von E-CHO-Zellen in DSPC vermitteln kann. Als Matrix diente LacFl88, ein Glykolipid mit Laktose-Kopfgruppe und partiell fluoriertem Lipidanker (Abb. 23).

Im mikroskopischen Bild sind schwarze Cluster (nicht-fluoriertes Glykolipid) auf einem hellen Hintergrund (fluorierte Matrix, in der sich Texas-Red[®] anreichert) zu erkennen, was der Vorstellung von Glykolipid-Domänen in einer fluorierten Matrix entspricht (Abb. 25).

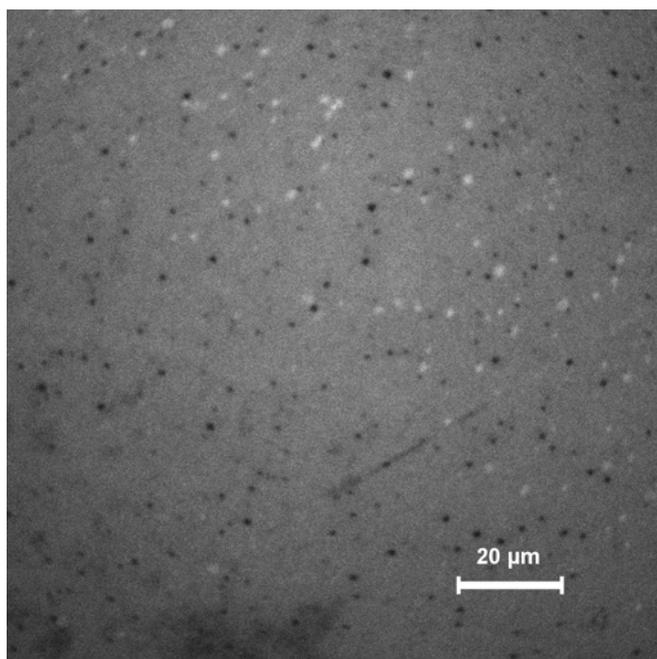


Abb. 25: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (100fache Vergrößerung) von 5 mol% sLexEO6 in LacFl88, Zusatz 0,1 mol% TexasRed[®]-PE

Für bekannte Roll-Konzentrationen des Liganden kann nur eine feste Adhäsion, jedoch kein Rollen, detektiert werden (Tab. 9). Eine unspezifische Adhäsion der E-CHO-Zellen am Matrixlipid LacFl88 kann ausgeschlossen werden (Tab. 9). Das Ergebnis hebt die Notwendigkeit einer ausgewogenen Ligandenkonzentration bzw. -dichte innerhalb des Clusters für die Auslösung des Rollvorganges hervor. In einem System mit starker Separierungstendenz der Liganden kann diese nicht erreicht werden. Offensichtlich sind die Liganden in Membranen, in denen entweder das Ligandlipid oder das Matrixlipid fluoriert ist, in den Clustern zu dicht gepackt und

nicht flexibel genug, um eine Rollbewegung zu induzieren. Zu erwähnen ist in diesem Zusammenhang der doppelte Flächenbedarf eines fluorierten Lipids gegenüber einem mit reinem Kohlenwasserstoffanker. In reinen Fluorlipid-Clustern ist somit der Abstand zwischen den Molekülen größer und die Packungsdichte niedriger als in Clustern aus nicht-fluorierten Lipiden. Scheinbar wird dadurch jedoch der Einfluss der Verdünnung durch die Matrixlipide in Clustern aus Liganden mit reinen Alkylketten nicht aufgewogen.

Matrix	Ligand	Ligand-Konzentration	Adhäsion	Rollgeschwindigkeit
LacF188	–	0%	5%	kein Rollen
LacF188	sLexEO6	5–0,001 %	100%	kein Rollen

Tab. 9: Adhäsion von E-CHO-Zellen an Monolayern aus LacF188 mit und ohne Zumischung von verschiedenen Konzentrationen sLexEO6

Um die Hypothese weiter zu untermauern, wurde der fluorierte Glykolipid-Ligand sLexF188 in eine fluorierte Matrix eingebaut. In dieser Anordnung nähern sich die Unterschiede in der Mischbarkeit den Verhältnissen in bekannten nicht-fluorierten Rollmembranen an. Auf Schichten mit einer Konzentration von 1 mol% sLexF188 konnte eine Adhäsion und ein langsames Rollen beobachtet werden, bei niedrigeren Konzentrationen kommt es zur Ablösung der Zellen (Tab. 10). Diese Resultate liefern weitere Hinweise für die Vorstellung, dass Cluster von fluorierten sLe^x-Glykolipiden innerhalb einer nicht-fluorierten Matrix aufgrund ihrer zu hohen Packungsdichte als Roll-Liganden nicht funktionsfähig sind.

Matrix	Ligand	Ligand-Konzentration	Adhäsion	Rollgeschwindigkeit
LacF188	sLexF188	1%	47%	1,8 $\mu\text{m/s} \pm 1,1$
LacF188	sLexF188	0,1 – 0,5%	0%	kein Rollen

Tab. 10: Adhäsion von E-CHO-Zellen an Monolayern aus LacF188 mit unterschiedlichen Konzentrationen an sLexF188

Zusammengefasst bestätigen die Ergebnisse, dass eine teilweise Fluorierung der Alkylketten von Glykolipiden deren Clusterung in einem nicht-fluorierten Matrixlipid bewirkt. Diese Cluster sind zwar als Liganden für E-Selektin funktionsfähig, können allerdings den dynamischen Prozess des Rollens nicht unterstützen. Eine mögliche Erklärung ist die hohe Packungsdichte innerhalb der Cluster aufgrund der vollständigen Entmischung von fluorierten Glykolipiden aus der Matrix.

4.2 Inhibitionsuntersuchungen

Nachdem sich das Testsystem bei der Untersuchung der Ligandenpräsentation unter Flussbedingungen bewährt hat, soll sein Einsatzgebiet auf das Screening löslicher Selektin-Inhibitoren ausgeweitet werden (4.2.1). Begonnen wurde mit einer Reihe von Saccharid-Strukturen, die sich strukturell am Tetrasaccharid sLe^x orientieren (4.2.2). Desweiteren wurden an die Struktur des Heparins angelehnte sulfatierte Polysaccharide (4.2.3) und Oligosaccharide aus einer natürlichen Quelle (humane Milch) untersucht (4.2.4).

4.2.1 Charakterisierung des Screening-Systems

Bei der Suche nach Selektin-Inhibitoren ist es wichtig, die besonderen Eigenschaften dieser Proteine zu berücksichtigen. Da sie in ihrer physiologischen Umgebung beim Bindungsprozess dem Scherstress ausgesetzt sind, ist ihre Funktionalität direkt mit der Gegenwart des Blutstromes verknüpft. Die Simulation der physiologischen Scherfluss-Bedingungen ist daher von essentieller Bedeutung. Gegenüber statischen Assays diskriminieren dynamische Testsysteme Adhäsionsmechanismen, die auf Gleichgewichtseinstellungen basieren. Sie erzeugen realistische Einschränkungen auf die Bindungsbildung hinsichtlich der Kontaktzeit und der Krafteinwirkung [405].

Im Gegensatz zu herkömmlichen statischen Bindungsassays kann im eingesetzten dynamischen Testsystem die inhibitorische Potenz einerseits in der Reduzierung der Anzahl rollender Zellen und andererseits in der Zunahme der Zellrollgeschwindigkeit umfassender analysiert werden. Mit der Untersuchung einer Reihe glykosidischer Verbindungen konnte deren Inhibitionsstärke exakt quantifiziert und mit den strukturellen Eigenschaften der Verbindungen korreliert werden [406]. Dabei treten qualitative Wirkunterschiede zwischen statischen und dynamischen Bedingungen auf. Unter dynamischen Bedingungen wirkt sich eine Ladungserhöhung im Molekül (2 Sulfatgruppen gegenüber 1 Sulfatierung) inhibierungssteigernd aus. Dies lässt sich durch den Charakter der Selektin-Bindung und eine unterschiedliche Dominanz der Bindungsarten in beiden Systemen erklären. Bei der Bindung entstehen neben Wasserstoff-Brücken-Bindungen an sulfatierten Tyrosinen Wasserstoff-Brücken-Bindungen an Kohlenhydratstrukturen. Die zuletzt genannten Bindungen sind kurzreichweitig. Elektrostatische Wechselwirkungen unter Beteiligung der Sulfatgruppen haben eine längere Reichweite. Plausibel erscheint, dass Moleküle mit erhöhtem elektrostatischen Bindungsanteil unter dynamischen Bedingungen bei der Ausbildung einer Bindung überlegen sind. Die unterschiedlichen Ergebnisse aus statischer und dynamischer Untersuchung betonen die wesentliche Bedeutung eines dynamischen Assays für ein erfolgreiches Screening von Selektin-inhibierenden Substanzen.

Der dynamische Inhibierungs-Assay kann auf zwei verschiedene Arten durchgeführt werden. Entweder rollen Ligand-haltige Zellen auf einer Oberfläche aus immobilisierten Selektinen, oder Selektin-tragende Zellen rollen auf einer Modellmembran mit sLe^x-Glykolipid-Liganden. Für E-Selektin wurde auf das gut charakterisierte System von E-Selektin-exprimierenden CHO-Zellen auf sLe^x-haltiger Membran zurückgegriffen. Der P-Selektin-Assay basiert auf dem Rollen von PSGL-1-präsentierenden Zellen auf einer Oberfläche aus immobilisiertem P-Selektin. P-Selektin ist im Gegensatz zu E-Selektin besser verfügbar, da es in ausreichender Menge und Reinheit aus Thrombozyten, wo es intrazellulär gespeichert vorliegt, isoliert werden kann.

Die Dichte der auf der Glasoberfläche fixierten Selektine ist ein ausschlaggebender Faktor für den Rollprozess. Während hohe Konzentrationen zu unphysiologischem festen Anhaften der Zellen führen und bei sehr geringen Selektin-Konzentrationen keine Adhäsion auftritt, erfordert der Rollprozess eine bestimmte Konzentration, die über eine ausgewogene Mischung von P-Selektin mit Albumin erreicht werden kann. Albumin unterdrückt die unspezifische Adhäsion an der Glasoberfläche und zeigt selbst keine Interaktion mit den Zellen. Als optimal wurde eine P-Selektin-Konzentration ausgewählt, die eine Rollgeschwindigkeit von 10 - 20 $\mu\text{m/s}$ bewirkt. Diese Werte entsprechen der physiologischen Rollgeschwindigkeit (Abb. 26).

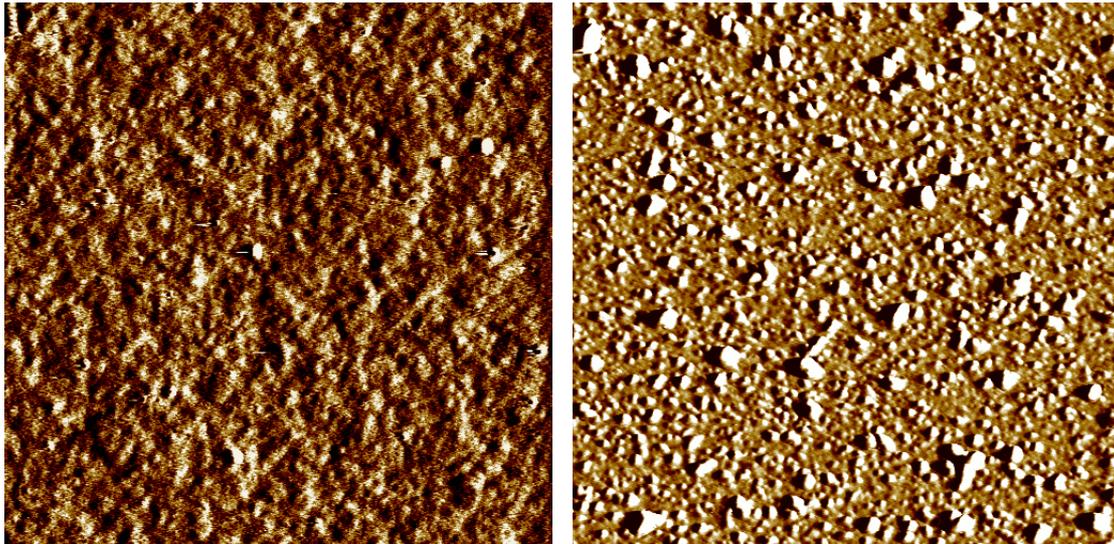


Abb. 26: „Atomic Force“-Mikroskopie-Aufnahmen ($1,5 \mu\text{m}^2$) zum Nachweis der Immobilisierung von Albumin (links) bzw. einer Albumin/P-Selektin-Mischung (rechts) auf den verwendeten Glasträgern

Der L-Selektin-Assay wurde aufbauend auf dem P-Selektin-Assay entwickelt und ist daher ähnlich strukturiert. Da L-Selektin in Form der Chimäre verwendet wurde, muss allerdings ein Fab-Fragment zugesetzt werden, das an freiliegende Fc-Teile bindet und sie dadurch für zelluläre Fc-Rezeptoren „maskiert“. Die Rollgeschwindigkeiten bewegen sich in der Größenordnung von 30 und 50 μm .

Verglichen mit E-Selektin ist das Rollen auf P- und L-Selektin schneller. Dies kann einerseits durch die intrinsischen Bindungskinetiken oder die längere und flexiblere Bindungskomponente des P-Selektins erklärt werden (s. Kap. 2.4.2).

Um die biologische Nähe des Systems nachzuweisen, wurden Leukozyten frisch isoliert und ihre Rollfähigkeit in der Durchflussapparatur geprüft. Dabei wurde zwischen stimulierten Leukozyten (3 Stunden mit IL-1 β) und nicht stimulierten unterschieden (Abb. 27).

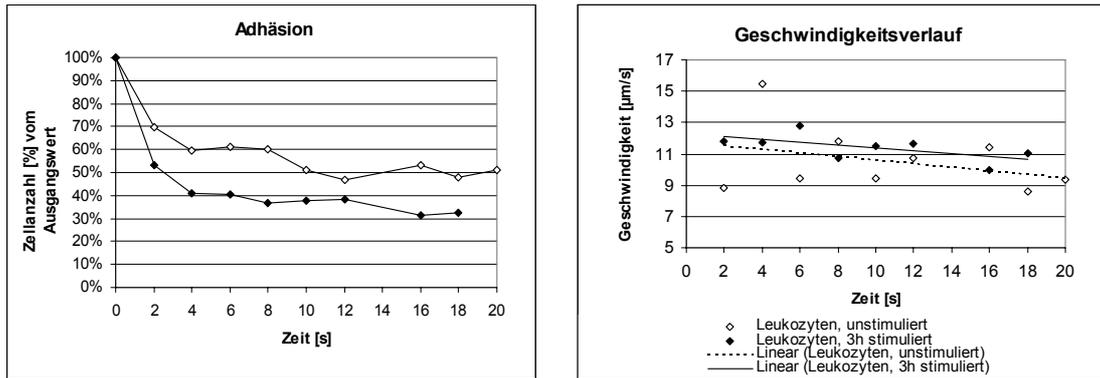


Abb. 27: Adhäsion und Geschwindigkeitsverlauf von rollenden Leukozyten auf einer P-Selektin-Schicht in den ersten 20 Sekunden nach Anschalten des Flusses

Die Daten lassen deutlich erkennen, dass das System den Rollvorgang von Leukozyten unterstützen kann. Bei den nicht stimulierten Zellen zeichnet sich eine leicht höhere Adhäsion ab, während sich die Rollgeschwindigkeiten für beide Leukozytengruppen zwischen 9 und 15 $\mu\text{m/s}$ bewegen. Diese Werte entsprechen dem physiologischen Rollbereich. Die Durchflusskammer kommt der physiologischen Umgebung somit sehr nahe. Aus praktischen Gründen werden allerdings in den folgenden Inhibitionsuntersuchungen Zelllinien eingesetzt.

Die Testsubstanzen werden unmittelbar vor dem Versuch mit den Zellen gemischt, damit sie mit gleicher Wahrscheinlichkeit mit den Liganden auf den Zellen um die Selektin-Bindungsstellen konkurrieren können (Abb. 28).

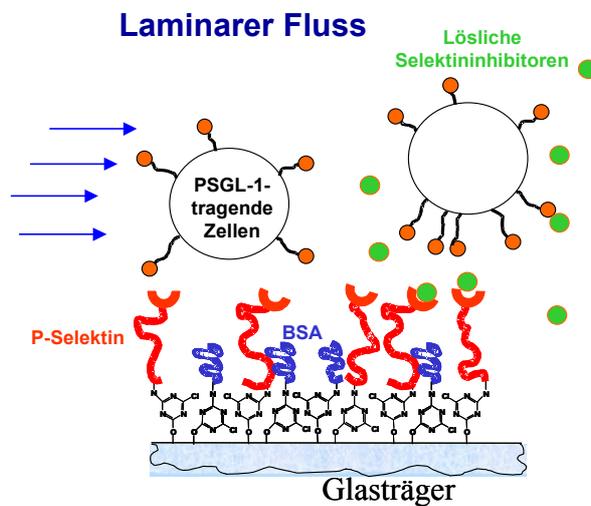


Abb. 28: Schema der Interaktion zwischen PSGL-1-tragenden Zellen und P-Selektin in der Durchflusskammer bei Zugabe von löslichen Selektin-Inhibitoren

Als Referenzwerte für die bei Zugabe von Inhibitorsubstanzen ermittelten experimentellen Daten dienen die Adhäsion und die Rollgeschwindigkeit gleichzeitig durchgeführter Versuche ohne Inhibitor-Zusatz. Diese sogenannten Blindwerte können von Tag zu Tag stark variieren und reflektieren damit die biologische Varianz, die bei der Arbeit mit Zellen zwangsläufig auftritt. Wichtig sind also nicht die direkt für die Substanz ermittelten Messwerte, sondern vielmehr ihre Differenz zu den jeweiligen Blindwerten.

4.2.2 sLe^x-Mimetika

Eine Reihe von Saccharid-Strukturen wurden bereits im dynamischen Testsystem auf ihre Fähigkeit, P-Selektin unter dynamischen Bedingungen zu inhibieren, untersucht [0]. Grundsätzlich wurde bei diesen Substanzen versucht, durch Modifikationen am Ligandenmolekül zu synthetisch leicht zugänglichen Verbindungen zu gelangen, die die Bindungsaffinität von sLe^x zu Selektinen übertreffen. Diese Herangehensweise reflektiert den klassischen Weg der Strukturabwandlung. Es handelt sich, ausgehend vom sLe^x, um stark strukturvereinfachte, sulfatierte Fukose-Galaktose-Derivate, die zusätzlich einen unterschiedlich großen lipophilen Molekülanteil besitzen (Abb. 29) [395]. Der glykosidische Anteil wurde also reduziert, hydrophobe Alkylketten zur Bindungsverstärkung eingefügt und die negative Ladung der Sialinsäure durch Sulfat substituiert.

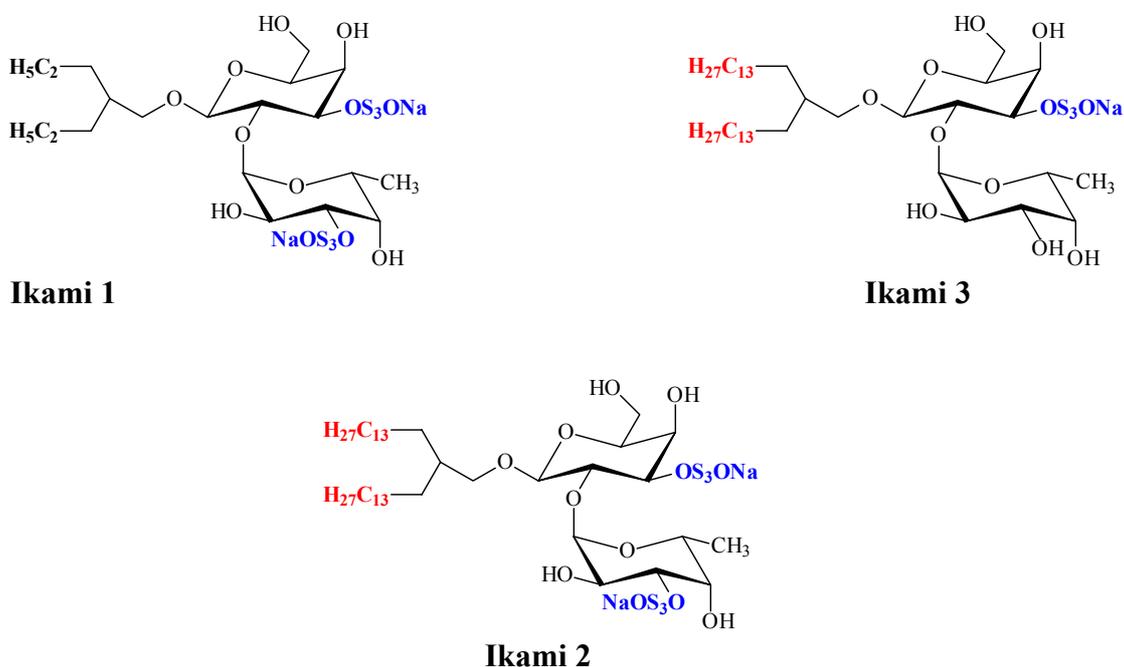


Abb. 29: Strukturen der sulfatierten Fukose-Galaktose-Derivate

Bei der Testung der Wirkung dieser Substanzen auf die Interaktion PSGL-1-tragender Zellen mit P-Selektin wurde als Referenzsubstanz lösliches sLe^x eingesetzt. Den stärksten inhibitorischen Effekt gegenüber sLe^x zeigt Ikami2. sLe^x selbst hat unter dynamischen Bedingungen keine Wirkung. Ein Vergleich von Ikami2 mit Ikami1 läßt darauf schließen, dass der langkettige lipophile Rest zu einer wesentlichen Affinitätssteigerung gegenüber P-Selektin führt. Allerdings hat auch die doppelte Zahl Sulfatgruppen in Ikami2 verglichen mit dem monosulfatierten Ikami3 einen deutlich bindungsverstärkenden Einfluss. Die erhöhte Affinität scheint also die Folge einer synergistischen Wirkung beider Modifikationen (negative Ladung, lipophiler Rest) zu sein.

Um das Ausmaß der Beteiligung der beiden Komponenten Lipophilie und Ladung in der Substanz Ikami2 an der Affinität zu analysieren, wurde hier in zwei Versuchssystemen einerseits auf den Effekt der Ladung, andererseits auf den Effekt eines lipophilen Restes fokussiert. Dafür wurde Ikami2 zunächst in eine Matrix aus

DSPC eingebaut und die Fähigkeit dieser Membran, eine Adhäsion oder eine Rollbewegung von E-CHO-Zellen zu vermitteln, geprüft. Auf diese Weise stehen die lipophilen Alkylketten von Ikami2 für die Interaktion mit E-Selektin nicht zur Verfügung, so dass hier auf die Bedeutung der Sulfatierung bzw. Ladung fokussiert werden kann. Als Vergleich dient das Glykolipid sLex0, bei dem sLe^x direkt, ohne Spacer, mit Dihexadecylglycerol verknüpft ist, da auch bei Ikami2 kein Spacer zwischen der glykosidischen Kopfgruppe und dem Alkylrest vorhanden ist. sLex0 wird ebenfalls in eine Matrix aus DSPC eingebettet. In dieser Anordnung hat sLex0 zwar in Konzentrationen über 0,1 mol% eine feste Adhäsion von E-CHO-Zellen verursacht, bei niedrigeren Konzentrationen lösen sich jedoch die Zellen von der Membran ab bzw. zeigen im Übergangsbereich nur eine langsame Bewegung (< 2 µm/s), die nicht als Rollen betrachtet werden kann. Dies liegt an der fehlenden Beweglichkeit der Kopfgruppe (s. Kap. 4.1.2). Insofern ist es wahrscheinlich, dass sich die Interaktion der Zellen nur in Form einer Adhäsion darstellen und unterscheiden wird. Eine höhere Adhäsion von E-CHO-Zellen auf der Membran mit Ikami2 als auf der Vergleichsmembran mit sLe^x könnte auf eine höhere Bindungsaffinität von Ikami2 zu E-Selektin hindeuten. Ein eventuell auftretendes langsames Rollen würde diese Vermutung unterstützen. Da der lipophile Molekülanteil an der Bindung nicht beteiligt sein kann, weist dies eher auf den Saccharidanteil als hauptsächliche Ursache für die Zunahme der Bindungseffizienz. Umgekehrt hat der lipophile Molekülanteil von Ikami2 einen ausgeprägten Einfluss auf die erhöhte Bindungsaffinität, wenn die Adhäsion geringer ist und ein möglicherweise auftretendes Rollen schneller ist.

Ikami2 wurde in zwei verschiedenen Konzentrationen (1 und 0,1 mol%) in die DSPC-Matrix eingebaut. Bei 1 mol% haften die E-CHO-Zellen, rollen allerdings nicht. Bei 10fach geringerer Konzentration reduziert sich die Adhäsion auf 15 % und die Zellen rollen mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von 6 µm/s. Um dieses Ergebnis in Beziehung zu sLe^x zu setzen, wurde das Vergleichslipid in derselben Konzentration verwendet (Tab. 11).

Matrix	Ligand	Ligand-Konzentration	Adhäsion	Rollgeschwindigkeit
DSPC	Ikami2	1 mol%	89 %	kein Rollen
DSPC	Ikami2	0,1 mol%	15 %	6,7 µm/s ± 2,2
DSPC	sLex0	0,1 mol%	36%	1,6 µm/s ± 0,8

Tab. 11: Interaktion der E-CHO-Zellen mit Ikami2 bzw. sLex0 in DSPC

Die Adhäsion der E-CHO-Zellen ist bei gleicher Konzentration auf sLe^x höher als auf Ikami2. Wie oben diskutiert deutet dies auf einen starken Einfluss der lipophilen Alkylketten auf die Inhibierungspotenz von Ikami2 hin. Die durch sLex0 vermittelte Bewegung der E-CHO-Zellen ist mit 1,6 µm/s erwartungsgemäß sehr langsam und liegt deutlich unter dem Minimalwert von 5 µm/s für physiologisches Rollen. Überraschenderweise zeigt sich auf Ikami2 trotz des fehlenden Spacers ein Rollen, dessen Geschwindigkeit sich am unteren Rand des physiologischen Rollbereichs bewegt und damit schneller als das Rollen auf sLex0 ist. Diese Eigenschaft kann gegenüber sLe^x als schwächere Bindungsaffinität interpretiert werden.

In einem zweiten Schritt wurde Ikami2 direkt mit einem sLe^x-Derivat, das aus einem kovalent mit Dihexadecylglycerol verknüpften sLe^x (sLexLac1) besteht, bezüglich

seiner Inhibierungspotenz verglichen. Zum Einsatz kommt hier das System PSGL-1-tragender Zellen, die mit immobilisiertem P-Selektin in der Flusskammer wechselwirken. Als Referenzsubstanz wurde lösliches sLe^x verwendet. Mit dieser Anordnung soll das Ausmaß der Wirkung einer lipophilen Gruppe im Molekül auf die Affinität ermittelt werden.

Im folgenden Diagramm sind die Interaktion von U937-Zellen mit P-Selektin und die Veränderungen bei Zugabe der verschiedenen Inhibitoren dargestellt. Es wurden jeweils 30 nmol sLe^x, sLexLac1 und Ikami2 einer Mio. Zellen zugesetzt (Abb. 30).

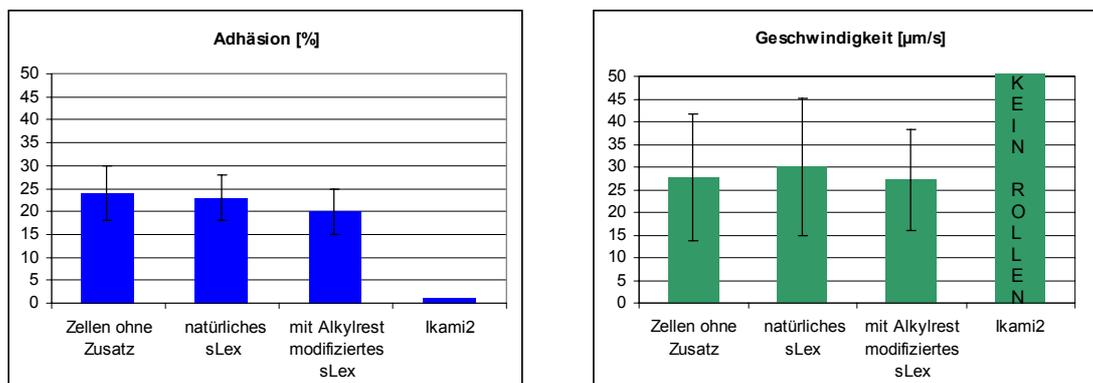


Abb. 30: Adhäsion und Geschwindigkeit von U937-Zellen auf P-Selektin ohne Zusatz und mit Zusatz von sLe^x, lipophil modifiziertem sLe^x und Ikami2

sLe^x und das lipophil modifizierte sLe^x verursachen keine Veränderung des Adhäsionsverhaltens der U937-Zellen. Der Zusatz von Ikami2 führt, wie schon früher festgestellt, zu einer nahezu vollständigen Abnahme der Adhäsion und einer nicht mehr messbaren Erhöhung der Rollgeschwindigkeit. Die Einführung eines lipophilen Restes in das natürliche sLe^x resultiert also nicht per se in einer Wirkungsverstärkung, obwohl die Membranversuche einen ausgeprägten Effekt vermuten ließen. Es ist allerdings anzumerken, dass die Daten aus beiden Versuchen nur eingeschränkt zueinander in Beziehung zu setzen sind, da zum einen die Interaktion mit E-Selektin, zum anderen mit P-Selektin untersucht wurde (aufgrund der zu dem Zeitpunkt fehlenden Verfügbarkeit von P-Selektin-haltigen Zellen bzw. reinem E-Selektin). Außerdem ist die im dynamischen Testsystem simulierte Rollbewegung gegenüber einer rein statischen Bindung ein sehr komplexer Vorgang, so dass Rückschlüsse von der Funktionsfähigkeit einer Substanz als Roll-Ligand auf ihre Bindungsaffinität nicht ohne weiteres zu ziehen, sondern Zusammenhänge nur zu vermuten sind. Dennoch zeichnet sich bei den detaillierten Untersuchungen ab, dass die hohe Inhibierungsfähigkeit von Ikami2 nur durch ein Zusammenwirken der beiden Komponenten, nicht durch eine der beiden Modifikationen allein, verursacht werden kann.

4.2.3 Sulfatierte Polysaccharide

Mit einem tieferen Einblick in die Struktur der Selektin/Ligand-Bindung und damit genaueren Kenntnissen über die molekularen Bindungsanforderungen [16] wurde deutlich, dass an der Interaktion hauptsächlich elektrostatische Kräfte beteiligt sind. Auf der Ligandenseite sind passfähige Kohlenhydrat-Epitope in Nachbarschaft zu negativen Ladungscustern (sulfatierte Tyrosine) ausschlaggebend. Vor diesem Hintergrund bieten sich, wie schon unter 2.7 diskutiert, die Heparinoide als potentiell Selektin-inhibierende Substanzklasse an. Sie repräsentieren Oligosaccharide, die den natürlichen Kohlenhydrat-Liganden ähnlich sind und eine hohe Ladungsdichte besitzen, die ihnen die Fähigkeit zu ausgeprägten elektrostatischen Wechselwirkungen verleiht. Vereinzelt wurde schon die Bindung von Selektin durch Heparin beschrieben. Daraus wurden bisher jedoch keine Struktur-Wirkungs-Beziehungen abgeleitet. Aus diesem Grund erschien es aussichtsreich, eine Reihe von sulfatierten Polysacchariden, u. a. Heparin selbst, im dynamischen Testsystem zu untersuchen.

Da natürliche Glukosaminoglukane wie Heparin im Allgemeinen wenig definierte, komplexe Molekülmischungen darstellen [407], wurden in diese Untersuchung neben den Heparinen semisynthetische, sulfatierte Polysaccharide einbezogen. Deren Inhibierungskapazität gegenüber E- und P- Selektin wird mit der Wirkung von zwei kommerziell erhältlichen Heparinzubereitungen verglichen. Bei letzteren handelt es sich um unfraktioniertes Heparin (UFH) und Certoparin, ein niedermolekulares Heparin („low molecular weight heparin“, LMWH) (s. Abb. 5, Kap. 2.7). UFH hat einen durchschnittlichen Sulfatierungsgrad von 1,2 (Sulfatgruppen pro Kohlenhydrateinheit) und ein Molekulargewicht von 28 kDa. Certoparin wird durch partielle Depolymerisation von natürlichem, d. h. unfraktioniertem, Heparin, hergestellt. Daher ist sein Molekulargewicht mit 10 kDa kleiner, der Sulfatierungsgrad jedoch gleich. Pentosanpolysulfat (PPS) ist ein semisynthetisches, lineares Polysaccharid, das aus 1→4-verknüpften β-D-Xylose-Einheiten besteht. Diese sind in Position 2 mit 4-O-Methyl-α-D-Glukuronsäure im Verhältnis eine Säure auf neun Xylose-Einheiten verzweigt [407]. Es besitzt durchschnittlich 1,9 Sulfatgruppen (mögliche Sulfatierungspositionen sind 2 und 3) pro Xylose und hat ein Molekulargewicht von 10 kDa (Abb. 31).

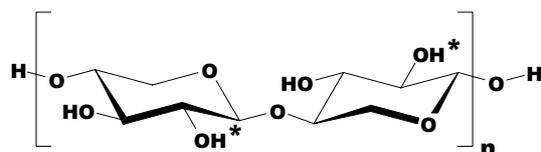


Abb. 31: Struktur von Pentosanpolysulfat, * markiert mögliche Verzweigungsstellen

Phycarin und Curdlan sind lineare β-1,3-Glukane (Abb. 32), die sich nur in ihrer Länge unterscheiden.

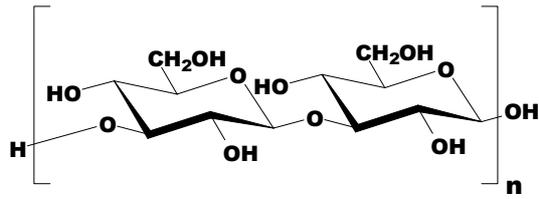


Abb. 32: Struktur von Phycarin ($n \leq 35$) und Curdlan ($n > 35$)

Bei bis zu 35 Glukose-Einheiten handelt es sich um Phycarin, bei über 35 Glukose-Einheiten um Curdlan. Bei der normalen Sulfatierung werden hauptsächlich die 6-ständigen Hydroxygruppen sulfatiert, während bei der selektiven Sulfatierung die Hydroxygruppen an Position 2 und 4 sulfatiert werden [396] (Tab. 12).

Verbindung	Sulfatierungsgrad	Molekulargewicht	Sulfatierungsposition
Normal sulfatiertes Phycarin (PhyS)	1,6	19 kDa	6, 2 und 4 der β -D-Glukose
Normal sulfatiertes Curdlan (CurS)	1,6	170 kDa	
Selektiv sulfatiertes Phycarin (2,4-PhyS)	1,1	14 kDa	2 und 4 der β -D-Glukose
Selektiv sulfatiertes Curdlan (2,4-CurS)	1,6	170 kDa	

Tab. 12: Durchschnittliche Molekülmassen, Sulfatierungsgrade und Sulfatierungspositionen der verwendeten Phycarin- und Curdlansulfate

Zunächst wurde der Einfluss der sulfatierten Polysaccharide auf die E-Selektin-vermittelte Zelladhäsion und den Rollvorgang untersucht. Als Referenzwerte dienen das Ausmaß der Bindung und die Rollgeschwindigkeit der E-CHO-Zellen auf der Modellmembran mit 0,005 mol% sLe^x-Glykolipid ohne Zusatz von inhibitorisch wirksamen Substanzen (Abb. 33 a und b).

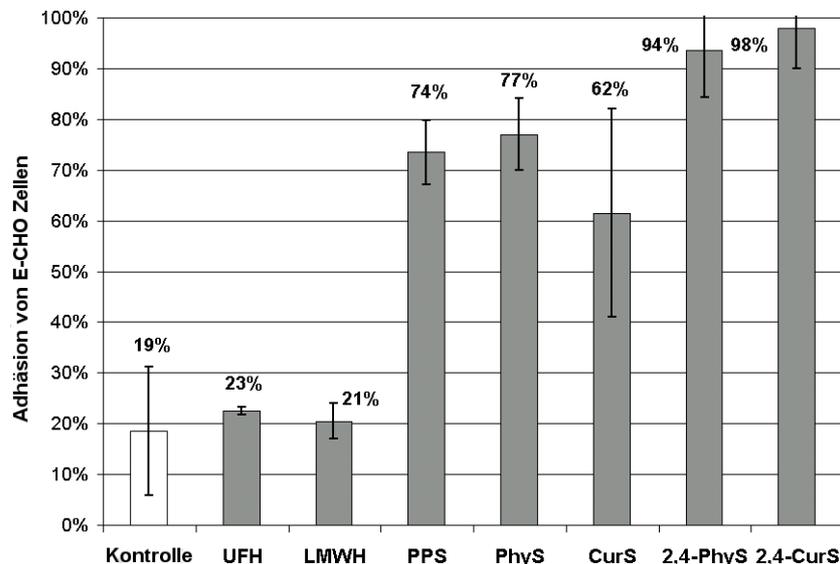


Abb. 33a: Adhäsion von E-CHO-Zellen auf einer Membran aus DSPC mit 0,005 mol% sLe^x-Glykolipid ohne und mit Zugabe der zu testenden Polysaccharide

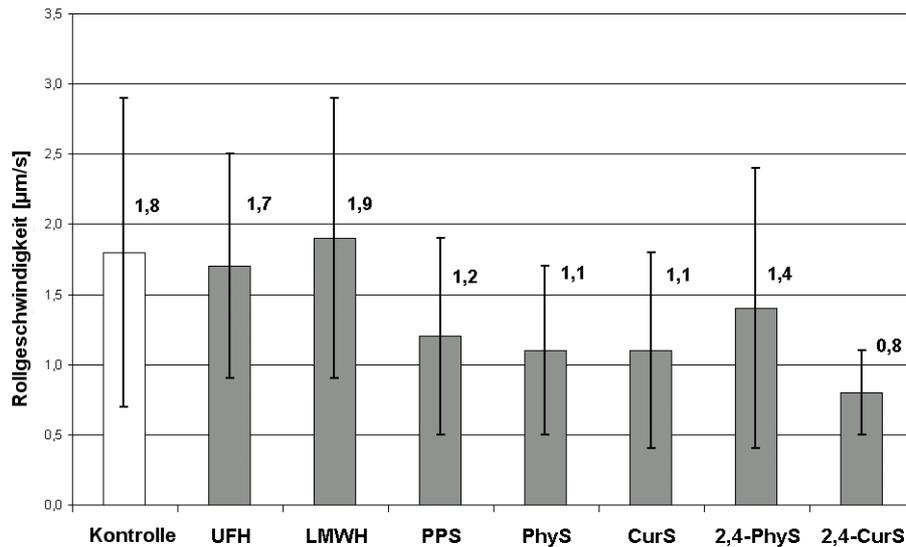


Abb. 33b: Rollgeschwindigkeit von E-CHO-Zellen auf einer Membran aus DSPC mit 0,005 mol% sLe^x-Glykolipid ohne und mit Zugabe der zu testenden Polysaccharide

Wie in Abbildungen 33 a und b zu erkennen ist, zeigen weder UFH noch LMWH eine Wirkung auf die Zelladhäsion oder die Rollgeschwindigkeit. Dies stimmt mit früheren Untersuchungen überein, in denen nachgewiesen wurde, dass Heparin an E-Selektin nicht bindet [379]. Im Gegensatz dazu führt die Gegenwart aller semisynthetischen Polysaccharide zu einer Zunahme der Zelladhäsion und einer Verlangsamung des Rollens. Die zunehmende Zelladhäsion könnte durch eine Einlagerung der Polysaccharide in die Modellmembran erklärt werden, wo diese als zusätzliche Liganden wirken könnten. In diesem Fall sollte der Effekt auch in reinen DSPC-Matrices ohne sLe^x-Liganden auftreten. Inhibitionsstudien unter Verwendung von Ligand-freien Membranen zeigen allerdings weder ohne noch mit der Zusetzung der Polysaccharide Zellbindung. Folglich kann eine unspezifische Einlagerung der Substanzen ausgeschlossen werden. Die Gegenwart von sLe^x-Liganden in der Membran ist allerdings Voraussetzung für den verstärkten Bindungseffekt durch die Polysaccharide. Eine zweite Möglichkeit wäre, dass sie als „Cross-linker“ an sLe^x auf der Membran und an eine Struktur auf der Zelloberfläche binden. Um zu ermitteln, ob diese Verknüpfung Selektin-abhängig ist, wurden die E-CHO-Zellen durch CHO-Zellen ohne E-Selektin ausgetauscht. Während diese Zellen in Abwesenheit der Polysaccharide nicht an eine sLe^x-Ligand-haltige Membran adhären, und nur 3 % der Zellen in Gegenwart von UFH haften, verursacht CurS einen Anstieg der Adhäsion auf 18 % der Zellen. Deshalb interagieren die Polysaccharide nicht mit E-Selektin, sondern mit anderen Epitopen auf der Zelloberfläche. Die Identifizierung der relevanten Epitope und des molekularen Mechanismus erfordert weitere Untersuchungen.

Der hier aufgetretene Widerspruch in der Wirkung mit der unter statischen Bedingungen (anhand der Adhäsion von U937-Zellen an E-Selektin) gefundenen Aktivität der Substanzen [408], könnte also durch strukturelle Eigenarten der E-CHO-Zellen erklärt werden und ist unabhängig von E-Selektin. Die Daten lassen den Schluss zu, dass weder die Heparine noch die semisynthetischen, sulfatierten Polysaccharide eine Inhibierung der E-Selektin-vermittelten Adhäsion und des Rollprozesses an sLe^x-Liganden bewirken.

Der P-Selektin-Assay basiert auf dem Rollen von U937-Zellen auf einer Oberfläche aus immobilisiertem P-Selektin und Albumin. Die Inhibierungsaktivität der Polysaccharide wurde in Bezug zu der des Standardinhibitors sLe^x gesetzt. Wegen der großen Unterschiede im Molekulargewicht zwischen den Polymeren und sLe^x wurden die eingesetzten Massen als Vergleichswert herangezogen.

Die Zugabe von 25 µg sLe^x zu 100 µl Zellsuspension (1 Mio. Zellen), welche als interner Standard angesehen wurde, reduziert die rollende Zellfraktion nicht signifikant um ein Fünftel (Abb. 34).

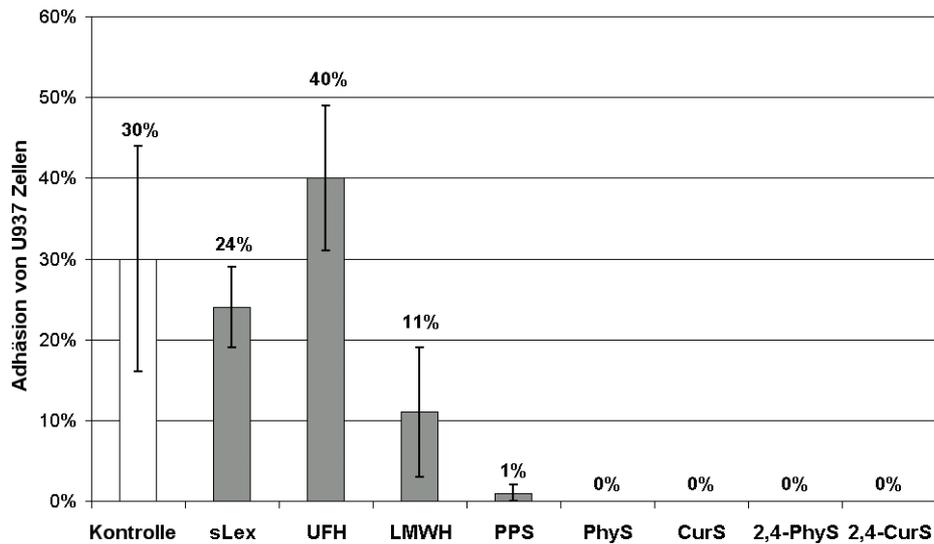


Abb. 34a: Adhäsion von U937-Zellen auf immobilisiertem P-Selektin ohne und mit Zugabe der zu testenden Polysaccharide

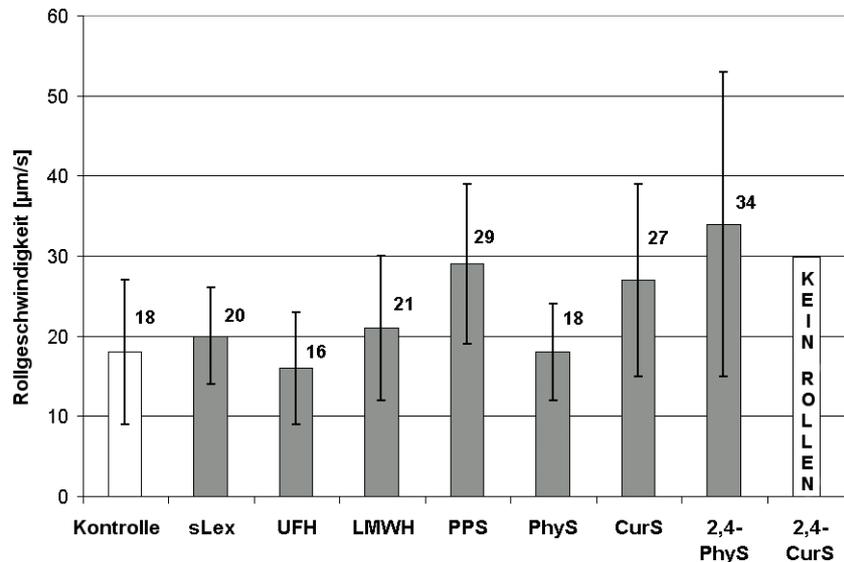


Abb. 34b: Rollgeschwindigkeit von U937-Zellen auf immobilisiertem P-Selektin ohne und mit Zugabe der zu testenden Polysaccharide

UFH zeigt keinen inhibitorischen Effekt, da der geringe Anstieg sich als nicht signifikant herausstellt. Auch LMWH blockiert P-Selektin in geringem Maße, jedoch wiederum nicht signifikant. Dementgegen zeigen die semisynthetischen

Verbindungen PPS, PhyS, CurS, 2,4-PhyS und 2,4-CurS eine sehr hohe und signifikante Inhibierungskapazität für P-Selektin, indem sie das Zellrollen im Detektionsbereich (30 s) bei einer Konzentration von 25 µg/ 100µl Zellsuspension komplett unterdrücken.

Der Wirkung auf die Adhäsion entsprechend war die Rollgeschwindigkeit durch UFH kaum beeinflusst, während LMWH und sLe^x einen geringen Anstieg erkennen lassen (Abb. 34b). Mit Ausnahme von PhyS lösen alle Polysaccharide eine beträchtlich schnellere Rollbewegung aus und inhibieren daher die Interaktion zwischen den Zellen und P-Selektin deutlich. 2,4-CurS reduziert die Anzahl rollender Zellen in einem solchen Ausmaß, dass es unmöglich wird, die exakte Rollgeschwindigkeit der restlichen Zellen zu bestimmen.

Insgesamt gesehen demonstrieren also beide Parameter, Adhäsion und Rollgeschwindigkeit, dass die fünf semisynthetischen Polysaccharide im Gegensatz zu UFH und LMWH wirksame P-Selektin-Inhibitoren sind, die eine viel höhere Aktivität als der Standard-Ligand aufweisen.

Beim Vergleich der Aktivitäten der Testsubstanzen sollten einige Struktur-Wirkungs-Beziehungen in Bezug auf Molekulargewicht (MW) und Sulfatierungsgrad (DS) abgeleitet werden können. Es ist zu vermuten, dass die elektrostatischen Interaktionen der negativ geladenen Polysaccharide mit den positiv geladenen Zielstrukturen mit steigender Ladungsdichte und Kettenlänge begünstigt werden.

Die jeweiligen Paare PhyS / CurS und 2,4-PhyS / 2,4-CurS zeigen mit zunehmendem MW einen Anstieg der Inhibierungsaktivität. Dagegen verhält sich LMWH dem UFH hinsichtlich der Inhibierungseffizienz überlegen. Zieht man jedoch den relativ kleinen Massenunterschied und strukturelle Inhomogenitäten in Betracht, ist eine Abhängigkeit zwischen Inhibierungseffizienz und MW wahrscheinlich.

In Analogie zum natürlichen Liganden PSGL-1, der sulfatierte Tyrosine, angeordnet als negativ geladene Cluster, enthält [65, 66], impliziert ein hoher DS bessere Bindungseigenschaften. Wang et al. haben festgestellt, dass natürliches Heparin Selektin bindet, und finden eine deutliche Abhängigkeit der Bindung vom DS [389].

PPS mit einem DS von 1,9 scheint effizienter zu wirken als LMWH mit einem DS von 1,2 und identischem MW. Vor dem Hintergrund der unterschiedlichen Polysaccharid-Grundstruktur erscheint diese Schlussfolgerung jedoch unwahrscheinlich.

Betrachtet man die Aktivitäten von PPS (DS = 1,9) und 2,4-PhyS (DS = 1,1), so scheint die zugrunde liegende Struktur ein wichtiger Parameter zu sein. Trotz des deutlich geringeren DS und nur etwas höherem MW ist 2,4-PhyS ein viel besserer P-Selektin-Antagonist. Deshalb ist die Polysaccharid-Grundstruktur und die genaue molekulare Struktur, wie das Sulfatierungsmuster, vermutlich von größerer Bedeutung für die Bindung an P-Selektin als der DS und das MW. Dies wird deutlich von dem Ergebnis unterstützt, dass die selektiv sulfatierten 2,4-PhyS und 2,4-CurS höhere Inhibierungsaktivitäten aufweisen als ihre korrespondierenden hauptsächlich in 6-Position sulfatierten Analoga. 2,4-PhyS war sogar trotz seines geringeren DS sowie geringeren MW wirksamer als CurS. Selektive Sulfatierung scheint also am effizientesten zu sein, um ausgehend von der Grundstruktur β-1,3-Glukan zu Derivaten mit hoher Bindungskapazität für P-Selektin zu gelangen.

Diese Ergebnisse führen zu der Frage nach der molekularen Basis für die P-Selektin/Ligand Wechselwirkungen. Der Standard sLe^x repräsentiert ein monomeres Bindungsepitop. Das ermöglicht aufgrund des äquimolaren Verhältnisses zu den Selektinen (jedes Molekül bindet an ein P-Selektin-Molekül) eine direkte Korrelation zwischen Menge und Aktivität. Werden multivalentes Binden und die Bedeutung von

elektrostatischen Kräften in Erwägung gezogen, könnten sulfatierte Polysaccharide auf eine andere Art wechselwirken. Um mehr Informationen über ihren Bindungsmechanismus zu gewinnen, wurden die Versuche mit zunehmend geringeren Mengen an 2,4-CurS, ausgehend von der ursprünglichen Konzentration von 25 µg/100 µl Zellsuspension, wiederholt. Bis zu einer Reduktion auf 0,06 µg/100 µl wurde die vollständige Inhibierungskapazität aufrecht erhalten, die weitere Verringerung auf 0,02 µg/100 µl führte zu einem kompletten Verlust der Inhibierungswirkung und das System näherte sich dem Leerwert (ohne Zugabe von Inhibitor) an. Ein lineares Verhältnis zwischen Menge und Aktivität des Heparinoids, das mit einer monomeren Interaktion einhergehen würde, liegt somit nicht vor. Scheinbar vermögen die Polymere eine dominante und funktionell relevante Fraktion der Selektine zu blockieren, wobei die Interaktion durch elektrostatische Anziehung gesteuert wird. Unterhalb einer kritischen Konzentration ist eine genügend große Anzahl freier Selektine vorhanden, um den Rollprozess zu unterstützen.

4.2.4 Oligosaccharide aus humaner Milch

Über die physiologische Funktion der Oligosaccharide in der humanen Milch ist noch nicht viel bekannt. Es gibt jedoch Hinweise, dass humane Oligosaccharide in der Milch Neugeborene gegen Infektionen und Entzündungsreaktionen schützen. Diese Fähigkeit wird ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit zellulären Adhäsionsmolekülen bzw. deren Liganden zugeschrieben. Oligosaccharide könnten z. B. als lösliche Ligand-Analoga die Anhaftung von Mikroben am Epithel verhindern. Möglicherweise stehen sie für eine Gruppe von protektiven nicht-immunologischen Substanzen in der Milch, die inflammatorische Prozesse beeinflussen können.

Die Muttermilch stellt, insbesondere während der ersten Lebensmonate, die beste Nahrung für den Säugling dar. Sie besteht zu über 80 % aus Wasser, ca. 4,5 % Fett, ca. 1,5 % Eiweiß und ca. 7 % Kohlenhydraten, sowie Mineralstoffen und Vitaminen. Die Zusammensetzung der Milch ändert sich im Verlauf der Laktation und passt sich damit den sich ändernden Bedürfnissen des wachsenden Säuglings an. Im Gegensatz zur Kuhmilch enthält Muttermilch Lysozym und Immunglobuline. So ist sie neben ihrer Funktion als Nährstoffquelle auch an der Entwicklung der kindlichen Immunabwehr beteiligt.

Einzigartig ist die humane Milch in der in ihr enthaltenen Menge an komplexen Oligosacchariden (HMO = Humanes Milch Oligosaccharid). Abgesehen von Elefantenmilch weist keine andere bisher analysierte Säugetiermilch so viele verschiedene fukosylierte Oligosaccharide in vergleichbaren Mengen auf [409]. Sie unterscheiden sich in Größe, Ladung, Sequenz und Häufigkeit des Vorkommens. Laktose kommt zu ca. 7 % in der Milch vor und ist damit der häufigste Zucker, neutrale Zucker machen einen Anteil von 1 % aus, ca. 0,1 % sind sialylierte (saure) Oligosaccharide. Ungefähr 90 unterschiedliche neutrale und saure Oligosaccharide sind bisher identifiziert worden. Die meisten davon haben Laktose als Kernstruktur und werden durch lineare oder verzweigte Verknüpfung mit Galaktose(β 1-3)N-Acetylglukosamin (Typ 1) oder Galaktose(β 1-4)N-Acetylglukosamin (Typ 2) gebildet. Diese Grundstrukturen können an verschiedenen Positionen fukosyliert oder sialyliert werden. Die Ketten dieser Oligosaccharide bestehen aus bis zu 50 monomeren Einheiten.

Ein enger Zusammenhang besteht zwischen dem Strukturmuster der Oligosaccharide in der Milch und der Lewis-Blutgruppenzugehörigkeit der Mutter. Dementsprechend existieren vier verschiedene Oligosaccharid-Milchgruppen, die sich durch die genetische Basis des Lewis-Blutgruppen-Systems bedingen. Die unterschiedlichen Lewis-Bluttypen sind genetisch hauptsächlich durch die Funktion der Lewis Gene, die für eine α 1,3- bzw. eine α 1,4-Fukosyltransferase kodieren, und ein weiteres Gen, das für eine α 1,2-Fukosyltransferase kodiert, bestimmt. In humaner Milch von Personen mit der Blutgruppe Le(a-b+) kommen alle drei Verknüpfungsarten (α 1,2, α 1,3, α 1,4) zwischen Fukose und Oligosaccharid vor. Bei der zweiten Gruppe Le(a+b-) fehlen α 1,2-Verknüpfungen der Fukose, während in der dritten Gruppe Le(a-b-) die Oligosaccharide keine α 1,4-verknüpfte Fukose haben. In der vierten Gruppe sind neben nicht-fukosylierten Oligosacchariden nur Verbindungen mit α 1,3-verknüpften Fukosen zu finden, während α 1,2- und α 1,4-Bindungen abwesend sind [410].

Als Voraussetzung für eine Wirkung in unteren Darmabschnitten bzw. biologische Aktivität im kindlichen Metabolismus müssen die Oligosaccharide den oberen Gastrointestinaltrakt unverdaut passieren und unversehrt über die Darmwand in die Blutbahn gelangen. Neutrale und saure Oligosaccharide weisen eine nahezu völlige

Resistenz gegen Pankreassekret und Hydrolasen der intestinalen Membran auf. Deshalb passieren sie den Dünndarm wahrscheinlich im Ganzen und die Mehrheit der HMOs erreicht trotz eines kleinen absorbierten Anteils unverdaut den Dickdarm und sie können dort ihre noch nicht vollständig aufgeklärte Wirkung entfalten [411]. Die Unempfindlichkeit gegenüber der enzymatischen Verdauung liegt vermutlich an der Präsenz von Fukose und Sialinsäure in den HMOs, die von den Verdauungsenzymen nicht gespalten werden können [412].

Im Gegensatz zu den heparinoiden, sulfatierten Polysacchariden, deren einzelne Struktur genau bekannt ist, sind die Milch-Oligosaccharid-Proben hinsichtlich ihrer Struktur wenig aufgeklärt. Die Grundbausteine, wie Laktose, Galaktose, N-Acetylglukosamin, aus denen die Oligosaccharide prinzipiell bestehen, sind jedoch bekannt, wie auch mögliche Modifikationen durch Fukosylierung oder Sialylierung. Die Strukturen können somit dem natürlichen Selektin-Liganden sLe^x stark ähneln. In der Tat sind Glykoproteine und Oligosaccharide mit den Selektin-Liganden sLe^x , sLe^a und Le^x aus humaner Milch isoliert worden [413, 414]. Die Heparinoide erfüllen neben den passfähigen Kohlenhydrat-Epitopen mit ihren Sulfatgruppen auch die 2. Bindungsanforderung (Ladungsclusterung) gemäß Somers et al. [16]. Da einige Heparinoide bereits die Bindung an die Selektine gezeigt hatten [408], erschienen sie als eine aussichtsreiche Substanzgruppe für die Testung im dynamischen Testsystem. Ob die HMOs die wichtigen Ladungscluster für eine Selektin-Bindung besitzen und ob sie Wechselwirkungen mit Selektinen eingehen können, ist bisher nicht bekannt. Allerdings haben HMOs konzentrationsabhängig die Adhäsion von Neutrophilen an stimulierte vaskuläre Endothelzellen inhibiert [415]. Und als Naturstoffe weisen sie gegenüber den semisynthetischen, sulfatierten Polysacchariden den eindeutigen Vorteil auf, dass von ihnen primär keine Toxizität angenommen wird. Damit zeigt diese Substanzgruppe sehr interessante, aussichtsreiche, Selektin-relevante Eigenschaften für eine Testung im dynamischen System auf.

Untersucht wurden 16 verschiedene Oligosaccharid-Fractionen aus der Muttermilch (Tab. 13). Die Auftrennung und Aufreinigung des Oligosaccharid-Anteils in der humanen Milch ist ein erster Schritt bei der Isolierung wirksamer Einzelstrukturen. Durch Fraktionierung und Konzentrierung der humanen Oligosaccharide sollte es bei der Suche nach wirksamen Substanzen möglich sein, auf bestimmte Strukturen zu fokussieren und wirksame Verbindungen einzugrenzen. Obwohl die Fraktionen in struktureller Hinsicht kaum aussagekräftig sind, decken sie ein breites Spektrum an strukturellen Eigenschaften (Ladung, Molekulargewicht, Kohlenhydratvariation) ab.

Nummer	Oligosaccharid	Nummer	Oligosaccharid
1.	Humane Oligosaccharide gesamt (HMOs)	7.	DS-LNT
2.	Saure Zucker (SZ) gesamt	8.	Fukoidan LMW
3.	Neutrale Zucker (NZ) gesamt	9.	Pektinhydrolysat
		10.	GOS \geq DP3
4.	Langkettiges Fruktan	11.	Langkettiges Fruktan
5.	Kurzkettiges Fruktan	12.	HMOs gesamt
6.	Fruktan Polysaccharid	13.	NZ gesamt 2
		14.	SZ gesamt
		15.	Fukosylierte HMOs
		16.	HMOs DP4

Tab. 13: Untersuchte Oligosaccharid-Fractionen aus humaner Milch

Mit unserem etablierten, manuellen Auswertemodus (Angabe von einzelnen Endwerten für Adhäsion und Rollgeschwindigkeit nach einer bestimmten Zeit) zeigt die Mehrzahl der Fraktionen keine Hemmwirkung auf P-Selektin. Aus der Vielzahl der Proben, deren Identität während der Untersuchung unbekannt war, kristallisierte sich nur das Oligosaccharid 8 als wirksam heraus. Als einziges Oligosaccharid zeichnet es sich durch eine starke und gut reproduzierbare Inhibition aus (Abb. 38, S. 90). Um das Verhalten der Zellen zu Beginn des Versuchs hervorzuheben, wo eine Wirkung am deutlichsten zu erkennen sein sollte, und den Verlauf des Rollprozesses sensitiver zu verfolgen, wurde zusätzlich eine computergestützte Auswertung eingesetzt. Die Parameter Adhäsion und Rollgeschwindigkeit werden nicht mehr als Endwerte, sondern in bestimmten Zeitabständen angegeben. Der jeweils analog mitgeführte Blindwert ohne Probenzugabe ist gestrichelt in der gleichen Farbe wie der Meßwert dargestellt. Ausschlaggebend für eine Inhibierungspotenz ist die Abnahme der Adhäsion gegenüber dem entsprechenden Blindwert bzw. eine Zunahme der Geschwindigkeit verglichen mit dem Blindwert. Abbildung 36, S. 88, zeigt beispielhaft für die wirkungslosen Oligosaccharide Oligosaccharid 15. Beim Vergleich gleichfarbiger Blind- und Meßwerte wird ersichtlich, dass die Wirkungslosigkeit sich nicht in den absoluten Werten bzw. in der Lage im Diagramm ausdrückt, sondern in der nicht vorhandenen Differenz zwischen diesen Werten sowohl bei der Adhäsion als auch bei der Geschwindigkeit. Im Gegensatz dazu sind Differenzen bei Positivkontrollen mit CurS (selektiv sulfatiertes Curdlan) deutlich zu erkennen (Abb. 37, S. 89). Wie schon mit dem klassischen Auswertemodus festgestellt wurde, inhibiert sLe^x P-Selektin unter dynamischen Bedingungen kaum. Zusätzlich zu den Oligosacchariden aus der Muttermilch wurden Fraktionen tryptisch/chymotryptisch verdauter, humaner Molkenproteine (HMP) zur Testung bereit gestellt. Obwohl bei diesen Proteinen eine passfähige Glykosylierung denkbar ist, konnte für sie keine Hemmwirkung auf P-Selektin detektiert werden. Die Abbildung 39, S. 91, stellt zum Beispiel das Verhalten von KG1a-Zellen mit und ohne Zugabe von HMP 1 dar.

Außerdem wurden drei Milchlipid-Proben untersucht, von denen das Gangolac (GD3 angereicherte Kuhmilch) hemmend wirkt, dieser Effekt tritt allerdings nicht bei allen untersuchten Konzentrationen auf (Abb. 40, S. 92). GD3 ist ein Gangliosid, das im Molekül zwei Sialinsäuren in glykosidischer Bindung enthält. Außerdem können Ganglioside mehrere negative Ladungen tragen. Diese strukturellen Charakteristika kommen den Bindungsanforderungen an P-Selektin sehr nahe. Warum eine Hemmung nur bei geringer Konzentration auftritt, verbleibt spekulativ.

Für eine erfolgreiche Weiterentwicklung der Inhibitorensuche sollte in Zukunft ausgehend von der Struktur des Oligosaccharid 8 auf strukturähnliche (polymere) Verbindungen fokussiert werden. Oligosaccharid 8 ist ein niedermolekulares Fukoidan, dessen Struktur nicht näher definiert ist. An sich ist Fukoidan ein hoch verzweigtes, sulfatiertes Polysaccharid, das hauptsächlich aus L-Fukose-Einheiten besteht (Abb. 35) und aus Braunalgen stammt. Diese strukturellen Charakteristika passen gut in das Bild von passfähigen Kohlenhydraten und Ladungscustern, die für die Bindung an P-Selektin erforderlich sein sollen. Tatsächlich wurde die Bindungsfähigkeit von Fukoidan an P-Selektin schon sehr früh entdeckt [377]. Insofern liegt es nahe, dass ein Fukoidan-Analogon ähnliche Wirksamkeit zeigt.

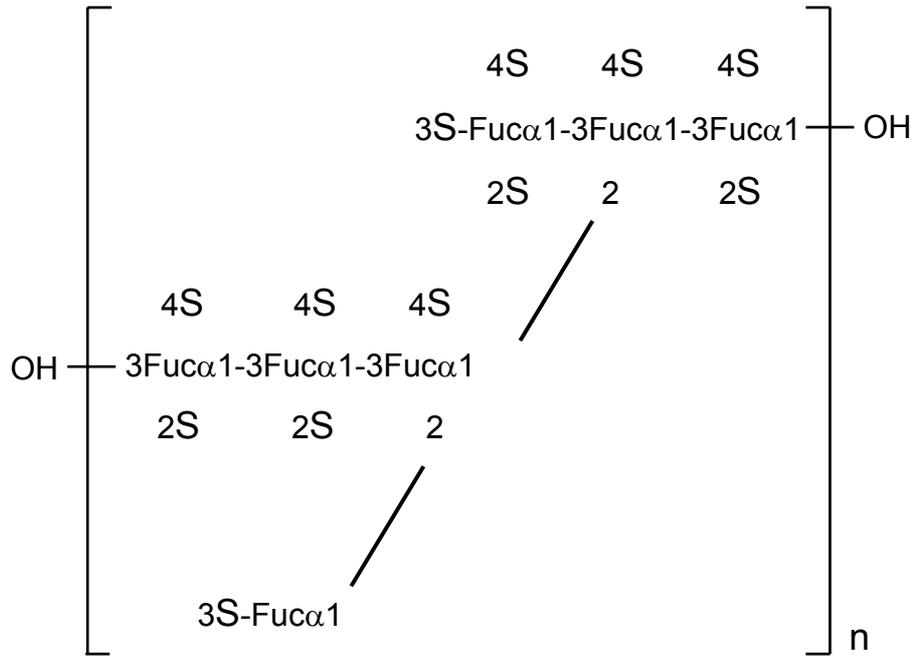


Abb. 35: Grundstruktur von Fukoidan: α -1,2- und α -1,3-glykosidisch verbundene L-Fukose-Einheiten (Fuc entspricht L-Fucopyranose), zusätzlich hoher Anteil veresterter SO_3H -Gruppen (2S, 3S und 4S entsprechen 2-, 3- oder 4-O-Sulfat)

Abb. 36: Beispiel für ein wirkungsloses Oligosaccharid, ausgewertet nach dem neuen computergestützten Verfahren

Adhäsion und Geschwindigkeit von KG1a-Zellen auf P-Selektin ohne (gestrichelte Linie) und mit Zusatz von Oligosaccharid 15 (durchgehende Linie)

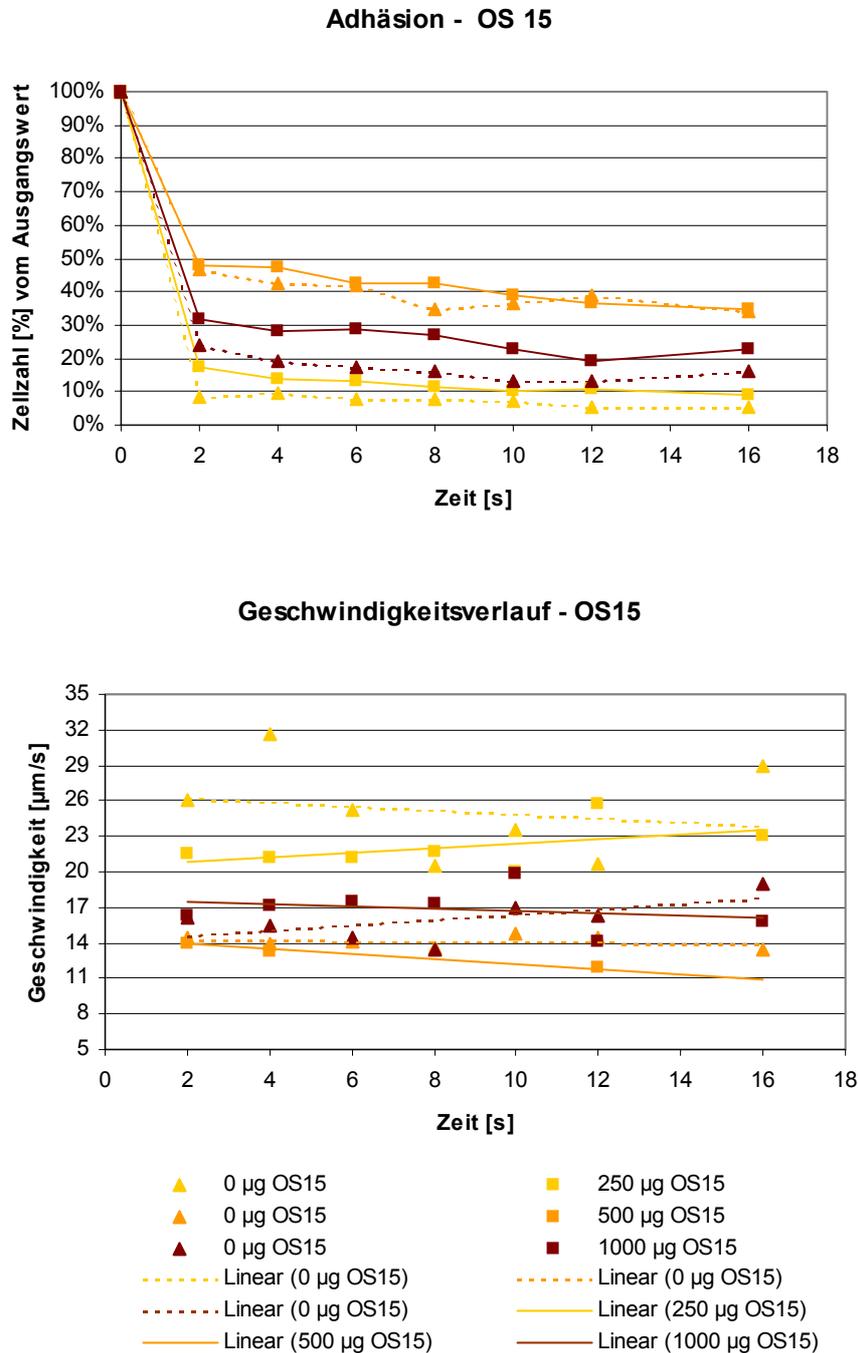
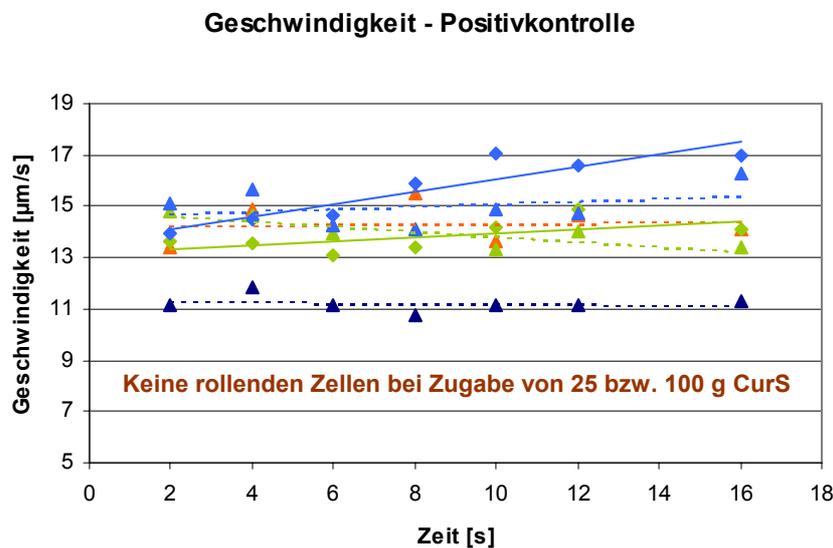
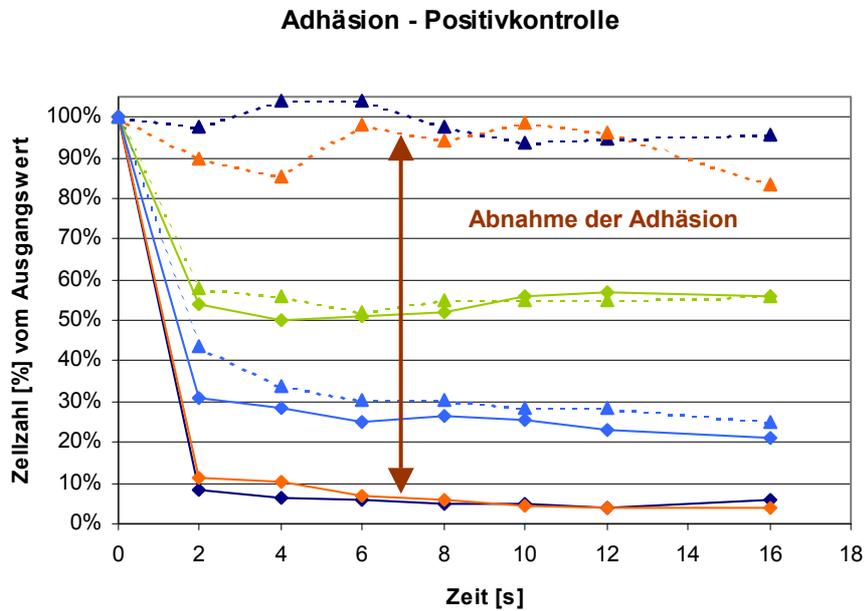


Abb. 37: Positivkontrollen, ausgewertet nach dem neuen computergestützten Verfahren

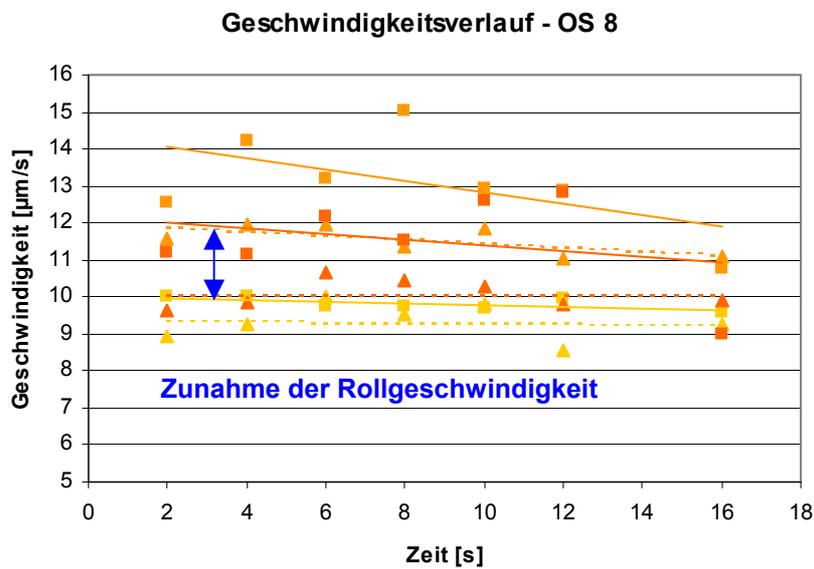
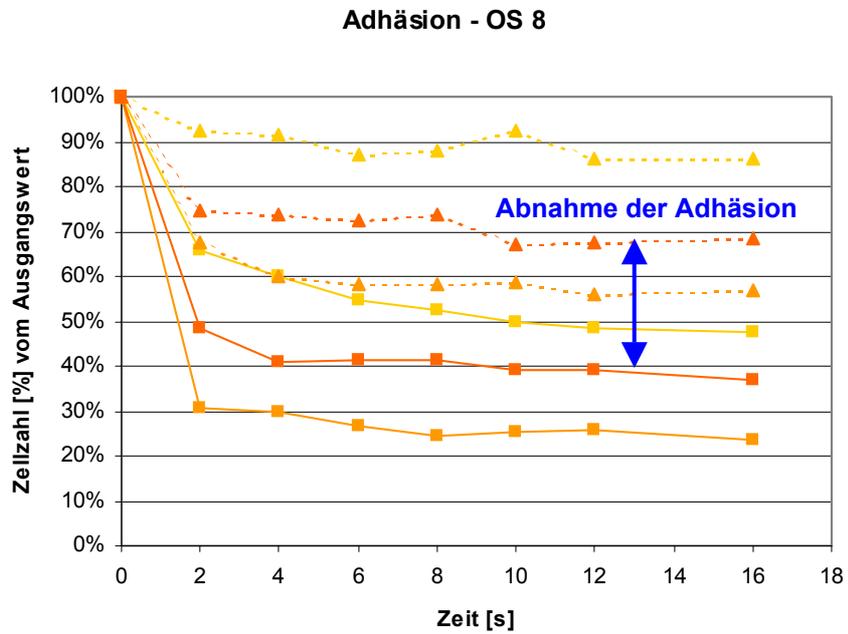
Adhäsion und Geschwindigkeit von KG1a-Zellen auf P-Selektin ohne (gestrichelte Linie) und mit Zusatz von CurS bzw. sLex^x (durchgängige Linie)



- | | |
|------------------------|--------------------------|
| ▲ 0 µg CurS | ▲ 0 µg CurS |
| ▲ 0 µg sLex | ◆ 250 µg sLex |
| ▲ 0 µg sLex | ◆ 250 µg sLex |
| --- Linear (0 µg CurS) | --- Linear (0 µg CurS) |
| --- Linear (0 µg sLex) | --- Linear (250 µg sLex) |
| --- Linear (0 µg sLex) | --- Linear (250 µg sLex) |

Abb. 38: Wirksames Oligosaccharid 8, ausgewertet nach dem neuen computergestützten Verfahren

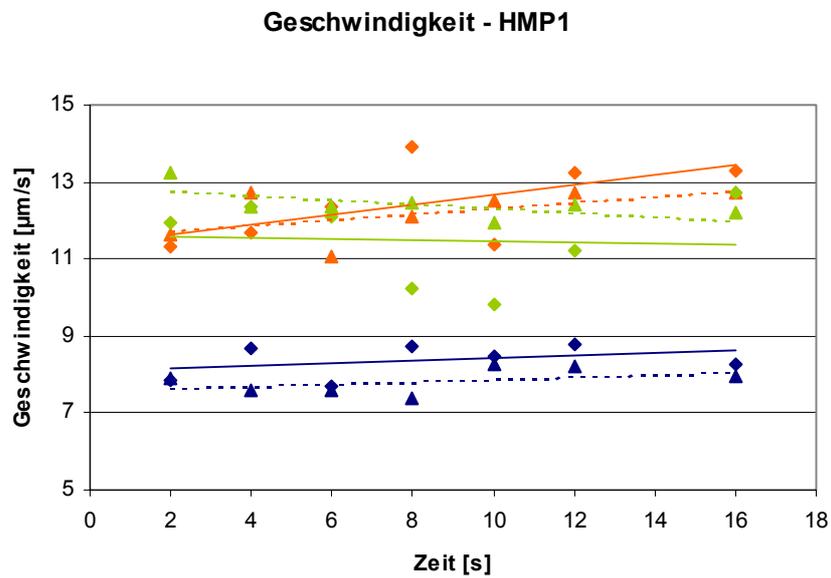
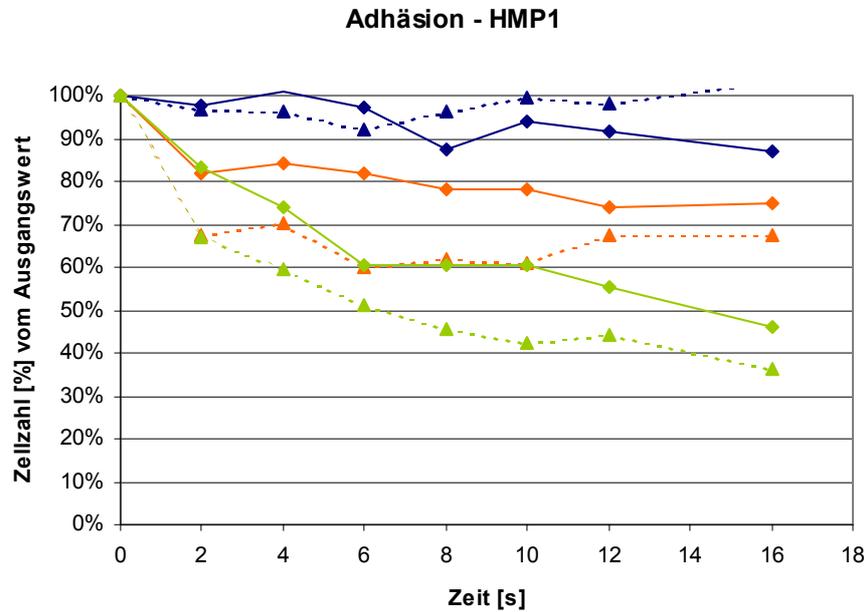
Adhäsion und Geschwindigkeit von KG1a-Zellen auf P-Selektin ohne (gestrichelte Linie) und mit Zusatz von Oligosaccharid 8 (durchgängige Linie)



- | | |
|--------------------------|------------------------|
| ▲ 0 µg OS 8 | ■ 250 µg OS 8 |
| ▲ 0 µg OS 8 | ■ 375 µg OS 8 |
| ▲ 0 µg OS 8 | ■ 500 µg OS 8 |
| - - - Linear (0 µg OS 8) | — Linear (250 µg OS 8) |
| - - - Linear (0 µg OS 8) | — Linear (375 µg OS 8) |
| - - - Linear (0 µg OS 8) | — Linear (500 µg OS 8) |

Abb. 39: Beispiel für ein wirkungsloses humanes Molkenprotein, ausgewertet nach dem neuen computergestützten Verfahren

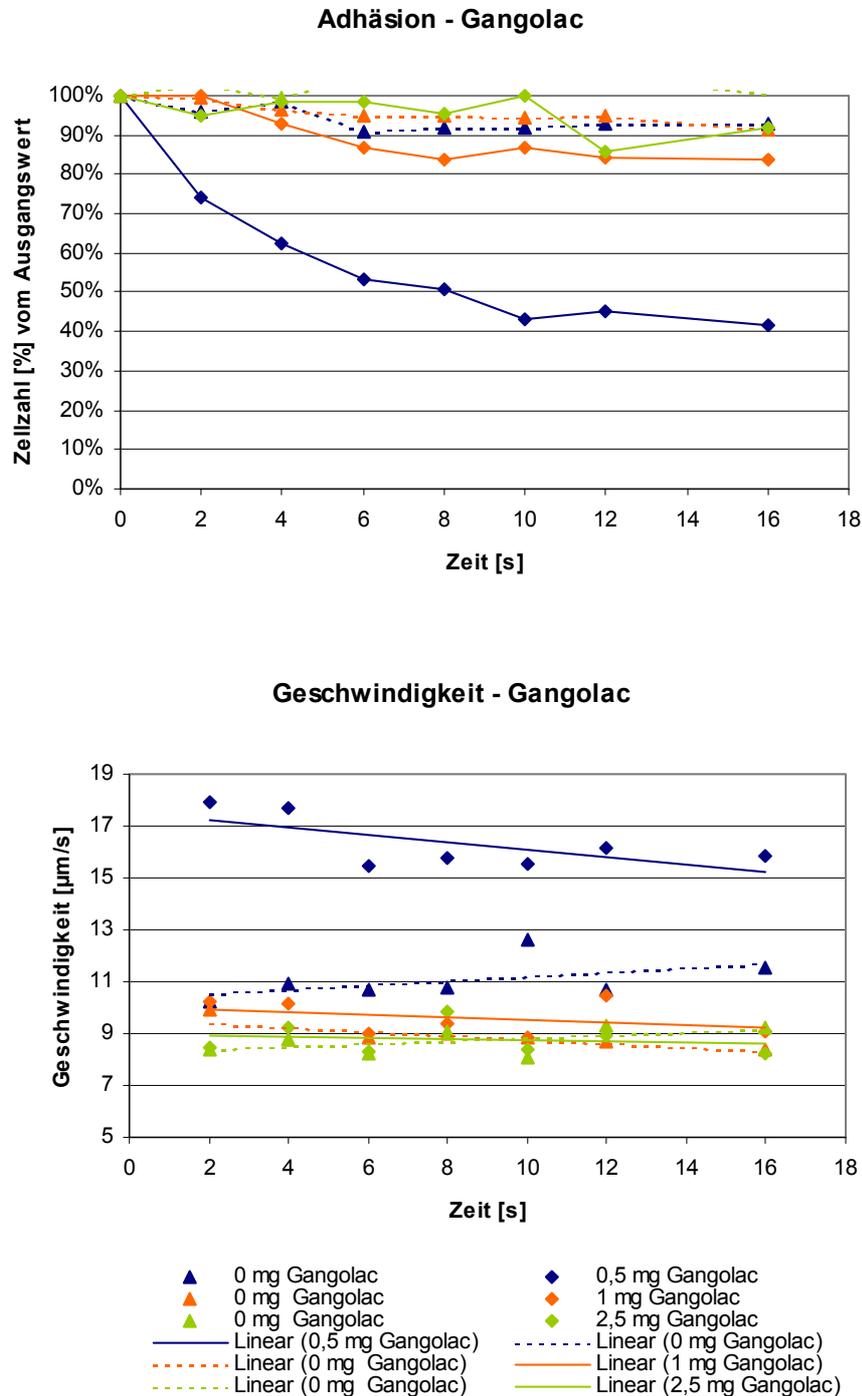
Adhäsion und Geschwindigkeit von KG1a-Zellen auf P-Selektin ohne (gestrichelte Linie) und mit Zusatz von HMP1 (durchgängige Linie)



- | | |
|------------------------|------------------------|
| ▲ 0 µg HMP1 | ◆ 500 µg HMP1 |
| ▲ 0 µg HMP1 | ◆ 1 mg HMP1 |
| ▲ 0 µg HMP1 | ◆ 1 mg HMP1 |
| — Linear (500 µg HMP1) | --- Linear (0 µg HMP1) |
| --- Linear (0 µg HMP1) | --- Linear (1 mg HMP1) |
| --- Linear (0 µg HMP1) | — Linear (1 mg HMP1) |

Abb. 40: Teilweise wirksames Gangolac, ausgewertet nach der neuen computergestützten Methode

Adhäsion und Geschwindigkeit von KG1a-Zellen auf P-Selektin ohne (gestrichelte Linie) und mit Zusatz von Gangolac (durchgängige Linie)



Abschließend lässt sich sagen, dass das Testsystem, verbessert durch das neue computergestützte Auswertesystem, sensitiv und spezifisch Inhibitoren für P-Selektin von wirkungslosen Verbindungen unterscheidet. Es ist deshalb ausgezeichnet für das Screening potentiell Selektin-hemmender Substanzen geeignet.

4.3 Adhäsion von humanen Krebszellen an Selektine

Unter der Annahme einer Beteiligung der Selektine am Metastasierungsprozess sind bisher viele in vitro- und in vivo-Untersuchungen durchgeführt worden. In statischen in vitro-Experimenten wurde die Adhäsion von Krebszellen an immobilisierte Selektine oder Endothelzellen analysiert. Dabei wird die Adhäsion mit der Expression von Liganden korreliert. Ein Einzelmechanismus lässt sich untersuchen. Von Nachteil ist das Fehlen der physiologischen Flussbedingungen. In vivo wurden Krebszellen inokuliert und die Metastasierung nach Selektinblockade untersucht. Ein Vorteil ist hier die physiologische Umgebung. Molekulare Mechanismen lassen sich jedoch nicht eindeutig ableiten. Das Ziel der vorliegenden Untersuchung ist daher einerseits auf die Wechselwirkung zwischen Selektinen und Tumorzellen zu fokussieren, dabei andererseits aber die physiologischen Flussbedingungen durch Verwendung der Durchflusskammer zu berücksichtigen. Die Betonung liegt auf der Fragestellung, ob Rollen von Tumorzellen der Initialschritt bei der Metastasierung sein kann.

Es wurden fünf Krebszelllinien ausgewählt. Darunter befinden sich eine Reihe von Gewebetumoren: Kolon- (HT-29), Leber- (HepG2) und Bronchialkarzinomzellen (LL bzw. LewisLung). Außerdem wurden Zellen mit hämatogenem Ursprung untersucht, die eine größere Ähnlichkeit mit Leukozyten aufweisen und daher für den Rollprozess prädestiniert sein sollten: myeloide Vorläuferzellen von Neutrophilen (HL-60) und hämatopoetische Stammzellen (KG1a). Die Zelllinien HL-60, KG1a und HepG2 sind von der Arbeitsgruppe um Dr. Zeisig (Max-Delbrück-Zentrum, Berlin) hinsichtlich ihrer Ausstattung mit Ligandenepitopen charakterisiert worden und exprimieren sLe^x, aber nicht sLe^a, O-glykosidisch an Proteine gebunden.

In Analogie zu bisherigen Versuchen wurde zunächst die statische Selektin-Bindung der Zelllinien untersucht. Dabei werden die Tumorzellen auf in einem Well immobilisierte Selektine gegeben. Alle fünf Tumorzelllinien zeigen hier eine deutliche Bindung an P-Selektin und, mit Ausnahme von HepG2- und LL-Zellen, an L-Selektin (Abb. 41).

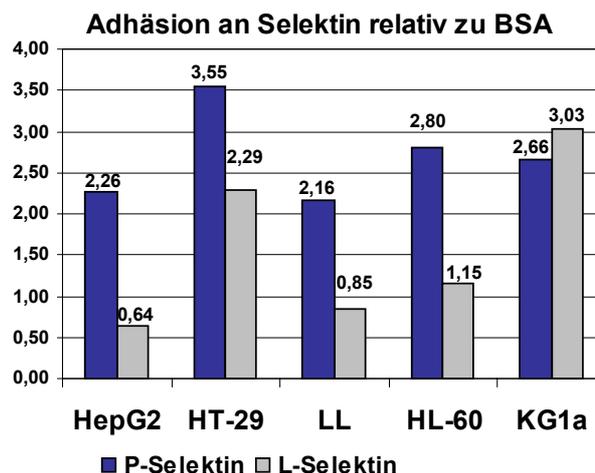


Abb. 41: Adhäsion an P- und L-Selektin relativ zu 0,5 % BSA (Adhäsion = 1)

Die dynamischen Untersuchungen wurden in der zuvor beschriebenen Flusskammer durchgeführt. Auf P- und L-Selektin rollende KG1a-Zellen werden routinemäßig für Inhibierungsstudien eingesetzt und wurden hier nicht noch einmal untersucht. Ebenso

verhält es sich mit HL-60-Zellen auf P-Selektin. Ihre dynamische Interaktion mit L-Selektin wurde nicht kontrolliert. Fokussiert wurde also im Gegensatz zu myeloiden Krebszellen auf Gewebetumorzellen. Eine Mehrheit der Zellen aus Tumorgewebe zeigt keine Bindung unter Strömungsbedingungen. Nur die Leberkarzinomzellen (HepG2) rollen auf L-Selektin verglichen mit Leukozyten mit fünf- bis sechsfacher Geschwindigkeit (Tab. 14 und Abb. 42).

Konzentration L-Selektin	Adhäsion	Rollgeschwindigkeit
0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	5 %	145,0 $\mu\text{m}/\text{s} \pm 31$
0,04 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	16 %	106,8 $\mu\text{m}/\text{s} \pm 14$

Tab. 14: Adhäsion und Rollgeschwindigkeit von HepG2-Zellen auf zwei verschiedenen L-Selektin-Konzentrationen

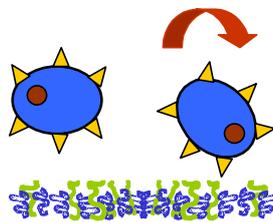


Abb. 42: Schema rollender HepG2-Zellen auf einer Schicht aus L-Selektin mit Albumin

Ein potentieller Ligand für L-Selektin auf HepG2-Zellen ist Nukleolin, das auf deren Oberfläche gefunden [416, 417] und kürzlich als L-Selektin-Ligand identifiziert wurde [96, 418].

Dass nur eine von drei Gewebetumorzelllinien unter dynamischen Bedingungen an L-Selektin adhärert, widerspricht der Hypothese, dass Rollen ein essentieller Schritt bei der Metastasierung ist. Andererseits impliziert die unter statischen Bedingungen gefundene Adhäsion eine Bedeutung der Selektine bei der Interaktion der Tumorzellen. Da in vivo eine Beteiligung von Selektinen nachgewiesen wurde, scheinen die Selektine keine direkte, sondern eine indirekte Funktion einzunehmen. Folgender Mechanismus wird postuliert: Die Bindung von Tumorzellen an Thrombozyten über P-Selektin und an Leukozyten über deren L-Selektin. Als Folge kommt es zur Bildung von Mikroemboli, die mechanisch in Gefäßen hängen bleiben oder über Selektin-Wechselwirkungen zwischen Leukozyten bzw. Thrombozyten und dem Endothel festhängen (Abb. 43).

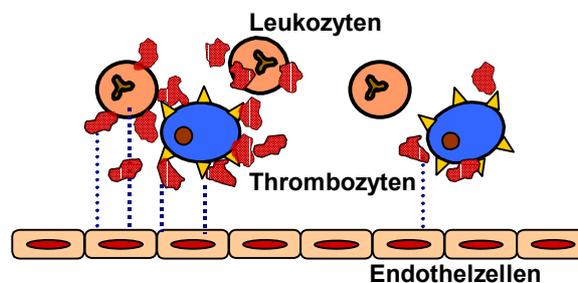


Abb. 43: Schema der interagierenden Krebszellen, Leukozyten, Thrombozyten und Endothelzellen

Die Elimination von Selektin-Bindungsereignissen bietet also auch auf Basis dieses Mechanismus aus pharmazeutischer Sicht neue Perspektiven bei der Unterdrückung der Metastasierung. Deshalb wurden die Inhibitionsuntersuchungen auf die Adhäsion der Krebszellen ausgeweitet. Als Standard diente wieder der natürliche Ligand sLe^x. Getestet wurden Inhibitoren, die zwei Substanzklassen repräsentieren: Das Polysaccharid 2,4-PhyS (selektiv sulfatiertes Phycarin), das schon in den früheren Untersuchungen die Adhäsion von U937-Zellen an P-Selektin blockiert hat, sowie das sLe^x-Mimetikum „Inhibitor 1“. Beide zeigen eine konzentrationsabhängige Wirkung auf die Adhäsion der HepG2-Zellen an L-Selektin (Abb. 44). sLe^x hat unter dynamischen Bedingungen wieder keine bzw. nur eine eingeschränkte Wirkung.

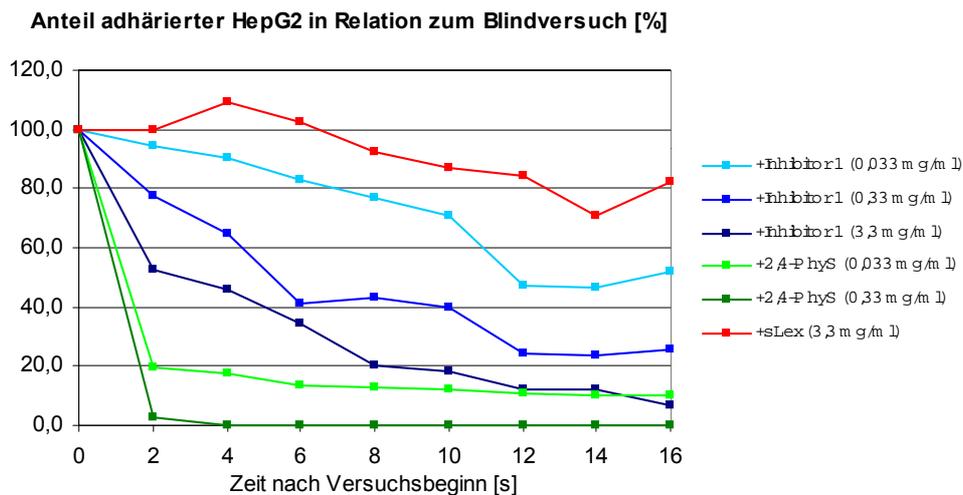


Abb. 44: Adhäsionsverhalten von HepG2-Zellen unter dem Einfluss von löslichem sLe^x, 2,4-PhyS und „Inhibitor 1“

Zusammengefasst konnte im dynamischen Testsystem keine direkte Wechselwirkung von Krebszellen mit Selektinen detektiert werden. Die direkte Bindung der Krebszellen am Endothel kann somit nicht als Initialschritt im Metastasierungsprozess postuliert werden. Die Einbeziehung von Thrombozyten und Leukozyten in die Krebszellbindung ist anzunehmen und erklärt die Selektin-Abhängigkeit. Die eingesetzten Inhibitoren unterdrücken konzentrationsabhängig das L-Selektin-vermittelte Rollen von Tumorzellen und bieten daher neue Ansatzpunkte für eine Therapie der Metastasierung.

5 Zusammenfassung

Die Selektine, eine Gruppe von drei Kohlenhydrat-bindenden Adhäsionsmolekülen, lösen im Zuge einer Entzündungsreaktion eine Kaskade von Adhäsionsereignissen aus, indem sie die Leukozyten aus dem Blutstrom „abfangen“ und in eine Rollbewegung entlang der Gefäßwand überführen. Diese Verlangsamung ermöglicht anderen Adhäsionsmolekülen die feste Adhäsion und die Extravasation in das entzündete Gewebe zu vermitteln. Entsprechend ihres Vorkommens werden sie als L-(Leukozyten), E-(Endothel) und P-(Plättchen und Endothel)Selektin bezeichnet. Eine pathologische Beteiligung der Selektine und der von ihnen unterstützten Rollbewegung wird bei verschiedenen entzündlichen Erkrankungen, angiogenetischen und metastatischen Krankheitsverläufen diskutiert. Da die Selektine eine Schlüsselstellung im Prozess der Leukozytenextravasation innehaben und ihre Expression räumlich und zeitlich auf das entzündete bzw. erkrankte Gewebe beschränkt ist, sind sie als pharmakologische Zielstruktur prädestiniert.

Um therapeutisch in pathologische durch die Selektine vermittelte Abläufe eingreifen zu können bzw. um neuartige Selektin-Inhibitoren zu finden, sind Kenntnisse über die molekulare Basis der Selektin-Interaktionen unerlässlich. In der vorliegenden Arbeit wurde die Ligandenpräsentation mit Fokus auf Clusterbildung und Flexibilität untersucht. Dabei wurde ein dynamisches Testsystem eingesetzt, welches die Auswirkungen der Scherkraft auf die Selektin-Bindung berücksichtigt. Gemessen wurden die Wechselwirkungen Selektin-haltiger Zellen mit einer Modellmembran aus Matrixlipid, in die sLe^x-Glykolipide als Liganden eingebettet sind. Durch Modifikationen der Glykolipide und Verwendung unterschiedlicher Matrixlipide konnte die laterale Anordnung der Ligand-Glykolipide variabel strukturiert werden. Das Einfügen von verschiedenen Spacern zwischen Kopfgruppe und Lipidanker veränderte die Flexibilität und Erkennbarkeit der Saccharidepitope.

- Durch Konjugation von NBD an einen Glykolipidanker konnte eine räumliche Konzentrierung relevanter, d. h. kleinster Mengen an Glykolipid in der Membran direkt nachgewiesen und mit der Funktionalität als Roll-Liganden korreliert werden. Dieses Ergebnis untermauert die Hypothese, dass die Bildung von Glykolipid-Clustern Voraussetzung für das Selektin-vermittelte Rollen ist.
- Für die Zugänglichkeit der Kopfgruppenepitope auf der Membranoberfläche ist ein minimaler Abstand notwendig. Eine gesteigerte Kopfgruppenbeweglichkeit verbessert die Ligandenfunktionalität. Dabei ist die absolute Länge der Spacer weniger wichtig als ihre Flexibilität, welche durch die intrinsische Flexibilität der Glykolipide und Wechselwirkungen innerhalb der Molekülassoziate bestimmt wird.
- Eine räumliche Konzentrierung von zwei Glykolipiden reicht für eine effektive Funktionsfähigkeit als multivalenter Ligand nicht aus.
- Die teilweise Fluorierung der Alkylketten in den Glykolipiden bewirkt deren Clusterung in einem nicht-fluorierten Matrixlipid. Die Cluster binden zwar an E-Selektin, können den dynamischen Rollprozess jedoch nicht unterstützen. Dies kann möglicherweise durch die hohe Packungsdichte innerhalb der

Cluster aufgrund der vollständigen Entmischung von fluorierten Glykolipiden in der Matrix erklärt werden.

Das Anwendungsgebiet des dynamischen Testsystems wurde auf das Screening löslicher Selektin-Inhibitoren ausgedehnt. Begonnen wurde mit einer Reihe von Saccharid-Strukturen, bei denen, ausgehend vom sLe^x, der glykosidische Anteil reduziert, hydrophobe Alkylketten zur Bindungsverstärkung eingefügt und die negative Ladung der Sialinsäure durch Sulfatgruppe(n) substituiert wurde. Außerdem boten sich heparinoide Verbindungen als zu testende Substanzklasse an, da sie einerseits aus Oligosacchariden bestehen, die den natürlichen Kohlenhydrat-Liganden ähnlich sind, andererseits zusätzlich eine hohe Ladungsdichte aufweisen. Fünf semisynthetische, sulfatierte Polysaccharide, die sich in ihrem Molekulargewicht und Sulfatierungsgrad unterscheiden, wurden mit zwei kommerziell erhältlichen Heparinzubereitungen verglichen. Eine dritte Substanzgruppe waren die natürlichen Oligosaccharide aus der humanen Milch. Es wurden 16 verschiedene Oligosaccharid-Fractionen, die zwar in struktureller Hinsicht kaum aussagekräftig sind, aber ein breites Spektrum an strukturellen Eigenschaften (Ladung, Molekulargewicht) abdecken, untersucht.

- Ein zweifach sulfatiertes Fukose-Galaktose-Derivat mit einer langen hydrophoben Seitenkette zeigt eine deutliche Wirkungssteigerung gegenüber sLe^x. Die hohe Inhibierungsfähigkeit scheint durch das Zusammenwirken dieser beiden Komponenten, nicht durch eine der beiden Modifikationen allein, verursacht zu werden.
- Die semisynthetischen Polysaccharide sind im Gegensatz zu den herkömmlichen Heparinen wirksame P-Selektin-Inhibitoren, die eine viel höhere Aktivität als der Standardligand sLe^x aufweisen. Dabei scheint die Polysaccharid-Grundstruktur und die genaue molekulare Anordnung, wie das Sulfatierungsmuster, von größerer Bedeutung für die Bindung an P-Selektin zu sein als der Sulfatierungsgrad und das Molekulargewicht. Die Polymere können vermutlich eine dominante und funktionell relevante Fraktion der Selektine blockieren, wobei die Interaktion durch elektrostatische Anziehung gesteuert wird.
- Als einzige Oligosaccharid-Probe zeichnet sich ein niedermolekulares Fukoidan, dessen Struktur nicht näher definiert ist, durch eine starke und gut reproduzierbare Inhibition aus. Fukoidan selbst ist ein hoch verzweigtes, sulfatiertes Polysaccharid, das hauptsächlich aus L-Fukose-Einheiten besteht. Für eine erfolgreiche Weiterentwicklung der Inhibitorensuche scheint es lohnenswert, auf strukturähnliche Verbindungen zu fokussieren.

Um die Rolle von Selektinen bei Tumorerkrankungen zu analysieren, wurden die Ligand-tragenden Zellen des Testsystems durch verschiedene Gewebetumorzelllinien ersetzt und deren Wechselwirkung mit P- und L-Selektin untersucht.

- Eine direkte Wechselwirkung mit den Selektinen kann dabei für eine Mehrheit der Krebszellen nicht detektiert werden. Die direkte Bindung kann daher nicht als Initialschritt im Metastasierungsprozess postuliert werden. Die

Einbeziehung von Thrombozyten und Leukozyten in die Bindung der Krebszellen ist anzunehmen und erklärt die Selektin-Abhängigkeit.

- Eingesetzte Inhibitoren (sulfatiertes Polysaccharid und sLe^x-Analogon) unterdrücken konzentrationsabhängig das L-Selektin-vermittelte Rollen von Leberkarzinomzellen und bieten daher neue Ansatzpunkte für eine Therapie der Metastasierung.

Im Zuge der Arbeit wurde im Gegensatz zur bisherigen manuellen Methode eine computergestützte Auswertung der Rollgeschwindigkeit sowie der Anzahl adhärerter Zellen eingeführt. Die Parameter Adhäsion und Rollgeschwindigkeit werden nicht mehr als Endwerte, sondern in bestimmten Zeitabständen angegeben. Dadurch kann das Verhalten der Zellen zu Beginn des Versuchs hervorgehoben werden, wo eine Wirkung am deutlichsten zu erkennen ist, und der Verlauf des Rollprozesses sensibler verfolgt werden. Die Ergebnisse können statistisch besser abgesichert werden.

Das System zeichnet sich durch eine hohe biologische Nähe aus, was durch die Rollfähigkeit frisch isolierter Leukozyten gezeigt werden konnte.

Durch die freie Auswahl von Selektinen und deren artifiziellen Liganden ist die Anordnung sehr variabel.

Abschließend lässt sich sagen, dass das dynamische Testsystem, verbessert um die neue Auswertemethode, hervorragend geeignet ist, sensitiv und spezifisch Selektin-Inhibitoren von wirkungslosen Substanzen zu diskriminieren. Es ist deshalb gut für das Screening möglicher Selektin-Inhibitoren geeignet.

Für die Zukunft sind weiterführende Untersuchungen mit sulfatierten Polysacchariden und hinsichtlich der Tumormetastasierung konkret geplant. Angedacht ist auch, die Suche nach Inhibitor-Substanzen in der humanen Milch auf der Basis des gewonnenen Wissens über die strukturellen Anforderungen (passfähige Kohlenhydrate, Ladungscluster) spezifischer zu gestalten.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Vogel,J.: Aufklärung der molekularen Mechanismen des Selektin-vermittelten Leukozytenrollens als Grundlage für eine antiinflammatorische Therapie. Dissertation, FB Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle, 2000.
- [2] Springer,T.A.: Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu. Rev. Physiol.* 57 (1995), 827-872.
- [3] Cohnheim,J.: Lectures on general pathology: A handbook for practitioners and students. The New Sydenham Society, London 1889.
- [4] Mackay,C.R.: Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat. Immunol.* 2 (2001), 95-101.
- [5] Smith,C.W., Marlin,S.D., Rothlein,R., Toman,C., Anderson,D.C.: Cooperative interactions of LFA-1 and Mac-1 with intercellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro. *J. Clin. Invest.* 83 (1989): 2008-2017.
- [6] Lawrence,M.B., Springer,T.A.: Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* 65 (1991), 859-873.
- [7] Alon,R., Kassner,P.D., Carr,M.W., Finger,E.B., Hemler,M.E., Springer,T.A.: The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1. *J. Cell Biol.* 128 (1995), 1243-1253.
- [8] Newman,P.J., Berndt,M.C., Gorski,J., White,G.C., Lyman,S., Paddock,C., Müller,W.A.: PECAM-1 (CD 31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science* 247 (1993), 1219-1222.
- [9] Müller,W.A., Weigl,S.A., Deng,X., Phillips,D.M.: PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J. Exp. Med.* 178 (1993), 449-460.
- [10] Patel,K.D., Nollert,M.U., McEver,R.P.: P-selectin must extend a sufficient length from the plasma membrane to mediate rolling of neutrophils. *J. Cell Biol.* 131 (1995), 1893-1902.
- [11] Chou,K.C.: The convergence-divergence duality in lectin domains of selectin family and its implications. *FEBS-Lett.* 363 (1995), 123-126.
- [12] Blanck,O., Iobst,S.T., Gabel,C., Drickamer,K.: Introduction of Selectin-like Binding Specificity into Homologous Mannose-binding Protein. *J. Biol. Chem.* 271 (1996), 7289-7292.
- [13] Erbe,D.V., Wolitzky,B.A., Presta,L.G., Norton,C.R., Ramor,R.J., Burns,D., Rumberger,J.M., Narasinga,R., Foxall,C., Brandley,B.K., Lasky,L.A.: Identification of an E-Selectin region critical for carbohydrate recognition. *J. Cell Biol.* 119 (1992), 215-227.
- [14] Li,S.H., Burnst,D.K., Rumberger,J.M., Presky,D.H., Wilkinson,V.L., Anostario,M., Wolitzky,B.A., Norton,R., Familletti,P.C., Kim,K.J., Goldstein,A.L., Cox,D.C., Huang,K.S.: Consensus repeat domains of E-Selectin enhance ligand binding. *J. Biol. Chem.* 269 (1994), 4431-4437.
- [15] Mehta,P., Patel,K.D., Laue,T.M., Erickson,H.P., McEver,R.P.: Soluble monomeric P-Selectin containing lectin and epidermal growth factor domains binds to P-Selectin glycoprotein ligand-1 on leukocytes. *Blood* 90 (1997), 2381-2389.
- [16] Somers,W.S., Tang,J., Shaw,G.D., Camphausen,R.T.: Insights into the molecular basis of leukocyte tethering and rolling revealed by structures of P- and E-selectin bound to Sle^x and PSGL-1. *Cell* 103 (2000), 467-479.

- [17] Dwir,O., Kansas,G.S., Alon,R.: An activated L-selectin mutant with conserved equilibrium binding properties but enhanced ligand recognition under shear flow. *J. Biol. Chem.* 275 (2000), 18682-18691.
- [18] Graves,B.J., Crowther,R.L., Chandran,C., Rumberger,J.M., Li,S., Huang,K.S., Presky,D.H., Familletti,P.C., Wolitzky,B.A., Burns,D.K.: Insight into E-Selectin/ligand interaction from the crystal structure and mutagenesis of the lec/EGF domain. *Nature* 367 (1994), 532-538.
- [19] Bajorath,J., Stenkamp,R., Aruffo,A.: Comparison of a protein model with its X-ray structure: The ligand binding domain of E-Selectin. *Bioconj. Chem.* 6 (1995), 3-6.
- [20] Gallatin,W.M., Weissman,I.L., Butcher,E.C.: A cell surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature* 304 (1983), 30-34.
- [21] Stoolman,L.M., Rosen,S.D.: Possible role for cell-surface carbohydrate-binding molecules in lymphocyte recirculation. *J. Cell Biol.* 96 (1983), 722-729.
- [22] Stoolman,L.M., Tenforde,T.S., Rosen,S.D.: Phosphomannosyl receptors may participate in the adhesive interaction between lymphocytes and high endothelial venules. *J. Cell Biol.* 99 (1984), 1535-1540.
- [23] Lewinsohn,D.M., Bargatze,R.F., Butcher,E.C.: Leukocyte-endothelial cell recognition: Evidence of a common molecular mechanism shared by neutrophils, lymphocytes and other leukocytes. *J. Immunol.* 138 (1987), 4313-4321.
- [24] Lasky,L.A., Singer,M.S., Yednock,T.A., Dowbenko,A., Fennie,C., Rodriguez,H., Nguyen,T., Stachel,S., Rosen,S.D.: Cloning of a lymphocyte homing receptor reveals a lectin domain. *Cell* 56 (1989), 1045-1055.
- [25] Johnston,G.I., Cook,R.G., McEver,R.P.: Cloning of GMP-140, a granule membrane protein of platelets and endothelium: sequence similarity to proteins involved in cell adhesion and inflammation. *Cell* 56 (1989), 1033-1044.
- [26] Bevilacqua,M.P., Stengelin,S., Gimbrone,M.A.Jr., Seed,B.: Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* 243 (1989), 1160-1165.
- [27] Bruehl,R.E., Springer,T.A., Bainton,D.F.: Quantitation of L-Selectin distribution on human leukocyte microvilli by immunogold labeling and electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 44 (1996), 835-844.
- [28] Picker,L.J., Warnock,R.A., Burns,A.R., Doerschuk,C.M., Berg,E.L., Butcher,E.C.: The neutrophil selectin LECAM-1 presents carbohydrate ligands to the vascular selectins ELAM-1 and GMP-140. *Cell* 66 (1991), 921-933.
- [29] Erlandsen,S.L., Hasslen,S.R., Nelson,R.D.: Detection and spatial distribution of the β 2Integrin (Mac-1) and L-Selectin (LECAM-1) adherence receptors on human neutrophils by high resolution field emission SEM. *J. Histochem. Cytochem.* 41 (1993), 327-333.
- [30] Kahn,J., Ingraham,R.H., Shirley,R., Migaki,G.I., Kishimoto,T.K.: Membrane proximal cleavage of L-Selectin: Identification of the cleavage site and a 6kD transmembrane peptide fragment of L-Selectin. *J. Cell Biol.* 125 (1994), 461-470.

- [31] Kishimoto, T.K., Jutila, M.A., Berg, E.L., Butcher, E.C.: Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. *Science* 245 (1989), 1238-1241.
- [32] Gordon, E.V., Strong, L.E., Kiessling, L.L.: Glycoprotein inspired materials promote the proteolytic release of cell surface L-Selectin. *Bioorg. Med. Chem.* 6 (1998), 1293-1299.
- [33] Bevilacqua, M.P., Pober, J.S., Mendrick, D.L., Cotran, R.S., Gimbrone, M.A. Jr.: Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987), 9238-9242.
- [34] Schindler, U., Baichwal, V.R.: Three NF κ B binding sites in the human E-Selectin gene required for maximal tumor necrosis factor alpha-induced expression. *Mol. Cell. Biol.* 14 (1994), 5820-5831.
- [35] McEver, R.P.: Regulation of expression of E-Selectin and P-Selectin. In: "The Selectins". Vestweber, D. (Ed.) Harwood Academic Publishers, Amsterdam 1997, 31-47.
- [36] Von Asmuth, E.J., Smeets, E.F., Ginsel, L.A., Onderwater, J.J., Leeuwenberg, J.F., Buurman, W.A.: Evidence for endocytosis of E-selectin in human endothelial cells. *Eur. J. Immunol.* 22 (1992), 2519-2526.
- [37] Subramaniam, M., Koedam, J.A., Wagner, D.D.: Divergent fates of P- and E-selectins after their expression on the plasma membrane. *Mol. Biol. Cell.* 4 (1993), 791-801.
- [38] Hsu-Lin, S., Berman, C.L., Furie, B.C., August, D., Furie, B.A.: Platelet membrane protein expressed during platelet activation and secretion. Studies using a monoclonal antibody specific for thrombin-activated platelets. *J. Biol. Chem.* 259 (1984), 9121-9126.
- [39] McEver, R.P., Martin, M.N.: A monoclonal antibody to a membrane glycoprotein binds only to activated platelets. *J. Biol. Chem.* 259 (1984), 9799-9804.
- [40] McEver, R.P., Beckstead, J.H., Moore, K.L., Marshall-Carlson, L., Bainton, D.F.: GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J. Clin. Invest.* 84 (1989), 92-99.
- [41] Geng, J.G., Bevilacqua, M.P., Moore, K.L., McIntyre, T.M., Prescott, S.M., Kim, J.M., Bliss, G.A.: Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature* 343 (1990), 757-760.
- [42] Hattori, R., Hamilton, K.K., Fugate, R.D., McEver, R.P., Sims, P.J.: Stimulated secretion of endothelial von Willebrand factor is accompanied by rapid redistribution to the cell surface of the intracellular granule membrane protein GMP-140. *J. Biol. Chem.* 264 (1989), 7768-7771.
- [43] Weller, A., Isenmann, S., Vestweber, D.: Cloning of the mouse endothelial selectins: expression of both E- and P-selectin is inducible by tumor necrosis factor-alpha. *J. Biol. Chem.* 267 (1992), 15176-15183.
- [44] Setiadi, H., Disdier, M., Green, S.A., Canfield, W.M., McEver, R.P.: Residues throughout the cytoplasmic domain affect the internalization efficiency of P-Selectin. *J. Biol. Chem.* 270 (1995), 26818-26826.
- [45] Straley, K.S., Green, S.A.: Rapid transport of internalized P-selectin to late endosomes and the TGN: roles in regulating cell surface expression and recycling to secretory granules. *J. Cell Biol.* 151 (2000), 107-116.
- [46] Ushiyama, S., Laue, T.M., Moore, K.L., Erickson, H.P., McEver, R.P.: Structural and functional characterization of monomeric soluble P-Selectin and

- comparison with membrane P-Selectin. *J. Biol. Chem.* 268 (1993), 15229-15237.
- [47] Barkalow, F.J., Barkalow, K.L., Mayadas, T.N.: Dimerization of P-selectin in platelets and endothelial cells. *Blood* 97 (2000), 3070-3077.
- [48] Phillips, M.L., Nudelman, E., Gaeta, F.C.A., Perez, M., Singhal, A.K., Hakamori, A.L., Paulson, J.C.: ELAM-1 mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand, sialyl-LewisX. *Science* 250 (1990), 1130-1132.
- [49] Walz, G., Aruffo, G., Kolanus, W., Bevilacqua, M., Seed, B.: Recognition by ELAM-1 of the sialyl LewisX determinant on myeloid and tumor cells. *Science* 250 (1990), 1132-1135.
- [50] Zhou, O., Moore, K.L., Smith, D.F., Varki, A., McEver, P.R., Cummings, R.D.: The selectin GMP 140 binds to sialylated, fucosylated lactosaminoglycans on both myeloid and nonmyeloid cells. *J. Cell Biol.* 115 (1991), 557-564.
- [51] Foxall, C., Watson, S.R., Dowbenko, D., Fennie, C., Lasky, S.A., Kiso, M., Hasegawa, A., Asa, D., Brandley, B.K.: The three members of the selectin receptor family recognize a common carbohydrate epitope, the sialyl LewisX oligosaccharide. *J. Cell Biol.* 117 (1992), 895-902.
- [52] Berg, E.L., Robinson, M.K., Mansson, O., Butcher, E.C., Magnani, E.L.: A carbohydrate domain common on both sialyl LewisX and sialyl LewisY is recognized by the endothelial cell leukocyte adhesion molecule ELAM-1. *J. Biol. Chem.* 266 (1991), 14869-14872.
- [53] Handa, K., Nudelman, E.D., Strout, M.R., Shiozawa, T., Hakamori, S.I.: Selectin GMP-140 (CD62, PADGEM) binds to sialyl LewisX and sialyl LewisY and sulfated glycans modulate this binding. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 181 (1991), 1223-1230.
- [54] Jacob, G.C., Kirmaier, C., Abbas, S.Z., Howard, S.C., Steininger, C.N., Welply, J.K., Scudder, P.: Binding of the Sialyl Lewis X to E-Selectin as measured by fluorescence polarization. *Biochemistry* 34 (1995), 1210-1217.
- [55] Cooke, R.M., Hale, R.S., Lister, S.G., Shah, G., Weir, M.P.: The conformation of the Sialyl Lewis X ligand changes upon binding to E-Selectin. *Biochemistry* 33 (1994), 10591-10596.
- [56] Poppe, L., Brown, G.S., Philo, J.S., Nikrad, P.V., Shah, B.H.: Conformation of the sLe^x tetrasaccharide, free in solution and bound to E-, P- and L-selectin. *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997), 1727-1736.
- [57] Moore, K.L., Varki, A., McEver, R.P.: GMP-140 binds to a glycoprotein receptor on human neutrophils: evidence for a lectin-like interaction. *J. Cell Biol.* 112 (1991), 491-499.
- [58] Sako, D., Chang, X.J., Barone, K.M., Vachino, G., White, H.M., Shaw, G., Veldman, G.M., Bean, K.M., Ahern, T.J., Furie, B., Cumming, D.A., Larsen, G.R.: Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin. *Cell* 75 (1993), 1179-1186.
- [59] Laszik, Z., Jansen, P.J., Cummings, R.D., Tedder, T.F., McEver, R.P., Moore, K.L.: P-selectin glycoprotein ligand-1 is broadly expressed in cells of myeloid, lymphoid, and dendritic lineage and in some nonhematopoietic cells. *Blood* 88 (1996), 3010-3021.
- [60] Moore, K.L., Patel, K.D., Bruehl, R.E., Li, F., Johnson, D.A., Lichenstein, H.S., Cummings, R.D., Bainton, D.F., McEver, R.P.: P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin. *J. Cell Biol.* 128 (1995), 661-671.

- [61] Snapp,K.R., Craig,R., Herron,M., Nelson,R.D., Stoolman,L.M., Kansas,G.S.: Dimerization of P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 (PSGL-1) required for optimal recognition of P-Selectin. *J. Cell Biol.* 142 (1998), 263-270.
- [62] Epperson,T.K., Patel,K.D., McEver,R.P., Cummings,R.D.: Noncovalent association of P-selectin glycoprotein ligand-1 and minimal determinants for binding to P-selectin. *J. Biol. Chem.* 275 (2000), 7839-7853.
- [63] Norgard,K.E., Moore,K.L., Diaz,S., Stults,N.L., Ushiyama,S., McEver,R.P., Cummings,R.D., Varki,A.: Characterization of a specific ligand for P-selectin on myeloid cells: a minor glycoprotein with sialylated O-linked oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* 268 (1993), 12764-12774.
- [64] Wilkins,P.P., McEver,R.P., Cummings,R.D.: Structures of the O-glycans on the P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 from HL-60 cells. *J. Biol. Chem.* 271 (1996), 18732-18742.
- [65] Sako,D., Comess,K.M., Barone,K.M., Camphausen,R.T., Cummings,R.D., Shaw,D.A.: A sulfated peptide segment at the amino terminus of PSGL-1 is critical for P-Selectin binding. *Cell* 83 (1995), 323-331.
- [66] Pouyani,T., Seed,B.: PSGL-1 recognition of P-Selectin is controlled by a tyrosine sulfation consensus at the PSGL-1 amino terminus. *Cell* 83 (1995), 333-343.
- [67] Wilkins,P.P., Moore,K.L., McEver,R.P., Cummings,R.D.: Tyrosine sulfation of P-selectin glycoprotein ligand-1 is required for high affinity binding to P-selectin. *J. Biol. Chem.* 270 (1995), 22677-22680.
- [68] Moore,K.L., Eaton,S.F., Lyons,D.E., Lichenstein,H.S., Cummings,R.D., McEver,R.P.: The P-Selectin Glycoprotein Ligand from human neutrophils display sialylated, fucosylated, O-linked poly-N-acetyllactosamine. *J. Biol. Chem.* 269 (1994), 23318-23327.
- [69] Ramachandran,V., Nollert,M.U., Qiu,H., Liu,W.J., Cummings,R.D., Zhu,C., McEver,R.P.: Tyrosine replacement in P-Selectin glycoprotein ligand-1 affects distinct kinetic and mechanical properties of bonds with P- and L-Selectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999), 13771-13776.
- [70] Goetz,D.J., Greif,D.M., Ding,H., Camphausen,R.T., Howes,S., Comess,K.M., Snapp,K.R., Kansas,G.S., Luscinskas,F.W.: Isolated P-selectin Glycoprotein Ligand-1 dynamic adhesion to P- and E-selectin. *J. Cell Biol.* 137 (1997), 509-519.
- [71] Rodgers,S.D., Camphausen, R.T., Hammer,D.A.: Sialyl LewisX-mediated, PSGL-1-independent rolling adhesion on P-selectin. *Biophys. J.* 79 (2000), 694-706.
- [72] Rodgers,S.D., Camphausen,R.T., Hammer,D.A.: Tyrosine sulfation enhances but is not required for PSGL-1 rolling adhesion on P-selectin. *Biophys. J.* 81 (2001), 2001-2009.
- [73] Asa,D., Raycroft,L., Ma,L., Aeed,P. A., Kaytes,P.S., Elhammer,A.P., Geng,J.: The P-selectin glycoprotein ligand functions as a common human leukocyte ligand for P- and E-selectins. *J. Biol. Chem.* 270 (1995), 11662-11670.
- [74] Moore,K.L.: Structure and function of P-selectin glycoprotein ligand-1. *Leuk. Lymphoma* 29 (1998), 1-15.
- [75] Yang,J., Hirata,T., Croce,K., Merrill-Skoloff,G., Tchernychev,B., Williams,E., Flaumenhaft,R., Furie,B.C., Furie,B.: Targeted gene disruption demonstrates that P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is required for P-selectin-mediated but not E-selectin-mediated neutrophil rolling and migration. *J. Exp. Med.* 190 (1999), 1769-1782.

- [76] Li,F., Wilkins,P.P., Crawley,S., Weinstein,J., Cummings,R.D., McEver,R.P.: Post-translational modifications of recombinant P-selectin glycoprotein ligand-1 required for binding to P- and E-selectin. *J. Biol. Chem.* 271 (1996), 3255-3264.
- [77] McEver,R.P., Cummings,R.D.: Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J. Clin. Invest.* 100 (1997), S97-103.
- [78] Li,F., Erickson,H.P., James,J.A., Moore,K.L., Cummings,R.D., McEver,R.P.: Visualization of P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 as a highly extended molecule and mapping of the protein epitopes for monoclonal antibodies. *J. Biol. Chem.* 271 (1996), 6342-6348.
- [79] Bruehl,R.E., Moore,K.L., Lorant,D.E., Borregaard,N., Zimmerman,G.A., McEver,R.P., Bainton,D.F.: Leukocyte activation induces surface redistribution of P-Selectin Glycoprotein Ligand-1. *J. Leukocyte Biol.* 61 (1997), 489-499.
- [80] DeBruijne-Admiraal,L.G., Modderman,P.W., Von dem Borne,A.E., Sonnenberg,A.: P-selectin mediate Ca²⁺ dependent adhesion of activated platelets to many different types of leukocytes: detection by flow cytometry. *Blood* 80 (1992), 134-142.
- [81] Aigner,S.: Funktionelle Analyse des CD24/P-Selektin-Bindungsweges. Dissertation, FB Biologie, Universität Kaiserslautern, 1997.
- [82] Aigner,S., Sthoeger,Z.M., Fogen,M., Zam,J., Ruppert,M., Zeller,Y., Vestweber,D., Stahel,R., Sammar,M., Altevogt,P.: CD24, a mucin-type glycoprotein, is a ligand for P-selectin on human tumor cells. *Blood* 89 (1997), 3385-3395.
- [83] Aigner,S., Ramos,C.L., Hafezi-Moghadam,A., Lawrence,M.B., Friederichs,J., Altevogt,P., Key,K.: CD24 mediates rolling of breast carcinoma cells on P-selectin. *FASEB J.* 12 (1998), 1241-1251.
- [84] Sanders,W.J., Katsumoto,T.R., Bertozzi,C.R., Rosen,S.D., Kiessling,L.L.: L-Selectin carbohydrate interactions: Relevant modifications of the Lewis X trisaccharide. *Biochemistry* 35 (1996), 14862-14867.
- [85] Mitsuoka,C., Sawada-Kasugai,M., Ando-Furui,K., Izawa,M., Nakamishi,S., Nakamura,H., Ishiba,H., Kiso,M., Kannagi,R.: Identification of the major carbohydrate capping group of the L-Selectin ligand on HEV in human lymph nodes as 6-sulfo Sialyl Lewis X. *J. Biol. Chem.* 273 (1998), 11225-11233.
- [86] Hwang,S.T., Singer,M.S., Giblin,P.A., Yednock,T.A., Bacon,K.B., Simon,S.I., Rosen,S.D.: GlyCAM-1, a physiologic ligand for L-Selectin, activates beta2 integrins on naive peripheral lymphocytes. *J. Exp. Med.* 184 (1996), 1343-1348.
- [87] Baumhueter,S., Singer,M.S., Henzel,W., Hemmerich,S., Renz,M., Rosen,S.D., Lasky,L.A.: Binding of L-selectin to the vascular sialomucin CD34. *Science* 262 (1993), 436-438.
- [88] Puri,K.D., Finger,E.B., Gaudernack,G., Springer,T.A.: Sialomucin CD34 is a major ligand in human tonsils high endothelial venules. *J. Cell Biol.* 131 (1995), 261-270.
- [89] Hiraoka,N., Petryniak,B., Nakayama,J., Tsuboi,S., Suzuki,M., Yeh,J.C., Tanaka,T., Miyasaka,M., Lowe,J.B., Fukuda,M. A novel high endothelial venule-specific sulfotransferase expresses 6-sulfo Sialyl Lewis X, an L-Selectin ligand displayed by CD 34. *Immunity* 11 (1999), 79-89.
- [90] Bargatze,R.F., Jutila,M.A., Butcher,E.C.: Distinct roles of L-Selectin and integrins alpha4beta7 and LFA-1 in lymphocyte homing to Peyer's patch-HEV

- in situ: The multistep model confirmed and refined. *Immunity* 3 (1995), 99-108.
- [91] Jones, W.M., Watts, G.M., Robinson, M.K., Vestweber, D., Jutila, M.A.: Comparison of E-selectin-binding glycoprotein ligands on human lymphocytes, neutrophils, and bovine gamma delta T cells. *J. Immunol.* 159 (1997), 3574-3583.
- [92] Zollner, O., Lenter, M.C., Blanks, J.E., Borges, E., Steegmaier, M., Zerwes, H.G., Vestweber, D.: L-selectin from human, but not from mouse neutrophils binds directly to E-selectin. *J. Cell Biol.* 136 (1997), 707-716.
- [93] Lawrence, M.B., Bainton, D.F., Springer, T.A.: Neutrophil tethering to and rolling on E-selectin are separable by requirement for L-selectin. *Immunity* 1 (1994), 137-145.
- [94] Fuhlbrigge, R.C., Alon, R., Puri, K.D., Lowe, J.B., Springer, T.A.: Sialylated, fucosylated ligands for L-Selectin expressed on leukocytes mediate tethering and rolling in physiologic flow conditions. *J. Cell Biol.* 135 (1996), 837-848.
- [95] Ramos, C.L., Smith, M.J., Snapp, K.R., Kansas, G.S., Stickney, G.W., Ley, K., Lawrence, M.B.: Functional characterization of L-selectin ligands on human neutrophils and leukemia cell lines: evidence for mucinlike ligand activity distinct from P-selectin glycoprotein ligand-1. *Blood* 91 (1998), 1067-1075.
- [96] Harms, G., Kraft, R., Grelle, G., Volz, B., Dervedde, J., Tauber, R.: Identification of nucleolin as a new L-selectin ligand. *Biochem. J.* 360 (2001), 531-538.
- [97] Kanamori, A., Kojima, N., Uchimura, K., Muramatsu, T., Tamatani, T., Berndt, M.C., Kansas, G.S., Kannagi, R.: Distinct sulfation requirements of selectins disclosed using cells that support rolling mediated by all three selectins under shear flow. *J. Biol. Chem.* 277 (2002), 32578-32586.
- [98] Wagers, A.J., Lowe, J.B., Kansas, G.S.: An important role for the α 1,3 fucosyltransferase, FucT-VII, in leukocyte adhesion to E-selectin. *Blood* 88 (1997), 2125-2132.
- [99] Brunk, D.K., Goetz, D.J., Hammer, D.A.: Sialyl Lewisx/E-Selectin-mediated rolling in a cell-free system. *Biophys. J.* 71 (1996), 2902-2907.
- [100] Levintovitz, A., Mühlhoff, J., Isenmann, S., Vestweber, D.: Identification of a glycoprotein ligand for E-Selectin on mouse myeloid cells. *J. Cell Biol.* 121 (1993), 449-459.
- [101] Steegmaier, M., Levintovitz, A., Isenmann, S., Borges, E., Lenter, M., Kocher, H.P., Kleuser, B., Vestweber, D.: The E-Selectin Ligand ESL-1 is a variant of a receptor for fibroblast growth factor. *Nature* 373 (1995), 615-620.
- [102] Lenter, M., Levintovitz, A., Isenmann, S., Vestweber, D.: Monospecific and common glycoprotein ligands for E- and P-Selectin on myeloid cells. *J. Cell Biol.* 125 (1994), 471-481.
- [103] Steegmaier, M., Borges, E., Berger, J., Schwarz, H., Vestweber, D.: The E-Selectin Ligand ESL-1 is located in the Golgi as well as on microvilli on the cell surface. *J. Cell Sci.* 110 (1997), 687-694.
- [104] Mulligan, M.S., Varani, J., Dame, M.K., Lane, C.L., Smith, C.W., Anderson, D.C., Ward, P.A.: Role of endothelial leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) in neutrophil-mediated lung injury in rats. *J. Clin. Invest.* 88 (1991), 1396-1406.
- [105] Dore, M., Korhjus, R.J., Granger, D.N., Entman, M.L., Smith, C.W.: P-Selectin mediates spontaneous leukocyte rolling in vivo. *Blood* 82 (1993), 1308-1316.

- [106] Olofsson,A., Arfors,K.E., Ramezani,L., Wolitzky,B.A., Butcher,E.C., von Adrian,U.H.: E-Selectin mediates leukocyte rolling in interleukin-1-treated rabbit mesentery venules. *Blood* 84 (1994), 2749-2758.
- [107] Bosse,R., Vestweber,D.: Only simultaneous blocking of the L- and P-Selectin completely inhibits neutrophil migration into mouse peritoneum. *Eur. J. Immunol.* 24 (1994), 3019-3024.
- [108] Jung,U., Ley,K.: Mice lacking two or all three selectins demonstrate overlapping and distinct functions for each selectin. *J. Immunol.* 162 (1999), 6755-6762.
- [109] Robinson,S.D., Frenette,P.S., Rayburn,H., Cummiskey,M., Ullman-Cullere,M., Wagner,D.D., Hynes,R.O.: Multiple, targeted deficiencies in selectins reveal a predominant role for P-selectin in leukocyte recruitment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999), 11452-11457.
- [110] Arbones,M.L., Ord,D.C., Ley,K., Ratech,H., Maynard-Curry,C., Otten,G., Capon,D.J., Tedder,D.F.: Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-Selectin-deficient mice. *Immunity* 1 (1994), 247-260.
- [111] Bullard,D.C., Kunkel,E.J., Kubo,H., Hicks,M.J., Lorenzo,I., Doyle,N.A., Doerschuk,C.M., Ley,K., Beaudet,A.L.: Infectious susceptibility and severe deficiency of leukocyte rolling and recruitment in E-selectin and P-selectin double mutant mice. *J. Exp. Med.* 183 (1996), 2329-2336.
- [112] Frenette,P.S., Mayadas,T.N., Rayburn,H., Hynes,R.O., Wagner,D.D.: Susceptibility to infection and altered hematopoiesis in mice deficient in both P- and E-selectins. *Cell* 84 (1996), 563-574.
- [113] Homeister,J.W., Zhang,M., Frenette,P.S., Hynes,R.O., Wagner,D.D., Lowe,J.B., Marks,R.M.: Overlapping functions of E- and P-selectin in neutrophil recruitment during acute inflammation. *Blood* 92 (1998), 2345-2352.
- [114] Mayadas,T.N., Johnson,R.C., Rayburn,H., Hynes,R.O., Wagner,D.D.: Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P-Selectin-deficient mice. *Cell* 74 (1993), 541-554.
- [115] Ley,K., Bullard,D.C., Arbones,M.L., Bosse,R., Vestweber,D., Tedder,T.F., Beaudet,A.L.: Sequential contribution of L- and P-selectin to leukocyte rolling in vivo. *J. Exp. Med.* 181 (1995), 669-675.
- [116] Kunkel,E.J., Ley,K.: Distinct phenotype of E-Selectin-deficient mice: E-Selectin is required for slow leukocyte rolling in vivo. *Circ. Res.* 79 (1996), 1196-1204.
- [117] Milstone,D.S., Fukumura,D., Padgett,R.C., O'Donnell,P.E., Davis,V.M., Benavidez,O.J., Monsky,W.L., Melder,R.J., Jain,R.K., Gimbrone,M.A.: Mice lacking E-Selectin show normal numbers of rolling leukocytes but reduced leukocyte stable arrest on cytokine-activated microvascular endothelium. *Microcirculation* 5 (1998), 153-171.
- [118] Forlow,S.B., White,E.J., Barlow,S.C., Feldman,S.H., Lu,H., Bagby,G.J., Beaudet,A.L., Bullard,D.C., Ley,K.: Severe inflammatory defect and reduced viability in CD18 and E-selectin double-mutant mice. *J. Clin. Invest.* 106 (2000), 1457-1466.
- [119] Bullard,D.C., Beaudet,A.L.: Analysis of selectin deficient mice. In: "The Selectins". D. Vestweber (Ed.). Harwood Academic Press, Amsterdam, 1997, 133-142.

- [120] Waddell,T.K., Fialkow,L., Chan,C.K., Kishimoto,T.K., Downey,G.P.: Potentiation of the oxidative burst of human neutrophils. A signaling role for L-Selectin. *J. Biol. Chem.* 269 (1994), 18485-18491.
- [121] Waddell,T.K., Fialkow,L., Chan,C.K., Kishimoto,T.K., Downey,G.P.: Signaling functions of L-Selectin. Enhancement of tyrosine phosphorylation and activation of MAP kinase. *J. Biol. Chem.* 270 (1995), 15403-15411.
- [122] Crockett-Torabi,E., Sulenbarger,B., Smith,C.W., Fantone,J.C.: Activation of human neutrophils through L-selectin and Mac-1 molecules. *J. Immunol.* 154 (1995), 2291-2302.
- [123] Simon,S.I., Burns,A.R., Taylor,A.D., Gopalan,P.K., Lynam,E.B., Sklar,L.A., Smith,C.W.: L-Selectin (CD 62L) crosslinking signals neutrophil adhesive functions via the Mac-1 (CD 11b/CD18) and beta2-integrins. *J. Immunol.* 155 (1995), 1502-1514.
- [124] Gopalan,P.K., Smith,C.W., Lu,H., Berg,E.L., McIntire,L.V., Simon,S.I.: Neutrophil CD18-dependent arrest on intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in shear flow can be activated through L-selectin. *J. Immunol.* 158 (1997), 367-375.
- [125] Green,C.E., Pearson,D.N., Christensen,N.B., Simon,S.I.: Topographic requirements and dynamics of signaling via L-selectin on neutrophils. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 284 (2003), C705-C717.
- [126] Lorant,D.E., Patel,K.D., McIntyre,T.M., McEver, R.P., Prescott,S.M., Zimmerman,G.A.: Coexpression of GMP-140 and PAF by endothelium stimulated by histamine or thrombin: a juxtacrine system for adhesion and activation of neutrophils. *J. Cell Biol.* 115 (1991), 223-234.
- [127] Weyrich,A.S., Elstad,M.R., McEver,R.P., McIntyre,T.M., Moore,K.L., Morrissey,J.H., Prescott,S.M., Zimmerman,G.A.: Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes. *J. Clin. Invest.* 97 (1996), 1525-1534.
- [128] Hidari,K.I., Weyrich,A.S., Zimmerman,G.A., McEver,R.P.: Engagement of P-selectin glycoprotein ligand-1 enhances tyrosine phosphorylation and activates mitogen-activated protein kinases in human neutrophils. *J.Biol.Chem.* 272 (1997), 28750-28756.
- [129] Rainger,G.E., Buckley,C., Simmons,D.L., Nash,G.B.: Cross-talk between cell adhesion molecules regulates the migration velocity of neutrophils. *Curr. Biol.* 7 (1997), 316-325.
- [130] Mahoney,T.S., Weyrich,A.S., Dixon,D.A., McIntyre,T., Prescott,S.M., Zimmerman,G.A.: Cell adhesion regulates gene expression at translational checkpoints in human myeloid leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001), 10284-10289.
- [131] Yoshida,M., Szente,B.E., Kiely,J.M., Rosenzweig,A., Gimbrone,M.A.Jr.: Phosphorylation of the cytoplasmic domain of E-selectin is regulated during leukocyte-endothelial adhesion. *J. Immunol.* 161 (1998), 933-941.
- [132] Chien,S.: Rheology in the microcirculation in normal and low flow states. *Adv. Shock Res.* 8 (1982), 71-80.
- [133] Atherton,A., Born,G.V.H.: Relationship between the velocity of rolling granulocytes and that of the blood flow in venules. *J. Physiol. London* 233 (1973), 157-165.
- [134] Atherton,A., Born,G.V.H.: Quantitative investigation of the adhesiveness of circulating polymorphonuclear leukocytes to blood vessel wall. *J. Physiol. London* 222 (1972), 447-474.

- [135] Munn,L.L., Melder,R.J., Jain,R.K.: Role of erythrocytes in leucocyte-endothelial interactions: mathematical model and experimental validation. *Biophys. J.* 71 (1996), 466-478.
- [136] Abbitt,K.B., Nash,G.B.: Characteristics of leukocyte adhesion directly observed in flowing whole blood in vitro. *Br. J. Haematol.* 112 (2001), 55-63.
- [137] Bargatze,R.F., Kurk,S., Butcher,E.C., Jutila,M.A.: Neutrophils roll on adherent neutrophils bound to cytokine-induced endothelial cells via L-selectin on the rolling cells. *J. Exp. Med.* 180 (1994), 1785-1792.
- [138] Walcheck,B., Moore,K.L., McEver,R.P., Kishimoto,T.K.: Neutrophil-neutrophil interactions under hydrodynamic shear stress involve L-selectin and PSGL-1. A mechanism that amplifies initial leukocyte accumulation of P-selectin in vitro. *J. Clin. Invest.* 98 (1996), 1081-1087.
- [139] Lim,Y.C., Snapp,K., Kansas,G.S., Camphausen,R., Ding,H., Lusinskas,F.W.: Important contributions of P-selectin glycoprotein ligand-1-mediated secondary capture to human monocyte adhesion to P-selectin, E-selectin, and TNF-alpha-activated endothelium under flow in vitro. *J. Immunol.* 161 (1998), 2501-2508.
- [140] Mitchell,D.J., Li,P., Reinhardt,P.H., Kubes,P.: Importance of L-selectin-dependent leukocyte-leukocyte interactions in human whole blood. *Blood* 95 (2000), 2954-2959.
- [141] Eriksson,E.E., Xie,X., Werr,J., Thoren,P., Lindbom,L.: Importance of primary capture and L-selectin-dependent secondary capture in leukocyte accumulation in inflammation and atherosclerosis in vivo. *J. Exp. Med.* 194 (2001), 205-218.
- [142] Lei,X., Lawrence,M.B., Dong,C.: Influence of cell deformation on leukocyte rolling adhesion in shear flow. *J. Biomech. Eng.* 121 (1999), 636-643.
- [143] Dong,C., Lei,X.: Biomechanics of cell rolling: shear flow, cell-surface adhesion, and cell deformability. *J. Biomech.* 33 (2000), 35-43.
- [144] Finger,E.B., Bruehl,R.E., Bainton,D.F., Springer,T.A.: A differential role for cell shape in neutrophil tethering and rolling on endothelial selectins under flow. *J. Immunol.* 157 (1996), 5085-5096.
- [145] Sheikh,S., Nash,G.B.: Treatment of neutrophils with cytochalasin converts rolling to stationary adhesion on P-Selectin. *J. Cell. Physiol.* 174 (1998), 206-216.
- [146] Shao,Y.J., Ting-Beall,H.P., Hochmuth,R.M.: Static and dynamic lengths of neutrophil microvilli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998), 6797-6802.
- [147] Park,E.Y.H., Smith,M.J., Stropp,E.S., Snapp,K.R., DiVietro,J.A., Walker,W.F., Schmidtke,D.W., Diamond,S.L., Lawrence,M.B.: Comparison of PSGL-1 microbead and neutrophil rolling: Microvillus elongation stabilizes P-selectin bond clusters. *Biophys. J.* 82 (2002), 1835-1847.
- [148] Schmidtke,D.W., Diamond,S.L.: Direct observation of membrane tethers formed during neutrophil attachment to platelets or P-selectin under physiological flow. *J. Cell Biol.* 149 (2000), 719-729.
- [149] Ramachandran,V., Yago,T., Epperson,T.K., Kobzdej,M.M.A., Nollert,M.U., Cummings,R.D., Zhu,C., McEver,R.P.: Dimerization of a selectin and its ligand stabilizes cell rolling and enhances tether strength in shear flow. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001), 10166-10171.
- [150] Zimmerman,G.A.: Two by two: The pairings of P-selectin and P-selectin glycoprotein ligand 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001), 10023-10024.

- [151] Kansas,G.S., Ley,K., Munro,J.M., Tedder,T.F.: Regulation of leukocyte rolling and adhesion to high endothelial venules through the cytoplasmic domain of L-selectin. *J. Exp. Med.* 177 (1993), 833-838.
- [152] Setiadi,H., Sedgewick,G., Erlandsen,S.L., McEver,R.P.: Interactions of the cytoplasmic domain of P-selectin with clathrin-coated pits enhance leukocyte adhesion under flow. *J. Cell Biol.* 142 (1998), 859-871.
- [153] Dwir,O., Kansas,G.S., Alon,R.: Cytoplasmic anchorage of L-selectin controls leukocyte capture and rolling by increasing the mechanical stability of the selectin tether. *J. Cell Biol.* 155 (2001), 145-156.
- [154] Snapp,K.R., Heitzig,C.E., Kansas,G.S.: Attachment of the PSGL-1 cytoplasmic domain to the actin cytoskeleton is essential for leukocyte rolling on P-selectin. *Blood* 99 (2002), 4494-4502.
- [155] Chen,S., Springer,T.A.: An automatic braking system that stabilizes leukocyte rolling by an increase in selectin bond number with shear. *J. Cell Biol.* 144 (1999), 185-200.
- [156] Smith,M.L., Smith,M.J., Lawrence,M.B., Ley,K.: Viscosity-independent velocity of neutrophils rolling on P-selectin in vitro or in vivo. *Microcirculation* 9 (2002), 523-536.
- [157] Lawrence,M.B., Springer,T.A.: Neutrophils roll on E-Selectin. *J. Immunol.* 151 (1993), 6338-6346.
- [158] Puri,K.D., Finger,E.B., Springer,T.A.: The faster kinetics of L-selectin than of E-selectin and P-selectin rolling at comparable binding strength. *J. Immunol.* 158 (1997), 405-413.
- [159] Nicholson,M.W., Barclay,A.N., Singer,M.S., Rosen,S.D., van der Merwe,P.A.: Affinity and kinetics analysis of L-Selectin (CD 62L) binding to Glycosylation dependent Cell Adhesion Molecule-1. *J. Biol. Chem.* 273 (1998), 763-770.
- [160] Mehta,P., Cummings,R.D., McEver,R.P.: Affinity and kinetic Analysis of P-selectin binding to P-selectin glycoprotein ligand-1. *J. Biol. Chem.* 273 (1998), 32506-32513.
- [161] Alon,R., Hammer,D.A., Springer,T.A.: Lifetime of the P-selectin-carbohydrate bond and its response to tensile force in hydrodynamic flow. *Nature* 374 (1995), 539-542.
- [162] Alon,R., Chen,S., Puri,K.D., Finger,E.B., Springer,T.A.: The kinetics of L-selectin tethers and the mechanics of selectin-mediated rolling. *J. Cell Biol.* 138 (1997), 1169-1180.
- [163] Fritz,J., Katopodis,A.G., Kolbinger,F., Anselmetti,D.: Force-mediated kinetics of single P-selectin/ligand complexes observed by atomic force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998), 12283-12288.
- [164] Evans,E., Leung,A., Hammer,D., Simon,S.: Chemically distinct transition states govern rapid dissociation of single L-selectin bonds under force. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001), 3784-3789.
- [165] Walcheck,B., Kahn,J., Fisher,J.M., Wang,B.B., Fisk,R.S., Payan,D.G., Feehan,C., Betageri,R., Darlak,K., Spatola,A.F., Kishimoto,T.K.: Neutrophil rolling altered by inhibition of L-Selectin shedding in vitro. *Nature* 380 (1996), 720-723.
- [166] Allport,J.R., Ding,H.T., Ager,A., Steeber,D.A., Tedder,T.F., Luscinskas,F.W.: L-Selectin shedding does not regulate human neutrophil attachment, rolling, or transmigration across human vascular endothelium in vitro. *J. Immunol.* 158 (1997), 4365-4372.

- [167] Alon,R., Chen,S., Fuhlbrigge,R., Puri,K.D., Springer,T.A.: The kinetics and shear threshold of transient and rolling interactions of L-selectin with its ligand on leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998), 11631-11636.
- [168] Hafezi-Moghadam,A., Ley,K.: Relevance of L-selectin shedding for leukocyte rolling in vivo. *J. Exp. Med.* 189 (1999), 939-948.
- [169] Hafezi-Moghadam,A., Thomas,K.L., Prorock,A.J., Huo,Y., Ley,K.: L-selectin shedding regulates leukocyte recruitment. *J. Exp. Med.* 193 (2001), 863-872.
- [170] Finger,E.B., Puri,K.D., Alon,R., Lawrence,M.B., von Andrian,U.H., Springer,T.A.: Adhesion through L-selectin requires a threshold hydrodynamic shear. *Nature* 379 (1996), 266-269.
- [171] Lawrence,M.B., Kansas,G.S., Kunkel,E.J., Ley,K.: Threshold levels of fluid shear promote leukocyte adhesion through selectins (CD62L,P,E). *J. Cell Biol.* 136 (1997), 717-727.
- [172] Greenberg,A.W., Brunk,D.K., Hammer,D.A.: Cell-free rolling mediated by L-selectin and Sialyl Lewis^x reveals the shear threshold effect. *Biophys. J.* 79 (2000), 2391-2402.
- [173] Civin,C.I., Strauss,L.C., Brovall,C., Fackler,M.J., Schwartz,J.F., Shaper,J.H.: Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J. Immunol.* 133 (1984), 157-165.
- [174] Berenson,R. J.: Transplantation of CD34+ hematopoietic precursors: clinical rationale. *Transplant. Proc.* 24 (1992), 3032-3034.
- [175] DiGiusto,D., Chen,S., Combs,J., Webb,S., Namikawa,R., Tsukamoto,A., Chen,B.P., Galy,A.H.: Human fetal bone marrow early progenitors for T, B, and myeloid cells are found exclusively in the population expressing high levels of CD34. *Blood* 84 (1994), 421-432.
- [176] Terstappen,L.W., Huang,S., Safford,M., Lansdorp,P.M., Loken,M.R.: Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+CD38- progenitor cells. *Blood* 77 (1991), 1218-1227.
- [177] Knapp,W., Strobl,H., Scheinecker,C., Bello-Fernandez,C., Majdic,O.: Molecular characterization of CD34+ human hematopoietic progenitor cells. *Ann. Hematol.* 70 (1995), 281-296.
- [178] Civin,C.I., Almeida-Porada,G., Lee,M.J., Olweus,J., Terstappen,L.W., Zanjani,E.D.: Sustained, retransplantable, multilineage engraftment of highly purified adult human bone marrow stem cells in vivo. *Blood* 88 (1996), 4102-4109.
- [179] Larochelle,A., Vormoor,J., Hanenberg,H., Wang,J.C., Bhatia,M., Lapidot,T., Moritz,T., Murdoch,B., Xiao,X.L., Kato,I., Williams,D.A., Dick,J.E.: Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: implications for gene therapy. *Nat. Med.* 2 (1996), 1329-1337.
- [180] Goodman,J.W., Hodgson,G.S.: Evidence for stem cells in the peripheral blood of mice. *Blood* 19 (1962), 702-709.
- [181] Jacobsen,K., Kravitz,J., Kincade,P.W., Osmond,D.G.: Adhesion receptors on bone marrow stromal cells: in vivo expression of vascular cell adhesion molecule-1 by reticular cells and sinusoidal endothelium in normal and gamma-irradiated mice. *Blood* 87 (1996), 73-82.
- [182] Schweitzer,K.M., Drager,A.M., van der Valk,P., Thijsen,S.F., Zevenbergen,A., Theijssmeijer,A.P., van der Schoot,C.E.,

- Langenhuijsen,M.M.: Constitutive expression of E-selectin and vascular adhesion molecule-1 on endothelial cells of hematopoietic tissues. *Am. J. Pathol.* 148 (1996), 165-175.
- [183] Mazo,I.B., Gutierrez-Ramos,J.C., Frenette,P.S., Hynes,R.O., Wagner,D.D., von Andrian,U.H.: Hematopoietic progenitor cell rolling in bone marrow microvessels: parallel contributions by endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule 1. *J. Exp. Med.* 188 (1998), 465-474.
- [184] Dercksen,M.W., Gerritsen,W.R., Rodenhuis,S., Dirkson,M.K., Slaper-Cortenbach,I.C., Schaasberg,W.P., Pinedo,H.M., von dem Borne,A.E., van der Schoot,C.E.: Expression of adhesion molecules on CD34+ cells: CD34+ L-selectin+ cells predict a rapid platelet recovery after peripheral blood stem cell transplantation. *Blood* 85 (1995), 3313-3319.
- [185] Mohle,R., Murea,S., Kirsch,M., Haas,R.: Differential expression of L-selectin, VLA-4 and LFA-1 on CD34+ progenitor cells from bone marrow and peripheral blood during G-CSF enhanced recovery. *Exp. Hematol.* 23 (1995), 1535-1543.
- [186] Asosingh,K., Renmans,W., Van der Gucht,K., Foulon,W., Schots,R., Van Riet,I., De Waele,M.: Circulating CD34+ cells in cord blood and mobilized blood have a different profile of adhesion molecules than bone marrow CD34+ cells. *Eur. J. Haematol.* 60 (1998), 153-160.
- [187] Zannettino,A.C., Berndt,M.C., Butcher,C., Butcher,E.C., Vadas,M.A., Simmons,P.J.: Primitive human hematopoietic progenitors adhere to P-selectin (CD62P). *Blood* 85 (1995), 3466-3477.
- [188] Tracey,J.B. und Rinder,H.M.: Characterization of the P-selectin ligand on human hematopoietic progenitors. *Exp. Hematol.* 24 (1996), 1494-1500.
- [189] Levesque,J.P., Zannettino,A.C., Pudney,M., Niutta,S., Haylock,D.N., Snapp,K.R., Kansas,G.S., Berndt,M.C., Simmons,P.J.: PSGL-1-mediated adhesion of human hematopoietic progenitors to P-selectin results in suppression of hematopoiesis. *Immunity* 11 (1999), 369-378.
- [190] Spertini,O., Cordey,A.S., Monai,N., Giuffre,L., Schapira,M.: P-selectin glycoprotein ligand 1 is a ligand for L-selectin on neutrophils, monocytes, and CD34+ hematopoietic progenitor cells. *J. Cell Biol.* 135 (1996), 523-531.
- [191] Sackstein,R., Dimitroff,C.J.: A hematopoietic cell L-selectin ligand that is distinct from PSGL-1 and displays N-glycan-dependent binding activity. *Blood* 96 (2000), 2765-2774.
- [192] Schweitzer,K.M.: Characterization of a newly established human bone marrow endothelial cell line: distinct adhesive properties for hematopoietic progenitors compared with human umbilical vein endothelial cells. *Lab. Invest.* 76 (1997), 25-36.
- [193] Peled,A., Grabovsky,V., Habler, L., et al.: The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34(+) cells on vascular endothelium under shear flow. *J. Clin. Invest.* 104 (1999), 1199-1211.
- [194] Greenberg,A.W., Kerr,W.G., Hammer, D.A.: Relationship between selectin-mediated -rolling of hematopoietic stem and progenitor cells and progression in hematopoietic development. *Blood* 95 (2000), 478-486.
- [195] Greenberg,A.W. und Hammer,D.A.: Cell Separation mediated by differential rolling adhesion. *Biotechnol. Bioeng.* 73 (2001), 111-124.
- [196] Frenette,P.S., Subbarao,S., Mazo,I.B., von Andrian,U.H., Wagner,D.D.: Endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule-1 promote

- hematopoietic progenitor homing to bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998), 14423-14428.
- [197] De Boer, F., Kessler, F.L., Netelenbos, T., Zweegman, S., Huijgens, P.C., van der Wall, E., van der Linden, J.A., Pinedo, H.M., Schuurhuis, G.J., Drager, A.M.: Homing and clonogenic outgrowth of CD34 (+) peripheral blood stem cells: a role for L-selectin? *Exp. Hematol.* 30 (2002), 590-597.
- [198] Frenette, P.S. und Weiss, L.: Sulfated glycans induce rapid hematopoietic progenitor cell mobilization: evidence for selectin-dependent and independent mechanisms. *Blood* 96 (2000), 2460-2468.
- [199] Simmons, P.J., Levesque, J.P., Zannettino, A.C.: Adhesion molecules in haemopoiesis. *Baillieres Clin. Haematol.* 10 (1997), 485-505.
- [200] Vora, D.K., Fang, Z.T., Liva, S.M., Tyner, T.R., Parhami, F., Watson, A.D., Drake, T.A., Territo, M.C., Berliner, J.A.: Induction of P-selectin by oxidized lipoproteins. Separate effects on synthesis and surface expression. *Circ. Res.* 80 (1997), 810-818.
- [201] Collins, R.G., Velji, R., Guevara, N.V., Hicks, M.J., Chan, L., Beaudet, A.L.: P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM) -1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J. Exp. Med.* 191 (2000), 189-194.
- [202] Dong, Z.M., Brown, A.A., Wagner, D.D.: Prominent role of P-selectin in the development of advanced atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Circulation* 101 (2000), 2290-2295.
- [203] O'Brien, K.D., McDonald, T.O., Chait, A., Allen, M.D., Alpers, C.E.: Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content. *Circulation* 93 (1996), 672-682.
- [204] Wenzel, K., Stahn, R., Speer, A., Denner, K., Glaser, C., Affeldt, M., Moobed, M., Scheer, A., Baumann, G., Felix, S. B.: Functional characterization of atherosclerosis-associated Ser128Arg and Leu554Phe E-selectin mutations. *Biol. Chem.* 380 (1999), 661-667.
- [205] Blann, A.D., Faragher, E.B., McCollum, C.N.: Increased soluble P-selectin following myocardial infarction: a new marker for the progression of atherosclerosis. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 8 (1997), 383-390.
- [206] Hwang, S.J., Ballantyne, C.M., Sharrett, A.R., Smith, L.C., Davis, C.E., Gotto, A.M.Jr., Boerwinkle, E.: Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Circulation* 96 (1997), 4219-4225.
- [207] Nasuno, A., Matsubara, T., Hori, T., Higuchi, K., Imai, S., Nakagawa, I., Tsuchida, K., Ozaki, K., Mezaki, T., Tanaka, T., Fuse, I., Aizawa, Y.: Levels of soluble E-selectin and ICAM-1 in the coronary circulation of patients with stable coronary artery disease: association with the severity of coronary atherosclerosis. *Jpn. Heart J.* 43 (2002): 93-101.
- [208] Peter, K., Nawroth, P., Conradt, C., Nordt, T., Weiss, T., Boehme, M., Wunsch, A., Allenberg, J., Kubler, W., Bode, C.: Circulating vascular adhesion molecule-1 correlates with the extent of human atherosclerosis in contrast to circulating intercellular adhesion molecule-1, E-selectin, P-selectin, and thrombomodulin. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17 (1997), 505-512.
- [209] Dreyer, W.J., Michael, L.H., West, M.S., Smith, C.W., Rothlein, R., Rossen, R.D., Anderson, D.C., Entman, M.L.: Neutrophil accumulation in ischemic canine

- myocardium. Insights into time course, distribution, and mechanism of localization during early reperfusion. *Circulation* 84 (1991), 400-411.
- [210] Entman,M.L., Michael,L., Rossen,R.D., Dreyer,W.J., Anderson,D.C., Taylor,A.A., Smith,C.W.: Inflammation in the course of early myocardial ischemia. *FASEB J.* 5 (1991), 2529-2537.
- [211] Connolly,E.S.Jr., Winfree,C.J., Prestigiacomo,C.J., Kim,S.C., Choudhri,T.F., Hoh,B.L., Naka,Y., Solomon,R.A., Pinsky,D.J.: Exacerbation of cerebral injury in mice that express the P-selectin gene: identification of P-selectin blockade as a new target for the treatment of stroke. *Circ. Res.* 81 (1997), 304-310.
- [212] Weyrich,A.S., Ma,X.Y., Lefer,D.J., Albertine,K.H., Lefer,A.M.: In vivo neutralization of P-selectin protects feline heart and endothelium in myocardial ischemia and reperfusion injury. *J. Clin. Invest.* 91 (1993), 2620-2629.
- [213] Huang,J., Choudhri,T.F., Winfree,C.J., McTaggart,R.A., Kiss,S., Mocco,J., Kim,L.J., Protopsaltis,T.S., Zhang,Y., Pinsky,D.J., Connolly,E.S.Jr.: Postischemic cerebrovascular E-selectin expression mediates tissue injury in murine stroke. *Stroke* 31 (2000), 3047-3053.
- [214] Takeda,H., Spatz,M., Ruetzler,C., McCarron,R., Becker,K., Hallenbeck,J.: Induction of mucosal tolerance to E-selectin prevents ischemic and hemorrhagic stroke in spontaneously hypertensive genetically stroke-prone rats. *Stroke* 33 (2002), 2156-2164.
- [215] Murohara,T., Margiotta,J., Phillips,L.M., Paulson,J.C., DeFrees,S., Zalipsky,S., Guo,L.S., Lefer,A.M.: Cardioprotection by liposome-conjugated sialyl Lewisx-oligosaccharide in myocardial ischemia and reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* 30 (1995), 965-974.
- [216] Armstead,V.E., Minchenko,A.G., Campbell,B., Lefer,A.M.: P-selectin is up-regulated in vital organs during murine traumatic shock. *FASEB J.* 11 (1997), 1271-1279.
- [217] Akgur,F.M., Zibari,G.B., McDonald,J.C., Granger,D.N., Brown,M.F.: Kinetics of P-selectin expression in regional vascular beds after resuscitation of hemorrhagic shock: a clue to the mechanism of multiple system organ failure. *Shock* 13 (2000), 140-144.
- [218] Sun,X., Rozenfeld,R.A., Qu,X., Huang,W., Gonzalez-Crussi,F., Hsueh,W.: P-selectin-deficient mice are protected from PAF-induced shock, intestinal injury, and lethality. *Am. J. Physiol.* 273 (1997), G56-61.
- [219] Scalia,R., Hayward,R., Armstead,V.E., Minchenko,A.G., Lefer,A.M.: Effect of recombinant soluble P-selectin glycoprotein ligand-1 on leukocyte-endothelium interaction in vivo. Role in rat traumatic shock. *Circ. Res.* 84 (1999), 93-102.
- [220] Winn,R.K., Paulson,J.C., Harlan,J.M.: A monoclonal antibody to P-selectin ameliorates injury associated with hemorrhagic shock in rabbits. *Am. J. Physiol.* 267 (1994), H2391-2397.
- [221] Kushimoto,S., Okajima,K., Uchiba,M., Murakami,K., Okabe,H., Takatsuki,K.: Pulmonary vascular injury induced by hemorrhagic shock is mediated by P-selectin in rats. *Thromb. Res.* 82 (1996), 97-106.
- [222] Rivera-Chavez,F., Toledo-Pereyra,L.H., Nora,D.T., Bachulis,B., Ilgenfritz,F., Dean,R.E.: P-selectin blockade is beneficial after uncontrolled hemorrhagic shock. *J. Trauma* 45 (1998), 440-445.

- [223] Ramamoorthy,C., Sharar,S.R., Harlan,J.M., Tedder,T.F., Winn,R.K.: Blocking L-selectin function attenuates reperfusion injury following hemorrhagic shock in rabbits. *Am. J. Physiol.* 271 (1996), H1871-1877.
- [224] Schlag,G., Redl,H.R., Till,G.O., Davies,J., Martin,U., Dumont,L.: Anti-L-selectin antibody treatment of hemorrhagic-traumatic shock in baboons. *Crit. Care Med.* 27 (1999), 1900-1907.
- [225] Rivera-Chavez,F.A., Toledo-Pereyra,L.H., Martinez-Mier,G., Nora,D.T., Harkema,J., Bachulis,B.L., Dean,R.E.: L-selectin blockade and liver function in rats after uncontrolled hemorrhagic shock. *J. Invest. Surg.* 14 (2001), 7-12.
- [226] Ramos-Kelly,J.R., Toledo-Pereyra,L.H., Jordan,J., Rivera-Chavez,F., Rohs,T., Holevar,M., Dixon,R.A., Yun,E., Ward,P.A.: Multiple selectin blockade with a small molecule inhibitor downregulates liver chemokine expression and neutrophil infiltration after hemorrhagic shock. *J. Trauma* 49 (2000), 92-100.
- [227] Ikeda,H., Ueyama,T., Murohara,T., Yasukawa,H., Haramaki,N., Eguchi,H., Katoh,A., Takajo,Y., Onitsuka,I., Ueno,T., Tojo,S.J., Imaizumi,T.: Adhesive interaction between P-selectin and sialyl Lewis(x) plays an important role in recurrent coronary arterial thrombosis in dogs. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19 (1999), 1083-1090.
- [228] Eppihimer,M.J., Schaub,R.G.: P-Selectin-dependent inhibition of thrombosis during venous stasis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20 (2000), 2483-2488.
- [229] Myers,D.D.Jr., Schaub,R., Wroblewski,S.K., Londy,F.J.3rd, Fex,B.A., Chapman,A.M., Greenfield,L.J., Wakefield,T.W.: P-selectin antagonism causes dose-dependent venous thrombosis inhibition. *Thromb. Haemost.* 85 (2001), 423-429.
- [230] Wakefield,T.W., Strieter,R.M., Downing,L.J., Kadell,A.M., Wilke,C.A., Burdick,M.D., Wroblewski,S.K., Phillips,M.L., Paulson,J.C., Anderson,D.C., Greenfield,L.J.: P-selectin and TNF inhibition reduce venous thrombosis inflammation. *J. Surg. Res.* 64 (1996), 26-31.
- [231] Downing,L.J., Wakefield,T.W., Strieter,R.M., Prince,M.R., Londy,F.J., Fowlkes,J.B., Hulin,M.S., Kadell,A.M., Wilke,C.A., Brown,S.L., Wroblewski,S.K., Burdick,M.D., Anderson,D.C., Greenfield,L.J.: Anti-P-selectin antibody decreases inflammation and thrombus formation in venous thrombosis. *J. Vasc. Surg.* 25 (1997), 816-827.
- [232] Blann,A.D., Noteboom,W.M., Rosendaal,F.R.: Increased soluble P-selectin levels following deep venous thrombosis: cause or effect? *Br. J. Haematol.* 108 (2000), 191-193.
- [233] Yang,L.C., Wang,C.J., Lee,T.H., Lin,F.C., Yang,B.Y., Lin,C.R., Lee,T.C.: Early diagnosis of deep vein thrombosis in female patients who undergo total knee arthroplasty with measurement of P-selectin activation. *J. Vasc. Surg.* 35 (2002), 707-712.
- [234] Morigi,M., Angioletti,S., Imberti,B., Donadelli,R., Micheletti,G., Figliuzzi,M., Remuzzi,A., Zoja,C., Remuzzi,G.: Leukocyte-endothelial interaction is augmented by high glucose concentrations and hyperglycemia in a NF- κ B-dependent fashion. *J. Clin. Invest.* 101 (1998), 1905-1915.
- [235] Narumi,S., Onozato,M.L., Tojo,A., Sakamoto,S., Tamatani,T.: Tissue-specific induction of E-selectin in glomeruli is augmented following diabetes mellitus. *Nephron* 89 (2001), 161-171.
- [236] Matsumoto,K., Sera,Y., Abe,Y., Tominaga,T., Horikami,K., Hirao,K., Ueki,Y., Miyake,S.: High serum concentrations of soluble E-selectin correlate

- with obesity but not fat distribution in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 51 (2002), 932-934.
- [237] Ryysy,L., Yki-Jarvinen,H.: Improvement of glycemic control by 1 year of insulin therapy leads to a sustained decrease in sE-selectin concentrations in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 24 (2001), 549-554.
- [238] Yngen,M., Ostenson,C.G., Li,N., Hjemdahl,P., Wallen,N.H.: Acute hyperglycemia increases soluble P-selectin in male patients with mild diabetes mellitus. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 12 (2001), 109-116.
- [239] Kopp,H.P., Hopmeier,P., Schernthaner,G.: Concentrations of circulating P-selectin are increased in patients with newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 106 (1998), 41-44.
- [240] Jilma,B., Fasching,P., Ruthner,C., Rumplmayr,A., Ruzicka,S., Kapiotis,S., Wagner,O.F., Eichler,H.G.: Elevated circulating P-selectin in insulin dependent diabetes mellitus. *Thromb. Haemost.* 76 (1996), 328-332.
- [241] Jude,E.B., Douglas,J.T., Anderson,S.G., Young,M.J., Boulton,A.J.: Circulating cellular adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, P- and E-selectin in the prediction of cardiovascular disease in diabetes mellitus. *Eur. J. Intern. Med.* 13 (2000), 185-189.
- [242] Kado,S., Nagata,N.: Circulating intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and E-selectin in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 46 (1999), 143-148.
- [243] Kretowski,A., Gillespie,K.M., Bingley,P.J., Kinalska,I.: Soluble L-selectin levels in type I diabetes mellitus: a surrogate marker for disease activity? *Immunology* 99 (2000), 320-325.
- [244] Matsumoto,K., Nakamura,H., Ueki,Y., Tominaga,T., Miyake,S.: Correction of hyperglycaemia reduces insulin resistance and serum soluble E-selectin levels in patients with Type 2 diabetes mellitus. *Diabet. Med.* 18 (2001), 224-228.
- [245] Klareskog,L., Ronnelid,J., Holm,G.: Immunopathogenesis and immunotherapy in rheumatoid arthritis: an area in transition. *J. Intern. Med.* 238 (1995), 191-206.
- [246] Wikaningrum,R., Highton,J., Parker,A., Coleman,M., Hessian,P.A., Roberts-Thomson,P.J., Ahern,M.J., Smith,M.D.: Pathogenic mechanisms in the rheumatoid nodule – Comparison of Proinflammatory Cytokine Production and Cell Adhesion Molecule Expression in Rheumatoid Nodules and Synovial Membranes from the Same Patient. *Arthritis Rheum.* 41 (1998), 1783-1797.
- [247] Jamar,F., Chapman,P.T., Harrison,A.A., Binns,R.M., Haskard,D.O., Peters,A.M.: Inflammatory arthritis: imaging of endothelial cell activation with an indium-111-labeled F(ab')₂ fragment of anti-E-selectin monoclonal antibody. *Radiology* 194 (1995), 843-850.
- [248] Heimbürger,M., Lerner,R., Palmblad,J.: Effects of Antirheumatic Drugs on Adhesiveness of Endothelial Cells and Neutrophils. *Biochem. Pharmacol.* 56 (1998), 1661-1669.
- [249] Nguyen,M., Strubel,N.A., Bischoff,J.: A role for sialyl Lewis X/A glycoconjugates in capillary morphogenesis. *Nature* 365 (1993), 267-269.
- [250] Kraling,B.M., Razon,M.J., Boon,L.M., Darveau,R.P., Boon,L.M.: E-selectin is present in proliferating endothelial cells in human hemangiomas. *Am. J. Path.* 148 (1996), 1181-1191.
- [251] Bischoff,J., Brasel,C., Kraling,B., Vranovska,K.: E-selectin is upregulated in proliferating endothelial cells in vitro. *Microcirculation* 4 (1997), 279-287.

- [252] Luo, J., Lin, J., Paranya, G., Bischoff, J., Angiostatin upregulates E-selectin in proliferating endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245 (1998): 906-911.
- [253] Budson, A.E., Ko, L., Brasel, C., Bischoff, J.: The angiogenesis inhibitor AGM-1470 selectively increases E-selectin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 225 (1996), 141-145.
- [254] Aoki, M., Kanamori, M., Yudoh, K., Ohmori, K., Yasuda, T., Kimura, T.: Effects of vascular endothelial growth factor and E-selectin on angiogenesis in the murine metastatic RCT sarcoma. *Tumor Biol.* 22 (2001), 239-246.
- [255] Yasuda, M., Shimizu, S., Tokuyama, S., Watanabe, T., Kiuchi, Y., Yamamoto, T.: A novel effect of polymorphonuclear leukocytes in the facilitation of angiogenesis. *Life Sci.* 66 (2000), 2113-2121.
- [256] Yasuda, M., Shimizu, S., Ohhina, K., Naito, S., Tokuyama, S., Mori, Y., Kiuchi, Y., Yamamoto, T.: Differential roles of ICAM-1 and E-selectin in polymorphonuclear leukocyte-induced angiogenesis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 282 (2002), C917-925.
- [257] Hebbar, M., Revillion, F., Louchez, M.M., Vilain, M.O., Fournier, C.: The relationship between concentrations of circulating soluble E-selectin and clinical, pathological and biological features in patients with breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 4 (1998), 373-380.
- [258] Wittig, B.M., Kaulen, H., Thees, R., Schmitt, C., Knolle, P., Stock, J., Meyer zum Buschenfelde, K.H., Dippold, W.: Elevated serum E-selectin in patients with liver metastases of colorectal cancer. *Eur. J. Cancer* 32A (1996), 1215-1218.
- [259] Koch, A.E., Halloran, M.M., Haskell, C.J., Shah, M.R., Polverini, P.J.: Angiogenesis mediated by soluble forms of E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1. *Nature* 376 (1995), 517-519.
- [260] Hebbar, M. und Peyrat, J.P.: Significance of soluble endothelial molecule E-selectin in patients with breast cancer. *Int. J. Biol. Markers* 15 (2000), 15-21.
- [261] Morbidelli, L., Brogelli, L., Granger, H.J., Ziche, M.: Endothelial cell migration is induced by soluble P-selectin. *Life Sci.* 62 (1998), PL7-11.
- [262] Nguyen, M., Eilber, F.R., Defrees, S.: Novel synthetic analogs of sialyl Lewis X can inhibit angiogenesis in vitro and in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 228 (1996), 716-723.
- [263] Gerritsen, M.E., Shen, C.P., Atkinson, W.J., Padgett, R.C., Gimbrone, M.A. Jr., Milstone, D.S.: Microvascular endothelial cells from E-selectin-deficient mice form tubes in vitro. *Lab. Invest.* 75 (1996), 175-184.
- [264] Hartwell, D.W., Butterfield, C.E., Frenette, P.S., Kenyon, B.M., Hynes, R.O., Folkman, J., Wagner, D.D.: Angiogenesis in P- and E-selectin-deficient mice. *Microcirculation* 5 (1998), 173-178.
- [265] Krause, T. und Turner, G.A.: Are Selectins involved in metastasis?. *Clin. Exp. Met.* 17 (1999), 183-192.
- [266] Ørntoft, T.F. und Vestergaard, E.M.: Clinical aspects of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. *Electrophoresis* 20 (1999), 362-371.
- [267] Weiss, L.: Biomechanical interactions of cancer cells with the microvasculature during hematogenous metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 11(1992), 227-235.
- [268] Koop, S., Schmidt, E.E., MacDonald, I.C., Morris, V.L., Khokha, R., Grattan, M., Leone, J., Chambers, A.F., Groom, A.C.: Independence of metastatic ability and extravasation: Metastatic ras-transformed and control fibroblasts extravasate equally well. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996), 11080-11084.

- [269] Morris,V.L., Schmidt,E.E., MacDonald,I.C., Groom,A.C., Chambers,A.F.: Sequential steps in hematogenous metastasis of cancer cells studied by in vivo videomicroscopy. *Invasion Metastasis* 17 (1997), 281-296.
- [270] Smith,C.W., Anderson,D.C.: PMN adhesion and extravasation as a paradigm for tumor cell dissemination. *Cancer Metastasis Rev.* 10 (1991), 61-78.
- [271] Tözeren,A., Kleinman,H.K., Grant,D.S., Morales,D., Mercurio,A.M., Byers,S.W.: E-selectin-mediated dynamic interactions of breast- and colon-cancer cells with endothelial-cell monolayers. *Int. J. Cancer* 69 (1995), 426-431.
- [272] Fukushima,K., Hirota,M., Terasaki,P.I., Wakisaka,A., Togashi,H., Chia,D., Suyama,N., Fukushi,Y., Nudelman,E., Hakomori,S.: Characterization of sialosylated Lewisx as a new tumor-associated antigen. *Cancer Res.* 44 (1984), 5279-5285.
- [273] Walz,G., Aruffo,A., Kolanus,W.: Recognition by ELAM-1 of the sialyl-Lex determinant on myeloid and tumor cells. *Science* 250 (1990), 1132-1135.
- [274] Majuri,M.L., Mattila,P., Renkonen,R.: Recombinant E-selectin-protein mediates tumor cell adhesion via sialyl-Lea and sialyl-Lex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182 (1992), 1376-1382.
- [275] Takada,A., Ohmori,K., Yoneda,T., Tsuyuoka,K., Hasegawa,A., Kiso,M., Kannagi,R.: Contribution of carbohydrate antigens sialyl Lewis A and sialyl Lewis X to adhesion of human cancer cells to vascular endothelium. *Cancer Res.* 53 (1993), 354-61.
- [276] Renkonen,J., Paavonen,T., Renkonen,R.: Endothelial and epithelial expression of sialyl Lewis (x) and sialyl Lewis (a) in lesions of breast carcinoma. *Int. J. Cancer.* 74 (1997), 296-300.
- [277] Hoff,S.D., Matsushita,Y., Ota,D.M., Cleary,K.R., Yamori,T., Hakomori,S., Irimura,T.: Increased expression of sialyl-dimeric LeX antigen in liver metastases of human colorectal carcinoma. *Cancer Res.* 49 (1989), 6883-6888.
- [278] Lauri,D., Needham,L., Martin-Padura,I., Dejana,E.: Tumor Cell Adhesion to Endothelial Cells: Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule-1 as an Inducible Adhesive Receptor Specific for Colon Carcinoma Cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 83 (1991), 1321-1324.
- [279] Sawada,R., Tsuboi,S., Fukuda,M.: Differential E-selectin-dependent Adhesion Efficiency in Sublines of Human Colon Cancer Exhibiting Distinct Metastatic Potentials. *J. Biol. Chem.* 269 (1994), 1425-1431.
- [280] Sato,M., Narita,T., Kimura,N., Zenita,K., Hashimoto,T.: The association of sialyl Lewis a antigen with the metastatic potential of human colon cancer cells. *Anticancer Res.* 17 (1997), 3505-12.
- [281] Nakamori,S., Kameyama,M., Imaoka,S., Furukawa,H., Ishikawa,O., Sasaki,Y., Izumi,Y., Irimura,T.: Involvement of carbohydrate antigen sialyl Lewis(x) in colorectal cancer metastasis. *Dis. Colon Rectum* 40 (1997), 420-431.
- [282] Laferriere,J., Houle,F., Taher,M.M., Valerie,K., Huot,J.: Transendothelial migration of colon carcinoma cells requires expression of E-selectin by endothelial cells and activation of stress-activated protein kinase-2 (SAPK2/p38) in the tumor cells. *J. Biol. Chem.* 276 (2001), 33762-72.
- [283] Flugy,A.M., D'Àmato,M., Russo,D., Di Bella,M.A., Alaimo,G., Kohn,E.C., De Leo,G., Alessandro,R.: E-selectin modulates the malignant properties of T84 colon carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293 (2002), 1099-1106.

- [284] Kawakami-Kimura,N., Narita,T., Ohmori,K., Yoneda,T., Matsumoto,K., Nakamura,T., Kannagi,R.: Involvement of hepatocyte growth factor in increased integrin expression on HepG2 cells triggered by adhesion to endothelial cells. *Br. J. Cancer* 75 (1997), 47-53.
- [285] Narita,T., Kawasaki-Kimura,N., Matsuura,N., Funahashi,H., Kannagi,R.: Adhesion of Human Breast Cancer Cells to Vascular Endothelium Mediated by Sialyl Lewis^x/E-selectin. *Breast Cancer* 3 (1996), 19-23.
- [286] Skorstengaard,K., Vestergaard,E.M., Langkilde,N.C., Christensen,L.L., Wolf,H., Ørntoft,T.F.: Lewis antigen mediated adhesion of freshly removed human bladder tumors to E-selectin. *J. Urol.* 161 (1999), 1316-1323.
- [287] Numahata,K., Satoh,M., Handa,K., Saito,S., Ohyama,C., Ito,A., Takahashi, T., Hoshi,S., Orikasa,S., Hakomori,S.I.: Sialosyl-Le(x) expression defines invasive and metastatic properties of bladder carcinoma. *Cancer* 94 (2002), 673-685.
- [288] Goetz,D.J., Brandley,B.K., Hammer,D.A.: An E-selectin-IgG Chimera Supports Sialylated Moiety Dependent Adhesion of Colon Carcinoma Cells Under Fluid Flow. *Ann. Biomed. Eng.* 24 (1996), 87-98.
- [289] Giavazzi,R., Foppolo,M., Dossi,R., Remuzzi,A.: Rolling and Adhesion of Human Tumor Cells on Vascular Endothelium under Physiological Flow Conditions. *J. Clin. Invest.* 92 (1993), 3038-3044.
- [290] Kitayama,J., Tsuno,N., Sunami,E., Osada,T., Muto,T., Nagawa,H.: E-selectin can mediate the arrest type of adhesion of colon cancer cells under physiological shear flow. *Eur. J. Cancer* 36 (2000), 121-127.
- [291] Moss,M.A., Zimmer,S., Anderson,K.W.: Role of metastatic potential in the adhesion of human breast cancer cells to endothelial monolayers. *Anticancer Res.* 20 (2000), 1425-1433.
- [292] Mannori,G., Santoro,D., Carter,L., Corless,C., Nelson,R.M., Bevilacqua,M.P.: Inhibition of colon carcinoma cell lung colony formation by a soluble form of E-selectin. *Am. J. Pathol.* 151 (1997), 233-243.
- [293] Biancone,L., Araki,M., Araki,K., Vassalli,P., Stamenkovic,I.: Redirection of tumor metastasis by expression of E-selektin in vivo. *J. Exp. Med.* 183 (1996), 581-587.
- [294] Ohyama,C., Tsuboi,S., Fukuda,M.: Dual roles of sialyl Lewis X oligosaccharides in tumor metastasis and rejection by natural killer cells. *The EMBO Journal* 18 (1999), 1516-1525.
- [295] Khatib,A.M., Kontogiannea,M., Fallavollita,L., Jamison,B., Meterissian,S., Brodt,P.: Rapid induction of cytokine and E-selectin expression in the liver in response to metastatic tumor cells. *Cancer Res.* 59 (1999), 1356-1361.
- [296] Weston,B.W., Hiller,K.M., Mayben,J.P., Manousos,G.A., Bendt,K.M., Liu,R., Cusack,J.C.Jr.: Expression of Human $\alpha(1,3)$ Fucosyltransferase Antisense Sequences Inhibits Selectin-mediated Adhesion and Liver Metastasis of Colon Carcinoma Cells. *Cancer Res.* 59 (1999), 2127-2135.
- [297] Uotani,H., Yamashita,I., Nagata,T., Kishimoto,H., Kashii,Y., Tsukuda,K.: Induction of E-selectin after partial hepatectomy promotes metastases to liver in mice. *J. Surg. Res.* 96 (2001), 197-203.
- [298] Fox,S.B., Turner,G.D., Gatter,K.C., Harris,A.L.: The increased of adhesion molecules ICAM-3, E- and P-selectins on breast cancer endothelium. *J. Pathol.* 177 (1995), 369-376.
- [299] Nguyen,M., Corless,C.L., Kraling,B.M., Tran,C., Atha,T., Bischoff,J., Barsky,S.H.: Vascular expression of E-selectin is increased in estrogen-

- receptor-negative breast cancer: a role for tumor-cell-secreted interleukin-1 alpha. *Am. J. Pathol.* 150 (1997), 1307-1314.
- [300] Kannagi,R.: Carbohydrate-mediated cell adhesion involved in hematogenous metastasis of cancer. *Glycoconj. J.* 14 (1997), 577-584.
- [301] Nakamori,S., Furukawa,H., Hiratsuka,M., Iwanaga,T., Imaoka,S., Ishikawa,O., Kabuto,T., Sasaki,Y., Kameyama,M., Ishiguro,S., Irimura,T.: Expression of carbohydrate antigen sialyl Le(a): a new functional prognostic factor in gastric cancer. *J. Clin. Oncol.* 15 (1997), 816-825.
- [302] Amado,M., Carneiro,F., Seixas,M., Clausen,H., Sobrinho-Simoes,M.: Dimeric sialyl-Le(x) expression in gastric carcinoma correlates with venous invasion and poor outcome. *Gastroenterology* 114 (1998), 462-470.
- [303] Mayer,B., Spatz,H., Funke,I., Johnson,J.P., Schildberg,F.W.: De novo expression of the cell adhesion molecule E-selectin on gastric cancer endothelium. *Langenbeck's Arch. Surg.* 383 (1998), 81-86.
- [304] Makino,T., Shimada,Y., Maeda,M., Komoto,I., Imamura,M.: Carbohydrate antigens as a risk factor for hematogenous recurrence of esophageal squamous cell carcinoma patients. *Oncol. Rep.* 8 (2001), 981-985.
- [305] Nakagoe,T., Fukushima,K., Tanaka,K., Sawai,T., Tsuji,T., Jibiki,M., Nanashima,A., Yamaguchi,H., Yasutake,T., Ayabe,H., Arisawa,K.: Evaluation of sialyl Lewis(a), sialyl Lewis(x), and sialyl Tn antigens expression levels as predictors of recurrence after curative surgery in node-negative colorectal cancer patients. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 21 (2002), 107-113.
- [306] Takahashi,Y., Mai,M., Watanabe,M., Tokiwa,M., Nishioka,K.: Relationship between serum ELAM-1 and metastasis among patients with colon cancer. *Dis. Colon Rectum* 41 (1998), 770-774.
- [307] Kitagawa,T., Matsumoto,K., Iriyama,K.: Serum Cell Adhesion Molecules in Patients with Colorectal Cancer. *Surg. Today Jpn. J. Surg.* 28 (1998), 262-267.
- [308] Alexiou,D., Karayiannakis,A.J., Syrigos,K.N., Zbar,A., Bramis,I., Tsigris,C.: Serum levels of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 in colorectal cancer patients: correlations with clinicopathological features, patient survival and tumour surgery. *Eur. J. Cancer* 37 (2001), 2392-2397.
- [309] Ito,K., Ye,C.L., Hibi,K., Mitsuoka,C., Kannagi,R., Hidemura,K., Ando,H., Kasai,Y., Akiyama,S., Nakao,A.: Paired tumor marker of soluble E-selectin and its ligand sialyl Lewis A in colorectal cancer. *J. Gastroenterol.* 36 (2001), 823-829.
- [310] Roselli,M., Mineo,T.C., Martini,F., Mariotti,F., Mariotti,S., Ambrogi,V., Spila,A., D'Alessandro,R., Basili,S., Guadagni,F., Ferroni,P.: Soluble selectin levels in patients with lung cancer. *Int. J. Biol. Markers* 17 (2002), 56-62.
- [311] Alexandroff,A.B., Jackson,A.M., Esuvaranathan,K., Prescott,S., James,K.: Autocrine regulation of ICAM-1 expression on bladder cancer cell lines: evidence for the role of IL-1alpha. *Immunol. Lett.* 40 (1994), 117-124.
- [312] Hayashi,O., Akashi,M., Fujime,M., Hanazawa,K., Kitagawa,R.: Detection of interleukin-1 activity in human bladder cancer cell lines. *J. Urol.* 151 (1994), 750-753.
- [313] Hakomori,S.: Novel endothelial cell activation factors released from activated platelets which induce E-Selectin expression and tumor cell adhesion to endothelial cells: a preliminary note. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 203 (1994), 1605-1613.
- [314] Lafrenie,R.M., Buchanan,M.R., Orr,F.W.: Adhesion molecules and their role in cancer metastasis. *Cell Biophys.* 23 (1993), 3-89.

- [315] Van den Brenk,H.A.S., Stone,M., Kelly,H., Orton,C., Sharpington,C.: Promotion of growth of tumour cells in acutely inflamed tissues. *Br. J. Cancer* 30 (1974), 246-260.
- [316] Morris,V.L., MacDonald,I.C., Koop,S., Schmidt,E.E., Chambers,A.F., Groom,A.C.: Early interactions of cancer cells with the microvasculature in mouse liver and muscle during hematogeneous metastasis: videomicroscopic analysis. *Clin. Exp. Metastasis* 11 (1993), 377-390.
- [317] Thorlacius,H., Prieto,J., Raud,J., Gautam,N., Patarroyo,M.: Tumor cell arrest in the microcirculation: lack of evidence for a leukocyte-like rolling adhesive interaction with vascular endothelium in vivo. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 83 (1997), 68-76.
- [318] Ding,L., Sunamura,M., Kodama,T., Yamauchi,J., Duda,D.G., Shimamura,H., Shibuya,K., Takeda,K., Matsuno,S.: In vivo evaluation of the early events associated with liver metastasis of circulating cancer cells. *Br. J. Cancer* 85 (2001), 431-438.
- [319] Pottratz,S.T., Hall,T.D., Scribner,W.M., Jayaram,H.N., Natarajan,V.: P-selectin-mediated attachment of small cell lung carcinoma to endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 15 (1996): L918-23.
- [320] Goetz,D.J., Ding,H., Atkinson,W.J., Vachino,G., Camphausen,R.T., Cumming,D.A., Luscinskas,F.W.: A human colon carcinoma cell line exhibits adhesive interactions with P-selectin under fluid flow via a PSGL-1-independent mechanism. *Am. J. Pathol.* 149 (1996), 1661-73.
- [321] Ma,Y.Q. und Geng,J.G.: Heparan Sulfate-Like Proteoglycans Mediate Adhesion of Human Malignant Melanoma A375 Cells to P-Selectin Under Flow. *J. Immunol.* 165 (2000), 558-565.
- [322] Kaytes,P.S., Geng,J.G.: P-selectin mediates adhesion of the human melanoma cell line NKI4: Identification of glycoprotein ligands. *Biochemistry* 37 (1998), 10514-10521.
- [323] Li,L., Short,H.J., Qian,K.X., Elhammer,A.P., Geng,J.G.: Characterization of glycoprotein ligands for P-selectin on a human small cell lung cancer cell line NCI-H345. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288 (2001), 637-644.
- [324] Aruffo,A., Dietsch,M.T., Wan,H., Hellström,K.E., Hellström,I.: Granule membrane protein 140 (GMP140) binds to carcinomas and carcinoma-derived cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89 (1992), 2292-2296.
- [325] Kim,Y.J., Borsig,L., Varki,N.M., Varki,A.: P-selectin deficiency attenuates tumor growth and metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998), 9325-9330.
- [326] Friederichs,J., Zeller,Y., Hafezi-Moghadam,A., Gröne,H.J., Ley,K., Altevogt,P.: The CD24/P-selectin Binding Pathway Initiates Lung Arrest of Human A125 Adenocarcinoma Cells. *Cancer Res.* 60 (2000), 6714-6722.
- [327] Ardizzoia,A., Lissoni,P., Brivio,F., Tisi,E., Perego,M.S., Grassi,M.G., Pittalis,S., Crispino,S., Barni,S., Tancini,G.: Tumor necrosis factor in solid tumors: increased blood levels in the metastatic disease. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* 6 (1992), 103-107.
- [328] Aviram,R. Raz,N., Kukulansky,T., Hollander,N.: Expression of L-selectin and efficient binding to high endothelial venules do not modulate the dissemination potential of murine B-cell lymphoma. *Cancer Immunol. Immunother.* 50 (2001), 61-68.

- [329] Quian,F., Hanahan,D., Weissman,I.L.: L-selectin can facilitate metastasis to lymph nodes in a transgenic mouse model of carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001), 3976-3981.
- [330] Spertini,O., Callegari,P., Cordey,A.S., Hauert,J., Joggi,J., von Fliedner,V., Schapira,M.: High levels of the shed form of L-selectin are present in patients with acute leukemia and inhibit blast cell adhesion to activated endothelium. *Blood* 84 (1994), 1249-1259.
- [331] Gasic,G.J., Gasic,T.B., Stewart,C.C.: Antimetastatic effects associated with platelet reduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash.)*. 61 (1968), 46-52.
- [332] Karpatkin,S., Pearlstein,E., Ambrogio,C., Collier,B.S.: Role of adhesive proteins in platelet tumor interaction in vitro and metastasis formation in vivo. *J. Clin. Invest.* 81 (1988), 1012-1019.
- [333] Crissman,J.D., Hatfield,J.S., Menter,D.G., Sloane,B. Honn,K.V.: Morphological study of the interaction of intravascular tumor cells with endothelial cells and subendothelial matrix. *Cancer Res.* 48 (1988), 4065-4072.
- [334] Mannucci,P.M., Cattaneo,M., Canciani,M.T., Maniezzo,M., Vaglini,M., Cascinelli,N.: Early presence of activated (“exhausted“) platelets in malignant tumors (breast adenocarcinoma and malignant melanoma). *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 25 (1989), 1413-1417.
- [335] Gasic,G J.: Role of plasma platelets, and endothelial cells in tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 3 (1984), 99-114.
- [336] Grignani,G., Pacchiarini,L., Pagliarino,M.: The possible role of blood platelets in tumour growth and dissemination. *Haematologica* 71 (1986), 245-255.
- [337] Honn,K.V., Tang,D.G., Crissman,J.D.: Platelets and cancer metastasis: a causal relationship? *Cancer Metastasis Rev.* 11 (1992), 325-351.
- [338] Stone,J.P. und Wagner,D.D.: P-Selectin Mediates Adhesion of Platelets to Neuroblastoma and Small Cell Lung Cancer. *J. Clin. Invest.* 92 (1993), 804-813.
- [339] Dardik,R., Savion,N., Kaufmann,Y., Varon,D.: Thrombin promotes platelet-mediated melanoma cell adhesion to endothelial cells under flow conditions: role of platelet glycoproteins P-selectin and GPIIb-IIIa. *Br. J. Cancer* 77 (1998), 2069-2075.
- [340] McCarthy,O.J.T., Shaker,A.M., Bray,P.F., Konstantopoulos,K.: Immobilized platelets support human colon carcinoma cell tethering, rolling, and firm adhesion under dynamic flow conditions. *Blood* 96 (2000), 1789-1797.
- [341] Borsig,L., Wong,R., Feramisco,J., Nadeau,D.R., Varki,N.M., Varki,A.: Heparin and cancer revisited: Mechanistic connections involving platelets, P-selectin, carcinoma mucins, and tumor metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001), 3352-3357.
- [342] Tohgo,A., Tanaka,N.G., Ogawa,H.: Platelet-aggregating activities of metastasizing tumor cells. IV. Effects of cell surface modification on thrombin generation, platelet aggregation and subsequent lung colonization. *Invasion Metastasis* 6 (1986), 58-68.
- [343] Tanaka,N.G., Tohgo,A., Ogawa,H.: Platelet-aggregating activities of metastasizing tumor cells. V. In situ roles of platelets in hematogenous metastases. *Invasion Metastasis* 6 (1986), 209-224.
- [344] Nieswandt,B., Hafner,M., Echtenacher,B., Mannel,D.N.: Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets. *Cancer Res.* 59 (1999), 1295-1300.

- [345] Dardik,R., Kaufmann,Y., Savion,N., Rosenberg,N., Shenkman,B., Varon,D.: Platelets mediate tumor cell adhesion to the subendothelium under flow conditions: involvement of platelet GPIIb-IIIa and tumor cell α_v integrins. *Int. J. Cancer* 70 (1997), 201-207.
- [346] Yu,Y., Zhou,X.D., Liu,Y.K., Ren,N., Chen,J., Zhao,Y.: Platelets promote the adhesion of human hepatoma cells with a highly metastatic potential to extracellular matrix protein: involvement of platelet P-selectin and GP IIb-IIIa. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 128 (2002), 283-287.
- [347] Kim,Y.J., Borsig,L., Han,H.L., Varki,N.M., Varki,A.: Distinct Selectin Ligands on Colon Carcinoma Mucins Can Mediate Pathological Interactions among Platelets, Leukocytes, and Endothelium. *Am. J. Pathol.* 155 (1999), 461-472.
- [348] Mannori,G. Crottet,P., Cecconi,O., Hanasaki,K. Aruffo,A., Nelson,R.M., Varki,A., Bevilacqua,M.P.: Differential colon cancer cell adhesion to E-, P-, and L-selectin: role of mucin-type glycoproteins. *Cancer Res.* 55 (1995), 4425-4431.
- [349] Jadhav,S., Bochner,B.S., Konstantopoulos,K.: Hydrodynamic shear regulates the kinetics and receptor specificity of polymorphonuclear leukocyte-colon carcinoma cell adhesive interactions. *J. Immunol.* 167 (2001), 5986-5993.
- [350] Borsig,L., Wong,R., Hynes,R.O., Varki,N.M., Varki,A.: Synergistic effects of L- and P-selectin in facilitating tumor metastasis can involve non-mucin ligands and implicate leukocytes as enhancers of metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002), 2193-2198.
- [351] Cooke,R.M., Hale,R.S., Lister,S.G., Shah,G., Weir,M.P.: The conformation of the sialyl Lewis^x ligand changes upon binding to E-Selectin. *Biochemistry* 33 (1994), 10591-10596.
- [352] Kogan,T.P., Revelle,B.M., Tapp,S., Scott,D., Beck,P.J.: A single amino acid residue can determine the ligand specificity of E-Selectin. *J. Biol. Chem.* 270 (1995), 14047-14055.
- [353] Simanek,E.E., McGarvey,J., Jablonowski,J.A., Wong,C.H.: Selectin-carbohydrate interactions: From natural ligands to designed mimetics. *Chem. Rev.* 98 (1998), 833-862.
- [354] Turunen,J.P., Majuri,M.L., Seppo,A., Tiisala,S., Paavonen,T., Miyasaka,M., Lemstrom,K., Penttila,L., Renkonen,O., Renkonen,R.: De novo expression of endothelial sialyl Lewis (a) and sialyl Lewis (x) during cardiac transplant rejection: superior capacity of a tetravalent sialyl Lewis (x) oligosaccharide in inhibiting L-selectin-dependent lymphocyte adhesion. *J. Exp. Med.* 182 (1995), 1133-1141.
- [355] Seppo,A., Turunen,J.P., Penttila,L., Keane,A., Renkonen,O., Renkonen,R.: Synthesis of a tetravalent sialyl Lewis x glycan, a high-affinity inhibitor of L-selectin-mediated lymphocyte binding to endothelium. *Glycobiology* 6 (1996), 65-71.
- [356] Toppila,S., Lauronen,J., Mattila,P., Turunen,J.P., Penttila,L., Paavonen,T., Renkonen,O., Renkonen,R.: L-selectin ligands in rat high endothelium: multivalent sialyl Lewis x glycans are high-affinity inhibitors of lymphocyte adhesion. *Eur. J. Immunol.* 27 (1997), 1360-1365.
- [357] Renkonen,O., Toppila,S., Penttila,L., Salminen,H., Helin,J., Maaheimo,H., Costello,C.E., Turunen,J.P., Renkonen,R.: Synthesis of new nanomolar saccharide inhibitors of lymphocyte adhesion: Different polylactosamine

- backbones present multiple Sialyl Lewis X determinants to L-Selectin in high affinity mode. *Glycobiology* 7 (1997), 453-461.
- [358] Manning,D.D., Strong,L.E., Hu,X., Beck,P.J., Kiessling,L.L.: Neoglycopolymer inhibitors of the selectins. *Tetrahedron Lett.* 53 (1997), 11937-11952.
- [359] Thoma,G., Duthaler,R.O., Magnani,J.L., Patton,J.T.: Nanomolar E-selectin inhibitors: 700-fold potentiation of affinity by multivalent ligand presentation. *J. Am. Soc.* 123 (2001), 10113-10114.
- [360] Spevak,W., Foxall,C., Charych,D.H., Dasgupta,F., Nagy,J.O.: Carbohydrates in an acidic multivalent assembly: Nanomolar P-selectin inhibitors. *J. Med. Chem.* 39 (1996), 1018-1020.
- [361] Sanders,W.J., Gordon,E.J., Dwir,O., Beck,P.J., Alon,R., Kiessling,L.L.: Inhibition of L-selectin-mediated leukocyte rolling by synthetic glycoprotein mimics. *J. Biol. Chem.* 274 (1999), 5271-5278.
- [362] Ramphal,J.Y., Hiroshige,M., Lou,B., Gaudino,J.J., Hayashi,M., Chen,S.M., Chiang,L.C., Gaeta,F.C., DeFrees,S.A.: Ligand interactions with E-Selectin. Identification of a new site for recognition of N-Acyl Aromatic Glucosamine substituents of Sialyl Lewis^x. *J. Med. Chem.* 39 (1996), 1357-1360.
- [363] Tsujishita,H., Hiramatsu,Y., Kondo,N., Ohmoto,H., Kondo,H., Kiso,M., Hasegawa,A.: Selectin-Ligand interactions revealed by molecular dynamics simulation in solution. *J. Med. Chem.* 40 (1997), 362-369.
- [364] Davenpeck,K.L., Berens,K.L., Dixon,R.A., Dupre,B., Bochner,B.S.: Inhibition of adhesion of human neutrophils and eosinophils to P-selectin by the sialyl Lewis antagonist TBC 1269: preferential activity against neutrophil adhesion in vitro. *J. Allergy Clin. Immunol.* 105 (2000), 769-775.
- [365] Nemoto,T., Burne,M.J., Daniels,F., O'Donnell,M.P., Crosson,J., Berens,K., Issekutz,A., Kasiske,B.L., Keane,W.F., Rabb,H.: Small molecule selectin ligand inhibition improves outcome in ischemic acute renal failure. *Kidney Int.* 60 (2001), 2205-2214.
- [366] Leppanen,A., Mehta,P., Ouyang,Y.B., Ju,T., Helin,J., Moore,K.L., van Die,I., Canfield,W.M., McEver,R.P., Cummings,R.D.: A novel glycosulfopeptide binds to P-selectin and inhibits leukocyte adhesion to P-selectin. *J. Biol. Chem.* 274 (1999), 24838-24848.
- [367] Leppanen,A., Penttila,L., Renkonen,O., McEver,R.P., Cummings,R.D.: Glycosulfopeptides with O-glycans containing sialylated and polyfucosylated poly lactosamine bind with low affinity to P-selectin. *J. Biol. Chem.* 277 (2002), 39749-39759.
- [368] Hicks,A.E., Leppanen,A., Cummings,R.D., McEver,R.P., Hellewell,P.G., Norman,K.E.: Glycosulfopeptides modeled on P-selectin glycoprotein ligand 1 inhibit P-selectin-dependent leukocyte rolling in vivo. *FASEB J.* 16 (2002), 1461-1462.
- [369] Hayward,R., Campbell,B., Shin,Y.K., Scalia,R., Lefer,A.M.: Recombinant soluble P-Selectin glycoprotein ligand-1 protects against myocardial ischemic reperfusion injury in cats. *Cardiovasc. Res.* 41 (1999), 65-76.
- [370] Eppihimer,M.J., Schaub,R.G.: Soluble P-selectin antagonist mediates rolling velocity and adhesion of leukocytes in acutely inflamed venules. *Microcirculation* 8 (2001), 15-24.
- [371] Kumar,A., Villani,M.P., Patel,U.K., Keith,J.C.Jr., Schaub,R.G.: Recombinant soluble form of PSGL-1 accelerates thrombolysis and prevents reocclusion in a porcine model. *Circulation* 99 (1999), 1363-1369.

- [372] Bienvenu,J.G., Tanguay,J.F., Theoret,J.F., Kumar,A., Schaub,R.G., Merhi,Y.: Recombinant soluble p-selectin glycoprotein ligand-1-Ig reduces restenosis through inhibition of platelet-neutrophil adhesion after double angioplasty in swine. *Circulation* 103 (2001), 1128-1134.
- [373] Theoret,J.F., Bienvenu,J.G., Kumar,A., Merhi,Y.: P-selectin antagonism with recombinant p-selectin glycoprotein ligand-1 (rPSGL-Ig) inhibits circulating activated platelet binding to neutrophils induced by damaged arterial surfaces. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298 (2001), 658-664.
- [374] Opal,S.M., Sypek,J.P., Keith,J.C.Jr., Schaub,R.G., Palardy,J.E., Parejo,N.A.: Evaluation of the safety of recombinant P-selectin glycoprotein ligand-immunoglobulin G fusion protein in experimental models of localized and systemic infection. *Shock* 15 (2001), 285-290.
- [375] Fukuda,M.N., Ohyama,C., Lowitz,K., Matsuo,O., Pasqualini,R., Ruoslahti,E., Fukuda,M.: A peptide mimic of E-selectin ligand inhibits sialyl Lewis X-dependent lung colonization of tumor cells. *Cancer Res.* 60 (2000), 450-456.
- [376] Molenaar,T.J.M., Appeldoorn,C.C.M., de Haas,S.A.M., Michon,I.N., Bonnefoy,A., Hoylaerts,M.F., Pannekoek,H., van Berkel,T.J.C., Kuiper,J., Biessen,E.A.L.: Specific inhibition of P-selectin-mediated cell adhesion by phage display-derived peptide antagonists. *Blood* 100 (2002), 3570-3577.
- [377] Skinner,M.P., Fournier,D.J., Andrews,R.K., Gorman,J.J., Chesterman,C.N., Berndt,M.C.: Characterization of human platelet GMP-140 as heparin-binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 164 (1989), 1373-1379.
- [378] Linhardt,R.J., Toida,T.: Heparin oligosaccharides: New analogues development and applications. In: "Carbohydrates in Drug Design". Wiczak,Z.J. & Nieforth,K.A. (Ed.) Marcel Dekker, New York 1997, 277-341.
- [379] Xie,X., Rivier,A.S., Zakrzewicz,A., Bernimoulin,M., Zeng,X.L., Wessel,H.P., Schapira,M., Spertini,O.: Inhibition of selectin-mediated cell adhesion and prevention of acute inflammation by nonanticoagulant sulfated saccharides. Studies with carboxyl-reduced and sulfated heparin and with trestatin a sulfate. *J. Biol. Chem.* 275 (2000), 34818-34825.
- [380] Skinner,M.P., Lucas,C.M., Burns,G.F., Chesterman,C.N., Berndt,M.C.: GMP-140 binding to neutrophils is inhibited by sulfated glycans. *J. Biol. Chem.* 266 (1991), 5371-5374.
- [381] Nelson,R.M., Cecconi,O., Roberts,W.G., Aruffo,A., Linhardt,R.J., Bevilacqua,M.P.: Heparin oligosaccharides bind L- and P-selectin and inhibit acute inflammation. *Blood* 82 (1993), 3253-3258.
- [382] Weitz-Schmidt,G., Gong,K.W., Wong,C.H.: Selectin/Glycoconjugate binding assays for the identification and optimization of selectin antagonists. *Anal. Biochem.* 273 (1999), 81-88.
- [383] Norgard-Sumnicht,K.E., Varki,N.M., Varki,A.: Calcium-dependent heparin-like ligands for L-Selectin in nonlymphoid endothelial cells. *Science* 261 (1993), 480-483.
- [384] Giuffre,L., Cordey,A.S., Monai,N., Tardy,Y., Schapira,M., Spertini,O.: Monocyte adhesion to activated aortic endothelium: role of L-selectin and heparan sulfate proteoglycans. *J. Cell Biol.* 136 (1997), 945-956.
- [385] Koenig,A., Norgard-Sumnicht,K., Linhardt,R., Varki,A.: Differential interactions of heparin and heparan sulfate glycosaminoglycans with the selectins. *J. Clin. Invest.* 101 (1998), 877-889.

- [386] Libersan,D., Khalil,A., Dagenais,P., Quan,E., Delorme,F., Uzan,A., Latour,J.G.: The low molecular weight heparin, enoxaparin, limits infarct size at reperfusion in the dog. *Cardiovasc. Res.* 37 (1998), 656-666.
- [387] Tangelder,G.J., Arfors,K.E.: Inhibition of leukocyte rolling in venules by protamine and sulfated polysaccharides. *Blood* 77 (1991), 1565-1571.
- [388] Yanaka,K., Spellman,S.R., McCarthy,J.B., Oegema,T.R.Jr., Low,W.C., Camarata,P.J.: Reduction of brain injury using heparin to inhibit leukocyte accumulation in a rat model of transient focal cerebral ischemia. I. Protective mechanism. *J. Neurosurg.* 85 (1996), 1102-1107.
- [389] Wang,L., Brown,J.R., Varki,A., Esko,J.D.: Heparin's anti-inflammatory effects require glucosamine 6-O-sulfation and are mediated by blockade of L- and P-selectins. *J. Clin. Invest.* 110 (2002), 127-136.
- [390] Gege,C., Vogel,J., Bendas,G., Rothe,U., Schmidt,R.R.: Synthesis of the Sialyl Lewis X epitope attached to glycolipids with different core structures and their Selectin-binding characteristics in a dynamic test system. *Chem. Eur. J.* 6 (2000), 111-122.
- [391] Bakowsky,U., Schumacher,G., Gege,C., Schmidt,R.R., Rothe,U., Bendas,G.: Cooperation between ligand mobility and accessibility for receptor recognition in Selectin-induced cell rolling. *Biochemistry* 41 (2002), 4704-4712.
- [392] Gege,C., Oscarson,S., Schmidt,R.R.: Synthesis of fluorescence labeled sialyl Lewis^x glycosphingolipids. *Tetrahedron Lett.* 42 (2001), 377-380.
- [393] Gege,C., Schneider,M.F., Schumacher,G., Limozin,L., Rothe,U., Bendas,G., Tanaka,M., Schmidt,R.R.: Artificial rafts of glycolipids with partially fluorinated membrane anchors – impact on cell adhesion. *J. Am. Chem. Soc.* (eingereicht).
- [394] Gege,C.: Synthetische und analytische Strategien zur Untersuchung der homophilen Kohlenhydrat-Wechselwirkungen. Dissertation, FB Chemie, Universität Konstanz, 2001.
- [395] Ikami,T., Kakigami,T., Baba,K., Hamajima,H., Jomori,T., Usui,T., Suzuki,Y., Tanaka,H., Ishida,H., Hasegawa,A., Kiso,M.: Synthetic studies on selectin ligands/inhibitors: synthesis and inhibitory activity of 2-*O*-fucosyl sulfatides containing 2-branched fatty alkyl residues in place of ceramide. *J. Carb. Chem.* 17 (1998), 453-470.
- [396] Alban,S., Franz,G.: Gas-liquid chromatography-mass spectrometry analysis of anticoagulant active curdlan sulfates. *Semin. Thromb. Hemost.* 20/2 (1994), 152-158.
- [397] Alban,S., Franz,G.: Characterization of the anticoagulant actions of a semisynthetic curdlan sulfate. *Thromb. Res.* 99 (2000), 377-388.
- [398] Vogel,J., Bendas,G., Bakowsky,U., Hummel,G., Schmidt,R.R., Kettmann,U., Rothe,U.: The role of glycolipids in mediating cell adhesion: a flow chamber study. *Biochem. Biophys. Acta* 1372 (1998), 205-215.
- [399] Stroud,M.R., Handa,K., Salyan,M.E.K., Ito,K., Lavery,S.B., Hakamori,S., Reinhold,B.B., Reinhold,V.N. Monosialogangliosides of human myelogenous leukemia HL 60 cells and normal human leukocytes. 2. Characterization of E-Selectin binding fractions and structural requirements for physiological binding to E-Selectin. *Biochemistry* 35 (1996), 770-778.
- [400] Müthing,J., Spanbroek,R., Peter-Katalinic,J., Hanisch,F.G., Hanski,C., Hasegawa,A., Unland,F., Lehmann,J., Tschesche,H., Egge,H.: Isolation and structural characterization of fucosylated gangliosides with linear poly-N-

- acetyllactosaminyl chains from human granulocytes. *Glycobiology* 6 (1996), 147-156.
- [401] Alon,R., Feizi,T., Yuen,C.T., Fuhlbrigge,R.C., Springer,T.A.: Glycolipid ligands for selectins support leukocyte tethering and rolling under physiologic flow conditions. *J. Immunol.* 154 (1995), 5356-5366.
- [402] Gege,C., Geyer,A., Schmidt, R.R.: Synthesis and molecular tumbling properties of sialyl Lewis X and derived neoglycolipids. *Chemistry* 8 (2002), 2454-2463.
- [403] Bakowsky,U., Rettig,W., Bendas,G., Vogel,J., Bakowsky,H., Harnagea,C., Rothe,U.: Characterization of the interactions between various hexadecylmannoside-phospholipid model membranes with the lectin Concanavalin A. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2 (2000), 4609-4614.
- [404] Krafft,M.P., Riess,J.G.: Highly fluorinated amphiphiles and colloidal systems, and their applications in the biomedical field. A contribution. *Biochimie* 80 (1998), 489-514.
- [405] Lawrence,M.B.: Selectin-carbohydrate interactions in shear flow. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5 (1999), 659-664.
- [406] Schumacher,G., Höpfner,M., Vogel,J., Bakowsky,U., Ikami,T., Rothe,U., Bendas,G.: Dynamisches Testsystem zur Untersuchung Selektin-inhibierender Substanzen als potentiell antiinflammatorische Verbindungen. *Pharm. Ind.* 64 (2002), 808-815.
- [407] Alban,S.: Carbohydrates with anticoagulant and antithrombotic properties. In: "Carbohydrates in Drug Design". Witczak,Z.J. & Nieforth,K.A. (Ed.) Marcel Dekker, New York 1997, 209-276.
- [408] Alban,S., Schauerle,A., Franz,G.: Anticoagulant sulfated polysaccharides: I. Synthesis and structure-activity relationships of new pullulan sulfates. *Carbohydr. Polym.* 47 (2001), 267-276.
- [409] Kunz,C., Rudloff,S., Schad,W., Braun,D.: Lactose-derived oligosaccharides in milk of the elephants – comparison to human milk. *Br. J. Nutr.* 82 (1999), 391-399.
- [410] Thurl,S., Henker,J., Siegel,M., Tovar,K., Sawatzki,G.: Detection of four human milk groups with respect to Lewis blood group dependent oligosaccharides. *Glycoconjugate J.* 14 (1997), 795-799.
- [411] Engfer,M.B., Stahl,B., Finke,B., Sawatzki,G., Daniel,H.: Human milk oligosaccharides are resistant to enzymatic hydrolysis in the upper gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.* 71 (2000), 1589-1596.
- [412] Gnoth,M.J., Kunz,C., Kinne-Saffran,E., Rudloff,S.: Human milk oligosaccharides are minimally digested in vitro. *J. Nutr.* 130 (2000), 3014-3020.
- [413] Schwertmann,A., Rudloff,S., Kunz,C.: Potential ligands for cell adhesion molecules in human milk. *Ann. Nutr. Metab.* 40 (1996), 252-262.
- [414] Rudloff,S., Stefan,C., Pohlentz,G., Kunz,C.: Detection of ligands for selectins in the oligosaccharide fraction of human milk. *Eur. J. Nutr.* 41 (2002), 85-92.
- [415] Klein,N., Schwertmann,A., Peters,M., Kunz,C., Strobel,S.: Immunomodulatory effects of breast milk oligosaccharides. *Adv. Exp. Med. Biol.* 478 (2000), 251-259.
- [416] Semenkovich,C.F., Ostlund,R.E.Jr., Olson,M.O., Yang,J.W.: A protein partially expressed on the surface of HepG2 cells that binds lipoproteins is nucleolin. *Biochemistry* 29 (1990), 9708-9713.

- [417] Deng,J.S., Ballou,B., Hofmeister,J.K.: Internalization of nucleolin-antibody into viable Hep-2 cells. Mol. Biol. Rep. 23 (1996), 191-195.
- [418] Harms,G.: Identifizierung neuartiger Liganden des Adhäsionsrezeptors L-Selektin – Die L-Selektin-vermittelte homotypische Adhäsion von Leukozyten in der akuten Entzündungsreaktion -. Dissertation, FB Biologie, Freie Universität Berlin, 2002.

Eigene Veröffentlichungen

Bakowsky,U., Schumacher,G., Gege,C., Schmidt,R.R., Rothe,U., Bendas,G.: Cooperation between ligand mobility and accessibility for receptor recognition in Selectin-induced cell rolling. *Biochemistry* 41 (2002), 4704-4712.

Schumacher,G., Höpfner,M., Vogel,J., Bakowsky,U., Ikami,T., Rothe,U., Bendas,G.: Dynamisches Testsystem zur Untersuchung Selektin-inhibierender Substanzen als potentiell antiinflammatorische Verbindungen. *Pharm. Ind.* 64 (2002), 808-815.

Höpfner,M., Schumacher,G., Alban,S., Rothe,U., Bendas,G.: The inhibition of selectin-induced cell binding and rolling by heparinoid compounds. *J. Pharm. Pharmacol.* (in Druck).

Gege,C., Schneider,M.F., Schumacher,G., Limozin,L., Rothe,U., Bendas,G., Tanaka,M., Schmidt,R.R.: Artificial rafts of glycolipids with partially fluorinated membrane anchors – impact on cell adhesion. *J. Am. Chem. Soc.* (eingereicht).

Danksagung

Herzlich bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Gerd Bendas und Herrn PD Dr. Ulrich Rothe. Unter ihrer Anleitung durfte ich die Arbeiten zu diesem interessanten Thema durchführen. Dabei habe ich ihre stete Bereitschaft zur Diskussion und Unterstützung sehr schätzen gelernt und mich in der vertrauensvollen und freundschaftlichen Atmosphäre wohl gefühlt.

Allen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe danke ich für die kontinuierliche Gesprächsbereitschaft, die Anregungen und die Kollegialität. Ausdrücklich nenne ich Herrn Dipl.-Pharm. Matthias Höpfner, der mir durch seine Hilfsbereitschaft, die weit über das normale Maß hinausgeht, und seine aufmunternde Art bei auftretenden Schwierigkeiten geholfen hat. Herrn Dr. Udo Bakowsky danke ich für Gespräche, denen ich wertvolle Hinweise entnahm, sowie wissenschaftliche Unterstützung durch die Anfertigung der AFM-Aufnahmen. Danken möchte ich auch Herrn Dipl.-Pharm. Mario Bandulik für seine immer prompte Bereitschaft bei Computerproblemen zu helfen und für interessante Diskussionen. Herrn Dr. Jan Vogel danke ich für die ausführliche Einführung in die Handhabung der Durchflusskammer und die Auswertungsmethoden, Frau Dipl.-Pharm. Juliane Fritzsche für die gelungene Zusammenarbeit im Rahmen ihrer Diplomarbeit.

Bei Frau Ursula Goder bedanke ich mich für die exzellente Zusammenarbeit und erwähne besonders ihr Bemühen, Zellwünschen meinerseits möglichst schnell nachzukommen.

Ich danke Frau Prof. Dr. Alban für die zur Verfügung überlassenen heparinoiden Verbindungen, Herrn Prof. Dr. Schmidt und Herrn Dr. Gege für die synthetischen Glykolipide, Herrn Dr. Zeisig für die bereit gestellten Zelllinien und Herrn Dr. Beermann für die Oligosaccharid-Proben aus der Milch.

Die Deutsche Forschungsgemeinschaft, Bonn, hat mich im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 197 und die Firma Milupa Research, Friedrichsdorf, im Rahmen einer bilateralen Zusammenarbeit finanziell unterstützt. Auch dafür möchte ich an dieser Stelle meinen Dank aussprechen.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle, im April 2003

Lebenslauf

geboren am 26.06.1973 in Hannover

Schulische Ausbildung:

- | | |
|------------------|------------------------------------------------------|
| 1979-1985 | Grundschule und Orientierungsstufe in Hannover |
| 1985-1992 | Städtisches Gymnasium in Porta Westfalica |
| 1989 | ein Trimester am Bedstone College in Ludlow, England |
| 1992 | Abitur, Note 1,3 |
| Juli – Dez. 1992 | Au-Pair-Aufenthalt in Norwegen |

Universitäre Ausbildung:

- | | |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------|
| 1993-1997 | Studium der Pharmazie an der Carolo-Wilhelmina-Universität in Braunschweig |
| März 1995 | 1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung, Note 2,0 |
| Mai 1997 | 2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung, Note 2,0 |

Berufliche Ausbildung

- | | |
|------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Juni – Nov. 1997 | Pharmaziepraktikum bei Salutas Pharma GmbH, Barleben |
| Dez. – Juni 1998 | Pharmaziepraktikum in der Paracelsus-Apotheke, Porta Westfalica |
| Juli 1998 | 3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung, Note 1,5
Approbation zur Apothekerin |

Wissenschaftliche Ausbildung:

- | | |
|---------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Sept. 1998 –
Juli 1999 | Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Biopharmazie und Pharmazeutische Technologie, Universität des Saarlandes |
| seit August 1999 | Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmazeutische Chemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg |