

„Beiträge zu neuartigen antiinflammatorischen Therapieansätzen durch die
pharmazeutische Ausnutzung von Selektinen“

H a b i l i t a t i o n s s c h r i f t



Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium habitatus (Dr. rer. nat. habil.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Herrn Dr. rer. nat. Gerd Bendas

geb. am: 01.11. 1964 in Naumburg

Gutachter

1. Prof. Dr. habil. Peter Nuhn (Halle)
2. Prof. Dr. habil. Dietmar Vestweber (Münster)
3. Prof. Dr. habil. Rolf Schubert (Freiburg)

Halle (Saale), Mai 2000

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Theoretischer Teil	3
2.1. Selektine und ihre Rolle im Entzündungsgeschehen.....	3
2.1.1. Die Adhäsionskaskade der Leukozyten im Prozeß der Entzündung.....	3
2.1.2. Selektine und ihre korrespondierenden Liganden	5
2.1.2.1. Struktur und Exprimierung der Selektine	5
2.1.2.2. Selektinliganden	7
2.1.2.3. Signalfunktionen der Selektine.....	10
2.1.3. Der molekulare Mechanismus des Selektin-vermittelten Zellrollens	10
2.1.4. Physikalische Parameter und mathematische Modellvorstellungen zur Beschreibung des Leukozytenrollens	14
2.2. Selektine als Zielstruktur für die pharmazeutische Forschung	17
2.2.1. Pathologische Expression von Selektinen	17
2.2.2. Suche nach kompetitiven Selektininhibitoren als potentielle Wirkstoffe.....	19
2.2.3. Bekannte Arzneistoffe mit möglicher Beeinflussung der Selektine	20
2.2.4. Diagnostische Bedeutung der Selektine und ihr Potential als Targetstrukturen für ein Drug Targeting	21
2.3. Immunoliposomen als Arzneistoffvehikel für ein Drug Targeting	22
2.3.1. Das therapeutische Potential von Liposomen	22
2.3.2. Die sterische Stabilisierung von Liposomen als Weg zur Zirkulationsverlängerung in vivo	23
2.3.3. Darstellung sterisch stabilisierter Immunoliposomen	24
2.3.4. Potentielle Probleme in der Targetierung von Immunoliposomen	26
2.3.5. Targeting von Immunoliposomen	27
2.4. Zielstellung dieser Arbeit.....	29
3. Materialien und Methoden	31
3.1. Chemikalien/Lipide	31
3.2. Durchflußapparatur	31
3.3. Darstellung der Modellmembranen	32
3.3.1. Trägermaterialien und Reinigung.....	32
3.3.2. Self-Assembling	32
3.3.3. Langmuir-Blodgett-Technik	32
3.4. Darstellung Selektin-haltiger Glasoberflächen	33
3.4.1. Isolation von P-Selektin aus Blutplättchen	33
3.4.2. Kovalente Immobilisierung des P-Selektins auf Glasplättchen	33
3.5. Zellkultivation und Antikörper	33
3.6. Liposomenpräparationen	34
3.7. Kunststoffpartikel.....	35
3.8. Zellrollexperimente	35
3.9. Präparative Darstellung des Proteinankers Cyanur-PEG-PE.....	36
3.10. Antikörperkopplungen an die Liposomen	37
3.10.1. Kopplung der Antikörper an konventionelle Liposomen	37
3.10.2. Antikörperkopplung an das Cyanur-PEG-PE	38
3.11. Untersuchung der Immunogenität der Immunoliposomen.....	38

3.12. In vitro-Zellbindungsstudien der Immunoliposomen	39
3.12.1. Messung unter statischen Bedingungen (plate reader)	39
3.12.2. Messung am Durchflußzytometer	39
3.12.3. Mikroskopische Auswertung der Liposomenbindung unter simulierten Scherflußbedingungen	39
3.13. Untersuchung der Zellinternalisierung der Liposomen	40
3.13.1. Pyraninmethode	40
3.13.2. Dithionit-Methode	40
3.13.3. Anwendung von Liposomen mit Fluoreszenz-Doppelmarkierung	40
3.13.4. Fusionsnachweis mit Calcein	41
3.13.5. Quantifizierung der internalisierten Liposomen durch Pronase-Behandlung	41
3.14. Konfokale Laser Scanning Mikroskopie	41
3.15. Rasterkraft Mikroskopie (AFM)	42
4. Ergebnisse	43
4.1. Untersuchung der molekularen Bindungseigenschaften der Selektine	43
4.1.1. Etablierung eines dynamischen Testsystems zur Untersuchung von Zelladhäsions- und Rollvorgängen	43
4.1.2. Simulierung der Selektin-induzierten Zelladhäsion durch Lektin-gekoppelte Liposomen oder Partikel unter Scherflußbedingungen	45
4.1.3. Einfluß der lateralen Ligandenverteilung auf das Selektin-vermittelte Zellrollen	48
4.1.4. Die Abhängigkeit des Zellrollens von den Scherflußbedingungen	54
4.1.5. Einfluß der Ligandenflexibilität auf das Selektin-vermittelte Zellrollen	56
4.2. Untersuchung selektininhibierender Verbindungen als potentielle antiinflammatorische Wirkstoffe	58
4.3. Nutzung vaskulärer Selektine als Targetstrukturen für Immunoliposomen zum Zwecke eines antiinflammatorisch gerichteten Drug Targetings	66
4.3.1. Methoden zur Herstellung selektingerichteter Immunoliposomen	66
4.3.1.1. Herstellung konventioneller sterisch stabilisierter Immunoliposomen	66
4.3.1.2. Nutzung von Cyanur-PEG-PE als neuartige Kopplungsstrategie für die Konjugation von Antikörpern an terminales PEG	68
4.3.2. Untersuchung der Immunogenität der Immunoliposomen	73
4.3.3. Targetierungsexperimente der Immunoliposomen	79
4.3.4. Analyse des Liposomenverhalten nach erfolgter Targetierung	83
4.3.4.1. Modelluntersuchungen zur gezielten Wirkstofffreisetzung aus Liposomen bei Targetbindung	83
4.3.4.2. Untersuchung der Internalisierung von Immunoliposomen durch HUVEC	86
5. Zusammenfassung	98
6. Literaturverzeichnis	100

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AS	Aminosäure
AFM	Atomic Force Microscopy
CHEMS	Cholesteryl Hemisuccinat
CHO-(Zellen)	Chinese Hamster Ovarial-(Zellen)
Chol	Cholesterol
cLSM	konfokales Laser Scanning Mikroskop
Con A	Concanavalin A
Cyanur-PEG-PE	N-[3-Chlor-5-(ω -(3,5-dichloro-2,4,6-triazoxyl)-poly(ethylenglykol)- α -amino)-2,4,6-triazyl]-DPPE
DiO	3,3' Dioctadecyloxycarbocyaninperchlorat
DOPA	1,2 Dioleoyl-sn-glycero-phosphatidsäure
DOPE	1,2 Dioleoyl-sn-glycero-phosphoethanolamin
DPPE	1,2 Dipalmitoyl-sn-glycero-phosphoethanolamin
DSPC	1,2 Distearoyl-sn-glycero-phosphocholin
DSPE	1,2 Distearoyl-sn-glycero-phosphoethanolamin
DTT	DL-Dithiothreitol
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid
EGF	Epidermal growth factor
ESL-1	E-Selectin-Ligand-1
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GlyCAM-1	Glycosylation-dependent Cell Adhesion Molecule-1
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HEV	High Endothelial Venules
HPTS	8-Hydroxypyren-1,3,6-trisulfonsäure
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
ICAM	Intercellular Adhesion Molecules
IL-1	Interleukin-1
IgSF	Immunglobulin-Superfamilie
k_{off}	Dissoziationskonstante
k_{on}	Assoziationskonstante
LAD	Leukocyte Adhesion Deficiency Syndrom
LFA-1	Lymphocyte Function associated Antigen-1
LPS	Lipopolysaccharid
LUV	Large unilamellar vesicle
MadCAM	Mucosal addressin Cell Adhesion Molecule
Mannosid 0	1-O-Hexadecyl- α -D-Mannopyranosid
Mannosid III	1-O-(3,6,9-Trioxapentacosyl)- α -D-mannopyranosid
Mannosid VIII	1-O-(3,6,9,12,15,18,21,24-Octaoxa-tetracontyl)- α -D-mannopyranosid
Mes	2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure
MLV	Multilamellare Vesikel
MPB-PE	N-(4'-(4''-Maleimidophenyl)butyryl)-phosphatidylethanolamin
mPEG-PE	Methoxypolyethylenglykol- phosphatidylethanolamin
NBD-PE	1,2 Dipalmitoyl-sn-glycero-phosphoethanolamin-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4yl)
NF κ B	Nuclear factor kappa B
N-Glut-PE	N-Glutaryl-Phosphatidylethanolamin
NHS	N-Hydroxysulfosuccinimid
NSAP	Nichtsteroidale Antiphlogistika
OG	Octylglucopyranosid

PBS	Phosphate buffered saline/ Phosphatpuffer
PDP-PE	N-(3'-(Pyridyldithio)-propionyl)-phosphatidylethanolamin
PECAM-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1
PEG	Polyethylenglykol
PL	Phospholipid
POPC	1-Palmitoyl, 2-Oleoyl- sn-glycero-phosphocholin
PSGL-1	P-Selectin Glycoprotein Ligand-1
RES	Retikuloendotheliales System
SCR	short consensus repeats
sLe ^a	Sialyl Lewis ^a
sLe ^x	Sialyl Lewis ^x
sLe ^x -L0	Sialyl Lewis ^x -Lipid/O Ethoxyeinheiten; (1,2-Di-O-hexadecyl-sn-3-glyceryl)-O-(triethylammonium-5-acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galakto-2-nonulopyranosylonat)-(2 \rightarrow 3)-(β -D-galaktopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[α -L-fucopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)]-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosid
sLe ^x -L3	Sialyl Lewis ^x -Lipid/3 Ethoxyeinheiten; [8-(1,2-Di-O-hexadecyl-sn-glycer-3-oxy)-3,6-dioxaoct-1yl]-O-(triethylammonium-5-acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galakto-2-nonulopyranosylonat)-(2 \rightarrow 3)-(β -D-galaktopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[α -L-fucopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)]-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosid
sLe ^x -L6	Sialyl Lewis ^x -Lipid/6 Ethoxyeinheiten; [17-(1,2-Di-O-hexadecyl-sn-glycer-3-oxy)-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadec-1-yl]-O-(triethylammonium-5-acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galakto-2-nonulopyranosylonat)-(2 \rightarrow 3)-(β -D-galaktopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[α -L-fucopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)]-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosid
sLe ^x -L9	Sialyl Lewis ^x -Lipid/9 Ethoxyeinheiten; [26-(1,2-Di-O-hexadecyl-sn-glycer-3-oxy)-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxaheptacos-1-yl]-O-(triethylammonium-5-acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galakto-2-nonulopyranosylonat)-(2 \rightarrow 3)-(β -D-galaktopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[α -L-fucopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)]-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosid
sLe ^x -Cer	Sialyl Lewis ^x -Lipid mit Laktosespacer und Ceramidanker; [(2S,3R,4E)-2-amino-3-hydroxy-2(N-palmitoyl)-octadec-4-en-1-yl]-D (Kalium-5-acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galakto-2-nonulopyranosylat)-(2 \rightarrow 3)-(β -D-galaktopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[α -L-fucopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)]-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-(β -D-galaktopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosid
SMPB	N-Succinimidyl-4-(p-maleimidophenyl)-butyrat
SPDP	N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)-propionat
SPC	Soja-Phosphatidylcholin
SUV	Small unilamellar vesicle
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α

1. Einleitung

Selektine sind eine Gruppe von kohlenhydratbindenden Adhäsionsmolekülen, die im Prozeß einer akuten oder chronischen Entzündung entscheidend zur Adhäsion der Leukozyten am vaskulären Endothel und zu deren chemotaktischen Emigration in das entzündete Gewebe beitragen. Dabei initiieren die Selektine eine komplexe Kaskade von Adhäsionsereignissen, indem sie fließende Leukozyten aus dem kapillaren Blutstrom durch Vermittlung einer rollenden Verlangsamung entlang der Gefäßwand lokal konzentrieren. Aufbauend auf diesem Prozeß können dann andere Adhäsionsmoleküle die feste Bindung der Leukozyten und deren Emigration in das Gewebe steuern.

Durch diese initiale Rolle in der zellulären Immunabwehr von Entzündungsereignissen wurden die Selektine mit ihrer strukturellen und funktionellen Aufklärung in den 90er Jahren zu einer ausgesprochen attraktiven Zielstruktur für die pharmazeutische Forschung. Sehr aussichtsreich erscheint dabei die Vorstellung, durch eine Modulation oder Blockierung der Selektinbindungen an einem sehr frühen und kausalen Punkt auf pathologische Entzündungsprozesse wie der rheumatoiden Arthritis oder der myocardialen Ischämie Einfluß nehmen zu können. Zu diesem Zweck jedoch müssen die molekularen Bindungseigenschaften der Selektine aufgeklärt und charakterisiert werden. Erschwerend wirkt dabei, daß Selektine als kohlenhydratbindende Proteine (Lektine) in Analogie zu anderen Rezeptoren dieser Klasse ihre glykosidischen Bindungs epitope mit nur geringer Affinität binden, und darüber hinaus die Struktur-Wirkungs-Beziehungen der natürlichen Selektinliganden noch nicht vollständig verstanden werden. Zusätzlich muß berücksichtigt werden, daß die Selektine ihre physiologische Bindungsfunktion beim Zellrollen unter dynamischen Flußbedingungen entfalten. Da eine solche Zellrollvermittlung eine einmalige Sonderform einer Zell-Zell-Wechselwirkung darstellt, ist die molekular mechanistische Aufklärung dieses Prozesses auch aus biophysikalischer Sicht von großem Interesse und für das Verständnis der Selektin-Ligand-Bindungen essentiell.

Aufgrund der Komplexität der bei der Leukozytenadhäsion stattfindenden Bindungsereignisse bedarf die molekulare Aufklärung der Selektinbindungseigenschaften einer abstrahierenden Vereinfachung in einem Modell.

In der vorliegenden Arbeit wird eine Modellanordnung vorgestellt, in der das selektinvermittelte Zellrollen unter den simulierten Scherflußbedingungen des kapillaren Blutstromes simuliert und mikroskopisch verfolgt werden kann. Zur Fokussierung auf die Bindungseigenschaften der Selektine befindet sich darin eine Kohlenhydratligand-haltige (Glykolipideinbau) Modellmembran, die als künstliche Endotheloberfläche unter Entzündungsbedingungen fungiert, an der Selektin-haltige Zellen adhäreren oder entlang rollen. Durch freie Variierbarkeit dieser Modellmembran (Ligandstruktur und -konzentration sowie laterale Ligandenverteilung innerhalb der Membranmatrix-Lipide) konnten die molekularen Bindungseigenschaften der Selektine erfaßt und die strukturellen Voraussetzungen der Liganden zur Rollvermittlung beschrieben werden. Durch diese Befunde konnten essentielle funktionelle Aspekte der natürlichen Selektinliganden postuliert werden.

Auf der Grundlage dieser molekular-mechanistischen Untersuchungen wurde die Modellanordnung genutzt, um eine Reihe von glykosidischen Verbindungen auf ihre Selektin-inhibierende, und damit potentiell antiinflammatorische Wirksamkeit unter den dynamischen Flußbedingungen zu testen. Die untersuchten Selektininhibitoren leiteten sich dabei durch Strukturvereinfachung von dem natürlichen Bindungs epitop Sialyl Lewis^X ab. Mit den gewonnenen Erkenntnissen über die inhibitorische Wirksamkeit konnten in Hinblick auf eine Struktur-Wirkungs-Beziehung strukturelle Empfehlungen für weitere inhibitorische Substanzen abgeleitet werden.

Ein völlig neuartiger Aspekt des pharmazeutischen Interesses an den Selektinen leitet sich aus der Tatsache ab, daß die vaskulären Selektine in ihrer Exprimierung durch die

Endothelzellen unmittelbar räumlich und auch zeitlich an das Entzündungsgeschehen gekoppelt sind. Damit bieten sie hervorragende Voraussetzungen für ihre Nutzung als Targetstrukturen für Arzneimittelvehikel, die man somit gezielt zum entzündeten Gewebe transportieren könnte. Daraus könnten völlig neuartige Impulse für eine antiinflammatorische Therapie resultieren.

In der vorgestellten Arbeit wird dieses neuartige Prinzip getestet, indem Selektin-gerichtete Immunoliposomen (anti-E-Selektin-Antikörper-gekoppelte Liposomen) als Drug Targeting Vehikel präpariert und auf ihre Targetierungseigenschaften untersucht werden. Dafür wurden in dieser Arbeit verschiedene Methoden der Antikörperkopplung an Liposomen wertend verglichen und eine neuartige Kopplungsmethode konzipiert. In Hinblick auf eine perspektivische in vivo-Anwendung solcher Immunoliposomen wurden diese auf ihre Immunogenität bei wiederholter Applizierung in Ratten untersucht.

Die Targetierungsstudien wurden unter in vitro-Bedingungen mit isolierten humanen Endothelzellen unter statischen sowie auch unter den simulierten Scherflußbedingungen des kapillaren Blutstromes durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, daß die Selektin-gerichteten Immunoliposomen eine spezifische Akkumulation an den aktivierten (entzündungsspezifischen) Endothelzellen aufweisen. Aufbauend auf diesem erfolgreichen Targetierungsprinzip ergeben sich vielfältige Herausforderungen für dessen therapeutische Ausnutzung. Stellvertretend hierfür werden in der Arbeit Prinzipien der gezielten Wirkstofffreisetzung aus den Liposomen nach Targetbindung am Endothel vorgestellt sowie Art und Ausmaß einer Liposomeninternalisierung durch die Endothelzellen verdeutlicht.

2. Theoretischer Teil

2.1. Selektine und ihre Rolle im Entzündungsgeschehen

2.1.1. Die Adhäsionskaskade der Leukozyten im Prozeß der Entzündung

Beim Auftreten lokaler Entzündungen chronischen oder akuten Ursprungs invadieren Phagozytose-befähigte Leukozyten zur Vermittlung ihrer zellulären Immunabwehrfunktion aus dem Blutstrom in das betroffene Gewebe. Diese Extravasation findet als ein hochregulativer Prozeß hauptsächlich in den kleinsten venösen Blutgefäßen, den postkapillaren Venolen statt. Voraussetzung für die Extravasation der Leukozyten ist deren rezeptorvermittelte Adhäsion an der Gefäßwand, welche durch die ineinandergreifenden Bindungsschritte als Adhäsionskaskade bezeichnet wird [1].

Eingeleitet wird dieser Prozeß durch die Freisetzung verschiedener Entzündungsmediatoren wie z.B. Histamin oder Thrombin in dem betroffenen Gewebe. Diese bewirken die typischen Entzündungssymptome, die sich auch durch Vasodilatation und Exsudation verlangsamernd auf die Blutflußcharakteristik im Entzündungsgebiet auswirken. Weiterhin vermitteln insbesondere freigesetzte Zytokine wie z.B. IL-1 oder TNF- α , daß die Endothelzellen spezifische Adhäsionsrezeptoren ausbilden, die somit die Endothelzellen in einen „pro-adhäsiven Zustand“ versetzen. Die Adhäsionskaskade der Leukozyten wird daraufhin durch erste transiente Kontakte der fließenden Zellen im kapillaren Blutstrom (ca. 2 mm/s) mit den Endothelzellen eingeleitet. Diese initiale Kontaktaufnahme, bei der die Bindungsereignisse durch Abschnitte noch freier Zellströmung unterbrochen werden, wird als Tethering bezeichnet. Aufbauend auf dem Tethering erhöht sich die Anzahl schwachaffiner Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen, was im Scherstrom der Gefäße zu einer rollenden Bewegung und Verlangsamung der Leukozyten (ca. 20 μ m/s) entlang des Gefäßendothels führt. Obwohl das Phänomen der Leukozytenakkumulation und Rollbewegung am Endothel im Entzündungsgebiet bereits vor über 100 Jahren mittels intravitalmikroskopischer Untersuchungen erkannt wurde [2], konnte erst zu Beginn der 90er Jahre durch die Entdeckung und Clonierung der Rezeptoren der Selektinfamilie die molekulare Grundlage dieser Prozesse vollständig aufgeklärt werden. Selektine sind Kohlenhydrat-bindende Membranproteine, die entsprechend ihres Ursprungs in L-(Leukozyten), E-(Endothel) und P-Selektin (Plättchen und Endothel) eingeteilt werden. Durch die transiente und schwach affine Bindung ihrer korrespondierenden Liganden vermitteln sie das Leukozytentethering und Rollen. Die dadurch lokal konzentrierten Leukozyten können nun ihrerseits durch endothelial-freigesetzte Mediatoren wie z.B. Chemokine oder den plättchenaggregierenden Faktor (PAF) in einen aktivierten Zustand gebracht werden [3,4]. Als Ergebnis dieser Aktivierung exprimieren die Leukozyten Rezeptoren der Integrinfamilie, die dann durch Bindung ihrer korrespondierenden Liganden aus der Immunglobulin-Superfamilie die nachfolgende feste Adhäsion der Leukozyten am Endothel und deren Emigration durch interzelluläre Zwischenräume in das entzündete Gewebe vermitteln.

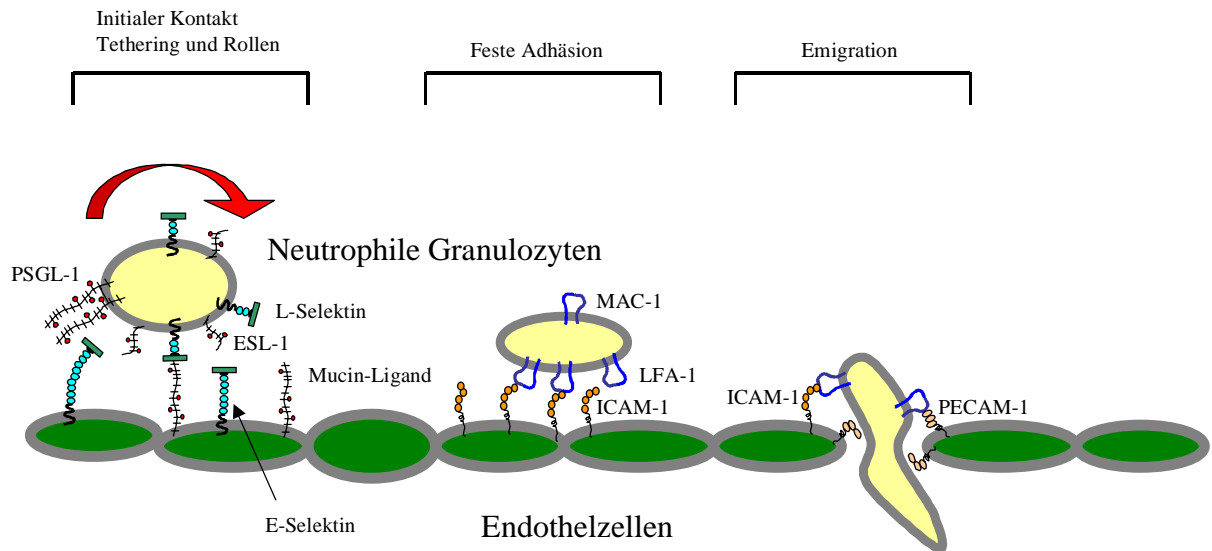


Abb.1: Schematische Darstellung der Adhäsionskaskade der Leukozyten unter Entzündungsbedingungen

Integrine sind langgestreckte, heterodimere Adhäsionsrezeptoren, die aus einer α - und einer β -Untereinheit bestehen. Strukturell werden die Integrine entsprechend ihrer β -Kette in acht verschiedene Gruppen eingeteilt. Auch funktionell werden damit solche Integrine voneinander unterschieden, die entweder Zell-Zell-Wechselwirkungen oder Zell-Matrix-Bindungen vermitteln. Für die aktivierten Leukozyten sind β_2 -Integrine spezifisch (CD11/CD18-Komplexe). Dabei unterscheidet man CD11a/CD18 ($\alpha_L\beta_2$; Lymphocyte Function associated Antigen-1 LFA-1), welches mit einem Basislevel auf allen Leukozyten vorhanden ist, von CD11b/CD18 ($\alpha_M\beta_2$; Mac-1), das in Granulozyten und Monozyten unter Aktivierung aus Speichergranula freigesetzt wird. Ferner ist auch das Integrin CD11c/CD18 (gp150,95) auf Monozyten und Granulozyten aktivierbar [5]. Die wichtigsten Liganden des LFA-1 und Mac-1 sind die Intercellular Adhesion Molecules (ICAM) auf den Endothelzellen, die als ICAM-2 (CD102) und ICAM-3 (CD 50) konstitutiv vorhanden sind oder wie ICAM-1 (CD54) durch Zytokine in ihrer Expression aktiviert werden [6-9]. Die feste integrinvermittelte Bindung der Leukozyten am Endothel führt zu einer Abflachung der Leukozyten, wobei die resultierende Vergrößerung der Kontaktfläche wiederum bindungsverstärkend wirkt. Ein direkter Signaltransduktionsmechanismus von den Selektinen auf die Integrine ist anzunehmen, dieser konnte bisher jedoch nicht mechanistisch geklärt werden.

Der sich anschließende Prozeß der Leukozytenextravasation durch die Endothelzell-Zwischenräume wird wiederum durch Integrin-Ligand-Wechselwirkungen gesteuert [10]. Die interzellulären Kontakte zwischen den Endothelzellen werden durch homogene Bindung von Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecules (PECAM-1, CD 31) gehalten, die ebenfalls zur Ig-SF gehören [11,12]. Durch Bindung der leukozytären Integrine an diese Rezeptoren werden die homogenen PECAM-1 Verbindungen gelöst, wobei die Leukozyten nunmehr in die resultierenden interzellulären Zwischenräume eindringen können. Der Prozeß der Leukozytenmigration wird durch verschiedene Signaltransduktionsmechanismen der Integrine gesteuert. Die Integrinbindung bei der festen Adhäsion der Leukozyten verursacht in den Endothelzellen strukturelle und molekulare Veränderungen des Zytoskeletts (outside-in signalling). So konnte gezeigt werden, daß eine Aktivierung verschiedener endothelialer Adhäsionsmoleküle durch Bindung zu einer Umorientierung und Polarisation des Zytoskeletts führt, die dann durch Ausbildung sogenannter stress-fiber eine Formveränderung der Zellen

und damit die Öffnung interzellulärer Lücken forciert [13]. Alternativ zu den beschriebenen Mechanismen wurde auch eine CD18-unabhängige Leukozytenextravasation unter in vivo-Bedingungen beschrieben. Dabei soll leukozytäres PECAM-1 durch homotypische Bindung an den interzellulären Zwischenräumen die Migration verwirklichen [14].

Obwohl diese komplexen und ineinandergreifenden Adhäsionsprozesse des Tethering und Rollens sowie der festen Adhäsion und Migration als essentielle Immunreaktion hauptsächlich an Neutrophilen untersucht und aufgeklärt wurden, sind sie prinzipiell auf alle Leukozyten übertragbar. Zusätzlich zu den beschriebenen Teilschritten können in ausgewählten Leukozyten (Lymphozyten, nicht in Neutrophilen) $\alpha 4$ -Integrine teilweise eine Art Rollfunktion erfüllen und somit als Brücke zwischen den Selektinen und den $\beta 2$ -Integrinen fungieren. [15].

Der funktionelle Ausfall von Einzelschritten dieser Kaskade kann dementsprechend zu einer Störung des Gesamtprozesses der Leukozytenextravasation führen. Dies verdeutlicht eindrucksvoll die essentielle Rolle der Selektine bei der Initiierung der Immunantwort bei Entzündungsreaktionen. In einer Vielzahl von in vitro-Untersuchungen (Selektin-Blockade durch z.B. Antikörper) oder in vivo-Studien (Selektin-defiziente Mäuse) konnte bewiesen werden, daß ohne die Selektinwirkung zum initialen Tethering und Rollen der Leukozyten im Entzündungsgebiet die nachfolgende feste Adhäsion nur inadäquat stattfinden kann [für Übersicht 16]. Ausdruck hierfür ist ebenfalls das Krankheitsbild des Leukocyte Adhesion Deficiency Syndrom-2 (LAD-2), bei dem durch eine Mutation im Kohlenhydratstoffwechsel keine funktionsfähigen Selektinliganden produziert werden können. Diese Patienten leiden trotz einer hohen Anzahl von Leukozyten im Blut durch die eingeschränkte Selektinfunktion an dauerhaften bakteriellen Infektionen [17]. In gleicher Weise unterstreicht das LAD-1 Syndrom die Bedeutung der $\beta 2$ Integrine für den Gesamtprozeß, da bei diesem Krankheitsbild durch die fehlende Expression der $\beta 2$ Ketten der Integrine keine Extravasation stattfindet, was zu den gleichen Krankheitssymptomen führt [18].

Da die Selektine im Gegensatz zu den ubiquitär vorkommenden Integrinen ausschließlich am Prozeß der entzündungsbedingten Leukozyten-Endothel-Wechselwirkung beteiligt sind und mit der Initiierung der Adhäsionskaskade eine Schlüsselstellung einnehmen, standen sie bereits kurz nach ihrer Entdeckung zu Beginn der 90er Jahre im Mittelpunkt vielfältiger wissenschaftlicher Forschungen zur molekularen Aufklärung der Entzündungsreaktionen und zur Auffindung neuartiger Angriffspunkte für eine antiinflammatorische Therapie.

2.1.2. Selektine und ihre korrespondierenden Liganden

2.1.2.1. Struktur und Exprimierung der Selektine

Selektine sind langgestreckte, membrangebundene Glykoproteine. Die drei Vertreter dieser Adhäsionsrezeptorfamilie E-, P- und L-Selektin (CD 62-E, -P, -L) weisen eine homologe Grundstruktur aus fünf unterschiedlichen Domänen auf (Abb. 2). Der C-terminale zytoplasmatische Rest der Selektine ist gemessen an den Gesamtmolekülen mit 17 Aminosäuren (AS) beim L-Selektin und 32 bzw. 35 AS bei E- und P-Selektin sehr klein, wobei ihm durch Verbindung zum Zytoskelett eine noch unvollständig geklärte Rolle bei der Signaltransduktion zukommt. Daran schließt sich eine einzelne transmembranäre Domäne an. Die Ausdehnung des extrazellulären Bereiches wird hauptsächlich durch eine, bei den einzelnen Selektinen unterschiedliche Anzahl sogenannter short consensus repeats (SCR) gebildet. Während humanes L-Selektin mit nur 2 SCR die kleinste Selektinstruktur darstellt, verleihen 6 bzw. 9 SCR bei humanem E- bzw. P-Selektin diesen Proteinen eine deutlich ausgedehntere Struktur. Darüberhinaus sind interindividuelle Unterschiede in der Zahl der SCR beschrieben. So weist P-Selektin aus Maus, Ratte oder Schaf nur 8 SCR und Rinder P-

Selektin nur 6 SCR auf. Auch ist die Anzahl der SCR bei E-Selektin in anderen Spezies geringer [19]. Die eigentliche Funktion dieser sich wiederholenden, aus jeweils ca. 60 AS bestehenden Elemente ist aber bisher unbekannt.

Einer, aus ca. 35-40 AS bestehenden, dem epidermalen Wachstumsfaktor gleichenden Domäne (EGF) folgt letztendlich im N-terminalen Bereich die eigentliche Lektin-Bindungsdomäne. Die Lektin-Domäne besteht aus ca. 120 AS und weist innerhalb der drei Selektine eine ca. 65-prozentige Sequenzhomologie auf [20]. Verschiedene Struktur- und Sequenzvergleiche wiesen auch auf große Ähnlichkeiten mit anderen Lektinen, z.B. dem Mannose-bindenden Protein hin [21,22] und verdeutlichten deren gemeinsame Natur als Kalzium-abhängige (C-Typ) Lektine. Die EGF- und Lektin-Domäne des E-Selektins wurden röntgenografisch mit einer 2 Å-Auflösung räumlich aufgeklärt [23]. Die Lektindomäne bildet eine globuläre Struktur mit einer flachen und oberflächlichen Bindungstasche für den Zuckerliganden. Diese Ergebnisse korrelieren ebenfalls mit der aus der AS-Sequenz ermittelten räumlichen Struktur dieser Bereiche [24]. Der EGF-Domäne wird auch eine aktive Rolle im Bindungsprozeß zugesprochen, indem sie eine räumliche Beeinflussung auf die Lektin-Domäne ausüben soll [25-27].

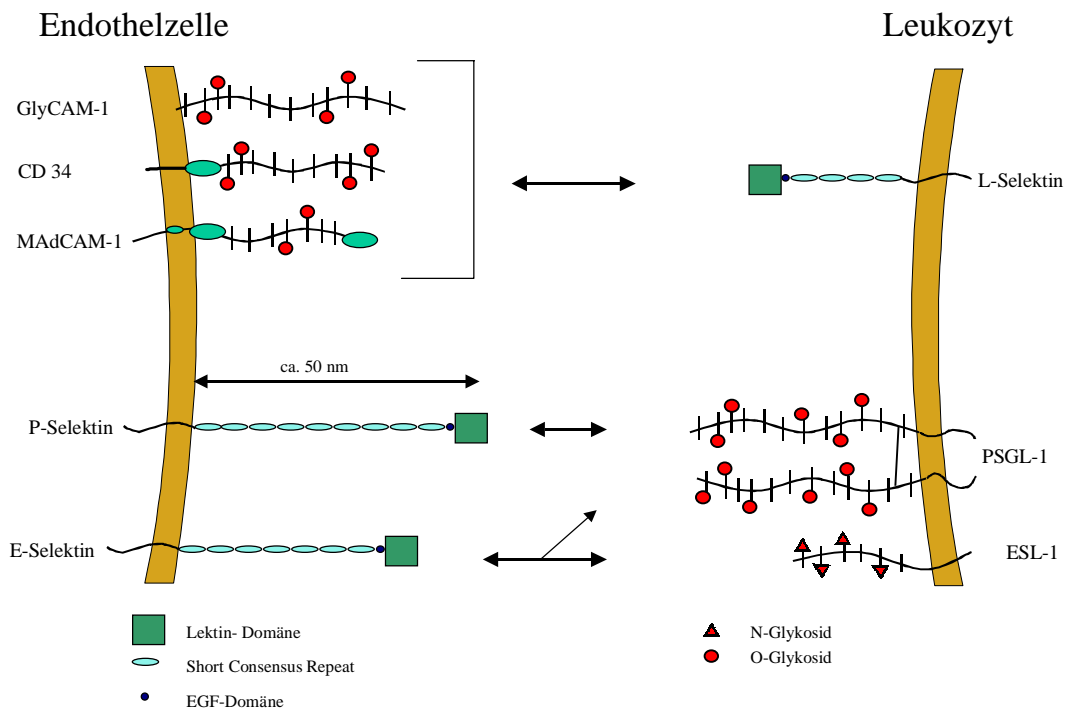


Abb. 2: Schematische Darstellung der Selektine und ihrer korrespondierenden Liganden

Trotz dieser strukturellen Homologien unterscheiden sich die drei Selektine in ihrer Aktivierung und Expression, was ihnen unterschiedliche Teilaufgaben im Prozeß des Leukozytentethering und -rollens zuordnet.

L-Selektin ist konstitutiv auf fast allen Leukozyten-Subtypen vorhanden. Neben der beschriebenen Leukozyten- insbesondere Neutrophilenadhäsion unter Entzündungsbedingungen ist das L-Selektin als einziges Selektin auch an der Rezirkulation von Lymphozyten aus speziellen venösen Gefäßen in das Lymphsystem beteiligt. In dieser Rolle, dem sogenannten lymphocyte homing, wurde es bereits 1983 beschrieben [28]. Später stellte man fest, daß dieser Prozeß Kohlenhydrat-abhängig [29] und mit Mannose-6-Phosphat haltigen Polysacchariden inhibierbar ist [30]. Mit der Clonierung des L-Selektins 1989 [31]

wurden Parallelen zu den daraufhin entdeckten anderen Selektinen und deren Funktion als Rollrezeptoren unter Entzündungsbedingungen offenkundig [32].

L-Selektin ist auf den Spitzen der Microvilli der Neutrophilen, Monozyten oder Lymphozyten lokalisiert, woraus trotz der relativ kleinen Molekülstruktur eine gute Zugänglichkeit im Bindungsprozeß resultiert [33,34]. Nach Aktivierung der Leukozyten wird L-Selektin innerhalb weniger Minuten proteolytisch von der Zelloberfläche abgespalten (Shedding). Die Spaltung wird vermutlich durch eine Metalloprotease an einer definierten und membrannahen Stelle durchgeführt [35]. Eine laterale Clusterung des L-Selektins im Bindungsprozeß wird ebenfalls als auslösender Faktor für das Shedding beschrieben [36]. Der postulierte Einfluß des L-Selektin-Sheddings als mechanistische Ursache für das Zellrollen soll später diskutiert werden.

E-Selektin, welches erstmals von Bevilacqua et al. 1989 charakterisiert wurde, wird von Endothelzellen nach Aktivierung mit Zytokinen, insbesondere IL-1 und TNF- α oder mit Lipopolysacchariden exprimiert [37]. Da die Aktivierung des E-Selektins auf Transkriptionsebene über eine de-novo Synthese erfolgt, erreicht die E-Selektin-Konzentration erst nach ca. 4 Stunden ihr Maximum und geht nach ca. 16-24 Stunden auf das Ausgangsniveau zurück [38]. Die Expression des Gens für das E-Selektin wird insbesondere durch den Transkriptionsfaktor κ B (NF κ B) gesteuert [39]. Da dessen Aktivierung über reaktive Sauerstoffspezies erfolgt, die im Normalzustand der Zelle durch eine Balance mit Radikalfängern unterdrückt werden [40], wird deutlich, daß die Wirkung oxidativer Streßfaktoren auf die Zelle zu einer verstärkten Exprimierung von E-Selektin führt.

E-Selektin wird nach Aktivierung teilweise proteolytisch abgespalten bzw. endozytotisch von der Zelloberfläche entfernt und im Lysosom abgebaut.

P-Selektin ist in funktionsfähiger Form in Speichergranula der Zellen (Weibel-Paladebodies der Endothelzellen und α -Granula der Thrombozyten) vorhanden, aus denen es nach Stimulation der Zellen mit Mediatoren wie Histamin, Thrombin oder Phorbol ester innerhalb von 10 Minuten an die Zelloberfläche gelangt [41]. Neben dieser Sofortreaktion wird P-Selektin auch nach Zellaktivierung mit Zytokinen oder Lipopolysacchariden (LPS) durch Aktivierung der Transkription neu synthetisiert [42]. Nach Exprimierung des Selektins an der Zelloberfläche wird es innerhalb von 30 bis 60 Minuten wieder durch Endozytose (mittels clathrin coated pits) entfernt und, reguliert durch komplexe Signalmechanismen des zytoplasmatischen Restes, entweder in die Speicher zurück überführt oder im Lysosom abgebaut [43].

Die Induktion der Selektinexpression durch unterschiedliche Entzündungsmediatoren steuert somit Dauer und Intensität des Leukozytenrollens und ordnet gleichzeitig den einzelnen Selektinen unterschiedliche Funktionen innerhalb des Rollprozesses zu. Während das räumlich exponierte P-Selektin mit seiner langgestreckten Struktur in Kombination mit L-Selektin in der Frühphase der Entzündung das Zellrollen vermittelt, ist das E-Selektin durch seine spätere Exprimierung und seine langsamere Bindungskinetik für die Überleitung zur festen Adhäsion der Leukozyten verantwortlich. Diese Befunde konnten in einer Vielzahl von Modelluntersuchungen in vitro oder mit selektindefizienten (knock out-) Mäusen in vivo gewonnen werden.

2.1.2.2. Selektinliganden

Im Gegensatz zu allen anderen Adhäsionsrezeptoren vermitteln Selektine ihre Bindungsfunktion durch die Erkennung von Kohlenhydratliganden. Von den beschriebenen Selektinen wurden bisher nur einzelne hochaffine Liganden charakterisiert. Prinzipiell sind dies mucinähnliche Glykoproteine. Als Mucine bezeichnet man langgestreckte und sehr hydrophile Glykoproteine, an deren serin- bzw. threoninreichen Peptidgrundgerüsten eine Vielzahl von Kohlenhydratseitenketten als die eigentlichen Bindungsepitope O-glykosidisch

verknüpft sind. So können bei einzelnen Mucinen Kohlenhydratanteile von bis zu 75% auftreten.

Als Bindungsepitope der Selektine spielen fucosylierte Laktosaminoglykane eine entscheidende Rolle, denn bereits vor der strukturellen Aufklärung physiologischer Selektinliganden stellte man fest, daß alle Selektine eine gewisse Bindungsaffinität zu der Blutgruppen-Determinante Lewis^X bzw eine höhere Affinität zu deren Sialinsäuregekoppelten Form Sialyl Lewis^X aufweisen [44-47]. In gleicher Weise wie Sialyl Lewis^X mit seiner speziellen Verknüpfung von N-Acetyllaktosamin mit Fucose und Sialinsäure (Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4[Fuc α 1,3]GlcNAc-O-R) weist auch sein Positionsisomer Sialyl Lewis^a (Neu5Ac α 2,3Gal β 1,3[Fuc α 1,4]GlcNAc-O-R) die gleiche Bindungsfähigkeit zu allen Selektinen auf [48,49]. Trotz der vergleichsweise sehr geringen Affinität der Selektine zu diesen Epitopen von ca. 1mM [50,51] konnten keine besser bindenden Kohlenhydrate gefunden werden. Die Klärung des wirksamen Bindungsprinzips wurde zusätzlich erschwert, da einzelne Untersuchungen keine Korrelation zwischen dem Gehalt an den Lewis-Epitopen und der Selektin-induzierten Zelladhäsion aufzeigten [52].

Durch Affinitäts-Isolierung von Zellysaten konnten einzelne mucinähnliche Selektinliganden (Sialomucine) gewonnen werden, die teilweise eine bis zu 10.000fach höhere Affinität zu den Selektinen wie das Sialyl Lewis^X aufweisen. Zwar zeigte die strukturelle Charakterisierung dieser Liganden individuelle Unterschiede, jedoch konnte die Affinitätssteigerung gegenüber den einzelnen Bindungsepitopen weder durch besser bindende Kohlenhydrate noch durch die Summation vieler Bindungsepitope schlüssig erklärt werden.

Der am besten charakterisierte Selektinligand ist der P-Selectin Glycoprotein Ligand PSGL-1, der erstmals von Moore et al. 1992 beschrieben wurde [53]. PSGL-1 ist ein langgestrecktes, über Disulfidbrücken verbundenes Dimer von ca. 250 kD, welches von verschiedenen myeloiden, lymphoiden und dendritischen Zellen exprimiert wird. Detaillierte Bindungsstudien zeigten, daß wiederum O-Glykosidase-empfindliche, α 1-3 fucosylierte und α 2-3 sialysierte Kohlenhydrate für die Bindung essentiell sind, deren Gehalt jedoch wie beim Sialyl Lewis^X unter einem Prozent liegt [54]. Dies spricht gegen eine einfache Summation vieler schwach-affiner Einzelbindungen im Prozeß der Leukozytenbindung. Spätere Untersuchungen zeigten, daß beim PSGL-1 verzweigte Kohlenhydrat-Seitenketten vorherrschen (sogenannte core-2 structures; Verzweigung durch β 1-6-Verknüpfung von GalNAc mit GlcNAc), die durch die räumlich enge Dimerisierung der Bindungsepitope affinitätserhöhend wirken könnten [55]. Zusätzlich zu diesen Kohlenhydrateigenschaften besitzt das PSGL-1 drei N-terminale sulfatierte Tyrosinreste, die eine deutliche Affinitätserhöhung bewirken [56,57]. Im Zusammenwirken dieser Bindungsvoraussetzungen könnte der Grund für die hohe Affinität des PSGL-1 zum P-Selektin von ca. 100 nM [58] und für die ca. 50-fach geringere Affinität zum E-Selektin liegen [59]. Neueste Untersuchungen zeigten, daß die Art und Anzahl der gebundenen sulfatierten Tyrosine von großer Bedeutung für die Bindungsstärke und Dissoziation des P- und auch L-Selektins sind [60].

Die räumliche Struktur des PSGL-1 als ein langgestrecktes, ca. 50 nm langes Protein an der Zelloberfläche, das auch als Multimer in Form von Rosetten vorkommt, konnte durch Elektronenmikroskopie verdeutlicht werden [61]. Da zudem PSGL-1 auf den Microvilli der Leukozyten lokalisiert ist [62], 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. Der Einfluß des PSGL-1 auf das Leukozyten-Rollen wurde in vielfältigen in vitro- und in vivo-Studien bewiesen und soll in dieser Funktion später diskutiert werden.

L-Selektin bindet mit ähnlich hoher Affinität wie das P-Selektin auch an den gleichen Domänen am PSGL-1. Somit werden nach Aktivierung homogene Leukozyt-Leukozyten-Bindungen ermöglicht. Diese sind in der Frühphase der Leukozytenrekrutierung am entzündeten Gewebe von großer Bedeutung, da die Bindung von Leukozyten an bereits

endothelial gebundenen Leukozyten (sog. sekundäres Tethering) wichtig für die Initiierung der Adhäsionskaskade ist [63,64]. Das sekundäre Tethering wird aber auch durch andere L-Selektin-Liganden auf den Leukozyten vermittelt. Fuhlbrigge et al. fanden an Granulozyten und Monozyten Hinweise auf sialysierte und fucosylierte L-Selektin-Liganden, die sich deutlich von den endothelialen Bindungsstrukturen unterscheiden [65]. Dieses sekundäre Tethering erweist sich insbesondere bei hohen Scherströmungen als essentielle Voraussetzung für eine effektive Leukozytenakkumulation im Entzündungsgebiet [66].

Als endotheliale L-Selektin-Liganden wurden bisher vier Glykoproteine beschrieben, von denen drei (GlyCAM-1, CD 34 und MadCAM-1) affinitätschromatografisch isoliert und charakterisiert werden konnten. Alle diese Liganden werden für den Prozeß der Lymphozytenrezirkulation an speziellen Endothelien (High Endothelial Venules-HEV) im lymphatischen Gewebe gebildet. Inwieweit weitere endotheliale Liganden existieren, die für die entzündungsbedingte Neutrophilenakkumulation verantwortlich sind, konnte bisher nicht strukturell aufgeklärt werden [67].

Das Glycosylation-dependent Cell Adhesion Molecule GlyCAM-1 ist ein 50 kD Sialomucin, das als sekretiertes Protein an den HEV vorkommt [68,69]. Die fehlende Membranverankerung spricht gegen eine Ligandenfunktion bei der Lymphozyten-Resirkulation, jedoch wird es als wichtiger Regulator z.B. der Integrinaktivierung bei diesem Prozeß beschrieben [70]. Im Unterschied zu den anderen Sialomucinen weisen die Kohlenhydrate des GlyCAM-1 zusätzliche Sulfatierungen auf, die besonders bei dem terminalen Sialyl Lewis^X als 6'Sialyl Lewis^X- (Sulfat am C6 der Galaktose) oder als 6 Sialyl Lewis^X- Sulfat (Sulfat am C6 des GlcNAc) auftreten [71,72]. Diese Sulfatierung im Molekül läßt auf eine zusätzliche kationische Bindungsstelle in der Lektindomäne des L-Selektins schließen.

CD 34 ist ein transmembranäres Sialomucin, welches im lymphatischen Gewebe als physiologischer Ligand des L-Selektins vorkommt [73]. Auch CD 34 weist sulfatierte Sialyl Lewis^X Strukturen als Bindungssepitope auf [74].

Das Mucosal addressin Cell Adhesion Molecule MadCAM-1 ist ein membrangebundener L-Selektin-Ligand an HEV im intestinalen Lymphgewebe, der neben seinen Kohlenhydratstrukturen auch Immunglobulin-Domänen im Molekül aufweist, womit es auch als Ligand für das Lymphozyten-Integrin $\alpha_4\beta_7$ fungieren kann [75].

Der E-Selectin-Ligand-1 (ESL-1) ist ein hoch affiner Ligand des E-Selektins, der von der Arbeitsgruppe Vestweber isoliert und strukturell aufgeklärt werden konnte. Es ist ein 150 kD membrangebundenes Glykoprotein auf Maus-Neutrophilen und myeloiden Zellen, das im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Sialomucinen die Kohlenhydratepitope N-glykosidisch gebunden hat [76]. ESL-1 zeigt keine Bindungsaffinität zu den anderen Selektinen [77]. Die genaue Strukturaufklärung erbrachte nur fünf Glykosylierungsstellen in diesem Molekül [78]. Im Gegensatz zu L-Selektin und PSGL-1, die durch ihre exponierte Lokalisation auf den Spitzen der Mikrovilli das Tethering und Rollen initiieren, wird ESL-1 im Randbereich der Mikrovilli exprimiert [79], was auf eine spätere Funktion des E-Selektins im Rollprozeß zur Verlangsamung der Leukozyten hinweist. Während die Bindungsaffinität des E-Selektins zum ESL-1 nicht eindeutig strukturell erklärbar ist, wurden andere hochaffine Strukturen auf Neutrophilen identifiziert, die mit ihrer tetraantennären Präsentation von Sialyl Lewis^X ein multimeres Bindungsprinzip als Affinitätsursache nahelegen [80].

Zusammenfassend betrachtet verdeutlichen die Selektin-Liganden kein klares Wirkprinzip zum Erhalt einer hohen Bindungsaffinität. Die räumlich konzentrierte Präsentation der Bindungssepitope an den Mucinen (sog. Cluster) und die daraus resultierende Multimerisierung der Bindungen muß neben einfachen Variationen der Bindungssepitope (Sulfatierungen) als die wahrscheinlichste Ursache für die hohe Bindungsaffinität angesehen werden.

Ungeklärt ist darüberhinaus, inwieweit lipid-verankerte Bindungs epitope (fucosylierte Monosialoganglioside), die aus verschiedenen Leukozyten isoliert werden konnten [81,82], eine physiologische Ligandenfunktion der Selektine erfüllen und strukturell in den Rollprozeß eingreifen können.

2.1.2.3. Signalfunktionen der Selektine

Die Adhäsionskaskade der Leukozyten ist ein hochregulierter Prozeß der ineinandergreifenden Aktivierung verschiedener Adhäsionsrezeptoren. Es ist daher anzunehmen, daß die Selektine als Initiatoren der Adhäsionskaskade mit den nachfolgenden Rezeptoren der Integrin- bzw. Immunoglobulinfamilie kommunizieren und somit zu deren Aktivierung beitragen. Dabei sollten die Selektine und Selektinliganden auf den Leukozyten mit ihrer Bindung die Integrine der β 2-Familie aktivieren, zusätzlich müßten die endothelialen Selektine die Bildung interzellulärer Zwischenräume zur Leukozytenmigration steuern. Die bisherigen Untersuchungen zur Signalfunktion der Selektine zeigen erst Ansätze zum Verständnis dieses Gesamtprozesses.

Erste Untersuchungen bewiesen, daß eine L-Selektin-Bindung an humanen Neutrophilen zu einer Erhöhung der zytosolischen freien Kalzium-Konzentration führt [83]. Dieser Prozeß geht auch mit einer Erhöhung der Tyrosinphosphorylierung an verschiedenen Proteinen einher [84]. In anderen Studien konnte die direkte Aktivierung des Integrins Mac-1 an Neutrophilen nach Antikörperbindung an L-Selektin [85] sowie die Beeinflussung der Neutrophilen-Elastizität durch Veränderung der Zytoskelettverankerung nachgewiesen werden [86]. Analoge Effekte konnten in Lymphozyten nach einer Ligandenbindung an das L-Selektin (GlyCAM-1) nachvollzogen werden [70,87]. In gleicher Weise führt auch die Betätigung von PSGL-1-Bindungen an Neutrophilen durch P-Selektin zu einer Stimulierung von Mac-1 und LFA-1. Inwieweit diese Prozesse in einem Zusammenhang stehen und intrazellulär gesteuert werden, ist bisher nicht bekannt.

Bei der Bindung der endothelialen Selektine und deren Signalfunktion scheint das Zytoskelett von großer Bedeutung zu sein. Yoshida et al. bewiesen, daß bei der Bindung von HL-60 Zellen an aktivierten Endothelzellen E-Selektin in der Kontaktzone beider Zellen zur Verstärkung der Bindung konzentriert wird. Dieser Transport wird durch die Verbindung des E-Selektins zum Zytoskelett im Bindungsprozeß realisiert [88]. Die Verbindung der Selektine zum Zytoskelett scheint auch direkt auf die Verformung, und damit die interzelluläre Lückenbildung der Endothelzellen einzuwirken, da bei einer E- bzw. P-Selektin-Bindung die Entstehung sog. stress-fibers des Zytoskeletts zur Öffnung zellulärer Zwischenräume nachgewiesen wurde [13]. Ein intrazelluläres Signal bei der E-Selektin-Bindung ist dabei eine schnelle Dephosphorylierung von Proteinen des zyttoplasmatischen Restes [89].

Trotz zunehmenden Einblicks in die Signalfunktion der Selektine können diese Untersuchungen bisher kein vollständiges Bild dieser komplexen Prozesse zeichnen.

2.1.3. Der molekulare Mechanismus des Selektin-vermittelten Zellrollens

Bereits vor über 100 Jahren wurde das Rollen von Leukozyten entlang der Gefäßwand als eine Erscheinung des Entzündungsprozesses beschrieben. Bevor man zu Beginn der 90er Jahre mit der Entdeckung der Selektine die molekulare Grundlage dieser rezeptorgesteuerten Adhäsionsform aufdecken konnte, wurde das Leukozytenrollen in vielfältigen Untersuchungen phänomenologisch charakterisiert und theoretisiert. Hydrodynamischen Untersuchungen zufolge bewegen sich größere Partikel in einem Poiseuille Flußsystem im Zentrum der Strömung, dies trifft normalerweise auch für Leukozyten zu. Unter Entzündungsbedingungen kommt es durch Vasodilatation, erhöhte Gefäßpermeabilität und teilweise Erhöhung des Hämatokrits zu einer verlangsamten Flußbewegung. Daraus resultierend werden die Leukozyten in die Randzone des Flusses gedrängt [90], Kontakte mit dem Endothel werden ermöglicht. Durch den parabolischen Strömungsquerschnitt innerhalb

der Kapillaren wirkt somit auf die Leukozyten am Rand eine ungleichförmige Kraft, aus der ein Drehmoment auf die Leukozyten resultiert. So ist erklärlich, daß sich auch unter Normalbedingungen ohne Entzündungsmediatoren eine Anzahl von Leukozyten (bis zu 40%) rollend entlang der Gefäßwand bewegt, wobei dies aber keine feste Adhäsion zur Folge hat. Die Strömungscharakteristik wird auch entscheidend durch den Gefäßdurchmesser und den Einfluß der Erythrozyten bestimmt [91,92]. Da das Rollen ausschließlich in Venolen, nicht aber in Arteriolen zu beobachten ist, sind neben den Scherbedingungen des Blutes auch strukturelle Faktoren des Endothels von entscheidender Bedeutung.

Mit der Definierung der Rolle der Selektine erkannte man den Zellroll-Vorgang als eine auf diese Strömungstheorie aufbauende Sonderform der rezeptorvermittelten Adhäsion, die aus dem Zusammenwirken spezieller struktureller und Bindungseigenschaften der Selektine und ihrer Liganden resultiert. Mit einer Vielzahl von in vivo- und in vitro-Untersuchungen sollte der molekulare Mechanismus der Selektinwirkung aufgeklärt werden.

Bei den in vivo-Studien sollte durch gezielte Blockierung einzelner Selektinarten mittels Antikörper oder durch Nutzung Selektin-defizienter Tiere der Beitrag von L-, P- und E-Selektin am Rollprozeß verdeutlicht werden.

Verschiedene in vivo-Experimente bewiesen, daß am Prozeß des Leukozytenrollens alle drei Selektine beteiligt sind [93,94]. Während das homing von Lymphozyten an HEV ausschließlich durch L-Selektin vermittelt wird, ist das Zusammenwirken aller drei Selektine für die Extravasation der Neutrophilen im Entzündungsgebiet essentiell. Dies konnte durch Antikörper-Blockierung in verschiedenen Extravasationsstudien bewiesen werden [95,96]. Einen ergänzenden Einblick in die Rolle der Selektine ergaben Studien mit Selektin-defizienten Mäusen. In L-Selektin-Mutanten ist sowohl die Extravasation wie auch das Rollverhalten der Leukozyten deutlich unterdrückt [97]. So zeigen auch P-Selektin-defiziente Mäuse eine reduzierte Neutrophilen-Emigration in das Peritoneum und vermindertes Rollen in der Frühphase der Entzündung (1-2h) [98]. Da das Fehlen des E-Selektins zu einem Ausfall der langsam rollenden Granulozyten führt, unterstreicht dies die Rolle des E-Selektins in der späteren Phase der Entzündung als Überleiter zur festen Adhäsion [99,100]. Doppelt mutante Mäuse mit fehlendem E- und P-Selektin zeigen chronisch entzündliche Erkrankungen, was die ineinandergreifende Funktion dieser beiden Selektine demonstriert. Diese Befunde wurden von Bullard und Beaudet [101] tabellarisch folgendermaßen zusammengefaßt.

Mutation	Gesamt-zustand	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 Selektindefizienz bei Mäusen auf entzündungsrelevante Parameter

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß diese in vivo-Untersuchungen den Beitrag der einzelnen Selektine am Rollprozeß ausgezeichnet unter physiologischen Bedingungen und mit Realitätsnähe verdeutlichen, jedoch können so keine Minimalanforderungen des Rollvorganges und keine mechanistisch/physikalischen Hintergründe aufgeklärt werden. An dieser Stelle setzen verschiedene in vitro-Studien ein.

Durch Nutzung isolierter Selektine oder Liganden in simulierten Scherfeldern können minimale Rollbedingungen definiert und die biophysikalischen Hintergründe der Selektinwirkung beleuchtet werden. Als Ergebnis dieser Studien konnte festgestellt werden, daß die Fähigkeit der Selektine zur schnellen Ausbildung und Dissoziation der Bindungen zu ihren Liganden, forciert durch die hohe Flexibilität und Dehnbarkeit dieser Strukturen im Scherstrom die molekulare Grundlage des Rollprozesses darstellt. Im einzelnen konnten viele Einflußparameter verdeutlicht werden.

Bereits 1991 konnten Lawrence und Springer zeigen, daß Neutrophile in einem Scherfeld auf immobilisiertem P-Selektin, nicht aber auf Integrinen rollen. Durch Modifizierung der Selektindichte oder des Schergrades konnten durch Auswertung der Rollgeschwindigkeit wichtige Rollparameter aufgezeichnet werden [102]. Analoge Untersuchungen mit E-Selektin wurden später von den gleichen Autoren veröffentlicht [103]. In einer vergleichenden Studie konnten Puri et al. 1997 zeigen, daß unter analogen Bedingungen (Scherkräfte, Liganden- bzw. Rezeptordichte) das L-Selektin-vermittelte Rollen mit 50–100 $\mu\text{m/s}$ ca. 7,5-10,5-fach schneller als das durch E- oder P-Selektin-vermittelte Rollen von Neutrophilen ist [104], wobei sich diese Unterschiede nicht in den initialen Tetherereignissen niederschlagen. Diese Befunde, die auch die Rolle der einzelnen Selektine im Rollprozeß widerspiegeln, müssen durch die kinetischen Bindungseigenschaften erklärt werden. Die dynamischen *in vitro*-Untersuchungen mit isolierten Selektinen eröffnen die Möglichkeit, kinetische Bindungseigenschaften zu bestimmen. Alon et al. konnten dies erstmals für immobilisiertes P-Selektin realisieren [105]. Er analysierte das Tether- und Rollverhalten von Neutrophilen an Schichten mit minimalen P-Selektin-Konzentrationen, um das Bindungsverhalten auf einzelne Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen abstrahieren zu können. Durch Variation der Scherkräfte und Analyse der Tetherhäufigkeit und –schrittweite erhielt er rechnerisch Daten für die Dissoziationskonstante k_{off} . Er konnte damit beweisen, daß mit einem k_{off} von $0,95 \pm 0,17 \text{ s}^{-1}$ und einer Assoziationskonstante k_{on} von $1,5 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ die sehr schnelle Bindungsbildung und –dissoziation die Ursache für die Rollbewegung darstellt.

Da sich die Dissoziationskonstante k_{off} nicht linear mit einer Erhöhung der Scherbelastung ändert, weist dies auch auf die Bedeutung der elastischen Dehnbarkeit der Bindungspartner hin. Mit der gleichen Verfahrensweise analysierten Alon et al. die kinetischen Bindungsdaten aller drei Selektine [106]. Dabei berücksichtigten sie zusätzlich, daß beim Rollverhalten durch die Selektine zwei unterschiedliche Bindungscharakteristika von Bedeutung sind. Einerseits muß die reine Bindungskinetik der Selektine ohne angewandte Kraft (intrinsische Bindungskinetik), andererseits auch die Veränderung der Bindungskinetik in Abhängigkeit der angelegten Scherkräfte (reactive compliance) berücksichtigt werden. Da sie in dieser Studie fanden, daß die intrinsische Dissoziationskonstante des L-Selektins (6,6-8,0 s^{-1}) ca. 7-10fach größer gegenüber der des E- und P-Selektin ist, fanden die Daten von Puri et al. über das schnellere Rollen an L-Selektin [104] darin ihre Begründung. Die Veränderung der Dissoziationskonstante durch angelegte Scherkräfte (reactive compliance) hingegen ist bei allen Selektinen ähnlich.

Nicholson et al. bestätigten kürzlich in einem zellfreien dynamischen Bindungsassay die schnelle Assoziations- und Dissoziationskinetik des L-Selektins zu seinem Liganden GlyCAM-1 ($k_{\text{on}} \geq 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; $k_{\text{off}} \geq 10 \text{ s}^{-1}$) [107]. Mit ebenfalls isolierten Bindungsstrukturen (P-Selektin und PSGL-1) konnten Fritz et al. über Atomic Force Mikroskopie-Technik (AFM) Bindungsstärken und deren Zeitabhängigkeit bestimmen [108]. Die daraus ermittelten Dissoziationskonstanten des P-Selektins von 0,02 bis 15 s^{-1} in Abhängigkeit der angelegten Kräfte befindet sich in Übereinstimmung mit den Werten von Alon [106].

Weiterhin wurde der Einfluß der schnellen proteolytischen Spaltung des L-Selektins von aktivierten Neutrophilen (Shedding) auf das Zellrollen untersucht und als Rollvoraussetzung definiert, da eine Unterdrückung der Proteolyse zur Rollverlangsamung und festen Adhäsion führte [109]. Allport et al. widersprachen mit einer Neutrophilen-

Rollstudie an Endothelzellen dieser Theorie [110]. Moghadam und Ley konnten aber letztendlich beweisen, daß eine Unterdrückung des L-Selektin-Sheddings tatsächlich zu einer Rollverlangsamung führt, diese aber in Anwesenheit von E-Selektin nicht mehr detektierbar ist [111]. Von gleicher Relevanz ist die Frage, ob das L-Selektin durch die Scherkräfte im Bindungsprozeß aus der Leukozytenmembran herausgerissen werden kann. Shao und Hochmuth bewiesen, daß das L-Selektin mit seiner Zytoskelettverankerung Scherkräften bis 45 pN widersteht. Da dieser Kräftewiderstand mit der Zeitdauer indirekt korreliert, ist durch die rapide Bindungskinetik des L-Selektins ein Herausreißen aus der Membran im Rollprozeß auszuschließen [112].

Die Tatsache, daß das Rollen ein stabil ausbalancierter dynamischer Gleichgewichtsprozeß der Bindungsbildung und Dissoziation der Selektine innerhalb großer physiologischer Grenzen ist, beweisen auch die Studien von Chen et al., die anstelle der Selektine oder Liganden die korrespondierenden bindenden Antikörper für Rolluntersuchungen immobilisierten [113]. Obwohl für diese Untersuchungen die mechanisch/elastischen Eigenschaften der Strukturen, wie z.B. des L-Selektins oder PSGL-1 an den Neutrophilen unverändert waren, kam es durch die veränderte Bindungskinetik zu den Antikörpern nicht zu einem Zellrollen sondern hauptsächlich zur festen Adhäsion. Aber auch die Flexibilität und Länge der Selektine ist für die Rollvermittlung entscheidend. Patel et al. konnten an P-Selektin Mutanten zeigen, daß mit der Verkürzung der Moleküllänge durch Reduzierung der SCR von 9 auf 4 die Fähigkeit zur Rollvermittlung endet [114]. Die Veränderungen in der Elastizität der Bindungspartner scheinen stärker tolerierbar zu sein, da ein Rollen Selektin-exprimierender Zellen auf Schichten ungeordneter sLe^x und sLe^a-Neoglykolipide detektierbar war [115].

Weiterhin wurden die räumlichen Verhältnisse der Bindungspartner in der Zone des Zellkontaktes analysiert. Dabei konnte man feststellen, daß die Microvilli der Leukozyten mit ihren darauf exponiert präsentierten Bindungsstrukturen (L-Selektin, PSGL-1) für den Rollprozeß von essentieller Bedeutung sind. Eine Reduzierung oder das vollständige Einschmelzen der Microvilli durch Zytoskelettzerstörung oder osmotisches Schwellen von Neutrophilen verhinderte vollständig das Tethering und verlangsamte die Rollgeschwindigkeit bis zur festen Adhäsion [116,117]. Daraus ergibt sich, daß der Rollprozeß kein fließendes Rollen ist, sondern im schrittweisen Rhythmus der Microvillikontaktaufnahme und -lösung stattfindet. Shao et al. untersuchten das Verhalten von Microvilli auf Neutrophilen unter Scherbelastung. In Abhängigkeit der angelegten Scherkräfte kommt es zu einer elastischen Ausdehnung der Microvilli, die bei Überschreitung bestimmter Scherkräfte zu einer fadenförmigen Verlängerung (definiert als Tether) führt [118].

Legt man zugrunde, daß ein Microvilli eine Gleichgewichtslänge von ca. 350 nm besitzt und die ca. 250 Microvilli pro Neutrophilen (Durchmesser ca. 8,5 µm) in einer Dichte von ca. 1,1 Microvilli/µm² resultieren [118], kommt man rechnerisch zu einer Schrittweite von ca. 1,7 µm von aufeinanderfolgenden Microvilli-Kontakten mit dem Untergrund [119]. Diese Schrittweite stimmt mit den videomikroskopisch detektierten Rollschritten von Neutrophilen bei geringem Scherstreß gut überein [119].

Bei all den vorab beschriebenen in vitro-Studien wurde weiterhin deutlich, daß mit einem linearen Ansteigen des Scherstromes die Rollgeschwindigkeit nur anfangs mit einem linearen Anstieg folgt, um dann über große Bereiche der Scherkraftzunahme auf einem Geschwindigkeitsplateau zu verbleiben. Da dieser Plateauverlauf dem Anstieg der Dissoziationskonstanten aller drei Selektine mit Scherzunahme widerspricht, muß ein Mechanismus den Rollprozeß über weite Bereiche stabilisieren. So konnten kürzlich die experimentellen Beweise erbracht werden, daß sich mit einer zunehmenden Scherbelastung Leukozyten abflachend deformieren und damit die Kontaktfläche zum Endothel vergrößern [119]. Die daraus resultierenden verstärkten Wechselwirkungen wirken dem erhöhten

Scherstreß ausgleichend entgegen, so daß bis zu einem Abreißpunkt die Rollgeschwindigkeit annähernd gleich bleibt.

Bei sehr geringen Scherbedingungen weist der Rollvorgang eine Besonderheit auf. Bei Unterschreitung eines minimalen Scherwertes (sog. Threshold phenomenon) finden keine Rollkontakte mehr statt [120,121]. Mechanistisch kann dies mit der fehlenden Korrelation der Bindungsdauer mit den Microvillisschritten oder mit einer fehlenden Zellabflachung zur Kontaktbildung interpretiert werden. Dieses Phänomen wird als Sicherheitsschritt vor zufälligen Aktivierungen der Adhäsionskaskade insbesondere der sekundären Tetherereignisse angesehen, da in Geweben und Organen häufig starke Unterschiede im kapillaren venösen Blutfluß existieren.

Aus all diesen Untersuchungen resultiert ein mechanistisches Grundverständnis der molekularen Selektinwirkung beim Leukozytenrollen. Den räumlichen Aspekten der Ligandenpräsentation wurde in diesen Untersuchungen jedoch keine besondere Aufmerksamkeit geschenkt, so daß die bereits erläuterten Fragen nach der Bedeutung eines multivalenten Bindens nicht geklärt werden konnten.

Da die meisten Studien an Neutrophilen durchgeführt wurden, sind nicht alle Details automatisch auf alle Leukozytensubtypen zu übertragen. Deren generelle Homologie und individuelle Unterschiede demonstriert eine Studie von Reinhard und Kubes [122], die über immobilisierte Selektine und Integrine bei verschiedenen Scherbedingungen Gesamtblut strömen ließen und die jeweilig adhärirten Leukozyten-Subpopulationen analysierten. Dabei erweisen sich die Neutrophilen als die am stärksten adhärirten Leukozyten unter starkem Scherfluß.

2.1.4. Physikalische Parameter und mathematische Modellvorstellungen zur Beschreibung des Leukozytenrollens

Für eine qualitative und quantitative Analyse der Selektinwirkungen müssen einige grundsätzliche physikalische Parameter der Rheologie des Blutflusses bekannt sein. Normalerweise gehorcht ein laminarer Fluß einer Newtonschen (nichtkomprimierbaren) Flüssigkeit in einer Röhre (Blutgefäß) dem Poiseuille'schen Gesetz welches besagt, daß die Volumenflußrate proportional zur Druckdifferenz zwischen Anfang und Ende einer Röhre und zur 4. Potenz seines Radius und indirekt proportional zur Länge der Röhre und der Viskosität des Mediums ist. Durch die hohe Anzahl von Zellen (Erythrozyten) ergeben sich im Blut quasi Viskositätsinhomogenitäten, so daß Blut als Nicht-Newtonsche Flüssigkeit rheologische Besonderheiten aufweist. Da die Erythrozyten im Zentrum der Gefäße strömen, erhöht dies die zentrale Viskosität deutlich und führt zur Bildung zellfreier Randbereiche. Daraus ergeben sich um ca. 2,1fach höhere Geschwindigkeitsgradienten vom Gefäßzentrum zum Rand im Vergleich zu einer Newtonschen Flüssigkeit [123].

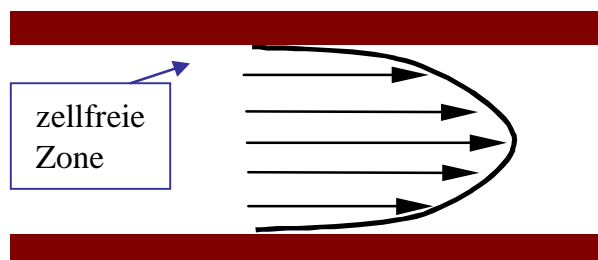


Abb.3: Geschwindigkeitsprofil des Blutes in einer Kapillare

In den postkapillaren Venolen mit ihren Durchmessern von ca. 10 bis 30 μm können die deformierbaren Erythrozyten die Leukozyten in die Randzone des parabolischen

Strömungsverlaufes drängen [124]. Dieser Einfluß wird aber erst besonders unter Entzündungsbedingungen evident. Dabei kommt es durch die erhöhte Gefäßpermeabilität und Vasodilatation zu einer Veränderung des Geschwindigkeitsprofils, wodurch die Leukozyten verstärkt in die Randzonen verdrängt werden. Dieser forcierende Einfluß der Erythrozyten auf die Entstehung von Leukozyten-Endothel-Kontakten konnte durch den simulierenden Vergleich von in vitro- und in vivo-Experimenten verdeutlicht werden [125]. Aus dem parabolischen Strömungsverlauf ergeben sich deutliche Geschwindigkeitsunterschiede innerhalb der Gefäße in Abhängigkeit der radialen Lage, diese können zu einer mittleren Blutflußgeschwindigkeit v_b gemittelt werden. Leukozyten im Randgebiet weisen ohne Kontakte und Bindungen dementsprechend eine minimale (kritische) Geschwindigkeit v_{crit} auf, bei deren Unterschreitung von Adhäsionsvorgängen ausgegangen werden kann.

Als Parameter dieses Geschwindigkeitsprofils dient der Schergrad, der als Gradient der Flußgeschwindigkeit in axialer Richtung zur radialen Lage definiert ist und in s^{-1} (Geschwindigkeit pro Längeneinheit) angegeben wird. Der Schergrad ergibt sich aus den geometrischen Verhältnissen des durchströmten Raumes.

Für Blutgefäße kann der Schergrad nach

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

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

$$G = 6 Q / b h^2 \quad \text{Gleichung 2}$$

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

Der Scherstreß τ_w hingegen definiert eine Scherkraft, die auf eine bestimmte Flächeneinheit der Gefäßwand wirkt.

Die Kraft wird in Pa, dyn/cm^2 ($1\text{Pa} = 10 \text{dyn/cm}^2$) oder Nm^{-2} angegeben und ist direkt proportional zum Schergrad. Beide Parameter stehen über die Viskosität des Mediums miteinander in Verbindung (Viskosität in centipoise = $0,01 \text{dyn s/cm}^2$). Sie wird nach

$$\tau_w = \eta dv/dr \quad \text{Gleichung 3}$$

berechnet, wobei η die Viskosität des Mediums bezeichnet.

Mit diesen Erkenntnissen wird erklärbar, daß auf einen Leukozyten an der Gefäßwand aufgrund des Scherprofils keine gleichmäßige Kraft sondern ein zum Zentrum des Gefäßes hin zunehmender Kräfteverlauf wirkt, der den Leukozyten in eine Rollbewegung versetzt.

Zur Berechnung einer über die Angriffsfläche an Körpern gemittelten Kraft im Scherstrom kann

$$F = 32 \eta r^2 G \quad \text{Gleichung 4}$$

genutzt werden [126], wobei η wiederum die Viskosität des Mediums, r der Zellradius und G den Schergrad beschreibt. Diese Gleichung leitet sich indirekt von Untersuchungen durch Goldman [127] über das Rollverhalten fester Kugeln an Oberflächen ab. Größtmäßig ergibt dies für Leukozyten eines Radius von $4 \mu\text{m}$ und einer Viskosität des wässrigen Mediums von ca. $0,001 \text{Pa s}$ eine Näherung von $F = 0,5 G$ [pN], was bei den Schergraden der postkapillaren Venolen ca. 100 bis 250pN entspricht.

Aufbauend auf solchen physikalischen Grundparametern wurde versucht, mathematische Modelle zur Beschreibung des Zellrollens zu erstellen. Die bisher beschriebenen mathematischen Modelle lassen sich prinzipiell durch ihre unterschiedliche Herangehensweise in phänomenologische Modelle und stochastische Modelle unterteilen.

Bei den phänomenologischen Modellen steht das Verhalten von Einzelzellen in ihrem Bindungsverhalten an Oberflächen durch Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen im Vordergrund. Unter Definierung bestimmter Ausgangsparameter (ebene Zelloberfläche mit einer konstanten Kontaktfläche homogener Kräfteverteilung) gewinnen diese Modelle eine hohe Anschaulichkeit über die Kräfte auf die Zelle beim Rollen und über die Randparameter des Rollprozesses [128]. Da das Modell aber den Einfluß der Zellform und der Oberfläche (Microvilli) unberücksichtigt läßt und damit sehr starke Abstraktionen eingeht, kann es keine echte Erklärung des Zellrollprozesses liefern.

Bei dem stochastischen Modell löst man sich von der exakten Beschreibung des Rollens einzelner Zellen, um durch die Analyse einer großen, und statistisch auswertbaren Anzahl von Rollzellen über wenige qualitative Parameter im mikroskopischen Bild den Rollprozeß zu beschreiben [129]. Dieses Modell ist weniger anschaulich, es kann aber durch stochastische Mittlung auch komplizierte mathematische Zusammenhänge erfassen. Die Analyse der Bewegung zeigte, daß das Zellrollen keine gleichförmige Bewegung, sondern ein schneller Wechsel von Bewegungs- und Stoppphasen ist. Dies wird mit der diskontinuierlichen Oberfläche der Leukozyten durch die Microvilli erklärbar, die durch Bindungsbildung und –lösung den Schrittwechsel vorgeben. Trotz dieser realen Bewegungsbeschreibung kann das Modell keine Randbedingungen bestimmen und keine Vorhersagen des Zellrollens treffen.

Beide Modelle erbringen trotz ihrer Einschränkungen einen Erkenntnisgewinn zum Verständnis des Zellrollprozesses, durch ihre grundsätzlich unterschiedlichen Herangehensweisen ergänzen sie sich aber nicht zu einem Gesamtbild.

In unserer Arbeitsgruppe wurde durch Bandulik [130] aufbauend auf dem dynamischen Modell eine mathematische Simulation vorgenommen, die die Zelldeformation im Scherfeld der Gefäße berücksichtigt. Dabei wird die Kontaktfläche der Zelle mit dem Untergrund nicht wie im dynamischen Modell als unveränderliche Kreisfläche, sondern als veränderliches Oval entsprechend der durch Scherkräfte tropfenförmigen Verformung der Zelle angenommen. Durch Einbeziehung eines auf die Zellen wirkenden Drehmomentes ergibt sich, daß die Kräfteverteilung auf die Einzelbindungen innerhalb der Kontaktfläche nicht gleichförmig sind. Während die den Scherkräften zugewandten (hinteren) Bindungen sehr hohen Kräften ausgesetzt sind, werden die vorderen Bindungen ohne Scherbelastung zu neuen Bindungspartnern „geschoben“. Da die Kräfte auf die Einzelbindungen nach Bell [131] auch direkt mit der Dissoziationskonstante nach

$$k_{\text{off}} = k_{\text{off } 0} e^{\frac{\gamma F_b}{k_b T}} \quad \text{Gleichung 5}$$

im Zusammenhang stehen ($k_{\text{off } 0}$ Dissoziationskonstante ohne äußere Krafteinwirkung; γ dimensionsloser Koeffizient für die Bindungslänge Ligand-Rezeptor; F_b Kraft auf eine Einzelbindung, k_b Boltzmannkonstante; T Temperatur), ergibt sich damit eine ungleichförmige Verteilung der Dissoziationskonstante über die Kontaktfläche.

Mit dieser Modellierung und der Berücksichtigung der Kräfteverteilung lassen sich die Ursachen einer Rollbewegung anschaulich verdeutlichen. In weiteren Arbeiten sollen diese Simulationen durch Einbeziehung experimenteller Daten auf wahre Zahlenwerte übertragen werden.

2.2. Selektine als Zielstruktur für die pharmazeutische Forschung

2.2.1. Pathologische Expression von Selektinen

Eine lokal überschießende Akkumulation von Leukozyten im Gewebe kann zur Pathogenese von Entzündungsreaktionen beitragen. Durch ihre zentrale Rolle bei der Adhäsion und Extravasation der Leukozyten kann eine Dysregulation der Selektine bei einer Anzahl entzündlicher Erkrankungen bzw. Autoimmunerkrankungen wie z. B. der myokardialen Ischämie oder der rheumatoiden Arthritis beobachtet und auch für diese mitverantwortlich gemacht werden.

Im Gefolge einer myokardialen Ischämie kann es nach Wiederherstellung der Gefäßdurchblutung (Reperfusion) zu einer pathologisch akuten Entzündungserscheinung kommen, bei der Leukozyten stark in das Gewebe invadieren [132]. Da das therapeutische Ziel nach einem Infarkt in einer schnellstmöglichen Beseitigung der Ischämie durch Thrombolyse und/oder Angioplastie besteht, müssen zur Risikominimierung Entzündungsprozesse in den geschädigten Arealen unterdrückt werden. Es konnte gezeigt werden, daß es durch hohe Konzentrationen freier Sauerstoffradikale in den Endothelzellen zu einer verstärkten Expressierung und verlangsamten Endozytose von P-Selektin kommt [133]. Mit einer gezielten Blockade der Selektine ergeben sich neuartige Ansatzpunkte zur Unterdrückung pathologischer Entzündungserscheinungen und zur Reduzierung der Infarktschäden. In verschiedenen in vivo-Untersuchungen konnte dies mit Selektinantikörpern [134] oder ligandhaltigen Liposomen als kompetitiven Antagonisten bewiesen werden [135]. Die Rolle des E- und P-Selektins bei der pathologischen Entzündung nach renaler bzw. hepatischer Ischämie und Reperfusion bzw. nach hämorrhagischem Schock konnte ebenfalls verdeutlicht werden [136-138].

Die rheumatoide Arthritis ist die häufigste chronisch entzündliche Systemerkrankung des Bindegewebes, von der ca. 2-3% der Bevölkerung betroffen sind. Die autoimmun entstandenen Rheumafaktoren bilden mit Antikörpern sogenannte Immunkomplexe, die eine starke Infiltration von phagozytierenden Leukozyten in die Synovialis auslösen. Durch freigesetzte Entzündungsmediatoren wird ein chronischer Entzündungsprozeß forciert. Obwohl die molekularen Mechanismen hierbei nicht so intensiv wie bei der Ischämie/Reperfusion untersucht wurden [139], konnte doch eine starke Anreicherung von E-Selektin im rheumatoiden Gewebe und damit dessen aktive Rolle in der Pathogenese aufgeklärt werden [140].

Den Selektinen wird weiterhin eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Atherosklerose zugeordnet. Die Atherosklerose ist als eine entzündlich-fibrotische Antwort auf die Akkumulation von cholesterolreichen Lipoproteinen in der Gefäßwand anzusehen. Die dabei auftretende Gewebeinvasion von Monozyten wird entscheidend durch P-Selektin vermittelt, welches, durch oxidiertes Low Density Lipoprotein (ox. LDL) induziert, verstärkt von den Endothelzellen exprimiert wird. Die verstärkte Expressierung 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 bewiesen werden [141,142].

Selektine spielen bei einer Anzahl weiterer entzündlicher Erkrankungen eine wichtige Rolle. So konnte deren Beteiligung an den diabetischen Gefäßschädigungen (Angiopathie) nachgewiesen werden. Durch dauerhaft erhöhte Glucosekonzentrationen kommt es zu oxidativem Streß für die Endothelzellen, der zur Expressierung von E-Selektin und anderen Adhäsionsrezeptoren und somit zur Bindung und Infiltration von Monozyten führt [143]. Im molekularen Mechanismus der Endothelzellaktivierung spielen sogenannte Advanced Glycation Endproducts (AGE) eine besondere Rolle, die als irreversible Produkte der Reaktion von Glucose mit Aminogruppen der Proteine durch Bindung an spezielle

Oberflächenrezeptoren den Transkriptionsfaktor κB aktivieren [144] und somit die Exprimierung der Selektine auslösen [145].

Neben ihrer Rolle in der Pathogenese verschiedener Entzündungserscheinungen sind Selektine ein wichtiger Faktor im Metastasierungsprozeß bei Krebserkrankungen. Trotz individueller herkunftsabhängiger Unterschiede der Krebszellen vermitteln die Selektine die Bindung verschiedener metastasierender Krebszellen aus dem Blutstrom an das Gefäßendothel und die anschließende Gewebeinvasion. Eine Verallgemeinerung bezüglich des Bindungsmechanismus und der beteiligten Bindungspartner kann aber auf Grund der Differenziertheit der unterschiedlichen Krebszellen nicht getroffen werden. Die Befunde wurden von Krause und Turner zusammengefaßt [146]. Ganz offensichtlich aber fungieren die auf den Krebszellen vorkommenden glykosylierten Strukturen (neben sLe^x insbesondere das Isomere sLe^a) als Selektinliganden. Dies konnte in einer Anzahl von in vitro- und in vivo-Untersuchungen durch gezielte Blockade der Selektine verdeutlicht werden. Während die Tatsache, daß Brust- und Colonkrebszellen über E-Selektin am Endothel binden und damit die Metastasierung einleiten, relativ gesichert erscheint [147-149], wurden für andere Krebszellarten auch abweichende Befunde erstellt. So wird der Beitrag des P-Selektins oder die Struktur der Glykoside in vielen Veröffentlichungen unterschiedlich diskutiert [150,151]. In nur einigen Experimenten konnte auch ein Rollen der Krebszellen verdeutlicht werden [152]. Die molekularen Mechanismen der Selektinaktivierung, sowie mögliche Signaltransduktionsmechanismen zur Vermittlung der Gewebeinvasion sind noch nicht aufgeklärt.

Aufgrund ihrer zentralen Rolle im pathologischen Entzündungsgeschehen bieten die Selektine einen völlig neuartigen Angriffspunkt für eine systematische antiinflammatorische Therapie.

In der bisherigen Behandlung chronischer oder autoimmun entstandener Entzündungen versucht man, die Entzündungssymptome wie Schmerz oder Fieber zu unterdrücken oder abzuschwächen. Die dabei eingesetzten nichtsteroidalen Antiphlogistika (NSAP) sind aber mit verschiedenen Nebenwirkungen behaftet und können, wie im Falle der Rheumatoiden Arthritis die Degenerierung der Gelenke nicht aufhalten. Fortschritte werden dabei durch neuere und selektiv wirkende NSAP (COX-2 Inhibitoren) erreicht [153]. Einen systematischen Eingriff in den Entzündungsfortgang bietet die Unterdrückung von proinflammatorischen Zytokinen. Dafür wurden in neuester Zeit Substanzen zur Hemmung des TNF- α (der lösliche TNF- α Rezeptor Etanercept oder der TNF- α -Antikörper Infliximab) zur Therapie der chronischen Polyarthritiden zugelassen [154,155] und verschiedene Mechanismen der Hemmung des IL-1 untersucht [156].

Mit einer gezielten Blockade der Selektine könnte direkt und systematisch auf den Prozeß der Leukozyten Chemotaxis Einfluß genommen werden. Die Attraktivität der Nutzung der Selektine als Targetstruktur für neuartige antiinflammatorische Stoffe widerspiegelt sich in den intensiven Bemühungen bei der Suche nach kompetitiven Selektininhibitoren. Diese soll im folgenden an verschiedenen Beispielen demonstriert werden.

2.2.2. Suche nach kompetitiven Selektininhibitoren als potentielle Wirkstoffe

Aufgrund seiner nachgewiesenen Bindungsfähigkeit zu allen drei Selektinen fungiert das Tetrasaccharid Sialyl Lewis^x als zentrale Leitsubstanz für die Suche nach selektininhibierenden Stoffen. Aufbauend auf den Röntgenstrukturdaten des E-Selektins [23] und verschiedenen NMR-Untersuchungen des gelösten bzw. am E-Selektin gebundenen sLe^x [157,158] konnten die für die Bindung essentiellen Strukturelemente verdeutlicht werden. So sind an der Bindung der Lektindomäne der Selektine die negative Ladung der Sialinsäure, sowie die 2-,3- und 4-ständige Hydroxygruppe der Fucose sowie die 6-ständige Hydroxygruppe der Galaktose direkt beteiligt.

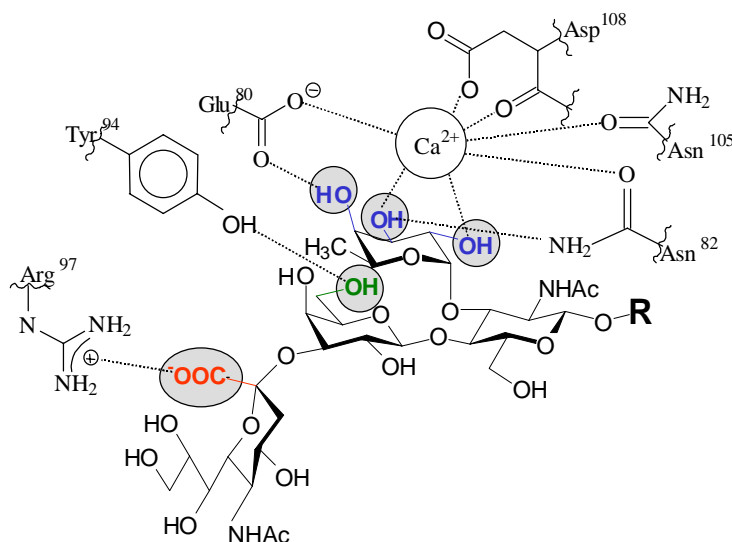


Abb. 4: Darstellung des Sialyl Lewis^x mit seinen für die Selektinbindung essentiellen pharmakophoren Gruppen

Mit einer Vielzahl von strukturellen Abwandlungen unter Beibehaltung dieser Strukturmerkmale versuchte man, zu besser bindenden Selektininhibitoren zu gelangen. Nachteile bei der Nutzung von glykosidischen Inhibitoren sind der komplexe Syntheseweg, die hydrolytische Instabilität dieser Substanzen und deren relativ geringe Bindungsaffinität. Deshalb versucht man, abstrahierend auf die essentiellen Strukturmerkmale des sLe^x stabilere und leichter herzustellende Glykoside zu gewinnen. Diese reduktionistische Herangehensweise soll im folgenden kurz an ausgewählten Beispielen verdeutlicht werden. Für eine umfangreiche Übersicht über synthetische Selektininhibitoren sei auf Shimanek [159] verwiesen.

I. Die einfachste synthetische Modifizierung des sLe^x besteht im Ersatz der negativ geladenen Sialinsäure durch einfachere, negativ geladene Strukturelemente. So sind Derivate mit einer Sulfatierung, Phosphorylierung bzw. Carbonsäurealkylierung am C3 der Galaktose beschrieben. Diese strukturelle Vereinfachung brachte ähnliche Bindungsergebnisse wie das sLe^x selbst [160,161].

II. Eine stärkere strukturelle Vereinfachung besteht im Ersatz der N-acetylierten Glucose, die keinen Bindungsbeitrag leistet, sondern nur für die optimale Ausrichtung der Gesamtstruktur verantwortlich ist. Der Ersatz der Glucose durch Alkandiole oder Cyclohexandiole ohne [162] oder mit gleichzeitiger Sialinsäuresubstitution [163] erbrachte verschiedenartige Derivate, die vereinzelt auch die Wirkstärke des sLe^x übertreffen.

Der gleichzeitige Ersatz von Glucose und Galaktose führte zwar zu einer Anzahl von rigiden und stabilen Fucose-Sialinsäure-Derivaten, die aber aufgrund der fehlenden

Bindungsbeteiligung der Galaktose-6-Hydroxygruppe keine Wirkverbesserung aufwiesen [164,165].

III. Die zahlenmäßig größte Gruppe von getesteten sLe^x-Analoge besteht aus Monosaccharidverbindungen, bei denen unter Beibehaltung der Fucose oder Nutzung von Mannose die anderen essentiellen Bindungsepitope durch nichtglykosidische Strukturen im Molekül ersetzt wurden. Die Mannose-basierenden Verbindungen zeigen bestenfalls eine gleiche Bindungsstärke wie das sLe^x zu den Selektinen [166]. Erfolgreicher hingegen sind Verbindungen, bei denen spezielle Peptide an der Fucose den Bindungsbeitrag der Galaktose und der negativen Sialinsäure simulieren. Unter diesen Substanzen weisen einige eine ähnliche, vereinzelt sogar eine deutlich bessere Bindungsaffinität als das sLe^x zu den Selektinen auf [167].

IV. Mit dem Ziel einer Bindungsverstärkung wurde ausgehend vom sLe^x nach zusätzlichen Bindungsepitopen gesucht. Durch Derivatisierung des sLe^x und der korrespondierenden Computersimulation der Bindung an der Lektindomäne konnte festgestellt werden, daß eine hydrophobe Substitution an der glykosidischen Hydroxygruppe oder am Amin des Glucosamins die Bindungseigenschaften deutlich verstärkt. Davon ausgehend wurden neue Derivate mit aromatischen Ringsystemen am Amin oder verzweigt-kettigen Fettsäuren am glykosidischen Rest des Glucosamins getestet, die teilweise eine über zehnfach stärkere Bindung als das sLe^x aufwiesen [168,169].

V. Eine andere Theorie zur Bindungsverstärkung geht von dem summarischen Zusammenwirken mehrerer Einzelbindungen aus, wie es bereits als Multivalenzhypothese als Ursache und Wirkprinzip der natürlichen Selektinliganden diskutiert wurde. Auf dieser Basis wurden verschiedene oligo- bzw. multimere Derivate synthetisiert, in denen eine Anzahl von sLe^x-Molekülen [170] bzw. deren strukturell vereinfachten Glykosiden [171] über unterschiedliche Trägermoleküle räumlich eng in Verbindung stehen. Die dabei erhaltenen, teilweise besseren Bindungswerte im Vergleich zum sLe^x können aber das Multimerisierungs-Prinzip der Bindung als Grundlage einer Affinitätserhöhung nicht schlüssig beweisen. Erschwerend für einen wertenden Vergleich aller synthetisierten Selektininhibitoren wirken sich die unterschiedlichen Testsysteme aus, die von den einzelnen Arbeitsgruppen angewendet werden.

Trotz der enormen Anzahl von synthetisierten Derivaten muß man resümieren, daß die Strategie der Strukturvereinfachung des sLe^x bei gleichzeitiger Affinitätserhöhung zu den Selektinen nur von mäßigem Erfolg getragen ist. Ausdruck dessen ist weiterhin, daß die erste selektininhibierende Substanz in der klinischen Prüfung das nahezu unveränderte sLe^x (als Pentasaccharid in der Phase II) ist. Cytel Corp. plant dessen Einsatz zur Behandlung der entzündlichen Reperfusionerscheinungen nach coronaren By-pass-Operationen.

Neue Impulse erhofft man sich weiterhin von Glykoproteinen, die man den essentiellen Bereichen der natürlichen Selektinliganden nachempfunden hat. So konnte kürzlich ein Glykosulfopeptid mit hoher Bindungsaffinität (350 nM) zum P-Selektin vorgestellt werden, welches dem N-Terminus des PSGL-1 nachempfunden wurde [172]. Auch konnte die entzündungshemmende Wirksamkeit von rekombinanten löslichen Formen des PSGL-1 in in vivo Untersuchungen direkt verdeutlicht werden [173].

2.2.3. Bekannte Arzneistoffe mit möglicher Beeinflussung der Selektine

Obwohl bisher keine Arzneistoffe als direkte kompetitive Inhibitoren der Selektine verfügbar sind, entfalten doch eine Anzahl von bekannten Arzneistoffen eine indirekte Wirkung auf die Selektine. Die Exprimierung der vaskulären Selektine E- und P-Selektin im Entzündungsprozeß wird u.a. durch den Transkriptionsfaktor κ B (NF κ B) beeinflusst. Dieser Transkriptionsfaktor ist auch für die Genregulation einer großen Anzahl weiterer Proteine (Zytokine, Acute phase Proteine, Wachstumsfaktoren und andere Adhäsionsmoleküle)

verantwortlich [174]. Die Hemmung des Transkriptionsfaktors κB ist dementsprechend eine potentielle therapeutische Strategie zur Behandlung von Immun- und entzündlichen Erkrankungen, die somit auch durch die reduzierte Selektinexprimierung ihre Wirksamkeit entfaltet.

Die Aktivierung des NF κB erfolgt über verschiedene Zwischenstufen durch proteolytische Abspaltung von einem Inhibitor. In diese Aktivierungskaskade greifen verschiedene Arzneistoffe hemmend ein, die somit eine anti-entzündliche Wirksamkeit entfalten. Glucocorticoide hemmen den NF κB durch direkte Bindung an das Molekül oder durch Aktivierung seines Inhibitors [175]. Die Acetylsalicylsäure hemmt die NF κB -Aktivierung durch Verhinderung des Einwanderns des Transkriptionsfaktors in den Zellkern oder durch Blockierung des Abbaus des Inhibitors. Für eine umfangreiche Übersicht über den NF κB und dessen medikamentöse Beeinflussung sei auf Rünegeler et al. verwiesen [176].

Neben dem Einfluß auf NF κB entfalten andere Arzneistoffe ihre antiinflammatorische Wirksamkeit ebenfalls über eine Hemmung der Selektine. Von Ibuprofen ist bekannt, daß es das Leukozytenrollen in vivo bei hohen Konzentrationen vermindert [177]. Dies wird durch ein verstärktes Shedding des L-Selektins von den Leukozyten durch Ibuprofen aber auch durch andere NSAP erklärt [178].

Die medikamentöse Therapie der rheumatoiden Arthritis ist mit dem Einsatz der Basisantirheumatika relativ empirisch entstanden. Mit den in den letzten Jahren gewonnenen Erkenntnissen über die Adhäsionskaskade der Leukozyten konnte aber für einzelne Basisantirheumatika ein molekularer Wirkungsmechanismus postuliert werden. So konnte gezeigt werden, daß die durch die Behandlung mit Goldverbindungen verminderte synoviale Expression von E-Selektin das antiinflammatorische Wirkprinzip darstellt [179]. Spätere Untersuchungen zeigten einen differenzierten Wirkungsmechanismus einzelner Goldverbindungen, wobei für Gold-Natrium-Thiomalat ein E-Selektin-unterdrückender Mechanismus bestätigt wurde [180].

2.2.4. Diagnostische Bedeutung der Selektine und ihr Potential als Targetstrukturen für ein Drug Targeting

Nach Vermittlung ihrer entzündungsspezifischen Adhäsionsfunktion wird ein Teil der Selektine proteolytisch von der Zelloberfläche entfernt. Dadurch kommt den Selektinen (neben dem L-Selektin insbesondere dem E-Selektin) auch eine wichtige diagnostische Rolle zu. In einer Vielzahl von Untersuchungen wird die charakteristische Erhöhung von löslichem Selektin im Serum im Verlauf entzündlicher Erkrankungen beschrieben und als ein Indikator genutzt [181,182]. Durch das kommerzielle Angebot von Selektin-ELISA-Testkits gewinnt diese Anwendung in der letzten Zeit zunehmend an Bedeutung.

Eine weitere diagnostische Anwendung beruht auf der Erkenntnis, daß die vaskulären Selektine E- und P-Selektin spezifisch nur an Orten der Entzündung exprimiert werden. Durch Applikation speziell geladener E- oder P-Selektin-Antikörper können diese durch Bindung an den endothelialen Selektinen Entzündungsherde für bildgebende Verfahren markieren [183].

Auf der Basis der spezifischen Exprimierung der endothelialen Selektine an Orten der Entzündung erschließt sich desweiteren ein völlig neuartiges therapeutisches Potential. Gelänge die Nutzung diese Selektine als Targetstrukturen für Arzneimittelvehikel, so könnten im Sinne eines Drug Targetings antiinflammatorische Substanzen oder Vehikel mit solchen Substanzen spezifisch zu Entzündungsherden transportiert und dort effizient und unter Umständen mit einer Reduzierung der systemischen Nebenwirkungen zur Wirkung gebracht werden. Die Ausnutzung dieses Prinzips wurde kürzlich mit dem Targeting von Sialyl Lewis^X-gekoppelten Komplementinhibitoren beschrieben, die durch ihre spezifische Akkumulation am Entzündungsort durch die sLe^X-Selektin-Bindung gegenüber einer

normalen Applikation der Komplementinhibitoren deutlich verstärkte antiinflammatorische Effekte erzielen [184,185]. Effizienter als das Targetieren einzelner Wirkstoffmoleküle erscheint die Nutzung von Arzneistoff-beladenen Vehikeln wie Liposomen, da diese neben einer höheren Wirkstoffbeladung auch vielfältig in ihren pharmakokinetischen Eigenschaften moduliert werden können.

2.3. Immunoliposomen als Arzneistoffvehikel für ein Drug Targeting

2.3.1. Das therapeutische Potential von Liposomen

Unter Drug Targeting versteht man die allgemeine pharmakologische und pharmazeutische Zielvorstellung, Arzneistoffe gerichtet zu ihrem Wirkort (Zellen, Gewebe oder Organe) zu leiten, um damit die therapeutische Effizienz zu erhöhen und gleichzeitig die Beeinflussung gesunder Zellen und damit das Entstehen unerwünschter toxischer Nebenwirkungen zu reduzieren. Obwohl dieses therapeutische Ziel bereits im Jahre 1906 von Paul Ehrlich mit dem „Prinzip der magischen Kugeln“ erkannt wurde, zeigen sich bis heute nur erste Lösungsansätze für ein erfolgreiches Drug Targeting.

Da Arzneistoffe nach ihrer Applikation im Körper verschiedenen pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Prozessen unterliegen, die einem Targeting entgegenwirken, erscheint die Nutzung von Arzneistoffvehikeln und deren Modifizierung zum Erhalt einer Targetspezifität ein aussichtsreiches Ziel. Liposomen bieten sich als solche Arzneistoffvehikel an.

Liposomen sind konzentrische Bilayergebilde, die durch die Selbstassoziation von Amphiphilen (zumeist Phospholipiden) im wässrigen Medium entstehen. Sie sind durch die Art der Lipide und die Anzahl ihrer Bilayer-Lamellen charakterisiert, morphologisch unterscheidet man sie in kleine unilamellare (SUV), große unilamellare (LUV) und multilamellare Vesikel (MLV). Da Liposomen bei ihrer Bildung einen Teil des wässrigen Mediums einschließen und durch den amphiphilen Charakter der Lipide auch lipophile Verbindungen im Inneren der Bilayer einbauen können, haben sie allgemein eine Transportfähigkeit für sowohl hydrophile wie auch lipophile Arzneistoffe. Darüberhinaus zeigen Liposomen, wenn diese aus Phospholipiden gebildet werden, eine gute Biokompatibilität, Bioabbaubarkeit und eine relativ geringe Toxizität und Immunogenität. Auch aus physiko-chemischer Sicht zeichnen sich die Liposomen gegenüber anderen Lipidassoziaten aus. Da sie sich im Gegensatz zu Mizellen oder Microemulsionen nicht an einem thermodynamischen Gleichgewichtspunkt befinden, sind Liposomen gegen Veränderungen der Umgebungsbedingungen wie z.B. Verdünnen des Mediums unempfindlich.

All diese Eigenschaften verleihen den Liposomen gute Voraussetzungen für ihre Anwendung als Drug Targeting Vehikel. Dieses Potential der Liposomen wurde bereits in den 70er Jahren erkannt [186,187], woraus vielfältige Untersuchungen zur systemischen Applikation von Liposomen folgten. Man mußte jedoch feststellen, daß Liposomen nach ihrer systemischen Applikation von Zellen des Retikuloendothelialen Systems (RES; insbesondere Leber und Milz) als Fremdstoffe erkannt und sehr schnell aus dem Körperkreislauf entzogen werden. Man konnte zwar durch Modifizierung der Liposomen (Applikation sehr kleiner Liposomen [188], hoher Cholesterolanteil [189] und Anwendung gesättigter und rigider Lipide [190,191]) oder durch Vorsättigung des RES verlängerte Zirkulationszeiten der Liposomen erlangen, prinzipiell aber stand die Abwehrfunktion des Körpers einem erfolgreichen Drug Targeting entgegen. Eine eingegrenzte Ausnutzung dieser Verhältnisse bestand im Targetieren von Zellen des RES durch Liposomen, um mit diesem indirekten Targeting beispielsweise zu einer Aktivierung von Makrophagen zur Metastasenbekämpfung beizutragen [192,193].

Für ein direktes Targeting der Liposomen ist es darüberhinaus auch notwendig, target-spezifische Bindungsstrukturen an die Liposomenoberflächen zu koppeln. Diese sollen die spezifische Liposomenbindung am Zielort ermöglichen, um dort eine Arzneistoffakkumulation zu erreichen. So wurden verschiedene Strukturen wie z.B. Peptide, Proteine oder Kohlenhydrate an Liposomen gekoppelt [194,195], um diesen eine Zielspezifität zu verleihen. Die aussichtsreichste Strategie im direkten Targeting bestand hierbei aber in der Kopplung gewebespezifischer Antikörper an die Liposomenoberfläche. Da Antikörper neben einer hohen Bindungsspezifität auch durch eine hohe Bindungsaffinität gekennzeichnet sind, erschienen diese sogenannten Immunoliposomen als sehr aussichtsreiche Kandidaten für ein Drug Targeting. Die erfolgreiche Akkumulation von Immunoliposomen an verschiedenartigen Zielzellen konnte unter in vitro-Bedingungen eindrucksvoll bestätigt werden [196-198], einer in vivo-Anwendung stand wiederum die schnelle Elimination dieser Liposomen aus dem Kreislauf entgegen.

Vor diesem Hintergrund befand sich die Liposomenforschung nach einer euphorischen Aufnahme der Idee eines Drug Targetings in den 80er Jahren in einer Stagnation. Erst neue Befunde zur Zirkulationsverlängerung der Liposomen zu Beginn der 90er Jahre ließen die Idee eines liposomalen Drug Targetings in wieder greifbare Nähe rücken.

2.3.2. Die sterische Stabilisierung von Liposomen als Weg zur Zirkulationsverlängerung in vivo

Da normale Liposomen nach systemischer Applikation sehr schnell durch Zellen des RES aufgenommen werden und somit nur sehr kurze Zirkulationshalbwertzeiten aufweisen, widerspricht dies deren Anwendung für ein systemisches Drug Targeting. Durch Zufall entdeckte im Jahre 1987 die Arbeitsgruppe um Allen, daß rigide Liposomen mit einem bestimmten Anteil eines Gangliosides (GM₁) deutlich verlängerte Zirkulationszeiten in Mäusen aufwiesen [199]. Durch Modifizierung der liposomalen Parameter und der eingesetzten Ganglioside wurde geschlußfolgert, daß dieser Effekt auf die voluminöse und flexible Kopfgruppe dieses Glykolipides zurückzuführen sei [200]. Erklärungen dafür wurden ebenfalls in Parallelen zu natürlichen Membranen und deren Schutz durch eine hydrophile Schicht, die Glykocalyx gesucht. Auch ist von bestimmten Streptokokken bekannt, daß sich diese durch ein hydrophiles Oberflächenprotein (M-Protein) einer Phagozytose entziehen können [201].

Der zirkulationsverlängernde Effekt von voluminösen, hydrophilen Verbindungen auf Liposomen konnte 1990 durch Blume und Cevc eindrucksvoll bewiesen werden, indem sie Phospholipide mit modifizierten Polyethylenglykol-Kopfgruppen (PEG) in die Liposomen einbauten [202]. Diese PEG-Lipide zeigten nicht nur deutlich stärkere Effekte auf die Zirkulationszeit, sie sind auch durch ihre Biokompatibilität und fehlende Eigenwirkung dem GM₁ deutlich vorzuziehen. Mit großer Euphorie folgten eine Vielzahl von Untersuchungen zur biologischen Wirkung PEG-modifizierter Liposomen und zur Theorie der PEG-Wirkung. Die sofortige kommerzielle Vermarktung des PEG-Effektes als sogenannte Stealth-Liposomen zu Beginn der 90er Jahre war Ausdruck für die große Erwartungshaltung an diese Liposomen für ein Drug Targeting.

Es wurde deutlich, daß der protektive Effekt des PEG von der Kettenlänge und der Menge des PEG-Lipides in den Liposomen abhängig ist [203-205]. PEG-Derivate mit Molmassen von ca. 2000 bis ca. 5000 zeigten dabei bei Konzentrationen von ca. 5 mol% die beste zirkulationsverlängernde Wirkung mit Halbwertzeiten der Liposomen von weit über 12 Stunden. Diese Wirkung interpretierte man als eine sterische Stabilisierung der Liposomen [206,207], so daß diese im Gegensatz zu normalen Liposomen vor einer Opsonierung und Anhaftung von Serumproteinen als Initialschritt der Phagozytose geschützt sind [Review 208]. Torchilin unterstützte dies durch mathematische Simulationen der PEG-Flexibilität

und Konformationen an der Vesikeloberfläche, die unter Berücksichtigung einer Aufenthaltswahrscheinlichkeit eine „konformative“ Wolke als Schutzschicht bilden [209].

Mit verschiedenen physikalischen Meßmethoden verschaffte man sich eine Vorstellung über die Erscheinung und Wirkung des PEG an der Liposomenoberfläche. So wurde deutlich, daß in Abhängigkeit von PEG-Länge und Konzentration diese bei geringeren Dichten als einzelne Wolken eines bestimmten Radius (Pilzmodell) vorliegen, wobei höhere Konzentrationen zu einer Ausrichtung ausgestreckter PEG-Ketten führen (Bürstenmodell) [210-212]. Aus Zeta-Potential-Bestimmungen und Röntgenuntersuchungen erhielt man übereinstimmend die Daten, daß z.B. ein PEG 2000 in „Bürstenform“ eine Schichtdicke von ca. 4-5 nm um die Liposomen aufbaut [213,214].

Mit all diesen Befunden zur enormen Zirkulationszeiten-Verlängerung durch die PEG-Modifizierung der Liposomen rückte ein liposomales Drug Targeting in greifbare Nähe. Durch die fehlende Opsonierung und Makrophagenaufnahme ergaben sich weitere günstige Eigenschaften dieser Liposomen. So zeigen diese im Gegensatz zu normalen Liposomen eine konzentrationsunabhängige Eliminationskinetik. Aus der langen Zirkulationszeit ergibt sich weiterhin auch die Möglichkeit eines passiven Targetings des nichtphagozytären Systems. So akkumulieren sich diese Liposomen in Bereichen starker Durchblutung und erhöhter Gefäßpermeabilität wie z.B. in soliden Tumoren oder infizierten Organen wie der Lunge [215-217].

Da trotz der Anwesenheit von PEG bei Einhaltung bestimmter Bedingungen die Kopplung von Antikörpern an Liposomenoberflächen gelingt [205], wurde mit der sterischen Stabilisierung auch das Prinzip der Immunoliposomen wieder völlig neu aufgegriffen.

2.3.3. Darstellung sterisch stabilisierter Immunoliposomen

Zur Herstellung von Immunoliposomen müssen gewebespezifische Antikörper an die Liposomenoberfläche gekoppelt werden, um den resultierenden Immunoliposomen eine Zielspezifität zu verleihen. Dafür sind eine Anzahl von Reaktionsverläufen beschrieben, um die Antikörper mit reaktiven Lipidderivaten der Liposomenmembranen zu konjugieren. Prinzipiell kann dabei die Antikörperkopplung an den bereits vorgeformten Liposomen oder an mizellar vorliegenden Ankerlipiden erfolgen, die dann erst nach vollendeter Kopplung durch Dialyse in Liposomen nachträglich eingebaut werden. Aufgrund der größeren Praktikabilität und der gezielten Antikörperbindung an der äußeren Bilayer sei hier nur der gebräuchlichere Weg der Kopplung an vorgeformte Liposomen beschrieben.

Grundsätzlich sollten die Kopplungstechniken einfach und in ausreichender Quantität verlaufen, ohne daß dabei die gekoppelten Antikörper ihre Bindungsaffinität zum Antigen verlieren. Dies beinhaltet, daß die Antikörper durch die Kopplungsreaktion keine chemische Veränderung erfahren und möglichst nicht unter Blockierung ihres reaktiven Zentrums gebunden werden.

Mit dem Prinzip der sterischen Stabilisierung der Liposomen durch PEG zur Zirkulationsverlängerung ergab sich auch zu Beginn der 90er Jahre ein völlig neuartiges Potential für die Immunoliposomen. Allerdings treten im Wechselspiel der sterischen Stabilisierung und der Antikörperkonjugation an den Liposomen verschiedene Schwierigkeiten auf. Die Abschirmung der Vesikeloberfläche durch PEG erschwert auch die Annäherung der Antikörper für die Konjugationsreaktion, gleichzeitig wird auch die Antigenerkennung der gebundenen Antikörper an den Zielzellen durch das PEG maskiert. Verschiedene Untersuchungen konnten aber beweisen, daß bei Einhaltung einer Balance ein Kompromiß aus sterischer Stabilisierung und ausreichender Antikörperkopplung bzw. Targeterkennung gewonnen werden kann [205,218]. So konnten letztendlich alle Kopplungsmethoden der klassischen Immunoliposomen auch auf sterisch stabilisierte Immunoliposomen übertragen werden.

Eine Einteilung der Kopplungsreaktionen kann in nichtkovalente Assoziationen und in kovalente chemische Fixierungen der Antikörper erfolgen.

Eine nichtkovalente Methode der Antikörperkonjugation stellt die sogenannte Biotin-Avidin-Technik dar. Grundlage dieser Kopplung ist die sehr starke Bindungsaffinität von Biotin und Avidin. Avidin mit seinen vier Bindungsstellen für Biotin fungiert bei dieser Methode als Brückenmolekül zwischen biotinylierten Lipiden der Liposomenmembran und biotinylierten Antikörpern [219]. Dem einfachen Verlauf dieser Kopplung steht die Gefahr einer Liposomenagglutination entgegen, auch ist die notwendige Biotinylierung der Antikörper von Nachteil. Diese Reaktion funktioniert auch unter Reduzierung der Kopplungsausbeute in Gegenwart von PEG [220].

Bei den kovalenten Konjugationsverfahren sind die sogenannten thioreaktiven Methoden von großer Bedeutung. Diese beruhen auf einer Thioetherbindung zwischen Antikörper und Lipidanker, die aus einer Additionsreaktion freier Thiolgruppen an Maleimidgruppierungen resultiert. Die gebräuchlichsten Derivate zu dieser Reaktion sind als Maleimidkomponente das p-Maleimidophenyl-Butyrat (MPB) und das Pyridyldithiopropionat (PDP), welches durch reduktive Spaltung seiner Disulfidbrücke mittels Dithiothreitol (DTT) für die Bildung eines Thiols sorgt. Je nach Ausrichtung der Reaktion kann Maleimid bzw. Thiol von Antikörper oder Lipidanker angeboten werden. Für die Reaktion ist die Derivatisierung der Antikörper bzw. des Lipidankers Phosphatidylethanolamin notwendig, was über die reaktiven Succinimide der oben genannten Verbindungen (N-Succinimidyl-4-(p-maleimidophenyl)-butyrat und N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat) realisiert wird. Fab'-Fragmente können ohne Derivatisierung an Maleimide gekoppelt werden, da diese nach Spaltung ihrer Disulfidbrücken zum F_c-Teil des Antikörpers freie Thiolgruppen generieren. Diese Kopplungsmethoden, die bereits für konventionelle Liposomen in den 80er Jahren beschrieben wurden [221,222], konnten auch erfolgreich auf PEG-haltige Vesikel übertragen werden [223]. Dabei werden MPB-PE haltige Vesikel in ihrer Umsetzung mit PDP-Antikörpern weniger durch PEG in ihrer Kopplungsausbeute reduziert als im Fall des PDP-PE mit den MPB-Antikörpern. Dies wurde mit der dominanteren Größe des Phenyl-gespacerten Maleimids an der Vesikeloberfläche erklärt, die durch die PEG-Ketten deutlich weniger beeinflusst werden als die Thiolgruppen des PDP. Trotz der guten Kopplungsausbeuten bei diesen Reaktionen erweisen sich die notwendigen Derivatisierungs- und Reinigungsschritte der Antikörper als Nachteil.

Eine weitere kovalente Konjugationstechnik ist die sogenannte Hydrazid-Methode. Chemische Grundlage ist hierbei die Kondensation einer Aldehydgruppe mit einer hydrazidhaltigen Verbindung. Diese Methode wurde von Chua et al. auf die Antikörperkopplung an Liposomen übertragen [224], indem durch milde Oxidation von Kohlenhydraten im F_c-Teil der Antikörper Aldehyde erzeugt wurden, die dann mit hydrazidhaltigen Lipidankern der Liposomenmembran reagieren. Als Vorteil dieser Konjugationsmethode wird der orientierte Einbau der Antikörper an die Liposomen angesehen, da nur die F_c-Teile Kohlenhydrat-Anteile besitzen. Nachteilig hingegen erscheint die Gefahr einer oxidativen Schädigung der Antikörper bei dieser Behandlung.

Als eine sehr vorteilhafte Kopplungsmethode erwies sich die Antikörperbindung über eine Carbonsäureamid-Bindung. Bei dieser kovalenten Kopplungstechnik fungiert N-Glutaryl-Phosphatidylethanolamin (N-Glut-PE) als Carbonsäure-reaktiver Anker in der Liposomenmembran. Durch Aktivierung der Carboxylgruppe mittels eines Carbodiimids (Ethyl-Dimethylaminopropyl-Carbodiimid; EDC) bei pH 3,5 entsteht ein reaktives O-Acyl-Intermediat, das dann bei einem pH von ca. 8 mit Amingruppen des Antikörpern umgesetzt werden kann [225].

Bogdanov ergänzte diese Methode durch den zusätzlichen Einsatz von N-Hydroxysulfosuccinimid (NHS), um der Hydrolyseinstabilität und der möglichen Isomerisierung des aktivierten Carbonyls entgegenzuwirken. Die gebildeten N-

Hydroxysulfosuccinimid-Ester sollen durch ihre langsamere Hydrolyse eine verbesserte Umsetzung mit den Antikörpern gewährleisten [226].

Als weitere Modifizierung wurden von Ezpeleta et al. alle Reaktionsschritte der Kopplung von Proteinen an N-Glut-PE mit EDC im Neutralen durchgeführt, um der hydrolytischen Deaktivierung des EDC im Sauren entgegenzuwirken [227].

All diese N-Glut-PE-Kopplungsvarianten zeichnen sich durch eine hohe Kopplungseffizienz aus. Der Einsatz des unmodifizierten Antikörpers ist ein entscheidender Vorteil dieser Methode.

Die Anwesenheit von PEG an den Liposomenoberflächen reduziert durch die sterische Abschirmung die Kopplungseffizienz dieser Konjugationsmethoden. Um dieses Problem zu überwinden wurde versucht, PEG-Lipide erst nach erfolgter Antikörperkopplung in die Liposomen einzubringen. Suzuki et al. schlugen vor, thiolreaktive PEG-Derivate erst nach der Antikörperbindung an den Maleimid-enthaltenden Liposomen zu konjugieren [228]. Ein anderer Lösungsansatz besteht in der mizellaren Zugabe von PEG-Lipiden zu den intakten Immunoliposomen, um bei erhöhten Temperaturen eine nachträgliche PEG-Inserierung zu erreichen [229]. Durch die erhöhten Temperaturen besteht jedoch die Gefahr der Antikörperdenaturierung oder der Bindungsspaltung. Beide Methoden fanden keine breite Anwendung.

Wesentlich aussichtsreicher erscheint dahingegen der Lösungsvorschlag, die Antikörper in Gegenwart von PEG nicht an der abgeschirmten Liposomenoberfläche, sondern an den terminalen Enden des PEG zu koppeln. Im Idealfall sollte daraus durch die exponierte Antikörperpräsentation eine sehr gute Targetbindungsfähigkeit unter Beibehaltung der sterischen Stabilisierung resultieren. Blume et al. beschrieben eine solche Kopplungsmethode bereits 1993 für die Bindung von Proteinliganden an carboxylhaltige PEG-Enden nach Carbodiimid-Aktivierung [230]. Durch den Einsatz verschiedener heterobifunktioneller PEG-Derivate konnten darauffolgend alle oben beschriebenen Kopplungsmethoden auf die terminale PEG-Konjugation übertragen werden. So wurden PEG-Lipide mit terminaler Carboxylgruppe [231,232], terminalen Hydraziden [223,233] oder mit terminalen thioreaktiven Derivaten (MPB oder PDP) [223,234,235] dargestellt und getestet werden.

In vielfältigen Targetierungsstudien mit diesen neuartigen Immunoliposomen zeigte sich die exponierte Antikörperpräsentation als sehr vorteilhaft zur Erhöhung der Targetbindungsfähigkeit bei langer Zirkulationsdauer.

2.3.4. Potentielle Probleme in der Targetierung von Immunoliposomen

Immunoliposomen zeichnen sich gegenüber anderen targetierten Ligandliposomen durch die spezifischen Bindungseigenschaften ihrer Antikörper mit einer Reihe von Vorteilen aus. Auch gegenüber anderen Antikörper-Arzneistoff-Assoziaten sind die Immunoliposomen wegen des bis zu 400fach höheren Arzneistoff/Antikörper-Verhältnisses deutlich günstiger zu bewerten. Trotzdem resultieren aus der Applikation speziesfremder Antikörper mit den Immunoliposomen im Prozeß des Drug Targeting verschiedene Probleme. Die meisten gegenwärtig angebotenen monoclonalen Antikörper werden in Mäusen generiert. Makrophagen besitzen einen Fc-Rezeptor, der speziesfremde Antikörper an diesem Molekülteil erkennt und phagozytiert [236,237]. Dementsprechend besteht die Gefahr, daß Immunoliposomen trotz einer sterischen Stabilisierung mit PEG verstärkt der Zirkulation entzogen werden. Tatsächlich konnte eine umgekehrte Proportionalität von gebundener Antikörpermenge zur Zirkulationszeit gefunden werden [234]. Generell werden die Mengen der gekoppelten Antikörper zur besseren Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Methoden und zur Nivellierung verschiedener Liposomenparameter in μg Antikörper pro μmol PL angegeben. In der o.g. Studie zeigt sich, daß Immunoliposomen mit Antikörpermengen über $70 \mu\text{g}/\mu\text{mol}$ PL deutlich schneller eliminiert werden, so daß möglichst Kopplungsmengen von ca. $30 \mu\text{g}/\mu\text{mol}$ PL für eine optimale Zirkulationszeit anzustreben sind. Dabei ist aber auf eine Balance für eine noch ausreichend starke Antigenerkennung an den Targetzellen zu achten.

Glücklicherweise zeigte sich nur im unteren Mengenbereich eine Abhängigkeit der Targetbindung von der gekoppelten Antikörpermenge, so daß Immunoliposomen mit ca. 20-40 µg Antikörper/µmol PL bei guter Targetierbarkeit Zirkulationshalbwertzeiten von mehreren Stunden aufweisen [234,238]. Zur weiteren Reduzierung der Makrophagenaufnahme wird anstelle der Bindung kompletter Antikörper die Konjugation der Fab'-Fragmente empfohlen.

Bei mehrfacher Applikation von Immunoliposomen ist mit umfangreicheren immunologischen Problemen zu rechnen. So kann die Applikation speziesfremder Antikörper zur Bildung von Anti-Antikörpern führen [239]. Der Einsatz von genetisch veränderten, teilweise humanisierten Antikörperchimären oder vollständig humanisierten Antikörpern aus genmanipulierten Bakterien könnte dieses Problem begrenzen, diesbezügliche experimentelle Daten liegen jedoch noch nicht vor.

Obwohl eine Anzahl von Studien die Eliminationskinetik nach einmaliger Gabe von Immunoliposomen zum Inhalt hat, existieren bisher nur drei Arbeiten, die die Elimination nach wiederholter Gabe der Immunoliposomen untersuchten [240-242]. Dabei zeigte sich eine rapide Abnahme der Zirkulationshalbwertzeit mit der zweiten Applikation, was auf eine starke Immunantwort zur Elimination der Liposomen zurückzuführen ist. Die Bildung von sekundären Antikörpern konnte in den Versuchstieren bereits nach der ersten Applikation nachgewiesen werden.

Ob diese Probleme mit den genannten Alternativen gelöst werden können, müssen weitere in vivo-Experimente beweisen.

2.3.5. Targeting von Immunoliposomen

Die Targetierungseigenschaften von Immunoliposomen wurden in einer Anzahl von in vitro- und in vivo-Experimenten untersucht. Diese Versuche zielen dabei hauptsächlich auf eine Optimierung des Drug Targetings von Chemotherapeutika zur Krebsbehandlung, da diese Stoffe durch ihre Toxizität und der oftmals notwendigen hohen Dosierung das größte Potential für ein Drug Targeting zur Reduzierung unerwünschter Nebenwirkungen besitzen. Darüberhinaus weisen die Krebsgewebe durch ihre starke Vaskularisierung verbunden mit hoher Permeabilität morphologisch gute Voraussetzungen für ein liposomales Targeting auf.

In ersten in vitro-Bindungsstudien an Lungenkrebs- bzw. Ovarialkrebs-Zelllinien konnte die deutlich höhere Bindungsaffinität gerichteter Immunoliposomen und darauffolgend eine wesentlich stärkere Zytotoxizität des liposomalen Doxorubicins bewiesen werden [243]. Kirpotin et al. konnten mit Immunoliposomen, die gegen das Krebsoberflächenantigen HER-2 gerichtet waren, eine starke Akkumulation und Zytotoxizität an Brustkrebszellen erreichen [244,245]. Koning et al. untersuchten die Targetbindung und Wirkstofffreisetzung aus Immunoliposomen an Colocarzinom-Zelllinien [246-247].

Bei den verschiedenen in vivo-Studien mußte eine Balance von ausreichender Zirkulationszeit mit der Targetierung/Zytotoxizität gefunden werden. Maruyama et al. konnten in verschiedenen Studien mit GM₁- oder PEG-haltigen Immunoliposomen die spezifische Akkumulation am Lungenendothel demonstrieren [248,232]. Ein ausgeprägter therapeutischer Effekt wurde mit der Targetierung von Doxorubicin-Immunoliposomen an Lungenkrebszellen der Maus erreicht, die unter Behandlung eine deutliche Reduzierung des Krebswachstums und eine Verlängerung der Überlebenszeit erfuhren [249]. Kirpotin et al. targetierten erfolgreich HER-2-exprimierende Brustkrebsgewebe in Mäusen, und verglichen in dieser Studie auch Doxorubicin-enthaltende konventionelle und terminal gekoppelte Immunoliposomen auf ihre Zytotoxizität [250]. Auch andere Autoren zeigten die erhöhte Zytotoxizität durch ein erfolgreiches Liposomentargeting in vivo [251,252]. Nam et al. richteten ihre Immunoliposomen gegen Krebszell-spezifische Kohlenhydratstrukturen, unter denen sie auch anti-Lewis^X-Antikörper benutzten [253].

Ein interessanter therapeutischer Ansatz wurde von Storm et al. beschrieben, die durch Targetierung enzymgekoppelter Immunoliposomen (sog. Immunoenzymosomes) am Krebsgewebe spezifisch die enzymatische Toxifizierung eines chemotherapeutischen Prodrugs erreichten [254].

Mit dem erfolgreichen Targetieren von Liposomen wird jedoch nicht automatisch ein therapeutischer Effekt erzielt. Zu diesem Zweck müssen die liposomalen Wirkstoffe entweder gezielt am Wirkort freigesetzt werden oder in freier bzw. liposomaler Form in die Targetzellen aufgenommen werden. Ein allgemeingültiger und favorisierter Weg kann hierfür nicht beschrieben werden, da das therapeutische Ziel der Liposomen auf die Art und Charakteristika der Targetzellen abgestimmt werden muß.

Die gezielte Wirkstofffreisetzung nach bzw. durch Targetbindung erfordert eine Balance zwischen einer ausreichenden Liposomenstabilität für die Targetierung mit der Möglichkeit einer Destabilisierung am Wirkort. Zu Ende der 80er Jahre wurden sogenannte targetsensitive Immunoliposomen beschrieben [255,256]. Diese bestehen überwiegend aus einem PL, welches im Normalfall keine Bilayer bildet und zur Ausbildung inverser hexagonaler Phasen tendiert. Werden einem solchen Lipid, wie z.B. dem Dioleoyl Phosphatidylethanolamin DOPE, lipidverankerte Antikörper als Stabilisatoren zugemischt, bilden sich targetierbare Immunoliposomen. Kommt es dann an den Targetzellen durch die Antikörperbindung zu einer lateralen Diffusion der Stabilisatoren innerhalb der Liposomen oder zur Aggregation benachbarter Liposomen, destabilisieren sich diese und setzen den eingeschlossenen Wirkstoff frei [257]. Dieses Prinzip konnte jedoch bisher nicht auf sterisch stabilisierte Immunoliposomen übertragen werden.

Entsprechend der Art der Targetzellen kann auch eine Internalisierung der Liposomen angestrebt werden, wobei hier hauptsächlich eine endozytotische Aufnahme im Mittelpunkt steht. Voraussetzung dafür ist eine sehr geringe Liposomengröße von möglichst unter 100 nm Durchmesser. Dabei erscheint es von Vorteil, aktive Internalisierungsmechanismen der Zelle für dieses Vorhaben auszunutzen. Durch Targetierung von endozytotischen Rezeptoren wie z.B. dem Transferrinrezeptor [258], dem LDL- [259] oder dem Folatezeptor [260] gelangen Liposomen dann aktiv in die Targetzellen. Aber auch eine unspezifische endozytotische Aktivität verschiedener Zellen, wie z.B. Makrophagen der Leber über sogenannte scavenger Rezeptoren wurden dafür ausgenutzt [Review 261]. Die endozytierten Liposomen gelangen dann über sogenannte coated vesicle in die Endosomen, wobei strukturell frühe Endosomen (pH 6-6,5) und späte Endosomen (pH 5-5,5) unterschieden werden [262]. Von dort gelangen die Vesikel in die Lysosomen. Da bei einem lysosomalen pH-Wert von 3,5-4 eine schnelle hydrolytische Zerstörung von PL und liposomalen Wirkstoffen stattfindet, müssen die Wirkstoffe bereits in den Endosomen freigesetzt werden. Dies kann durch pH-sensitive Immunoliposomen geschehen. Wie die targetsensitiven Immunoliposomen bestehen diese überwiegend aus DOPE, welches durch ein säurehaltiges Amphiphil stabilisiert wird. Während dieser Stabilisator im Neutralen dissoziiert und damit stärker hydratisiert vorliegt, wird im sauren Milieu der Endosomen die Dissoziation und damit die bilayerstabilisierende Hydratisierung zurückgedrängt, so daß die Liposomen durch Inversmizellbildung zerfallen. Als Stabilisator hat dabei insbesondere Cholesterylhemisuccinat Bedeutung [263, 264], wobei aber auch Versuche mit Dialkylsuccinylglycerolen und Alkylhomocysteinen vorgenommen wurden [265,266].

Zusammenfassend kann man feststellen, daß Immunoliposomen ein großes therapeutisches Potential als Drug Delivery Systems besitzen. Nach erfolgter Targetbindung muß das Verhalten der Liposomen für das therapeutische Ziel weiter gesteuert werden. Dieses Verhalten der Liposomen muß mit den Charakteristika der Zielzellen abgestimmt werden.

2.4. Zielstellung dieser Arbeit

Selektine nehmen aufgrund ihrer initialen Stellung in der Adhäsionskaskade der Leukozyten eine Schlüsselrolle der Immunantwort bei Entzündungserscheinungen ein. Aus diesem Grund ist die Untersuchung der Bindungseigenschaften dieser Adhäsionsrezeptoren von großer pharmakologischer Bedeutung. Zudem stellt die von den Selektinen vermittelte Rollbewegung der Leukozyten eine absolute Sonderform einer Zell-Zell-Wechselwirkung dar, so daß die Aufklärung dieses Prozesses auch wichtige biophysikalische Aspekte beinhaltet.

Durch die Komplexität der an der Leukozytenadhäsion beteiligten unterschiedlichen Rezeptoren und durch die dynamischen Bindungseigenschaften der Selektine muß zu deren Untersuchung ein reduktionistisches und dynamisches Modellsystem geschaffen werden.

Erstes Ziel dieser Arbeit war es also, ein dynamisches Testsystem zu etablieren, mit dem die molekularen Bindungseigenschaften der Selektine im Prozeß des Zellrollens abstrahierend untersucht werden können. Zur kontinuierlichen Modifizierung der Einflußbedingungen auf die Bindungseigenschaften sollte eine Variable in dieses Testsystem integriert werden. Im Gegensatz zu anderen in vitro-Untersuchungen des Zellrollens, bei denen direkte Zell-Zell-Wechselwirkungen oder das Zellrollen an isolierten Selektinen analysiert wurde, sollten sich diese Arbeiten auf die Modifizierung der artifiziellen Liganden konzentrieren. Da zudem die natürlichen Selektinliganden in ihrer Bindungsfunktion und dem Ursprung ihrer Bindungsaffinität nicht vollständig verstanden sind, könnten aus dieser Herangehensweise außerdem weitere Erkenntnisse über die Wirkungsweise der Liganden resultieren.

Die Inhibierung der Selektine stellt eine neuartige Möglichkeit zur kausalen Einflußnahme und Unterdrückung pathologischer Entzündungsprozesse dar. Aufbauend auf dem oben beschriebenen Testsystem, mit dem unter in vitro-Bedingungen das Selektinvermittelte Zellrollen simuliert werden kann, könnte dann die Unterdrückung der Selektinbindungen durch Inhibitoren unter dynamischen Bedingungen quantifiziert werden.

Zweites Ziel dieser Arbeit war es somit, in einem dynamischen Testsystem selektininhibierende Substanzen als potentielle antiinflammatorische Verbindungen auf ihre Wirksamkeit zu untersuchen. Nach Möglichkeit sollten Unterschiede zu statischen Bindungsstudien erkannt und begründet werden, um daraus in Form einer Struktur-Wirkungs-Beziehung Erkenntnisse für weitere Inhibitoren abzuleiten.

Die vaskulären Selektine, die speziell nur am Ort der Entzündung von den Endothelzellen exprimiert werden, bieten sich als exzellente Targetstrukturen für ein entzündungsspezifisches Drug Targeting an. Immunoliposomen haben ein großes Potential als Arzneistoffvehikel, wobei ihre hauptsächliche Zielrichtung in der Optimierung der chemotherapeutischen Krebsbehandlung liegt. Die Anwendung des Targetierungsprinzips der Immunoliposomen auf die vaskulären Selektine erscheint in vielerlei Hinsicht sehr erfolgversprechend, da beispielsweise die Immunoliposomen für die Targeterkennung und -bindung das Gefäßsystem nicht verlassen müßten.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es also, in dem etablierten dynamischen Testsystem die Möglichkeit der Ausnutzung der Selektine als Targetstrukturen für Arzneimittelvehikel zu untersuchen. Als Arzneistoffvehikel sollten Immunoliposomen fungieren, die damit erstmals in Kombination mit Selektinen für ein entzündungsspezifisches Targeting genutzt würden. Somit sollten für diese Aufgabenstellung selektingerichtete Immunoliposomen hergestellt und in ihren Targetierungseigenschaften untersucht und optimiert werden. Durch die Verfolgung des Schicksals der Liposomen nach erfolgter Targetierung könnten weiterhin Erkenntnisse über die physiologischen Funktionen der vaskulären Selektine resultieren.

Anmerkungen zu dieser Arbeit

Die experimentellen Studien zu dieser Arbeit begannen zu Anfang des Jahres 1996. Zu diesem Zeitpunkt hatte man grundlegende Erkenntnisse über die Rolle der Selektine im Entzündungsprozeß, über ihre Struktur und ihre statischen Bindungseigenschaften. In den letzten Jahren konnte man einen deutlichen Zuwachs der Forschungsaktivitäten auf dem Gebiet der Selektine verzeichnen, was sich beispielsweise in einer enormen Anzahl von Veröffentlichungen (weit mehr als 100 monatlich mit dem Stichwort „Selectins“) widerspiegelt. Dabei wurden schwerpunktmäßig die pathologische Rolle der Selektine, Selektininhibitoren und Verbindungs- und Signalfunktionen der Selektine zu den anderen Adhäsionsrezeptoren untersucht. Aber auch die Charakterisierung der dynamischen Bindungsfunktionen der Selektine im Rollprozeß wurde in diesen Jahren entscheidend vorangebracht. Diese Erkenntnisse (Bestimmung der kinetischen Bindungsdaten der Selektine, Rolle der Zelldeformation für das Zellrollen, alternative Rezeptoren für Rolluntersuchungen) überschneiden sich teilweise mit unseren experimentellen Arbeiten und Ergebnissen, so daß der Erkenntnisgewinn dieser Arbeit mittlerweile schon in das Gesamtbild der Selektinaufklärung aufgenommen ist, und experimentelle Ansätze aus heutiger Sicht mit dieser Erkenntnis interpretiert werden müssen. Dies trifft insbesondere für unsere Voruntersuchungen zur Etablierung des dynamischen Rollassays zu. Eine Übersicht unserer veröffentlichten Arbeiten über diesen Zeitraum befindet sich im Anhang.

Zu Beginn unserer Liposomentargeting-Studien war die Nutzung des E-Selektins als Target ein völlig neuer Ansatz, der aber mittlerweile auch von anderen Arbeitsgruppen übernommen wurde. Im Verlauf dieser Arbeiten wurde eine Studie mit ähnlicher Zielstellung veröffentlicht [267].

In den experimentellen Arbeiten wurden zur Ergänzung von Aussagen teilweise analytische Methoden genutzt, auf deren theoretische Grundlagen in dieser Arbeit nicht explizit eingegangen werden soll. Dies trifft insbesondere für die Ergebnisse der Quarzmikrowaage und die Befunde der Fluoreszenzpolarisation zu. An diesen Stellen wird auf detaillierte Referenzen (Diplomarbeiten) verwiesen.

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen eines von mir mit geleiteten Projektes im Sonderforschungsbereich 197. Für die Arbeiten in dem Projekt betreute ich zwei Doktoranden, deren Ergebnisse teilweise mit in diese Arbeit eingeflossen sind. Dafür wird an den betreffenden Stellen auf die Promotionsarbeiten (zeitgleiche Fertigstellung mit dieser Arbeit) verwiesen.

3. Materialien und Methoden

3.1. Chemikalien/Lipide

SPC wurde von Lucas Meyer (Hamburg) bezogen. Die Phospholipide DPPE, DSPE, DSPC, POPC sowie die Chemikalien EDC, Chol., CHEMS (Morpholinosalz), N,N-Diisopropylethylamin, 2.4.6. Trichloro-1.3.5-triazin (Cyanurchlorid), Glutarsäureanhydrid, SPDP, SMPB, Natriumdithionit, Methyl- α -mannopyranosid und DTT wie auch Avidin und das Lektin Concanavalin A waren von SIGMA-Chemikalien GmbH (Deisenhofen), PDP-PE, MPB-PE und Biotin-PE wurden von Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA bezogen. Das O-(2-Aminoethyl)-polyethylenglykol (α -Amino- ω -Hydroxy-PEG 3000) stammt von FLUKA (Neu Ulm). DOPE, OG wurden von ALEXIS Co. (Grünberg) bezogen.

Als Fluoreszenzfarbstoffe wurden Lissamine[®] Rhodamin-PE, DiO (Avanti Polar Lipids), HPTS, NBD-PE, FITC-Dextran (Sigma) sowie Calcein und 6-Carboxyfluorescein von Fluka verwendet.

Die Enzyme Pronase (Protease aus *Streptomyces griseus*), Trypsin und α -Chymotrypsin stammen von Sigma.

Der Proteinanker N-Glut-PE wurde in der Arbeitsgruppe entsprechend einer Vorschrift nach Weissig [268] synthetisiert.

Die verwendeten sLe^x-enthaltenden Glykolipide wurden im Rahmen einer Kooperation von der Arbeitsgruppe Prof. R.R. Schmidt (Uni Konstanz) durch DC C. Gege und Dr. G. Hummel synthetisiert. Bei diesen Lipiden war die sLe^x-Kopfgruppe direkt (sLe^xL0) oder durch 3 (sLe^xL3), 6 (sLe^xL6) oder 9 Ethoxyeinheiten (sLe^xL9) an einem 1,2-Dihexadecylglycerol gebunden, oder durch eine Laktoseeinheit zu einem Ceramid (sLe^xCer) verknüpft. Die Reinheit der Substanzen wurden durch HPLC und NMR bewiesen [269,270]. Lösliches sLe^x wurde auch von der AG Schmidt gefertigt, oder von Oxford Glyco Systems, U.K. bezogen.

Die glykosidischen Selektininhibitoren (4.2.) wurden uns von der Kenkyoshu Co. Ltd., Japan zur Verfügung gestellt.

Die Puffer PBS, HEPES, Mes und MOPS (alle Sigma) wurden nach Standardprotokollen hergestellt und waren von analytischer Reinheit.

3.2. Durchflußapparat

Die verwendete Durchflußapparat wurde in Auftragsarbeit aus Polyacrylat gefertigt. An der Unterseite der Apparatur befindet sich die eigentliche Durchflußkammer, die eine Länge von 11 mm, eine Breite von 6 mm und eine Höhe von 0,45 mm aufweist. Um Inhomogenitäten der Strömung in der Kammer zu vermeiden, wurden die Randbereiche abgerundet. Als Strömungsein- bzw. -auslaß sind von der Oberseite in die Durchflußkammer zwei Bohrungen eingebracht, an die an der Oberseite Schlauchansätze befestigt wurden. Die Durchflußkammer ist von einer runden, in die Apparatur eingelassenen Gummidichtung (Durchmesser 15 mm) umgeben, auf die zum Verschließen der Kammer ein rundes Deckgläschen von 18 mm Durchmesser aufgebracht wird. Das Glas wird durch einen Metallring über 3 Schrauben in der Apparatur fixiert.

Die Schlauchverbindungen der Apparatur haben einen Innendurchmesser von 1 mm. Im zuführenden Schlauch befindet sich unmittelbar vor der Apparatur eine Blasenfalle (2 ml Vial), die mit einem Septum abgedichtet ist, durch die die Zellsuspension injiziert werden kann.

Die Durchflußapparat für die Liposomentargeting-Untersuchungen unter Scherflußbedingungen war analog konstruiert und enthielt an der Unterseite zwei, nacheinander geschaltete Durchflußkammern der oben angegebenen Bauart.

3.3. Darstellung der Modellmembranen

3.3.1. Trägermaterialien und Reinigung

Als transparente Trägermaterialien für die Modellmembranen wurden runde Mikroskop-Deckgläser eines Durchmessers von 18 mm bei allen mikroskopischen Untersuchungen genutzt. Die Charakterisierung der Modellmembran durch AFM erfolgte auf Trägern aus Silizium. Diese Materialien wurden vor dem Gebrauch einer Reinigung unterzogen, um eine sehr homogene und chemisch eindeutige Oberfläche zu erhalten. Nach mechanischem Polieren wurden die Glasträger mit einer Mischung aus konz. $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ (7/3) für 30 Minuten bei 80°C im Ultraschallbad behandelt (oxidative Entfernung aller Oberflächenverunreinigungen). Siliziumwafer wurden dagegen im ersten Schritt mit $\text{HCl}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ (1/1/5) unter den gleichen Bedingungen behandelt. Danach wurde 30 Minuten mit MilliQ[®] gespült. Um alle Oberflächenmoleküle zum Silanol zu reduzieren, folgte ein Reinigungsschritt mit $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ (1/1/5) für 30 Minuten bei 80°C im Ultraschallbad. Schließlich wurden die Träger 30 Minuten mit MilliQ[®] Wasser gespült und getrocknet.

3.3.2. Self-Assembling

Die frisch gereinigten Trägermaterialien wurden mit Dimethyloctadecyl-Chlorsilan (Fluka) bei 50°C für 30 Minuten inkubiert. Bei dieser Prozedur bildet sich durch die kovalente Reaktion des Silans mit den Hydroxygruppen der Glasoberfläche eine homogene Monolayer, die dem Material hydrophobe Oberflächeneigenschaften verleiht. Die so vorbehandelten Träger wurden zur Komplettierung der Modellmembran mit der Langmuir-Blodgett-Technik weiterbehandelt.

3.3.3. Langmuir-Blodgett-Technik

Die in frisch destilliertem Chloroform/Methanol (2:1/v:v) gelösten Lipide wurden auf der Wasser/Luft-Grenzfläche eines Langmuir-Troges (Filmwaage Typ R&K Riegler & Kirstein GmbH, Deutschland) aufgespreitet. Als Subphase wurde MilliQ[®] Wasser verwendet. Nach Abdampfen des Lösungsmittels (15 min) wurde der Lipidfilm bei 25°C mit einer Geschwindigkeit von $0,01 \text{ nm}^2 \text{ min}^{-1} \text{ Molekül}^{-1}$ bis 38 mN/m komprimiert. Bei diesem Lateraldruck wurde der Lipidfilm auf die hydrophobisierten Trägermaterialien nach einem x-Typ-Transfer übertragen. Die Tauchgeschwindigkeit betrug dabei $0,5 \text{ mm/s}$ und das Übertragungsverhältnis lag zwischen 0,95 und 1.

Diese feststofffixierten Modellmembranen wurden innerhalb der nächsten Stunde für weitere Experimente verwendet.

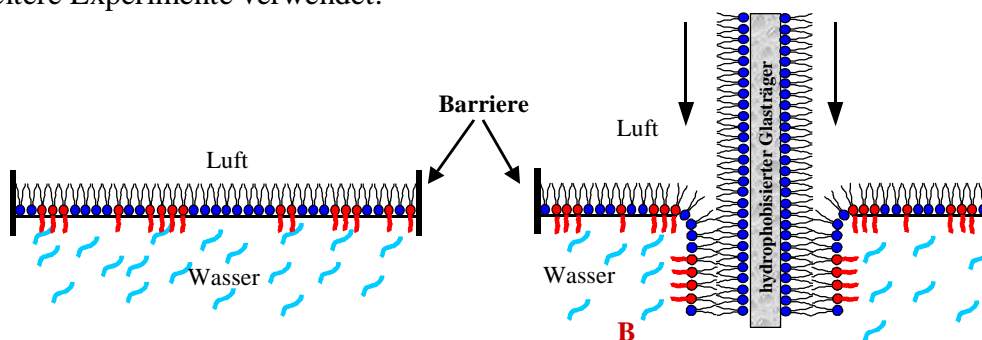


Abb. 5: Langmuir-Blodgett-Technik

3.4. Darstellung Selektin-haltiger Glasoberflächen

3.4.1. Isolation von P-Selektin aus Blutplättchen

P-Selektin wurde in unserer Arbeitsgruppe basierend auf einer Vorschrift von Moore aus Thrombozyten isoliert, gereinigt und konzentriert [271]. Dabei wurden humane Thrombozyten zunächst durch schrittweise Zentrifugation (200 g und 1500 g) von Erythrozyten weitgehend getrennt. Das Thrombozytenkonzentrat wurde dann durch einen Frier-Tau-Prozess lysiert, anschließend wurden die Membranbestandteile bei 20.000 g abzentrifugiert und mit 1%iger Triton X 100-Lösung behandelt. Dadurch gehen Membranproteine in Lösung und nicht lösungsvermittelte Membranbestandteile können bei 20000g abgetrennt werden.

Die so gewonnenen P-Selektin-reichen Membranproteine wurden affinitätschromatografisch über eine Concanavalin A-Säule gereinigt. Die P-Selektin-ConA Bindungen wurden mittels Methylmannosid verdrängt, wobei das Selektin mit Octylglykosid als Lösungsvermittler von der Chromatographiesäule eluiert wurde.

3.4.2. Kovalente Immobilisierung des P-Selektins auf Glasplättchen

Das isolierte P-Selektin wurde über Cyanurchlorid an Glasoberflächen gebunden. Dafür wurden ca. 10 frisch gereinigte Glasplättchen (3.1.1.) in 20 ml eines Boratpuffers (pH 8,8) mit 2 g Cyanurchlorid über 16 Stunden versetzt. Nach Trocknung der Gläser wurden diese mit 1 ml einer Mischung aus Selektinlösung und Albuminlösung (jeweils 100 µl einer Lösung mit 0,7 µmol/ml) mit Boratpuffer pH 8,8 für 2 Stunden bei Raumtemperatur umgesetzt. Als Blindwert wurde nur die Albuminlösung verwendet. Nach der Kopplung wurden die Gläser mit PBS gespült.

3.5. Zellkultivation und Antikörper

E-Selektin-transfizierte Chinese Hamster Ovarial Zellen (CHO-E-Zellen) wurden in MEM- α Medium mit 10% fötalem Kälberserum, 2 mM L-Glutamin und 100 nM Penicillin/Streptomycin kultiviert (alles c.c. pro GmbH, Neustadt). 5×10^4 CHO-E-Zellen wurden in Kulturflaschen ausgesät und bei 37°C in 5% CO₂ drei bis vier Tage inkubiert, bis sie nahezu konfluent ausgewachsen waren. Nach einer dreiminütigen Trypsinisierung mit 2 ml 0,25% Trypsin in EDTA wurden die Zellen in Zentrifugationsröhrchen überführt, für 3 min bei 430 g zentrifugiert und gewaschen. Danach erfolgte die Fluoreszenzmarkierung der Zellen mit Calcium GreenTM -2 AM (Molecular Probes, Leiden, Holland). Die so behandelten Zellen bleiben für ca. vier Stunden in Suspension, in dieser Zeit wurden die Zellrollexperimente durchgeführt.

Für die Inhibierungsexperimente kamen HL-60-Zellen zum Einsatz. Diese wurden für die Kultivierung zu ca. 50.000 Zellen pro ml in RPMI-Medium mit 10 % FKS, Refobacin und Fungizone bei 37 °C unter 5% CO₂ kultiviert. Die Vitalität der Zellen wurde mit Trypanblau getestet.

Für die Immunoliposomen-Targetierungsstudien wurden Endothelzellen aus humanen Nabelschnuren (HUVEC) maximal 24 Stunden postnatal isoliert.

Die Isolation erfolgte unter sterilen Bedingungen (Laminar flow box) mit sterilen Lösungen, die vor Präparationsbeginn im Brutschrank auf 37°C gebracht wurden. Nach einer äußeren Reinigung der Schnur mit 70%igem Ethanol wurde an beiden Seiten ca. 1 cm abgetrennt. Danach wurde die Vene mittels einer Knopfkanüle katheterisiert und dann dreimal

mit je 50 ml physiologischer NaCl gespült, um etwaige Thromben zu lösen. Nach einer nochmaligen Reinigung mit 50 ml PBS (Ca^{++} und Mg^{++} enthaltend) wurde die Vene mit Luft durchspült. Nach diesen Reinigungsschritten wurden die Enden der Schnur abgeflammt und an einer Seite verschlossen. Im Anschluß wurden 15 ml einer 0,15%igen Chymotrypsinlösung langsam bis zur prallen Füllung der Vene eingespritzt. Nach einer 30 minütigen Inkubationszeit im Brutschrank bei 37°C wurde die Schnur leicht massiert, um die Ablösung der Endothelzellen zu forcieren. Nach Öffnung der Vene wurde der Inhalt in ein 50 ml Falconröhrchen aufgenommen. Es wurde zweimal mit je 15 ml Medium nachgespült, die vereinigten Lösungen wurden zentrifugiert und das entstandene Zellpellet in frischem Medium aufgenommen und in Kulturflaschen überführt. Die Zusammensetzung des Kulturmediums war: 500 ml Medium M199 mit Earl's Salzen (Gibco BRL), dem 5 ml Penicillin/Streptomycinlösung 1%, 5 ml essentielle Aminosäuremischung 1% (c.c.pro GmbH), 5 ml 1%iger Pyruvatlösung, 5ml HEPES (10mM, pH 7,4), 2,5 ml Schutzfaktor und 100 ml (20% ig) fötales Kälberserum zugegeben wurden.

Die Kulturflaschen wurden vor Zellzugabe mit Gelatinelösung imprägniert. Nach 3 Stunden wurde ein Anhaften der HUVEC am Boden der Kulturgefäße sichtbar, so daß ein Mediumwechsel erfolgen konnte. Nach 2 bis 4 Tagen zeigten die HUVEC ein konfluentes Wachstum und wurden erstmals passagiert. Für die Zellversuche wurden HUVEC der zweiten oder dritten Passage verwendet, da die HUVEC ab der fünften Passage kein E-Selektin mehr exprimierten.

Bei den Internalisierungsstudien der Liposomen mittels HPTS kamen als Vergleichszellen Keratinozyten und die Makrophagen-Zelllinie J 774 zum Einsatz.

Die verwendeten Keratinozyten (HaCat, Passage 27) wurden uns von Prof. Wohlrab (Universitätshautklinik, Uni Halle) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung erfolgte in Keratinocyte SFM (Gibco-BRL) bei 37°C unter 5% CO_2 bis zu einem konfluenten Wachstum der Zellen über 4 bis 5 Tage nach Aussaat.

Die Makrophagen-Zelllinie J774 (Passage 8, American Type Culture Collection) erhielten wir von der Arbeitsgruppe Prof. Schröder, FB Pharmazie, Inst. für Pharmakologie und Toxikologie. Die Zellen wurden in Dulbecco's modified Eagles Medium + 10% PBS + Penicillin/Streptomycin bei 37°C unter 5% CO_2 bis zu einem konfluenten Wachstum kultiviert.

Die anti(Maus)-E-Selektin Antikörper (Ratten IgG), die für die CHO-E-Zellen zur Anwendung kamen, wurden uns freundlicherweise von Prof. Vestweber (Universität Münster) überlassen. Zur Charakterisierung der Ligandenverteilung in den Modellmembranen kam ein FITC-markiertes anti-sLe^x-IgG (Camion, Heidelberg) zur Anwendung. Humanes IgG sowie biotinyliertes IgG für den Vergleich der Kopplungsmethoden, hochgereinigtes Maus IgG für die Immunogenitätsuntersuchungen sowie anti-Biotin-IgG für die targetsensitiven Liposomen stammte von Sigma. Der anti(human)-E-Selektin Antikörper (BBA 26) für die Targetierung der HUVEC wurde von R&D Systems, Wiesbaden erworben.

3.6. Liposomenpräparationen

Die in dieser Arbeit verwendeten Liposomen wurden über die Hydratationsmethode hergestellt. Dafür wurden die entsprechenden Lipide in Chloroform als definierte Stammlösungen aufgenommen. Entsprechende Mengen dieser Stammlösungen (je nach der Verwendung der Liposomen mit mPEG-PE, Proteinankern oder Fluoreszenzlabeln) wurden in einen Rundkolben gefüllt und zur Bildung eines Lipidfilms am Vakuumrotationsverdampfer bei ca. 35°C vom Chloroform befreit. Nach einer Trocknungszeit von minimal 2 Stunden im Exsiccator unter Vakuum erfolgte die Zugabe einer adäquaten Menge von Dispergierungsmedium, wobei die Dispergierung der Lipide mit Hilfe von Glasperlen durch manuelles Schütteln über 10 Minuten bei 60°C erfolgte. Die Dispersionen wurden

anschließend über mindestens 16 Stunden mechanisch geschüttelt und danach fünfmal durch eine Polycarbonatmembran der gewünschten Porengröße (Nucleopor, Porengröße 400, 200, 100, 50nm) extrudiert (Extruder, Lipex Biomembrane, Vancouver, Canada).

Die Liposomen wurden auf ihre erhaltene Größe mittels dynamischer Lichtstreuung (Malvern, Autosizer IIc) überprüft und dann der weiteren Verwendung (z.B. Proteinkopplung) zugeführt.

Zur Herstellung der polymerisierten Liposomen wurde ein Lipidfilm (15 μmol) wie oben angegeben hergestellt und dann in 1 ml einer Mischung aus 100 μl Acryloxyethyltrimethylammonium Chlorid (Polysciences Inc. Warrington, PA, USA) und 900 μl PBS mit 0,5 mg Riboflavin und 0-5mg N,N'-Methylenbisacrylamid (Sigma) unter Lichtabschluß bei Raumtemperatur dispergiert. Nach 16-stündiger Schüttelbehandlung unter Lichtabschluß wurden die Liposomen extrudiert und anschließend mittels Gelchromatografie (Sephadex G 50, Pharmacia, Schweden) vom Monomer der Liposomenaußenphase abgetrennt. Daraufhin wurden die Liposomen unter UV-Licht für ca. 12 Stunden polymerisiert und einer Proteinkopplung unterzogen.

3.7. Kunststoffpartikel

Die als künstliche Rollzellen bzw. Targetzellen untersuchten Feststoffpartikel bestanden aus Melamin, und wurden in unterschiedlichen Größen (250 nm, 850 nm, 2,6 μm , 7 μm) von der AERES GmbH Berlin bezogen. Zur Funktionalisierung der Partikel mit einer umgebenden Bilayer wurden die Partikel im ersten Schritt hydrophobisiert. Dafür wurden sie in trockenem Chloroform über ca. 16 Stunden unter Rühren mit Cyanurchlorid und N,N-Diisopropylethylamin bei Raumtemperatur aktiviert. Nach Entfernen des überschüssigen Cyanurchlorids durch Zentrifugation der aktivierten Partikel wurden diese dann wiederum in trockenem Chloroform aufgenommen und mit DPPE umgesetzt. Durch die selektive Kopplung der DPPE-Aminogruppe am Cyanurchlorid weisen die Alkylreste nach außen und verleihen den Partikeln eine Hydrophobizität. Durch Vesikelfusion auf diese Monolayer wird eine Bilayer komplettiert. Dafür werden ein Teil der Partikel mit einem ca. 10-50fachen Überschuß (berechnet nach Lipidmenge) an ca. 100 nm großen Liposomen versetzt und ca. 16 Stunden geschüttelt. In dieser Zeit fusioniert ein Teil der Liposomen zu einer dichten Bilayer auf den Partikeln. Der Liposomenüberschuß wird über Zentrifugation von den Partikeln entfernt.

3.8. Zellrollexperimente

Für die Zellrollexperimente wurde die Durchflußkammer am Mikroskopisch des Laser Scanning Mikroskops installiert und für mindestens 20 Minuten auf 37°C temperiert.

Prinzipiell erfolgte die definierte Durchströmung der Kammer mittels hydrostatischen Drucks. Dafür diente ein 250 ml Scheidetrichter als Reservoir für das Fließmedium, der an einem skalierten Stativständer in variabler Höhe befestigt wurde. Resultierend aus der Höhe des Reservoirs und des Flüssigkeitsspiegel entstand ein definierter hydrostatischer Druck, der durch die ausgeflossene Menge Medium in einen 10 ml Maßkolben pro Zeiteinheit geeicht werden konnte. Über die Durchflußmenge und die geometrischen Daten der Kammer konnten die Scherraten ausgerechnet und zur Skalierung des Statives korreliert werden.

Für die Rolluntersuchungen sollten die vorbereiteten Zellen (3.5.) relativ hochkonzentriert in den Mikroskop-Bildausschnitt gelangen, um möglichst viele Zellen auswerten zu können. Deshalb wurden die Zellen nicht im gesamten Fließmedium suspendiert, sondern 10^6 Zellen in 150 μl Medium direkt durch das Septum der Blasenfalle in den Flüssigkeitsstrom injiziert. Nach ca. 3 Sekunden waren die Zellen im Bildausschnitt angelangt. An diesem Zeitpunkt wurde der Fluß unterbrochen, um eine Zellsedimentation zu ermöglichen. Nach einer Sedimentationszeit von 5 Minuten befanden sich alle Zellen mit der

Modellmembran der Kammer in Kontakt, und der Fluß wurde wieder hergestellt. Der Verlauf der Zell-Membran-Wechselwirkungen wurde alle zwei Sekunden mittels eines digitalen Mikroskopbildes abgespeichert. Durch diese Bildsequenz läßt sich die Bewegung jeder einzelnen Zelle nachvollziehen und auswerten.

Bei Versuchen mit den löslichen Inhibitoren der Arbeitsgruppe Ikami wurden der HL-60-Zellsuspension 30 nmol der entsprechenden Substanzen vor Einspülen in die Kammer zugefügt.

3.9. Präparative Darstellung des Proteinankers Cyanur-PEG-PE

Die Herstellung des Proteinankers Cyanur-PEG-PE (N-[3-Chlor-5-(ω -(3,5-dichloro-2,4,6-triazoxyl)-poly(ethylenglykol)- α -amino)-2,4,6-triazyl]-DPPE) erfolgt über drei Stufen. Zuerst wird Cyanurchlorid (2.4.6. Trichloro-1.3.5 triazin) mit der Aminogruppe des DPPE umgesetzt, wobei im Anschluß das gekoppelte Cyanurchlorid in einer weiteren Substitutionsreaktion die Aminogruppe eines heterobifunktionellen PEG (α -Amino- ω -Hydroxy-PEG 3000) bindet. Das entstandene Produkt (N-[3-Chlor-5-(ω -(hydroxy-poly(ethylenglykol)- α -amino)-2,4,6-triazyl]-DPPE) wird dann terminal mit einem weiteren Cyanurchlorid umgesetzt. Dieser Cyanurchloridrest gestattet die terminale Antikörperkopplung an liposomale PEG-Ketten.

Zur synthetischen Darstellung des Proteinankers Cyanur-PEG-PE wurden 150 mg DPPE (0,21 mmol) in trockenem Chloroform gelöst und mit einem dreifach molaren Überschuß von Cyanurchlorid (118 mg) in Gegenwart eines äquimolaren Gehaltes an N,N-Diisopropylethylamin (29 mg) bei Raumtemperatur über ca. 72 h gerührt. Die Umsetzung des DPPE (Rf 0,55/ Chloroform/Methanol/Wasser 65/35/1, Detektion mit Bromthymolblau, anschließend Molybdänspray zum Phosphatnachweis) zum DPPE-Cyanurchlorid (Rf 0,72) erfolgt nahezu vollständig, wobei das Produkt mittels präparativer DC (Kieselgel, 2mm Schichtdicke, Merck,) isoliert wurde. Das Produkt war chromatografisch rein und wurde mittels Elementaranalyse (Cl, N) bestätigt.

Zur Kopplung einer PEG-Kette an das DPPE-Cyanurchlorid wird das Produkt wiederum in trockenem Chloroform aufgenommen und mit einer 0,9-fachen molaren Menge des heterobifunktionellen α -Amino- ω -Hydroxy-PEG (3000) in Gegenwart eines äquimolaren Gehalt an N,N-Diisopropylethylamin über ca. 72 h bei Raumtemperatur umgesetzt. Um das entstandene Produkt (Rf 0,65) von dem nichtumgesetzten PEG-Derivat zu trennen, wurde der Reaktionsansatz dreimal mit Wasser ausgeschüttelt, die Chloroformphase eingengt und über 24 h am Ölpumpenvakuum getrocknet.

In der dritten Umsetzungsreaktion wird das entstandene Produkt PEG-PE zur Kopplung des Cyanurchlorides an die freie terminale Hydroxygruppe des PEG mit einem dreifach molaren Überschuß an Cyanurchlorid unter äquimolarer Zugabe von N,N-Diisopropylethylamin in trockenem Chloroform wiederum über 72 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Isolation des Endproduktes Cyanur-PEG-PE (Rf 0,6) erfolgte durch Säulenchromatografie (Kieselgel 60, Merck) unter Elution mit Chloroform/Methanol 90/10 bzw. 70/30. Die Gesamtausbeute dieser Umsetzungen betrug ca. 25%. Das Endprodukt war chromatografisch rein. Die Identität wurde durch Elementaranalyse bestimmt. Aufgrund der nicht exakt definierten Molmasse des PEG wurde durch vergleichende Analyse mit dem PEG (N-Bestimmung) eine mittlere Molmasse bestimmt und dann für die Charakterisierung des Endproduktes berücksichtigt (Cl,N). Das Cyanur-PEG-PE wurde mit definierter Menge in Chloroform aufgenommen und als Stammlösung bei -20°C gelagert.

3.10. Antikörperkopplungen an die Liposomen

3.10.1. Kopplung der Antikörper an konventionelle Liposomen

Für alle Antikörper-Kopplungsmethoden wurde von einem initialen molaren Antikörper/Lipid Verhältnis von 1:1000 ausgegangen. Die Quantifizierung der gekoppelten Antikörpermenge erfolgte über eine Proteinbestimmung nach Peterson und Lowry [272]. Als Grundlipidmischung für alle Liposomen wurde SPC/Chol 7:3 (molar) verwendet. Diese Mischung wurde den entsprechenden Kopplungsmethoden angepaßt, indem die zugegebenen Proteinanker, mPEG-PE und u.U. die fluoreszenten Lipidlabel auf Kosten des SPC eingebaut wurden. Nach einer erfolgten Antikörperkopplung wurden die Immunoliposomen einer Phosphatbestimmung unterzogen [273], um Lipidverluste durch die chromatografischen Trennschritte berücksichtigen zu können.

N-Glut-PE: Für die Antikörperkopplung an N-Glut-PE wurden Liposomen mit 10 mol% dieses Ankers in PBS (pH 7,4) hergestellt. Diese wurden durch die Zugabe von EDC (6mg EDC/ μ mol N-Glut-PE) über 4-6 Stunden bei Raumtemperatur unter Schütteln aktiviert. Danach wurde der Überschuß an EDC durch Gelchromatografie (Sephadex G 50) abgetrennt. Die entsprechende Menge Antikörper wird zu den Liposomen gegeben. Nach einer Reaktionszeit von ca. 16 Stunden bei Raumtemperatur unter Schütteln wird die ungebundene Antikörpermenge gelchromatografisch (Sephadex 4B, Sigma) abgetrennt.

Für die Kopplung von Con A wurde ein molares Verhältnis von Con A/Lipid 1:100 genutzt, die Kopplungsschritte waren identisch.

Biotin-Avidin-Technik: Für die nichtkovalente Biotin-Avidin-Kopplungstechnik wurden Liposomen in HEPES hergestellt, die 0,1 mol% Biotin-PE enthielten. Diese Liposomen wurden dann schrittweise einer Avidin-Lösung in HEPES bis zum Erreichen eines äquimolaren Verhältnisses von Biotin und Avidin zugegeben, wobei nach jedem Zugabeschritt intensiv durch Vortexer gemischt wurde. Nach einer 30minütigen Inkubationszeit wurden dann die biotinylierten Antikörper als HEPES-Lösung zugegeben, wobei nach erneuter Inkubation über 30 Minuten dann die nichtgebundenen Antikörper über Sephadex 4B abgetrennt wurden.

PDP-PE-Kopplung: Für diese Kopplung mußte der Antikörper mit einer Maleimidgruppe versehen werden, dies geschah entsprechend der Vorgaben von Hansen et al. [223]. Dafür wurde SMPB in DMF langsam zu einer Antikörperlösung in HEPES gegeben, bis ein molares Verhältnis von SMPB/Antikörper 20:1 erreicht war. Nach 90minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Überschuß an SMPB über Sephadex G 50 unter Eluierung mit einem Puffer von pH 6,7 (25mM Mes, 25mM HEPES, 140mM NaCl) abgetrennt.

Liposomen, die 1mol% PDP-PE enthielten, wurden in dem gleichen Puffer hergestellt. Zur Reduzierung der Disulfidbrücke des PDP-PE wurde DTT bis zum Erreichen einer 20 mM Endkonzentration zugefügt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor der Überschuß an DTT durch Sephadex G 50 abgetrennt wurde. Die entsprechende Menge des MPB-Antikörpers wurde dann sofort zu den Liposomen gegeben. Nach 16 Stunden wurden auf dem beschriebenen Weg die nichtgekoppelten MPB-Antikörper abgetrennt.

MPB-PE-Kopplung: Für diese Technik mußten freie Thiolgruppen an den Antikörpern generiert werden. Dafür wurde SPDP in Ethanol zu einer HEPES-Lösung des Antikörpers gegeben, bis ein molares Verhältnis von SPDP/Antikörper 10:1 erreicht war. Nach 30 Minuten Inkubation wurde der Überschuß an SPDP wiederum mit Sephadex G 50 abgetrennt, wobei mit einem Puffer von pH 4,7 (100mM Na acetat, 100mM NaCl) eluiert wurde. Unmittelbar vor der Proteinkopplung wurde die Disulfidgruppe des PDP durch DTT reduziert und das DTT durch Gelchromatografie und Elution mit Puffer pH 6,7 entfernt.

Die frisch thiolierten Antikörper wurden zu Liposomen von pH 6,7 gegeben, die 1 mol% MPB-PE enthielten. Nach 16stündiger Inkubation wurde über Sepharose 4B und Elution mit HEPES getrennt.

3.10.2. Antikörperkopplung an das Cyanur-PEG-PE

Zur Antikörperkopplung an die terminalen PEG-Reste des Cyanur-PEG-PE wurden Liposomen mit unterschiedlichem Gehalt an Cyanur-PEG-PE (0-7,5 mol%) entsprechend der o.g. Hydratisierungsmethode in 0,15M NaCl (0,5 ml) hergestellt. Die korrespondierende Menge des zu koppelnden Antikörpers wurde in 0,5 ml Boratpuffer eines pH von 8,8 gelöst und der Präparation zugesetzt. Die Kopplung erfolgt bei Raumtemperatur über 16 Stunden unter Schütteln. Nach dieser Zeit werden die resultierenden Immunliposomen von den nicht gebundenen Antikörpern durch Gelchromatografie (Sepharose 4B) unter Elution mit PBS (0,15M, pH 7,4) getrennt.

3.11. Untersuchung der Immunogenität der Immunliposomen

Zur Untersuchung der Immunogenität von Liposomen bzw. Immunliposomen wurde diese in Ratten i.v. injiziert, wobei nach einer wiederholten Gabe der Liposomen nach einer Inkubationszeit der Blutspiegelverlauf bzw. die Organanreicherung der Liposomen analysiert wurde. Dafür wurden konventionelle (N-Glut-PE, 5mol% PEG-PE) und terminal gekoppelte Immunliposomen (Cyanur-PEG-PE, 5 mol% bzw. 3 mol%+2mol% mPEG-PE) unter sterilen Bedingungen hergestellt (Vesikelgröße ca. 85 nm) und mit einem hochgereinigten Maus IgG (SIGMA) wie angegeben gekoppelt. Als Kontrolle wurden Standardliposomen (SPC/Chol) mit ebenfalls 5 mol% mPEG-PE eingesetzt. Diese Liposomen wurden am Tag 1 männlichen, ca. 8 Wochen alten Wag-Rij-Ratten von ca. 250 g Gewicht unter Diethylether-Narkose i.v. injiziert, wobei die genaue Dosierung (2 µmol Liposomen/ 100g) durch Differenzmessung der Spritzen vor und nach erfolgter Injektion berechnet wurde. Am Tag 14 erhielten die Ratten eine wiederholte Liposomeninjektion, wobei die Liposomen zur Verfolgung des Blutspiegelverlaufs und der Organverteilung den radioaktiven Markers ³H Cholesteryloleyl ether (Amersham, Buckinghamshire, UK) (0,5 µCi/2 µmol Lipid) enthielten. Gemessen vom Zeitpunkt dieser Injektion wurden den Ratten unter Anästhesie nach 2, 5, und 10 Minuten sowie nach 1, 2, 3, 6 und 24 Stunden Blutproben entnommen. Nach 24 Stunden wurden die Ratten getötet, der Blutkreislauf mit Puffer gespült und die Leber, Milz, Lunge, Herz und Nieren entnommen. Diese Organe wurden unmittelbar darauf homogenisiert und nach geeigneten Verdünnungsschritten gemeinsam mit den Blutproben (Serum) auf ihren Radioaktivitätsgehalt vermessen. Durch Vermessung von verschiedenen Äquivalenten der Ausgangsliposomen konnte die gesamte, den einzelnen Ratten applizierte Radioaktivitätsmenge berechnet werden. Unter Berücksichtigung der Gesamtserum-Menge jedes Tieres (Gewicht x 0,0219) + 2,66 und der vorgenommenen Verdünnungsschritte konnten dann die erhaltenen Blut-Zeit- bzw. Organ-Werte zu dem Ausgangswert prozentual ins Verhältnis gesetzt werden.

Die pharmakokinetische Auswertung der Blutspiegelverlaufes wurde mittels Topfit, Version 2.0 vorgenommen [274]. Es wurde eine kompartmentfreie Analyse unter Annahme einer Bolus infusion vorgenommen. Als Dosiseneinheit wurden die prozentualen Werte der Radioaktivität zur Zeit in Minuten verwendet.

3.12. In vitro-Zellbindungsstudien der Immunoliposomen

Bei der Verwendung der HUVEC als Targetzellen für die Immunoliposomen mußten diese durch ihre nichtkonstitutive Expressierung des E-Selektins vor den Versuchen einer Stimulation mit rekombinantem humanen IL-1 β (aus E. coli, Boehringer Mannheim) unterzogen werden. Der Nachweis der E-Selektin-Expressierung und deren zeitlichen Verlauf wurde mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper (FITC-markierter sekundärer Antikörper gegen anti-E-Selektin-IgG, SIGMA) durchgeführt.

3.12.1. Messung unter statischen Bedingungen (plate reader)

Nach einem konfluenten Wachstum wurden die HUVEC durch Behandlung mit Trypsin (0,25% Trypsin-EDTA) aus den Kulturflaschen geerntet und auf 96-well-Platten (Labsystems) übertragen. Pro well (Gelatineimprägnierung) wurden ca. 40.000 Zellen ausgesät, die innerhalb von ca. 3 Stunden eine festhaftende Monolayer bildeten. 3 Stunden vor Liposomenzugabe wurden die HUVEC mit IL-1 β (16 ng / 2 ml Medium) bei 37 °C stimuliert. Nach erneutem Mediumwechsel wurden die verschiedenen Liposomenpräparationen zu den HUVEC gegeben. Die Liposomeninkubation erfolgte zur Fokussierung auf Bindungsprozesse ohne endozytotische Aufnahme bei 4°C über 90 Minuten, wobei das Lipid-Zell-Verhältnis 1 μ mol Lipid/10⁶ HUVEC betrug. Anschließend wurden die nicht gebundenen Liposomen durch Spülen der wells entfernt und eine fluorimetrische Quantifizierung (Fluoroscan Ascent, Labsystems) durchgeführt. Als Blindwerte dienten die Zellen ohne Liposomenbehandlung.

3.12.2. Messung am Durchflußzytometer

Nach Trypsinisierung wurden die HUVEC in Kulturschälchen (Gelatineimprägnierung) überführt und für ca. 12 Stunden im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) belassen. Nach den angegebenen Stimulationsschritten und der Liposomeninkubierung bei 4°C wurden die nicht gebundenen Liposomen wiederum durch mehrfaches Spülen von den HUVEC getrennt. Anschließend wurden die HUVEC mechanisch von den Böden der Kulturschalen entfernt und der durchflußzytometrischen Messung zugeführt.

Diese erfolgte an einem Durchflußzytometer FACScan (Becton Dickinson, San Diego, USA) bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm. Die Zellsuspension wurde mit einer Konzentration von ca. 10⁶ Zellen/ml verwendet. Für diese Untersuchungen enthielten die Liposomen 3 mol% NBD-PE. Die Messungen wurden freundlicherweise von Dipl. Phys. Klapperstück an der Universitätshautklinik durchgeführt.

3.12.3. Mikroskopische Auswertung der Liposomenbindung unter simulierten Scherflußbedingungen

Nach Trypsinisierung wurden ca. 500.000 HUVEC auf runde Mikroskopie-Deckgläschen (Gelatineimprägnierung, 18 mm Durchmesser, 0,5 mm dick) aufgebracht und für 3 Stunden im Brutschrank belassen. Nach dieser Zeit hafteten die Zellen fest an, so daß die Gläser in die Doppel-Durchflußapparatur (3.2.) eingebaut werden konnten. Als interner Vergleich wurde immer ein Gläschen mit stimulierten und eines mit unstimulierten HUVEC gleichzeitig in der Doppelkammer für die Liposomenexperimente verwendet. Die Durchflußapparatur wurde am thermostatierten Mikroskopisch (37°C) fixiert und mit einer Walzenpumpe verbunden. Unter einem kontinuierlichen Mediumfluß von 2,4 ml/min (entsprechend einem Schergrad von 200 s⁻¹) wurden die betreffenden Liposomenpräparationen (3 mol% NBD-PE enthaltend) dem Strom zugegeben. Vor jeder mikroskopischen Untersuchung (0; 0,5 h; 5 h; 18 h) wurde der Liposomenfluß für 5 Minuten durch reines Medium ersetzt und anschließend wieder aufgenommen.

3.13. Untersuchung der Zellinternalisierung der Liposomen

3.13.1. Pyraninmethode

Zur Untersuchung der Liposomeninternalisierung mittels Pyranin (8-Hydroxy-1,3,6-trisulfonsäure; HPTS) wurde zuerst der reine Farbstoff auf seine spektralen Eigenschaften in Abhängigkeit vom pH untersucht. Laut Literaturangaben wurde ein Pyraninpuffer mit pH 5,1 [275] hergestellt, von dem ausgehend mit gelösten 60 μM HPTS durch NaOH-Zugabe die gewünschten pH-Werte zwischen 5,5 und 8,5 eingestellt wurden. Die Fluoreszenz-Anregungsspektren wurden dann für diese Lösungen bei Anregungswellenlängen von 200-500 nm mit Emission bei 512 nm aufgezeichnet (Fluorimeter Hitachi Fluoroscanner).

Für die Internalisierungsexperimente wurden die Liposomen in einer 35 mM HPTS-Lösung hergestellt und nach Abtrennung des HPTS im äußeren Medium unfunktionalisiert oder nach Antikörperkopplung (3.10.1) verwendet.

Die Vergleichszellen Keratinozyten und J774 wurden ohne weitere Vorbehandlung genutzt, bei HUVEC erfolgte wiederum eine Stimulierung (3.12).

Ca. 12 Stunden vor den eigentlichen Versuchen wurden ca. 10^6 Zellen auf Kulturschalen verteilt. Nach Adhärenz der Zellen wurden diese mit pyraninenthaltenden Liposomen (Pyranosomen) bei 4°C oder 37°C inkubiert und anschließend die nicht gebundenen Pyranosomen durch mehrmaliges Spülen entfernt. Nach Ablösen der Zellen von den Kulturschalen wurden diese direkt der Fluoreszenzmessung mit den o.g. Parametern zugeführt. Die Liposomen-freien Zellen wurden nach analoger Behandlung als Blindwerte verwandt.

3.13.2. Dithionit-Methode

Für die Internalisierungsuntersuchungen mit Hilfe des NBD-Quenchers Dithionit mußten Liposomen angewendet werden, die NBD-PE nur in der äußeren Monolayer enthielten. Dies wurde durch eine Ethanolinjektionsmethode gewährleistet. Dafür wurden die intakten und ungelabelten Liposomen (in PBS) unter vortexen mit einer ethanolischen NBD-PE Lösung (entsprechend 3 mol%) eines solchen Volumens versetzt, das ca. 1 Vol% der wässrigen Phase entsprach. Zur Überprüfung des asymmetrischen Einbaus des NBD-PE wurde die Fluoreszenzabnahme unter Dithionit-Zugabe am Fluorimeter verfolgt (Anregung 490nm, Emission 530 nm). Dafür wurden den Liposomen in einer Küvette unterschiedliche Mengen einer Dithionit-Stammlösung (Tris, pH10) bis zum Erreichen eines molaren Verhältnisses von (NBD:Dithionit) 1:50.000; 1:100.000 oder 1:200.000 zugegeben. Die abnehmende Fluoreszenzintensität wurde innerhalb von 10 Minuten kontinuierlich analysiert.

Für die Zelluntersuchungen wurden die HUVEC wiederum nach Trypsinisierung auf Deckgläschen (18 mm Durchmesser, Gelatinebehandlung) aufgebracht und 3 Stunden im Brutschrank belassen und anschließend stimuliert. Danach wurden die Liposomen (1 μmol Lipid/ 10^6 HUVEC) für 90 Minuten bei 37°C auf die Zellen gegeben und anschließend die nicht gebundenen Liposomen durch Spülen entfernt. Nach einer ersten fluoreszenzmikroskopischen Analyse der Zellen am LSM wurden diese für 3 Minuten mit einer 20 mM Lösung von Dithionit versetzt und nach mehrfachem Spülen erneut analysiert.

3.13.3. Anwendung von Liposomen mit Fluoreszenz-Doppelmarkierung

Für diese Versuche wurden unfunktionalisierte Liposomen benutzt, die mit eingeschlossenem FITC-Dextran und eingebautem Rhodamin-PE eine Doppelmarkierung enthielten.

Die HUVEC Vorbehandlung und die Liposomen-Inkubation erfolgten wie bei der Dithionit-Methode. Nach dem Abspülen der nichtassoziierten Liposomen wurden die Zellen zur vollständigen Liposomenentfernung („acid wash“) für 3 Minuten mit einem Puffer pH 3 (3,6g Essigsäure, 7,02g NaCl, 0,7g KCl, 0,64g CaCl₂, 0,32g KH₂PO₄, 0,28g MgSO₄, 4,96g NaHCO₃, 2,66g Glucose pro Liter) behandelt und anschließend erneut sorgfältig gespült. Unmittelbar daran erfolgte die mikroskopische Auswertung am LSM unter Berücksichtigung beider Anregungswellenlängen (488nm und 543nm).

3.13.4. Fusionsnachweis mit Calcein

Die für diese Versuche angewendeten unfunktionalisierten Liposomen enthielten 100mM Calcein. Die HUVEC-Aktivierung, die Liposomenmenge und Inkubationszeit waren dem Dithionit-Versuch identisch, wobei die Inkubation parallel bei 4°C und 37°C erfolgte. Nach Entfernung der nicht gebundenen Liposomen und des freigesetzten Calceins durch intensives Spülen wurden die Proben fluoreszenzmikroskopisch am LSM (Anregung 488 nm) analysiert.

3.13.5. Quantifizierung der internalisierten Liposomen durch Pronase-Behandlung

Die Liposomen für diese Versuche enthielten 0,4 mol% DiO. Nach Trypsinisierung wurden die HUVEC auf Kulturschalen überführt und 3 Stunden im Brutschrank belassen. Die Hälfte der Zellansätze wurde anschließend stimuliert. Für 90 Minuten wurden die Liposomen bei 37°C mit den Zellen in Kontakt gebracht, wobei bei diesen Versuchen ein Verhältnis von 0,5 µmol Lipid/ 10⁶ Zellen eingehalten wurde. Nach dieser Zeit wurden die nicht gebundenen Liposomen wiederum durch Spülen entfernt. Anschließend wurden in jede Kulturschale 0,8 ml einer 0,1% igen Pronase-Lösung gegeben. Nach einer Minute wurden die abgelösten Zellen in ein Eppendorfgefäß überführt, welches 0,8 ml einer 30%igen Saccharose-Lösung enthielt. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 100.000 g wurde der Überstand am Fluorimeter (Anregung 484 nm, Emission 501 nm) vermessen. Das im Eppendorf verbliebene Zellpelett wurde mit einer 0,2 %igen Triton X 100-Lösung unter Vortexen zerstört, das resultierende Lysat wurde nochmals für 10 Minuten bei 100.000 g zentrifugiert. Der Überstand, der nun die internalisierten Liposomen beinhaltete, wurde analog vermessen. Als Blindansatz diente ein analog behandeltes, Liposomen-freies Zellansatz.

3.14. Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Die mikroskopischen Untersuchungen der Modellmembranen oder der Zellrollexperimente wurden an einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop durchgeführt (LSM 410 invert, Carl Zeiss, Germany). Bei einem solchen Mikroskop wird die Probe mit einem Laserstrahl gescannt. Die Wellenlänge des Laserlichtes liegt mit 488 nm oder 543 nm im Bereich der Anregungsmaxima der von uns verwendeten Fluoreszenzmarker. Das Emissionslicht gelangt über mehrere Strahlenteiler und Paßfilter zu einem Photomultiplier und wird dort elektronisch ausgewertet. Das konfokale Prinzip des Mikroskopes beruht auf einer variablen Lochblende vor dem Multiplier, die die Überstrahlungen des Emissionslichtes reduziert, die in z-Richtung der Probe entsteht. Dadurch ist es möglich, nur Fluoreszenzen zu detektieren, die sich in unmittelbarer Nähe des Untersuchungsobjektes befinden. Emissionslicht von darüber befindlichen Zellen bzw. Liposomen wird nicht erfaßt.

3.15. Rasterkraft Mikroskopie (AFM)

Das AFM erlaubt Untersuchungen in molekularen Dimensionen an Oberflächen biologischer und mechanisch empfindlicher Systeme in ihrer natürlichen Umgebung ohne spezielle Probenpräparation.

Beim AFM wird eine nur wenige μm große Abtastspitze, die sich am Ende einer federnden Zunge (Cantilever) befindet, rasterförmig über die Probenoberfläche geführt. Ein Detektor mißt die Auslenkung des Cantilevers in der z-Achse, entsprechend der Topografie der Probenoberfläche. Die dreidimensionale Abbildung der Oberfläche wird nun durch die Darstellung der gemessenen z-Auslenkung des Cantilevers als Funktion der x-y-Position der Rasterbewegung der Probe erzeugt.

Die AFM-Untersuchungen wurden freundlicherweise von Dr. U. Bakowsky am Max-Planck-Institut für Mikrostrukturphysik, Halle an einem Nanoscope IIIa (Digital Instruments, Santa Barbara, CA, USA) durchgeführt. Die hydratisierten Proben befanden sich dafür unter MilliQ® oder dem entsprechenden Puffer.

4. Ergebnisse

4.1. Untersuchung der molekularen Bindungseigenschaften der Selektine

4.1.1. Etablierung eines dynamischen Testsystems zur Untersuchung von Zelladhäsions- und Rollvorgängen

Zur Untersuchung der molekularen Bindungseigenschaften der Selektine im Prozeß der Zelladhäsion oder des Zellrollens mußte eine abstrahierende Modellanordnung geschaffen werden. In diesem Modell sollten die Bindungspartner (Selektine und deren Liganden) unter dynamischen Bedingungen in Wechselwirkung treten. Für eine möglichst große Variierbarkeit und damit Aussagefähigkeit der Untersuchungen mußte eine Seite der Bindungspartner definiert modifizierbar sein. Zu diesem Zweck sollten Selektin- oder Ligandhaltige Zellen über Modellmembranen gespült werden, in denen die korrespondierenden Bindungspartner in definierter Weise inkorporiert sind. Durch Variation dieser Modellmembranen kann dann auf die Bindungseigenschaften der Selektine fokussiert werden.

Aus diesem Grund wurde zu Beginn unserer Arbeiten eine Durchflußapparatur konstruiert. Für eine Simulierung der kapillaren Blutflußbedingungen mußte in diese Apparatur eine Durchflußkammer eingebracht werden, in der in einer laminaren Strömung Zellen über eine feststoffixierte Modellmembran gespült werden können. Dabei sollte die supportfixierte Modellmembran einfach und schnell in die Durchflußkammer inserierbar sein, um diese in den Experimenten leicht modifizieren zu können. Für eine mikroskopische Auswertbarkeit der Zelladhäsionsereignisse war eine möglichst universelle Paßfähigkeit der Kammer für verschiedene mikroskopische Verfahren anzustreben.

In der Literatur sind verschiedene Scherflußapparaturen beschrieben, von denen sich die planaren Durchflußkammern [276,277] aufgrund der besseren mikroskopischen Fokussierbarkeit und der möglichen Strömungsberechnungen für unsere Belange besonders anboten. Für eine solche Durchflußkammer existieren keine spezifischen geometrischen Anforderungen, zur Gewährung eines laminaren Stromes sollte jedoch die Höhe der Durchflußkammer möglichst gering sein.

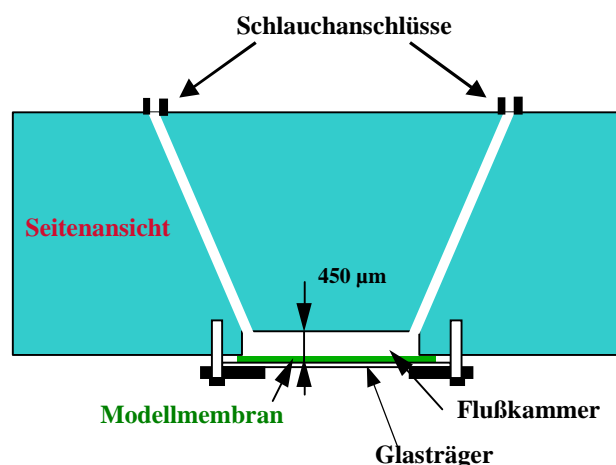


Abb 6: Schematische Darstellung der Durchflußapparatur

Wir fertigten eine transparente Durchflußapparatur aus Polyacrylat an, in deren Unterseite die eigentliche Durchflußkammer eingebracht war. Die Wahl der geometrischen Dimensionen dieser Durchflußkammer (geringe Höhe von 0,45 mm, keine Kanten) sollte die

Laminarität der Strömung gewährleisten und Verwirbelungen des Strömungsmediums ausschließen. Ein gleichmäßiger und definierter Flüssigkeitsstrom durch die Kammer ohne störende Pumpbewegung wird dabei durch einen hydrostatischen Druck eines Flüssigkeitsreservoirs gewährleistet. Aus den geometrischen Daten der Kammer (Höhe 0,45 mm; Breite 6 mm; Länge 11 mm) läßt sich für jede Durchflußrate (Volumen/Zeit) der Schergrad nach Gleichung 2 (2.1.4.) berechnen. Die Durchflußrate wiederum kann durch den hydrostatischen Druck (Höhe des Flüssigkeitsreservoirs) variiert werden.

Die Durchflußkammer wird auf der Unterseite durch ein Mikroskopie-Deckgläschen verschlossen, auf das zuvor durch verschiedene Techniken eine Modellmembran aufgebracht wurde. Die Positionierung der Durchflußkammer an der Unterseite der Apparatur und die Wahl von Glas als Träger für die Modellmembran gestatten eine inverse Mikroskopie. Durch Anwendung der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie kann somit die Bewegung von fluoreszenzmarkierten Zellen in unmittelbarer Nähe der Modellmembran detektiert werden. Zusätzlich kann die Apparatur aber auch durch ihre optische Transparenz für Durchlichtuntersuchungen herangezogen werden.

Aus den Maßgaben dieses Modells ergeben sich für die feststofffixierten Modellmembranen auf den Deckgläsern verschiedene Anforderungen. Diese Membranen sollten neben einer reproduzierbaren Herstellbarkeit auch die Möglichkeit eines definierten Einbaus von lipophilisierten Bindungspartnern (insbesondere Glykolipiden) und eine ausreichende Scherstabilität aufweisen.

Zur Herstellung von supportfixierten Modellmembranen existieren verschiedene Techniken. So wird beispielsweise die Fusion bzw. das Aufspreiten von Liposomen an Feststoffoberflächen genutzt, um diese mit einer Bilayer zu überziehen. Dieser Prozeß wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen durchgeführt und analysiert, er ist aber relativ schwierig steuerbar und ergibt keine exakt reproduzierbaren Resultate [278]. Eine weitere Methode besteht in der kovalenten Fixierung von Lipiden an Feststoffoberflächen (sog. Self assembling). Werden die Kopfgruppen von Lipiden über ihre spezifische Reaktivität an Oberflächen gebunden, entstehen Monolayer [279], die durch andere Techniken mit einer zweiten Monolayer zu einer vollständigen Bilayer ergänzt werden können.

Eine weitere etablierte Methode zur Herstellung von Bilayern auf Oberflächen ist die Langmuir-Blodgett-Technik [280]. Bei dieser Methode werden z.B. Phospholipide an einer Wasser/Luft-Grenzfläche vororganisiert. Resultierend aus der Amphiphilie der Moleküle richten diese ihre Kopfgruppen in die Wasserphase und ihre hydrophoben Areale zur Luft aus. Durch laterale Komprimierung dieses Oberflächenfilmes unter isothermen Bedingungen durchlaufen die Lipide verschiedene Phasenzustände. Im komprimierten Zustand können diese Filme dann durch langsames Hindurchtauchen eines planaren Materials unter Konstanthalten des lateralen Druckes auf den Feststoff übertragen werden. Wird das Plättchen aus der Wasserphase durch die Monolayer gezogen, sind die Kopfgruppen der Phospholipide zur Materialoberfläche gerichtet und über Wasserstoffbrückenbindungen adsorptiv gebunden. Wird der Feststoff dann wieder aus der Luft durch die Monolayer in die Wasserphase zurücküberführt, überträgt sich die Monolayer in umgekehrter Orientierung und komplettiert somit zur Bilayer.

In unserer Arbeitsgruppe wurden alle drei Methoden zur Erzeugung von supportfixierten Modellmembranen getestet und im Hinblick auf Praktikabilität der Durchführbarkeit sowie auf Definiertheit, Reproduzierbarkeit und Stabilität der Membranen verglichen. Für eine umfassende Beschreibung der Ergebnisse und der analytischen Methoden sei auf Vogel verwiesen [281].

Als optimierte Methode zur Herstellung unserer Modellmembranen für die Durchflußkammer wurde eine Kombination aus Self Assembly und Langmuir-Blodgett-(LB)-Technik ausgewählt. Dabei kombinierten wir die Vorzüge einer hohen Stabilität und

Kopplungsdichte der unteren kovalent fixierten Monolayer auf dem Glas mit der definierten und reproduzierbaren Übertragbarkeit der zweiten Monolayer mittels der LB-Technik.

Zur Herstellung der ersten Monolayer wurden die gereinigten Gläser mit Dimethyloctadecyl-Chlorsilan umgesetzt. Durch Reaktion mit den Hydroxygruppen des Glases kommt es zur kovalenten Fixierung des Silans, welches dem Glas durch die nach außen gerichteten Alkylketten eine starke Hydrophobizität verleiht. Diese hydrophoben Gläser können nun mittels LB-Technik aus der Luft durch einen (die spezifischen Bindungskomponenten enthaltenden) Oberflächenfilm in die Wasserphase getaucht werden, wobei sich eine Bilayer ausbildet. Die resultierenden Bilayer können durch Modifizierung der LB-Filme bezüglich Art, Konzentration und lateraler Verteilung der Bindungskomponenten und durch die Wahl der Matrixlipide in diesen Filmen in großem Umfang variiert werden. So kann man beispielsweise bei Lipidmischungen mit unterschiedlicher Fluidität der Komponenten laterale Entmischungen (Cluster) erzeugen und übertragen.

Trotz der kovalenten Fixierung der unteren Monolayer auf dem Glas zeigen die supportfixierten Membranen eine große Analogie zum Verhalten natürlicher biologischer Membranen. Biomembranen weisen eine laterale Diffusion der Membranbestandteile auf, was auch für feststofffixierte Membranen beschrieben wurde [282]. Für uns war dies von Interesse, um eine laterale Veränderung der Modellmembranen zwischen Präparation und Experiment möglichst zu vermeiden. Um die laterale Diffusion in unseren Modellmembranen zu untersuchen, führten wir ein modifiziertes Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP)-Experiment durch. Bei einer solchen Untersuchung wird ein lipidverankerter Fluoreszenzlabel in die Membran eingebaut und anschließend durch sehr hohe Strahlungsintensität in einem definierten Bereich bestimmter Größe gelöscht. Die Fähigkeit der umgebenden Fluoreszenzlabel zur erneuten Auffüllung dieses Bereiches gibt Auskunft über die laterale Diffusion der Lipide und deren Ausmaß.

Für diese Untersuchungen wurde eine fluide POPC-Membran mit 2% des Fluoreszenzlabels NBD-PE durch LB-Technik auf hydrophobisiertes Glas übertragen und anschließend in einem Bereich von 30x30 μm ausgebleicht [281]. Da innerhalb von ca. 120 Minuten eine Fluoreszenzwiederherstellung in dem Bereich erfolgte, beweist dies die Fähigkeit der Lipide in unseren präparierten Modellmembranen zur lateralen Diffusion. Dieses Ergebnis wurde mit einer fluiden Membran erhalten, die im Vergleich zu rigiden Membranen eine stärkere Diffusion aufweisen sollte. Wir leiteten daraus ab, daß mit den präparierten meist rigiden Modellmembranen innerhalb von 60 Minuten die Adhäsionsexperimente durchzuführen sind, um eine laterale Veränderung der übertragenen Bilayer zwischen Präparation und Experiment sicher ausschließen zu können.

4.1.2. Simulierung der Selektin-induzierten Zelladhäsion durch Lektin-gekoppelte Liposomen oder Partikel unter Scherflußbedingungen

Mit der vorgestellten Durchflußapparatur sollten zu Beginn modellhafte Experimente zur Simulation einer Selektin-abhängigen Zelladhäsion unternommen werden. Das Ziel bestand darin, die physikochemischen Randbedingungen zu erkunden und Einflußparameter auf die Zelladhäsion zu verdeutlichen.

Aufgrund des Modellcharakters dieser Studie kamen anstelle Selektin-haltiger Zellen Rezeptor-gekoppelte Liposomen als Zellmodelle zum Einsatz, da sich Liposomen durch ihre einfache und definierbare Herstellung und Modifizierbarkeit für diese Belange besonders anboten. Als Modellrezeptor für das Selektin wurde das Lektin Concanavalin A (Con A) gewählt, welches sich durch eine analoge Affinität zu seinen monosaccharidischen Liganden [283] wie die Selektine zum sLe^x [50] von ca. 1 mM auszeichnet. Das Con A wurde kovalent an die Liposomenoberfläche über den liposomalen Anker N-Glut-PE (siehe 4.3.1.1.) gekoppelt. Als Liposomen kamen LUV einer Größe von ca. 300 – 350 nm der Lipidzusammensetzung SPC/Chol/N-Glut-PE 6/3/1 zum Einsatz. Die Funktionsfähigkeit des

gekoppelten Con A wurde über Liposomenagglutinationsmessungen mit mannosyliertem Albumin nachgewiesen.

Con A hat eine Bindungsaffinität zu Glucose- und Mannosederivaten. Aus diesem Grund wurden als korrespondierende Liganden für die Con A-Liposomen unterschiedliche Alkylmannoside in die Modellmembran der Durchflußkammer eingebaut. Diese wiesen mit einer Hexadecylkette einen einheitlichen hydrophoben Bereich auf, der entweder direkt mit der Mannosekopfgruppe (Mannosid 0) oder über 3 bzw. 8 Ethoxyeinheiten als hydrophilen Spacer (Mannosid III bzw. VIII) verbunden waren. Diese Mannoside wurden zu 10 mol% einer DSPC Matrix zugemischt und über die LB-Technik auf die Glasträger übertragen. Die physikochemische Analyse der Mischfilme erbrachte, daß die Mannoside in entmischter geclusteter Form innerhalb der Matrix sowohl an der Wasser/Luft-Grenzfläche als auch nach Übertragung auf dem Glas vorlagen [284,285].

Die mit NBD-PE gelabelten Con A-Liposomen wurden nun bei einem Schergrad von ca. 200 s^{-1} , der einen unteren Wert des kapillaren Blutstromes repräsentiert, über die Modellmembranen gespült. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung erbrachte, daß über den Meßzeitraum von 10 Minuten die Liposomen kumulativ an der Modellmembran adhärten. Dies zeigt sich in fluoreszenten Spots, während fließende Liposomen (ca. $20\text{-}40 \mu\text{m/s}$) als helle Streifen erschienen. Nach diesem Zeitpunkt wurde mit Puffer bei gleichem Schergrad weiter gespült, so daß keine weiteren Adhäsionsereignisse stattfinden konnten. Nach ca. 30 Minuten hatte sich die Erscheinung der gebundenen Vesikel deutlich verändert, da aus den hell fluoreszierenden Spots größere und schwächer fluoreszente Areale geworden waren. Da eine Ablösung durch Bindungsinhibierung mittels des gelösten Methyl- α -mannosides (0,1 M) nicht mehr möglich war, interpretierten wir diese Erscheinung als ein Aufspreiten der Liposomen auf der Modellmembran. Da unfunktionalisierte Liposomen nur schwach adhärten und die Bindung nicht in eine Fusion überging, mußte die spezifischen Bindung der Liposomen deren Fusion initiieren.

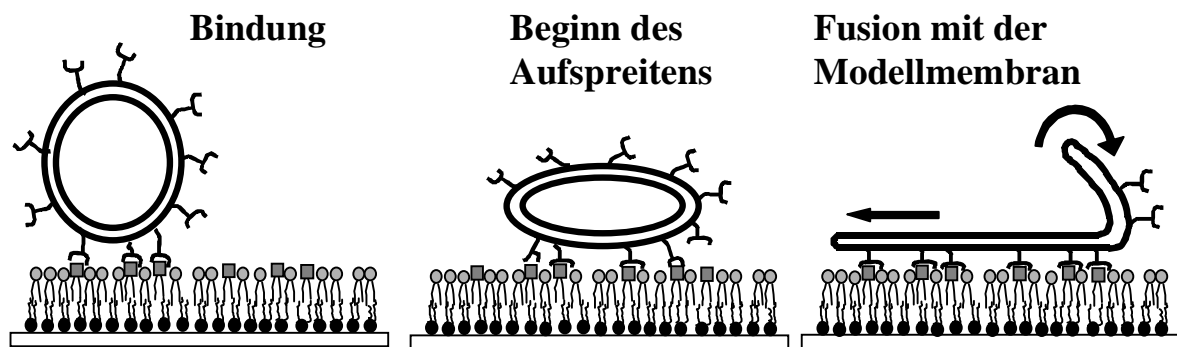


Abb.7: Schema des postulierten Mechanismus des Liposomenaufspreitens an Modellmembranen nach initialer spezifischer Bindung

Daraus läßt sich ableiten, daß in dem etablierten Modellsystem eine Lektin-induzierte Adhäsion unter Scherbedingungen stattfindet und auch detektiert werden kann, für eine reversible Bindung aber zusätzlich eine ausreichende Elastizität der Zellen oder Zellmodelle zur Fusionsverhinderung notwendig ist.

In weiteren Untersuchungen sollte der Einfluß einer veränderten Liposomenelastizität auf das Adhäsionsverhalten verdeutlicht werden. Dafür planten wir eine Polymerisierung der Liposomen im Inneren, die den Con-A-Liposomen dann in Analogie zum Zytoskelett natürlicher Zellen eine elastische Stabilität verleihen sollte. Dafür wendeten wir eine neuartige Polymerisationsmethode an. Wie bei einem Zytoskelett sollte ein Polymernetzwerk im Inneren der Liposomen direkt mit der inneren Monolayer in Verbindung stehen, um diese

zu stabilisieren. Durch die Auswahl eines kationischen Monomers sollte die Wechselwirkung ladungsinduziert zur negativ geladenen Liposomenmembran (zusätzlich 5 mol% PG) stattfinden. Als Monomer kam ein Cholinether der Acrylsäure zur Anwendung, der nach gelchromatographischer Entfernung vom äußeren Medium der Liposomen im Inneren durch UV-Licht polymerisiert wurde. Durch die Zugabe unterschiedlicher Mengen eines Vernetzers (N,N'-Methylenbisacrylamid, 0-5 Gewichts% des Gesamtacrylats) sollte die Elastizität graduell erhöht werden. Die erfolgreiche Polymerisierung konnte durch Raman-spektroskopische Untersuchungen (Abnahme des C=C Peaks bei 1635 s^{-1} auf ca. 10%) nachgewiesen werden. Gleichzeitig gelang es, mit Hilfe der Fluoreszenzpolarisation an Hand der Fluoreszenzabnahme und gleichzeitiger Polarisationszunahme der Membransonde Diphenylhexatrien (DPH) zu zeigen, daß es durch die Polymerisationwirkung auf die innere Monolayer zu einer Fluiditätsabnahme der Bilayer kommt.^a Wir nahmen diese Befunde als Beweis einer Elastizitätszunahme und führten diese Vesikel nach Con A-Kopplung weiteren Adhäsionsexperimenten zu. Als Maß einer vollkommen rigiden und unelastischen Modellzelle nutzen wir Melamin-Feststoffpartikel vergleichbarer Größe (400 nm), die mit einer analogen Con A-haltigen Bilayer überzogen waren.

Die Adhäsionsexperimente zeigten, daß das sichtbare Aufspreiten der Con A-Vesikel an der Modellmembran mit zunehmender Elastizität zurückgedrängt wird, eine inhibitorische Verdrängung der gebundenen Vesikel sowie auch der Partikel gelang jedoch nicht. Durch die fehlende weiche Verformbarkeit der Liposomen war das Ausmaß der unspezifischen Membranwechselwirkungen zurückgedrängt aber nicht aufgehoben worden [284].

Auf dem Weg zu einer reversiblen und inhibierbaren Lektinbindung inkorporierten wir weiterhin 10 mol% DPPG in die Modellmembran, um durch elektrostatische Abstoßung der negativ geladenen Vesikel eine Balance aus Ligand-Rezeptor-Bindungen und Unterdrückung unspezifische Membraneffekte zu finden. Der Ladungseinfluß auf die Reduzierung der Zelladhäsion am Endothel ist bekannt [286]. Die elektrostatische Abstoßung ist eine langreichweitige Kraft, die insbesondere bei Bilayerseparationen größer 30 \AA von Bedeutung ist. Dies manifestierte sich in unserem Fall darin, daß nur noch der Ligand mit dem längsten hydrophilen Spacer und der damit exponiertesten Mannosidpräsentation, das Mannosid VIII zur Bindung befähigt war. Nach diesen Veränderungen war ein Teil der Bindungen durch Methylmannosid inhibierbar.

Als letztendliche Modifizierung inserierten wir unterschiedliche Konzentrationen von mPEG-PE in die Liposomen, um damit eine natürliche Glykocalix zu simulieren. Als Glykocalix bezeichnet man die ca. 100 \AA dicke Ummantelung aller Zellen aus hydrophilen Glykoproteinen, die durch eine sterische Abschirmung unspezifische Kontakte und Wechselwirkungen abschwächt. Diese Funktion wird auch mPEG-PE bei Liposomen als sog. sterische Stabilisierung zugeschrieben (vgl. 2.3.2.). Das eingesetzte mPEG-PE 2000 hat eine Ausdehnung von ca. 50 \AA [211], und korreliert somit gut mit der Molekülgröße des Con A [287].

Die Adhäsionsuntersuchungen der polymerisierten, negativ geladenen und durch mPEG-PE (4 mol% Optimum) sterisch stabilisierten Con A-Vesikel zeigten zwar ein

^a Die Zunahme der Liposomenelastizität wurde in parallelen Experimenten auch mittels der Quarzmikrowaage nachgewiesen. Bei dieser Biosensortechnik werden Masseanlagerungen im Nanogramm-Bereich an Quarzoberflächen durch eine zur Masse korrelierende Frequenzänderung detektiert. In einer Durchflußapparatur wurde ein Schwingquarz, der mit identischen Modellmembranen zu den o.g. Studien beschichtet war, verwendet. Damit konnte die Liposomenadhäsion mengenmäßig analysiert werden. Ein zunehmender Polymerisationsgrad durch steigende Konzentrationen des Vernetzers führte zu einer geringeren Frequenzdifferenz [288]. Dies kann als Unterdrückung der unspezifischen Liposomenadhäsion/Liposomenspreitung an der Modellmembran interpretiert werden.

geringeres Bindungsausmaß, aber diese Bindungen waren jetzt vollständig durch Methylmannosid inhibierbar. Dies repräsentiert somit die optimale Liposomenzusammensetzung zur Simulation einer Lektin-induzierten Zelladhäsion.

Die angewendeten ca. 350 nm großen Liposomen unterliegen bei den gewählten Scherflußbedingungen des Modells einer Scherkraft von ca. 0,5 bis 1 pN (entsprechend der Scherkraftberechnung 2.1.4.). Ausgehend von der beschriebenen Dissoziationskonstante des Con A von 10^{-4} M und einer abgeschätzten Bindungslänge von 5-10 nm [287] ergibt sich eine Gleichgewichts-Bindungskraft von ca. 10-50 pN pro Con A-Ligand-Wechselwirkung entsprechend Gleichung 5. Da angenommen werden kann, daß die Liposomen über mehrere Con A-Mannosid-Bindungen gleichzeitig gebunden werden, ist die Effizienz der Liposomenbindung offensichtlich. Legt man ein starres Kugelmodell mit einem zehnfach größeren Durchmesser zugrunde, so würde auf ein solches Partikel eine Kraft von ca. 50 bis 100 pN wirken (vgl. 2.1.4.). Nimmt man bei der nichtdeformierbaren Oberfläche der Partikel nur wenige gleichzeitige Einzelbindungen an, existiert ein annäherndes Gleichgewicht von Scher- und Bindungskräften, das eine Ursache für das Selektin-vermittelte Zellrollen darstellen könnte. Um dies zu überprüfen nutzten wir 2,6 µm große Partikel als Zellmodelle, die mit der aus dem Liposomensystem optimierten Bilayerzusammensetzung ummantelt wurden. Diese Partikel zeigen eine feste und inhibierbare Adhäsion, aber eine Rollbewegung entlang der Ligandcluster findet nicht statt.

Daraus lassen sich folgende Schlußfolgerungen ziehen:

- Eine stabile Zelladhäsion läßt sich auch unter Scherbedingungen realisieren. Zu berücksichtigen sind dabei eine ausreichende elastische Stabilität der Zellen, die Einbeziehung von Ladungseffekten und der Einfluß einer sterischen Abschirmung der Zellen.
- Das Selektin-induzierte Zellrollen ist ein weit komplizierterer Mechanismus. Trotz eines angenommenen Gleichgewichtes zwischen Scher- und Bindungskräften und der Wahl eines gleichaffinen Liganden war ein Zellrollprozeß mit dem Con A-System nicht zu simulieren. Folglich müssen weitere Faktoren wie z.B. eine spezifische Kinetik der Bindungsbildung und -dissoziation, spezielle elastische Eigenschaften von Liganden und Rezeptoren sowie ein definiertes Maß der Zelldeformierbarkeit für den Zellrollprozeß von Bedeutung sein.

Mit diesen Modelluntersuchungen zu Beginn unserer Arbeiten gewannen wir grundlegende Kenntnisse über die Lektin-induzierte Zelladhäsion unter Scherbedingungen und deren Einflußfaktoren. Der Zellrollprozeß als Sonderform der Zelladhäsion scheint insbesondere durch die strukturellen und kinetischen Bindungseigenschaften der Selektine und ihrer Liganden geprägt zu sein, er ist nicht losgelöst von diesen zu simulieren.

4.1.3. Einfluß der lateralen Ligandenverteilung auf das Selektin-vermittelte Zellrollen

In den vorangegangenen Untersuchungen zeigte sich, daß die Modellanordnung prinzipiell zur Detektion von Bindungsereignissen unter Scherflußbedingungen geeignet ist. Weiterhin wurde deutlich, daß für die Aufklärung der molekularen Bindungseigenschaften im Zellrollprozeß das Verhalten der Selektine nicht durch andere Rezeptoren simuliert werden kann, was die Sonderstellung der Selektine als Adhäsionsrezeptoren unterstreicht. Aus diesem Grund wurden die weiteren Untersuchungen der molekularen Bindungseigenschaften im Zellrollprozeß auf Selektin-Ligand-Systeme übertragen.

Eine in vitro-Simulation des Leukozytenrollens unter Flußbedingungen wurde bereits von Lawrence und Springer vorgestellt [102,103]. In diesen Studien immobilisierten sie isolierte Selektine in einer Durchflußapparatur und zogen dann aus dem Bindungs- und Rollverhalten von Neutrophilen an diesen Schichten Rückschlüsse über die molekularen Bindungseigenschaften. Bei diesen Arbeiten wurden die Selektinschichten unterschiedlich modifiziert, die Liganden (PSGL-1 an den Neutrophilen) wurden als Konstante betrachtet. Dementsprechend ergaben diese Studien zwar wichtige Aussagen über die

Bindungseigenschaften der Selektine beim Rollen, während das Bindungsverhalten der natürlichen Liganden bzw. die strukturellen Ursachen für deren bis zu 1000fach höhere Bindungsaffinität gegenüber der Bindungsstärke des einzelnen Epitopes sLe^x nicht geklärt wurde.

Deshalb sollen sich unsere Untersuchungen zum Selektin-vermittelten Zellrollens auf die Auswirkungen einer Ligandenvariation konzentrieren. Durch den Einbau von Selektin-spezifischen Glykolipid-Liganden in die supportfixierte Modellmembran können durch Auswertung des Bindungs- und Rollverhaltens Selektin-haltiger Zellen an diesen Membranen strukturelle Aussagen zur Ligandenwirkung im Rollprozeß getroffen werden. Mit der Wahl von Glykolipiden, die als Kopfgruppe das Bindungsepitop sLe^x besitzen, können prinzipiell zwei Aspekte geklärt werden. Einerseits ist von Interesse, ob der orientierte Einbau von Glykolipid-Liganden in Membranen ein Zellrollen vermitteln kann. Daraus ergeben sich Hinweise, ob die aus Granulozyten isolierten sLe^x -Ceramide [81,82] als natürliche Selektinliganden fungieren. Andererseits können mit dem variablen Einbau der Glykolipide in die Modellmembran strukturelle Hintergründe der natürlichen Selektinliganden simuliert werden. Im Vordergrund steht dabei die Fragestellung, ob die räumliche Konzentrierung der Bindungsepitope in Clustern und damit eine Multimerisierung schwach affiner Bindungen das Prinzip der natürlichen Liganden zum Erreichen einer hohen Bindungsaffinität darstellt.

Für unsere Untersuchungen wählten wir ein Glykolipid als Liganden, bei dem eine sLe^x -Kopfgruppe über einen Laktospacer an einem Ceramid als Membrananker gekoppelt war („ sLe^x -Cer“). Diese Verbindung wurde in Analogie zu einem natürlich vorkommenden Glykolipid synthetisch hergestellt [270].

Zum Einbau des sLe^x -Cer in die Modellmembranen kam wieder die LB-Technik zum Einsatz (4.1.1.). Dafür wurden zuerst unterschiedliche Konzentrationen des Ceramids (1 bis 10 mol%) mit DSPC gemischt und anschließend an der Wasser-Luft-Grenzfläche ausgespreitet. Werden auf einer Filmwaage Lipidgemische unterschiedlicher Fluidität gespreitet, können durch die bevorzugte Wechselwirkung gleichfluider Lipide Entmischungen auftreten, die sich als lokale Cluster äußern. Erste Hinweise über das Verhalten des fluiden sLe^x -Cer in der rigiden DSPC-Matrix erbrachten Fluoreszenz-Filmwaage-Untersuchungen. Dabei analysiert man fluoreszenzmikroskopisch die Verteilung eines fluoreszenten Lipides (NBD-PC) in der Monolayer, das sich entsprechend seiner Fluidität in der fluiden Phase anreichert. Als Ergebnis erhält man eine sichtbare Separation von hellen und dunklen Arealen. Die Auswertung der DSPC/ sLe^x -Cer-Monolayer zeigte deutlich, daß sich das Ceramid in diesem Konzentrationsbereich in Clustern in der Matrix organisiert [289]. Diese Monolayer wurden dann mit der beschriebenen LB-Technik auf die hydrophobisierten Gläser übertragen (3.3.). Dabei war für die folgenden Untersuchungen von besonderem Interesse, inwieweit die geclusterte Strukturierung der Ceramide in der Matrix auch durch die Übertragung auf das Glas erhalten bleibt. Die Ceramid-Cluster in den supportfixierten Modellmembranen wurden mit zwei verschiedenen Techniken nachgewiesen. Durch Inkubierung eines fluoreszenzmarkierten anti- sLe^x -IgG mit der Modellmembran wurde im Fluoreszenzmikroskop nach verschiedenen Spülschritten deutlich, daß sich die Antikörper nicht homogen auf der Membran verteilten, sondern in bestimmten Arealen anreicherten. Dies nahmen wir als Beweis für die Ceramid-Cluster in der Modellmembran. Zusätzlich analysierten wir die übertragenen Bilayer mittels Atomic Force Mikroskopie (AFM). Die AFM-Aufnahme in einer Dimension von 800x800 nm ist in Abb. 8 dargestellt.

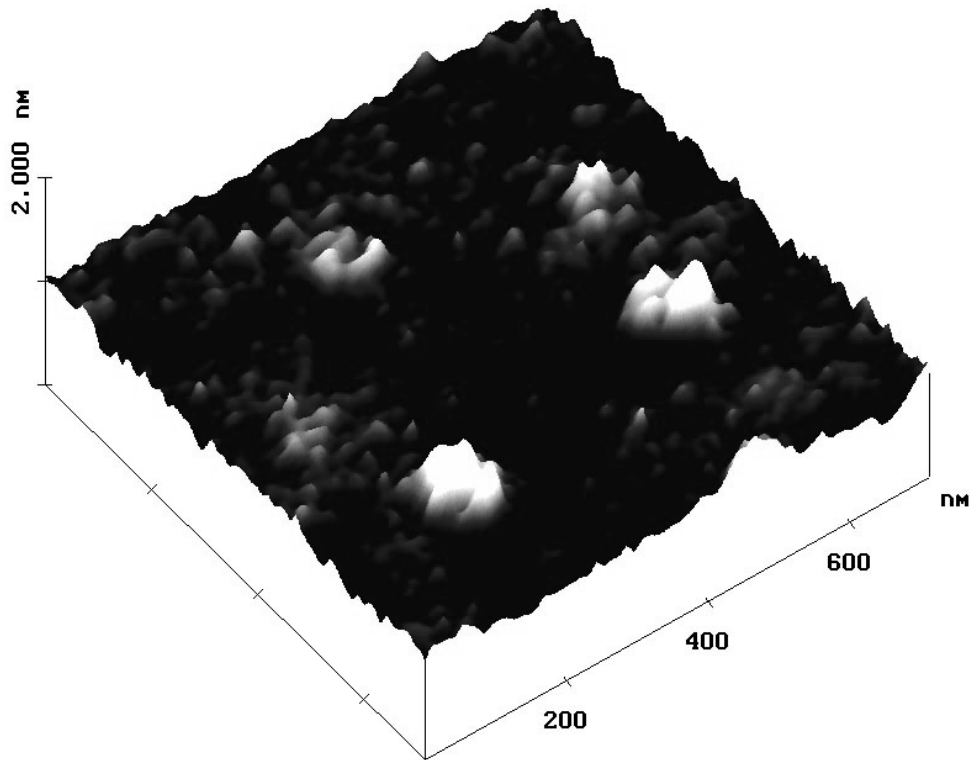


Abb. 8: AFM-Aufnahme einer supportfixierten Modellmembran aus DSPC mit 1 mol% sLe^x-Cer.

Die Oberflächentopologie der Membran kennzeichnet die geclusterten Ceramide als helle Erhebungen aus der DSPC-Matrix. Die einzelnen Cluster erscheinen als runde Areale eines Durchmessers von ca. 20 nm. Geht man von einem Kopfgruppen-Flächenbedarf eines sLe^x-Cer von ca. 0,6 nm² bei dem Übertragungsdruck von 40 mN/m aus, so könnten die Cluster aus ungefähr 500 Glykolipiden bestehen. Inwieweit durch eine begrenzte Mischbarkeit auch DSPC-Moleküle mit in den Clustern vorhanden sind, kann nicht eindeutig geklärt werden. Analoge Untersuchungen zeigten, daß sich mit einer Veränderung der sLe^x-Cer-Konzentration in der Membran die Struktur und Größe der Cluster nicht ändert, lediglich deren Anzahl. Bei höheren Konzentrationen schließen sich einzelne Cluster zu größeren Aggregaten zusammen, die aber noch sichtbar aus Einzelclustern bestehen (sichtbar im vorderen Teil der Abb.8).

Die nachgewiesene Clusterung der Ceramide in der Modellmembran bildet die Voraussetzung, um den postulierten Zusammenhang zwischen Bindungsmultimerisierung und Zellrollen nachzuweisen, und Rückschlüsse auf die natürlichen Liganden ziehen zu können. Um klare Aussagen über den Ligandeneinfluß zu erhalten, sollten die Selektin-haltigen Rollzellen sowohl bezüglich ihrer Selektinkonzentration als auch bei deren räumlicher Exprimierung von einer großen Konstanz geprägt sein. Dafür wählten wir Chinese Hamster Ovarial-Zellen (CHO), die durch Gentransfektion konstitutiv eine relativ hohe Konzentration an E-Selektin exprimieren (CHO-E). Die gleichmäßige Verteilung des E-Selektins über die nahezu microvillifreie Zelloberfläche konnten wir vor Beginn der Untersuchungen mittels Elektronenmikroskopie nachweisen [289].

Mit diesen Voraussetzungen wurden die Zellrollexperimente begonnen. Dafür wurden die auf Deckgläschen supportfixierten Modellmembranen in die Durchflußapparatur eingebaut und diese auf einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (LSM) installiert. Die fluoreszenzmarkierten CHO-E-Zellen wurden unmittelbar vor der Apparatur konzentriert in

den Strom des Mediums bei einer Scherrate von 200 s^{-1} eingespritzt. Bei Erscheinen der Zellen im mikroskopischen Bild wurde der Strom für 5 Minuten unterbrochen, um einer möglichst großen Anzahl von Zellen eine Sedimentation auf der Modellmembran zu gewähren. Normalerweise sedimentierten dabei ca. 50 bis 200 Zellen in einem Bildausschnitt mit einer Diagonalenlänge von $960 \text{ }\mu\text{m}$. Nach dieser Zeit wurde der Scherstrom wieder angelegt und das Verhalten der Zellen für mindestens 40 Sekunden oder so lange analysiert, bis keine Veränderungen mehr eintraten. Die sedimentierten Zellen werden als 100 %-Wert angesehen, zu dem das Verhalten der Zellen unter Fluß dann prozentual ins Verhältnis gesetzt wird. Durch die Digitalisierung der mikroskopischen Befunde entsteht im Computer aller zwei Sekunden ein vollständiges Bild der aufgenommenen Fläche. Mit diesen erhaltenen Bildersequenzen kann dann neben der Zelladhäsionsfraktion bzw. Rollfraktion auch die Rollgeschwindigkeit anhand der Schrittweite im Zweisekudentakt errechnet werden.

Zu Beginn dieser Untersuchungen wurde überprüft, inwieweit die Ligandenkonzentration innerhalb der geclusterten Modellmembran einen Einfluß auf das mögliche Zellrollen nimmt. Da aus der Literatur keine übertragbaren Werte über Liganden- bzw. Epitopenkonzentrationen bekannt sind, wurden die Experimente beginnend mit 10 mol% sLe^x-Cer unter einer schrittweisen Reduzierung der Liganden durchgeführt. Es zeigte sich, daß bei sLe^x-Cer-Konzentrationen zwischen 10 und 0,1 mol% der dominierende Anteil der Zellen auch unter Strömungsbedingungen adhärirt bleibt, ein Zellrollen findet nicht statt. Bei einer weiteren Reduzierung der sLe^x-Cer bis zu 0,01 mol% bleiben deutlich weniger Zellen gebunden, dafür aber ist eine große Anzahl rollender Zellen zu detektieren. Diese Zellen bewegen sich mit einer Geschwindigkeit von 6 bis ca. $16 \text{ }\mu\text{m/s}$, was einen unteren Wert der natürlichen Leukozytenrollgeschwindigkeit repräsentiert. Mit weiterer Reduzierung der Liganden (0,005 mol%) findet kein Zellrollen mehr statt, der überwiegende Teil der Zellen reißt von der Membran ab. Diese Befunde sind in Tab. 2 zusammengefaßt.

sLe ^x -Cer-Konzentration	Fraktion stabil adhärirter Zellen [%]	Rollende Zellfraktion [%]	Fraktion abgelöster Zellen [%]
10	91,7	0	8,3
1	92,4	0	7,6
0,1	90,1	0	9,9
0,05	27,4	61,2	11,4
0,015	9,3	74,6	16,1
0,01	5,0	77,2	17,8
0,005	4,7	0	95,3

Tab.2: Charakterisierung des Zellverhaltens unter Scherflußbedingungen in Abhängigkeit von der sLe^x-Cer-Konzentration in der Modellmembran (Mittelwerte aus mindestens 4 Einzelbestimmungen, Abweichungen <10%).

Da das Zellroll- und Adhäsionsverhalten mit einem blockierenden anti-E-Selektin IgG unterdrückt werden konnte, und da an einer reinen DSPC-Schicht keine Zell-Wechselwirkungen eintraten, ist das Bindungsverhalten spezifisch auf das E-Selektin zurückzuführen und andere Effekte auszuschließen.

An dieser Stelle läßt sich resümieren, daß einfache sLe^x-Lipide nach einem gerichteten und natürlich-analogen Einbau in Membranen als Rolliganden für Selektine fungieren können. Dies beweist, daß die Rollvermittlung nicht ultimativ an die ausgedehnte und flexible Struktur der natürlichen mucinähnlichen Selektinliganden gebunden ist. Es zeigt sich weiterhin, daß der Übergang von fester Adhäsion zu Rollbewegung durch die Ligandenkonzentration gesteuert werden kann, wobei der rollvermittelnde Konzentrationsbereich zwischen 0,05 % und 0,01 % liegt. Auch gestatten die bisherigen

Ergebnisse, quantitative Betrachtungen über die Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen innerhalb des Rollbereiches anzustellen. Die Ligandkonzentrationen von 0,05 bzw. 0,01 mol% entsprechen ca. 300 bzw. 60 sLe^x-Cer pro μm^2 , wenn man wiederum vom Flächenbedarf der DSPC- Moleküle von 0,45 nm^2 und der sLe^x-Cer von 0,6 nm^2 beim Übertragungsdruck von 40 mN/m ausgeht. Damit liegen die Abschätzungen deutlich unter der Anzahl von sLe^x-Molekülen an Neutrophilen, die mit ca. 50.000/ μm^2 angegeben wurden [290]. Setzt man diese geringen sLe^x-Mengen mit den angenommenen Selektinkonzentrationen von ca. 1000/ μm^2 auf den CHO-E-Zellen ins Verhältnis, ergeben sich in der Kontaktfläche Ligand:Rezeptor-Verhältnisse von 3:10 bzw. 0,6:10. Daraus ergibt sich bereits rein rechnerisch, daß eine Ligandenclusterung für die Erhöhung der lokalen Ligandenkonzentration und damit einem Ausgleich des Rezeptor/Ligand-Verhältnisses notwendig ist. Da die Zellen aber ausschließlich in diesem Konzentrationsbereich und nicht bei höheren Ligandendichten rollen, kann dies nicht als alleinige Begründung für die Notwendigkeit einer Ligandenclusterung gelten.

Um zu überprüfen, inwieweit die geclusterten Liganden auch funktionell für das Rollen essentiell sind, führten wir die folgenden Untersuchungen durch. Wir wählten mit POPC ein fluides Matrixlipid für die Modellmembranen aus, um durch die vollständige Mischbarkeit des sLe^x-Cer mit dem POPC zu Membranen mit homogen verteilten Liganden zu gelangen. Durch die Gegenüberstellung der homogen verteilten gegen die geclusterten Modellmembranen sollte die funktionelle Bedeutung einer lokalen Ligandenkonzentrierung verdeutlicht werden.

Die Analyse der POPC/sLe^x-Cer Monolayer gab weder auf der Filmwaage mittels Fluoreszenzmikroskopie noch im übertragenen Zustand unter Verwendung fluoreszenter anti-sLe^x-IgG Hinweise auf eine laterale Entmischung der Liganden.

In Analogie zu den vorangegangenen Arbeiten führten wir die Rollexperimente an diesen homogen verteilten Ligandmembranen ausgehend von 10 mol% sLe^x-Cer unter schrittweiser Ligandreduzierung durch. Ähnlich wie bei den DSPC-Membranen adhärierte der überwiegende Anteil von Zellen bis zu einer Ligandkonzentration von 0,05 mol% fest an der Membran. Eine weitere Reduzierung hingegen führte nicht in einen Rollbereich, die Zellen wurden plötzlich abgespült und nur eine kleine Zellfraktion von ca. 5% verblieb auf der Membran oder bewegte sich mit einer Geschwindigkeit von ca. 5 $\mu\text{m}/\text{s}$, was nach unserer Anschauung nicht als Rollen anzusehen ist. Da bei Blockierungsexperimenten mit einem anti-E-Selektin-IgG ebenfalls ca. 5% der Zellen adhäriert blieben, und eine ähnliche Zahl haftender Zellen auch an reinen POPC-Membranen detektierbar war, wurden diese Bindungsereignisse auf unspezifische Zell-Membran-Wechselwirkungen zurückgeführt.

Damit war ein weiterer Beweis erbracht, daß eine laterale Ligandenclusterung eine funktionelle Voraussetzung für das Selektin-vermittelte Zellrollen darstellt.

Um diese These zu untermauern und um sicherzustellen, daß das fehlende Zellrollen nicht auf das POPC-Matrixlipid selbst sondern auf die homogene sLe^x-Cer-Verteilung zurückzuführen ist, schlossen wir weitere Experimente an. In diesen Arbeiten sollte unter Einbeziehung von POPC der Einfluß einer Veränderung der Clusterart auf das Zellrollen verdeutlicht werden.

Da POPC und das sLe^x-Cer als fluide Lipide eine Mischbarkeit aufweisen, sollten beide gemeinsam in der rigiden DSPC-Matrix Cluster bilden. Damit sollten die Liganden durch das POPC in den Clustern quasi verdünnt werden, so daß als Ergebnis im Vergleich zu den DSPC/ sLe^x-Cer-Membranen größere Cluster mit einer geringeren lokalen Dichte von sLe^x-Cer resultieren. Um zu einer mittleren Rollkonzentration des sLe^x-Cer von 0,025mol% in dieser Membran zu gelangen, wurden 0,5mol% des Liganden mit POPC gemischt und dann 5% dieser Mischung in eine DSPC-Monolayer inkorporiert. Mit den beschriebenen Techniken konnte wiederum eine Clusterbildung sowohl auf der Filmwaage als auch nach Übertragung der Monolayer nachgewiesen werden. Verglichen mit der DSPC/ sLe^x-Cer Membran binden

die fluoreszenten Antikörper in größeren Arealen an diesen Membranen, was als ein Hinweis für größere Cluster anzusehen sein könnte. Aufgrund der Größe der IgG-Moleküle von ca. 8 nm und der relativ kleinen Dimensionen der Cluster ist dies aber nicht als ein sehr sensibler Beweis anzusehen.

Die Zellroll-Untersuchungen an diesen Membranen mit den gemischten Clustern bewiesen deren Fähigkeit zur Vermittlung des Zellrollens. Die Zellen rollten mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von ca. 10 $\mu\text{m/s}$ nahezu analog wie auf der DSPC-Schicht gleicher Ligandenkonzentration. Sollte die Ligandenverdünnung innerhalb der gemischten Cluster zu ihrer effektiveren Bindungsausnutzung führen, müßten in diesen Schichten die Liganden noch weiter zu verdünnen sein als in den DSPC-Membranen, ohne die Fähigkeit zur Rollvermittlung zu verlieren. Durch Verdünnung des sLe^x-Cer bis zu 0,002 mol% konnte dies tatsächlich nachgewiesen werden. Bei Unterschreitung dieser Konzentration findet keine meßbare Zell-Wechselwirkung mehr statt. Die Abhängigkeit des Rollverhaltens von der Ligandenkonzentration und der Matrix ist in Abb. 9 gegenübergestellt.

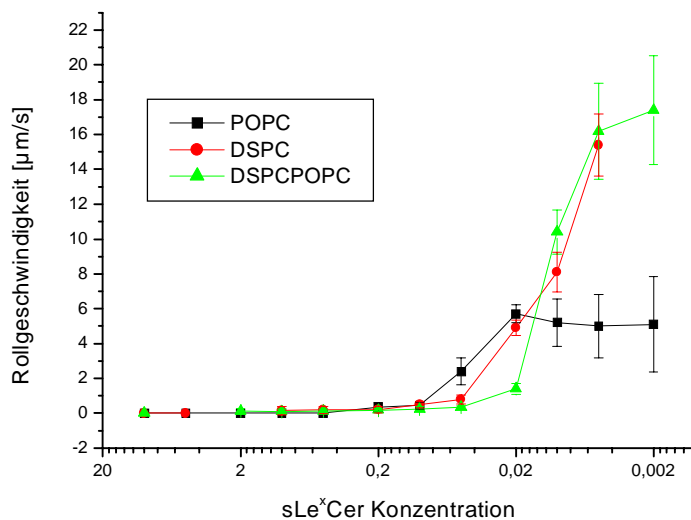


Abb. 9: Abhängigkeit des Zellrollverhaltens (Geschwindigkeit) der CHO-E-Zellen von der Ligandenkonzentration und der Matrixart. Die Daten sind Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen.

Die Abbildung verdeutlicht nochmals durch die längeranhaltende Rollfähigkeit der DSPC/POPC-Membranen bei Ligandenreduzierung die effektivere Bindungsfähigkeit der sLe^x-Cer in den gemischten Clustern bei der Vermittlung des Zellrollens.

Faßt man alle Ergebnisse zusammen so läßt sich schlußfolgern, daß mit unseren ligandhaltigen Modellmembranen das Selektin-induzierte Zellrollen simuliert und in seinen molekularen Ursachen untersucht werden kann. Es zeigte sich, daß eine lokale Konzentrierung der Glykolipid-Liganden in Clustern innerhalb der Matrix eine funktionelle Voraussetzung für das Selektin-vermittelte Zellrollen darstellt. Bezieht man die Kontaktfläche der Zell-Membran-Wechselwirkung in unsere Überlegungen mit ein so zeigt sich, daß die ca. 8-10 μm großen CHO-E-Zellen bei Membrankontakt mit mehreren Clustern gleichzeitig in Wechselwirkung treten. Dies beweist, daß das Zellrollen keine sprunghafte Bewegung der Zelle zu großen aufeinanderfolgenden Bindungscleistern ist, sondern im Rollprozeß eine gleichzeitige Bindung und Lösung vieler Bindungen an unterschiedlichen Clustern stattfindet. Bei Vergrößerung der Cluster erhöht sich die Chance der Bindungsbildung trotz der damit einhergehenden „Ausdünnung“ der Liganden in den Clustern. Da es an Membranen mit homogener Ligandenverteilung auch bei höheren Konzentrationen nicht zu einer

Rollbewegung kommt, ist nicht die summarische Anwesenheit der Liganden, sondern vielmehr deren räumliche Organisation von entscheidender Bedeutung. Dies beweist also, daß die laterale Konzentrierung von schwach affinen Bindungsepitopen in Clustern zu hochaffinen Ligandenbereichen führt. Diese Erkenntnisse legen nahe, daß dieses Prinzip der Multivalenz auch die Ursache für die hohe Bindungsaffinität der natürlichen Selektinliganden darstellt. Da die natürlichen Selektinliganden durch ihre langgestreckte, aus der Membran herausragende Mucinstruktur mit den vielen entlang der Peptidkette angeordneten Bindungsepitopen bessere Randbedingungen für die Rollvermittlung bieten, sollten für eine effektive Selektinbindung weniger Ligandmoleküle als in unserer Modellmembran notwendig sein.

Mit dieser Studie konnte ein Beweis für die Multivalenz-Hypothese der Selektinbindungen unter Verwendung von Glykolipid-Liganden erbracht werden. Da für deren Nachweis in unserer Modellanordnung einige Abstraktionen notwendig waren, können wir das Prinzip, nicht aber die zahlenmäßigen Daten auf die physiologischen Abläufe beim Leukozytenrollen direkt übertragen. So sind beispielsweise die hier detektierten Zellrollgeschwindigkeiten relativ niedrig, weil sich das von uns verwendete E-Selektin durch eine langsamere Bindungskinetik vom natürlicherweise dominierenden L-Selektin unterscheidet [104]. Die Anwesenheit von Microvilli an Leukozyten wird den hier beschriebenen Bindungsmechanismus durch den zusätzlichen Schrittrhythmus der Microvilli überlagern, so daß die resultierende Geschwindigkeit weiter erhöht wird.

4.1.4. Die Abhängigkeit des Zellrollens von den Scherflußbedingungen

Die bisherigen Zellrolluntersuchungen wurden bei einem Schergrad von 200 s^{-1} durchgeführt, was einen unteren Wert der Scherbedingungen in postkapillaren Venolen repräsentiert. Durch die folgenden Untersuchungen sollte festgestellt werden, wie sich das Zellrollen und dessen Geschwindigkeit bei variierenden Scherbedingungen verhält.

Dafür wählten wir als stabiles Membransystem die DSPC-Monolayer mit $0,025 \text{ mol\% sLe}^x\text{-Cer}$ aus, die entsprechend der obigen Rollexperimente durch eine mittlere Ligandenkonzentration und Rollgeschwindigkeit gekennzeichnet ist. Bei diesen Experimenten wurden die CHO-E-Zellen nach der initialen Sedimentierung in Abständen von 10 Sekunden schrittweise steigenden Schergraden ausgesetzt. Die Auswertung der Bildsequenzen ergab dann zu den einzelnen Schergraden die korrespondierenden Geschwindigkeiten. Diese Abhängigkeit ist in Abb. 10 dargestellt.

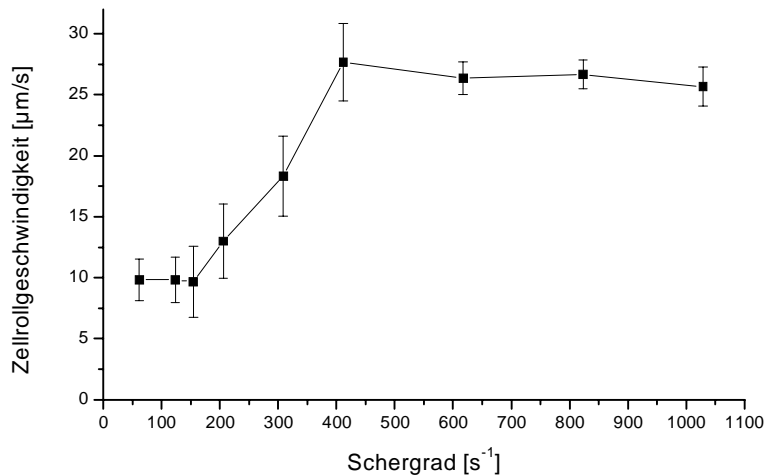


Abb. 10: Abhängigkeit der Zellrollgeschwindigkeit von CHO-E-Zellen an einer DSPC/ sLe^x-Cer (0,025 mol%) Membran vom Schergrad

Aus der Abbildung wird ersichtlich, daß bis zu einem Schergrad von $50\ s^{-1}$ kein Zellrollen stattfindet. Bei Erhöhung der Scherbelastung bis zu ca. $170\ s^{-1}$ rollen die Zellen langsam und unabhängig vom Schergrad mit ca. $10\ \mu m/s$. Mit weiterer Erhöhung des Schergrades bis zu $450\ s^{-1}$ nimmt die Geschwindigkeit bis zu einem Geschwindigkeitsplateau von ca. $27\ \mu m/s$ linear zu, um dort auch bei weiterer Schergraderhöhung bis $1000\ s^{-1}$ zu verbleiben.

Das Auftreten eines Geschwindigkeitsplateaus des Selektin-vermittelten Zellrollens bei hohen Scherbelastungen wurde bereits von Springer et al. bei verschiedenen Untersuchungen beschrieben [102,113,116]. Physiologischer Hintergrund dieses ausbalancierten Geschwindigkeitsverhaltens liegt in den kapillaren Scherstreßunterschieden innerhalb verschiedener Organe und Gewebe, in denen dann durch eine ausgeglichene Rollgeschwindigkeit gleichartige Bedingungen für die nachfolgenden Adhäsions- und Emigrationsschritte der Leukozyten besteht. Funktionell muß dieses Geschwindigkeitsverhalten einerseits mit den kinetischen Bindungseigenschaften der Selektine und andererseits mit dem Zellverhalten bei Scherbelastung erklärt werden. In unseren mikroskopischen Untersuchungen konnte mangels einer ausreichenden Auflösung eine Zelldeformation unter Scherstreß nicht verfolgt werden. Diese scheint aber von einem theoretischen Standpunkt aus die Ursache für das beschriebene Geschwindigkeitsverhalten zu sein. In unserer Arbeitsgruppe wurde von Bandulik eine mathematische Simulation des Zellverhaltens im Rollprozeß unter Scherbedingungen durchgeführt [130]. In diesem Modell wird berücksichtigt, daß eine Zelle im Randbereich einer laminaren Strömung der aus Scherkraft und Drehmoment resultierenden Andruckkraft an die Gefäßwand durch Deformation auszuweichen versucht. Daraus ergibt sich eine ovale, sich vergrößernde Kontaktfläche mit einer ungleichmäßigen Kräfteverteilung innerhalb dieses Areal. Die Rollgeschwindigkeit resultiert demnach aus dem Verhältnis der sich verkleinernden Querschnittsfläche der Zelle im Scherstrom und der zunehmenden Kontaktfläche mit dem Untergrund. Unter Annahme einer ellipsoid verformten Zelle konnte die Kraft auf die Zelle unter Berücksichtigung von Querschnittsabnahme und Kontaktflächenzunahme mathematisch beschrieben werden. Das Ergebnis dieser Simulation ist ein linearer Kräfteanstieg auf die Zelle mit zunehmender Scherbelastung im unteren Bereich, der mit weiterer Erhöhung der Scherbelastung durch die berücksichtigte Zellverformung in eine Phase eines Kräfteplateaus übergeht. Dieses simulierte Kräftegleichgewicht an den Zellen beschreibt exakt den von uns gefundenen Kurvenverlauf der Geschwindigkeitszunahme unter steigender Scherbelastung.

Es ist daher sicher anzunehmen, daß das detektierte Geschwindigkeitsplateau das Resultat der Zelldeformation unter Scherbedingungen ist. Neueste Untersuchungen von Springer et al. bewiesen eine Leukozytendeformation in Abhängigkeit vom Scherstreß [119], was unsere These des Rollverhaltens bestärkt.

Bei unseren Rollgeschwindigkeits-Analysen war das von Springer et al. beschriebene Threshold phenomenon [213,214] nicht nachweisbar. Bei diesem Phänomen gehen die Leukozyten bei Unterschreitung eines kritischen Scherwertes keine Membrankontakte mehr ein, was als ein Sicherheitsschritt vor unkontrollierter Leukozytenaggregation interpretiert wurde. Als Ursache dafür wurde eine fehlende Zelldeformation und ein Ungleichgewicht bezüglich Zellbewegung und Bindungsbildung bei den geringen Scherbelastungen beschrieben. Offensichtlich aber ist diese Erscheinung an das Vorhandensein von Microvilli und an die für ein Tethering ausgelegten Sialomucine gebunden, was bei der ebenmäßigen Zelloberfläche und der gleichmäßigen Clusterdichte in unserem Modell nicht zutrifft.

Zusammenfassend kann man sagen, daß in dem Modellsystem das Selektin-vermittelte Rollen bei unterschiedlichen Scherbelastungen exakt simuliert werden konnte. Das auch von anderen Arbeitsgruppen beschriebene Geschwindigkeitsplateau bei hohem Scherstreß konnte durch mathematische Simulationen als ein Effekt der Zelldeformation bewiesen werden.

4.1.5. Einfluß der Ligandenflexibilität auf das Selektin-vermittelte Zellrollen

Die natürlichen Selektinliganden sind durch ihre langgestreckte Sialomucin-Struktur gekennzeichnet. Einerseits können sie damit die Bindungsepitope in einer exponierten Position entfernt von der Zelloberfläche für die Selektinbindung präsentieren, was wie im Falle des PSGL-1 mit einer Länge von ca. 50 nm für den initialen Kontakt beim Tethering von großem Vorteil ist. Andererseits können sie aber auch durch ihre strukturelle Flexibilität aktiv auf den Zellrollprozeß einwirken. Aus diesem Grund soll in den folgenden Studien mit dem dynamischen Testsystem der Einfluß einer definierten Flexibilitätsveränderung der Selektinliganden auf das Zellrollen untersucht werden.

In den bisherigen Untersuchungen erwies sich das multivalente Binden der Selektine zu den immobilisierten Liganden als essentielle Rollvoraussetzung, das dementsprechend auch als Funktionsprinzip der natürlichen Liganden postuliert wurde. Diese Studien wurden mit dem natürlich-analogen Glykolipid sLe^x-Cer durchgeführt, bei dem die sLe^x-Kopfgruppe durch einen relativ rigiden Laktose-Spacer mit dem Ceramid als Membrananker verbunden ist. Diese Kopfgruppe sollte bei ihrer Präsentation an der Membranoberfläche zwar eine ausreichende Zugänglichkeit für die Bindung aber keine bemerkenswerte Flexibilität besitzen. Somit ist der Flexibilitätseinfluß der natürlichen Selektinliganden nicht zu simulieren. Durch den Einsatz neuartiger Glykolipide, bei denen durch die Nutzung definierter und hydrophiler Spacer der Abstand zu ihrem Membrananker und damit ihre Lage an der Membranoberfläche graduell verändert werden kann, sollte der Einfluß der Ligandenflexibilität auf das Zellrollen verdeutlicht werden. Zu diesem Zweck verwendeten wir sLe^x-Lipide, deren Kopfgruppen direkt (sLe^x-L0), oder über 3 Ethoxy- (sLe^x-L3), 6 Ethoxy- (sLe^x-L6) oder über 9 Ethoxyeinheiten (sLe^x-L9) an einem Dialkylglycerol als Membrananker gebunden waren. Geht man durch röntgenografische Werte von einer Länge einer Ethoxyeinheit von ca. 0,35 nm aus [291], so ergeben sich für die einzelnen Liganden bei einer ideal gestreckten Konformation der Spacer Längenunterschiede von jeweils ca. 1 nm. Da die Ethoxyspacer jedoch in wässriger Lösung nicht gestreckt sondern in einer verknäulten Form vorliegen werden, wird sich für den Bindungsprozeß nicht in erster Linie die exponierte Präsentation, wohl aber die erhöhte Flexibilität im Vergleich der Liganden widerspiegeln.

Für unsere Zellrolluntersuchungen wurden die beschriebenen vier Liganden jeweils in eine DSPC-Matrix eingebaut, wobei wiederum für alle Liganden Entmischungserscheinungen mit Clusterbildungen nachgewiesen werden konnten. Beginnend mit

Ligandenkonzentrationen von 1 mol% wurden unter Ligandenreduzierung das Zellrollverhalten bei 200 s^{-1} analysiert. Diese Ergebnisse sind in Abb. 11 zusammengefaßt.

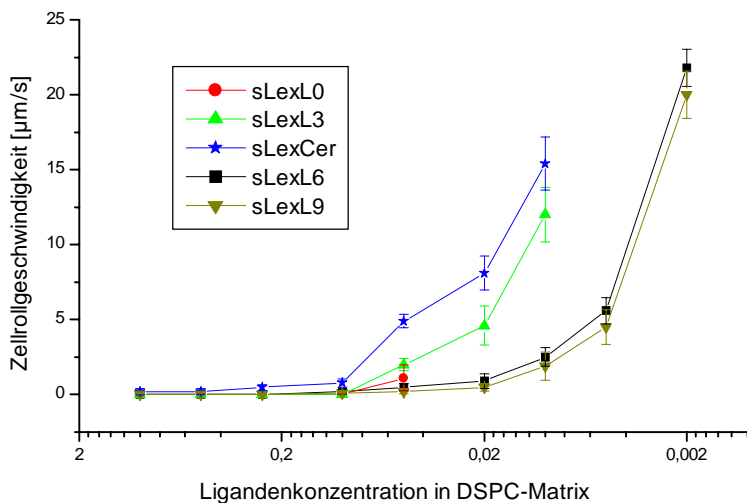


Abb. 11: Einfluß der Ligandenflexibilität auf das Rollverhalten von CHO-E-Zellen

Der kürzeste und spacerfreie Ligand sLe^x-L0 zeigt bis zu einer Konzentration von 0,05 mol% in der DSPC-Membran eine feste Adhäsion der CHO-E-Zellen, die weitere Reduzierung der sLe^x-L0 -Menge führt zum vollständigen Ausbleiben jeglicher Zell-Membran-Wechselwirkungen. Damit ist dieses Lipid infolge seiner Präsentation der sLe^x -Kopfgruppe unmittelbar an der Membranoberfläche nicht zur Rollvermittlung befähigt. Da bei der festen Zelladhäsion bei höheren Konzentrationen die prinzipielle Erkennbarkeit und Zugänglichkeit dieses Liganden bewiesen ist läßt sich ableiten, daß ein Mindestmaß an Flexibilität der Liganden zur Rollvermittlung notwendig ist.

Der nächstgrößere Ligand sLe^x-L3 mit den 3 Ethoxyeinheiten als Spacer hingegen vermag ab der Konzentration von 0,05 mol% das Zellrollen zu vermitteln. Mit weiterer Reduzierung der Ligandenmenge bis zu 0,01 mol% nimmt die Zellrollgeschwindigkeit zu, bei Unterschreitung dieser Konzentration reißen alle Zellen im Scherstrom ab. Damit weist das sLe^x-L3 in seinem Verhalten (Konzentrationsbereich der Rollvermittlung) große Ähnlichkeit zu dem zuvor untersuchten sLe^x-Cer auf. Die strukturelle Gegenüberstellung beider Liganden zeigt [269], daß der Laktosespacer des sLe^x-Cer eine vergleichbare Größe wie die drei Ethoxyeinheiten des sLe^x-L3 aufweist. Offensichtlich aber kann der flexiblere Ligand sLe^x-L3 durch bessere Kopfgruppenanpassung innerhalb der Cluster die Zellen effektiver binden, woraus die langsamere Rollgeschwindigkeit der CHO-E-Zellen gegenüber dem rigidieren sLe^x-Cer erklärbar wäre.

Auf dieser Basis läßt sich auch das Verhalten der beiden längsten Liganden sLe^x-L6 und sLe^x-L9 erklären. Beide Verbindungen können durch ihre hohe Flexibilität die CHO-E-Zellen bis zu einer Konzentration von 0,01 mol% fest binden, erst bei Unterschreitung dieser Konzentration vermitteln sie das Zellrollen. Dann jedoch rollen die Zellen bis zu einer Ligandenkonzentration von 0,0025 mol% mit einer für diese Ligandenmenge hohen Rollgeschwindigkeit von ca. $20 \mu\text{m/s}$. Daraus lassen sich folgende Aussagen ableiten:

Eine Zunahme der Flexibilität und damit auch der Erkennbarkeit der Bindungs epitope an der Membranoberfläche vergrößert zwar den Roll-Konzentrationsbereich nicht, dieser wird jedoch zu geringeren Ligandenmengen hin verschoben. Dies zeigt, daß eine Flexibilitätserhöhung forciierend auf den Zellrollprozeß wirkt. Beim Einsatz der Ethoxyspacer unterliegt der Einfluß der Flexibilität auf das Rollen einer Art Sättigung, da die Liganden mit

6 bzw. 9 Ethoxyeinheiten ein analoges Verhalten aufweisen. Daraus läßt sich schlußfolgern, daß bei den natürlichen Selektinliganden die langgestreckte und hochflexible Sialomucinstruktur effektiv an die Rollvermittlung bei der Selektinbindung angepaßt ist. Dadurch kann die absolute Konzentration an Bindungsepitopen in diesen Liganden verringert werden, was in guter Übereinstimmung mit unserer mengenmäßigen Abschätzung der Epitope (in 4.1.2.3.) mit den natürlich vorkommenden Selektinliganden [54] steht.

Faßt man alle Zellrollexperimente nochmals zusammen so läßt sich feststellen, daß mit Hilfe des dynamischen Testsystems molekulare Bindungseigenschaften der Selektine im Rollprozeß abstrahierend aufgeklärt werden können. Es zeigte sich, daß Glykolipid-verankerte Bindungsepitope an der Oberfläche der Modellmembran das Zellrollen vermitteln können, wenn diese sich lateral strukturiert und räumlich konzentriert in Clustern befinden. Damit läßt sich beweisen, daß der Selektin-Bindungsprozeß aus der Multimerisierung vieler schwach-affiner Einzelbindungen resultiert, was somit auch als Wirkprinzip der natürlichen Selektinliganden postuliert wurde.

Neben diesem Multimerisierungseffekt ist die Flexibilität der Liganden von Bedeutung. Eine Flexibilitätserhöhung forciert das Zellrollverhalten und reduziert die notwendige Anzahl von Bindungsepitopen für den Rollprozeß. Daraus läßt sich die relativ geringe Anzahl von Bindungsepitopen an den hochflexiblen natürlichen Sialomucin-Liganden erklären.

Die Scherstreßabhängigkeit des Zellrollens und damit die Rollgeschwindigkeit wird entscheidend durch die Zelldeformation bestimmt und führt zu einem Geschwindigkeitsplateau bei hohem Scherstreß. Der Selektin-abhängige Zellrollprozeß ist dementsprechend ein hochgradig regulierter und über weite Bereiche äußerer Bedingungen ausbalancierter Bindungsprozeß, der nicht als instabile Zwischenstufe zwischen fester Adhäsion der Zellen und deren Abreißen im Scherstrom anzusehen ist.

4.2. Untersuchung selektininhibierender Verbindungen als potentielle antiinflammatorische Wirkstoffe

Durch ihre initiale Stellung in der Adhäsionskaskade der Leukozyten nehmen die Selektine eine Schlüsselstellung in der Immunabwehr bei Entzündungserkrankungen ein. Die selektive Modulierung oder Blockierung der Selektinbindung könnte somit eine neue Möglichkeit eröffnen, an einem kausalen Punkt direkt blockierend auf pathologische Entzündungserscheinungen einzuwirken. Von dieser Idee getragen wurden in den letzten Jahren eine Vielzahl von glykosidischen Selektininhibitoren als potentiell antiinflammatorische Verbindungen synthetisiert und auf ihre Bindungsfähigkeit untersucht. Die Inhibierungsexperimente wurden unter statischen Bedingungen durchgeführt, was eigentlich den dynamischen Bindungseigenschaften der Selektine im Prozeß des Zellrollens nicht ausreichend Rechnung trägt. Aufbauend auf unseren Untersuchungen zum Selektin-vermittelten Zellrollen im dynamischen Testsystem werden in dem folgenden Kapitel dynamische Inhibierungsexperimente vorgestellt, bei denen die inhibitorische Wirkung der untersuchten Verbindungen direkt auf das Zellrollen verdeutlicht werden kann.

Bei der Suche nach potenten Selektininhibitoren fungierte das Bindungsepitop Sialyl Lewis^x aufgrund seiner nachgewiesenen Bindungsfähigkeit für alle drei Selektine als Standardligand. Durch verschiedene Strategien versuchte man, ausgehend vom sLe^x und unter Beibehaltung der als essentiell erkannten pharmakophoren Gruppen zu einfacheren und besser bindenden Inhibitoren zu gelangen (vgl. 2.2.2.).

Eine dieser Strategien ist darauf gerichtet, durch den Einbau zusätzlicher hydrophober Epitope in das sLe^x dessen geringe Bindungsstärke von etwa 1mM zu vergrößern. Ihren Ausgang nahm diese Strategie durch die Erkenntnis, daß ein Deoxyderivat des sLe^x (dehydroxyliert am C1 des GlcNAc) eine bis zu 40fach höhere Bindungsaffinität zum P-Selektin besitzt als das sLe^x [292]. Als Mechanismus wurde postuliert, daß durch die fehlende

Hydroxygruppe der Pyranosering des GlcNAc partiell hydrophobisiert wird, und damit besser mit einem Histidinrest in der Nähe der eigentlichen Lektindomäne wechselwirken kann [293]. Ähnliche Befunde bestärkten diese Theorie einer hydrophoben Substitution. Ramphal et al. konnten zeigen, daß eine Substitution des Acetylrestes im GlcNAc des sLe^x durch ein aromatisches Ringsystem die Bindungsaffinität zum E-Selektin um das zehnfache verstärkt [168]. Darauf aufbauend fanden Tsujishita et al., daß eine Substitution an der glykosidischen Hydroxygruppe des GlcNAc mit einem langkettig verzweigten Alkylrest ein Wirkungsoptimum darstellt. Durch Molecular Modelling wurde verdeutlicht, daß bei dieser Substanz der sLe^x-Anteil normal in der Bindungstasche der Lektindomäne bindet, während die zwei Alkylreste entlang zweier hydrophober Rillen an der Oberfläche des E-Selektins orientiert sind und so bindungsverstärkend wirken [294].

Eine logische Konsequenz dieser Untersuchungen stellen die Studien von Ikami et al. dar. Diese Arbeitsgruppe stellte eine große Anzahl von potentiellen Selektininhibitoren vor, die neben der beschriebenen Alkylsubstitution unterschiedlich starke Vereinfachungen im sLe^x-Bereich aufweisen. Die von Ikami beschriebenen Glykolipide sind Laktose-, Galaktose- oder Fucose-Galaktose-Derivate, die zusätzlich im Molekül eine unterschiedliche Anzahl von Sulfatierungen oder Phosphorylierungen aufweisen [295-297]. Vor dem Hintergrund, daß für die P- und L-Selektin-Bindung zusätzliche negative Ladungen durch Sulfatierungen in den Liganden eine große Rolle spielen, was man aus den Bindungsepitopen des L-Selektin-Liganden GlyCAM-1 und aus der Bindungsfähigkeit zu polysulfatierten Sacchariden ableiten kann [298,299], erscheinen diese Inhibitoren sehr aussichtsreich. Zudem ist auch bekannt, daß Laktosederivate mit einem speziellen Sulfatierungsmuster als L-Selektin-Inhibitoren gelten und dabei eine leicht stärkere Wirksamkeit aufweisen als sLe^x [300].

Die inhibitorische Wirksamkeit aller Selektininhibitoren wurde bisher in statischen Bindungsassays ermittelt. Diese von den unterschiedlichen Arbeitsgruppen angewendeten Testsysteme unterscheiden sich hinsichtlich der gewählten Bindungskomponenten. In manchen Assays wird die Bindung von Selektin-haltigen Zellen an andere Zellen mit den korrespondierenden Liganden gemessen und inhibiert. Die meisten Tests arbeiten mit Oberflächen-immobilisierten Selektinen und quantifizieren die Bindung Ligand-haltiger Zellen. Die einzelnen Arbeiten unterscheiden sich dabei in der Art der Selektine und deren Fixierung, da sowohl natürliche isolierte Selektine als auch IgG-Selektin-Fusionsproteine zur Anwendung kommen. Daher sind die angegebenen Inhibierungsdaten der einzelnen Arbeitsgruppen nur eingeschränkt miteinander vergleichbar. Prinzipiell muß man sagen, daß eine Bindungsuntersuchung unter statischen Bedingungen die dynamischen Bindungseigenschaften der Selektine im Prozeß des Zellrollens nicht ausreichend widerspiegeln kann. Um einer Selektin-Inhibierung unter physiologischen Bedingungen näher zu kommen ist es vorteilhafter, unter dynamischen Flußbedingungen zu arbeiten.

Aufbauend auf unseren vorangegangenen Arbeiten über die molekularen Bindungseigenschaften der Selektine im Zellrollprozeß nutzten wir nun das dynamische Testsystem zur Untersuchung der inhibitorischen Eigenschaften von sLe^x-analogen Glykosiden.

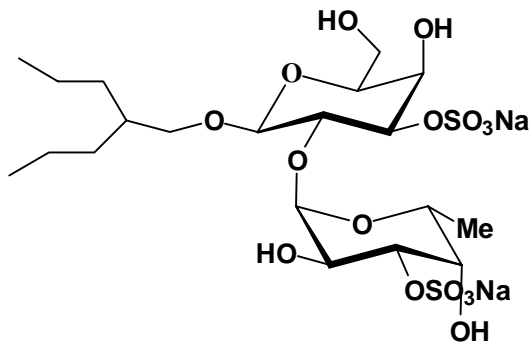
Prinzipiell sollte die Bindung eines Rezeptors zu seinem Liganden nur von der Art der pharmakophoren Gruppen abhängen, ungeachtet einer statischen oder dynamischen Bindungsbildung. Davon aber könnten die Selektine eine Ausnahme bilden. Die Selektine sind im Gegensatz zu anderen Rezeptoren durch ihre spezifische Bindungskinetik gekennzeichnet. Nur bei sehr schneller Bindungsbildung und -dissoziation kann es zum Zellrollen kommen, daher sind auch die potentiellen Inhibitoren an diese Bindungskinetik gebunden. Darüberhinaus binden die Selektine die Epitope der Liganden nur sehr schwach affin. Zudem sind die Selektinliganden und die untersuchten glykosidischen Inhibitoren sehr hydrophil, so daß Wasserstoffbrückenbindungen eine dominante Rolle spielen, und damit das umgebende Medium die Bindungseigenschaften modulieren wird. Aus dieser Argumentation

läßt sich ableiten, daß die Wirkung eines Selektininhibitors unter Ruhe im statischen Assay mit der in einer Durchflußanordnung trotz analoger Bindungspartner nicht gleichzusetzen ist.

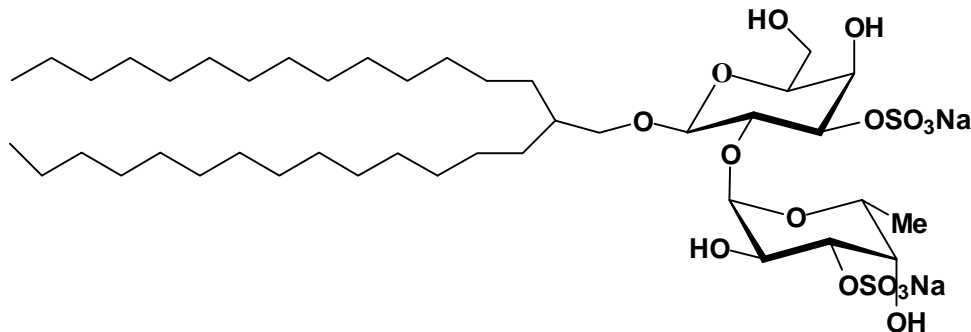
In unserem Testsystem kamen eine Reihe der von Ikami vorgestellten Galaktose- oder Fucose-Galaktose-Derivate zum Einsatz. Von diesen Derivaten waren die statischen Inhibierungsdaten bekannt, die dann direkt zu den dynamischen Werten ins Verhältnis gesetzt werden sollten. Durch die Auswahl strukturverwandter Derivate kann zudem der Einfluß bestimmter Strukturelemente auf eventuelle Wirkunterschiede zwischen statischem und dynamischen Assay verdeutlicht werden.

Die untersuchten Glykolipide sind in der folgenden Abbildung dargestellt. Sie sollen im weiteren durch ihre Numerierung oder ihre triviale Bezeichnung beschrieben werden.

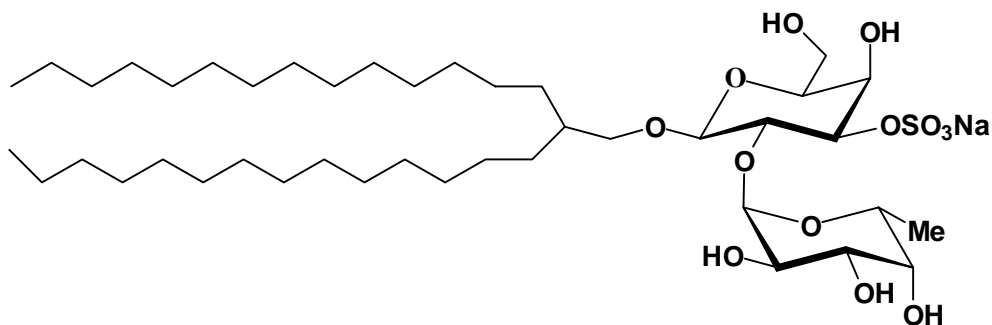
1. Dinatrium [2-(Propyl)pentyl-O-(α -L-fucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-galaktopyranosyl)-3O,3O'-disulfonat]



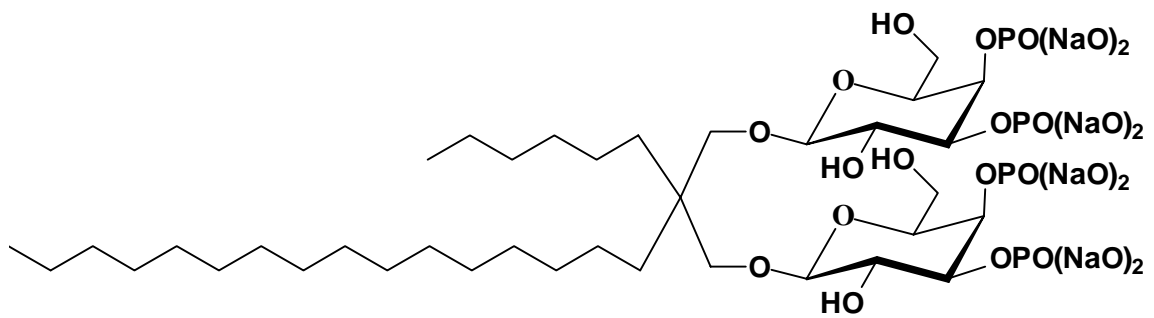
2. Dinatrium [2-(Tetradecyl)hexadecyl-O-(α -L-fucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-galaktopyranosyl)- 3O,3O'-disulfonat]



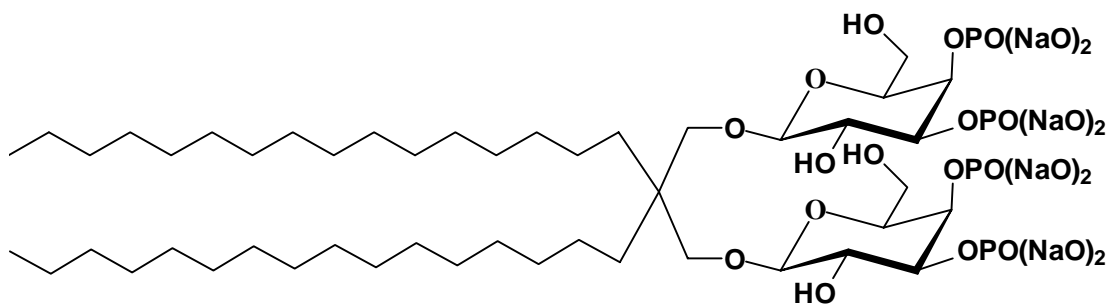
3. Natrium [2-(Tetradecyl)hexadecyl-O-(α -L-Fucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-galaktopyranosyl)-3O-sulfonat]



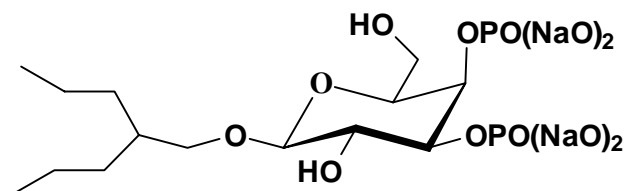
4. Octanatrium [2-Hexadecyl-2-hexyl-propan-1,3-O,O'-bis-(β-D-galaktopyranosyl)-3O,4O,3'O,4'O-tetraphosphonat]



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



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



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

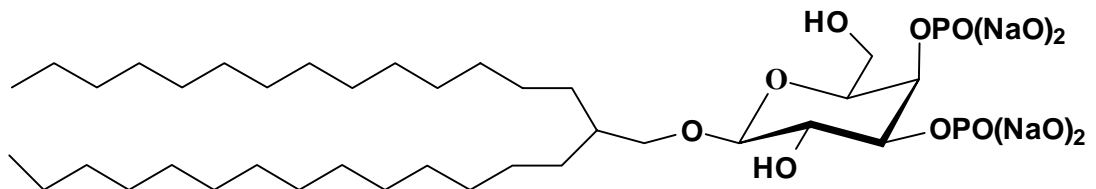


Abb. 12: Strukturen der getesteten Selektininhibitoren

Diese Stoffe stehen strukturell in einer logischen Beziehung. Substanz 1 ist ein kurzkettiges, disulfatiertes Fucose-Galaktose-Derivat. In Analogie zum sLe^x weist es mit den Fucose-Hydroxygruppen, der 6-OH-Gruppe der Galaktose und der negativen Ladung an der Galaktose durch zwei Sulfatreste im Molekül alle pharmakophoren Gruppen des sLe^x auf,

zusätzlich kann auf den Einfluß der kurzkettigen Alkylreste fokussiert werden. Substanz 2 ist von identischer Struktur, zeigt aber eine Substitution mit einem langkettig verzweigten Alkylrest. Dazu analog ist wiederum Substanz 3, bei der durch Monosulfatierung der Galaktose der Einfluß der Ladungsanzahl verdeutlicht werden kann. So kann innerhalb dieser drei Stoffe der Einfluß der Alkylkettenlänge und der Ladungsanzahl untersucht werden.

Die Substanzen 4 und 5 sind Dimere diphosphorylierter Galaktoside, die sich durch die unterschiedliche Kettenlänge der Alkylreste unterscheiden. Sie weisen strukturell weniger Ähnlichkeiten zum sLe^x auf, sie könnten aber durch die Dimerisierung (Multivalenz) und die hohe Ladungsdichte Wirksamkeiten aufweisen. Identische Kopfgruppen weisen auch Substanzen 6 und 7 auf, wobei diese Stoffe im Gegensatz zu 4 und 5 als Monomere vorliegen. Im Vergleich dieser vier Substanzen sollte der Einfluß einer Kopfgruppenwiederholung und wiederum der Effekt der Alkyllänge auf die inhibitorsche Wirksamkeit hervortreten.

Für diese Verbindungen wurden von Ikami et al. die Inhibierungswerte für alle drei Selektine ermittelt. In den statischen Bindungsassays wurde die Verdrängung von ligandhaltigen HL-60-Zellen von den immobilisierten Selektin-IgG-Fusionsproteinen gemessen. Die Daten wurden als prozentuale Hemmung bei einer Konzentration von 0,3 mM angegeben und zu sLe^x ins Verhältnis gesetzt. Die Hemmwerte sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Substanz	Triviale Beschreibung	% Hemmung des P-Selektins	% Hemmung des L-Selektins	% Hemmung des E-Selektins
sLe^x	Standard	3±6	0±5	0±4
1	Kurzkett.disulfat. Fucose Galaktose	16	33	2
2	Langkett.disulfat. Fucose Galaktose	76	69	8
3	Langk.monosulf. Fucose Galaktose	100	100	0
4	Gem.kett. dimere diphosph.Galakt.	0	0	5
5	Langkett.dimere diphosph. Galakt	0	0	11
6	Kurzkett.diphos. Galaktose	13	0	20
7	Langkett.diphos. Galaktose	24	0	20

Tab.3: Inhibierungswerte der verwendeten Glykolipide im statischen Bindungsassay nach Ikami [295-297]

Aus diesen Hemmwerten wird in grober Übersicht sichtbar, daß die langkettigen Derivate gegenüber den kurz-kettigen von Vorteil sind. Zur Ladungsart oder -anzahl wird keine Korrelation sichtbar. Erstaunlicherweise sind die monomeren Derivate 6 und 7 deutlich wirksamer als ihre dimeren Analoga 4 und 5. Gemessen am sLe^x zeigen die wirksamsten Substanzen eine enorme Wirkungsverbesserung. Diese Angaben sind aber durch die ungenügende Aussagefähigkeit der sLe^x -Hemmwerte in diesem Testsystem schwer zu interpretieren.

Zur Durchführung der Inhibierungsstudien in unserer Durchflußkammer nahmen wir zwei konstruktive Veränderungen vor. In unseren bisherigen mechanistischen Untersuchungen des Zellrollens wurden CHO-E-Zellen mit einer relativ homogenen Verteilung an E-Selektin eingesetzt, während die Strukturierung der Modellmembran mit den

synthetischen sLe^x-Liganden erfolgte. Für eine gute Vergleichbarkeit unserer Inhibierungsstudien zu den Daten von Ikami et al. sollten aber HL-60 Zellen als Rollzellen zum Einsatz kommen. Diese Zellen besitzen den P-Selektin-Liganden PSGL-1, der im Molekül eine solche Strukturierung der Bindungsepitope aufweist, die wir in den vorangegangenen Studien in unseren Modellmembranen simulierten. Durch eine Fixierung von P-Selektin auf der Glasoberfläche gelingt es unter Umkehrung der Bindungsverhältnisse, ein Rollassay zu etablieren. Dabei ergeben sich zwei weitere Vorteile: Durch die Inhibierung der natürlichen Bindungspartner PSGL-1 und P-Selektin ist man den physiologischen Bedingungen mehr angenähert als mit synthetischen sLe^x-Derivaten. Andererseits weisen die zu untersuchenden Glykolipide durch ihren Molekülaufbau amphiphile Eigenschaften auf, so daß sie die vorab genutzten supportfixierten Modellmembranen beeinflussen oder zerstören könnten.

Zur Verbesserung der Stabilität unter Strömungsbedingungen wählten wir eine kovalente Fixierung des P-Selektins an den Glasplättchen. Das P-Selektin wurde vorher nach einer leicht modifizierten Standardvorschrift aus Blutplättchen isoliert [271] und seine Identität mittels Gelelektrophorese bzw. Western blot nachgewiesen. Zur kovalenten Fixierung aktivierten wir die gereinigten Gläser durch Umsetzung mit Cyanurchlorid. Dieses trivalente Kopplungsreagenz kann in erster Reaktion mit den Hydroxygruppen der Glasoberfläche reagieren, um dann durch Umsetzung mit Aminogruppen der Proteine eine Fixierung zu vermitteln. Albumin-gekoppelte Gläser dienten als Blindprobe, an denen die HL-60 Zellen unter den simulierten Scherflußbedingungen des kapillaren Blutstromes mit einem Schergrad von ca. 200 s⁻¹ weder eine Bindung noch eine Rollbewegung zeigten. Unter schrittweisem Zumischen von P-Selektin zu einer Albuminlösung vor der Fixierung wurde dann mit einem äquimolaren Verhältnis beider Proteine ein Punkt erreicht, bei dem die HL-60 Zellen über die Glasoberfläche rollten. Nach Einspülen der HL-60 Zellen und einer kurzen Inkubation auf den immobilisierten Selektinen wurden die Zellen im Sichtfeld ausgezählt, bevor nach erneutem Durchströmen der Kammer die Zahl der bindenden bzw. rollenden Zellen sowie deren Rollgeschwindigkeit analysiert wurde.

Das prozentuale Verhältnis der bindenden oder rollenden Zellen zur Anzahl der unter statischen Bedingungen haftenden sowie die ermittelte Rollgeschwindigkeit wurde als Bezugswert für die Inhibierungsstudien genutzt. Mit gleichem Ablauf wurden danach die Inhibierungsexperimente durchgeführt. Gemischt mit ca. 30 nmol der Glykolipide (entsprechend einem ca. 100fachen molaren Überschuß gegenüber den räumlich maximal zu immobilisierenden Selektinen von 0,1 nmol) wurden die HL-60 Zellen unmittelbar vor der Durchflußkammer ohne Verdünnung dem strömenden Medium zugemischt. In der kurzen statischen Präinkubationsphase konkurrieren somit die PSGL-1 Liganden der Zellen und die Glykolipide um die Selektinbindungen. Im Fluß unter Scherstreißbedingungen wurden wiederum die Zahl und die Geschwindigkeit der rollenden Zellen ermittelt.

Die inhibitorische Wirksamkeit der Substanzen manifestiert sich also in dem dynamischen Testsystem in zwei Parametern. In Analogie zu den statischen Assays wird auch in unserem Test die Zahl der bindenden Zellen reduziert. Der dynamische Aspekt manifestiert sich aber zusätzlich in einer Erhöhung der Zellrollgeschwindigkeit. Beide Parameter sollten miteinander korrelieren und so ein umfassenderes Bild der Inhibitoren zeichnen. Die Testergebnisse mit beiden Parametern sind in Abb. 13 gegenüber dem Verhalten von sLe^x dargestellt.

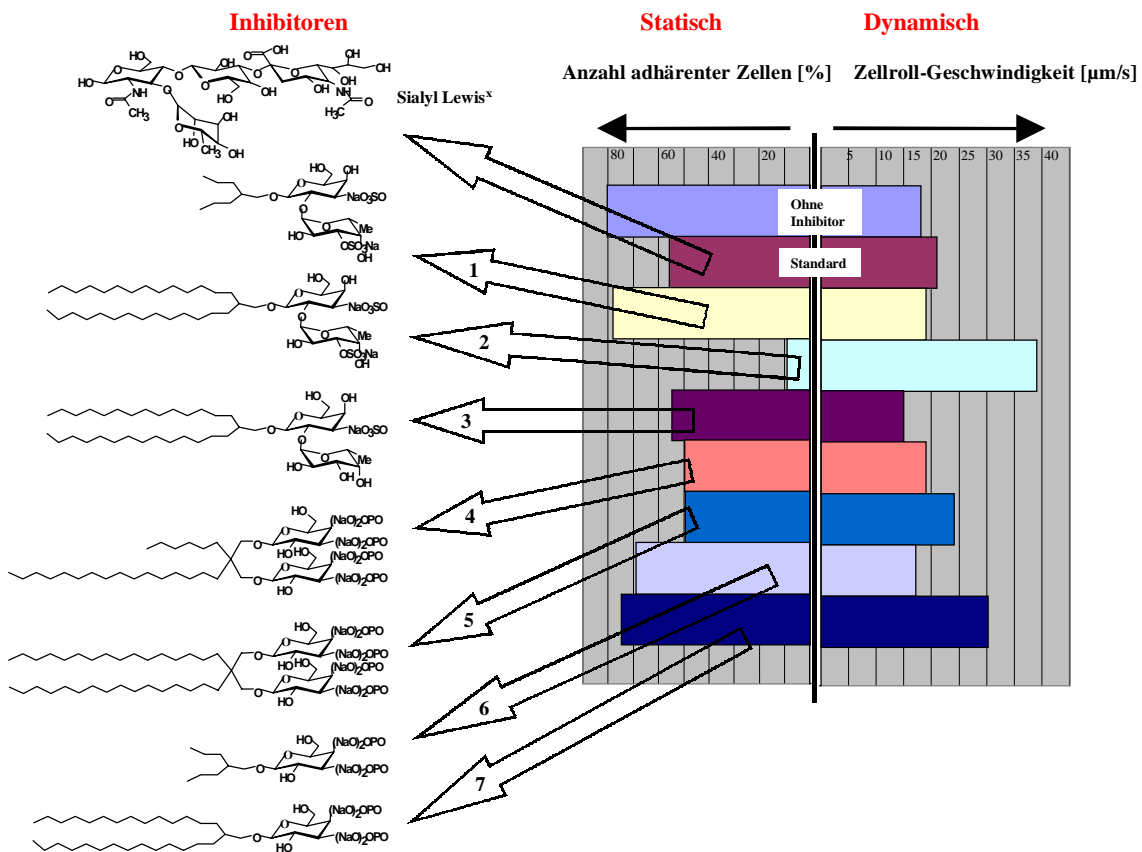


Abb. 13: Einfluß der inhibitorischen Aktivität der untersuchten Glykoside auf das Bindungs- und Rollverhalten der HL-60-Zellen

Vergleicht man die Anzahl der bindenden bzw. rollenden Zellen bei allen untersuchten Inhibitoren, so zeigen sich deutliche Unterschiede gegenüber der Wirkung des sLe^x, die nach unserer Auffassung aber wesentlich realistischer erscheinen als die tabellarisch aufgelisteten Werte der statischen Untersuchungen von Ikami et al.. Während die meisten Substanzen ein ähnliches Verhalten wie sLe^x zeigen, weist Substanz 2 eine wesentlich stärkere Wirksamkeit auf. Als Konsequenz einer partiellen P-Selektin-Blockierung sollte sich parallel zur Reduzierung der Zahl adhärenter Zellen die Zellrollgeschwindigkeit erhöhen. Den stärksten Effekt zeigt wiederum Substanz 2, die sich mit einer Rollgeschwindigkeit von ca. 40 µm/s als effektivster Inhibitor in diesem Test absetzt. Weiterhin wird sichtbar, daß Substanzen gleicher Effektivität in Bezug auf die Zellhaftung auf der dynamischen Seite eine sichtbare Differenzierung erfahren. Da die Zellrollgeschwindigkeit die physiologischeren Bedingungen repräsentiert, sollte dieser Parameter zur Bewertung aussagekräftiger sein. Lediglich Substanz 7 weist mit einer relativ hohen Rollgeschwindigkeit keine Korrelation zur Anzahl der gebundenen Zellen auf.

In einer ersten Bewertung zeigt sich das dynamische Testsystem für Inhibierungsstudien sehr gut geeignet, die gewonnenen Testdaten sind gut differenzierbar und realistisch.

Betrachtet man die Testergebnisse vom strukturellen Standpunkt der Inhibitoren, so erweist sich das langkettige disulfatierte Fucose-Galaktose-Derivat deutlich am wirkungsstärksten. Aus der großen Wirkdifferenz zu Substanz 1 läßt sich ableiten, daß die langkettige Alkylsubstitution eindeutig bindungsverstärkend wirkt. Aber auch die Anzahl der negativen Ladungen ist von Bedeutung, wie die Unterschiede zu der monosulfatierten, ansonsten identischen Substanz 3 beweisen. Die Substanzen 4 und 5 haben eine wiederum deutlich höhere Ladungsdichte, aber die fehlende Fucose in diesen Molekülen wirkt sich negativ auf das Bindungsergebnis aus. Trotzdem zeigen die beiden Substanzen eine nahezu

identische Wirksamkeit wie das sLe^x. Die Dimerisierung der Kopfgruppen ist ebenfalls wirkungsverstärkend, wie die monomeren Verbindungen 6 und 7 im Unterschied zu 4 und 5 beweisen. Lediglich Substanz 7 erhöht die Rollgeschwindigkeit, was mit dieser strukturellen Erklärung nicht korreliert aber zumindest den Vorteil der langkettigen Substitution demonstriert.

Diese Wirkungsabstufung innerhalb der Inhibitoren weicht in einigen Punkten von den Daten nach Ikami ab. Prinzipiell sind auch bei Ikami die langkettigen Derivate favorisiert. In seinen Untersuchungen erwies sich das monosulfatierte langkettige Fucose-Galaktose-Derivat am wirksamsten, gefolgt von dem disulfatierten Derivat Substanz 2. Die dimeren Verbindungen 4 und 5 waren wirkungslos, hingegen die monomeren Analoga 6 und 7 deutlich besser als sLe^x. Diese Wirkunterschiede müssen durch das veränderte Bindungsverhalten der Inhibitoren beim Übergang von statischen zu dynamischen Bedingungen erklärt werden.

Generell sind die glykosidischen Selektininhibitoren relativ hydrophil und vermitteln ihre Bindung zum Teil über Wasserstoffbrückenbindungen. Diese Bindungen sind nicht weitreichend und in ständiger Konkurrenz zu den Wassermolekülen des Mediums. Darüberhinaus ist die Bindungsaffinität der Selektine zu ihren Bindungszeptoren sehr gering und von einer besonders schnellen Kinetik geprägt. Daraus läßt sich ableiten, daß solche Inhibitoren in ihrer Bindungsfähigkeit stark von der Art und Bewegung des Mediums abhängen. So könnte es erklärlich sein, daß die Verbindungen unter statischen Bedingungen deutlich besser wirken. Kommen andere Bindungsarten hinzu, verändern sich die beschriebenen Verhältnisse. Ladungsinduzierte Wechselwirkungen sind langreichweitig. Sie sollten somit weniger anfällig gegen die Veränderungen des Mediums sein. Dies könnte die wesentlich bessere Wirksamkeit der disulfatierten Verbindung 2 gegenüber der monosulfatierten Substanz 3 erklären, deren Wirkungsverhältnisse im Assay bei Ikami genau umgekehrt waren. Mit einem Ladungseinfluß ließe sich auch das bessere Binden der dimeren Substanzen 4 und 5, die bei Ikami als wirkungslos eingestuft wurden, gegenüber 6 und 7 erklären, da die erstgenannten eine wesentlich höhere Ladungsdichte aufweisen.

Faßt man diese Untersuchungen zusammen, so läßt sich feststellen, daß unser dynamisches Testsystem auch zur Untersuchung von Selektininhibitoren sehr gut geeignet ist. Es zeigt sich, daß es bei der Inhibitorbestimmung deutliche und erklärbare Unterschiede zwischen statischen und dynamischen Testbedingungen gibt. Da die dynamischen Untersuchungsbedingungen das physiologische Verhalten besser simulieren, erscheinen diese Ergebnisse realistischer. Zudem gibt es beim dynamischen Testsystem mit der Analyse der Zellanzahl und der Zellrollgeschwindigkeit zwei Auswertungsparameter, die eine differenziertere Bewertung der Inhibitoren erlauben. Gegenüber einem statischen Zellbindungsassay ist ein solcher dynamischer Test jedoch wesentlich aufwendiger und daher eher für eine Anwendung im Rahmen eines fortgeschrittenen Screenings denkbar.

Aus struktureller Sicht ergänzen die hier untersuchten Glykolipide die Palette der bekannten Inhibitoren beträchtlich. Es konnte nachgewiesen werden, daß eine hydrophobe Substitution mit einem langen und verzweigten Alkylrest große Vorteile für die Bindung bringt. Die Anwesenheit der Fucose erwies sich ebenfalls als essentiell. Durch den beschriebenen Ladungseinfluß ist das disulfatierte Fucose-Galaktose-Derivat mit langkettiger Substitution die optimale Verbindung. Obwohl sich in diesem dynamischen Assay keine Gleichgewichts-Bindungskonstanten bestimmen lassen, kann für diese Substanz in Relation zum sLe^x von einer Bindungskonstante um 100 nM ausgegangen werden. Die Substanz befindet sich gegenwärtig in einer fortgeschrittenen in vivo-Testung.

4.3. Nutzung vaskulärer Selektine als Targetstrukturen für Immunoliposomen zum Zwecke eines antiinflammatorisch gerichteten Drug Targetings

Die vaskulären Selektine E- und P-Selektin sind in ihrer Expressierung durch die kapillaren Endothelzellen unmittelbar räumlich und zeitlich an Entzündungsereignisse gekoppelt. Damit bieten sie hervorragende Voraussetzung für ihre Nutzung als Targetstrukturen, um auf diesem Wege Arzneistoffvehikel zum entzündeten Gewebe zu transportieren. Ein weiterer entscheidender Vorteil im Targetieren dieser Selektine besteht darin, daß die Arzneistoffvehikel für die Targeterkennung und –bindung das Gefäßsystem nicht verlassen müssen. Aufgrund der unterschiedlichen Expressionszeit und –dauer der beiden Selektine bietet sich insbesondere das E-Selektin für diese Zwecke an. Auf dieser Grundlage könnten sich völlig neuartige Ansätze für eine antiinflammatorische Therapie eröffnen.

Da Immunoliposomen ein großes Potential als Drug Targeting Systeme besitzen, sollen durch die Kopplung von anti-E-Selektin-Antikörpern an Liposomen selektingerichtete Immunoliposomen hergestellt und deren Targetierungseigenschaften untersucht und optimiert werden. Diese neuartige Strategie wird in den nächsten Kapiteln vorgestellt. Dafür werden zu Beginn Methoden zur Herstellung von Immunoliposomen verglichen und optimiert. Im Anschluß daran werden die ausgewählten Immunoliposomen unter in vivo-Bedingungen auf ihre Immunogenität untersucht. Dies leitet zu den eigentlichen in vitro-Targetierungsstudien der Immunoliposomen an Endothelzellen über. Aufbauend auf einem erfolgreichen Targeting wird dann das weitere Verhalten der Liposomen an den Targetzellen untersucht, um daraus für perspektivische Therapieansätze größtmöglichen Nutzen zu ziehen.

4.3.1. Methoden zur Herstellung selektingerichteter Immunoliposomen

4.3.1.1. Herstellung konventioneller sterisch stabilisierter Immunoliposomen

Zur Herstellung konventioneller Immunoliposomen wurden eine Anzahl von Methoden zur Kopplung der Antikörper an die Liposomenoberflächen beschrieben (vgl. Kap. 2.3.3.). Diese beruhen auf unterschiedlichen kovalenten und nichtkovalenten Konjugationstechniken. Weiterhin wurde bewiesen, daß diese Kopplungstechniken auch in Anwesenheit von mPEG-PE an der Liposomenoberfläche funktionieren, dies aber zu einer Reduzierung der Kopplungsausbeute durch die sterische Stabilisierung der Liposomenoberfläche führt [205]. Obwohl alle diese Methoden ausreichend etabliert sind, findet man in der Literatur keine direkt vergleichenden Studien zu diesen Techniken.

Für die Herstellung der Selektin-gerichteten Immunoliposomen sollte eine dieser Konjugationstechniken ausgewählt werden. Aus diesem Grund testeten wir diese etablierten Kopplungsverfahren und bewerteten die Ergebnisse einerseits quantitativ nach der Menge der gekoppelten Antikörper und andererseits nach der Praktikabilität der Methode.

Zum Vergleich der Kopplungsausbeute wurden die Konjugationen mit humanem IgG als Probeantikörper statt der eigentlichen anti-E-Selektin IgG durchgeführt. Zur Vereinheitlichung wurden alle Kopplungsreaktionen mit einem initialen Antikörper/Lipid Molverhältnis von 1:1000 durchgeführt, welches entsprechend der Untersuchungen von Hansen et al. den besten Kompromiß aus eingesetzter und gekoppelter Antikörpermenge darstellt [223]. Die gekoppelte Antikörpermenge wurde durch Proteinbestimmungen quantifiziert.

Als Methoden für diesen Vergleich wählten wir die nichtkovalente Biotin-Avidin-Technik und die kovalenten Verfahren der Kopplung an PDP-PE bzw. MPB-PE über die Thioetherbindung und die Carbonsäureamidbindung an das N-Glut-PE. All diese Verfahren führten wir ohne, und in Anwesenheit von 2 bzw. 5 mol% mPEG-PE 2000 in den Liposomen

durch. Die erzielten Kopplungsausbeuten sind in Abb. 14 grafisch dargestellt, wobei die gekoppelten Antikörpermengen in $\mu\text{g Protein}/\mu\text{mol Lipid}$ angegeben sind.

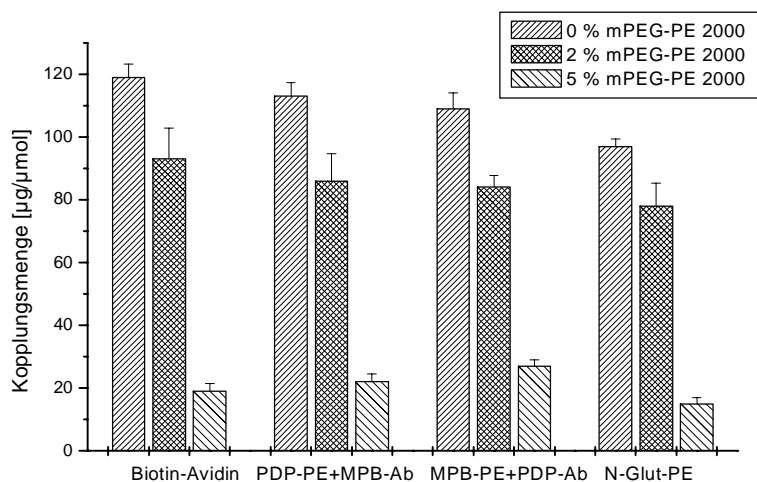


Abb.14: Vergleich der Kopplungseffizienz verschiedener Konjugationsmethoden. Die Daten repräsentieren Mittelwerte von mindestens drei Einzelbestimmungen.

Aus der Abbildung wird deutlich, daß alle Konjugationstechniken zu einer sehr ähnlichen Kopplungsausbeute führen. Übereinstimmung besteht auch darin, daß die Anwesenheit von mPEG-PE an der Liposomenoberfläche das Kopplungsausmaß in einem vergleichbaren Maß reduziert. Während 2 mol% mPEG-PE zu einer nur moderaten Abnahme des gekoppelten Proteins führt, verursachen 5 mol% des mPEG-PE eine Reduzierung um 80-90% der ursprünglich gebundenen Menge der PEG-freien Liposomen. Zu unseren erhobenen Daten finden sich nur einzelne Vergleichswerte in der Literatur. So sind unsere Ergebnisse der PDP-PE und MPB-PE Technik in guter Übereinstimmung mit Hansen et al., die lediglich für das MPB-PE mit 5 mol% PEG-PE eine höhere Kopplungsausbeute fanden [223]. Vom Standpunkt einer quantitativen Bewertung kann also keine der Methoden direkt favorisiert werden.

Betrachtet man hingegen die Praktikabilität der Kopplungsdurchführung, fallen deutliche Unterschiede auf. Die Biotin-Avidin-Methode ist eine schnelle und einfache Konjugationstechnik, die wir nach eingehender Verfahrensoptimierung auch ohne Vesikelaggregation durchführen konnten. Trotzdem ist die Notwendigkeit spezieller biotinylierter Antikörper oder die Biotinylierung mit den damit verbundenen Reinigungsschritten als deutlicher Nachteil anzusehen. Ähnliches gilt auch für die thioreaktiven Methoden des PDP-PE und MPB-PE. Obwohl beide Kopplungsverfahren mit sehr guter Quantität verlaufen, sind auch hierbei die notwendige Derivatisierung der Antikörper und die notwendigen gelchromatografischen Reinigungsschritte von Nachteil. Dies gilt insbesondere vor dem Hintergrund der enorm hohen Preise der spezifischen monoklonalen Antikörper.

Dahingegen ist die Kopplungsmethode an N-Glut-PE von deutlichem Vorteil, denn hier können die Antikörper ohne vorherige Umsetzung oder Derivatisierung direkt gekoppelt werden. Der Aktivierungsschritt mit einem Carbodiimid (EDC) findet an den Anker-molekülen der Liposomen statt und beeinflusst so die zu koppelnden Antikörper nicht. Von dieser Kopplungsreaktion gibt es drei, leicht voneinander abweichende Varianten (vgl. 2.3.3.). In vergleichenden Studien in der Arbeitsgruppe [301] konnte gezeigt werden, daß die hier angewendete Variante der Kopplung bei neutralem pH gegenüber der von Weissig vorgeschlagenen pH-Veränderungen oder gegenüber der von Bogdanov favorisierten

zusätzliche Anwendung von N-Hydroxysulfosuccinimid zumindest gleichzusetzen ist [225, 226].

Aus diesem Grund favorisierten wir die N-Glut-PE Methode als Verfahren zur Herstellung der konventionellen Immunoliposomen für unsere weiteren Untersuchungen.

4.3.1.2. Nutzung von Cyanur-PEG-PE als neuartige Kopplungsstrategie für die Konjugation von Antikörpern an terminales PEG

Aus den vorangegangenen Untersuchungen wird deutlich, daß in Übereinstimmung mit Literaturdaten eine sterische Stabilisierung der Liposomen die Antikörperkopplung an der Liposomenoberfläche vermindert. Als ein Lösungsvorschlag dieses Problems hat sich die Antikörperkopplung an die terminalen PEG-Reste gut bewährt. In der Literatur werden unter Nutzung unterschiedlicher heterobifunktioneller PEG-Derivate verschiedene Kopplungsstrategien beschrieben. Nachteil dieser Methoden ist es wiederum, daß die Antikörper für die Konjugation erst derivatisiert werden müssen (Hydrazid- bzw. thioreaktive Methoden [223,233-235]) oder zumindest weiterer Aktivierungsreagenzien bedürfen [230, 231]. Da zudem diese Derivate nicht kommerziell erhältlich sind, strebten wir die Darstellung eines eigenen PL-PEG-Ankers an, der eine einfache und gut steuerbare Proteinkopplung an den PEG-Enden ohne vorherige Antikörperderivatisierung gestattet.

Unsere Wahl fiel auf Cyanurchlorid, welches als trifunktionelles Reagenz eine reaktive Abstufung in der nucleophilen Substitution an den Chlorsubstituenten aufweist. Während sich die erste und zweite Substitution im schwach alkalischen Milieu leicht vollzieht, ist die dritte Substitution stark abgeschwächt. Dies erscheint sehr geeignet, um über Cyanurchlorid eine Verbindung zwischen PEG und einer Aminogruppe eines Antikörpers zu generieren. Auch in der Vergangenheit wurde Cyanurchlorid bereits genutzt, um Proteine an hydrophile Matrixsubstanzen wie z.B. PEG zu konjugieren [302,303]. Die Biokompatibilität des Cyanurchlorides wurde in vielfältigen Untersuchungen überprüft. Zwar wirkt das reine Cyanurchlorid als sensorische Noxe auf die Atemwege [304], jedoch beweisen umfangreiche Zellstudien, daß es weder akute oder chronische Toxizität noch mutagene oder gentoxische Effekte aufweist [305]. Die Reaktivitätsabstufung über den pH-Wert (reaktiv im schwach alkalischen Milieu, kaum Reaktivität im Neutralen) verleiht dem Cyanurchlorid eine weitere Sicherheit für seine Anwendung als Antikörper-Kopplungsreagenz. Die Zielstruktur des Proteinankers „Cyanur-PEG-PE“ ist in Abb. 15 dargestellt.

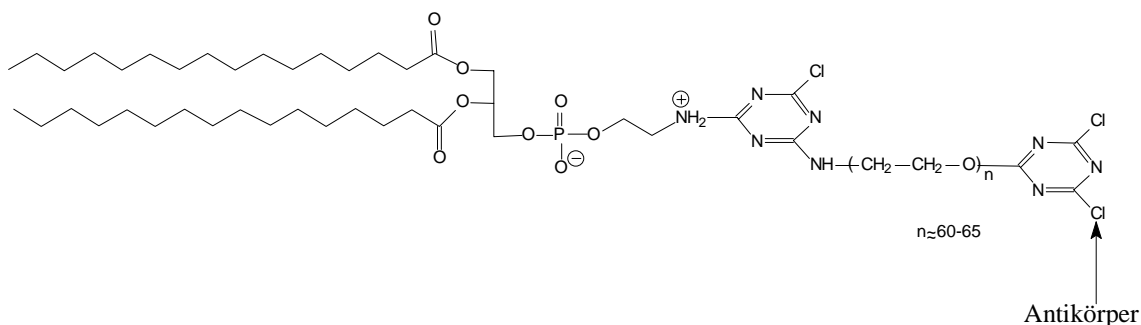


Abb. 15: Struktur des Proteinankers Cyanur-PEG-PE für die terminale Antikörperkopplung an Liposomen

Die Darstellung des Ankers Cyanur-PEG-PE erfolgte über drei Stufen [306]. Zu Beginn wird Cyanurchlorid an die Aminogruppe eines DPPE gebunden, was dann als Kopplungsreagenz für die nachfolgende Konjugation eines PEG fungiert. Wir nutzten ein heterobifunktionelles PEG (α -Amino- ω -Hydroxy-PEG 3000), um durch die unterschiedliche Reaktivität der terminalen Amino- bzw. Hydroxygruppen die Bildung dimerer Produkte zu vermeiden. Durch Reaktion der stärker nucleophilen Aminogruppe mit dem Cyanurchlorid entsteht ein PEG-PE-Derivat mit terminaler Hydroxygruppe. An diese kann nun in letzter

Stufe der Umsetzung eine weiteres Cyanurchlorid gekoppelt werden, welches dann als Kopplungsreagenz für die Aminogruppen der Antikörper fungiert.

Auf diesem Wege erhielten wir das gewünschte Produkt mit einer Ausbeute von ca. 25%. Da das heterobifunktionelle PEG-Derivat nur mit einer Molmasse von 3000 kommerziell erhältlich war, unterscheidet sich der Anker diesbezüglich von dem gebräuchlichen mPEG-PE 2000. Deshalb sollte in ersten Versuchen überprüft werden, inwieweit sich das Cyanur-PEG-PE in Liposomen einbauen läßt und deren Eigenschaften beeinflußt. Es konnte gezeigt werden, daß Cyanur-PEG-PE bis zu 10 mol% in die von uns favorisierten SPC/Chol Liposomen einzubauen war, ohne daß eine Veränderung der Vesikelgröße oder deren Permeabilität auftrat.

Auf dieser Basis wurde die Antikörperkopplungsfähigkeit von Cyanur-PEG-PE-Liposomen untersucht. Eine nucleophile Substitution am Cyanurchlorid findet unter alkalischen Bedingungen statt und wird über den pH-Wert in ihrem Ausmaß reguliert. Aus diesem Grund führten wir Kopplungsreaktionen an Liposomen mit 5 mol% Cyanur-PEG-PE in einem pH-Bereich zwischen 7,0 und 9,75 in Boratpuffer durch, um die Kopplungsbedingungen bei einem, für die Antikörperstabilität noch verträglichen pH-Wert zu optimieren. Die Abhängigkeit der Kopplungsfähigkeit vom pH-Wert ist in Abb. 16 dargestellt.

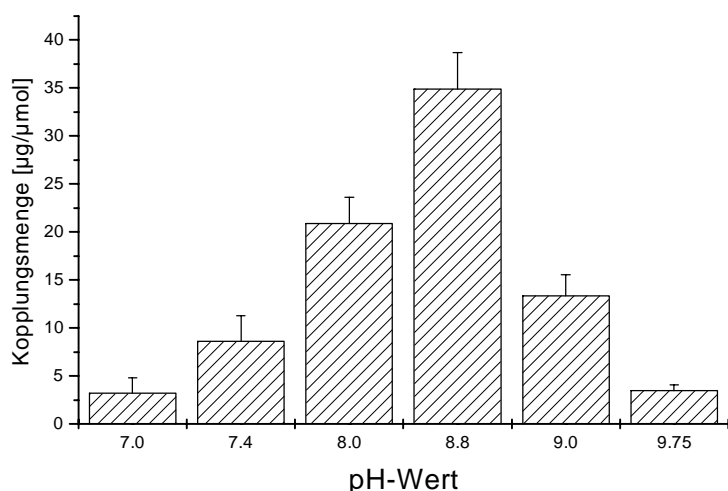


Abb. 16: Abhängigkeit der Antikörperkopplung an Cyanur-PEG-PE-Liposomen vom pH-Wert

Aus der Abbildung wird ersichtlich, daß die Kopplungsfähigkeit des Anker-moleküls ausgehend von einer Reaktionsunfähigkeit bei neutralem pH mit der Alkalisierung des Mediums bis zu einem pH von 8,8 drastisch zunimmt. Der pH-Wert von 8,8 repräsentiert die optimalen Kopplungsbedingungen, da eine weitere Alkalisierung wieder zu einer deutlichen Kopplungsabnahme führt. Dieses Verhalten ist mit der chemischen Reaktivität des Cyanurchlorides erklärbar. Während die Nucleophilie der Aminogruppen der Antikörper an ein basisches Medium gebunden ist und somit im Neutralen keine Reaktion stattfindet, wird das Cyanurchlorid im stärker alkalischen Medium bei $\text{pH} > 8,8$ unter Ringöffnung hydrolysiert. Da der pH-Wert von 8,8 auch für die Proteine verträglich ist, wurde er als Optimum der Kopplungsreaktion für alle weiteren Untersuchungen mit Cyanur-PEG-PE-Immunoliposomen genutzt. Darüberhinaus wird ersichtlich, daß bei einer Applikation der Immunoliposomen unter neutralen physiologischen Bedingungen keine Gefahr unerwünschter Nebenreaktionen durch die nach der Antikörperkopplung noch existierenden Chlorsubstituenten am Cyanurchlorid besteht. Damit ist bewiesen, daß der Cyanur-PEG-PE-Anker in einer einfachen Umsetzungsreaktion ohne weitere Aktivierungsschritte und leicht

über den pH-Wert steuerbar Antikörper koppeln kann. Dies erscheint im Vergleich zu den anderen beschriebenen Kopplungsmethoden von großem Vorteil.

In anschließenden Untersuchungen sollte das exakte Kopplungsausmaß von Cyanur-PEG-PE Liposomen für Antikörper bestimmt werden. Da die Bindungsfähigkeit von der Menge der Anker-moleküle in den Liposomen abhängen sollte, wurden Liposomen mit unterschiedlichem Cyanur-PEG-PE-Gehalt von 0,5 mol% bis zu 7,5 mol% hergestellt und den Kopplungsreaktionen unterzogen. Die Ergebnisse der Proteinbestimmungen nach erfolgter Konjugationsreaktion sind in Abb. 17 dargestellt.

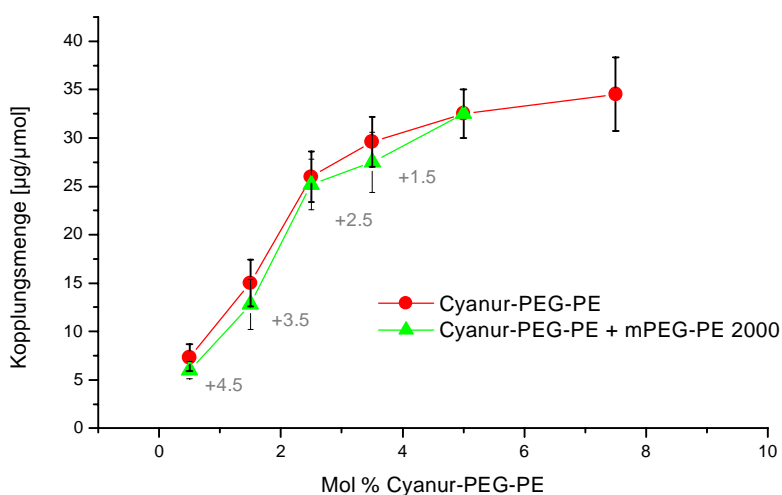


Abb. 17: Antikörperkopplungs-Ausmaß von Immunoliposomen in Abhängigkeit von der Cyanur-PEG-PE-Konzentration ohne (runde Symbole) und mit Zugabe von mPEG-PE 2000 (dreieckige Symbole).

Es zeigt sich am Kurvenverlauf (runde Symbole), daß bis zu einer Ankerkonzentration von 2,5 mol% die Kopplungsfähigkeit deutlich zunimmt, eine weitere Erhöhung der Konzentration an Cyanur-PEG-PE bis zu 7,5 mol% verursacht nur noch leicht höhere Werte. Größenmäßig gruppieren sich die Daten bei höherer Ankerkonzentration um ca. 30 µg Antikörper pro µmol PL, was aus Sicht der Targetierung dieser Liposomen einen mittleren Wert repräsentiert. Im Vergleich zu den PEG-freien konventionellen Konjugationsmethoden (Abb. 14, 4.3.1.1.) sind diese Werte als eher gering einzuschätzen. Die konventionellen Immunoliposomen jedoch wurden in ihrem Bindungsausmaß stark durch mPEG-PE in den Liposomen eingeschränkt. Da bei den Cyanur-PEG-PE-Immunoliposomen die Antikörperkopplung nicht an der Liposomenoberfläche sondern terminal am PEG stattfindet und der Anker selbst eine sterische Stabilisierung bewirkt, sollte zusätzliches mPEG-PE 2000 in den Liposomen keine deutliche Beeinflussung der Kopplung verursachen. Um dies zu überprüfen, wurden die Kopplungen in Gegenwart von mPEG-PE 2000 durchgeführt. Für eine Vergleichbarkeit mit den konventionellen Immunoliposomen wurde immer soviel mPEG-PE 2000 zugegeben, daß das Cyanur-PEG-PE zu insgesamt 5 mol% PEG-Derivat ergänzt wurde. Die Abbildung verdeutlicht (dreieckige Symbole), daß die Kopplungsausbeute dadurch nur unwesentlich beeinflusst wird. Vergleicht man diese Werte mit den konventionellen Immunoliposomen, so wird beispielsweise bei 5 mol% Cyanur-PEG-PE die deutliche Überlegenheit dieser Kopplungstechnik bei gleichzeitiger sterischer Stabilisierung deutlich.

Durch die terminale Kopplung am PEG sollten sich die Antikörper an den Cyanur-PEG-PE-Immunoliposomen nicht nur in ihrer exponierten Lage, sondern auch in ihrer Flexibilität gegenüber den konventionellen Immunoliposomen unterscheiden. Dies sollte ein entscheidender Vorteil für die Targetierungsexperimente sein, da die terminal gekoppelten

Antikörper effektiver an den Targets binden können. Die Unterschiede in der Antikörperlokalisation konnten bisher nie direkt bewiesen, sondern immer indirekt über die beschriebenen Targetierungseffekte postuliert werden.

Mit mikroskopischen Mitteln versuchten wir im folgenden, Unterschiede in der Lokalisation der Antikörper bei konventioneller oder PEG-terminaler Kopplung zu verdeutlichen. Die dafür notwendige molekulare Auflösung sollte prinzipiell mit der Atomic Force Mikroskopie möglich sein. Bei dieser Technik entsteht ein Abbild durch rasterförmiges Abtasten der Oberfläche des Untersuchungsgegenstandes mittels einer feinst ausgezogenen Siliziumnitritspitze (Cantilever). Da diese Technik eine gewisse Rigidität des Untergrundes voraussetzt, sind bisher keine topografischen Abbildungen der Oberflächen von fluiden Liposomen bekannt geworden.

In einem ersten Übersichtsbild (Abb. 18a) erscheinen die Cyanur-PEG-PE-Immunoliposomen als eine relativ einheitliche Liposomenpopulation von ca. 200 nm Durchmesser. Diese Werte sind in Übereinstimmung mit Daten der dynamischen Lichtstreuung und beweisen, daß die Antikörperkopplung ohne Veränderung der liposomalen Größe stattfindet.

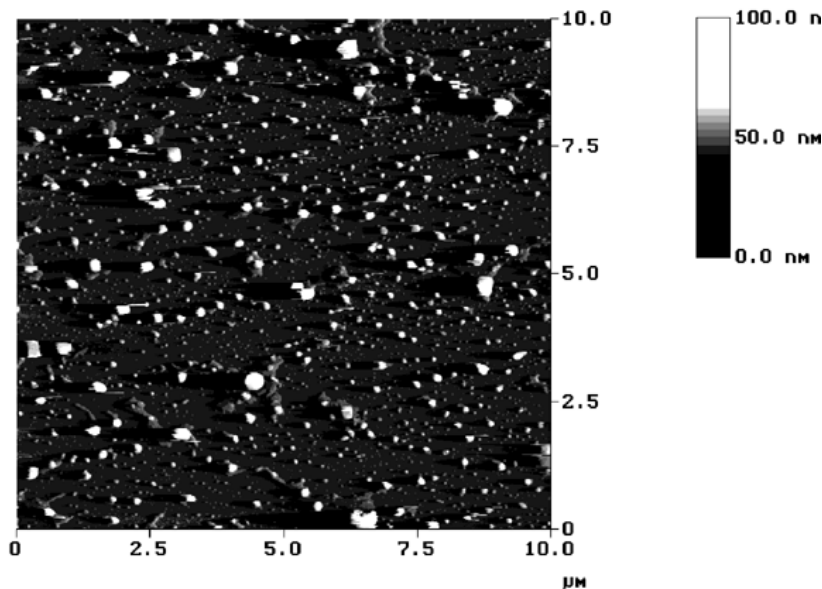


Abb. 18 a: AFM-Bild einer Dispersion von Cyanur-PEG-PE-Immunoliposomen im „Höhenmodus“

Auch nach starker Vergrößerung einzelner Cyanur-PEG-PE-Immunoliposomen wie in Abb. 18b zeigt sich entlang des Oberflächenscans keine detektierbare Proteinstruktur, da Antikörper mit ihrer Größe in einer Dimension von ca. 5 bis 10 nm sichtbar sein müßten. Dieses Ergebnis widerspricht jedoch den Daten der Proteinbestimmungen. Nur in dem oberen Randbereich der Liposomen sind Oberflächenstrukturen sichtbar. Es gelang eine Fokussierung auf diesen Bereich, in dessen Ergebnis in Abb. 18c eine trimere kugelförmige Struktur sichtbar wurde. Diese trimere Struktur aus Kugeln mit einem Durchmesser von jeweils ca. 6 bis 8 nm könnte ein einzelnes IgG-Molekül repräsentieren, wobei sich diese Abbildung in sehr guter Übereinstimmung mit Daten von Fritz et al. befindet [307].

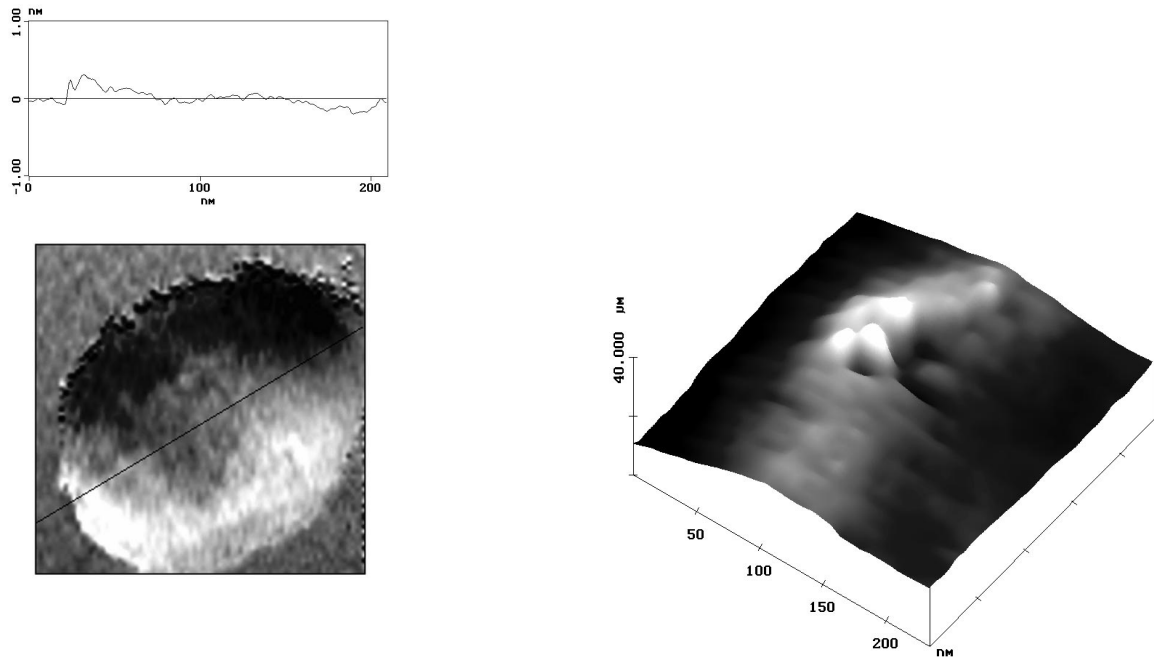


Abb. 18b und 18c: b: AFM-Abbildung und Oberflächenscan entlang eines Cyanur-PEG-PE-Immunoliposoms im „Amplituden-Modus“. c (rechts): AFM-Aufnahme der oberen Randzone des Liposoms aus Abb. 18b.

Damit ist bewiesen, daß sich Antikörpermoleküle an den Cyanur-PEG-PE-Immunoliposomen befinden, diese aber auf der Liposomenoberfläche nicht detektiert werden können. Um zu überprüfen, ob dies ein allgemeines Problem der AFM-Technik ist, oder in der Struktur der Cyanur-PEG-PE-Immunoliposomen begründet liegt, untersuchten wir analog konventionelle Immunoliposomen mit gekoppelten Antikörpern.

Diese zeigen, wie in Abb. 19a sichtbar, über die gesamte Liposomenoberfläche verteilt eine gleichmäßige Strukturierung. Löst man diese wie in Abb. 19b im Oberflächenscan größenmäßig auf, erscheinen vielfältige Strukturen in der Dimension der Antikörper.

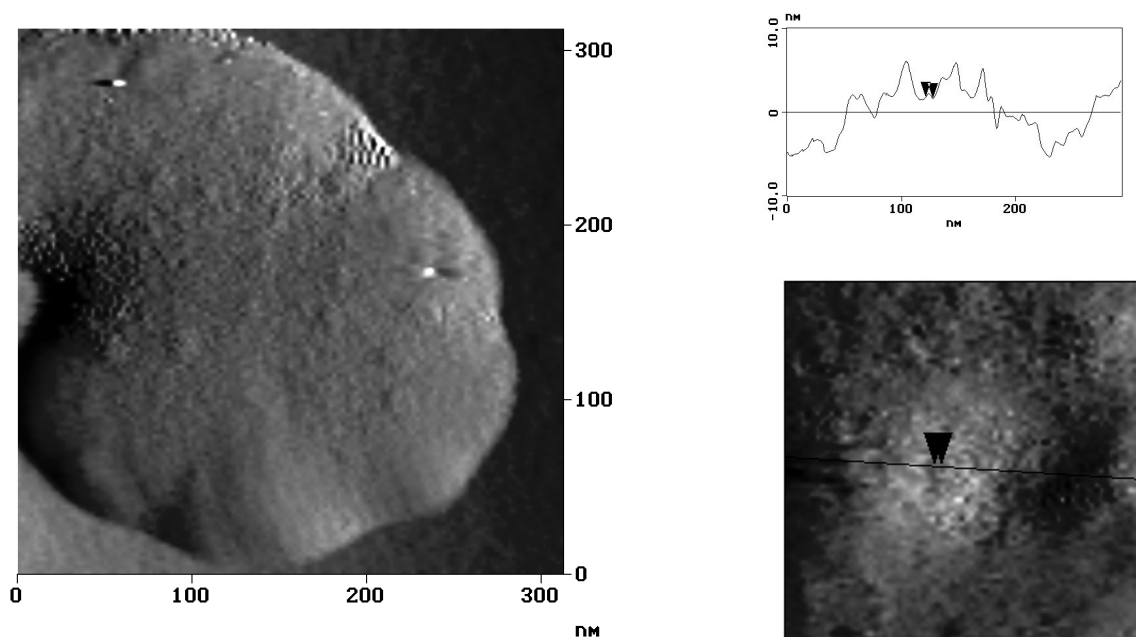


Abb. 19a und 19b: a (links): Oberflächenstruktur eines N-Glut-PE-Immunliposomes durch AFM im „Amplituden Modus“. b (rechts): Größenmäßige Detektion der Oberflächenstrukturen von Abb. 19a.

Da damit bewiesen wird, daß die AFM-Technik prinzipiell gekoppelte Antikörper an Liposomenoberflächen detektieren kann, muß der fehlende Nachweis an Cyanur-PEG-PE-Immunliposomen an der Art der Antikörperkopplung liegen. Wie bereits beschrieben, braucht die AFM-Technik eine gewisse Rigidität des Objektes bei seiner Abtastung für eine Bildgebung. Dies ist sicher bei den konventionell-gekoppelten Antikörpern der Fall, da diese direkt auf der Liposomenoberfläche lokalisiert sind und damit auch häufig durch mehrerer Anker-moleküle gleichzeitig gekoppelt werden. Im Gegensatz dazu haben die PEG-terminal gekoppelten Antikörper keinen festen Kontakt zur Liposomenoberfläche und können so bei einem Scanning über die Liposomen der AFM-Spitze ausweichen. Damit stärkt diese AFM-Untersuchung die Hypothese, daß die PEG-terminal gekoppelten Antikörper eine deutlich erhöhte Flexibilität an der Liposomenoberfläche im Vergleich mit konventionellen Immunliposomen besitzen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß mit dem Cyanur-PEG-PE eine neue Kopplungstechnik für die PEG-terminale Anbindung von Antikörpern an Liposomen etabliert wurde. Diese Technik bedarf keiner Aktivierungsschritte und ist über den pH-Wert sehr gut steuerbar. Die erzielten Kopplungsergebnisse übertreffen bei sterischer Stabilisierung das Kopplungsausmaß konventioneller Immunliposomen deutlich. Da AFM-Untersuchungen bewiesen, daß die Antikörper am PEG-Terminus eine hohe Flexibilität aufweisen, sollten diese Cyanur-PEG-PE-Immunliposomen für die Targetierungsexperimente sehr gute Voraussetzungen besitzen.

4.3.2. Untersuchung der Immunogenität der Immunliposomen

Die Kopplung der Antikörper an die PEG-terminalen Cyanurchloride des Cyanur-PEG-PE- Ankers soll durch die exponierte Lage an der Liposomenoberfläche zu einer besseren Zugänglichkeit und damit Targetbindungsfähigkeit der Liposomen führen. Gleichzeitig aber

ist auch anzunehmen, daß diese exponiert präsentierten Antikörper bei einer in vivo-Applizierung verstärkt von den Makrophagen erkannt und dem Kreislauf entzogen werden. Studien beweisen, daß solche terminal gekoppelten Immunoliposomen tatsächlich eine etwas verkürzte Eliminationshalbwertszeit gegenüber konventionellen Immunoliposomen des gleichen PEG-Gehaltes aufweisen [234]. Da die Eliminationsgeschwindigkeit von der Menge des gekoppelten Antikörpers abhängt, fand man mit der Kopplung mittlerer Antikörpermengen von ca. 30 µg/µmol PL einen guten Kompromiß zwischen Zirkulationszeit und Targetierbarkeit. Diese Untersuchungen zur einmaligen Eliminierung der Immunoliposomen über 24 Stunden repräsentieren lediglich deren Makrophagenaufnahme, nicht aber die gesamten immunologischen Abwehrreaktionen des Körpers, die sich nicht innerhalb dieser Zeit manifestieren. Darüberhinaus ist auch aus therapeutischer Sicht eine einmalige Gabe von Liposomen (ausgenommen Diagnostik) nicht relevant.

Konventionelle Immunoliposomen wurden durch mehrfache Applikation auf ihre Immunogenität untersucht [308]. Dabei konnte man durch die Bildung von Anti-Antikörpern feststellen, daß die liposomale Kopplung das immunologische Potential von Antikörpern drastisch erhöht [309,310].

Trotz der vielfältigen pharmakokinetischen Studien des Verhaltens von PEG-haltigen Liposomen und Immunoliposomen existieren bisher nur drei Arbeiten, die sich mit dem immunologischen Potential von PEG-haltigen Immunoliposomen nach mehrfacher Applikation beschäftigen [240-242]. Nur eine dieser Arbeiten untersucht dabei PEG-terminal gekoppelte Antikörper [242]. In dieser Untersuchung zeigten die PEG-Hydrazid gekoppelten Immunoliposomen ein starkes immunogenes Potential, was sich in einer rapiden Eliminationsbeschleunigung der zweiten und dritten applizierten Liposomendosis und in der Bildung von Anti-Antikörpern manifestierte.

In unserem Interesse lag es nun, die Immunogenität der Immunoliposomen mit dem neuartigen Anker Cyanur-PEG-PE zu untersuchen, und dieses mit dem Verhalten konventioneller, PEG-haltiger Immunoliposomen bzw. zu Kontrollliposomen zu vergleichen. Dafür präparierten wir SPC/Chol Liposomen mit 3 bzw. 5 mol% Cyanur-PEG-PE („Cyanur 3“; „Cyanur 5“) und solche, die neben 10 mol% N-Glut-PE auch 5 mol% mPEG-PE enthielten („N-Glut-PE“). Damit in allen Präparationen einheitlich 5 mol% eines PEG-Derivates enthalten waren, wurden dem „Cyanur 3“-Ansatz noch 2 mol% mPEG-PE zugegeben, als Kontrolle dienten SPC/Chol Liposomen mit 5 mol% mPEG-PE. Um spezifische Bindungsprozesse der Antikörper nach Applikation auszuschließen, wurde ein irrelevantes, hochgereinigtes Maus-IgG an die drei Ansätze gekoppelt. Die Kopplungsausbeute wurde mittels Proteinbestimmung vorgenommen. Sie ergab für Cyanur 3: 27 µg/µmol PL, für Cyanur 5: 32 µg/µmol PL und für N-Glut-PE: 25 µg/µmol PL. In Hinblick auf die Antikörpermenge bestand somit eine sehr gute Vergleichbarkeit der drei Präparationen, auch liegt diese Menge im Bereich des von Allen gekennzeichneten günstigen immunologischen Verhaltens der Liposomen [234]. Für einen direkten Vergleich mit der von Harding vorgestellten Studie [242] (Angabe in Antikörper pro Liposom) rechneten wir zusätzlich unter Berücksichtigung liposomaler Parameter (Durchmesser ca. 85 nm) über den Flächenbedarf der Kopfgruppen diesen Parameter für unsere Liposomen aus und erhielten: Cyanur 3: 18 IgG/Liposom; Cyanur 5: 21 IgG/Liposom; N-Glut-PE: 17 IgG/Liposom.

Jede dieser Präparationen wurde nun in jeweils zwei Ratten (2 µmol/ 100 g Körpergewicht) i.v. appliziert. Nach einer 14-tägigen Inkubationszeit erhielten diese Ratten erneut die gleiche Dosis der gleichen Präparation, die nun aber mit einem ³H-Cholesterollabel versehen waren. Über einen Zeitraum von 24 h wurden regelmäßig Blutproben entnommen. Nach 24 h wurde das Tier entblutet und die für die Aussagen relevanten Organe Leber, Milz, Herz, Lunge und Nieren entnommen. Es wurde eine Aktivitätsmessung in den Blutproben und Geweben durchgeführt und diese prozentual zur applizierten Gesamtmenge ins Verhältnis gesetzt.

Die Blutspiegelwerte wurden für eine pharmakokinetische Berechnung herangezogen. Mit einer kompartmentfreien Analyse wurden die Plasmahalbwertszeit ($t_{1/2}$), die Fläche unter der Kurve (AUC), die mittlere Verweildauer (MRT) sowie die Clearance der applizierten Liposomen in allen Ratten bestimmt. Diese Daten sind in Tabelle 4 verzeichnet.

Applizierte Liposomenart	HWZ $t_{1/2}$ [min] / [h]	AUC $_{0-\infty}$ [%min/%]	MRT [min]	Clearance $_{tot}$ [%/min]
Cyan3 – Cyan3	776 / 12,9	109650	1050	$9,1 \cdot 10^{-4}$
Cyan3 – Cyan3	884 / 14,7	103000	1250	$9,7 \cdot 10^{-4}$
Cyan5 – Cyan5	1112 / 18,5	143300	1600	$6,9 \cdot 10^{-4}$
Cyan5 – Cyan5	904 / 15,0	142000	1250	$7,0 \cdot 10^{-4}$
N-Glut – N-Glut	389 / 6,4	50500	460	$2,0 \cdot 10^{-3}$
N-Glut – N-Glut	446 / 7,4	50100	550	$2,0 \cdot 10^{-3}$
Kontr. – Kontr.	291 / 4,8	46800	330	$2,1 \cdot 10^{-3}$
Kontr. – Kontr.	292 / 4,8	42600	330	$2,3 \cdot 10^{-3}$

Tab. 4: Pharmakokinetische Parameter der Liposomenelimination aus dem Plasma nach zweimaliger identischer Applikation

Alle pharmakokinetischen Parameter beweisen eindeutig, daß die Cyanur-PEG-PE-haltigen Immunliposomen deutlich langsamer aus dem Blutkreislauf entfernt werden als die N-Glut-PE bzw. Kontrollliposomen. Dies wird noch stärker durch die grafische Darstellung der prozentualen Retention gegen die Zeit in Abbildung 20 verdeutlicht. Da die prozentualen Blutspiegelwerte und die pharmakokinetischen Parameter der zwei parallelen Bestimmungen jeweils nur wenig voneinander abwichen, wurden sie als Mittelwerte zusammengefaßt und in Abb. 20 aufgenommen.

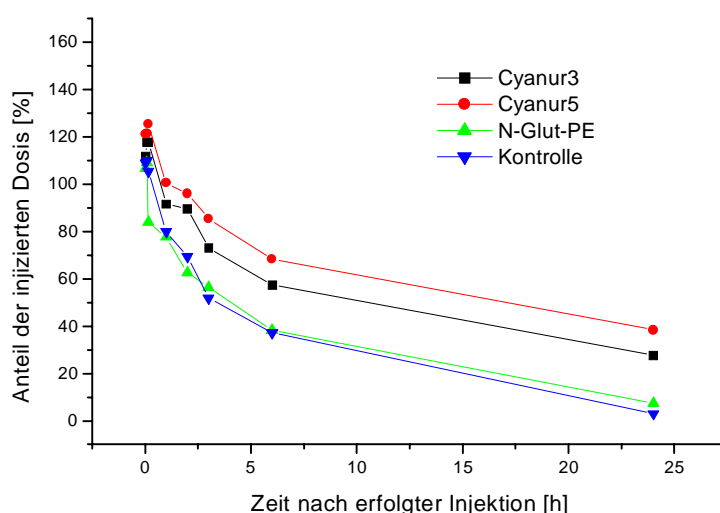


Abb. 20: Vergleich der Eliminationskinetik unterschiedlicher Immunliposomen nach zweifacher i.v. Applikation in Ratten (Daten sind jeweils Mittelwerte zweier paralleler Bestimmungen, vgl. Tab. 4)

Bei Betrachtung des Blutspiegelverlaufes wird deutlich, daß alle vier Präparationen trotz individueller Unterschiede relativ lange Zirkulationszeiten im Blut aufwiesen. Dabei zeigen die beiden terminal gekoppelten Immunliposomen-Ansätze noch deutlich höhere Blutspiegel, wobei sie sich insbesondere ab dem 2 Stunden-Wert von den Kontroll- und den N-Glut-PE-Liposomen unterscheiden. Ausdruck hierfür sind die HWZ von 13,8 h bzw. 16,7 h für Cyanur 3 bzw. Cyanur 5 gegenüber den HWZ von 6,9 h bzw. 4,8 h der N-Glut-PE bzw.

Kontrolliposomen. Mit diesen HWZ verbleiben diese Liposomen zwar kürzer im Körper als normale, sterisch stabilisierte Liposomen bei Erstapplikation (HWZ ca. 20h). Betrachtet man dies jedoch vom Blickpunkt einer wiederholten Gabe mit der Berücksichtigung der gekoppelten Antikörper ergibt sich ein dramatischer Unterschied zu den von Harding untersuchten Hydrazid-PEG-Immunoliposomen, die bei nahezu identischer Antikörpermenge (18 IgG/Liposom) bei der zweiten Injektion in Ratten nur noch eine Halbwertszeit von 0,5 h aufwiesen. Im direkten Vergleich dieser terminal gekoppelten Immunoliposomen spricht dies prinzipiell für eine deutlich geringe Immunogenität der Cyanur-PEG-PE Liposomen, die aber noch weiterer Erklärungen und Untersuchungen bedarf. Da dieses stark differierende Verhalten nicht allein durch die experimentellen Unterschiede (Harding: Sprague Dawley-versus WagRij-Ratten in unseren Experimenten) zu erklären ist, muß der Grund dieser Unterschiede in der Art der Antikörperbindung und –ausrichtung liegen. Offensichtlich sind die terminalen Hydrazidgruppen und die Anwesenheit der oxidierten Antikörper bei dieser Kopplungsstrategie wesentlich immunogener als die hier vorgestellten terminalen Cyanurchloride. Leider sind in der Literatur keine weiteren Daten für einen umfassenderen Vergleich vorhanden, um die Kopplungschemie mit dem immunogenen Potential zu korrelieren.

Auffällig an den Daten ist weiterhin der nahezu analoge Verlauf der N-Glut-PE Vesikel mit den Kontrolliposomen. Dies läßt sich mit einem geringen immunologischen Potential des gekoppelten IgG an der PEG-haltigen Liposomenoberfläche interpretieren. Dahingegen scheinen die 5 mol% mPEG-PE in beiden Präparationen das immunologische Verhalten der Liposomen stärker zu beeinflussen. Phillips et al. konnten demonstrieren, daß mPEG-PE im Gegensatz zu seiner bekannten zirkulationsverlängernden Wirkung bei Erstapplikationen bei mehrfacher Gabe die Immunogenität von Liposomen deutlich erhöht [240]. Dies könnte auch bei unseren Daten der Fall zu sein. Dieser Effekt scheint bei dem Cyanur-PEG-PE trotz der gekoppelten Antikörper schwächer ausgeprägt zu sein. Vielleicht spielt dabei die höhere Molmasse von 3000 gegenüber dem gebräuchlichen mPEG-PE 2000 eine Rolle. Da auch die Bildung von anti-Phospholipid-Antikörpern in der Literatur als ein Fakt der Liposomenimmunogenität beschrieben ist [311], erörtern wir die Möglichkeit der Bildung von anti-mPEG-PE Antikörpern, da bei dieser Hypothese der unterschiedliche mPEG-PE-Gehalt (5 mol% bei Kontrolle und N-Glut-PE; 2 mol% Cyanur 3; 0 % bei Cyanur 5) gut mit der Abnahme der Kursationszeiten korrelieren würde. Jedoch konnten wir im 24 h Serum keine solchen Antikörper detektieren.

Eine mögliche mechanistische Erklärung dieser Phänomene liefert eine Studie von Dams et al., die in unterschiedliche Species wiederholt PEG-haltige Liposomen applizierten [312]. Auch sie fanden für die reinen PEG-Liposomen bei Ratten nach der zweiten Applikation eine dramatische Abnahme der Zirkulationszeit und eine starke Leberanreicherung der Liposomen. Sie bewiesen, daß trotz der sterischen Stabilisierung der Vesikel eine Opsonierung mit einem nach Erstkontakt aktivierten Serumfaktor unbekannter Genese (hitze-labil, ca. 150 kD) stattfindet, der dann die verstärkte Leberaufnahme vermittelt. Da eine solche Opsonierung als Ursache der Immunogenität konventioneller Liposomen beschrieben wurde [313,314], muß der These der nichtimmunogenen PEG-Liposomen widersprochen werden. Sollte auch in unseren Experimenten eine solche Opsonierung mit einem Serumfaktor die Ursache der Eliminationskinetik sein, könnte tatsächlich die längere Zirkulation der Cyanur-PEG-PE Vesikel mit ihrem größeren PEG-Volumen (3000) und der daraus reduzierten Opsonierung erklärt werden.

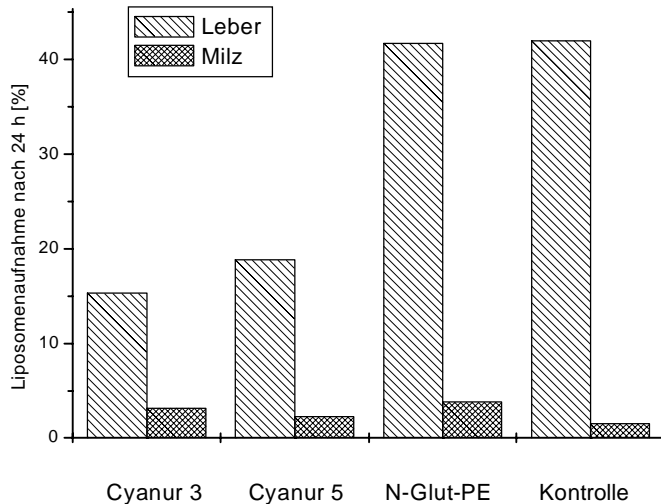


Abb. 21: Organverteilung der verschiedenen Immunoliposomen 24 h nach Zweitapplikation in Ratten

Als weiteres Kriterium der unterschiedlichen Immunogenität der verschiedenen Präparationen untersuchten wir deren Organverteilung. Dabei wird offensichtlich, daß beide Cyanur-PEG-PE Präparationen mit ihren deutlich höheren Blutspiegelkurven korrelierend eine wesentlich geringere Leberakkumulation aufweisen im Vergleich zu den N-Glut-PE und Kontrollliposomen. Beide zeigen dabei, wie auch bei den Blutspiegelverläufen sehr große Ähnlichkeit, die Leberaufnahme übertrifft die Cyanur-PEG-PE Ansätze um mehr als das Doppelte. Auch die Milz zeigt in allen Fällen eine deutliche aber ähnliche Aufnahmerate, die aber in Hinblick auf eine unterschiedliche Immunogenität nicht interpretiert werden kann. Lunge, Herz und Nieren bieten wegen ihren Werten von unter 0,3 % bei dieser begrenzten Probenanzahl keine Möglichkeit einer gesicherten Auswertung. In Übereinstimmung mit den Blutspiegelkurven beweisen auch die Organverteilungen ein deutlich geringeres immunogenes Potential der Cyanur-PEG-PE-Liposomen gegenüber den N-Glut-PE und Kontrollansätzen.

Zur weiteren Fokussierung auf die Immunogenität des Cyanur PEG-PE applizierten wir Cyanur 3 als zweite Injektion in Versuchstiere, die als erste Injektion N-Glut-PE, Cyanur 5, Kontrollliposomen oder nur Puffer bekommen hatten. Prinzipiell sollten daraus zwei Aussagen resultieren. Werden die Cyanur 3 Liposomen in Ratten injiziert, die als Erstinjektion eine immunogenere Liposomenpräparation erhielten, so sollte auch die Elimination der zweiten Probe im Vergleich zur zweimaligen Cyanur 3 Applikation beschleunigt sein. Andererseits erhält man durch die mit Puffer vorinkubierten, und damit nicht immunisierten Tiere einen direkten Vergleich zur quasi Ersteliminierung des Cyanur 3.

Auch für diese Blutspiegeldaten wurden die üblichen pharmakokinetischen Berechnungen angestellt.

Applizierte Liposomenart	HWZ $t_{1/2}$ [min] / [h]	AUC $_{0-\infty}$ [%min/%]	MRT [min]	Clearance _{tot} [%/min]
Cyan3 – Cyan3	776 / 12,9	109650	1050	$9,1 \cdot 10^{-4}$
Cyan3 – Cyan3	884 / 14,7	103000	1250	$9,7 \cdot 10^{-4}$
Puffer – Cyan3	790 / 13,2	94900	1090	$1,0 \cdot 10^{-3}$
Puffer – Cyan3	802 / 13,3	97000	1120	$1,0 \cdot 10^{-3}$
Cyan5 – Cyan3	633 / 10,5	90550	840	$1,1 \cdot 10^{-3}$
N-Glut – Cyan3	615 / 10,7	72900	840	$1,4 \cdot 10^{-3}$
N-Glut – Cyan3	646 / 10,7	71700	900	$1,4 \cdot 10^{-3}$
Kontr. – Cyan3	827 / 13,8	100600	1140	$9,9 \cdot 10^{-4}$

Tab. 5: Pharmakokinetische Parameter der Cyanur 3-Elimination aus dem Plasma nach Applikation in unterschiedlich vorinkubierte Tiere

Betrachtet man diese pharmakokinetischen Parameter, so wird ein ausgeglichenes ähnliches Verhalten aller Präparationen deutlich. Auffällig ist, daß die Elimination nach einer zweimaligen Cyanur 3 Applikation mit der Cyanur 3 Eliminierung aus mit Puffer vorinkubierten Ratten (entsprechend Erstinjektion) nahezu identisch ist, was wiederum für eine sehr geringe Immunogenität der Cyanur-PEG-PE Immunliposomen spricht. Die mit Cyanur 5 und N-Glut-PE vorinkubierten Tiere zeigen eine leicht beschleunigte Eliminierung gemessen an den Puffer und Kontroll-vorbehandelten Tieren. Das ausgeglichene Verhalten wird auch wieder in der grafischen Darstellung der Eliminationsverläufe in Abb. 22 deutlich.

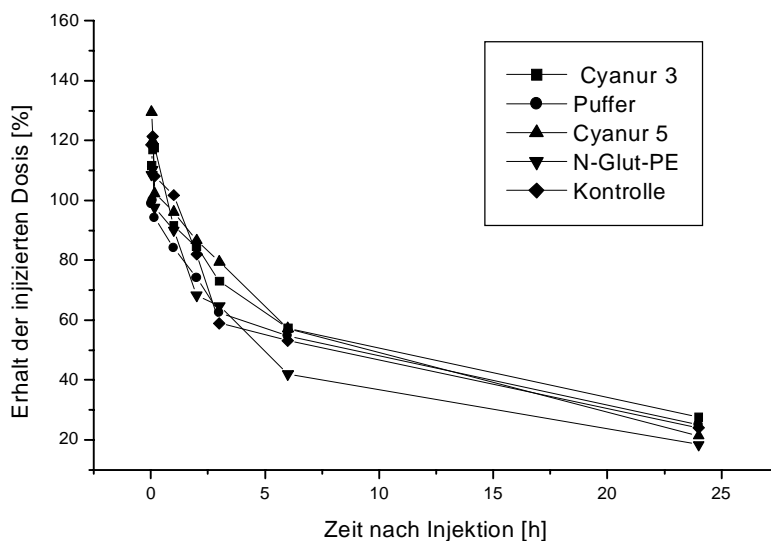


Abb. 22: Eliminationsverlauf von i.v. applizierten Cyanur 3-Immunliposomen in unterschiedlich vorinkubierten Ratten.

Die Abbildung verdeutlicht das analoge Eliminationsverhalten. Auch die Erstinjektion der stärker immunogenen N-Glut-PE und Kontrollliposomen verursacht keine drastische Veränderung der Cyanur 3 Eliminierung. Im Kurvenverlauf zeigen zwar die mit N-Glut-PE vorbehandelten Tiere leicht erniedrigte Blutspiegelwerte, es ergibt sich jedoch ein ausgeglichenes Gesamtbild. Auch hier kann postuliert werden, daß bei stärker vorimmunisierten Ratten die Cyanur-PEG-PE Vesikel schwächer opsonisiert werden und damit länger im Blut verbleiben. Die Vorinkubationen mit N-Glut-PE bzw. Kontrollliposomen zeigen in diesen Experimenten eine geringere Leberanreicherung der Cyanur 3-Liposomen

gegenüber der zweifachen N-Glut-PE bzw. Kontrollliposomen-Applikation (24,6% vs. 41,1% und 25,4% vs. 42%), die aber wiederum im Vergleich zu den Cyanur 5-Cyanur 3-Tieren mit 12,8% und den Puffer-Cyanur 3-Tieren mit 16,5% die stärkere Immunogenität von N-Glut-PE- und der Kontrollliposomen beweisen.

Zusammenfassend kann man feststellen, daß deutliche Unterschiede in der Immunogenität der verwendeten Liposomen bzw. Immunoliposomen bestehen. Die von uns konzipierten Cyanur-PEG-PE Immunoliposomen zeigen trotz der terminalen Antikörperkopplung eine erstaunlich geringe Immunogenität, die deutlich unter der der untersuchten konventionellen Immunoliposomen liegt. Die relativ starke Immunogenität einfacher, sterisch stabilisierter Liposomen beweist, daß eine Zirkulationsverlängerung durch die PEG-Derivate nicht automatisch zu immunologisch problemlosen Liposomenpräparationen führt.

Durch die geringe Anzahl von Versuchstieren kann diese Aussage jedoch nicht als eine endgültige Bewertung der Immunogenität der untersuchten Liposomen gelten. In weiterführenden Experimenten soll der Einfluß der Injektionsintervalle auf die Immunantwort verdeutlicht werden. Ebenso sollen zur Überprüfung des postulierten Einflusses der PEG-Größe unterschiedliche PEG-Derivate in den Immunoliposomen untersucht werden.

Trotzdem läßt sich aus diesen Studien resümieren, daß die Cyanur-PEG-PE Immunoliposomen damit eine entscheidende Voraussetzung für die folgenden Targetierungsexperimente in Hinblick auf zukünftige in vivo-Anwendung besitzen.

4.3.3. Targetierungsexperimente der Immunoliposomen

In den vorangegangenen Kapiteln wurden konventionelle und PEG-terminal gekoppelte Immunoliposomen charakterisiert und in ihrer Kopplungsfähigkeit für Antikörper optimiert. Mit diesen Immunoliposomen sollen nun in vitro-Targetbindungs-Experimente durchgeführt werden.

Die geplante Targetierung des E-Selektins an Endothelzellen eröffnet dabei völlig neuartige Perspektiven, um Arzneistoffvehikel gezielt zum entzündeten Gewebe zu transportieren. Für dieses therapeutische Ziel werden im folgenden verschiedene in vitro-Bindungsmodelle und Bindungsuntersuchungen vorgestellt, um eine spezifische Akkumulation von Immunoliposomen an aktivierten Endothelzellen unter simulierten Entzündungsbedingungen zu erreichen.

Auf Grund seiner Expressionskinetik erscheint das E-Selektin als die am besten geeignete Targetierungsstruktur an Endothelzellen für ein antiinflammatorisch gerichtetes Drug Targeting. Gemeinsam mit dem P-Selektin wird es nur unter Entzündungsbedingungen exprimiert, es unterscheidet sich aber vom P-Selektin durch die längeranhaltende Aktivität. Im Gegensatz zu verschiedenen anderen Adhäsionsrezeptoren an Endothelzellen (ICAM-1 und VCAM-1) zeigt dementsprechend E-Selektin unter normalen Bedingungen keine Basislevel, die sich beispielsweise bei Targetierungsstudien an ICAM-1 als nachteilig erwiesen [315]. Um diese Regulationsmechanismen auch in den in vitro-Targetexperimenten zu berücksichtigen, mußten geeignete Targetzellen ausgewählt werden.

Zu diesem Zweck wurden Endothelzellen aus humanen Nabelschnuren (HUVEC) genutzt, die nach Isolation und Kultivierung bis zu einer fünften Passagierung der Zellen die Fähigkeit zur E-Selektin-Expression unter Aktivierung behielten. Für die Targetuntersuchungen wurden immer HUVEC der zweiten oder dritten Passage verwendet. Durch fluoreszenzmarkierte Antikörper gegen E-Selektin wurde die optimale Stimulation der Zellen mit IL-1 β zeitlich verfolgt.

Nach unserer Modellvorstellung simulieren konfluente Schichten dieser Zellen die Auskleidung der kapillaren Gefäße im entzündeten Gewebe, an denen die E-Selektin-gerichteten Immunoliposomen binden sollen. Für einen umfassenden Targetierungsvergleich

von konventionellen und terminal gekoppelten Immunoliposomen wurden sowohl an N-Glut-PE- und an Cyanur-PEG-PE-Liposomen anti-E-Selektin-IgG (BBA26) gekoppelt. Die Bindung der fluoreszenzmarkierten Liposomen an den HUVEC wurde hauptsächlich in Mikrotiterplatten durchgeführt und photometrisch ausgewertet. Ergänzende Untersuchungen wurden auch mit einem Durchflußzytometer gewonnen.

Im Targetierungsverhalten der konventionellen N-Glut-PE Immunoliposomen wurde der Einfluß einer sterischen Stabilisierung durch steigende Konzentrationen von mPEG-PE sehr deutlich. Die PEG-freien Liposomen zeigen ein stark ausgeprägtes Bindungsverhalten, das in Abb. 23 mit seinen Fluoreszenzwerten als 100 % gesetzt wurde. Eine Zunahme des mPEG-PE auf 1 mol% bewirkt bereits eine deutliche Abnahme der Bindungsfähigkeit. Dies wird nicht auf die reduzierte Anzahl gekoppelter Antikörper, sondern auf die Unterdrückung unspezifischer Adhäsionseffekte der Liposomen an den Zellen zurückzuführen sein. Das Ausmaß der unspezifischen Adsorption wird auch an dem PEG-freien Blindwert (0/5) ersichtlich. Eine weitere Erhöhung der mPEG-PE-Konzentration auf 3 mol% bzw. 5 mol% reduziert das Bindungsausmaß weiter. So zeigt die für eine in vivo-Anwendung relevante Präparation mit 5 mol% mPEG-PE ein Bindungsverhalten von relativen 50%. Im Vergleich zu den PEG-haltigen (5/5 unspesz.) oder PEG-freien (0/5 unspesz.) Blindliposomen mit einem nicht bindenden Antikörper ergibt dies eine ca. verdoppelte Akkumulation an den Endothelzellen. Da der Bindungsunterschied zwischen Liposomen mit spezifischem anti-E-Selektin-IgG und unspezifischen Antikörpern an unstimulierten HUVEC nicht detektierbar war (nicht gezeigt), beweisen diese Experimente erstmals die spezifische, E-Selektin-vermittelte Liposomenakkumulation an Endothelzellen.

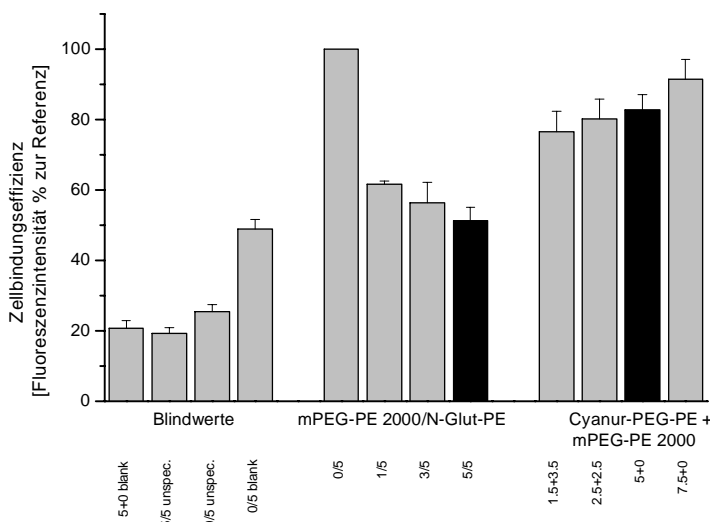


Abb. 23: Vergleich der in vitro-Targetbindung von N-Glut-PE- und Cyanur-PEG-PE-Immunoliposomen. Die Daten repräsentieren relative Fluoreszenzeinheiten, wobei die PEG-freien N-Glut-PE Liposomen (spezifische und unspezifische Adhäsion) als 100 % fungieren.

Analoge Bindungsexperimente wurden auch mit den terminal gekoppelten Cyanur-PEG-PE-Immunoliposomen durchgeführt. Dabei enthielten diese Liposomen unterschiedliche Konzentrationen des Ankers Cyanur-PEG-PE, wobei die Präparationen wiederum mit mPEG-PE zu 5 mol% PEG-Derivat ergänzt wurden. Man kann deshalb davon ausgehen, daß alle unspezifischen Adhäsionseffekte dieser Liposomen gleichmäßig und in einem hohen Maße unterdrückt werden. Es zeigt sich, daß die Cyanur-PEG-PE-Immunoliposomen in ihrem Bindungsausmaß die konventionellen N-Glut-PE Liposomen deutlich übertreffen. Obwohl

eine steigende Ankerkonzentration das Bindungsverhalten verbessert, übertrifft bereits der Ansatz mit nur 1,5 mol% Cyanur-PEG-PE die konventionellen Liposomen um ca. 50%. Dieses deutlich bessere Bindungsverhalten sollte durch die exponierte Lokalisation und damit Zugänglichkeit und auch auf die erhöhte Flexibilität der PEG-terminal gekoppelten Antikörper am Cyanur-PEG-PE zurückzuführen sein. Dies korreliert mit unseren AFM-Untersuchungen der Liposomenoberflächen (Abb. 18 und 19, 4.1.2.2.) und mit Literaturdaten über die besseren Targetierungseigenschaften terminal gekoppelter Immunoliposomen [232,234]. Vergleicht man das Bindungsverhalten dieser Liposomen mit den Cyanur-PEG-PE-Blindliposomen (5+0 blank) ergibt sich eine ca. drei- bis vierfach stärkere spezifische Liposomenakkumulation an den HUVEC.

Da auch die durchflußzytometrischen Untersuchungen die genannten Ergebnisse in ihren Größenrelationen bestätigten [316], läßt sich resümieren, daß mit dem erfolgreichen Targetieren des E-Selektins mit Immunoliposomen ein erfolgversprechender Weg für ein antiinflammatorisches Drug Targeting eröffnet wird.

Auf Grund der abstrakten Modelleigenschaften dieser Studie tragen die Größenordnungen der Liposomenakkumulation an den Endothelzellen nur einen orientierenden Charakter. Da sich die statischen Bindungsuntersuchungen stark von den physiologischen Bedingungen unterscheiden, sind auch die Angaben von Spragg et al. [267] über das hohe Ausmaß einer Liposomenakkumulation an Endothelzellen von keiner vergleichenden Aussagefähigkeit.

Bei einer in vivo-Applikation müssen die Immunoliposomen das E-Selektin an den kapillaren Endothelien unter den Scherflußbedingungen des Blutstromes erreichen und binden. Um unsere in vitro-Untersuchungen näher an die physiologischen Bedingungen anzupassen, sollten die Targetierungsexperimente an den Endothelzellen unter den simulierten Scherflußbedingungen des Blutstromes durchgeführt werden. Dafür verwendeten wir eine Durchflußapparatur, an deren Unterseite sich zwei hintereinandergeschaltete Durchflußkammern befanden. Diese lassen sich durch runde Mikroskopiegläser verschließen. Kultiviert man auf diesen Gläsern eine konfluente HUVEC-Schicht, kann man mit definiertem Strom fluoreszenzmarkierte Liposomen über die Zellmonolayer leiten und das Bindungsausmaß mikroskopisch detektieren. Durch die parallele Verwendung einer stimulierten und einer nicht stimulierten HUVEC-Monolayer innerhalb eines Versuches ergibt sich eine sehr gute Vergleichbarkeit und Aussagefähigkeit über die Spezifität der Bindungen am E-Selektin. Diese Untersuchungen wurden am konfokalen LSM durchgeführt. Die mit NBD-PE markierten Liposomen erscheinen im Bindungsprozeß als fluoreszenter Ring um die Zellen bzw. als flächiger Besatz auf den Zellen, wobei keine einzelnen Liposomen sichtbar sind.

In ersten Experimenten wurden die Liposomen durch hydrostatischen Druck bei einem Schergrad von ca. 200 s^{-1} einfach mit dem Medium über die Schichten gespült und das Ergebnis ausgewertet. Es zeigte sich bereits bei diesem kurzzeitigen Kontakt, daß die spezifischen Immunoliposomen stärker an den stimulierten Endothelzellen hafteten [316].

Unter physiologischen Bedingungen sollten die Liposomen bei einer ausreichenden Zirkulationszeit durch den Blutkreislauf wiederholt mit den Targetzellen in Kontakt kommen. Um dies zu simulieren, schlossen wir einen Pumpkreislauf mit den Liposomen im Zellmedium an die Durchflußkammern an und analysierten das Bindungsverhalten der Liposomen über längere Zeiträume bei dem angegebenen Schergrad. Da auch bei diesen Untersuchungen PEG-freie Blindliposomen relativ stark sowohl an stimulierten als auch an unstimulierten HUVEC unspezifisch adhärirten, wählten wir für die eigentlichen Bindungsstudien die spezifischen N-Glut-PE Immunoliposomen bzw. die Blindliposomen mit 5 mol% mPEG-PE und die Ansätze mit 5 mol% Cyanur-PEG-PE aus. Die Bindung der Liposomen an den Zellen wurde nach 0,5 h; 5 h und nach 18 h durchgeführt. Mikroskopische

Analysen der HUVEC-Monolayer bewiesen, daß auch über 18 h bei 37°C unter Strömungsbedingungen die Zellen intakt waren.

Im Bindungsverhalten der PEG-haltigen Blindliposomen zeigte sich über den gesamten Zeitraum eine nur sehr schwache Adhäsion an stimulierten wie auch unstimulierten HUVEC. Dahingegen zeigten die spezifischen N-Glut-PE Immunoliposomen mit zunehmender Strömungszeit eine kumulative Bindung an den stimulierten HUVEC. Da das Bindungsausmaß an den unstimulierten HUVEC dem der Blindliposomen entsprach, beweist es die Spezifität der Bindung der Immunoliposomen über das E-Selektin. Im Vergleich zu den N-Glut-PE Liposomen zeigten wiederum die terminal gekoppelten Cyanur-PEG-PE-Immunoliposomen ein deutlich höheres Bindungsausmaß, dargestellt in Abb. 24.

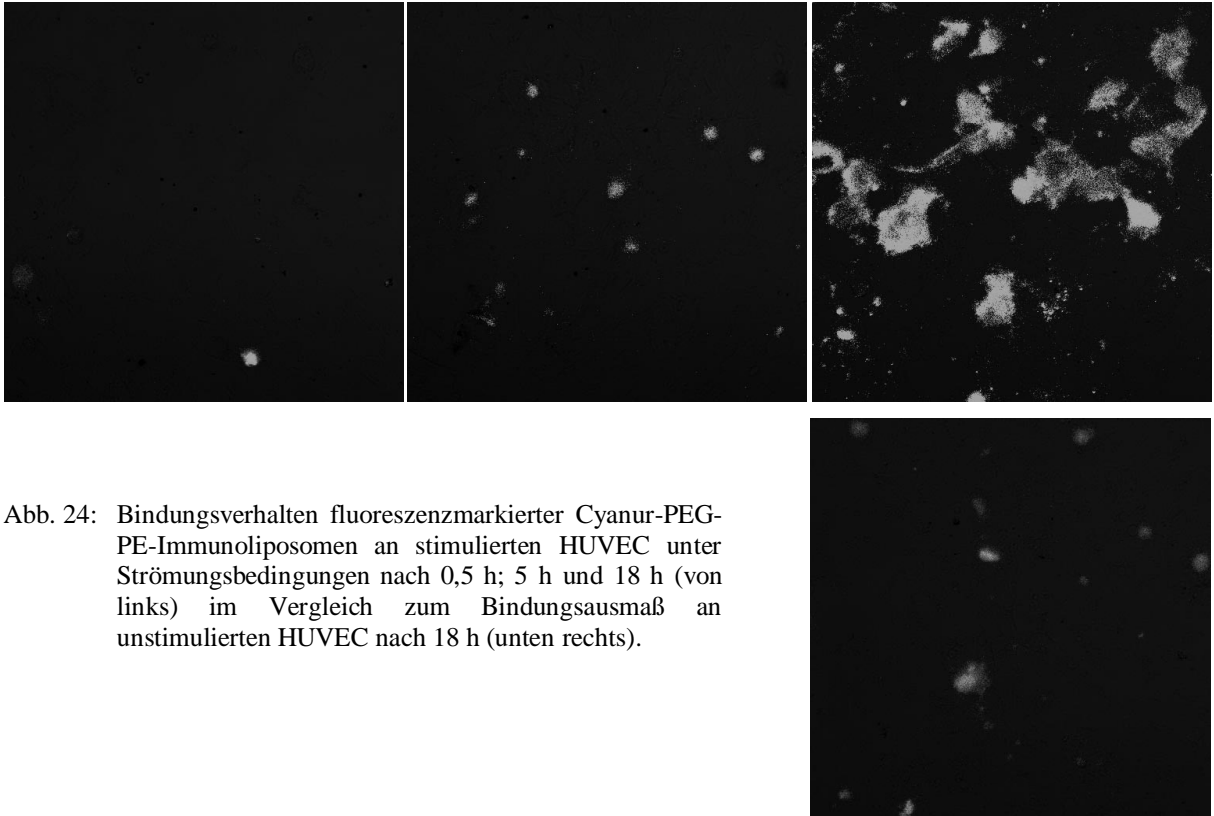


Abb. 24: Bindungsverhalten fluoreszenzmarkierter Cyanur-PEG-PE-Immunoliposomen an stimulierten HUVEC unter Strömungsbedingungen nach 0,5 h; 5 h und 18 h (von links) im Vergleich zum Bindungsausmaß an unstimulierten HUVEC nach 18 h (unten rechts).

Die leichter zugängliche Antikörperlokalisation mit einer erhöhten Flexibilität an diesen Liposomen erweist sich also insbesondere unter dynamischen Bedingungen als großer Vorteil gegenüber den konventionellen Immunoliposomen. Diese Ergebnisse beweisen, daß die Immunoliposomen unter den simulierten Scherflußbedingungen des Blutstromes innerhalb eines therapierelevanten Zeitraumes binden und diese Bindung auch bestehen bleibt.

Zusammenfassend kann man sagen, daß mit unterschiedlichen Modellsystemen das Prinzip des Liposomentargeting an E-Selektin als eine neue Perspektive für ein antiinflammatorisches Drug Delivery demonstriert werden konnte. Die Überlegenheit von PEG-terminal gekoppelten Immunoliposomen gegenüber konventionellen wurde eindeutig sichtbar. Da die Liposomen auch unter den simulierten Scherflußbedingungen des Blutstromes die Targetzellen binden und diese Bindung über längere Zeiträume bestehen bleibt, ergeben sich vielfältige therapeutische Möglichkeiten aus dem Verhalten der Liposomen nach Targetbindung, welches im folgenden analysiert werden soll.

4.3.4. Analyse des Liposomenverhalten nach erfolgter Targetierung

In dem vorangegangenen Kapitel konnte gezeigt werden, daß sich die E-Selektin-gerichteten Immunoliposomen spezifisch an den aktivierten Endothelzellen sowohl unter statischen als auch dynamischen Scherflußbedingungen anreichern. Ein erfolgreiches Targeting stellt jedoch noch kein therapeutisches Endziel dar, da dieses erst aus der spezifischen Wechselwirkung der Liposomen mit den Zielzellen resultiert. Dies wiederum ist von der Art der Zielzellen und von einer Vielzahl liposomaler Parameter abhängig. Für unsere Experimente gilt es zu klären, wie sich die Immunoliposomen nach erfolgter E-Selektin-Bindung an den HUVEC verhalten, um daraus Lösungsvorschläge für eine perspektivisch therapeutische Nutzung zu geben. Prinzipiell sind zwei verschiedene Wege vorstellbar. Sollten die Immunoliposomen nach Targetbindung nicht in die HUVEC aufgenommen werden, müßte eine gezielte Wirkstofffreisetzung unter dem Targetierungsprozeß erreicht werden. Für den Fall einer Liposomeninternalisierung sollten Weg und Ausmaß eines solchen Prozesses aufgeklärt werden. Beide Aspekte werden in den folgenden Kapiteln behandelt.

4.3.4.1. Modelluntersuchungen zur gezielten Wirkstofffreisetzung aus Liposomen bei Targetbindung

Eine Wirkstofffreisetzung aus den E-Selektin-gerichteten Immunoliposomen nach Targetierung am Endothel wäre in therapeutischer Hinsicht sehr sinnvoll, da bekanntermaßen das Endothel im Entzündungsgebiet eine deutlich erhöhte Permeabilität aufweist [317,318]. Somit könnten die freigesetzten Arzneistoffe, die auch in der Randzone des kapillaren Blutstromes nur geringeren Schergraden ausgesetzt sind, verstärkt in die entzündeten subendothelialen Gewebe eindringen. Dies sollte gegenüber einer systemischen Applikation der Arzneistoffe von deutlichem Vorteil sein.

Zur gezielten Wirkstofffreisetzung aus Immunoliposomen im Prozeß der Targetbindung wurden von Huang et al. die sog. targetsensitiven Immunoliposomen konzipiert (vgl. auch 2.5.3.) [255-257]. Die Wirkungsweise dieser Liposomen besteht in einer Balance zwischen einer ausreichenden Bilayerstabilität im Targetierungsprozeß und einer Destabilisierung und damit Zerfall der Liposomen nach erfolgter Targetbindung. Basis hierfür ist die Tendenz des liposomalen DOPE zur Inversmizellbildung, wenn es nicht durch Lipide mit voluminösen Kopfgruppen zu einer Bilayerbildung in den Liposomen stabilisiert wird. Als optimierte Präparation wurde eine Stabilisierung des DOPE mit 20 mol% DOPA und einem geringen Anteil von 0,1 mol% N-Glut-PE zur Antikörperkopplung vorgeschlagen. Diese Liposomen sollen nach Bindung an den Targetzellen durch gegenseitige Aggregation zerfallen. Voraussetzung dafür ist die eng benachbarte, multimere Bindung der Liposomen an den Targets, aber auch eine Mindestmenge Antikörper an diesen Liposomen erwies sich als essentiell. Dieser Mechanismus konnte bisher nicht auf sterisch stabilisierte Liposomen übertragen werden.

Um die Möglichkeit einer Wirkstofffreisetzung aus sterisch stabilisierten Selektin-gerichteten Immunoliposomen zu analysieren, führten wir eine Reihe von Modelluntersuchungen durch. Ziel war es dabei zu überprüfen, inwieweit sich eine sterische Stabilisierung der Liposomen mit dem targetsensitiven Prinzip kombinieren läßt. Dafür mußte eine ausbalancierte Mischung zur Stabilisierung einer DOPE-basierenden, mPEG-PE 2000 und N-Glut-PE enthaltenden Bilayer gefunden werden, die nach Antikörperkopplung unter Targetbindung zerfällt.

Wegen des modellhaften Charakters dieser Studie kamen anstelle der anti-E-Selektin Antikörper anti-Biotin Antikörper zum Einsatz, da hierbei die Targetzelle durch Biotin-PE-enthaltende Liposomen oder Partikel simuliert werden konnte [319].

mPEG-PE hat aufgrund seiner voluminösen hydrophilen Kopfgruppe auch eine stabilisierende Wirkung auf DOPE-Bilayer. Bei Liposomenbildungs- und Stabilitätsuntersuchungen konnte durch den schrittweisen Ersatz des DOPA durch mPEG-PE festgestellt werden, daß mPEG-PE allein in Konzentrationen größer 0,5 mol% die DOPE-Bilayer (1mol% N-Glut-PE) stabilisiert. Diese Liposomen lassen sich durch die Hydratisierungsmethode herstellen und anschließend mit dem Antikörper koppeln. Sie unterscheiden sich dahingehend von der komplizierten Inkubationstechnik zum nachträglichen Einbau der gekoppelten Antikörper nach Pinnaduwege [257].

Für die Freisetzungsuntersuchungen wurden die ca. 170 nm großen anti-Biotin-Immunoliposomen mit 50 mM Calceinlösung gefüllt und in Wechselwirkung mit Biotin-PE-(10 mol%) enthaltenden Liposomen gebracht. Die Mengen wurden so gewählt, daß es einem molaren Verhältnis von Antikörper zu Biotin von ca 1:100 entsprach. Die Fluoreszenzfreisetzung infolge dieser Bindungsprozesse wurde dann gemessen. Als Blindwert fungierte die Wechselwirkung mit Biotin-PE-freien Liposomen. Da von Pinnaduwege das multimere Binden für die Aggregation benachbarter Immunliposomen als essentiell erkannt wurde, was u.U. an den kleinen Biotin-PE-enthaltenden Liposomen nicht realisiert werden kann, wählten wir zusätzlich Partikel von 850 nm oder 7 µm Größe als Targetzellen, die durch Vesikelfusion eine analoge Biotin-PE-haltige Bilayer erhielten.

Zur Simulation physiologischer Bedingungen wurden die Freisetzungsuntersuchungen zuerst bei 37°C durchgeführt. Betrachtet man das Verhalten der Immunliposomen mit 1 mol% mPEG-PE, eine Stunde nach Targetbindung in Abb. 25, so wird deutlich, daß die Liposomen bei unspezifischer Wechselwirkung mit den Blindwert-Liposomen kein Calcein freisetzen, hingegen bei der Bindung an den spezifischen Targetzellen eine deutliche Freisetzung erfolgt.

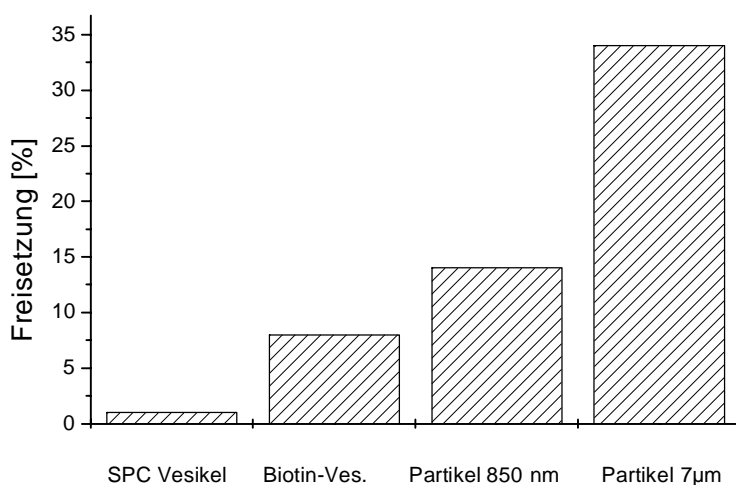


Abb. 25: Fluoreszenzfreisetzung aus Immunliposomen (DOPE mit 1 mol% mPEG-PE) bei 37°C über eine Stunde nach Bindung unterschiedlicher Targets (Mittelwerte von Dreifachmessungen)

Da sich die Wechselwirkung mit den 7µm großen Biotin-haltigen Partikel im Freisetzungsausmaß eindeutig von den kleineren Partikeln und den Vesikeln abhebt, ist offensichtlich die eng benachbarte Bindung der Immunliposomen und deren Aggregation an relativ ebenen Targetoberflächen der entscheidende Zerfallsmechanismus der targetsensitiven Immunliposomen.

Modifiziert man die mPEG-PE-Menge in den targetsensitiven Liposomen, kommt man zu folgenden Ergebnissen. Der Einbau von 3 mol% mPEG-PE führt zu einer wesentlich stärkeren Bilayerstabilisierung, die demzufolge auch im Targetbindungsprozeß wesentlich

weniger destabilisiert wird. Aus Abb. 26 wird sichtbar, daß zwar wiederum die großen Partikel am effektivsten sind, das Gesamtausmaß der Freisetzung jedoch nicht befriedigt.

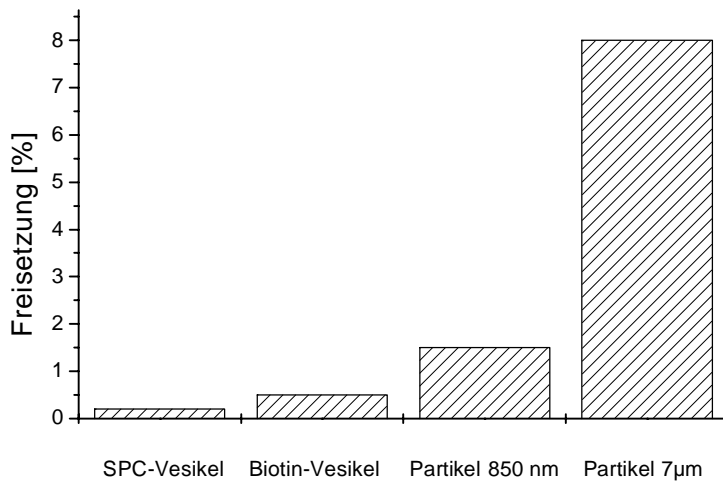


Abb. 26: Freigesetztes Calcein aus Immunliposomen (DOPE mit 3 mol% mPEG-PE) eine Stunde nach Targetbindung bei 37°C (Mittelwerte von Dreifachmessungen)

Eine Verringerung des PEG auf 0,5 mol% kann kaum noch eine ausreichende Balance zur Bilayerstabilisierung aufrechterhalten, da selbst bei unspezifischen Wechselwirkungen mit Blindwert-Liposomen schon beträchtliche Mengen an Calcein freigesetzt werden. Das Freisetzungsausmaß an den 7 µm Partikeln unterscheidet sich hingegen nicht von den Präparationen mit 1 mol% PEG.

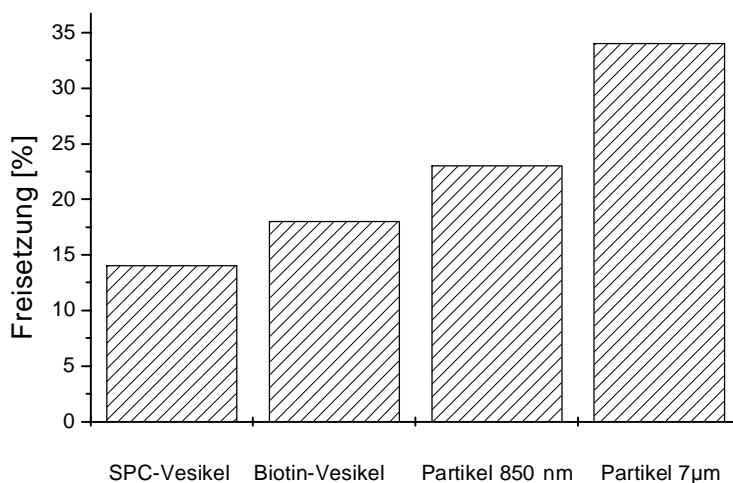


Abb. 27: Fluoreszenzfreisetzung aus Immunliposomen (DOPE mit 0,5 mol% PEG-PE) bei 37°C über eine Stunde nach Bindung unterschiedlicher Targets (Mittelwerte von Dreifachmessungen)

Zusammenfassend kann man sagen, daß das targetsensitive Prinzip auch auf sterisch stabilisierte Immunliposomen übertragen werden konnte. Eine DOPE-Liposomenpräparation mit 1 mol% mPEG-PE 2000 stellt die beste Bilayerbalance dar. Diese Immunliposomen setzten spezifisch unter Targetbindung ein Drittel ihres Inhaltes innerhalb einer Stunde bei 37°C frei, was übertragen auf den Targeting-Prozeß der Endothelzellen sehr akzeptable Werte sind.

Pinnaduwege und Huang erreichten die Freisetzung aus ihren DOPE/DOPA Liposomen nur bei hohen Temperaturen. Obwohl aus therapeutischer Sicht die gewählten Temperaturen von 60°C nicht sinnvoll erscheinen, führten wir für eine bessere Vergleichbarkeit zu dieser Studie und wegen des Modellcharakters unserer Arbeiten die Freisetzungsanalysen zusätzlich bei höheren Temperaturen durch.

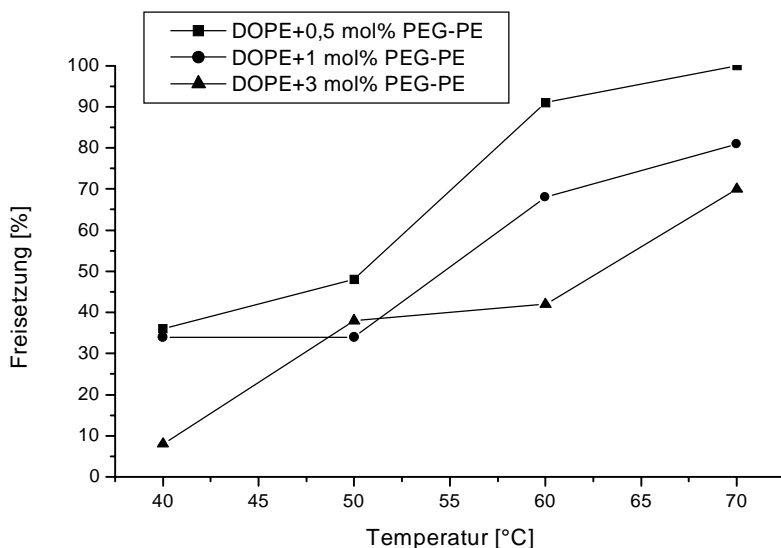


Abb. 28: Vergleich der Fluoreszenzfreisetzung aus Immunoliposomen mit unterschiedlichem Gehalt an mPEG-PE nach Bindung an 7 µm Biotin-Partikeln unter zehnmütiger Inkubation bei erhöhten Temperaturen (Mittelwerte zweier Messungen)

Die Abbildung verdeutlicht, daß eine Temperaturerhöhung das Freisetzungsausmaß wesentlich erhöht. Alle drei Präparationen setzen bei Bindung an den 7µm Partikeln zwischen 50°C und 70°C den überwiegenden Anteil ihres Calceins frei, die Unterschiede korrelieren mit den obigen Ergebnissen. Diese Ergebnisse befinden sich im Vergleich zu den Angaben von Huang et al. (ca. 80% Freisetzung bei 60°C) in der gleichen Größenordnung. Die positiven Ergebnisse dieser modellhaften Studie zur Wirkstofffreisetzung aus sterisch stabilisierten Liposomen soll in zukünftigen Experimenten direkt im Targetbindungsprozeß untersucht und verfolgt werden.

4.3.4.2. Untersuchung der Internalisierung von Immunoliposomen durch HUVEC

Eine Internalisierung von Liposomen durch Zellen ist kein verallgemeinerbares Phänomen, da es stark von der Art der Zellen und auch von strukturellen Parametern der Liposomen abhängt. Prinzipiell können Liposomen auf unterschiedliche Weise mit Zellen in Wechselwirkung treten. Neben unspezifischen Membraneffekten wie Fusion oder Lipidaustausch von Liposom und Zielzelle, die oftmals die Freisetzung liposomaler Inhaltstoffe in die Zelle bewirken, ist die rezeptorvermittelte, endozytische Liposomenaufnahme in die Zellen der häufigere und oft auch gewünschte Weg der Wechselwirkung.

Auf unsere Experimente übertragen muß festgestellt werden, daß nahezu keine Kenntnisse über das endozytische Verhalten von HUVEC in Wechselwirkung mit Liposomen aus der Literatur bekannt sind. Da das E-Selektin nach erfolgter Expressierung im Verlauf weniger Stunden hauptsächlich endozytisch von der Zelloberfläche entfernt wird, könnte ein solcher Mechanismus auch für die am E-Selektin gebundenen Liposomen

postuliert werden. Daher soll in den folgenden Internalisierungsstudien Endozytoseprozessen besondere Beachtung geschenkt werden.

Eine etablierte Methode zur Untersuchung einer endozytotischen Liposomenaufnahme basiert auf dem Fluoreszenzfarbstoff Hydroxypyranintrisulfonsäure (HPTS). Ein solches HPTS-Assay wurde verschiedentlich zum Nachweis des endozytotischen bzw. phagozytotischen Verhaltens von Makrophagen und anderen Zellen angewendet [320].

Grundlage dieses Assays ist die pH-abhängige Veränderung der spektralen Eigenschaften des HPTS. Durch Einschluß einer wässrigen HPTS-Lösung in Liposomen sollten dann im Zuge einer endozytotischen Aufnahme und damit Kontakt mit dem sauren pH der Endosomen die spektralen Veränderungen das Ausmaß einer Endozytose repräsentieren.

Zur Etablierung dieses Assays wurden diese Eigenschaften im Rahmen einer Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe [275] ausführlich charakterisiert. HPTS zeigt bei Fluoreszenzanregung mit 465 nm eine Emission bei 512 nm, die sich in Abhängigkeit vom pH-Wertes im Ausmaß unterscheidet. Diese Unterschiede sind jedoch für eine Quantifizierung der Endozytose zu gering. Dahingegen können die Fluoreszenzanregungsspektren besser ausgewertet werden. Dafür wird HPTS mit unterschiedlichen Wellenlängen angeregt, und die Emission bei 512 nm aufgezeichnet. Im Bereich von 400–480 nm ergeben sich dabei deutliche Unterschiede in Abhängigkeit des pH-Wertes. In diesem Bereich hat HPTS zwei Anregungsmaxima.

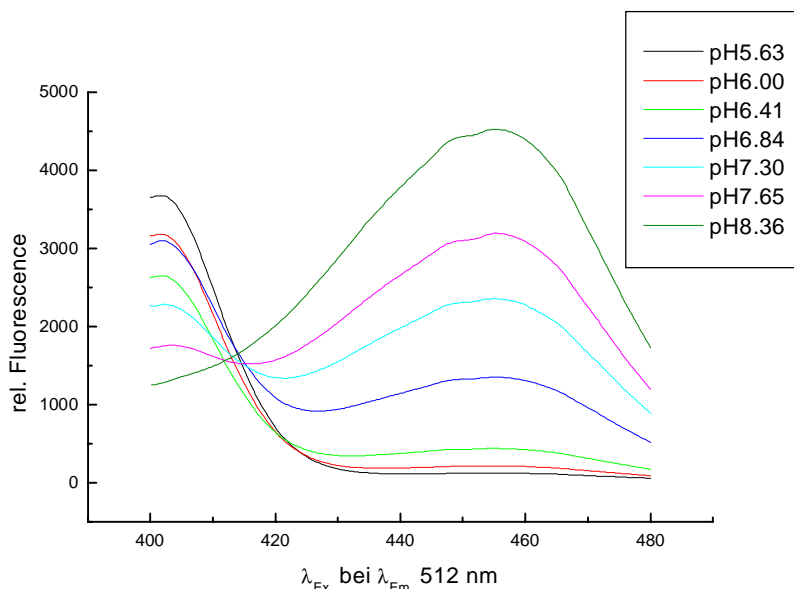


Abb. 29: Fluoreszenzanregungsspektrum von HPTS (Emission 512 nm) in Abhängigkeit von pH-Wert

Während im sauren Milieu das Anregungsmaximum bei 405 nm liegt, ist es im Neutralen/Basischen zu 460 nm verschoben. Besonders günstig für die Auswertung ist, daß im Sauren bei 460 nm nahezu keine Anregung mehr stattfindet, so daß diese Wellenlänge für die Quantifizierung besonders sensitiv erscheint. Der Schnittpunkt aller Spektren bei 415 nm (isosbestischer Punkt) zeigt keine pH-Abhängigkeit und kann somit als Maß der Konzentration des HPTS herangezogen werden. Um also die Änderungen der spektralen Eigenschaften im Verlauf einer Endozytose unabhängig von der Konzentration darzustellen, vergleicht man jeweils die Quotienten der Anregungswerte bei 405 bzw. 460 nm mit der Intensität bei 415 nm. Es ist also zu erwarten, daß ein Endozytoseprozeß durch ein Ansteigen des Quotienten aus 405/415 nm und ein Absinken des Quotienten aus 460/415 nm

detektiert ist. Durch diese konzentrationsunabhängige Betrachtung können auch verschiedene experimentelle Ansätze miteinander verglichen werden.

Aus weiteren Voruntersuchungen ging hervor, daß sich HPTS in Liposomen (Pyranosomen) tendenziell wie der freie Farbstoff verhält [275].

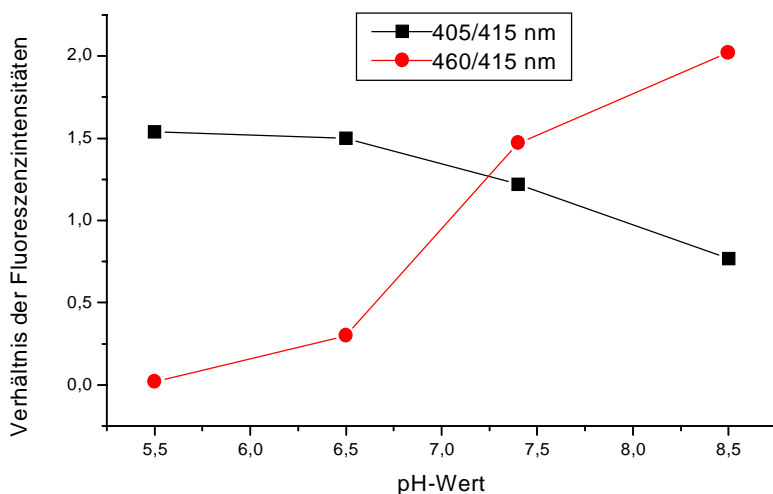


Abb. 30: Konzentrationsunabhängige Veränderung der Fluoreszenzanregung bei 405 nm bzw. 460 nm mit dem pH-Wert

Um die Endozytoseaktivität der HUVEC besser beurteilen zu können und um die Sensitivität des HPTS-Assays zu testen, wurden zuerst Endozytoseuntersuchungen an Zellen sehr starker und an Zellen ohne Endozytoseaktivität vorgenommen. Da die Endozytose ein aktiver Zellprozeß ist, wurden alle Untersuchungen bei 37°C durchgeführt.

Makrophagen sind spezialisierte Zellen der Körperabwehr, die durch ihre hohe Endozytoseaktivität gekennzeichnet sind. Sie fungierten in dem Testsystem als 100%-Werte. Es kam die makrophagenähnliche Zelllinie J 774 zum Einsatz, die bekanntermaßen eine hohe Aufnahme von negativ geladenen Liposomen aufweist. Die Endozytose von Phosphatidylglycerol-haltigen Liposomen wurde über einen Zeitraum von 120 Minuten verfolgt. Die Auswertung der spektralen Eigenschaften des HPTS erbrachte einen deutlichen Anstieg des Quotienten aus den Anregungswerten bei 405/415 nm und einen deutlichen Abfall des Quotienten von 460/415 nm in Abb. 31 a und b. Die damit nachgewiesene Acidifizierung des HPTS im Prozeß der Endozytose demonstriert einerseits die Funktionsfähigkeit des Assays und liefert andererseits Hinweise für die maximal zu erwartenden Meßwerte.

Als Negativkontrolle, d.h. Zellen ohne Endozytoseaktivität, kamen Keratinozyten zum Einsatz. Die Analyse des endozytotischen Verhaltens über 300 Minuten erbrachte keinerlei Hinweis auf eine Zellaufnahme. Die Quotienten beider Meßwerte verlaufen nahezu parallel zur x-Achse. Der leichte Abfall beider Werte nach 200 Minuten kann nicht eindeutig interpretiert werden.

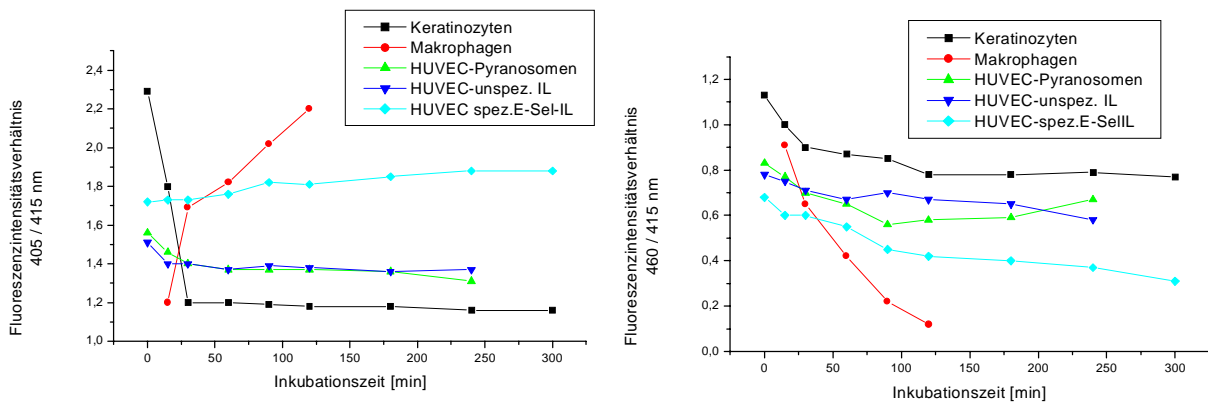


Abb. 31a und b: Vergleich der endozytotischen Aufnahmekapazität der HUVEC für unterschiedliche Liposomen gemessen an dem Verhalten von Keratinozyten und Makrophagen anhand des Fluoreszenzintensitätsverhältnisses von 405/415 nm (a) und 460/415 nm (b) rechts.

Mit diesen Erkenntnissen über die Funktionsfähigkeit des Assays wurden die Untersuchungen auf die HUVEC übertragen. Zur besseren funktionellen Unterscheidung einer unspezifischen endozytotischen Aufnahme von E-Selektin-abhängigen Endozytoseprozessen wurden zuerst normale Pyranosomen, danach Immunoliposomen mit einem gekoppelten irrelevanten IgG und zuletzt E-Selektin-gerichtete Immunoliposomen untersucht.

Die mit IL-1 β stimulierten HUVEC zeigen für die normalen Pyranosomen keine erkennbare endozytotische Aufnahme. Der Kurvenabfall der 460/415 nm Verhältnisse spricht zwar für eine leichte Abnahme der neutralen HPTS-Konzentration, da aber auch das 405/415 nm Verhältnis in Abb. 31 a abfällt, kann der Grund dafür nicht in einer Ansäuerung des Milieus liegen.

Die Untersuchung der irrelevanten Immunoliposomen hatte folgenden Hintergrund. Da HUVEC nach Literaturangaben über Fc-Rezeptoren verfügen sollen [321], könnte eine Internalisierung von Immunoliposomen ungeachtet ihrer Selektinausrichtung über diesen Rezeptor stattfinden. Aber auch bei diesen Versuchen zeigten sich keine Anzeichen einer endozytotischen Aufnahme, wie der parallele Kurvenverlauf beider Quotienten zur x-Achse in Abb. 31 bestätigt.

Im Hauptansatz kamen die E-Selektin-gerichteten Immunoliposomen zum Einsatz. Die Analyse der spektralen Eigenschaften des HPTS über 300 Minuten zeigte eine deutliche, wenn auch im Ausmaß relativ geringe Endozytose. Dies ist am Kurvenverlauf ersichtlich, bei dem ein Abfall des 460/415 nm Quotienten (Abb. 31 b) im Gegensatz zu den vorangegangenen Untersuchungen durch eine Zunahme des 405/415 nm Quotienten in Abb. 31 a als Acidifizierung des HPTS bestätigt wird.

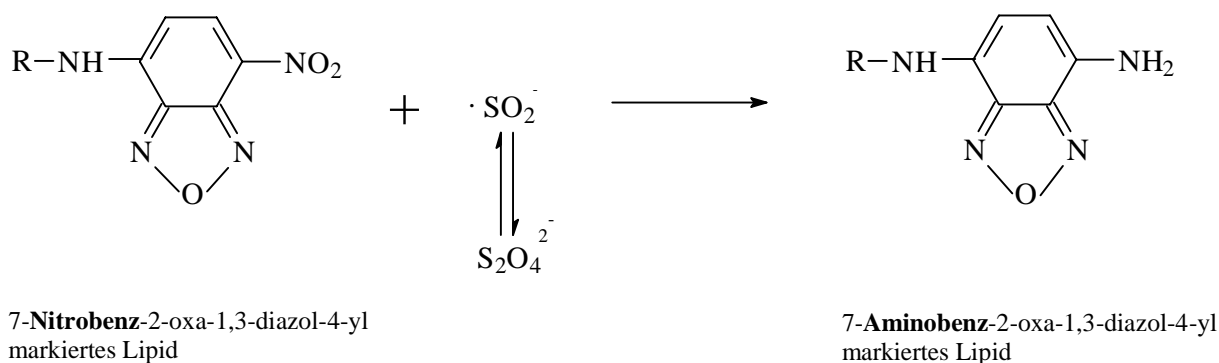
Der Befund, daß nur die Selektin-gerichteten Immunoliposomen durch die HUVEC endozytotisch aufgenommen werden, findet Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Spragg [267]. Die Ursache hierfür und das geringe Ausmaß der Aufnahme bedürfen jedoch weiterer Interpretationen. Es kann nicht klar definiert werden, ob das E-Selektin wirklich aktiv die Endozytose der spezifischen Immunoliposomen vermittelt. Möglicherweise liegt die Ursache der Internalisierung auch in der vorherigen festen Bindung und damit Konzentrierung der Liposomen an den Endothelzellen, was bei den anderen Liposomenarten nicht möglich war. Einen solchen Verlauf beschreiben auch Kirpotin et al. beim Krebszell-Targeting durch Immunoliposomen. Die vorher targetierten und damit fest gebundenen Liposomen wurden in ihren Versuchen 25-80fach stärker endozytiert als normale Liposomen, obwohl kein Endozytoserezeptor targetiert wurde [322].

Bezüglich des geringen Endozytoseausmaßes der spezifischen Immunliposomen kann nicht eindeutig geklärt werden, ob dies an der fehlenden Sensitivität des Assays liegt oder wirklich durch die physiologischen Eigenschaften der HUVEC bedingt ist. Gegen den zweiten Fakt spricht, daß Untersuchungen an anderen Endothelzellen deutliche Aufnahmeraten für targetierte und auch normale Liposomen aufweisen. So konnten Mastrobattista et al. zeigen, daß 60% der gebundenen Immunliposomen am ICAM-1 von bronchialen Epithelzellen aufgenommen werden [323]. Kamps et al. beschrieben eine starke Aufnahmekapazität von Leberendothelzellen für stark negativ geladene Liposomen über einen Scavenger-Rezeptor-vermittelten Prozeß [324]. Andere Studien beweisen aber auch, daß Liposomen auf einem nichtendozytotischen Weg in Leberendothelzellen gelangen können [325].

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß mit dem für endozytotische Prozesse spezifischen HPTS-Assay eine Aufnahme der Selektin-gerichteten Immunliposomen in die HUVEC bestimmt werden konnte. Das Ausmaß der Aufnahme ist sehr gering und kann allein mit dieser Methode nur relativ quantifiziert werden. Inwieweit dies an der fehlenden Sensitivität des Assays oder an den Eigenschaften der HUVEC liegt oder ob alternative Aufnahmemechanismen existieren, müssen weitere Untersuchungen zum Aufnahmeverhalten der HUVEC zeigen.

Als wichtige ergänzende Aussage zu den HPTS-Studien erscheint die Untersuchung der allgemeinen Aufnahmekapazität der HUVEC ohne das Vorliegen eines spezifischen Targetings. Vom therapeutischen Standpunkt aus steht bei einer gewünschten Internalisierung der summarische Effekt und nicht ein spezifischer Weg der Zellaufnahme im Mittelpunkt. Für solche summarischen Betrachtungen der Liposomeninsertion bieten sich mikroskopische Untersuchungen an.

Ein Problem mikroskopischer Untersuchungen, auch der in dieser Arbeit genutzten konfokalen Fluoreszenzmikroskopie ist es, bei Liposomen-Zell-Wechselwirkungen die exakte Lokalisation der fluoreszenzmarkierten Liposomen zu bestimmen. Auch mit dem konfokalen Prinzip kann nicht exakt unterschieden werden, ob Liposomen nur an der Zelloberfläche adhären oder ins Zellinnere aufgenommen wurden. Eine Lösung bietet die sogenannte Dithionit-Methode. Bei dieser Methode werden die Fluorophore der adsorbierten Liposomen an der Zelloberfläche gelöscht, nur die internalisierten Liposomen erscheinen fluoreszent. Damit kann eine Unterscheidung zwischen Bindung und Insertion der Liposomen vorgenommen werden. Chemische Grundlage dieser Methode ist die reduzierende Wirkung von Dithionit-Ionen ($S_2O_4^{2-}$) auf die Nitrogruppe des Liposomenmarkers NBD-(PE), der dadurch in die nichtfluoreszente Aminof orm übergeht. Eine Ringöffnung findet dabei nicht statt [326].



Dithionit liegt in wässriger Lösung im Gleichgewicht mit dem SO_2^- -Radikal vor, die beide durch ihre Ladungen für Membranen impermeabel sind [326]. Daher ist es eine

Voraussetzung für diese Methode, daß die Liposomen die NBD-PE-Marker nur in die äußere Monolayer eingebaut bekommen, da nur diese Moleküle dann an der Zelloberfläche in Kontakt mit der Dithionit-Lösung gelangen. Da das Dithionit aber auch nicht die Zellmembran passieren kann, fluoreszieren nach einer Dithionitzugabe nur die inserierten Liposomen in den Zellen. Aus Literaturdaten ist bekannt [326], daß Dithionit bis zu einer Konzentration von 100 mM keine Zytotoxizität aufweist.

Zum asymmetrischen Einbau (nur äußere Monolayer) des NBD-PE in Liposomen kam die sog. Ethanolinjektion zu Anwendung. Dabei wird die gewünschte Endkonzentration an NBD-PE in einem kleinen Volumen Ethanol gelöst den bereits fertig gebildeten Liposomen unter Rühren langsam zugefügt. Das Volumen an Ethanol sollte einen Volumenanteil an der Gesamtmenge von 1% nicht überschreiten. Dieser Prozeß geht ohne Veränderung der Liposomengröße vonstatten. Zur Überprüfung der asymmetrischen Liposomen und der Dithionit-Technik wurden in der Arbeitsgruppe umfangreiche Voruntersuchung durchgeführt [316]. Diese belegen, daß asymmetrische Liposomen mit 3% NBD-PE durch die Zugabe eines 100.000-200.000-fachen molaren Überschusses an Dithionit innerhalb von 30 Sekunden auf ca. 10-20% der Ausgangsfluoreszenz gelöscht werden. Damit sind alle äußeren NBD-Moleküle gelöscht. Nach diesem Zeitpunkt findet noch eine weitere, sehr langsame Fluoreszenzabnahme statt, die den Transbilayer-Austausch einzelner NBD-Moleküle von der inneren zur äußeren Monolayer kennzeichnet. Um diesen Flip-Flop-Mechanismus der Lipidmarker möglichst gering zu halten, wurden die asymmetrischen Liposomen für die folgenden Untersuchungen frisch hergestellt bzw. bei 4°C gelagert.

Für die mikroskopischen Untersuchungen wurden HUVEC auf Glasplättchen kultiviert und nach Aktivierung mit asymmetrischen Liposomen (3mol% NBD-PE) über 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die nichtassoziierten Liposomen abgespült und die Zellen mit einer 20 mM Dithionitlösung für 3 Minuten bei 4°C behandelt.

Die erfolgreiche Löschung der Fluoreszenz auf der Außenseite der Zellen ist in Abb. 32 dargestellt, aus der auch die Möglichkeit einer sehr differenzierten Lokalisierung der Vesikel resultiert.

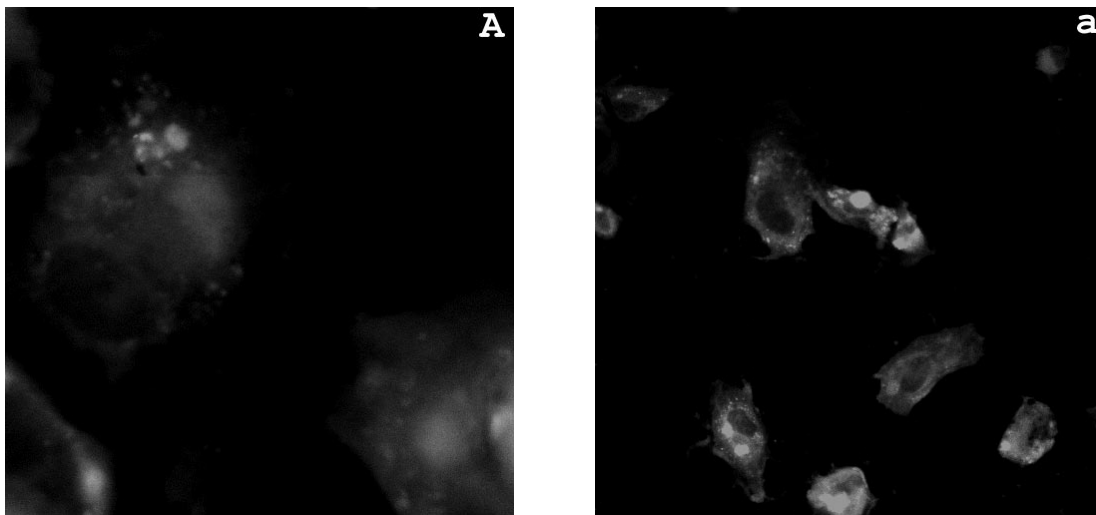


Abb. 32: Anwendung der Dithionit-Technik zur Verdeutlichung einer endozytotischen Aufnahme von Liposomen durch HUVEC. Die Fluoreszenzlöschung der im linken Bild (A) dargestellten gesamten Liposomen durch Dithionit zeigt den Anteil der endozytierten Liposomen in rechten Bild (a).

Während vor Dithionitzugabe die Zelloberflächen gleichmäßig hell durch adsorbierte und möglicherweise fusionierte Vesikel erscheinen (linkes Bild), können nach Dithionitzugabe die inneren Kompartimente sichtbar gemacht werden (rechtes Bild). Die

punktförmigen Fluoreszenzbereiche kennzeichnen liposomengefüllte Vakuolen der Endosomen. Als zusätzlichen Beweis dieser These unterzogen wir analoge Proben einer konfokalen mikroskopischen Detektion. Dabei wurden die Zellen in z-Richtung durchfokussiert und Aufnahmen im Abstand von jeweils $0,65\ \mu\text{m}$ gewonnen (Abb. 33). Beginnend von der Unterseite der Zellen ohne Fluoreszenz auf der Zellmembran nähert man sich im Mittelpunkt der Zelle von $3-6\ \mu\text{m}$ der stärksten Fluoreszenz, die dann wieder zur Oberseite hin abnimmt. Auch hier sieht man eindrucksvoll die punktförmigen Fluoreszenzareale der Endosomen. Gleichzeitig belegt der dunkel abgehobene Zellkern die intrazelluläre Lokalisation des Aufnahmebereiches.

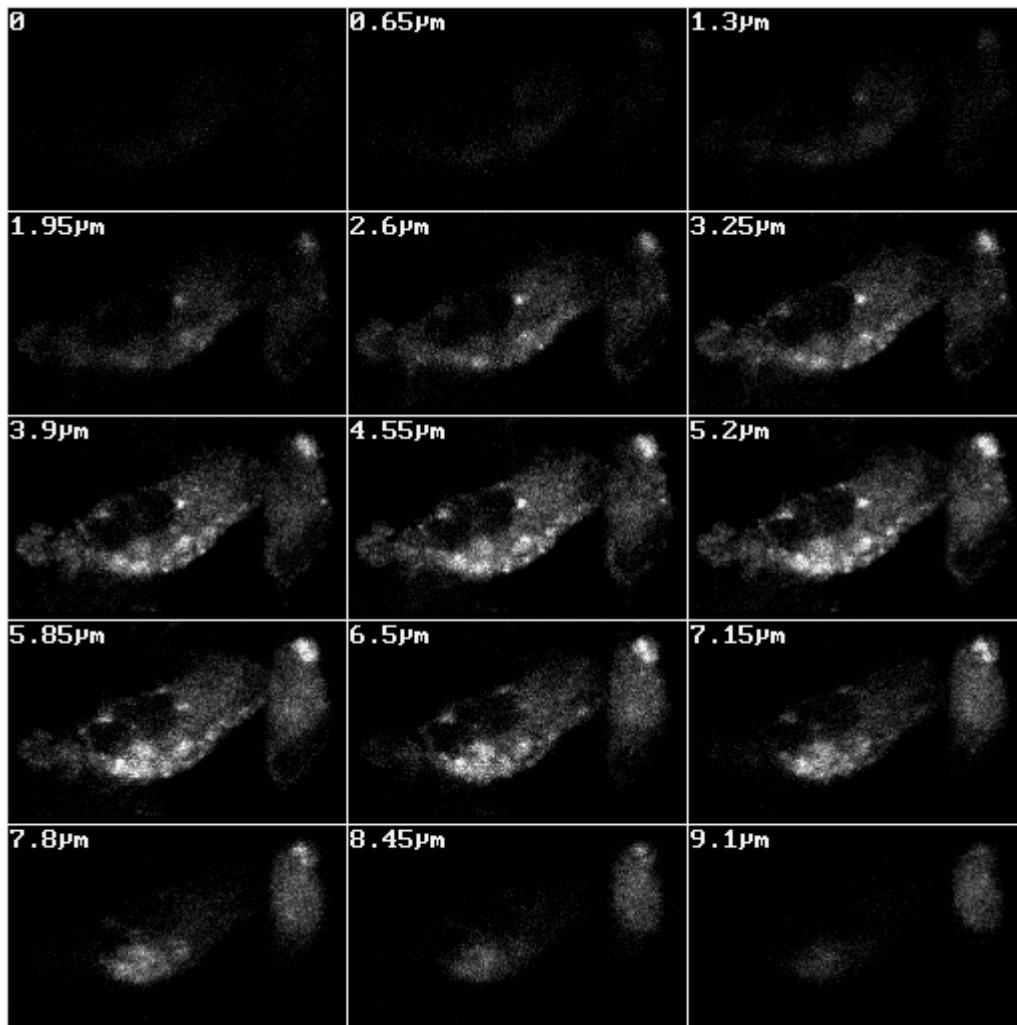


Abb. 33: Fokussierung durch eine mit Dithionit behandelte Endothelzelle zur Verdeutlichung der endozytierten Liposomen.

Damit beweisen diese Untersuchungen, daß auch normale Liposomen von HUVEC endozytotisch aufgenommen werden, und somit HUVEC eine höhere endozytotische Aktivität besitzen, als aus dem HPTS-Assay abzuleiten war. Orientierende Vergleichsuntersuchungen mit spezifischen Selektin-gerichteten Immunliposomen zeigten eine nur leicht erhöhte Endozytoserate um ca. 10-30% gegenüber den unfunktionalisierten Liposomen.

Zur weiteren mikroskopischen Untersuchung der Internalisierungsmechanismen der HUVEC kam eine andere Fluoreszenztechnik zum Einsatz. Durch die gleichzeitige Nutzung eines hydrophilen Markers im Liposomeninneren und eines lipophilen Markers mit anderen

spektralen Eigenschaften in der Liposomenmembran kann das Schicksal der Liposomen nach Zellkontakt gut verfolgt werden. Dies wurde von Mastrobattista et al. bei Internalisierungsstudien demonstriert [323].

Zu diesem Zweck inkorporierten wir hydrophiles FITC-Dextran in Rhodamin-PE gelabelte Liposomen. Wie bei den Dithionit-Experimenten wurden auch diese unspezifischen Liposomen für 90 Minuten bei 37 °C mit an Glas haftenden HUVEC inkubiert. Nach diesem Zeitraum wurden die adsorbierten Vesikel durch Spülen entfernt. Da dies nicht vollständig gelingt, kam die sog. Acid-Wash Technik zum Einsatz. Dabei werden die Zellen für 10 Minuten mit einem Zitratpuffer (pH 3) bei 4°C versetzt und nach Spülen sofort mikroskopisch untersucht. Die saure Behandlung der Zelloberfläche führt zu einer hydrolytischen Abspaltung von Oberflächenstrukturen, so auch der gebundenen Vesikel. Die gemessene Fluoreszenz, die also nur von inkorporierten Liposomen stammen kann, läßt sich räumlich zuordnen. Eine Kolokalisation beider Marker spricht für intakte Vesikel, die auf endozytotischem Wege in die Zellen gelangen. Eine Rhodaminanreicherung an der Zellmembran weist auf Fusionsprozesse hin, die gleichzeitig mit einer Freisetzung des FITC-Dextrans ins Zytosol einhergehen müßten.

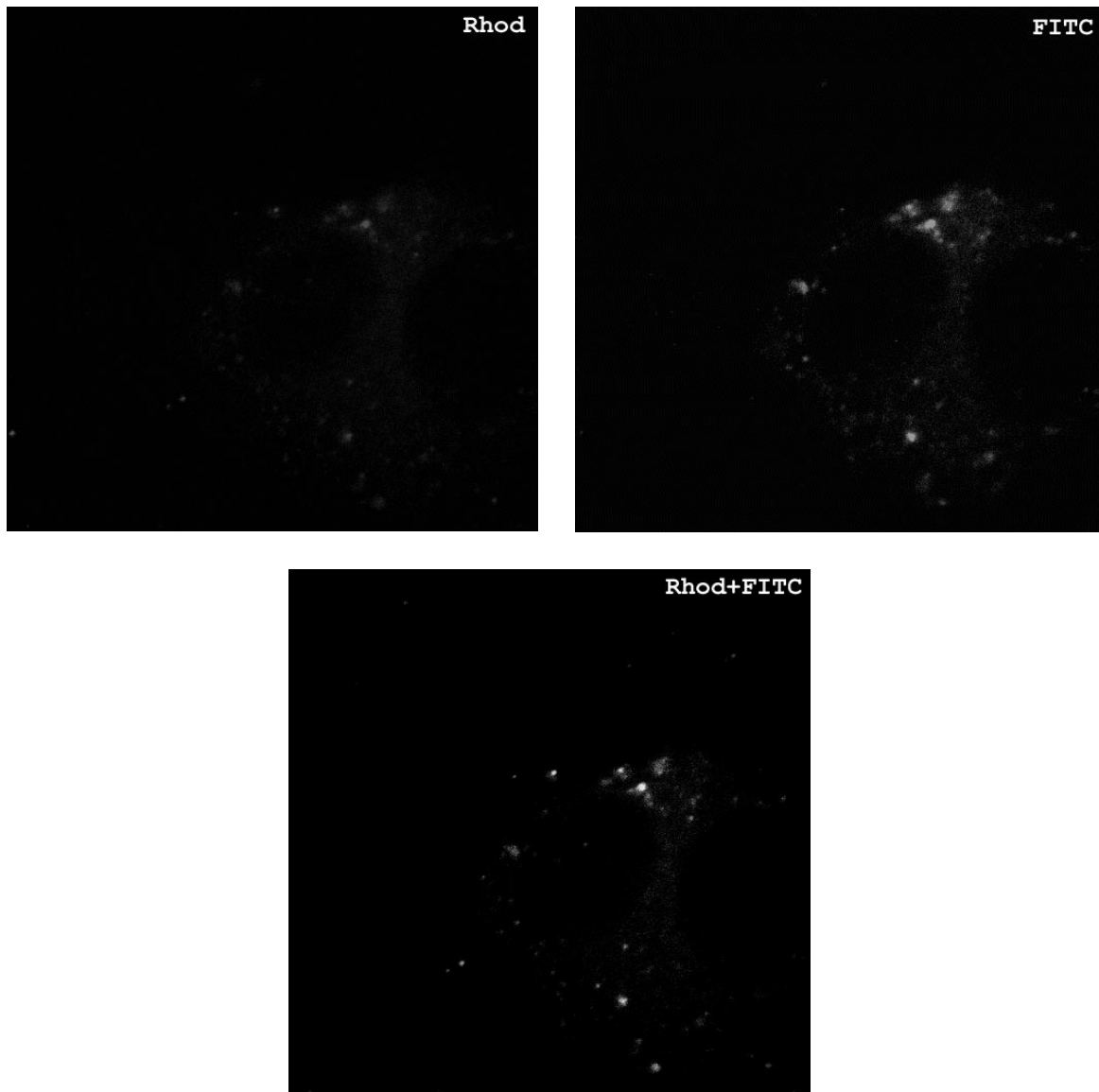


Abb. 34: Verhalten doppelt-markierter Liposomen an HUVEC zur Differenzierung von Endozytose- und Fusionsprozessen.

Die Ergebnisse in Abb. 34 zeigen eine dominierende Kolokalisation beider Marker in der abgebildeten Zelle, die sowohl als Einzelbilder und auch als Überlagerung mit der resultierenden Mischfarbe Orange deutlich wird. Dieser Befund, wie auch das erneute Auftreten der punktförmigen Areale spricht wiederum für eine endozytische Vesikelaufnahme durch die HUVEC. Aus der flächigen Rhodaminfluoreszenz, die nicht überall mit FITC überlagert ist, läßt sich auch ein Anteil von Vesikelfusion mit den Zellmembranen ableiten. Aus diesem Grund sollte mit einer dritten Methode die Fusionsdetektion im Mittelpunkt stehen.

Zur Fusionsuntersuchung bedient man sich hydrophiler Fluoreszenz-Einschlußmarker wie z.B. Calcein. Werden diese in hoher, selbstlöschender Konzentration in die Vesikel eingebaut, findet bei einer Fusion mit der Zellmembran eine Freisetzung und Verdünnung des Markers mit dem Zytosol statt, was sich als flächige Fluoreszenz widerspiegelt. Anhaftende intakte Vesikel sollten durch den Selbstlöschereffekt nicht detektierbar sein. Endozytierte Vesikel sollten ihren Marker nicht über das gesamte Zytosol verdünnen, sondern müßten durch Lysis und Verdünnung in den Endosomen als fluoreszierende punktförmige Areale

erscheinen. Da Fusion ein zellpassiver Prozeß ist, kann durch die Wahl der Temperatur (4°C nur Fusion; 37°C Fusion und Endozytose) eine weitere Differenzierung der Aufnahmeprozesse vorgenommen werden.

Vor diesem Hintergrund wurden in unseren Experimenten calceinenthaltende Liposomen für 90 Minuten bei 4°C bzw. 37°C mit adhärennten HUVEC inkubiert. Nach einem gründlichen Spülen adsorbierter Liposomen ergab sich folgendes Bild:

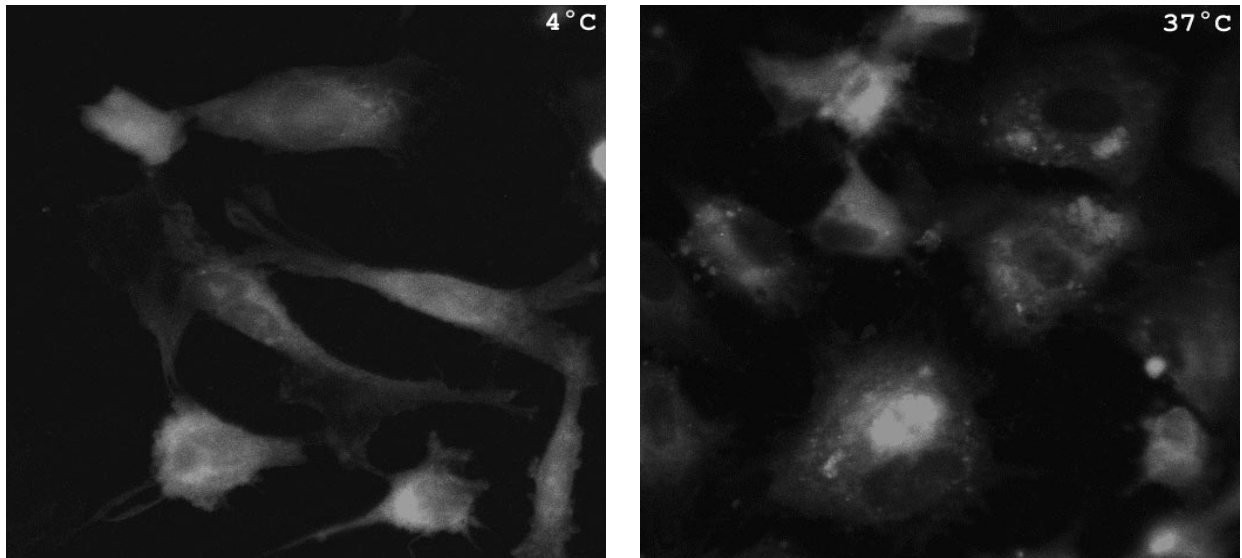


Abb. 35: Wechselwirkung calceinenthaltender Liposomen mit HUVEC bei 4°C (Fusion) links und bei 37°C (Fusion und Endozytose) rechtes Bild

Die bei 4°C inkubierten Vesikel haben durch Fusion ihr Calcein gleichmäßig in das Zytosol abgegeben, die Zellen erscheinen einheitlich hell (linkes Bild). Bei 37°C hingegen (rechtes Bild) zeichnen sich deutlich die bereits mehrfach detektierten Vakuolenbereiche ab, die wiederum für eine Endozytose sprechen. Mit dieser Methode lassen sich somit sehr elegant Fusion und Endozytose nebeneinander nachweisen.

Faßt man die Ergebnisse der drei mikroskopischen Untersuchungen zusammen, so zeigt sich, daß die endozytotische Aufnahmekapazität der HUVEC größer ist, als sie mit dem HPTS-Assay nachgewiesen werden konnte. So endozytieren die HUVEC auch unspezifische Liposomen, wobei dieser Prozeß auch durch Fusion der Liposomen mit der Zellmembran überlagert wird. Daraus läßt sich schlußfolgern, daß nach einem erfolgten Targeting an den HUVEC eine Liposomenaufnahme in die Zellen mit hoher Wahrscheinlichkeit stattfindet.

Die mikroskopischen Untersuchungen ergaben eine gute qualitative Beschreibung der Internalisierungsmechanismen. Durch weiterführende Studien in der Arbeitsgruppe sollte die Internalisierung auch quantitativ auswertbar werden [316].

Für diese Experimente werden die HUVEC für 90 Minuten bei 37°C mit unfunktionalisierten fluoreszierenden Liposomen inkubiert und anschließend von den nichtgebundenen Liposomen durch Spülen befreit. Zur quantitativen Unterscheidung der gebundenen und internalisierten Liposomen werden die Zellen kurz einer Proteasebehandlung (Pronaselösung 0,1%) unterzogen, durch die die anhaftenden Liposomen von den Zellen getrennt werden. Nach Zentrifugation können durch Fluoreszenzmessung im Überstand die gebundenen Liposomen quantifiziert werden. Die internalisierten Liposomen im Zellpellet können anschließend ebenfalls nach einer Detergenzbehandlung quantifiziert werden. Zur besseren fluoreszenztechnischen Vermessung kam für diese Untersuchungen der lipophile Marker Dioctadecyloxycarbocyaninperchlorat (DiO) zu Einsatz, der durch seine höhere molare Fluoreszenzausbeute im Vergleich zu NBD-PE für eine Quantifizierung sensitiver

erscheint. Auf einfachem Wege können so die internalisierten Liposomen zu den gebundenen prozentual ins Verhältnis gesetzt werden. Auf dieser Grundlage wurde das Verhalten von stimulierten und nicht stimulierten HUVEC miteinander verglichen. Obwohl beide Zellansätze vergleichbare Mengen an Liposomen binden, werden bei den stimulierten HUVEC 25,5%, dahingegen bei den nicht stimulierten HUVEC nur ca. 23,5% dieser Liposomen internalisiert. Die erhöhte Internalisierung der HUVEC befindet sich in Übereinstimmung mit Literaturdaten über das Verhalten anderer Endothelzellen [327]. Mit diesen Ergebnissen werden die mikroskopischen Resultate erneut bestätigt, eine Internalisierung der Liposomen nach Targetierung ist für die therapeutische Nutzung in Betracht zu ziehen.

Die prozentuale Angabe der gebundenen oder internalisierten Liposomen ist nur eine relative Aussage, die mit anderen Studien und Zellen nicht vergleichbar ist. Zu diesem Zweck wurden durch Bestimmung der Ausgangsfluoreszenz der Liposomen unter Berechnung der Liposomenanzahl dieser Konzentration (über Flächenbedarf der Lipide, den bekannten Innen- und Außendurchmesser der Liposomen bei angenommener Unilamellarität) diese Ergebnisse auch in Liposomenanzahl pro Zelle umgerechnet. Diese Angaben findet man auch in anderen Veröffentlichungen. Es ergab sich, daß gesamt ca. 15.000 Liposomen pro Zelle assoziiert und internalisiert sind. Auch dieser Zahlenwert ist für einen Vergleich mit anderen Studien nicht geeignet, da er von verschiedenen Liposomenparametern abhängig ist, und damit verfälscht werden kann. Als unabhängige Größe wurde die Angabe von nmol liposomales Lipid/Zelle ausgewählt. Damit ergab sich für die stimulierten HUVEC eine Aufnahme von $1,7 \times 10^{-7}$ nmol Lipid/Zelle, für die unstimulierten HUVEC ein Wert von $1,5 \times 10^{-7}$ nmol Lipid/Zelle.

Für eine Einordnung und Bewertung dieser Daten wurden zwei Studien als Vergleich hinzugezogen, in denen die Internalisierung von Immunoliposomen nach erfolgtem Targeting an bronchialen Epithelzellen [323] und die Internalisierung unfunktionalisierter normaler Liposomen durch makrophagenähnliche Zellen untersucht wurden [328]. Auf gleichem Wege wurden die Angaben Liposomen/Zelle in nmol Lipid/Zelle umgerechnet, wobei zu beachten war, daß die Liposomen in beiden Studien mit ca. 200 nm größer als in unseren Experimenten waren. Es ergab sich, daß die spezifisch targetierten Immunoliposomen in der ersteren Studie zu ca. 6×10^{-6} nmol Lipid/Zelle, die Liposomen der zweiten Studie von den makrophagenähnlichen Zellen zu $1,4 \times 10^{-7}$ nmol Lipid/Zelle aufgenommen wurden. Von der prinzipiellen Größenordnung stimmen die Werte gut überein. Aus der ersten Studie kann man ableiten, daß durch die spezifische Targetierung und damit Konzentrierung der Liposomen an der Zelloberfläche auch die Internalisierungsrate erhöht wird. Der Vergleich mit den makrophagenähnlichen Zellen erbringt sehr ähnliche Werte, wobei hier durch die größeren Liposomen von den Zellen eine höhere Endozytoseleistung erbracht werden muß.

Faßt man alle Internalisierungsuntersuchungen zusammen, so kann man feststellen, daß HUVEC eine deutliche Internalisierungstendenz für Liposomen besitzen. Mit dem endozytosespezifischen Nachweis mittels HPTS konnte die Endozytose von Selektin-gerichteten Immunoliposomen nach Targetbindung nachgewiesen werden. Ergänzende mikroskopische Befunde über eine Internalisierung von unspezifischen Liposomen zeigten, daß neben einer Endozytose auch Fusionsprozesse der Liposomen mit der Zellmembran stattfinden. Die Quantifizierung dieser Aufnahmeprozesse ergibt für die HUVEC eine deutliche, mit anderen Zellen vergleichbare Internalisierungsrate. Erste orientierende Studien zeigen, daß für spezifisch targetierte E-Selektin-gerichtete Immunoliposomen eine leicht höhere Liposomenaufnahme in die Zellen zu erwarten ist. Diese Untersuchungen sind Gegenstand weiterführender Arbeiten.

Mit diesen Kenntnissen sollte für eine perspektivische Nutzung von Selektin-gerichteten Immunoliposomen zur antiinflammatorischen Therapie eine Zellinternalisierung als Wirkprinzip genutzt werden. Eine solche endozytotische Liposomeninternalisierung bietet sich beispielsweise für eine antisense-Oligonucleotid-Strategie an. Damit könnte durch die

internalisierten antisense-Oligonucleotide z.B. die Expression weiterer Adhäsionsmoleküle (Integrine oder ICAM-1) an den Endothelzellen blockiert werden, um kausal Entzündungsreaktionen zu unterbrechen. Arbeiten zu dieser Strategie befinden sich in Vorbereitung. Zum Schutz solcher eingeschleusten Oligonucleotide vor einem lysosomalen Abbau müßten pH-sensitive Liposomen diese Strukturen bereits in den Endosomen freisetzen. Gegenwärtig werden Untersuchungen zu sterisch stabilisierten pH-sensitiven Liposomen durchgeführt, die dann bei dieser Strategie Verwendung finden können.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit soll die pharmazeutische Relevanz der Selektine verdeutlicht werden. Zu diesem Zweck wurden Beiträge zur Aufklärung der molekularen Bindungseigenschaften der Selektine erbracht, auf denen aufbauend verschiedene Verbindungen als Selektininhibitoren untersucht und in ihrer Perspektive als potentielle antiinflammatorische Substanzen dargestellt wurden. Weiterhin wird mit der Nutzung von Selektinen als Targetstruktur für Arzneimittelvehikel ein neuer Weg für die Effektivierung einer antiinflammatorischen Therapie aufgezeigt.

Selektine nehmen auf Grund ihrer initialen Stellung in der Adhäsionskaskade der Leukozyten unter Entzündungsbedingungen eine Schlüsselrolle in der Entzündungsentstehung ein. Die von den Selektinen vermittelte Leukozytenbindung äußert sich in einer Zellrollbewegung unter Scherflußbedingungen, so daß neben ihrer physiologischen Funktion die Selektine auch durch diese einmalige Sonderform einer Adhäsion aus mechanistisch/biophysikalischer Sicht sehr interessant erscheinen. Obwohl die Selektine seit ihrer Entdeckung und funktionellen Aufklärung zu Beginn der 90er Jahre intensiv untersucht werden, sind einzelne Aspekte der molekularen Bindungseigenschaften nicht vollständig verstanden.

In der vorliegenden Arbeit wird ein abstrahierendes Testmodell vorgestellt, mit dem im Prozeß des Selektin-vermittelten Zellrollens auf die funktionellen Aspekte der Selektinliganden fokussiert werden kann. Die natürlichen mucinähnlichen Selektinliganden sind in ihrer Funktion der Rollvermittlung ungenügend charakterisiert. Durch Einsatz einer modifizierbaren ligandhaltigen Modellmembran wurde deutlich, daß die Summation vieler schwachaffiner, aber räumlich konzentrierter Einzelbindungen eine essentielle Bindungsvoraussetzung für die Selektine im Rollprozeß darstellt. Wir postulierten daraus, daß die natürlichen Selektinliganden durch eine Multimerisierung von schwach affinen Kohlenhydratpitopen im Molekül die notwendige Bindungsaffinität zu den Selektinen erlangen. Weiterhin konnte erkannt werden, daß eine Flexibilitätszunahme der Liganden das Rollverhalten forciert und damit die Zahl der notwendigen einzelnen Bindungsepitope reduziert werden kann. Auf dieser Basis konnte das Selektin-vermittelte Zellrollen simuliert und verschiedene Einflußfaktoren untersucht werden.

Mit dieser funktionsfähigen Zellrollanordnung wurden in weitergehenden Untersuchungen Substanzen auf ihre Selektin-inhibierende Wirksamkeit charakterisiert. Da Selektine an einer Vielzahl von pathologischen Entzündungsereignissen beteiligt sind, könnte aus der Blockierung der Selektine die Möglichkeit einer frühen und kausalen Einflußnahme bzw. Unterdrückung dieser pathologischen Prozesse resultieren. In dem dynamischen Rollassay wurden verschiedene glykosidische Verbindungen getestet, wobei deren inhibitorische Potenz exakt an Hand der reduzierten Anzahl der gebundenen Zellen und an deren Rollgeschwindigkeit quantifiziert werden konnte. Damit erwies sich dieses dynamische Testassay aussagefähiger als die gebräuchlichen statischen Zellbindungs-Untersuchungen. Unterschiede in der inhibitorischen Wirksamkeit zwischen statischen und dynamischen Bindungsbedingungen konnten strukturell diskutiert werden, wobei aus dem physiologisch relevanteren dynamischen Test Empfehlungen für die Inhibitorstrukturen abgeleitet werden konnten.

Da die vaskulären Selektine räumlich und zeitlich an das Entzündungsgeschehen gebunden von den Endothelzellen exprimiert werden, wurden sie in dieser Arbeit als Targetstrukturen für Arzneimittelvehikel vorgeschlagen. Mit diesem völlig neuartigen Prinzip sollen Arzneistoffe gezielt zum entzündeten Gewebe transportiert werden können, um somit eine antiinflammatorische Therapie zu effektivieren. Als Arzneistoffvehikel werden in dieser Arbeit Immunoliposomen als sog. Drug Delivery Systems angewendet. Dafür wurden zuerst die Wege zur Darstellung von Immunoliposomen verglichen und eine neuartige Methode zur

Herstellung dieser Antikörper-gekoppelten Liposomen etabliert. Durch Immunogenitätsuntersuchungen in Ratten konnte das immunogene Potential dieser Immunoliposomen bei mehrfacher Applikation in Hinblick auf zukünftige in vivo-Anwendungen charakterisiert und auf die strukturellen Eigenschaften der Immunoliposomen zurückgeführt werden. In den in vitro-Targeting-Studien konnte gezeigt werden, daß sich die Liposomen mit den gekoppelten anti-E-Selektin-Antikörpern spezifisch, und in einem wesentlich stärkeren Maße als normale Liposomen an stimulierten Endothelzellen akkumulieren. Für die Berücksichtigung der physiologischen Bedingungen wurden diese Targetierungsexperimente auch unter den simulierten Scherflußbedingungen des kapillaren Blutstromes durchgeführt. Da nach einem erfolgreichen Targeting die Immunoliposomen auch unter Scherbedingungen an den Endothelzellen gebunden bleiben, wurde das Schicksal der Zell-gebundenen Liposomen weiter verfolgt, um daraus einen direkten therapeutischen Nutzen an den Zielzellen abzuleiten. Dafür wurden einerseits Liposomen strukturiert, die nach Targetbindung ihre Inhaltsstoffe gezielt freisetzen, was vor dem Hintergrund einer erhöhten Gefäßpermeabilität unter Entzündungsbedingungen sehr vorteilhaft erscheint. Andererseits wurde die Internalisierung der Liposomen durch die Endothelzellen analysiert. Da ein in dieser Arbeit quantifizierter Anteil der Liposomen auch in die Endothelzellen aufgenommen wird, erscheint eine intrazelluläre Beeinflussung der Endothelzellen durch liposomale Wirkstoffe eine weitere sehr aussichtsreiche Perspektive zu sein.

Der Kenntnisstand dieser Arbeit repräsentiert keinen Endpunkt der Untersuchungen, auf allen drei Teilgebieten (molekulare Bindungsaufklärung der Selektine, Selektininhibitoren und Selektintargeting) sind weiterführende Studien in Arbeit oder in Planung.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Springer,T.A.: Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu. Rev. Physiol.* 57 (1995), 827-872.
- [2] Cohnheim,J.: Lectures on general pathology: A handbook for practitioners and students. (1889), The New Sydenham Society, London.
- [3] Baggiolini,M., Dewald,B., Moser,B.: Human chemokines: An update. *Annu. Rev. Immunol.* 15 (1997), 675-705.
- [4] Zimmerman,G.A., McIntyre,T.M., Prescott,S.M.: Adhesion and signalling in vascular cell-cell-interactions. *J. Clin. Invest.* 98 (1997), 1699-1701.
- [5] Stewart,M., Thiel,M., Hagg,N.: Leukocyte integrins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7 (1995), 690-696.
- [6] Arnaout,M.A.: Structure and function of the leukocyte adhesion molecule CD11/CD18. *Blood* 75 (1990), 1037-1050.
- [7] Arnaout,M.A., Lanier,L.L., Faller,D.V.: Relative contribution of the leukocyte adhesion molecule Mac-1, LFA-1 and p150,95 (LeuM5) in adhesion of granulocytes and monocytes to vascular endothelium is tissue- and stimulus-specific. *J. Cell Physiol.* 137 (1988), 305-309.
- [8] De Fougères,A.R., Springer,T.A.: Intercellular adhesion molecule-3, a third adhesion counter receptor for lymphocyte function-associated molecule-1 on resting lymphocytes. *J. Exp. Med.* 175 (1992), 185-190.
- [9] Harlan,J.M., Killen,P.D., Senecal,F.M., Schwartz,B.R., Yee,E.K., Taylor,R.F., Beatty,P.G., Price,T.H., Ochs,H.D.: The role of neutrophil membrane glycoprotein gp 150 in neutrophil adherence to endothelium in vitro. *Blood* 66 (1985), 167-178.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] Lorenzon,P., Vecile,E., Nardon,E., Ferrero,E., Harlan,J.M., Todesco,F., Dobrina,A.: Endothelial cell E- and P-Selectin and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 function as signaling receptors. *J. Cell Biol.* 142 (1998), 1381-1391.
- [14] Vaporciyan,A.A., DeLisser,H.M., Yan,H.C., Mendiguren,I.I., Thom,S.R., Jones,M.L., Ward,P.A., Albelda,S.M.: Involvement of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 in neutrophil recruitment in vivo. *Science* 262 (1993), 1580-1582.
- [15] Berlin,C., Bargatze,R.F., Campbell,J.J., von Adrian,U.H., Szabo,M.C., Hasslen,S.R., Nelson,R.D., Berg,E.L., Erlandsen,S.L., Butcher,E.C.: α 4-Integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiological flow. *Cell* 80 (1995), 413-422.
- [16] Vestweber,D., Blanks,J.E.: Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol. Rev.* 79 (1999), 181-213.
- [17] Etzioni,A., Jonas,P.: The in vivo role of Selectins-Lessons from Leukocyte Adhesion Deficiency (LAD) II. In: *The Selectins*. Ed. Vestweber,D., Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 1997, 117-125.
- [18] Harlan,J.M.: Leukocyte adhesion deficiency syndrome: insight into the molecular basis of leukocyte emigration. *Clin. Immunol. Immunopath.* 67 (1993), S 16.

- [19] Huang,K.S., Graves,B.J., Wolitzky,B.A.: Functional analysis of Selectin structure. In: Selectins. Ed. Vestweber,D. Harwood Academic press (1997), 1-29.
- [20] Chou,K.C.: The convergence-divergence duality in lectin domains of selectin family and its implications. FEBS-Lett. 363 (1995), 123-126.
- [21] Torgersen,D., Mullin,N.P., Drickamer,K.: Mechanism of ligand binding to E- and P-Selectin analyzed using selectin/mannose-binding protein chimeras. J. Biol. Chem. 273 (1998), 6254-6261.
- [22] Blanck,O., Iobst,S.T., Gabel,C., Drickamer,K.: Introduction of selectin-like specificity into a homologous mannose-binding protein. J. Biol. Chem. 271 (1996), 7289-7292.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] 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.
- [26] 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.
- [27] 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.
- [28] 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.
- [29] Stoolman,L.M., Rosen,S.D.: Possible role for cell surface carbohydrate-binding molecules in lymphocyte recirculation. J. Cell Biol. 96 (1983), 722-729.
- [30] Yednock,T.A., Stoolman,L.M., Rosen,S.D.: Phosphomannosyl-derivatized beads detect a receptor involved in lymphocyte homing. J. Cell Biol. 104 (1987), 713-714.
- [31] 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.
- [32] 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.
- [33] 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.
- [34] 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.
- [35] 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.
- [36] 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.

- [37] Bevilacqua, M.P., Stengelin, S., Gimbrone, M.A., Seed, B.: Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: An inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* 243 (1989), 1160-1165.
- [38] 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.
- [39] 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.
- [40] Jang-Ik, L., Burckard, G.J.: Nuclear factor kappa B: Important transcription factor and therapeutic target. *J. Clin. Pharmacol.* 38 (1998), 981-993.
- [41] Geng, J.G., Bevilacqua, M.P., Moore, K.L., McIntyre, T.M., Prescott, S.M., Kim, J.M., Bliss, G.A., Zimmerman, G.A., McEver, R.P.: Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature* 343 (1990), 757-760.
- [42] McEver, R.P.: Selectin-carbohydrate interactions during inflammation and metastasis. *Glycoconj. J.* 14 (1997), 585-591.
- [43] 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.
- [44] 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-Lewis^X. *Science* 250 (1990), 1130-1132.
- [45] Walz, G., Aruffo, G., Kolanus, W., Bevilacqua, M., Seed, B.: Recognition by ELAM-1 of the sialyl Lewis^X determinant on myeloid and tumor cells. *Science* 250 (1990), 1132-1135.
- [46] 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.
- [47] 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 Lewis^X oligosaccharide. *J. Cell Biol.* 117 (1992), 895-902.
- [48] Berg, E.L., Robinson, M.K., Mansson, O., Butcher, E.C., Magnani, E.L.: A carbohydrate domain common on both sialyl Lewis^a and sialyl Lewis^X is recognized by the endothelial cell leukocyte adhesion molecule ELAM-1. *J. Biol. Chem.* 266 (1991), 14869-14872.
- [49] Handa, K., Nudelman, E.D., Strout, M.R., Shiozawa, T., Hakamori, S.I.: Selectin GMP-140 (CD62, PADGEM) binds to sialyl Lewis^a and sialyl Lewis^X and sulfated glycans modulate this binding. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 181 (1991), 1223-1230.
- [50] 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.
- [51] 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.
- [52] 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.
- [53] Moore, K.L., Stults, N.L., Diaz, S., Smith, D.F., Cummings, R.D., Varki, A., McEver, R.P.: Identification of a specific glycoprotein ligand for P-Selectin (CD 62) on myeloid cells. *J. Cell Biol.* 118 (1992), 445-456.

- [54] 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.
- [55] 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.
- [56] 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.
- [57] 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.
- [58] 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.
- [59] 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.
- [60] 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.
- [61] 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.
- [62] 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.
- [63] 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.
- [64] Simon,S.I., Rochon,Y.P., Lynam,E.B., Smith,C.W., Anderson,C.W., Sklar,L.A.: β -2 Integrin and L-Selectin are obligatory receptors in neutrophil aggregation. *Blood* 82 (1993), 1097-1106.
- [65] 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.
- [66] Alon,R., Fuhlbrigge,R.C., Finger,E.B., Springer,T.A.: Interactions through L-Selectin between leukocytes and adherent leukocytes nucleate rolling adhesion on selectins and VCAM-1 in shear flow. *J. Cell Biol.* 135 (1996), 849-865.
- [67] Kimura,N., Mitsuoka,C., Kanamori,A., Hiraiwa,N., Uchimura,K., Muramatsu,T., Tamatani,T., Kansas,G.S., Kannagi,R.: Reconstitution of functional L-Selectin ligands on a cultured human endothelial cell line by cotransfection of α 1.3fucosyltransferase VII and newly cloned GlcNAc β -6-sulfotransferase cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999), 4530-4535.
- [68] Brustein,M., Kraal,G., Mebius,R.E., Watson,S.: Identification of a soluble form of a ligand for the lymphocyte homing receptor. *J. Exp. Med.* 176 (1992), 1415-1419.

- [69] Mebius,R.E., Dowbnk,D., Williams,A., Fennie,C., Lasky,L.A., Watson,S.R.: Expression of GlyCAM-1, an endothelial ligand for L-Selectin, is affected by afferent lymphatic flow. *J. Immunol.* 151 (1993), 6769-6776.
- [70] 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.
- [71] 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.
- [72] 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.
- [73] 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.
- [74] 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.
- [75] 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.
- [76] 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.
- [77] 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.
- [78] 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.
- [79] Steegmaier,M., Borges,E., Berger,J., Schwarz,H., Vestweber,D.: The E-Selectin Ligand ESL-1 in located in the Golgi as well as on microvilli on the cell surface. *J. Cell Sci.* 110 (1997), 687-694.
- [80] Patel,T.P., Goelz,S.E., Lobb,R.R., Parekh,R.B.: Isolation and characterization of natural-associated carbohydrate ligands for E-Selectin. *Biochemistry* 33 (1994), 14815-14824.
- [81] 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.
- [82] Müthing,J., Spanbroek,R., Peter-Katalinic,J., Hanisch,F., 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.
- [83] 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.

- [84] 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.
- [85] 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.
- [86] Simon,S.I., Cherapanov,V., Nadra,I., Waddell,T.K., Seo,S.M., Wang,Q., Doerschuk,C.M., Downey,G.P.: Signaling function of L-Selectin in neutrophils: Alteration in the cytoskeleton and colocalization with CD 18. *J. Immunol.* 163 (1999), 2891-2901.
- [87] Giblin,P.A., Hwang,S.T., Katsumoto,T.R., Rosen,S.D.: Ligation of L-Selectin on T lymphocytes activates β 1 integrins and promotes adhesion to fibronectin. *J. Immunol.* 159 (1997), 3498-3501.
- [88] Yoshida,M., Westlin,W.F., Wang,N., Ingber,D.E., Rosenzweig,A., Resnick,N., Gimbrone,M.A.: Leukocyte adhesion to vascular endothelium induces E-Selectin linkage to the actin cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 133 (1996), 445-455.
- [89] Yoshida,M., Szente,B.E., Kiely,J.M., Rosenzweig,A., Gimbrone,M.A.: Phosphorylation of the cytoplasmic domain of E-Selectin is regulated during leukocyte-endothelial adhesion. *J. Immunol.* 161 (1998), 933-941.
- [90] Chien,S.: Rheology in the microcirculation in normal and low flow states. *Adv. Shock Res.* 8 (1982), 71-80.
- [91] 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.
- [92] 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.
- [93] 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.
- [94] Dore,M., Korthius,R.J., Granger,D.N., Entman,M.L., Smith,C.W.: P-Selectin mediates spontaneous leukocyte rolling in vivo. *Blood* 82 (1993), 1308-1316.
- [95] 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.
- [96] 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.
- [97] 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.
- [98] 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.
- [99] 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.
- [100] 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.

- [101] Bullard,D.C., Beaudet,A.L.: Analysis of selectin deficient mice. In: *The Selectins*. D. Vestweber (Ed.). Harwood Academic Press, Amsterdam, 1997, 133-142.
- [102] Lawrence,M.B., Springer,T.A.: Leukocytes roll on Selectin at physiologic flow rates: Distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* 65 (1991), 859-873.
- [103] Lawrence,M.B., Springer,T.A.: Neutrophils roll on E-Selectin. *J. Immunol.* 151 (1993), 6338-6346.
- [104] Puri,K.D., Finger,E.B., Springer,T.A.: The faster kinetic of L-Selectin than of E-Selectin and P-Selectin rolling at comparable binding strength. *J. Immunol.* 158 (1997), 405-413.
- [105] 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.
- [106] 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.
- [107] 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.
- [108] Fritz,J., Katapodis,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.
- [109] 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.
- [110] 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.
- [111] Hafez-Moghadam,A., Ley,K.: Relevance of L-Selectin shedding for leukocyte rolling in vivo. *J. Exp. Med.* 189 (1999), 939-947.
- [112] Shao,J.Y., Hochmuth,R.M.: Mechanical anchoring strength of L-Selectin, β 2 Integrins, and CD 45 to neutrophil cytoskeleton and membrane. *Biophys. J.* 77 (1999), 587-596.
- [113] Chen,S., Alon,R., Fuhlbrigge,R.C., Springer,T.A.: Rolling and transient tethering of leukocytes on antibodies reveal specialization of selectins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997), 3172-3177.
- [114] 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.
- [115] 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.
- [116] 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.
- [117] 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.
- [118] 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.
- [119] 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.

- [120] Finger,E.B., Puri,K.D., Alon,R., Lawrence,M., von Adrian,U., Springer,T.A.: Adhesion through L-Selectin requires a threshold hydrodynamic shear. *Nature* 379 (1996), 266-269.
- [121] Lawrence,M., Kansas,G.S., Kunkel,E.J., Ley,K.: Threshold levels of fluid shear promotes leukocyte adhesion through selectins. *J. Cell Biol.* 136 (1997), 717-727.
- [122] Reinhardt,P.H., Kubes,P.: Differential leukocyte recruitment from whole blood via endothelial adhesion molecules under shear conditions. *Blood* 92 (1998), 4691-4699.
- [123] Reneman,R.S., Woldhius,B., oudeEgbrink,M.G.A., Slaaf,D.W., Tangelder,G.J.: Concentration and velocity profiles of blood cells in the microcirculation. In: *Advances in cardiovascular engineering*. Ed. Hwang,N.H.C., Turitto,V.T., Yen,M.R.T. Plenum Press, New York 1992, 25-40.
- [124] Schmid-Schönbein,G.W., Usami,S., Skalak,R., Chien,S.: The interaction of leukocytes and erythrocytes in capillary and postcapillary vessels. *Microvasc. Res.* 19 (1980), 45-70.
- [125] Melder,R.J., Munn,L.L., Yamada,S., Ohkubo,C., Jain,R.K.: Selectin- and Integrin-mediated T-Lymphocyte rolling and arrest on TNF- α -activated endothelium: Augmentation by erythrocytes. *Biophys. J.* 69 (1995), 2131-2138.
- [126] Tissot,O., Pierres,A., Delaage,M., Bongrand,P.: Motion of cells sedimenting of a solid surface in a laminar shear flow. *Biophys. J.* 58 (1992), 641-652.
- [127] Goldman,A.J., Cox,R.G., Brenner,H.: Slow viscous motion of a sphere parallel to a plane wall: II. Couette flow. *Chem. Eng. Sci.* 22 (1967), 653-660.
- [128] Hammer,A.D., Lauffenburger,D.A.: A dynamical model for receptor-mediated cell adhesion to surfaces. *Biophys. J.* 52 (1987), 475-487..
- [129] Zhao,Y., Chien,S., Skalak,R.: A stochastic model for leukocyte rolling. *Biophys. J.* 69 (1995), 1309-1320.
- [130] Bandulik,M.: Mathematische Modellierung des selektininduzierten Zellrollens im Scherfeld. Diplom FB Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle, (1998).
- [131] Bell,G.I.: Models for the specific adhesion of cell to cells. *Science* 200 (1978), 618-627.
- [132] Dreyer,W.J., Michael,L.H., West,S.W., Smith,C.W., Rothlein,R., Rosen,R.D., Anderson,D.C., Entman,M.L.: Neutrophil accumulation in ischemic canine myocardium: Insight into the time course, distribution and mechanism of localization during early reperfusion. *Circulation* 84 (1991), 400-411.
- [133] Weyrich,A.S., Ma,X., Lefer,D.J., Albertine,K.H., Lefer,A.M.: In vivo neutralization of P-Selectin protects feline heart and endothelium im myocardial ischemia and reperfusion injury. *J. Clin. Invest.* 91 (1993), 2620-2629.
- [134] Ma,X., Weyrich,A.S., Lefer,D.J., Buerke,M., Albertine,K.H., Kishimoto,T.K., Lefer,A.M.: Monoclonal antibody to L-Selectin attenuates neutrophil accumulation and protects ischemic reperfused cat myocardium. *Circulation* 88 (1993), 649-658.
- [135] Murohara,T., Margiotta,J., Phillips,L.M., Paulson,J.C., DeFrees,S., Zalipsky,S., Guo,L.S.S., Lefer,A.M.: Cardioprotection by liposome-conjugated Sialyl Lewis X-oligosaccharide in myocardial ischaemia and reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* 30 (1995), 965-974.
- [136] Zizzi, H.C., Zibari,G.B., Granger,D.N., Singh,I., Cruz,L.D., Abreio,F., McDonald,J.C., Brown,M.F.: Quantification of P-Selectin expression after renal ischemia and reperfusion. *J. Pediat. Surg.* 32 (1997), 1010-1013.
- [137] Burke,J., Zibari,G.B., Brown,M.F., Granger,N., Kelly,R., Singh,I., McDonald, J.C.: Hepatic ischemia-reperfusion injury causes E-Selectin upregulation. *Transplantation Proceedings* 30 (1998), 2321-2323.

- [138] Scalia,R., Armstead,V.E., Minchenko,A.G., Lefer,A.M.: Essential role of P-Selectin in the initiation of the inflammatory response induced by hemorrhage and reinfusion. *J. Exp.Med.* 189 (1999), 931-938.
- [139] Klareskog,L., Rönnelid,J., Holm,G.: Immunopathogenesis and immunotherapy in rheumatoid arthritis: An area in transition. *J. Intern. Med.* 238 (1995), 191-206.
- [140] 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 nodules. *Arthritis & Rheumatism* 41 (1998), 1783-1797.
- [141] Vora,D.K., Fang,Z.T., Liva,S.M., Tyner,T.R., Parhami,F., Watson,A.D.: Induction of P-Selectin by oxidized lipoproteins: Separate effects of synthesis and surface expression. *Circ. Res.* 80 (1997), 810-818.
- [142] Mehta,A., Yang,B., Khan,S., Hendricks,J.B., Stephen,C., Mehta,I.L.: Oxidized low-density lipoproteins facilitate leukocyte adhesion to aortic intima without affecting endothelium dependent relaxation: Role of P-Selectin. *Arteroscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15 (1995), 2076-2083.
- [143] 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.
- [144] Pieper,G.M., Ul-Haq,R.: Activation of nuclear factor- κ B in cultured endothelial cells by increased glucose concentration: Prevention by calphostin C. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 30 (1997), 528-532.
- [145] Kunt,T., Forst,T., Harzer,O., Buchert,G., Pfützner,A., Löbig,M., Zschäbitz,A., Stofft,E., Engelbach,M., Beyer,J.: The influence of advanced glycation endproducts (AGE) on the expression of human endothelial adhesion molecules. *Exp. Clin. Endocrin. Diabetes* 106 (1998), 183-188.
- [146] Krause,T., Turner,G.A.: Are selectins involved in metastasis? *Clin. Exp. Metastasis* 17 (1999), 183-192.
- [147] Biancone,L., Araki,M., Araki,K., Vasalli,P., Stamencovic,I.: Redirection of tumor metastasis by expression of E-Selectin in vivo. *J. Exp. Med.* 183 (1996), 581-587.
- [148] Sato,M., Narita,T., Kimura,N., Zenita,K., Hashimoto,T., Manabe,T., Kannagi,R.: The assoziation of Sialyl Lewis^a antigen with the metastatic potential of human colon cancer cells. *Anticancer Res.* 17 (1997), 3505-3512.
- [149] Matsuura,N., Narita,T., Hiraiwa,N., Hiraiwa,M., Murai,H., Iwase,T., Funahashi,H., Imai,T., Takagi,H., Kannagi,R.: Gene expression of fucosyl- and sialyl-transferasen which synthesize Sialyl Lewis X, the carbohydrate ligands for E-Selectin, in human breast cancer. *Int. J. Oncol.* 12 (1998), 1157-1164.
- [150] 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.
- [151] Okazaki,K., Nakayama,Y., Shibao,K., Hirata,K., Nagata,N., Itoh,H.: Enhancement of metastatic activity of colon cancer as influenced by expression of cell surface antigen. *J. Surg. Res.* 78 (1998), 78-84.
- [152] 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.
- [153] Dannhardt,G., Hahn,L.: COX-2-Inhibitoren: Aktueller Stand und Ausblick. *Pharm.i.u.Z.* 29 (2000), 100-106.
- [154] Sorbera,L.A., Rabasseda,X., Leeson,P.A.: Etancept. *Drugs of the Future* 23 (1998), 951-954)
- [155] Brunner,U., Gensthaler,B.M.: Infliximab. *Pharmazeutische Zeitung* 144 (1999), 3264.

- [156] Chiou,G.C.Y.: Interleukin-1 blockers: A new class of nonarachidonate nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Drugs of the Future* 24 (1999), 979-990.
- [157] 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.
- [158] 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.
- [159] 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.
- [160] Ohmoto,H., Nakamura,K., Inoue,T., Kondo,N., Inoue,Y., Yoshino,K., Kondo,H., Ishida,H., Kiso,M., Hasegawa,A.J.: Studies on selectin blockers 1: Structure activity relationships of Sialyl Lewis^x analogs. *J. Med. Chem.* 39 (1996), 1339-1343.
- [161] Manning,D.D., Bertozzi,C.R., Rosen,S.D., Kiessling,L.L.: Tin-mediated phosphorylation-Synthesis and selectin binding of a phospho-Lewis^a analog. *Tetrahedron Lett.* 37 (1996), 1953-1956
- [162] Toepfer,A., Kretzschmar,G., Bartnik,E.: Synthesis of novel mimetics of the Sialyl Lewis X determinant. *Tetrahedron Lett.* 36 (1995), 9161-9164.
- [163] Norman,K.E., Anderson,G.P., Kolb,H.C., Ley,K., Ernst,B.: Sialyl Lewis X (sLex) and an sLex mimetic, CGP69669A, disrupt E-Selectin-dependent leukocyte rolling in vivo. *Blood* 91 (1998), 475-483.
- [164] Murphy,P.V., Hubbard,R.E., Manallack,D.T., Wills,R.E., Montana,J.G., Taylor,R.J.K.: The design, synthesis and evaluation of novel conformationally rigid analogues of Sialyl Lewis X. *Bioorg. Med. Chem.* 6 (1998), 2421-2439.
- [165] Birkbeck,A.A., Ley,S.V., Prodger,J.C.: Spiroketal glycomimetics: The synthesis of a conformationally restrained Sialyl Lewis X mimic. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 5 (1995), 2637-2642.
- [166] Kogan,T.P., Dupre,B., Keller,K.M., Scott,I.L., Bui,H., Market,R.V., Beck,P.J., Voytus,J.A., Revelle,B.M., Scott,D.: Rational design and synthesis of small molecule, non-oligosaccharide selectin inhibitors: (α -D-Mannopyranosyloxy) biphenyl-substituted carboxylic acids. *J. Med. Chem.* 38 (1995), 4976-4984.
- [167] Wong,C.H., Moris-Varas,F., Hung,S.C., Marron,T.G., Lin,C.C., Gong,K.W., Weitz-Schmidt,G.: Small molecules as structural and functional mimetics of sLex tetrasaccharide in selectin inhibition: A remarkable enhancement of inhibition by additional negative charge and for hydrophobic groups. *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1996), 8152-8158.
- [168] 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.
- [169] 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.
- [170] 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 poly lactosamine backbones present multiple Sialyl Lewis X determinants to L-Selectin in high affinity mode. *Glycobiology* 7 (1997), 453-461.
- [171] Manning,D.D., Strong,L.E., Hu,X., Beck,P.J., Kiessling,L.L.: Neoglycopolymer inhibitors of the selectins. *Tetrahedron* 53 (1997), 11937-11952.

- [172] Leppänen,A., Mehta,P., Ouyang,Y.B., Ju,T., Helin,J., Moore,K.L., vanDie,I., Canfield,W.M., McEver,R.P., Cumming,R.D.: A novel glycosulfopeptide binds to P-Selectin and inhibits leukocyte adhesion to P-Selectin. *J. Biol. Chem.* 274 (1999), 24838-24848.
- [173] 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.
- [174] Lee,J.I., Burckart,G.J.: Nuclear factor kappa B. Important transcription factor and therapeutic target. *J. Clin. Pharmacol.* 38 (1998), 981-993.
- [175] Cronstein,B.N., Kimmel,S.C., Levin,R.I., Martiniuk,F., Weissmann,G.: A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: The glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of ELAM-1 and ICAM-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992), 9991-9995.
- [176] Rünegeler,P., Lyß,G., Merfort,I.: Transkriptionsfaktor NFκB: Zentraler Mediator im Immunsystem und Entzündungsgeschehen. *Pharm. Ztg.* 144 (1999), 1160-1165.
- [177] Slater,C., House,S.D.: Effects of non steroidal antiinflammatory drugs on microvascular dynamics. *Microvasc. Res.* 45 (1993), 166-179.
- [178] Diaz-Gonzalez,F., Gonzalez-Alvaro,I., Campanero,M.R., Mollinedo,F., Del Pozo,M.A., Munoz,C., Pivel,J.P., Sanchez-Madrid,F.: Prevention of in vitro neutrophil-endothelial attachment through shedding of L-Selectin by non steroidal antiinflammatory drugs. *J.Clin. Invest.* 95 (1995), 1756-1765.
- [179] Corkill,M.M., Kirkham,B.W., Haskard,D.O., Barbatis,C., Gibson,T., Panayi,G.S.: Gold treatment of rheumatoid arthritis decreases synovial expression of the endothelial leukocyte adhesion receptor ELAM-1. *J. Rheumatol* 18 (1991), 1453-1460.
- [180] Heimbürger,M., Lerner,R., Palmblad,J.: Effect of antirheumatic drugs on adhesiveness of endothelial cells and neutrophils. *Biochem. Pharmacol.* 56 (1998), 1661-1669.
- [181] Bloom,B.J., Miller,L.C., Tucker,L.B., Schaller,J.G., Blier,R.P.: Soluble adhesion molecules in juvenile rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 26 (1999), 2044-2048.
- [182] Blann,A., Kumar,P., Krupinski,J., McCollum,C., Beeves,D.G., Lip,G.Y.: Soluble intercellular adhesion molecular-1, E-Selectin, VCAM-1 and von Willebrand factor in stroke. *Blood-Coagul.-Fibrinolysis* 10 (1999), 277-284.
- [183] Jamar,F., Chapman,P.T., Harrison,A.A., Binns,R.M., Haskard,D.O., Peters,A.M.: Inflammatory arthritis: imaging of endothelial cells activation with an indium-111-labeled F(ab)₂ fragment of anti E-Selectin monoclonal antibody. *Radiology* 194 (1995), 843-850.
- [184] Mulligan,M.S., Warner,R.L., Rittershaus,C.W., Thomas,L.J., Ryan,U.S., Foreman,K.E., Crouch,L.D., Till,G.O., Ward,P.A.: Endothelial targeting and enhanced antiinflammatory effects of complement inhibitors possessing Sialyl Lewis X moieties. *J. Immunol.* 162 (1999), 4952-4959.
- [185] Huang,J., Kim,L.J., Mealey,R., Marsh,H.C., Zhang,Y., Tenner,A.J., Connolly,E.S., Pinsky,D.J.: Neuronal protection in stroke by an sLex-glycosylated complement inhibitory protein. *Science* 285 (1999), 595-599.
- [186] Gregoriadis,G.: The carrier potential of liposomes. *New Engl. J. Med.* 295 (1976), 704-710.
- [187] Papahadjopoulos,D. (Ed.) *Liposomes and their use in biology and medicine.* New York Academy of Science 308 (1978), 1-462.
- [188] Juliano,R., Stamp,D.: Effect of particle size and charge on the clearance of liposomes and liposome-encapsulated drugs. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 63 (1975), 651-658.

- [189] Kirby,C., Clarke,J., Gregoriadis,G.: Effect of the cholesterol content of small unilamellar liposomes on their stability in vitro and in vivo. *Biochem. J.* 186 (1980), 591-598.
- [190] Senior,J., Gregoriadis,G.: Is half-life of circulating small unilamellar liposomes determined by changes in their permeability? *FEBS Lett.* 145 (1982), 109-114.
- [191] Hwang,K.J., Luke,K.F.S., Baumier,P.L.: Hepatic uptake and degradation of unilamellar shingomyelin/cholesterol liposomes: A kinetic study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980), 4030-4034.
- [192] Kleinerman,E.S., Murray,J.L., Synder,J.S., Cunningham,J.E., Fiedler,I.J.: Activation of tumoricidal properties in monocytes from cancer patients following intravenous administration of liposomes containing muramyl tripeptide phosphatidylethanolamine. *Cancer Res.* 49 (1989), 4665-4670.
- [193] Fiedler,I.J.: Systemic activation of macrophages by liposomes containing muramyl tripeptide phosphatidylethanolamine for therapy of cancer metastasis. *J. Liposome Res.* 1 (1990), 461-471.
- [194] Vidal,M., Sainte-Marie,J., Philippot,J.R., Bienvenue,A.: The influence of coupling transferrin to liposomes or minibeads on its uptake and fate in leukemic L2C cells. *FEBS Lett.* 216 (1987), 159-163.
- [195] Spanjer,H.H., vanBerkel,T.J., Scherphof,G., Kempen,H.J.: The effect of a water soluble trigalactoside terminated cholesterol derivative on the in vivo fate of small unilamellar vesicles in rats. *Biochim. Biophys. Acta* 816 (1985), 396-402.
- [196] Leserman,L.D., Barbet,J., Kourilsky,F., Weinstein,J.N.: Targeting to cells of fluorescent liposomes covalently coupled with monoclonal antibody or protein A. *Nature* 288 (1980), 602-604.
- [197] Heath,T.D., Fraley,R.T., Papahadjopoulos,D.: Antibody targeting of liposomes: cell specificity obtained by conjugation of F(ab')₂ to vesicle surface. *Science* 210 (1980), 8015-8018.
- [198] Matthay,K.K., Heath,T.D., Badger,C.C., Bernstein,I.D., Papahadjopoulos,D.: Antibody directed liposomes: comparison of various ligands for association, endocytosis and drug delivery. *Cancer Res.* 46 (1986), 4904-4910.
- [199] Allen,T.M., Chonn,A.: Large unilamellar liposomes with low uptake into the reticuloendothelial system. *FEBS Lett.* 223 (1987), 42-46.
- [200] Allen,T.M., Hansen,C., Rutledge,J.: Liposomes with prolonged circulation times: Factors affecting uptake by reticuloendothelial and other tissues. *Biochim. Biophys. Acta* 981 (1989), 27-35.
- [201] Horstmann,R.F.D., Sieverstein,H.J., Knobloch,J., Fischetti,V.A.: Antiphagocytic activity of streptococcal M protein: Selective binding of complement control protein factor H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988), 1657-1662.
- [202] Blume,G., Cevc,G.: Liposomes for the sustained drug release. *Biochim. Biophys. Acta* 1029 (1990), 91-97.
- [203] Maruyama,K., Yuda,T., Okamoto,A., Ishikura,C., Kojima,S., Iwatsura,M.: Effect of molecular weight in amphipathic polyethyleneglycol on prolonging the circulation time of large unilamellar liposomes. *Chem. Pharm. Bull.* 39 (1991), 1620-1622.
- [204] Allen,T.M., Hansen,C., Martin,F., Redemann,C., Yau-Young,A.: Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* 1066 (1991), 29-36.
- [205] Klibanov,A.L., Maruyama,K., Beckerleg,A.M., Torchilin,V.P., Huang,L.: Activity of amphipathic poly (ethylene glycol) 5000 to prolong the circulation time of liposomes depends on the liposome size and is unfavorable for immunoliposome binding to target. *Biochim. Biophys. Acta* 1062 (1991), 142-148.

- [206] Lasic,D.D., Martin,F.J., Gabizon,A., Huang,S.K., Papahadjopoulos,D.: Sterically stabilized liposomes: A hypothesis on the molecular origin of the extended circulation times. *Biochim. Biophys. Acta* 1070 (1991), 187-192.
- [207] Woodle,M.C., Lasic,D.D.: Sterically stabilized liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* 1113 (1992), 171-199.
- [208] Allen,T.M.: The use of glycolipids and hydrophilic polymers in avoiding rapid uptake of liposomes by the mononuclear phagocyte system. *Adv. Drug Del. Rev.* 13 (1994), 285-309.
- [209] Torchilin,V.P.: How do polymers prolong circulation time of liposomes? *J. Liposome Res.* 6 (1996), 99-116.
- [210] Kenworthy,A.K., Simon,S.A., McIntosh,T.J.: Structure and phase behavior of lipid suspensions containing phospholipids with covalently attached poly (ethylene glycol). *Biophys. J.* 68 (1995), 1903-1920.
- [211] Kenworthy,A.K., Hristova,K., Needham,D., McIntosh,T.J.: Range and magnitude of the steric pressure between bilayers containing phospholipids with covalently attached poly (ethylene glycol). *Biophys. J.* 68 (1995), 1921-1936.
- [212] Kuhl,T.L., Leckband,D.E., Lasic,D.D., Israelachvili,J.N.: Modulation of interaction forces between bilayers exposing short-chained ethylene oxide headgroups. *Biophys. J.* 66 (1994), 1479-1488.
- [213] Needham,D., McIntosh,T.J., Lasic,D.D.: Repulsive interactions and mechanical stability of polymer-grafted lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1108 (1992), 40-48.
- [214] Woodle,M.C., Newman,M.S., Cohen,J.A.: Sterically stabilized liposomes: Physical and biological properties. *J. Drug Targeting* 2 (1994), 397-403.
- [215] Dewhirst,M., Needham,D.: Extravasation of Stealth liposomes into tumors: Direct measurement of accumulation and vascular permeability using a skin flap window chamber. In: *Stealth Liposomes*. Ed. Lasic,D.D., Martin,F. CRC Press Boca Raton, USA 1995, 127-138.
- [216] Vaage,J., Barbera,E.: Tissue uptake and therapeutic effect of Stealth doxorubicin. In: *Stealth Liposomes*. Ed. Lasic,D.D., Martin,F. CRC Press Boca Raton, USA 1995, 149-172.
- [217] Bakker-Woudenberg,I.A.J.M., van Etten,E.W.M.: Long circulating liposomes containing antibacterial and antifungal agents. In: *Medical application of liposomes*. Ed. Lasic,D.D., Papahadjopoulos,D. Elsevier Amsterdam, The Netherlands, 1998, 181-188.
- [218] Harasym,T.O., Tardi,P., Lomman,S.A., Ansell,S.M., Bally,M.B., Cullis,P.R., Choi,L.S.L.: Poly (ethylene glycol)-modified phospholipids prevent aggregation during covalent conjugation of proteins to liposomes. *Bioconj. Chem.* 6 (1995), 187-195.
- [219] Urdal,D.L., Hakamori,S.: Tumor-associated ganglio-N-triosylceramide: Target for antibody-dependent avidin-mediated drug killing of tumor cells. *J. Biol. Chem.* 255 (1980), 10509-10515.
- [220] Agrawal,A.K., Allen,T.M.: Attachment of antibodies to pegylated liposomes by the biotin-avidin-method. *Biophys. J.* 61 (1992), A 493.
- [221] Martin,F.J., Hubbell,W.I., Papahadjopoulos,D.: Immunospecific targeting of liposomes to cells: A novel and efficient method for covalent attachment of Fab' fragments via disulfide bonds. *Biochemistry* 20 (1981), 4229-4238.
- [222] Martin,F.J., Papahadjopoulos,D.: Irreversible coupling of immunoglobulin fragments to preformed vesicles. An improved method for liposome targeting. *J. Biol. Chem.* 257 (1982), 286-288.

- [223] Hansen,C.B., Kao,G.Y., Moase,E.H., Zalipsky,S., Allen,T.M.: Attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes: Evaluation, comparison and optimization of coupling procedures. *Biochim. Biophys. Acta* 1239 (1995), 133-144.
- [224] Chua,M.M., Fan,S.T., Karush,F.: Attachment of immunoglobulins to liposomal membranes via protein carbohydrate. *Biochim. Biophys. Acta* 800 (1984), 291-300.
- [225] Weissig,V., Lasch,J., Klibanov,A., Torchilin,V.P.: A new hydrophobic anchor for the attachment of proteins to liposomal membranes. *FEBS Lett.* 202 (1986), 86-90.
- [226] Bogdanov,A.A., Klibanov,A.L., Torchilin,V.P.: Protein immobilization on the surface of liposomes via carbodiimide activation in the presence of N-hydroxysulfosuccinimide. *FEBS Lett.* 231 (1988), 381-384.
- [227] Ezpelata,I., Irache,S.M., Stainmesse,S., Chabenat,C., Guenguen,I., Orecchioni,A.M.: Preparation of actin-vinculin nanoparticle conjugates using the carbodiimide technique. *Int. J. Pharm.* 142 (1995), 227-233.
- [228] Suzuki,S., Watanabe,S., Masuko,T., Hashimoto,Y.: Preparation of long circulating liposomes containing adriamycin by a novel method to coat immunoliposomes with poly (ethylene glycol). *Biochim. Biophys. Acta* 1245 (1995), 9-16.
- [229] Uster,P.S., Allen,T.M., Daniel,P.E., Mendez,C.Y., Newman,M.S., Zhu,G.Z.: Insertion of poly (ethylene glycol) derivatized phospholipids into preformed liposomes results in prolonged circulation time. *FEBS Lett.* 386 (1996), 243-246.
- [230] Blume,G., Cevc,G., Crommelin,M.D., Bakker-Woudenberg,L.A., Kluft,C., Storm,G.: Specific targeting with poly (ethylene glycol)-modified liposomes: Coupling of homing devices to the ends of the polymeric chains combines effective target binding with long circulation times. *Biochim. Biophys. Acta* 1149 (1993), 180-184.
- [231] Takizawa,T., Maruyama,K., Iwatsuru,M.: Novel immunoliposomes modified with amphipathic polyethyleneglycols conjugated at their distal terminals to monoclonal antibodies. *J. Liposome Res.* 6 (1996), 261.
- [232] Maruyama,K., Takizawa,T., Yuda,T., Kennel,S.J., Huang,L., Iwatsuru,M.: Targetability of novel immunoliposomes modified with amphipathic poly (ethylene glycol)s conjugated at their distal terminals to monoclonal antibodies. *Biochim. Biophys. Acta* 1234 (1995), 74-80.
- [233] Zalipsky,S.: Synthesis of end-group functionalized polyethylene glycol-lipid conjugates for preparation of polymer-grafted liposomes. *Bioconj. Chem.* 4 (1993), 296-299.
- [234] Allen,T.M., Brandeis,E., Hansen,C.B., Kao,G.Y., Zalipsky,S.: A new strategy for attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes resulting in efficient targeting to cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1237 (1995), 99-108.
- [235] Maruyama,K., Takizawa,T., Takahashi,N., Tagawa,T., Nagaike,K., Iwatsuru,M.: Factors influencing longevity and target binding of PEG-immunoliposomes conjugated antibodies at PEG's terminals. *J. Liposome Res.* 6 (1996), 206-207.
- [236] Morgan,E.L.: Biological activities residing in the Fc region of immunoglobulins. *Adv. Immunol.* 40 (1987), 61-134.
- [237] Ravetch,J.V., Kinet,J.P.: Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 9 (1991), 457-492.
- [238] Emanuel,N., Kedar,E., Bolotin,E.M., Smorodinsky,N., Barenholz,Y.: Preparation and characterization of doxorubicin-loaded sterically stabilized immunoliposomes. *Pharm Res.* 13 (1996), 352-359.
- [239] Courtenay-Luck,N.S., Epenetos,A.A., Moore,R., Larche,M., Pecatasides,D., Ritter,M.A.: Development of primary and secondary immune responses to mouse monoclonal antibodies used in the diagnosis and therapy of malignant neoplasm. *Canc. Res.* 46 (1986), 6489-6493.
- [240] Phillips,N.C., Gagne,L., Tsoukas,C., Dahman,J.: Immunoliposome targeting to murine CD4⁺ leukocytes is dependent on immune status. *J. Immunol.* 152 (1994), 3168-3174.

- [241] Phillips,N.C., Dahman,J.: Immunogenicity of immunoliposomes: reactivity against species-specific IgG and liposomal phospholipids. *Immunol. Lett.* 45 (1995), 149-152.
- [242] Harding,J.A., Engbers,C.M., Newman,M.S., Goldstein,N.I., Zalipsky,S.: Immunogenicity and pharmacokinetic attributes of poly (ethylene glycol)-grafted immunoliposomes. *Biochim. Biophys. Acta* 1327 (1997), 181-192.
- [243] Ahmad,I., Allen,T.M.: Antibody-mediated specific binding and cytotoxicity of liposome-entrapped doxorubicin to lung cancer cells in vitro. *Cancer Res.* 52 (1992), 4817-4820.
- [244] Kirpotin,W., Park,J.W., Hong,K., Zalipsky,S., Li,W.L., Carter,P., Benz,C.C., Papahadjopoulos,D.: Sterically stabilized anti HER-2 immunoliposomes: Design and targeting to human breast cancer cells in vitro. *Biochemistry* 36 (1997), 66-75.
- [245] Park,J.W., Hong,K., Carter,P., Kotts,C., Shalaby,R., Giltinan,D., Wirth,C., Asgari,H., Wod,W.I., Papahadjopoulos,D., Benz,C.: Development of anti-HER-2-immunoliposomes for breast cancer chemotherapy. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 12 (1993), 118.
- [246] Koning,G.A., Gorter,A., Scherphof,G.L., Kamps,J.A.: Antiproliferative effect of immunoliposomes containing 5-fluorodeoxyuridine-dipalmitate on colon cancer cells. *Br. J. Cancer* 80 (1999), 1718-1725.
- [247] Koning,G.A., Morselt,H.W., Velinova,M.J., Donga,J., Allen,T.M., Zalipsky,S., Kamps,J.A., Scherphof,G.L.: Selective transfer of a lipophilic prodrug of 5-fluorodeoxyuridine from immunoliposomes to colon cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1420 (1999), 153-167.
- [248] Maruyama,K., Kennel,S.J., Huang,L.: Lipid composition is important for highly efficient target binding and retention of immunoliposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990), 5744-5748.
- [249] Ahmad,I., Longenecker,M., Samuel,J., Allen,T.M.: Antibody-targeted delivery of doxorubicin-entrapped in sterically stabilized liposomes can eradicate lung cancer in mice. *Canc. Res.* 53 (1993), 1484-1488.
- [250] Kirpotin,W., Park,J.W., Hong,K., Keller,G., Benz,C.C., Papahadjopoulos,D.: Binding and endocytosis of sterically stabilized anti HER-2 immunoliposomes by human breast cancer cells. *Proc. Am. Assoc. Canc. Res.* 37 (1996), 3186.
- [251] Yanagie,H., Tomita,T., Kobayashi,H., Fujii,Y., Nonaka,Y., Saegusa,Y., Hasumi,K., Eriguchi,M., Kobayashi,T., Ono,K.: Inhibition of human pancreatic cancer growth in nude mice by boron neutron capture therapy. *Br. J. Canc.* 75 (1997), 660-665.
- [252] Emanuel,N., Kedar,E., Bolotin,E.M., Smorodinsky,N., Barenholz,Y.: Targeted delivery of doxorubicin via sterically stabilized immunoliposomes: Pharmacokinetics and biodistribution in tumor-bearing mice. *Pharm. Res.* 13 (1996), 861-868.
- [253] Nam,S.M., Kim,H.S., Ahn,W.S., Park,Y.S.: Sterically stabilized anti-GM3, anti Lex immunoliposomes: Targeting to B16BL6, HRT-18 cancer cells. *Oncology Res.* 11 (1999), 9-16.
- [254] Storm,G., Vingerhoeds,M.H., Crommelin,D.J.A., Haisma,H.J.: Immunoliposomes bearing enzymes (Immunoenzymosomes) for site-specific activation of anticancer prodrugs. *Adv. Drug Del. Rev.* 24 (1997), 225-231.
- [255] Ho,R.J.Y., Rouse,B.T., Huang,L.: Target-sensitive immunoliposomes; preparation and characterization. *Biochemistry* 25 (1986), 5500-5506.
- [256] Ho,R.J.Y., Rouse,B.T., Huang,L.: Target-sensitive immunoliposomes as an efficient drug carrier for antiviral activity. *J. Biol. Chem.* 262 (1987), 13973-13978.
- [257] Pinnaduwaage,P., Huang,L.: Stable target-sensitive immunoliposomes. *Biochemistry* 31 (1992), 2850-2855.

- [258] Ciechanover,A., Schwartz,A.L., Dautry-Vasat,A., Lodish,H.F.: Kinetics of internalization and recycling of transferrin and the transferrin receptor in a human hepatoma cell line. *J. Biol. Chem.* 258 (1983), 9681-9689.
- [259] Lundberg,B., Hong,K., Papahadjopoulos,D.: Conjugation of apolipoprotein B with liposomes and targeting to cells in culture. *Biochim. Biophys. Acta* 1149 (1993), 305-312.
- [260] Lee,R.J., Low,P.S.: Folate-mediated tumor cell targeting of liposome-entrapped doxorubicin in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* 1233 (1995), 134-144.
- [261] Scherphof,G.L., Velinova,M., Kamps,J., Donga,J., van der Want,H., Kuipers,F., Havekes,L., Daemen,T.: Modulation of pharmacokinetic behavior of liposomes. *Adv. Drug Del. Rev.* 24 (1997), 179-191.
- [262] Schmid,S.L., Fuchs,R., Male,P., Mellman,I.: Two distinct subpopulations of endosomes involved in membrane recycling and transport to lysosomes. *Cell* 52 (1988), 73-83.
- [263] Collins,D., Litzinger,D.C., Huang,L.: Structural and functional comparisons of pH-sensitive liposomes composed of phosphatidylethanolamine and three different diacylsuccinylglycerols. *Biochim. Biophys. Acta* 1025 (1990), 234-242.
- [264] Collins,D., Maxfield,F., Huang,L.: Immunoliposomes with different acid sensitivities as probes for the cellular endocytic pathway. *Biochim. Biophys. Acta* 987 (1989), 47-55.
- [265] Düzgünes,N., Straubinger,R.M., Baldwin,P.A., Papahadjopoulos,D.: pH-sensitive liposomes: Introduction of foreign substances into cells. In: *Membrane fusion*. Ed.: Wilschut,J., Hoeckstra,D., Marcel Dekker Inc. 1991, 713-730.
- [266] Slepishkin,V.A., Simoes,S., Dazin,P., Newman,M.S., Guo,L.S., Pedrosa de Lima,M.C., Düzgünes,N.: Sterically stabilized pH-sensitive liposomes: Intracellular delivery of aqueous contents and prolonged circulation in vivo. *J. Biol. Chem.* 272 (1997), 2382-2388..
- [267] Spragg,D.D., Alford,D.R., Greferath,R., Larsen,C.E., Lee,K.D., Gurtner,G.C., Cybulsky,M.I., Tosi,P.F., Nicolau,C., Gimbrone,M.A.: Immunotargeting of liposomes to activated vascular endothelial cells: A strategy for site-selective delivery in the cardiovascular system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997), 8795-9800.
- [268] Weissig,V.: Methoden zur Darstellung funktionalisierter Liposomen mit Adjuvaneffekt. Habilitation, Martin-Luther-Universität Halle, 1991.
- [269] Gege,C., Vogel,J., Bendas,G., Rothe,R. 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.
- [270] Hummel,G., Schmidt,R.R.: A versatile synthesis of the lactoneo-series antigen-Synthesis of the Sialyl dimer Lewis X and Dimer Lewis Y. *Tetrahedron Lett.* 38 (1997), 1173-1176.
- [271] 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.
- [272] Peterson,G.L.: *Analytical Biochemistry* 83 (1977), 346-356.
- [273] Ames,B.N., Dubin,D.T.: The role of polyamines in the neutralization of Bacteriophage deoxyribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* 235 (1960), 769-775
- [274] Heinzl,G., Woloszak,R., Thomann,P.: Topfit Version 2.0: Pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis system for the PC. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1993.
- [275] Rohde,C.: Fluorimetrische Charakterisierung der endozytotischen Aufnahme von Liposomen durch Endothelzellen unter Entzündungsbedingungen. Diplomarbeit, FB Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle, 1999.

- [276] Doroszewski,J., Skierski,J., Pradka,L.: Interaction of neoplastic cells with glass surface under flow conditions. *Exp. Cell Res.* 104 (1977), 335-343.
- [277] Lawrence,M.B., McIntire,L.V., Eskin,S.G.: Effect of flow on polymorphonuclear leukocyte/endothelial cell adhesion. *Blood* 70 (1987), 1284-1290.
- [278] Kalb,E., Frey,S., Tamm,L.K.: Formation of supported bilayers by fusion of vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 1103 (1992), 307-316.
- [279] Brink,G., Schmitt,L., Tampe`R., Sackmann,E.: Self assembly of covalently anchored phospholipid supported membranes by use of DODA-Suc-NHS-lipids. *Biochim. Biophys. Acta* 1196 (1994), 227-230.
- [280] Tamm,L.K., McConnell,H.M.: Supported phospholipid bilayers. *Biophys. J.* 47 (1985), 105-113.
- [281] Vogel,J.: Aufklärung der molekularen Mechanismen des Selektin-vermittelten Leukozytenrollens als Grundlage für eine antiinflammatorische Therapie. Dissertation (in Vorb.), FB Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle, 2000.
- [282] Tamm,L.K.: Lateral diffusion and fluorescence microscope studies on a monoclonal antibody specifically bound to supported phospholipid bilayers. *Biochemistry* 27 (1988), 1450-1457.
- [283] Lewis,S.D., Shafer,J.A., Goldstein,I.J.: Kinetic parameters for the binding of p-Nitrophenyl a-D-Mannopyranoside to Concanavalin A. *Arch. Biochem. Biophys.* 172 (1976), 689-695.
- [284] Bendas,G., Vogel,J., Bakowsky,U., Krause,A., Müller,J., Rothe,U.: A liposome-based model system for the simulation of lectin-induced cell adhesion. *Biochim. Biophys. Acta* 1325 (1997), 297-308.
- [285] Bakowsky,U., Rettig,W., Bendas,G., Vogel,J., Bakowsky,H., Rothe,U.: Characterization of the interactions between various alkylmannoside/phospholipid model membranes with the mannose-specific binding lectin Concanavalin A. *Ber. Buns. Ges. (in Druck)*.
- [286] Gorog,P., Born,G.V.R.: Increased adhesiveness of granulocytes in rabbit ear chamber blood vessels perfused with neuraminidase. *Microvasc. Res.* 23 (1980), 380-384.
- [287] Naismith,J.H., Field,R.A.: Structural basis of trimannoside recognition of concanavalin A. *J. Biol. Chem.* 271 (1996), 972-976.
- [288] Liebau,M., Bendas,G., Rothe,U., Neubert,R.H.H.: Adhesive interactions of liposomes with supported planar bilayers on QCM as a new adhesion model. *Sensors and Actuators B* 47 (1998), 239-245.
- [289] 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. *Biochim. Biophys. Acta* 1372 (1998), 205-215.
- [290] Symington,F.W., Hedges,D.L., Hakamori,S.I.: *J. Immunol.* 134 (1985), 2498-2506.
- [291] Rosch,M.: *Kolloid-Z.* 146 (1956), 80-82.
- [292] Ohmoto,H., Nakamura,K., Inoue,T., Kondo,N., Inoue,Y., Yoshino,K., Kondo,H., Ishida,H., Kiso,M., Hasegawa,A.: Studies on selectin blockers 1: Structure activity relationships of Sialyl Lewis^X analogs. *J. Med. Chem.* 39 (1996), 1339-1343.
- [293] Hiramatsu,Y., Tsujishita,H., Kondo,H.: Studies on selectin blockers 3: Investigation of the carbohydrate ligand of Sialyl Lewis^X recognition site of P-Selectin. *J. Med. Chem.* 39 (1996), 4547-4553.
- [294] 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.
- [295] 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. Carbohydrate Chem.* 17 (1998), 453-470.
- [296] Ikami,T., Tomiya,N., Morimoto,T., Iwata,N., Yamashita,R., Jomori,T., Usui,T., Suzuki,Y., Tanaka,H., Miyamoto,D., Ishida,H., Hasegawa,A., Kiso,M.: Synthetic studies on selectin ligands/inhibitors: Synthesis and biological activity of the sulfated and phosphorylated multivalent β -D-Galactopyranosides containing fatty alkyl residues. *J. Carbohydrate Chem.* 17 (1998), 499-518.
- [297] Ikami,T., Tsuruta,N., Inagaki,H., Kakigami,T., Matsumoto,Y., Tomiya,N., Jomori,T., Usui,T., Suzuki,Y., Tanaka,H., Miyamoto,D., Ishida,H., Hasegawa,A., Kiso,M.: Synthetic studies on selectin ligands/inhibitors: Synthesis and biological evaluation of sulfated and phosphorylated β -D-Galacto- and Lactopyranosides containing fatty alkyl residues of different carbon chain length. *Chem. Pharm. Bull.* 46 (1998), 797-806.
- [298] Ley,K., Cerrito,M., Arfors,K.E.: Sulfated polysaccharides inhibit leukocyte rolling in rabbit mesentery venules. *Am. J. Physiol.* 260 (1991), H1667-H1673.
- [299] Ley,K., Linnemann,G., Meinen,M., Stollman,L.M., Gaetgens,P.: Fucoidin, but not yeast polyphosphomannan PPME inhibits leukocyte rolling in venules of the rat mesentery. *Blood* 81 (1993), 177-185.
- [300] Bertozzi,C.R., Fukuda,S., Rosen,S.D.: Sulfated disaccharide inhibitors of L-Selectin: Deriving structural leads from a physiological Selectin ligand. *Biochemistry* 44 (1995), 14271-14278.
- [301] Schmidt,R.: Darstellung und Charakterisierung von Antikörper-gekoppelten Liposomen für deren gezielte Anreicherung an Adhäsionsrezeptoren. Diplomarbeit, FB Pharmazie, Halle, 1997.
- [302] Jackson,C.J., Charlton,J.L., Kuzminski,K., Lang,G.M., Schon,A.H.: Synthesis, isolation and characterization of conjugates of ovalbumin with monomethoxypolyethyleneglycol using cyanuric chloride as a coupling agent. *Anal. Biochem.* 165 (1987), 114-127.
- [303] Suzuki,T., Kanbara,N., Tomono,T., Hayashi,N., Shinohara,I.: Physicochemical and biological properties of poly(ethylene glycol)-coupled immunoglobulin G. *Biochim. Biophys. Acta* 788 (1984), 248-255.
- [304] Rydzynski,K., Jedrychowski,R.: Sensory irritating properties of cyanuric chloride as revealed with plethysmographic method. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health.* 7 (1994), 149-154.
- [305] Wyszynska,K., Przybojewska,B., Spiechowicz,E., Chwialkowska-Liro,W., Dziubaltowska,E., Rydzynski,K.: Cyanuric chloride has no genotoxic and mutagenic properties in bacteria and bone marrow cells. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health.* 7 (1994), 281-289.
- [306] Bendas,G., Krause,A., Bakowsky,U., Vogel,J., Rothe,U.: Targetability of novel immunoliposomes prepared by a new antibody conjugation technique. *Int. J. Pharm.* 181 (1999), 79-93.
- [307] Fritz,J., Anselmetti,D., Jarchow,J., Fernandez-Busquets,X.: Probing single biomolecules with atomic force microscopy. *J. Struct. Biol.* 119 (1997), 165-171.
- [308] Phillips,N.C., Emili,A.: Immunogenicity of immunoliposomes. *Immunol. Lett.* 30 (1991), 291-296
- [309] Phillips,N.C., Emili,A.: Enhanced antibody response to liposome-associated proteins: Preferential stimulation of IgG2a/IgG2b production. *Vaccine* 10 (1992), 151-158
- [310] Alving,C.R.: Immunological aspects of liposomes: Presentation and processing of liposomal protein and phospholipid antigens. *Biochim. Biophys. Acta* 1113 (1992), 307-322.
- [311] Alving,C.R.: Natural antibodies against phospholipids and liposomes in human. *Biochem. Soc. Trans.* 12 (1984), 342-344.

- [312] Dams,E.T.M., Laverman,P., Oyen,W.J.G., Storm,G., Scherphof,G.L., van der Meer,J.W.M, Corstens,F.H.M., Boerman,O.C.: Accelerated blood clearance and altered biodistribution of repeated injections of sterically stabilized liposomes. *J. Pharm. Exp. Therap.* 292 (2000), 1071-1079.
- [313] Devine,D.V., Marjan,J.M.: The role of immunoproteins in the survival of liposomes in the circulation. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 14 (1997), 105-131.
- [314] Liu,D.,Hu,Q., Song,Y.K.: Liposome clearance from blood: different animal species have different mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* 1240 (1995), 277-284.
- [315] Bloemen,P.G.M., Henricks,P.A.J., van Bloois,L., van den Tweel,M.C., Bloem,A.C., Nijkamp,F.P., Crommelin,D.J.A., Storm,G.: Adhesion molecules: a new target for immunoliposome-mediated drug delivery. *FEBS Lett.* 357 (1995), 140-144.
- [316] Krause,A.: Selektin-gerichtete Immunoliposomen als neuartiges Prinzip einer antiinflammatorischen Therapie. Dissertation (in Vorb.), FB Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle, 2000.
- [317] Peter,A.M.: The use of nuclear medicine in infections. *Br. J. Radiol.* 71 (1998), 252-261.
- [318] Tedgui,A.: Endothelial permeability under physiological and pathological conditions. *Prostagl. Leukotriens, Essential Fatty Acids* 54 (1996), 27-29.
- [319] Hartung,B.: Darstellung und Charakterisierung targetsensitiver Immunoliposomen mit sterischer Stabilisierung. Diplom, FB Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle, 2000.
- [320] Straubinger,R.M., Papahadjopoulos,D., Hong,K.: Endocytosis and intracellular fate of liposomes using Pyranine as a probe. *Biochemistry* 29 (1990), 4929-4939.
- [321] Pan,L.F., Kreisle,R.A., Shi,Y.D.: Expression of endothelial IgG-Fc receptors and markers on various cells. *Chin. Med. J.* 112 (1999), 157-161.
- [322] Kirpotin,D.B., Park,J.W., Hong,K., Shao,Y., Colbern,G., Zheng,W., Meyer,O., Benz,C.C., Papadahjopoulos,D.: Targeting of sterically stabilized liposomes to cancer overexpressing HER2/neu proto-oncogene. In: *Medical application of liposomes*. Ed. Lasic,D.D., Papahadjopoulos,D. Elsevier Amsterdam, The Netherlands, 1998, 325-345.
- [323] Mastrobattista,E., Storm,G., van Bloois,L., Rezka,R., Bloemen,P.G.M., Crommelin,D.J.A., Henricks,P.A.J.: Cellular uptake of liposomes targeted to intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on bronchial epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1419 (1999), 353-363.
- [324] Kamps,J.A., Morselt,H.W., Swart,P.J., Meijer,D.K., Scherphof,G.L.: Massive targeting of liposomes, surface modified with anionized albumins, to hepatic endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997), 11681-11685.
- [325] Dini,L., Falasca,L., Ruzzittu,M.T.: Interaction between isolated and purified liver cells and small unilamellar liposomes. *Liver* 18 (1998), 229-238.
- [326] McIntyre,J.C., Sleight,R.G. Fluorescence assay for phospholipid membrane asymmetry. *Biochemistry* 30 (1991), 11819-11827.
- [327] Defazio,G., Ribatti,D., Nico,B., Ricchinti,F.: Endocytosis of horshradish peroxidase by brain microvascular and umbilical vein endothelial cells in culture: An ultrastructural and morphometric study. *Brain Research Bulletin* 43 (1997), 467-472.
- [328] Ishiwata,H., Sato,S.B., Kobayashi,S., Oku,M.: Polyethyleneglycol derivative of cholesterol reduces binding step of liposome uptake by murine macrophage like cell line J 774 and human hepatoma cell line Hep G2. *Chem. Pharm. Bul.* 46 (1998), 1907-1913.

Eigene Veröffentlichungen mit einem direkten Bezug zu dieser Arbeit

Bendas,G., Vogel,J., Bakowsky,U., Krause,A., Müller,J., Rothe,U. A liposome-based model system for the simulation of lectin-induced cell adhesion. *Biochim. Biophys. Acta* 1325 (1997), 297-308.

Geyer,A., Reinhardt,S., Bendas,G., Rothe,U., Schmidt,R.R. C2-symmetric Lewis antigen mimetics exhibiting the common structural motif. *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997), 11707-11708.

Bendas,G., Krause,A., Schmidt,R., Vogel,J., Rothe,U. Selectins as new targets for immunoliposome-mediated drug delivery- A potential way of antiinflammatory therapy. *Pharm. Acta Helv.* 73 (1998), 19-26.

Liebau,M., Bendas,G., Rothe,U., Neubert,R.H.H. Adhesive interactions of liposomes with supported planar bilayers on QCM as a new adhesion model. *Sensors and Actuators B* 47 (1998), 239-245.

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. *Biochim. Biophys. Acta* 1372 (1998), 205-215.

Bendas,G.,Krause,A., Bakowsky,U., Vogel,J., Rothe,U. Targetability of novel immunoliposomes prepared by a new antibody conjugation technique. *Int. J. Pharm.*181 (1999), 79-93.

Liebau,M., Hildebrand,A., Bendas,G., Rothe,U., Neubert,R.H.H. Entwicklung eines Bioadhäsionsmodells auf der Basis der Quarzmikrobalance für die Charakterisierung pharmazeutischer Vehikelsysteme, *Pharm. Ind.* 5 (1999), 459-462 (Teil 1),

Pharm. Ind. 6 (1999), 558-563 (Teil 2).

Bendas,G. Selektine als neue Zielstrukturen für die Pharmaforschung. *Pharmazeutische Zeitung* 46 (1999), 10-16.

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.

Buchartikel:

Bendas,G. Advances and Concepts in Immunoliposome Development. In: *Therapeutic Antibody Technology*. Ed. Steplewsky,Z., Kieber-Emmons,T. Marcel Dekker, New York, 2000 (in Präp).

Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. Peter Nuhn sehr herzlich für seine Förderung und für sein Interesse an meiner Arbeit sowie für die mir von ihm gewährte Freiheit bei meiner wissenschaftlichen Tätigkeit am Institut für Pharmazeutische Chemie des Fachbereiches Pharmazie.

Mein außerordentlicher Dank gilt Herrn PD Dr. Ulrich Rothe. In unserer Zusammenarbeit und bei der Betreuung unserer gemeinsamen Projekte wurde mir durch seine Erfahrungen, seine Kreativität und Kritiken und durch seine Aufgeschlossenheit neuartigen wissenschaftlichen Fragestellungen gegenüber viel Wissen zuteil. Ich danke ihm für die kollegiale und freundschaftliche Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Selektine sehr herzlich.

Ich bedanke mich sehr herzlich bei den beiden Doktoranden, die ich im Rahmen unseres Projektes im Sonderforschungsbereich betreuen durfte. Dipl. Pharm. Annett Krause und Dipl. Pharm. Jan Vogel sei für ihre hohe Sachkompetenz, ihre Motivation und ihre freundschaftliche und kollegiale Zusammenarbeit bei der Durchführung ihrer Studien außerordentlich gedankt.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Dr. Udo Bakowsky für die Durchführung der AFM-Untersuchungen und für die angeregten Diskussionen zu physiko-chemischen Fragestellungen.

Ich danke Frau Ursula Goder für ihre exzellente wissenschaftliche Assistenz bei allen Zelluntersuchungen sehr herzlich.

Mein großer Dank richtet sich an Professor Dr. Gerrit Scherphof sowie Dr. Jan Kamps und Henriette Morselt des Department of Physiological Chemistry, Rijksuniversiteit Groningen für die Ermöglichung eines Arbeitsaufenthaltes an ihrem Institut, für die freundschaftliche Aufnahme und für die wissenschaftliche Kooperation und Unterstützung.

Ich danke Herrn Professor Dr. Richard R. Schmidt, Fachbereich Chemie der Universität Konstanz sowie seinem Doktoranden Dipl. Chem. Christian Gege für unsere Kooperation sehr herzlich. Die im Rahmen dieser Zusammenarbeit hergestellten synthetischen Glykoside haben einen wichtigen inhaltlichen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet.

Ich danke allen Diplomanden, die in der Zeit dieser Arbeit in unserer Arbeitsgruppe tätig waren. Stellvertretend für sie alle sei Ragna Schmidt, Mario Bandulik, Carla Rohde, Britta Hartung sowie Stephan Peer gedankt, da Aspekte ihrer Diplomarbeiten in der hier vorgestellten Arbeit Verwendung fanden.

Stellvertretend für alle Mitarbeiter des Institutes für Pharmazeutische Chemie sei Herrn Professor Dr. Bodo Dobner für seine Diskussions- und Hilfsbereitschaft bei chemisch synthetischen Fragestellungen sehr herzlich gedankt.

Mein Dank richtet sich an Dr. Maik Liebau und Herrn Professor Dr. Reinhard Neubert für die Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Quarzmikrobalance.

Diese Arbeit wurde im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 197 angefertigt. Daher möchte ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung und Ausstattung sehr herzlich danken.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, daß ich die vorliegende Habilitationsschrift 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, April 2000

Lebenslauf

geboren am 01.11. 1964 in Naumburg

Schulbildung:

1971-1979 6. Polytechnische Oberschule Naumburg
1979-1983 Erweiterte Oberschule Naumburg, Abschluss mit Abitur

Nov. 1983-
April 1985 Grundwehrdienst

Berufsausbildung:

Mai 1985-
August 1985 Praktikumstätigkeit, Pharmazeutisches Zentrum Naumburg
September 1985-
August 1990 Studium der Pharmazie an der Martin-Luther-Universität Halle
Abschluß als Diplompharmazeut
April 1991 Approbation als Apotheker
1990-1994 Doktorandentätigkeit am Institut für Pharmazeutische Chemie, FB
Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle
Mai 1994 Promotion zum Dr. rer. nat. unter Leitung von Prof. Dr. P. Nuhn
Mit einer Arbeit unter dem Titel: „ Stabilisierung von Liposomen durch
freie und membrangebundene Zucker im Lyophilisationsprozeß“
September 1994- Tätigkeit als wissenschaftlicher Assistent im Institut für
Pharmazeutische Chemie am Fachbereich Pharmazie, Martin-Luther-
Universität Halle
Mai/Juni 1999 Wissenschaftlicher Aufenthalt an der Rijksuniversiteit Groningen
(Niederlande) am Institut für Physiologische Chemie (Prof. Dr. G.
Scherphof)