

Aus der Abteilung für Neonatologie, Universitätsklinikum Charité,  
Campus Virchow-Klinikum (Leiter: Prof. Dr. med. M. Obladen)  
Otto-Heubner-Centrum für Kinder- und Jugendmedizin

Sprecher: Prof. Dr. med. E. L. Grauel  
Humboldt-Universität zu Berlin

## DISSERTATION

# **Messung L-Selektin-abhängiger Adhäsionsprozesse mit Hilfe eines homotypischen Aggregationsassays**

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin  
vorgelegt von: Alexander Gratopp

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. R. Felix

Gutachter: 1. PD Dr. D. Fröhlich  
2. Prof. Dr. med. M. Obladen  
3. Prof. Dr. med. R. Tauber

eingereicht: 13.09.1999  
Datum der Promotion: 17.06.2000

## Abstract

In bestimmten klinischen Situationen, etwa nach einer Ischämie mit nachfolgender Reperfusion (Myokardinfarkt) oder bei der Entwicklung einer Schocklunge, kann es zu einer überschießenden Extravasation von Leukozyten in das umliegende Gewebe kommen, die eine zusätzliche Gewebeschädigung hervorruft. In Tierexperimenten ließen sich durch eine pharmakologische Blockade des Adhäsionsmoleküls L-Selektin (CD62L) protektive Effekte erzielen, in dem der durch die Leukozyten bedingte sekundäre Gewebeschaden reduziert oder sogar ganz verhindert wurde. Zur Entwicklung von klinisch einsetzbaren L-Selektin-Antagonisten wurde hier als Zielsetzung nach einem Assayverfahren gesucht, mit dem sich in kleinen Probenvolumina und mit hohen Durchsatzzahlen die relative Wirksamkeit von L-Selektin-Antagonisten quantifizieren lässt. Als Korrelat der L-Selektin-abhängigen Bindung von Leukozyten an bereits wandständig arretierte Leukozyten wurde dazu die homotypische Aggregation von humanen Granulozyten unter Scherkraftbedingungen *in vitro* näher untersucht. Nach Optimierung zahlreicher Variablen konnte mit Hilfe dieses Assayverfahren in spezifischer Weise die *in vitro*-Aggregatbildung von humanen neutrophilen Granulozyten durch Antikörper gegen L-Selektin und lösliches L-Selektin vermindert werden. Saure Kohlenhydratpolymere mit L-Selektin-bindenden Eigenschaften (Fucoidin, hochmolekulares Dextransulfat, Heparine) ließen ebenfalls eine Hemmung der Aggregation erkennen. Allerdings gestaltete sich der Aggregationsassay mit menschlichen neutrophilen Granulozyten, trotz Entwicklung eines durchflußzytometrischen Auswertungsverfahrens, als sehr arbeitsaufwendig und erlaubte letztlich nur einen geringen Probendurchsatz. Insgesamt ist das Verfahren der homotypischen Aggregation mit frisch isolierten humanen Granulozyten für ausgewählte experimentelle Fragestellungen einsetzbar, während seine Brauchbarkeit für größere Serienuntersuchungen verneint werden muss.

Schlagworte: L-Selektin – Leukozyten – homotypische Aggregation – Adhäsionsmoleküle

## Abstract

Ischemia followed by reperfusion, as happens in myocardial infarction, or the development of acute respiratory distress syndrome, are associated with an exaggerated extravasation of leukocytes into the surrounding tissue, which may cause severe bystander damage. In animal models of these diseases, pharmacological blockage of the leukocyte adhesion molecule, L-selectin (CD62L), has been shown to be partially protective by reduction or inhibition of leukocyte-mediated secondary tissue damage. The aim of this project was the development of an *in vitro* assay to investigate the relative effectiveness of potential L-selectin antagonists. Ideally, the assay should require low sample volumes and allow for measurements of larger series of reagents. The assay system investigated was based on the homotypic granulocyte aggregation under shear stress, which mimics the L-selectin-dependent adhesion of leukocytes to previously arrested neutrophils on vascular endothelium. After optimizing numerous variables of the aggregation assay, the requirement of L-selectin for the homotypic granulocyte aggregation induced was demonstrated by inhibition experiments using soluble L-selectin or monoclonal antibodies directed against the lectin domain of L-selectin. Several carbohydrate polymers with L-selectin binding properties, such as the seaweed-derived fucose polymer fucoidin, high-molecular-weight dextran sulfate or heparin, also inhibited neutrophil aggregation in a dose-dependent fashion. However, despite employing a flow cytometry-based read-out technique, the assay remained extremely labor intensive, precluding investigations of extended series. Therefore, the homotypic aggregation experiments with freshly isolated human granulocytes remains a useful tool to further evaluate specific questions of L-selectin dependent adhesion processes, but it is not apt for transfer into routine laboratories.

Keywords: L-Selectin – Leukocytes – homotypic aggregation – adhesion molecules

## Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Michael Obladen, der es mir ermöglichte, unter seiner Leitung im Labor für Neonatologie dieses Promotionsvorhaben zu realisieren und mir damit zu meinen ersten wissenschaftlichen Gehversuchen auf dem Gebiet der Immunologie verholfen hat.

Ganz besonderen Dank möchte ich auch meinem Betreuer Herrn Priv. Doz. Dr. med. Christoph Bühner aussprechen, ohne dessen phantastische Betreuung und Unterstützung eine Verwirklichung dieses Promotionsvorhabens nicht denkbar gewesen wäre. Nicht nur seine wissenschaftliche Betreuung in allen denkbaren Fragestellungen, sondern auch seine persönliche und freundschaftliche Zuwendung haben mir geholfen, die Höhen und Tiefen des "Forscherdaseins" zu meistern.

Bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Neonatologie-Labors. Dabei sei besonders Herr Doz. Dr. rer. nat. Dietger Stibenz erwähnt, dem ich von ganzem Herzen für all seine Hinweise und Anregungen sowie seine Hilfestellungen danke, die er mir im Zusammenhang mit der Entwicklung des Aggregationsassays gegeben hat. So danke ich außerdem Frau Evelyn Strauß, die immer bereit war, mir in labortechnischen Fragen mit Rat und Tat zur Seite zu stehen. Für seine Hilfe bei allen Problemen der computergestützten Auswertung und Darstellung möchte ich mich des weiteren bei Herrn Boris Metze bedanken.

Sehr herzlich danken möchte ich auch Frau Lucia Badiali (Abteilung für Hämatologie und Onkologie, Kinderklinik Charité), die mir mit großem Engagement bei der Betreuung der Zellkulturen half und mir oft mit ihren Hinweisen bei der Lösung von Problemen im Zusammenhang mit der Durchflußzytometrie zur Verfügung stand.

Für die Bereitstellung von Reagentien und Proben sowie für die fruchtbare Kooperation im Rahmen des LAR Projekts bedanke ich mich gern bei Dipl. Biol. Claudia Fieger, Dr. rer. nat. Bärbel Volz, Dr. rer. nat. Sonja Emig (Abt. für Klinische Chemie und Biochemie, Klinikum Benjamin Franklin FU Berlin) und Dr. rer. nat. Nils Peter Debus (Institut für Diagnostikforschung Berlin).

Promotionsvorhaben: Alexander Gratopp:

**Messung L-Selektin-abhängiger Adhäsionsprozesse mit Hilfe eines homotypischen Aggregationsassays**

**Erklärung an Eides Statt**

Die hier vorliegende Dissertation wurde von mir, Alexander Gratopp, selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfaßt. Die Dissertation stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar. Ich versichere, daß die die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, 26.07.2000

Alexander Gratopp

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Verzeichnis wiederkehrender Abkürzungen</b>	<b>7</b>
<b>2. Zusammenfassung</b>	<b>8</b>
<b>3. Einleitung</b>	<b>10</b>
3.1 Einführung	10
3.2 Problemstellung	12
3.3 Fragestellung	13
<b>4. Methoden</b>	<b>15</b>
4.1 Verwendete Antikörperpräparationen (DREG 200 Fab)	15
4.2 Untersuchungsmaterial und Zellgewinnung	16
4.3 Der homotypische Aggregationsassay	17
4.4 Durchflußzytometrie	18
4.4.1 Bestimmung der L-Selektin-Expression	18
4.4.2 Bestimmung der Aggregation	20
<b>5. Ergebnisse mit Kommentar</b>	<b>22</b>
5.1 Homotypische Neutrophilenaggregation	22
5.1.1 Kalzium/Magnesiumionen- und Scherkraftabhängigkeit	22
5.1.2 Saure Kohlenhydratpolymere als Inhibitoren der Aggregation	27
5.1.3 Monoklonale Anti-CD62L- und Anti-CD18-mAb als Inhibitoren	30
5.2 Einsatz von Jurkat-Zellen im Aggregationsassay	32
<b>6. Diskussion</b>	<b>39</b>
<b>7. Verwendetes Material</b>	<b>43</b>
<b>8. Lebenslauf</b>	<b>45</b>
<b>9. Literatur</b>	<b>46</b>

## 1 Verzeichnis wiederkehrender Abkürzungen

<b>ARDS</b>	Acute Respiratory Distress Syndrome
<b>BSA</b>	Bovine serum albumin, Rinderserumalbumin
<b>CD</b>	Cluster of Differentiation
<b>CD11/CD18</b>	$\beta_2$ -Integrine
<b>CD62L</b>	L-Selektin
<b>EDTA</b>	Äthylen-diamin-tetra-acetat
<b>FCS</b>	Fetal calf serum, foetales Kälberserum
<b>FITC</b>	Fluorescein-iso-thio-cyanat
<b>fHP</b>	formyl-Hexapeptid
<b>fMLP</b>	formyl-(Met-Leu-Phe)-Tripeptid
<b>HEV</b>	High Endothelial Venules
<b>ICAM-1</b>	Intercellular Cell Adhesion Molecule 1
<b>mAb</b>	monoclonal Anti-body
<b>NaN<sub>3</sub></b>	Natrium-Azid
<b>PBS</b>	Phosphate-buffered saline, phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
<b>PMA</b>	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
<b>PSGL-1</b>	P-Selectin Glycoprotein Ligand-1
<b>sCD62L</b>	soluble (lösliches) L-Selektin
<b>SD</b>	Standardabweichung
<b>TNF</b>	Tumor-Nekrose-Faktor

## 2 Zusammenfassung

Der Übertritt von Leukozyten aus den Blutgefäßen in das umliegende Gewebe ist von großer Bedeutung bei der Infektabwehr im Rahmen von akuten und chronischen Entzündungs-vorgängen. In bestimmten klinischen Situationen, etwa nach einer Ischämie mit nachfolgender Reperfusion oder bei der Entwicklung einer Schocklunge, kann es zu einer überschießenden Extravasation von Leukozyten in das umliegende Gewebe kommen, die eine zusätzliche Gewebeschädigung hervorruft. Werden im Tierexperiment bestimmte Adhäsionsmoleküle, die bei der Extravasation von Leukozyten aus den Gefäßen eine Rolle spielen, pharmakologisch blockiert, läßt sich damit der Leukozyten-bedingte sekundäre Gewebeschaden reduzieren oder sogar ganz verhindern. Insbesondere gilt dies für die Blockade des Leukozyten-Adhäsionsmoleküls L-Selektin (CD62L), das zu Beginn der Extravasationskaskade eine reversible Bindung der Leukozyten an das Endothel der Gefäßwand oder an bereits dort arretierte Leukozyten vermittelt. Diese L-Selektin-vermittelte reversible Bindung wird nachfolgend durch andere Adhäsionsmoleküle, insbesondere CD11/CD18-Integrine, stabilisiert und mündet schließlich in einem festen Aneinanderhaften der Zellen.

Zur Entwicklung von klinisch einsetzbaren L-Selektin-Antagonisten wurde als Zielsetzung der vorgelegten Arbeit nach einem Assayverfahren gesucht, mit dem sich in kleinen Probenvolumina und mit hohen Durchsatzzahlen die relative Wirksamkeit von L-Selektin-Antagonisten quantifizieren läßt. Als Korrelat der L-Selektin-abhängigen Bindung von Leukozyten an bereits wandständig arretierte Leukozyten wurde dazu die homotypische Aggregation von humanen Granulozyten unter Scherkraftbedingungen näher untersucht.

Der Versuchsaufbau basiert auf der Ausbildung von homotypischen Aggregaten von Leukozyten, die in einem 12 x 80 mm Reagenzglas durch die Aktion eines Rührmagneten einer variablen Scherkraft unterworfen werden. Die Aggregatbildung tritt ca. 20-60 Sekunden nach Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen sowie eines Aktivators auf. Nach Optimierung zahlreicher Variablen zeigte das bisher im wesentlichen nur von einer Arbeitsgruppe in den USA angewandte Verfahren ein für L-Selektin-abhängige Adhäsionsprozesse typisches Scherkraftoptimum und eine nahezu komplette Hemmung durch Entzug zweiwertiger Kationen, die ebenfalls für L-Selektin-abhängige Adhäsionsprozesse



typisch ist. In spezifischer Weise wurde die Aggregatbildung von humanen neutrophilen Granulozyten durch Antikörper gegen L-Selektin und lösliches L-Selektin vermindert. Saure Kohlenhydratpolymere mit L-Selektin-bindenden Eigenschaften (Fucoidin, hochmolekulares Dextransulfat, Heparine) ließen ebenfalls eine Hemmung der Aggregation erkennen.

Während sich die Eingangs gestellte Anforderung eines geringen Probenvolumens für die Beurteilung von Substanzen, die derzeit nur in kleinen Mengen aufgereinigt zur Verfügung stehen, im Versuchsaufbau verwirklichen ließ, gestaltete sich der Aggregationsassay mit menschlichen neutrophilen Granulozyten trotz Entwicklung eines durchflußzytometrischen Auswertungsverfahrens als sehr arbeitsaufwendig und erlaubte letztlich nur einen geringen Probendurchsatz. Erschwerend kam eine starke Spenderabhängigkeit der jeweiligen Granulozytenpräparation hinzu. Zellen der L-Selektin exprimierenden T-Zell-Linie Jurkat, die statt frisch isolierter Granulozyten eingesetzt wurden, zeigten ebenfalls eine L-Selektin-abhängige Aggregation, die jedoch starken Schwankungen im Rahmen der Zellkultur unterworfen war. Die Messung der ED<sub>50</sub>-Werte für eine Reihe von L-Selektin-Antagonisten zeigte aber für frisch isolierte Granulozyten und Jurkat-Zellen im Rahmen einer Zehnerpotenz ähnliche Werte. Interessanterweise ließ sich die Aggregation von Granulozyten durch Antikörper gegen CD11/CD18-Integrine nahezu vollständig hemmen, nicht jedoch die von Jurkat-Zellen.

Während insgesamt das Verfahren der homotypischen Aggregation sowohl mit frisch isolierten humanen Granulozyten als auch mit Jurkat-Zellen für ausgewählte experimentelle Fragestellungen einsetzbar ist, muß seine Brauchbarkeit für größere Serienuntersuchungen verneint werden.

### 3 Einleitung

#### 3.1 Einführung

Die Interaktion des Leukozyten-Adhäsionsmoleküls L-Selektin mit verschiedenen Kohlenhydratstrukturen auf Endothelzellen und anderen Leukozyten steht am Anfang einer Kaskade, die zur Extravasation der Leukozyten führt. Diese Extravasation der Leukozyten ist für zwei wesentliche Vorgänge der körpereigenen Immunabwehr erforderlich:

- (1) *Für die Rekrutierung von Leukozyten in chronische und akute Entzündungsherde und*
- (2) *für das Rezirkulieren von Lymphozyten, die aus dem Blut in Lymphknoten und lymphatisches Gewebe, wie Peyer'sche Plaques, übertreten („Homing“), um diese sekundären lymphatischen Organe über den Lymphweg dann wieder zu verlassen.*

Beide Prozesse sind L-Selektin vermittelt und führen bei gleicher Kaskadenabfolge zu einer Diapedese in das darunterliegende Endothel <sup>1,2</sup>.

Im postkapillären Strombett kann L-Selektin eine reversible Bindung fließender Leukozyten an das Gefäßwandendothel initiieren <sup>3</sup>. Dabei handelt es sich nicht nur um eine Bindung an aktiviertes oder spezialisiertes Endothel <sup>4-7</sup>, sondern auch um eine Bindung an andere, bereits arretierte Leukozyten <sup>8</sup> und immobilisierte Thrombozyten <sup>9,10</sup>. D.h. auch weiter lumenwärts befindliche Leukozyten werden von arretierten Leukozyten rekrutiert und in den Migrationsprozeß mit einbezogen. Dieser Teilprozess der Kaskade wird als homotypische Aggregation bezeichnet <sup>1</sup>. Durch den Kontakt von L-Selektin mit korrespondierenden Kohlenhydratstrukturen kommt es zu einem dramatischen Abbremsen der Leukozyten auf weniger als 1 % der Ausgangsgeschwindigkeit <sup>5</sup>. Dies ist die Voraussetzung für einen definitiven Stopp der Leukozyten <sup>11</sup>, der durch die Wechselwirkung von Adhäsionsmolekülen der Integrin- und Immunglobulin-Superfamilie vermittelt wird. Der Bremskontakt mit der Gefäßwand („Rolling“) mit anschließender Extravasation ist vor allem im Stromgebiet der postkapillären Venulen von Lymphknoten, Mesenterium und Haut zu beobachten, wo die Flußgeschwindigkeiten ihren niedrigsten Wert erreichen. In anderen Organen, so z.B. Gehirn oder Lunge, findet die entzündungsassoziierte Extravasation im Bereich der Kapillaren statt <sup>12</sup>.

Vitalmikroskopisch betrachtet, scheinen die abgebremsten Leukozyten an der Gefäßwand entlangzurollen ("Rolling")<sup>8</sup>, ein Vorgang, von dem man weiß, daß er in den meisten Fällen auf der Interaktion von Selektinen mit ihren Liganden beruht<sup>5, 6, 13</sup>. Dieses "Rolling" ist zunächst reversibel - nur, wenn der Leukozyt ein zusätzliches Signal erhält, kommt es zum definitiven Stopp. Dieses Signal kann vermittelt werden durch die Interaktion von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren<sup>7, 14</sup> mit chemotaktischen Stoffen<sup>15</sup> oder durch Kreuzvernetzung von L-Selektin-Molekülen<sup>16-20</sup>; beide Signalwege wirken synergistisch<sup>21</sup>. Innerhalb weniger Sekunden kommt es dabei zu einer Aktivierung von Integrinen (CD11a,b/CD18) auf der Leukozytenoberfläche (quantitative und qualitative Integrin-Hochregulation), durch die sich ihre Affinität für die entsprechenden Liganden so stark erhöht, daß aus dem „Rolling“ ein vollständiges Anhalten wird<sup>22, 23</sup>. Das ist die Voraussetzung für die nachfolgende Diapedese, die einen Zeitraum von bis zu 10 Minuten in Anspruch nehmen kann und für die andere Interaktionen verantwortlich sind.

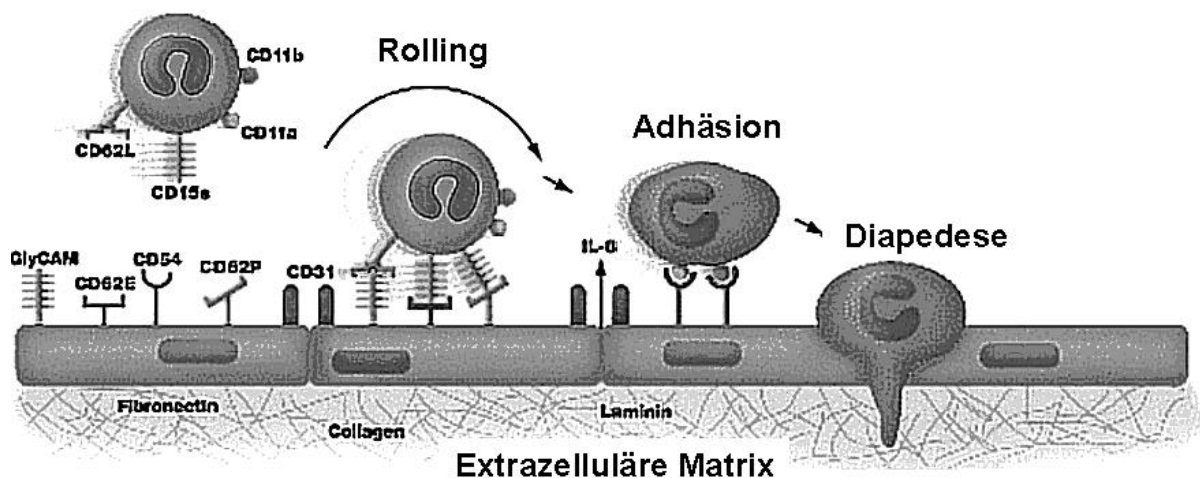


Abb. 1: Darstellung der Migrationskaskade von peripheren Leukozyten

Aufgrund der sequentiellen Abfolge von Selektin-abhängigem Abbremsen und Integrin-gesteuertem Stopp unterbleibt die gesamte nachgeordnete Kaskade der Diapedese, wenn einer der beiden vorangehenden Schritte blockiert wird<sup>6, 24-26</sup>.

Die Extravasation neutrophiler Granulozyten erfolgt nur auf Entzündungsreize hin. So bewirken z.B. im mesenterialen Strombett schwache Stimuli zunächst P- und L-Selektin vermitteltes Abbremsen passierender Leukozyten. Bei stärkeren Stimuli, die mit der Freisetzung von Zytokinen wie  $\text{TNF}\alpha$  verbunden sind, ist die Abbremsphase fast ausschließlich L-Selektin-abhängig<sup>27</sup>. So läßt sich die Ansammlung von Granulozyten in akuten Entzündungsherden durch L-Selektin-Blockade mit monoklonalen Antikörpern weitgehend und durch kombinierte L- und P-Selektin-Blockade vollständig unterbinden<sup>28,30</sup>. Die Einwanderung von Lymphozyten in chronische Entzündungsherde wird durch gegen L-Selektin gerichtete monoklonale Antikörper ebenfalls stark reduziert<sup>31</sup>. Darüber hinaus vermittelt lymphozytäres L-Selektin das auch in Abwesenheit jeglicher inflammatorischer Stimuli stattfindende Zirkulieren von Lymphozyten in Lymphknoten (L-Selektin gilt deshalb als der klassische „Homing-Receptor“) sowie in geringem Maße auch in organisiertes mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe<sup>31</sup>. Die L-Selektin vermittelte Lymphozyten-Extravasation in sekundäre lymphatische Organe ist beschränkt auf spezialisierte postkapilläre Gefäße (high endothelial venules, HEV)<sup>32</sup>, während die Granulozytenextravasation sowohl in postkapillären Venulen als auch in Kapillaren stattfinden kann<sup>12</sup>.

### **3.2 Problemstellung**

Eine L-Selektin-Blockade kann immer dann klinisch sinnvoll sein, wenn eine überschießende Leukozytenextravasation mit einer zusätzlichen Schädigung des Gewebes verbunden ist. Die Aktivität neutrophiler Granulozyten im Gewebeverband führt zu erheblichen Zellschäden und kann so eine Entzündung unterhalten bzw. aggravieren<sup>33</sup>. Bei einer Reihe von akuten inflammatorischen Prozessen ist die Wirksamkeit intravenös verabreichter L-Selektin-Antagonisten tierexperimentell inzwischen gut belegt. Darüber hinaus ist die Verabreichung von L-Selektin-Antagonisten ein interessanter Ansatzpunkt bei chronischen Entzündungsprozessen aus dem Formenkreis der Autoimmunkrankheiten oder zur Verhinderung oder Behandlung einer Transplantatabstoßung.

Tierversuche deuten darauf hin, daß eine vorübergehende L-Selektin-Blockade in bestimmten Situationen medizinisch sinnvoll und möglich ist.

Zwischen der durch die Grundlagenforschung erfolgten Aufklärung der Mechanismen, die die Leukozytenextravasation regulieren, und der Abklärung des Nutzungspotentials pharmakologischer L-Selektin-Antagonisten einerseits, sowie der Entwicklung zukünftig einsetzbarer Substanzgruppen andererseits, klafft aber eine beträchtliche Lücke. Im Tierversuch eingesetzte pharmakologische L-Selektin-Antagonisten bedürften vor einem etwaigen Einsatz beim Patienten einer gezielten Fortentwicklung, was wiederum eine Erweiterung unserer Kenntnisse der Struktur-Wirkungs-Zusammenhänge erforderlich macht. Sehr wenig Informationen gibt es bisher über die L-Selektin-Liganden auf Leukozyten, die die homotypische Aggregation und die Interaktion von im Blutstrom bewegten Leukozyten mit bereits an der Gefäßwand arretierten Leukozyten vermitteln.

Während für die Eruierung physiologischer L-Selektin-Funktionen und potentieller therapeutischer Indikationen zur L-Selektin-Blockade tierexperimentelle Arbeiten unverzichtbar sind, eignen sich solche Modelle nicht zur Bestimmung der relativen Potenz von Molekülen, die mit der L-Selektin-Kohlenhydratinteraktion funktionell interferieren. Hierfür sind Verfahren nötig, die in verhältnismäßig kurzer Zeit die Bearbeitung einer größeren Anzahl von Proben zulassen und dabei möglichst auch mit kleinen Mengen in Lösung befindlicher Substanzen unter physiologischen Pufferbedingungen auskommen. Damit besteht die Notwendigkeit für ein *in vitro* Testsystem, um mit dessen Hilfe den Einfluß gezielter chemisch oder molekularbiologisch durchgeführter Veränderungen an L-Selektin-Antagonisten bzw. Kompetitoren rasch abschätzen und detaillierte Dosis-Wirkungskurven aufstellen zu können. Mittelfristig ist es darüber hinaus erforderlich, eventuelle Wirkungsverluste bei einer pharmazeutischen Aufarbeitung von L-Selektin-Antagonisten qualitativ wie quantitativ zu erfassen.

### **3.3 Fragestellung**

Eine L-Selektin-Blockade kann immer dann klinisch sinnvoll sein, wenn eine überschießende Leukozytenextravasation mit einer zusätzlichen Schädigung des Gewebes verbunden ist. Die Aktivität neutrophiler Granulozyten im Gewebeverband führt zu erheblichen Zellschäden und kann so eine Entzündung unterhalten bzw. aggravieren<sup>33</sup>. Bei einer Reihe von akuten inflammatorischen Prozessen ist die Wirksamkeit intravenös verabreichter L-Selektin-Antagonisten tierexperimentell inzwischen gut belegt. Darüber hinaus ist die Verabreichung von

L-Selektin-Antagonisten ein interessanter Ansatzpunkt bei chronischen Entzündungsprozessen aus dem Formenkreis der Autoimmunkrankheiten oder zur Verhinderung oder Behandlung einer Transplantatabstoßung.

Tierversuche deuten darauf hin, daß eine vorübergehende L-Selektin-Blockade in bestimmten Situationen medizinisch sinnvoll und möglich ist. Zwischen der durch die Grundlagenforschung erfolgten Aufklärung der Mechanismen, die die Leukozytenextravasation regulieren, und der Abklärung des Nutzungspotentials pharmakologischer L-Selektin-Antagonisten einerseits, sowie der Entwicklung zukünftig einsetzbarer Substanzgruppen andererseits, klafft aber eine beträchtliche Lücke. Im Tierversuch eingesetzte pharmakologische L-Selektin-Antagonisten bedürften vor einem etwaigen Einsatz beim Patienten einer gezielten Fortentwicklung, was wiederum eine Erweiterung unserer Kenntnisse der Struktur-Wirkungs-Zusammenhänge erforderlich macht. Sehr wenig Informationen gibt es bisher über die L-Selektin-Liganden auf Leukozyten, die die homotypische Aggregation und die Interaktion von im Blutstrom bewegten Leukozyten mit bereits an der Gefäßwand arretierten Leukozyten vermitteln.

Während für die Eruierung physiologischer L-Selektin-Funktionen und potentieller therapeutischer Indikationen zur L-Selektin-Blockade tierexperimentelle Arbeiten unverzichtbar sind, eignen sich solche Modelle nicht zur Bestimmung der relativen Potenz von Molekülen, die mit der L-Selektin-Kohlenhydratinteraktion funktionell interferieren. Hierfür sind Verfahren nötig, die in verhältnismäßig kurzer Zeit die Bearbeitung einer größeren Anzahl von Proben zulassen und dabei möglichst auch mit kleinen Mengen in Lösung befindlicher Substanzen unter physiologischen Pufferbedingungen auskommen. Damit besteht die Notwendigkeit für ein *in vitro* Testsystem, um mit dessen Hilfe den Einfluß gezielter chemisch oder molekularbiologisch durchgeführter Veränderungen an L-Selektin-Antagonisten bzw. Kompetitoren rasch abschätzen und detaillierte Dosis-Wirkungskurven aufstellen zu können. Mittelfristig ist es darüber hinaus erforderlich, eventuelle Wirkungsverluste bei einer pharmazeutischen Aufarbeitung von L-Selektin-Antagonisten qualitativ wie quantitativ zu erfassen.

## 4 Methoden

### 4.1 Verwendete Antikörperpräparationen (DREG 200 Fab)

Die Hybridoma-Zellkulturen werden in Hybridoma-Medium+Glutamax II gehalten. Bei Gewinnung der Antikörper-Lösung wird das gesamte Volumen der Gewebekulturflasche bis auf 5 ml in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Die Falcon-Röhrchen werden 20 min bei 2500 U/min ohne Bremse zentrifugiert. Der Überstand (jeweils 200 ml) wird in ein Sammelgefäß gegeben und mit 1 ml 20 %  $\text{NaN}_3$  versetzt. Der Kulturüberstand wird mit sterilen Einmalfilterhaltern (2 $\mu$ ) sterilfiltriert. Anschließend läuft die gesamte Menge Überstand über eine Protein G-Sepharose 4 Fast Flow-Säule (Fa. Pharmacia Biotech) bei 4°C. Nachfolgend wird die Säule mehrfach mit Bindungspuffer (0,02 M Na-P-Puffer, 0,005 %  $\text{NaN}_3$ , pH 7,0) gewaschen. Danach werden je 4 ml mit 0,1 M Gly-HCl (pH 2,6-2,7) eluiert sowie in 4 ml Fraktionen aufgefangen und sofort mit je 300 $\mu$ l Tris-Puffer (0,1 M Tris-HCl, pH 9,0) neutralisiert. Jede Fraktion wird sofort gevortext und bei 280 nm wird in einer UV-Küvette die optische Dichte gemessen. Die proteinhaltigen Fraktionen werden gepoolt und durch Ultrafiltration über Centriplus-50 Einheiten (Amicon) konzentriert und in PBS+ $\text{NaN}_3$ +PMSF-Puffer überführt. Die gepoolten Fraktionen werden bei 4°C und 4000 U/min zentrifugiert bis das Volumen in den Einheiten deutlich verringert ist. Das Zentrifugat wird dann verworfen und die obere Hülse wird mit PBS-PMSF-Puffer aufgefüllt. Der Waschvorgang wird insgesamt zweimal vorgenommen. Wenn nur noch 1-2 ml in der oberen Hülse vorhanden sind, entfernt man den unteren Teil der Centriplus-Concetrator-Einheiten, setzt auf den oberen Teil den dazugehörigen konischen Aufsatz und stellt die Einheit mit dem Konus nach unten erneut in die Zentrifuge. Anschließend wird die Einheit bei 4°C für 8 min bei 400 U/min zentrifugiert und eine Volumenbestimmung durchgeführt. Die Proteinbestimmung erfolgt nach der BCA-Methode (PIERCE, Kat.-Nr. 23225) mit BSA als Proteinstandard. Dabei kann die Proteinbestimmung durch Umrechnung der Einsatzmengen in Mikrotiterplatten durchgeführt werden. Die Proteinstandards und Antikörper-Konzentratverdünnungen werden mit PMSF-Puffer angesetzt. Die Messung erfolgt bei 570 nm.

Die Fab-Fragment-Präparation erfolgte ausgehend von je 5 mg monoklonalen Antikörper nach Konzentrieren auf ca. 10 mg/ml und Umpuffern in 20 mM Phosphatpuffer (pH 7.0, 10 mM EDTA) durch Ultrafiltration durch Centricon

30-Einheiten (Amicon) nach der Vorschrift und mit dem ImmunoPure Fab-Präparation-Kit (Kat.-Nr- 44885X) von Pierce (3 h Verdauungsdauer bei 37°C mit Papain unter Rotieren). Die Ausbeuten an isolierten Fab-Fragmenten (nach Entfernung unverdauter IgG's und der Fc Fragmente durch Protein A-Affinitäts-Chromatographie) betrug 63 %. Die Reinheit der Fab-Fragmente und der zeitliche Ablauf der Papainspaltung wurden durch SDS-PAGE in 12,5 % Acrylamidgelen in Gegenwart von  $\beta$ -Mercaptoäthanol/Färbung durch Coomassie (PhastSystem, Pharmacia LKB) geprüft. Alle Proteinbestimmungen erfolgten nach der BCA-Methode (PIERCE, Kat.-Nr. 23225) mit BSA als Proteinstandard.

#### **4.2 Untersuchungsmaterial und Zellgewinnung**

Für alle experimentellen Untersuchungen wurde als humanes Ausgangsmaterial für die Gewinnung von neutrophilen Granulozyten entweder frisch gewonnenes Cubitalvenenblut gesunder Erwachsener oder Buffy coats, die bei der Verarbeitung von Spenderblut anfallende leukozytenreiche Interphase zwischen Plasma und Erythrozytenkonzentrat, eingesetzt.

Buffy coats werden in 15 ml Falcon-Röhrchen gefüllt und sedimentieren ca. 2 h im Wasserbad bei 37°C. Anschließend wird das leukozytenreiche Plasma mit einer Pasteur-Pipette vorsichtig abgenommen. Das leukozytenreiche Plasma wird dann dreimal mit Tyrode-Lösung bei 1200 U/min und 22°C für 10 min gewaschen. Das Sediment in 25 ml Tyrode-Lsg. wird auf eine 15 ml Ficoll-Paque-Lösung aufgetragen und bei 2100 U/min, 22°C für 30 min ohne Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation befinden sich die Granulozyten mit kontaminierenden Erythrozyten im Sediment des 50 ml Falcon-Röhrchen. Das Trennmedium und die Lymphozyten werden abgesaugt. Die Granulozyten werden anschließend bei 2100 U/min, 5 min mit RPMI 1640 bei 22°C gewaschen. Die kontaminierenden Erythrozyten werden hypoton lysiert. Dazu wird die Zellsuspension (max. 2 ml) mit 50 ml pyrogenfreiem Wasser 20 s geschwenkt und anschließend wird mit 2,63 ml 20 x PBS-Lsg. wieder die Isotonie hergestellt. Die Granulozyten werden wiederum gewaschen, danach gezählt und in sterilen 12 x 75mm-Polyesterol-Röhrchen in Tyrode-Lsg. zu  $1,0 \times 10^7$  Zellen/ml resuspendiert.

L-Selektin expremierende humane Jurkat-Zellen aus einer T-Zell-Leukämie-Linie (CD4<sup>+</sup>) werden aus einer Kultur in glutaminhaltigem RPMI 1640 mit 10 %



FCS gewonnen. Die Jurkat-Zellen werden zweimal mit RPMI 1640 bei 2100 U/min, 5 min bei 22°C gewaschen. Anschließend werden die Jurkat-Zellen bei 2100 U/min, 5 min mit Tyrode-Lsg. bei 22°C gewaschen. Die Jurkats werden dann ebenfalls gezählt und zu  $1,0 \times 10^7$  Zellen/ml in sterilen 12 x 75 mm Polyesterol-Röhrchen resuspendiert.

### 4.3 Der homotypische Aggregationsassay

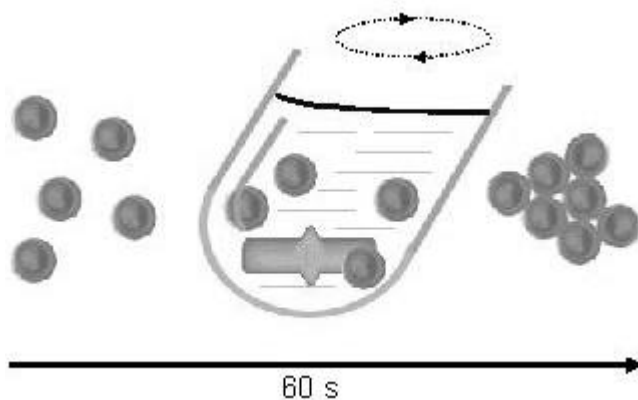
Die skizzierten Anforderungen sollten von dem im folgenden beschriebenen Aggregationsassay erfüllt werden. Als Vorlage diente ein Assayverfahren der homotypischen Aggregation zur Messung der L-Selektin-abhängigen interleukozytären Adhärenz unter Scherkraftbedingungen, der von der Arbeitsgruppe um Sklar etablierte wurde<sup>34</sup>. In Gegenwart von Scherkräften kommt es bei 37°C nach Kontakt mit chemotaktischen Stimuli binnen 30-60 s zu einer innerhalb von ca. 6 min reversiblen homotypischen Aggregatbildung humaner neutrophiler Granulozyten. Dieses Phänomen dürfte als Äquivalent der *in vivo* zu beobachtenden Abbrems- und Rollphase von Leukozyten an bereits wandständig arretierte Leukozyten zu werten sein.

Das Assayverfahren der homotypischen Aggregation zur Messung der L-Selektin-abhängigen interleukozytären Adhärenz unter Scherkraftbedingungen wurde mit Modifikationen eingesetzt. Diese Modifikationen betreffen:

- (1) *den alternativen Einsatz der L-Selektin expremierenden humanen T-Zell-Leukämieinie Jurkat statt von frisch präparierter Granulozyten*
- (2) *die Färbung der Zellen mit Acridin-Orange oder alternativ mit CMFDA und LDS 751 zur Optimierung der Darstellung der Aggregate im FACScan-Durchflußzytometer*
- (3) *die Fixierung der Zellen mit Glutaraldehyd nach erfolgter Aggregation bzw. Sofortmessung nach erfolgter Aggregation im FACScan-Durchflußzytometer.*

Frisch aus Buffy coats gewonnene Granulozyten oder Jurkat-Zellen aus einer Kultur in glutaminhaltigem RPMI 1640 mit 10 % FCS wurden für 2 min mit 0,5 mg/ml Acridin-Orange gefärbt, zweimal gewaschen und in einer Konzentration von  $10^7$ /ml in Tyrode-Lsg. (pH 7,35) resuspendiert.

Eine Menge von 170  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension wurden in einem 12 x 75 mm Polystyrol-Röhrchen in einem Wasserbad bei 37°C gehalten. Danach wurden dieser Zellsuspension 10  $\mu\text{l}$  der zu testenden Substanz hinzugefügt. Mit einem 2 x 5 mm Rührmagnet wurde die Zellsuspension mit 600-800 U/min gerührt, nach 2 min erfolgte die Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$  (Endkonzentration 1,8 mM),  $\text{Mg}^{2+}$  (Endkonzentration 0,5 mM) und Formylhexapeptid (Endkonzentration 1  $\mu\text{M}$ ).



*Abb. 2: Prinzip des Aggregationsassays: Neutrophile Granulozyten ( $1,0 \times 10^7$  Zellen/ml) in Tyrode-Lsg. (37°C) werden mit Hilfe eines 2 x 5 mm Rührmagneten in sterilen 12 x 75 mm Polystyrol-Röhrchen auf 600 U/min beschleunigt und durch Zusatz von Formylhexapeptid und CaMg-Lsg. zur Aggregation gebracht. Nach 60 s wird der Prozeß durch Hinzugabe von 1,5 ml eiskaltem Glutaraldehyd (2 %) gestoppt.*

Die Reaktion wurde nach 60 s durch Zugabe von 1,5 ml 2 % Glutaraldehyd-Lösung (2-4°C) gestoppt. Alternativ wurden Messungen "nativ" durchgeführt, d.h. nach einer definierten Zeit wurden das Ausmaß der Aggregation ohne vorherige Fixierung direkt durchflußzytometrisch bestimmt.

#### **4.4 Durchflußzytometrie**

##### **4.4.1 Bestimmung der L-Selektin-Expression**

Zur Bestimmung der L-Selektin-Expression der verwendeten Zellen wurden Kontrollen der jeweiligen Zellsuspensionen mit eisgekühlter phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung (PBS) in Gegenwart von 0,15 % BSA, 0,1 % humanem partiell aggregiertem Immunglobulin und 0,2%  $\text{NaN}_3$  gewaschen und für 30 min mit Fluoreszeinisothiozyanat (FITC)-gekoppeltem Antikörper (anti-Leu8 bzw. muriner  $\text{IgG}_2$ -Isotyp-Kontrollpräparation) auf Eis inkubiert. Danach erfolgte eine simultane Fixierung der Leukozyten und Lyse der Erythrozyten durch zehnmünütige Inkubation mit FACS Lysing Solution (Becton Dickinson). Nach

Zentrifugieren und Waschen der Proben (8 min bei 2100 U/min) wurden den 250 µl Proben ein gleiches Volumen 2 % Paraformaldehyd in 1,5 x PBS zugefügt. Die Messung oberflächenreaktiven L-Selektins erfolgte mit einem Durchflußzytometer der Fa. Becton Dickinson (FACScan), gegebenenfalls nach Verdünnung der Proben mit PBS (0,2% NaN<sub>3</sub> und 0,15% BSA).

Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten wurden anhand ihres Vorwärts- und Seitstreulichtverhaltens identifiziert. Da eine Normalverteilung der Fluoreszenzintensität zwar angenähert bei den Kontrollen, nicht aber notwendigerweise bei den anti-L-Selektin-Antikörper inkubierten Proben zu erkennen war (Vgl. Abb. 3), erfolgte die statistische Auswertung durch Vergleich der Mediane.

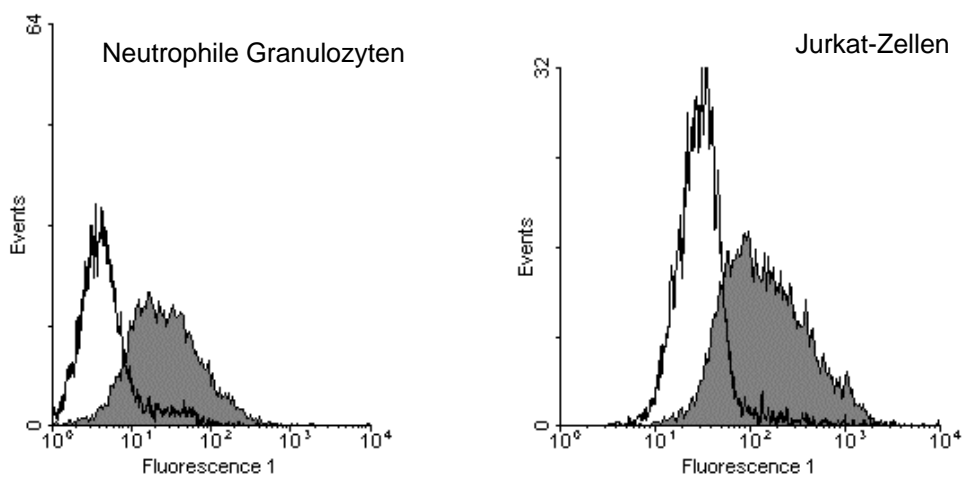


Abb. 3: L-Selektin-Expression im FACScan (Fluorescence 1) neutrophiler Granulozyten (links) und Jurkat-Zellen (rechts) mit (FITC)-gekoppeltem mAb anti-Leu8 (Positivkontrolle - grau) bzw. Maus- IgG<sub>2a</sub>-Isotyp-Kontrollpräparation (Negativkontrolle - weiß).

#### 4.4.2 Bestimmung der Aggregation

Bei der durchflußzytometrischen Auswertung wurden Aggregate aufgrund ihres höheren Forward-Scatters oder durch ihre stärkere Fluoreszenz in Kanal 1 nach Färbung mit Acridin-Orange (alternativ nach Färbung mit LDS 751 im Kanal 2) identifiziert und so von nicht-aggregierten Zellen unterschieden. Bei der Berechnung der Aggregationsrate wurden die Zählereignisse im Bereich der aggregierten und nicht-aggregierten Zellen zueinander ins Verhältnis gesetzt. Dazu wurden zu jedem Experiment eine Positivkontrolle mit maximaler Stimulation der Aggregation (1  $\mu\text{M}$  Formylhexapeptid, 1,8 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , 0,5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ , 2 min) und eine Negativkontrolle mit maximaler Inhibition der Aggregation durchgeführt. Als Negativkontrolle diente der Zusatz von Citrat (5,3 mM) beim Neutrophilen-Assay und von Fucoidin (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) beim Jurkat-Assay. Diese beiden Substanzen hatten den günstigsten Einfluß auf die nach Aktivierung der Zellen auftretende Silhouettenänderung (shape change). Diese Negativkontrollen wurden dann als Standard-Negativkontrollen betrachtet, auf die sich alle Inhibitoren der Aggregation bezogen. Mit Hilfe eines Gatingverfahrens wurden die aggregierten Zellen in einer Population zusammengefaßt und für die Berechnung der Aggregationsrate eingesetzt. Das Gatingverfahren orientierte sich in jedem Experiment an den durchgeführten Kontrollen und wurde für jedes Experiment separat durchgeführt.

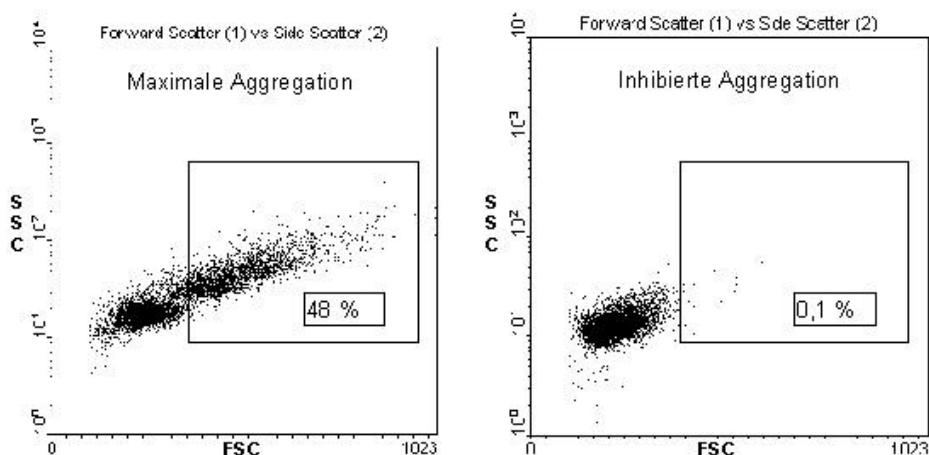


Abb. 4: Aggregation von neutrophilen Granulozyten nach Aktivierung mit 1  $\mu\text{M}$  Formylhexapeptid, 1,8 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , 0,5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ , 2 min., Links: Postivkontrolle mit maximaler Aggregation, Rechts: Negativkontrolle bei maximaler Inhibition der Aggregation (hier mit Citrat 5,3 mM)

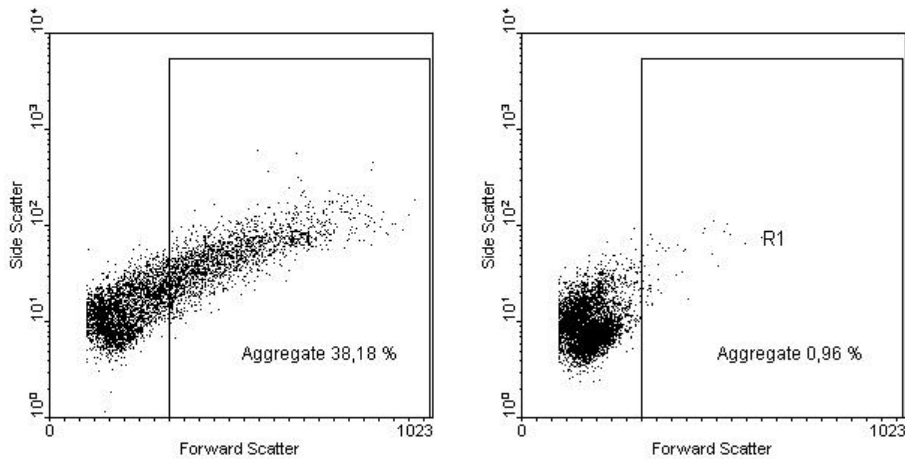


Abb. 5: Aggregation von Jurkat-Zellen im Aggregationsassay, Links: Positivkontrolle mit maximaler Aggregation, dabei entsprechen die gemessenen Ereignisse in der Region R1 Aggregaten (Doubletten, Triplets usw.). Rechts: Negativkontrolle bei maximaler Inhibition der Aggregation (hier mit Fucoidin 100 µg/ml)

Während die manuelle Auszählung der Aggregate gegenüber der durchfluß-zytometrischen Quantifizierung aufgrund der Unabhängigkeit gegenüber aktivierungsbedingten Silhouettenänderungen (Reorganisation des Zytosklettes, shape change) derzeit die exaktere Methode darstellt, ist für größere Probendurchsätze im Rahmen eines eventuell notwendig werdenden Up-scalings einer automatischen Probenmessung der Vorzug zu geben. Entsprechend standardisierte Gatingverfahren und Auszählalgorithmen waren damit Teil des Arbeitsprogrammes.

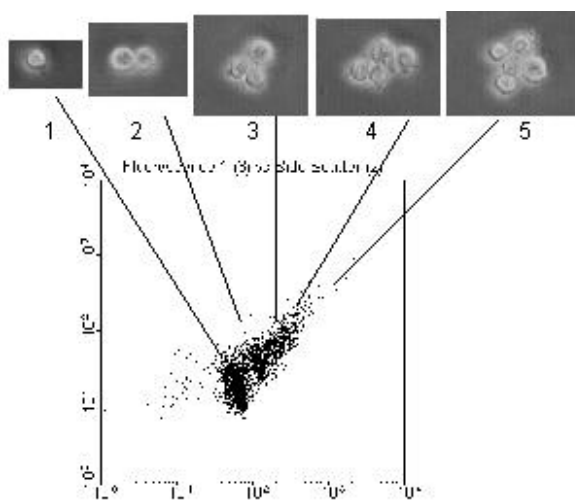


Abb. 6: Interpretation der Darstellungen im Durchflußzytometer (FACScan) im Fluorescence (FL1)/Side Scatter (SSC) Modus: Aggregation neutrophiler Granulozyten in Tyrode-Lsg. mit 1 µM Formylhexapeptid, 1,8 mM Ca<sup>2+</sup>, 0,5 mM Mg<sup>2+</sup>; Differenzierung der Singlets, Doublets, Triplets usw. im Vergleich der Darstellung der Zellen im Lichtmikroskop und im FACScan

## 5 Ergebnisse mit Kommentar

### 5.1 Homotypische Neutrophilenaggregation

Die L-Selektin-abhängige Aggregation neutrophiler Granulozyten ist u.a. charakterisiert durch Kalzium-Abhängigkeit<sup>35-38</sup>, Fucoidin-Hemmbarkeit (Fucoidin ist ein natürliches Fucosesulfatpolymer, welches auch als Ligand für L-Selektin fungiert)<sup>34, 39-42</sup> bzw. Hemmbarkeit durch andere saure polymere Kohlenhydratstrukturen (z.B. Dextransulfat MW 500 KD) und durch Blockierbarkeit der Aggregation durch Fab-Fragmente von DREG 200 (monoklonale Antikörper gegen L-Selektin)<sup>2, 24-26</sup> oder auch durch lösliches Plasma-s-L-Selektin. Anhand der genannten Parameter war es zunächst notwendig, die *in vitro* initiierte Aggregation zu charakterisieren und hinsichtlich ihrer spezifischen L-Selektin-Abhängigkeit zu überprüfen.

#### 5.1.1 Kalzium/Magnesiumionen- und Scherkraftabhängigkeit

Die homotypische Aggregation neutrophiler Granulozyten ist von der Expression und Regulation von L-Selektin und  $\beta_2$ -Integrinen (CD11/CD18) abhängig<sup>1,2</sup>. Wie auch bei der vorher genannten Leukozyt-Endothelzell-Interaktion geht man von der Vorstellung aus, daß L-Selektin für die Herstellung des primären interzellulären Kontakts benötigt wird, der durch die folgende  $\beta_2$ -Integrin-ICAM-Wechselwirkung unumkehrbar wird. Beide Prozesse erfordern die Anwesenheit von zweiwertigen Kalzium- und Magnesiumionen im extrazellulären Milieu.

L-Selektin ist ein monomeres Transmembran-Glykoprotein mit extrazellulärer Lage des N-terminalen Proteinanteils (Klasse I). Die ersten 120 N-terminalen Aminosäuren bilden eine Domäne, die eine große Ähnlichkeit mit dem Kohlenhydrat-bindenden Anteil verschiedener  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Lektine aufweist. Die aus der Struktur der N-terminalen C-Typ-Lektin-Domäne abgeleitete Annahme, daß L-Selektin in  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Weise an Kohlenhydratstrukturen mit negativer Ladung bindet, entspricht mit wenigen Ausnahmen den meisten *in vitro*- wie *in vivo*-Untersuchungen<sup>35, 38</sup>, bei denen in funktionellen Studien L-Selektin-abhängige Adhäsionsprozesse durch Komplexierung zweiwertiger Ionen fast komplett inhibiert wurden. Die Alpha-Untereinheit von CD11b enthält drei

Bindungs-Domänen für zweiwertige Ionen in der Nähe vom N-terminalen Ende des Moleküls. Es wird davon ausgegangen, daß die Besetzung dieser Bindungsstellen für die Bindung des entsprechenden Liganden bei der Aggregation notwendig sind <sup>25</sup>.

Die  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -Abhängigkeit der Aggregation läßt sich durch An- oder Abwesenheit der zweiwertigen Ionen im Versuchsansatz des Aggregationsassays nachweisen. Zur Kontrolle der genannten Abhängigkeit wurden im Experiment Konzentrationsreihen von Citrat bzw. EDTA als Chelatoren zweiwertiger Ionen eingesetzt und vergleichend mit dem Standardansatz (1,8 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,5 mM  $\text{MgCl}_2$ ) die Aggregationsraten ermittelt. Im Experiment konnte nachgewiesen werden, daß die Aggregation durch  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Entzug nahezu komplett hemmbar ist.

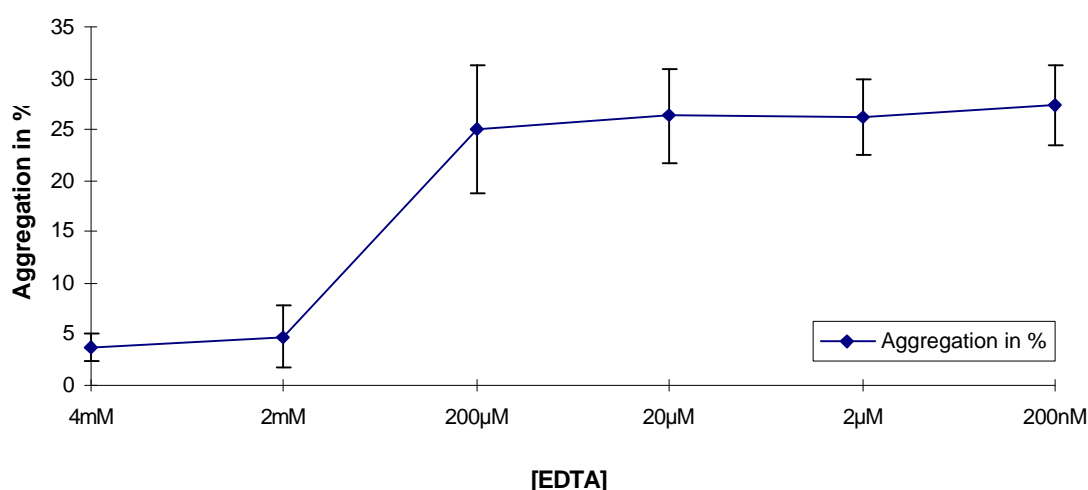


Abb. 7: Bestimmung der  $ED_{50}$  von EDTA im Neutrophilen-Aggregationsassay (die Auswertung erfolgte vergleichend im Lichtmikroskop und im Durchflußzytometer)

$\text{Ca}^{2+}$ -CHELATOR	MAX. INHIBITION DER AGGREGATION
EDTA	2 mM
Citrat	4 mM

Tab. 1: Bestimmung der Aggregations-Inhibition durch Citrat und EDTA im Neutrophilen-Aggregationsassay nach Aktivierung mit 1  $\mu\text{M}$  Formylhexapeptid, 1,8 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , 0,5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ , 2 min

Die recht hohen Werte für die maximale Inhibition der Aggregate wurden mit den in der stark negativ geladenen Glykokalyx der Zellmembran gebundenen  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen begründet. So konnte auch im  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  freien Medium eine Aggregation neutrophiler Granulozyten ausgelöst werden, die durch zusätzliche  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Zugabe verstärkt und durch EDTA bzw. Citrat inhibiert werden konnte (Abb. 8).

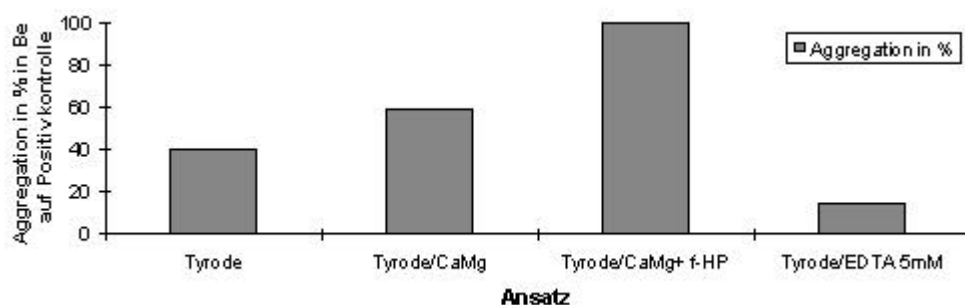


Abb. 8: Nachweis der  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der Aggregation neutrophiler Granulozyten: Auch in  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  freier Tyrode-Lsg. kommt es zu einer basalen Aggregation, die aber durch Zugabe von EDTA in den Aggregationsansatz nahezu vollständig aufgehoben wird.

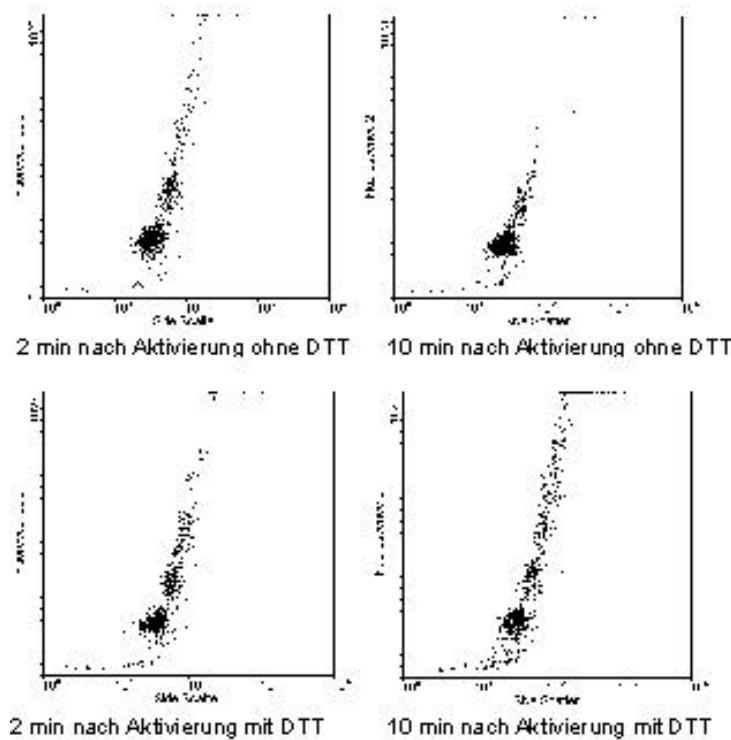
Zur Stimulation von Leukozyten wurden als Aktivatoren Formylhexapeptid (CHO-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys, Endkonzentration  $1 \mu\text{M}$ ) oder Formyltripeptid (CHO-Met-Leu-Phe, Endkonzentration  $1 \mu\text{M}$ ) eingesetzt, welche über spezifische Bindung an G-Proteine gekoppelte Rezeptoren zu einem kurzfristigen Anstieg der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führen und im Aggregationsexperiment zu einer Zunahme der Aggregation gegenüber der rein  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -vermittelten Aggregation führen. Der Effekt wurde durch einen Affinitätsanstieg des L-Selektins für seine Liganden erklärt <sup>43</sup>.

Neutrophile Granulozyten aggregierten nach Stimulation mit chemotaktischen Aktivatoren, wie Formylhexapeptid, innerhalb von 30 s reversibel, 2 min nach Stimulation kam es zum Zerfall der Aggregate, der 5-7 min nach Aggregationseinleitung abgeschlossen war. Es wurde beobachtet, daß Dithiotreitol (DTT) die Disaggregation der Aggregate verhindert bzw. signifikant verzögert, ohne selbst eine Aggregation zu induzieren. Dadurch ließen sich über den Meßzeitraum größere Aggregate darstellen <sup>25</sup>.

Dithiotreitol hat keinen Einfluß auf die Funktionalität oder Expression von L-



Selektin auf Leukozyten, sondern stimuliert  $\beta_2$ -Integrine, sich an ICAM zu binden. Dabei geht man von der Vorstellung aus, daß Oxidantien und Antioxidantien Einfluß auf die Konformation der  $\beta_2$ -Integrine haben <sup>25</sup>. Zur weiteren Erhöhung der Meßempfindlichkeit des Aggregationsassays wurde daher Dithiotreitol dem Ansatz (1 mM) zugefügt, um den vermittelten interzellulären Kontakt länger aufrechtzuerhalten (Abb. 9 und 10).



*Abb. 9: Einfluß von 1 mM Dithiotreitol (DTT) auf die Aggregation neutrophiler Granulozyten im Zeitintervall von 2 min und 10 min (Darstellung im Dotplot-Diagramm SSC/FL2-Modus nach Färbung mit LDS 751, Messung nativ - ohne Fixierung mit Glutaraldehyd 2 %)*

Die homotypische Aggregation neutrophiler Granulozyten, also die Rekrutierung weiter lumenwärts schwimmender Granulozyten durch bereits adherente Granulozyten, findet *in vivo* unter dynamischen Flußbedingungen statt. Die Funktionalität der Adhäsionsmoleküle, die am schrittweisen Abbremsen der Leukozyten sequentiell beteiligt sind, ist an unterschiedliche Geschwindigkeitsbereiche (oder auch Scherkräfte) gebunden <sup>13, 27, 44, 45</sup>. Für die initiale Ankopplung des Leukozyten an die Endothelwand, die bei hoher Geschwindigkeit stattfinden muß, spielt L-Selektin eine herausragende Rolle <sup>46-48</sup>. L-Selektin scheint seine Wirkung überhaupt nur in Gegenwart von höheren Scherkräften entfalten zu können <sup>49</sup>. Die Zelladhäsion unter hydrodynamischen Scherkraftverhältnissen *in vivo* erfordert, daß die Rezeptoren (L-Selektin) die Liganden suffizient über die Dauer des Kontakts binden, um den Scherkräften zu widerstehen <sup>50</sup>. Somit sollte die Interaktion von L-Selektin und Ligandenstrukturen

*in vitro* unter dynamischen Bedingungen durchgeführt werden und eine deutliche, reproduzierbare Scherkraftabhängigkeit zeigen.

Die dynamischen *in vivo* Flußverhältnisse wurden mit Hilfe eines 2 x 5 mm Rührmagneten simuliert. Dabei wurden die in Suspension befindlichen Zellen in sterilen 12 x 75 mm-Polysterol-Röhrchen unter Verwendung des 2 x 5 mm Rührmagneten beschleunigt. Die Umdrehungszahl des Rührmagneten wurde mittels eines Magnetührers mit justierbarer Drehgeschwindigkeit eingestellt. Es war nicht möglich, die *in vivo* herrschenden dynamischen Flußverhältnisse/Scherkräfte mit dem im Aggregationsexperiment festgestellten Optimum rechnerisch zu vergleichen. Als Optimum für die adhäsive L-Selektin-Funktion gilt ein relativ enger Bereich „shear stress“ von 4-7 dyn/m<sup>2</sup> <sup>51</sup>. Bei der Aggregation neutrophiler Granulozyten stellte sich ein Rühr optimum von 400-500 U/min ein, wenn man als Maß für die Aggregation den Anteil großer Aggregate (n ≥ 5, Pentupletten) festlegt (Abb. 10). Ferner zeigt die Abb. 10 den aggregationsfördernden Effekt von DTT.

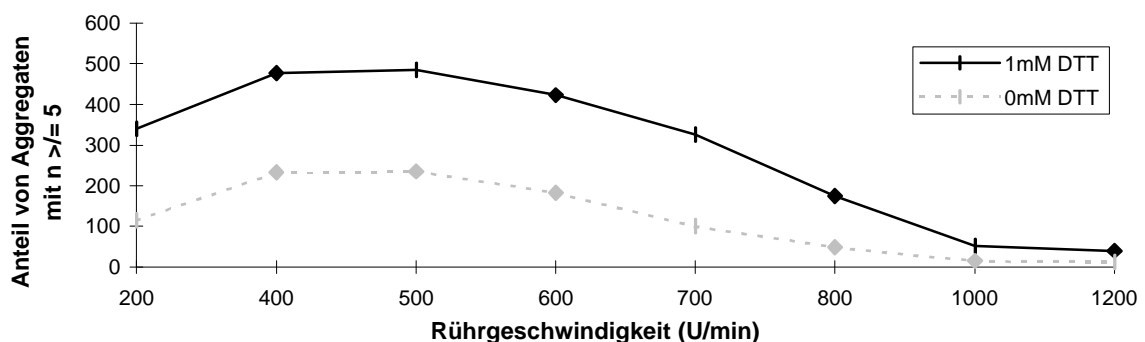


Abb. 10: Scherkraftabhängigkeit der Aggregation, Bildung von Aggregaten mit n<sup>3</sup> Pentupletten in An- und Abwesenheit von 1 mM Dithiotreitol (DTT)

Betrachtet man dagegen die Bildung aller Aggregate (n ≥ 2, Doubletten), dann zeigt sich ein Optimum der Rührgeschwindigkeit bei 600 U/min (Abb.11), das bei weiteren Experimenten als Standard benutzt wurde. Offensichtlich ist die Bildung größerer Aggregate scherkräftempfindlicher als die der kleineren. Der Aggregationsassay ist damit durch reproduzierbare, deutliche Scherkraftabhängigkeit gekennzeichnet.

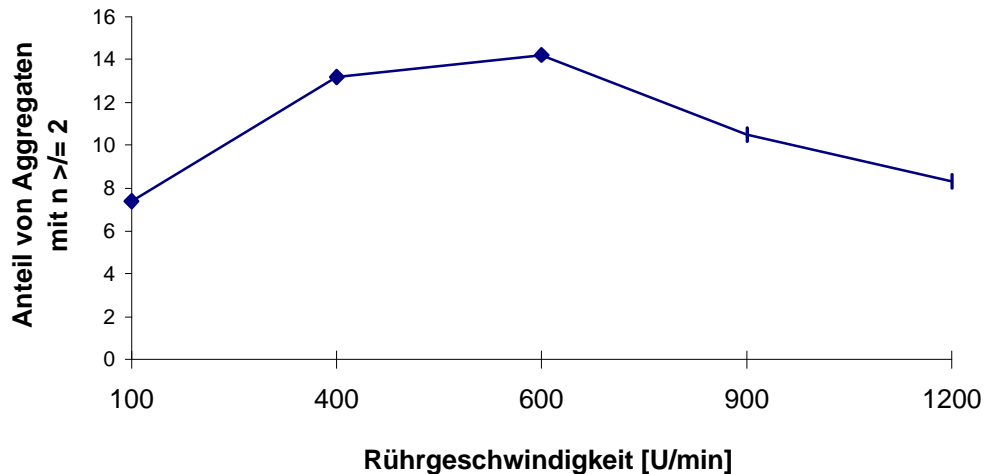


Abb. 11: Darstellung der Scherkraftabhängigkeit der Aggregation mit einem Aggregationsoptimum bei 600 U/min (Aktivierung mit 1  $\mu\text{M}$  Formylhexapeptid, 1,8 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , 0,5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ , 2 min)

#### 5.1.2 Saure Kohlenhydratpolymere als Inhibitoren der Aggregation

In funktionellen Studien können L-Selektin-abhängige Adhäsionsprozesse entweder durch Komplexierung zweiwertiger Kationen oder durch das aus Algen gewonnene Fucose-/Fucose-4-Sulfat-Polymer Fucoidin komplett inhibiert werden<sup>34, 39-42</sup>. Als Kandidaten für physiologische Liganden gelten zwei unterschiedliche Klassen saurer Kohlenhydrat-Polymere:

(1) *Lineare Heparansulfatglykosaminoglykane*

(2) *Glykoproteine mit verzweigten O-glykosidisch verknüpften fucosylierten Laktosamin-Oligosaccharidstrukturen, die Sulfat- und Neuraminsäurereste tragen und daher im physiologischen pH-Bereich ebenfalls negativ geladen sind.*

Alle bisher vorliegenden Daten haben die aus der Lektinstruktur abgeleitete Vermutung einer Bindung von L-Selektin an Kohlenhydratstrukturen bestätigt. Die speziellen Anforderungen an eine L-Selektin-Bindung bezüglich Sterik und Ladungsverteilung werden offensichtlich von chemisch sehr unterschiedlichen Molekülen (Glykoproteinen, Glykolipiden, Proteoglykanen) realisiert, die

gewebsspezifisch von mit L-Selektin interagierenden Zellen (HEV-Endothel von Lymphknoten, HEV-Endothel von Mukosa-assoziiertem lymphatischem Gewebe, Endothel in Entzündungsarealen, Thrombozyten, Leukozyten) expremiert werden  
52

Ähnlich wie eine L-Selektin-Blockade durch monoklonale Antikörper wirken sich L-Selektin-bindende saure Kohlenhydratpolymere wie Fucoidin bzw. Dextransulfat (MW 500 KD) negativ auf die Fähigkeit neutrophiler Granulozyten zur homotypischen Aggregation aus. Wie aus bereits veröffentlichten Arbeiten hervorgeht, hemmen schon nanomolare Konzentrationen von diesen phosphorylierten Polysacchariden die Aggregation. Sie haben dabei aber keinen Einfluß auf die Regulation von L-Selektin nach Stimulation, auch wird kein Einfluß auf die Bindung von Formyl-Peptiden an den Rezeptor beobachtet. Dextransulfat und Fucoidin konkurrieren hingegen mit den natürlichen Liganden um die L-Selektin-Bindungsstellen. Dies unterstützt die Auffassung, daß der Aggregationsprozeß durch die Interaktion von Kohlenhydratstrukturen (Lektin-artigen Rezeptoren) vermittelt wird<sup>34</sup>.

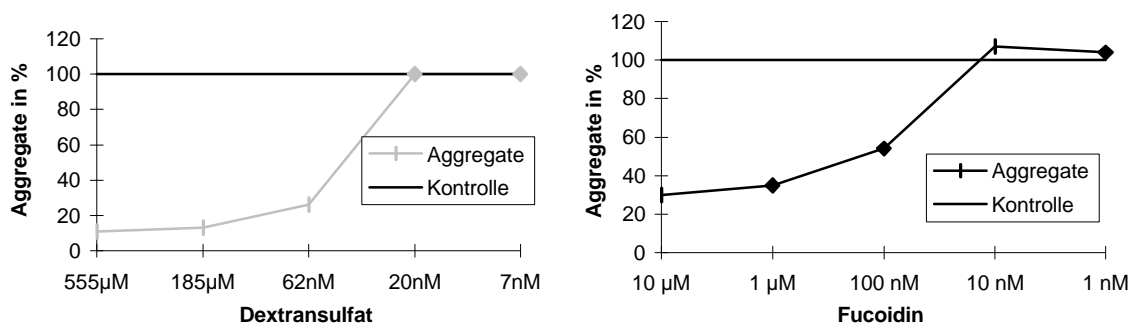


Abb. 12: Konzentrationsabhängigkeit der Inhibition der homotypischen Aggregation von Granulozyten durch Dextransulfat und Fucoidin (Aktivierung mit 1 µM Formylhexapeptid, 1,8 mM Ca<sup>2+</sup>, 0,5 mM Mg<sup>2+</sup>, 2 min)

Fucoidin und Dextransulfat ergaben die erwartete sigmoide Abhängigkeit der Hemmung vom Logarithmus der Konzentration, außerdem hemmt Dextransulfat stärker als Fucoidin. Dies stimmt qualitativ mit schon publizierten Angaben überein (Fucoidin ED<sub>50</sub> > 21 nM, Dextransulfat ED<sub>50</sub> > 8 nM)<sup>34</sup>.

Analog der Blockade durch Fucoidin und Dextransulfat wirken sich Heparine negativ auf die Fähigkeit neutrophiler Granulozyten zur homotypischen

Aggregation aus. Kultivierte periphere Endothelzellen enthalten heparinartige Strukturen, an die L-Selektin  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig bindet. Intravenöse Verabreichung von Heparin-Tetrasacchariden bewirkt ähnlich einer L-Selektin-Blockade durch monoklonale Antikörper eine deutliche Reduktion der Extravasation neutrophiler Granulozyten in Peritonealexsudat. Dies hat eine Entsprechung in der antiinflammatorischen Wirkung bestimmter Heparinpräparationen in verschiedenen Tiermodellen (Transplantatabstoßung, Adjuvansarthritis, experimentelle Autoimmun-Enzephalomyelitis)<sup>52, 54</sup>. Es kamen verschiedene Heparine, sowohl von Schweinedarmmukosa (Fa. Sigma H 3393) als auch von Rinderlunge (Fa. Sigma H 9133) zum Einsatz. Die Aggregation wird zu 50-80 % durch Heparin (300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Endkonzentration) gehemmt. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Präparationen festgestellt werden. Die  $\text{ED}_{50}$  lag in beiden Fällen zwischen 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  und 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Heparin im Aggregationsansatz.

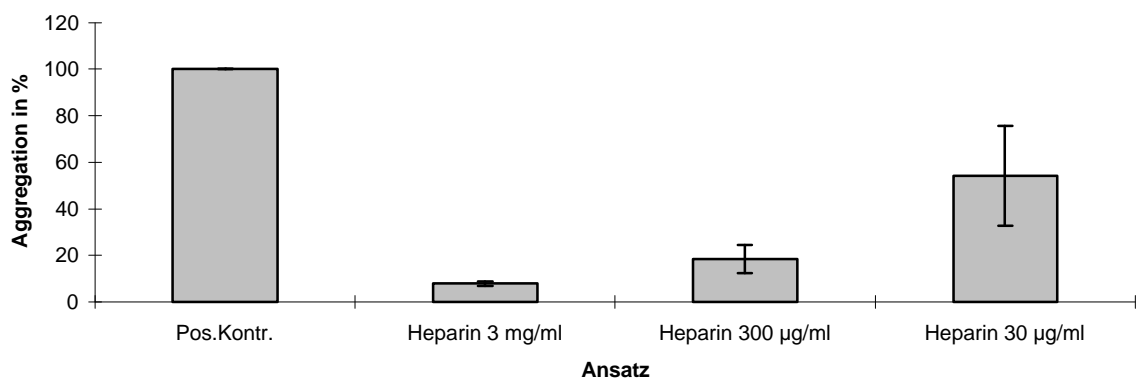


Abb. 13: Inhibition der homotypischen Aggregation durch Heparin (Fa. Sigma H 3393) nach Aktivierung mit 1  $\mu\text{M}$  Formylhexapeptid, 1,8 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , 0,5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ , 2 min ( $m \pm \text{SD}$ ,  $n=3$ ).

Saure Kohlenhydratpolymere	ED <sub>50</sub> IM AGGREGATIONSEXPERIMENT
<b>Fucoidin (MW= 100 KD)</b> <b>(Fa. Sigma)</b>	ca. 64 nM
<b>Dextransulfat (MW=500 KD)</b> <b>(Fa. Pharmacia)</b>	ca. 40 nM
<b>Heparin</b> <b>(Fa. Sigma) H-9133</b>	zw. 300 - 30 µg/ml

Tab. 2: Bestimmung der ED<sub>50</sub> von Fucoidin, Dextransulfat (MW 500 KD) und Heparin im Neutrophilen-Aggregationsassay

### 5.1.3 Monoklonale Anti-CD62L- und Anti-CD18-Antikörper als Inhibitoren

Entsprechend der Blockade durch saure Kohlenhydrate wie Fucoidin oder Dextransulfat wirken sich spezifische monoklonale Antikörper gegen L-Selektin und CD18 negativ auf die Fähigkeit der Neutrophilen-Aggregation aus<sup>28-31</sup>. Sowohl das Rollen der Granulozyten an der Endothelwand<sup>3</sup>, als auch das Rollen von Granulozyten an bereits wandständig arretierten Granulozyten und die damit verbundene Granulozytenaggregatbildung kann durch Antikörper gegen das Adhäsionsmolekül L-Selectin (CD62L) weitgehend bzw. vollständig gehemmt werden<sup>1, 2, 8</sup>. In verschiedenen Tiermodellen sind Anti-L-Selektin-Antikörper eingesetzt worden, etwa zur Reduzierung des Ischämie-Reperfusion-Schadens<sup>55, 56</sup> und zur Prophylaxe gegen die Entwicklung einer Schocklunge<sup>57</sup>.

Die homotypische Aggregation von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten wird sowohl durch blockierende Antikörper gegen L-Selectin als auch gegen  $\beta$ 2-Integrine vermindert<sup>2, 24-26</sup>, aus diesem Grunde wurden folgende funktionsblockierende monoklonale Antikörper verwendet: DREG 200-Fab-Fragmente (Anti-CD62L-mAb) und IB4-Antikörper (Anti-CD18-mAb). Die Aggregation konnte durch den Einsatz von sättigenden Konzentrationen an DREG 200 Fab (8 µg/ml) um 31 % ( $\pm$  10 %) und durch IB4 (12 µg/ml) um 94 % ( $\pm$  3 %), verglichen mit der Positivkontrolle (1µM Formylhexapeptid, 1,8 mM Ca<sup>2+</sup>, 0,5 mM Mg<sup>2+</sup>), reduziert werden.

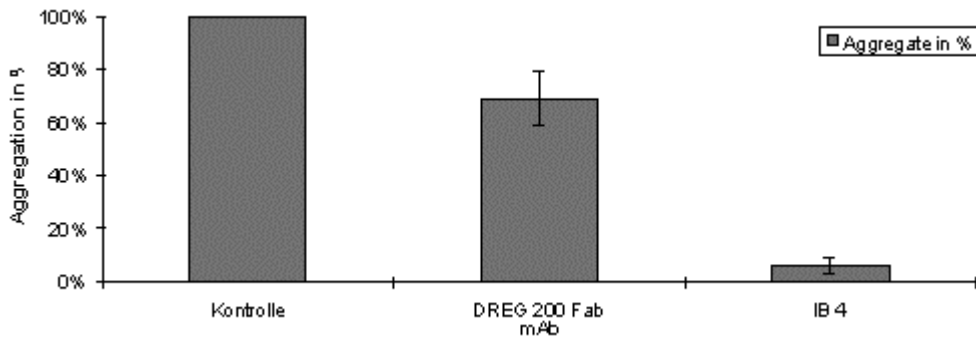


Abb. 14: Hemmung der Neutrophilenaggregation durch monoklonale Antikörper: Anti-CD62L mAb DREG 200 Fab (8µg/ml) um 31 % (± 10 %) und Anti-CD18 mAb IB4 (12µg/ml) um 94 % (± 3%)

Es wurden vor allem große Aggregate (Quadrupletts und Pentupletts) durch eine reproduzierbare spezifische Inhibition durch DREG 200-Fab gehemmt (44,1 % Inhibition). Kleine Aggregate (Doubletts-Quadrupletts), die bei weitem überwiegen, wurden mit 23,2 % Inhibition deutlich weniger betroffen. Der Anti-CD18-mAb (IB4) dagegen unterbindet die Neutrophilen Aggregation der kleinen Aggregate in erheblich größerem Umfang (Abb. 16). Eine genaue Identifizierung der Aggregate gelang im Durchflußzytometer im Fluoreszenz 2-Kanal nach Färbung mit LDS 751 und Darstellung im FL2/SSC-Dot-Plot (gutes Signal-/Hintergrundsverhältnis, Abb. 15) und sofortiger Messung (nativ) ohne Fixierung der Zellen mit Glutaraldehyd.

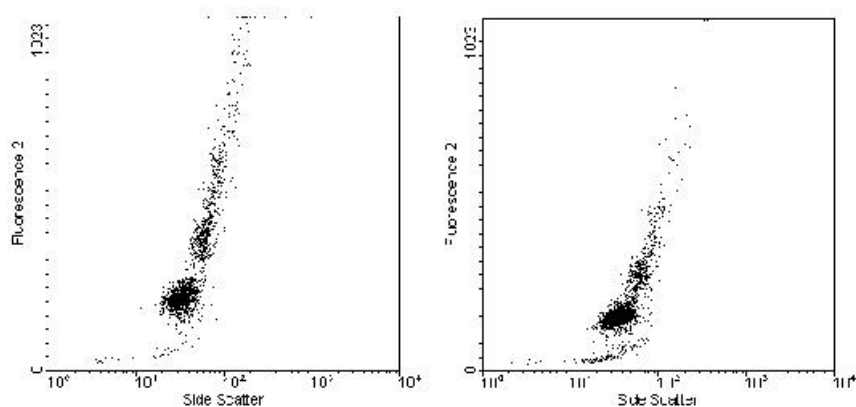


Abb. 15: Inhibition der Neutrophilen-Aggregation durch DREG 200 Fab: Links: Positivkontrolle nach Aktivierung (1 µM fHP, 1,8 mM Ca<sup>2+</sup>, 0,5 mM Mg<sup>2+</sup>, 2 min), Rechts: DREG 200 Fab 20 µg/ml (Inkubation 30 min) nach Aktivierung (siehe bevor), deutliche Hemmung der Bildung größerer Aggregate im Dotplot (FL2/SSC nach LDS 751-Färbung)

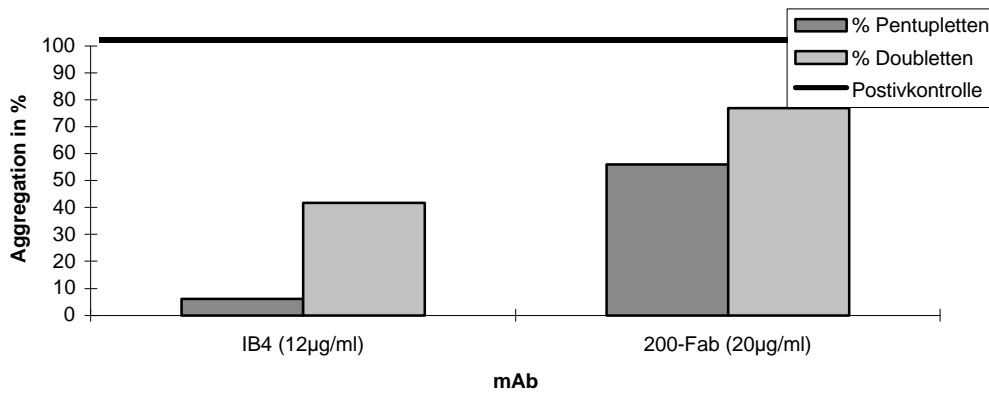


Abb. 16: Inhibitorische Wirkung der monoklonalen Antikörper IB4 (Anti-CD18-mAb) und DREG 200 Fab (Anti-CD62L-mAb) im Neutrophilen Aggregationsassay: IB4 hemmt deutlich stärker die Bildung kleinerer und größerer Aggregate nach Aktivierung ( $1 \mu\text{M}$  fHP,  $1,8 \text{ mM Ca}^{2+}$ ,  $0,5 \text{ mM Mg}^{2+}$ , 2 min).

## 5.2 Einsatz von Jurkat-Zellen im Aggregationsassay

Zur weiteren Vereinfachung des Aggregationsassays wurden die Aggregationsexperimente auch mit Zellen der L-Selektin-exprimierenden T-Zell-Leukämie-Linie Jurkat anstelle mit frisch präparierten Granulozyten durchgeführt. Die Verwendung von Jurkat-Zellen stellte insofern eine Vereinfachung dar, als dadurch die recht zeitaufwendige Reinigungsprozedur entfiel und eine Unabhängigkeit von der Blutbank bzw. von Spendern erzielt werden konnte. Außerdem bestand die Annahme, daß somit eine Konstanz hinsichtlich des Zustands der Zellen (Voraktivierung, L-Selektin-Expression) erzielt werden könnte und als Störgröße entfiel. Dazu wurden vergleichende Experimente mit Jurkat-Zellen durchgeführt.

Es zeigte sich, daß Jurkat-Zellen in vergleichbarer Weise aggregieren und prinzipiell einer durchflußzytometrischen Quantifizierung (Anwendung des Gatingverfahrens im FACScan) zugänglich sind. Wie auch bei neutrophilen Granulozyten, wurde allen Aggregationsexperimenten eine L-Selektin-Expressionskontrolle vorangestellt. Es galt, einen Parameter zu finden, der mit dem qualitativen Zustand bzw. der Güte der Zellen korreliert.



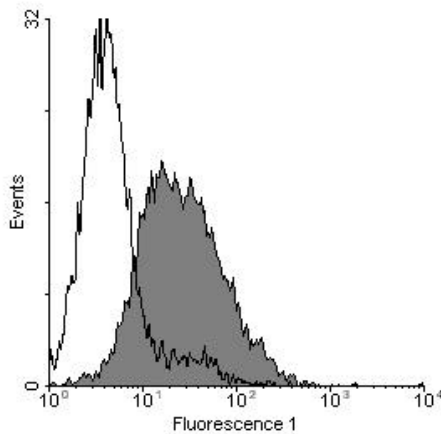


Abb. 17: L-Selektinexpressions-Kontrolle vor jedem Aggregationsexperiment mit Zellen der T-Zell-Leukämieinie Jurkat: (FITC)-gekoppeltem mAb Anti-Leu8 (Positivkontrolle - grau) bzw. Maus- IgG<sub>2a</sub>-Isotyp-Kontrollpräparation (Negativkontrolle - weiß). Die statistische Auswertung erfolgte durch Vergleich der Mediane im Fluoreszenz 1 Histogramm und Berechnung des Netto-Medians (Differenz Positiv-/Negativkontrolle).

Es konnte keine signifikante Korrelation zwischen maximal erzielter Aggregation und dem Netto-Median der L-Selektin-Expression festgestellt werden ( $p > 0,1$ , Spearman's Rangordnungs-Test). Außerdem zeigte sich, daß die L-Selektin-Expression wie auch die L-Selektin-abhängige Aggregation starken Schwankungen im Rahmen der Kultur unterworfen war. Im Vergleich zu neutrophilen Granulozyten kam es durchschnittlich zu einer um 36,2 % ( $\pm 11,6$  %) geringeren maximalen Aggregation und zu einer erheblichen Inkohärenz innerhalb der Kontrollen, was einen entscheidenden Einfluß auf die Güte der Ergebnisse bei der Bestimmung von Dosis-Wirkungsbeziehungen von potentiellen Inhibitoren bzw. Kompetitoren der L-Selektin-abhängigen homotypischen Aggregation hatte (Abb. 18).

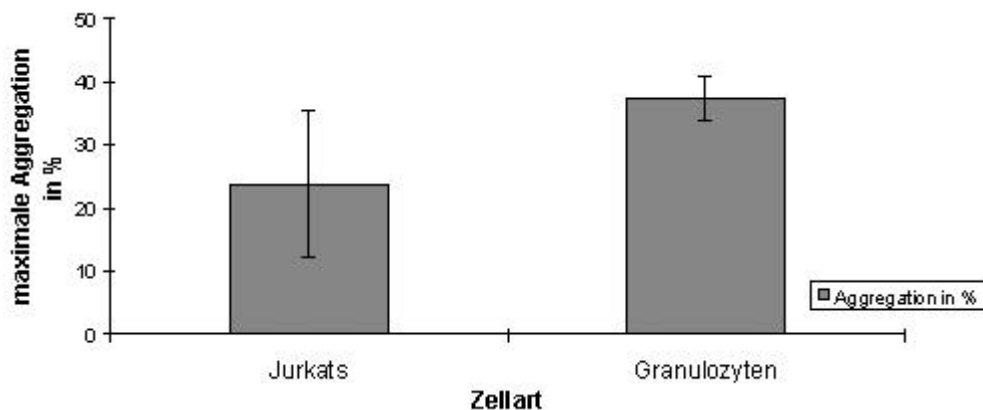


Abb. 18: Vergleich der maximalen Aggregationsraten von Jurkat-Zellen und Granulozyten nach Aktivierung ( $1\mu\text{M}$  fHP,  $1,8\text{ mM}$   $\text{Ca}^{2+}$ ,  $0,5\text{ mM}$   $\text{Mg}^{2+}$ , 2 min): Die durchschnittliche maximale Aggregation bei Jurkat-Zellen betrug 23,8 % ( $\pm 11,6$  %) und bei neutrophilen Granulozyten 37,3 % ( $\pm 3,5$  %), ( $m \pm SD$ ,  $n=8$ )

Infolge der hier gezeigten Ergebnisse wurde bei weiteren Experimenten zu jeder getesteten Probe separat eine Positivkontrolle durchgeführt, wodurch der maximale Probendurchsatz erheblich eingeschränkt wurde. Analog der Positivkontrolle im Aggregationsassay mit neutrophilen Granulozyten wurden die Jurkat-Zellen mit Formylhexapeptid bzw. Formyltripeptid (Endkonzentration  $1\mu\text{M}$ ,  $1,8\text{ mM Ca}^{2+}$ ,  $0,5\text{ mM Mg}^{2+}$ ) aktiviert (Abb. 19).

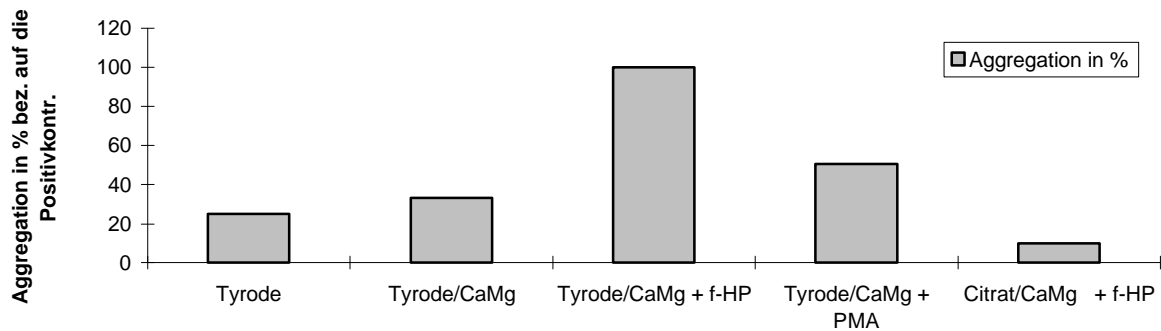


Abb. 19: Aktivierung der Jurkat-Zellen analog der Granulozyten im Neutrophilenassay ( $1\mu\text{M fHP}$ ,  $1,8\text{ mM Ca}^{2+}$ ,  $0,5\text{ mM Mg}^{2+}$ , 2 min); die Aggregation konnte durch den Zusatz von Citrat ( $5,3\text{ mM}$ ) nahezu komplett inhibiert werden.

Die L-Selektin-abhängige Aggregation ist u.a. charakterisiert durch Kalzium-Abhängigkeit, Scherkraftabhängigkeit, Fucoidin-Hemmbarkeit bzw. Hemmbarkeit durch andere saure polymere Kohlenhydratstrukturen (z.B. Dextransulfat MW 500 KD, Heparin) und Blockierbarkeit der Aggregation durch andere spezifische Kompetitoren, wie lösliches Plasma-s-L-Selektin<sup>58</sup>. Anhand der genannten Parameter war es zunächst notwendig, die initiierte Aggregation der Jurkat-Zellen zu charakterisieren und hinsichtlich ihrer spezifischen L-Selektin-Abhängigkeit zu überprüfen. Weiterhin stellte sich die Frage der Vergleichbarkeit der gewonnenen Ergebnisse mit denen aus der Neutrophilen-Aggregation.

Die Aggregation von Jurkat-Zellen ist durch reproduzierbare, deutliche Scherkraftabhängigkeit gekennzeichnet. Betrachtet man die Scherkraftabhängigkeit der Aggregation von Jurkat-Zellen, zeigt sich ein Maximum der Aggregation bei ca.  $600\text{ U/min}$ , wenn man die Bildung aller Aggregate ( $n \geq 2$ , Doubletten) berücksichtigt. Das Rühr optimum wurde bei weiteren Experimenten als Standard benutzt.

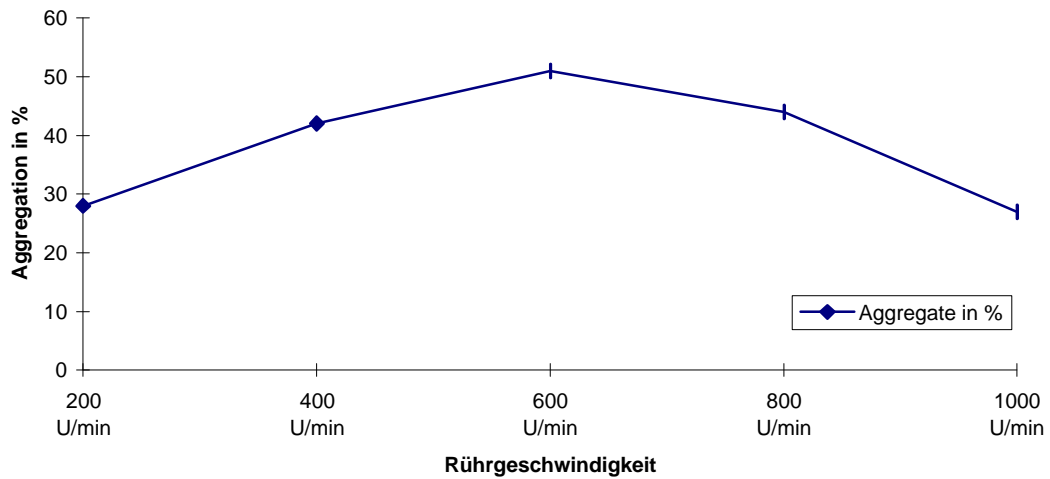


Abb. 20: Jurkat-Zellen: Nachweis der scherkraftabhängigen Aggregation mit einem Rühr optimum bei ca. 600 U/min nach Aktivierung (1  $\mu\text{M}$  fHP, 1,8 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , 0,5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ , 2 min)

Durch Komplexierung von  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  konnte auch die Aggregation von Jurkat-Zellen inhibiert werden: Zur Kontrolle der genannten Abhängigkeit wurden im Aggregationsansatz Konzentrationsreihen von Citrat durchgeführt und vergleichend mit dem Standardansatz (1,8 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,5 mM  $\text{MgCl}_2$ ) die Aggregationsraten ermittelt (Abb. 21). Im Experiment konnte nachgewiesen werden, daß die Aggregation durch  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Entzug nahezu komplett hemmbar ist.

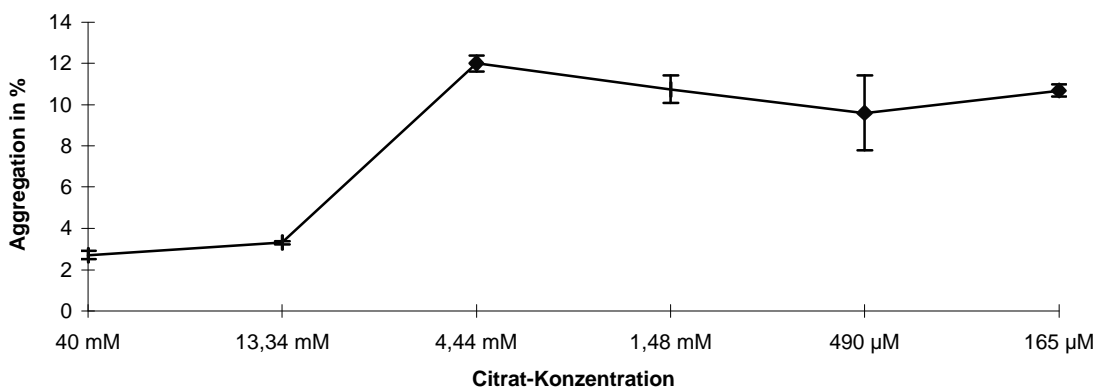


Abb. 21: Bestimmung der  $\text{ED}_{50}$  von Citrat im Jurkat-Aggregationsassay (Aktivierung mit 1  $\mu\text{M}$  fHP, 1,8 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , 0,5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ , 2 min), ( $\pm$  SD,  $n=3$ )

Die Messung der ED<sub>50</sub>-Werte für eine Reihe von L-Selektin-Antagonisten zeigte aber für frisch isolierte Granulozyten und Jurkat-Zellen im Rahmen einer Zehnerpotenz ähnliche Werte. Auch das aus Algen gewonnene Fucose-/Fucose-4-Sulfat-Polymer Fucoidin zeigt im Jurkat-Aggregationsassay die sigmoide Abhängigkeit der Hemmung vom Logarithmus der Konzentration (Abb. 22). Die halbmaximale Hemmkonzentration entsprach mit ca. 52 nM in etwa der im Neutrophilen-Aggregationsassay gemessenen ED<sub>50</sub> für Fucoidin (64 nM).

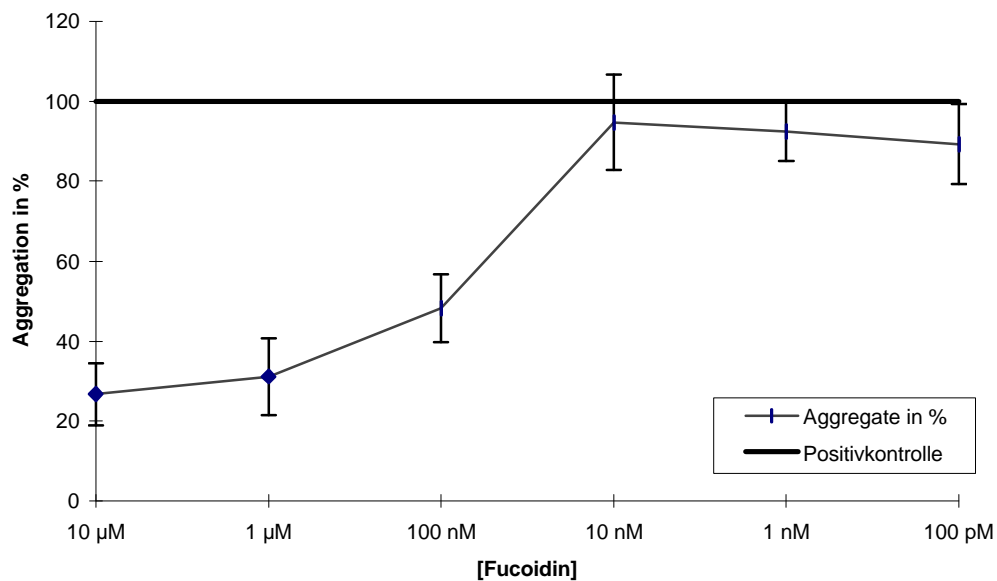


Abb. 22: Konzentrationsabhängigkeit der Inhibition der homotypischen Aggregation von Jurkat-Zellen durch Fucoidin nach Aktivierung (1 µM fHP, 1,8 mM Ca<sup>2+</sup>, 0,5 mM Mg<sup>2+</sup>, 2 min), ( $m \pm SD$ ,  $n=3$ )

Auch die im Neutrophilen-Aggregationsassay nachgewiesene Inhibition der Aggregation durch saure Kohlenhydratpolymere wie Heparin bzw. Dextransulfat (MW 500 KD) konnte bei Jurkat-Zellen reproduziert werden.

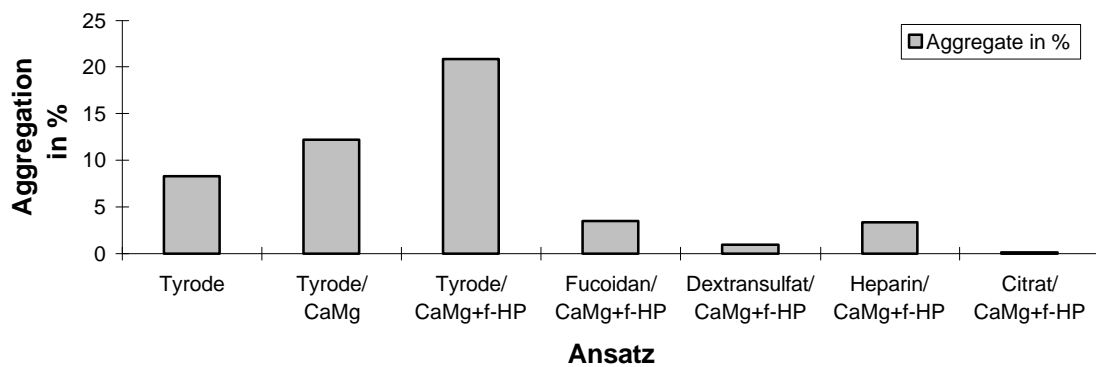


Abb. 23: Inhibition der Aggregation im Jurkat-Aggregationsassay durch saure Kohlenhydrat-polymere: Fucoidin (100µg/ml), Dextransulfat MW 500 KD (55 µM) und Heparin (300 µg/ml) nach Aktivierung (1 µM fHP, 1,8 mM Ca<sup>2+</sup>, 0,5 mM Mg<sup>2+</sup>, 2 min), Negativkontrolle Citrat (5,3 mM)

Interessanterweise ließ sich die Aggregation von Granulozyten durch Antikörper gegen CD11/CD18-Integrine (IB4, 12 µg/ml) um 94 % (± 3 %) nahezu vollständig hemmen, nicht jedoch die von Jurkat-Zellen (Abb. 24). Der Anti-CD18 mAb IB4 hatte keinen Einfluß auf das Ausmaß der Aggregation.

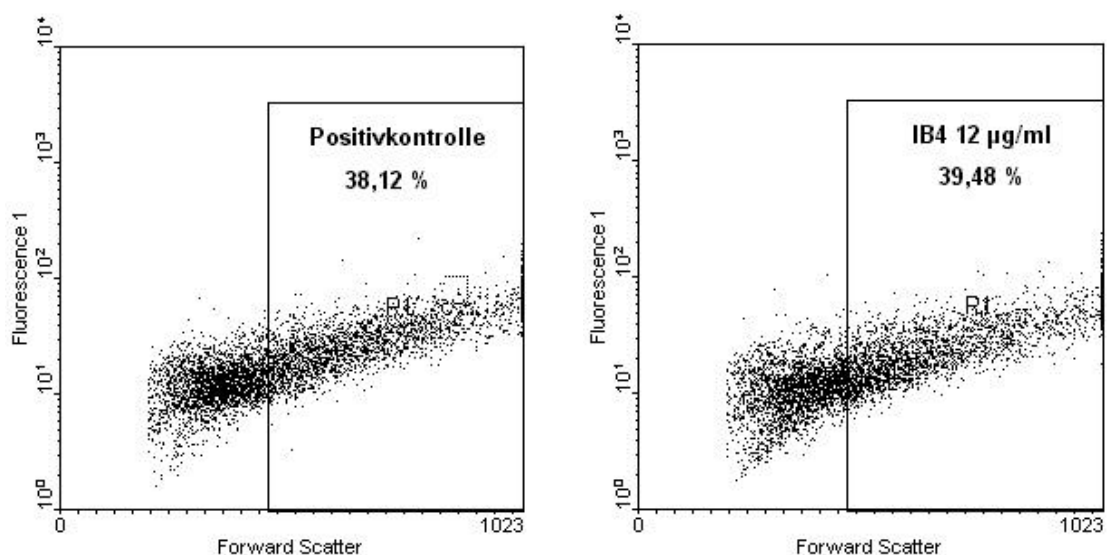
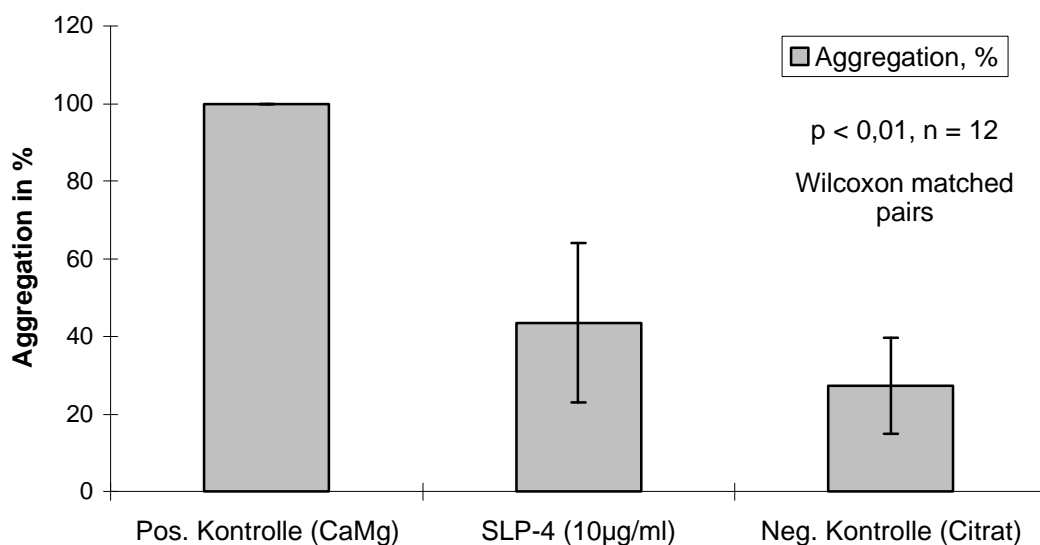


Abb. 24: Einsatz von Anti-CD18 mAb IB4 (12µg/ml) im Jurkat-Aggregationsassay: Keine Inhibition der Aggregation verglichen mit der Positivkontrolle (1 µM fHP, 1,8 mM Ca<sup>2+</sup>, 0,5 mM Mg<sup>2+</sup>, 2 min)

Außer durch den Verlust der L-Selektin-Expression für die aktivierte Zelle ist die L-Selektin-Abspaltung funktionell bedeutsam durch die Entstehung von löslichem L-Selektin (sCD62L), welches mit L-Selektin-abhängigen Adhäsionsprozessen anderer Zellen interferieren kann<sup>59</sup>. In ähnlicher Weise interferiert so z.B. sCD62L mit der Bindung zwischen Leukozyten oder Blasten an aktiviertes Endothel<sup>58, 60</sup>. In dieser Weise zeigte sich auch experimentell lösliches L-Selektin (sCD62L) als kompetitiver Antagonist der adhäsionsvermittelnden Wirkung von L-Selektin<sup>61, 62</sup>.

Zur Überprüfung der funktionellen Aktivität von sCD62L wurde aus Gründen der Menge und Reinheit zunächst rekombinantes sCD62L (SLP-4) eingesetzt (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. R. Tauber u. Mitarbeiterinnen, Abt. Klinische Chemie und Biochemie des Virchow-Klinikums). Im homotypischen Aggregationsassay mit Jurkat-Zellen kam es dosisabhängig zu einer deutlichen Hemmung der L-Selektin-abhängigen Aggregation (Abb. 25), mit einem Konzentrationsbereich halbmaximaler Hemmung (ED<sub>50</sub>) von etwa 10<sup>-7</sup> M.



*Abb. 25: Funktionelle Aktivität von löslichem rekombinanten L-Selektin (rsCD62L). Aggregation kultivierter Zellen der L-Selektin-exprimierenden T-Lymphoblastischen Jurkat-Linie unter Scherkraftbedingungen, Mittelwert ± SD von 6 unabhängigen Experimenten, normiert auf die Positivkontrolle (ohne Inhibitor = 100 %). Die Verringerung der Aggregation durch rsCD62L und Citrat, bezogen auf die Positivkontrolle, ist jeweils signifikant.*

## 6 Diskussion

Zielsetzung dieses Promotionsvorhabens war es, ein Assayverfahren zu etablieren, mit dem sich die L-Selektin-abhängige homotypische Aggregation von humanen neutrophilen Granulozyten *in vitro* quantifizieren läßt. Diese homotypische Aggregation sollte dem L-Selektin vermittelten "Rolling" über bereits endothelgebundene bzw. auf dem Endothel rollenden Granulozyten entsprechen. Dieser Teilschritt ist maßgeblich verantwortlich für die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten beim Migrationsvorgang im Rahmen von Entzündungsreaktionen<sup>1</sup>,<sup>2</sup>. Grundlage war die Beobachtung, daß die homotypische Aggregation im Reagenzglas unter dynamischen Bedingungen simuliert werden kann und durchflußzytometrisch quantifizierbar ist. Dabei wurde in der Eingangs gefaßten Fragestellung nach einem Verfahren gesucht, dessen Einsatz in verhältnismäßig kurzer Zeit die Bearbeitung einer größeren Anzahl von Proben zuläßt und dabei möglichst auch mit kleinen Mengen in Lösung befindlicher Substanzen unter physiologischen Pufferbedingungen auskommt. Außerdem sollte es möglich sein, detaillierte Dosis-Wirkungskurven von potentiellen Inhibitoren der L-Selektin-abhängigen Aggregation aufzustellen und qualitativ zu beurteilen, um den Assay zur routinemäßigen Überprüfung derselben einsetzen zu können. Bei der Fragestellung wurde sich an einem bereits publizierten Assayverfahren<sup>2</sup> orientiert, welches mit z.T. erheblichen Modifikationen zur Anwendung kam, um den genannten Forderungen zu entsprechen.

Während sich die gestellte Anforderung eines geringen Probenvolumens für die Beurteilung von Substanzen, die derzeit nur in kleinen Mengen aufgereinigt zur Verfügung stehen, im verwendeten Versuchsaufbau verwirklichen ließ, gestaltete sich der Aggregationsassay mit humanen neutrophilen Granulozyten und mit Zellen der humanen T-Zell-Leukämieinie problematisch und als sehr arbeitsaufwendig. Die Verwendung von neutrophilen Granulozyten im Aggregationsassay hatte den Vorteil, daß man dadurch den *in vivo*-Verhältnissen recht nahe kam. Dafür mußte allerdings eine aufwendige Aufreinigungs-prozedur und eine starke Spenderabhängigkeit der jeweiligen Granulozytenpräparation hingenommen werden, was den Arbeitsaufwand vergrößerte und auf diese Weise den maximalen Probendurchsatz bedeutend einschränkte. Aus diesem Grunde wurden zur Vereinfachung alternativ Versuchsreihen mit der artifiziellen L-

Selektin-exprimierenden T-Zell-Leukämie-Linie Jurkat durchgeführt.

Sowohl neutrophile Granulozyten als auch Jurkat-Zellen zeigten nach Zugabe von 1  $\mu$ M Formyl-Hexapeptid in Gegenwart von 1,8 mM  $\text{Ca}^{2+}$  und 0,5 mM  $\text{Mg}^{2+}$  scherkraftabhängig (Rühroptimum 600 U/min) eine Aggregation, die sich jedoch in Ausmaß und Beständigkeit im Verlauf von Meßreihen erheblich unterschied. Mit neutrophilen Granulozyten konnte eine durchschnittliche Aggregationsrate von 37 % ( $\pm$  3,5 %) und mit Jurkat-Zellen eine Rate von nur 23,8 % ( $\pm$  11,6 %) erzielt werden. Die mit der niedrigeren Aggregationsrate der Jurkat-Zellen verbundene größere Inkohärenz innerhalb der Kontrollen im Aggregationsassay hatte einen entscheidenden Einfluß auf die Güte der Ergebnisse bei der Bestimmung von Dosis-Wirkungsbeziehungen von potentiellen Inhibitoren mit der Konsequenz, daß bei Experimenten mit Jurkat-Zellen zu jeder gemessenen Probe separat eine Positivkontrolle mitgeführt werden mußte. Der maximale Probendurchsatz wurde dadurch massiv eingeschränkt. Damit wurde der Vorteil, der durch die vereinfachte Aufarbeitung der Jurkat-Zellen gegenüber der der Granulozyten (Wegfall der zeitaufwendigen Reinigungsprozedur) erzielt wurde, wieder ausgeglichen. Die Erwartung, daß mit der Verwendung von Jurkat-Zellen eine Konstanz hinsichtlich des Zustands der Zellen (Voraktivierung, L-Selektin-Expression) erzielt werden könne und damit als Störgröße entfiere, erfüllte sich nicht. So zeigte sich, daß die L-Selektin-Expression wie auch die L-Selektin-abhängige Aggregation starken Schwankungen im Rahmen der Zellkultur unterworfen war. Ferner konnte auch keine signifikante Korrelation zwischen maximal erzielter Aggregation und dem Netto-Median der L-Selektin-Expression festgestellt werden ( $p > 0,1$ , Spearman's Rangordnungs-Test). Es fehlt somit ein Parameter, mit dem es möglich ist, eine Aussage über die Qualität der Jurkat-Zellen in Bezug auf die Verwendung im Aggregationsassay zu treffen bzw. Veränderungen, die die Zellen im Rahmen der Zellkultur unterworfen sind, zu dokumentieren.

Die aus der Struktur der N-terminalen C-Typ-Lektin-Domäne von L-Selektin abgeleitete Annahme, daß L-Selektin in  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Weise an Kohlenhydratstrukturen mit negativer Ladung bindet, entspricht den Ergebnissen der meisten *in vitro*- wie *in vivo*-Untersuchungen<sup>35-38</sup>, bei denen in funktionellen Studien L-Selektin-abhängige Adhäsionsprozesse durch Komplexbildung zweiwertiger Ionen fast komplett inhibiert wurden. Folgerichtig ließ sich die



Aggregation der neutrophilen Granulozyten und der Jurkat-Zellen durch Komplexbildner für zweiwertige Metall-Ionen (2 mM EDTA, 4 mM Citrat) nahezu komplett inhibieren.

Ebenso ließ sich die Aggregation der Granulozyten und der Jurkat-Zellen durch Dextransulfat (MW 500 KD) und Fucoidin (MW 100 KD) hemmen. Fucoidin und Dextransulfat ergaben die erwartete sigmoide Abhängigkeit der Inhibition vom Logarithmus der Konzentration.

Aggregationsassay mit:	- neutrophilen Granulozyten	- Jurkat-Zellen
<b>Fucoidin ED<sub>50</sub></b>	ca. 64 nM	ca. 52 nM

Tab. 3: Experimentell gemessene ED<sub>50</sub> von Fucoidin im Aggregationsassay

Außerdem zeigte sich im Neutrophilenassay, daß Dextransulfat die Aggregation stärker hemmt als Fucoidin (Dextransulfat<sub>ED50</sub> ca. 40 nM, Fucoidin<sub>ED50</sub> ca. 64 nM), was mit bereits publizierten Angaben übereinstimmt<sup>34</sup>. Nach allgemeiner Auffassung hemmen schon nanomolare Konzentrationen von phosphorylierten Polysacchariden, wie Fucoidin und Dextransulfat (MW 500 KD) die Fähigkeit neutrophiler Granulozyten zur homotypischen Aggregation. Dabei konkurrieren Dextransulfat und Fucoidin wahrscheinlich mit den natürlichen Liganden um die L-Selektin-Bindungsstellen<sup>34</sup>. Durch den Aggregationsassay mit neutrophilen Granulozyten und mit Jurkat-Zellen konnten folglich recht genaue Ergebnisse hinsichtlich der ED<sub>50</sub> von bekannten L-Selektin-Inhibitoren und Kompetitoren erzielt werden.

An der Zellaggregation neutrophiler Granulozyten unter Scherkraftbedingungen sind außer L-Selektin-Liganden-Interaktionen noch andere Liganden-Rezeptor-Interaktionen beteiligt<sup>1, 2</sup>. Zwar gelang im Aggregationsassay der Nachweis der Beteiligung von L-Selektin an der Aggregation neutrophiler Granulozyten mit reproduzierbarer Sicherheit durch die spezifische Inhibition der Aggregation durch monoklonale Anti-L-Selektin-Antikörper Fab-DREG 200 (8µg/ml) um 31 % (± 10 %). Dagegen konnte jedoch eine fast komplette Hemmung der Aggregation um 94 % (± 3 %) durch den Einsatz von monoklonalen

Anti-CD18-Antikörpern-IB4 (12µg/ml) erreicht werden. Die gezeigten Ergebnisse mit monoklonalen Antikörpern sprechen daher auch für eine ablaufende Integrin-abhängige Aggregation. Beim Neutrophilen-Aggregationsassay sind die sekundären und stabileren Integrin (CD11/CD18)-vermittelten Wechselwirkungen für das Ergebnis entscheidender als die primären L-Selektin-abhängigen. Wahrscheinlich läßt sich jedoch die folgende Hochregulation bzw. Aktivierung der Integrine mit der Folge der Bildung stabilerer Aggregate durch Anti-L-Selektin-mAb (DREG 200-Fab) inhibieren. Somit ließe sich erklären, daß vor allem große Aggregate ( $n \geq 5$ ) durch DREG 200-Fab (44,1 % Inhibition) betroffen sind. Die bei weitem überwiegenden kleinen Aggregate ( $2 \leq n \leq 5$ ) wurden mit 23,2 % Inhibition deutlich weniger gehemmt. Interessanterweise ließ sich dagegen die Aggregation von Jurkat-Zellen nicht durch monokonale Antikörper gegen CD18 (mAb-IB4) hemmen. Die Aggregation der Jurkat-Zellen ließ sich hingegen spezifisch durch rekombinantes lösliches L-Selektin (SLP 4,  $10^{-7}$  M) um ca. 56,5 % ( $\pm 20,5$  %) inhibieren.

Die hier aufgezeigten Ergebnisse deuten darauf hin, daß auch der Prozeß der homotypischen Aggregation im Rahmen der Extravasation von Leukozyten *in vivo* erheblich komplexer ist als zunächst angenommen. Die beteiligten Prozesse der homotypischen Aggregation laufen keinesfalls ausschließlich sequentiell ab, sondern auch parallel und sind daher mit Hilfe des entwickelten Assaysystems nicht strikt voneinander zu trennen. Bei neutrophilen Granulozyten spielen sowohl L-Selektin- als auch Integrin-Wechselwirkungen eine maßgebliche Rolle. Die Messung der ED<sub>50</sub>-Werte für eine Reihe von L-Selektin-Antagonisten zeigte aber für frisch isolierte Granulozyten und Jurkat-Zellen im Rahmen einer Zehnerpotenz ähnliche Werte. Die einleitend dargestellten *in vitro*-Experimente zeigen, daß es möglich ist, ein derartiges Assayverfahren für die Messung L-Selektin-abhängiger Aggregationsvorgänge zu verwenden. Während insgesamt das Verfahren der homotypischen Aggregation sowohl mit frisch isolierten humanen Granulozyten als auch mit Jurkat-Zellen für ausgewählte experimentelle Fragestellungen einsetzbar ist, muß seine Brauchbarkeit für umfangreiche systematische Serienuntersuchungen verneint werden.

## 7 Verwendetes Material

Acridin-Orange Fa. Fluka	0,5 mg/ml
CaMg-Stammlösung:	18 mM CaCl <sub>2</sub> , 5 mM MgCl <sub>2</sub> in H <sub>2</sub> O
Citrat (Na <sub>3</sub> -Citrat+H <sub>2</sub> O)	5,3 mM in H <sub>2</sub> O mit NaOH gepuffert pH 7.3 (MW 294 ,1 g/mol)
Dextransulfat Fa.Pharmacia (MW= 500 KD)	5 µM in PBS
DREG 200 mAb Fab DREG 200 mAb (Hybridoma-Zellen freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. E. Butcher, San Francisco, USA)	50 ng/10 µl 17 ng/10 µl
EDTA	4 mM (Stammlösung)
FACS-Lysing Solution Fa. Becton Dickinson	
Ficoll Paque Fa. Pharmacia	
Formyl-Hexapeptid (CHO-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys) Fa. Bachem	2 mM gelöst in 80% AcOH und gepuffert mit NaOH
Formyl-Tripeptide FMLP (CHO-Met-Leu-Phe) Fa. Bachem	10 µM in 5% Dimethylformamid
Fucoidin Fa.Sigma MW 100 KD	10 µM in PBS
Glutaraldehyd 25 % Fa. Sigma	
Heparin Fa. Sigma H 3393 (Schweinedarmmukosa)	Stammlsg. 10.000 U/ml
Heparin Fa. Sigma H 9133 (Rinderlunge)	Stammlsg. 10.000 U/ml
IB4 mAb Fa. Ancell	

IgG2 $\alpha$ -FITC mAb Fa. Becton Dickinson	
Leu8-FITC mAb Fa. Becton Dickinson	
PBS-IgG+BSA+Azid (1000 ml): PBS-Salze (Fa. Seromed) 9,55 g	0,2 % NaN <sub>3</sub> , 0,15 % BSA; 0,1% h-IgG pH 7.3
rekombinantes lösliches-L-Selektin (SLP4) MW= 65 KD aus BHK-Zellen  (freundlicherweise zur Verfügung gestellt vom Institut für Diagnostikforschung, Berlin)	0,33 pMol/10 $\mu$ l
RPMI 1680 with L-Glutamine Fa. Gibco	
Tyrode-Lösung	110 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O 56 mg, Glucose, 30 mM HEPES, pH 7.35

## **8 Lebenslauf**

geboren: am 21.06.1972 in Bad Saarow-Pieskow

7/1991 Allgemeinen Hochschulreife am Runge Gymnasium Oranienburg

### **Studium**

seit 10/1992 Studium an der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

3/1995 Ärztliche Vorprüfung und Wechsel an die Humboldt Universität Berlin

4/1996 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

4/1998 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

5/1999 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### **Famulaturen**

7-8/1996 Radiologie: Virchow-Klinikum, Abteilung Sonographie

9/1996 Pädiatrie: Children's Hospital Seattle, University of Washington, USA,  
Department of Neurology

3-4/1997 Pädiatrie: Kinderklinik des UKRV – KMT

8-9/1997 Pädiatrie: Kinderarztpraxis in Velten

### **Praktisches Jahr**

8-9/1997 Chirurgie: Baragwanath Hospital Johannesburg, University of  
Witwatersrand, RSA

9-12/1998 Pädiatrie: Children's Hospital Seattle, University of Washington, USA

1-4/1999 Innere: FLT Berlin-Buch

### **Promotionsvorhaben**

1996-1999 "Messung L-Selektin-abhängiger Adhäsionsprozesse mit Hilfe des  
homotypischen "Aggregationsassays"

### **Tätigkeiten neben dem Studium**

10/1991-9/1992 Rettungssanitäter an der Sanitätsschule in Würzburg

1997/98 Mitarbeit im Institut für Diagnostikforschung im LAR Verbundprojekt zur  
Entwicklung spezifischer Diagnostika auf der Grundlage zuckervermittelter  
Rezeptor Ligand-Wechselwirkungen von L-Selektin

## 9 Literatur

1. Simon SI, Chambers JD, Butcher E, Sklar LA. Neutrophil aggregation is  $\beta$  2-integrin- and L-selectin-dependent in blood and isolated cells. *J Immunol* 1992;149:2765-71.
2. Simon SI, Rochon YP, Lynam EB, Smith CW, Anderson DC, Sklar LA.  $\beta$  2-integrin and L-selectin are obligatory receptors in neutrophil aggregation. *Blood* 1993;82:1097-106.
3. von Andrian UH, Chambers JD, McEvoy LM, Bargatze RF, Arfors KE, Butcher EC. Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte  $\beta$ 2 integrins in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:7538-42.
4. Zakrzewicz A, Gräfe M, Terbeek D, Bongrazio M, Auch-Schwelk W, Walzog B, Graf K, Fleck E, Ley K, Gaethgens P. L-selectin dependent leukocyte adhesion to microvascular but not to macrovascular endothelial cells of the human coronary system. *Blood* 1997;89:3228-35.
5. Ley K, Gaehtgens P, Fennie C, Singer MS, Lasky LA, Rosen SD. Lectin-like cell adhesion molecule 1 mediates leukocyte rolling in mesenteric venules in vivo. *Blood* 1991;77:2553-5.
6. von Andrian UH, Hansell P, Chambers JD, Berger EM, Torres Filho I, Butcher EC, Arfors KE. L-selectin function is required for beta 2-integrin-mediated neutrophil adhesion at physiological shear rates in vivo. *Am J Physiol* 1992;263:H1034-44.
7. Bargatze RF, Butcher EC. Rapid G protein-regulated activation event involved in lymphocyte binding to high endothelial venules. *J Exp Med* 1993;178:367-72.
8. Bargatze RF, Kurk S, Butcher EC, Jutila MA. Neutrophils roll on adherent neutrophils bound to cytokine-induced endothelial cells via L-selectin on the rolling cells. *J Exp Med* 1994;180:1785-92.
9. Buttrum SM, Hatton R, Nash GB. Selectin-mediated rolling of neutrophils on immobilized platelets. *Blood* 1993;82:1165-74.
10. Rainger, G. E.; Buckley, C.; Simmons, D. L., and Nash, G. B. Neutrophils rolling on immobilised platelets migrate into homotypic aggregates after activation. *Thromb Haemost.* 1998 Jun; 79(6):1177-83;
11. Lindbom, L.; Xie, X.; Raud, J., and Hedqvist, P. Chemoattractant-induced firm adhesion of leukocytes to vascular endothelium in vivo is critically dependent on initial leukocyte rolling. *Acta Physiol Scand.* 1992 Dec; 146(4):415-21;
12. Downey, G. P.; Worthen, G. S.; Henson, P. M., and Hyde, D. M. Neutrophil sequestration and migration in localized pulmonary inflammation. Capillary localization and migration across the interalveolar septum. *Am Rev Respir Dis.* 1993 Jan; 147(1):168-76;
13. Kansas GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* 1996;88:3259-87.
14. Laudanna C, Campbell JJ, Butcher EC. Role of Rho in chemoattractant-activated leukocyte adhesion through integrins. *Science* 1996;271:981-3.
15. Middleton J, Neil S, Wintle J, Clark-Lewis I, Moore H, Lam C, Mauer M, Hub E, Rot A. Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells. *Cell* 1997;91:385-95.
16. Simon SI, Burns AR, Taylor AD, Gopalan PK, Lynam EB, Sklar LA, Smith CW. L-selectin (CD62L) cross-linking signals neutrophil adhesive functions via the Mac-1 (CD11b/CD18)  $\beta$ 2-integrin. *J Immunol* 1995;155:1502-14.
17. Hwang ST, Singer MS, Giblin PA, Yednock TA, Bacon KB, Simon SI, Rosen SD. GlyCAM-1, a physiologic ligand for L-selectin, activates  $\beta$ 2 integrins on naive peripheral lymphocytes. *J Exp Med* 1996;184:1343-8.
18. Sikorski MA, Staunton DE, Mier JW. L-selectin crosslinking induces integrin-dependent adhesion: evidence for a signaling pathway involving PTK but not PKC. *Cell Adhes Commun* 1996;4:355-67.
19. Gopalan PK, Smith CW, Lu H, Berg EL, McIntire LV, Simon SI. Neutrophil CD18-dependent arrest on intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in shear flow can be activated through L-selectin. *J Immunol* 1997;158:367-75.
20. Giblin PA, Hwang ST, Katsumoto TR, Rosen SD. Ligation of L-selectin on T lymphocytes activates  $\beta$ 1 integrins and promotes adhesion to fibronectin. *J Immunol* 1997;159:3498-507.

21. Tsang YM, Neelamegham S, Hu Y, Berg EL, Burns AR, Smith CW, Simon SI. Synergy between L-selectin signalling and chemotactic activation during neutrophil adhesion and transmigration. *J Immunol* 1997;159:4566-77.
22. Butcher EC. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 1991;67:1033-6.
23. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994;76:301-14.
24. Bennett TA, Schammel CMG, Lynam EB, Guyer DA, Mellors A, Edwards B, Rogelj S, Sklar LA. Evidence for a third component in neutrophil aggregation: potential roles of O-linked glycoproteins as L-selectin counter-structures. *J Leukocyt Biol* 1995;58:510-18.
25. Lynam EB, Rogelj S, Edwards BS, Sklar LA. Enhanced aggregation of human neutrophils by MnCl<sub>2</sub> or DTT differentiates the roles of L-selectin and  $\beta$ 2-integrins. *J Leukocyt Biol* 1996;60:356-64.
26. Teixeira MM, Rossi AG, Hellewell PG. Adhesion mechanisms involved in C5a-induced eosinophil homotypic aggregation. *J Leukocyt Biol* 1996;59:389-96.
27. Ley K, Bullard DC, Arbonés ML, Bosse R, Vestweber D, Tedder TF, Beaudet AL. Sequential contribution of L- and P-selectin to leukocyte rolling in vivo. *J Exp Med* 1995;181:669-75.
28. Watson SR, Fennie C, Lasky LA. Neutrophil influx into an inflammatory site inhibited by a soluble homing receptor-IgG chimera. *Nature* 1991;349:164-7.
29. Dawson J, Sedgwick AD, Edwards JC, Lees P. The monoclonal antibody MEL-14 can block lymphocyte migration into a site of chronic inflammation. *Eur J Immunol* 1992;22:1647-50.
30. Bosse R, and Vestweber, D. Only simultaneous blocking of the L- and P-selectin completely inhibits neutrophil migration into mouse peritoneum. *Eur J Immunol*. 1994 Dec; 24(12):3019-24;
31. Hamann A, Jablonski Westrich D, Jonas P, Thiele HG. Homing receptors reexamined: mouse LECAM-1 (MEL-14 antigen) is involved in lymphocyte migration into gut-associated lymphoid tissue. *Eur J Immunol* 1991;21:2925-9.
32. Girard JP, Springer TA. High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration. *Immunol Today* 1995;16:449-57.
33. Smith JA. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J Leukoc Biol* 1994;56:672-86.
34. Rochon YP, Simon SI, Lynam EB, Sklar LA. A role for lectin interactions during human neutrophil aggregation. *J Immunol* 1994;152:1385-93.
35. Varki A. Selectin ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:7390-7.
36. Varki A. Selectin ligands: will the real ones please stand up? *J Clin Invest* 1997;99:158-62.
37. Needham LK, Schnaar RL. The HNK-1 reactive sulfoglucuronyl glycolipids are ligands for L-selectin and P-selectin but not E-selectin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:1359-63.
38. Iwabuchi K, Nagaoka I, Someya A, Yamashita T. Type IV collagen-binding proteins of neutrophils: possible involvement of L-selectin in the neutrophil binding to type IV collagen. *Blood* 1996;87:365-72.
39. Stoolman LM, Yednock TA, Rosen SD. Homing receptors on human and rodent lymphocytes--evidence for a conserved carbohydrate-binding specificity. *Blood* 1987;70:1842-50.
40. Weston SA, Parish CR. Modification of lymphocyte migration by mannans and phosphomannans. Different carbohydrate structures control entry of lymphocytes into spleen and lymph nodes. *J Immunol* 1991;146:4180-6.
41. Imai Y, Singer MS, Fennie C, Lasky LA, Rosen SD. Identification of a carbohydrate-based endothelial ligand for a lymphocyte homing receptor. *J Cell Biol* 1991;113:1213-21.
42. Ley K, Linnemann G, Meinen M, Stoolman LM, Gaetgens P. Fucoidin, but not yeast polyphosphomannan PPME, inhibits leukocyte rolling in venules of the rat mesentery. *Blood* 1993;81:177-85.

43. Griffin JD, Spertini O, Ernst TJ, Belvin MP, Levine HB, Kanakura Y, Tedder TF. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other cytokines regulate surface expression of the leukocyte adhesion molecule-1 on human neutrophils, monocytes, and their precursors. *J Immunol* 1990;145:576-84.
44. Alon R, Chen S, Puri KD, Finger EB, Springer TA. The kinetics of L-selectin tethers and the mechanics of selectin-mediated rolling. *J Cell Biol* 1997;138:1169-80.
45. Lynam, E.; Sklar, L. A.; Taylor, A. D.; Neelamegham, S.; Edwards, B. S.; Smith, C. W., and Simon, S. I. Beta2-integrins mediate stable adhesion in collisional interactions between neutrophils and ICAM-1-expressing cells. *J Leukoc Biol.* 1998 Nov; 64(5):622-30;
46. Lawrence MB, Bainton DF, Springer TA. Neutrophil tethering to and rolling on E-selectin are separable by requirement for L-selectin. *Immunity* 1994;1:137-45.
47. Lawrence MB, Kansas GS, Kunkel EJ, Ley K. Threshold levels of fluid shear promote leukocyte adhesion through selectins (CD62L,P,E). *J Cell Biol* 1997;136:717-27.
48. Puri KD, Finger EB, Springer TA. The faster kinetics of L-selectin than of E-selectin and P-selectin rolling at comparable binding strength. *J Immunol* 1997;158:405-13.
49. Finger EB, Puri KD, Alon R, Lawrence MB, von Andrian UH, Springer TA. Adhesion through L-selectin requires a threshold hydrodynamic shear. *Nature* 1996;379:266-9.
50. Simon, S. I.; Neelamegham, S.; Taylor, A., and Smith, C. W. The multistep process of homotypic neutrophil aggregation: a review of the molecules and effects of hydrodynamics. *Cell Adhes Commun.* 1998; 6(2-3):263-76;
51. Lynam, E.; Sklar, L. A.; Taylor, A. D.; Neelamegham, S.; Edwards, B. S.; Smith, C. W., and Simon, S. I. Beta2-integrins mediate stable adhesion in collisional interactions between neutrophils and ICAM-1-expressing cells. *J Leukoc Biol.* 1998 Nov; 64(5):622-30;
52. Kawashima, H.; Watanabe, N.; Hirose, M.; Li, Y. F.; Hirose, J., and Miyasaka, M. Vascular and non-vascular ligands for L-selectin. *Cell Adhes Commun.* 1998; 6(2-3):135-9;
- 53.. Nelson RM, Cecconi O, Roberts WG, Aruffo A, Linhardt RJ, Bevilacqua MP. Heparin oligosaccharides bind L- and P-selectin and inhibit acute inflammation. *Blood* 1993;82:3253-8.
54. Lider O, Baharav E, Mekori YA, Miller T, Naparstek Y, Vlodavsky I, Cohen IR. Suppression of experimental autoimmune diseases and prolongation of allograft survival by treatment of animals with low doses of heparins. *J Clin Invest* 1989;83:752-6.
55. Mihelcic D, Schleiffenbaum B, Tedder TF, Sharar SR, Harlan JM, Winn RK. Inhibition of leukocyte L-selectin function with a monoclonal antibody attenuates reperfusion injury to the rabbit ear. *Blood* 1994;84:2322-8.
56. Buerke M, Weyrich AS, Zheng Z, Gaeta FC, Forrest MJ, Lefer AM. Sialyl Lewisx-containing oligosaccharide attenuates myocardial reperfusion injury in cats. *J Clin Invest* 1994;93:1140-8.
57. Mulligan MS, Miyasaka M, Tamatani T, Jones ML, Ward PA. Requirements for L-selectin in neutrophil-mediated lung injury in rats. *J Immunol* 1994;152:832-40
58. Schleiffenbaum B, Spertini O, Tedder TF. Soluble L-selectin is present in human plasma at high levels and retains functional activity. *J Cell Biol* 1992;119:229-38.
59. Shimada, Y.; Sato, S.; Hasegawa, M.; Tedder, T., and Takehara, K. Elevated serum L-selectin levels and abnormal regulation of L-selectin expression on leukocytes in atopic dermatitis: Soluble L-selectin levels indicate disease severity. *J Allergy Clin Immunol.* 1999 Jul; 104(1):163-168;
60. Spertini O, Callegari P, Cordey AS, Hauert J, Joggi J, von Fliedner V, Schapira M. High levels of the shed form of L-selectin are present in patients with acute leukemia and inhibit blast cell adhesion to activated endothelium. *Blood* 1994;84:1249-56.
61. Donnelly SC, Haslett C, Dransfield I, Robertson CE, Carter DC, Ross JA, Grant IS, Tedder TF. Role of selectins in development of adult respiratory distress syndrome [see comments]. *Lancet* 1994;344:215-9.
62. Mulligan MS, Watson SR, Fennie C, Ward PA. Protective effects of selectin chimeras in neutrophil-mediated lung injury. *J Immunol* 1993;151:6410-7.