Aus der Klinik für Kardiologie/ Innere Medizin

Deutsches Herzzentrum Berlin

Stiftung des bürgerlichen Rechts

DISSERTATION

Flussgeschwindigkeiten von Leukozyten über Endothelzellmonolayer

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Usan Thanabalasingam
aus Inuvil/ Sri Lanka

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. E. Fleck

2. Prof. Dr. med. D. Vestweber

3. Prof. Dr. med. A. Pries

Datum der Promotion: 14.05.2004

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG 1

2 MATERIAL UND METHODEN 3

2.1 Endothelzellen 3

2.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen 3

2.1.2 Isolation der Endothelzellen 4

2.1.2.1 Humane umbilikale venöse Endothelzellen (HUVEC) 4

2.1.3 Isolation der humanen kardialen mikrovaskulären Endothelzellen (HCMEC) 4

2.1.4 Herstellung von UEA-I beschichteten Dynabeads und Trennung der Endothelzellen aus einer Mischkultur 5

2.1.5 Immunfluoreszenzfärbung der Endothelzellen 6

2.2 Leukozyten 8

2.2.1 Allgemeine Kulturbedingungen 8

2.2.2 Beschreibung der verwendeten Leukozyten 8

2.2.3 Charakterisierung der Oberflächenmerkmale durch FACS 8

2.3 Der Flusskammerversuch 10

2.3.1 Vorbereitung der Endothelzellen 10

2.3.2 Vorbereitung der Leukozyten 10

2.3.3 Aufbau der Flusskammer 11

2.3.4 Berechnung der Wandschubspannung („shear stress“) 11

2.3.5 Durchführung des Versuchs 13

2.4 Datenverarbeitung und Statistik 15

3 ERGEBNISSE 16

3.1 Nachweis von Endothelzellen in der Zellkultur 16

3.2 Ergebnisse der FACS-Analyse der Nalm6-IF4 Zellen 16

3.3 L-Selektin vermittelte Interaktion zwischen Endothel und Leukozyten 18

3.3.1 Feste Adhäsion von Leukozyten an humanen kardialen mikrovaskulären Endothelzellen (HCMEC) 18
3.3.2 Flussgeschwindigkeit von Nalm6-IF4 Zellen auf HCMEC 22
3.3.3 Versuche mit Tunicamycin 31
3.3.3.1 Adhäsion 31
3.3.3.2 Flussgeschwindigkeit 34

3.4 E-Selektin vermittelte Interaktion zwischen Endothel und Leukozyten 39
3.4.1 Feste Adhäsion von HL60 Zellen an humanen umbilikalen venösen Endothelzellen (HUVEC) 39
3.4.2 Flussgeschwindigkeit von HL60 Zellen auf humanen umbilikalen venösen Endothelzellen (HUVEC) 42
3.4.3 E-Selektin vermitteltes Rollen von HL60 Zellen auf HUVEC 46

4 DISKUSSION 48

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse 48

4.2 Diskussion der Methodik und des Versuchsaufbaus 48
4.2.1 Physiologie der Leukozyten-Endothel-Interaktionen 48
4.2.2 Möglichkeiten zur Messung der Leukozyten-Endothel-Interaktionen 50
4.2.3 Eigenes Modell zur Messung der Leukozyten-Endothel-Interaktionen 50

4.3 Nachweis der Selektin abhängigen festen Adhäsion 53
4.3.1 Struktur und Expression von L-, P- und E-Selektin 53
4.3.2 Selektin abhängige feste Adhäsion 54

4.4 Nachweis der Induzierbarkeit von Selektin Liganden durch TNFα 57
4.4.1 L-Selektin Liganden 57
4.4.2 Messung der Leukozytengeschwindigkeit zur Untersuchung selektinvermittelter Interaktionen 60
4.4.3 Die Wirkung Selektin vermittelter Interaktionen auf die Flussgeschwindigkeit von Leukozyten 61
4.4.3.1 Erkenntnisse aus publizierten Studien 61
4.4.3.2 Flussgeschwindigkeiten von Leukozyten auf HCMEC 61
4.4.3.3 Struturelle Eigenschaften von L-Selektin Liganden auf HCMEC 66

4.4.3.4 E-Selektin vermittelte Leukozyten-Endothel-Interaktionen 67

4.5 Wertung der Ergebnisse 68

5 ZUSAMMENFASSUNG 70

6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 71

7 HERSTELLERVERZEICHNIS 72

8 LITERATURVERZEICHNIS 75

9 ANHANG 84

9.1 Danksagung 84

9.2 Eidesstattliche Erklärung 85

9.3 Publikationen 86

9.4 Lebenslauf 87

1 Einleitung

Die Rekrutierung von Leukozyten aus Blutgefäßen in das Gewebe stellt einen wichtigen Bestandteil der Abwehr von Krankheitserregern und der Regeneration von verletztem Gewebe dar. Dabei kommt es zu Interaktionen zwischen Endothelzellen und Leukozyten, die dazu führen, dass Leukozyten aus dem Blutstrom abgefangen werden, an Endothelzellen adhärieren, um anschließend durch das Endothel das Blutgefäß zu verlassen. Es sind jedoch auch pathologische Phänomene bekannt, bei denen es zu einer unangemessenen Extravasation der Leukozyten kommt oder bei denen der Schaden durch die emigrierten Leukozyten überwiegt. Beispiele dafür sind die Rheumatoide Arthritis [1], bei der es zur Infiltration der Gelenkssynovia mit Lymphozyten kommt, das chronische Asthma bronchiale [2] mit Infiltration der Bronchialschleimhaut mit Lymphozyten oder der Reperfusionsschaden des Myokards nach Rekanalisation einer thrombosierten Koronararterie [3,4].

Beteiligt an diesem in einer mehrstufigen Kaskade von Interaktionen ablaufendem Prozess der Extravasation sind verschiedene Klassen von Adhäsionsmolekülen, die von Leukozyten und Endothelzellen exprimiert werden. Unter ihnen spielen Selektine und die mit ihnen interagierenden Liganden eine besondere Rolle, da sie den initialen Schritt der Adhäsionskaskade, das Rollen der Leukozyten auf dem Endothel, vermitteln. Bisher sind die drei Selektine, E-Selektin, P-Selektin und L-Selektin, bekannt [5]. L-Selektin befindet sich auf Leukozyten und seine Liganden auf Endothelzellen [6]. Die beiden vaskulären Selektine, E- und P-Selektin, werden von Endothelzellen exprimiert, ihre Liganden befinden sich auf Leukozyten [7,8]. Auf selektinvermitteltes Rollen folgt durch Einwirkung von Chemokinen, die lokal von Endothelzellen freigesetzt werden, eine Aktivierung der Integrine auf den Leukozyten, das den zweiten Schritt der Kaskade darstellt. Die Interaktion der aktivierten Integrine mit Adhäsionsmolekülen der Immunglobulin-Supergen-Familie, die von Endothelzellen exprimiert werden, führt zu einer festen Adhäsion der Leukozyten an das Endothel. Diesem dritten Schritt folgt die Transmigration der Leukozyten durch das Endothel.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit L-Selektin und seinem vaskulären Ligand. L-Selektin wird fast von allen Leukozyten konstitutiv exprimiert, während seine Liganden gewebeabhängig entweder konstitutiv (Lymphknoten) [9] oder erst nach Stimulation durch Entzündungsmediatoren (z.B. Aorta und Niere) [10,11] von Endothelzellen exprimiert werden.

In Voruntersuchungen wurde L-Selektin abhängige Adhäsion von Leukozyten an TNFα--stimulierten humanen kardialen mikrovaskulären Endothelzellen (HCMEC) unter

Flussbedingungen nachgewiesen [12,13]. Der auf diesen Endothelzellen exprimierte L-Selektin Ligand unterschied sich biochemisch von den bereits bekannten und gut charakterisierten Liganden im lymphatischen Gewebe. Während Liganden des lymphatischen Gewebes als O-Glykane beschrieben wurden, gibt es Hinweise, dass vaskuläre Liganden Heparansulfat-Bestandteile besitzen, jedoch keine O-Glykane. Zum Nachweis der selektinvermittelten Interaktionen wurde in diesen Studien die feste Adhäsion von Leukozyten an das Endothel untersucht, ein Maß, das mehrere Schritte der oben beschriebenen Adhäsionskaskade (1. Rollen, 2. Aktivierung der Leukozyten, 3. feste Adhäsion der Leukozyten) beinhaltet.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Fragestellung bearbeitet werden, ob L-Selektin Liganden auf HCMEC konstitutiv exprimiert werden und die stärkere Adhäsion an TNFα-stimulierten HCMEC durch die Aktivierung der festen Adhäsion (Schritte zwei und drei der Adhäsionskaskade) bedingt ist oder ob die stärkere Adhäsion der Leukozyten durch eine vermehrte Expression von L-Selektin Liganden nach TNFα-Stimulation bedingt ist. Um L-Selektin vermittelte Interaktionen selektiv zu untersuchen, wurden Flußgeschwindigkeiten von Leukozyten gemessen, da bekannt war, daß selektinvermittelte Interaktionen zu einer Verminderung der Leukozytengeschwindigkeit führen [14]. Weiterhin wurde untersucht, welche biochemischen Strukturen für die Funktionsfähigkeit der L-Selektin Liganden notwendig sind. Um zu überprüfen, ob die aus den Versuchen mit L-Selektin gewonnenen Erkenntnisse auch für andere Selektine zutreffen, wurden E-Selektin vermittelte Interaktionen zwischen Leukozyten und Endothelzellen untersucht. E-Selektin wird von Endothelzellen nach Stimulation durch Entzündungsmediatoren exprimiert und interagiert mit leukozytären Liganden [5,15].

2 Material und Methoden

2.1 Endothelzellen

2.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Die Endothelzellen wurden mit einem standardisierten Kulturmedium in einem Brutschrank bei 37° C und 5% CO_2-Zufuhr kultiviert. Das Kulturmedium bestand aus Medium 199, das mit 20% fötalem Kälberserum, 1% L-Glutamin (200 mM), Streptomycin (100 µg/ml), Penicillin (100 U/ml), Hepes-Puffer (10 mM/l) und acidic-Fibroblast Growth Factor (10 ng/ml) angereichert wurde. Die verwendeten Kulturflaschen wurden zuvor mit einer 0,2%-Gelatinelösung über mindestens 24 Stunden bei 4° C beschichtet.

Zur Passage wurden konfluente Endothelzellkulturen zunächst unter dem Mikroskop begutachtet. Um Zelltrümmer herauszuspülen, wurden die Kulturen zunächst mit einer PBS-Lösung (ohne Ca^{++}/Mg^{++}) und dann mit PBS (ohne Ca^{++}/Mg^{++})/EDTA-Lösung (0,02%) gespült. Mittels 2 ml einer 0,25%-Trypsin-EDTA-Lösung wurden die Endothelzellen von der Kulturflasche abgelöst, und nach Kontrolle unter dem Mikroskop wurde durch Zugabe von Kulturmedium die Aktivität des Trypsins gestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und bei 200 g für 5 Minuten zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in frischem Kulturmedium resuspendiert und auf drei neue Kulturflaschen verteilt, die zuvor mit Gelatine beschichtet worden waren. Regelmäßig wurden die Zellkulturen unter dem Mikroskop auf Integrität und Proliferation begutachtet und mit neuem Kulturmedium versorgt.

2.1.2 Isolation der Endothelzellen

2.1.2.1 Humane umbilikale venöse Endothelzellen (HUVEC)

Die Isolation von Nabelschnurendothelzellen erfolgte in modifizierter Form nach einer publizierten Methode[16,17].

Die Nabelschnur wurde direkt nach der Geburt an beiden Enden abgeklemmt und in einer PBS-Lösung (+ Ca^{++}/Mg^{++}) mit Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin (100µg/ml) in das Labor transportiert. Zur Gewinnung der Endothelzellen wurden zunächst die Klemmen abgeschnitten und das in der Nabelschnur verbliebene Restblut herausgepresst. Die Vena umbilicalis wurde von einem Ende der Nabelschnur aus mit einem Venenverweilkatheter kanüliert und mit einer PBS-Lösung (ohne Ca^{++}/Mg^{++}) gespült. Anschließend wurde das andere Ende der Nabelschnur abgeklemmt. Durch den Venenverweilkatheter wurden 10 ml einer Dispase-II-Lösung (2,4 U/l) in die Vena umbilicalis gespritzt und der Katheter anschließend verschlossen. Die Nabelschnur wurde nun für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Nabelschnur an einem Stativ aufgehängt und die Klemmen abgeschnitten. Die herauslaufende Zellsuspension wurde in einem Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Durch Spülen der Vena umbilicalis konnten weitere abgelöste Zellen gewonnen werden. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in frischem Kulturmedium resuspendiert und in eine zuvor mit Gelatine beschichtete Kulturflasche gegeben. Am darauffolgenden Tag wurde die Kultur mit PBS-Lösung (+ Ca^{++}/Mg^{++}) gespült, um Zelltrümmer und Blutzellen herauszuspülen. Die nach ca. einer Woche konfluenten Kulturen wurden auf drei neue Flaschen verteilt. Für Versuche wurden HUVEC der 3.Passage verwendet.

2.1.3 Isolation der humanen kardialen mikrovaskulären Endothelzellen (HCMEC)

Die Isolation der humanen kardialen mikrovaskulären Endothelzellen erfolgte analog einer im Labor seit Jahren etablierten Methode [18].

Unmittelbar nach Explantation eines Herzens im Rahmen einer Herztransplantation im Deutschen Herzzentrum Berlin wurde aus dem linken Ventrikel ein rundes Myokardstück mit der es versorgenden Koronararterie ausgeschnitten und in kalter Ringer-Lösung ins Labor transportiert. Alle nachfolgend beschriebenen Schritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Die das Myokardstück versorgende Koronararterie wurde mit einem Venenverweilkatheter kanüliert und mit dem Myokardstück vernäht. Zunächst wurden 50 ml Krebs-Henseleit-Puffer und dann 50 ml Krebs-Henseleit-Puffer + 0,1 M $CaCl_2$ über diesen Katheter perfundiert. Anschließend wurde mit einer Enzymlösung perfundiert, die aus 0,074% Collagenase (Typ II von Clostridium perfringens), 0,012% Dispase (5000 U/l), 0,012% Trypsin /1:250), 20 U/ml DNAse I und 0,27% Bovines Serumalbumin (Fraktion V, 7,5%). Die herauslaufende Lösung wurde auf 37° C erwärmt und erneut der Perfusion zugeführt. Die mit Hilfe einer Rollenpumpe durchgeführte Perfusion hatte eine Gesamtdauer von ca. 20 Minuten. Ein ausreichender Perfusionsdruck von 20-50 mmHg war notwendig, um die der Koronararterie zugeführte Enzymlösung in das Myokardgewebe zu pressen. Daher wurde der Perfusionsdruck während der gesamten Perfusion über eine Steigleitung kontrolliert und nötigenfalls über die Flussrate adaptiert. Das so angedaute Myokard wurde vom epikardialen Fettgewebe und dem Endokard getrennt, in kleine Stücke geschnitten und in der bereits für die Perfusion verwendeten Enzymlösung unter Begasung mit Carbogen (95% O_2 und 5% CO_2) für weitere 30 Minuten verdaut. Anschließend wurde die Begasung abgestellt. Nachdem größere Stücke sedimentierten hatten, wurde der Überstand in Reaktionsgefäße gegeben, während den größeren Gewebestücken PBS zugegeben wurde, um unter erneuter Begasung für eine Minute eine Durchmischung zu erreichen. Nachdem die Gewebestücke wieder sedimentierten hatten, wurde der Überstand entnommen. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis ca. 200 ml Zellsuspension gewonnen worden war. Diese Suspension wurde zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet aus jedem Reaktionsgefäß mit 8 ml Kulturmedium resuspendiert. Anschließend wurden jeweils 8 ml Zellsuspension in zuvor mit Gelatine beschichtete Kulturflaschen (75cm^2) gegeben. Einen Tag nach der Isolation wurde die Kultur mit PBS-Lösung gespült, um Blutzellen und Zelldetritus zu entfernen. Nach ca. 8-10 Tagen war die Primärkultur konfluent. Um aus dieser aus Endothelzellen, Perizyten und Fibroblasten bestehenden Mischkultur eine reine Endothelzellkultur zu gewinnen, wurden die Endothelzellen während der ersten Passage mit Hilfe von UEA-I beschichteten Dynabeads von den übrigen Zellen, wie nachfolgend beschrieben, getrennt. Für Versuche wurden Zellen der 2.- 4. Passage verwendet.

2.1.4 Herstellung von UEA-I beschichteten Dynabeads und Trennung der Endothelzellen aus einer Mischkultur

Um Endothelzellen in einer Mischkultur von anderen Zellen wie Fibroblasten oder Perizyten zu trennen, wurde die Eigenschaft der Endothelzellen, an Lektine zu binden, ausgenutzt. Die

Lektine wurden an mikroskopisch kleine Kügelchen (Dynabeads) gekoppelt, die in der Lage sind, sich in einem Magnetfeld zu sammeln.

Während der Passage einer Endothelzellkultur wurden die Zellen, wie unter *2.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen* beschrieben, mit Trypsin von den Kulturflaschen abgelöst und zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in PBS-Lösung resuspendiert. In diese Suspension wurden die Lektin-gekoppelten-Beads gegeben, so dass es zu einer lektinvermittelten Bindung der Endothelzellen an die Dynabeads kam. In einem Magnetic Particle Concentrator wurden die gebundenen Endothelzellen vom Überstand durch ein starkes Magnetfeld getrennt.

Nachfolgend wird die Koppelung des Lektins an die Dynabeads beschrieben.

In 500 µl Borat-Puffer mit einem pH-Wert von 9,0 wurden 425 µl Tosyl-aktivierte Dynabeads (Konz. 4x 10^8 Beads/ml) und 75 µl UEA-I-Stammlösung (Lektin aus Ulex europäus, Konz. 1mg/ml) über 24 Stunden bei 4°C unter Rotation inkubiert. In einem Magnetic Particle Concentrator wurden die Lektinmoleküle, die an die Beads gekoppelt wurden, vom übrigen Lektin getrennt. Nachdem der Überstand abgesaugt worden war, wurden die Beads in PBS + 0,1% FKS aufgeschüttelt und erneut in den Magnetic Particle Concentrator zur Trennung gegeben. Dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal vorgenommen. Anschließend wurden die Beads in 500 µl PBS + 0,1% FKS resuspendiert, so dass die Endkonzentration der Beads-Lösung 4 x 10^8 Dynabeads/ml betrug. Die Dynabeads wurden bis zur Verwendung bei 4°Cgelagert.

2.1.5 Immunfluoreszenzfärbung der Endothelzellen

Die Charakterisierung der kultivierten Zellen als Endothelzellen gelang über den Nachweis von zwei Antigenen, die spezifisch von Endothelzellen exprimiert werden. Zum einen ist dies Factor-VIII-related-Antigen und zum Zweiten CD31. Factor-VIII-related-Antigen wird nur von Endothelzellen und Megakaryozyten exprimiert und in der Immunfluoreszenzfärbung in zytoplasmatischen Granula dargestellt [17,19,20]. CD31 wird auf der Zelloberfläche von Endothelzellen exprimiert, daneben auch von Blutzellen wie Monozyten, Thrombozyten und Neutrophilen und Subklassen von T-Lymphozyten [21,22]. Endothelzellen können daher spezifisch mittels CD31 identifiziert werden. Das Präimmunserum der Maus diente als Negativkontrolle.

Die auf Deckgläsern kultivierten Endothelzellen wurden mit Methanol für 20 Minuten bei – 20°C fixiert und danach dreimal mit PBS gespült. Anschließend erfolgte Inkubation mit den

Antikörpern Maus-Anti-Faktor-VIII-related-Ag, Maus-Anti-CD31 und Maus-Präimmunserum in einer Verdünnung von 1: 100 in PBS und FKS 0,1 % für 45 Minuten bei Raumtemperatur. Nach mehrmaligem Spülen mit PBS wurde mit einem zweitem Antikörper inkubiert mit einer Verdünnung von 1:500 in PBS und FKS 0,1%. Dieser zweite Antikörper war mit dem Fluoreszenzfarbstof Cy-3 markiert und gegen die zuvor genannten Antigene gerichtet. Die Zellen wurden daraufhin mit PBS gespült, mit einer Abdecklösung überschichtet und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Unter dem Mikroskop wurde anschließend die Fluoreszenz beurteilt.

2.2 Leukozyten

2.2.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Alle verwendeten Leukozyten wurden mit dem Standardkulturmedium RPMI 1640 kultiviert, das mit 10% FKS, 1% L-Glutamin (200 mM), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin angereichert wurde. Alle drei Tage wurden die Leukozyten mit frischem Kulturmedium versorgt, indem ca. 3/4 der aufgeschüttelten Zellsuspension verworfen und mit frischem Medium ersetzt wurde. Die Leukozyten wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2-Zufuhr kultiviert.

2.2.2 Beschreibung der verwendeten Leukozyten

Die in dieser Studie verwendeten Leukozyten, Nalm6 Zellen, Nalm6-IF4 Zellen und HL60 Zellen, wurden von Leukämie-Patienten isoliert. Sie zeichnen sich durch Immortalität, gute Proliferationsfähigkeit und Stabilität der von ihnen exprimierten Merkmalen aus.

Nalm6 Zellen sind L-Selektin negative Prä-B-Lymphozyten, Nalm6-IF4 Zellen sind mit L-Selektin kodierender c-DNA stabil transfizierte Nalm6 Zellen und zeichnen sich durch eine hohe L-Selektin-Expression aus [23,24]. An die L-Selektin kodierende DNA ist ein Resistenzgen gegen Geneticin gekoppelt. Bei Mediumwechsel der Nalm6-IF4 Zellen wurde dem frischem Medium Geneticin zugesetzt. Somit wurde sichergestellt, dass in der Kultur nur L-Selektin exprimierende Zellen proliferierten.

HL60 Zellen sind eine promyelozytäre Zelllinie und nach einer hohen Expression von E-Selektin-Liganden selektiert [25,26,27] . Sie exprimieren kein L-Selektin [28].

Sämtliche Leukozyten wurden von Dr.med. A. Zakrzewicz, Institut für Physiologie der FU Berlin, zur Verfügung gestellt.

2.2.3 Charakterisierung der Oberflächenmerkmale durch FACS

Mittels Durchflußzytometrie wurde die Expression von L-Selektin auf Nalm6-IF4 Zellen nachgewiesen. Dazu wurden eine Million Leukozyten der Kultur entnommen und in 1 ml PBS

mit 5 µl einer Stammlösung (1 µg/µl) des Fluoreszenz markierten Antikörpers gegen L-Selektin, TQ1,[9] für 60 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension zenrifugiert und der Überstand verworfen. Nach wiederholtem Waschen mit PBS + 0,1% FKS wurden die Leukozyten in 500µl PBS resuspendiert. Mit Hilfe eines FACS-Gerätes wurde die Fluoreszenz anaylsiert.

2.3 Der Flusskammerversuch

2.3.1 Vorbereitung der Endothelzellen

Die für den Flusskammerversuch verwendeten Endothelzellen wurden auf mit Fibronectin (1 µg/cm^2) beschichteten Deckgläsern (24 mm x 60 mm) kultiviert. 24 bis 48 Stunden nach Aussaat bildeten die Endothelzellen einen konfluenten Monolayer.

Ein Teil der Endothelzellen wurde mit TNFα (500 U/ml) für die Dauer von 5 Stunden stimuliert.

Für einen Teil der Versuche wurden die stimulierten Zellen mit BBA2 oder Tunicamycin inkubiert. BBA2 ist ein gegen E-Selektin gerichteter Antikörper, der in einer Konzentration von 10 µg/ml den mit TNFα stimulierten Zellen für die Dauer von 15 Minuten vor dem Versuch zugegeben wurde. Tunicamycin, das im intrazellulären Stoffwechsel die Ausbildung N-glykosidischer Bindungen inhibiert, wurde in einer Konzentration von 10 µg/ml 30 Minuten vor und während der Stimulation mit TNFα eingesetzt.

2.3.2 Vorbereitung der Leukozyten

Um die Leukozyten im Flusskammerversuch unter dem Mikroskop besser sichtbar zu machen, wurden sie mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Dazu wurden ca. 5 Millionen Leuzkozyten in 10 ml Kulturmedium mit 150 µl einer 5(6)-Carboxyfloureszein-Diacetat-Lösung (4,6mg/ml; 10mM) für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Leukozyten wurden dann in frischem Medium in einer Konzentration von 1,5 Mio Zellen/ml resuspendiert.

Für einige Versuche wurden die Nalm6-IF4 Zellen mit dem gegen L-Selektin gerichteten monoklonalen Antikörper DREG 200 (10 µg/ml) für 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

2.3.3 Aufbau der Flusskammer

Die Flusskammer, die ein Blutgefäß im Endstromgebiet simulieren sollte, wurde nach oben von der Plexiglasoberfläche des Flusskammerkörpers begrenzt. Die untere Begrenzung wurde durch das Deckglas gebildet, auf dem Endothelzellen kultiviert wurden. Zwischen Deckglas und Plexiglasoberfläche befand sich eine 0,12 mm dünne Schablone, die am Eingang einen engen Ausschnitt hatte, der sich zum Ausfluss in hyperbolischer Form erweiterte, und die seitliche Begrenzung der Kammer darstellte.

Mittels eines Perfusors und entsprechenden Perfusorleitungen konnte eine konstante Perfusion gewährleistet werden. Die Ausweitung der Schablonenausschnitts zum Ausfluss bedingte bei konstantem Fluss eine Verminderung der Geschwindigkeit des Perfusionsmediums. Durch an der Außenwand zirkulierendes Wasser wurde die Flusskammer auf einer Temperatur von 37°C gehalten. Das Perfusionsmedium, das aus Medium 199 angereichert mit 0,1% bovinem Serumalbumin (FraktionV, 7,5), 100 µg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin bestand, wurde kurz vor dem Versuch auf 37°C erwärmt. Die Perfusorleitungen befanden sich auf längerer Strecke in einem auf 37°C temperierten Wärmebad, so dass das Perfusionsmedium über die gesamte Dauer des Versuchs auf 37°C erwärmt blieb.

2.3.4 Berechnung der Wandschubspannung („shear stress“)

Fließt eine Flüssigkeit durch ein rohrähnliches Gefäß, entsteht durch die kontinuierliche Wirkung visköser Kräfte ein Widerstand gegen diese Bewegung. Dabei ist das Maximum dieser Kräfte an der Gefäßwand zu finden, zur Gefäßmitte hin nimmt das Ausmaß dieser Kräfte ab. Dies hat zur Folge, dass die Geschwindigkeit der Flüssigkeit und ihrer Bestandteile in der Gefäßmitte maximal ist und zur Wand hin sich kontinuierlich verringert. Aufgrund der Geschwindigkeitsdifferenz zwischen benachbarten Flüssigkeitsschichten muss Arbeit verrichtet werden, um die viskösen Kräfte zwischen benachbarten Schichten zu überwinden. Ein Maß dieser Arbeit wird durch die tangentiale Kraft pro Flächeneinheit oder Wandschubspannung (τ) repräsentiert [29].

Die Wandschubspannung (τ) konnte für jeden beliebigen Punkt innerhalb der Flusskammer nach untenstehender Formel berechnet werden [30].

$$Wandschubspannung\ (\tau) = \frac{6 \cdot Viskosität \cdot Flußrate \cdot \left(1 - \frac{l}{L}\right)}{(h^2 \cdot \omega)}$$

l = Entfernung von Einfluss [in mm]

L = Länge der Kammer [38 mm]

h = Höhe der Kammer [120 µm]

Viskosität=0,75cPoise

ω = Breite am Einstrom [2,2 mm]

Flussrate = 116 µl/min

Durch die Form der Schablone ergaben sich somit bei einem vorgegebenem Fluss von 116 µm/s unterschiedliche Werte für die Wandschubspannung abhängig von der Entfernung vom Einfluss. Sie betrug am Einfluß 2,4 dyn/cm^2 und nahm stetig zum Abflus ab, so dass sie dort 0,6 dyn/cm^2 betrug.

Für die Geschwindigkeitsverteilung $v_{(y)}$ im ebenen Kanal, wie es die Flusskammer in dieser Studie darstellt, gilt [31] :

$$V[y] = \frac{\tau \cdot (h^2 - y^2)}{H \cdot \eta}$$

τ = Wandschubspannung

h = halbe Kanalhöhe (60µm)

η = Viskosität (0,75cPoise)

H = Höhe des Kanals (120µm)

y = Abstand zw. Kanalmitte und dem Punkt, für den v berechnet werden soll (in µm)

Es ergibt sich hier ein parabelförmiges Geschwindigkeitsprofil, das zur Mittelebene symmetrisch ist. Die maximale Geschwindigkeit v_{max} = 6732 µm/s ergibt sich in der Kanalmitte bei y= 0 und die minimale v_{min} = 0 µm/s an der Gefäßwand bei y = h für τ = 1,66 dyne/cm^2. Entsprechend der o.g. Formel werden bei einem Durchmesser von 7µm für Nalm6 Zellen und 13 µm für HL60 Zellen [32] Geschwindigkeiten von 1480 µm/s bzw. 2600 µm/s für Leukozyten erwartet, die direkt am Endothel entlang fließen, ohne jedoch spezifische Bindungen mit den Endothelzellen einzugehen.

2.3.5 Durchführung des Versuchs

Ein Deckglas, auf dem Endothelzellen kultiviert wurden, wurde in die Fluskammer eingelegt. Dieses wurde dann unter ein invertiertes Mikroskop gelegt. Die Endothelzellen wurden auf Integrität überprüft und der Perfusor mit einer Flussrate von 117µm/s eingeschaltet. Nach einem Fluss über ca. einer Minute, um Zelldetritus aus der Flusskammer zu spülen, wurde über einen Dreiwegehahn am Einfluss der Kammer 100 µl einer fluoreszenzmarkierten Leukozytensuspension (Konz. 1,5 Mio. Zellen/ml) eingespült. Eine Videokamera, die an das Mikroskop mit Fluoreszenz anregendem Licht angeschlossen war, nahm den Fluss der Leukozyten auf ein Videoband auf. Die Flusskammer wurde so unter das Mikroskop platziert, dass die Videokamera den Bereich von 15 mm vom Einfluss, entsprechend einer Wandschubspannung von 1,66 dyn/cm^2, aufnehmen konnte. Über die Feineinstellung des Mikroskops wurde das Endothelzellmonolayer fokussiert, so dass auf dem Videobild überwiegend nur jene Leukozyten zu sehen waren, die direkt am Endothel entlang flossen. Es wurden jedoch auch Leukozyten erfasst, die sich oberhalb dieser Ebene befanden. Diese konnten aber eindeutig durch ihre unscharfen Ränder erkannt werden. Gleichzeitig wurde das aufgenommene Bild über einen Monitor verfolgt, so dass der korrekte Fluss beurteilt werden konnte. Eine digitale Zeitanzeige mit einer Genauigkeit von Hundertselsekunden wurde mit in das Bild eingeblendet. Nach ca. 5 Minuten waren alle Leukozyten durch die Flusskammer geflossen, so dass dann die Videoaufnahme beendet wurde. Anschließend erfolgte am Mikroskop die Auszählung der an den Endothelzellen fest adhärenten Leukozyten. Zwischen 5 und 30 mm vom Einfluss wurden 9 verschiedene Gesichtsfelder ausgezählt, die 9 Werten für die Wandschubspannungen entsprachen (0,6 – 2,4 dyn/cm^2) . Danach erfolgte die Auswertung der Videoaufnahmen. Pro Deckglas wurde die Geschwindigkeit von 100 aufeinander folgenden Leukozyten ca. 90 Sekunden nach dem Einspritzen dieser in die Flusskammer ermittelt. Bei einer Dauer von ca. 3 Minuten für den Durchfluß des überwiegenden Anteils der Zellen entsprach dieser Zeitbereich etwa der halben Zeitdauer. Eine „slow-motion“-Funktion des Videorecorders erlaubte die Auswertung von langsam aufeinanderfolgenden Einzelbildern, deren zeitlicher Abstand jeweils 4 Hundertselsekunden betrug. Zur Ermittlung der Geschwindigkeit wurde der Bildschirm mit einer transparenten Folie mit Zentimeterraster beklebt, so dass durch den langsamen Bildvorschub eine Anfangsstrecke (s_1) und eine Endstrecke (s_2) für jeden Leukozyten auf dem Raster abgelesen werden konnte. Dabei wurde jeder Leukozyt über eine Strecke von ca. 25 cm auf dem Bildschirm verfolgt, entsprechend einer Strecke von ca. 500 µm in der Flusskammer. Diese Beziehung wurde durch eine Videoaufnahme einer Neubauer-

Zählkammer unter dem Mikroskop ermittelt. Zusätzlich wurde jeweils die zugehörige Anfangszeit (t_1) und die Endzeit (t_2) vom Bild abgelesen. Durch Subtraktion von s_1 von s_2 bzw. t_1 von t_2 wurde die zurückgelegte Strecke und die dazu benötigte Zeit berechnet. Die Division von Δs durch Δt ergab die Geschwindigkeit jedes einzelnen Leukozyten.

Somit ergaben sich pro Deckglas zum einen 9 Datenpaare, bestehend aus der Zahl der adhärenten Leukozyten und der jeweils zugehörigen Wandschubspannung, und zum Zweiten 100 Werte für die Geschwindigkeit von 100 Leukozyten.

In einigen Experimenten wurde die Zahl rollender Leukozyten ermittelt. Diese konnten von frei fließenden Leukozyten durch ihre um etwa hundertfach geringere Geschwindigkeit eindeutig unterschieden werden. Auf dem Videobild stellten sich rollende Leukozyten als Kreise dar, während frei fließende Leukozyten aufgrund ihrer höheren Geschwindigkeit als schmale Streifen zu sehen waren. Pro Deckglas wurde die Zahl aller rollenden Leukozyten über die Dauer von drei Minuten, die für den Durchfluss aller Leukozyten benötigt wurde, ermittelt. Weiterhin wurde die Rollgeschwindigkeit nach der für die frei fließenden Leukozyten verwendeten Methode gemessen, um durch den Vergleich mit den in der Literatur angegebenen Werten das Rollen eindeutig definieren zu können.

2.4 Datenverarbeitung und Statistik

Es wurde die feste Adhäsion der Leukozyten in Abhängigkeit von der Wandschubspannung (τ) sowie die Flussgeschwindigkeit von Leukozyten dargestellt. Der Wert „n“ gibt die Anzahl der untersuchten Deckgläschen an.

Die feste Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen wurde in Prozent der Kontrolle (unbehandelte Leukozyten an mit TNFα stimulierten Endothelzellen) in Abhängigkeit von der Wandschubspannung (τ) als Mittelwerte ± Standardfehler angegeben.

Die pro Deckgläschen gemessene Flussgeschwindigkeit von 100 Leukozyten wurde 50 Geschwindigkeitsklassen zwischen 100 und 5000 µm/s zugeordnet, wobei die Differenz zwischen zwei aufeinander folgenden Klassen jeweils 100 µm/s betrug. Die kumulative Anzahl der Zellen einer Geschwindigkeitsklasse wurde als Mittelwert gegen die zugehörige Geschwindigkeitsklasse aufgetragen. Aus dieser Geschwindigkeitsverteilung wurde die mediane Flussgeschwindigkeit sowie die 25. und 75. Perzentile ermittelt.

Die Signifikanz der Daten für die feste Adhäsion wurde mit Hilfe des einseitigen Student-t-Tests für nicht gepaarte Stichproben überprüft [33]. Verglichen wurden dabei jeweils die Daten für einen Wandschubspannungsbereich, z.B. die Adhäsion der Nalm6 Zellen versus Nalm6-IF4 Zellen. Die Überprüfung der Signifikanz der Daten für die Flussgeschwindigkeit erfolgte mit Hilfe des Kolmogorow-Smirnow-Tests für zwei Stichproben [34]. Verglichen wurde hierbei die kumulative Geschwindigkeitsverteilung, z.B. die der Nalm6 Zellen versus Nalm6-IF4 Zellen. Als Niveau für die Signifikanz wurde ein Wert für $p < 0{,}05$ angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis von Endothelzellen in der Zellkultur

Wie unter *2. Material und Methoden* beschrieben, erfolgte die Isolation und Kultivierung von Endothelzellen. Es wurden Endothelzellen aus der Mikrovaskulatur des humanen Myokards und aus humanen Nabelschnurvenen gewonnen.

Um zu gewährleisten, dass die bei der Isolation gewonnenen Zellkultur ausschließlich Endothelzellen enthielt, wurden diese Zellen auf die beiden spezifischen endothelialen Marker Faktor VIII related antigen und das CD31 untersucht. Dabei wurde in den für die Versuche verwendeten Zellkulturen regelmäßig ein Anteil von mehr als 95 Prozent Endothelzellen gefunden.

3.2 Ergebnisse der FACS-Analyse der Nalm6-IF4 Zellen

L-Selektin negative Nalm6 Zellen und die mit der cDNA für L-Selektin transfizierten Nalm6-IF4-Zellen wurden auf die Expression von L-Selektin überprüft. Dazu wurden die Zellen mit dem L-Selektin markierenden Antikörper TQ1 gefärbt. Mittels Durchflußzytometrie wurde dann die Floureszenz analysiert. Dabei zeigte sich für die nichttransfizierten Nalm6 Zellen eine geringe Hintergrundfloureszenz, während für Nalm6-IF4 Zellen eine um mindestens zwei dekadische Log-Stufen größere Floureszenz nachgewiesen werden konnte. Daraus ist abzuleiten, dass Nalm6-IF4 Zellen eine gute Expression für L-Selektin aufweisen, die Nalm6-Zellen jedoch keine.

Die Ergenisse der FACS-Analyse sind in der Abbildung 1 wiedergegeben.

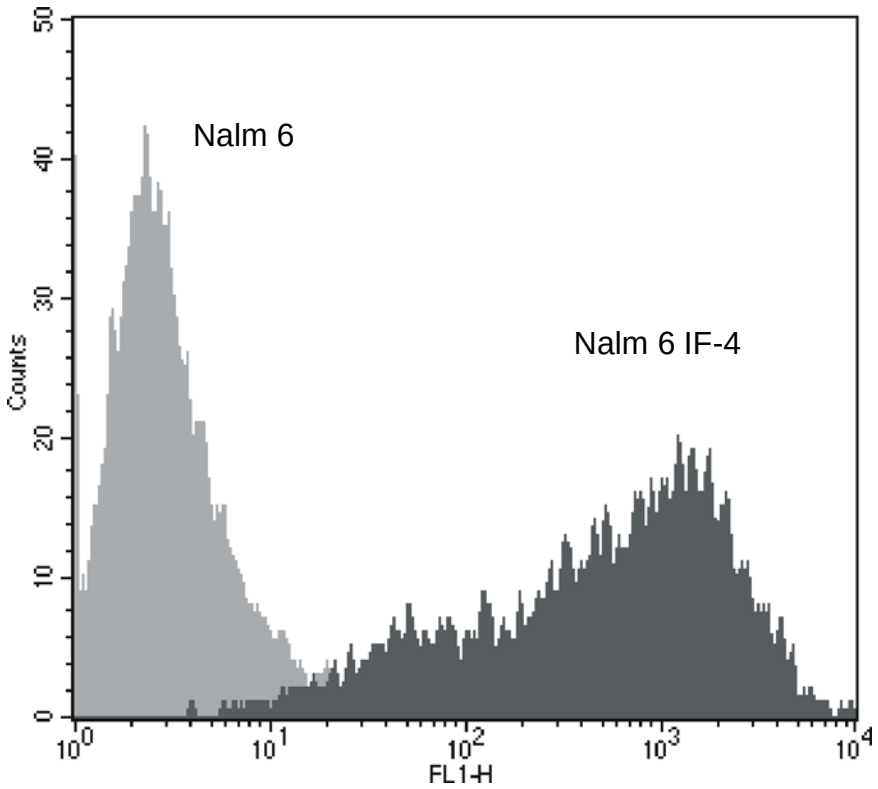


Abbildung 1:

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der Durchflusszytometrie der Nalm6 und Nalm6-IF4 Zellen mit einem Floureszenz markierten Antikörper gegen L-Selektin (TQ1).

Auf der x-Achse ist der Wert für die Floureszenz aufgetragen. Diesen Werten ist auf der y-Achse die absolute Anzahl von Nalm6 bzw. Nalm6-IF4 Zellen, die mit dieser Floureszenz erfasst wurden, zugeordnet. Es stellt sich die deutliche Expression von L-Selektin auf den Nalm6-IF4 Zellen dar.

3.3 L-Selektin vermittelte Interaktion zwischen Endothel und Leukozyten

3.3.1 Feste Adhäsion von Leukozyten an humanen kardialen mikrovaskulären Endothelzellen (HCMEC)

Die feste Adhäsion von Nalm6-IF4 Zellen an unstimulierten Endothelzellen war in allen untersuchten Wandschubspannungsbereichen zwischen (τ) 0,6 - 2,4 dyn/cm^2 geringer ausgeprägt als an zuvor für 5 Stunden mit 500 U/ml TNFα stimulierten Endothelzellen. Sie betrug 0 Prozent bei τ = 2,4 dyn/cm^2 und 8,7 ± 0,9 Prozent bei τ = 0,6 dyn/cm^2 der Adhäsion an stimulierten Endothelzellen.

Bei einer Wandschubspannung von 1,66 dyne/cm^2 betrug die absolute Anzahl an adhärenten Leukozyten an stimulierten Endothelzellen 67 ± 12, während sie ohne Stimulation auf 0 Zellen abfiel ($p < 0,01$ gegen unstimulierte Kontrollen, n = 12).

Die Adhäsion der L-Selektin negativen Nalm6 Zellen war im Vergleich mit L-Selektin positiven Nalm6-IF4 Zellen signifikant schwächer. Sie betrug bei einer Wandschubspannung von τ = 2,4 dyn/cm^2 26 ± 10 Prozent und bei τ = 0,6 dyn/cm^2 76 ± 6 Prozent der Adhäsion der Nalm6-IF4 Zellen. Bei einer Wandschubspannung von 1,66 dyn/cm^2 betrug die absolute Anzahl an adhärenten Nalm6 Zellen 15,7 ± 4,2. Dies entspricht einer Reduktion auf 23,2 ± 6,2 Prozent gegenüber Nalm6-IF4 Zellen ($p < 0,01$ gegen L-Selektin exprimierende Nalm6-IF4 Zellen, n = 10). Der Unterschied zwischen L-Selektin positiven und negativen Leukozyten war besonders im höheren Wandschubspannungsbereich ($\tau > 1,5$ dyn/cm^2) groß.

Wurden Nalm6-IF4 Zellen vor dem Versuch mit L-Selektin blockierendem Antikörper AK DREG 200 inkubiert, so reduzierte sich ihre Adhäsion an stimulierten Endothelzellen signifikant. Sie betrug 0 Prozent bei τ = 2,4 dyn/cm^2 und stieg auf 22,3 ± 5,4 Prozent bei τ = 0,6 dyn/cm^2 an. Bei τ = 1,66 dyn/cm^2 betrug die Anzahl der adhärenten Zellen 0,8 ± 0,3, was einer Reduktion auf 1,23 ± 0,5 Prozent entspricht ($p < 0,01$ gegen unbehandelte Nalm6-IF4 Zellen, n = 6). Diese Werte gleichen nahezu denen der Adhäsion von Nalm6-IF4 Zellen auf unstimulierten Endothelzellen. Da der Antikörper DREG 200 spezifisch die Interaktion von

L-Selektin hemmt, ist die stärkere Adhäsion von Nalm6-IF4 Zellen an stimulierten Endothelzellen gegenüber unstimulierten Endothelzellen auf L-Selektin abhängige Interaktionen zurückzuführen.

Wurden die mit TNFα stimulierten Endothelzellen mit E-Selektin blockierendem Antikörper BBA2 inkubiert, so verminderte sich die Adhäsion der Nalm6-IF4 Zellen auf 83,6 ± 3,6 bis 57,9 ± 1,4 Prozent bei Wandschubspannungen zwischen 0,6 und 2,4 dyn/cm^2. Bei τ = 1,66 dyn/cm^2 betrug die Anzahl der adhärenten Zellen 67,7 ± 7,3, was einer Reduktion auf 67,5 ± 3,3 Prozent entspricht ($p < 0,01$ gegen unbehandelte Endothelzellen, $n = 6$). Der Unterschied zwischen der Adhäsion an mit BBA2 behandelten Endothelzellen und ohne Antikörperbehandlung gibt die E-Selektin abhängige Adhäsion der Nalm6-IF4 Zellen an. Der durch BBA2 blockierbare Anteil der Adhäsion kam möglicherweise durch eine Interaktion zwischen L-Selektin mit E-Selektin zustande.

Die Stimulation der HCMEC mit TNFα führte zu einer stärkeren Adhäsion von Nalm6-IF4 Zellen in allen untersuchten Wandschubspannungsbereichen. Die Versuche mit L-Selektin negativen Nalm6 Zellen und anti-L-Selektin Antikörper DREG 200 bestätigten die L-Selektin Abhängigkeit dieses Effektes. Die Versuche mit anti-E-Selektin Antikörper BBA2 zeigten, dass ein Teil der L-Selektin abhängigen Adhäsion auf eine Interaktion mit E-Selektin zurückgeführt werden kann. Der Vergleich der Nalm6-IF4 Zellen mit Nalm6 Zellen zeigte weiterhin, dass die Adhäsion im höheren Wandschubspannungsbereich (> 1,5 dyne/cm^2) überwiegend L-Selektin abhängig ist, da der Unterschied zwischen L-Selektin positiven und negativen Leukozyten besonders im höheren Wandschubspannungsbereich (τ > 1,5 dyn/cm^2) groß war und sich beide Zelltypen nur in der L-Selektin-Expression unterschieden.

Die aufgeführten Daten sind in den Abbildungen 2 und 3 dargestellt.

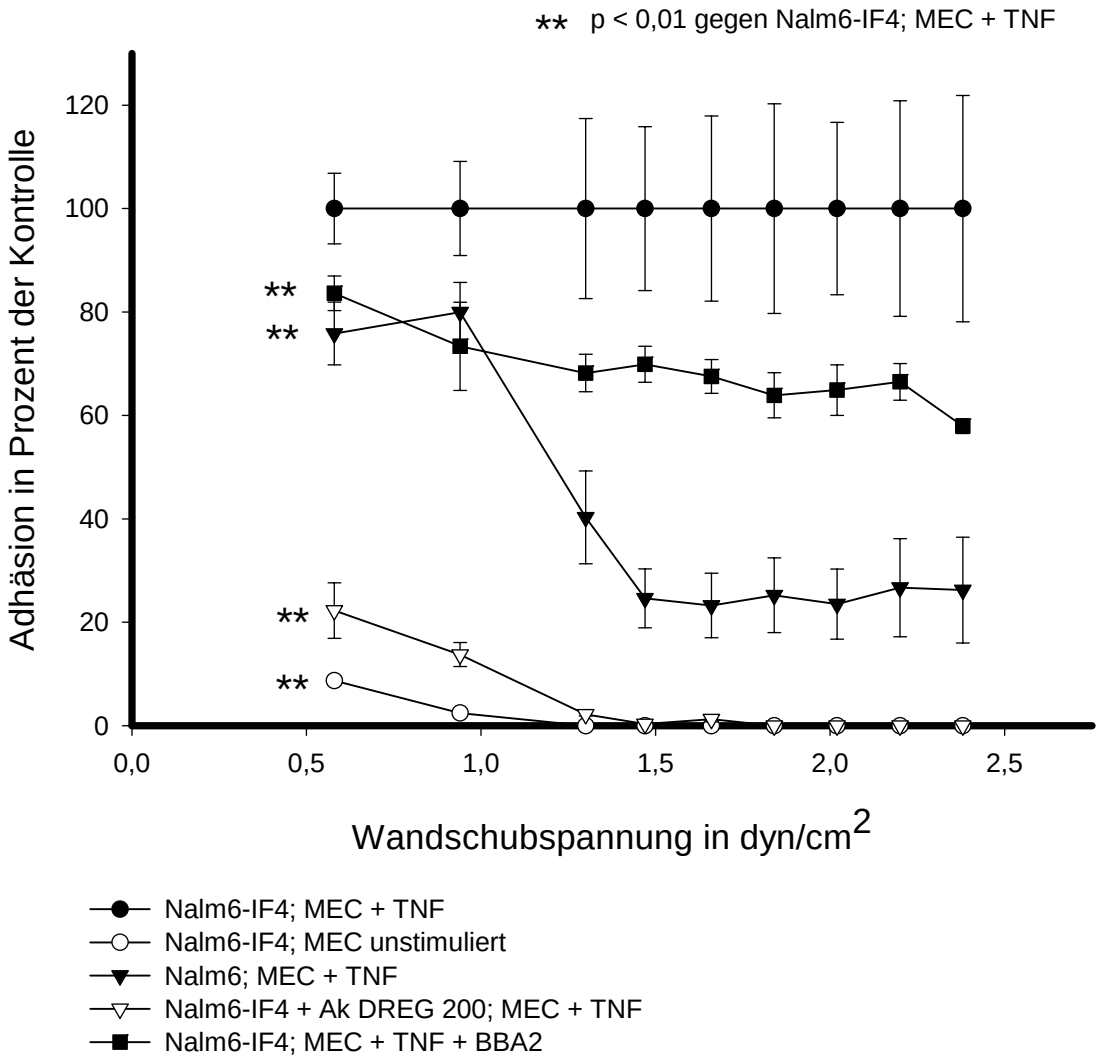


Abbildung 2:

Feste Adhäsion der Nalm6 und Nalm6-IF4 Zellen an HCMEC

Die relative Adhäsion bezogen auf die Adhäsion der Nalm6-IF4 Zellen an stimulierten Endothelzellen ist der jeweiligen Wandschubspannung zugeordnet. L-Selektin negative Nalm6 Zellen adhärierten schlechter als L-Selektin positive Nalm6-IF4 Zellen. Durch Zugabe des L-Selektin blockierenden Antikörpers, DREG 200, konnte die L-Selektin abhängige Adhäsion signifikant reduziert werden. Die Behandlung der Endothelzellen mit dem E-Selektin blockierenden Antikörper, BBA2, führte nur zu einer leichten Reduktion der Adhäsion der Nalm6-IF4 Zellen.

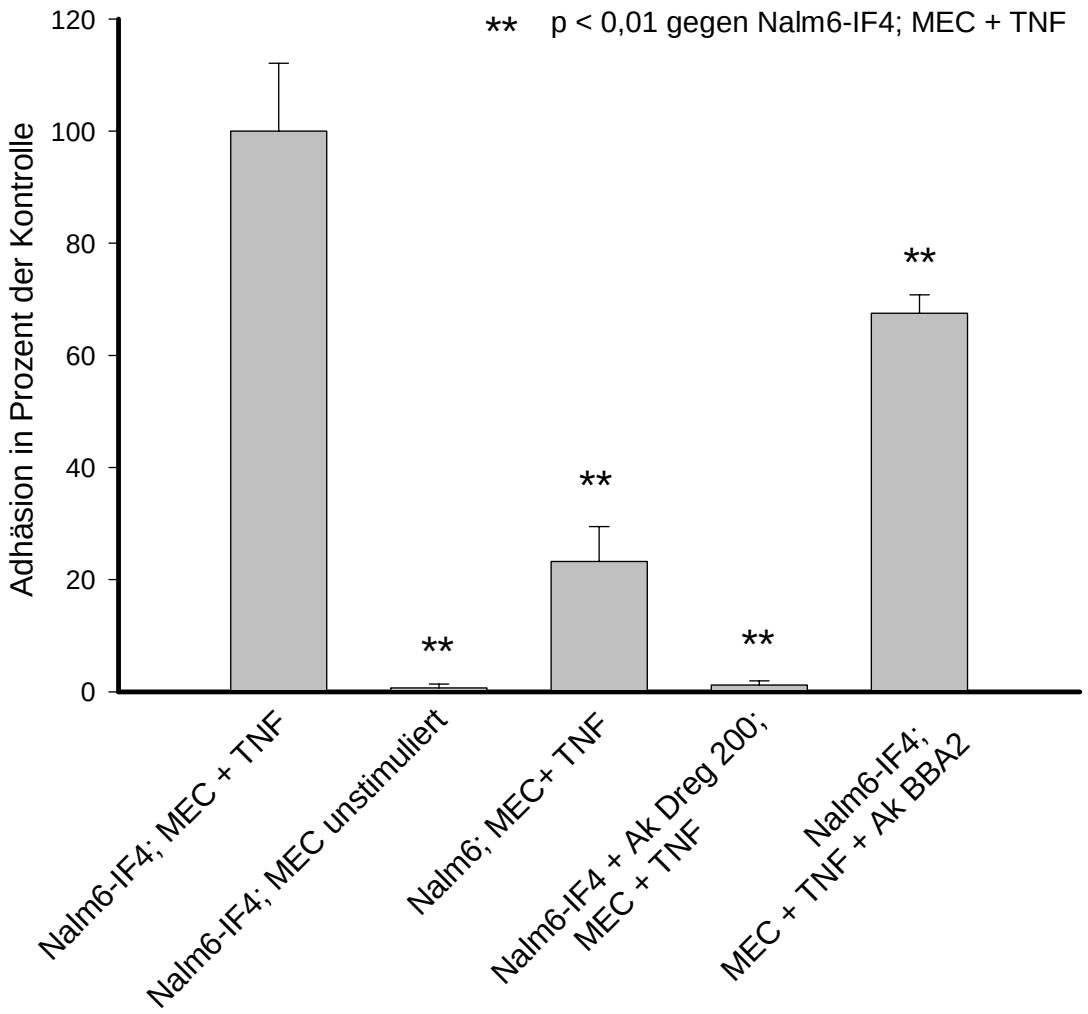


Abbildung 3:

Adhäsion von Leukozyten bei einer Wandschubspannung von 1,66 dyne/cm^2

L-Selektin negative Nalm6 Zellen adhärierten signifikant schlechter als L-Selektin positive Nalm6-IF4 Zellen. Die L-Selektin abhängige Adhäsion konnte durch den L-Selektin bindenden Antikörper, DREG 200, vollständig blockiert werden. Die Behandlung der Endothelzellen mit dem E-Selektin bindenden Antikörper, BBA2, reduzierte die Adhäsion auf ca. 60 %.

3.3.2 Flussgeschwindigkeit von Nalm6-IF4 Zellen auf HCMEC

Bei einer Wandschubspannung von 1,66 dyn/cm^2 wurde die Flussgeschwindigkeit (v) von jeweils 100 Nalm6-IF4 Zellen auf unstimulierten HCMEC, 100 Nalm6-IF4 Zellen auf zuvor mit TNFα stimulierten HCMEC und 100 Nalm6-Zellen auf stimulierten HCMEC gemessen. Dabei wurden Flussgeschwindigkeiten (v) zwischen 100 µm/s und 5000 µm/s gemessen. Beim Vergleich der kumulativen Geschwindigkeitsverteilung der für L-Selektin positven Leukozyten auf stimulierten Endothelzellen mit der Geschwindigkeitsverteilung auf unstimulierten Endothelzellen zeigte sich die größte Differenz bei der Geschwindigkeitsklasse 2300 µm/s. Daher wurde postuliert, dass das Vorhandensein L-Selektin abhängiger Interaktionen bzw. deren Fehlen sich im Anteil der Zellen mit Geschwindigkeiten v < 2300 µm/s widerspiegelt.

Nalm6-IF4 Zellen auf unstimulierten Endothelzellen hatten eine mediane Flussgeschwindigkeit von 2800 µm/s (25. Perzentile 2300µm/s; 75. Perzentile 3400 µm/s), der Anteil der Zellen mit v < 2300 µm/s betrug 27,1 ± 2,7 %. Wurden die Endothelzellen zuvor mit TNFα stimuliert, verminderte sich der Median signifikant auf 2100 µm/s (25. Perzentile 1700 µm/s; 75. Perzentile 2400 µm/s) ($p < 0,01$ gegen unstimulierte Kontrollen, n=12), der Anteil der Zellen mit v < 2300 µm/s stieg signifikant auf 71,3 ± 5,8 % ($p < 0,01$ gegen unstimulierte Kontrollen, n=12). Die Stimulation der Endothelzellen mit TNFα führte daher zu einer Reduktion der Flussgeschwindigkeit von L-Selektin positiven Leukozyten.

Verglichen wurde weiterhin die Flussgeschwindigkeit der Nalm6-IF4 Zellen mit der von L-Selektin negativen Nalm6 Zellen. Die letzteren hatten signifikant höhere Werte für v. Der Median betrug 2600 µm/s (2100µm/s; 3200 µm/s), der Anteil der Zellen mit v < 2300 µm/s 36,5 ± 3,6 % ($p < 0,01$ gegen L-Selektin exprimierende Nalm6-IF4-Zellen, n = 10). Da sich beide Zellreihen lediglich in der L-Selektin Expression unterscheiden, sind die langsameren Geschwindigkeiten der Nalm6-IF4 Zellen gegenüber Nalm6 Zellen auf die L-Selektin Expression zurückzuführen.

Wurden Nalm6-IF4 Zellen vor dem Versuch mit dem L-Selektin blockierenden Antikörper AK DREG 200 inkubiert, so stieg deren mediane Flussgeschwindigkeit auf 2500 µm/s (2100 µm/s; 3000 µm/s), der Anteil der Zellen mit v < 2300 µm/s betrug 19,8 ± 6 % ($p < 0,01$ gegen unbehandelte Nalm6-IF4 Zellen, n= 6).

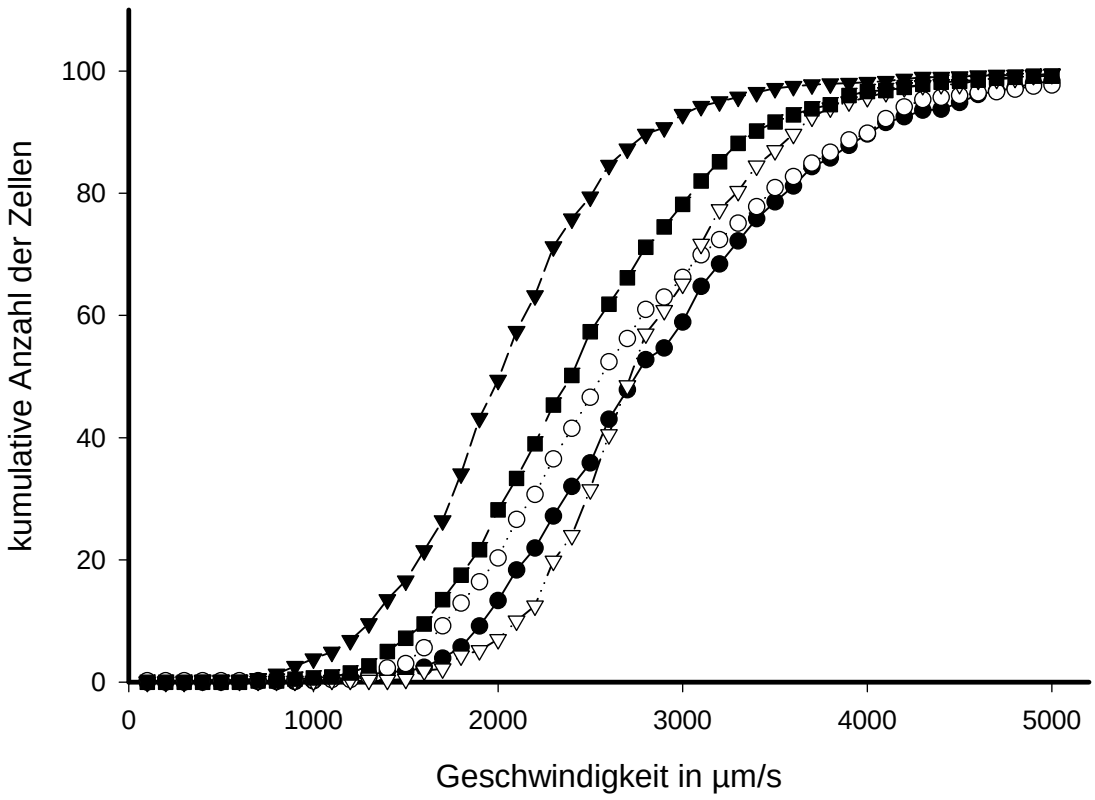
Wurden stimulierte Endothelzellen mit dem E-Selektin blockierenden Antikörper BBA2

inkubiert, so erhöhte sich die mediane Flussgeschwindigkeit der Nalm6-IF4 Zellen auf 2300 µm/s (1900 µm/s; 2800 µm/s), der Anteil der Zellen mit $v < 2300$ µm/s betrug 45 ± 5,7 % ($p < 0,01$ gegen unbehandelte Endothelzellen, $n = 6$). Dies lässt wie bei den Adhäsionsversuchen darauf schließen, dass ein Teil der L-Selektin abhängigen Verminderung der Flussgeschwindigkeit auf die Interaktion mit E-Selektin zurückzuführen ist.

Die Stimulation der HCMEC mit TNFα führte zu einer Verminderung der Flussgeschwindigkeit von Nalm6-IF4 Zellen. Die Versuche mit L-Selektin negativen Nalm6 Zellen und anti-L-Selektin Antikörper bestätigten die L-Selektin Abhängigkeit dieses Effektes. Die Versuche mit anti-E-Selektin Antikörper zeigten, dass ein Teil der L-Selektin abhängigen Reduktion der Leukozytengeschwindigkeit durch die Interaktion mit E-Selektin zustande kam.

Weiterhin sollte die Zahl rollender Zellen und deren Geschwindigkeit ermittelt werden. In allen durchgeführten Versuchen wurden nur vereinzelt rollende Zellen beobachtet, deren Anzahl für eine statistische Verwertbarkeit zu gering war. Durch den Vergleich ihrer Geschwindigkeiten (100 µm/s) mit denen der übrigen Zellen und den Referenzwerten aus der Literatur konnten sie eindeutig als rollende Zellen identifiziert werden.

Die oben aufgeführten Daten sind in den Abbildungen 4 bis 9 dargestellt.



** p < 0,01 gegen Nalm6-IF4; MEC + TNF

Abbildung 4:

Kumulative Geschwindigkeitsverteilung von Leukozyten an HCMEC

Die Stimulation der Endothelzellen mit TNFα führte zu einer signifikanten Verminderung der Flussgeschwindigkeit der für L-Selektin positiven Nalm6-IF4 Zellen ($p < 0,01$ für Nalm6-IF4/MEC + TNF vs. Nalm6-IF4/ MEC unstimuliert). L-Selektin negative Nalm6 Zellen bewegten sich auf mit TNFα stimulierten Endothelzellen mit einer signifikant höheren Geschwindigkeit als Nalm6-IF4 Zellen ($p < 0,01$). Dieser Unterschied gibt die L-Selektin abhängige Flussgeschwindigkeitsverminderung wieder.

Wurden Nalm6-IF4 Zellen mit dem L-Selektin blockierenden Antikörper, DREG 200, inkubiert, führte dies zu einer Aufhebung der durch Stimulation der Endothelzellen bewirkten Verminderung der Flussgeschwindigkeit ($p < 0,01$ gegen Nalm6-IF4/ MEC + TNF). Die Inkubation mit dem E-Selektin blockierenden Antikörper, BBA2, bewirkte nur eine geringfügige aber signifikante Erhöhung der Flussgeschwindigkeit der Nalm6-IF4 Zellen auf stimulierten Endothelzellen ($p < 0,01$ gegen Nalm6-IF4/ MEC + TNF).

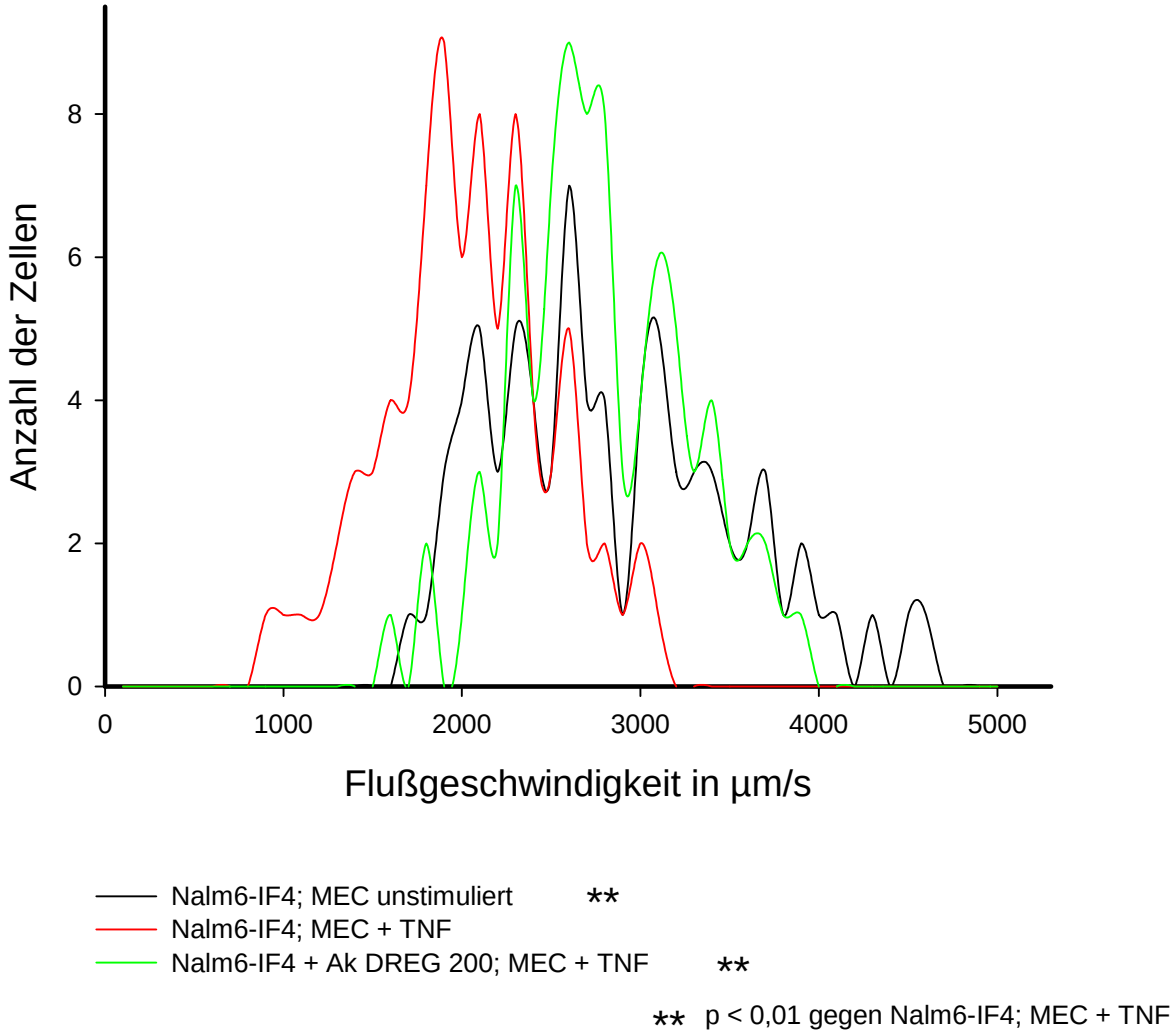


Abbildung 5:

Im obigen Diagramm ist die Anzahl der Leukozyten gegen die zugehörige Geschwindigkeitsklasse aufgetragen. Die Stimulation der Endothelzellen mit TNF führt zu einer Rechtsverschiebung der Kurve, die eine Verlangsamung der Leukozyten anzeigt. Dieser Effekt ist durch die Inkubation der Leukozyten mit einem anti-L-Selektin-Antikörper vollständig hemmbar.

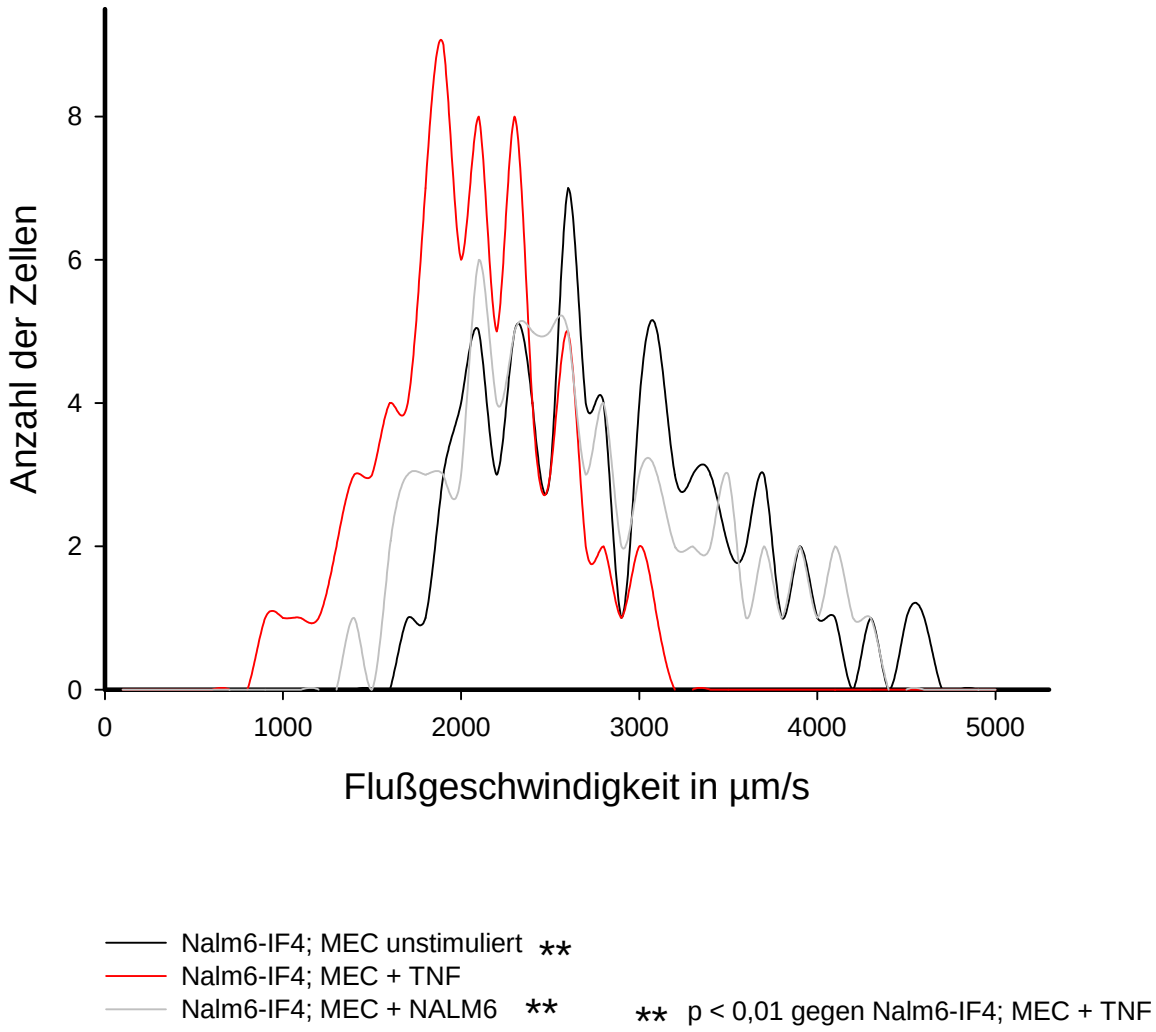
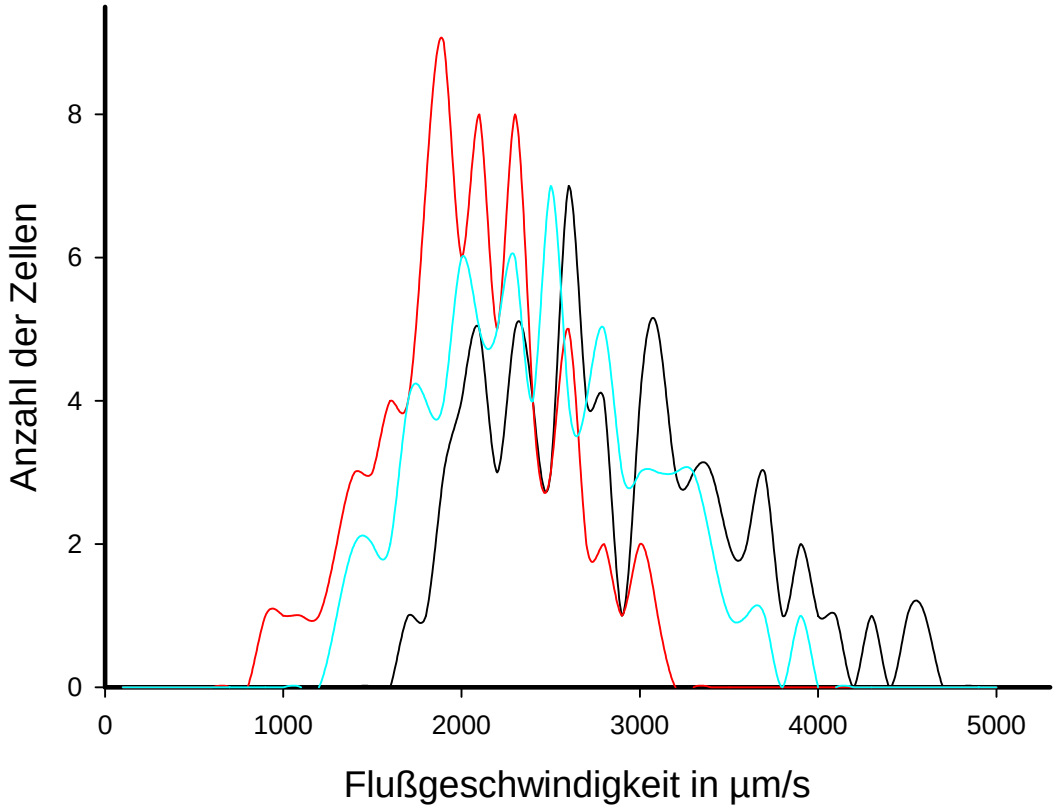


Abbildung 6:

Geschwindigkeitsverteilung selektinnegativer Nalm6 Zellen im Vergleich zu L-Selektin positiven Nalm6-IF4 Zellen

Stimulation der Endothelzellen mit TNF führt zu einer stärkeren Verlangsamung der Nalm6-IF4 Zellen als der Nalm6 Zellen



Nalm6-IF4; MEC unstimuliert **
Nalm6-IF4; MEC + TNF
Nalm6-IF4; MEC + TNF + BBA2 **

** $p < 0{,}01$ gegen Nalm6-IF4; MEC + TNF

Abbildung 7:

Wirkung von BBA2 auf die Flussgeschwindigkeit L-Selektin positiver Nalm6-IF4 Zellen

Die durch die Stimulation der Endothelzellen mit TNF α bewirkte Geschwindigkeitsreduktion ist durch den anti-E-Selektin Antikörper BBA2 teilweise hemmbar.

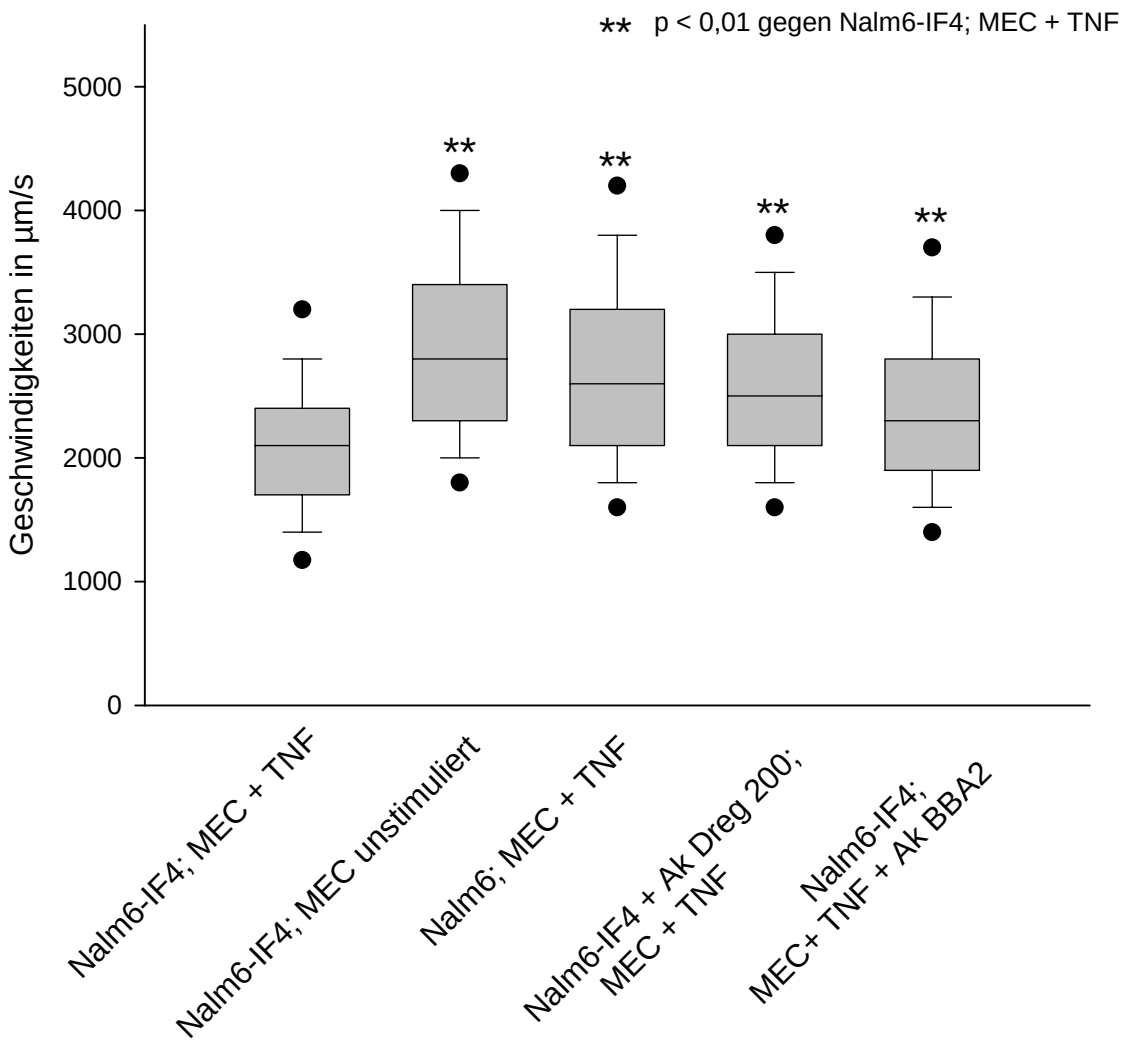


Abbildung 8:

Mediane Flussgeschwindigkeit der Nalm6 und Nalm6-IF4 Zellen auf HCMEC Die mediane Flussgeschwindigkeit von L-Selektin positiven Nalm6-IF4 Zellen war nach Stimulation der Endothelzellen mit TNFα niedriger als ohne Stimulation. Diese Wirkung ließ sich durch Inkubation der Nalm6-IF4 Zellen mit dem L-Selektin blockierenden Antikörper, DREG 200, nahezu vollständig inhibieren. Die Inkubation der Endothelzellen mit dem E-Selektin blockierenden Antikörper, BBA2, bewirkte eine schwächere Anhebung des Medians. L-Selektin negative Nalm6 Zellen besaßen eine höhere mediane Flussgeschwindigkeit als Nalm6-IF4 Zellen auf TNFα-stimulierten Endothelzellen.

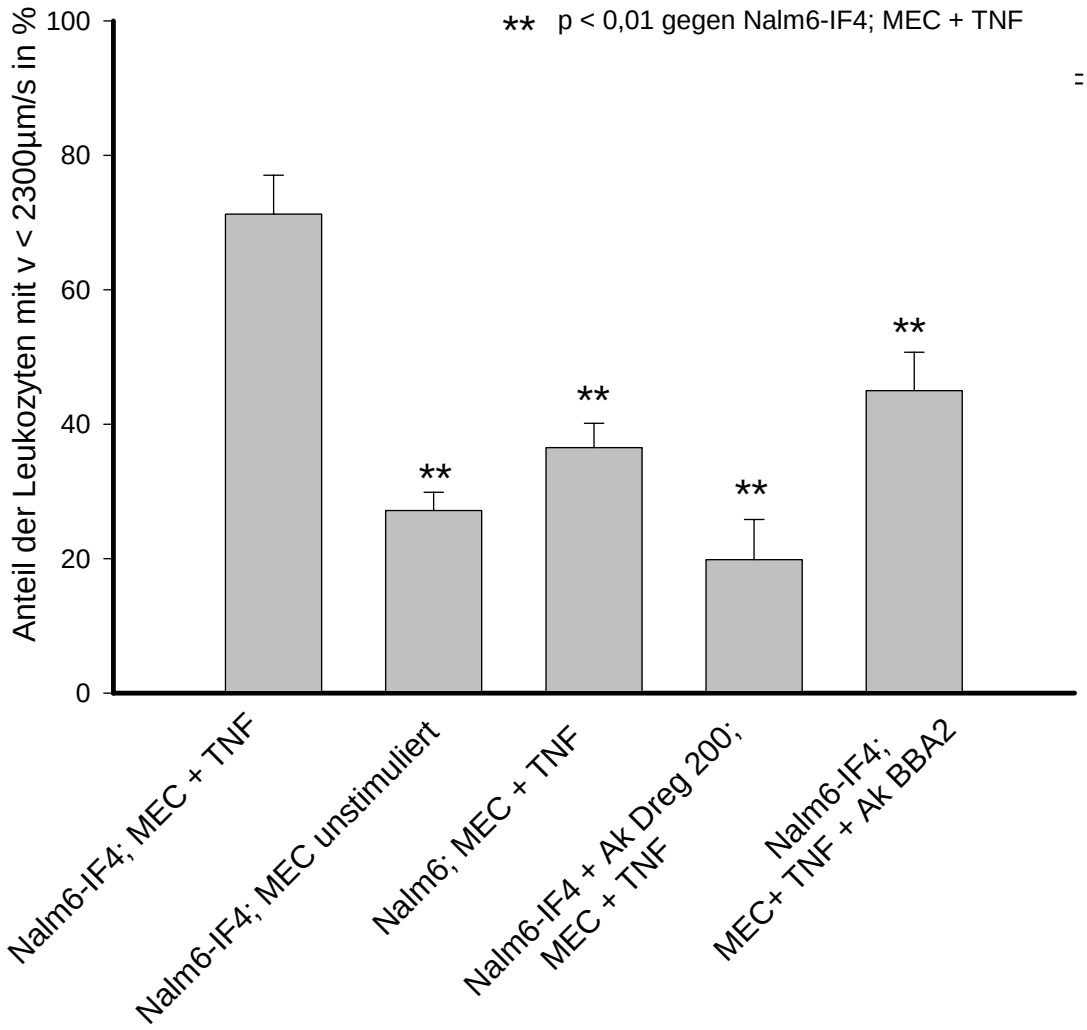


Abbildung 9:

Anteil der Leukozyten mit v < 2300 µm/s

Der Anteil der L-Selektin positiven Nalm6-IF4 Zellen mit v < 2300 µm/s betrug weniger als 30 % an unstimulierten Endothelzellen, während er nach Stimulation mit TNFα auf über 70 % anstieg. Diese Wirkung konnte durch den L-Selektin blockierenden Antikörper, DREG 200, gehemmt werden. Auch die Inkubation der zuvor mit TNFα-stimulierten Endothelzellen mit dem E-Selektin blockierenden Antikörper, BBA2, führte zu einer Verminderung des Anteils der Nalm6-IF4 Zellen mit v < 2300 µm/s. Sie war jedoch schwächer ausgeprägt als nach Behandlung mit dem Antikörper DREG 200 und gibt den Anteil der E-Selektin vermittelten Interaktion an der L-Selektin abhängigen Adhäsion wieder. Der Anteil der L-Selektin negativen Nalm6 Zellen mit v < 2300 µm/s war signifikant geringer als der der Nalm6-IF4 Zellen.

3.3.3 Versuche mit Tunicamycin

Verglichen wurden die Adhäsion und Flussgeschwindigkeit von Nalm6-IF4 Zellen auf TNFα-stimulierten HCMEC mit denen auf HCMEC, die mit TNFα stimuliert wurden und zusätzlich mit Tunicamycin inkubiert wurden.

3.3.3.1 Adhäsion

Die Adhäsion an TNFα-stimulierten Endothelzellen, die zusätzlich mit Tunicamycin behandelt wurden, verringerte sich signifikant gegenüber Endothelzellen ohne Tunicamycinbehandlung. In den Wandschubspannungsbereichen von 0,6 dyn/cm^2 bis 2,4 dyn/cm^2 verminderte sich die Adhäsion nach Tunicamycinbehandlung auf 54,8 ± 2,8 Prozent bei 0,6 dyn/cm² bis 0 Prozent bei 2,6 dyn/cm². Bei einer Wandschubspannung von 1,66 dyn/cm^2 betrug die absolute Anzahl an adhärenten Zellen nach Tunicamycinbehandlung 5,4 ± 2,8 gegenüber 38,6 ± 2,9 Zellen ohne Tunicamycinbehandlung. Dies bedeutete eine Reduktion auf 14 ± 5,8 Prozent ($p < 0,01$, n=10).

Die Adhäsion von Nalm6-IF4 Zellen an unstimulierten Endothelzellen betrug zwischen 12,3 ± 3,1 Prozent bei 0,6 dyn/cm^2 und 0 Prozent bei 2,4 dyn/cm^2 der Adhäsion an stimulierten Endothelzellen. Bei 1,66 dyn/cm^2 betrug die Adhäsion 0,2 ± 0,2 Zellen bzw. 0,5 ± 0,5 Prozent der Adhäsion an stimulierten Endothelzellen ($p < 0,01$, n=10).

L-Selektin abhängige Adhäsion an stimulierten Endothelzellen wird durch Tunicamycin signifikant gehemmt. Dieser Effekt ist besonders im höheren Wandschubspannungsbereich (> 1,5 dyn/cm²) groß.

In den Abbildungen 10 und 11 sind die o.g. Daten dargestellt.

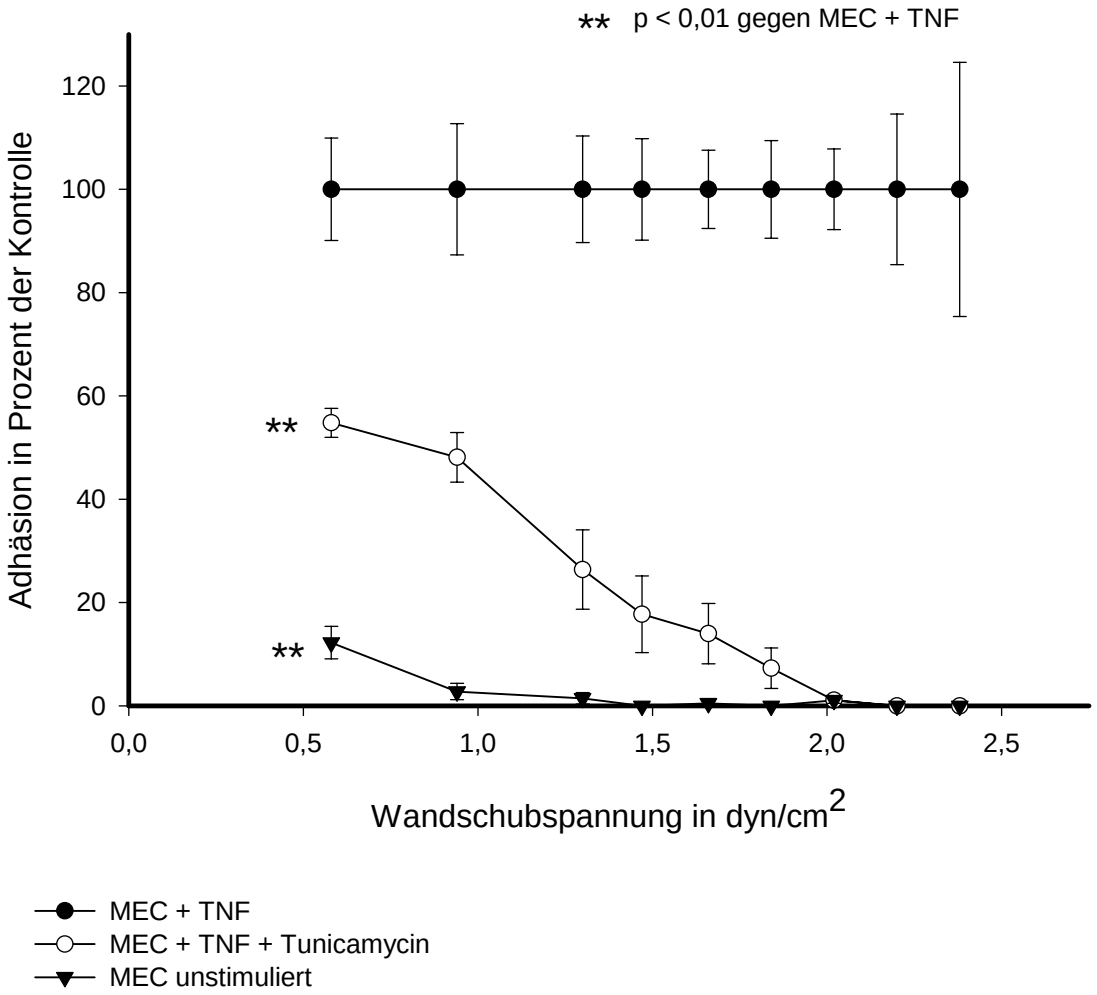


Abbildung 10:

Einfluss des Tunicamycins auf L-Selektin abhängige Adhäsion

Die Behandlung der mit TNFα stimulierten Endothelzellen mit Tunicamycin führte zu einer signifikanten Hemmung der L-Selektin abhängigen Adhäsion der Nalm6-IF4 Zellen im gesamten untersuchten Wandschubspannungsbereich.

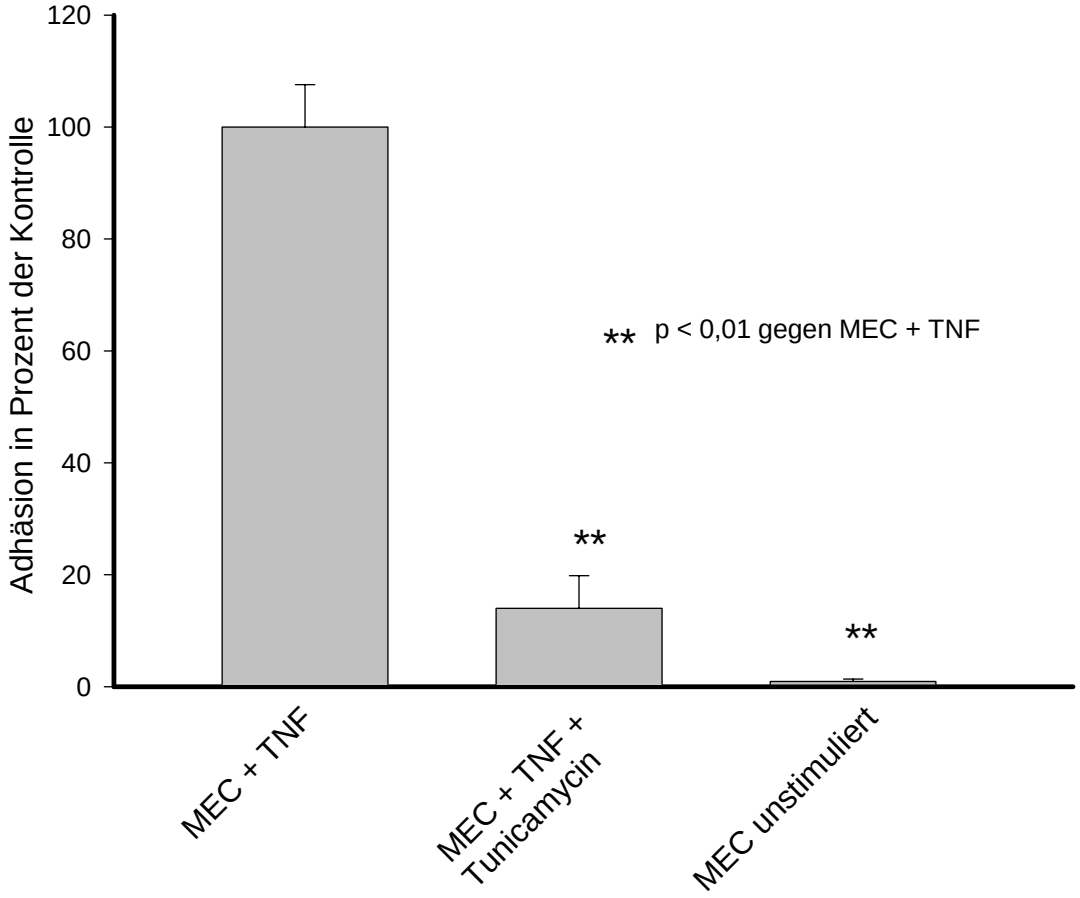


Abbildung 11:

Diese Abbildung zeigt die Wirkung desTunicamycins auf die feste Adhäsion der Nalm6-IF4 Zellen bei einer Wandschubspannung von 1,66 dyn/cm^2. Die Zahl der fest adhärenten Leukozyten an stimulierten Endothelzellen wurde durch die Inkubation mit Tunicamycin auf weniger als 14 % gegenüber der Nichtbehandlung mit Tunicamycin reduziert.

3.3.3.2 Flussgeschwindigkeit

Bei einer Wandschubspannung von 1,68 dyn/cm^2 wurde die Flussgeschwindigkeit (v) von jeweils 100 Nalm6-IF4-Zellen auf unstimulierten HCMEC, 100 Nalm6-IF4-Zellen auf zuvor mit TNFα stimulierten HCMEC und 100 Nalm6-IF4-Zellen auf stimulierten HCMEC, die zuvor mit Tunicamycin behandelt wurden, gemessen . Dabei wurden Flussgeschwindigkeiten (v) zwischen 1000 µm/s und 5000µm/s gemessen. Es zeigte sich unter Tunicamycinbehandlung eine signifikante Flussbeschleunigung gegenüber den stimulierten Endothelzellen ohne Tunicamycinbehandlung.

Nalm6-IF4 Zellen auf unstimulierten Endothelzellen besaßen eine mediane Flussgeschwindigkeit von 3600 µm/s (25. Perzentile 3000 µm/s; 75.Perzentile 4200 µm/s), der Anteil der Zellen mit $v < 2300$µm/s betrug 4,6 ± 0,4 %. Wurden die Endothelzellen zuvor mit TNFα stimuliert, verminderte sich der Median signifikant auf 2700 µm/s (2300 µm/s; 3200 µm/s) ($p < 0,01$ gegen unstimulierte Kontrollen, n=12), der Anteil der Zellen mit $v <$ 2300µm/s stieg signifikant auf 24,8 ± 2,9 % ($p < 0,01$ gegen unstimulierte Kontrollen, n=12).

Wurden stimulierte Endothelzellen zusätzlich mit Tunicamycin behandelt, so stieg die mediane Flussgeschwindigkeit wieder signifikant auf 3200 µm/s (2700 µm/s; 3700 µm/s) an, der Anteil der Zellen mit $v < 2300$ µm/s verminderte sich dementsprechend signifikant auf 8,9 ± 1,7 % ($p< 0,01$ gegen ohne Tunicamycinbehandlung, n=12).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Verminderung der Flussgeschwindigkeit nach Stimulation der Endothelzellen mit TNFα signifikant durch die Behandlung der Endothelzellen mit Tunicamycin inhibiert werden kann.

Die oben aufgeführten Daten sind in den Abbildungen 12 bis 15 dargestellt.

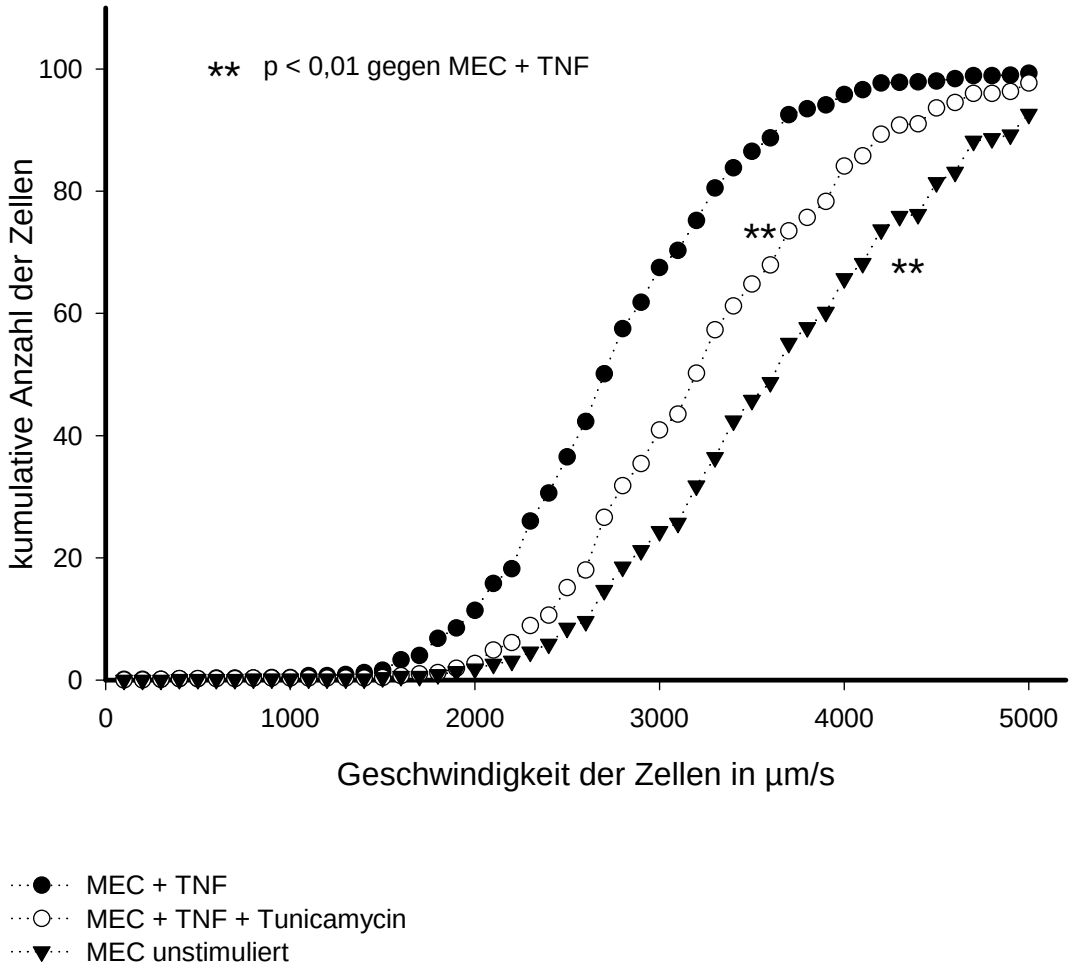
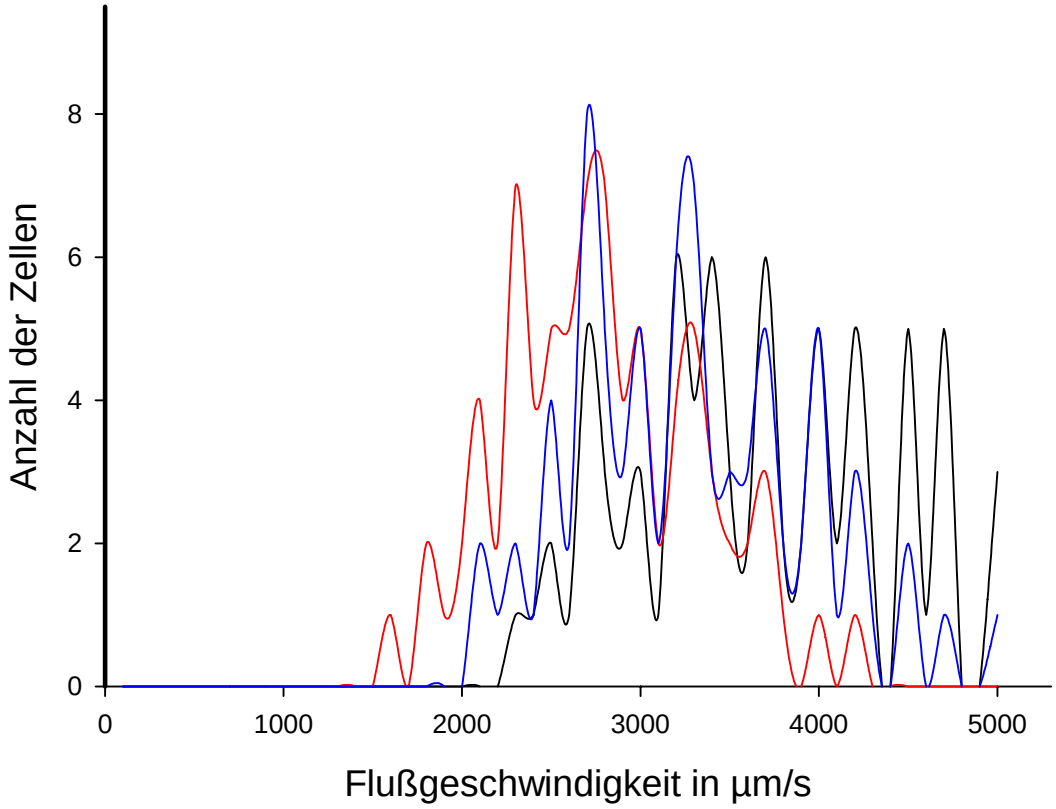


Abbildung 12:

Dargestellt ist die Flussgeschwindigkeit von jeweils 100 Nalm6-IF4 Zellen auf unstimulierten Endothelzellen, auf TNFα stimulierten Endothelzellen sowie auf stimulierten Endothelzellen mit Tunicamycinbehandlung. Zu sehen ist die deutliche Flussgeschwindigkeitsbeschleunigung auf stimulierten Endothelzellen, die zusätzlich mit Tunicamycin behandelt wurden, gegenüber der alleinigen Inkubation mit TNFα ($p < 0,01$ für MEC + TNF vs MEC + TNF + Tunicamycin).



Nalm6-IF4; MEC unstimuliert **
Nalm6-IF4; MEC + TNF
Nalm6-IF4; MEC + TNF + Tunicamycin **

** p < 0,01 gegen Nalm6-IF4; MEC + TNF

Abbildung 13:

Wirkung von Tunicamycin auf die Flussgeschwindigkeit L-Selektin positiver Nalm6-IF4 Zellen

Die durch TNFα induzierte Reduktion der Geschwindigkeit ist durch Tunicamycin hemmbar.

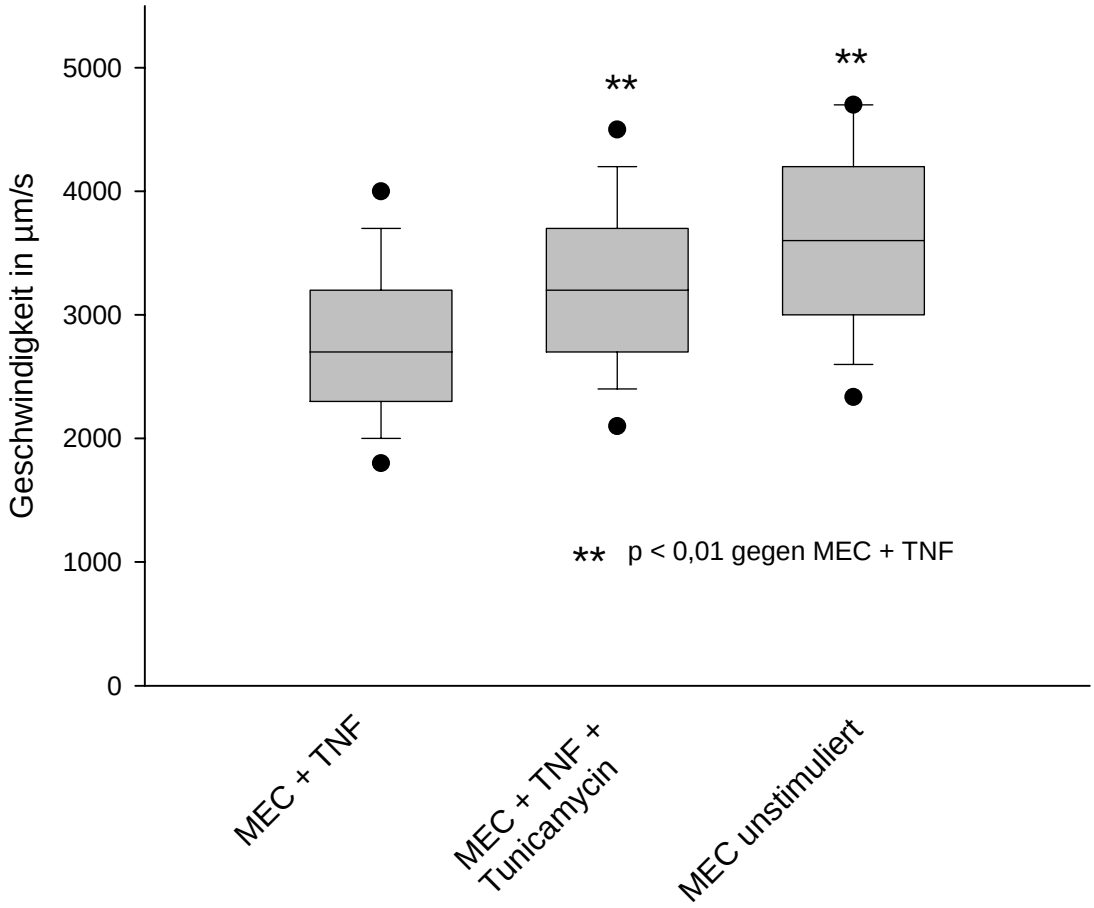


Abbildung 14:

Diese Abbildung zeigt die Wirkung des Tunicamycins auf den Median der Flussgeschwindigkeit von Nalm6-IF4 Zellen. Die Inkubation der mit TNFα stimulierten Endothelzellen mit Tunicamycin führte zu einer signifikanten Erhöhung der medianen Flussgeschwindigkeit.

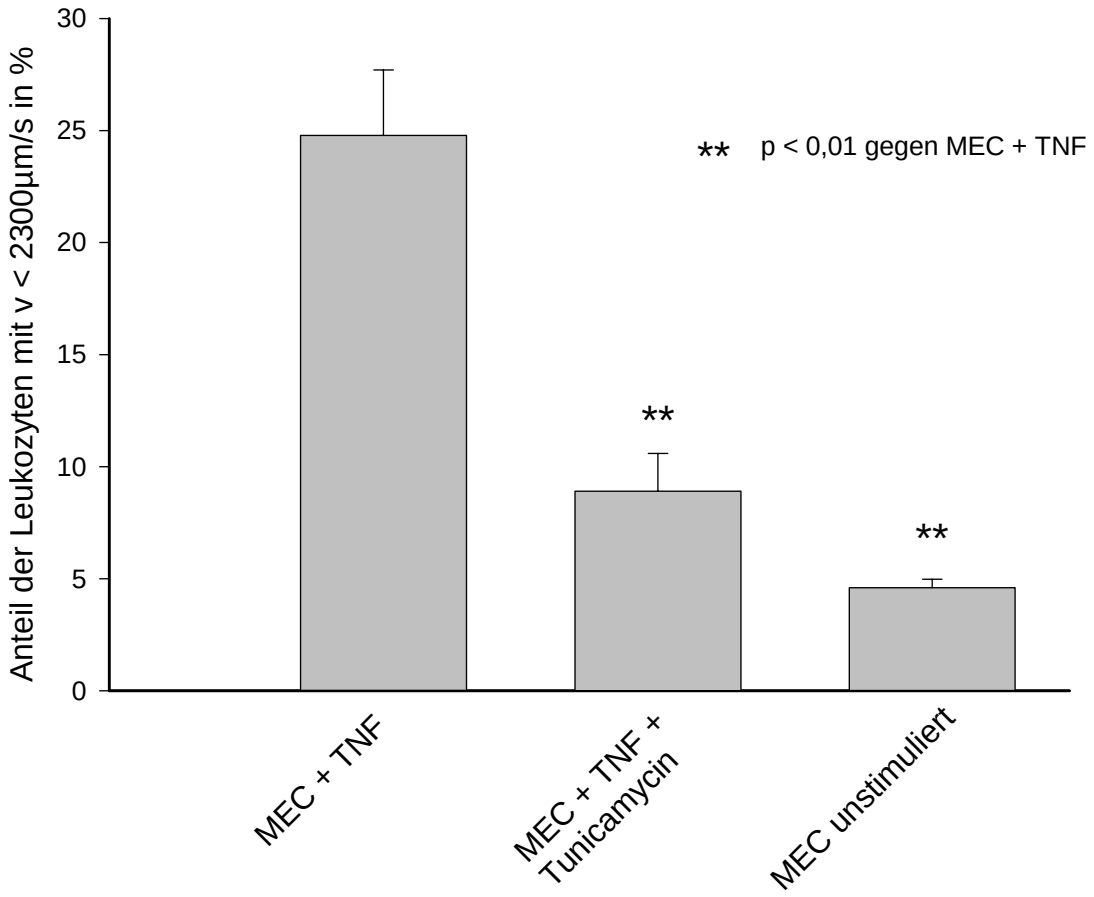


Abbildung 15:

Diese Abbildung zeigt die Anzahl der Leukozyten mit einer Flussgeschwindigkeit v < 2300 µm/s nach unterschiedlicher Behandlung der Endothelzellen. Zu sehen ist der deutliche Rückgang der Anzahl der Leukozyten mit v < 2300 µm/s nach Tunicamycinbehandlung der mit TNFα stimulierten Endothelzellen gegenüber der alleinigen Stimulation der Endothelzellen mit TNFα.

3.4 E-Selektin vermittelte Interaktion zwischen Endothel und Leukozyten

3.4.1 Feste Adhäsion von HL60 Zellen an humanen umbilikalen venösen Endothelzellen (HUVEC)

Die Adhäsion von HL60 Zellen an unstimulierten Endothelzellen war in allen untersuchten Wandschubspannungsbereichen (τ) zwischen 0,6 - 2,4 dyn/cm^2 geringer ausgeprägt als an zuvor für 5 Stunden mit 1000 U/ml TNFα stimulierten Endothelzellen. Sie betrug 0 Prozent bei τ = 2,4dyn/cm^2 und 7,8 ± 3,0 Prozent bei τ = 0,6 dyn/cm^2 der Adhäsion an stimulierten Endothelzellen.

Bei einer Wandschubspannung von 1,66 dyn/cm^2 betrug die absolute Anzahl an adhärenten Leukozyten an stimulierten Endothelzellen 59,4 ± 5,8, während sie ohne Stimulation auf 0 Zellen abfiel ($p < 0,01$ gegen unstimulierte Kontrollen, n = 8).

Wurden TNFα-stimulierte Endothelzellen zusätzlich mit dem E-Selektin blockierenden Antikörper BBA2 inkubiert, so verminderte sich die Adhäsion der HL60 Zellen auf 71,3 ± 2,5 % bei 0,6 dyn/cm² bis 15,2 ± 4,1 Prozent bei einer Wandschubspannung von 2,4 dyn/cm^2. Bei τ = 1,66 dyn/cm^2 betrug die Anzahl der adhärenten Zellen 19,6 ± 2,2, was einer Reduktion auf 33 ± 3,7 Prozent entspricht ($p < 0,01$ gegen stimulierteEndothelzellen ohne Behandlung mit BBA2, n = 8).

Im höheren Wandschubspannungsbereich ($\tau > 1,5$ dyn/cm^2) fand feste Adhäsion nur an TNFα-stimulierten Endothelzellen statt. Diese Adhäsion konnte signifikant durch den E-Selektin blockierenden Antikörper, BBA2, inhibiert werden.

Die aufgeführten Daten sind in den Abbildungen 16 und 17 dargestellt.

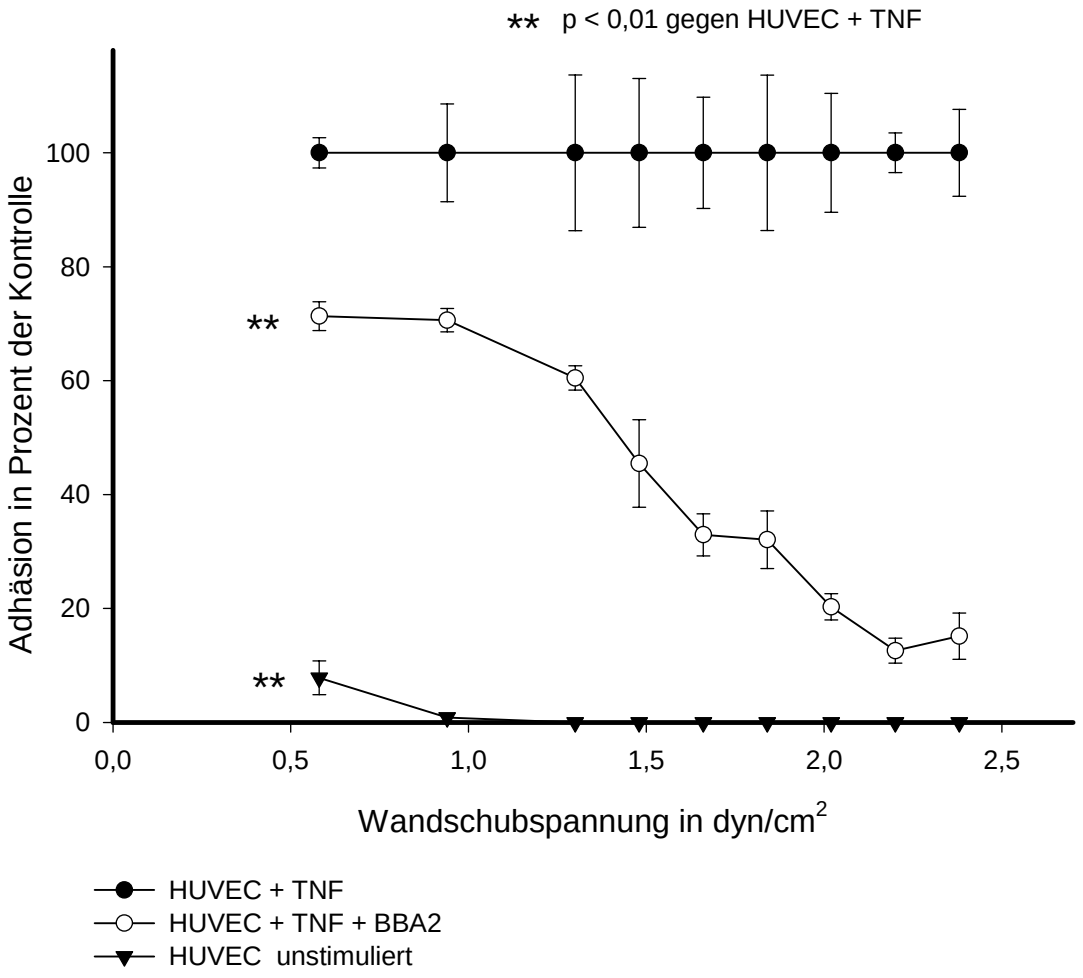


Abbildung 16:

Feste Adhäsion von HL60 Zellen an HUVEC

In dieser Abbildung ist die Zahl der fest adhärenten HL60 Zellen an HUVEC in Prozent der Positivkontrolle und in Abhängigkeit von der Wandschubspannung dargestellt. Die Adhäsion an TNFα-stimulierten HUVEC wurde durch die zusätzliche Inkubation der Endothelzellen mit dem E-Selektin blockierenden Antikörper, BBA2, deutlich vermindert.

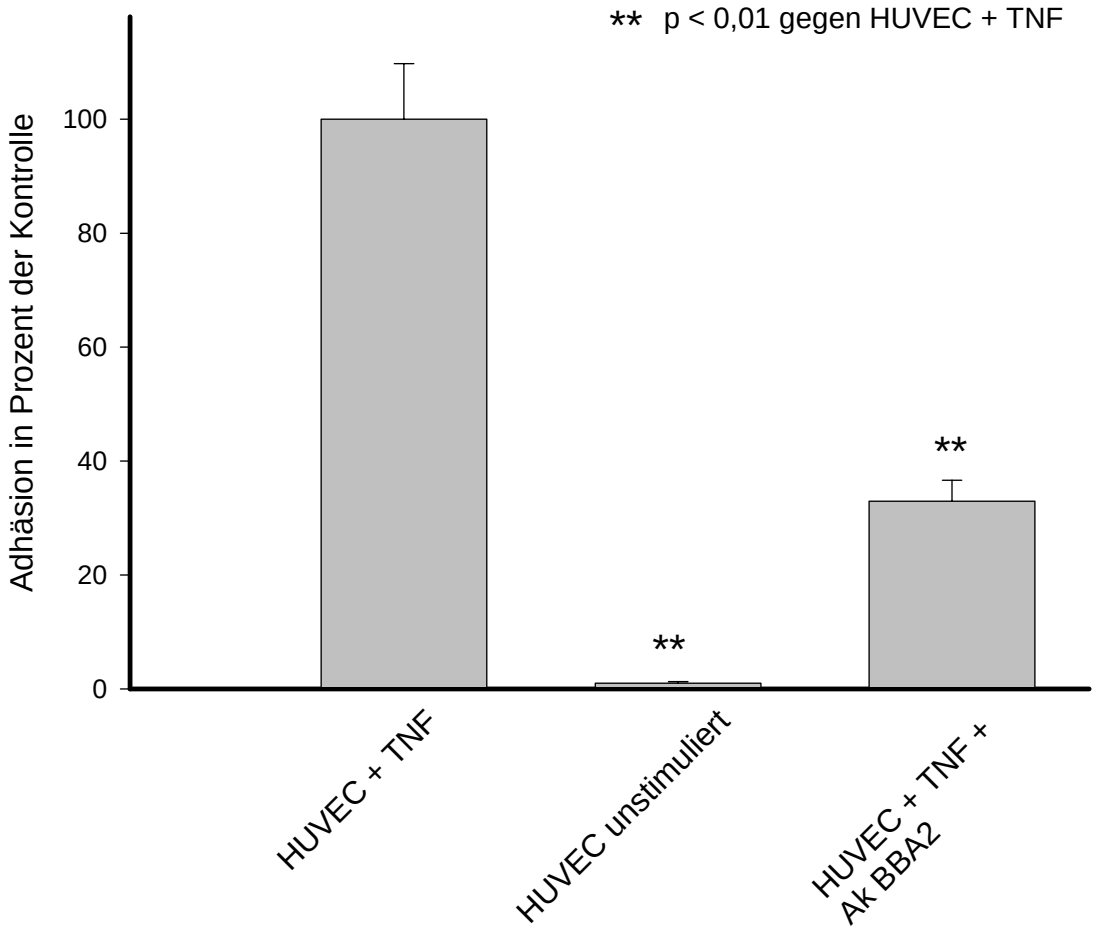


Abbildung 17:

Adhäsion von HL60 Zellen an HUVEC bei 1,66 dyn/cm^2

Die signifikante Hemmung der festen Adhäsion an stimulierten Endothelzellen durch den anti-E-Selektin Antikörper, BBA2, weist auf E-Selektin Abhängigkeit der Leukozytenadhäsion hin.

3.4.2 Flussgeschwindigkeit von HL60 Zellen auf humanen umbilikalen venösen Endothelzellen (HUVEC)

Bei einer Wandschubspannung von 1,66 dyn/cm^2 wurde die Flussgeschwindigkeit (v) von jeweils 100 HL60 Zellen auf unstimulierten HUVEC, auf zuvor mit TNFα stimulierten HCMEC und auf stimulierten HCMEC, die zusätzlich mit BBA2 behandelt wurden, gemessen. Es wurden Flussgeschwindigkeiten (v) zwischen 1000 µm/s und 5000 µm/s gemessen. Die größte Differenz zwischen der kumulativen Geschwindigkeitsverteilung der HL60 Zellen auf stimulierten Endothelzellen und der auf unstimulierten Endothelzellen war bei der Geschwindigkeitsklasse 3500 µm/s zu sehen. Daher wurde postuliert, dass E-Selektin vermittelte Interaktionen zu einer Zunahme des Anteils der Leukozyten mit einer Geschwindigkeit $v < 3500$ µm/s führen.

HL60 Zellen auf unstimulierten Endothelzellen hatten eine mediane Flussgeschwindigkeit von 4100 µm/s (25. Perzentile 3500 µm/s; 75. Perzentile 4825 µm/s), der Anteil der Zellen mit $v < 3500$µm/s betrug 25,3 ± 5,4 %. Wurden die Endothelzellen zuvor mit TNFα stimuliert, verminderte sich der Median signifikant auf 3300 µm/s (2800 µm/s; 3900 µm/s) ($p < 0,01$ gegen unstimulierte Kontrollen, n=6), der Anteil der Zellen mit $v < 3500$ µm/s stieg signifikant auf 62,7 ± 7,4 % ($p < 0,01$ gegen unstimulierte Kontrollen, n=6).

Wurden stimulierte Endothelzellen vor dem Versuch mit dem E-Selektin blockierenden Antikörper BBA2 inkubiert, stieg die mediane Flussgeschwindigkeit auf 3900 µm/s (3300µm/s; 4600 µm/s) an, der Anteil der Zellen mit $v < 3500$ µm/s betrug 32,3 ± 5,6 % ($p < 0,01$ gegen stimulierte Endothelzellen ohne BBA2-Behandlung, n = 6).

Die Stimulation von HUVEC mit TNFα führte zu einer Verminderung der Flussgeschwindigkeit. Dieser Effekt konnte signifikant durch den anti-E-Selektin Antikörper, BBA2, gehemmt werden, was auf E-Selektin Abhängigkeit dieses Effektes hinweist.

Die aufgeführten Daten sind in den Abbildungen 18 bis 20 dargestellt.

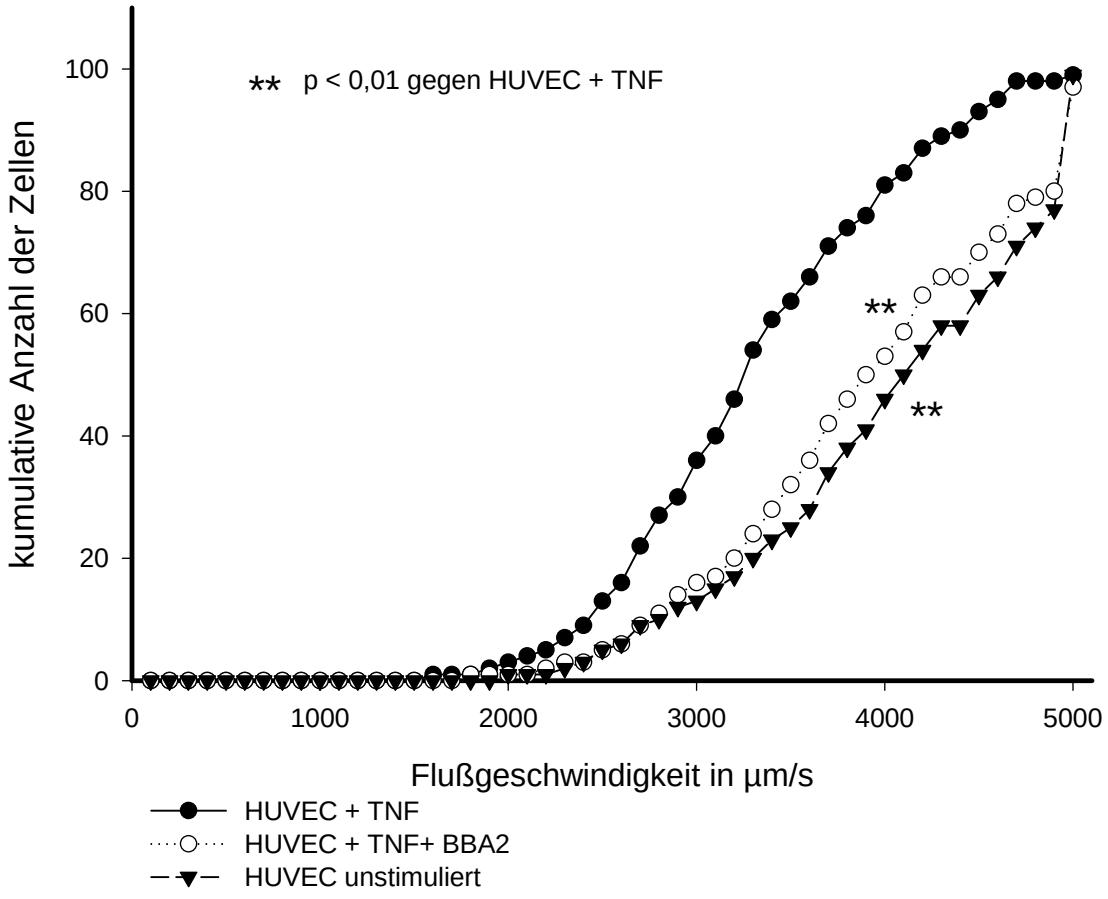


Abbildung 18:

Flussgeschwindigkeit von HL60 Zellen auf HUVEC

Die Stimulation der Endothelzellen mit TNFα führte zu einer signifikanten Verminderung der Flussgeschwindigkeit ($p < 0,01$ gegen unstimulierte Kontrollen). Diese Wirkung des TNFα wurde durch die zusätzliche Inkubation mit dem E-Selektin blockierenden Antikörper,BBA2, nahezu aufgehoben ($p < 0,01$ gegen stimulierte Endothelzellen ohne Behandlung mit BBA2).

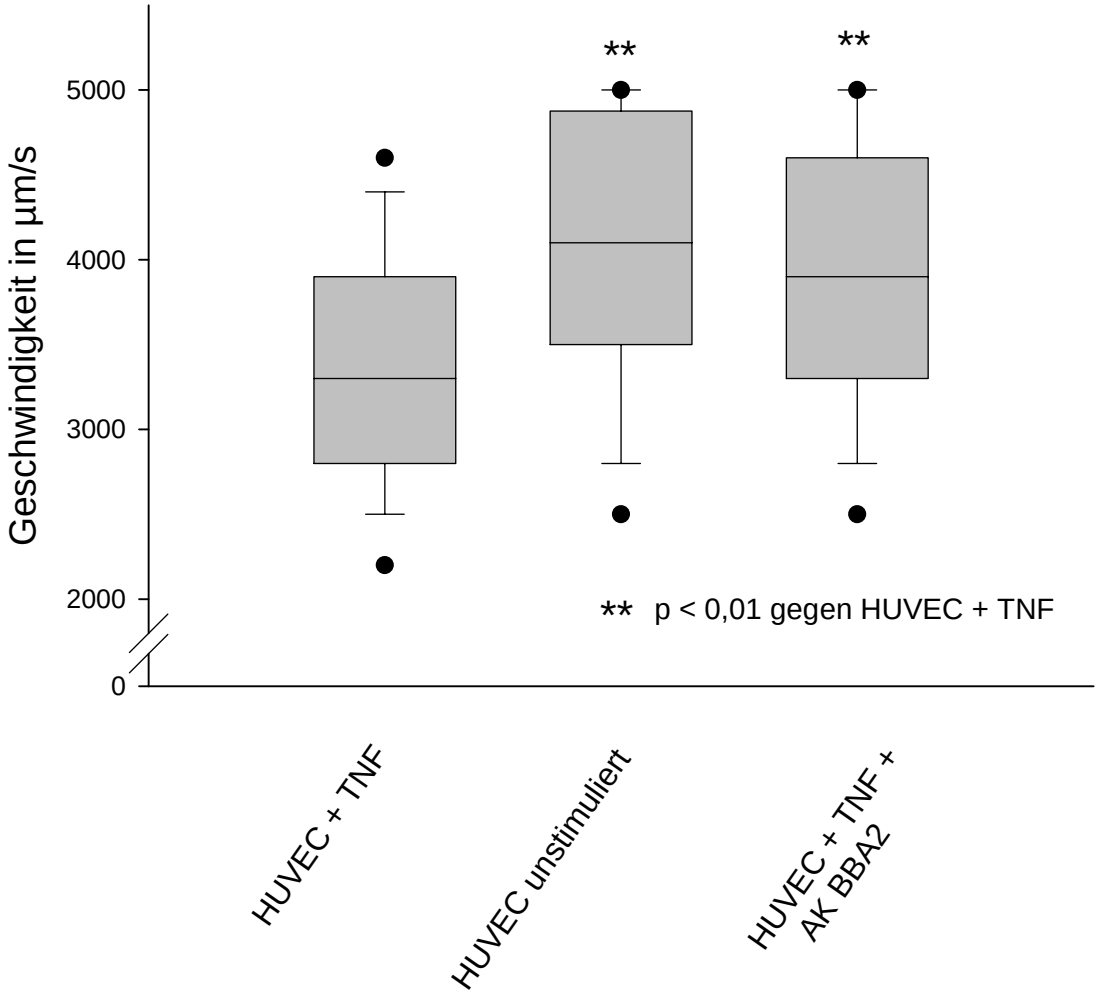


Abbildung 19:

Mediane Flussgeschwindigkeit von HL60 Zellen auf HUVEC

Die mediane Flussgeschwindigkeit auf TNFα-stimulierten Endothelzellen war signifikant langsamer als auf unstimulierten Endothelzellen. Wurden stimulierte Endothelzellen zusätzlich mit dem anti-E-Selektin Antikörper, BBA2, inkubiert, stieg die mediane Flussgeschwindigkeit wieder deutlich an, was auf eine E-Selektin Abhängigkeit der TNFα-Wirkung hinweist.

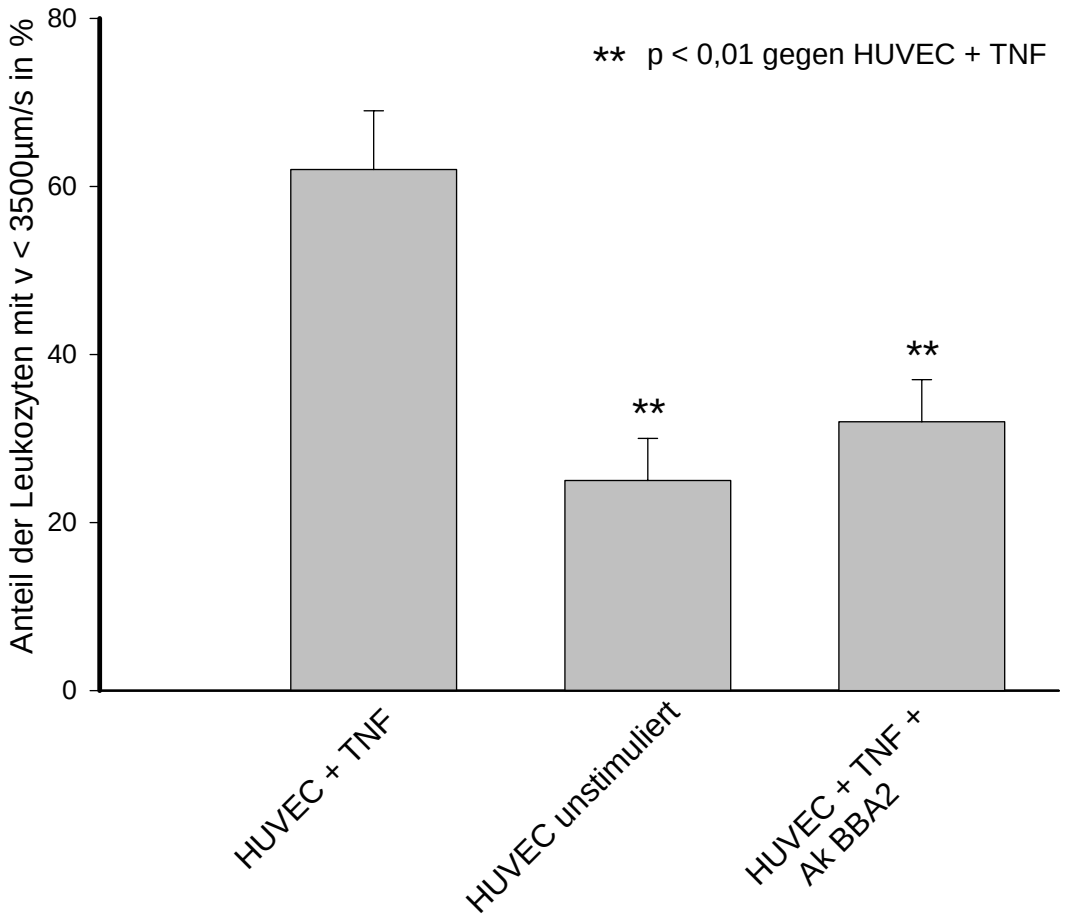


Abbildung 20:

Anteil der HL 60 Zellen mit einer Flussgeschwindigkeit v < 3500 µm/s

Die Zahl der HL60 Zellen mit v < 3500 µm/s stieg nach Stimualtion mit TNFα signifikant an. Diese Wirkung des TNFα konnte durch den E-Selektin blockierenden Antikörper, BBA2, deutlich gehemmt werden.

3.4.3 E-Selektin vermitteltes Rollen von HL60 Zellen auf HUVEC

Bei einer Wandschubspannung von 1,66 dyn/cm^2 wurde die Anzahl und Geschwindigkeit von rollenden HL60 Zellen auf humanen umbilikalen venösen Endothelzellen über einen Zeitraum von 5 Minuten ermittelt. Auf unstimulierten Endothelzellen war kein Rollen nachweisbar.

Auf TNFα-stimulierten Endothelzellen wurden in einem Zeitraum von 5 Minuten 20,3 ± 4,8 rollende Zellen mit einer mittleren Geschwindigkeit von 6,7 ± 0,3 µm/s beobachtet ($p < 0,01$ gegen unstimulierte Endothelzellen, $n = 6$).

Wurden stimulierte Endothelzellen zusätzlich mit BBA2 inkubiert, so verminderte sich die Zahl der rollenden Zellen in einem Zeitraum von 5 Minuten signifikant auf 3 ± 1,4 mit einer mittleren Geschwindigkeit von 6 ± 0,8 µm/s ($p < 0,01$ gegen TNFα-stimulierte Endothelzellen, $n = 6$).

Die o.g.Daten sind in der Abbildung 21 dargestellt.

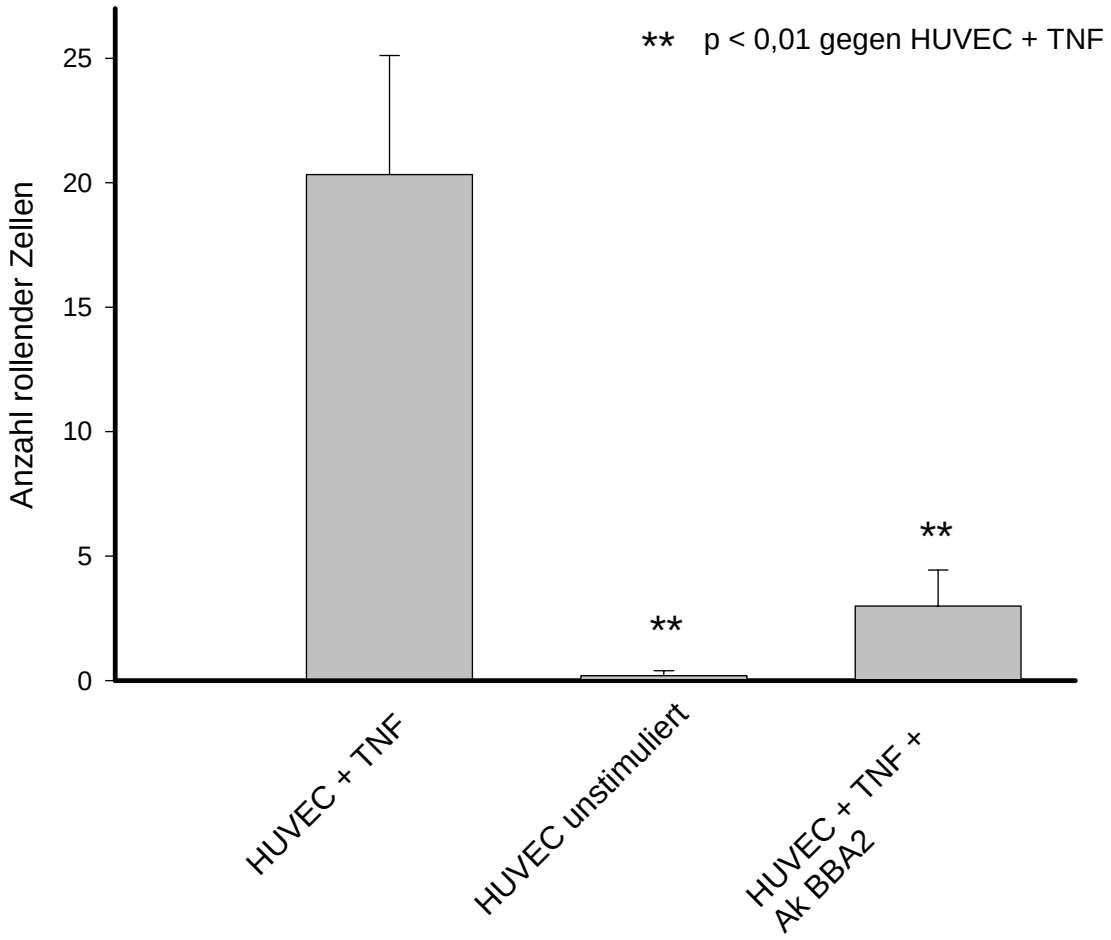


Abbildung 21:

Anzahl rollender HL60 Zellen auf HUVEC bei $\tau = 1{,}66$ dyn/cm^2

Auf ruhenden HUVEC konnte kein Rollen nachgewiesen werden. Das nach Stimulation der Endothelzellen mit TNFα beobachtete Rollen konnte signifikant durch den E-Selektin blockierenden Antikörper, BBA2, gehemmt werden.

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Versuche mit Nalm6-IF4 Zellen zeigten, dass die Stimulation humaner kardialer mikrovaskulärer Endothelzellen mit TNFα zu einer Verminderung der Flussgeschwindigkeit sowie zu einer Zunahme der festen Adhäsion von L-Selektin positiven Leukozyten führten. Die L-Selektin Abhängigkeit dieses Effektes konnte durch die Versuche mit L-Selektin negativen Leukozyten sowie mit dem anti-L-Selektin Antikörper, DREG 200, bestätigt werden. Tunicamycin, das die Ausbildung N-glykosidischer Bindungen hemmt, inhibierte L-Selektin abhängige Leukozyten-Endothel-Interaktionen.

In den Versuchen mit humanen umbilikalen venösen Endothelzellen (HUVEC) zeigten sich selektinvermittelte Interaktionen wie bereits bei den Versuchen mit Nalm6-IF4 Zellen erst nach Stimulation der Endothelzellen mit TNFα. Die Inkubation der Endothelzellen mit TNFα bewirkte eine Verminderung der Leukozytengeschwindigkeit und eine Zunahme der festen Adhäsion, die E-Selektin abhängig waren. Das selektinvermittelte typische Rollen war nur auf stimulierten Endothelzellen zu beobachten.

4.2 Diskussion der Methodik und des Versuchsaufbaus

4.2.1 Physiologie der Leukozyten-Endothel-Interaktionen

Die Leukozytendiapedese aus den Blutgefäßen in das Gewebe stellt einen wichtigen Bestandteil der körpereigenen Abwehr dar. Im Verlauf eines Entzündungsprozesses kommt es zur lokalen und/oder systemischen Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie IL-1 oder TNFα, die Endothelzellen aktivieren. Diese exprimieren daraufhin Adhäsionsmoleküle auf ihrer Oberfläche, die mit Partnermolekülen auf der Leukozytenoberfläche interagieren. Bei diesen Interaktionen wird die Expression eines der beiden Partner reguliert, während der andere meist dauerhaft exprimiert wird. Dies ermöglicht im Zusammenspiel mit den Chemokinen eine auf den Bedarf ausgerichtete Leukozytenrekrutierung. Zu diesen Adhäsionsmolekülen gehören Selektine, Selektinliganden, Integrine (z.B. α1β2, α4β7) und Zelladhäsionsmoleküle der

Immunglobulinsupergenfamilie (VCAM-1, ICAM-1). Diese verschiedenen Gruppen haben unterschiedliche, teilweise überlappende Funktionen [14].

Für den Vorgang der Adhäsion der Leukozyten an das Endothel wurde ein Modell aus mehreren aufeinander folgenden Einzelschritten entwickelt [35,36,37]. Am Anfang steht das Abfangen der frei fließenden Leukozyten („capture“) aus dem Blutstrom durch die intiale Interaktion („tethering“) und das anschließende Rollen der Leukozyten entlang des Endothels („rolling“). Im zweiten Schritt werden die rollenden Leukozyten von Chemokinen aktiviert. Als nächstes kommt es durch die Ausbildung einer festen Bindung zwischen den aktivierten Leukozyten und Endothelzellen zu einem vollständigen Arrest der Leukozyten. Als vierter Schritt folgt die Migration der Leukozyten zwischen den Endothelzellen in das umliegende Gewebe.

In dieser Adhäsionskaskade übernehmen die o.g. Adhäsionsmoleküle unterschiedliche, teilweise überlappende Funktionen. Der erste Schritt des „tethering“ und „rolling“ wird von Selektinen und den mit ihnen interagierenden Liganden vermittelt. Diese initiale Bindung führt zu einem Abbremsen und Rollen der frei fließenden Leukozyten auf dem Endothel, so dass ihre Flussgeschwindigkeit um etwa den Faktor 100 reduziert wird. Der Vorgang des Rollens kommt durch die sehr hohe Dissoziationsrate der Bindungen zwischen den Selektinen und ihren Liganden zustande, so dass die Bindungen nur für kurze Zeit aufrecht erhalten und wieder gelöst werden. Stromabwärts treten wieder neue Bindungen auf, die nach kurzer Zeit erneut gelöst werden, so dass sich in der Summe das Bild des Rollens ergibt [38,39,40]. Die Kinetik der Dissoziation der Bindungen ergibt somit auch die Geschwindigkeit des Rollens [41] . Einen wichtigen Einfluß auf diesen Vorgang hat die Wandschubspannung (τ), eine auf die Leukozyten einwirkende tangentiale Kraft, die Leukozyten in Fließbewegung hält. Verschiedene Studien zeigten, dass für die selektinvermittelte Interaktion ein Schwellenwert für die Wandschubspannung (τ = 0,5-1 dyn/cm^2) überschritten werden muß [42,43,44]. Neben Selektinen sind auch das Adhäsionsmolekülpaar VCAM-1/$\alpha_4\beta_7$-Integrin sowie das $\alpha_4\beta_1$-Integrin in der Lage, bei einer Wandschubspannung $\tau > 1{,}0$ dyn/cm^2 Leukozytenrollen zu vermitteln [45,46,47]. Die Selektin/Ligand-Interaktionen sowie die Einwirkung lokaler von Endothelzellen präsentierten Chemokinen, wie IL-8 oder PAF (Plättchen aktivierender Faktor), führt zu einer Aktivierung von Leukozyten, die den zweiten Schritt der Adhäsionskaskade nach dem initialen Rollen darstellt [48,49,50]. Die Aktivierung der Leukozyten bewirkt eine Konformationsänderung der bereits auf der Leukozytenoberfläche exprimierten Integrine und erhöht somit ihre Avidität für eine Bindung mit den auf Endothelzellen exprimierten

Zelladhäsionsmolekülen der Immunglobulin-Supergen-Familie wie VCAM-1 oder ICAM-1 [51,52]. Die Interaktion dieser beiden Molekülpaare bewirkt eine feste Adhäsion der Leukozyten an das Endothel, so dass die Leukozyten zum vollständigen Stillstand kommen. Alle Schritte der Adhäsionskaskade bis einschließlich der festen Adhäsion sind potentiell reversibel, so dass rollende Zellen oder auch fest adhärente Zellen sich von ihrer Bindung an das Endothel lösen können und wieder in den freien Blutstrom übertreten können. Auf die feste Adhäsion folgt als vierter Schritt der Adhäsionskaskade die Transmigration der Leukozyten in das Gewebe. Eine wesentliche Rolle spielt bei diesem Schritt das PECAM-1 (CD 31), ein Adhäsionsmolekül aus der Immunglobulin-Supergen-Familie [53,54].

Bei diesem Mehrschrittmodell der Leukozytenadhäsion haben Selektine und ihre Liganden eine Schlüsselfunktion, da sie mit dem „tethering“ und „rolling“ der Leukozyten die Adhäsionskaskade einleiten.

4.2.2 Möglichkeiten zur Messung der Leukozyten-Endothel-Interaktionen

Zur Untersuchung der Leukozyten-Endothel-Interaktion sind bisher zwei Versuchsansätze zur Anwendung gekommen, zum einen die intravitale Mikroskopie mit der direkten Beobachtung der Vorgänge im Tierversuch [55,56,57,58] und zum Zweiten Versuche mit Zellkulturen [59,60]. Die vorliegende Arbeit benutzte die letztere Versuchsanordnung, da kein etabliertes System zur in vivo Untersuchung von humanen Endothelzellen zur Verfügung steht [61]. Die verwendeten Leukozyten sind von Leukämiepatienten gewonnene spezielle immortale Zelllinien mit stabiler Expression von Oberflächenmolekülen, welche einen entscheidenden Vorteil gegenüber der Verwendung von nativen Leukozyten bietet, da letztere durch Vorgänge wie L-Selektin-„shedding“, dem Verlust von L-Selektin nach Stimulation, ein instabiles Expressionsmuster aufweisen [62].

4.2.3 Eigenes Modell zur Messung der Leukozyten-Endothel-Interaktionen

Versuchsmodelle mit Endothelzellen aus Zellkulturen haben im Vergleich zu in vivo Systemen den Nachteil, dass diese durch die Gewinnung und Kultivierung sich verändern können. Durch Schaffung von Kulturbedingungen, die nahe an die physiologischen heranreichten, sollte diese Störgröße so gering wie möglich gehalten werden. Aus diesem Grunde wurden nur Endothelzellen aus der zweiten bis zur vierten Passage für die Versuche verwendet. Aufgrund

der verwendeten Isolationstechnik muss davon ausgegangen werden, dass die gewonnene Endothelzellkultur aus Endothelzellen der verschiedenen Abschnitte des mikrovaskulären Gefäßbettes (Arteriolen, Kapillaren und postkapilläre Venolen) bestand, während bei der intravitalen Mikroskopie die einzelnen Abschnitte isoliert betrachtet werden können.

Die Verwendung einer Flusskammer in dieser Arbeit hatte zum Ziel, physiologische Bedingungen eines Blutgefäßes so gut wie möglich zu simulieren und definierte Bedingungen für alle Versuche zu schaffen. Dies wurde erreicht, indem die Flusskammer und das Perfusionsmedium während des Versuches auf 37° C temperiert wurden, die Wandschubspannung durch die Form der Flusskammer und die Flussrate des Perfusionsmediums auf Werte gehalten wurden, bei denen Adhäsion von Leukozyten in postkapillären Venolen beobachtet wurden. Ein konstanter laminarer Fluss ermöglichte, zu jedem Zeitpunkt des Versuches jedem Punkt in der Flusskammer einen genauen Wert für die Wandschubspannung zuzuordnen. Dafür wurde in Kauf genommen, daß die physiologischen Bedingungen des pulsatilen Blutflusses nicht exakt übernomen wurden. Während ein Perfusionsgerät den kontinuierlichen Fluss des Perfusionsmediums antrieb, wurde während des Versuches über einen Dreiwegehahn am Eingang der Flusskammer ein Bolus einer Leukozytensuspension injiziert. Diese Gabe eines Bolus in den Strom steht jedoch im Gegensatz zur in vivo Situation, bei der ein kontinuierlicher Fluss des Leukozyten enthaltenden Blutes erfolgt. Eine Möglichkeit, dies nachzuahmen, wäre die Perfusionsspritze nicht nur mit Perfusionsmedium zu füllen, sondern bereits in die Spritze die Leukozytensuspension zu geben, so dass über die Perfusionsspritze ein kontinuierlicher Fluss einer Leukozytensuspension gesteuert werden könnte. Dieser Versuchsansatz bewährte sich nicht, da während der Dauer des Versuches die Leukozyten auf den Boden der Spritze sedimentierten und somit eine definierte Konzentration der Leukozyten im Perfusionsmedium nicht sicherzustellen war.

Die Flusskammer, die im Querschnitt ein Viereck ergab, war nur von einer Seite mit Endothel bedeckt. Dies entspricht zwar nicht den physiologischen Bedingungen, auf die Leukozytengeschwindigkeit wird dies jedoch keinen signifikanten Einfluß gehabt haben, da, wie bereits unter *2.3.3 Aufbau der Flusskammer* beschrieben, diese von der Gefäßwand zur Mitte des Gefäßes zunimmt, dort das Maximum erreicht, um dann zur gegenüberliegenden Gefäßwand hin wieder abzunehmen. Somit hängt die Geschwindigkeit hauptsächlich vom Abstand von der Wand bzw. Gefäßmitte ab. Jedoch wird die Zahl der mit dem Endothel interagierenden Leukozyten in einem Gefäßabschnitt vermindert sein. Da lediglich der Unterschied zwischen unstimulierten und stimulierten Endothelzellen beurteilt werden sollte, ist die absolute Anzahl der interagierenden Zellen von untergeordneter Bedeutung. Wie bereits oben beschrieben, wird

der erste Schritt der Adhäsionskaskade von Selektinen und ihren Liganden vermittelt. Die selektinabhängige Interaktion führt zu einer Reduktion der Flussgeschwindigkeit der Leukozyten und dem charakteristischen Rollen. Mit dem Nachweis dieser Phänomene und ihrer Inhibierbarkeit durch Blockade der Selektine konnte gezeigt werden, dass mit dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Versuchsaufbau in vitro Bedingungen zu schaffen sind, um Interaktionen zwischen Selektinen und ihren Liganden zu untersuchen.

4.3 Nachweis der Selektin abhängigen festen Adhäsion

4.3.1 Struktur und Expression von L-, P- und E-Selektin

In der vorliegenden Arbeit wurde die durch Selektine und ihre Liganden vermittelte Adhäsion untersucht.

Es sind derzeit drei Selektine bekannt, E-, P- und L-Selektin. Ihre Funktion ist im Gegensatz zu anderen Zelladhäsionsmolekülen wie den Integrinen einzig auf das vaskuläre System beschränkt [63].

Selektine sind transmembranöse Proteine und besitzen eine für sie charakteristische extrazelluläre Region, bestehend aus einer NH_2-terminalen Ca^{2+}-abhängigen (C-Typ)-Lektindomäne, einer epidermal growth factor (EGF)-ähnlichen Domäne und zwei bis neun short consensus repeats, Einheiten, die homolog zu Domänen in Komplement bindenden Proteinen sind. Selektine sind das einzige bekannte Beispiel für diese drei Domänen in unmittelbarer Juxtaposition [63].

Die Expression von L-Selektin beschränkt sich auf hämatopoeitische Zellen. Es wird auf fast allen Klassen von Leukozyten dauerhaft exprimiert [64,65]. Unstimulierte Leukozyten exprimieren L-Selektin auf den Mikrovilli, was den frühen endothelialen Kontakt begünstigen kann. Nach Chemokinaktivierung von Lymphozyten und Neutrophilen verlieren diese L-Selektin durch Endoproteolyse, das in der Literatur als „shedding“ bezeichnet wird [66]. Lösliches L-Selektin ist ebenfalls funktionell aktiv und kann damit ein Puffersystem darstellen, das vor einem Leukozytenrollen in Geweben mit subakuter Entzündung schützt [63,67]. Weiterhin wurde demonstriert, dass erhöhte Plasmakonzentrationen des löslichen L-Selektins als Marker für Leukozytenaktivierung und damit als Marker für Entzündung dienen könnten [68,69].

P-Selektin befindet sich konstitutiv in Weibel-Pallade-Körperchen der Endothelzellen und α-Granula der Thrombozyten. Es kann innerhalb von Minuten nach Aktivierung der sie enthaltenden Zellen durch Chemokine an die Zelloberfläche mobilisiert werden [70,71]. Die Expression ist nach 5-10 Minuten maximal. Nach 30-60 Minuten wird P-Selektin durch Endozytose von der Zelloberfläche wieder in das Zellinnere befördert und dem Golgi-Apparat zur Wiederaufbereitung zugeführt. Weiterhin kann die Expression des P-Selektins auf der

Transkriptionsebene reguliert werden. Es wurde gezeigt, dass verschiedene Entzündungsmediatoren wie TNFα oder IL-4 das Transkriptionsniveau für P-Selektin steigern können [72,73,74].

E-Selektin ist ähnlich wie P-Selektin auf der Zelloberfläche von ruhenden Endothelzellen nicht nachweisbar und kann durch Zytokine wie TNFα oder IL-1β induziert werden [75,76]. 3-4 Stunden nach Stimulation werden maximale Werte erreicht. Die Expression geht nach 16-24 Stunden auf Basalwerte zurück.

Weitere Erkenntnisse über die Rolle der Selektine lieferten Untersuchungen mit Selektin defizienten Mäusen. Das Leukozytenrollen kurze Zeit nach chirurgischem Trauma (1-2 Stunden) ist P-Selektin abhängig, während L-Selektin eine entscheidende Rolle zu späteren Zeitpunkten (nach 24 Stunden) spielt [77,78]. Ähnliche Ergebnisse brachten Versuche mit Selektin defizienten Mäusen nach peritonealer Thioglykollat-Instillation als Entzündungsstimulus [79,80].

4.3.2 Selektin abhängige feste Adhäsion

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Untersuchung der Selektin abhängigen Adhäsion an humanen Endothelzellen die beiden Prä-B-Lymphozytenreihen Nalm6 und Nalm6-IF4 (zur Untersuchung des L-Selektins) und HL 60 Zellen aus der granulozytären Reihe (zur Untersuchung des E-Selektins) verwendet.

Nalm6 Zellen unterschieden sich von Nalm6-IF4 Zellen dadurch, dass letztere mit der für L-Selektin kodierenden c-DNA transfiziert waren. Die damit verbundene dauerhafte L-Selektin-Expression der Nalm6-IF4 Zellen wurde durch die Ergebnisse der FACScan-Analyse bestätigt. Betrachtet man die Ergebnisse der Adhäsionsversuche mit diesen beiden Leukozytenreihen, so wird deutlich, dass Nalm6-IF4 Zellen in allen untersuchten Wandschubspannungsbereichen signifikant stärker adhärierten als Nalm6 Zellen. Dieser Unterschied war v.a. bei Wandschubspannungen $\tau > 1{,}5$ dyn/cm^2 am deutlichsten. Da sich beide Zellarten nur in der L-Selektin-Expression unterschieden, ist die signifikant stärkere Adhäsion der Nalm6-IF4 Zellen gegenüber Nalm6 Zellen auf L-Selektin zurückzuführen. Bestätigt wurde dies durch die Versuche mit dem L-Selektin blockierenden Antikörper DREG 200. Die Adhäsion der Nalm6-IF4 Zellen konnte bei Wandschubspannungen $\tau \geq 1{,}5$ dyn/cm^2 vollständig durch den Antikörper gehemmt werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte die L-Selektin abhängige Adhäsion von Nalm6-IF4 Zellen auf Endothelzellen durch die Zugabe eines E-Selektins Antikörpers - abhängig von der Wandschubspannung – zu einem geringen Teil gehemmt werden. Zöllner und Vestweber [81] hatten bereits zeigen können, dass E-Selektin mit Anteilen des glykolisierten L-Selektins auf humanen Granulozyten interagiert und L-Selektin daher ein Ligand des E-Selektins darstellen kann. Die Autoren konnten ferner zeigen, dass diese Eigenschaft des L-Selektins überwiegend für granulozytäres L-Selektin und weniger für lymphozytäres L-Selektin zutrifft, da sie unterschiedlich glykolysiert sind. Obwohl Nalm6 Zellen als prä-B-Zellen lymphozytären Ursprungs sind, lassen die in dieser Arbeit gewonnen Daten vermuten, dass ein Teil der Adhäsion von Nalm6-IF4 Zellen durch die Interaktion L-Selektins mit E-Selektin auf dem Endothel zustande kam und L-Selektin auf Nalm6-IF4 Zellen ebenfalls funktionell als E-Selektin Ligand wirken kann. Darüber hinaus ist es möglich, dass Nalm6-IF4 Zellen spezifische E-Selektin Liganden exprimieren und somit ein Teil der Adhäsion L-Selektin unabhängig war. Die durchgeführten Untersuchungen genügen jedoch nicht, um die Effekte der E-Selektin Antikörper auf die Interaktion zwischen Nalm6-IF4 Zellen und Endothelzellen schlüssig zu beantworten.

Bei Wandschubspannungen $\tau < 1{,}5$ dyn/cm^2 ließ sich die Adhäsion der Nalm6-IF4 Zellen nicht vollständig durch den Antikörper DREG 200 blockieren, so dass in diesem Bereich eine L-Selektin unabhängige Interaktion stattgefunden haben muß. Yago et al. [82] als auch Berlin und Butcher [688] zeigten, dass native B-Lymphozyten $\alpha_4\beta_7$-Integrine exprimierten und über diese an das Endothel bei Wandschubspannungen um 1,5 dyn/cm² rollen. In niedrigen Wandschubspannungsbereichen ist überdies nur eine geringere Selektin abhängige Interaktion zu erwarten, da für diese der Schwellenwert von 0,5-1,0 dyn/cm^2 überschritten werden muß [83]. Eine unzureichende Antikörperkonzentration als Ursache für die nicht vollständige Blockade der L-Selektin abhängigen Adhäsion ist unwahrscheinlich, da bei Wandschubspannungen $\tau > 1{,}5$ dyn/cm^2 mit der gleichen Antikörperkonzentration eine vollständige Blockade erzielt wurde. Eine Selektin unabhängige Interaktion erklärt auch die Tatsache, dass L-Selektin negative Nalm6 Zellen zwar signifikant schlechter adhärierten als Nalm6 IF4 Zellen, aber bei niedrigen Wandschubspannungen eine Basisadhäsion zeigten und der Unterschied in der Adhäsion beider Zellarten weniger zutage trat. Es wurde bereits von verschieden Autoren gezeigt, dass auch Nalm6 Zellen $\alpha4\beta1$-Integrine exprimieren und über die Interaktion mit VCAM-1 an Endothelzellen adhärieren können [28,84]

Da sich Nalm6-IF4 Zellen und Nalm6 Zellen durch die Transfektion der für L-Selektin kodierenden cDNA unterscheiden, muss angenommen werden, dass der Unterschied in der

Adhäsion bei höheren Wandschubspannungen (> 1,5 dyn/cm²) zwischen diesen beiden Leukozytenarten die L-Selektin abhängige Adhäsion wiedergibt. Daher ist zu erwarten, dass durch einen L-Selektin blockierenden Antikörper die Adhäsion von Nalm6-IF4 Zellen auf die der Nalm6 Zellen reduziert. Die Inkubation der Nalm6-IF4 Zellen mit dem anti-L-Selektin-Antikörper DREG 200 führte zu einer fast vollständigen Hemmung der Adhäsion, damit zu einer Reduktion der Adhäsion, die über die der Nalm6 Zellen bei niedrigen Wandschubspannungen (< 1,5dyn/cm²) hinausging. Es kann spekuliert werden, dass die L-Selektin unabhängigen Adhäsionsvorgänge bei Nalm6 Zellen eine stärkere Rolle spielen als bei Nalm6-IF4 Zellen. Möglicherweise exprimieren Nalm6-IF4 Zellen durch die starke Expression von L-Selektin weniger Zelladhäsionsmoleküle, die Selektin unabhängiges Rollen vermitteln - wie z.B. $\alpha_4\beta_1$-Integrine - als Nalm6 Zellen, da die Zelloberfläche bereits von L-Selektin bedeckt ist.

Das Adhäsionsverhalten von HL60 Zellen an humanen umbilikalen venösen Endothelzellen (HUVEC), eine in der Literatur häufig verwendete humane Endothelzellart, wurde ebenfalls untersucht. HL60 Zellen sind Promyelozyten mit starker Expression für E-Selektin Liganden und eignen sich daher gut für die Untersuchung der E-Selektin vermittelten Interaktion zwischen Leukozyten und dem Endothel [85,86]. Die Adhäsionsversuche mit HL60 Zellen zeigten, dass bei Wandschubspannungen $\tau > 1{,}5$ dyn/cm^2 keine Adhäsion von HL60 Zellen an unstimulierten Endothelzellen stattfand. Die Adhäsion von HL60 Zellen an stimulierten HUVEC konnte mit dem E-Selektin blockierenden Antikörper BBA2, abhängig von der Wandschubspannung, bis zu 90% gehemmt werden.

Die Stimulation der Endothelzellen mit TNFα führte daher zu E-Selektin abhängigen Interaktionen zwischen HL60 Zellen und HUVEC. Die schlechtere Hemmbarkeit durch BBA2 bei Wandschubspannungen $\tau < 1{,}5$ dyn/cm^2 läßt sich in Analogie zu den Vorgängen bei Nalm6-IF4 Zellen durch Selektin unabhängige Interaktionen erklären.

4.4 Nachweis der Induzierbarkeit von Selektin Liganden durch TNFα

4.4.1 L-Selektin Liganden

Selektinvermittelte Interaktionen werden durch das Zusammenspiel folgender Strukturen herbeigeführt: Rezeptor – Ligand - Träger [87]. Die Selektine fungieren bei dieser Interaktion als Rezeptoren. Selektin Liganden sind Kohlenhydrate, die optimal durch einen Träger (Proteine oder Lipide) präsentiert werden müssen, um von Selektinen erkannt zu werden. In der vorliegenden Arbeit sollten vaskuläre L-Selektin Liganden charakterisiert und ihre biochemischen Eigenschaften mit den bekannten Liganden des lymphatischen Gewebes verglichen werden.

Zu den Selektin Liganden gehören sialylierte und glykosylierte Laktosamine wie Sialyl Lewis^{x} oder das Isomer Sialyl Lewis^{a} [88]. Auch die nicht sialylierte Form des Lewis^{x} wird von Selektinen erkannt [89]. Die Sulfatierung dieser oder ähnlicher Kohlenhydratstrukturen bietet zusätzliche Bindungsstellen für L-Selektin und P-Selektin, jedoch offensichtlich nicht für E-Selektin [90,91].

Verschiedene murine Sialomucine (sialinsäurereiche Glykoproteine) aus dem lymphatischen Gewebe wurden als L-Selektin Liganden beschrieben : CD34, MAdCAM-1, GlyCAM-1, Sgp200 [92]. CD34 wird von den meisten Endothelzellen und auch von hämatopoeitischen Stammzellen exprimiert. Eine spezifische sulfatierte Glykoform dieses Moleküls allein wird vom L-Selektin erkannt und wurde auf den Hochendothelialen Venolen (spezialisierte Endothelzellen des lymphatischen Gewebes) gefunden, während die auf vaskulärem Endothel exprimierten Varianten nicht mit diesem Selektin interagieren. Da die Leukozytenextravasation in das lymphatische Gewebe in CD34-defizienten Mäusen nicht vermindert wird, ist die physiologische Rolle des CD34 noch unklar [93]. MAdCAM-1 vermittelt Leukozytenrollen im gastrointestinalen lymphatischen Gewebe durch die Interaktion mit L-Selektin und auch mit dem α4β7-Integrin und spielt so eine Schlüsselrolle im Homing-Prozess der Lymphozyten in dieses Gewebe [94]. GlyCAM-1 wird vorwiegend vom HEV synthetisiert und ist ein sezerniertes Glykoprotein, das auf der Zelloberfläche gebunden wird [95]. Als lösliches Molekül kann es

durch die Interaktion mit L-Selektin auf Lymphozyten deren Integrine aktivieren und auf diese Weise die feste Adäsion verstärken. Da es durch die Bindung des löslichen L-Selektins die adhäsive Funktion des Selektins hemmen kann, muss die genaue physiologische Funktion des Moleküls noch geklärt werden [96,97,98]. Sgp200, ein viertes sulfatiertes Glykoprotein aus den HEV, wurde ebenfalls als ein L-Selektin Ligand beschrieben [99,100].

Podocalyxcin-like protein (PCLP), ebenfalls Sialoprotein, wurde ursprünglich wegen der starken negativen Ladung als ein antiadhäsives Molekül angesehen, das im Glomerulum der Niere an der Bildung des Filtrationsschlitzes beteiligt ist. [101]. Jedoch gibt es auch Berichte, dass PCLP , das nicht nur in seiner Struktur dem oben beschriebenen Liganden CD34 ähnlich ist, sondern wie CD34 auch auf dem vaskulären Endothel verschiedener Gewebe exprimiert wird, als L-Selektin Ligand auf HEV fungiert [102].

Die oben beschriebenen L-Selektin Liganden auf Hochendothelialen Venolen (HEV) des lymphatischen Gewebes sind in der Literatur gut charakterisiert. Sie sind Glykoproteine, deren Kohlenhydratanteil O-glykosidisch an das Proteingerüst gebunden ist. Im Gegensatz dazu ist nur wenig über L-Selektin Liganden auf vaskulärem Endothel bekannt. Einige Studien berichteten über L-Selektin abhängige Leukozytenadhäsion an zytokinaktivierten nichtlymphatischen vaskulären Endothelzellen [10,11,103]. Auf bovinen aortalen Endothelzellen wurden Heparansulfatproteoglykane als Liganden identifiziert, die für ihre Interaktion mit L-Selektin keine Sialinsäurereste benötigen. Heparinähnliche Liganden für L-Selektin wurden auf HUVEC und auf pulmonalarteriellen Endothelzellen des Kalbes gefunden [104]. Diese Liganden scheinen funktionell und strukturell sich von denen im lymphatischen Gewebe zu unterscheiden. Während Liganden auf HEV konstitutiv exprimiert werden, wird die Expression der vaskulären Liganden nach Zytokinaktivierung hochreguliert. Liganden auf HEV sind O-Glykane, die durch den monoklonalen Antikörper MECA-79 erkannt werden, hingegen scheinen O-glykosidisch gebundene Zucker und das MECA-79 Epitop für vaskuläre Liganden in den veröffentlichten Studien keine Rolle zu spielen [12,105]. Durch die Untersuchung von L-Selektin Liganden auf HCMEC in der vorliegenden Studie sollten weitere Erkenntnisse über vaskuläre L-Selektin Liganden gewonnen werden.

Die o.g. L-Selektin Liganden werden von Endothelzellen exprimiert und vermitteln Leukozyten-Endothel-Interaktionen. Jedoch wurde auch über L-Selektin Liganden berichtet, die von Leukozyten exprimiert werden und Leukozyten-Leukozyten-Interaktionen vermitteln [106]. Ein gut charakterisierter Ligand für P-Selektin ist P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (PSGL-1), der v.a. von hämatopoeitischen Zellen exprimiert wird [107] und sich unter bestimmten

pathologischen Bedingungen auch auf Endothelzellen findet [108]. Zusätzlich zur Fukosylierung und Sialylierung der Kohlenhydratbestandteile ist die Sulfatierung der Tyrosinreste des PSGL-1 notwendig, damit dieser als P-Selektin Ligand wirken kann [90]. Mit P-Selektin interagierend vermittelt PSGL-1 „tethering“ und „rolling“ von Leukozyten bei physiologischen Wandschubspannungen. Mit einem modifizierten Glykosylierungsmuster wird PSGL-1 auch von E-Selektin erkannt [108,109]. Verschiedene in vitro Studien zeigten, dass L-Selektin von frei fließenden Leukozyten mit PSGL-1 und anderen Liganden auf bereits fest adhärenten Leukozyten interagiert und somit Leukozyten-Leukozyten-Interaktionen vermittelt [110,111,112,113]. Diese als „secondary capture” bezeichnete Leukozyten-Leukozyten-Interaktion beschleunigte die Akkumulation von Leukozyten in Versuchsansätzen mit einer Flusskammer. Jedoch wird die physiologische Bedeutung dieses Phänomens von einigen Autoren in Frage gestellt. Kunkel et al. [114] berichten, dass diese Interaktionen zwar auch in vivo vorkommen, ihr Beitrag zur Rekrutierung von Leukozyten aber minimal ist. Mitchell et al.[58] stellten fest, dass dieses Phönomen in einem Versuchsansatz mit Vollblut gar nicht auftritt, und erklären dies mit der geringeren Wahrscheinlichkeit für das Aufeinandertreffen von Leukozyten im Vollblut im Vergleich zu einer reinen Leukozytensuspension aufgrund des viel höheren Anteils der Erythrozyten gegenüber Leukozyten im Vollblut.

4.4.2 Messung der Leukozytengeschwindigkeit zur Untersuchung selektinvermittelter Interaktionen

Die Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen läuft, wie unter *4.2.1 Physiologie der Leukozyten-Endothel-Interaktionen beschrieben*, in einer Kaskade von mehreren Schritten ab. Am Anfang der Kaskade steht die selektinvermittelte Verminderung der Leukozytengeschwindigkeit („tethering“ und „rolling“). Durch Einwirkung von Chemokinen werden die entlang des Endothels rollenden Leukozyten aktiviert. Daraufhin kommt es zur festen Adhäsion der Leukozyten an das Endothel. Als letzter Schritt folgt die Transmigration der Leukozyten durch das Endothel. Jeder dieser einzelnen Schritte ist Voraussetzung für den folgenden. Daher kann mit dem Nachweis von fester Adhäsion, die dem dritten Schritt entspricht, auch der Nachweis der ihr vorangegangenen Schritte erbracht werden. In Voruntersuchungen [12,13] wurde dieser Zusammenhang genutzt, um die Expression von L-Selektin Liganden auf TNFα-stimulierten Endothelzellen nachzuweisen. Dabei wurde gezeigt, dass Leukozyten L-Selektin abhängig stärker an TNFα-stimulierten humanen kardialen mikrovaskulären Endothelzellen (HCMEC) adhärierten als an unstimulierten HCMEC.

In der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, ob HCMEC L-Selektin Liganden konstitutiv auf ihrer Oberfläche exprimieren oder nur nach Stimulation mit TNFα. Da bei der Messung der festen Adhäsion mehrere Schritte der Adhäsionskaskade (1.Rollen, 2. Aktivierung der Leukozyten und 3. feste Adhäsion) erfasst werden, kann nicht differenziert werden, ob L-Selektin Liganden konstitutiv exprimiert werden und die stärkere Adhäsion an TNFα-stimulierten HCMEC allein durch vermehrte Sekretion von Chemokinen und vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen der Ig-Supergen-Familie (ICAM-1, VCAM-1) bedingt ist oder ob die stärkere Adhäsion auch durch die vermehrte Expression von L-Selektin Liganden mitbedingt ist. Da bekannt war, dass selektinvermittelte Interaktionen zu einer Verminderung der Leukozytengeschwindigkeit führen [14], wurden in der vorliegenden Arbeit Flussgeschwindigkeiten von Leukozyten gemessen, um selektinvermittelte Interaktionen direkt zu untersuchen.

4.4.3 Die Wirkung Selektin vermittelter Interaktionen auf die Flussgeschwindigkeit von Leukozyten

4.4.3.1 Erkenntnisse aus publizierten Studien

Die Interaktion zwischen Selektinen und ihren Liganden führt nach dem z.Zt. anerkannten Modell zum Abfangen der Leukozyten aus dem Blutstrom und dem darauf folgenden Rollen auf dem Endothel. Dies bedeutet eine Verminderung der Flussgeschwindigkeit der Leukozyten auf 1/100 bis teilweise weniger als 1/1000 ihrer ursprünglichen Geschwindigkeit im Blutstrom. Die Rollgeschwindigkeit hängt dabei v.a. von drei Faktoren ab, vom beteiligten Selektin, von der Dichte der Selektin- bzw. Ligandmoleküle und der Wandschubspannung [41]. In mehreren Studien wurde gezeigt, dass mit steigender Wandschubspannung, d.h. der tangentialen Kraft, die die Leukozyten in Fließbewegung hält, die Rollgeschwindigkeit zunimmt [41,83,115]. Während es einheitliche Daten über die schnellere Geschwindigkeit des L-Selektin vermittelten Rollens gegenüber
P-Selektin und E-Selektin gibt [41], wird unterschiedlich über das Verhältnis zwischen E-Selektin und P-Selektin berichtet. So berichten K. Patel et al. [116] über ein 2-fach schnelleres Rollen über E-Selektin gegnüber P-Selektin, während Finger et al. [41] vergleichbare Rollgeschwindigkeiten für E- und P-Selektin angeben. Lawrence und Springer [115] geben jedoch langsamere Geschwindigkeiten für E-Selektin gegenüber P-Selektin an. Bei Auswertung der verschiedenen Studien ergeben sich bei einer Wandschubspannung von 2 dyn/cm^2 Rollgeschwindigkeiten von 1-6 µm/s für E-Selektin, 1-9 µm/s für P-Selektin und 100-120 µm/s für L-Selektin.

4.4.3.2 Flussgeschwindigkeiten von Leukozyten auf HCMEC

Die Flussgeschwindigkeitsmessung von Nalm6 und Nalm6-IF4 Zellen ergab signifikant langsamere Geschwindigkeiten für L-Selektin positive Nalm6-IF4 Zellen auf stimulierten HCMEC gegenüber unstimulierten HCMEC. Nalm6-IF4 Zellen auf stimulierten HCMEC besaßen auch signifikant langsamere Geschwindigkeiten als L-Selektin negative Nalm6 Zellen auf stimulierten HCMEC. Aus diesen Ergebnissen lassen sich folgende Schlußfolgerungen ziehen:

1. Die Geschwindigkeitsreduktion war L-Selektin abhängig.
2. Die Interaktion L-Selektins, die zur Geschwindigkeitsverminderung führte, fand nur an zuvor stimulierten Endothelzellen statt.

Dies wurde durch die Versuche mit dem L-Selektin blockierenden Antikörper DREG 200 bestätigt. Die Flussgeschwindigkeiten von DREG-200-behandelten Nalm6-IF4 Zellen auf stimulierten HCMEC waren mit denen von unbehandelten Nalm6-IF4 Zellen auf unstimulierten HCMEC vergleichbar. Da L-Selektin dauerhaft auf den verwendeten Leukozyten exprimiert wird, weist das Ergebnis, dass L-Selektin abhängige Interaktionen nur an stimulierten Endothelzellen nachzuweisen ist, darauf hin, dass der mit L-Selektin interagierende Ligand nur von stimulierten Endothelzellen exprimiert wird.

Die Adhäsionversuche zeigten bereits, dass ein Teil der Adhäsion von L-Selektin positiven Nalm6-IF4 Zellen durch E-Selektin vermittelt wurde. Daher wurde auch der Einfluss E-Selektins auf die Flussgeschwindigkeitsminderung der Nalm6-IF4 Zellen auf stimulierten HCMEC untersucht. Die Inkubation der zuvor mit TNFα stimulierten Endothelzellen mit dem E-Selektin blockierenden Antikörper, BBA2, führte zu einer Beschleunigung der Nalm6-IF4 Zellen gegenüber der Nichtbehandlung mit BBA2. Jedoch hatten Nalm6-IF4 Zellen auch nach Inkubation der Endothelzellen mit BBA2 ein signifikant schnelleres Geschwindigkeitsprofil als Nalm6-IF4 Zellen auf unstimulierten Endothelzellen. Ein Teil der Adhäsion der L-Selektin positiven Nalm6-IF4 Zellen war daher E-Selektin vermittelt. Wie bereits unter *4.3.2 Selektin abhängige feste Adhäsion* diskutiert, kommen sowohl L-Selektin als auch andere Liganden auf Nalm6-IF4 Zellen als korrespondierende Partner für E-Selektin in Frage.

Die Messung von Leukozytengeschwindigkeiten auf HCMEC zeigten daher, dass L-Selektin Liganden auf HCMEC nach Stimulation durch Entzündungsmediatoren vermehrt exprimiert wurden und L-Selektin auch auf prä-B-Lymphozyten möglicherweise ein Ligand für E-Selektin darstellt.

L-Selektin Liganden werden auf HEV des lymphatischen Gewebes dauerhaft exprimiert, und ermöglichen so ein kontinuierliches Lymphozytenhoming. Für vaskuläre Endothelzellen sind Regulationsmechanismen der Adhäsion wie die vermehrte Expression von E-Selektin und Zelladhäsionsmolekülen der Immunglobulin-Supergen-Familie nach Stimulation durch Entzündungsmediatoren bekannt, um eine bedarfsgerechte Leukozytendiapedese zu ermöglichen. Da L-Selektin auf Leukozyten dauerhaft exprimiert wird, stellt die Regulation der Expression seines Liganden auf vaskulären Endothelzellen eine weitere Möglichkeit dar, Leukozyten-Endothel-Interaktionen zu steuern.

Nur in wenigen Studien wurde zusätzlich zu Rollgeschwindigkeiten auch die Geschwindigkeit der frei fließenden Leukozyten gemessen. Es wurde berichtet, dass rollende Zellen von frei fließenden Zellen durch die viel größere Geschwindigkeit der letzteren unterschieden werden

konnten [59,117]. Die in der Literatur angegebenen Werte für die gemessene Flussgeschwindigkeit von Leukozyten unter den in postkapillären Venolen herrschenden Bedingungen betrugen 1-2,5 mm/s. Nur in einer Studie wurde auch die Flussgeschwindigkeit von scheinbar nicht mit dem Endothel interagierenden Leukozyten auf stimulierten Endothelzellen mit der auf unstimulierten Endothelzellen verglichen [118]. Dabei zeigte sich eine signifikante Verminderung der Flussgeschwindigkeit nach Zytokinaktivierung, die Selektin unabhängig war. Da jedoch Leukozyten in der Mittelachse des Stromes untersucht wurden, wo eine Leukozyten-Endothel-Interaktion unwahrscheinlich ist, können mit dieser Methode keine Aussagen über die Wirkung selektinvermittelter Interaktionen auf die Flussgeschwindigkeit gezogen werden. Ein Vergleich dieser Daten mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie ist nicht möglich, da in der vorliegenden Arbeit Flussgeschwindigkeiten von Leukozyten direkt oberhalb des Endothelzellmonolayers gemessen wurden. Es konnte dabei gezeigt werden, dass Selektin-Ligand-Interaktionen zu einer Verminderung der Flussgeschwindigkeit führen, deren Werte jedoch deutlich über denen von Rollgeschwindigkeiten lagen.

Wie bereits unter 2.3.4 Berechnung der Wandschubspannung („shear stress“) erläutert, wurden für Nalm6 Leukozyten ohne eine spezifische Interaktion mit dem Endothel Flussgeschwindigkeiten von 1480 µm/s erwartet. In den Versuchen mit Nalm6-IF4 Zellen auf unstimuliertem Endothel, in denen spezifische Selektin-Ligand-Interaktionen nicht zu erwarten sind, wurden mediane Flussgeschwindigkeiten von 2800 µm/s gemessen, was gut mit den berechneten Daten übereinstimmt. Eine mögliche Erklärung für die etwas höheren gemessenen Geschwindigkeiten ist die Tatsache, dass die Geschwindigkeitsberechnung sich direkt auf die an der Gefäßwand entlang fließenden Leukozyten bezieht. Damit nur diese Leukozyten in die Geschwindigkeitsanalyse eingingen, wurde das Mikroskop so eingestellt, dass das Endothel fokussiert wurde. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß aufgrund einer Tiefenunschärfe des Mikroskops letztlich auch Leukozyten erfasst wurden, die nicht unmittelbar am Endothel entlang flossen, so dass die gemessenen mittleren Geschwindigkeiten etwas höher waren als berechnet waren.

In 4.2.1 Physiologie der Leukozyten-Endothel-Interaktionen wurde beschrieben, dass Selektin-Ligand-Interaktionen zu einer Reduktion der Leukozytengeschwindigkeit auf 1/100 des Ausgangswertes führen. Mikroskopisch sind die auf diese Weise verlangsamten Leukozyten eindeutig durch ihre rollende Bewegung von den frei fließenden Leukozyten zu unterscheiden. Diese Geschwindigkeitsreduktion wird auf spezielle Charakteristika dieser Interaktionen zurückgeführt. Selektine und ihren Liganden sind in der Lage, in kurzer Zeit Bindungen einzugehen und sich zu lösen, was sich in hohen Bindugskonstanten widerspiegelt, d.h. hohe

„on rates“ (Assoziationskonstante) und „off rates“ (Dissoziationskonstante) [119]. Das Ausmaß der Verlangsamung hängt daher davon ab, wie lange eine Bindung aufrecht erhalten wird. Diese initiale Geschwindigkeitsreduktion ist als Rollen eindeutig vom freien Fluß zu unterscheiden. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Selektin vermittelte Flußgeschwindigkeitsreduktion stellt ein vom Rollen zu unterscheidendes Phänomen dar. Da das Rollen durch das Wechselspiel zwischen der Wandschubspannung, die Leukozyten in Fluß hält, und der Selektin vermittelten Adhäsion, die Leukozyten an das Endothel binden, zustande kommt, ist als theoretische Erklärung möglich, daß in dem gewählten Versuchsmodell im Vergleich zu den publizierten Studien das Gleichgwicht zugunsten des freien Flusses verschoben ist. Dies kann zum Beispiel durch eine höhere Wandschubspannung oder durch höhere „off rates“ bedingt sein. Da durch den Aufbau der Flußkammer und den vorgegebenen Fluß des Perfusionsmediums definierte Wandschubspannungen erzielt werden konnten, die auch denen in der publizierten Literatur entsprechen, ist die erste Erklärung unwahrscheinlich. Auch wurde von anderen Autoren gezeigt, dass mit der Erhöhung der Wandschubspannung die Rollgeschwindigkeit steigt, aber das typische Rollen noch vorhanden war. Höhere „off rates“ und eine geringere Dichte der L-Selektin Liganden im Vergleich zu den bisher publizierten Modellen könnten eine schwächer ausgeprägte Geschwindigkeitsreduktion erklären. Jedoch sollten auch in diesem Falle die Leukozyten durch eine holperige („jerky“) Bewegung sich von den frei fließenden Leukozyten zu unterscheiden sein [83,120], was in den o.g. Versuchen nicht beobachtet werden konnte. Aufgrund dieser um mindestens eine Dimension unterschiedlichen Werte für Rollgeschwindigkeiten im Vergleich zu Geschwindigkeiten von frei fließenden Leukozyten wurde in den Versuchen mit L-Selektin positiven Nalm6-IF4 Leukozyten auf stimuliertem Endothel ein zweigipfliges Geschwindigkeitsprofil erwartet. Dabei sollte ein Gipfel durch frei fließende Leukozyten in einem Geschwindigkeitsbereich um 1500 µm/s entstehen und ein weiterer in einem langsameren Bereich um 100 µm/s durch rollende Leukozyten. Wie z.B. in der Abbildung 5 zu sehen, führt die Stimulation der Endothelzellen zu einer Linksverschiebung der Kurve, die eine Verlangsamung anzeigt. Eine Mehrgipfligkeit ist jedoch nicht abzugrenzen.

Publizierte Untersuchungen anderer Autoren zeigten bereits, daß der erste Schritt der Leukozytenadhäsion ebenfalls in eine Kaskade unterteilt werden kann [121]. Durch unterschiedliche Bindungseigenschaften der einzelnen Selektine wurden wie o.g. unterschiedliche Rollgeschwindigkeiten je nach beteligtem Selektin gemessen. Es wurde daher vermutet, daß jedes einzelne Selektin somit auch eine unterschiedliche Funktion wahrnimmt. L-Selektin vermittelt in dieser Subkaskade den ersten Schritt. Durch die Expression an der Spitze der Mikrovilli ist L-Selektin in der Lage, den ersten Kontakt zu initieren und somit Leukozyten

aus dem freien Strom abzufangen und die Geschwindigkeit zunächst auf 1/10 zu reduzieren, bevor P- und E-Selektin die Geschwindigkeit weiterreduzieren [120] [77]. Jedoch ist auch diese initiale Geschwindigkeitsreduktion mikroskopisch eindeutig vom freien Fluß zu unterscheiden, da die Leukozyten in den Videoaufnahmen als Kreise erscheinen im Vergleich zu frei fließenden Zellen, die als schmale Streifen sich darstellen.

Ein in der Literatur benutzter Wert, um Selektin-Ligand-Interaktionen zu quantifizieren, ist die sog. „rolling flux fraction". Dieser bezeichnet den Anteil der rollenden Leukozyten an der Gesamtzahl aller durch einen Gefäßabschnitt in einer Zeiteinheit fließenden Leukozyten. Er wird mit 25 % angegeben, wenn das Selektin und der korrespondierende Ligand exprimiert sind [117]. In den Versuchen mit Nalm6-IF4 Zellen zeigten sich jedoch nur vereinzelt rollende Leukozyten, deren Anzahl für eine statistische Verwertung zu gering war. Es sind verschiedene Erklärungen für die geringe Anzahl rollender Leukozyten möglich. Die Videoaufnahmen der Versuche zeigten, dass Leukozyten vom Strom abgefangen wurden und nach kurzem „tethering" bereits an der Stelle zur festen Adhäsion kamen, wo auch der auf den Videoaufnahmen sichtbare erste Kontakt mit dem Endothel stattfand, ohne eine längere Rollbewegung entlang des Endothels. Da das Rollen auf den Videoaufnahmen nicht dokumentiert werden konnte, kann postuliert werden, dass nur eine kurze Aktivierungsphase nötig war, so dass unmittelbar nach dem Abfangen und dem „tethering" die nötige Avidität für eine feste Adhäsion vorhanden war.

Nur in wenigen Publikation wird dieses Phänomen der festen Adhäsion ohne sichtbares Rollen bzw. Rollen mit sehr kurzer Dauer beschrieben. Rainger et al. berichteten, dass der Anteil der Zellen, die ohne vorheriges Rollen oder nur mit einer Rolldauer < 1 s fest adhärent wurden, 13 – 40% der gesamten fest adhärenten Zellen betrug und dass v.a. Chemokine wie IL-8 und PAF für die direkte Konversion vom „tethering" zur festen Adhäsion ohne zwischengeschaltetes Rollen verantwortlich sind [122]. Daher besteht die Möglichkeit, dass diese Konversion bei Nalm6 Zellen in einem viel größerem Maß stattfindet. Eine weitere Erklärung könnte in einer biphasischen Leukozyten-Endothel-Interaktion liegen. Während einer ersten Interaktion kommt es nach dem Abfangen der Leukozyten zur Rolladhäsion, während derer die Leukozyten aktiviert werden. Da die Selektin-Ligand-Interaktion potentiell reversibel ist, könnten sich die aktivierten Leukozyten von dieser Bindung lösen. Bei einer erneuten Adhäsion könnten die aktivierten Leukozyten unmittelbar nach dem Abfangen aus dem Strom unter Umgehung des Zwischenschritts des Rollens fest adhärieren. Diese Erklärung ist jedoch weniger wahrscheinlich, da auch bei einer geringeren Vergrößerung durch das Mikroskop, bei der ein größerer Abschnitt der Flusskammer betrachtet werden konnte, der erste Teil der vermuteten biphasischen Adhäsion, das Rollen, nicht gesehen wurde.

Zusammenfassend ist daher festzustellen, dass die in der vorliegenden Studie gezeigte Selektin vermittelte Verlangsamung der Leukozyten nicht durch das bisher bekannte Modell der Selektin-Ligand-Interaktionen erklärt werden kann. Möglicherweise ist das bisherige Modell der Leukozytenadhäsion durch einen weiteren Schritt zu ergänzen, der selbst dem Schritt des „capture“ vorangeht. Die Flußgeschwindigkeit der Leukozyten wird reduziert, bevor sie sichtbar vom Blutstrom abgefangen werden.

4.4.3.3 Struturelle Eigenschaften von L-Selektin Liganden auf HCMEC

Die strukturellen Eigenschaften der L-Selektin Liganden auf HCMEC wurden auf ihren Einfluss auf die Flussgeschwindigkeit untersucht. Die bekannten L-Selektin Liganden der hochendothelialen Venolen des lymphatischen Gewebes enthalten Kohlenhydratreste, die O-glykosidisch an den Proteinkern gebunden sind. In früheren Untersuchungen wurde gezeigt [12], dass die Hemmung der Ausbildung von O-glykosidischen Bindungen keinen Einfluss auf die Adhäsionsfähigkeit des L-Selektin Liganden auf HCMEC hat. Jedoch waren N-glykosidisch gebundene Zucker notwendig für die Interaktion der Nalm6-IF4 Zellen mit HCMEC. Da lediglich die feste Adhäsion untersucht worden war, konnte nicht differenziert werden, ob N-glykosidisch gebundene Zucker für die Phase des selektinvermittelten Rollens oder für die Phase der festen Adhäsion oder für beide benötigt werden (siehe auch *4.4.1 Messung der Leukozytengeschwindigkeit zur Untersuchung selektinvermittelter Interaktionen*). In der vorliegenden Arbeit sollte durch die Messung der Flussgeschwindigkeit, u.a. die Frage beantwortet werden, ob L-Selektin Liganden auf HCMEC N-glykosidisch gebundene Zucker für ihre Interaktion mit L-Selektin benötigen.

Tunicamycin hemmt die Ausbildung von N-glykosidischen Bindungen, in dem es die Übertragung von N-Acetylglukosamin auf Dolicholphosphat inhibiert [123]. Die Ergebnisse der Tunicamycinversuche zeigten, dass die Flussgeschwindigkeit von Leukozyten auf TNFα-aktivierten Endothelzellen signifikant ansteigt, wenn die Endothelzellen zuvor mit Tunicamycin behandelt wurden. N-glykosidisch gebundene Zuckerreste sind daher kritische Bestandteile des endothelialen Liganden für die Interaktion mit L-Selektin. Die Flussgeschwindigkeit nach Behandlung der TNFα-aktivierten Endothelzellen mit Tunicamycin erreichte nicht die Werte von Nalm6-IF4 Zellen auf unstimulierten Endothelzellen, so dass die L-Selektin abhängige Interaktion nicht vollständig gehemmt wurde. Eine mögliche Erklärung ist, dass ein Teil der L-Selektin abhängigen Interaktion mit E-Selektin erfolgte und diese von der Behandlung mit Tunicamycin unbeeinflusst blieb.

4.4.3.4 E-Selektin vermittelte Leukozyten-Endothel-Interaktionen

Mit den gleichen Methoden wie für L-Selektin sollte der Einfluß der E-Selektin abhängigen Interaktion auf die Flussgeschwindigkeit und das Rollen der Leukozyten untersucht werden, um zu überprüfen, ob die aus der Untersuchung L-Selektin abhängiger Interaktionen gewonnenen Erkenntnisse auch für andere Selektine zutreffen. E-Selektin wird nur auf aktivierten Endothelzellen exprimiert [119,124,125]. Seine Liganden befinden sich auf Leukozyten. Es sind drei Liganden bekannt, die von E-Selektin erkannt werden : E-Selektin Ligand-1 (ESL-1) und die bereits oben beschriebenen Moleküle L-Selektin und PSGL-1. ESL-1 ist ein Glykoprotein mit N-glykosidisch gebundenen aber nicht O-glykosidisch gebundenen Kohlenhydratseitenketten, das v.a. durch Leukozyten der myeloischen Reihe exprimiert wird [126]. Die mit E-Selektin interagierenden Anteile sind sialylierte und fukosilierte Laktosamine [119,127].

Die Flussgeschwindigkeitsmessungen von HL60 Zellen zeigten, dass E-Selektin vermittelte Interaktionen, ähnlich wie L-Selektin vermittelte Interaktionen bei den Versuchen mit Nalm6-IF4 Zellen, zu einer Geschwindigkeitsabnahme der Leukozyten führen. Weiterhin führte die Stimulation der Endothelzellen mit TNFα zur Rolladhäsion von HL60 Zellen, während auf ruhenden Endothelzellen kein Rollen zu beobachten war. Die E-Selektin Abhängigkeit des Rollens konnte durch den anti-E-Selektin-Antikörper, BBA2, gezeigt werden. Nach Aktivierung exprimieren Endothelzellen P-Selektin, dessen Ligand (PSGL-1) von HL60 Zellen exprimiert wird [128]. Da BBA2 das Rollen nicht vollständig inhibierte, könnte P-Selektin ebenfalls zum Rollen beigetragen haben.

Ein Vergleich der Zahl der rollenden Zellen mit der sog. „rolling flux fraction“, die in der publizierten Literatur zur Quantifizierung des Rollens benutzt wird, ist wie bei L-Selektin schwierig, da die Zahl der rollenden Zellen in dem hier verwendeten Versuchsaufbau gering war im Vergleich zu der Zahl rollender Zellen in in vivo Versuchen in intakten Gefäßen. Eine Interaktion ist hierbei an allen Seiten des Gefäßes möglich, während in der Flusskammer nur eine Seite von Endothel bedeckt war. In vivo Studien erfolgte ein kontinuierlicher Fluss der Leukozytensuspension, während in der vorliegenden Studie ein Bolus einer Leukozytensuspension in den fließenden Strom gegeben wurde.

Die Versuche mit HL60 Zellen zeigten, dass das Phänomen des Rollens mit den in dieser Arbeit verwendeten Methoden grundsätzlich untersucht und quantifiziert werden kann. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass E-Selektin vermittelte Interaktionen ähnlich wie L-Selektin vermittelte Interaktionen zu einer Verminderung der Leukozytengeschwindigkeit führen, die

vom bisher bekannten Selektin vermittelten Rollen zu unterscheiden ist.

4.5 Wertung der Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit konnte verschiedene Zusammenhänge der Selektin vermittelten Leukozyten-Endothel-Interaktion aufzeigen. L-Selektin Liganden auf humanen kardialen mikrovaskulären Endothelzellen werden erst nach Aktivierung der Endothelzellen mit TNFα exprimiert. Für ihre Interaktion mit L-Selektin waren N-glykosidisch gebundene Zuckerreste notwendig. Weiterhin wurde gezeigt, daß L-Selektin/Ligand-Interaktionen zu einer Flussgeschwindigkeitsminderung von Leukozyten führen. Diese Zusammenhänge konnten auch für E-Selektin nachgewiesen werden. Die Interaktion E-Selektins mit seinen Liganden auf Leukozyten führte zusätzlich zur Flussgeschwindigkeitsminderung auch zu dem für Selektin/Ligand-Interaktionen typischen Rollen von Leukozyten auf Endothelzellen, das bei L-Selektin abhängigen Interaktionen nicht beobachtet wurde.

Aus diesen Erkenntnissen lassen sich therapeutische Konsequenzen für pathologische Phänomene ableiten, bei denen Selektin abhängige Adhäsion eine Rolle spielt. Beispiele dafür sind Reperfusionsschaden [129,130] oder Transplantatabstoßungen [131]. Der anti-L-Selektin-Antikörper, DREG 200, konnte in einem Tiermodell den myokardialen Reperfusionsschaden günstig beeinflussen [3]. Der Nachteil der Verwendung von anti-Selektin-Antikörpern liegt in der systemischen Blockade L-Selektins. Da es Hinweise für strukturelle Unterschiede zwischen vaskulären Liganden und Liganden des lymphatischen Gewebes gibt (siehe *4.4.2 L-Selektin Liganden*), könnte die Gabe von Antikörpern gegen Liganden die Wirkung auf das gewünschte Organ bzw. Organsystem begrenzen. Daher ergeben sich durch die in dieser Studie erfolgte weitere Charakterisierung der Liganden auf HCMEC Perspektiven für die Entwicklung von spezifischeren Therapiemodellen.

In früheren Studien wurde gezeigt, dass Zelladhäsionsmoleküle wie ICAM-1, VCAM-1 oder E-Selektin im Rahmen von Atherosklerose, Vaskulitiden oder chronisch entzündlichen Darmerkrankungen vermehrt exprimiert werden [132,133,134]. In ähnlicher Weise könnte durch weiterführende Studien die Eignung von vaskulären L-Selektin Liganden als ein Marker für Entzündungen überprüft werden.

Wie bereits unter *4.4.2 L-Selektin Liganden* beschrieben, wurden in früheren Untersuchungen Hinweise für Heparansulfate als L-Selektin Liganden auf HCMEC und anderen vaskulären Endothelzellen gefunden [104] [11,12]. Da Heparin biochemisch eng mit Heparansulfat

verwandt ist [135], untersuchten Koenig et al. [136], welchen Einfluß das in der klinischen Medizin als Antikoagulans verwendete Heparin [137,138] auf Selektin vermittelte Interaktionen hat. Sie konnten zeigen, dass unfraktioniertes Heparin an L- und P-Selektin binden konnte jedoch nicht an E-Selektin. Das pharmazeutische unfraktionierte Heparin konnte die Bindung von L- und P-Selektin an Sialyl Lewis^{x} bereits in einer um ein Vielfaches geringeren Konzentration hemmen, als es für eine Antikoagulation erforderlich ist. Weiterhin zeigte sich, dass unfraktioniertes Heparin ein wesentlich stärkerer Inhibitor dieser Interaktion war als fraktioniertes Heparin. Daher wurde von den Autoren die Frage aufgeworfen, ob die Wirkung des in der Therapie des akuten Myokardinfarktes eingesetzten Heparins nicht primär im Schutz vor Selektin vermittelten Reperfusionsschadens liegt als in der Antikoagulation. Diese Ergebnisse zeigen damit weitere Möglichkeiten, die durch die Charakterisierung von L-Selektin Liganden gewonnenen Erkenntnisse in der klinischen Medizin zu verwenden.

5 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Rollgeschwindigkeiten von Leukozyten auf humanen kardialen mikrovaskulären Endothelzellen (HCMEC) und humanen umbilikalen venösen Endothelzellen (HUVEC).

Die Endothelzellen wurden aus explantierten humanen Herzen sowie aus menschlichen Nabelschnüren unmittelbar postpartal gewonnen.

Unter definierten Bedingungen wurden die in einer Flusskammer gemessenen Geschwindigkeiten von L-Selektin exprimierenden Nalm6-IF4 Zellen auf unstimulierten Endothelzellen mit denen auf stimulierten Endothelzellen verglichen. Die langsamere Geschwindigkeit der Leukozyten auf stimulierten Endothelzellen weist darauf hin, dass L-Selektin Liganden auf humanen kardialen mikrovaskulären Endothelzellen erst nach Stimulation exprimiert werden. Die beobachtete Geschwindigkeitsreduktion der Leukozyten ist jedoch von dem in der Literatur beschriebenen Selektin vermittelten Rollen zu unterscheiden. In den Versuchen mit Tunicamycin wurde gezeigt, dass N-glykosidisch gebundene Zucker kritische Bestandteile der Liganden für ihre Interaktion mit L-Selektin sind.

Unter den gleichen Versuchsbedingungen wurde auch der Einfluss E-Selektin vermittelter Interaktionen auf die Geschwindigkeit der HL60 Zellen untersucht. Neben dem typischen Rollen wurde hier ebenfalls eine Selektin abhängige Geschwindigkeitsreduktion gesehen.

6 Abkürzungsverzeichnis

Liste häufig verwendeter Abkürzungen.

EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
ESL-1	E-Selectin Ligand-1
FKS	foetales Kälberserum
HCMEC	humane kardiale mikrovaskuläre Endothelzellen
HEV	Hoch-Endotheliale Venolen
HL 60	Granulozyten mit hoher Expression für ESL-1
HUVEC	humane umbilikal-venöse Endothelzellen
NALM6	L-Selektin negative prä-B-Lymphozyten
Nalm6-IF4	mit der cDNA für L-Selektin transfizierte prä-B-Lymphozyten
PBS	Phosphat gepufferte Lösung
PSGL-1	P-Selectin Glykoproteinligand-1
TNFα	Tumor Nekrose Fakor α
UEA-I	Lektin von Ulex europaeus

7 Herstellerverzeichnis

Die verwendeten Materialien und Instrumente wurden bei den nachfolgend aufgeführten Firmen erworben.

B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

Perfusorleitungen

Perfusorspritze

Beckton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland

FACS-Gerät

Biochrom KG, Berlin, Deutschland

Fibronektin

Foetales Kälberserum (FKS)

L-Glutamin Lösung

Medium 199

PBS (mit Ca^{2+} und Mg^{2+})

PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+})

Boehringer-Mannheim, Mannheim, Deutschland

Dispase II (24 U/ml)

DNAse I

Coulter Immunology, Hialeah, Fl., USA

TQ-1 Antikörper (Anti L-Selektin)

Dako A/S, Glostrup Dänemark

Anti CD31 Antikörper

Anti Faktor VIII related Antigen Antikörper (Maus)

Cy 3 Anti Maus-IgG Antikörper

Dynal, Oslo, Norwegen

Magnetic Particle Concentrator

Tosyl-aktivierte Dynabeads

Falcon, Heidelberg, Deutschland

Petrischalen

Reaktionsgefäße (15 ml und 50 ml)

Zellkulturflaschen (T25 und T75)

Fresenius AG, Bad Homburg, Deutschland

Perfusionsgerät

Gibco BLR, Eggenheim, Deutschland

RPMi 1640 Medium

Trypsin-EDTA (0,25%)

Grünenthal GmbH., Aachen, Deutschland

Penicillin

Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland

Brutschrank

Merck, Darmstadt, Deutschland

$CaCl_2$

Methanol

Ohmeda, Helsingborg, Schweden

Venenverweilkatheter (Durchmesser 1,0 oder 1,4 mm)

Pepro Tech, London, Großbritanien

Tumor-Nekrose-Faktor α (TNFα)

Recker, Berlin, Deutschland

Deckgläschen (24 x 60 mm)

Nylonnetz (Porengröße 200 µm)

Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland

Filter (0,2 µl Porenweite)

Serva, Heidelberg, Deutschland

Trypsin (1:250)

Sigma, Deisenhofen, Deutschland

Bovines Serum Albumin (Fraktion V, 7,5 %)

5 (6)-Carboxyfloureszein Diacetat

Collagenase II (von Clostridium perfringens)

EDTA

Gelatine

HEPES-Puffer

Krebs-Henseleit-Puffer

Lektin von Ulex europaeus (UEA-I)

Natrium Borat

Streptomycin

Tunicamycin

8 Literaturverzeichnis

[1] Pitzalis, C. (1996): The Michael Mason Prize Essay 1996. Role of adhesion mechanisms in the pathogenesis of chronic synovitis, Br J Rheumatol 35 [12], Seite 1198-1215.

[2] Symon, F. A.; McNulty, C. A. und Wardlaw, A. J. (1999): P- and L-selectin mediate binding of T cells to chronically inflamed human airway endothelium, Eur J Immunol 29 [4], Seite 1324-1333.

[3] Ma, X. L.; Weyrich, A. S.; Lefer, D. J.; Buerke, M.; Albertine, K. H.; Kishimoto, T. K. und Lefer, A. M. (1993): Monoclonal antibody to L-selectin attenuates neutrophil accumulation and protects ischemic reperfused cat myocardium, Circulation 88 [2], Seite 649-658.

[4] Buerke, M.; Weyrich, A. S.; Murohara, T.; Queen, C.; Klingbeil, C. K.; Co, M. S. und Lefer, A. M. (1994): Humanized monoclonal antibody DREG-200 directed against I-selectin protects in feline myocardial reperfusion injury, J Pharmacol Exp Ther 271 [1], Seite 134-142.

[5] Bevilacqua, M. P. und Nelson, R. M. (1993): Selectins, J Clin Invest 91 [2], Seite 379-387.

[6] Ley, K.; Gaehtgens, P.; Fennie, C.; Singer, M. S.; Lasky, L. A. und Rosen, S. D. (1991): Lectin-like cell adhesion molecule 1 mediates leukocyte rolling in mesenteric venules in vivo, Blood 77 [12], Seite 2553-2555.

[7] Abbassi, O.; Kishimoto, T. K.; McIntire, L. V.; Anderson, D. C. und Smith, C. W. (1993): E-selectin supports neutrophil rolling in vitro under conditions of flow, J Clin Invest 92 [6], Seite 2719-2730.

[8] Kubes, P. und Kanwar, S. (1994): Histamine induces leukocyte rolling in post-capillary venules. A P- selectin-mediated event, J Immunol 152 [7], Seite 3570-3577.

[9] Tedder, T. F.; Penta, A. C.; Levine, H. B. und Freedman, A. S. (1990): Expression of the human leukocyte adhesion molecule, LAM1. Identity with the TQ1 and Leu-8 differentiation antigens, J Immunol 144 [2], Seite 532-540.

[10] Brady, H. R.; Spertini, O.; Jimenez, W.; Brenner, B. M.; Marsden, P. A. und Tedder, T. F. (1992): Neutrophils, monocytes, and lymphocytes bind to cytokine-activated kidney glomerular endothelial cells through L-selectin (LAM-1) in vitro, J Immunol 149 [7], Seite 2437-2444.

[11] Giuffre, L.; Cordey, A. S.; Monai, N.; Tardy, Y.; Schapira, M. und Spertini, O. (1997): Monocyte adhesion to activated aortic endothelium: role of L-selectin and heparan sulfate proteoglycans, J Cell Biol 136 [4], Seite 945-956.

[12] Schulz, M. (2001): L-Selectin abhängige Adhäsion an humanen Endothelzellen, Humboldt-Universität Berlin. Dissertation

[13] Zakrzewicz, A.; Gräfe, M.; Terbeek, D.; Bongrazio, M.; Auch-Schwelk, W.; Walzog, B.; Graf, K.; Fleck, E.; Ley, K. und Gaehtgens, P. (1997): L-selectin-dependent leukocyte adhesion to microvascular but not to macrovascular endothelial cells of the human coronary system, Blood 89, Seite 3228-3235.

[14] Springer, T. A. (1990): Adhesion receptors of the immune system, Nature 346, Seite 425-434.

[15] Pober, J. S. und Cotran, R. S. (1990): Cytokines and endothelial cell biology, Physiol 70 [2], Seite 427-451.

[16] Franke, R. P.; Gräfe, M.; Schnittler, H.; Seiffge, D.; Mittermayer, C. und Drenckhahn, D. (1984): Induction of human vascular endothelial stress fibres by fluid shear stress, Nature 307, Seite 648-649.

[17] Jaffe, E. A.; Nachman, R. L.; Becker, C. G. und Minick, C. R. (1973): Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria, J Clin Invest 52, Seite 2745-2756.

[18] Gräfe, M.; Auch-Schwelk, W.; Graf, K.; Terbeek, D.; Hertel, H.; Unkelbach, M.; Hildebrandt, A. G. und Fleck, E. (1994): Isolation and characterization of macrovascular and microvascular endothelial cells from human hearts, Am J Physiol 267, Seite H2138-H2148.

[19] Belloni, P. N. und Tressler, R. J. (1990): Microvascular endothelial cell heterogeneity: interactions with leukocytes and tumor cells, Cancer Metastasis Rev 8 [4], Seite 353-389.

[20] Jaffe, E. A. und Ross, R. (1988): Synthesis of von willebrand factor by endothelial cells, U.S.Ryan, Endothelial cells , Seite 119-126, Boca Raton, Florida, CRC Press, Inc.

[21] DeLisser, H. M.; Newman, P. J. und Albelda, S. M. (1994): Molecular and functional aspects of PECAM-1/CD31, Immunol Today 15 [10], Seite 490-495.

[22] Vecchi, A.; Garlanda, C.; Lampugnani, M. G.; Resnati, M.; Matteucci, C.; Stoppacciaro, A.; Schnurch, H.; Risau, W.; Ruco, L.; Mantovani, A. und . (1994): Monoclonal antibodies specific for endothelial cells of mouse blood vessels. Their application in the identification of adult and embryonic endothelium, Eur J Cell Biol 63 [2], Seite 247-254.

[23] Campana, D.; Janossy, G.; Bofill, M.; Trejdosiewicz, L. K.; Ma, D.; Hoffbrand, A. V.; Mason, D. Y.; Lebacq, A. M. und Forster, H. K. (1985): Human B cell development. I. Phenotypic differences of B lymphocytes in the bone marrow and peripheral lymphoid tissue, J Immunol 134 [3], Seite 1524-1530.

[24] Loftin, K. C.; Reuben, J. M.; Hersh, E. M. und Sujansky, D. (1985): Cytoplasmic IgM in leukemic B cells by flow cytometry, Leuk Res 9 [11], Seite 1379-1387.

[25] Clarke, J. L. und Watkins, W. M. (1997): Independent regulation of Fuc-TIV and Fuc-TVII genes leading to modulation of cell surface antigen expression in developing myeloid cells, Glycobiology 7 [6], Seite 835-846.

[26] Rao, R. M.; Clarke, J. L.; Ortlepp, S.; Robinson, M. K.; Landis, R. C. und Haskard, D. O. (2002): The S128R polymorphism of E-selectin mediates neuraminidase-resistant tethering of myeloid cells under shear flow, Eur J Immunol 32 [1], Seite 251-260.

[27] Wagers, A. J.; Stoolman, L. M.; Kannagi, R.; Craig, R. und Kansas, G. S. (1997): Expression of leukocyte fucosyltransferases regulates binding to E- selectin: relationship to previously implicated carbohydrate epitopes, J Immunol 159 [4], Seite 1917-1929.

[28] Turner, M. L.; Masek, L. C.; Hardy, C. L.; Parker, A. C. und Sweetenham, J. W. (1998): Comparative adhesion of human haemopoietic cell lines to extracellular matrix components, bone marrow stromal and endothelial cultures, Br J Haematol 100 [1], Seite 112-122.

[29] Lelkes PI und Samet MM (1999): Mechanical Forces and the Endothelium 6, Rubanyi GM, Harwood academic publishers, ISBN: 90-5702-447-0.

[30] McIntire, L. V. und Eskin, S. G. (1989): Mechanical and biochemical aspects of Leucocyte Interactions with model vessel wall, Meiselman, H. J; Lichtman, M. A. und La Celle, P. L., White Cell Mechanics: Basic Science and Clinical aspects , Seite 209, New York , Lisbon.

[31] Mote, R. (1997): Konstruktion eines Bioassay-Flußmodells mit einer Parallelflußkammer zur Untersuchung der Scherspannung auf Endothelzellen, Deutsches Herzzentrum Berlin/ Technische Fachhochschule Berlin. Dissertation

[32] Parmley, R. T.; Akin, D. T.; Barton, J. C.; Gilbert, C. S. und Kinkade, J. M., Jr. (1987): Cytochemistry and ultrastructural morphometry of cultured HL60 myeloid leukemia cells, Cancer Res 47 [18], Seite 4932-4940.

[33] Sachs, L. (2002): Angewandte Statistik10. Auflage, Berlin; Heidelberg; New York, ISBN: 3-540-42448-2.

[34] Darling, D. A. (1957): The Kolmogorov-Smirnov, Cramer-Mises tests, Ann Math Statist 28,

Seite 823-838.

[35] Butcher, E. C. (1991): Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity, Cell 67 [6], Seite 1033-1036.

[36] Springer, T. A. (1994): Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm, Cell 76, Seite 301-314.

[37] von Andrian, U. H.; Chambers, J. D.; McEvoy, L. M.; Bargatze, R. F.; Arfors, K. E. und Butcher, E. C. (1991): 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 USA 88 [17], Seite 7538-7542.

[38] McEver, R. P.; Moore, K. L. und Cummings, R. D. (1995): Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions, J Biol Chem 270 [19], Seite 11025-11028.

[39] Alon, R.; Hammer, D. A. und Springer, T. A. (1995): Lifetime of the P-selectin-carbohydrate bond and its response to tensile force in hydrodynamic flow, Nature 374 [6522], Seite 539-542.

[40] Kaplanski, G.; Farnarier, C.; Tissot, O.; Pierres, A.; Benoliel, A. M.; Alessi, M. C.; Kaplanski, S. und Bongrand, P. (1993): Granulocyte-endothelium initial adhesion. Analysis of transient binding events mediated by E-selectin in a laminar shear flow, Biophys J 64 [6], Seite 1922-1933.

[41] Puri, K. D.; Finger, E. B. und Springer, T. A. (1997): The faster kinetics of L-selectin than of E-selectin and P-selectin rolling at comparable binding strength, J Immunol 158 [1], Seite 405-413.

[42] Finger, E. B.; Puri, K. D.; Alon, R.; Lawrence, M. B.; von, Andrian UH und Springer, T. A. (1996): Adhesion through L-selectin requires a threshold hydrodynamic shear, Nature 379 [6562], Seite 266-269.

[43] Gaboury, J. P. und Kubes, P. (1994): Reductions in physiologic shear rates lead to CD11/CD18-dependent, selectin-independent leukocyte rolling in vivo, Blood 83 [2], Seite 345-350.

[44] Lawrence, M. B.; Kansas, G. S.; Kunkel, E. J. und Ley, K. (1997): Threshold levels of fluid shear promote leukocyte adhesion through selectins (CD62L,P,E), J Cell Biol 136 [3], Seite 717-727.

[45] Berlin, C.; Bargatze, R. F.; Campell, J. J.; von Adrian, U. H.; Szabo, M. C.; Hasslen, S. R.; Nelson, R. D.; Berg, E. L.; Erlandsen, S. L. und Butcher, E. C. (1995): a4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow, Cell 80, Seite 413-422.

[46] Reinhardt, P. H.; Elliott, J. F. und Kubes, P. (1997): Neutrophils can adhere via alpha4beta1-integrin under flow conditions, Blood 89 [10], Seite 3837-3846.

[47] Alon, R.; Kassner, P. D.; Carr, M. W.; Finger, E. B.; Hemler, M. E. und Springer, T. A. (1995): The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1, J Cell Biol 128 [6], Seite 1243-1253.

[48] Colditz, I. G. und Topper, E. K. (1991): The effect of systemic treatment with platelet-activating factor on the migration of eosinophils to lung, pleural and peritoneal cavities in the guinea pig, Int Arch Allergy Appl Immunol 95 [1], Seite 94-96.

[49] Nourshargh, S. und Williams, T. J. (1990): Evidence that a receptor-operated event on the neutrophil mediates neutrophil accumulation in vivo. Pretreatment of 111In-neutrophils with pertussis toxin in vitro inhibits their accumulation in vivo, J Immunol 145 [8], Seite 2633-2638.

[50] Sekido, N.; Mukaida, N.; Harada, A.; Nakanishi, I.; Watanabe, Y. und Matsushima, K. (1993): Prevention of lung reperfusion injury in rabbits by a monoclonal antibody against interleukin-8, Nature 365 [6447], Seite 654-657.

[51] Cooper, D.; Butcher, C. M.; Berndt, M. C. und Vadas, M. A. (1994): P-selectin interacts

with a beta 2-integrin to enhance phagocytosis, J Immunol 153 [7], Seite 3199-3209.

[52] Gamble, J. R.; Skinner, M. P.; Berndt, M. C. und Vadas, M. A. (1990): Prevention of activated neutrophil adhesion to endothelium by soluble adhesion protein GMP140, Science 249 [4967], Seite 414-417.

[53] Muller, W. A.; Weigl, S. A.; Deng, X. und Phillips, D. M. (1993): PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes, J Exp Med 178 [2], Seite 449-460.

[54] Vaporciyan, A. A.; DeLisser, H. M.; Yan, H. C.; Mendiguren, I. I.; Thom, S. R.; Jones, M. L.; Ward, P. A. und Albelda, S. M. (1993): Involvement of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 in neutrophil recruitment in vivo, Science 262 [5139], Seite 1580-1582.

[55] Atherton, A. und Born, G. V. (1972): Quantitative investigations of the adhesiveness of circulating polymorphonuclear leucocytes to blood vessel walls, J Physiol 222 [2], Seite 447-474.

[56] Atherton, A. und Born, G. V. (1973): Proceedings: Effects of neuraminidase and N-acetyl neuraminic acid on the adhesion of circulating granulocytes and platelets in venules, J Physiol 234 [2], Seite 66P-67P.

[57] Cohnheim, J (1889): Lectures on General Pathology: A Handbook for Practitioners and Students, The New Sydenham Society (London).

[58] Mitchell, D. J.; Li, P.; Reinhardt, P. H. und Kubes, P. (2000): Importance of L-selectin-dependent leukocyte-leukocyte interactions in human whole blood, Blood 95 [9], Seite 2954-2959.

[59] Luscinskas, F. W.; Kansas, G. S.; Ding, H.; Pizcueta, P.; Schleiffenbaum, B. E.; Tedder, T. F. und Gimbrone, M. A., Jr. (1994): Monocyte rolling, arrest and spreading on IL-4-activated vascular endothelium under flow is mediated via sequential action of L-selectin, beta 1-integrins, and beta 2-integrins, J Cell Biol 125 [6], Seite 1417-1427.

[60] Jones, D. A.; Smith, C. W.; Picker, L. J. und McIntire, L. V. (1996): Neutrophil adhesion to 24-hour IL-1-stimulated endothelial cells under conditions of flow, J Immunol 157, Seite 858-863.

[61] Kirveskari, J.; Vesaluoma, M. H.; Moilanen, J. A.; Tervo, T. M.; Petroll, M. W.; Linnolahti, E. und Renkonen, R. (2001): A novel non-invasive, in vivo technique for the quantification of leukocyte rolling and extravasation at sites of inflammation in human patients, Nat Med 7 [3], Seite 376-379.

[62] Tedder, T. F. (1991): Cell-surface receptor shedding: a means of regulating function, Am J Resp Cell Mol Biol 5 [4], Seite 305-306.

[63] Tedder, T. F.; Steeber, D. A.; Chen, A. und Engel, P. (1995): The selectins: vascular adhesion molecules, FASEB J 9 [10], Seite 866-873.

[64] Gallatin, W. M.; Weissman, I. L. und Butcher, E. C. (1983): A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes, Nature 304 [5921], Seite 30-34.

[65] Lanier, L. L.; Engleman, E. G.; Gatenby, P.; Babcock, G. F.; Warner, N. L. und Herzenberg, L. A. (1983): Correlation of functional properties of human lymphoid cell subsets and surface marker phenotypes using multiparameter analysis and flow cytometry, Immunol Rev 74, Seite 143-160.

[66] Chen, A.; Engel, P. und Tedder, T. F. (1995): Structural requirements regulate endoproteolytic release of the L- selectin (CD62L) adhesion receptor from the cell surface of leukocytes, J Exp Med 182 [2], Seite 519-530.

[67] Gearing, A. J. und Newman, W. (1993): Circulating adhesion molecules in disease, Immunol Today 14 [10], Seite 506-512.

[68] Bührer, C.; Graulich, J.; Stibenz, D.; Dudenhausen, J. W. und Obladen, M. (1994): L-selectin is down-regulated in umbilical cord blood granulocytes and monocytes of newborn

infants with acute bacterial infection, Pediatr Res 36 [6], Seite 799-804.

[69] Kerner, T.; Ahlers, O.; Spielmann, S.; Keh, D.; Bührer, C.; Gerlach, M.; Hofler, S. und Gerlach, H. (1999): L-selectin in trauma patients: a marker for organ dysfunction and outcome?, Eur J Clin 29 [12], Seite 1077-1086.

[70] Geng, J. G.; Bevilacqua, M. P.; Moore, K. L.; McIntyre, T. M.; Prescott, S. M.; Kim, J. M.; Bliss, G. A.; Zimmerman, G. A. und McEver, R. P. (1990): Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140, Nature 343 [6260], Seite 757-760.

[71] Hattori, R.; Hamilton, K. K.; Fugate, R. D.; McEver, R. P. und Sims, P. J. (1989): Stimulated secretion of endothelial von Willebrand factor is accompanied by rapid redistribution to the cell surface of the intracellular granule membrane protein GMP-140, J Biol Chem 264 [14], Seite 7768-7771.

[72] Hahne, M.; Jager, U.; Isenmann, S.; Hallmann, R. und Vestweber, D. (1993): Five tumor necrosis factor-inducible cell adhesion mechanisms on the surface of mouse endothelioma cells mediate the binding of leukocytes, J Cell Biol 121 [3], Seite 655-664.

[73] Sanders, W. E.; Wilson, R. W.; Ballantyne, C. M. und Beaudet, A. L. (1992): Molecular cloning and analysis of in vivo expression of murine P- selectin, Blood 80 [3], Seite 795-800.

[74] Weller, A.; Isenmann, S. und Vestweber, D. (1992): Cloning of the mouse endothelial selectins. Expression of both E- and P- selectin is inducible by tumor necrosis factor alpha, J Biol Chem 267 [21], Seite 15176-15183.

[75] Bevilacqua, M. P.; Pober, J. S.; Mendrick, D. L.; Cotran, R. S. und Gimbrone, M. A., Jr. (1987): Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule, Proc Natl Acad Sci USA 84, Seite 9238-9242.

[76] Pober, J. S.; Lapierre, L. A.; Stolpen, A. H.; Brock, T. A.; Springer, T. A.; Fiers, W.; Bevilacqua, M. P.; Mendrick, D. L. und Gimbrone, M. A., Jr. (1987): Activation of cultured human endothelial cells by recombinant lymphotoxin: comparison with tumor necrosis factor and interleukin 1 species, J Immunol 138 [10], Seite 3319-3324.

[77] Ley, K.; Bullard, D. C.; Arbones, M. L.; Bosse, R.; Vestweber, D.; Tedder, T. F. und Beaudet, A. L. (1995): Sequential contribution of L- and P-selectin to leukocyte rolling in vivo, J Exp Med 181, Seite 669.

[78] Ley, K. und Tedder, T. F. (1995): Leukocyte interactions with vascular endothelium. New insights into selectin-mediated attachment and rolling, J Immunol 155 [2], Seite 525-528.

[79] Arbones, M. L.; Ord, D. C.; Ley, K.; Ratech, H.; Maynard-Curry, C.; Otten, G.; Capon, D. J. und Tedder, T. F. (1994): Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L- selectin-deficient mice, Immunity 1 [4], Seite 247-260.

[80] Mayadas, T. N.; Johnson, R. C.; Rayburn, H.; Hynes, R. O. und Wagner, D. D. (1993): Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice.

[81] Zöllner, O.; Lenter, M. C.; Blanks, J. E.; Borges, E.; Steegmaier, M.; Zerwes, H. G. und Vestweber, D. (1997): L-selectin from human, but not from mouse neutrophils binds directly to E-selectin, J Cell Biol 136 [3], Seite 707-716.

[82] Yago, T.; Tsukuda, M.; Tajima, H.; Nishi, T.; Kurata-Miura, K.; Ohkubo, J. und Minami, M. (1997): Analysis of initial attachment of B cells to endothelial cells under flow conditions, J Immunol 158 [2], Seite 707-714.

[83] Alon, R.; Chen, S.; Fuhlbrigge, R.; Puri, K. D. und Springer, T. A. (1998): The kinetics and shear threshold of transient and rolling interactions of L-selectin with its ligand on leukocytes, Proc Natl Acad Sci USA 95 [20], Seite 11631-11636.

[84] Tsuzuki, S.; Toyama-Sorimachi, N.; Kitamura, F.; Tobita, Y. und Miyasaka, M. (1998): FK506 (tacrolimus) inhibits extravasation of lymphoid cells by abrogating VLA-4/VCAM-1 mediated transendothelial migration, FEBS Lett 430 [3], Seite 414-418.

[85] Collins, S. J.; Ruscetti, F. W.; Gallagher, R. E. und Gallo, R. C. (1978): Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds, Proc Natl Acad Sci USA 75 [5], Seite 2458-2462.

[86] Gallagher, R.; Collins, S.; Trujillo, J.; McCredie, K.; Ahearn, M.; Tsai, S.; Metzgar, R.; Aulakh, G.; Ting, R.; Ruscetti, F. und Gallo, R. (1979): Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia, Blood 54 [3], Seite 713-733.

[87] Crocker, P. R. und Feizi, T. (1996): Carbohydrate recognition systems: functional triads in cell-cell interactions, Curr Opin Struct Biol 6 [5], Seite 679-691.

[88] McEver, R. P. (1994): Selectins, Curr Opin Immunol 6 [1], Seite 75-84.

[89] Rosen, S. D. und Bertozzi, C. R. (1994): The selectins and their ligands, Curr Opin Cell Biol 6 [5], Seite 663-673.

[90] Pouyani, T. und Seed, B. (1995): PSGL-1 recognition of P-selectin is controlled by a tyrosine sulfation consensus at the PSGL-1 amino terminus, Cell 83 [2], Seite 333-343.

[91] Shailubhai, K.; Khai, Huynh Q.; Boddupalli, H.; Yu, H. H. und Jacob, G. S. (1999): Purification and characterization of a lymph node sulfotransferase responsible for 6-O-sulfation of the galactose residues in 2'- fucosyllactose and other sialyl LewisX-related sugars, Biochem Biophys Res Commun 256 [1], Seite 170-176.

[92] Shimizu, Y. und Shaw, S. (1993): Mucins in the mainstream, Nature 366, Seite 630-631.

[93] Baumhueter, S.; Singer, M. S.; Henzel, W.; Hemmerich, S.; Renz, M.; Rosen, S. D. und Lasky, L. A. (1993): Binding of L-Selectin to the vascular sialomucin CD34, Science 262, Seite 436-438.

[94] Berg, E. L.; McEvoy, L. M.; Berlin, C.; Bargatze, R. F. und Butcher, E. C. (1993): L-selectin-mediated lymphocyte rolling on MAdCAM-1, Nature 366, Seite 695-698.

[95] Brustein, M.; Kraal, G.; Mebius, R. E. und Watson, S. R. (1992): Identification of a soluble form of a ligand for the lymphocyte homing receptor, J Exp Med 176 [5], Seite 1415-1419.

[96] Hemmerich, S.; Leffler, H. und Rosen, S. D. (1995): Structure of the O-glycans in GlyCAM-1, an endothelial-derived ligand for L-selectin, J Biol Chem 270 [20], Seite 12035-12047.

[97] Bührer, C.; Herold, R.; Stibenz, D.; Henze, G. und Obladen, M. (1996): Cerebrospinal fluid soluble L-selectin (sCD62L) in meningoencephalitis, Arch Dis Child 74 [4], Seite 288-292.

[98] Bührer, C.; Stiller, B.; Alexi-Meskishvili, V.; Hetzer, R. und Lange, P. E. (1998): Soluble L-selectin plasma concentrations in infants undergoing heart surgery: no association with capillary leak syndrome or need for respiratory support, Intensive Care Med 24 [10], Seite 1093-1098.

[99] Hemmerich, S.; Butcher, E. C. und Rosen, S. D. (1994): Sulfation-dependent recognition of high endothelial venules (HEV)- ligands by L-selectin and MECA 79, and adhesion-blocking monoclonal antibody, J Exp Med 180, Seite 2219-2226.

[100] Imai, Y.; Lasky, L. A. und Rosen, S. D. (1993): Sulphation requirement for Glycam-1, an endothelial ligand for L-selectin, Nature 361, Seite 555-557.

[101] Kershaw, D. B.; Thomas, P. E.; Wharram, B. L.; Goyal, M.; Wiggins, J. E.; Whiteside, C. I. und Wiggins, R. C. (1995): Molecular cloning, expression, and characterization of podocalyxin-like protein 1 from rabbit as a transmembrane protein of glomerular podocytes and vascular endothelium, J Biol Chem 270 [49], Seite 29439-29446.

[102] Sassetti, C.; Tangemann, K.; Singer, M. S.; Kershaw, D. B. und Rosen, S. D. (1998): Identification of podocalyxin-like protein as a high endothelial venule ligand for L-selectin: parallels to CD34, J Exp Med 187 [12], Seite 1965-1975.

[103] Spertini, O.; Luscinskas, F. W.; Kansas, G. S.; Munro, J. M.; Griffin, J. D.; Gimbrone, M. A. Jr und Tedder, T. F. (1991): Leukocyte adhesion molecule-1 (LAM-1, L-selectin) interacts with an inducible endothelial cell ligand to support leukocyte adhesion, J Immunol 147 [8], Seite 2565-2573.

[104] Norgard-Sumnicht, K.; Varki, N. M. und Varki, A. (1993): Calcium-dependent heparin-like ligands for L-selectin in nonlymphoid endothelial cells, Science 261, Seite 480-483.

[105] Gräfe, M., Debus, N. P., Schriever, F., Bührer, C., Graf, K., Zakrzewicz, A., and Fleck, E. (2000): Die Rolle des MECA79 Epitops bei L-Selectin adhängiger Adhäsion an humanen kardialen mikrovaskulären Endothelzellen, Z Kardiol 89 [Suppl 5], Seite 287. Abstract

[106] Alon, R.; Fuhlbrigge, R. C.; Finger, E. B. und Springer, T. A. (1996): Interactions through L-selectin between leukocytes and adherent leukocytes nucleate rolling adhesions on selectins and VCAM-1 in shear flow, J Cell Biol 135 [3], Seite 849-865.

[107] Moore, K. L. (1998): Structure and function of P-selectin glycoprotein ligand-1, Leuk Lymphoma 29 [1-2], Seite 1-15.

[108] Laszik, Z.; Jansen, P. J.; Cummings, R. D.; Tedder, T. F.; McEver, R. P. und Moore, K. L. (1996): P-selectin glycoprotein ligand-1 is broadly expressed in cells of myeloid, lymphoid, and dendritic lineage and in some nonhematopoietic cells, Blood 88 [8], Seite 3010-3021.

[109] Priest, R.; Bird, M. I. und Malhotra, R. (1998): Characterization of E-selectin-binding epitopes expressed by skin- homing T cells, Immunology 94 [4], Seite 523-528.

[110] Walcheck, B.; Moore, K. L.; McEver, R. P. und Kishimoto, T. K. (1996): Neutrophil-neutrophil interactions under hydrodynamic shear stress involve L-selectin and PSGL-1. A mechanism that amplifies initial leukocyte accumulation of P-selectin in vitro, J Clin Invest 98 [5], Seite 1081-1087.

[111] Ramos, C. L.; Smith, M. J.; Snapp, K. R.; Kansas, G. S.; Stickney, G. W.; Ley, K. und Lawrence, M. B. (1998): Functional characterization of L-selectin ligands on human neutrophils and leukemia cell lines: evidence for mucinlike ligand activity distinct from P-selectin glycoprotein ligand-1, Blood 91 [3], Seite 1067-1075.

[112] Bargatze, R. F.; Kurk, S.; Butcher, E. C. und Jutila, M. A. (1994): Neutrophils roll on adherent neutrophils bound to cytokine-induced endothelial cells via L-selectin on the rolling cells, J Exp Med 180 [5], Seite 1785-1792.

[113] Fuhlbrigge, R. C.; Alon, R.; Puri, K. D.; Lowe, J. B. und Springer, T. A. (1996): Sialylated, fucosylated ligands for L-selectin expressed on leukocytes mediate tethering and rolling adhesions in physiologic flow conditions, J Cell Biol 135 [3], Seite 837-848.

[114] Kunkel, E. J.; Chomas, J. E. und Ley, K. (1998): Role of primary and secondary capture for leukocyte accumulation in vivo, Circ Res 82 [1], Seite 30-38.

[115] Lawrence, M. B. und Springer, T. A. (1991): Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins, Cell 65 [5], Seite 859-873.

[116] Patel, K. D.; Moore, K. L.; Nollert, M. U. und McEver, R. P. (1995): Neutrophils use both shared and distinct mechanisms to adhere to selectins under static and flow conditions, J Clin Invest 96 [4], Seite 1887-1896.

[117] Kunkel, E. J. und Ley, K. (1996): Distinct phenotype of E-selectin-deficient mice. E-selectin is required for slow leukocyte rolling in vivo, Circ Res 79 [6], Seite 1196-1204.

[118] Sperandio, M.; Forlow, S. B.; Thatte, J.; Ellies, L. G.; Marth, J. D. und Ley, K. (2001): Differential requirements for core2 glucosaminyltransferase for endothelial L-selectin ligand function in vivo, J Immunol 167 [4], Seite 2268-2274.

[119] Vestweber, D. und Blanks, J. E. (1999): Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands, Physiol 79 [1], Seite 181-213.

[120] Jung, U.; Bullard, D. C.; Tedder, T. F. und Ley, K. (1996): Velocity differences between L- and P-selectin-dependent neutrophil rolling in venules of mouse cremaster muscle in vivo, Am J Physiol 271 [6 Pt 2], Seite H2740-H2747.

[121] Ley, K. (2001): Functions of selectins, Results Probl Cell Differ 33:177-200., Seite 177-200.

[122] Rainger, G. E.; Fisher, A. C. und Nash, G. B. (1997): Endothelial-borne platelet-activating factor and interleukin-8 rapidly immobilize rolling neutrophils, Am J Physiol 272 [1 Pt 2], Seite H114-H122.

[123] Kuo, S. C. und Lampen, O. (1976): Tunicamycin inhibition of (3H) glucosamine incorporation into yeast glycoproteins: binding of tunicamycin and interaction with phospholipids, Arch Biochem Biophys 172 [2], Seite 574-581.

[124] Miki, I.; Kusano, A.; Ohta, S.; Hanai, N.; Otoshi, M.; Masaki, S.; Sato, S. und Ohmori, K. (1996): Histamine enhanced the TNF-alpha-induced expression of E-selectin and ICAM-1 on vascular endothelial cells, Cell Immunol. 171 [2], Seite 285-288.

[125] Schweitzer, K. M.; Drager, A. M.; van, der, V; Thijsen, S. F.; Zevenbergen, A.; Theijsmeijer, A. P.; van der Schoot, C. E. und Langenhuijsen, M. M. (1996): Constitutive expression of E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 on endothelial cells of hematopoietic tissues, Am J Pathol 148 [1], Seite 165-175.

[126] Steegmaier, M.; Levinovitz, A.; Isenmann, S.; Borges, E.; Lenter, M.; Kocher, H. P.; Kleuser, B. und Vestweber, D. (1995): The E-selectin-ligand ESL-1 is a variant of a receptor for fibroblast growth factor, Nature 373 [6515], Seite 615-620.

[127] Lenter, M.; Levinovitz, A.; Isenmann, S. und Vestweber, D. (1994): Monospecific and common glycoprotein ligands for E- and P- selectin on myeloid cells, J Cell Biol 125 [2], Seite 471-481.

[128] Sako, D.; Chang, X. J.; Barone, K. M.; Vachino, G.; White, H. M.; Shaw, G.; Veldman, G. M.; Bean, K. M.; Ahern, T. J.; Furie, B. und . (1993): Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin, Cell 75 [6], Seite 1179-1186.

[129] Lefer, A. M. (1995): Role of selectins in myocardial ischemia-reperfusion injury, Ann Thorac Surg 60 [3], Seite 773-777.

[130] Tsao, P. S.; Aoki, N.; Lefer, D. J.; Johnson, G., III und Lefer, A. M. (1990): Time course of endothelial dysfunction and myocardial injury during myocardial ischemia and reperfusion in the cat, Circulation 82 [4], Seite 1402-1412.

[131] Kirveskari, J.; Paavonen, T.; Hayry, P. und Renkonen, R. (2000): De novo induction of endothelial L-selectin ligands during kidney allograft rejection, J Am Soc Nephrol 11 [12], Seite 2358-2365.

[132] Kume, N.; Cybulsky, M. I. und Gimbrone, M. A., Jr. (1992): Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells, J Clin Invest 90 [3], Seite 1138-1144.

[133] Majewski, S.; Hunzelmann, N.; Johnson, J. P.; Jung, C.; Mauch, C.; Ziegler-Heitbrock, H. W.; Riethmuller, G. und Krieg, T. (1991): Expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the skin of patients with systemic scleroderma, J Invest Dermatol 97 [4], Seite 667-671.

[134] Schurmann, G. M.; Bishop, A. E.; Facer, P.; Vecchio, M.; Lee, J. C.; Rampton, D. S. und Polak, J. M. (1995): Increased expression of cell adhesion molecule P-selectin in active inflammatory bowel disease, Gut 36 [3], Seite 411-418.

[135] Bame, K. J.; Lidholt, K.; Lindahl, U. und Esko, J. D. (1991): Biosynthesis of heparan sulfate, J Biol Chem 266, Seite 10287-10293.

[136] Koenig, A.; Norgard-Sumnicht, K.; Linhardt, R. und Varki, A. (1998): Differential

interactions of heparin and heparan sulfate glycosaminoglycans with the selectins. Implications for the use of unfractionated and low molecular weight heparins as therapeutic agents, J Clin Invest 101 [4], Seite 877-889.

[137] Alexander, P. und Giangola, G. (1999): Deep venous thrombosis and pulmonary embolism: diagnosis, prophylaxis, and treatment, Ann Vasc Surg 13 [3], Seite 318-327.

[138] Staudinger, T.; Locker, G. J. und Frass, M. (1996): Management of acquired coagulation disorders in emergency and intensive- care medicine, Semin Thromb Hemost 22 [1], Seite 93-104.

9 Anhang

9.1 Danksagung

Mein Dank gilt vor allem:

PD Dr. med. Michael Gräfe für die herausragende Betreuung und seine Unterstützung während aller Phasen der Erstellung dieser Arbeit.

PD Dr. med. Kristof Graf und den Mitgliedern der Arbeitsgruppe für Experimentelle Kardiologie am Deutschen Herzzentrum Berlin.

Dr. med. Ernst Wellnhofer für die Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Prof. Dr. E. Fleck für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Dr. med. Andreas Zakrzewicz Institut für Physiologie der Freien Universität Berlin, für die Hilfe bei der Versuchsanordung und die Überlassung der Leukozytenzellinien.

Meinen Eltern

und meiner Schwester für die Unterstützung vor, während und nach dem Studium.

9.2 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre, die vorliegende Dissertationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst zu haben. Die beschriebenen Ergebnisse sind selbst gewonnen. Die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern sowie die Literatur wurden vollständig angegeben.

Berlin, den 14.05.2004

U.Thanabalasingam

9.3 Publikationen

1. Gräfe M, Eschenhagen P, Thanabalasingam U, Henn V, Zakrzewicz A, Fleck E. CD-40 stimulation affects E-selectin and L-selectin-dependent adhesion to vascular endothelial cells differently. Basic Research in Cardiology 96. 2001.
   Ref Type: Abstract
2. Gräfe M, Eschenhagen P, Thanabalasingam U, Stibenz D, Zakrzewicz A. CD40 stimulation affects E-selectin and L-selectin-dependent adhesion to vascular endothelial cells differently. Circulation 106[19, suppl], II-182. 2002.
   Ref Type: Abstract
3. Gräfe M, Thanabalasingam U, Stibenz D, Goetze S, Pregla R, Fleck E. Characterization of L-selectin-dependent adhesion to human microvascular cardiac endothelial cells. European Heart Journal 23[Abstract Suppl], 463. 2003.
   Ref Type: Abstract
4. Gräfe M, Thanabalasingam U, Pregla R, Goetze S. Charakterisierung L-Selectin abhängiger Adhäsion an menschlichen mikrovaskulären kardialen Endothelzellen. Zeitschrift für Kardiologie 91[suppl 1], I/80. 2002.
   Ref Type: Abstract
5. Gräfe M, Thanabalasingam U, Zakrzewicz A, Bührer C, Holzmeister J, Gaehtgens P. Rolling velocities of leukocytes during L-selectin-dependent interactions with human cardiac microvascular endothelial cells. Circulation 102[18], II-112. 2000.
   Ref Type: Abstract
6. Thanabalasingam U, Zakrzewicz A, Bührer C, Holzmeister J, Gräfe M. Rollgeschwindigkeit von Leukozyten bei L-Selectin abhängigen Interaktionen mit menschlichen mikrovaskulären kardialen Endothelzellen. Zeitschrift für Kardiologie 89[Suppl 5], 40. 2000.
   Ref Type: Abstract

9.4 Lebenslauf

Angaben zur Person

Name :	Usan Thanabalasingam
Wohnort :	Bürknerstrasse 27
	12047 Berlin
Geburtstag und –ort :	28.06.1974, Inuvil/Sri Lanka
Einreise nach Deutschland :	Februar 1981
Familienstand :	ledig
Nationalität :	deutsch

Schulausbildung

8/1981 – 7/1987	Hermann-Sander-Grundschule/ Berlin
8/1987 – 6/1994	Albrecht-Dürer-Oberschule (Gymnasium)/ Berlin
9.06.1994	Abitur

Berufsausbildung

Studium der Humanmedizin

4/1995 – 3/1997	Vorklinisches Studium/ Freie Universität Berlin
4/1997 – 4/2002	Klinischer Abschnitt/ Humboldt-Universität Berlin
13.05.2002	III. Staatsexamen

Studienbegleitende Tätigkeiten

Famulaturen :

August 1998	Kardiologie/ Krankenhaus am Urban
September 1998	Orthopädie/ Krankenhaus am Urban
September 1999	Kardiologie/ Praxis Dres. Brede/ Hintze
März + April 2000	Entwicklungshilfeprojekte in Südindien
September 2001	Nephrologie/ Universitätsklinikum Rudolf Virchow

Promotion

seit Januar 1999	experimentelle Doktorarbeit bei
	Prof. Dr. E. Fleck
	Klinik für Innere Medizin/Kardiologie,
	Deutsches Herzzentrum Berlin
	Thema: „Flussgeschwindigkeiten von Leukozyten auf Endothelmonolayer“ (in Begutachtung)

Berufliche Tätigkeit

Arzt im Praktikum seit 1.1.2003 in der

Klinik für Innere Medizin/Kardiologie (Direktor Prof. Dr.med. E. Fleck),

Deutsches Herzzentrum Berlin

Berlin, 14.05.2004

Usan Thanabalasingam