

Untersuchung der Heparinwirkung an Adhäsionsrezeptoren mithilfe akustischer Biosensoren

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen-Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Dirk Simonis

aus

Daun

Bonn, März 2009

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Im Rahmen des Graduiertenkollegs 677
„Struktur und molekulare Interaktion als Basis der
Arzneimittelwirkung“

Referent: Prof. Dr. Gerd Bendas

Korreferent: Prof. Dr. Christa E. Müller

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Mai 2009

Diese Schrift ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr: 2009

Before you leave these portals
to meet less fortunate mortals,
there's just one final message I would give to you.

You all have learned reliance
on the sacred teachings of science,
so I hope through life you never will decline,
in spite of philistine defiance,
to do what all good scientists do.

Experiment,
Make it your motto day and night.

Experiment,
And it will lead you to the light.

The apple on the top of the tree
is never too high to achieve.
So take an example from Eve.

Experiment.

Be curious,
Though interfering friends may frown.

Get furious,
At each attempt to hold you down.

If this advice you'll only employ,
the future can offer you infinite joy
and merriment.

Experiment,
and you'll see.

Cole Porter

für Christiane in unendlicher Liebe und Dankbarkeit

Danksagung

Mein erster und ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Gerd Bendas, der mir dieses interessante Thema überlassen hat. Ich danke ihm für die engagierte Betreuung, für das Vertrauen, das er mir und meiner Arbeit stets entgegengebracht hat, für die freundschaftliche Atmosphäre auf die er immer bedacht war und für die stets „offene Tür“ für Gespräche und Diskussionen.

Frau Prof. Dr. Müller danke ich herzlich für die Übernahme des Korreferats. Frau Prof. Dr. König und Herrn Prof. Dr. Häberlein danke ich für die Mitwirkung in der Prüfungskommission.

Frau Prof. Dr. Alban, Christian-Albrechts-Universität Kiel, möchte ich für die gute Zusammenarbeit und die Überlassung von Testsubstanzen für diese Arbeit danken. Herrn Prof. Dr. Casu und Frau Dr. Naggi, Istituto di Ricerche Chimiche e Biochimiche „G. Ronzoni“, Mailand, sei Dank für die Überlassung verschiedener Heparinderivate gesagt. Herrn Dr. Borsig, Universität Zürich, danke ich herzlich für die hervorragende Zusammenarbeit, die Durchführung von Adhäsionsassays, die vielen Diskussionen und Anregungen, die Überlassung von Substanzen und von Zelllinien. Für die Möglichkeit, das konfokale Laser-Scanning-Mikroskop ihres Instituts nutzen zu dürfen, danke ich Herrn PD Dr. Rothe, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und seinen Mitarbeitern, allen voran Frau Dr. Dölling und Mario Bandulik. Für die Überlassung der MV3-Melanomzelllinie danke ich Herrn Dr. Zeisig, Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin, Berlin. Ich danke Herrn Dr. Gronewold, Biosensor GmbH, Bonn, für die stets freundliche, geduldige und kompetente Beratung bei allen Fragen rund um den SAW-Biosensor. Ebenso danke ich Frau Kiwitz, Biosensor GmbH, Bonn, für ihre Hilfe bei Fragen rund um die Auswertungssoftware.

Viele Menschen haben dazu beigetragen, dass die letzten Jahre eine wirkliche Bereicherung für mich darstellen. Deshalb danke ich allen Kollegen der Arbeitsgruppe Bendas für die wunderbare Zusammenarbeit und das harmonische Miteinander. Martin Schlesinger und Patrick Schmitz danke ich für ihr Engagement und die hervorragende Zusammenarbeit im Rahmen ihrer Diplomarbeiten, die ich betreuen durfte und deren Ergebnisse in diese Arbeit einfließen. Juliane Fritzsche möchte

ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit, für ihre Geduld beim Korrekturlesen dieser Arbeit und für ihr immenses Wissen danken, das sie stets mit mir geteilt hat. Astrid Hartung und Katrin Reder-Christ waren neben den bisher genannten wunderbare Büro- und Laborkollegen in den letzten Jahren und ich hoffe, dass unsere Freundschaft noch lange Bestand haben möge. Michaela Krieger, Saad Al-Kaddah, Sara Gosk, Claudia Ulbrich, Annette Konold und Manuela Brunschweiger danke ich für das vertrauensvolle Miteinander in der Arbeitsgruppe.

Den Technischen Assistenten Iris Jusen, Dieter Baumert und Hildegard Falkenstein-Paul danke ich für die stete Unterstützung bei allen Fragen des täglichen (Labor)bedarfs. Herrn Wolfgang Bosse sei für seine Geduld bei allen elektronischen Problemen gedankt. Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen um Prof. Dr. Wiese und Prof. Dr. Kassack möchte ich für das nette Arbeitsklima danken. Besonders seien Björn Conrads für viele Gespräche, Federico Marighetti für die Nachhilfe in Italienisch und Anna Jacobs für ihre aufopfernde Hilfsbereitschaft und die Fahrgemeinschaft gedankt.

Den Assistenten des 3. Semesters danke ich für die gute Zusammenarbeit in diesem anspruchsvollen Praktikum. Allen Assistenten der Pharmazeutischen Chemie danke ich für ihr Vertrauen, das sie in mich als Assistentensprecher gesetzt haben.

Ich danke dem Graduiertenkolleg 677 „Struktur und molekulare Interaktion als Basis der Arzneimittelwirkung“ für die finanzielle Unterstützung und seinen Mitgliedern für den regen Gedankenaustausch.

Allen Freunden und Verwandten danke ich für das in mich gesetzte Vertrauen, den neutralen Blick von Außen und dafür, dass sie mir immer Mut gemacht haben. Yvonne Heinzen sei an dieser Stelle mein Dank für die Hilfe bei der Erstellung der schematischen Abbildungen dieser Dissertationsschrift vorgebracht.

Meinen Eltern und Brüdern gilt mein besonderer Dank. Durch ihre Unterstützung wurden mein Pharmaziestudium, mein Aufenthalt in Italien und die anschließende Promotion erst möglich.

Meinem Sohn Leonhard danke ich für seine Geduld, seine Gutmütigkeit und sein fröhliches Wesen.

Mein größter Dank aber gilt meiner Frau Christiane, die stets zu mir gestanden, mir nach Kräften den Rücken frei gehalten und meine Entscheidungen immer mitgetragen hat. Besonders für die letzten Monate mit all ihren Entbehrungen und für ihre bedingungslose Liebe reicht kein Dankeswort aus.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretischer Teil	3
2.1	Selektine	3
2.1.1	Aufbau und Physiologie der Selektine	3
2.1.2	Selektinliganden	7
2.1.3	Kinetik der Selektinbindung	13
2.1.4	Selektininhibitoren	18
2.2	Die hämatogene Metastasierung	21
2.2.1	Selektine und Selektinliganden bei der hämatogenen Metastaserung	24
2.2.2	Auswirkungen der Heparin-gabe auf den Verlauf von Krebserkrankungen	28
2.2.3	Selektinblockade durch Heparin als antimetastatischer Mechanismus	32
2.2.4	Aufbau, Vorkommen und strukturelle Anforderungen des Heparins an die Selektinblockade	34
2.3	Integrine	37
2.3.1	Aufbau und Physiologie der Integrine	37
2.3.2	Integrinliganden	41
2.3.3	Integrin VLA-4 und VCAM-1	44
2.3.4	Bedeutung von VCAM-1 und VLA-4 im Rahmen von Krebserkrankungen	46
2.3.5	Heparin als Integrin-Ligand	47
2.4	Biosensoren	49
2.5	Akustische Biosensoren	51
2.5.1	Grundlagen der akustischen Biophysik	52
2.5.2	Messungen in Flüssigkeit mit akustischen Biosensoren	55
2.5.3	Funktionsweise und Anwendung von QCM und SAW im Vergleich	56

2.5.4	Bestimmung kinetischer Bindungskonstanten mit QCM und SAW	61
2.5.5	Detektion von Zell-Bindungen mit QCM und SAW	64
2.6	Biosensoren zur Charakterisierung von Selektin- und Integrin-Wechselwirkungen	65
3	Material und Methoden	67
3.1	Verwendete Materialien	67
3.1.1	Geräte	67
3.1.2	Chemikalien	68
3.1.3	Antikörper	70
3.1.4	Testsubstanzen	71
3.1.5	sonstige Materialien	71
3.1.6	Puffer und Lösungen	73
3.1.7	Computerprogramme	80
3.1.8	Statistik	81
3.2	Zellkultur	81
3.2.1	Revitalisierung und Inkulturnahme der Zellen	82
3.2.2	Kryokonservierung	82
3.2.3	Zellzahlbestimmung	82
3.2.4	Kultivierung der Melanomzelllinie MV3	83
3.2.5	Kultivierung der Zelllinie P-Sel-CHO	84
3.3	Gewinnung von murinen P-Selektin-Fc-Chimären aus Ovarialzellen des chinesischen Hamsters	85
3.3.1	Zellkultur im Produktionszyklus	85
3.3.2	Gewinnung der mP-Sel-Fc-Chimären aus dem Nährmedium	86
3.3.3	Quantitative und qualitative Charakterisierung der mP-Sel-Fc-Chimären	87
3.4	Membranpräparation von MV3-Zellen	90
3.4.1	Zellkultur zur Vorbereitung der Membranpräparation	90
3.4.2	Einfache Membranpräparation	90
3.4.3	Membranpräparation nach Lever	91
3.4.4	Gewinnung von Membranproteinen mithilfe von Oktylglucosid	92
3.4.5	Bestimmung des Proteingehalts nach Membranpräparation	92
3.4.6	Detektion von VLA-4 durch Gelelektrophorese und Western-Blot	93
3.5	Quarzmikroaagensystem LiquiLab21 [®]	94
3.5.1	Charakterisierung der Quarzsensoren und deren Reinigung	95
3.5.2	Immobilisation von Proteinen auf den Quarzsensoren	97

3.5.3	Immobilisation von Sulfatid-haltigen oder sLex-haltigen Modellmembranen	97
3.5.4	Durchführung der QCM-Experimente	99
3.6	Akustischer Oberflächenwellensensor (SAW) S-sens [®] K5	100
3.6.1	Charakterisierung und Reinigung der S-sens [®] K5-Quarzsensoren	100
3.6.2	Immobilisation von 11-Mercaptoundecansäure auf den S-sens [®] K5-Quarzsensoren	102
3.6.3	<i>In situ</i> -Immobilisation von Proteinen durch EDC/NHS	103
3.6.4	Immobilisation von Membranvesikeln auf 1-Thio- β -D-Glucose	104
3.6.5	Durchführung von Bindungsexperimenten am SAW-Biosensor	104
3.6.6	Durchführung von Inhibitionsexperimenten am SAW-Biosensor	105
3.7	Herstellung Selektinligand-haltiger Liposomen	105
3.8	Immobilisation von Selektinligand-haltigen Membranen auf Glas und Charakterisierung mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie	106
4	Ergebnisse und Diskussion	111
4.1	Biosensor-Charakterisierung der Heparin-Selektin-Wechselwirkung	111
4.1.1	Optimierung der Immobilisierung von hP-Selektin-Fc-Chimären	111
4.1.2	Überprüfung der Immobilisation und Funktionalität der hP-Selektin-Fc-Chimären	113
4.1.3	Detektion und kinetische Betrachtung der Bindung von UFH an hP-Selektin-Fc-Chimären	114
4.1.4	Übertragung des Messsystems auf hL-Selektin-Fc-Chimären	120
4.1.5	Detektion und kinetische Betrachtung der Bindung von LMWH an hP- und hL-Selektin-Fc-Chimären	121
4.2	Herleitung von Struktur-Wirkungsbeziehungen durch Bindungsstudien mit sulfatierten Polysacchariden an hP-Selektin-Fc-Chimären	125
4.2.1	Korrelation von kinetischen Bindungskonstanten mit Daten aus einem Zellrollassay	127
4.2.2	Untersuchung von Heparinderivaten mit und ohne Selektin-Bindungsfähigkeit an mP-Sel-Fc-Chimären	132
4.3	Biosensoruntersuchung Selektinligand-basierter Tumorzellmodelle	136
4.3.1	Untersuchung der Lateralverteilung von Selektinliganden mittels LSM	138

4.3.2	Bindung von mP-Selektin-Fc-Chimären an Ligand-haltigen Modellmembranen	143
4.3.3	Liposomen als Tumorzellmodelle	145
4.3.4	Inhibition der Liposomenbindung durch Heparin	147
4.4	Untersuchung der VLA-4-Beteiligung an der Tumorzellmetastasierung mittels SAW-Biosensors	151
4.4.1	Optimierung der Messparameter für Zellbindungsuntersuchungen am SAW-Biosensor	152
4.4.2	Einfluss der Integrinaktivierung auf die Zellbindung an immobilisiertem VCAM-1 und Natalizumab	155
4.4.3	Untersuchung der Wechselwirkung von Heparin mit VCAM-1 und Natalizumab	157
4.4.4	Inhibition der Bindung von MV3-Melanomzellen durch Heparin	159
4.5	Isolierte Untersuchung der Bindung von Heparin an VLA-4	162
4.5.1	Gewinnung und Charakterisierung von VLA-4-haltigen Membranvesikeln	162
4.5.2	Immobilisation von VLA-4-haltigen Membranvesikeln auf SAW-Sensorchips	165
4.5.3	Detektion und kinetische Betrachtung der Bindung von LMWH an membrangebundenem VLA-4	167
5	Zusammenfassung	173
	Tabellenverzeichnis	175
	Abbildungsverzeichnis	176
	Literaturverzeichnis	181
	Publikationsliste	201
	Verfassererklärung	203
	Lebenslauf	205

Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström (10^{-10} m)
AFM	engl. Atomic Force Microscopy, dt. Rasterkraftmikroskopie
anti-P-Sele-mAb	humanes P-Selektin-bindender monoklonaler Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dem.	demineralisiertes Wasser
AS	Aminosäure
BSA	Rinderserum-Albumin
CD	engl. Cluster of Differentiation, dt. nach Oberflächenmerkmalen geordnete Rezeptorklasse
CLA	engl. Lymphocyte-associated Antigen, dt. Haut-T-Lymphozyten assoziiertes Antigen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DS	engl. Degree of Sulfation, dt. Sulfatierungsgrad
DSPC	1,2-Distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DTT	Dithiothreitol
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N</i> '-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid
EGF	engl. Epidermal Growth Factor, dt. epidermaler Wachstumsfaktor
ePSGL-1	endothelialer P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1
ESI-MS	Elektrospray-Ionisation-Massenspektroskopie
ESL-1	E-Selektin-Ligand-1
EZM	Extrazelluläre Matrix
FimH	Mannose bindendes Adhesin
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FT	Fucosyltransferase
G-418	Geneticin

HCELL	E- und L-Selektin-Ligand hämatopoetischer Progenitorzellen
HECs	engl. High Endothelial Cells
HEV	Postkapillare Venolen mit dickem Endothel
HiT	Heparin-induzierte Thrombozytopenie
hL-Sel-Fc-Chim.	humane L-Selektin-Fc-Chimären
HPLC	engl. High-Performance Liquid Chromatography, dt. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HUVEC	engl. Human Umbilical Vein Endothelial Cell, dt. Humane-Nabelschnurvenen-Endothelzellen
I.E.	Internationale Einheit
ICAM	engl. Inter Cellular Adhesion Molecule, dt. Interzelluläres Adhäsionsmolekül
IFN- α	Interferon- α
Ig-SF	Immunglobulin-Superfamilie
IL-1	Interleukin-1
INCAM-110	engl. Inducible Cell Adhesion Molecule-110, dt. Induzierbares Zelladhäsionsmolekül-110
IUPAC	engl. International Union of Pure and Applied Chemistry, dt. Internationale Union für reine und angewandte Chemie
k_{Ass}	Assoziationskonstante
k_{Diss}	Dissoziationskonstante
K_{D}	Gleichgewichtsdissoziationskonstante
L ⁻	L-Selektin-defiziente Mäuse
LFA-1	Lymphozytenfunktion-assoziiertes Antigen-1
LMWH	engl. Low Molecular Weight Heparin, dt. niedermolekulares Heparin
LSM	konfokales Laser-Scanning-Mikroskop
Mac-1	Macrophagen-Antigen-1
MAdCAM-1	engl. Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule-1, dt. Mucosa-Adressin-Zelladhäsionsmolekül-1
MIDAS	engl. Metal Ion Dependent Adhesion Site, dt. Metallionenabhängiges Bindungsmotiv
mP-Sel-Fc-Chim.	murine P-Selektin-Fc-Chimären
MUA	engl. 11-mercapto undecanoic acid, dt. 11-Mercapto-undecansäure

MW	engl. Molecular Weight, dt. Molare Masse
MWCO	engl. Molecular Weight Cut-Off, dt. Molekülgrößenabhängige Trenngrenze
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
P [±]	Mäuse mit einer Defizienz für endotheliales P-Selektin, die aber thrombozytäres P-Selektin exprimieren
P ⁻	P-Selektin-defiziente Mäuse
PAP	Probenauftragpuffer
PAS	Protein-A-Sepharose
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PE	Polyethylen
PhyS	Phycarinsulfat
PMMA	Polymethylmethacrylat
pN	Piconewton
PNAd	engl. Peripheral Lymph Node Addressin, dt. Peripheres Lymphknoten-Adressin
POPC	Palmitoyl-2-oleyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
PSGL-1	P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1
PVDF	Polyvinylidendifluorid
QCM	engl. Quartz Crystal Microbalance, dt. Quarzmikrowaage
RGD	Tripeptid bestehend aus Arginin-Glycin-Aspartat
RIfS	reflektometrische Interferenzspektroskopie
rPSGL-1	rekombinanter P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
SAW	engl. Surface Acoustic Wave, dt. akustische Oberflächenwelle
SCR	Short Consensus Repeat
SDS	engl. sodiumdodecylsulfate, dt. Natriumdodecylsulfat
sLe ^a	Neu5Ac α 2 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 3[Fuc α 1 \rightarrow 4]GlcNAc-O-R
sLe ^X	Neu5Ac α 2 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4[Fuc α 1 \rightarrow 3]GlcNAc-O-R
SPR	engl. Surface Plasmon Resonance, dt. Oberflächenplasmonresonanz

ssDNA	engl. single stranded Desoxyribonucleic Acid, dt. Einzelstrang-Desoxyribonucleinsäure
TBS	engl. Tris-buffered Saline, dt. Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-10fach	Tris-gepufferte Salzlösung-Konzentrat 10fach
TBS-T	Tris-gepufferte-Salzlösung mit Tween-Zusatz (0,2%)
TCA	engl. Trichloroacetic Acid, dt. Trichloressigsäure
TFPI	engl. Tissue Factor Pathway Inhibitor, dt. Inhibitor des Wachstumsfaktor-Freisetzungsweges
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
U	Umdrehungen
UFH	unfraktioniertes Heparin
VCAM-1	engl. Vascular Cell Adhesion Molecule-1, dt. Vasculäres Zelladhäsionsmolekül-1
VLA-4	Very Late Activation Antigen-4
vs.	versus
VTE	venöse Thromboembolie

1 Einleitung

Kaum eine andere medizinische Diagnose bringt Menschen an einen derartigen Wendepunkt im Leben wie die Erkennung einer Krebserkrankung. Zusammen mit all den Veränderungen, die das Wissen um einen Tumor im eigenen Körper mit sich bringt, ist die Frage nach dem Vorhandensein von Metastasen und dem Fortschreiten der Metastasierung entscheidend für die Hoffnung auf eine Genesungsmöglichkeit. Denn die meisten Patienten versterben nicht an dem Primärtumor, sondern an Tochtergeschwülsten, die sich in benachbarte oder entfernte Organe ausbreiten können.

Die Mechanismen, die das Eindringen von Tumorzellen in die Blutbahn, Überleben, Transport, Ansiedlung in anderen Organen und das weitere Wachstum kontrollieren, sind sehr komplex und bieten bisher noch keine klinisch relevanten pharmakologischen Ansatzpunkte zur Intervention an. Das Verständnis der Wechselwirkungen von Tumorzellen mit anderen physiologischen Strukturen kann dazu beitragen, Interventionspunkte und Zielstrukturen für die Prävention und die Behandlung der Metastasierung zu identifizieren.

Tumorzellen nutzen dabei oftmals physiologische Prozesse, um ihre eigene Verbreitung voranzutreiben. Selektine, Kohlenhydrat-bindende Zelladhäsionsmoleküle vermitteln im Rahmen von Entzündungsprozessen die Leukozytenrekrutierung und tragen damit zur Immunantwort bei. Viele Tumorzellen sind in der Lage, mit Selektinen in Wechselwirkung zu treten. Zum Schutz vor dem Immunsystem können sie sich mit Thrombozyten und Leukozyten umgeben und gleichzeitig Mechanismen zur Extravasation nutzen. Neben Selektinen sind vor allem Wechselwirkungen von Integrinen mit Molekülen der Immunglobulin-Superfamilie an der adhäsiven Interaktion von Tumorzellen, insbesondere zur Bindung an das Gefäßendothel, beteiligt.

Die Hemmung solcher Bindungsprozesse stellt einen vielversprechenden Ansatz zur Hemmung der hämatogenen Metastasierung im Gesamten dar. Die Gabe von Heparin zur Prophylaxe thromboembolischer Ereignisse, wie sie im Rahmen von Krebserkrankungen häufig auftreten, zeigte in klinischen Studien eine antimetastatische Wirkung. Diese wird unter anderem der Wechselwirkung von Heparin mit Selektinen zugerechnet. Da die Wirkung nicht vollständig mit der antikoagulatorischen Aktivität

des Heparins zu erklären ist, stellen die Adhäsionsrezeptor-vermittelten Mechanismen ein aktuelles Forschungsthema dar. Die Heparinwirkung an Selektinen wird derzeit intensiv in Tiermodellen und in Zell-basierten *in vitro*-Studien untersucht. Die meisten dieser Methoden erlauben die Detektion des Effektes der Heparinwirkung, während die molekularen Grundlagen dieser Interaktion noch nicht vollständig verstanden sind.

Von Selektinen und Integrinen ist bekannt, dass sie komplexe Mechanismen zur Steuerung von Affinität und Avidität bei der Ligandbindungsfähigkeit ausnutzen. Im Verständnis dieser Steuerungsprozesse liegt ein Schlüssel für die erfolgreiche Suche nach potentiellen Inhibitoren. Akustische Biosensoren bieten die Möglichkeit, molekulare Interaktionen in Echtzeit zu verfolgen.

Ziel dieser Arbeit soll die Biosensoruntersuchung der Heparinwirkung an Selektinen und dem Integrin VLA-4 als neuer Zielstruktur antimetastatischer Therapieansätze sein. Die Quarzmikrowaage und der akustische Oberflächenwellensensor sollen dabei als Werkzeuge etabliert werden, um Modelle aufzustellen, die die Adhäsionsrezeptor-Heparin-Wechselwirkung auf molekularer Ebene erfassen. Gleichzeitig soll durch die Anwendung liposomaler und zellulärer Tumorzellmodelle ein umfassenderes Bild der Bedeutung von Heparin als Inhibitor der Tumorzellmetastasierung gewonnen werden.

2 Theoretischer Teil

2.1 Selektine

2.1.1 Aufbau und Physiologie der Selektine

Selektine sind Adhäsionsrezeptoren, die Kohlenhydratstrukturen als Liganden binden. Der Name, bestehend aus *Sel* für „selektiv“ und *Lektin*, der Bezeichnung für kohlenhydratbindendes Protein bringt diese Eigenschaft zum Ausdruck.

Die Familie der Selektine besteht aus drei Mitgliedern, die untereinander einen sehr hohen Verwandtschaftsgrad aufweisen: L-Selektin (gp90^{MEL-14}, LECAM-1, CD62L), E-Selektin (ELAM-1, CD62E), und P-Selektin (PADGEM, GMP-140, CD62P). Die drei Selektine sind im Zuge der Säugetierentwicklung hoch konserviert. So unterscheiden sich die bindenden Lektindomänen von murinem, humanem oder bovinem Selektin kaum [1]. Die Buchstaben L, E und P stehen für die zelluläre Lokalisation der verschiedenen Selektine. So findet man L-Selektin auf Leukozyten, E-Selektin auf Endothelzellen und P-Selektin auf Blutplättchen (engl. platelets), darüber hinaus aber auch auf Endothelzellen. Alle drei Selektine sind Glykoproteine und besitzen fünf grundsätzliche Strukturmerkmale: einen kurzen zytoplasmatischen Teil (17-35 AS je nach Selektin-Subtyp), eine einzelne membrandurchspannende Domäne, eine bestimmte Anzahl von sich wiederholenden Proteinbausteinen, die als „short consensus repeats“ (SCR) bezeichnet werden, eine Domäne, die aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit dem epidermalen Wachstumsfaktor als EGF¹-Domäne (30 AS) bezeichnet wird und am *N*-terminalen Ende des Proteins eine Lektin-Bindungsdomäne (120 AS). Aufgrund der Ähnlichkeit zu anderen Lektindomänen, die wie die der Selektine ihre Liganden Ca²⁺-abhängig binden, gehört sie in die Familie der C-Typ-Lektine. E-, L- und P-Selektin weisen im Bereich der Lektindomäne eine Sequenzhomologie von 60% auf. Der augenscheinlichste Unterschied besteht in der Anzahl der SCR. Während L-Selektin nur zwei SCR besitzt, verleihen sechs SCR beim E-Selektin und neun SCR beim P-Selektin diesen beiden Vertretern eine gewisse räumliche Reichweite, die für

¹engl. Epidermal Growth Factor

die Präsentation der Lektindomäne bei Bindungsprozessen von Vorteil ist [2]. Jedes einzelne SCR besteht aus 60 AS [1, 3].

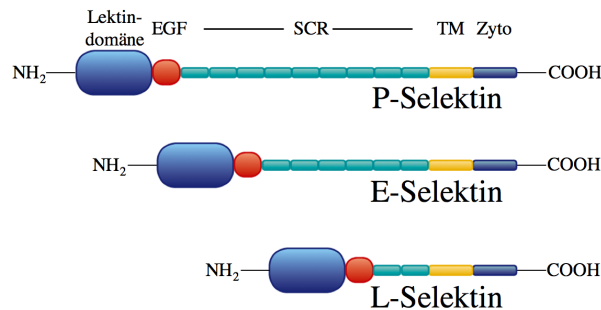


Abb. 2.1: Aufbau der Selektine. Die drei Vertreter der Selektinfamilie P-, E- und L-Selektin in schematischer Darstellung nach Hanley [4]. Am *N*-terminalen Ende befindet sich die Lektindomäne an die sich die EGF-Domäne (EGF) und die Short-Consensus-Repeats (SCR) anschließen. Auf die transmembranäre Domäne (TM) folgt das *C*-terminale Ende der zytoplasmatischen Domäne (Zyto).

Die Konformationsaufklärung von E-Selektin durch Ko-Kristallisation mit seinem Liganden und anschließender Röntgenstrukturanalyse durch Graves und Mitarbeiter 1994 legte eine wichtige Rolle der EGF-Domäne bei der Bindung der Zuckerliganden gemeinsam mit der Lektindomäne nahe [5]. Kolbinger und Mitarbeiter konnten durch Mutagenesestudien dagegen zeigen, dass die Anwesenheit der Lektindomäne allein für die Spezifität der Bindung ausreicht [6]. Phan et al. postulierten, dass die EGF-Domäne durch Aufrechterhaltung einer ganz bestimmten Konformation zu einer Affinitätserhöhung des Rezeptors führt [7].

Der kurzen zytoplasmatischen Domäne wird vor allem eine Rolle bei der Signaltransduktion zugeschrieben. Durch ihre Verbindung zum Zytoskelett kann sie zum Beispiel die später beschriebene Freisetzung von P-Selektin aus Speichergranula regulieren [8]. Bei L-Selektin führt die Entfernung der zytoplasmatischen Domäne zum Verlust der Rolleigenschaften von Leukozyten, obwohl die prinzipielle Bindungsfähigkeit und auch die Affinität der Lektin-Bindungsstelle erhalten bleiben [9].

Die physiologische Bedeutung der Selektine liegt in der Rekrutierung von Leukozyten im Zuge von Entzündungsprozessen. Dabei übernehmen Selektine durch Bindung ihrer Liganden die Funktion der initialen Kontaktaufnahme zwischen Endothelzellen und Leukozyten. Die Leukozyten vollführen dabei zuerst sprungartige Bewegungen, die später in eine charakteristische Rollbewegung entlang des Endothels übergeht. Diese beiden Vorgänge werden als „tethering“ und „rolling“ bezeichnet. Dadurch werden die Leukozyten derart abgebremst, dass es zusätzlich zu einer Abflachung der Leukozyten kommt, die mit einer vermehrten Präsentation weiterer Selektine/bzw.

Selektinliganden und der Integrine kommt. Im Anschluss an diesen Prozess können Rezeptoren der Integrinfamilie durch Bindung ihrer Liganden die Leukozyten zum Arrest auf dem Endothel zwingen, der Voraussetzung für die anschließende Transmigration in das entzündete Gewebe. Die bisher beschriebenen Prozesse werden noch dadurch verstärkt, dass die Annäherung der Leukozyten an das Endothel diesen die Möglichkeit geben, in Wechselwirkung miteinander zu treten und durch Chemokine Integrine zu aktivieren. Der Gesamtprozess aus Kontaktaufnahme, Rollbewegung, fester Adhäsion und Transmigration wird als Adhäsionskaskade der Leukozyten bezeichnet [10]. Abbildung 2.2 verdeutlicht das komplexe Zusammenspiel der verschiedenen Selektine und ihrer Liganden sowie die Beteiligung der verschiedenen Integrine bei der Rekrutierung von Leukozyten im Rahmen von Entzündungsreaktionen.

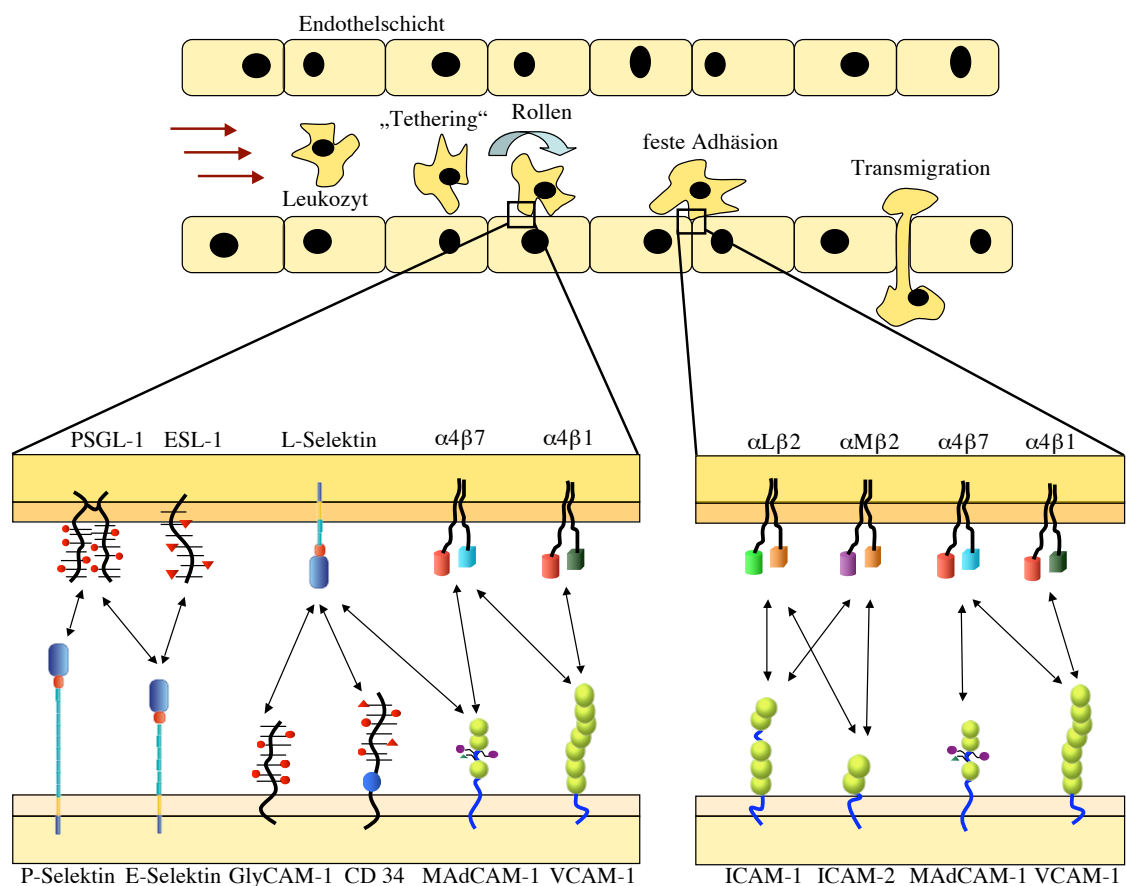


Abb. 2.2: Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen in der Adhäsionskaskade der Leukozyten. Selektine vermitteln „Tethering“ und Rollen der Leukozyten über Wechselwirkungen mit ihren Liganden. Integrin-Wechselwirkungen mit Mitgliedern der Immunglobulin-Superfamilie führen zur festen Adhäsion der Leukozyten. Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis. Darstellung modifiziert nach Bendas [11].

Auch wenn die drei Selektine sich in ihrer Struktur sehr ähneln, so gibt es bezüglich ihres Vorkommens, ihrer Aktivierung und ihrer Wirkung Unterschiede. E-Selektin

wird wie schon erwähnt auf Endothelzellen exprimiert. Im Vergleich zu den anderen beiden Selektinvertretern kommt es erst spät im Rahmen von Entzündungsreaktionen zur Wirkung, da erst nach drei bis vier Stunden maximale Konzentrationen von E-Selektin erreicht werden. Diese zeitliche Verzögerung kann mit der *de novo*-Synthese von E-Selektin nach Stimulation durch Zytokine wie IL-1 und TNF- α oder nach Stimulation mit Lipopolysacchariden erklärt werden [12]. Die Genexpression wird durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B gesteuert, für den es drei Bindungsstellen auf dem E-Selektin-codierenden Gen gibt [13]. Erst nach 24 Stunden werden wieder die Ausgangskonzentrationen von E-Selektin auf der Zelloberfläche erreicht. Die Entfernung erfolgt dabei über Endozytose und anschließenden Abbau in Lysosomen. Im Vergleich zu den beiden anderen Selektinen weist E-Selektin damit die längste Dauer der Wirkungsvermittlung im Entzündungsprozess auf.

L-Selektin wird konstitutiv auf Leukozyten exprimiert. Es stellt das humane Homologe des murinen peripheren Lymphknoten „homing“-Rezeptors dar, der für die zielgerichtete (engl. „homing“) Rekrutierung von Lymphozyten in das Lymphsystem verantwortlich ist [14]. Darüber hinaus ist L-Selektin essentiell für das Leukozytenrollen entlang des Endothels im Rahmen von Entzündungsprozessen. Dabei spielt neben der besonderen Bindungskinetik des L-Selektins an seine Liganden (siehe Kapitel 2.1.3) auch die schnelle Entfernung des L-Selektins selbst von der Oberfläche der Leukozyten eine entscheidende Rolle. Das rasche „Abwerfen“ des Rezeptors durch Proteolyse wird als „shedding“ bezeichnet. Es konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung dieser Proteolyse das Rollverhalten der Leukozyten unterdrückt und statt dessen zu einer festen Adhäsion der Leukozyten führt [15]. Zytokine wie TNF- α oder IL-8 können die Geschwindigkeit des „sheddings“ erhöhen [16]. Dabei entstehendes lösliches L-Selektin (sL-Selektin) wirkt selbst im Sinne einer negativen Rückkopplung auf die Leukozytenadhäsion [17].

P-Selektin wird wie L-Selektin konstitutiv synthetisiert. Im Gegensatz zu L-Selektin wird P-Selektin aber in α -Granula der Thrombozyten und in Weibel-Palade-Körperchen von Endothelzellen gespeichert. Die Präsentation erfolgt nach Stimulierung durch Thrombin, Histamin oder Phorbolmyristat. Dadurch wandern die P-Selektin-haltigen Zellkompartimente zur Zellmembran und verschmelzen mit dieser, so dass P-Selektin auf der Zelloberfläche erscheint. Dieser Vorgang vollzieht sich innerhalb von zehn Minuten [18]. Gleichzeitig regen Zytokine und Lipopolysaccharide die *de novo*-Synthese von P-Selektin auf Transkriptionsebene an [19]. Die Entfernung des P-Selektins von der Zelloberfläche erfolgt innerhalb von 30 bis 60 Minuten durch Endozytose. Es kann dann entweder erneut in den eben genannten Speicherorten vorrätig gehalten oder in Lysosomen gänzlich abgebaut werden [20]. Das Zusammenspiel

von E- und P-Selektin auf der Endotheloberfläche stellt somit einen hochregulierten Prozess dar, um die Rekrutierung von Leukozyten einerseits sehr schnell sicherzustellen (durch P-Selektin) und auf der anderen Seite eine langanhaltende Wirkung zu erzielen (durch E-Selektin).

2.1.2 Selektinliganden

Im Kapitel 2.1.1 wurde bereits auf die Namensgebung der Selektine und die Erkennung von Kohlenhydratstrukturen als Liganden eingegangen. Nachdem eine gewisse Affinität aller Selektine zur Blutgruppenderminante Lewis^X nachgewiesen werden konnte, zeigten Foxall et al. 1992, dass alle drei Selektine das sialysierte Lewis^X (sLe^X, Neu5Ac α 2 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4[Fuc α 1 \rightarrow 3]GlcNAc-O-R)² binden [21], wenn auch mit sehr geringer Affinität ($K_D = 0,5 - 1,0$ mM) [22, 23]. Neben sLe^X bindet auch sein Positionsisomer sLe^a (Neu5Ac α 2 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 3[Fuc α 1 \rightarrow 4]GlcNAc-O-R) alle drei Selektine mit gleicher Affinität [24, 25].

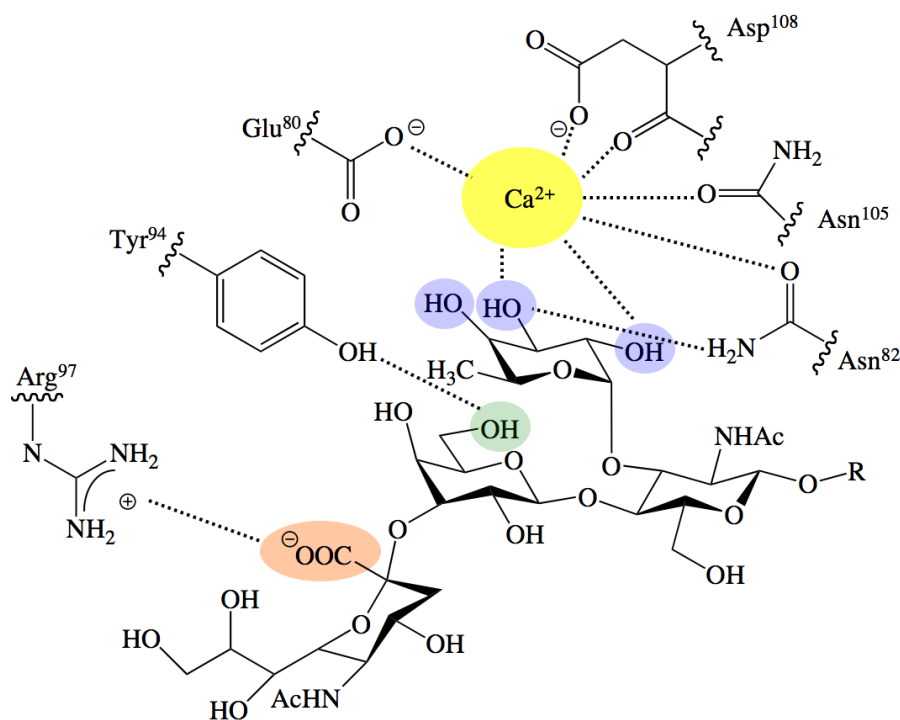


Abb. 2.3: Sialyl Lewis^X. Dieses Tetrasaccharid bestehend aus Fucose, Galaktose, *N*-Acetylglucosamin und Sialinsäure ist das kleinste Bindungsepitop, das von allen drei Selektinen erkannt wird. Hier ist sLe^X in der Bindungstasche von E-Selektin dargestellt. An der Bindung der Lektindomäne der Selektine sind die negative Ladung der Sialinsäure, sowie die 2-,3- und 4-ständige Hydroxygruppe der Fucose und die 6-ständige Hydroxygruppe der Galaktose beteiligt. Die Bindung wird über Ca²⁺ koordiniert.

²engl. sialyl Lewis^X

Die meisten Selektinbindungsepitope liegen nicht isoliert vor, sondern in Form von muzinähnlichen Glykoproteinen. Muzine (lat. mucus, Schleim) sind langgestreckte, stark verzweigte Glykoproteine mit einer zentralen Proteinkette, von der aus eine Vielzahl von Zuckerresten abzweigen. Die Zuckerreste verleihen den Muzinen einen stark hydrophilen Charakter und schützen das Proteingrundgerüst vor enzymatischem Abbau. Im so genannten Rückgrat des Proteins finden sich vor allem die Aminosäuren Serin, Threonin und Prolin. Die Zuckerreste, bei denen vor allem fucosylierte Laktosaminoglykane von Bedeutung sind, sind über *O*-glykosidische Bindungen an das Proteingerüst kovalent gebunden. Die Bindung von *N*-Acetylgalaktosamin als erster Zuckerrest der Seitenkette an Serin oder Threonin unterscheidet Muzine von den meisten anderen Glykoproteinen, bei denen *N*-Acetylgalaktosamin über eine Amidgruppe mit Asparagin verbunden ist. Die Bezeichnung „muzinähnliche“ Glykoproteine bei den Selektinliganden ist in der Tatsache begründet, dass diesen die so genannten „Tandem-Wiederholungen“ (engl. „tandem repeats“) fehlen, einer bestimmten Abfolge von sich wiederholenden Aminosäuren wie sie für „echte“ Muzine typisch ist [26, 27].

Durch die Präsentation vieler potentieller Bindungsepitope bei muzinähnlichen Selektinliganden kann eine Affinitätserhöhung vom millimolaren Bereich für isoliertes sLe^X zum hohen nanomolaren Bereich für natürlich vorkommende Muzinliganden festgehalten werden [28, 29]. Welche Bedeutung diese kinetischen Parameter auf die Funktion der Selektine haben, wird an anderer Stelle (Kapitel 2.1.3) erklärt.

In den folgenden Abschnitten soll auf die Liganden der unterschiedlichen Selektine eingegangen werden.

E-Selektin-Liganden

ESL-1 (E-Selektin-Ligand-1) ist der bekannteste E-Selektin-Ligand. Er wurde erstmals durch Levinovitz et al. 1993 beschrieben und als 150 kD schweres fucosyliertes, membranständiges Glykoprotein charakterisiert [30]. Während bei den meisten anderen Selektinliganden die Anbindung der Zuckerreste an das Proteinrückgrat über *O*-glykosidische Bindungen erfolgt, sind die Zuckerreste im ESL-1 *N*-glykosidisch angebunden. Da E-Selektin und seine Liganden im Rahmen dieser Arbeit nicht näher betrachtet werden, soll an dieser Stelle nur kurz erwähnt werden, dass es zu ESL-1 zwei Homologe gibt, den „cysteine rich FGF receptor“, das den „basic fibroblast growth factor“ (FGF³) bindet [31] und auch identisch mit dem „Golgi complex-localized glycoprotein-1“ (GLG1⁴) ist, das auch als MG-160 bezeichnet wird [32].

³engl. basic Fibroblast Growth Factor

⁴engl. Golgi complex-Localized Glycoprotein 1

ESL-1 unterscheidet sich aber von diesen intrazellulär vorkommenden Proteinen in seinem posttranslationalen Fucosylierungsmuster, das entscheidend für die Bindung an E-Selektin ist. Als E-Selektin-Ligand kann es demnach nur bei Expression an der Zelloberfläche und bei korrekter Glykosylierung fungieren [33]. Zu P- und L-Selektin hat ESL-1 keine Affinität [34].

Als weitere potentielle Liganden für E-Selektin sind das Haut-assoziierte Lymphozyten-Antigen (CLA⁵), als speziell glykosylierte Form des PSGL-1 [35], CD43 [36], der E- und L-Selektin-Ligand-hämatopoetischer Progenitorzellen (HCELL⁶), eine spezielle Glykoform des CD44 [37], β 2-Integrine [38] und Glykolipide [39] zu nennen. Für humanes L-Selektin ist ebenfalls eine Bindung an E-Selektin beschrieben [40, 41].

Der „jüngste“ E-Selektin-Ligand ist „death receptor-3“ (DR3⁷), der auf den KOLONKARZINOMZELLINIEN HT-29 und LoVo exprimiert wird. Er kann durch E-Selektin aktiviert werden und führt nach Kinasenaktivierung zur endothelialen Transmigration der Tumorzellen, was diesen einen Überlebensvorteil verschafft [42].

L-Selektin-Liganden

Die Rolle des L-Selektins wurde erstmals bei der Untersuchung des Übergangs von Leukozyten aus der Blutbahn in das Lymphsystem erkannt. Dieser Übergang findet in den so genannten „high endothelial venules“ (HEV⁸) statt, die ihren Namen der Tatsache verdanken, dass hier die Endothelzellen nicht flach sind, sondern eine kubische Form besitzen (HECs⁹), so dass die Zellen ein vergleichsweise dickes Endothel ausbilden [43]. Diese spezialisierten postkapillaren Venolen findet man in verschiedenen sekundären lymphatischen Organen wie Lymphknoten, Rachenmandeln, Peyerschen Plaques in Dünndarm und Wurmfortsatz sowie in kleineren Aggregaten lymphatischen Gewebes im Magen und Dickdarm [44]. Man findet sie nicht in der Milz.

In einer grundlegenden Arbeit aus dem Jahr 1964 konnten Gowans und Knight mithilfe von Gewebsschnitten die Lokalisation, Extravasation und Rezirkulation von Leukozyten aus der Blutbahn in das Lymphsystem und zurück im Bereich der HEV von Lymphknoten nachweisen und trugen damit maßgeblich zum Verständnis der Spezifität der Immunabwehr bei [45]. 1976 gelang es, die molekulare Basis für die Extravasation durch Antikörperexperimente zu klären. Als Zielstruktur für den Antikörper MEL-14 wurde das Antigen gp^{MEL-14} identifiziert, das später als CD62L bzw.

⁵engl. Cutaneous Lymphocyte-associated Antigen

⁶engl. Hematopoetic Cell E- and L-selectin Ligand

⁷engl. Death Receptor-3

⁸engl. High Endothelial Venules

⁹engl. High Endothelial Cells

L-Selektin bezeichnet wurde [14]. Während L-Selektin auf Leukozytenseite entdeckt wurde, konnten auf der Seite der HEV verschiedene L-Selektin-Liganden charakterisiert werden. Dies gelang zuerst für das „glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1“ (GlyCAM-1¹⁰), für CD34 und für Podocalyxin. Sie alle zählen zu den Sialomuzinen. Das Vorhandensein von Sialinsäure in den Ligandstrukturen konnte mittels Sialinidasebehandlung festgestellt werden [46]. Während Podocalyxin und CD34 membranständige Rezeptoren darstellen, ist GlyCAM-1 ein löslicher Rezeptor, der im Plasma, aber auch in den Milchdrüsen und der Milch verschiedener Spezies vorkommt. Dabei bindet GlyCAM-1 aus der Milch nicht an L-Selektin [47]. Ohne Membranverankerung vermag GlyCAM-1 nicht direkt an der Leukozytenrezirkulation teilzunehmen. Eine indirekte Beteiligung wird aber über die Aktivierung von Integrinen angenommen [48].

GlyCAM-1 ist der am besten charakterisierte L-Selektin-Ligand. Verschiedene Sulfatierungsmuster des sLe^X sind für diesen Liganden bekannt. Als 6-Sulfo- sLe^X bezeichnet man sLe^X mit einer Sulfatierung am C6 des GlcNac. Ist dagegen die Position C6 der Galaktose sulfatiert, wird die Struktur 6'-Sulfo- sLe^X genannt. Sie wurde erstmals in Mäusen identifiziert. Man weiß, dass 6-Sulfo- sLe^X eine höhere Affinität zu L-Selektin aufweist als sLe^X . Die physiologische Bedeutung von 6'-Sulfo- sLe^X ist noch nicht geklärt, zumal in sekundären Lymphorganen des Menschen bislang kein 6'-Sulfo- sLe^X nachgewiesen werden konnte [49, 50].

Bei der weiteren Suche nach möglichen Selektinliganden kam vor allem der Antikörper MECA-79 zum Einsatz, mit dem einerseits HEV in Lymphknoten markiert werden, der andererseits aber auch eine Blockade des Lymphozyten-„homings“ vermittelt [51]. Dabei bindet MECA-79 verschiedene Glykoproteine, die unter dem Begriff „peripheral lymph node addressins“ (PNAd¹¹) zusammengefasst werden. Neben murinem GlyCAM-1, humanem oder murinem CD34 und humanem Podocalyxin sind das 2002 charakterisierte humane oder murine Endomucin als weiteres Sialomucin [52] und das „mucosal addressin cell adhesion molecule-1“ (MAdCAM-1¹²) zu nennen. Es wird auf mesenterialen Lymphknoten und auf HEV der Peyerschen Plaques exprimiert. Seine kurze Muzindomäne verleiht ihm die Fähigkeit L-Selektin zu binden [53]. Darüber hinaus besitzt MAdCAM-1 aber auch eine Immunglobulindomäne, die es zur Bindung an das Lymphozyten-Integrin $\alpha 4\beta 7$ befähigt. Diese Bindung ist für das „homing“ von Lymphozyten in Darm-assoziierten lymphoiden Organen und Geweben von großer Bedeutung [54].

¹⁰engl. Glycosilation-dependent Cell Adhesion Molecule-1

¹¹engl. Peripheral Lymph Node Adressin

¹²engl. Mucosal Adressin Cell Adhesion Molecule-1

Es ist bekannt, dass die HEV humaner Rachenmandeln noch weitere L-Selektin-Liganden ohne Muzinstruktur tragen, deren genaue Struktur aber noch aufgeklärt werden muss. Diese Liganden stellen keine Zielstruktur für MECA-79 dar und werden nicht zu den PNAd gezählt [55].

Mithilfe von GlyCAM-1- und/oder CD34-Knock-Out-Mäusen konnte gezeigt werden, dass das Fehlen einer dieser beiden Liganden keinen Effekt auf das Lymphozyten-„homing“ hat, während die Unterdrückung eines Gens (engl. „gene silencing“), das die posttranslationale Glykosylierung von gleichen Bereichen der beiden Liganden steuert, zum Verlust der Lymphozyten-„homings“ führt.

P-Selektin-Liganden

PSGL-1 wurde erstmals 1992 durch Moore et al. beschrieben. Sie gewannen einen P-Selektin-Liganden aus der Zellmembran von myeloiden Zellen und identifizierten ihn als sialinhaltiges Glykoprotein [56]. Sein Molekulargewicht konnte mit 250 kD bestimmt werden. PSGL-1 ist ein langgestrecktes Homodimer, dessen Monomere über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Schon in frühen Arbeiten konnte durch die Behandlung mit verschiedenen Sialinidasen und weiteren Enzymen gezeigt werden, dass PSGL-1 neben dem sLe^X-Motiv *O*-glykosidisch verknüpfte α -1,3-Fucosylierungen und α -2,3-Sialysierungen enthält, die an Threonin⁵⁷ gebunden sind. Da die Behandlung mit Sialinidasen die Bindungsfähigkeit PSGL-1-exprimierender Zellen nicht deutlich herabsetzen konnte, wurde postuliert, dass nur ein Teil aller Sialinsäuren und sLe^X-Strukturen derartig gebunden sind [57].

Wilkins et al. untersuchten die Kohlenhydratstrukturen, die *O*-glykosidisch an Serin und Threonin gebunden sind näher und isolierten aus den Zellmembranen von HL-60-Zellen PSGL-1, dessen Zucker-Vorläufer-Moleküle metabolisch mit ³H radioaktiv markiert wurden. Sie fanden heraus, dass PSGL-1 weniger stark fucosyliert ist als angenommen und dass der größte Teil der *O*-Glykane aus neutralen oder sialinisierten Formen des „Core-2“-Tetrasaccharids Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 6[Gal β 1 \rightarrow 3]GalNAcOH besteht. Der Begriff „Core-2 structure“ beschreibt die Verzweigung von Kohlenhydraten durch β -1,6-Verknüpfung von GalNAc mit GlcNAc. Ein verhältnismäßig kleiner Anteil der *O*-Glykane ist $\alpha\beta$ -1,3-fucosyliert und teilt sich in zwei Hauptfraktionen auf, die beide das sLe^X-Motiv besitzen. Eine Fraktion weist ein disialysiertes, monofucosyliertes Glykan auf und die andere ein monosialysiertes, trifucosyliertes Glykan mit einem Polylaktosamin-Rückgrat. Die Wichtigkeit der fucosylierten Anteile konnte dadurch demonstriert werden, dass das Vorhandensein der beschriebenen „Core-2“-Struktur alleine nicht für die P-Selektin-Bindungsfähigkeit ausreicht. Leukosialin (CD43), das ebenfalls aus HL-60-Zellen isoliert wurde, besitzt zwar

die gleiche „Core-2“-Struktur, aber keine fucosylierten Glykane und weist keine Selektin-Bindungsfähigkeit auf [58].

Die Wichtigkeit von ladungsinduzierten Wechselwirkungen für die Selektinbindung lässt sich mit einer Affinitätssteigerung der Bindung von PSGL-1 durch die *N*-terminale Sulfatierung der Tyrosinreste an den Positionen 46, 48 und 51 erklären. Bei partieller Desulfatierung bleibt eine gewisse Bindungsfähigkeit des PSGL-1 erhalten. Fehlen aber alle Sulfatgruppen, ist eine P-Selektin-Bindung nicht mehr möglich [59].

Zwar exprimieren die meisten Leukozyten PSGL-1, eine P-Selektin-Bindung wird aber nur bei 10-20% aller Lymphozyten erreicht. Wie schon für E- und L-Selektin-Liganden beschrieben, stellt auch PSGL-1 hohe Ansprüche an die posttranslationale Glykosylierung und erfordert darüber hinaus die schon erwähnte Tyrosinsulfatierung, um die P-Selektin-Bindungsfähigkeit zu gewährleisten [60].

Durch seine Länge von 50 nm besitzt PSGL-1 eine relativ große Reichweite, die dadurch verstärkt wird, dass es auf den Spitzen der Mikrovilli der Leukozyten lokalisiert ist. Beide Faktoren zusammen prädestinieren die P-Selektin-PSGL-1-Wechselwirkung für die initiale Kontaktaufnahme von Leukozyten mit dem Endothel im Entzündungsprozess [61].

Bei der Beschreibung der Liganden für E- und L-Selektin wurde schon erwähnt, dass PSGL-1 auch diese beiden Selektinvertreter zu binden vermag. Dabei hat L-Selektin die gleichen strukturellen Anforderungen an PSGL-1 wie P-Selektin. Dieser Interaktion wird vor allem im Rahmen von Leukozyt-Leukozyt-Wechselwirkungen eine Bedeutung zugemessen, die zu einer Beschleunigung der Adhäsionskaskade führten. E-Selektin hingegen bindet PSGL-1 in anderer Weise. Während die „Core-2“-Struktur sich hier positiv auf die Bindung auswirkt, unterscheidet E-Selektin nicht zwischen sulfatierten und nicht-sulfatierten Tyrosinresten am *N*-terminalen Ende des Proteins [62]. Die Bindungsaffinität von PSGL-1 zu E-Selektin ist darüber hinaus etwa 50fach geringer als die zu P-Selektin, was die Unterschiede in ihrem Bindungsverhalten noch einmal hervorhebt [63].

PSGL-1 wird zusätzlich zu den Leukozyten auch auf Thrombozyten exprimiert. Die dadurch ermöglichten Thrombozyt-Endothel- und Thrombozyt-Thrombozyt-Wechselwirkung sind biologisch noch nicht zweifelsfrei eingeordnet [64]. Die konstitutive Expression von funktionstüchtigem PSGL-1 auf Endothelzellen (ePSGL-1) vermittelt die Adhäsion von Monozyten oder Monozyt-Thrombozyt-Komplexen am unstimulierten Endothel [65].

Ein P-Selektin-Ligand, der vor allem für den Prozess der Metastasierung von Bedeutung ist, ist CD24. CD24 ist ein kleines Protein bestehend aus 27 Aminosäuren und mit starker Glykosylierung, das über einen Glykosylphosphatidylinositolrest

in der Zellmembran verankert ist. Es bietet zahlreiche Anknüpfungspunkte für *O*-Glykane, da die Hälfte der Aminosäuren Serin oder Threonin sind. Die Expression von CD24 erfolgt in der Frühphase der B-Zell-Entwicklung. Es fehlt aber auf Monozyten und ausgereiften T-Zellen, so dass CD24 in gesundem Gewebe nicht zu finden ist, wohl aber auf der Oberfläche verschiedener humaner Karzinomzellen [66]. Das Vorhandensein von sLe^X-modifiziertem CD24 auf verschiedenen Karzinomzellen und das gleichzeitige Fehlen von PSGL-1 auf diesen Zellen unterstreicht die Rolle, die CD24 bei Adhäsionsvorgängen zwischen Tumorzellen und Endothel bzw. Thrombozyten spielen könnte [67].

Die Beschreibung der Vielfalt der Selektinliganden zeigt, dass diese Rezeptorfamilie auf unterschiedlichste Art und Weise Wechselwirkungen zu vermitteln vermag, die nicht nur für das Leukozytenrollen verantwortlich ist, sondern, wie der Fortgang dieser Arbeit zeigen wird, bei anderen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen von Bedeutung sind.

2.1.3 Kinetik der Selektinbindung

Das Verständnis der Selektin-vermittelten Rollbewegung von Leukozyten entlang des Endothels auf molekularer Ebene ist von entscheidender Wichtigkeit für die Suche nach möglichen Selektininhibitoren. Dabei war schon in frühen Arbeiten zu diesem Thema bekannt, dass die Betrachtung der Rezeptor-Ligand-Bindung alleine nicht ausreichen würde, das Rollphänomen zu erklären. Folgende weitere Parameter, die für Selektin-vermittelte Bewegung von Bedeutung sind, sollen im Folgenden vorgestellt werden:

- Einfluss von Scherkräften auf die kinetischen Anforderungen der Selektinbindung
- „catch bond behavior“ der Selektine
- Einfluss der Leukozytenverformung auf die Einzelbindung und die Präsentation von Bindungsepitopen
- Rezeptor- und/oder Ligandanhäufung durch „Cluster“-Strukturen

Die mechanische Belastung der Selektinbindung durch Scherkräfte, die auf die Leukozyten im Blutsystem wirken, ist eine wichtige Komponente für die Kinetik der Selektinbindung. Es ist vorstellbar, dass die Selektin-Ligand-Bindung unter Schereinfluss sehr rasch erfolgen muss, damit es zu einer Wechselwirkung kommen kann. Das rasche Zustandekommen einer Rezeptor-Ligand-Bindung ist wiederum von einer schnellen Assoziationskonstanten (k_{Ass}) abhängig. So konnten Nicholson et al. zeigen, dass die Bindung zwischen löslichem L-Selektin und immobilisiertem

GlyCAM-1 mit einer Assoziationskonstanten von $k_{Ass} > 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ eingegangen wird [68]. Die Bindung zwischen löslichem P-Selektin und seinem immobilisierten Liganden PSGL-1 wird sogar noch schneller, und zwar mit einer Assoziationskonstanten von $k_{Ass} = 4,4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ausgebildet [69]. Die schnellere Assoziationskonstante für P-Selektin kann mit dessen Beteiligung in der frühen Phase der Adhäsionkaskade der Leukozyten erklärt werden.

Da Selektine keine feste Adhäsion der Leukozyten vermitteln sollen, sondern die schon beschriebene Rollbewegung, ist es nach erfolgreich eingegangener Bindung ebenso wichtig, dass die Selektin-Ligand-Bindung auch schnell wieder gelöst wird. Diese Anforderung wird durch eine schnelle Dissoziationskonstante von $k_{Diss} > 10 \text{ s}^{-1}$ für die L-Selektin-GlyCAM-1-Bindung und von $k_{Diss} = 1,4 \text{ s}^{-1}$ für die P-Selektin-PSGL-1-Bindung erreicht. Für die Bindung von E-Selektin an seinen natürlichen Liganden ESL-1 ist ebenfalls eine schnelle Dissoziationskonstante von $k_{Diss} = 0,5 \text{ s}^{-1}$ beschrieben [70]. Daraus ergibt sich für die L-Selektin-GlyCAM-1-Bindung eine moderate Gleichgewichtsdissoziationskonstante (K_D) von $1,08 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ und für die P-Selektin-Bindung an PSGL-1 $K_D = 3,0 \cdot 10^{-7} \text{ M}$.

Betrachtet man die eingegangene Bindung zwischen Selektin und Ligand genauer, so erkennt man, dass die Bindung selbst während ihrer kurzen Lebensdauer unterschiedlichen Zugkräften durch das Scherverhalten der Leukozyten ausgesetzt ist. Der Einfluss dieser Zugkräfte (engl. „tensile forces“ bzw. „tensile strenghts“) wurde lange Zeit kontrovers diskutiert. Bell stellte schon 1978 ein theoretisches Modell zur Beschreibung von Zell-Zell-Wechselwirkungen auf und postulierte darin, dass Zugkräfte die Lebensdauer von Rezeptor-Ligand-Bindungen bei Zell-Zell-Kontakten grundsätzlich verkürzen, weil sie die Energiebarriere zwischen gebundenem und ungebundenem Zustand herabsetzen [71]. In der Literatur wird dieses Modell als „slip bond behavior“ bezeichnet. Das „slip bond behavior“ wurde lange Zeit auch für die Selektinbindung angenommen und konnte in verschiedenen Arbeiten für alle drei Selektinvertreter gezeigt werden [72–75].

Andere Arbeiten zeigten, dass durch die Einwirkung einer Zugkraft die Lebensdauer und die Stärke einer Rezeptor-Ligand-Interaktion verlängert bzw. verstärkt wird. Ein solches Phänomen kann dadurch erklärt werden, dass die Bindungspartner sich in Folge der einwirkenden Kraft besser zueinander ausrichten können. Man bezeichnet es als „catch bond behavior“ [76]. Experimentell konnte dies für die Selektin-Ligand-Bindung erstmals durch Marshall et al. gezeigt werden [77]. Mithilfe von Rasterkraftmikroskopie (AFM¹³) konnten sie den Zusammenhang zwischen ausgeübter Kraft auf die Selektinbindung und deren Lebenszeit aufklären. Dazu

¹³engl. Atomic Force Microscopy

immobilisierten sie den natürlichen Liganden für P-Selektin PSGL-1 auf der Spitze der Rastermikroskopnadel und bewegten diese so über einer Schicht aus immobilisiertem P-Selektin, dass Rezeptor und Ligand in Wechselwirkung treten konnten. Durch Verwendung einer Schicht mit nur sehr wenigen immobilisierten P-Selektin-Rezeptoren konnten sie sicherstellen, dass jedes PSGL-1 nur mit einem einzigen P-Selektin interagieren konnte. Durch Ausüben verschiedener Zugkräfte auf die Rastermikroskopnadel im Bereich weniger pN wurde die Bindung strapaziert und deren Lebenszeit aufgezeichnet.

Die Erhöhung der Kraft auf die Rastermikroskopnadel führte zu einer Verlängerung der Lebensdauer der Bindung, also zu einem „catch bond behavior“. Erst nach Überschreiten einer kritischen Kraft resultierte aus jeder weiteren Kraftvergrößerung wieder die Verkürzung der Lebensdauer („slip bond behavior“). Die Widersprüche zu bisherigen Erkenntnissen, die ein „slip bond behavior“ für die Selektinbindung postulierten, konnten damit erklärt werden, dass in den vorangegangenen Arbeiten mit derart großen Kräften gearbeitet wurde, dass nur der „slip bond“-Bereich der Bindung erfasst wurde. Abbildung 2.4 zeigt die Ergebnisse des hier beschriebenen Versuches.

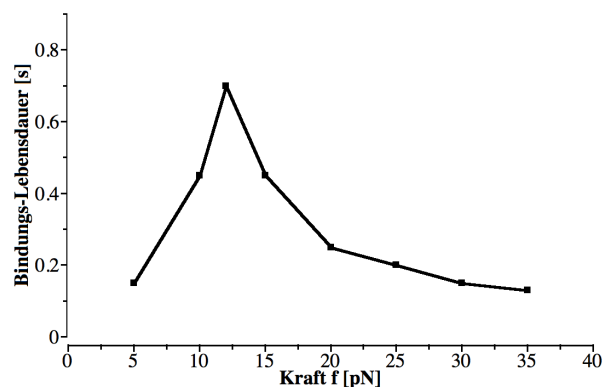


Abb. 2.4: Zusammenhang zwischen ausgeübter Kraft und Lebensdauer für die Bindung zwischen PSGL-1 und P-Selektin (AFM-Experiment). Auf der Spitze einer Rastermikroskopnadel wurde PSGL-1 immobilisiert und mit P-Selektin in Kontakt gebracht. Die Erhöhung der Zugkraft auf die Nadel resultierte bis zu einer bestimmten Kraft in einem „catch bond behavior“ der Bindung und erst nach Überschreiten der maximalen Lebensdauer der Bindung in einem „slip bond behavior“. (Grafik erstellt mit experimentellen Daten aus Marshall et al. [77])

Verschiedene Modelle versuchen dieses Verhalten zu erklären. Aus Kristallisationsexperimenten von P-Selektin mit und ohne seinen Liganden PSGL-1 erkennt man Unterschiede in einer Region, die die EGF-Domäne und die Lektinbindungsdomäne verbindet und die als Gelenkdomäne (engl. „hinge domain“) bezeichnet wird. Ohne PSGL-1 liegt diese Domäne im P-Selektin in einem geschlossenen Winkel zum Rest

des Proteins vor, während die Anwesenheit von PSGL-1 in einem offenen Winkel resultiert [78]. Die beiden Zustände wurden als niedrig- bzw. hoch affiner Zustand des P-Selektins eingeordnet. Kräfte, so postulierten es 2003 Konstantopoulos et al., sorgen für die Öffnung der Gelenkdomäne und dadurch für die Änderung des Affinitätszustandes. Für die P-Selektin-PSGL-1-Bindung könnte die offene Form bedeuten, dass eine Kraft, die auf die Ligandbindung ausgeübt wird, die Position des PSGL-1 in der Bindungstasche verändert. Dabei werden Bindungen gelöst und wegen des hoch affinen Zustandes direkt neue Bindungen eingegangen. Im Englischen wird dieses Modell als „sliding rebinding model“ bezeichnet. Es vermittelt die Vorstellung, dass PSGL-1 durch Krafteinwirkung von einer Bindungsstelle zur nächsten „schlittert“ [79].

Eine weitere mögliche Erklärung für das „catch bond behavior“ der Selektine könnte eine allosterische Aktivierung der Bindungsdomäne sein. Durch Einwirkung einer äußeren Kraft auf die Ligand-Rezeptor-Bindung werden bindungshemmende Domänen innerhalb der Bindungstasche weggeschoben, so dass bindungsfördernde Areale einen größeren Einfluss auf die Bindung übernehmen können. Für das bakterielle Adhesin FimH ist ein solcher Mechanismus beschrieben [80]. Man kann mithilfe von Computermodellen einen allosterischen Mechanismus zur Beschreibung des „catch bond behaviors“ auch bei Selektinen nahelegen [81].

Unabhängig vom angewendeten Modell können Übergänge zwischen „catch-“ und „slip bond behavior“ eine Erklärung dafür sein, dass in Flusskammerexperimenten gezeigt werden konnte, dass die Erhöhung des Scherstresses erst eine Verstärkung der Rollbewegung zur Folge hat und später zu einer schnelleren Rollbewegungen bzw. zu einem Ablösen der Zellen führt [74, 82].

Für L-Selektin wird angenommen, dass die Kombination aus „catch bond behavior“ und 7-9fach schnellerer k_{Diss} im Vergleich zu E- und P-Selektin dafür sorgt, dass Leukozyten im Zentrum von Blutgefäßen keine Interaktionen untereinander eingehen, weil dort niedrigere Scherkräfte vorherrschen, als in unmittelbarer Nähe zum Endothel [83].

Zusätzlich zu den bisher beschriebenen Einflussgrößen auf die Selektinbindung konnte gezeigt werden, dass die Verformung der Leukozyten durch Scherkräfte sich auf jede einzelne Selektin-Ligand-Bindung auswirkt (siehe Abbildung 2.5), aber auch, dass durch ein Abflachen der Leukozyten während des Rollprozesses die Anzahl der Bindungsmöglichkeiten erhöht wird [72].

Die durch Alon et al. berechneten Kräfte von 112 pN pro Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung korrespondieren mit Kräften wie sie mithilfe von rasterkraftmikroskopischen Experimenten gefunden wurde. Bei derartigen Experimenten lag die Kraft, die

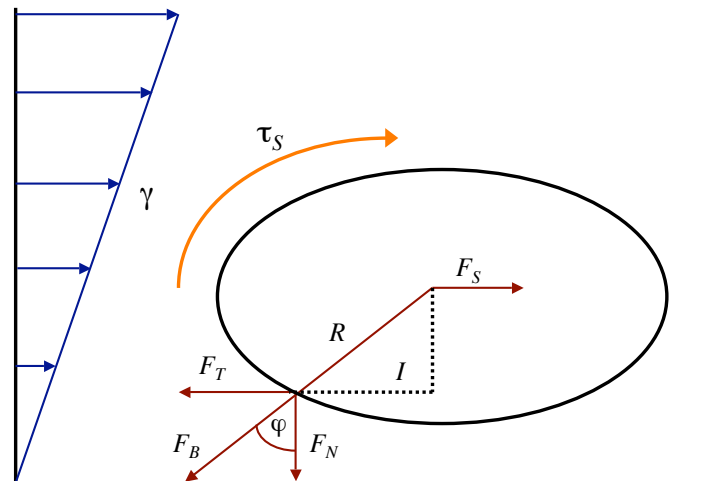


Abb. 2.5: Einfluss der Kräfte auf einen Leukozyten im Prozess des „Tetherings“ unter Scherstress. Scherstress der Scherrate γ induziert eine Kraft F_S und ein Drehmoment τ_S auf einen Leukozyten mit dem Zellradius R . Die Bindung der Zelle an seinen Liganden mit der Kraft F_N resultiert in der Kraft F_B , die auf die Zelle wirkt. Die Bindung ist über die Distanz I vom Massenzentrum der Zelle entfernt. I ist eine Funktion der Deformation der Zelle, und die Kraft F_B ist abhängig vom Radius R . Wird R durch Abflachen der Zelle im Anschluss an die Bindung größer, resultiert auch eine größere Kraft. Bei gegebenem Zellradius $R = 4,25 \mu\text{m}$, $I = 4 \mu\text{m}$ und einem Scherstress von $1,1 \text{ dyn cm}^2$ ergibt sich für eine ruhende Zelle, bei der die Nettokräfte und das Drehmoment = 0 sind, eine auf die Zellbindung wirkende Kraft von 112 pN . Abbildung und Berechnung wurden modifiziert nach Alon et al. [72].

aufgewendet werden musste, die PSGL-1-P-Selektin-Bindung zu lösen, zwischen 165 pN und 175 pN [84, 85]. In einem Computermodell konnten Pawar et al. allerdings zeigen, dass das Rollverhalten stärker durch das „catch-slip bond behavior“ als durch das Abflachen der Leukozyten beeinflusst wird [86].

Als letzter Einflussfaktor auf die Kinetik der isolierten Einzelbindung sei die Fluidität der Mikro villi der Endothelzellen genannt. Je fluider diese sind, desto höher ist die Affinität der resultierenden Selektinbindung [87, 88].

Im Kapitel 2.1.2 wurde die Bedeutung der multiplen Präsentation von einzelnen Selektinbindungsepitopen in Form von Muzinliganden erwähnt und die damit einhergehende Affinitätserhöhung für die Selektinbindung erläutert. Neben der Affinitätsregulierung über multimere Präsentation von Bindungsepitopen innerhalb eines Ligandmoleküls stellt die lokale Anhäufung von Selektinen selbst, aber auch von Selektinliganden in Form von so genannten „Clustern“ eine Möglichkeit der Aviditätserhöhung der Selektin-Ligand-Wechselwirkung dar. Für E-, L- und P-Selektin konnten Clusterstrukturen auf Zelloberflächen nachgewiesen werden [89–91]. Für E-Selektin konnte gezeigt werden, dass die Clusterung in so genannten „lipid rafts“ nicht nur der Aviditätserhöhung dient, sondern essentiell für die Signaltransduktion

im Leukozyt-Endothel-Adhäsionsprozess ist [92]. Auf der Seite der Bindungsepitope konnte eine Clusterung des P-Selektin-Liganden CD24 nachgewiesen werden [93]. Ausführlich wurde der Einfluss des Ligandenclustering durch Vogel et al. untersucht. Sie konnten zeigen, dass sLe^X-tragende Glykolipide in Modellmembranen konzentrationsabhängig clustern. Eine verstärkte Clusterung des Selektinliganden führt dazu, dass Zellen in einem Rollassay bei niedrigen Ligandkonzentrationen die charakteristische Rollbewegung zeigen, bei höheren Konzentrationen aber adhäreren. Die Adhäsion als Folge des Clustering wurde dabei mit einer starken Aviditätserhöhung erklärt [94].

Als weiteren aviditätsfördernden Parameter für die Selektin-Ligand-Interaktion ist die Flexibilität der Selektinepitope zu nennen. *In vitro* konnte mit verschiedenen sLe^X-Glykolipid-Derivaten gezeigt werden, dass der Einbau unterschiedlich flexibler Platzhalter zwischen sLe^X-Epitop und Lipidanker zu unterschiedlichen Ergebnissen bei der Bindung von E-Selektin führt [95].

Die bisherigen Ausführungen sollen die Komplexität der Selektin-Ligand-Bindung in ihrer Mechanik und Kinetik verdeutlichen. Gleichzeitig wird verständlich, dass bei der Suche nach potentiellen Selektininhibitoren diese Aspekte Beachtung finden müssen, um wirksame Antagonisten zu finden. Abschließend fasst Tabelle 2.1 wichtige kinetische Bindungskonstanten für die Bindung zwischen Selektinen und verschiedenen natürlichen und künstlichen Bindungspartnern zusammen.

Tab. 2.1: Kinetische Daten der Selektin-Ligand-Interaktion

Selektin	Ligand	K_D	k_{Ass} [$M^{-1} s^{-1}$]	k_{Diss} [s^{-1}]	Referenz
P-Selektin	PSGL-1 von humanen Neutrophilen	200 nM	$7 \cdot 10^6$	1,5	[2]
	des PSGL-1-NH ₂ -Terminus				
	PSGL-1-Ig-Chimären	60 nM	$4 \cdot 10^5$	$3 \cdot 10^{-4}$	[84]
	PSGL-1 (human)	320 nM	$4,4 \cdot 10^6$	1,4	[28]
E-Selektin	sLe ^X	7,8 mM	$6,7 \cdot 10^4$	533	[96]
	Maus-ESL-1 (37 °C)	62 µM	$7,4 \cdot 10^4$	4,6	[97]
	Maus-ESL-1 (25 °C)	56 µM	$4,8 \cdot 10^4$	2,7	[97]
	lösliches sLe ^X	107 µM	n.b.	n.b.	[22]
	lösliches sLe ^X	720 µM	$2,3 \cdot 10^5$	164	[96]
L-Selektin	Maus-GlyCAM-1	108 µM	$1 \cdot 10^5$	10	[68]
	sLe ^X	3,9 mM	$2,8 \cdot 10^4$	1000	[96]

2.1.4 Selektininhibitoren

Aufgrund der vielfältigen Beteiligung von Selektinen bei pathologischen Zuständen wie chronisch entzündlichen Erkrankungen, Arteriosklerose oder der hämatogenen

Metastasierung bieten sie sich als Zielstruktur für potentielle Inhibitoren an. Dabei werden verschiedene Ansätze bei der Inhibitorsuche verfolgt.

Ein Ansatz beim Versuch die Selektinfunktion zu unterbinden, ist die Blockierung der Bildung von Selektinliganden. Die Bindungsepitope sLe^x und sLe^a werden im Golgi-Apparat über *O*- oder *N*-glykosidische Bindungen durch sequentiellen Einsatz von *N*-Acetylglucosaminyl-, Galaktosyl-, Sialyl- und Fucosyltransferasen (FT) an das Protein-Rückgrat zum Beispiel des PSGL-1 gebunden. Der Einsatz von Inhibitoren dieser Enzyme wie zum Beispiel von Fucosyltransferase-Inhibitoren sollte dazu führen, dass die Bildung funktionstüchtiger Selektinliganden ausbleibt [98, 99]. Es gibt verschiedene Gründe, warum dieser in der Theorie naheliegende Ansatz bisher nicht zu potenten antiinflammatorischen oder antimetastatischen Substanzen geführt hat. Die Struktur der verschiedenen FT ist nicht genau bekannt, da es an Röntgenkristallographischen- oder NMR-Strukturanalysen fehlt. Man weiß aber, dass die Inhibition einer bestimmten FT, z.B. FT7, durch andere FT wie FT5 übernommen werden kann. Vor allem aber fehlt es den bisher gefundenen FT-Inhibitoren sowohl an Inhibitionspotenz als auch an ausreichend hoher Affinität zu den FT [100, 101].

Pathophysiologisch spielt die Unterdrückung der Selektinligand-Bildung im so genannten Leukozytenadhäsion-Defizienz-Syndrom Typ II eine Rolle. Dieser sehr seltene Gendefekt beim Menschen, der sich in einem gestörten Fucosemetabolismus äußert geht mit einer starken Immunsuppression einher [102]. Deshalb ist die Immunsuppression mit der Folge opportunistischer Infektionen als Nebenwirkung anti-Selektin-gerichteter Therapien gefürchtet.

Ein weiterer naheliegender Ansatz ist der Einsatz von Selektin-Antikörpern. Der Einsatz des anti-L-Selektin-AK Aselizumab in einer klinischen Studie zur Behandlung von Patienten mit multiplen Traumen führte nicht zu einer Verbesserung klinisch relevanter Parameter wie Länge der künstlichen Beatmung, Länge der Intensivbehandlung oder genereller Hospitalisierungsdauer [103].

Neben der Blockade der Selektinfunktion durch Antikörper können sie durch exogen zugeführte Selektinliganden blockiert und dadurch in ihrer Funktion gestört werden. Lösliches PSGL-1-Immunglobulin, das aus den 47 *N*-terminalen AS des PSGL-1 und der Fc-Domäne von IgG1 besteht, inhibiert *in vitro* das Leukozytenrollen [59]. *In vivo* konnte die Wirksamkeit des PSGL-1-Ig durch Intravitalmikroskopie belegt werden [104]. Es stellte sich aber heraus, dass für die antiinflammatorische Wirksamkeit 30fach geringere Konzentrationen an PSGL-1-Ig benötigt wurden, als sie für die Inhibition des Leukozytenrollens nötig sind, so dass andere Wirkmechanismen wie die Bindung verschiedener Chemokine und die damit verbundene Inhibition der Chemotaxis von Maus-Neutrophilen eher als Begründung für die letztendliche Wirkung dienen [104].

Hohe Produktionskosten aufgrund der Expression von PSGL-1-Ig in Säugetierzellen, die mit Genen für Fucosyltransferasen und GlcNAc-Transferasen ko-transfiziert werden mussten, um die posttranslationale Glykosylierung zu gewährleisten, waren ein Grund für das Aussetzen von klinischen Studien mit PSGL-1-Ig. Als weiterer Grund kam die moderate Effektivität hinzu [105].

sLe^X wurde lange Zeit als Leitstruktur zur Synthese glykosidischer und nicht-glykosidischer „small molecule“-Inhibitoren angesehen. Durch Analyse der pharmakophoren Gruppen und struktureller Veränderungen wurde versucht, potente Inhibitoren zu finden. Durch den Ersatz von Kohlenhydratstrukturen des sLe^X durch andere Pharmakophore versprach man sich unter anderem eine leichtere synthetische Zugänglichkeit. Kohlenhydrate unterliegen *in vivo* einer ausgeprägten enzymatischen Degradation, die zusätzlich limitierend ist. Eine schlechte orale Bioverfügbarkeit, die die Injektion dieser Inhibitoren erfordert, kommt als weitere Limitierung hinzu. Der Hauptgrund aber, warum Kohlenhydrat-basierte sLe^X-Mimetika in klinischen Studien keinen Therapievorteil zeigen konnten, liegt in den geringen, dem sLe^X ähnlichen Bindungsaffinitäten von $K_D \sim 1$ mM.

Aus dieser Gruppe hat bisher nur das Molekül mit dem Namen Bimosiamose (TBC1269, Encysive) nennenswerten Erfolg in klinischen Studien der Phase IIa bei der Behandlung von Psoriasis und Asthma gezeigt. Die Struktur von Bimosiamose ist Abbildung 2.6 zu entnehmen und stellt ein sLe^X-Dimer-Mimetikum dar. Es hat Bindungsaffinität zu allen drei Selektinverteatern und wird daher als Pan-Selektin-Antagonist bezeichnet [106]. Doch auch Bimosiamose zeigt bei der Untersuchung kinetischer Parameter das sLe^X-typische Bindungsverhalten mit einer sehr schnellen Dissoziationskonstanten von $k_{Diss} > 3$ s⁻¹. Die Assoziationskonstante von $k_{Ass} > 2,7 \cdot 10^3$ M⁻¹s⁻¹ führt zu einer Affinität der Bimosiamose im mikromolaren Bereich ($K_D = 111,4$ μM). Es ergaben sich nur marginale Unterschiede in der Bindungskinetik bei Anwesenheit oder Abwesenheit von Ca²⁺-Ionen, die für die sLe^X-Bindung essentiell sind. Die entsprechenden Untersuchungen wurden an P-Selektin durchgeführt. Man weiß, dass es durchaus Unterschiede in der Ca²⁺-Abhängigkeit der Selektine geben kann. So konnten Koenig et al. für die Bindung eines Heparin-Tetrasaccharids eine Ca²⁺-Unabhängigkeit für die Bindung an P-Selektin zeigen, wobei das gleiche Molekül L-Selektin ausschließlich Ca²⁺-abhängig zu binden vermochte [107]. Nach Bindung von Bimosiamose können weder Antikörper, die gegen die Lektin-Domäne des Selektins gerichtet sind, noch Antikörper gegen die EGF-Domäne am Selektin binden. Es wird vermutet, dass Bimosiamose die Bindung an der Lektin-Domäne sterisch unterbindet und es dadurch zu einer Konformationsänderung im Selektinmolekül kommt, die die Bindung an der EGF-Domäne allosterisch unterdrückt [108].

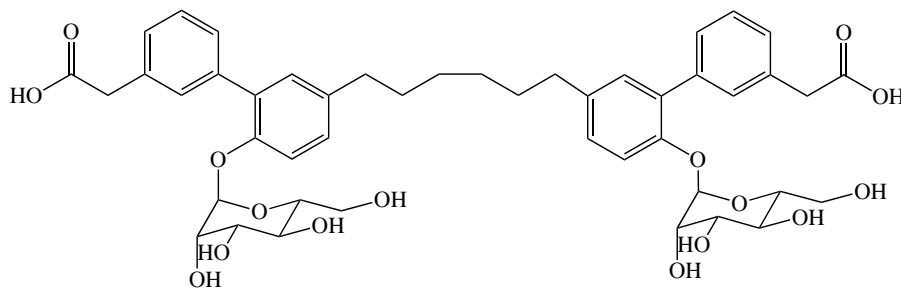


Abb. 2.6: Bimosiamose (TBC1269). Bimosiamose (1,6-bis[3-(3-carboxymethylphenyl)-4-(2- α -D-mannopyranosyloxy)-phenyl]-hexan) ist als einziges sLe^X-Dimer-Mimetikum zur Zeit in klinischen Studien der Phase IIa zur Therapie von Asthma und Psoriasis.

Mit vielfältigen Variationen des sLe^X-Grundgerüsts konnten Substanzen geschaffen werden, die sLe^X selbst in ihren IC₅₀-Werten bei der Hemmung von Leukozytenadhäsionsvorgängen übertreffen. Als Beispiel sei die *O*-Methylierung der β 1-Position des GlcNAc im sLe^X genannt, die zu einer Verbesserung der IC₅₀ von 5 mM für sLe^X nach 0,6 mM für sLe^X-OMe führt. Trotzdem haben derartige sLe^X-Mimetika bisher keinen klinischen Erfolg bei der Therapie chronisch entzündlicher Erkrankungen gezeigt.

Die Liste der Versuche, potente Selektininhibitoren zu finden, könnte noch um einige weitere Ansätze und Vertreter erweitert werden, die ausführlich bei Bendas [11] beschrieben sind. Es bleibt aber festzuhalten, dass alle Ansätze, die im klinischen Einsatz bei der Therapie chronisch entzündlicher Erkrankungen sind, keine signifikanten Vorteile aufweisen konnten. Die einzige Ausnahme mit klinischer Relevanz ist der Einsatz des Glucosaminoglykans Heparin und verschiedener Heparinderivate zur Prävention und Therapie der hämatogenen Metastasierung. Im Folgenden soll auf den Einsatz von Heparin, der Beteiligung der Adhäsionsrezeptoren und die Bedeutung kinetischer Parameter bei der Therapie der hämatogenen Metastasierung näher eingegangen werden.

2.2 Die hämatogene Metastasierung

Zu einem der sechs Kennzeichen für Krebs zählt neben Immortalität, abnormaler Wachstumsregulierung, autarkem Wachstum, Umgehung der Apoptose und fortwährender Angiogenese auch die Fähigkeit der Zellen zur Invasion und Metastasierung [109]. Die Verbreitung von Tumorzellen eines Primärtumors an andere Stellen des Organismus über das Blut- oder Lymphsystem ist ein hoch regulierter Prozess, der bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt und verstanden ist. Dieses komplexe Zusammenspiel von Ablösen der Zellen vom Primärtumor, Überwindung von Gewebs-

barrieren, Intravasation, Transport durch Blut- oder Lymphsystem, Adhäsion und Extravasation im Zielorgan, der Proliferation und Angiogenese wird als „metastatische Kaskade“ bezeichnet. Jeder einzelne dieser Schritte muss erfolgreich absolviert werden, damit es tatsächlich zur Metastasenbildung kommt. Dies hat zur Folge, dass nur 0,01% aller Tumorzellen, die die Zirkulation erreichen Metastasen bilden können [110].

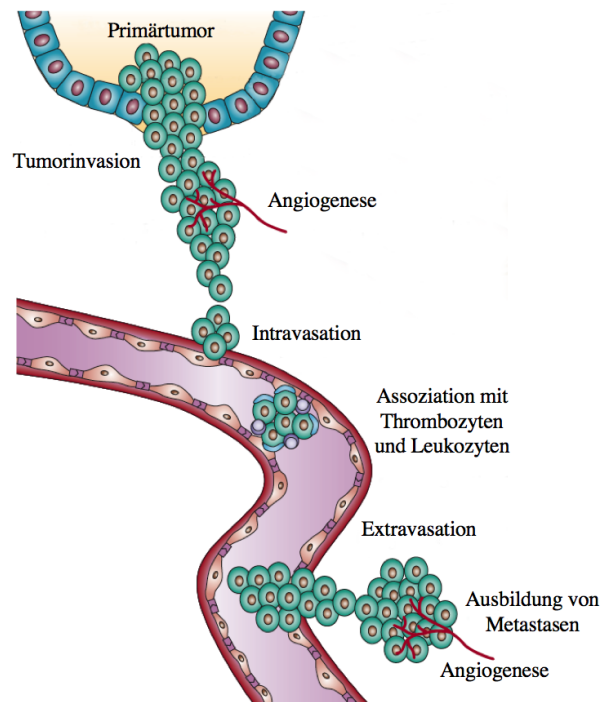


Abb. 2.7: Schematische Darstellung der hämatogenen Metastasierung. Die Abbildung stellt den Ablauf der hämatogenen Metastasierung mit folgenden Einzelschritten dar: Ablösen von einzelnen Zellen vom Primärtumor; Überwindung der EZM und Invasion in das Blutsystem; Ummantelung mit Thrombozyten und Leukozyten zum Schutz vor Scherstress und Angriff durch das Immunsystem; Transport durch den Organismus; mechanischer Arrest oder Arrest durch Wechselwirkung mit dem Gefäßendothel; Extravasation; Ausbildung von Mikrometastasen und Angiogenese zum Anschluss an die Blutversorgung. Abbildung modifiziert nach Guo und Giancotti [111].

Bei einigen Tumorzellen kommt es schon während der Ausbildung des Primärtumors zum Ablösen einzelner Zellen durch den Verlust von Zell-Zell-Kontakten. Die Fähigkeit dieser Zellen, die extrazelluläre Matrix und dabei speziell die Basalmembran überwinden zu können, stellt einen Hauptfaktor dar, warum bestimmte Tumorzellen wie das kleinzellige Lungenkarzinom, das maligne Melanom oder das Pankreaskarzinom ein hohes metastatisches Potential haben, während andere Tumorarten wie die intraepitheliale Prostataneoplasie überhaupt nicht zur Metastasenbildung neigen [112]. Zellen, die sich derart von ihrem Gewebsanker getrennt haben, müssen den Prozess der Anoikis umgehen können. Anoikis ist ein Schutzmechanismus, der bei

nicht entarteten Zellen dafür sorgt, dass sie außerhalb ihres Gewebeverbandes nicht überleben können. Dieser Mechanismus dient physiologischer Weise zum Schutz vor einer Ansiedlung von Zellen außerhalb ihrer anatomisch vorgesehenen Lokalisation [113]. Die Fortbewegung durch die extrazelluläre Matrix wird durch die Sezernierung von Matrixmetalloproteinasen und einer teilweise amöboiden Fortbewegungsfähigkeit aufgrund fluider Zellmembranen gewährleistet [114].

Im Anschluss an die Degradation der Blutgefäßwände und dem Eintritt in das Blutsystem sind die Tumorzellen verschiedenen Stressfaktoren ausgesetzt, die ihre Überlebenschancen drastisch herabsetzen. Dazu gehören Bestandteile des Immunsystems, die die Tumorzellen als fremd erkennen, die Einwirkung von Scherkräften auf die Zellen und die Notwendigkeit nach erfolgtem Transport durch den Organismus an bestimmten Stellen das Blutsystem wieder zu verlassen. Versuche mit radioaktiv markierten Tumorzellen haben gezeigt, dass bei diesem Schritt der metastatischen Kaskade die meisten Tumorzellen absterben [115].

Einen Schutz können die Tumorzellen durch Wechselwirkungen mit Thrombozyten und Leukozyten erreichen, die rasch nach dem Eintritt in das Blutsystem erfolgen müssen. Dadurch bilden sich Mikroemboli, die an anderen Stellen des Organismus mechanisch oder durch spezifische Wechselwirkungen mit dem Endothel der Blutgefäße zum Arrest kommen. Es kann die Extravasation aus dem Blutgefäß und die Ausbildung von Mikrometastasen erfolgen, die ab einer Größe von 2 mm durch Initiierung von Angiogenese an die Versorgung durch das Blutsystem angeschlossen werden müssen.

Damit Tumorzellen die Passage im Blutsystem überleben und Wechselwirkungen zu physiologischen Blutbestandteilen eingegangen werden können, bedienen sie sich verschiedenster Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen. Von unterschiedlichen Adhäsionsmolekülen wie GPIIb/IX/V, GPIIb/IIIa und Tumorzell-ständigem $\alpha V\beta 3$ weiß man, dass sie die Adhäsion zwischen Tumorzellen und Thrombozyten fördern. Darüber hinaus spielen aber vor allem Selektine, allen voran thrombozytäres P-Selektin eine wichtige Rolle bei der Assoziation von Tumorzellen und Thrombozyten. Verschiedene Tumorzelllinien exprimieren eine Vielzahl von Muzinliganden, die eine Selektinbindung vermitteln können.

Die Überlebensvorteile, die eine Ummantelung mit Thrombozyten nach sich ziehen, können verkürzt wie folgt zusammengefasst werden:

- Schutz vor zytotoxischer Aktivität von NK-Zellen und vor Scherkräften
- Bildung größerer Tumorzell-Thrombozyt-Aggregate, die zur Embolie in Mikrogefäßen führen kann und den Tumorzellen dadurch eine Möglichkeit zum Arrest bietet

- Einnahme einer Brückenfunktion zur Bindung an Leukozyten und Endothelzellen und dadurch Förderung der Extravasation
- Verstärkung von Angiogenese und Wachstum nach erfolgter Extravasation durch thrombozytäre Wachstumsfaktoren sowie Anpassung an die neue Umgebung [116, 117]

Eine Inhibition dieser Ummantellung stellt damit ein interessantes Target für eine antimetastatische Therapie dar, wobei die Notwendigkeit der Aufrechterhaltung der physiologischen Hämostase als limitierender Faktor an dieser Stelle zu nennen ist. In der gezielten Hemmung von Selektin- bzw. Integrin-Wechselwirkungen könnte ein Schlüssel für die Lösung dieses Konfliktes liegen.

2.2.1 Selektine und Selektinliganden bei der hämatogenen Metastasierung

Die Wechselwirkung von Tumorzellen mit Leukozyten, Thrombozyten und Endothelzellen legt eine Beteiligung von Selektin-Ligand-Wechselwirkungen als Komponente dieser Interaktionen nahe und soll im Folgenden näher betrachtet werden.

Die Wechselwirkung von E-Selektin mit Muzinliganden auf Tumorzellen stellt für diese eine Möglichkeit dar, am Endothel zu adhäreren. Verschiedene sLe^X und sLe^a tragende Liganden konnten auf Kolonkarzinomzellen, Mammakarzinomzellen oder Prostatakarzinomzellen ebenso nachgewiesen werden, wie die Bindungsfähigkeit dieser Tumorzellen an endotheliales E-Selektin *in vivo* [118–120].

Die Expression des E-Selektin-Liganden ESL-1 auf Tumorzellen wurde noch nicht zweifelsfrei gezeigt. PSGL-1, das neben P-Selektin auch E-Selektin bindet, konnte auf Tumorzelllinien detektiert werden. Das Gleiche gilt für eine Isoform von CD44. CD44 bindet neben Hyaluronsäure und anderen Bestandteilen der extrazellulären Matrix auch E-Selektin. Auf der Kolonkarzinomzelllinie LS174T konnte eine Isoform des CD44 mit posttranslationalen *N*-Glykosylierungen nachgewiesen werden, die sowohl E- als auch L- und P-Selektin binden kann [121, 122].

Da E-Selektin physiologisch im Rahmen von Entzündungsreaktionen erst nach einigen Stunden nach *de novo*-Synthese auf der Oberfläche von Endothelzellen erscheint, werden bei der Tumorzellmetastasierung verschiedene Mechanismen genutzt, die Expression von E-Selektin zu erhöhen. Erhöhte E-Selektin-Expression bei chronisch entzündlichen Erkrankungen wird als ein Hinweis für die erhöhte Inzidenz von Tumorerkrankungen in Folge angesehen. Durch Produktion von TNF- α , IL-1 β oder IFN- γ , aber auch durch Zytokin-Induktion mittels tumorzellständiger Kohlenhydratstrukturen ist eine Endothelaktivierung mit erhöhter E-Selektin-Expression als Folge

möglich [123, 124]. Gelangen Tumorzellen in die hepatische Mikrozirkulation, können sie durch Aktivierung von Kupfferzellen diese zu erhöhter TNF- α -Bildung anregen und somit indirekt eine erhöhte Expression von E-Selektin, aber auch von VCAM-1 induzieren. Erhöhte Plasmaspiegel von sLe^X, sLe^a oder löslichem E-Selektin gelten als Indikator für eine schlechte Prognose bei Tumorpatienten [125].

Neben der Induzierung der E-Selektin-Expression ist auch eine konstitutive Expression von E-Selektin auf Endothelzellen des Knochenmarks beschrieben, die bei der Metastasierung von Mammakarzinom- und Prostatakarzinomzellen in das Knochenmark über E-Selektin-vermitteltes „homing“ eine Rolle spielt [126]. Die Metastasierung wird demnach durch die Wechselwirkung von Selektinliganden auf Tumorzellen und endotheliale E-Selektin stark gefördert [127].

Neben E-Selektin, das ausschließlich auf Endothelzellen exprimiert wird, wird auch P-Selektin eine wichtige Rolle bei der Tumorzellmetastasierung zugeschrieben. Vor allem die schon beschriebene Tumorzell-Thrombozyt-Wechselwirkung konnte in verschiedenen Studien als prometastatisch charakterisiert werden. Kim et al. konnten nach Injektion von Tumorzellen in P-Selektin-Knock-Out-Mäuse (P⁻) eine geringere Ansiedlung von Lungenmetastasen im Vergleich zu Wildtypmäusen feststellen. Die Thrombozyten dieser Mäuse zeigten keine Adhäsionsfähigkeit an Tumorzellmuzine, und in P⁻ waren Tumorzellen im Vergleich zu Wildtypmäusen weniger stark mit Thrombozyten assoziiert [128]. Aber auch endotheliales P-Selektin spielt eine Rolle bei der Tumorzellmetastasierung. So konnten Ludwig et al. den Einfluss von endotheliale und thrombozytärem P-Selektin getrennt voneinander betrachten. Dazu implantierten sie Wildtypmäusen das Knochenmark von P⁻, so dass die Mäuse zwar kein thrombozytäres, wohl aber endotheliales P-Selektin exprimierten (P[±]). Die Injektion von Melanomzellen der Zelllinie B16F10 führte zu einer geringeren Metastasenbildung in den Lungen der P[±] im Vergleich zum Wildtyp. Die Unterdrückung der Metastasenbildung war allerdings geringer als in P⁻. Diese Ergebnisse zeigten, dass auch endotheliales P-Selektin bei der Metastasierung von Melanomzellen eine Rolle spielt, wenn auch der Haupteffekt auf eine Wechselwirkung mit thrombozytärem P-Selektin zurückzuführen ist [129].

Zwar tragen einige Tumorzellarten PSGL-1 als Selektinliganden, auf epithelialen Tumorzellen konnte aber vor allem CD44v, eine O-sialysierte Isoform des CD44 als Selektinligand identifiziert werden [122]. CD24 ist ein weiterer Ligand, der seine P-Selektin-Bindungsfähigkeit durch das Vorhandensein einer sLe^X-Modifikation erreicht und der *in vitro* eine Rollbewegung von Tumorzellen vermitteln kann [130]. Chondroitinsulfate, Heparansulfat-ähnliche Proteoglykane und Sulfatide sind P-Selektin-

tinliganden auf Tumorzellen, die kein sLe^X-Motiv beinhalten, deren Bindungsfähigkeit aber an das Vorhandensein einer Sulfatgruppe gekoppelt ist [131–133].

Während P- und E-Selektin bisher noch nicht auf Tumorzelllinien nachgewiesen werden konnten, tragen verschiedene entartete Blutzelllinien L-Selektin. Bei unterschiedlichen leukämischen Erkrankungen und beim malignem Lymphom konnten ähnliche L-Selektin-Expressionsmuster nachgewiesen werden. L-Selektin kann eine prometastatische Wirkung durch Vermittlung von Adhäsionsvorgängen zum Beispiel in Lymphknoten entfalten, wie sie für L-Selektin-exprimierende Insulinome in transgenen Mäusen nachgewiesen wurde.

Die Rolle leukozytären L-Selektins bei der Tumorzellmetastasierung ist ambivalent. So können Tumorzellen, die Liganden für L-Selektin exprimieren, dafür sorgen, dass zytotoxische Lymphozyten im Rahmen der Immunabwehr durch Infiltration in das Tumorgewebe den Krebs bekämpfen. Eine solche antimetastatische Wirkung von L-Selektin konnte mithilfe von L-Selektin- und ICAM-1-defizienten Mäusen und kombiniert defizienten Mäusen für das Wachstum und die Lungenmetastasierung von Melanomzellen nachgewiesen werden [134]. Andererseits werden erhöhte Serumlevel an L-Selektin mit einer schlechten Prognose in Verbindung gebracht. Dabei ist vorstellbar, dass lösliches L-Selektin die Immunabwehr durch Blockierung der entsprechenden Liganden auf den Tumorzellen herabsetzt [135].

Verschiedene Krebszellen exprimieren Liganden für L-Selektin und können dadurch in Wechselwirkung mit Leukozyten treten. Als Beispiele seien Prostatakarzinomzellen [136] oder die Kolonkarzinomzelllinie LS180 genannt, die Liganden für L-, E- und P-Selektin besitzt [137]. Durch Muzinepitope mit Bindungsfähigkeit zu allen drei Selektinen kann eine Quervernetzung von Tumorzellen, Thrombozyten, Leukozyten und Endothelzellen erreicht werden. Dadurch kann es zur Bildung größerer Zellaggregate kommen, die wiederum vermehrt zur Mikroembolbildung neigen. Neben der mechanischen Arrestfähigkeit durch eine entsprechende Größe kann über Wechselwirkung mit endothelialelem E-Selektin auch eine gezielte Adhäsion an das Endothel erreicht werden [138]. Da sowohl L-Selektin-Antikörper als auch die Verwendung von L-Selektin-defizienten Mäusen zu geringeren Metastasierungsraten im Vergleich zum Wildtyp bei verschiedenen Metastasierungsmodellen mit Kolonkarzinomzellen führte, gilt die Beteiligung von L-Selektin als gesichert. Für LS180-Zellen konnte ein synergistisches Zusammenspiel von L- und P-Selektin bei der Tumorzellmetastasierung gezeigt werden. Für die Lungenmetastasierung von Adenokarzinomzellen ergab sich, dass P-Selektin vor allem durch Bindung von Sulfatiden an der Metastasierung teilnimmt, während die Liganden für L-Selektin vor allem durch Sialomuzine und Glucosaminoglykane repräsentiert werden. Die Wechselwirkung mit den verschiede-

denen Selektinen ist dabei zeitlich verschoben. Während P-Selektin in einer frühen Phase die Adhäsion von Plättchen an die Tumorzellen fördert, vermag leukozytäres L-Selektin später die Ausbildung eines Leukozytenmantels um das Aggregat aus Tumorzelle und Thrombozyten zu fördern. Dabei kann L-Selektin der Leukozyten direkt mit den Tumorzellen interagieren, oder es kommt zur Bindung thrombozytären P-Selektins an leukozytäres PSGL-1. Dadurch ist die schon beschriebene mechanische Arrestvermittlung gefördert und außerdem können Leukozyten eine Brückenfunktion zum Endothel hin einnehmen. Dazu ist es aber von Nöten, dass Endothelzellen vermehrt Liganden für L-Selektin exprimieren. Ähnlich wie in entzündetem Gewebe können Tumorzellen durch Sekretion von Zytokinen auch in nicht-lymphoiden Organen zu einer vermehrten Bildung von L-Selektin-Liganden auf Endothelzellen beitragen. Läubli et al. konnten genau diesen Mechanismus nachweisen [139].

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die drei Selektine auf unterschiedliche Art und Weise synergistisch zur Tumorzellmetastasierung beitragen können. Die beschriebenen Zusammenhänge sind in Abbildung 2.8 dargestellt.

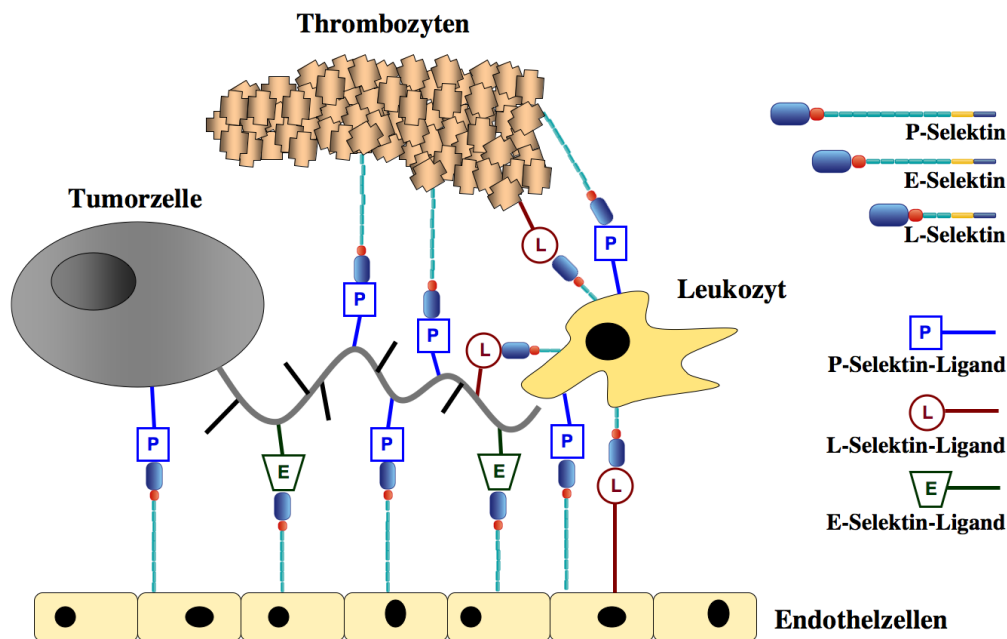


Abb. 2.8: Potentielle Selektin-Tumorzellinteraktionen. Tumorzellen exprimieren Liganden für E-, L- und P-Selektin. Über E- und P-Selektin können sie in Kontakt mit Endothelzellen treten, über P-Selektin darüber hinaus mit Thrombozyten. Durch entsprechende tumorzellständige L-Selektin-Liganden wird die Bindung an Leukozyten vermittelt. Leukozyten exprimieren L-Selektin und binden Thrombozyten über thrombozytäres PSGL-1. Nach Induktion endogener L-Selektin-Liganden ist die Wechselwirkung mit dem Endothel möglich. Die Darstellung wurde modifiziert nach Borsig et al. [140].

2.2.2 Auswirkungen der Heparin-gabe auf den Verlauf von Krebserkrankungen

Durch zahlreiche Arbeiten zur mechanistischen Funktion der Antikoagulation im Rahmen von Krebserkrankungen weiß man, dass Tumorzellen selbst die Koagulation aktivieren können. Die Bildung von Fibrin-Gerinsel am Ende der Koagulationskaskade ist direkt in das Tumorwachstum und in die Tumorverbreitung involviert. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Transfektion eines Onkogens in Leberzellen der Mäuse nicht nur zur Ausbildung eines Leberkarzinoms führte, sondern gleichzeitig mit einer Hyperkoagulation einherging, der venöse Thrombosen und schwere Blutungen folgten [141]. Deshalb wird der Hyperkoagulationsstatus, der durch die Krebserkrankung hervorgerufen wird, als Hoch-Risikofaktor für die Ausbildung thromboembolischer Komplikationen gesehen. Gleichzeitig beeinflusst die Aktivierung des Koagulationssystems die Biologie der Tumorzellen selbst [142, 143].

Vor diesen Erkenntnissen stand das Wissen, dass thromboembolische Ereignisse gehäuft bei Krebserkrankungen auftreten. Durch Begleiterscheinungen bei der Therapie von Krebserkrankungen wie Operationen, Chemotherapie, zentralvenösen Verweilkathetern, Immobilisation, Infektionen und Malnutrition ist die Gefahr, eine venöse Thromboembolie (VTE) zu erleiden, erhöht. Darüber hinaus ist aber auch bekannt, dass Patienten, die unter Metastasen leiden, ein 15fach erhöhtes Thromboembolierisiko haben als Patienten, bei denen noch keine Metastasen festgestellt werden konnten [144]. Gleichzeitig stellt die VTE die zweithäufigste Todesursache bei Krebspatienten dar [145]. Daher gehört die Thromboseprophylaxe und ggf. die Thrombotherapie zu den Standardmaßnahmen im Rahmen der Therapie von Krebserkrankungen. Unfraktionierte Heparine (UFH¹⁴) galten lange als Medikation der Wahl und werden nach und nach durch niedermolekulare Heparine (LMWH¹⁵) abgelöst, die in ihrer Anwendung als genauso effektiv wie UFH angesehen werden, aber seltener zu der gefürchteten Nebenwirkung der heparininduzierten Thrombozytopenie führen [146]. (Zur Struktur von Heparin und Unterschieden zwischen UFH und LMWH siehe Kapitel 2.2.4.) Die initiale Gabe von Heparin und anschließender Rezidivprophylaxe mit oralen Antikoagulantien wird als weniger effektiv angesehen und bringt außerdem eine höhere Blutungsneigung bei den Patienten mit sich [147, 148].

Inzwischen ist die Heparin-gabe zur Thromboseprophylaxe im Rahmen von Krebstherapien in die Behandlungsrichtlinien aufgenommen worden, wobei vorgesehen ist, alle hospitalisierten Patienten mit LMWH zu behandeln und eine Rezidivprophylaxe für drei bis sechs Monate durchzuführen. Bei andauernder Krebserkrankung soll

¹⁴engl. Unfractionated Heparin

¹⁵engl. Low Molecular Weight Heparin

den Richtlinien entsprechend auch die Gabe von LMWH fortgesetzt werden [149]. Da das hämostatische System an Tumorwachstum und Entwicklung beteiligt ist, wurde versucht in klinischen Studien nachzuweisen, dass die beschriebenen positiven Effekte einer Heparin-gabe auf den Krankheitsverlauf auf einen antineoplastischen Effekt zurückzuführen sind. In den 80er und 90er Jahren des letzten Jahrhunderts konnte mithilfe von retrospektiven Evaluierungen gezeigt werden, dass Krebspatienten durch die perioperative Prophylaxe mit UFH im Vergleich zu Patienten, denen keine Prophylaxe zuteil wurde, einen Überlebensvorteil hatten [150]. Diese Patienten hatten aber nicht nur eine höhere 3-Jahres-Überlebensrate, sondern starben auch seltener an Metastasen als die Patienten der Kontrollgruppe. Lebeau et al. konnten darüber hinaus zeigen, dass Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom auf die entsprechende Chemotherapie besser ansprachen, wenn gleichzeitig UFH verabreicht wurde im Vergleich zu Patienten, die nicht mit UFH behandelt wurden (37% vs. 23%, $p = 0,04$). Eine Überlebenszeitverlängerung unter Heparin-gabe konnte ebenfalls gezeigt werden, wobei diese nur für Patienten im frühen Krankheitsstadium signifikant war ($p = 0,03$) [151]. Smorenburg et al. setzten sich 1999 in einem Review kritisch mit den Ergebnissen der eben genannten Studie und weiterer Studien zur Wirkung von UFH bei Krebspatienten auseinander. Nach Diskussion aller methodisch korrekt durchgeführter Studien zu diesem Thema kamen sie zu dem Schluss, dass die positiven Effekte einer UFH-Gabe auf die Überlebenszeit von Krebspatienten nicht zweifelsfrei nachgewiesen seien [152].

Im Gegensatz zu der nicht ganz eindeutigen Datenlage für die Anwendung von UFH konnten positive Effekte bei der Verwendung von LMWH in der Krebstherapie in verschiedenen klinischen Studien nachgewiesen werden. Zuerst zeigten zwei Meta-Analysen klinischer Studien, in denen UFH gegen LMWH zur Initialbehandlung von VTE eingesetzt wurde, eine Reduktion der Mortalität bei der Krebsbehandlung unter LMWH [153, 154]. Auf dieser Grundlage wurden randomisierte, prospektive Studien durchgeführt, deren primärer Endpunkt die Überlebenszeit von Patienten ohne VTE unter LMWH-Gabe war. Dabei wurden verschiedene Tumorzelltypen, Krankheitsstadien und andere prognostische Variablen herangezogen. Nach einer Pilotstudie durch Wojtukiewicz et al. mit 27 Melanom-Patienten, in der die Ergebnisse der Meta-Analysen nachvollzogen werden konnten [155], waren es vor allem zwei groß angelegte Studien aus den Jahren 2004 und 2005, die durch ihr prospektives, randomisiertes, placebo-kontrolliertes Studiendesign valide Erkenntnisse zur antineoplastischen Wirkung von LMWH lieferten. In der FAMOUS¹⁶-Studie wurden 385 Patienten mit vorangeschrittenen soliden Tumoren verschiedener Typen täg-

¹⁶engl. Fragmin Advanced Malignancy Outcome Study

lich mit 5 000 I.E.-anti-Xa s.c. Dalteparin behandelt und mit einer Placebo-Gruppe verglichen, wobei keiner der Patienten im Vorfeld Anzeichen thromboembolischer Ereignisse zeigte. In der Überlebenszeit nach einem, zwei und drei Jahren konnte für die Verumgruppe ein Überlebensvorteil festgestellt werden, der allerdings nicht signifikant unterschiedlich zur Placebo-Gruppe war. In einer Post-hoc Subgruppenanalyse konnte aber gezeigt werden, dass Patienten mit einer guten Prognose (Überlebenszeit > 17 Monate) durch LMWH-Gabe einen signifikanten Überlebensvorteil nach zwei und drei Jahren verglichen mit der Placebo-Gruppe aufwiesen ($p = 0,03$) [156]. In der MALT¹⁷-Studie konnten Klerk et al. ebenfalls einen Überlebensvorteil von Krebspatienten mit fortgeschrittenen und metastasierenden Tumoren durch Gabe des LMWH Nadroparin feststellen [157]. Altinbas et al. wiesen nach, dass die Gabe des LMWH Dalteparins in Kombination mit einer Chemotherapie zu einem Überlebensvorteil im Vergleich zu der alleinigen Durchführung der Chemotherapie bei Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom unterschiedlicher Stadien und ohne VTE führte (13,0 Monate vs. 8,0 Monate) [158]. Die beschriebenen Studien belegen den Nutzen der Heparin-gabe bei Krebspatienten. Die Tatsache, dass vor allem Patienten ohne bestehende Metastasen eine Überlebenszeitverlängerung aufwiesen, gibt Hinweise auf den Wirkmechanismus, der dem Nutzen zu Grunde liegt und der in der Hemmung der Metastasierung zu vermuten ist. Durch eine Vielzahl von Tierexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Heparin-gabe eher die Metastasierung als den Primärtumor beeinflusst [159].

Die klinischen Daten weisen trotz des zuweilen unterschiedlichen Studiendesigns einen positiven Effekt des Heparins für Krebspatienten nach. Diese Wirkung, die sich noch meist lange nach dem Therapieende äußert, kann nicht allein auf den antikoagulatorischen Effekt zurückzuführen sein, da der Therapiezeitraum meist recht limitiert ist [157]. Zwar konnte schon in den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts für die antikoagulatorische Therapie mit dem Vitamin K-Antagonisten Warfarin ein antineoplastischer Effekt bei der Therapie des kleinzelligen Bronchialkarzinoms nachgewiesen werden [160], für andere Krebsarten konnte ein solcher Nachweis in späteren Studien allerdings nicht erbracht werden [161]. Während die Interpretation der Daten der beschriebenen Studien zuweilen nicht zu eindeutigen Aussagen führt, konnte im Mausmodell und in verschiedenen *in vitro*-Studien ein klareres Bild gezeichnet werden. Verschiedene Studien zur Heparinwirkung in Mäusen belegen einen antimetastatischen Effekt sowohl für UFH als auch für LMWH für Zelllinien muriner oder humaner Herkunft. Derartige Studien wurden für Kolonkarzinom-, Melanom-, Lungenkarzinom- und Mammakarzinomzelllinien durchgeführt [150, 159, 162]. In

¹⁷engl. Malignancy And Low Molecular Weight Heparin Therapy

vielen dieser Mausmodelle wurden den Mäusen Tumorzellen direkt in das venöse Blutsystem gespritzt. Bei dieser Methode kann die Heparinwirkung zu ganz bestimmten Zeitpunkten untersucht und die möglichen beteiligten Wechselwirkungen auf eine übersichtliche Anzahl begrenzt werden. So konnte die Metastasenbildung muriner Melanomzellen durch eine einzige Injektion von UFH oder LMWH signifikant gesenkt werden [129, 163, 164]. In vielen dieser Studien wurden UFH und LMWH in unphysiologisch hohen Konzentrationen eingesetzt, aber auch in Studien zur Metastasierung von Kolonkarzinom- und Melanomzellen mit klinisch relevanten Dosierungen konnte eine antimetastatische Wirkung durch Heparin gegeben nachgewiesen werden [165, 166]. Der Zeitpunkt der Heparinabgabe scheint ein wichtiger Faktor in derartigen Studien zu sein, da die Heparinabgabe unmittelbar vor Tumorzellinjektion zu einem Effekt führt, währenddessen die Heparinapplikation 24 Stunden vor Tumorzellinjektion keine antimetastatische Wirkung hervorruft [129, 162, 164]. Diese und weitere Tiermodelle zur antimetastatischen Wirkung von Heparin sind ausführlich bei Niers et al. zusammengefasst [159].

Heparin ist eine komplexe Mischung aus Glucosaminoglykanen und weist eine Vielzahl biologischer Funktionen auf [162, 167–170]. An dieser Stelle seien nur einige genannt, die im Rahmen von Krebserkrankungen eine Rolle spielen können.

- Antikoagulation
- Freisetzung von Inhibitoren des Wachstumsfaktor-Freisetzungswegs (TFPI¹⁸)
- Inhibition der Angiogenese
- Modulation der Proteasenaktivität und von Komponenten der extrazellulären Matrix
- Bindung von Wachstumsfaktoren
- Inhibition der Heparanase
- Inhibitor Selektin-abhängiger Interaktionen

Bei näherer Betrachtung der schon beschriebenen Tierexperimente zeigt sich, dass einige der erwähnten Heparinwirkungen hier nicht in Frage kommen. Wenn Tumorzellen direkt in die Blutbahn injiziert werden, ist der Kontakt zu Bestandteilen des Blutsystems oder Endothelzellen dominant und so auch als Wirkort für Heparin anzusehen. Heparin wird aber nach seiner Gabe innerhalb weniger Stunden aus dem systemischen Blutkreislauf entfernt, so dass seine Wirkung auf die Angiogenese oder die Bindung von Wachstumsfaktoren in dieser frühen Phase von untergeordneter Relevanz sein dürfte [171]. Das Pentasaccharid Fondaparinux besitzt die antikoagulatorische Wirksamkeit des Heparins. Ihm fehlen aber viele weitere Heparinwirkungen,

¹⁸engl. Tissue Factor Pathway Inhibitor

und es zeigte in Studien auch kein antimetastatisches Potential [165]. Aufgrund der derzeitigen Studienlage ist es naheliegend, dass die antimetastatische Wirkung des Heparins nicht alleine mit der Antikoagulation zu erklären ist. Adhäsionsrezeptoren wie Selektine sind die naheliegendsten Zielstrukturen für die Heparinbindung, denn sie sind nachweislich im Prozess der hämatogenen Metastasierung beiteiligt (siehe Kapitel 2.2.1) und stellen darüber hinaus Bindungspartner für Heparin dar. Dieser Zusammenhang soll im folgenden Kapitel näher beleuchtet werden.

2.2.3 Selektinblockade durch Heparin als antimetastatischer Mechanismus

In Kapitel 2.2.1 wurde beschrieben, inwiefern die Wechselwirkung von Tumorzellen und Selektinen einen Beitrag zur hämatogenen Metastasierung leistet. Von Heparin weiß man seit Ende der achtziger Jahre des vergangenen Jahrhunderts, dass es ein potenter Selektinligand ist. Skinner et al. wiesen als erste die Bindungsfähigkeit von Heparin an P-Selektin nach und zeigten, dass auch andere sulfatierte Glykane wie Fucoidan oder Dextransulfat P-Selektin zu binden vermögen und Heparin von der Bindungsstelle verdrängen können [172]. Noch vor der Aufklärung der Struktur des PSGL-1 war bekannt, dass Heparin neben den anderen genannten Glykanen, die Bindung von Neutrophilen an P-Selektin inhibiert. Somit konnten strukturelle Voraussetzungen für die P-Selektin-Bindungsfähigkeit postuliert werden, noch bevor man die eigentliche Struktur des nativen P-Selektin-Liganden kannte [173].

Auf die Bedeutung Selektin-defizienter Mäuse wurde unter anderem in Kapitel 2.2.1 eingegangen. Durch sie konnte die Bedeutung dieser Adhäsionsrezeptoren für die Tumorzellmetastasierung gezeigt werden. Mit den gleichen Modellen konnte auch die Potenz von Heparin als Inhibitor Selektin-vermittelter Metastasierungsvorgänge nachgewiesen werden. So zeigen Wildtypmäuse, denen 30 Minuten vor der Injektion von Tumorzellen Heparin gespritzt wurde, eine ähnliche Reduktion der Lungenmetastasen wie P-Selektin-defiziente Mäuse. Die Kombination aus P-Selektin-Defizienz und Heparingabe führte dagegen nicht zu einer weiteren Reduktion der hämatogenen Metastasierung. Derartige Experimente zeigen, dass Selektindefizienz und Heparingabe am gleichen Punkt des metastatischen Geschehens eingreifen. Durch Bindung an P-Selektin kann Heparin die Bildung von Thrombozyt-Tumorzell-Mikroemboli unterdrücken. Der antimetastatische Effekt äußert sich aber nicht nur im Zeitrahmen des Experimentes. Auch nach sechs Wochen zeigen Mäuse, die vor der Tumorzellinjektion Heparin erhalten haben, weniger metastatische Herde in der Lunge als die Kontrollgruppe [171]. Um diesen ungewöhnlichen Effekt zu erklären, wird im Kapitel 4 der mögliche Einfluss der Bindungskinetik diskutiert.

Da Heparin Bindungsfähigkeit sowohl zu L- als auch zu P-Selektin besitzt, ist die isolierte Untersuchung der Heparinwirkung an beiden Rezeptoren für das weitere Verständnis wichtig. Ähnlich der P-Selektin-Defizienz folgt auch aus der L-Selektin-Defizienz in Mäusen eine geringere Metastasierungsneigung. Die Bildung von Mikroemboli aus Tumorzellen und Thrombozyten ist bei L-Selektin-defizienten Mäusen nicht beeinflusst, da sie P-Selektin vermittelt ist. Durch Heparin-gabe ist in L-Mäusen eine weitere Reduktion der Metastasenbildung möglich, die bei P-Mäusen nicht erfolgt. In diesem Modell nehmen Leukozyten als mögliche Partner bei der Selektin-vermittelten Thrombenbildung eine entscheidende Rolle ein. In Kapitel 2.2.1 wurde erwähnt, dass L- und P-Selektin zu unterschiedlichen Zeiten bei der Tumorzellmetastasierung ihre Wirkung entfalten. Dadurch lässt sich auch erklären, dass eine L-Selektin-Blockade durch Heparin idealerweise sechs bis 18 Stunden nach Tumorzellinjektion erfolgt (zur Hemmung von P-Selektin 30 Minuten vor der Tumorzellinjektion). Überträgt man diese Erkenntnisse auf ihre klinische Relevanz, so wird klar, dass nur die Inhibition beider Selektine zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Metastasierungs geschehens zu einem Therapieerfolg führen kann. Für Patienten im fortgeschrittenen Krankheitsstadium, bei denen bereits Tumorzellen in die Blutbahn gelangt sind, gestaltet sich ein Eingreifen durch Heparin dagegen schwieriger [128, 139].

Bei den beschriebenen Modellen zur Untersuchung der Heparinwirkung konnte in Mäusen mit L- und gleichzeitiger P-Selektin-Defizienz durch die Heparin-gabe kein weiterer antimetastatischer Effekt festgestellt werden. Hier spielen also die zusätzlichen Heparinwirkungen, die in Kapitel 2.2.2 beschrieben wurden, keine Rolle. Allerdings lassen sich diese Erkenntnisse nicht auf die klinische Relevanz im Allgemeinen zurückprojizieren, da die verwendeten Tumorzelllinien ihr metastatisches Potential vor allem über ihre Selektinbindungsfähigkeit vermittelten.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Heparin seine nachweisbare antimetastatische Aktivität durchaus durch die Blockade von L- und P-Selektin-vermittelten Adhäsionsvorgängen entfalten kann, während es keine Affinität zu E-Selektin aufweist. Die Untersuchung der Heparinbindung auf molekularer Ebene und die Aufstellung von Struktur-Wirkungsbeziehungen kann zum einen zum Verständnis der Selektinblockade beitragen und zum anderen zum Design von Heparinabkömmlingen führen, die ihre Wirkung vor allem über die Selektinblockade vermitteln.

2.2.4 Aufbau, Vorkommen und strukturelle Anforderungen des Heparins an die Selektinblockade

Heparin ist ein polydisperses Gemisch linearer Glucosaminoglykane. Die Struktur wird aus einem Disaccharid-Grundbaustein gebildet, der unterschiedlich zusammengesetzt sein kann. 75-90% der Disaccharide werden aus L-Iduronsäure und D-Glucosamin gebildet. Andere mögliche Disaccharide zeichnen sich vor allem durch veränderte Sulfatierungsgrade und -muster aus. D-Glucuronsäure, das Epimer der L-Iduronsäure, und *N*-Acetylglucosamin seien als weitere mögliche Monosaccharide genannt.

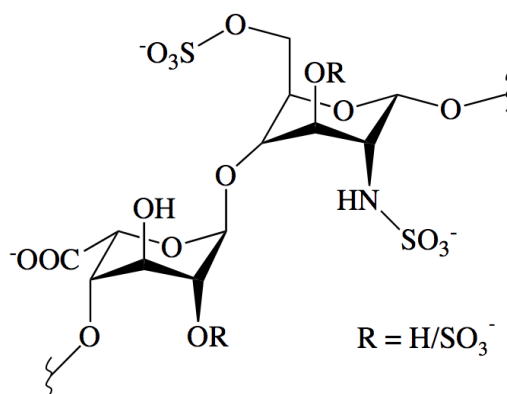


Abb. 2.9: Heparin. Das Disaccharid aus L-Iduronsäure und einem disulfatierten Glucosamin ($R = H$). Die Position 2-O der Iduronsäure und die Position 3-O des Glucosamins können sulfatiert oder desulfatiert vorliegen.

Endogen kommt Heparin in verschiedenen Organen des Menschen wie Milz, Leber, Lunge, Darmmukosa, Thymus und Herz vor. Es wird in Granula von Mastzellen und basophilen Granulozyten zusammen mit Histamin gespeichert und kann unter Einwirkung von Proteinasen und Endoglykosidasen aus diesen freigesetzt werden. Die physiologische Rolle des Heparins ist dabei bis heute noch nicht eindeutig geklärt.

Heparin, das aus Schweinedarmmukosa oder Rinderlungen gewonnen wird, ist seit über 70 Jahren das Therapeutikum der Wahl zur antikoagulatorischen Therapie. Dabei differenziert man pharmakologisch zwischen unterschiedlichen Heparinen. Unfraktioniertes Heparin (UFH) besteht aus 200 bis 300 Monosacchariden und weist ein Molekulargewicht zwischen 5 und 30 kD auf (mittleres Molekulargewicht 15 kD). Seine antikoagulatorische Wirkung vermittelt es als vor allem als Kofaktor von Antithrombin III im Rahmen der Blutgerinnungskaskade. Durch Bindung und Konformationsänderung verstärkt es dessen Wirkung bei der Komplexbildung verschiedener Faktoren der Blutgerinnungskaskade (Faktoren IIa (Thrombin), IXa, Xa, XIa und XIIa), die dadurch in ihrer proteolytischen Aktivität gehemmt werden. Die Dosierung von UFH erfolgt in Internationalen Einheiten (I.E.), da Heparin als

Substanzmischung mit unterschiedlichen Molekulargewichtsspektren produkt- und chargenspezifische Wirksamkeiten aufweist. Dabei entspricht 1 mg UFH etwa 150 I.E.

Das Europäische Arzneibuch unterscheidet LMWH von UFH über deren Faktor IIa-Aktivität und Molekülmassenverteilung. Das Verhältnis von Faktor Xa- zu Faktor IIa-Aktivität muss demnach für LMWH mindestens gleich 1,5 sein. Die mittlere relative Molekülmasse und mindestens 60% der Moleküle müssen < 8 kD sein [174]. Ihre antikoagulatorische Wirkung vermitteln LMWH dabei durch Wechselwirkung mit verschiedenen Hämostase-Parametern, vorwiegend durch die Hemmung von Faktor Xa. Faktor IIa (Thrombin) wird durch LMWH deutlich weniger beeinflusst. Diese Eigenschaft äußert sich vor allem in einer geringeren Blutungsneigung der Patienten. Da LMWH eine höhere biologische Verfügbarkeit besitzen als UFH und dadurch eine längere Wirksamkeit, gelten sie heute als Mittel der Wahl zur antikoagulatorischen Therapie. LMWH werden durch Depolymerisation aus UFH gewonnen. Die Techniken, die dabei zum Einsatz kommen, sind ausführlich bei Linhardt et al. beschrieben [175]. An dieser Stelle sollen Techniken erwähnt werden, die für in dieser Arbeit verwendete Produkte zum Einsatz kommen:

- alkalische β -Elimination von Heparin-Benzylester zur Herstellung von Enoxaparin (Clexane[®])
- Desaminative Spaltung von Heparin aus Schweinedarmukosa mit salpetriger Säure zur Herstellung von Nadroparin (Fraxiparin[®])
- β -Elimination durch Heparinase von UFH zur Herstellung von Tinzaparin (Innohep[®])

Aufgrund der Heterogenität des Heparins versuchte man bald die Frage zu klären, welche Strukturmerkmale essentiell für die Bindung an Selektinen sind. Man kam zu der Erkenntnis, dass molekulare Anforderungen, die für die antikoagulatorische Wirkung des Heparins verantwortlich sind, sich von denen für die L- und P-Selektin-Bindungsfähigkeit unterscheiden [176, 177]. Als wichtige strukturelle Parameter wurden die Kettenlänge und die Ladung der Heparinmoleküle determiniert. Koenig et al. zeigten, dass UFH besser in der Lage sind, die Bindung von sLe^X oder PSGL-1-positiven Zellen an L- und P-Selektin zu inhibieren als LMWH und postulierten, dass eine größere Kettenlänge eine verbesserte Selektinbindungsfähigkeit mit sich bringe. Sie zeigten, dass UFH in 12-50fach geringeren Konzentrationen zur Selektininhibition eingesetzt werden können als sie für die antikoagulatorische Wirkung notwendig sind [107].

Neben der Kettenlänge und damit einhergehenden dem Molekulargewicht ist die Ladung des Heparins essentiell für die Selektinbindung. Durch Reduktion der Car-

boxylgruppe des Heparins werden so genannte „CR-heparins“¹⁹ erhalten, was zu einem Verlust der L- und P-Selektin-Bindungsfähigkeit führt. Bei der Reduktion entsteht aus der Carboxylgruppe eine Hydroxylgruppe, die wiederum sulfatiert werden kann, so dass ein so genanntes „CRS-heparin“²⁰ erhalten wird, das durch die Sulfatierung seine L- und P-Selektin-Bindungsfähigkeit wieder erhält, gleichzeitig aber keine antikoagulatorischen Eigenschaften mehr aufweist [178]. Über die Sulfatierung des Heparins ist bekannt, dass die C6-Sulfatierung des Glucosamins für die Selektinbindung essentiell ist. Eine Desulfatierung der Positionen 2-O und 3-O führt zu einem Verlust der antikoagulatorischen Heparinaktivität, wobei die Selektinbindungsfähigkeit erhalten bleibt [179, 180]. Trotz der bisherigen Erkenntnisse zu Struktur-Wirkungsbeziehungen von Heparin bei der Selektinblockade, ist es schwierig ein umfassendes Bild zu zeichnen, da Heparin ein heterogenes Gemisch verschiedenster Glucosaminoglykane darstellt. Die Untersuchung von Heparinzubereitungen mit engerer Massenverteilung (LMWH), der Einsatz semisynthetischer Heparine oder isolierter homogener Heparinfraktionen stellt verschiedene Ansatzpunkte zur weiteren Aufklärung der Grundlagen der Heparin-Selektin-Wechselwirkung dar.

Während für die Interaktion von Selektinen und seinen nativen Liganden kinetische Bindungsdaten vorliegen und man eine recht genaue Vorstellung vom Einfluss der Bindungskinetik auf die Selektinfunktion hat (siehe Kapitel 2.1.3), ist der Einfluss der Kinetik auf die Heparin-Selektin-Bindung noch nicht hinsichtlich der Inhibition der Tumorzellmetastasierung untersucht. Nur eine Arbeit berichtet über die Bestimmung von Bindungskonstanten der Heparin-P-Selektin-Bindung, ohne aber auf die Auswirkungen für die Inhibitionseigenschaften näher einzugehen [181]. Eine derartige Betrachtung soll in dieser Arbeit in Kapitel 4 angestellt werden.

Frau Dr. Juliane Fritzsche aus unserer Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass Heparin die Tumorzelladhäsion von B16F10-Melanomzellen zu inhibieren vermag, obwohl weder Selektine noch Selektinliganden auf der Oberfläche dieser Zelllinie nachzuweisen waren. Sie postulierte die Hemmung der Wechselwirkung des Integrins VLA-4 mit seinem Liganden VCAM-1, nachdem Heparin sowohl die Adhäsion von B16F10 an immobilisierten Endothelzellen als auch an immobilisierten VCAM-1-Fc-Chimären unterdrücken konnte. Da die Untersuchung dieser Wechselwirkung auf molekularer Ebene Teil dieser Arbeit sein wird, werden in den folgenden Kapiteln Integrine und Integrinliganden vorgestellt sowie deren Beteiligung bei der hämatogenen Metastasierung und die Wechselwirkung mit Heparin beleuchtet.

¹⁹engl. Carboxy Reduced heparin

²⁰engl. Carboxy Reduced Sulfated heparin

2.3 Integrine

2.3.1 Aufbau und Physiologie der Integrine

Die Selektin-vermittelte initiale Kontaktaufnahme, das Zellrollen und die Kinetik der Selektine sind ein wichtiger Bestandteil für die Frühphase der Rekrutierung von Leukozyten im Entzündungsgeschehen. Damit es aber zur Transmigration der Leukozyten kommt, bedarf es der festen Adhäsion am Endothel. Diese Aufgabe wird durch die Adhäsionsrezeptorfamilie der Integrine übernommen.

Strukturell sind Integrine langgestreckte, nicht-kovalent verbundene $\alpha\beta$ -Heterodimere. Jede Untereinheit hat eine verhältnismäßig lange extrazelluläre Domäne, eine transmembranäre Domäne und eine kurze zytoplasmatische Domäne aus 20-27 AS. In Wirbeltieren sind bislang 18 α - und acht β -Untereinheiten identifiziert, deren Kombination 24 verschiedene Integrine ergibt. Während manche Untereinheiten nur in einem einzigen Integrin anzutreffen sind, sind andere wie zum Beispiel die β 1-Untereinheit in 12 Integrinen oder die α V in fünf Integrinen zu finden. Integrine unterscheiden sich sehr in ihrer Ligandspezifität. Die spezifische α/β -Kombination ist nicht nur für die Liganderkennung verantwortlich, sondern beeinflusst darüber hinaus die Verbindung zu Komponenten des Zytoskeletts oder die Signalweiterleitung. Die Integrin-Zytoskelett-Verbindung („Integrierung“) ist namensgebend für diese Klasse der Adhäsionsrezeptoren.

Durch ihre Expression auf der Außenseite der Zellen und der gleichzeitigen Verbindung zum Zytoskelett können Integrine die Rolle von Schnittstellen einnehmen, die durch Ligandinteraktion den Zellen Informationen über ihre Lokalisation im Gewebe und ihr zelluläres Umfeld geben können [182]. Integrine vermitteln den Zusammenhalt von Gewebeverbänden und die Steuerung von Bewegung und Wachstum. Die genannten Funktionen können unter dem Begriff Zell-Matrix-Wechselwirkungen zusammengefasst werden. In ihrer Rolle als Adhäsionsrezeptoren vermitteln sie Zell-Zell-Wechselwirkungen.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten die unterschiedlichen Integrine zu gruppieren. Eine dieser Möglichkeiten ist die Einteilung anhand ihrer β -Untereinheiten. β 1-Integrine sind auf nahezu allen Zelltypen exprimiert und vermitteln vor allem Zell-Matrix-Wechselwirkungen. Zu den Liganden zählen entsprechend Moleküle der EZM wie Fibronectin, Vitronectin, Laminin, Osteopontin, Knochen-Sialoprotein und Kollagen [183]. Eine Ausnahme dieser Gruppierung stellt das Integrin α 4 β 1 (VLA-4²¹) dar, das in Kapitel 2.3.3 ausführlich vorgestellt wird. Es bindet neben Fibronectin auch VCAM-1²², einen Liganden aus der Immunglobulin-Superfamilie.

²²engl. Vascular Cell Adhesion Molecule-1

Während β 1-Integrine ubiquitär anzutreffen sind, ist die Expression der β 2- und der β 7-Untereinheit auf Leukozyten beschränkt, so dass die zweite große Gruppe die β 2-Integrine darstellen. Zusätzlich zu den beiden genannten sind auf Leukozyten auch Integrine mit β 1-, β 3- und β 7-Untereinheiten zu finden [184]. Wichtige Vertreter der β 2-Integrine sind das Lymphozyten-Funktion-assoziierte Antigen-1 (α L β 2, LFA-1²³) und das Macrophagen-Antigen-1 (α M β 2, Mac-1²⁴). Während LFA-1 konstitutiv auf allen Leukozyten vorhanden ist, wird Mac-1 in Speichergranula der Granulozyten und Monozyten vorgehalten und bei Aktivierung freigesetzt [185]. Liganden dieser Integrine sind vor allem in der Gruppe der ICAM²⁵ zu finden, der Interzellulären Adhäsionsmoleküle. Während ICAM-1 durch Zytokine induzierbar ist, werden ICAM-2 und ICAM-3 konstitutiv exprimiert.

Im Folgenden soll kurz auf den Aufbau der Integrine eingegangen werden. Die α -Untereinheit besitzt als wesentliche Strukturelemente den β -Propeller, die I-Domäne, die Stelzenregion, die transmembranäre und die zytoplasmatische Domäne. Sieben Segmente mit jeweils 60 AS am N-terminalen Ende der α -Untereinheit bilden den β -Propeller, dessen Konformation ihm einen scheibenförmigen Aufbau verleiht. Nur neun der α -Untereinheiten (α L, α M, α X, α D, α E, α 1, α 2, α 10 und α 11) besitzen die 200 Aminosäuren lange I-Domäne, die in verschiedenen Arbeiten auch als von-Willebrand-Faktor-A-Domäne bezeichnet wird. Die I-Domäne ist dabei zwischen die β -Faltblätter II und III des β -Propellers inseriert. Bei Integrinen mit diesen α -Untereinheiten bildet die I-Domäne die wichtigste, bei einigen die ausschließliche Bindungsdomäne.

Die Ligandbindung wird koordinativ über zweiwertige Metallionen ausgebildet. Die Teilbereiche der I-Domäne, die an koordinativen Bindungen zu den Metallionen beteiligt sind, werden Metallionen-abhängiges-Bindungsmotiv (MIDAS²⁶) genannt. Über das MIDAS-Motiv und die koordinative Bindung zu zweiwertigen Metallionen können negativ geladene Regionen der Liganden gebunden werden. Die Verbindung zwischen I-Domäne und dem β -Faltblatt des β -Propellers wird über eine flexible Kette aus 20 AS hergestellt. Der hohe Serinanteil dieses Verbindungsstücks sorgt für eine gewisse Flexibilität und Beweglichkeit, die für die Rezeptoraktivierung von Bedeutung ist. Integrine ohne I-Domäne werden als Non- α I-Integrine bezeichnet. Die Ligandbindung bei diesen Integrinen wird über den β -Propeller der α -Untereinheit und die β -Untereinheit vermittelt. An den β -Propeller schließt sich die 170 Å lange

²³engl. Lymphocyte Function-associated Antigen-1

²⁴engl. Macrophage Antigen-1

²⁵engl. InterCellular Adhesion Molecule

²⁶engl. Metal Ion-Dependent Adhesion Site

Stelzenregion an, die die Verbindung zur transmembranären Domäne darstellt und hauptverantwortlich für die Reichweite der α -Untereinheit ist.

Die β -Untereinheit besitzt ebenfalls das MIDAS-Motiv, das in einer Region eingebettet ist, die mit der I-Domäne der α -Untereinheit eine gewisse Sequenzhomologie aufweist und deshalb als I-ähnliche Domäne bezeichnet wird. Bei Non- α -I-Integrinen bildet die I-ähnliche Domäne zusammen mit dem β -Propeller der α -Untereinheit die Bindungsdomäne. An die Stelzenregion der β -Untereinheit schließt sich eine kurze Aminosäuresequenz an, die aufgrund ihrer Ähnlichkeit zum epidermalen Wachstumsfaktor (EGF²⁷) als I-EGF-Domäne bezeichnet wird und eine wichtige Rolle bei der Integrinaktivierung spielt. Abbildung 2.10 stellt den Aufbau der Integrine schematisch dar.

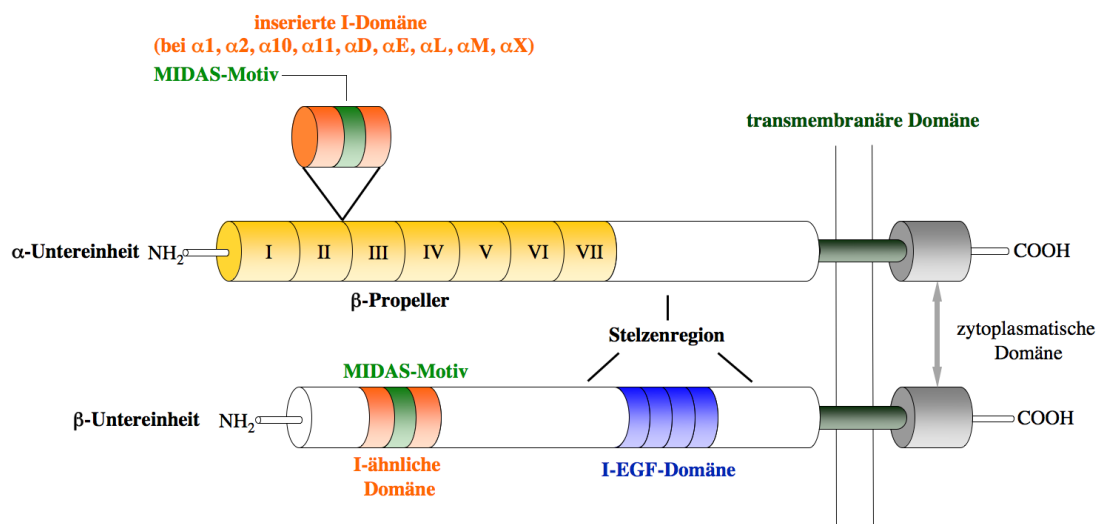


Abb. 2.10: Schematischer Aufbau der Integrine. Die Darstellung zeigt den schematischen Aufbau des Integrin-Heterodimers mit den einzelnen Domänen. Darstellung modifiziert nach Mould [186] und Shimaoka [187].

Integrine unterliegen komplexen Mechanismen zur Regulierung ihrer Ligandaffinität und -avidität. Durch einen Prozess, der als „inside-out signalling“ bezeichnet wird, können Stimuli anderer Rezeptoren, ausgelöst durch Zytokine auf der Seite der zytoplasmatischen Domäne, Signalwege induzieren, die die Affinität der Integrine oder ihre Präsentation auf der Zelloberfläche in kürzester Zeit verändern. Im Rahmen der Immunantwort und bei Entzündungsprozessen ist diese Form der Aktivierung von Integrinen auf Leukozyten und Thrombozyten von besonderer Wichtigkeit, denn deren schnelle Wirkungsvermittlung bei diesen Prozessen ist essentiell für die physiologische Funktion.

²⁷engl. Epidermal Growth Factor

Experimentelle Affinitäts- und Aviditätsveränderungen können außerhalb der Zellen durch zweiwertige Kationen wie Mn^{2+} oder Ca^{2+} , aber auch durch Antikörper oder Phorbolster ausgelöst werden. Die Anwesenheit der genannten Stoffe sorgt für eine Konformationsänderung des Integrins, die mit einer starken Affinitätsänderung einhergeht. Am Beispiel der α L-I-Domäne konnte gezeigt werden, dass sich die so genannte geschlossene und die offene Konformation in ihren K_D -Werten für die Bindung ihres natürlichen Liganden unterscheiden. Für die geschlossene Konformation wurde ein K_D -Wert von 2 mM bestimmt, während die offene Konformation einen K_D -Wert von 200 nM besitzt. Neben diesen beiden Extremen werden multiple Zwischenstadien sowohl für die Konformation als auch für die resultierenden Gleichgewichtsdissoziationskonstanten postuliert [187].

Verschiedene Arbeiten beschäftigen sich mit der molekularen Basis dieser Affinitätsveränderung und unterschiedliche Modelle vermögen sie zu beschreiben. Durch Bewegung des C-terminalen Linkers, der I-Domäne und β -Propeller verbindet, können die I-Domäne der α -Untereinheit und die I-ähnliche Domäne der β -Untereinheit in räumliche Nähe zueinander treten und so die Affinität der I-Domäne beeinflussen. Dieses Modell wird als Glockenseilmodell (engl. „bell-rope model“) bezeichnet [187, 188].

Ein weiteres Modell ist das so genannte Klappmessermodell (engl. „switchblade-like model“), das die Situation beschreibt, dass die I-Domäne, der β -Propeller und die I-ähnliche Domäne im inaktiven Zustand der Zellmembran zugewandt sind. Durch Bewegungen in den I-EGF-Modulen und den Stelzenregionen kommt es zu einem Aufrichten des gesamten Integrins und dadurch zu einer Zuwendung der Bindungsdomänen in Richtung potentieller Liganden [189].

Neben der Beeinflussung der Affinität eines einzelnen Rezeptors können Prozesse, die zu multivalenten Interaktionen führen die Avidität der Rezeptorbindung stark regulieren. Als Beispiel sei das Clustern vieler Rezeptoren zu einem so genannten „Patch“ genannt [190]. Im Falle der Integrine muss dazu deren Verbindung zum Zytoskelett kurzzeitig gelöst werden, woran sich eine laterale Diffusion entlang der Zellmembran anschließt, die zur Ausbildung von so genannten „Microclustern“ führt, die sich im weiteren Verlauf dann zu größeren „Cluster-Patches“ zusammenlagern [191].

Als „outside-in signalling“ werden Prozesse bezeichnet, bei denen die Ligandbindung und die anschließende Clusterung der Rezeptoren die Signalwege im Zellinneren beeinflussen. Also Folge des „outside-in signalling“ werden Morphologie, Wachstum und Differenzierung der Integrin-exprimierenden Zellen beeinflusst [192].

Das Zusammenspiel von Affinitätserhöhung durch Konformationsänderung und Aviditätserhöhung durch Clustern ist noch nicht vollständig verstanden. Es ist leicht vorstellbar, dass durch die Anwesenheit vieler Bindungspartner für einen Liganden in Form von Clustern die Wahrscheinlichkeit erhöht ist, eine Bindung eingehen zu können. Diese Vorstellung deckt sich mit Erkenntnissen von Bazzoni et al., die postulierten, dass die maßgebliche Aviditätserhöhung nicht durch konformelle Änderungen innerhalb der Integrine hervorgerufen wird, sondern durch die Clusterung nach erfolgter Ligandbindung [193]. Die Reihenfolge von Konformationsänderung und sich daran anschließender Clusterung lässt andere Autoren aber zu dem Schluss kommen, dass die Zeit, die zwischen Ligandbindung und Clusterung liegt, zu lange ist, um wirklich physiologische Relevanz im Zelladhäsionsprozess zu haben. Die Bindungsaffinität zwischen Integrinen und Liganden muss innerhalb von Sekunden erhöht werden, um zirkulierende Zellen erreichen zu können. Somit wäre die Affinitätsveränderung durch Konformationsänderung die Voraussetzung für die Zellbindung, während die später einsetzende Clusterung die Zelladhäsion nur noch zu stabilisieren vermag [187, 191].

2.3.2 Integrinliganden

Die meisten Integrin-Ligand-Paare wurden entweder durch Affinitätschromatographie oder durch Subtyp-spezifische Antikörper gefunden. Zusätzlich konnten diese Daten durch direkte Protein-Protein-Bindungsassays unterstützt werden. Eine Möglichkeit, die Vielzahl der Integrin-Ligand-Wechselwirkungen zu ordnen, ist die Einteilung in vier Hauptklassen aufgrund der strukturellen Gemeinsamkeiten von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen. Diese Klassen stehen in keinem Zusammenhang mit der evolutionären Entwicklung der Wechselwirkung [183].

RGD-bindende Integrine

Alle fünf α V-Integrine, zwei β 1-Integrine (α 5 β 1 und α 8 β 1) und α IIB β 3 binden Liganden, die das Tripeptid bestehend aus Arginin-Glycin-Aspartat (RGD) in ihrer Bindungsdomäne aufweisen. RGD findet sich vor allem in Proteinen der EZM. Die Bindung von Integrin-tragenden Zellen an RGD verhindert, dass die Zellen die Anoikis eingehen wie sie für Zellen, die sich außerhalb ihres Gewebeverbandes befinden, üblich ist. Es sei am Rande bemerkt, dass lösliche RGD-Tripeptide als mögliche Inhibitoren von Angiogenese, chronisch entzündlichen Erkrankungen und auch der Metastasierung untersucht werden, weil sie durch Bindung an Integrine deren Adhäsion an die EZM unterdrücken können und dadurch zur Anoikis der Zellen führen [194].

Im Falle der physiologischen Funktion der RGD-Tripeptide kommt es zur Bindung an eine Oberfläche zwischen der α - und der β -Untereinheit, wobei das Arginin des RGD in eine Bindungstasche des β -Propellers der α -Untereinheit passt, und Aspartat über eine kationische koordinative Bindung an die I-ähnliche Domäne der β -Untereinheit bindet [195, 196]. Eine Vielzahl von Proteinen der EZM besitzen das RGD-Motiv, als Beispiele seien Fibronectin, Vitronectin, von-Willebrand-Faktor und Thrombospondin genannt. Obwohl das Bindungsmotiv bei allen Bindungspartnern gleich ist, unterscheiden sich die Wechselwirkungen bei verschiedenen Integrinen in ihrer Affinität. Dies ist auf Unterschiede in der Präzision mit der RGD seine Bindungsmotive auf der α - und β -Untereinheit verschiedener Integrine binden kann, zurückzuführen [183].

LDV-bindende Integrine

LDV ist ein Tripeptid bestehend aus Leucin-Aspartat-Valin. Am bekanntesten ist sein Vorkommen in einer Spleißvariante des Fibronectins und wird vor allem durch das $\alpha 4\beta 1$ -Integrin (VLA-4) erkannt [197]. Außerdem binden $\alpha 4\beta 7$, $\alpha 9\beta 1$, die vier Mitglieder der $\beta 2$ -Familie und $\alpha E\beta 7$ LDV-Sequenzen in ihren Liganden. Obwohl strukturell sehr unterschiedlich zum RGD-Motiv, ist die Funktion des LDV-Motivs ähnlich. Ein Austausch von RGD durch Mutagenese zu LDV durch Tselepis et al. im Schlangengift-Desintegrin Kistrin führte zu einem Verlust der Bindungsfähigkeit an die physiologischen Liganden $\alpha V\beta 3$ und $\alpha 5\beta 1$ und gleichzeitig zur Bindungsfähigkeit an $\alpha 4\beta 1$, das durch Kistrin physiologisch nicht erkannt wird [198]. Als Desintegrine werden Proteine bezeichnet, die als Antagonisten Integrine binden und dadurch zu einem Verlust der Zellbindungsfähigkeit führen. Das Schlangengift Kistrin sorgt zum Beispiel zu einer Unterdrückung der $\alpha IIb\beta 3$ (GPIIb/IIIa)-induzierten Plättchenaggregation und wurde als Therapeutikum bei arteriellen Thrombosen untersucht [199].

Holomoge des LDV finden sich auch in Mitgliedern der Immunglobulin-Superfamilie wie VCAM-1 [200] und MAdCAM-1 [183]. Der genaue Bindungsort für das LDV-Motiv an Integrinen ist noch nicht aufgeklärt, aber es wird als sehr wahrscheinlich angesehen, dass LDV an ähnlichen Stellen bindet wie RGD. Der Einbau von LDV und RGD in nicht-adhäsive Proteine wie Staphylokokkus-Protein A führt zu einer Zellbindungsfähigkeit dieses Proteins [201].

$\beta 2$ -Integrine, die exklusiv auf Leukozyten exprimiert werden und dadurch für die Extravasation der Leukozyten im Rahmen der Adhäsionskaskade und für das „homing“ der Lymphozyten zuständig sind, binden ihre Liganden hauptsächlich durch eine Interaktion mit der I-Domäne der α -Untereinheit. Der zu Grunde liegende Me-

chanismus ist für die Interaktion zwischen der α L-I-Domäne und ICAM-1 ausführlich beschrieben [202]. Obwohl der Bindungsmechanismus sehr verschieden vom bisher beschriebenen LDV-Bindungsmechanismus ist, sind die Bindungsdomänen der Liganden dem LDV-Motiv sehr ähnlich. Der Hauptunterschied liegt darin, dass β 1- und β 7-Integrine Aspartat zur Koordination des Kations nutzen, während β 2-Integrine die Koordination über Glutamat ausbilden.

Weitere Integrinligandklassen seien an dieser Stelle nur der Vollständigkeit halber erwähnt.

- I-Domänen- β 1-Integrine (zeichnen sich durch ihre Laminin- und Kollagen-Bindungsfähigkeit aus [203])
- Laminin-bindende Integrine ohne I-Domäne [183]
- weitere Integrin-Ligand-Interaktionen (wie die Bindungsfähigkeit an Heparin, die in Kapitel 2.3.5 erläutert wird)

Abbildung 2.11 verdeutlicht die möglichen Kombinationen von α - und β -Untereinheiten der Integrine und die Zuordnung der Ligandklassen.

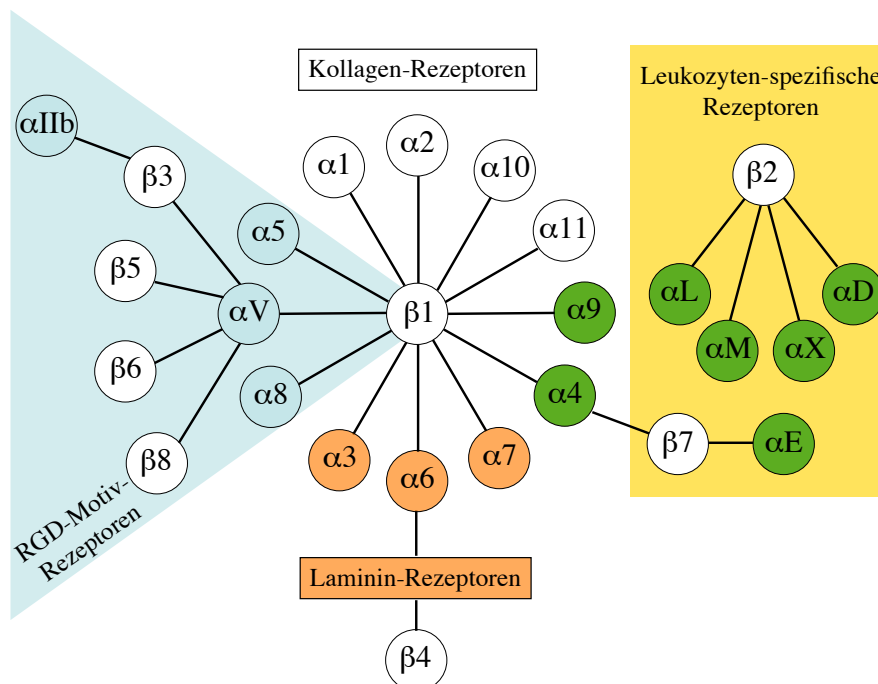


Abb. 2.11: Integrin-Kombinationen und Ligandklassen. β 1-Integrine bilden die größte Gruppe der Integrine und vermitteln vor allem Zell-Matrix-Wechselwirkungen: weiss: Kollagen- und Laminin-bindende Integrine, orange: ausschließlich Laminin-bindende Integrine. Die gelb unterlegten Integrine werden exklusiv auf Leukozyten exprimiert. Grün unterlegte α -Untereinheiten: LDV-bindende Integrine. Blau: RGD-Motiv-aufweisende Integrine. Abbildung modifiziert nach Hynes et al. [204].

2.3.3 Integrin VLA-4 und VCAM-1

Das Integrin VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$, CD49d/CD29) gehört zur VLA-Proteinfamilie. Der Begriff VLA leitet sich vom Englischen „very late activation antigen“ ab und charakterisiert die Eigenschaft der Mitglieder dieser Proteinfamilie, erst zwei bis vier Wochen nach *in vitro*-Stimulation im Prozess der T-Zellaktivierung in Aktion zu treten. Nachdem VLA-1 1983 und später VLA-2 durch Hemler et al. entdeckt und in den folgenden Jahren charakterisiert wurden, wurde VLA-4 zusammen mit VLA-3 und VLA-5 1987 von der gleichen Arbeitsgruppe erstmalig unter diesem Namen beschrieben [205, 206]. Nahezu gleichzeitig zeigten sie, dass mit der Entdeckung der VLA-Proteine 3 und 5 diejenigen Rezeptoren gefunden waren, von denen vorher nur die Fibronektin- und Laminin-Bindungsfähigkeit bekannt war und man schlussfolgerte, dass über diese Rezeptoren Zelladhäsion an die beiden Matrixproteine vermittelt werden kann [207].

Die VLA-Proteine weisen alle die gleiche β -Untereinheit auf und unterscheiden sich in ihren α -Untereinheiten. Die α -Untereinheit des VLA-4 ist 150 kD schwer und wie bei allen Integrinen mit der β -Untereinheit (130 kD) nicht-kovalent 1:1 assoziiert. Hemler et al. konnten es auf Lymphozyten und Monozyten nachweisen [206]. Bei der allgemeinen Beschreibung der Integrine wurde schon erwähnt, dass VLA-4 zu den Integrinen ohne inserierte I-Domäne gehört. Wie alle anderen VLA-Integrine vermittelt auch VLA-4 Zell-Matrix-Bindungen zum Beispiel zu Fibronektin. Im Vergleich zu VLA-5 wird diese Bindung allerdings an einer alternativ gespleißten Domäne des Fibronektins eingegangen. Unter den VLA-Proteinen bildet es eine Ausnahme, weil es neben Zell-Matrix-Wechselwirkungen auch Zell-Zell-Bindungen durch Bindung an VCAM-1 eingeht. Durch diese Eigenschaft kann VLA-4 am Entzündungsgeschehen teilnehmen, indem es die Bindung zwischen endotheliale VCAM-1 und verschiedenen Leukozyten wie Eosinophilen, Basophilen, NK-Zellen, Monozyten, B- und T-Zellen ermöglicht, die zur Transmigration dieser Zellen in das entzündete Gewebe führt.

VCAM-1 gehört als Ligand des VLA-4 zu einer weiteren Gruppe von Zelladhäsionsrezeptoren, der Immunglobulin-Superfamilie (Ig-SF). Diese große Proteinfamilie zeichnet sich durch das Vorhandensein von einer oder mehrerer homologer Ig-Einheiten aus. Ig-Einheiten sind aus 70 bis 100 AS aufgebaut, die durch Cysteine voneinander getrennt sind. Sie ordnen sich in Form nicht-paralleler β -Stränge an, die wiederum β -Faltblätter in einer so genannten „Sandwich“-Form bilden, die durch Disulfidbrücken stabilisiert wird [208]. Zelladhäsionsmoleküle bilden nur eine Untergruppe der Ig-SF, die unter anderem auch T-Zell-Rezeptoren, Wachstumsfaktoren oder das bakterielle Adhäsionsmolekül Intimin beinhaltet. Die Ig-Domänen der Prote-

ine der Ig-SF werden auf der extrazellulären Seite exprimiert. Die meisten Mitglieder der Familie besitzen eine transmembranäre Domäne und einen kurzen zytoplasmatischen Rest [209]. Neben ihrer Rolle als Adhäsionsrezeptorliganden sind sie auch bei der Entwicklung des Nervensystems und der Embryonalentwicklung beteiligt [209, 210]. Für die Zelladhäsion sind neben VCAM-1 die Unterfamilie der ICAMS mit fünf Mitgliedern und das Mucosa-Addressin-Zelladhäsionsmolekül-1 (MAdCAM-1) zu nennen [211, 212].

VCAM-1 wurde von zwei Gruppen unabhängig voneinander entdeckt. Durch Antikörperexperimente konnte ein Protein auf HUVEC²⁸ identifiziert werden, dessen Expression durch TNF- α induziert werden konnte. Man bezeichnete es deshalb mit dem Begriff „inducible cell adhesion molecule-110“ (INCAM-110²⁹). Seine Expression auf bestimmten Tumorzellen wurde schon in den ersten Arbeiten zu diesem Liganden nachgewiesen [118, 213]. Osborn und Mitarbeiter fanden ebenfalls 1989 einen Rezeptor, der monozytäre und lymphozytäre Zelllinien zur Adhäsion bringen konnte. Diesen Rezeptor, den sie mittels Klonierung auf HUVEC nach Stimulation mit TNF- α oder IL-1 nachweisen konnten, nannten sie VCAM-1 [214]. Die Similarität von INCAM-10 und VCAM-1 wurde 1990 durch Rice et al. bewiesen [213].

Die VCAM-1-Expression auf der Oberfläche von Endothelzellen wird nicht nur durch TNF- α , sondern auch durch Lipopolysaccharide und Thrombin erhöht. Auf genetischer Ebene regen IFN- α und IL-4 sowohl die VCAM-1- als auch die ICAM-1-Bildung an. Bei entsprechender Integrinaktivierung kann dadurch die Leukozytenadhäsion auf Endothelzellen gefördert werden [211, 215, 216].

Die VLA-4-Bindungsfähigkeit von VCAM-1 wurde sehr früh nach der Entdeckung von VCAM-1 nachgewiesen. Dieser Wechselwirkung, die nicht über die Fibronectin-Bindungsstelle im VLA-4 vermittelt wird, wurde eine große Bedeutung in der Rekrutierung mononukleärer Leukozyten vorhergesagt [217]. Inzwischen ist bekannt, dass VLA-4 nicht das einzige Integrin ist, dass VCAM-1 zu binden vermag. Auch $\alpha 4\beta 7$, $\alpha D\beta 2$ und $\alpha M\beta 2$ haben Affinität zu VCAM-1. Neben der Expression auf vaskulären Zellen wird VCAM-1 auch auf Monozyten-ähnlichen Zellen der Leber (Kupfferzellen), des Gehirns sowie einigen epithelialen Zellen der Niere exprimiert [213, 218]. Die Expression auf Tumorzellen wurde schon erwähnt und wird in Kapitel 2.3.4 noch näher erläutert.

Ähnlich wie L-Selektin unterliegt auf der Zelloberfläche exprimiertes VCAM-1 dem Prozess des „sheddings“. Durch das Entfernen von VCAM-1 von der Endotheloberfläche wird die Adhäsion von Leukozyten vermindert. Analog zu L-Selektin

²⁸engl. Human Umbilical Vein Endothelial Cells

²⁹engl. INducible Cell Adhesion Molecule-110

wird auch löslichem VCAM-1 eine regulatorische Funktion im Prozess der Leukozytenrekrutierung zugesprochen. Die Tatsache, dass abgelöstes VCAM-1 immer noch Integrinbindungsfähigkeit besitzt, gibt ihm die Möglichkeit, als endogener Inhibitor zu wirken.

2.3.4 Bedeutung von VCAM-1 und VLA-4 im Rahmen von Krebserkrankungen

VCAM-1 wird neben seiner Expression auf Endothelzellen der Blutgefäße auch auf verschiedenen malignen Zelllinien exprimiert. Als Beispiel seien Zellen von Kopf- und Halstumoren [219], Mammakarzinom- [220] sowie Magenkarzinomzellen [221] zu nennen. Eine Erhöhung der VCAM-1-Expression auf diesen Zellen wird als prognostischer Marker genauso herangezogen wie erhöhte Serumlevel an VCAM-1. Lösliches VCAM-1 kann VLA-4-positive T-Lymphozyten binden. Diese entfernen sich dadurch von Tumorzellen. Daher kann die VCAM-1-VLA-4-Interaktion als pro-neoplastischer Faktor wirken [222].

Für Prostatakarzinomzellen konnte gezeigt werden, dass die VCAM-1-Expression mit dem Übergang vom Entzündungsstadium in die Karzinogenese einhergeht. Für diese Krebsart gilt die enge Verbindung zwischen chronischer Entzündung und neoplastischer Entartung als gesichert, während der molekulare Mechanismus noch nicht vollständig geklärt ist. Wong et al. postulieren in ihrer Arbeit, dass die Expressionserhöhung von VCAM-1 und anderer Oberflächenstrukturen auf Prostataepithelzellen den Übergang zwischen Entzündung und Krebserkrankung markiert [223].

Andererseits kann VCAM-1 auf Tumorzellen selbst zur Rekrutierung von T-Lymphozyten beitragen. Für Tumorzellen bestimmter Nierenkarzinome ist zum Beispiel beschrieben, dass die Expression von VCAM-1 zur verstärkten Rekrutierung von Lymphozyten führt, die mit verringerter Metastasierung und vermindertem Tumorstadium in Verbindung gebracht wird [224]. VCAM-1 nimmt also im Rahmen von Krebserkrankungen keine eindeutige Rolle als pro- oder antineoplastisch-wirkender Ligand ein.

Auch VLA-4 wird eine Bedeutung bei der Rekrutierung von zytotoxischen T-Zellen zugesprochen. Sasaki und Mitarbeiter konnten durch Stimulation von Tc-2-Zellen, einer CD8-positiven zytotoxischen T-Zelllinie, mit IL-4 eine Herabregulierung der VLA-4-Expression bei gleichzeitigem Erhalt der Expressionsmuster für andere Oberflächenproteine erreichen. Die VLA-4-Suppression führte zu einer Verringerung der Transmigrationsfähigkeit der Tc-2-Zellen in das Melanomgewebe von Mäusen, so dass im Umkehrschluss VLA-4 eine Bedeutung für die antineoplastische Aktivität von zytotoxischen T-Zellen beigemessen wurde [225].

VLA-4 wird auf verschiedenen Tumorzellen exprimiert. Neben Osteosarkom- und Rhabdomyosarkomzelllinien [226] ist vor allem die Expression auf verschiedenen Melanomzelllinien zu nennen [227, 228]. Die Wechselwirkung von tumorzellständigem VLA-4 mit endotheliale VCAM-1 spielt dabei als Adhäsionsmechanismus zur Rekrutierung von Tumorzellen aus der Blutbahn in andere Gewebe eine Rolle. Klemke et al. konnten *in vitro* die Adhäsion und Transmigration von VLA-4-positiven Tumorzellen an Endothelzellschichten nachweisen [229]. Im Mausmodell konnte mithilfe von VCAM-1-Expressionsstimulierung die VLA-4-VCAM-1-Wechselwirkung als prometastatische Wechselwirkung im Rahmen der Lungenmetastasierung verschiedener Krebszelllinien nachgewiesen werden [230–232].

Ähnlich wie die Expression von VCAM-1 auf Tumorzellen mit dem Verlauf der Krebserkrankung korreliert, gilt dies auch für die Expression von VLA-4 auf Melanomzellen primärer Tumore [233]. Die Auswirkungen, die eine vermehrte Expression von VLA-4 auf die Metastasierung hat, werden von unterschiedlichen Gruppen unterschiedlich bewertet. Qian et al. transfizierten eine VLA-4-negative hochmetastatische Zelllinie mit der cDNA für die Integrin- α -Untereinheit. Da die Zelle das Gen für die β 1-Untereinheit besaß, war sie in der Lage, das α 4 β 1-Heterodimer zu exprimieren. Dadurch verlor die Zelllinie ihre Metastasierungsfähigkeit sowohl *in vitro* als auch nach s.c.-Injektion im Mausmodell. Da die Metastasierungseigenschaften der Zelllinie bei i.v.-Injektion erhalten blieb, postulierten die Autoren, dass VLA-4 vor allem bei der Durchquerung der EZM im Rahmen der Metastasierung eine Rolle spielt [234]. Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit von Liang und Dong betont die Rekrutierung von Tumorzellen über die VLA-4-VCAM-1-Interaktion. Sie wiesen für sLe^{x/a}-negative Melanomzellen die Adhäsions- und Transmigrationsfähigkeit an Endothelzellschichten unter Flussbedingungen nach [235].

Der Einfluss von VLA-4 und VCAM-1 auf die hämatogene Metastasierung ist mit der jetzigen Datenlage nicht eindeutig einzuordnen. Die Untersuchung dieser Wechselwirkung als Zielstruktur für Inhibitionsansätze könnte einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Rolle im Rahmen der Tumorzellmetastasierung leisten und gleichzeitig zu einem Therapieansatz zur Behandlung der Metastasierung führen. Inwiefern Heparin als Integrin-Ligand diese Aufgabe erfüllen kann, soll im Folgenden erläutert werden.

2.3.5 Heparin als Integrin-Ligand

Die Funktion endogenen Heparins ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Viele Heparinwirkungen und Bindungsmöglichkeiten wurden in den vorangegangenen Kapiteln erwähnt. Eine weitere Heparin-Wechselwirkung ist die Bindungsfähigkeit

an verschiedenen Integrinen. So bindet Heparin die Integrine $\alpha M\beta 2$ (Mac-1) und $\alpha X\beta 2$ mit hoher Affinität [236, 237]. Diese beiden Integrine spielen eine wichtige Rolle bei der Adhäsion und Migration von myeloiden Leukozyten. Durch Bindung verschiedener Komplement-Fragmente sind sie darüber hinaus an der Phagozytose von Mikroben beteiligt. *In vitro* konnte die Bindungsfähigkeit von Leukozyten an immobilisiertem Heparin durch Diamond et al. nachgewiesen werden. Durch Transfektion von Makrophagen und der dadurch resultierenden Expression des Integrins $\alpha X\beta 2$ konnte diesen Zelllinien eine Heparin-Bindungsfähigkeit verliehen werden [237]. Die Bindung des Heparins erfolgt dabei Mg^{2+} -abhängig an der I-Domäne der genannten Integrine. Das Pentasaccharid Fondaparinux zeigte in den genannten Arbeiten keine Integrin-Bindungsfähigkeit. Eine Anzahl von > 10 Monomeren wurde als Mindestlänge für die Heparininteraktion gefunden. Durch Konformationsänderungen im $\alpha X\beta 2$ nach Bindung von größeren Heparinfragmenten konnte eine allosterische Regulierung der Heparinaffinität festgestellt werden [238].

Für Thrombozyten ist die Heparin-induzierte Thrombozytenaggregation beschrieben. Als Nebenwirkung einer Heparintherapie werden sie je nach zeitlichem Auftreten im Therapieverlauf als HiT I und HiT II bezeichnet. Da sie unbehandelt zum Schlaganfall führen können, sind sie sehr gefürchtet. Es wird vermutet, dass die Bindung von Heparin am GPIIb/IIIa (Integrin $\alpha IIb\beta 3$) zu einem „outside-in signalling“ führt, das die Fibrinogenbindungsfähigkeit der Thrombozyten erhöht [239].

Heparin vermag die Adhäsion leukämischer Zellen an verschiedene Integrine zu modulieren. Dabei sorgt die Bindung von Heparin an Integrine mit $\beta 3$ -Untereinheit für eine Verstärkung der Zellbindung, während Bindung an Integrine mit $\beta 5$ -Untereinheit zur Inhibition der Bindungsfähigkeit der Zellen führt [240].

Park und Mitarbeiter konnten kürzlich zeigen, dass die Kombination von Heparin mit dem RGD-Bindungsmotiv in einem Molekül zu einem wirksamen Inhibitor von Tumorwachstum und Angiogenese im Tiermodell bei Plattenepithelkarzinom führt. *In vitro* konnte eine starke Bindungsfähigkeit an Integrin $\alpha V\beta 3$ festgestellt werden, die auch die Adhäsion und Migration von Endothelzellen an Vitronektin zu unterdrücken vermochte [241].

Es wurde schon erwähnt, dass sich Frau Dr. Juliane Fritzsche aus unserer Arbeitsgruppe mit der Interaktion von Heparin und anderen sulfatierten Polysacchariden mit dem Integrin VLA-4 beschäftigt hat. Sie konnte zeigen, dass Heparin die Adhäsion von B16F10-Melanomzellen in einem Zelladhäsionsassay an VCAM-1 inhibiert. UFH waren dabei weniger potent als LMWH. Phycarinsulfate, die als potente Selektininhibitoren anerkannt sind, zeigten keine Inhibitorwirkung bei der VLA-4-VCAM-1-Interaktion [242]. Mit dieser Arbeit wurde die Integrin-Inhibition durch Heparin

erstmals mit dem Prozess der hämatogenen Tumorzellmetastasierung in Verbindung gebracht und VLA-4 als neue Zielstruktur für eine antimetastatische Therapie erkannt. Die mechanistische Untersuchung der Heparin-VLA-4-Interaktion soll Teil dieser Arbeit sein und wird ausführlich im Kapitel 4 behandelt.

2.4 Biosensoren

In den vorangegangenen Kapiteln wurde die Bedeutung von Adhäsionsrezeptor-Ligand-Wechselwirkungen und deren Inhibition erläutert. Verschiedene *in vitro*- und Tiermodelle stehen am Beginn der Charakterisierung derartiger Wechselwirkungen. Während Tier- und zellbasierte-Modelle besonders geeignet sind, die Folgen einer Wechselwirkung, wie zum Beispiel die Zelladhäsion im Flusskammerassay oder die Unterdrückung der Metastasierung durch Heparin darzustellen, gibt es andere Methoden, die die Detektion dieser Wechselwirkungen auf molekularer Ebene ermöglichen. Dadurch können Erkenntnisse zu molekularen Mechanismen, räumlichen Anforderungen und zeitlichem Verlauf der Wechselwirkungen gewonnen werden. Unter dem Begriff „Biosensoren“ wird eine Vielzahl von Methoden zusammengefasst, die es ermöglichen, auch Wechselwirkungen zwischen Adhäsionsrezeptoren wie Selektinen, Integrinen und ihren Liganden oder Inhibitoren isoliert zu betrachten und in elektrische Signale umzusetzen. Im Folgenden sollen Biosensoren im Allgemeinen und speziell akustische Biosensoren vorgestellt und ihre Bedeutung für die Detektion von Adhäsionsrezeptorwechselwirkungen erläutert werden.

Die Internationale Union für reine und angewandte Chemie (IUPAC³⁰) definiert einen Biosensor als geschlossenes integriertes System, das eine spezifische quantitative oder halb-quantitative analytische Information liefert und das aus biologischem Erkennungselement (biochemischer Rezeptor) und Signalumwandler (Transducer) besteht, die sich in direktem räumlichen Kontakt befinden [243]. Die biologischen Moleküle, die dabei als Erkennungseinheiten fungieren, werden in das Sensorsystem integriert. Bei solchen Molekülen kann es sich um Rezeptoren, Antikörper, Enzyme, DNA, RNA oder Kohlenhydratstrukturen handeln. Aber auch Mikroorganismen, eukariotische Zellen oder Gewebsschnitte können als Erkennungseinheit eingesetzt werden. Die Wechselwirkung solcher Erkennungseinheiten mit anderen Molekülen kann über verschiedene physikalische Prinzipien detektiert und durch den Signalwandler in ein auswertbares elektrisches Signal umgesetzt werden [244].

Der Signalwandler wird durch die IUPAC als Einheit definiert, die bestimmte Formen von Energie in elektrische Energie und dadurch in Signale umsetzt. Abbildung

³⁰engl. International Union of Pure and Applied Chemistry

2.12 illustriert schematisch den allgemeinen Aufbau eines Biosensors und verdeutlicht einige ausgewählte Anwendungsgebiete.

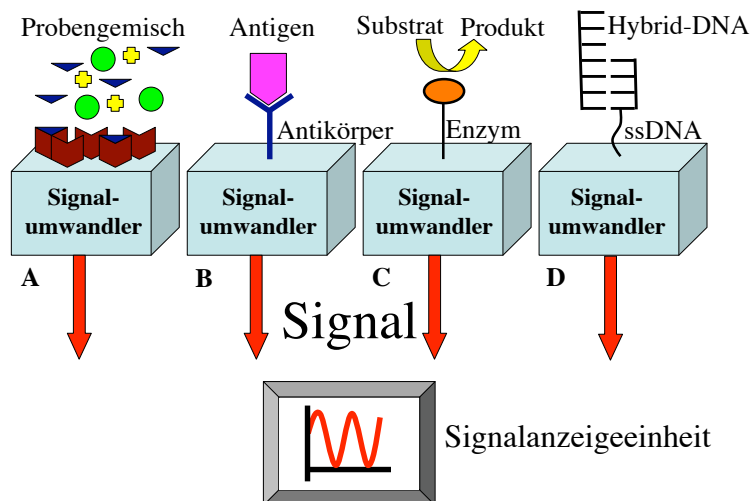


Abb. 2.12: Schematischer Aufbau von Biosensoren und beispielhafte Anwendungsgebiete. Verschiedene Erkennungseinheiten bilden eine funktionelle Einheit mit dem jeweiligen Signalumwandler, der die Interaktion von Erkennungseinheit und Analytmolekülen in ein (meist elektrisches) Signal umwandelt. Dieses Signal kann zur bildlichen Darstellung zu einer Anzeige weitergeleitet werden. **A:** Die Erkennungseinheit wechselwirkt nur mit einer Molekülsorte aus einem heterogenen Probengemisch. **B:** Ein Antikörper bindet sein Antigen. **C:** Ein Enzym setzt sein Substrat zu einem spezifischen Produkt um. **D:** ssDNA³¹ bindet an komplementäre DNA unter Ausbildung von Hybrid-DNA.

In der Theorie können verschiedene physikalische Phänomene in der Biosensorik zur Signalwandlung genutzt werden: akustische Wellen, Heizkapazität, Heiztransfer, Photonen, Neutronen, Ionen, radioaktive Partikel, Elektronen, elektrische und magnetische Felder. In der Praxis basieren die meisten gebräuchlichen Biosensoren auf optischen Signalumwandlern. Nur wenige neuartige Signalumwandlungsmöglichkeiten haben den akademischen Bereich verlassen und sind zu robusten und kommerziell erhältlichen Systemen avanciert [245–248]. Zu den wichtigsten optischen Biosensorsystemen gehören Oberflächenplasmonresonanz-Biosensoren (SPR³²) und reflektometrische Interferenzspektroskopie-Biosensoren (RIfS). Die Zahl von 1350 Publikationen basierend auf SPR-Experimenten im Vergleich zu 600 Publikationen mit akustischen Biosensoren im Jahr 2006 dokumentiert die vorherrschende Stellung optischer Biosensorsysteme [249]. SPR-Biosensoren sind hochentwickelt und gelten in der wissenschaftlichen Gemeinschaft als Methode der Wahl zur Detektion von Interaktionen auf molekularer Ebene. Trotz alledem sind SPR-Sensoren in bestimmten

³¹engl. single-stranded Deoxyribonucleic acid

³²engl. Surface Plasmon Resonance Spectroscopy

Bereichen aufgrund des grundsätzlichen Messprinzips limitiert. Diese Limitierungen äußern sich vor allem

- bei der Detektion von Signalen, die nicht durch reine Massenveränderungen verursacht sind (Dichte, Viskosität, Proteinfaltung).
- bei den Möglichkeiten der chemischen Modifikation der Sensoroberfläche, da die Messung der Refraktionsänderung eine Goldoberfläche voraussetzt und die Hersteller von SPR-Biosensoren vor-funktionalisierte Sensorchips anbieten, deren genaue Beschichtung als Firmengeheimnis gilt.
- im großen Einfluss äußerer Faktoren wie Pufferwechsel auf den Refraktionsindex, der eine Neukalibrierung des Systems bei einem Pufferwechsel erfordert [249].

Trotz der vorherrschenden Stellung optischer Biosensoren finden akustische Biosensoren in den letzten zehn bis fünfzehn Jahren nicht nur wegen ihres breiten Einsatzgebietes mehr Beachtung. Vor allem besetzen sie Nischen in der Detektion molekularer Interaktionen, bei denen es nicht nur um reine Massenveränderungen geht, sondern auch um die Charakterisierung viskoelastischer Eigenschaften [250].

Im Folgenden sollen akustische Biosensoren wie die Quarzmikrowaage oder akustische Oberflächenwellensensoren näher vorgestellt und von anderen Biosensoren abgegrenzt werden.

2.5 Akustische Biosensoren

Akustische Biosensoren gehören zu den mikrogravimetrischen Systemen und werden in der Literatur allgemein als QCM³³-Sensoren bezeichnet. In den folgenden Kapiteln wird näher darauf eingegangen, dass diese Begriffsverwendung nicht ganz exakt ist, da ganz verschiedene Signalumwandlungswege unter dem Begriff QCM zusammengefasst werden, die aber unterschiedliche physikalische Phänomene zur Transduktion nutzen [243]. Allen akustischen Biosensoren ist die Messung von physikalischen Eigenschaften akustischer Wellen gemein, die sich in oder an der Oberfläche von so genannten piezoelektrischen Substraten bewegen. Der piezoelektrische Effekt ist eine Eigenschaft bestimmter Feststoffe, auf gerichteten mechanischen Zug, Druck oder Torsion mit einer Änderung der Ladungsverteilung innerhalb des Feststoffs zu reagieren. Der Begriff selbst leitet sich vom griechischen $\Pi\epsilon\zeta\epsilon\iota\nu$ „drücken, pressen“ ab und wurde erstmals im Jahr 1880 durch die Brüder Pierre und Jacque Curie beschrieben [251, 252]. Dieser Effekt tritt ausschließlich in nichtleitenden Materialien auf, deren Kristalle

³³engl. Quartz Crystal Microbalance

kein Inversionszentrum in ihrer Kristallstruktur aufweisen. Der prominenteste Vertreter ist α -Quarz, ein Mineral, das chemisch aus Siliziumdioxid besteht und im Gegensatz zu Feldspat, einer anderen Modifikation des Siliziumdioxids, eine trigonale Kristallstruktur aufweist. Lithiumniobat, Bariumtitanat, Galliumorthophosphat und Berlinit sind weitere Beispiele für piezoelektrische Kristalle. Abbildung 2.13 stellt das Zustandekommen des piezoelektrischen Effekts durch mechanische Beanspruchung bestimmter Materialien schematisch dar.

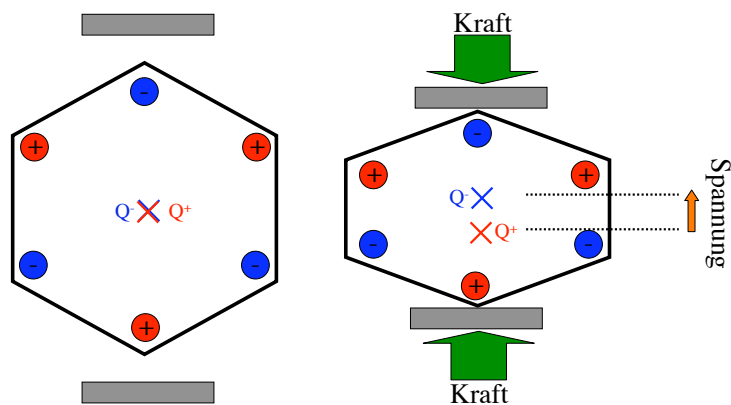


Abb. 2.13: Schematische Darstellung des piezoelektrischen Effekts. Die Ladungsschwerpunkte Q^+ und Q^- , die im linken Bildteil noch übereinander liegen, verlagern sich im rechten Bildteil durch Einwirkung einer mechanischen Kraft. Dadurch entsteht ein elektrischer Dipol, der als elektrische Spannung gemessen werden kann. Die Abbildung wurde in Anlehnung an Degreen [253] erstellt.

Als inversen oder reziproken piezoelektrischen Effekt bezeichnet man die Eigenschaft der eben genannten Materialien, auf das Anlegen eines äußeren elektrischen Feldes mit einer mechanischen Verformung zu reagieren. Diese Verformung ist von der Art des elektrischen Feldes abhängig. Bei einer angelegten Wechselspannung erreicht die Deformationsschwingung des piezoelektrischen Materials ein Maximum, wenn die Wechselfrequenz der Spannung und die Schwingung in Resonanz sind. Die Lage dieses Maximums wird darüber hinaus auch von der Dichte, der Temperatur und der Viskosität des angrenzenden Mediums beeinflusst. Diese Beeinflussbarkeit der Verformung prädestiniert den inversen piezoelektrischen Effekts als analytisches Messprinzip.

2.5.1 Grundlagen der akustischen Biophysik

Akustische Signalwandler auf Basis von Quarzkristallen sind Teil unseres Alltags, ohne dass man sich dessen immer bewusst ist. Im Milliardenmaßstab werden Quarzkristalle in Armbanduhren, Computern, Fernsehern, Autos, elektronischen Geräten,

vor allem Telefonen, verbaut. In den frühen Tagen der elektronischen Kommunikation, als Quarz-Resonatoren nur im limitierten Umfang zu erhalten waren, fand die Frequenzeinstellung solcher Resonatoren noch nach empirischen Vorgehensweisen statt [254].

Erst durch Erkenntnisse des deutschen Physikers Günther Sauerbrey aus dem Jahre 1959 war es möglich, die Frequenzeigenschaften von Schwingquarzen exakt voraus zu berechnen und einzustellen [255]. Durch Anlegen einer Wechselspannung an der Ober- und Unterseite eines Quarzkristalls, der mit einer Goldelektrode bedampft ist, kommt es innerhalb des Kristalls zu einer Verschiebung von Ionen in jeder einzelnen Elementarzelle des Quarzkristalls. Die Summe dieser Einzelverschiebungen resultiert in einer Verformung des Kristalls. Da es sich bei der angelegten Spannung um eine Wechselspannung handelt, ändert die Verformung mit jedem Wechsel der Spannung ihre Richtung. Die Frequenz der Verformung entspricht im Resonanzfall der Frequenz der angelegten Spannung. Bei dieser Verformung werden die Schichten des Quarzes gegeneinander verschoben. Innerhalb der Schichten kommt es aber nicht zu einer Deformation. Diese Art der Quarzschwingung wird als Scherschwingung oder Scher-Dickenschwingung bezeichnet [256]. In Abbildung 2.14 ist die Scherschwingung eines Quarzkristalls nach Anlegen eines elektrischen Feldes dargestellt.

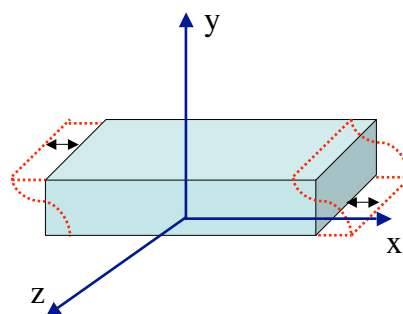


Abb. 2.14: Schematische Darstellung des Scher-Dickenschwingmodus. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes an der Ober- und Unterseite einer Platte aus α -Quarz kommt es zu einer Verschiebung der Quarzschichten in horizontaler Ebene, ohne dass es zu einer Deformation innerhalb der Schicht kommt. Die Anlegungsrichtung läuft entlang der y -Achse. Die x -Achse markiert die Schwingrichtung. Eine Bewegung in Richtung der z -Achse bleibt aus.

Die Anregungsrichtung verläuft dabei senkrecht zur Quarzoberfläche, die Schwingung vollzieht sich in der horizontalen Achse. Die Grundfrequenz f_Q hängt von der Dicke des Quarzes d_Q und der Ausbreitungsgeschwindigkeit der Transversalwelle v_{tr} ab. Die Ausbreitungsgeschwindigkeit hängt von der Dichte der Quarzscheibe und vom Schermodus der Schwingung ab und kann als konstant angesehen werden.

$$f_Q = \frac{v_{tr}}{2d_Q} \quad (2.1)$$

Sauerbrey konnte erstmals zeigen, dass es einen linearen Zusammenhang zwischen der Resonanzfrequenz eines Schwingquarzes im Scher-Dickenschwingmodus und dessen Masse gibt. Er bezog bei seinen Betrachtungen aber nicht nur die Eigenmasse des Quarzes mit ein, sondern zeigte auch, dass eine Masse, die sich auf dem Quarzmaterial anlagert und im Verhältnis zur Gesamtmasse des Quarzes klein ist (maximal 2% des Eigengewichtes des Quarzkristalls), sich genauso verhält wie das Quarzmaterial selbst. Eine aufgelagerte Masse ändert somit formal die Dicke der Quarzscheibe und damit die Resonanzfrequenz der Quarzschwingung (siehe Gleichung 2.2).

$$\frac{\Delta f}{f} = -\frac{\Delta d_Q}{d_Q} = -\frac{\Delta m}{\rho_Q F_Q d_Q} \quad (2.2)$$

In dieser Gleichung stellen f die Eigenfrequenz des Quarzes, ρ_Q die Dichte der Quarzscheibe, F_Q die Fläche, d_Q die Dicke der Quarzscheibe und Δm die Masse einer zu wiegenden Schicht auf dem Kristall dar. Da sich die Eigenschaften der Quarzscheibe während der Messung nicht verändern, können d_Q , ρ_Q und F_Q als konstant angesehen werden und in der Konstanten C_f zusammengefasst werden. C_f ist demnach eine Gerätekonstante und wird als Schichtwägemempfindlichkeit bezeichnet.

$$\Delta f = -C_f \Delta m \quad (2.3)$$

Aus Gleichung 2.2 und 2.3 geht hervor, dass die Massenänderung an der Oberfläche eines zur Schwingung angeregten Quarzsensors eine proportionale Änderung der Resonanzfrequenz zur Folge hat. Diese Änderung hängt unter anderem von der Eigenfrequenz des Quarzes ab. Je höher die Eigenfrequenz ist, desto höher ist die Empfindlichkeit des gesamten Messsystems. Für einen 10 MHz-Quarzsensoren, wie er in der Praxis eingesetzt wird, ergibt sich eine Empfindlichkeit von $0,226 \text{ Hz cm}^{-2}$. Auf einer Fläche von 1 cm^2 verursacht eine Massenlagerung von $4,4 \text{ ng}$ eine Frequenzänderung von 1 Hz . Bei der Anwendung von Quarzmikrowaagen, die auf der Schwingung von Quarzsensoren im Scher-Dickenschwingmodus basieren, kann eine Steigerung der Empfindlichkeit durch eine Erhöhung der Eigenfrequenz erreicht werden. Diese ist wiederum abhängig von der Dicke des Quarzes. Je dünner der Quarz, desto höher ist seine Eigenfrequenz. Es gilt Gleichung 2.4, die besagt, dass eine Resonanzschwingung genau für den Fall erreicht wird, bei dem die Dicke der Quarzscheibe d_Q halb so groß ist wie die Wellenlänge der induzierten Transversalwelle λ_Q .

$$d_Q = \frac{\lambda_Q}{2} \quad (2.4)$$

In der Praxis kann die Empfindlichkeit aber nur bedingt gesteigert werden, denn die Verringerung der Dicke eines Quarzkristalls führt zu Problemen in der Handhabung. Außerdem wird der schaltungstechnische Aufwand durch eine Frequenzerhöhung wesentlich größer. Für die klassische QCM-Technik finden Quarzsensoren mit 5-30 MHz Resonanzfrequenz Anwendung. Bei der Verwendung von akustischen Oberflächenwellensensoren können diese Probleme umgangen werden, da durch die spezielle Schnitttechnik des Quarzes eine extrem dünne Führungsschicht erhalten wird, die die eigentliche Schwingung induziert, die aber auf einem dickeren (nichtschrwingenden) Quarzuntergrund liegt. Daher ist es möglich, Eigenfrequenzen von bis zu 150 MHz einzusetzen und dadurch die Empfindlichkeit drastisch zu steigern. Auf detailliertere und weitere Besonderheiten der SAW-Technik wird in Kapitel 2.5.3 eingegangen. Sauerbrey postulierte in seiner Arbeit, dass das empirische Eichen von Quarzresonatoren wie es für die Telekommunikation üblich war, entfallen werde und dass es durch Kenntnis der Dicke (und damit der Masse) des Quarzsensors möglich sein werde, dessen Resonanzfrequenz vorherzusagen. Er und andere Wissenschaftler seiner Zeit konnten das immense Potential, das in der von ihnen erforschten Technik liegt, jedoch noch nicht vollends abschätzen, da die Anwendung ihrer Kenntnisse erst durch komplexe elektronische Schaltungen möglich wurde. Der Einfluss der Elektronik auf die Entwicklung der QCM-Technik soll im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter betrachtet werden, kann aber unter Borngräber [257] detailliert nachvollzogen werden.

2.5.2 Messungen in Flüssigkeit mit akustischen Biosensoren

Die beschriebenen Zusammenhänge zwischen der Resonanzfrequenz eines Schwingquarzes und der Massenbeladung wurden ursprünglich für Messungen an Quarz-Luft-Phasengrenzen beschrieben und gelten streng genommen nur hier. Bei Messungen in Flüssigkeit kommt es zu erheblichen Energieverlusten der Quarzschwingung durch die umgebende (flüssige) Materie. An Luft oder im Vakuum sind diese Verluste vernachlässigbar klein. In Flüssigkeiten wird die Quarzschwingung aber derart stark gedämpft, dass sie lange Zeit als limitierender Faktor für derartige Messungen angesehen wurden. Durch die elektronische Entwicklung der letzten Jahrzehnte konnten geeignete Beschaltungen für Messanordnungen in Flüssigkeiten realisiert werden, die ausreichend stabile Schwingungen ermöglichen. Derartige Schaltungen erlauben es sogar, neben der reinen Massenlagerung an Quarzoberflächen auch viskoelastische Eigenschaften der adsorbierten Masse zu detektieren.

Gleichzeitig beeinflusst auch jede Änderung der Flüssigkeit über der Quarzoberfläche, wie man sie zum Beispiel durch einen Pufferwechsel erreichen würde, die Schwingung des Quarzsensors, denn durch Änderung der Viskosität des angrenzenden

Mediums verändert sich auch der Energieverlust der eigentlichen Quarschwingung. Gordon und Kanazawa widmeten sich in ihren Arbeiten dem Einfluss von Flüssigkeiten auf die Resonanzschwingung eines Schwingquarzes und kamen zu folgendem mathematischen Zusammenhang [258, 259].

$$\Delta f = -f_0^{\frac{3}{2}} \sqrt{\frac{\eta_{fl} \rho_{fl}}{\Pi \mu_Q \rho_Q}} \quad (2.5)$$

Die Gleichung zeigt, dass es zu einer Frequenzänderung für einen Quarzsensor mit der Resonanzfrequenz f_0 kommt, wenn sich die Dichte des flüssigen Mediums ρ_{fl} oder dessen Viskosität η_{fl} ändern. In dieser Gleichung sind μ_Q (Schermodul des Quarzes [$\frac{g}{cm^2}$]) und ρ_Q (Dichte des Quarzes) konstant.

Die Viskosität eines flüssigen Mediums hängt wiederum von der Temperatur des Mediums ab, so dass ein weiterer Faktor für die Errechnung einer Frequenzänderung berücksichtigt werden muss. Da die Temperatur aber auch einen direkten Einfluss auf die Resonanzfrequenz hat, ist Temperaturkonstanz für QCM-Experimente von äußerster Wichtigkeit. Für einen in dieser Arbeit verwendeten 10 MHz-Quarzsensor beträgt der Temperaturkoeffizient in wässriger Umgebung 15 Hz/K in einem Temperaturbereich von 30-50 °C [257]. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass eine Frequenzänderung von 15 Hz genau in dem Bereich liegt, den man für eine Protein-Kohlenhydrat-Wechselwirkung im mikromolaren Konzentrationsbereich erwartet, wird die Wichtigkeit konstanter Temperaturverhältnisse nochmals verdeutlicht.

2.5.3 Funktionsweise und Anwendung von QCM und SAW im Vergleich

Als akustische Biosensoren basieren sowohl die QCM- als auch die SAW-Technik auf den gleichen physikalischen Grundprinzipien wie sie in den vorangegangenen Abschnitten beschrieben wurden. Um die Techniken voneinander abzugrenzen, bietet sich vor allem die Art und Weise an, mit der sich die akustische Welle im entsprechenden Material fortbewegt. Die bisher benutzten Modellbeschreibungen für akustische Biosensoren repräsentieren vor allem die QCM-Technik. Die entsprechenden Sensoren arbeiten im Scher-Dickenschwingmodus. Nach Anlegen einer Spannung an Ober- und Unterseite des entsprechenden Sensors verbreitet sich die akustische Welle im gesamten piezoelektrischen Substrat. Die Auslenkung der Welle ist unmittelbar an der Ober- und Unterseite des Sensors am stärksten, woher auch die Sensitivität gegenüber Oberflächeninteraktionen rührt. Es wurde schon beschrieben, dass die Limitierung der QCM-Technik in der Sensitivität liegt, da eine höhere Sensitivität mit dünneren Sensoren einhergeht. Werden bestimmte Dicken unterschritten,

ist der Sensor zu zerbrechlich, als dass man ihn im Laboralltag benutzen könnte. Standardmäßig werden Sensoren mit Resonanzfrequenzen zwischen 5 und 30 MHz eingesetzt.

In SAW-Sensoren breitet sich die akustische Welle nur in einer sehr dünnen Führungsschicht unterhalb der Sensoroberfläche aus. Die Schicht wird durch die Herstellung der Sensoren mittels ST-Schnitt gewonnen (siehe Kapitel 3.6.1). Die Gesamtdicke des Quarzes spielt bei SAW-Sensoren daher keine Rolle und ist nicht limitierend für die Sensitivität. SAW-Sensoren gehören aufgrund der geringen Dicke der Führungsschicht zu den sensitivsten akustischen Biosensoren.

Während bei der QCM-Technik die Umgebung des Quarzsensors (z.B. Flüssigkeiten, Bindungsereignisse auf der Oberfläche, Viskosität, Temperatur) die Frequenz der Quarzschwingung im Gesamten verändert, werden bei der in dieser Arbeit verwendeten SAW-Technik Änderungen in Phase und Amplitude der Scherwelle detektiert. In beiden Fällen müssen die Änderungen der Welleneigenschaften durch geeignete elektronische Schaltungen erfasst werden.

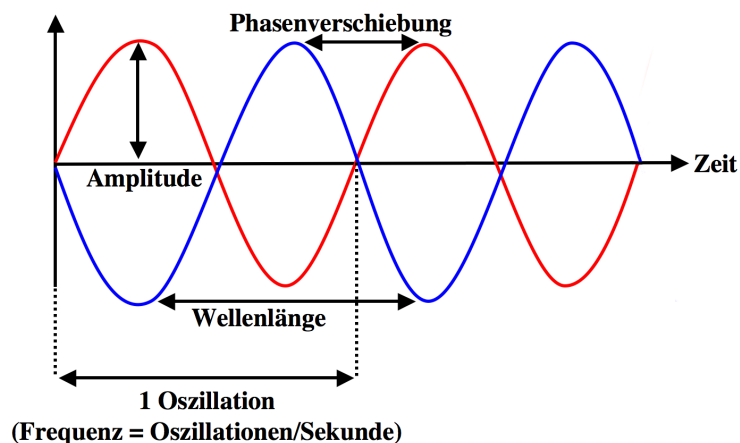


Abb. 2.15: Schematische Darstellung von Welleneigenschaften. Beim QCM-Sensor werden Frequenzänderungen aufgrund von Massenauflagerungen detektiert. Beim hier verwendeten SAW-Sensor werden Massenveränderungen auf der Sensoroberfläche als Phasenveränderung der resultierenden Love-Welle und Änderungen der viskoelastischen Eigenschaften als Veränderung der Amplitude der Scherwelle detektiert.

Bei QCM-Sensoren führt eine angelegte Wechselspannung zu Scher-Dickenschwingungen wie sie in Abbildung 2.14 schematisch dargestellt sind. SAW-Sensoren können je nach Bauart des Quarzes verschiedene Arten der Wellenpropagation ermöglichen. An dieser Stelle seien die Rayleigh-Welle (benannt nach dem Mathematiker Lord Rayleigh, der die Existenz dieser Welle 1885 voraussagte, noch bevor man sie tatsächlich detektieren konnte), die Lamb-Welle (benannt nach dem Mathematiker Horace Lamb; entdeckt 1917) und die Love-Welle (benannt nach dem Mathematiker Augustus

Edward Hough Love, der die nach ihm benannte Welle 1911 beschrieb) erwähnt. Letztgenannte wird in dieser Arbeit als Wellenpropagation des SAW-Sensors genutzt.

Oberflächenwellen spielen bis heute vor allem in der Seismologie eine große Rolle. Die genannten Modelle wurden dazu entwickelt, die Bewegung der Erdkruste mathematisch zu beschreiben. In Abbildung 2.16 sind Rayleigh-Welle und Love-Welle schematisch gegenübergestellt.

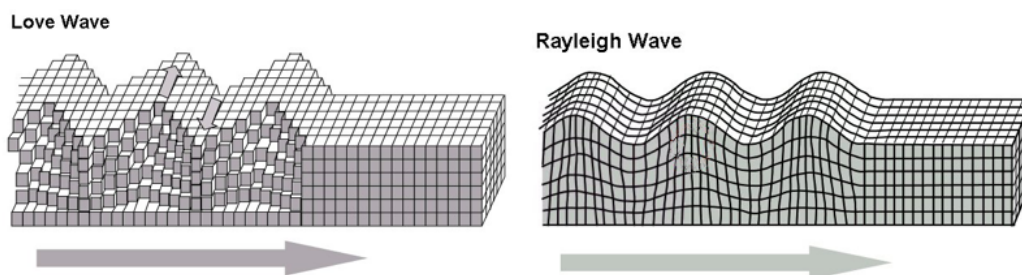


Abb. 2.16: Schematische Darstellung von Love- und Rayleigh-Welle. Diese beiden in der Seismologie erstmals beschriebenen Oberflächenwellen unterscheiden sich vor allem in ihrer Ausbreitungsrichtung. Während die Love-Welle ausschließlich zu Verschiebungen in der z -Achse führt, werden die Elementarzellen bei der Rayleigh-Welle in y -Achsen-Richtung verschoben. Für SAW-Biosensoren bedeutet dieser Unterschied, dass Love-Wellen eine wesentlich geringere Eindringtiefe in Massenauflagerungen auf dem Sensor haben als Rayleigh-Wellen. Deshalb eignen sich Love-Wellen besonders zur Messung in Flüssigkeiten. Im Gegensatz zur Rayleigh-Welle kommt es bei Love-Wellen auch nicht zu Deformationen innerhalb einer Elementarzelle. Lamb-Wellen sind wesentlich komplexer in ihrem Ausbreitungsverhalten und werden deshalb an dieser Stelle nicht dargestellt. Die Verwendung der Abbildungen erfolgt unter den Maßgaben einer „public domain“ [260, 261].

Grundsätzlich lassen sich mit QCM und SAW alle erdenklichen Vorgänge detektieren, die mit einer Massenänderung an der Sensoroberfläche einhergehen. So stellt die Detektion von Adsorptionsprozessen eines der Hauptanwendungsgebiete für die QCM dar. Dabei kann die Adsorption von Proteinen genauso verfolgt werden wie die Ausbildung von Polymerschichten, Korrosionsvorgänge, Ätzwvorgänge oder die Detektion von Gasadsorptionsvorgängen [256].

Für die Lebenswissenschaften geht es dagegen vor allem um Erkenntnisse zum Zusammenspiel biologischer Moleküle wie Proteine, Kohlenhydrate oder Lipide. Derartige Erkenntnisse sind wichtig für das Verständnis der Wechselwirkungen von Zellen und ganzen Organismen. Auch wenn akustische Biosensoren als Konkurrenz zu etablierten optischen Methoden wie SPR angesehen werden, so verdanken sie ihr Einsatzpotential nicht zuletzt genau diesen Techniken. Die Immobilisation der verschiedenen genannten Biomoleküle, aber auch synthetischer kleiner Moleküle hat den Einsatz der Biosensoren in den Lebenswissenschaften stark beeinflusst. Die Anzahl der unterschiedlichen Immobilisationsmethoden ist dabei fast genauso groß

wie die Zahl der Veröffentlichungen auf diesem Gebiet. Grundsätzlich verläuft die Immobilisation aber oftmals nach folgendem Schema:

- Bindung von organischen Molekülen an Gold über *SH*-Gruppen
- Aktivierung des ersten Monolayers mithilfe reaktiver Gruppen
- Immobilisation des Biomoleküls durch Reaktion mit den reaktiven Gruppen des ersten Monolayers
- Absättigung unspezifischer Bindungsstellen

Die häufigste Variation des beschriebenen Ablaufs ist die Derivatisierung der zu immobilisierenden Biomoleküle mit Gruppen, die sofort zur Reaktion mit Gold oder anderen Sensoroberflächen (z.B. Dextranoberflächen) befähigt sind. Die Immobilisation über unspezifische hydrophile oder hydrophobe Wechselwirkungen mit der Sensoroberfläche stellt eine weitere Möglichkeit der Funktionalisierung von Sensoren dar.

Die folgenden Tabellen sollen einen ausschnittartigen Überblick über die Anwendungsmöglichkeiten von akustischen Biosensoren zur Detektion biochemischer Wechselwirkungen geben.

Tab. 2.2: Anwendungsmöglichkeiten QCM

Autoren	Wechselwirkung	Erkenntnis	Referenz
Shons et al.	BSA-Antikörper an immobilisiertem BSA	Die Wechselwirkung konnte detektiert werden. Die Methode war im Jahr der Veröffentlichung (1972) noch schlecht zu reproduzieren und Viskositätseffekte störten stark aufgrund fehlender elektronischer Schaltungsmöglichkeiten.	[262]
König et al.	Herpesviren an Antikörpern, die über Protein-A-Sepharose immobilisiert wurden	Verschiedene Herpesviren konnten über QCM aus einer Mischung differenziert werden. Dabei kam die so genannte „Dip-Methode“ zum Einsatz, bei der der Quarz vor und nach Kontakt mit der Analytlösung vermessen wird.	[263]
Stair et al.	Immobilisierung des Peptids AAPVAAK an einer Schicht aus Dextran-Hydrogel. Verfolgung des Abbaus der Schicht durch neutrophile Elastase	Ein direkter Zusammenhang zwischen Proteaseaktivität und Abbaukinetik konnte detektiert werden. Die Geschwindigkeit des Abbaus war abhängig von der Quervernetzung des immobilisierten Proteins mit der Dextran-Hydrogelschicht.	[264]

Tab. 2.2: (Fortsetzung – Anwendungsmöglichkeiten QCM)

Autoren	Wechselwirkung	Erkenntnis	Referenz
Lassalle et al.	Immobilisierung von DNA-Oligonukleotiden durch elektrisch induzierte Polymerisation von Pyrrol am 5'-Ende zu Polypyrrol. Detektion der Hybridisierung von Komplementär-DNA	Die Immobilisation durch elektrochemische Polymerisation erlaubt die Steuerung der Ausbildung der DNA-Schicht. Die Hybridisierungsreaktion konnte in Echtzeit verfolgt werden. Die ermittelte Masse aus der Hybridisierungsreaktion konnte durch fluoreszenzmikroskopische Experimente bestätigt werden.	[265]
Höpfner et al.	Immobilisierung verschiedener Proteine und Detektion der Bindung Ligandhaltiger Liposomen	Über QCM kann nicht nur die Bindung der targetierten Liposomen an die entsprechenden Proteine verfolgt, sondern gleichzeitig Erkenntnisse über das Deformations-, Spreit- oder Fusionsverhalten der Liposomen gewonnen werden.	[266]
Christ et al.	Immobilisierung von bakteriellen Modellmembranen mittels Langmuir-Blodgett-Methode	Isolierte Betrachtung der Bindung verschiedener Lantibiotika an Modellmembranen ohne und mit dem bakteriellen Target Lipid II. Bestimmung der Bindungskinetik verschiedener Lantibiotika an Lipid II-haltigen Membranen.	[267]

Tab. 2.3: Anwendungsmöglichkeiten SAW

Autoren	Wechselwirkung	Erkenntnis	Referenz
Gronewold et al.	Immobilisierung biotinylierter Oligonukleotide an vorimmobilisiertem Streptavidin und Ausbildung von Hybrid-DNA	Detektion von Punktmutationen durch Hybridisierungsversuche mit verschiedenen DNA-Sequenzen. Mithilfe von Bindungskinetiken konnte der Einfluss der Mutation auf die Hybridisierung quantifiziert werden.	[268]
Perpeet et al.	Immobilisierung von Antithrombin-Antikörpern und Bestimmung der Bindungskinetik von Antithrombin	Ohne weitere Markierung der Analyten konnte gezeigt werden, dass die verwendeten Antithrombin-Antikörper Antithrombin mit einer Kinetik im hohen nanomolaren Bereich binden.	[269]

Tab. 2.3: (Fortsetzung – Anwendungsmöglichkeiten SAW)

Autoren	Wechselwirkung	Erkenntnis	Referenz
Andrä et al.	Immobilisierung von Lipid-Doppelschichten an einer vorimmobilisierten Schicht aus Poly-Lysin und Detektion der Wechselwirkung mit antimikrobiell wirksamen Peptiden	Die gleichmäßige Immobilisation von Lipid-Doppelschichten, ausgehend von Liposomen, ist möglich und konnte über AFM-Experimente belegt werden. Die Bindung des antibakteriellen Cathelicidin-basierten Peptids LL32 konnte verfolgt werden. Durch Analyse der Amplitudenveränderung des Bindungssignals wurde postuliert, dass die Membran durch Bindung des Peptids rigider wird.	[270]

2.5.4 Bestimmung kinetischer Bindungskonstanten mit QCM und SAW

Sowohl die QCM-Technik als auch die SAW-Technik bieten die Möglichkeit, nicht nur Bindungen zwischen Rezeptor und Liganden als Änderung der Masse zu detektieren, um somit eine Aussage über das Gesamtausmaß der Bindung zu treffen. Sie ermöglichen es darüber hinaus, den zeitlichen Verlauf dieser Interaktion zu verfolgen und aus den erhobenen Daten Bindungskonstanten für die jeweilige Interaktion zu bestimmen. Derartige Bindungskonstanten helfen bei der Beurteilung der Bindungsstärke und bieten die Möglichkeit, Vergleiche zwischen natürlichen Liganden und potentiellen Inhibitoren einer Zielstruktur aufzustellen.

Verschiedene mathematische Modelle stehen bei der Errechnung von Bindungskonstanten zu Verfügung. Im Folgenden soll näher auf die Methoden eingegangen werden, die im Rahmen dieser Arbeit Anwendung fanden. Für die Ableitung kinetischer Bindungskonstanten mithilfe der QCM-Technik geht man für spezifische Rezeptor-Ligand bzw. Rezeptor-Inhibitor-Bindungen von einem 1:1-Kinetikmodell aus. In diesem Modell bindet ein gelöstes Analytmolekül (A) genau ein immobilisiertes Molekül auf der Sensoroberfläche (B). Die Bildung eines Komplexes aus A und B ist ein reversibler Vorgang. Die Geschwindigkeit der Komplexbildung wird durch die Konstante k_{Ass} bestimmt, die Auflösung des Komplexes durch die Geschwindigkeitskonstante k_{Diss} (siehe Gleichung 2.6).



Die Reaktionsgeschwindigkeit für Gleichung 2.6 ergibt sich entsprechend Gleichung 2.7.

$$\frac{\Delta[AB]}{\Delta t} = k_{Ass}[A][B] - k_{Diss}[AB] \quad (2.7)$$

Da die Dissoziation des Komplexes aus A und B nur von der Konzentration des Komplexes $[AB]$ selbst abhängt, kann für diesen Vorgang eine Kinetik erster Ordnung angenommen werden. Die Bildung von AB aus A und B ist von den Konzentrationen beider Einzelkomponenten abhängig und damit formal ein Vorgang mit Kinetik 2. Ordnung. Bei Versuchen unter Flussbedingungen wird aber die Konzentration des Analyten A durch die ständige Nachlieferung von A konstant gehalten, so dass der Assoziationsvorgang unter diesen Bedingungen nur von der Konzentration von B abhängt und damit einer Kinetik pseudoerster Ordnung folgt. Somit können die Faktoren k_{Ass} und $[A]$ zu einer neuen Konstante k' zusammengefasst werden.

$$\frac{\Delta[AB]}{\Delta t} = k'[B] - k_{Diss}[AB] \quad (2.8)$$

Mithilfe der QCM können Massen, aber nicht Konzentrationen, direkt bestimmt werden. Die Masse von A , die dabei an B bindet, ist proportional zur Konzentration von A . Da die gebundene Masse auch proportional zu einer resultierenden Frequenzänderung ist, gilt für die Veränderung der Frequenz mit der Zeit eine Abhängigkeit von den Geschwindigkeitskonstanten für die Bildung des Komplexes AB und dessen Dissoziation.

$$\frac{\Delta f}{\Delta t} = k_{Ass}[A](f_{max} - f) - k_{Diss}f \quad (2.9)$$

In Gleichung 2.9 entspricht f der Frequenzänderung, die durch die Bildung des Komplexes AB hervorgerufen wird. A ist die konstante Konzentration des Analyten im Fließsystem und f_{max} stellt die maximale Frequenzänderung bei Belegung aller möglicher Bindungsstellen auf der Sensoroberfläche dar. Aus Gleichung 2.9 kann man schließen, dass der Prozess der Dissoziation des Komplexes AB von keiner Konzentration, sondern nur von der Geschwindigkeitskonstanten k_{Diss} abhängt, so dass für die isolierte Betrachtung des Dissoziationsvorgangs Gleichung 2.10 gilt.

$$\frac{\Delta f}{\Delta t} = -k_{Diss}f \quad (2.10)$$

Aus dem Kurvenverlauf eines Bindungsexperimentes können mithilfe einer nicht-linearen Kurvenanpassung die Geschwindigkeitskonstanten k_{Ass} und k_{Diss} bestimmt werden. Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten k_{Diss} wird Gleichung 2.11 angewendet, zur Bestimmung der Assoziationskonstanten k_{Ass} Gleichung 2.12.

$$\Delta f = \Delta f_0 e^{-(k_{Diss}(t-t_0))} \quad (2.11)$$

$$\Delta f = -\frac{k_{Ass}[A]f_{max}}{k_{Ass}[A] + k_{Diss}} \left(1 - e^{-(k_{Ass}[A] + k_{Diss}(t-t_0))}\right) \quad (2.12)$$

Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D ergibt sich als Quotient aus k_{Diss} und k_{Ass} .

$$K_D = \frac{k_{Diss}}{k_{Ass}} \quad (2.13)$$

Mithilfe dieses Modells lassen sich mit der Durchführung eines Bindungsexperiments bei einer einzigen Konzentration alle kinetischen Konstanten errechnen.

Eine aufwändigere Methode kommt bei der Anwendung des SAW-Biosensors zum Einsatz. Durch die Vermessung von Konzentrationsreihen können Bindungsereignisse in Abhängigkeit der Konzentration des Analyten vermessen werden. Durch nicht-lineare Kurvenregression können idealisierte Bindungskurven aus mathematischen Modellen an den tatsächlichen Kurvenverlauf angepasst werden. Dabei steht neben einem einfachen 1:1-Bindungsmodell auch ein erweitertes Bindungsmodell zur Verfügung, das Vorgänge beschreibt, bei dem der Analyt nicht während der Versuchszeit komplett wieder von der Oberfläche des Sensors dissoziiert, sondern zu einem gewissen Anteil dort verbleibt (siehe Abbildung 2.17 B).

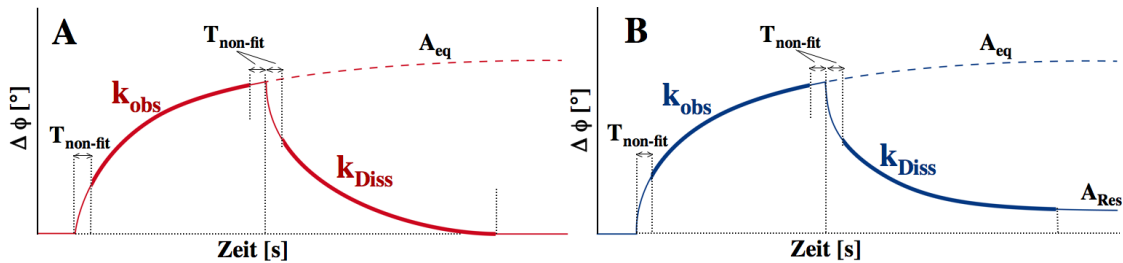


Abb. 2.17: Modelle zur Errechnung kinetischer Bindungskonstanten aus einem SAW-Experiment. A: einfaches 1:1-Bindungsmodell. k_{obs} ist die Assoziationskonstante bei einer ganz bestimmten Konzentration. A_{eq} ist die Phasenverschiebung, die durch Bindung des Analyten im Gleichgewichtszustand erreicht würde. Da aber mit Puffer gespült wird, dissoziiert der Analyt wieder von der Oberfläche und man kann k_{Diss} , die Dissoziationskonstante errechnen. $T_{non-fit}$ sind Bereiche der Bindungskurve, die im Modell nicht einbezogen werden, um Einfüsse wie Pufferwechsel oder Pumpenschalten nicht mit zu berechnen. **B:** A_{res} ist die Phasenverschiebung, die nach Dissoziation des Analyten verbleibt, da nicht alle Moleküle im Verlauf des Experiments dissoziieren. Alle anderen Platzhalter entsprechen den Platzhaltern unter A.

Für die Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten k_{obs} im einfachen 1:1-Modell unter A in Abbildung 2.17 wird Gleichung 2.14 angewendet. K_{Diss} errechnet sich nach Gleichung 2.15.

$$\text{wenn } t \leq t_{stop}, \text{ dann } A(t) = A_{eq} (1 - e^{(-k_{obs}t)}) \quad (2.14)$$

$$\text{wenn } t > t_{stop}, \text{ dann } A(t) = A_{t_{stop}} e^{(-k_{Diss}(t-t_{stop}))} \quad (2.15)$$

Für das 1:1-Modell mit Residienberücksichtigung errechnet sich k_{obs} ebenfalls wie in Gleichung 2.14 beschrieben. Für die Errechnung der Dissoziationskonstanten wird das Residuum berücksichtigt und k_{Diss} ergibt sich nach Gleichung 2.16.

$$\text{wenn } t > t_{stop}, \text{ dann } A(t) = A_{res} + (A_{t_{stop}} - A_{res}) e^{(-k_{diss}(t-t_{stop}))} \quad (2.16)$$

Da die Konzentration des Analyten nicht in die Gleichungen 2.14 bis 2.16 eingeht, kann aus den so erhaltenen Daten die Assoziationskonstante k_{Ass} nicht direkt abgeleitet werden wie es im verwendeten Modell für die QCM möglich ist (siehe Gleichung 2.12). Da k_{Ass} aber eine konzentrationsabhängige Konstante ist, muss diese auch für das SAW-Modell berücksichtigt werden. Der Wert, den k_{obs} annimmt, ist linear abhängig von der Konzentration $[A]$ des Analyten. Trägt man k_{obs} für verschiedene vermessene Konzentrationen gegen die Konzentrationen selbst auf, so erhält man durch lineare Regression der erhaltenen Punkte eine Geradengleichung mit der Form entsprechend Gleichung 2.17.

$$k_{obs} = k_{Ass}[A] + k_{Diss} \quad (2.17)$$

Aus der Steigung der erhaltenen Geraden kann man k_{Ass} ableiten, der y -Achsenabschnitt liefert k_{Diss} . Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D lässt sich auch für dieses Modell mit Gleichung 2.13 berechnen.

2.5.5 Detektion von Zell-Bindungen mit QCM und SAW

Die Detektion von Zellbindungen mithilfe von akustischen Biosensoren stellt eines der interessantesten Anwendungsgebiete in diesem Bereich dar. Vor allem die Analytik in Lebensmittel-herstellenden Betrieben hat großes Interesse an derartigen Systemen, da klassische Methoden zum Beispiel zur Bestimmung von Bakterienkontaminationen in Lebensmitteln aufwändige Kultivierungs- und Analyseverfahren erfordern. Die Wechselwirkung von bakteriellen Oberflächenantigenen mit immobilisierten Antikörpern könnte ein schnelles und günstiges Verfahren darstellen, um Bakterienzahlen zu bestimmen. Tatsächlich konnte in verschiedenen Arbeiten die Adhäsion von Bakterien und die Ausbildung von Biofilmen auf QCM-Sensoren gezeigt werden [271]. Eine

Bestimmung von exakten adhärennten Massen oder Bakterienzahlen ist aber bisher noch nicht gelungen. Die QCM-Technik ist an dieser Stelle limitiert. Die Limitierung soll am Beispiel einer Arbeit von Gyrtte und Mitarbeitern erläutert werden. Ihnen gelang die Kultivierung von Affennierenzellen *in situ* auf Quarzsensoren. Die gemessene Frequenzänderung ergab nach Einsetzen in die Sauerbrey-Gleichung aber nicht die Masse, die einem Zellmonolayer dieser Zellart entspricht. Die wahre Masse war 250fach größer als die detektierte. Die Sauerbrey-Gleichung gilt streng genommen nur für dünne, rigide, gleichmäßig verteilte Adsorptionsschichten. Zellen dagegen sind dagegen verhältnismäßig groß und fluide. Hinzu kommt, dass die Eindringtiefe der akustischen Welle mit 250 nM nur einen Bruchteil der Masse einer Zelle erfasst. Die Änderung der Resonanzfrequenz wird demnach nur von dem Teil der Zelle verursacht, der im Bereich der Eindringtiefe liegt. Die Verwendung von 10 µm großen Latexpartikeln an Stelle von Zellen konnte zwar die Problematik der großen Fluidität und ungleichmäßigen Verteilung der Adsorptionsschicht relativieren, aber auch hier wurden aufgrund der zu geringen Eindringtiefe keine exakten Massen bestimmt [272].

Die beschriebene Problematik zur Bestimmung von Zellzahlen ergibt sich bei der SAW-Technik in noch höherem Maße, da hier die Eindringtiefe der akustischen Welle mit 30 nm noch geringer ist. Grundsätzlich lassen sich aber auch mit der SAW-Technik Zell-Adhäsionsvorgänge detektieren wie es in verschiedenen Arbeiten für Bakterien, Hefen und Säugetierzellen gezeigt werden konnte [273, 274].

Mithilfe eines SAW-Sensors konnten Hong und Mitarbeiter die Adhäsion von Säugetierzellen (arterielle Endothelzellen) auf einem Sensorchip verfolgen. Sie konnten keine Zellzahl bestimmen, aber Aussagen zum zeitlichen Verlauf des Adhäsionsprozesses treffen [275].

Im Rahmen dieser Arbeit werden Methoden entwickelt, die den Einsatz akustischer Biosensoren erstmals auf dem Gebiet der Adhäsionsrezeptor-vermittelten Zelladhäsion und deren Inhibition ermöglichen.

2.6 Biosensoren zur Charakterisierung von Selektin- und Integrin-Wechselwirkungen

In Kapitel 2.1.3 wurden kinetische Bindungskonstanten für die Wechselwirkung zwischen Selektinen und ihre Liganden aufgeführt. Diese Daten wurden mit unterschiedlichen experimentellen Ansätzen erhoben. Biosensor-Ansätze zur Bestimmung kinetischer Bindungskonstanten beruhen vor allem auf der Anwendung der SPR-Technik oder der Rasterkraftmikroskopie.

Die erste Arbeit von Nicholson et al. zur Bestimmung der Bindungskinetik von L-Selektin an seinem Liganden GlyCAM-1 nutzte die SPR-Technik, wobei GlyCAM-1 auf der Sensoroberfläche immobilisiert und lösliches L-Selektin über diese Schicht gegeben wurde [68]. Während die kinetischen Daten der P-Selektin-PSGL-1-Bindung mithilfe von Zellexperimenten aus Adhäsionsassays bestimmt wurden [72], nutzten Beauharnois et al. SPR-Experimente, um die Bindungskinetik verschiedener sLe^x-Variationen sowie die des Inhibitors Bimosiamose zu bestimmen. Dabei immobilisierten sie P-Selektin-Fc-Chimären und injizierten die Bindungspartner in den laufenden Pufferfluss [108]. Im Kapitel 2.1.3 wurde die Aufklärung des „catch bond behaviors“ mithilfe der Rasterkraftmikroskopie durch Marshall et al. erläutert.

Die Wechselwirkung von Heparin mit Selektinen ist nur in einer Arbeit aus dem Jahre 2003 mithilfe von Biosensoren untersucht worden. Wang und Mitarbeiter immobilisierten dazu Heparin auf der Goldoberfläche von SPR-Sensoren und detektierten die Wechselwirkung mit löslichen P-Selektin-Fc-Chimären [181]. Die Bindung von Heparin an den Integrinen $\alpha X\beta 2$ wurde ebenfalls durch SPR-Experimente charakterisiert [238].

Akustische Biosensoren wurden bisher noch nicht eingesetzt, um die Bindung von Adhäsionsrezeptoren wie Selektinen und Integrinen zu untersuchen. Im Rahmen dieser Arbeit werden akustische Biosensoren erstmals genutzt, um isolierte Molekülinteraktionen der Adhäsionsrezeptoren mit ihren Liganden und Inhibitoren zu detektieren. Darüber hinaus soll durch die Untersuchung von Liposomen-basierten Tumorzellmodellen und Zellexperimenten an den akustischen Biosensoren ein Beitrag zum Verständnis der Rolle der Adhäsionsrezeptoren im Zuge der Tumorzellmetastasierung und zum Verständnis der Inhibitorwirkung des Heparins in diesem Prozess geleistet werden.

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Materialien

3.1.1 Geräte

Tab. 3.1: Geräte

Gerät	Hersteller
Analysewaage Sartorius Basic BA210S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Autosizer 2C	Malvern Instruments, Worcestershire, UK
Autosizer Correlator Series 7032	Malvern Instruments, Worcestershire, UK
Blottingapparatur Mini-Protean II	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Casy [®] 1 Model TT Cell Counter + Analyser System	Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland
Cryo 1°C Freezing Container	Nalge Nunc International, Hereford, UK
Durchflusskühler Ecoline RE 104	Lauda, Lauda-Königshofen, Deutschland
Durchflusskühler F 25	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach-Schwarzwald, Deutschland
Elektrophoreseapparatur Mini-Protean II	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Elektrophorese-Stromgeber EC250-90	Life Sciences Int. GmbH, Frankfurt, Deutschland
FORMA Universal-Wassermantelinkubator 3121	ThermoQuest Analytische Systeme GmbH, Egelsbach, Deutschland
Geldokumentationseinheit Versa Doc Imagine System 5000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Handdispenser Handystep	Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland
Kalomel pH-Elektrode E6009-1EA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Konfokales Laserscanningmikroskop TCS SP5	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Kraftaufnehmer und Steuerung der Langmuir-Filmwaage	Riegler & Kirstein GmbH, Potsdam, Deutschland
Kühlzelle	Viessmann AG & Co KG, Hof (Saale), Deutschland
Langmuir-Filmwaage	Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Deutschland
Lipix [™] Basic Extruder	Northern Lipids, Vancouver, Kanada
Magnetrührer MR 3001	Heidolph Elektro GmbH & Co KG, Kelheim, Deutschland
Orbitalschüttler	Edmund Bühler GmbH, Tübingen, Deutschland

Tab. 3.1: (Fortsetzung – Geräte)

Gerät	Hersteller
pH-Meter ϕ 720	Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, USA
Photometer Ultraspec 4000	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK
Polytron-Homogenisator PT 10-35	Kinematica AG, Littau-Luzern, Schweiz
Potter Elvehjem Glashomogenisator-Antrieb	Janke & Kunkel IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Potter-Glashomogenisator	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Pumpe ISM 796	Ismatec SA, Labortechnik-Analytik, Glattbrugg-Zürch, Schweiz
QCM LiquiLab21 [®]	Institut für Automation und Kommunikation e.V. (ifak), Barleben, Deutschland
QCM Quarzsensoren	Institut für Automation und Kommunikation e.V. (ifak), Barleben, Deutschland
Rotationsverdampfer Rotovapor	Glasapparate-Fabrik Flawill, Flawill, Schweiz
S-sens [®] K5 Surface acoustic wave biosensor	Biosensor GmbH, Bonn, Deutschland
S-sens [®] K5 Quarzsensoren	Biosensor GmbH, Bonn, Deutschland
Trockenschrank T 5042	Heraeus, Hanau, Deutschland
Ultraschallbad Bandelin Sonorex RK 102 H	Bandelin electronic, Berlin, Deutschland
Ultrazentrifuge Optima LE-80K	Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, USA
Vakuumpumpe	Vacubrand GmbH & Co, Wertheim, Deutschland
Vortexer MS 1 Minishaker	Janke & Kunkel IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Wasseraufbereitungsanlage Millipore Elix	Millipore Corporation, Billerica, USA
Wasserbad TW 12	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach-Schwarzwald, Deutschland
Zentrifuge 5417C	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Avanti [™] J-25	Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, USA
Zentrifuge mini Spin	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

3.1.2 Chemikalien

Tab. 3.2: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid-Lösung (30%)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Adipinsäuredihydrazid	ACROS Organics, Geel, Belgien
Amidoschwarz	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ammoniaklösung (26%)	Riedel-de Haën, Seelze, Deutschland
Ammoniumacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Bacillol [®] AF	Bode Chemie, Hamburg, Deutschland
Borsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Bovines Serumalbumin, Fraktion V \geq 96%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

Tab. 3.2: (Fortsetzung – Chemikalien)

Chemikalie	Hersteller
Brilliant Blau R250	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
BSA-Stammlösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Calciumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
CASY [®] ton-Lösung	Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland
Chloroform	Riedel-de Haën, Seetze, Deutschland
Cyanurchlorid	ACROS Organics, Geel, Belgien
1,2-Distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin	Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, USA
N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
Dimethylsulfoxid	ACROS Organics, Geel, Belgien
3,3'-Diocetadecyloxycarbocyaninperchlorat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
EDTA-Lösung (0,02%) E8008	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Ethanol 96% (V/V), technisch, vergällt mit PE	Hofmann Chemie Import-Export GmbH, Hamburg, Deutschland
Ethanolamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Fetales Kälberserum F7524	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
G-418	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Glycerol (wasserfrei)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Hexadecan-1-thiol	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
Hydrazinhydroxid 80%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
N-Hydroxysuccinimid	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
Immobilon [™] -Western Chemiluminescent HRP	Millipore Corporation, Billerica, USA
Isopropanol	Riedel-de Haën, Seetze, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
low-IgG-FKS	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
L-Selektin-Fc-Chimären (rekombinant, human)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
L-Selektin-Fc-Chimären (rekombinant, murin)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
Magermilchpulver Sucofin	TSI GmbH & Co. KG, Zeven, Deutschland
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Mangan(II)-chlorid-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Melsept SF	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
MEM- α + Ribonukleoside + Desoxyribonukleoside	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
6-Mercaptohexan-1-ol	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
11-Mercaptoundecansäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Monochlorodimethyloctadecylsilan	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
Natriumazid	Janssen Chimica, Beerse, Belgien
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Tab. 3.2: (Fortsetzung – Chemikalien)

Chemikalie	Hersteller
Natriumdodecylsulfat	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid	ACROS Organics, Geel, Belgien
n-Octyl- β -D-glucopyranosid	Alexis Chemicals, Grünberg, Deutschland
Opti-MEM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Palmitoyl-2-oleyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin	Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, USA
Polylysin	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Protein-A-Sepharose	GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Schweden
Protein-Standard	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
P-Selektin-Fc-Chimären (rekombinant, human)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
RPMI-1640-Medium R8758	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Schwefelsäure 95%-97%	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
Standardpuffer pH 4,01	Hanna Instruments, Tanneries Cedex, Frankreich
Standardpuffer pH 7,01	Hanna Instruments, Tanneries Cedex, Frankreich
Standardpuffer pH 10,01	Hanna Instruments, Tanneries Cedex, Frankreich
Synthetische Luft	Praxair GmbH, Bonn, Deutschland
TEMED	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
1-Thio- β -D-glucose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Trichloressigsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Trypsin-EDTA-Lösung (0,25%) T4049	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Tween 20	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
VCAM-1-Fc-Chimären (rekombinant, human)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30%	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
Zitronensäure, wasserfrei	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

3.1.3 Antikörper

Tab. 3.3: Antikörper

Antikörper	Hersteller
anti-Maus-Heparin/Heparansulfat, Klon: T320.11, Isotyp: Maus-IgG ₁	Antibodies-Online GmbH, Aachen, Deutschland
anti-Human-CD62P (P-Selektin), Klon: AK-4, Isotyp: Maus IgG _{1,κ}	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
anti-Maus-CD106 (VCAM-1), Klon: M/K-2, Isotyp: Ratte((Lewis) IgG _{1,κ}	Chemicon Europe/Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland
Anti-Human-IgG (γ -Ketten-spezifisch), Klon: polyklonal, isoliert aus der Ziege	Antibodies-Online GmbH, Aachen, Deutschland

Tab. 3.3: (Fortsetzung – Antikörper)

Antikörper	Hersteller
Natalizumab (Tysabri [®]), anti-Human-CD49d (VLA-4)	BiogenIdec GmbH, Ismaning, Deutschland

3.1.4 Testsubstanzen

Tab. 3.4: Testsubstanzen

Substanz	Hersteller
Enoxaparin-Natrium (Clexane [®] 20 mg/mL)	Sanofi-Aventis GmbH, Frankfurt/Main, Deutschland
Fondaparinux (Arixtra [®] 2,5 mg/mL)	Sanofi-Aventis GmbH, Frankfurt/Main, Deutschland
Fucoidan	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Heparin Liquemin [®] N 5000 (5 000 I.E./0,5 mL)	Hoffmann-La-Roche AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
Heparin-Natrium 5000 ratiopharm [®] (5 000 I.E./0,2 mL)	Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
Nadroparin-Calcium (Fraxiparin [®] 1 900 I.E. Anti-Xa/0,2 mL)	GlaxoSmithKline GmbH & Co KG, München, Deutschland
Phycarinsulfate PhyS1 – PhyS6	synthetisiert durch die Arbeitsgruppe um Frau Prof. Dr. Susanne Alban, Christian-Albrechts-Universität Kiel, Deutschland
PSGL-1 (rekombinant, human)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
sLe ^X -TEG _{N2}	synthetisiert durch Herrn Dr. Christian Gege, Universität-Konstanz, Deutschland
SM-4-Sulfatid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Tinzaparin-Natrium, (Innohep [™] , 20 000 I.E. Anti-Xa/mL)	LEO Pharmaceutical Products Ltd. A/S, Ballerup, Dänemark

3.1.5 sonstige Materialien

Tab. 3.5: Sonstige Materialien

Bezeichnung	Hersteller
CASY [®] cups	Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland
CellScraper-Gummischaber 25 cm	Sarstedt AG & Co KG, Nürnberg, Deutschland
Cellstar [®] Kulturflasche 25 cm ² , mit Filter	Greiner-Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Cellstar [®] Kulturflasche 75 cm ² , mit Filter	Greiner-Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

Tab. 3.5: (Fortsetzung – Sonstige Materialien)

Bezeichnung	Hersteller
Cellstar [®] Kulturflasche 175 cm ² , mit Filter	Greiner-Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Cellstar [®] Zentrifugenröhrchen, PP-Röhrchen 15 mL	Greiner-Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Centricon 30.000 Zentrifugenfilter	Chemicon Europe/Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland
Chromatographiesäule 1 mL	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Deckgläser, rund, Durchmesser 18 mm, Stärke 3 (0,28-0,32 mm)	Labor- und Medizintechnik Dr. J. Rost, Leipzig, Deutschland
Dialyseschlauch MWCO 12-14 kD	Spectrum Laboratories Inc., Breda, Niederlande
Dichtscheibe G8-Sil/rot-weiß	CS-Chromatographie-Service GmbH, Langerwehe, Deutschland
Einmalspritzen Injekt 10 mL	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Feder S15	CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe, Deutschland
Gewebekulturschale 145 cm ²	Sarstedt AG & Co KG, Nürnberg, Deutschland
Kryoröhrchen PP, mit Schraubverschluss, steril	Greiner-Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Mikroeinsetz G30	CS-Chromatographie-Service GmbH, Langerwehe, Deutschland
NUNC [™] nunclon ^Δ Zellkulturflasche 175 cm ²	Nalge Nunc International, Hereford, UK
pH-Papier	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Pipette 10 µL	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette 100 µL	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette 1000 µL	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette 5 mL Plastibrand [®]	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen 1–200 µL, gelb	Starlab GmbH, Ahrensburg, Deutschland
Pipettenspitzen 100–1000 µL, natur	Starlab GmbH, Ahrensburg, Deutschland
Pipettenspitzen 5 mL Plastibrand [®]	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Reagiergefäß 0,5 mL	Sarstedt AG & Co KG, Nürnberg, Deutschland
Reagiergefäß 1,5 mL	Sarstedt AG & Co KG, Nürnberg, Deutschland
Reagiergefäß 2,0 mL	Sarstedt AG & Co KG, Nürnberg, Deutschland
Schraubkappe G8-L	CS-Chromatographie-Service GmbH, Langerwehe, Deutschland
Sterilfilter FP 30/0,2 CA-S	Whatman GmbH, Dassel, Deutschland
Sterilfilter Millipore Express [™] Plus	Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland

3.1.6 Puffer und Lösungen

Amidoschwarz-Färbelösung

50 mL Eisessig
 225 mL Methanol
 1,25 g Amidoschwarz 10B
 ad 500 mL Aqua dem.

Ammoniumacetat-Lösung

10 M

770 mg Ammoniumacetat
 ad 1 mL Aqua dem.

Die Ammoniumacetatlösung wird nach der Herstellung bei 4-8 °C gelagert und nach fünf Tagen verworfen.

Ammoniumpersulfat (APS)-Lösung

10% (m/V)

10 g Ammoniumpersulfat
 ad 100 mL Aqua dem.

Die APS-Lösung ist instabil. Sie wird daher am Versuchstag frisch hergestellt und bis zur Verwendung auf Eis gelagert.

Blockierungslösung

5% (m/V)

5 g Magermilchpulver
 ad 100 mL TBS-T-Puffer

Die Mischung muss mindestens 20 min gerührt werden bis sich das Magermilchpulver gelöst hat.

Borat-Puffer

pH 8,8

618,4 mg Borsäure
 ad 100 mL Aqua dem.

Die pH-Wert-Einstellung auf pH 8,8 erfolgt mit 1 M NaOH.

Bromphenolblau-Lösung

10 µL 96 %ig (V/V) Ethanol
 ~1 mg Bromphenolblau gesättigt
 ad 10 mL Aqua dem.

Die Bromphenolblau-Lösung wird in einem 15 mL-PP-Röhrchen hergestellt. Es handelt sich um eine gesättigte Lösung. Ungelöster Farbstoff wird durch Zentrifugation pelletiert und der Überstand zur Herstellung des Probenauftragspuffers verwendet. Die Lagerung erfolgt bei -20 °C.

3 Material und Methoden

BSA-Stammlösung

9 μL Protein-Standard (Sigma)
ad 200 μL Aqua dem.

Calciumchlorid-Stammlösung

1 M

1,11 g Calciumchlorid
ad 10 mL Aqua dem.

Die Calciumchlorid-Stammlösung wird bei 4-8 °C gelagert.

Ca²⁺ und Mg²⁺-Stammlösung

500 mM

7,35 g Calciumchlorid-Dihydrat
10,16 g Magnesiumchlorid-Hexahydrat
ad 100 mL Aqua dem.

Die Ca²⁺- und Mg²⁺-Stammösung wird bei 4-8 °C gelagert.

Coomassieblau-Entfärbelösung

200 mL Methanol
100 mL Eisessig
ad 1 000 mL Aqua dem.

Coomassieblau-Färbelösung

250 mL Methanol
50 mL Eisessig
1,25 g Coomassie Brilliant Blau R250
ad 500 mL Aqua dem.

Cyanurchlorid-Lösung

1% (m/V)

100 mg Cyanurchlorid
ad 10 mL Chloroform

Die Cyanurchlorid-Lösung wird für 10 min im Ultraschallbad inkubiert.

Dithiothreitol (DTT)-Lösung

3,2 M

4,93 g DTT
ad 10 mL Aqua dem.

Die DTT-Lösung ist instabil. Sie wird daher am Versuchstag frisch hergestellt und bis zur Verwendung auf Eis gelagert.

N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid-hydrochlorid (EDC)-Lösung

0,4 M

15 mg EDC
ad 200 μL Phosphatpuffer nach Sörensen pH 7,4

Die EDC-Lösung wird für jeden Versuch frisch hergestellt.

EDTA-Na-Stammlösung	0,2 M
----------------------------	-------

3,72 g EDTA-Na
ad 50 mL Aqua dem.

Der pH-Wert der EDTA-Lösung wird mit 10 M NaOH auf pH 7,4 eingestellt und sie wird bei 4-8 °C gelagert.

Elektrophoresepuffer-Stammlösung	pH 8,9 bei RT
---	---------------

144 g Glycin
30 g Tris
10 g SDS
ad 1 000 mL Aqua dem.

Elutionslösung

125 µL EDTA-Na pH 8,0
500 mg Natriumhydroxid
ad 500 mL 50 % (V/V) Ethanol

Entfärbelösung

10 mL Eisessig
450 mL Methanol
ad 500 mL Aqua dem.

Erntepuffer	pH 7,5 bei RT
--------------------	---------------

6,80 g Kaliumdihydrogenphosphat
373 mg Kaliumchlorid
8,77 g Natriumchlorid
ad 1 000 mL Aqua dem.

Der pH-Wert wird mit 1 M Natronlauge eingestellt.

Ethanolamin-Lösung	1 M (pH 8,5)
---------------------------	--------------

6,11 g Ethanolamin
ad 100 mL Aqua dem.

Der pH-Wert wird mit 10 M HCl eingestellt und die Lösung bei -20 °C gelagert.

Glycin-HCl-Puffer pH 3,0/pH 2,5	0,1 M
--	-------

750 mg Glycin
ad 100 mL Aqua dem.

Die pH-Wert Einstellung erfolgt mit HCl_{konz.}.

3 Material und Methoden

Hexadecan-1-thiol-Lösung 1 mM

256 mg Hexadecan-1-thiol
ad 100 mL Chloroform

Homogenisierungspuffer nach Lever

21,30 g Saccharose
300 mg Tris
50 µL Magnesiumchlorid-Hexahydrat-Stammlösung
ad 250 mL Aqua dem.

Hydrazin-Lösung 1 M

0,40 g Hydrazinhydroxid (80%ig)
ad 10 mL Aqua dem.

N-Hydroxysuccinimid-Lösung (NHS) 0,1 M

11,5 mg NHS
ad 1000 µL Phosphatpuffer nach Sörensen pH 7,4

Die NHS-Lösung wird für jeden Versuch frisch hergestellt.

Lager-Puffer

7 µL β-Mercaptoethanol
0,25 mL EDTA-Na pH 8,0
25 mL 50 % Glycerol
0,5 mL Tris-HCl pH 7,5
ad 50,0 mL Aqua dem.

Magnesiumchlorid-Hexahydrat-Stammlösung 1 M

2,03 g Magnesiumchlorid-Hexahydrat
ad 10 mL Aqua dem.

Mn²⁺-Lösung 0,1 M

1,62 g Manganchlorid-Dihydrat
ad 100 mL Aqua dem.

6-Mercaptohexan-1-ol-Lösung 0,1 M

134 mg Mercaptohexan-1-ol
ad 10 mL Chloroform

11-Mercaptoundecansäure-Stammlösung 2 M

2,18 g Mercaptoundecansäure
ad 10 mL Ethanol (absolutiert)

Die 11-Mercaptoundecansäure-Stammlösung wird bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Zur Herstellung der gebrauchsfertigen Lösung mit einer Konzentration von 0,2 M werden 200 µL der Stammlösung mit absolutiertem Ethanol ad 10 mL aufgefüllt.

Natalizumab-Lösung für Western-Blot

15 mg	Natriumazid	
750 mg	BSA ¹	
60 µL	Natalizumab (Tysabri TM -Handelsprodukt)	(1,2 mg)
15 mL	TBS-T	

Oktylglucosid(n-Octyl-β-D-glucoopyranosid)-Lösung 2% (m/V)

2,0 g	Oktylglucosid
ad 100 mL	PBS-Puffer

Phosphatgepufferte-Salzlösung(PBS²) Konzentrat-20fach

80 g	Natriumchlorid
2 g	Kaliumchlorid
12,6 g	Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
2 g	Kaliumdihydrogenphosphat
ad 500 mL	Aqua dem.

Das Pufferkonzentrat wird bei 4-8 °C gelagert.

Phosphatgepufferte-Salzlösung gebrauchsfertige Lösung (PBS)

25,0 mL	PBS-Konzentrat-20fach
ad 500 mL	Aqua dem.

Der Puffer wird für QCM- und SAW-Experimente durch Anlegen eines Vakuums entgast und bei 4-8 °C gelagert.

Phosphatgepufferte-Salzlösung mit 1 mM Ca²⁺ und Mg²⁺ (PBS+)

1,0 mL	Ca ²⁺ und Mg ²⁺ -Stammlösung	0,5 M
25,0 mL	PBS-Konzentrat-20fach	
ad 500 mL	Aqua dem.	

Der Puffer wird für QCM- und SAW-Experimente durch Anlegen eines Vakuums entgast und bei 4-8 °C gelagert.

Phosphatpuffer nach Sørensen Lösung A

9,078 g	Kaliumdihydrogenphosphat
ad 1 000 mL	Aqua dem.

Phosphatpuffer nach Sørensen Lösung B

11,876 g	Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
ad 1 000 mL	Aqua dem.

Durch Vorlage der in Tabelle 3.6 ausgewiesenen Milliliterzahl von Lösung B und Auffüllen ad 100 mL mit Lösung A werden die in der Tabelle ausgewiesenen pH Werte bei RT eingestellt. Eine weitere pH-Wert-Einstellung ist nicht mehr nötig.

¹engl. Bovine Serum Albumine

²engl. Phosphate Buffered Saline

Tab. 3.6: Mischungsschema für Phosphatpuffer nach Sørensen zum Erhalt der angegebenen pH Werte

pH Wert	,0	,1	,2	,3	,4	,5	,6	,7	,8	,9
4										0,60
5	0,95	1,35	1,80	2,30	3,00	3,90	4,90	6,20	7,90	9,80
6	12,1	15,0	18,4	22,1	26,4	31,3	37,2	43,0	49,2	55,2
7	61,2	67,0	72,6	77,7	81,8	85,2	88,5	91,2	93,6	95,3
8	96,9									

Piranha-Lösung

10,0 mL	H ₂ O ₂	35% (m/V)
30,0 mL	H ₂ SO ₄	98% (m/V)

Die Piranha-Lösung wird zur Reinigung der Quarzsensoren frisch hergestellt. Zur Mischung wird ein Erlenmeyerkolben in einem Wasserbad vorgekühlt. H₂O₂ wird vorgelegt und H₂SO₄ vorsichtig hinzugegeben. Die Lösung kann verwendet werden, sobald die Mischungsreaktion abgeschlossen ist und die Lösung Raumtemperatur erreicht hat. (Heiße Piranha-Lösung löst die Goldschicht von der Quarzoberfläche!)

Polylysin-Stammlösung

4 mg/mL

400 mg Polylysin
ad 100,0 mL Natriumhydroxid-Lösung 0,01 M mit 0,1 M Natriumchlorid

Durch 1:100 Verdünnung der Polylysin-Stammlösung mit Natriumhydroxid-Lösung 0,01 M mit 0,1 M Natriumchlorid wird die gewünschte Konzentration von 0,04 mg/mL für SAW-Experimente erhalten.

Probenauftragpuffer (PAP)

1,75 mL Tris-HCl pH 6,8
1,5 mL Glycerol
5 mL 10 % SDS-Lösung
1,25 mL Bromphenolblau-Lösung

Der Probenauftragpuffer wird in einem 15 mL-PP-Röhrchen hergestellt, aliquotiert (475 µL) und in 1,5 mL PP-Reaktionsgefäßen bei -20 °C gelagert. Der PAP wird kurz vor der Verwendung durch Zugabe von 25 µL DTT-Lösung (Endkonzentration 160 mM) vervollständigt.

Resuspensionspuffer nach Lever

pH 7,4 bei 4 °C

8,56 g Saccharose
120 mg Tris
ad 100 mL Aqua dem.

Saccharosekissen

87,5 g Saccharose
 300 mg Tris
 73 mg EDTA
 ad 250 mL Aqua dem.

Sekundär-Antikörper-Lösung für Western-Blot

1 g Magermilchpulver
 10 µL Sekundär-Antikörper-Stammlösung
 20 mL TBS-T

Das Magermilchpulver wird in 15 mL TBS-T mit einem Magnetrührer für 20 min gerührt. Anschließend wird der Sekundärantikörper zugesetzt und mit TBS-T ad 20 mL aufgefüllt. Die Lösung wird bei 4-8 °C gelagert.

1-Thio-β-D-Glucose-Lösung 10 mM

218 mg 1-Thio-β-D-Glucose
 ad 100 mL Aqua dem.

Transferpuffer pH 8,2-8,4 bei RT

28,80 g Glycin
 6,06 g Tris
 ad 2 000 mL Aqua dem.

Der Transferpuffer wird am Tag vor der Durchführung des Western-Blots hergestellt. Nach dem Lösen der Substanzen in Wasser sollte der pH-Wert im Bereich von pH 8,2-8,4 liegen. Die Lösung wird dann bis zur Verwendung auf 4-8 °C gekühlt.

Trichloressigsäure(TCA³)-Lösung 100% (m/V)

100 g TCA
 ad 100 mL Aqua dem.

Tris-gepufferte Salzlösung (TBS⁴) pH 8,0 20 mM

242 mg Tris
 20 mg Natriumazid
 ad 100 mL Aqua dem.

Die pH-Wert-Einstellung erfolgt mit HCl_{konz.}.

Tris-gepufferte Salzlösung-Konzentrat-10fach (TBS-10fach) pH 7,3

40 g Natriumchlorid
 6,06 g Tris
 ad 500 mL Aqua dem.

Die pH-Wert-Einstellung erfolgt mit HCl_{konz.}.

³engl. TriChloroAcetic acid

⁴engl. Tris Buffered Saline

Tris-HCl-Puffer pH 8,0/pH 6,8 1 M

12,1 g Tris
ad 100 mL Aqua dem.

Die pH-Wert Einstellung erfolgt mit HCl_{konz.}.

Tris-SDS⁵-Lösung pH 7,5 bei RT

12,1 g Tris
2 g Natriumdodecylsulfat (SDS)
ad 100 mL Aqua dem.

Tris-gepufferte-Salzlösung mit Tween-Zusatz (TBS-T) (0,2% (m/V))

40 mL TBS-10fach
800 µL Tween 20
ad 400 mL Aqua dem.

Verdünnungspuffer pH 7,5 bei RT

42,79 g Saccharose
600 mg Tris
ad 500 mL Aqua dem.

Waschpuffer

21,20 g Saccharose
300 mg Tris
50 µL Magnesiumchlorid-Hexahydrat-Stammlösung
ad 250 mL Aqua dem.

Die pH-Wert Einstellung erfolgt mit Di-Natriumhydrogenphosphat.

Alle Tris-basierten Puffer werden in der Kühlkammer mit 1 M HCl auf den gewünschten pH-Wert eingestellt und bei 4-8 °C gelagert.

Zitronensäure-Lösung pH 5,8

1,92 g Zitronensäure wasserfrei
ad 100 mL Aqua dem.

Die pH-Wert Einstellung erfolgt mit einer kaltgesättigten Lösung von Di-Natriumhydrogenphosphat.

3.1.7 Computerprogramme

Die Steuerung der Quarzmikrowaage LiquiLab21[®] erfolgt mithilfe der Software LiquiLab21[®] (ifak, Barleben, Deutschland). Die Visualisierung der Kraftaufnahme durch die Langmuir-Filmwaage wird durch die Software Ruk Trough Control realisiert. Der akustische Oberflächenwellensensor S-sens[®] K5 wird durch die Software

⁵engl. SodiumDodecylSulfate

Biosens K12 (Biosensor GmbH, Bonn, Deutschland) gesteuert. Diese Software erlaubt die gleichzeitige Visualisierung und Speicherung der Bindungsexperimente. Die HPLC-Autosamplereinheit am akustischen Oberflächenwellensensor wird mit der Software SequenceMaster6 programmiert.

Die Auswertung der Experimente und die grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgt computergestützt mit folgenden Programmen:

- OriginTM, Additive, Friedrichsdorf, Deutschland
- Microsoft Excel:mac 2004TM, Microsoft Corporation, Redmond, USA
- ChemDraw Ultra 8.0TM, CambridgeSoft Corporation, Cambridge, USA

Die Erstellung schematischer Abbildungen erfolgt mit folgenden Programmen:

- Microsoft PowerPoint:mac 2004TM, Microsoft Corporation, Redmond, USA
- Adobe Photoshop CSTM, Adobe Systems GmbH, München, Deutschland

Die Dissertationschrift wurde mit L^AT_EX erstellt.

3.1.8 Statistik

Die Werte dieser Arbeit repräsentieren Mittelwerte aus mindestens drei identischen Experimenten \pm Standardabweichung, wenn nicht anders angegeben. Signifikante Unterschiede wurden mithilfe des ungepaarten Studentschen t-Tests ermittelt. Die Signifikanzebenen sind den jeweiligen Darstellungen zu entnehmen, wobei gilt:

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.2 Zellkultur

Die Kultivierung der in dieser Arbeit verwendeten Zellen findet unter aseptischen Bedingungen in einem entsprechend ausgestatteten Zelllabor statt. Alle Verbrauchsmaterialien werden vor den Arbeiten bei 120 °C für 20 min autoklaviert. Geräte und Verbrauchsmaterialien, die nicht autoklaviert werden können, werden zu Beginn der Arbeiten mit Bacillol[®] AF eingesprüht und dadurch desinfiziert. Die Arbeiten finden unter einer Werkbank mit laminarer Luftführung statt. Die Werkbank wird ebenfalls zu Beginn der Versuche mit Bacillol[®] AF desinfiziert. Die Lagerung der Nährmedien und aller weiterer Lösungen und Puffer erfolgt bei 4-8 °C. Diese werden zu Beginn der Arbeiten in einem Thermostaten auf 37 °C aufgeheizt. Die Kultivierung der Zellen erfolgt in einem Wassermantel-Inkubator bei 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5%.

3.2.1 Revitalisierung und Inkulturnahme der Zellen

Die Zelllinien werden in flüssigem Stickstoff bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ in entsprechenden Kryoröhrchen gelagert. Zur Revitalisierung der Zellen werden die Kryoröhrchen aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und in der Hand zügig aufgewärmt. Durch Zugabe von 1 mL aufgewärmten Nährmedium wird der Auftauprozess zum einen beschleunigt und zum anderen eine Resuspension der Zellen erreicht. Die Zellen werden in ein PP-Röhrchen mit 7 mL vorgelegtem Nährmedium überführt. Das Kryoröhrchen wird mit einem weiteren Milliliter des Nährmediums gespült und mit der restlichen Zellsuspension vereinigt. Die Zellsuspension wird bei $312 \times g$ und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 4 min zentrifugiert. Die bisher beschriebenen Arbeitsschritte müssen zügig erfolgen, um die Zellen nur möglichst kurz der schädigenden Wirkung des DMSO auszusetzen, mit dem sie eingefroren wurden. Der Überstand wird nach der Zentrifugation abgesaugt und verworfen. Das Zellpellet wird in 1 mL Nährmedium resuspendiert. In einer Zellkulturflasche mit 25 cm^2 Bodenfläche und Membranfilter werden 9 mL Nährmedium vorgelegt und die Zellsuspension hineingegeben. Der Wachstumsstatus wird täglich mikroskopisch anhand der Konfluenz der Zellen bestimmt. Ein Medienwechsel erfolgt immer dann, wenn das Nährmedium durch Ausscheidungsprodukte der Zellen einen sauren pH-Wert annimmt, was durch einen Umschlag des Indikators Phenolrot von rot nach gelb angezeigt wird. In diesem Fall wird das Nährmedium abgesaugt und durch frisches Nährmedium gleichen Volumens ersetzt.

3.2.2 Kryokonservierung

Die dauerhafte Lagerung der Zellen erfolgt, wie schon erwähnt, in flüssigem Stickstoff bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Damit die Zellen während des Einfrierens nicht zerplatzen, wird eine Mischung aus 10% DMSO (V/V) und 90% FKS (V/V) (inaktiviert für 30 min bei $56\text{ }^{\circ}\text{C}$) zur Kryoprotektion eingesetzt. $1 \cdot 10^6$ Zellen werden nach dem Ablösen vom Boden der Zellkulturflasche zentrifugiert und in 1 mL des oben genannten Einfriermediums resuspendiert. Die Zellsuspension wird in Kryoröhrchen überführt und diese in einen Einfriercontainer (Cryo $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ Freezing Container) gestellt, der mit Isopropanol befüllt ist. Der Container wird für 4 Stunden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und gewährleistet ein Abkühlen der Zellen um $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro Minute. Anschließend werden die Kryoröhrchen zur dauerhaften Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

3.2.3 Zellzahlbestimmung

Für die Subkultivierung, für die Kryokonservierung der Zellen, aber auch für Zellversuche am SAW-Biosensor erfolgt eine Bestimmung der Zellzahl mithilfe des CASY[®]1

Modell TT. Zur Bestimmung der Zellzahl werden die entsprechenden Zellen vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst, zentrifugiert, das Nährmedium abgesaugt und durch 2 mL frisches Nährmedium ersetzt, in dem die Zellen resuspendiert werden. 20 μL dieser Suspension werden in 10 mL sterilfiltrierter CASY[®]ton Lösung verdünnt. Aus dieser Verdünnung kann anschließend mithilfe des CASY[®]1 Modell TT die Zellzahl bestimmt werden.

Dieses Gerät arbeitet nach dem Prinzip des Coulter-Counters. An einer Kapillare definierter Geometrie (\varnothing 150 μm) wird über zwei Platinelektroden eine Spannung angelegt. Der Widerstand wird durch den elektrischen Leiter zwischen den beiden Elektroden festgelegt. Dabei handelt es sich um CASY[®]ton Lösung, eine Elektrolytlösung konstanter Ionenstärke, so dass der Widerstand als konstant angesehen werden kann. Weil Spannung und Widerstand in dieser Arbeitsanordnung konstant gehalten werden, resultiert auch eine konstante Stromstärke.

400 μL der Zellsuspension werden mit konstanter Geschwindigkeit in die Kapillare gesaugt und passieren die beiden Platinelektroden. Intakte Zellen verhalten sich aufgrund ihrer Phospholipidmembranen wie Isolatoren. Gemäß Gleichung 3.1 ändert sich beim Durchtritt der Zellen durch die Kapillare der Länge l deren Querschnittsfläche A , wodurch der elektrische Widerstand R der Lösung ansteigt (ρ : spezifischer Widerstand).

$$R = \rho \frac{l}{A} \quad (3.1)$$

Rein messtechnisch werden mit dieser Methode Zellvolumina bestimmt, die durch Integration der Messwerte (elektronische Pulsflächenanalyse) in eine lineare Durchmesserverteilung umgerechnet werden. Da die Zellen vereinzelt durch die Kapillare gezogen werden, ergibt jede einzelne Zelle einen Messimpuls, der als Zählwert dient. Die Darstellung erfolgt durch Auftragen der Zellzahl in Abhängigkeit des Zelldurchmessers. Mit dieser Methode lassen sich Zellen mit einem Durchmesser von 8-40 μm bestimmen.

3.2.4 Kultivierung der Melanomzelllinie MV3

MV3 ist eine Melanomzelllinie, deren Etablierung durch van Muijen et al. [276] detailliert beschrieben wurde. In Kürze kann die Etablierung wie folgt dargestellt werden: Fragmente frischer Melanommetastasen eines 76-jährigen Krebspatienten wurden Nacktmäusen subkutan gespritzt. Nach drei Passagen in der Maus wurde ein Teil des Xenotransplantats entnommen und unter der Bezeichnung MV3 kultiviert. Die Zelllinie zeichnet sich durch ihr hohes metastatisches Potential in Nacktmäusen

aus. MV3 Melanomzellen wurden unserer Arbeitsgruppe dankenswerter Weise durch Herrn Dr. Reiner Zeisig (Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin, Berlin) zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung erfolgt in RPMI-1640 Nährmedium unter Zusatz von nicht-inaktiviertem FKS 10% (V/V). Das Nährmedium wird alle zwei Tage gewechselt. Die Konfluenz der Zelllinie wird nach ca. vier Tagen erreicht. Bevor die Zellen geerntet werden, wird mit 5 mL PBS (steril) gespült, um Zellfragmente und schon abgelöste Zellen zu entfernen. Zum Ablösen der Zellen werden je nach Größe der Zellkulturflasche 2-4 mL EDTA-Lösung 0,02% (m/V) zugesetzt und bei 37 °C für drei Minuten inkubiert. Durch leichtes Klopfen und Spülen mit 2-4 mL frischen Nährmediums werden die Zellen vom Boden der Kulturflasche entfernt. Die Zellsuspension wird in ein 15 mL-PP-Röhrchen überführt, zentrifugiert und pelletiert. Nach Resuspension in 4 mL frischem Nährmedium wird die Zellzahl wie unter 3.2.3 beschrieben bestimmt. $2 \cdot 10^6$ Zellen werden in eine Zellkulturflasche mit 175 cm² gegeben, in die vorher 20 mL Nährmedium vorgelegt werden.

Für Versuche mit dem SAW-Biosensor werden die Zellen wie beschrieben abgelöst, zentrifugiert und anschließend in steril filtriertem PBS+ resuspendiert.

Zur Durchführung einer späteren Membranpräparation der MV3, werden die Zellen an Stelle einer Zellkulturflasche auf Zellkulturschalen ausgesäht (siehe Kapitel 3.4).

Revitalisierung und Kryokonservierung erfolgen wie unter 3.2.1 und 3.2.2 beschrieben.

3.2.5 Kultivierung der Zelllinie P-Sel-CHO

Bei P-Sel-CHO handelt es sich um Eierstockzellen des Chinesischen Hamsters, die in der Guppe um Prof. Varki, University of California, La Jolla, USA, stabil mit einem Gen transfiziert wurden, das die Zellen zur Produktion von rekombinanten Maus-P-Selektin-Fc-Chimären (mP-Sel-Fc-Chim.) befähigt. Diese werden von den Zellen in das Nährmedium abgegeben.

Die Zellen werden in MEM- α -Medium mit Ribonukleosiden und Desoxyribonukleosiden unter Zusatz von FKS 10%ig (V/V) kultiviert. Das Nährmedium wird alle zwei Tage gewechselt. Die Zellen sind nach 2-4 Tagen konfluent. Sie werden mithilfe von 2-4 mL Trypsin-EDTA-Lösung (0,25%) und durch Inkubation für drei Minuten bei 37 °C vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst. Nach Zentrifugation, Pelletierung und Resuspension in 2 mL Nährmedium wird die Zellzahl bestimmt. Zur weiteren Kultivierung werden $2 \cdot 10^6$ Zellen in Kulturflaschen mit 175 cm² Bodenfläche und 10 mL vorgelegtem Nährmedium gegeben. Revitalisierung und Kryokonservierung erfolgen wie unter 3.2.1 und 3.2.2 beschrieben. Die spezielle Kultivierung der Zelllinie

zur Produktion und anschließenden Isolierung von mP-Sel-Fc-Chim. ist in Kapitel 3.3 beschrieben.

3.3 Gewinnung von murinen P-Selektin-Fc-Chimären aus Ovarialzellen des chinesischen Hamsters

3.3.1 Zellkultur im Produktionszyklus

Zur Produktion von mP-Sel-Fc-Chim. durch die stabil transfizierten CHO-Zellen werden diese wie in 3.2.5 beschrieben für mindestens vier Tage ohne Selektionsdruck kultiviert. Die Zellen werden vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst, zentrifugiert, pelletiert und in Zellkulturflaschen mit 175 cm² Bodenfläche überführt, in die vorher eine Nährmedienmischung aus MEM- α -Medium mit Ribonukleosiden und Desoxyribonukleosiden unter Zusatz von FKS 10% (V/V) und des Selektionsfaktor G-418 (1 mg/mL) vorgelegt wurde. Bei diesem Selektionsfaktor handelt es sich um ein Aminoglycosid-Antibiotikum, das in hohem Maße die Proteinbiosynthese in eukariotischen Zellen durch Bindung der 80s-Ribosomen beeinträchtigt. Die hier verwendeten stabil transfizierten CHO-Zellen tragen nicht nur ein Gen für die Produktion von mP-Sel-Fc-Chim., sondern wurden gleichzeitig mit einem Resistenzgen gegen G-418 transfiziert. Durch diesen Zusatz selektiert man tatsächlich transfizierte Zellen von denen, die durch Mutation die Fähigkeit verloren haben, mP-Sel-Fc-Chim. zu produzieren.

Wenn die Zellen nach 2–4 Tagen zu ca. 90 % konfluent sind, werden sie für den eigentlichen Produktionszyklus auf zehn Zellkulturflaschen aufgeteilt. Dazu werden $3 \cdot 10^6$ Zellen in Zellkulturflaschen überführt, die mindestens 125 mL Nährmedium bei der Kultur adhärenter Zellen aufnehmen können (NUNCTM nunclon^A, 175 cm²). Es werden 50 mL Nährmedium, bestehend aus MEM- α -Medium mit Ribonukleosiden und Desoxyribonukleosiden und 8 % low-IgG-FKS, vorgelegt. Diese speziell aufgearbeitete FKS-Zubereitung wird eingesetzt, um bei der späteren Isolierung der Fc-Chimären keine Bestandteile des Nährmediums, wie zum Beispiel IgG-Protein zu isolieren. Nach zwei Tagen werden 20 mL OptiMEM Nährmedium pro Zellkulturflasche zu dem bereits vorhandenen Nährmedium hinzugegeben. Da dieses Medium alle für die Zellkultur benötigten Aminosäuren schon in gelöster Form beinhaltet, kann auf einen weiteren Zusatz von FKS verzichtet werden. Nach zwei weiteren Tagen werden noch einmal 30 mL OptiMEM-Medium dazugegeben.

Das Wachstum der Zellen wird täglich kontrolliert. Es erfolgt keine weitere Nährmedienzugabe. Die Zellen werden solange in Kultur gehalten, wie sie sich nicht

vom Boden der Zellkulturflaschen ablösen (ca. sieben Tage). Sobald sich die Zellen vermehrt in Form größerer Fragmente vom Boden ablösen, wird das gesamte Nährmedium gesammelt und durch Zentrifugation von Zellen und Zellbestandteilen getrennt (10 min bei $312 \times g$, 4°C). Das Nährmedium wird in Duranglasflaschen gesammelt und mit Natriumazid bis zu einem Massegehalt von 0,05 % (m/V) versetzt. Das Medium kann so für mehrere Wochen bei $4-8^\circ\text{C}$ gelagert werden.

3.3.2 Gewinnung der mP-Sel-Fc-Chimären aus dem Nährmedium

Wird das Nährmedium nicht sofort nach seiner Gewinnung weiterverwendet und im Kühlschrank gelagert, sollte es vor der Proteinaufreinigung noch einmal zentrifugiert werden. Das Volumen des Nährmediums wird anhand der Skala der Duranglasflasche grob bestimmt. Anschließend versetzt man das Nährmedium mit 1/100 seines Volumens mit EDTA-Lösung (0,5 M, pH 7,5) und dann mit 1/100 seines Volumens mit Tris-HCl (1 M, pH 8,0). Pro Liter Nährmedium wird 1 mL Protein-A-Sepharose (PAS) hinzugegeben. Nach Zugabe eines Rührfisches wird das Nährmedium bei geringer Rührstärke in einer Kühlkammer bei 4°C für sieben Tage gerührt. Dabei binden die Fc-Chimären des produzierten murinen P-Selektins an die PAS, während andere Proteine in Lösung bleiben. Die PAS wird durch Zentrifugation vom Nährmediumüberstand getrennt. Der Überstand wird bis zur Proteinbestimmung bei 4°C aufbewahrt, um die Option einer erneuten Extraktion der mP-Sel-Fc-Chim. offen zu halten.

Das Pellet aus PAS wird in 1 mL TBS-Puffer (pH 8,0) suspendiert und in eine 1 mL-Chromatographiesäule mit Fritte überführt. Die PAS wird mit 10 mL TBS-Puffer (pH 8,0) auf der Chromatographiesäule gespült. Anschließend wird mit 5 mL Zitronensäurepuffer (pH 5,8) gespült. Die Fc-Chimären werden dann mit 8,0 mL Glycin-HCl-Puffer (pH 3,0) eluiert. Die daraus resultierende Fraktion wird mit Tris-HCl-Puffer (pH 8,0) neutralisiert, wobei pro Milliliter Eluat 100 μL Tris-Puffer eingesetzt werden. Der pH-Wert kann mittels pH-Papier bestimmt werden.

Ein Dialyseschlauch mit einem MWCO⁶ von 14-15 kD wird für eine Stunde in Aqua dem. eingelegt, um Natriumazid, mit dem der Schlauch konserviert wird, zu lösen. Anschließend wird er dreimal mit Aqua dem. von innen gespült. Der Dialyseschlauch wird an seiner Unterseite mit einer Blei-beschwerten Klammer verschlossen und das Eluat eingefüllt. Nach Verschluss der Oberseite des Schlauchs mit einer Kunststoffklammer wird er in einen Behälter mit 5 L PBS-Puffer eingehängt,

⁶engl. Molecular Weight Cut Off

der mit einem Magnetrührer versehen ist und auf einer Rührplatte steht. Die Dialyse wird für zwölf Stunden bei 4 °C durchgeführt.

Nach der Dialyse wird die Fraktion in ein Centricon 30.000-Zentrifugenfiltrerröhrchen überführt und bei 4000 ×g für 10 min und 4 °C zentrifugiert. Bei dieser Zentrifugation bleiben alle Bestandteile, die ein Molekulargewicht größer 30 kD aufweisen, oberhalb der Filtereinheit im Zentrifugenröhrchen, während alle kleineren Bestandteile die Filtermembran passieren. Wenn das Volumen nach Zentrifugation oberhalb der Filtermembran ≤ 500 µL ist, wird 1 mL sterilfiltrierter PBS hinzugegeben. Mit einer Pipette wird die Lösung oberhalb der Filtermembran aufgezogen und die Filtermembran vorsichtig gespült, um daran haftende Proteine abzulösen. Diese Prozedur wird nach erneuter Zentrifugation noch zweimal wiederholt. Dadurch wird zum einen eine Reinigung der mP-Sel-Fc-Chim. erreicht und zum anderen eine übermäßige Adsorption der Chimären an der Filtermembran verhindert.

Bis zur Bestimmung des Proteingehalts und der Reinheitsprüfung mittels SDS-Gelelektrophorese wird die mP-Sel-Fc-Chim.-haltige Lösung zu 50 µL aliquotiert und bei -80 °C eingefroren. Eingefrorene mP-Sel.-Fc-Chim. sollten nicht länger als sechs bis neun Monate gelagert werden, weil sie nach längerer Lagerungszeit ihre Bindungseigenschaften verändern.

3.3.3 Quantitative und qualitative Charakterisierung der mP-Sel-Fc-Chimären

Zur quantitativen Charakterisierung der mP-Sel-Fc-Chim. werden die gewonnenen Proben mithilfe des Amidoschwarz-Assays auf ihren Proteingehalt geprüft. Dabei wird die UV-Absorption der Proben nach Mischung mit dem Farbstoff Amidoschwarz 10B bestimmt und mit der Absorption einer BSA-Kalibriergeraden bekannten Proteingehalts unter gleichen Bedingungen verglichen. Aus diesem Vergleich kann der Proteingehalt der Proben abgeleitet werden. Die BSA-Vergleichsreihe wird wie in Tabelle 3.7 dargestellt hergestellt.

Die Proben werden so verdünnt, dass ein Proteingehalt von ca. 10 µg zu erwarten ist. Gibt es keine Anhaltspunkte für den zu erwartenden Proteingehalt, werden die Proben in unterschiedlichen Verdünnungsstufen eingesetzt. Alle folgenden Schritte werden sowohl für die Proben der Kalibriergeraden als auch für die zu bestimmenden Proben durchgeführt. 10 µL der Probenverdünnung werden mit Aqua dem. ad 225 µL aufgefüllt. 30 µL 1 M Tris-HCl (pH 7,5 mit SDS (2%)) werden hinzugegeben und die Proben werden auf dem Vortexschüttler gemischt. Eisgekühlte TCA-Lösung (100%) wird zu je 50 µL hinzugefügt, die Proben werden erneut gemischt und für zwei Minuten bei RT inkubiert. Während der Inkubationszeit wird eine PVDF-

Tab. 3.7: Pipettierschema der BSA-Kalibriergeraden

Protein	0,2 mg/mL BSA- Stammlösung	H₂O
0 µg	0 µL	225 µL
0,5 µg	2,5 µL	222,5µL
1 µg	5 µL	220 µL
2 µg	10 µL	215 µL
5 µg	25 µL	200 µL
7,5 µg	37,5 µL	187,5 µL
10 µg	50 µL	175 µL
12,5 µg	62,5 µL	162,5 µL
15 µg	75 µL	150 µL

Membran (11,0 cm · 7,2 cm) zuerst für 15 s mit Methanol benetzt und anschließend für 2 min in Aqua dem. gewässert. Ein Filterpapier gleicher Größe wird ebenfalls mit Aqua dem. befeuchtet. Filterpapier (unten) und Membran (oben) werden in den Vakuumblock eingespannt, wobei die Schrauben gleichmäßig und nicht zu fest anzuziehen sind. Über eine elektrische Vakuumpumpe wird ein Druck von 600 mbar angelegt. Proben der Kalibriergeraden und zu vermessende Proben werden in die Vertiefungen des Vakuumblocks hineinpipettiert, wobei das Lösungsmittel durch die Membran hindurchgezogen wird und Proteinbestandteile auf ihr haften bleiben. Die Probengefäße werden zur quantitativen Proteinbestimmung mit 180 µL TCA (6%) gespült und diese Lösungen ebenfalls in die entsprechenden Vertiefungen pipettiert. Mit je 180 µL TCA (6%) werden die Vertiefungen des Vakuumblocks noch ein letztes Mal gespült.

Die Membran wird aus dem Vakuumblock ausgebaut und für 20 min in Amidoschwarz 10B gefärbt. In der Zwischenzeit werden 150 µL der BSA-Stammlösung mit Aqua dem. ad 7,5 mL aufgefüllt, in Quarzküvetten gefüllt und als Nullwert bei einer Wellenlänge von 278 nm im UV-Meter vermessen. Die gefärbte Membran wird für 1 min in Aqua dem. gespült und dreimal für je 3 min in 25 mL Entfärbelösung gelegt. Anschließend wird sie für 3 min in Aqua dem. gelegt, um überschüssige Entfärbelösung zu entfernen. Die Membran wird vorsichtig trocken getupft und die erkennbaren Proteinflecken werden mit einer Lochzange ausgestanzt. 1 mL Elutionslösung wird in Glasröhrchen vorgelegt und die ausgestanzten Membranstücke werden für 15 min in die Elutionslösung gegeben, wobei alle 5 min gerührt wird. Der Farbstoff geht dabei in die Elutionslösung über. Da der Farbstoffgehalt proportional zur gebundenen Proteinmenge auf der Membran ist, kann durch anschließende UV-photometrische Vermessung bei 630 nm der Proteingehalt der Proben anhand der Kalibriergeraden bestimmt werden.

3.3 Gewinnung von murinen P-Selektin-Fc-Chimären aus Ovarialzellen des chinesischen Hamsters

Die Reinheit der mP-Sel-Fc-Chim. wird mithilfe einer SDS-Gelelektrophorese bestimmt. Dazu müssen zuerst Trenn- und Sammelgel gegossen und die Elektrophorese-Apparatur aufgebaut werden. Trenn- und Sammelgel setzen sich wie in Tabelle 3.8 beschrieben zusammen.

Tab. 3.8: Pippetierschema für Trenn- und Sammelgel

	Trenngel 7,5 %ig	Sammelgel 5 %ig
Trenngelpuffer	5,625 mL	–
Sammelgelpuffer	–	625 µL
Aqua dem.	5,365 mL	3,465 mL
Acrylamid 30%	3,750 mL	833 µL
SDS 10%	150 µL	50 µL
TEMED	12 µL	5 µL
APS 10%ig	100 µL	20,8 µL

Bis auf TEMED und APS 10% werden alle Komponenten für das Trenngel in einem PP-Röhrchen zusammenpipettiert. Nach Zugabe dieser beiden Komponenten wird das Trenngel zügig bis zu einer entsprechenden Markierung auf den Glasplatten der Gießapparatur gegossen und anschließend mit 1 mL Aqua dem. überschichtet. Nach einer Polymerisationszeit von 30 min wird das überschichtete Wasser mit einem Papiertuch aufgesaugt. Anschließend wird das Sammelgel fertig gestellt und zügig bis unter den Rand der Apparatur eingefüllt. Ein Plastikamm, der die Taschen zur Aufnahme der Proben im Gel formt, wird in die Apparatur eingesteckt und für die Polymerisationszeit von 30 min dort belassen.

5 µL der mP-Sel-Fc-Chimären-Lösung werden mit PBS-Puffer ad 10 µL aufgefüllt. Zu jeder Probe werden 10 µL PAP zur anschließenden Denaturierung gegeben. Die Proben werden dazu 5 min in einen Heizblock bei 90 °C erhitzt. Der Plastikamm wird aus dem Sammelgel vorsichtig herausgezogen und das Gel, das sich zwischen zwei Glasplatten befindet, wird in die Elektrophoresekammer eingebaut. Die Kammer wird mit Elektrophorese-Puffer befüllt. Die Probenaschen werden mithilfe einer Pipette mit Elektrophorese-Puffer gespült und anschließend aufgefüllt. Die Proben werden vorsichtig in die Probenaschen gefüllt. In eine Probenasche wird der Proteinmarker gefüllt, dessen Proteinzusammensetzung bekannt ist und dessen Banden bei der Versuchsauswertung einen Anhaltspunkt für die Größe der Proteine in den Proben liefert. Bei einer Spannung von 200 V wird die Elektrophorese für 37 min durchgeführt. Nach dieser Zeit wird das Gel aus der Apparatur herausgenommen und von den Glasplatten getrennt. Das Sammelgel wird mithilfe eines Skalpell abgetrennt und verworfen. Das Trenngel wird für 1,5 h in einer Coomassieblau-Färbelösung auf einem Orbitalschüttler mit 150 U/min inkubiert. Danach wird das Gel aus der Färbe-

lösung entnommen und überschüssige Färbelösung vorsichtig mit einem Papiertuch aufgesaugt. Das Gel wird für ca. 30 min in die Entfärbelösung gegeben und wie oben beschrieben auf dem Schüttler inkubiert.

Sollte die Färbung noch zu intensiv sein, wird dieser Schritt wiederholt. Sollte das Gel zu sehr entfärbt sein, kann es durch erneute Inkubation in Färbelösung wieder angefärbt werden. Wenn das Gel die gewünschte Färbung angenommen hat, wird es für 1,5 h in Aqua dem. gewässert, bevor es zwischen zwei Plastikfolien gelegt wird. In dieser Plastikhülle kann das Gel zur Auswertung mit einem Computerscanner fotografiert werden.

3.4 Membranpräparation von MV3-Zellen

3.4.1 Zellkultur zur Vorbereitung der Membranpräparation

Die Zellkultur der MV3-Zellen wurde unter 3.2.4 beschrieben. Sie erfolgt für eine anschließende Membranpräparation auf 145 cm² Gewebekulturschalen mit Deckel an Stelle von Kulturflaschen mit Membranfilter. Für die Membranpräparation empfiehlt es sich, mindestens 20 Gewebekulturschalen mit Zellen anzulegen, um eine ausreichende Membran- bzw. Proteinausbeute zu gewährleisten. Die Zellen werden geerntet, wenn sie zu ca. 90% konfluent sind.

3.4.2 Einfache Membranpräparation

Die Zellkulturschalen werden vom Nährmedium befreit und mit je 2,4 mL Homogenisationspuffer benetzt. Anschließend werden die Zellen mechanisch mit einem Zellschaber vom Boden entfernt. Zur Steigerung der Ausbeute wird die Zellsuspension von einer Zellkulturschale auf die nächste überführt. Die Zellsuspension wird anschließend in PP-Röhrchen pipettiert und auf Eis gelagert. Der Inhalt der PP-Röhrchen wird im Polytron-Homogenisator zerkleinert. Dazu wird dieser auf „Stufe 6“ hochgefahren und für 12s werden Hübe ausgeführt. Die Zerkleinerung wird zwei mal wiederholt. In der Zwischenzeit werden die PP-Röhrchen auf Eis gelagert, um eine Überhitzung der Suspension zu vermeiden. Die aufgeschlossene Zellsuspension wird in Zentrifugengläser überführt und das Gewicht mit Homogenisationspuffer austariert. Es folgt die erste Zentrifugation (Rotor JA 25.50) bei $40\,000 \times g$ für 2 min bei 2 °C. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in Lager-Puffer resuspendiert. Die Suspension wird wie vorher beschrieben noch einmal zentrifugiert. Die Prozedur wird ein weiteres mal wiederholt. Das erhaltene Pellet wird in 7 mL PBS+ resuspendiert. Die Suspension wird aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

3.4.3 Membranpräparation nach Lever

Die hier beschriebene Membranpräparation ist eine modifizierte Form der Membranpräparation nach Lever [277].

Das Nährmedium wird von den Kulturschalen abgesaugt. Anschließend werden je 3 mL Erntepuffer auf die Schalen gegeben. Die am Boden haftenden Zellen werden mithilfe eines Gummischabers von der Oberfläche gelöst. Die Kulturschalen werden mit der erhaltenen Suspension noch dreimal gespült, bevor diese in 50 mL-PP-Röhrchen überführt wird. Zur weiteren Erhöhung der Ausbeute werden je fünf Gewebekulturschalen noch einmal mit jeweils 5 mL Erntepuffer nachgespült. Diese Suspension wird von Schale zu Schale weiterpipettiert. Bei 20 Kulturschalen erhält man so 20 mL Spüllösung. Die Spüllösung wird gleichmäßig auf die PP-Röhrchen mit der restlichen Zellsuspension verteilt ($2 \cdot 40$ mL Gesamtvolumen). Die Suspension wird während der Präparation durchgehend auf Eis gekühlt, um einen proteolytischen Abbau der Membranproteine zu verhindern. Die Zellen werden bei $4000 \times g$ und 4°C (Beckman-Zentrifuge mit Ausschwingrotor) für 10 min zentrifugiert. Die erhaltenen Pellets werden mittels Vortexschüttler in 20 mL frischem Erntepuffer resuspendiert und abermals wie beschrieben zentrifugiert. Durch diese beiden Zentrifugationen befreit man die Zellen vom Nährmedium. Im Anschluss werden die Pellets in je 20 mL Homogenisierungspuffer nach Lever resuspendiert.

Der eigentliche Aufschluss der Zellen erfolgt mithilfe des Polytron-Homogenisators. Durch fünf Hübe auf „Stufe 6“ der Apparatur von jeweils 15 s Dauer werden die Zellen in Zellfragmente zerkleinert. Die Zellen bzw. Zellfragmente werden zwischen den Hüben auf Eis gelagert, um eine Überhitzung durch die mechanisch eingetragene Wärme zu verhindern. Mithilfe der EDTA-Na-Stammlösung wird eine EDTA-Konzentration von 1 mM in der Suspension eingestellt (100 μL EDTA-Na-Stammlösung auf 20 mL Zellsuspension). Für die spätere Charakterisierung werden Proben mit jeweils 100 μL Volumen gezogen und bei -80°C eingefroren (Polytron-Probe). Das Homogenat wird für 10 min bei $800 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Dadurch werden Zellkerne und noch intakte Zellen von den restlichen Zellbestandteilen abgetrennt.

In zwei 50 mL PP-Röhrchen werden 5 mL der Saccharoselösung (35%) vorgelegt. Über dieses Saccharoselösung werden jeweils 20 mL des Überstandes aus der vorherigen Zentrifugation vorsichtig überschichtet. Saccharoselösung und Überstand werden für 1 h bei 7 500 U/min (Beckman Avanti 20XP, Rotor JS 7.5) und 4°C zentrifugiert. Der Überstand dieser Zentrifugation und die Hälfte des Saccharoselösung werden gesammelt und mit Verdünnungspuffer 1:1 verdünnt. Die so erhaltene Suspension wird auf Zentrifugengläser verteilt, die mithilfe einer Analysenwaage durch Zugabe

von Verdünnungspuffer austariert werden. Es erfolgt die letzte Zentrifugation in der Ultrazentrifuge (Beckman, Rotor 45 Ti) bei $100\,000 \times g$ und 4°C für 1 h.

Das Pellet dieser Zentrifugation wird in 1 mL Resuspensionspuffer nach Lever aufgenommen, die Zentrifugengläser mit je 1 mL Resuspensionspuffer gespült und die Suspension in Pottergläser überführt. Durch fünf Hübe im Potter Elvehjem Glashomogenisator bei 1 500 U/min wird die Suspension mit dem Ziel homogenisiert, gleichmäßige Membranvesikel zu erhalten. Die Vesikel werden zu je 250 μL aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

3.4.4 Gewinnung von Membranproteinen mithilfe von Oktylglucosid

Die MV3-Zellen werden wie unter 3.2.4 beschrieben kultiviert und für diese Methode auf 40 Gewebekulturschalen mit 145 cm^2 Bodenfläche verteilt. Wenn die Zellen zu 90% konfluent sind, werden auf jede Schale 3 mL Oktylglucosid-Lösung gegeben und die Zellen für 10 min bzw. 30 min bei 250 U/min auf dem Horizontalschüttler geschüttelt. Die Oktylglucosid-Lösung wird von den Gewebekulturschalen abgenommen und in einem 50 mL-PP-Röhrchen vereinigt. Zellen und Zellfragmente werden zweimal bei $312 \times g$ für 4 min bei 4°C pelletiert. Mit dem Überstand werden 5 mL eines Saccharosekissens in einem PP-Röhrchen vorsichtig überschichtet. Das entstandene Zweiphasensystem wird für 1 h bei $10\,000 \times g$ zentrifugiert, wodurch Zellorganellen von Proteinen und anderen kleineren Bestandteilen abgetrennt werden.

Der Überstand dieser Zentrifugation wird in einen Dialyseschlauch mit einem MWCO von 14-15 kD überführt, der auf der einen Seite mit einer Blei-beschwerten Klammer und auf der anderen Seite mit einer Kunststoffklammer verschlossen wird. Pro Zentimeter Dialyseschlauch können 2 mL Lösung eingesetzt werden. An den Enden ist auf eine ausreichende Schlauchlänge zum Verschluss des Systems zu achten. Die Lösung wird in 5 L PBS-Puffer in einer Kühlkammer bei 4°C unter leichtem Rühren dialysiert. Dabei gehen kleinere Proteine sowie ein Teil des Oktylglucosids in den PBS-Puffer außerhalb des Dialyseschlauchs über. Nach zwölf Stunden wird der PBS-Puffer erneuert, ebenso nach weiteren zwölf Stunden. Nach insgesamt 36 Stunden Dialyse wird die Lösung zu 1 mL aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

3.4.5 Bestimmung des Proteingehalts nach Membranpräparation

Um das Vorhandensein bestimmter Membranproteine wie VLA-4 später über Gelelektrophorese und Western Blot nachweisen zu können, muss zuvor der Gesamt-

proteingehalt der Membranpräparation bestimmt werden. Die Bestimmung mittels Amidoschwarz-Assays erfolgt wie unter 3.3.3 beschrieben.

3.4.6 Detektion von VLA-4 durch Gelelektrophorese und Western-Blot

Die Detektion von VLA-4 in der Membranpräparation erfolgt durch SDS-Gelelektrophorese und anschließendem Western-Blot. Die Durchführung der Gelelektrophorese wird unter 3.3.3 beschrieben.

Das Acrylamidgel wird nach der Entnahme aus der Elektrophoreseapparatur nicht einer Farbreaktion zugeführt, sondern für einen Western-Blot verwendet. Dazu wird eine PVDF-Membran auf die Größe der Blotting-Apparatur zurechtgeschnitten und in Methanol für 20 s geschüttelt. Bis zur weiteren Verwendung der Membran wird sie in Transferpuffer geschüttelt. Das Acrylamidgel der Elektrophorese wird mithilfe eines Skalpells in Trenn- und Sammelgel aufgeteilt. Das Sammelgel wird verworfen und das Trenngel in 10 mL Transferpuffer äquilibriert. Die Kunststoffkammer, in der der Western-Blot durchgeführt wird, wird mit Transferpuffer ausgespült und anschließend bis zur Hälfte mit Transferpuffer gefüllt. Ein Gefrier-Akku, der vorher mit Aqua dem. befüllt und bei -20°C eingefroren wurde, wird ebenfalls in die Western-Blot-Kammer eingesetzt. Eine Plastikschaale mit mindestens $1\,200\text{ cm}^2$ Bodenfläche wird mit Transferpuffer befüllt. In diese Plastikschaale werden zwei Fiberglasmatten mit den Abmessungen des Acrylamidgels eingelegt. Mithilfe eines Glasstabs wird die Luft aus den Poren der Fiberglasstruktur herausgedrückt. Außerdem werden zwei Stücke Blottingpapier in den Transferpuffer eingelegt. Das Acrylamidgel wird nun in den Sandwich-Halter der Blotting-Apparatur eingebaut. Die Abfolge der Sandwich-Lagen ist: Fiberglasmatte, Blottingpapier, PVDF-Membran, Acrylamidgel, Blottingpapier, Fiberglasmatte. Der Einbau erfolgt bei ständiger Bedeckung der Komponenten mit Transferpuffer. Bevor die Halterung verschlossen wird, werden nochmals die Luftblasen mit einem Glasstab entfernt. Die Halterung wird zusammen mit einem Magnetrührer in die Blotting-Kunststoffkammer eingebaut und auf einem Magnetrührer platziert. Der Elektro-Blot erfolgt unter Rühren bei einer Spannung von 100 V und einer Stromstärke von 350 mA für eine Stunde. Dabei werden die Proteine vom Acrylamidgel auf die Blottingmembran übertragen. Da der Protein-Größenstandard, der bei der Gelelektrophorese verwendet wird, durch einen Farbstoff angefärbt ist, kann die erfolgreiche Übertragung der Proteine anhand dieses Markers überprüft werden. Alle anderen Proteine sind nicht auf der Membran zu erkennen und müssen durch die im Folgenden beschriebenen Schritte erst sichtbar gemacht werden.

Zuerst werden mit 50 mL der Blockierungslösung unspezifische Bindungsstellen auf der Membranoberfläche abgesättigt. Dabei wird die Membran für 1 h bei RT geschüttelt. Anschließend wird dreimal mit je 10 mL TBS-T für 10 min unter Schütteln gespült. Die Visualisierung erfolgt mithilfe zweier Antikörper-Reaktionen. Beim ersten verwendeten Antikörper handelt es sich um Natalizumab, einen Antikörper gegen die $\alpha 4$ -Domäne des VLA-4. TBS-T wird von der Membran abgeschüttet und durch 10 mL der Natalizumab-Lösung für Western-Blot ersetzt. Dabei ist darauf zu achten, dass die Antikörper-Lösung nicht direkt auf die Membran gegeben wird, sondern an den Rand der Plastischale. Die Membran wird 1 h bei RT in dieser Lösung geschüttelt. Die Membran wird in der Antikörperlösung belassen und über Nacht abgedeckt im Kühlschrank bei 4-8 °C gelagert.

Am nächsten Morgen wird die Natalizumab-Lösung für Western-Blot mit einer Pipette abgenommen und kann für weitere Versuche in einem PP-Röhrchen bei 4-8 °C gelagert werden. Die Membran wird dreimal für jeweils 10 min mit TBS-T unter Schütteln gespült. 10 mL der Sekundär-Antikörper-Lösung für Western-Blot werden zur Membran gegeben, wobei auch hier ein direktes Beträufeln der Membran zu vermeiden ist. In dieser Lösung wird die Membran für 1,5 h bei RT geschüttelt. Die Lösung des sekundären Antikörpers entspricht einer 1:20 000-Verdünnung des reinen anti-Human-IgG-HRP-konjugierten Antikörpers. Dieser Antikörper richtet sich gegen den Fc-Teil von Natalizumab. Danach wird die Lösung mit der Pipette abgenommen und verworfen. Die Membran wird zweimal für jeweils 10 min in TBS-T unter Schütteln gespült.

Zur Detektion werden 4 mL ECL-Reagenz (ECL⁷), bestehend aus 2 mL Luminol für Western-Blot und 2 mL Peroxid-Lösung für Western-Blot, durch Mischen hergestellt. Die Lösung wird für 2 min auf die Membran gegeben. Dabei setzt die Meerettich-Peroxidase, die an den sekundären Antikörper konjugiert ist, das ECL-Reagenz um, dessen Chemilumineszenz mit einer entsprechenden Kamera detektiert werden kann. Dazu wird die Membran in eine Klarsichtfolie gelegt und Luftblasen werden herausgestrichen. Es erfolgt erst eine Belichtung für 2 s und ggf. eine längere Belichtung zur Visualisierung des gesuchten VLA-4-Proteins.

3.5 Quarzmikrowaagensystem LiquiLab21[®]

Das Quarzmikrowaagensystem (QCM⁸) LiquiLab21[®] wurde vom Institut für Automation und Kommunikation (ifak), Barleben, entwickelt. Das System bietet vier

⁷engl. Enhanced ChemiLuminescence

⁸engl. Quartz Crystal Microbalance

Messplätze mit Oszillatoren, auf denen die Messkammern mit den Quarzsensoren aufgesteckt und unabhängig voneinander vermessen werden können. Die Messplätze sind in einen temperierbaren Behälter eingebaut. Das Zusammenspiel einer Wasserkühlung im Boden des Behälters und einer Einrichtung zum Beheizen der Luft im Behälter sorgt für konstante Temperaturbedingungen.

Die verwendeten Messkammern bestehen aus PMMA (Messkammerboden) und Polycarbonat (Messkammerdeckel). Der detaillierte Aufbau der Messkammern ist in Abbildung 3.1 dargestellt.

Um das System für Messungen unter Durchflussbedingungen nutzen zu können, werden Silikonschläuche (Innendurchmesser 1,02 mm) zu den Messkammern gelegt. Über eine Zwölfwalzenpumpe wird zum einen ein Pufferfluss sichergestellt, zum anderen aber auch der Transport von Analytlösungen zur Oberfläche des Quarzsensors. Wenn nicht anders gekennzeichnet, beträgt die Flussrate bei den hier dargestellten Versuchen $270 \mu\text{L min}^{-1}$. Dabei wird ein Schergrad von etwa 5 s^{-1} erreicht. Die Analytzugabe erfolgt über ein Dreiwegehahnsystem. Durch Blasenfallen, die im Schlauchsystem verschaltet sind, wird die Luftblasen-freie Befüllung während der Analytzugabe gewährleistet. Ein Überlauf sorgt für den Druckausgleich.

Die Resonanzfrequenz wird von den Oszillatormessplätzen mit einer Zeitauflösung von einem Messwert pro Sekunde erfasst und an einen mit entsprechender Visualisierungssoftware ausgestatteten Computer weitergegeben. Neben der Frequenzänderung, die eine Aussage über Massenveränderungen auf der Quarzoberfläche macht, wird die Dämpfungsänderung im Zuge der Experimente aufgezeichnet. Die Dämpfungsänderung macht eine Aussage über viskoelastischen Veränderungen auf der Sensoroberfläche und ergibt sich aus der Spannung, die benötigt wird, um eine konstante Amplitude der Quarzschwingung aufrecht zu erhalten. Je höher diese Spannung ist, desto höher ist die Dämpfung der Quarzschwingung.

Auf die elektronische Realisierung der Messmethode soll im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter eingegangen werden. Einzelheiten hierzu können ausführlich unter Borngräber [257] nachgelesen werden.

3.5.1 Charakterisierung der Quarzsensoren und deren Reinigung

Bei den Sensoren, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet werden, handelt es sich um planare Quarzkristalle, die durch AT-Schnitt aus einem Quarzkristall ohne Symmetriezentrum herausgeschnitten werden. Bei dieser Art des Schnittes wird eine Quarzplatte in einem Winkel zwischen $35,10^\circ$ bis $35,15^\circ$ zur optischen Achse des Quarzkristalls herausgeschnitten. Die Resonanzschwingung derartig hergestellter Quarzscheiben erweist sich als besonders temperaturbeständig. Die Resonanzfrequenz

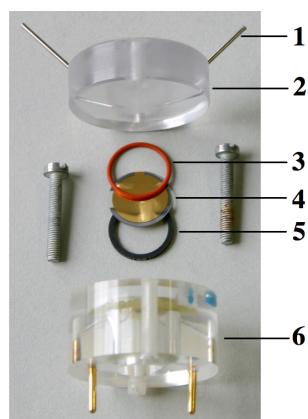


Abb. 3.1: Aufbau einer Messkammer im LiquiLab 21[®]. 1: Ein- und Auslasskanülen 2: Kammerdeckel 3: Silikon-O-Ring zum Abdichten des Quarzsensors 4: Quarzkristall 5: Leitgummi (Gummidichtring, in den ein Silberfaden zur Weiterleitung des elektrischen Stroms eingelassen ist) 6: Kammerboden mit Kontaktstiften; der Durchmesser der Messzelle beträgt 30 mm, die Höhe ohne Kontaktstifte 25 mm; das Zellvolumen beträgt 100 μL .

der hier verwendeten Schwingquarze beträgt 10 MHz, der Durchmesser 14 mm, die aktive Sensorfläche ist 0,28 cm^2 groß.

Um einerseits das Anlegen einer elektrischen Spannung an den Quarzkristall zu ermöglichen und andererseits eine Oberfläche für weitere chemische Modifikationen zu bieten, ist der Sensor von beiden Seiten mit einer Goldelektrode im Hochvakuum bedampft. Um der etwa 1000 \AA dicken Goldschicht einen besseren Halt auf der Quarzoberfläche zu verschaffen, wird vorher eine etwa 200 \AA dicke Chromschicht aufgedampft.

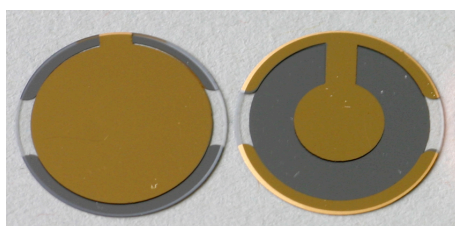


Abb. 3.2: Ober- und Unterseite der verwendeten Quarzsensoren. Die hier dargestellten Quarzsensoren werden für die experimentellen Arbeiten verwendet. Die Resonanzfrequenz der Quarzkristalle beträgt 10 MHz. Die Goldelektrode dient zum Anlegen einer Wechselspannung und gleichzeitig zur Immobilisation von Biomolekülen.

Die Quarzsensoren werden dreimal für jeweils 3 min von beiden Seiten mit Piranha-Lösung gereinigt. Die Lösung wird mit einer Pipette auf die Goldelektrode des Sensors getropft. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wird mit Aqua dem. gespült. Zum Schluss werden die Quarzsensoren ein weiteres Mal mit Aqua dem. und anschließend mit Ethanol (96% V/V) gespült, bevor sie unter einem Strom synthetischer Luft getrocknet werden.

3.5.2 Immobilisation von Proteinen auf den Quarzsensoren

Um den Biosensor mit Proteinen zu funktionalisieren, werden die vorher gereinigten Quarzsensoren über Nacht in 6-Mercaptohexan-1-ol-Lösung eingelegt. Durch Selbstorganisation (engl. Self-Assembling) der Thiolgruppen auf der Goldoberfläche und der hoch organisierten Anordnung der Alkylketten zueinander kommt es zu einer Hydroxylierung der Goldoberfläche. Der Quarzsensoren wird mit Ethanol (96% V/V) gespült und unter Luftstrom getrocknet.

Die weitere Aktivierung der Hydroxyloberfläche erfolgt durch zweistündige Inkubation in Cyanurchlorid-Lösung. Dabei kommt es zur Bindung des Cyanurchlorids an die Hydroxylgruppe des Mercaptohexan-1-ols durch Austausch eines Chloratoms. Anschließend wird der Sensor ein weiteres Mal mit Ethanol (96% V/V) gespült und wie schon beschrieben getrocknet. Folgende Proteinlösungen werden mit 20 µL Borat-Puffer (pH 8,8) gemischt und auf die Oberseite der Quarzsensoren pipettiert:

- 20 µL hP-Selektin-Fc-Chimären-Lösung (0,2 mg/mL)
- 20 µL mP-Selektin-Fc-Chimären-Lösung (0,2 mg/mL)
- 20 µL hL-Selektin-Fc-Chimären-Lösung (0,2 mg/mL)
- 20 µL hVCAM-1-Fc-Chimären-Lösung (0,2 mg/mL)

Unter diesen leicht basischen Bedingungen kommt es zur kovalenten Bindung des Proteins durch nukleophile Substitution eines weiteren Chloratoms des Cyanurchlorids. Die zu Grunde liegende chemische Reaktion wird in Abbildung 3.3 erläutert.

Nach Ende der Inkubationszeit werden die Quarze mit Aqua dem. gespült, unter Luftstrom getrocknet und wie unter Abbildung 3.1 dargestellt in die Messkammer eingebaut. Sie wird über die Zwölfwalzenpumpe mit Fließpuffer gefüllt, wobei auf eine blasenfreie Befüllung zu achten ist und im ausgeschalteten Zustand der QCM mit ihren Kontaktstiften auf einen der Oszillatorensteckplätze aufgesteckt.

3.5.3 Immobilisation von Sulfatid-haltigen oder sLex-haltigen Modellmembranen

Zur Immobilisation von Modellmembranen auf der Oberfläche der Quarzsensoren werden die Schwingquarze wie unter 3.5.1 beschrieben gereinigt. Anschließend werden sie in Hexadecan-1-thiol-Lösung für 12 h eingelegt. Sie werden mit Ethanol (96% V/V) gespült und unter Luftstrom getrocknet. Die durch das Self-Assembling ausgebildete hydrophobe Schicht dient als Trägerschicht für den zweiten Immobilisationsschritt.

Der Trog der Langmuir-Blodgett-Filmwaage wird mit Ethanol (96% V/V) unter Zuhilfenahme fusenfreier Papiertücher ausgewischt und anschließend mit Ethanol

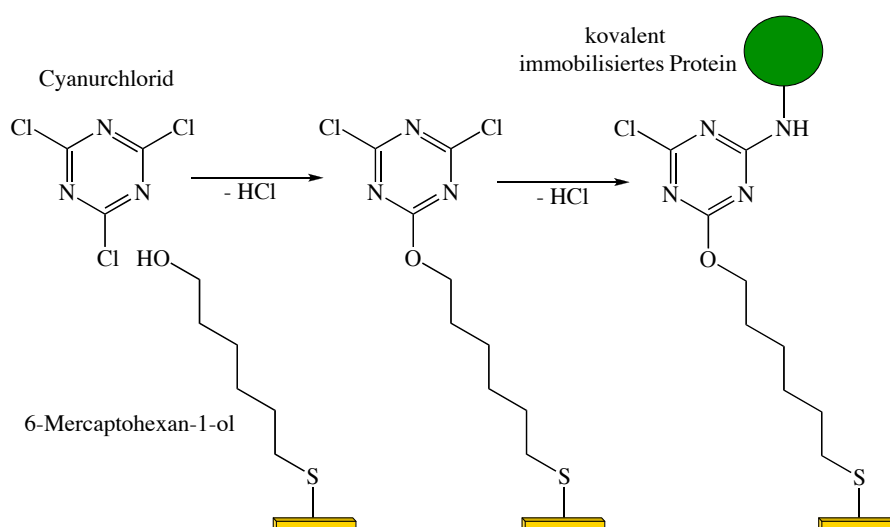


Abb. 3.3: Kopplungsreaktionen von Cyanurchlorid. Cyanurchlorid wird unter HCl-Abspaltung im Sinne einer nukleophilen Substitution an die Hydroxylgruppe des Mercaptohexan-1-ols gebunden. Da die Reaktionsgeschwindigkeit durch die erste Substitutionsreaktion vermindert ist, erfolgt die Kopplung des Proteins unter erneuter HCl-Abspaltung und Bindung über eine freie Aminogruppe des Proteins langsamer. Mit dieser Methode ist die kovalente Immobilisation verschiedener Proteine auf funktionalisierten Goldoberflächen möglich.

befüllt. Verschmutzungen, die durch Ethanol gelöst werden, können dann zusammen mit dem Ethanol mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt werden. Anschließend wird der Trog mit Aqua dem. befüllt, das ebenfalls wieder abgesaugt wird. Durch diesen Schritt werden Ethanolreste und weitere hydrophile Verschmutzungen entfernt. Der Trog wird erneut mit Aqua dem. gefüllt. Die Mischung aus Phospholipid und SM4-Sulfatid bzw. sLe^X -TEG_{N2} in Chloroform wird in entsprechenden Mischungsverhältnissen mit einer Hamilton-Spritze aufgebracht. Folgende Lipidmischungen werden für die Bindungsuntersuchungen aufgetragen:

- DSPC (10 mM) mit 0,5 mol% oder 5 mol% SM4-Sulfatid bzw. sLe^X -TEG_{N2}
- POPC (10 mM) mit 0,5 mol% oder 5 mol% SM4-Sulfatid bzw. sLe^X -TEG_{N2}

Während der 30-minütigen Ruhephase orientieren sich die Phospholipide mit ihren polaren Kopfgruppen zur Wasserphase hin, während die Alkylketten sich zur Luftphase hin anordnen. Das Chloroform verdunstet während dieser Ruhephase und es kommt zu einer gleichförmigen Verteilung des Lipidfilms an der Wasser-Luft-Grenzfläche. Mithilfe einer verschiebbaren Barriere wird der Film komprimiert. Die Verfolgung der Lateraldruckänderung wird über einen frei hängenden Kraftaufnehmer gewährleistet, der die Lateraldruckänderung als Änderung der Oberflächenspannung detektiert. Diese Kraftänderung wird durch eine Elektronikeinheit verstärkt und über

ein Computersystem visualisiert. Wenn ein Lateraldruck von 38 mN/m erreicht ist, wird der Quarzsensoren in die Halterung eines Filmlifts eingehängt und senkrecht über der Wasser-Luft-Grenzfläche positioniert. Mit einer Geschwindigkeit von 5 mm/min wird der Sensor senkrecht durch die Lipidoberfläche in den Trog bewegt. Dabei gehen die Alkylketten auf der Quarzoberfläche hydrophobe Wechselwirkungen mit den Alkylketten der Phospholipide ein. Verstärkt durch den eingestellten Lateraldruck kommt es zur Ausbildung eines Bilayers auf der Quarzsensoroberfläche. Abbildung 3.4 verdeutlicht den Übertragungsvorgang schematisch.

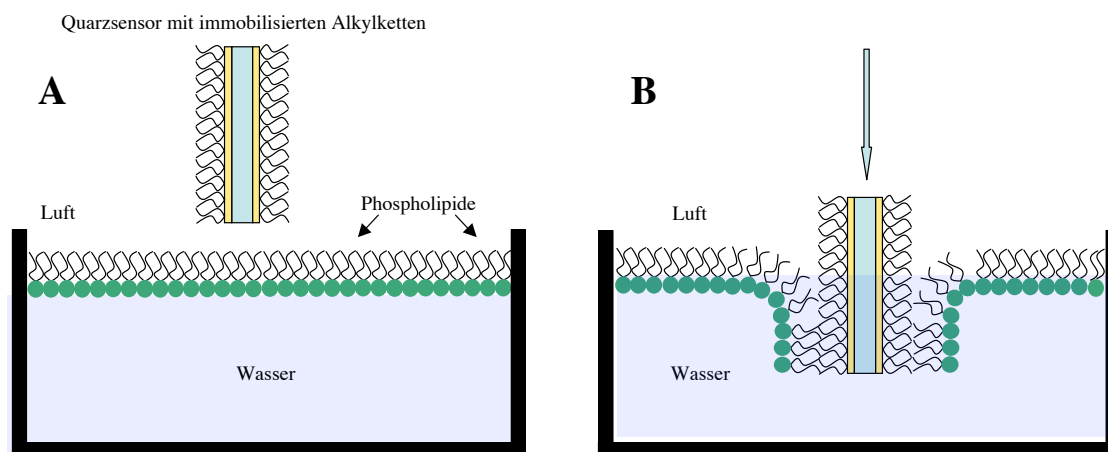


Abb. 3.4: Übertragung eines komprimierten Lipidfilms mithilfe eines Langmuir-Trogs auf einen Quarzsensoren mit vorimmobilisierten Alkylketten. **A:** Die Phospholipid-Sulfatid- bzw. sLex-TEG_{N2}-Mischung hat sich an der Wasser-Luft-Grenzfläche des Langmuir-Trogs entsprechend der Polaritäten der Moleküle angeordnet. **B:** Der vorbeschichtete Quarzsensoren wird senkrecht durch die komprimierte Phospholipidmischung bewegt. Dabei gehen die Alkylketten der Phospholipide hydrophobe Wechselwirkungen mit den Alkylketten des Quarzsensors ein. Man erhält ein Phospholipid-Bilayer auf der Quarzoberfläche.

Die Quarzsensoren werden unter Wasser in die Messkammern der Quarzmikrowaage eingebaut und wie unter 3.5.2 beschrieben mit der Quarzmikrowaage verbunden.

3.5.4 Durchführung der QCM-Experimente

Der grundsätzliche Aufbau der Quarzmikrowaage wurde in Kapitel 3.5 erläutert. Die Beschichtung und Funktionalisierung der Quarzsensoroberfläche wurde in den Kapiteln 3.5.2 und 3.5.3 aufgeführt.

Wenn die Messkammern über die Oszillatorensteckplätze mit der QCM verbunden sind und der Pufferfluss über die Zwölfwalzenpumpe eingeschaltet ist, beginnt die Einschwingphase der Quarzsensoren. In der 30-minütigen Einschwingphase stellt sich bei einer Anregungsfrequenz von 10 MHz eine konstante Resonanzfrequenz

von ca. 10 MHz ein. Über einen Dreiwegehahn werden die Analytlösungen in das System appliziert. Der Pufferfluss transportiert die Analyten zur Quarzoberfläche, wo Bindungsereignisse stattfinden und als Veränderung der Resonanzfrequenz detektiert werden. Im Anschluss an die Analytzugabe wird mit Puffer gespült.

3.6 Akustischer Oberflächenwellensensor (SAW)

S-sens[®] K5

Der in dieser Arbeit verwendete akustische Oberflächenwellensensor S-sens[®] K5 wird von der Biosensor GmbH in Bonn hergestellt. Die zentrale Messeinheit besteht aus einem kompakten Chip-Lesegerät, in das Quarzsensoren über eine spezielle Halterung sehr genau in einer Mikroflusszelle eingebaut werden können. Die Mikroflusszelle unterteilt die goldbeschichtete Quarzoberfläche in fünf Messkammern, durch die ein Pufferfluss mäanderförmig durchgeleitet wird. Durch eine spezielle elektronische Schaltung können Bindungsereignisse in jeder einzelnen Messkammer unabhängig voneinander und in Echtzeit detektiert werden.

Die Messeinheit wird durch ein Peltier-Element mit einer Genauigkeit von $\pm 0,001$ K temperiert. Der Pufferfluss über die Sensoroberfläche wird durch eine Gewinde-Kolbenpumpe gewährleistet. Diese Art der Pufferzuführung sorgt für konstante laminare Flussbedingungen. Die Probenzuführung wird durch einen handelsüblichen HPLC⁹-Autosampler gewährleistet. Die Abbildungen 3.5 und 3.6 zeigen Einzelkomponenten des S-sens[®] K5 und Abbildung 3.7 zeigt das gesamte Messsystem inklusive des Autosamplers.

Durch eine entsprechende elektronische Schaltung werden die Änderungen von Phase und Amplitude einer akustischen Oberflächenwelle (hier einer Love-Welle) detektiert, die sich innerhalb der Führungsschicht aus Siliziumdioxid bewegt. Während Phasenveränderungen von Masseauflagerungen auf der Oberfläche abhängen, können mithilfe der Amplitudenveränderungen viskoelastische Eigenschaften charakterisiert werden.

3.6.1 Charakterisierung und Reinigung der S-sens[®] K5-Quarzsensoren

Die Quarzsensoren des S-sens[®] K5-Biosensors werden unter Reinraumbedingungen durch die Biosensor GmbH in Bonn hergestellt. Das genaue Herstellungsprotokoll kann bei Schlenzog et al. [278] nachgelesen werden. In Kürze kann gesagt festgehalten

⁹engl. High Performance Liquid Chromatographie



Abb. 3.5: Messeinheit des S-sens[®] K5 mit Kolben-Gewindepumpe.

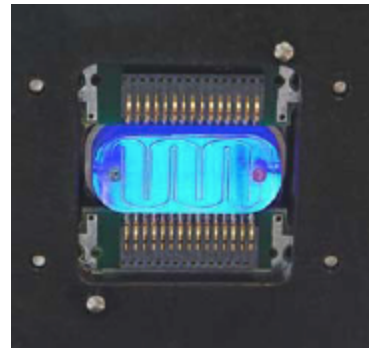


Abb. 3.6: Mikroflusszelle zum Einbau von Quarzsensoren mit mäanderförmiger Pufferflussführung und separater Kontaktierung der fünf Messkanäle.

werden, dass ein 500 μm dicker Quarzkristall durch ST-Schnitt erhalten wird. Bei dieser Schnittart werden Quarzscheiben in einem Winkel von $42,75^\circ$ zur optischen Achse geschnitten. Dabei erhält man Quarzscheiben, die eine Führungsschicht für die Ausbreitung der Love-Scherwelle mit einer Dicke von 5 μm direkt unterhalb der Quarzoberfläche enthält. Auf den Quarz werden im Wechsel Chrom-Gold-Chrom-Schichten aufgedampft, die Dicken von 120 Å , 3000 Å und 120 Å besitzen. Auch hier dient die Goldschicht zum einen der Immobilisation von Biomolekülen auf der Quarzoberfläche und zum anderen zur elektrischen Kontaktierung. Zur Erzeugung der Love-Scherwelle werden je 25 Paare der interdigitalen Transduktoren im so genannten „finger split design“ über Ionenstrahlätzung herausgearbeitet. Nach physikalischer Charakterisierung durch den Hersteller werden die Quarzscheiben auf eine Kantenlänge von 14 mm \cdot 19 mm zurecht geschnitten.

Durch Einbau des Sensorchips in die Mikroflusszelle des S-sens[®] K5 werden auf der Sensoroberfläche fünf Messkanäle ausgebildet, von denen jeder einzeln ausgelesen wird. Jeder Messkanal hat eine aktive Sensoroberfläche von 6 mm². Jede Messkammer hat ein Volumen von 4 μL . Die Detektionsgrenze wird vom Hersteller mit 0,8 pg/mm² angegeben. Vor jedem Versuch wird die Funktionalität der Quarzsensoren durch Aufnahme eines Schwingungsspektrums im Frequenzbereich von 142-154 MHz überprüft. Anhand dieses Spektrums kann die optimale Schwingfrequenz der Führungsschicht zur Ausbildung der Love-Scherwelle mithilfe des Computerprogramms Biosens K12 bestimmt werden.

Die Reinigung der Quarzsensoren erfolgt in einem mehrstufigen Prozess. Zuerst werden die Quarzsensoren in einer Lösung aus 1 mL Gigasept in 9 mL Aqua dem. im Ultraschallbad für 15 min inkubiert, um grobe Verschmutzungen und Zellreste



Abb. 3.7: S-sens[®] K5-Gesamtsystem mit Messeinheit, Pumpensystem und Autosampler

aus vorherigen Versuchen zu entfernen. Die Sensoren werden gründlich mit Aqua dem. und anschließend mit Ethanol 96% (V/V) gespült und unter synthetischer Luft getrocknet. Anschließend wird Piranha-Lösung auf die Goldoberfläche getropft und für 2 min inkubiert. Die Quarze werden mit Aqua dem. und Ethanol gespült und wiederum getrocknet. Dieser Vorgang wird zwei mal wiederholt.

3.6.2 Immobilisation von 11-Mercaptoundecansäure auf den S-sens[®] K5-Quarzsensoren

Die Immobilisation einer Schicht aus 11-Mercaptoundecansäure (MUA)¹⁰ auf der Goldoberfläche der Quarzsensoren erfolgt über das Self-Assembling von Thiogruppen an Gold, durch Inkubation in 10 mL Mercaptoundecansäure-Lösung über Nacht. Anschließend werden die Goldsensoren in 10 mL absolutiertem Ethanol für 5 min im Ultraschallbad sonifiziert. Derartig beschichtet können die Quarzsensoren über mehrere Wochen im Kühlschrank gelagert werden.

Die Beschichtung mit Carboxylgruppen-haltigen Molekülen erlaubt Proteine, sowie Kohlenhydratstrukturen in anschließenden Schritten zu immobilisieren.

¹⁰engl. Mercapto Undecanoic Acid

3.6.3 *In situ*-Immobilisation von Proteinen durch EDC/NHS

Der S-sens[®] K5-Biosensor bietet die Möglichkeit, Proteine oder andere Biomoleküle unmittelbar vor einem Bindungsexperiment zu immobilisieren und mithilfe der Software Biosens K12 in Echtzeit zu verfolgen.

Der mit MUA beschichtete Quarz (siehe Abschnitt 3.6.2) wird in den S-sens[®] K5-Biosensor eingebaut und mit entgastem Aqua dem. bei einer Flussrate von 40 $\mu\text{L}/\text{min}$ äquilibriert. Die einzelnen Reagenzien werden durch den Autosampler dispensiert und in einer vorgegebenen Reihenfolge über die Sensoroberfläche geschickt. Die Immobilisation wird mit Wasser als Fließmittel bei einer Flussrate von 40 $\mu\text{L}/\text{min}$ durchgeführt. Es erfolgt die Injektion einer 1:1-Mischung von 60 μL EDC-Lösung und 60 μL NHS-Lösung. Durch diese Mischung wird die Carboxylgruppe der MUA aktiviert (siehe Abb. 3.8). Anschließend werden nicht-immobilisierte EDC- und NHS-Moleküle 5 min lang durch Aqua dem. weggespült.

Es folgt die Injektion der Proteinlösung in Phosphatpuffer nach Sörensen (pH 7,4). Der Proteingehalt der injizierten Lösungen muss für jedes Protein individuell bestimmt werden. Für Proteine, deren Immobilisierungseigenschaften nicht bekannt sind, sollte eine Gesamtproteinmenge von 4 μg pro Injektion nicht unterschritten werden. Das Injektionsvolumen sollte nicht größer als 200 μL sein, um eine ausreichend hohe Proteinkonzentration in der Umgebung der aktivierten Carboxylgruppen zu gewährleisten. Folgende Protein-Massenkonzentrationen werden für die in dieser Arbeit immobilisierten Proteine verwendet:

- Natalizumab: 10 μg in 160 μL Phosphatpuffer nach Sörensen pH 7,4
- hVCAM-1-Fc-Chim.: 4 μg in 80 μL Phosphatpuffer nach Sörensen pH 7,4

Nach der eigentlichen Proteinimmobilisation wird noch einmal 5 min lang mit Aqua dem. gespült. Zur Absättigung von Carboxylgruppen, die keine Proteinbindung eingegangen sind, erfolgt eine Injektion einer Mischung aus 60 μL Ethanolaminlösung (pH 8,5) und 60 μL Ammoniumacetatpuffer. Es wird wiederum mit Aqua dem. 5 min lang gespült. Zur späteren Differenzierung von Phasenverschiebungen aufgrund von Masseauflagerungen von Phasenverschiebungen aufgrund von Viskoelastizitätseffekten werden 80 μL einer Glycerollösung (5% m/m) injiziert. Das erhaltene Phasensignal wird nur durch Viskositätsveränderungen hervorgerufen und entspricht dem Viskositätsanteil des Phasensignals bei der Immobilisation einer Proteinschicht. Mithilfe der Software Biosens K12 kann die Phasenverschiebung der Proteinimmobilisation um diesen Viskositätsanteil korrigiert werden. Nach erneutem Spülen kann ein Pufferwechsel durchgeführt werden. Die chemischen Reaktionen, die der Immobilisation zu Grunde liegen, sind in Abbildung 3.8 dargestellt.

3.6.4 Immobilisation von Membranvesikeln auf 1-Thio- β -D-Glucose

Zur Ausbildung hydrophiler Monolayer auf den S-sens[®] K5-Quarzsensoren werden diese in 1-Thio- β -D-Glucose-Lösung über Nacht eingelegt. Nach kurzem Spülen mit Ethanol 96% (V/V) und Trocknen unter Luftstrom werden die Quarzsensoren in den Sensor eingebaut und unter Pufferfluss äquilibriert.

Die Membranvesikel aus der jeweiligen Membranpräparation werden 1:1 mit PBS-Puffer verdünnt und 200 μ L dieser Verdünnung werden über den Autosampler injiziert. Die Immobilisation der proteinhaltigen Vesikel kann in Echtzeit verfolgt werden.

3.6.5 Durchführung von Bindungsexperimenten am SAW- Biosensor

Bindungsexperimente am SAW-Biosensor beruhen auf einem experimentellen Aufbau, der die Immobilisierung einer der beiden Bindungspartner auf der Oberfläche des Sensors vorsieht. Mögliche Immobilisierungstechniken verschiedenster Zielstrukturen wurden in den vorangegangenen Abschnitten ebenso ausführlich beschrieben wie der Einbau und die Konditionierung der S-sens[®] K5-Sensoren.

Der zweite Bindungspartner wird im Rahmen des Experiments in der mobilen Phase über die immobilisierte Schicht gespült. Kommt es zu Wechselwirkungen in Form nicht-kovalenter Bindungen zwischen Molekülen der mobilen Phase und der immobilisierten Oberfläche, können diese über das schon beschriebene Messprinzip detektiert werden. Die Auswahl der jeweiligen immobilisierten und mobilen Komponente für die einzelnen Experimente wird in Kapitel 4 ausführlich diskutiert. Werden Proteine in der mobilen Phase der Messung zugeführt, um später kinetische Bindungskonstanten aus den ermittelten Daten zu extrahieren, werden in einem ersten Experiment Proben mit einem Konzentrationsspektrum von 10^{-10} bis 10^{-3} M eingesetzt.

Aus den Ergebnissen des Experiments kann ein Konzentrationsbereich herausgefiltert werden, der eine ausreichende Bindung des Proteins, aber wenig unspezifische Bindung zeigt. Für diesen Bereich werden für ein neues Experiment Proben in Konzentrationsschritten von $2,5 \cdot 10^{-x}$ M erstellt und vermessen. Handelt es sich bei den Proteinen der mobilen Phase um Antikörper, ist es nicht erforderlich im ersten Experiment Proben mit Konzentrationen höher als 10^{-5} M einzusetzen, da für Antikörper-Antigen-Interaktionen niedrige Gleichgewichtsdissoziationskonstanten angenommen werden können. Die Verdünnung der Proteinproben erfolgt immer in dem Puffer, der auch später als Fließpuffer im SAW-Experiment verwendet wird, um Phasenverschiebungen aufgrund von Pufferwechseln zu vermeiden. Die Proben

werden in Glas-Mikroeinsätzen vorgelegt, die mithilfe einer Feder an das Septum des Probendeckels gedrückt werden. Durch die Verwendung solcher Einsätze ermöglicht man zum einen das Dispensieren im Bereich von 20 bis 200 μL und unterdrückt zum anderen bei niedrig konzentrierten Proben unspezifische Wechselwirkungen, die bei der Verwendung von Kunststoff-Reagiergefäßen auftreten. Die Probengefäße werden in den Autosampler eingestellt und mithilfe der Software SequenceMaster6 wird ein Injektionsregime für die Proben mit aufsteigenden Konzentrationen erstellt.

3.6.6 Durchführung von Inhibitionsexperimenten am SAW-Biosensor

In der vorliegenden Arbeit wird die Bindung von MV3-Melanomzellen an verschiedenen Zielstrukturen untersucht, wobei der Fokus auf der Inhibition solcher Wechselwirkungen mit verschiedenen Substanzen gelegt wird. Dazu werden Zellen über immobilisierte Zielstrukturen gespült, die eine Wechselwirkung mit MV3-Zellen erwarten lassen. Die Immobilisation solcher Strukturen wie VCAM-1 oder Natalizumab wird im Abschnitt 3.6.3 vorgestellt. Zur Durchführung des Experiments werden MV3 wie im Abschnitt 3.2.4 beschrieben kultiviert, vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und in 1 mL PBS+-Puffer resuspendiert. Anschließend erfolgt die Bestimmung der Zellzahl wie unter 3.2.3 beschrieben.

Durch Zugabe von 10 μL Mn^{2+} -Lösung zur Zellsuspension wird eine Mn^{2+} -Konzentration von 1 mM eingestellt, um VLA-4 auf der Oberfläche der MV3 zu aktivieren. Je nach Inhibitionsbedingungen werden 500 μg Heparin oder 5 μg Natalizumab zur Zellsuspension gegeben und die Mischung auf dem Vortexschüttler gerührt. Exakt 4 min nach dem Rühren wird die Sequenz zur Injektion von $1 \cdot 10^6$ Zellen am SAW-Biosensor gestartet. Dazu muss aus den Daten der Zellzahlbestimmung das Volumen der Zellsuspension errechnet werden, in dem sich genau $1 \cdot 10^6$ Zellen befinden. Bei einer Zellkulturflasche mit 75 cm^2 Bodenfläche, die zu 90% konfluent ist, handelt es sich dabei um ein Volumen zwischen 170 und 220 μL . Der hier beschriebene zeitliche Ablauf des Inhibitionsexperiments sollte exakt eingehalten werden, um die Reproduzierbarkeit der Inhibitionsdaten zu gewährleisten.

3.7 Herstellung Selektinligand-haltiger Liposomen

SM4-Sulfatid und sLex- TEG_{N2} -haltige Liposomen können mithilfe der Film-Hydratationsmethode hergestellt werden. Als Grundmatrix für die in dieser Arbeit verwendeten Liposomen dient das fluide Lipid POPC, da es sich verhältnismäßig leicht zu

Liposomen verarbeiten lässt. POPC-Liposomen mit folgenden Selektinligandanteilen werden für die Versuche hergestellt:

- POPC + 5 mol%/10 mol% SM4-Sulfatid
- POPC + 5 mol%/10 mol% sLe^X-TEG_{N2}

Zur Herstellung vom Liposomen mit einem Gesamtlipidgehalt von 1 μ mol werden die Chloroformlösungen aus POPC (10 mM) und SM4-Sulfatid (0,1 mM) bzw. sLe^X-TEG_{N2} (0,5 mM) in einem Rundkolben gemischt. Das Chloroform wird am Rotationsverdampfer bei 200 mbar Druck und einer Wasserbadtemperatur von 40 °C abdestilliert. Die Lipide bilden dabei einen klar erkennbaren Film an der Glaswand des Rundkolbens. Wenn sich kein Chloroform mehr sichtbar im Kolben befindet, wird für weitere 30 min bei maximalem Unterdruck weiterrotiert, um auch letzte Chloroformreste sicher zu entfernen. 1 mL sterilfiltrierter PBS wird zusammen mit 5 Glasperlen (\varnothing 2,50 mm) zum Lipidfilm gegeben. Durch vorsichtiges Schütteln des Kolbens mit der Hand und der zwischenzeitlichen Erwärmung auf 40 °C im Wasserbad für 10 min wird der Lipidfilm von der Kolbenwand gelöst. Durch weiteres Schütteln für 12 h auf dem Horizontalschüttler bei 150 U/min wird der Film hydratisiert, wobei sich spontan Liposomen verschiedener Größe bilden.

Am nächsten Tag wird die kolloidale Liposomenlösung fünfmal mit Überdruck durch eine Polycarbonatmembran mit 100 nm Porendurchmesser gepresst. Bei dieser Extrusion werden größere Liposomen in kleinere Vesikel aufgebrochen, die sich im Anschluss spontan wieder zu unilamellaren Liposomen zusammenlagern. Durch die Wiederholung der Extrusion erreicht man eine homogene Größenverteilung der Liposomen mit einer durchschnittlichen Größe von etwa 100 nm. Die Größenverteilung und der Polydispersitätsindex als Maß für die Güte der Größenverteilung werden über Photonenkorrelationsspektroskopie (Malvern Autosizer) bestimmt.

3.8 Immobilisation von Selektinligand-haltigen Membranen auf Glas und Charakterisierung mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie

Um Selektinligand-haltige Membranen auf Glas immobilisieren zu können, muss die Glasoberfläche in einem ersten Schritt hydrophobisiert werden. Dazu werden Glasplättchen mit einem Durchmesser von 18 mm und einer Dicke von 0,2 mm in Piranha-Lösung für 15 min im Ultraschallbad inkubiert. Die Piranha-Lösung wird abgossen und durch 100 mL Aqua dem. ersetzt. Die Glasplättchen werden

3.8 Immobilisation von Selektinligand-haltigen Membranen auf Glas und Charakterisierung mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie

geschwenkt und die Spüllösung verworfen. Dieser Vorgang wird zehnmal wiederholt. Es folgt eine weitere 15-minütige Inkubation der Glasplättchen im Ultraschallbad, wobei eine Mischung aus Wasserstoffperoxid (35%), Ammoniak (30%) und Wasser im Verhältnis 1:1:5 eingesetzt wird. Auch diese Lösung wird verworfen und die Glasplättchen werden 15 mal mit Aqua dem. wie oben beschrieben gespült, bevor sie im Trockenschrank bei 70 °C getrocknet werden.

Die Beschichtung der Glasplättchen mit einer ersten hydrophoben Schicht erfolgt in flüssigem Monochlordimethyloctadecylsilan für 10 min bei 70 °C. Die Glasplättchen werden dann mit heißem Chloroform und anschließend mit Aqua dem. gespült und unter Luftstrom getrocknet. In Kapitel 3.5.3 wird die Langmuir-Blodgett-Methode zur Übertragung von Lipidfilmen auf hydrophobe Oberflächen ausführlich beschrieben. Mit dieser Technik werden auch die im folgenden vorgestellten Lipidfilme auf die hydrophobisierten Glasplättchen übertragen.

Da die Modellmembranen anschließend mithilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops (LSM¹¹) charakterisiert werden sollen, wird neben den Matrixlipiden DSPC oder POPC und den Selektinliganden sLe^X-TEG_{N2} oder SM4 der Fluoreszenzfarbstoff DiO mit einem Gehalt von 1 mol% zusammen mit den anderen Lipiden auf die Wasseroberfläche des Langmuir-Trogs aufgebracht. Die hydrophobisierten Glasplättchen werden analog zu den Quarzsensoren senkrecht durch den komprimierten Lipidfilm gefahren. Die Filmwaage ist in dieser Zeit mit Aluminiumfolie abzdunkeln, um ein vorzeitiges Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffs DiO zu verhindern. Derartig übertragene Modellmembranen müssen unmittelbar nach ihrer Fertigstellung der mikroskopischen Betrachtung zugeführt werden, um ein Trocknen und Reißen der Lipidfilme zu verhindern.

Das verwendete konfokale Laser-Scanning-Mikroskop verwendet, wie die konventionelle Fluoreszenzmikroskopie, eine Linse sowohl als Objektiv als auch als Kondensor. Dadurch entfällt der exakte Abgleich zweier Linsen. Neben dem Laser-Scanning-Modus kann das Mikroskop wie ein Fluoreszenzmikroskop arbeiten. Dabei wird die Betrachtungsebene des zu untersuchende Lipidfilms mithilfe von Grob- und Feintrieb anhand der Helligkeitsintensitäten eingestellt. Anschließend wird die Probe mit Laserlicht abgetastet. Dabei tritt das verwendete Laserlicht durch eine Lochblende und eine Apertur und wird auf einen Strahlenteiler (dichroitischen Spiegel) fokussiert, den es passiert. Es trifft von hinten auf das Objektiv und wird durch dieses auf einen bestimmten Punkt der Probe gestrahlt. Das Laserlicht regt den Farbstoff in der Probe zur Fluoreszenz an (hier DiO, Anregungswellenlänge 487 nm, Emissionswellenlänge 501 nm). Das emittierte Licht wird durch die selbe Linse zurückgeleitet. Da es den

¹¹engl. confocal Laser Scanning Microscope

Strahlenteiler nicht durchdringen kann, sondern von diesem reflektiert wird, trifft es auf eine zweite Linse, die es auf ein Pinhole und den dahinter liegenden Detektor leitet. Die Lochblende hält die optischen Informationen zurück, die nicht aus der Fokalebene der Probe stammen. Da nur Informationen innerhalb des Fokus des Laserlichtes auf der Probe detektiert werden, muss die Probe in allen drei Raumrichtungen abgetastet werden, um einen ausreichend großen Bildausschnitt zu erhalten. Dies erfolgt über die Bewegung des Objektisches. Durch die anschließende Digitalisierung der Lichtinformationen durch einen angeschlossenen Rechner erhält man aus den Einzelpunktinformationen eine dreidimensionale Abbildung der Probe.

3.8 Immobilisation von Selektinligand-haltigen Membranen auf Glas und
Charakterisierung mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie

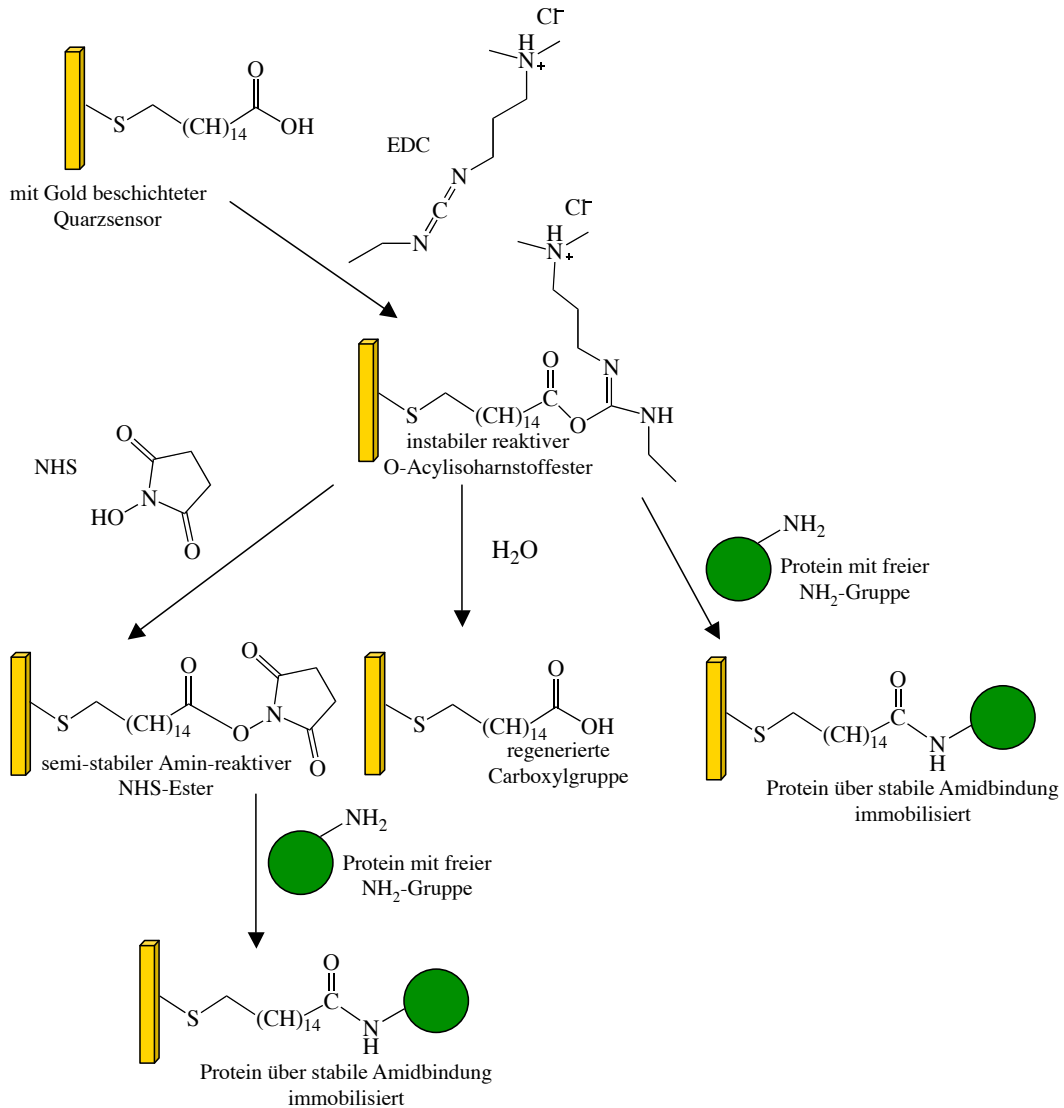


Abb. 3.8: Reaktionsmechanismus der Immobilisation von Proteinen über EDC und NHS. Der Hydroxylsauerstoff der Carbonsäurefunktion immobilisierter Mercapto- undecansäure bindet nach nukleophilem Angriff an das Kohlenstoffatom der Carbodiimid-Funktion, wodurch ein instabiler reaktiver *O*-Acylharnstoffester gebildet wird. Dieser *O*-Acylharnstoffester kann sich durch Regeneration der Carbonsäurefunktion, Ausbildung einer stabilen Amidfunktion durch Bindung einer freien Aminfunktion eines Proteins oder durch Reaktion mit NHS zu einem semi-stabilen Amin-reaktiven NHS-Ester stabilisieren. Dieser NHS-Ester kann durch Reaktion mit der freien Aminfunktion eines Proteins zu dessen Immobilisierung über eine Amidbindung führen.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Biosensor-Charakterisierung der Heparin-Selektin-Wechselwirkung

4.1.1 Optimierung der Immobilisierung von hP-Selektin-Fc-Chimären

In den folgenden Untersuchungen wurde die Wechselwirkung von Heparin mit Selektinen isoliert mithilfe eines akustischen Biosensors charakterisiert. Die Bestimmung von Bindungskinetiken derartiger Interaktionen sollte dabei zu einem größeren Verständnis der Heparinwirkung im Rahmen der hämatogenen Tumorzellmetastasierung führen. Bei der Untersuchung der Wechselwirkung von Heparin mit Selektinen mittels eines Biosensors muss ein Bindungspartner immobilisiert vorliegen, während der andere von der mobilen Phase aus mit ihm in Wechselwirkung tritt. Während die Immobilisierung von Kohlenhydratstrukturen anspruchsvoll ist, gibt es verschiedene etablierte Möglichkeiten, Proteine kovalent auf Goldoberflächen zu fixieren. Für die folgenden Experimente wurde die Immobilisierung von hP-Sel-Fc-Chim. mithilfe von Cyanurchlorid gewählt (siehe Kapitel 3.5.2).

Die zu immobilisierende Proteinmenge musste dabei für jedes Messsystem individuell bestimmt werden. Die Chimären wurden in unterschiedlichen Massenkonzentrationen von 0,1-5 $\mu\text{g}/40 \mu\text{L}$ immobilisiert. Das Volumen wurde so gewählt, um eine vollständige Bedeckung der funktionalisierten Goldoberfläche zu gewährleisten. Zur Überprüfung der Immobilisierung wurde die Bindung von $4 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ Fucoidan als Frequenzänderung detektiert. Von Fucoidan ist die Selektin-Bindungsfähigkeit beschrieben [172]. Die Ergebnisse der Bindungsuntersuchung sind in Abbildung 4.1 dargestellt.

Es soll an dieser Stelle erwähnt werden, dass die eingesetzte Massenkonzentration mit der tatsächlich immobilisierten Proteinmenge nicht gleich zu setzen ist. Theoretisch kann die immobilisierte Proteinmenge durch Frequenzbestimmung vor und nach der Immobilisierung und Einsetzen der detektierten Frequenzänderung in die Sauerbrey-Gleichung bestimmt werden. Diese Methode war für den in dieser Arbeit

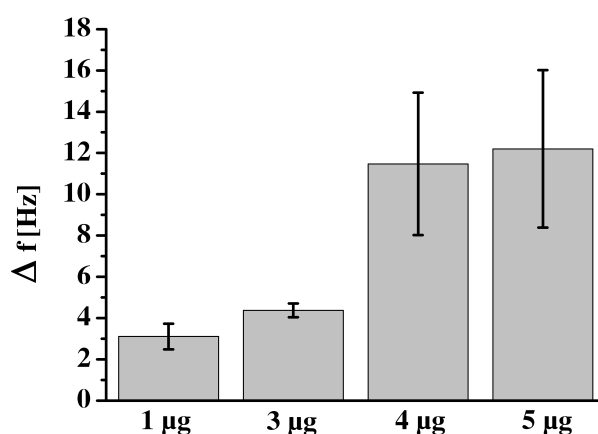


Abb. 4.1: Optimierung der Biosensor-Funktionalisierung. Absolute Frequenzänderungen, hervorgerufen durch die Bindung von $4 \cdot 10^{-6}$ M Fucoidan in PBS+ an unterschiedlichen Mengen von hP-Sel-Fc-Chim. Die Erhöhung der Massenkonzentration von $4 \mu\text{g}/40 \mu\text{L}$ auf $5 \mu\text{g}/40 \mu\text{L}$ führt nicht zu einer signifikant höheren Frequenzänderung, so dass $4 \mu\text{g}/40 \mu\text{L}$ als Massenkonzentration bei der Immobilisierung von hP-Sel-Fc-Chim. für alle weiteren Experimente Verwendung fand.

eingesetzten QCM-Sensor nicht praktikabel, da die Grundfrequenz des Schwingquarzes sehr vom manuellen Einbau abhängt und von Versuch zu Versuch variiert. Deshalb kam hier eine indirekte Methode zum Einsatz, die die Proteinmenge über ihre Ligand-Bindungs-fähigkeit zwar nicht quantitativ determinierte, aber zu optimalen Versuchsbedingungen führte. Für die Immobilisierung von verschiedenen Proteinen auf SPR-Sensoren sind ebenfalls Massenkonzentrationen zwischen $1\text{-}100 \mu\text{g}/\text{mL}$ für die Ausgangsproteinlösung beschrieben [279].

Als weiterer Optimierungsversuch sei an dieser Stelle die Ko-Immobilisation von hP-Sel-Fc-Chim. mit einer BSA-Lösung (4%) genannt. Alternativ wurden die Quarzsensoren mit der gleichen BSA-Lösung nach erfolgter Immobilisation von Selektin inkubiert. Die BSA-Immobilisation brachte im QCM-Assay keine Vorteile. Da Fucoidan aber eine hohe Affinität zu reinen BSA-Schichten auf dem Quarzsensor aufwies, wurde von der Ko-Immobilisation abgesehen. Die Anwendung einer BSA-Lösung nach erfolgter Selektin-Immobilisation wurde untersucht, um die mögliche Absättigung nicht besetzter Bindungsstellen am reaktiven Verbindungsstück Cyanurchlorid zu erreichen (siehe Abbildung 3.3). Durch Bindungsstudien mit Fucoidan konnte gezeigt werden, dass eine derartige Absättigung nicht stattfand, da keine Frequenzunterschiede zwischen Quarzen mit und ohne BSA-Absättigung festgestellt werden konnten. Cyanurchlorid ist äußerst hydrolyseempfindlich. Nach der zweistündigen Inkubation mit der Lösung aus hP-Sel-Fc-Chim. in PBS+ waren alle Cyanurchlorid-Moleküle hydrolysiert. Im Gegensatz dazu ist für Zellrollassays die Mischung aus Selektin-

Fc-Chimären und BSA essentiell, um ein Zellrollen und keine feste Adhäsion von Selektinligand-exprimierenden Zellen zu erreichen.

4.1.2 Überprüfung der Immobilisation und Funktionalität der hP-Selektin-Fc-Chimären

Fucoidan kam bei der Optimierung der Proteinmenge zum Einsatz, da seine Selektin-Bindungs-fähigkeit bekannt ist und es in größeren Mengen günstig zugänglich ist. Die Fucoidan-Bindungsstelle im Selektin ist noch nicht genau charakterisiert. Für die nachfolgenden Experimente war es daher wichtig, die Anwesenheit des Selektins mit einem anderen Bindungspartner zu verifizieren und die Funktionalität des Selektins zu überprüfen. Mithilfe eines anti-hP-Sel-mAb konnte die Anwesenheit der hP-Sel-Fc-Chim. auf der Sensoroberfläche überprüft werden. Die Detektion der Bindung von rPSGL-1 an hP-Sel-Fc-Chim. zeigte darüber hinaus, dass die Lektindomäne bei ausreichend vielen Molekülen auf der Sensoroberfläche intakt vorlag. Neben der bloßen Detektion der Bindung konnten für die beschriebenen Wechselwirkungen auch kinetische Bindungskonstanten abgeleitet werden (siehe Tabelle 4.1).

Die Bindung des anti-P-Sel-mAb an hP-Selektin konnte in dieser Arbeit erstmals mithilfe eines akustischen Biosensors bestimmt werden. Die erhaltenen Bindungskonstanten liegen in dem Bereich, den man für die Bindung eines Antikörpers an sein Antigen erwarten würde.

Beim Vergleich der kinetischen Bindungskonstanten von rPSGL-1 mit PSGL-1, das von humanen Neutrophilen isoliert wurde, fällt auf, dass rPSGL-1 eine etwas größere Gleichgewichtsdissoziationskonstante als isoliertes PSGL-1 aufweist (559 nM vs. 200 nM, vgl. Tabelle 2.1). Unterschiede im Bindungsverhalten werden vor allem bei der Betrachtung von Assoziationskonstante und Dissoziationskonstante deutlich. Mit $2,62 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ hat rPSGL-1 eine etwa 270fach kleinere Assoziationskonstante als isoliertes PSGL-1 mit einer berechneten Assoziationskonstanten von $7,00 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Die Dissoziationskonstante ist bei rPSGL-1 etwa 100fach kleiner ($1,2 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ vs. $1,5 \text{ s}^{-1}$). Es verbleibt nach Bindung also hundert mal länger am Rezeptor. rPSGL-1 liegt als Monomer vor, während natives PSGL-1 ein Dimer darstellt. Die Präsentation von weniger sLe^X-Motiven im Monomer könnte ein Grund für die geringere Affinität und die kleinere Assoziationskonstante sein, erklärt aber nicht die Umkehrung der Verhältnisse für die Dissoziationskonstante. Für andere monomere PSGL-1-Variationen sind kinetische Daten beschrieben, die denen des isolierten PSGL-1 nahezu entsprechen ($K_D = 320 \text{ nM}$, $k_{Ass} = 4,4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{Diss} = 1,4 \text{ s}^{-1}$, [28]). In der Literatur zeigt sich allerdings, dass die kinetischen Daten für verschiedene PSGL-1-Variationen erhebliche Unterschiede auch in den kinetischen Bindungskonstanten aufweisen können. Tabelle

2.1 ist zu entnehmen, dass PSGL-1-Ig-Chimären in AFM-Experimenten kinetische Bindungskonstanten zeigten, bei denen die Gleichgewichtsdissoziationskonstante um den Faktor 3-5 von isoliertem bzw. monomeren PSGL-1 abwich, während vor allem die Dissoziationskonstante mit $k_{Diss} = 3 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ um den Faktor 100 kleiner war als die Dissoziationskonstante für PSGL-1. Die unterschiedliche Expression der verschiedenen PSGL-1-Variationen, vor allem die posttranslationale Glykosylierung sind als mögliche Gründe für Affinitätsunterschiede zu nennen. Als weiterer Faktor kommt der unterschiedliche Versuchsaufbau zur Detektion hinzu. In verschiedenen Experimenten wurde PSGL-1 immobilisiert, in anderen, wie im hier beschriebenen, P-Selektin. Als letzter Faktor ist zu beachten, dass AFM-Experimente Phänomene wie das „catch-slip bond behavior“ erfassen, da auf die Bindung eine mechanische Kraft wirkt, während selbst unter Flussbedingungen in SPR- oder QCM-Experimenten vor allem Gleichgewichtszustände das Eingehen oder das Lösen von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen bestimmen. Für den Fortgang dieser Arbeit bleibt festzuhalten, dass die erstmalige Bindungsstudie von rPSGL-1 an immobilisierten hP-Sel-Fc-Chim. die Funktionalität der Selektine belegt. Die erhaltenen kinetischen Daten können als weiterer Baustein angesehen werden, um Bindungsaffinitäten verschiedener PSGL-1-Variationen zu beschreiben.

Tab. 4.1: Kinetische Bindungskonstanten zur Bindung von rPSGL-1 und anti-P-Sel mAb an immobilisierten hP-Selektin-Fc-Chimären

	K_D [M]	k_{Ass} [$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]	k_{Diss} [s^{-1}]
anti-P-Sel-mAb	$1,98 \cdot 10^{-10}$ $\pm 0,01 \cdot 10^{-10}$	$2,02 \cdot 10^5$ $\pm 0,02 \cdot 10^5$	$4,00 \cdot 10^{-5}$ $\pm 0,05 \cdot 10^{-5}$
rPSGL-1	$5,59 \cdot 10^{-7}$ $\pm 0,11 \cdot 10^{-7}$	$2,61 \cdot 10^4$ $\pm 0,17 \cdot 10^4$	$1,20 \cdot 10^{-2}$ $\pm 0,24 \cdot 10^{-2}$

4.1.3 Detektion und kinetische Betrachtung der Bindung von UFH an hP-Selektin-Fc-Chimären

Nachdem die Funktionalität immobilisierter hP-Sel-Fc-Chim. auf QCM-Sensoren nachgewiesen wurde, konnte die Bindung zwischen verschiedenen UFH an P-Selektin untersucht werden. Zur Bestimmung kinetischer Bindungskonstanten war es erforderlich, die Konzentrationen der Analytlösung zu kennen und in das mathematische Modell einzubeziehen. Da unfractioniertes Heparin eine Mischung verschiedenster Molekülgrößen darstellt, konnte nur eine mittlere Konzentration ermittelt werden.

UFH werden in internationalen Einheiten dosiert. Für jede Heparincharge wird die *in vitro*-Wirksamkeit an Faktor IIa (Thrombin) und Faktor Xa individuell bestimmt. Die Hersteller von zwei der hier verwendeten UFH, Roche und Ratiopharm, waren so freundlich, die Ergebnisse ihrer Aktivitätsbestimmungen für diese Arbeit zur Verfügung zu stellen. Entsprechend ihrer Analysenzertifikate ergaben sich folgende Konzentrationen für Liquemin N und Heparin Ratiopharm:

- Liquemin N: 10 497 I.E./mL (\cong 105,0 % der deklarierten Konzentration)
- Heparin Ratiopharm: 24 075 I.E./mL (\cong 96,3 % der deklarierten Konzentration)

Für das dritte verwendete UFH Calciparin konnten keine Anlysendaten vom Hersteller erhalten werden, so dass die angegebene Konzentration von 25 000 I.E./mL in die Rechnungen Eingang fand. Die mittlere molare Masse wurde für alle drei UFH mit 15 kD angenommen.

Zur Evaluierung optimaler Konzentrationen für die Bindungsuntersuchungen wurden Versuchsreihen mit UFH-Konzentrationen zwischen $1,28 \cdot 10^{-6}$ M und $1,28 \cdot 10^{-5}$ M zur Bindung an P-Selektin eingesetzt. Für kleinere Konzentrationen als $1,28 \cdot 10^{-6}$ M waren die erhaltenen Frequenzänderungen zu klein, als dass kinetische Bindungskonstanten über nicht-lineare Kurvenregression hätten bestimmt werden können. Für Konzentrationen größer als $1,28 \cdot 10^{-5}$ M ergaben sich gleiche Werte für k_{Diss} , während k_{Ass} mit höher werdenden Konzentrationen kleiner wurde. Dieses Phänomen deutet darauf hin, dass eine Konzentrationserhöhung ab einer bestimmten Konzentrationsschwelle keine Auswirkung auf die Assoziationsgeschwindigkeit hat. Da ein Konzentrationsanstieg aber in Gleichung 2.12 berücksichtigt wird, verringert sich der resultierende Wert für k_{Ass} . Aus diesem Grund wurde die Konzentration von $2,56 \cdot 10^{-6}$ M für alle weiteren UFH-Experimente verwendet.

Die in Kapitel 2.5.4 vorgestellten Methoden zur Bestimmung kinetischer Bindungskonstanten aus einem QCM-Experiment gelten streng genommen nur für Modelle mit einer Kinetik erster Ordnung. Da eine Komponente (Heparin) ständig über den Pufferfluss nachgeliefert wird, kann ihre Konzentration als konstant angesehen werden. Die kinetischen Eigenschaften werden im Modell von der Konzentration des Selektin-Heparin-Komplex bestimmt. Ob die Bindung zweier Komponenten einem solchen Modell zugeordnet werden kann, ist mit einer Methode nach Minunni et al. bestimmbar [280]. Aus den Frequenzveränderungen eines Bindungsexperimentes wurde $\frac{df}{dt}$ gegen df aufgetragen. Dabei wurden für verschiedene Konzentrationen Geraden erhalten, so dass man von einer Kinetik pseudoerster Ordnung ausgehen kann.

Abbildung 4.2 zeigt einen Frequenzverlauf für das Bindungsexperiment von Liquemin N an hP-Sel-Fc-Chim. mit den Ergebnissen der nicht-linearen Kurvenregression

zur Bestimmung von k_{Ass} und k_{Diss} . Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D errechnet sich nach Gleichung 2.13.

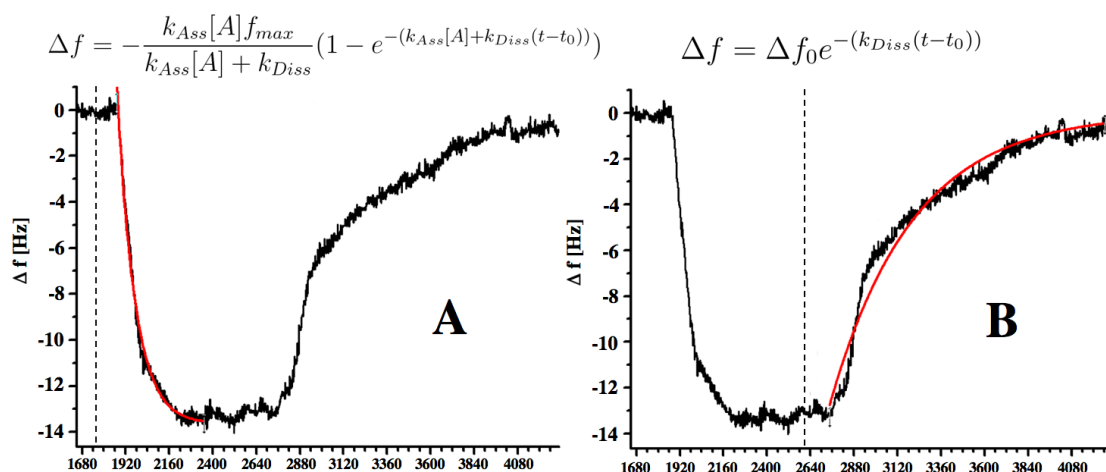


Abb. 4.2: Beispielhafter Kurvenverlauf der Bindung von Liquemin N an hP-Selektin-Fc-Chim. **A:** Durch nicht-lineare Kurvenregression konnte aus dem absteigenden Ast der Frequenzverlaufskurve (rot unterlegt) die Assoziationskonstante k_{Ass} mit der angegebenen Gleichung bestimmt werden (siehe auch Gleichung 2.12 in Kapitel 2.5.4). Die gestrichelte Linie markiert den Zeitpunkt des Beginns der Heparinzugabe. **B:** Die gestrichelte Linie markiert hier den Zeitpunkt des Endes der Heparinzugabe. Beim nachfolgenden Spülen mit PBS+ dissoziieren Heparinmoleküle von P-Selektin. Aus dem daraus resultierenden Frequenzanstieg konnte mithilfe nicht-linearer Kurvenregression (rot unterlegt) unter Anwendung der angegebenen Gleichung die Dissoziationskonstante k_{Diss} bestimmt werden (siehe auch Gleichung 2.11 in Kapitel 2.5.4).

Die Ergebnisse für die Bestimmung der kinetischen Bindungskonstanten von Calciparin, Liquemin N und Heparin Ratiopharm sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst.

Tab. 4.2: Kinetische Bindungskonstanten zur Bindung von Calciparin, Liquemin N und Heparin Ratiopharm an immobilisierten hP-Selektin-Fc-Chimären.

	K_D [M]	k_{Ass} [$M^{-1}s^{-1}$]	k_{Diss} [s^{-1}]
Calciparin	$1,21 \cdot 10^{-6}$ $\pm 0,14 \cdot 10^{-6}$	$1,91 \cdot 10^3$ $\pm 0,34 \cdot 10^3$	$2,27 \cdot 10^{-3}$ $\pm 0,17 \cdot 10^{-3}$
Liquemin N	$0,61 \cdot 10^{-6}$ $\pm 0,13 \cdot 10^{-6}$	$3,27 \cdot 10^3$ $\pm 0,56 \cdot 10^3$	$1,96 \cdot 10^{-3}$ $\pm 0,16 \cdot 10^{-3}$
Heparin Ratiopharm	$0,59 \cdot 10^{-6}$ $\pm 0,26 \cdot 10^{-6}$	$2,31 \cdot 10^3$ $\pm 0,74 \cdot 10^3$	$1,23 \cdot 10^{-3}$ $\pm 0,27 \cdot 10^{-3}$

Die erhaltenen K_D -Werte von $1,21 \cdot 10^{-6}$ M bis $0,59 \cdot 10^{-6}$ M verdeutlichen die Fähigkeit von UFH, P-Selektin mit hoher Affinität zu binden. Gleichzeitig zeigt

sich, dass die verschiedenen Heparinpräparationen Unterschiede in ihrem Bindungsverhalten aufweisen. Calciparin besitzt sowohl eine kleinere Assoziationskonstante als auch eine größere Dissoziationskonstante als die beiden anderen UFH. Heparin Ratiopharm ist das UFH mit der stärksten Affinität zu hP-Sel-Fc-Chim. Dabei wird die höhere Affinität vor allem durch die langsamere Dissoziation vom Rezeptor begründet, während die Assoziationskonstante sogar kleiner ist als die des Lique-min N. Der Vergleich mit den Bindungsdaten von rPSGL-1 und anti-P-Sel-mAb zeigt, dass die verschiedenen UFH zwar eine geringere Affinität zu P-Selektin besitzen als der spezifische Antikörper, dass sie aber eine vergleichbare Affinität wie rPSGL-1 aufweisen. Bindungsdaten anderer PSGL-1-Variationen in der Literatur zeigen darüber hinaus, dass vor allem die Dissoziation der UFH von P-Selektin etwa 1000fach langsamer ist als die Dissoziation von PSGL-1, das von Neutrophilen isoliert wurde (vgl. Heparin Ratiopharm: $k_{Dis} = 1,23 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ vs. PSGL-1 von Neutrophilen $k_{Dis} = 1,4 \text{ s}^{-1}$). Übertragen auf die physiologische Situation bleibt festzuhalten, dass in die Blutbahn injiziertes Heparin P-Selektin weniger schnell zu binden vermag als natives PSGL-1. Hat Heparin aber einmal gebunden, ist der Rezeptor für längere Zeit blockiert, so dass PSGL-1 nicht mit Selektin interagieren kann. Für die hämatogene Metastasierung ist vorstellbar, dass die Mobilität der beteiligten Bindungspartner der Heparinwirkung entgegen kommt. Ist zum Beispiel thrombozytäres P-Selektin durch Heparin blockiert, können tumorzellständige Selektinliganden nicht sofort nach Eintritt in die Blutbahn an diese binden. Der Zeitpunkt der Wechselwirkung ist aber für das Überleben der Tumorzellen während der Passage im Blutsystem enorm wichtig, da sonst sowohl Scherkräfte als auch Bestandteile des Immunsystems den Tumorzellen schaden können. Die Bindungsdaten des Heparins korrelieren mit Erkenntnissen aus Mausexperimenten, wie sie in Kapitel 2.2.3 beschrieben wurden. Demnach führt die einmalige Gabe von Heparin 30 min vor Tumorzellinjektion zu einer Reduzierung der Lungenmetastasen. Auch sechs Wochen nach Tumorzellinjektion zeigten die Heparin-behandelten Mäuse keine metastatischen Veränderungen. Gleichzeitig konnte aber mit Calcein-AM-markierten Thrombozyten gezeigt werden, dass Heparin die Adhäsion von Thrombozyten an Tumorzellen für fünf Stunden effektiv zu unterbinden vermochte [171]. Die langsame Dissoziationskonstante des Heparins von P-Selektin könnte den Zeitraum der Adhäsionsblockade von Thrombozyten an Tumorzellen erklären. Der Prozess der hämatogenen Metastasierung ist also nicht nur hoch reguliert, sondern auch hoch empfindlich gegenüber Störungen im Ablauf der metastatischen Kaskade. Die Bindung von Heparin an P-Selektin ist demnach eine sehr effektive Störung dieses Ablaufs.

In der Literatur gibt es nur eine weitere Arbeit bei der die Affinität von Heparin an P-Selektin bestimmt wurde. Wang und Mitarbeiter nutzten hierfür eine SPR-Methode. Dabei wurden die Bindungskonstanten aus Tabelle 4.3 gefunden [181]. Es zeigt sich, dass bei dieser Bestimmung die Gleichgewichtsdissoziationskonstante eine halbe Zehnerpotenz kleiner war als die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen. Die leicht höhere Affinität liegt vor allem in der 10fach schnelleren Assoziationskonstanten begründet. Die Dissoziationskonstante liegt in einem sehr ähnlichen Bereich wie die Werte aus Tabelle 4.2. Verschiedene Gründe können für die beschriebenen Unterschiede verantwortlich sein. Beim Vergleich von Liquemin N, Heparin Ratiopharm und Calciparin zeigen sich produktspezifische Unterschiede, so dass ein direkter Vergleich mit einem weiteren Heparin nur bedingt möglich ist. Das in der Arbeit von Wang et al. eingesetzte Heparin war keine therapeutische Zubereitung, sondern eine derivatisierte Form, die dann auf der Goldoberfläche des SPR-Sensorchips immobilisiert wurde. In der veränderten Immobilisierungsstrategie ist der Hauptgrund für die Unterschiede in den Assoziationskonstanten zu suchen. Durch die Immobilisation von Heparin wird die Möglichkeit geschaffen, dass P-Selektin vielfältige Bindungsmöglichkeiten vorfindet, da das Bindungsmotiv in polymerer Form vorliegt. Umgekehrt muss Heparin im QCM-Experiment die Bindungsstelle im immobilisierten P-Selektin genau vorfinden. Diese These wird dadurch erhärtet, dass die Dissoziationskonstanten nahezu identisch sind. Sind P-Selektin und Heparin demnach eine Bindung eingegangen, spielen Faktoren wie Orientierung der Immobilisation und Präsentation von Bindungsstellen keine Rolle mehr. Der Dissoziationsprozess verläuft in beiden experimentellen Ansätzen gleich. Trotz der beschriebenen Unterschiede bleibt festzuhalten, dass der Vergleich der kinetischen Parameter, wie sie mithilfe der QCM bestimmt wurden, mit Daten aus SPR-Experimenten zu vergleichbaren Ergebnissen führt und als weiterer Indikator für die Anwendbarkeit des QCM-Systems anzusehen ist.

Tab. 4.3: Kinetische Bindungskonstanten zur Bindung von P-Selektin an immobilisiertem Heparin mittels SPR nach Wang et al. [181]. *: Da die Assoziationskonstante k_{Ass} aus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D und der Dissoziationskonstanten k_{Diss} errechnet wurde, kann keine Standardabweichung angegeben werden.

	K_D [M]	k_{Ass} [M ⁻¹ s ⁻¹]	k_{Diss} [s ⁻¹]
Heparin	$1,15 \cdot 10^{-7}$ $\pm 0,06 \cdot 10^{-7}$	$2,74 \cdot 10^4$ *	$3,15 \cdot 10^{-3}$ $\pm 0,34 \cdot 10^{-3}$

Ein Vergleich der kinetischen Daten der UFH mit Bindungsdaten der Bimosiamose (TBC1269), dem derzeit einzigen Selektininhibitor der klinischen Phase IIa,

zeigt, dass alle UFH P-Selektin mit 100-500fach höherer Affinität binden (vgl. Bimosiamose: $K_D = 114 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, $k_{Ass} = 2,7 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{Dis} = 3 \text{ s}^{-1}$, [108]). Obwohl Bimosiamose eine 10fach höhere Assoziationskonstante besitzt, sorgt die mehr als 1000fach schnellere Dissoziation für die geringere Affinität. Bimosiamose besitzt damit die affinitätsmäßigen Eigenschaften anderer sLe^X-Derivate, die als Selektininhibitor charakterisiert wurden. Die klinischen Studien mit Bimosiamose untersuchen seine Wirksamkeit bei chronisch entzündlichen Erkrankungen wie Psoriasis und Asthma. Eine Wirksamkeit zur Reduzierung der Metastasierung wurde bisher noch nicht untersucht.

Mithilfe der hier erhobenen kinetischen Daten kann über die bisher beschriebenen Feststellungen hinaus gezeigt werden, dass die Bindungsdaten verschiedener UFH an P-Selektin nicht mit den antikoagulatorischen Eigenschaften der UFH korrelieren. Durch die Bestimmung der APTT¹- und der Thrombin-Zeit für Heparin Ratiopharm und Liquemin N, die dankenswerter Weise im Labor von Frau Prof. Dr. Alban, Christian-Albrechts Universität Kiel, durchgeführt wurden, konnte gezeigt werden, dass bei den beiden genannten UFH-Zubereitungen sich Antikoagulationsverhalten und P-Selektin-Bindungsfähigkeit gegenläufig verhalten. Während Heparin Ratiopharm eine stärkere Affinität und eine langsamere k_{Dis} bei der Bindung an P-Selektin aufweist als Liquemin N, zeigt letzteres leicht bessere antikoagulatorische Eigenschaften als das Ratiopharm-Präparat. Der hier verwendete Test findet auch in der Detektion von Verunreinigungen in Heparinzubereitungen Anwendung und ist ausführlich bei Alban und Lühn beschrieben [281]. Diese Erkenntnisse decken sich mit anderen Arbeiten, die zeigen konnten, dass durch chemische Modifikation Heparine erhalten werden können, bei denen Selektinbindungsfähigkeit und antikoagulatorische Aktivität voneinander getrennt werden können [179, 180].

Der Einfluss weiterer affinitätsbestimmender Faktoren wie Zugkräfte oder „catch-slip bond behavior“ kann mit dem QCM-Assay nicht näher untersucht werden. Heparin liegt in gelöster Form vor. Kräfte, wie sie natürliche zelluläre Liganden auf die Selektinbindung ausüben können, herrschen nicht vor. Für die physiologische Situation ist ebenfalls nicht mit einem Einfluss dieser Parameter zu rechnen, da auch hier Heparin aus einer Lösung heraus mit Selektinen in Wechselwirkung tritt.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass alle drei verwendeten UFH hP-Sel-Fc-Chim. mit Affinitäten im mikromolaren bis hohen nanomolaren Bereich binden können und dass die Affinität weniger durch eine schnelle Assoziationskonstante erreicht wird als vielmehr durch eine ausgeprägt langsame Dissoziationskonstante. Verschiedene UFH-Varianten unterscheiden sich dabei untereinander in Bezug auf

¹engl. Activated Partial Thromboplastin Time

die Bindungskonstanten. Für zwei der hier verwendeten UFH konnte gezeigt werden, dass antikoagulatorische Eigenschaften und P-Selektin-Bindungsfähigkeit nicht abhängig voneinander sind. Die Daten unterstreichen die Fähigkeit von UFH, die P-Selektin-vermittelte Wechselwirkung verschiedener Zellen mit Thrombozyten und Endothelzellen zu inhibieren.

4.1.4 Übertragung des Messsystems auf hL-Selektin-Fc-Chimären

Neben der Wechselwirkung von Tumorzellen mit Thrombozyten, die durch P-Selektin vermittelt werden kann, spielen auch Wechselwirkungen von Tumorzellen mit Leukozyten eine wichtige Rolle bei der hämatogenen Metastasierung (siehe Abbildung 2.8). Da die Bindungsfähigkeit von UFH an L-Selektin bekannt ist, stellte die Erhebung von kinetischen Bindungskonstanten für UFH an L-Selektin einen weiteren Schritt zum Verständnis der Heparinwirkung an Selektinen dar. Dazu wurden analog zu den Versuchen im vorhergehenden Kapitel humane L-Selektin-Fc-Chimären (hL-Sel-Fc-Chim.) auf den Quarzsensoren immobilisiert und die kinetischen Bindungskonstanten des UFH Liquemin N bestimmt. Die immobilisierten Proteinmengen und injizierten Heparinkonzentrationen wurden aus den vorhergehenden Versuchen übernommen. Dabei wurden die in Tabelle 4.4 angegebenen Bindungskonstanten detektiert.

Tab. 4.4: Kinetische Bindungskonstanten zur Bindung von Liquemin N an immobilisierten hL-Selektin-Fc-Chimären.

	K_D [M]	k_{Ass} [M ⁻¹ s ⁻¹]	k_{Diss} [s ⁻¹]
Liquemin N	$1,06 \cdot 10^{-7}$ $\pm 0,64 \cdot 10^{-7}$	$4,96 \cdot 10^3$ $\pm 3,28 \cdot 10^3$	$3,72 \cdot 10^{-4}$ $\pm 0,79 \cdot 10^{-4}$

Die Bindungsfähigkeit von Heparin an L-Selektin wurde in Kapitel 2.2.3 anhand von Mausexperimenten erläutert. Die kinetische Betrachtung dieser Wechselwirkung auf molekularer Ebene ist in der Literatur bisher noch nicht beschrieben. Die hier vorgestellten Daten unterstreichen die Fähigkeit von Heparin sowohl L- als auch P-Selektin mit hoher Affinität zu binden. Es zeigt sich sogar, dass Liquemin N zu L-Selektin eine höhere Affinität besitzt als zu P-Selektin. Sowohl eine größere Assoziationskonstante als auch eine kleinere Dissoziationskonstante tragen zu diesem Effekt bei. Die größere räumliche Reichweite des P-Selektin durch eine größere Anzahl von SCR verschafft im QCM-Experiment keinen Vorteil. Ähnlich wie bei der P-Selektin-Inhibition im Mausmodell spielt auch bei L-Selektin der Zeitpunkt der Inhibition eine wichtige Rolle. Die Blockade von L-Selektin verhindert im Rahmen der

hämatogenen Metastasierung die Assoziation von Tumorzell-Thrombozyt-Aggregaten mit Leukozyten. Diese spielt aber erst nach einigen Stunden nach Tumorzellinvasion in das Blutssystem eine Rolle. Läubli et al. konnten zeigen, dass die Heparin-Gabe 30 min vor der Tumorzellinjektion in P⁻ keinen Effekt hatte, da P-Selektin vermittelte Prozesse nicht gehemmt werden konnten. Durch die schnelle systemische Clearance des Heparins wurde auch kein L-Selektin-vermittelter Effekt detektiert, da schon ein so großer Anteil des Wirkstoffs eliminiert war. Die Injektion von Heparin 6-8 Stunden nach Tumorzellinjektion hatte dagegen einen antimetastatischen Effekt in P⁻, der mit der L-Selektin-Inhibition erklärt werden konnte. In L⁻ hatte diese späte Gabe hingegen keinen Effekt [139].

In der Literatur wird in verschiedenen Arbeiten die L-Selektin- gegen die P-Selektin-Beteiligung am Prozess der hämatogenen Metastasierung abgewogen. Zu dieser Fragestellung können die hier beschriebenen QCM-Experimente keinen Beitrag leisten. Sie demonstrieren aber, dass UFH unabhängig von dieser Fragestellung sowohl L- als auch P-Selektin mit hoher Affinität zu binden vermögen und dass die Wirkung *in vivo* nicht in erster Linie durch die Affinität bestimmt wird, sondern von anderen Faktoren, wie dem Zeitpunkt der Heparin-Gabe, abhängt.

4.1.5 Detektion und kinetische Betrachtung der Bindung von LMWH an hP- und hL-Selektin-Fc-Chimären

Verschiedene klinische Studien legen einen Nutzen der Gabe von UFH bei Krebspatienten nahe. In Kapitel 2.2.2 wurde ein Artikel von Smorenburg erwähnt, der die Wirkung von UFH bei Krebspatienten als nicht eindeutig belegt einstuft [152]. Für LMWH gilt der Nutzen bei Krebspatienten im frühen Krankheitsstadium und vor Auftreten von Metastasen dagegen als gesichert. Daher wurden zwei verschiedene LMWH, die vorher sowohl im Maus- als auch in verschiedenen *in vitro*-Modellen untersucht wurden, auf ihre P- und L-Selektin-Bindungsfähigkeit im QCM-Assay untersucht.

LMWH besitzen eine geringere durchschnittliche Molekülgröße als UFH. Aus den Fachinformationen für die beiden getesteten LMWH Nadroparin (Fraxiparin®) und Enoxaparin (Clexane®) konnten sowohl die Massenkonzentrationen der Zubereitungen als auch die mittlere molare Masse wie folgt entnommen werden:

- Nadroparin: 1 mg \cong 113 I.E., \varnothing MW 4,5 kD
- Enoxaparin: 1 mg \cong 100 I.E., \varnothing MW 4,5 kD

Nach Vorversuchen zur Konzentrationsoptimierung der LMWH an hP- und hL-Selektin wurde eine Konzentration von $7,41 \cdot 10^{-6}$ M (\cong 100 μ g/mL) für die weiteren

Versuche bestimmt. Im Vergleich zu UFH, die mit 33 $\mu\text{g}/\text{mL}$ eingesetzt wurden, gibt dies den Unterschied der durchschnittlichen molaren Massen wieder. Die Bindungsdaten sind Tabelle 4.5 zu entnehmen.

Tab. 4.5: Kinetische Bindungskonstanten zur Bindung von Enoxaparin und Nadroparin an immobilisierten hL- bzw. hP-Selektin-Fc-Chimären.

Selektin-Typ	K_D [M]	k_{Ass} [$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]	k_{Diss} [s^{-1}]
P-Selektin			
Enoxaparin	$4,60 \cdot 10^{-6}$ $\pm 3,72 \cdot 10^{-6}$	$5,18 \cdot 10^2$ $\pm 3,61 \cdot 10^2$	$3,28 \cdot 10^{-3}$ $\pm 1,31 \cdot 10^{-3}$
Nadroparin	$7,61 \cdot 10^{-6}$ $\pm 3,33 \cdot 10^{-6}$	$5,36 \cdot 10^2$ $\pm 2,16 \cdot 10^2$	$3,80 \cdot 10^{-3}$ $\pm 1,75 \cdot 10^{-3}$
L-Selektin			
Enoxaparin	$2,01 \cdot 10^{-6}$ $\pm 0,57 \cdot 10^{-6}$	$5,98 \cdot 10^2$ $\pm 1,30 \cdot 10^2$	$1,19 \cdot 10^{-3}$ $\pm 0,39 \cdot 10^{-3}$
Nadroparin	$2,84 \cdot 10^{-6}$ $\pm 2,02 \cdot 10^{-6}$	$5,63 \cdot 10^2$ $\pm 2,09 \cdot 10^2$	$1,33 \cdot 10^{-3}$ $\pm 0,82 \cdot 10^{-3}$

Diese Daten stellen die erste Erhebung von Bindungskonstanten von LMWH an Selektinen dar. Es ist darüber hinaus das erste Mal, dass Bindungsdaten von Heparin an L-Selektin bestimmt wurden. Die unterschiedliche Herstellungsweise von Enoxaparin und Nadroparin führt zu Unterschieden in der strukturellen Zusammensetzung, die sich wiederum auf die Aktivitätsprofile auswirken können. Verschiedene LMWH wurden auf ihre Selektin-Interaktionsfähigkeit *in vitro* und *in vivo* untersucht. Dabei zeigte sich, dass es Unterschiede in der Inhibierbarkeit Selektin-vermittelter Prozesse gibt. Die isolierte Betrachtung der Wechselwirkung auf molekularer Ebene zeigt, dass die hier ausgewählten LMWH sowohl P- als auch L-Selektin ähnlich affin binden. Sowohl Enoxaparin als auch Nadroparin binden P- und L-Selektin mit Affinitäten im mikromolaren Bereich, wobei die Affinität zu L-Selektin etwas höher ist als zu P-Selektin. Die Assoziationskonstanten sind für die Bindung an L-Selektin höher, die Dissoziationskonstanten niedriger. Die Unterschiede sind in allen Fällen nicht stark ausgeprägt. In der Literatur sind verschiedene experimentelle Ansätze beschrieben, die die Wirkung von UFH und LMWH als P-Selektin-Inhibitor untersucht haben. So zeigten Ludwig et al., dass UFH bei geringeren anti-Xa-Konzentrationen die Metastasierung von B16F10-Melanomzellen in Mäusen inhibierte als Nadroparin und Enoxaparin. Bei höheren Konzentrationen zeigte Nadroparin eine stärkere antimetastatische Wirkung als UFH und Enoxaparin. Enoxaparin war in diesen Experimenten

der schwächste Inhibitor der Metastasierung [166]. Die Befunde decken sich nur teilweise mit den hier vorgestellten Bindungsdaten. UFH besitzen eine höhere Affinität zu hP-Selektin als die beiden verwendeten LMWH. Der Unterschied ist vor allem auf die 5fach schnellere Assoziationskonstante des UFH zurückzuführen. Die größere Kettenlänge und die etwas höhere Ladungsdichte bei UFH könnten ein Grund für die schnellere Assoziationskonstante sein. Das stärkere Inhibitionspotential *in vivo* ließe sich so erklären.

Die Unterschiede, die sich zwischen Nadroparin und Enoxaparin im Tierexperiment zeigten, sind nicht mit Unterschieden in ihrer Bindungskinetik zu korrelieren. An dieser Stelle müssen andere Einflussfaktoren wie die systemische Clearance oder die systemische Verteilung für die Inhibitionskapazität verantwortlich sein. In ihrem Molekulargewicht und ihrer Ladungsverteilung unterscheiden sich Enoxaparin und Nadroparin nicht. Dies zeigt sich auch in ihrer Fähigkeit, P-Selektin mit sehr ähnlicher Affinität zu binden.

Die Differenzierung zwischen L- und P-Selektin-Einfluss auf die hämatogene Metastasierung wurde schon im vorangegangenen Kapitel angesprochen. Stevenson et al. untersuchten die Adhäsion von fluoreszenz-markierten Tumorzellen an immobilisierten L- bzw. P-Selektin-Fc-Chimären bei gleichzeitiger Zugabe steigender anti-Xa-Konzentrationen verschiedener LMWH (u.a. Enoxaparin) und UFH. Dabei zeigte UFH an beiden Selektinen die beste Inhibitorwirkung, während Enoxaparin nur die Adhäsion an P-Selektin unterdrücken konnte. Auch alle anderen Heparine zeigten vor allem eine Unterdrückung der P-Selektin-Bindung [165]. Die gleiche Gruppe hatte aber auch nachgewiesen, dass die Blockade von L-Selektin durch Heparin *in vivo* zur antimetastatischen Aktivität beiträgt [139]. Die hier gezeigten kinetischen Daten unterstützen die *in vivo*-Befunde, da beide LMWH L-Selektin mit leicht höheren Affinitäten im Vergleich zu P-Selektin banden. Die Daten legen nahe, dass die strukturellen Anforderungen für die Heparinbindungsfähigkeit in L- und P-Selektin ähnlich sind. Der Hauptunterschied zwischen den beiden Selektinen liegt in der Anzahl der SCR. Die daraus resultierende geringere Länge des L-Selektins wirkt sich im QCM-Assay nicht in einer schlechteren Erreichbarkeit für Heparin aus. Umgekehrt verschafft die größere räumliche Reichweite des P-Selektins keinen Vorteil.

Die grundsätzliche Fähigkeit der Inhibition der hämatogenen Metastasierung durch Wechselwirkungen mit L- und P-Selektin konnte mit diesen Daten erstmals auf molekularer Ebene nachgewiesen werden. Es bleibt festzuhalten, dass die intrinsische Affinität verschiedener LMWH *in vitro* nicht mit ihrer Wirkung *in vivo* korrelieren muss. Die Daten können als Grundlage dienen, Unterschiede in der *in vi-*

vo-Wirksamkeit in Faktoren wie Pharmakokinetik und Pharmakodynamik zu suchen und nicht in der Selektiv-Bindungsfähigkeit.

4.2 Herleitung von Struktur-Wirkungsbeziehungen durch Bindungsstudien mit sulfatierten Polysacchariden an hP-Selektin-Fc-Chimären

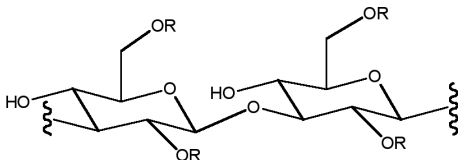
Die Bindung von Heparin an Selektin kann durch die Erhebung kinetischer Bindungsdaten genauer charakterisiert werden. Die Aufstellung von Struktur-Wirkungsbeziehungen mithilfe von Heparinen gestaltet sich schwierig. Selbst wenn die Zusammensetzung der Molekülgrößenspektren einer Heparinzubereitung bekannt ist, können durch Biosensor-Studien immer nur Bindungsdaten für die gesamte Mischung aufgestellt werden. Für die Praxis und die Korrelation mit *in vivo*-Daten ist diese Herangehensweise sinnvoll und ausreichend, da auch dort Heparinmischungen eingesetzt werden. Zur Untersuchung von Struktur-Wirkungsbeziehungen hat uns Frau Prof. Dr. Alban, Christian-Albrechts-Universität Kiel, dankenswerter Weise eine Reihe von Phycarinsulfatderivaten zur Verfügung gestellt, die für die folgenden Untersuchungen als Heparinanaloga dienten. Durch Sulfatierung von Phycarin, das aus Sporophyten des gefingerten Seetangs (lat. *Laminaria digitata*, Familie: Fucaceae) isoliert wurde, konnte eine Reihe von β -1,3-Glucansulfaten erhalten werden, die im Folgenden als PhyS bezeichnet werden. Synthese und Analytik der Phycarinsulfate sind ausführlich bei Alban und Franz [282], sowie bei Fritzsche et al. [283] beschrieben. Sie weisen ein durchschnittliches hydrodynamisches Molekulargewicht (MW_{HD}) von 18-19 kD auf. Dies entspricht einem durchschnittlichen Molekulargewicht von etwa 10 kD (verifiziert durch ESI-MS²). Das Sulfatierungsmuster wurde durch Methylierungs-Ethylierungsanalytik und anschließende Gas-Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektroskopie bestimmt. Dabei wurden die partiell methylierten, ethylierten Alditolacetate detektiert.

Für die Bestimmung der bindungskinetischen Daten wurden die Phycarinsulfate in gleichen Massenkonzentrationen wie die UFH in den vorher beschriebenen Versuchen eingesetzt ($33 \mu\text{g/mL} \hat{=} 2,78 \cdot 10^{-6} \text{ M}$). Aus Tabelle 4.6 sind die Bindungsdaten der verschiedenen Phycarinsulfate und der durchschnittliche Sulfatierungsgrad zu entnehmen.

Der durchschnittliche Sulfatierungsgrad von UFH ist 1,1 pro Monosaccharid und der Grad der Carboxylierung beträgt definitionsgemäß 0,5. Der Einfluss der Ladung auf die Selektin-Bindungsfähigkeit kann demnach mit UFH nicht untersucht werden. Unterschiede im Bindungsverhalten erklären sich nicht aus Unterschieden in der Ladungsdichte, sondern aus anderen Strukturmerkmalen wie der Kettenlän-

²engl. Electrospray Ionisation-Mass Spectrometry

Tab. 4.6: Allgemeine Strukturformel der Phycarin(sulfate) und ihre Bindungskonstanten an hP-Selektin-Fc-Chimären. DS: engl. Degree of Sulfation, dt. Sulfatierungsgrad

 R=H/SO ₃ Na	DS	K_D [M]	k_{Ass} [M ⁻¹ s ⁻¹]	k_{Diss} [s ⁻¹]
PhyS1	0,00	nicht detektierbar		
PhyS2	0,75	$91,6 \cdot 10^{-7}$ $\pm 26,8 \cdot 10^{-7}$	$0,52 \cdot 10^3$ $\pm 0,18 \cdot 10^3$	$20,6 \cdot 10^{-4}$ $\pm 9,2 \cdot 10^{-4}$
PhyS3	1,48	$5,01 \cdot 10^{-7}$ $\pm 2,78 \cdot 10^{-7}$	$1,72 \cdot 10^3$ $\pm 1,11 \cdot 10^3$	$6,50 \cdot 10^{-4}$ $\pm 0,98 \cdot 10^{-4}$
PhyS4	1,80	$1,59 \cdot 10^{-7}$ $\pm 0,91 \cdot 10^{-7}$	$2,47 \cdot 10^3$ $\pm 0,91 \cdot 10^3$	$3,83 \cdot 10^{-4}$ $\pm 2,66 \cdot 10^{-4}$
PhyS5	2,21	$1,70 \cdot 10^{-7}$ $\pm 0,40 \cdot 10^{-7}$	$2,16 \cdot 10^3$ $\pm 0,04 \cdot 10^3$	$3,67 \cdot 10^{-4}$ $\pm 0,85 \cdot 10^{-4}$
PhyS6	2,80	$0,44 \cdot 10^{-7}$ $\pm 0,25 \cdot 10^{-7}$	$6,64 \cdot 10^3$ $\pm 1,78 \cdot 10^3$	$2,87 \cdot 10^{-4}$ $\pm 1,95 \cdot 10^{-4}$

ge. Ladungsinduzierte Wechselwirkungen sind für Selektininteraktionen essentiell. Dies gilt sowohl für die natürlichen Liganden als auch für mögliche Inhibitoren. Durch die Bestimmung der Bindungskinetik von β -1,3-Glucanen mit definiertem Sulfatierungsgrad ist es erstmals möglich, diese beiden Molekülmerkmale zu korrelieren. Das ungeladene PhyS1 zeigte keine Bindungsfähigkeit an hP-Sel-Fc-Chim. Dieser Befund bestätigt, dass ladungsinduzierte Wechselwirkungen für die Selektin-Bindungsfähigkeit essentiell sind. Die anderen Glucansulfate banden immobilisierte P-Sel-Fc-Chim. im QCM-Assay. Eine Abhängigkeit von Ladung und Affinität ist erkennbar. PhyS2 (DS 0,75) hat eine etwa 10fach geringere Affinität zu P-Selektin als UFH. PhyS3 weist eine vergleichbare Affinität auf, während die Derivate PhyS4 - PhyS6 eine deutlich höhere Affinität besitzen. Während PhyS2 eine geringere Ladungsdichte aufweist als UFH und PhyS3 eine ähnliche Ladungsdichte besitzt, sind

alle weiteren PhyS höher geladen. Daher ist in der Ladungsdichte ein Grund für die Selektinbindungsfähigkeit zu suchen.

Bei genauerer Betrachtung wird eine Abhängigkeit zwischen den Assoziationskonstanten und der Ladungsdichte als Strukturparameter deutlich. Der große Sprung zwischen den Assoziationskonstanten von PhyS5 und PhyS6 ist auffällig und nicht hinreichend mit dem höheren DS zu erklären. Gleichzeitig nimmt die Dissoziationskonstante mit steigendem DS ab. Die Substanzen verbleiben bei höherer Ladungsdichte länger am Rezeptorprotein. Die Ladung beeinflusst demnach beide Teilvorgänge, die für die Affinität verantwortlich sind. Die Daten können als Grundlage dienen, den Einfluss der Ladungsdichte bei der Suche nach neuen glykosidischen Selektininhibitoren zu berücksichtigen. Die hier vorgestellten Substanzen sind potentielle Leitstrukturen bei dieser Suche. *In vitro* übertreffen sie die Bindungsfähigkeit des Heparins. Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante von PhyS6 mit $K_D = 0,44 \cdot 10^{-7}$ M ist die höchste, die für Selektininhibitoren mit Ausnahme von Antikörpern bisher beschrieben wurde. Andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass PhyS4 im Tiermodell gute antiinflammatorische Eigenschaften besitzt. Da es nur vermindert in L- bzw. P-Mäusen wirkte, konnte das antiinflammatorische Potential auf eine Selektininhibition zurückgeführt werden [284]. Daten zur antimetastatischen Potenz dieser Substanzen *in vivo* sind bisher noch nicht veröffentlicht.

An dieser Stelle bleibt festzuhalten, dass das Vorhandensein von Ladungen essentiell für die Selektinbindung von glykosidischen Inhibitoren ist und dass mit steigender Ladungsdichte die Affinität zunimmt. Diese Zunahme ist sowohl durch eine Vergrößerung der Assoziationskonstanten und einer Verkleinerung der Dissoziationskonstanten mit steigendem DS zu erklären. Ein Vergleich der Bindungsdaten mit dem Inhibitionspotential der gleichen Substanzen in einem Zellrollassay im folgenden Kapitel soll weitere Erkenntnisse zu Struktur-Wirkungsbeziehungen erbringen.

4.2.1 Korrelation von kinetischen Bindungskonstanten mit Daten aus einem Zellrollassay

Die kinetischen Bindungsdaten geben einen detaillierten Einblick in das Bindungsverhalten der verschiedenen Heparine und der Reihe der PhyS an hP-Sel-Fc-Chim. Der Vergleich mit Daten eines Zellrollassays gibt darüber hinaus die Möglichkeit, den Effekt bestimmter struktureller Eigenschaften auf das Adhäsionsverhalten von Zellen an Selektinen zu untersuchen.

Der verwendete Zellrollassay ist in unserer Arbeitsgruppe von Frau Dr. Gabriele Schumacher etabliert worden. Frau Dr. Juliane Fritzsche nutzte ihn erstmals im Rahmen ihrer Dissertation, um Struktur-Wirkungsbeziehungen bei der Selektininhibition

aufzustellen. Der detaillierte experimentelle Aufbau und die Versuchsbedingungen für die hier beschriebenen Experimente sind Fritzsche et al. zu entnehmen [283]. Zum Verständnis der verglichenen Datensätze soll der Assay in Kürze hier vorgestellt werden.

Durch Immobilisation von hP-Sel-Fc-Chim. auf Glasplättchen kann das Rollverhalten von PSGL-1-exprimierenden U937-Zellen unter Scherung mikroskopisch betrachtet und die Rollgeschwindigkeiten mithilfe einer speziellen Computersoftware ausgewertet werden. Das Adhäsions- und Rollverhalten von $1 \cdot 10^6$ U937 ohne Inkubation mit einem potentiellen Inhibitor dient als Kontrollexperiment. Die Inkubation der Zellsuspension mit Heparin oder PhyS kann zu einer Verringerung der interagierenden Zellfraktion führen, die als Prozentwert des Kontrollversuchs angegeben wird. Der maximale Inhibitionseffekt in diesem Assay zeigt sich nach vier Sekunden. Deshalb wurden die kinetischen Parameter mit der relativen Zelladhäsion nach vier Sekunden verglichen.

Abbildung 4.3 zeigt, dass eine Korrelation der einzelnen kinetischen Parameter von UFH mit der relativen Zelladhäsion nach vier Sekunden nur bedingt möglich ist. Im Zellrollassay nimmt die Inhibitionspez von Calciparin über Liquemin N nach Heparin Ratiopharm zu. Die Assoziationskonstanten der drei UFH geben diesen Trend nicht genau wieder. Heparin Ratiopharm besitzt eine kleinere Assoziationskonstante als Liquemin N, obwohl es im Zellrollassay der stärkste Inhibitor war. Die Dissoziationskonstanten lassen die Tendenz der Inhibitorwirkung nachvollziehen. Der Vergleich des Calciparin-Effekts mit seinen kinetischen Bindungsdaten ist schwierig, da es im Zellrollassay keine Inhibitorwirkung zeigte, im QCM-Assay P-Selektin aber zu binden vermochte. Dabei hatte es die geringste Affinität im Vergleich der drei UFH. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass bestimmte kinetische Voraussetzungen erfüllt sein müssen (z.B. eine bestimmte Affinität), bevor eine UFH-Zubereitung die P-Selektin-Wirkung auf Zellebene unterdrücken kann. Eine lineare Korrelation der Zellrolldaten und der kinetischen Bindungsparameter wurde nicht durchgeführt, da für Calciparin kein Inhibitionseffekt im Zellrollassay zu erkennen war. Auf die Korrelation von lediglich zwei Datenpaaren für Liquemin N und Heparin Ratiopharm wurde aus statistischen Gründen verzichtet. Darüber hinaus ist die genaue Zusammensetzung der UFH nicht bekannt, die Ableitung von Struktur-Wirkungsbeziehungen aus einem derart komplexen Substanzgemisch ist daher schwierig.

Die Reihe der PhyS bietet sich dagegen für eine lineare Korrelation der Zellrolldaten mit den Bindungsdaten an. Die Molekülgröße der PhyS ist bekannt, der Sulfatierungsgrad ist für jedes Mitglied definiert. Abbildung 4.4 zeigt, dass sich die Steigerung der Inhibitionspez mit steigendem Sulfatierungsgrad in allen drei

4.2 Herleitung von Struktur-Wirkungsbeziehungen durch Bindungsstudien mit sulfatierten Polysacchariden an hP-Selektin-Fc-Chimären

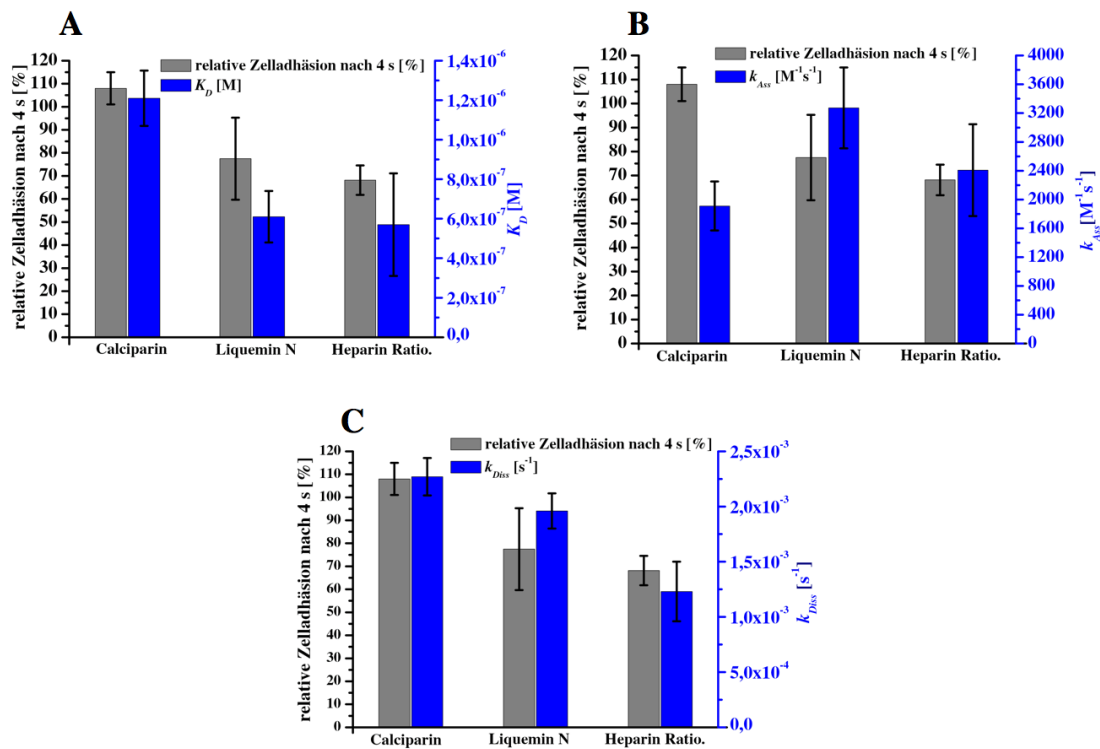


Abb. 4.3: Vergleich der Inhibitionsdaten im Zellrollassay mit den kinetischen Bindungsparametern von Calciparin, Liquemin N und Heparin Ratiopharm an hP-Selektin-Fc-Chimären. In allen drei Abbildungen stellen die grauen Balken die relative Zelladhäsion von U937-Zellen an hP-Sel-Fc-Chim. nach 4 s dar. Dabei wurden die Zellen unmittelbar vor der Applikation in das Messsystem mit 500 µg eines der drei UFH inkubiert. Die resultierende Zelladhäsion wurde in Vergleich zu nicht behandelten Zellen gesetzt. Nach 4 s ist im Zellrollassay der maximale Inhibitionseffekt erreicht. Die blauen Balken stellen folgende kinetische Parameter für die gleichen UFH dar: **A:** Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D , **B:** Assoziationskonstante k_{Ass} , **C:** Dissoziationskonstante k_{Diss} .

kinetischen Parametern niederschlägt. Im Zellrollassay ist ab einem DS von 1,80 keine signifikante Steigerung der Inhibitionswirkung feststellbar.

Will man die Inhibitionsdaten des Zellrollassays mit den Bindungsparametern linear korrelieren, muss beachtet werden, dass die erstgenannten Daten nur Werte zwischen 0% und 100% annehmen. Die Einflüsse auf das Rollverhalten durch Variablen wie der Bindungskinetik können nicht durch lineare Regression untersucht werden, da wesentliche Voraussetzungen wie Normalverteilung der Residuen und Varianzhomogenität nicht gewährleistet sind. Durch Anwendung der Logit-Transformation wird der begrenzte Zahlenraum des Zellrollexperiments auf den gesamten Raum der reellen Zahlen projiziert. Erst dann ist eine lineare Korrelation mit den bindungskinetischen Daten möglich. Abbildung 4.5 verdeutlicht die Durchführung der Logit-Transformation und die Konsequenzen für den Datensatz.

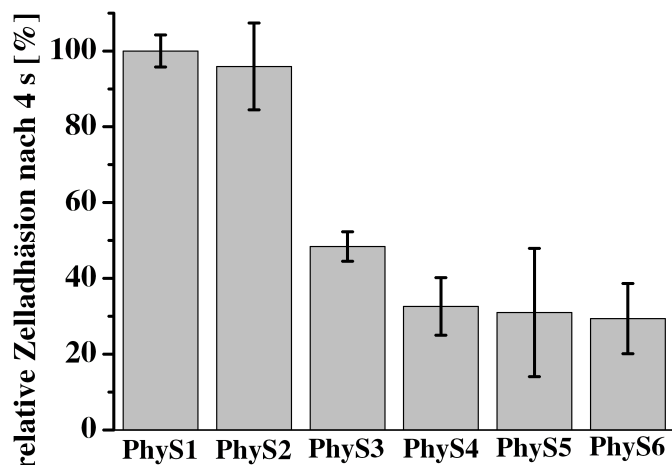


Abb. 4.4: Inhibitionsdaten eines Zellrollassays von PhysS1 – PhysS6 an hP-Selektin-Fc-Chimären. Die relative Zelladhäsion nach 4 s nimmt mit steigendem DS ab. Ab einem DS von 1,80 verändert sich das Inhibitionspotential nicht mehr signifikant. Die Grafik wurde mit Daten aus Fritzsche et al. erstellt [283].

Die Mittelwerte der Zellrolldaten wurden in Gleichung 4.1 eingesetzt. Die erhaltenen Logit-Transformationswerte konnten dann mit den kinetischen Bindungsdaten linear korreliert werden.

$$L = \ln \left(\frac{p}{1-p} \right) \quad (4.1)$$

Frau Dr. Juliane Fritzsche konnte mit ihren Arbeiten zeigen, dass die Inhibitions Potenz der PhyS von ihrer Nettoladung abhängt. Durch die Korrelation ihrer Daten mit den einzelnen Bindungsparametern in Abbildung 4.6 zeigt sich, dass die Erhöhung der Ladungsdichte Konsequenzen auf alle kinetischen Parameter hat. Ein linearer Zusammenhang besteht aber vor allem zwischen Inhibitions Potenz und der Dissoziationskonstanten k_{Diss} . Die lineare Abhängigkeit der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D als Quotient aus k_{Ass} und k_{Diss} wird durch die Dissoziationskonstante hervorgerufen. Die Zelladhäsion hängt nicht linear von der Assoziationskonstanten k_{Ass} ab. Damit bestätigt sich die Annahme, die schon der Vergleich von Adhäsionsinhibition und Bindungskinetik für die Heparinzubereitungen ergab, dass vor allem die langsame Dissoziationskonstante die Inhibitions Potenz von glykosidischen Selektininhibitoren steuert.

Die Ergebnisse der Korrelation erklären, warum viele der Selektininhibitoren auf sLe^X-Basis nur mäßigen Effekt bei der Inhibition Selektin-vermittelter Prozesse zeigen. Zwar binden sie den Rezeptor mit hoher Geschwindigkeit, durch die schnelle Dissozia-

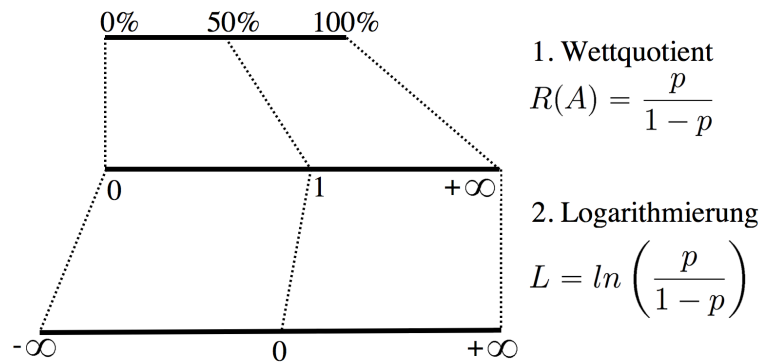


Abb. 4.5: Logit-Transformation. Durch Aufstellen des Wettquotienten kann der begrenzte Zahlenraum von 0% bis 100% auf $+\infty$ erweitert werden. Der Quotient $\frac{p}{1-p}$ stellt ein so genanntes „Odd“ dar, das Verhältnis von Wahrscheinlichkeit zu Gegenwahrscheinlichkeit für ein bestimmtes Ereignis. Am Beispiel für die relative Zelladhäsion nach 4 s bei Inhibition durch PhyS4 mit 32,59%, ergibt sich das Odd als $\frac{0,3259}{1-0,3259} = 0,4835$. Durch Logarithmierung ergibt sich als Logit-Wert $L = -0,7268$. Durch die Logarithmierung wird der Wertebereich im negativen Zahlenbereich auf $-\infty$ gespreitet. Die Theorie der Logit-Transformation kann bei Urban detailliert nachgelesen werden [285].

tion werden sie aber schnell wieder freigegeben. SLe^X-Mimetika verdeutlichen auch, dass ein niedriger K_D -Wert nicht als Determinante für einen guten Inhibitor ausreicht. Sowohl bei Entzündungsprozessen als auch bei der hämatogenen Metastasierung bewegen sich die betroffenen Zielstrukturen (Leukozyten, Thrombozyten). Statische Gleichgewichtszustände herrschen nicht. Daher ist die isolierte Betrachtung von k_{Ass} und k_{Diss} besser geeignet, das Inhibitorpotential abzuschätzen. Hierbei erweist sich k_{Diss} als der einflussreichere Parameter. Berücksichtigt man diese Erkenntnisse bei der Betrachtung anderer Selektininhibitoren wie der Bimosiamose oder anderer sLe^X-Mimetika, so lässt sich erklären, dass deren Probleme, sich als Selektininhibitoren in der Klinik zu etablieren, unter anderem in den schnellen Dissoziationskonstanten zu suchen sind (vgl. Bimosiamose $K_D = 111,4 \cdot 10^{-6}$ M, $k_{Diss} = 3$ s⁻¹).

In vitro-Assays wie die hier vorgestellten Rollexperimente sind hervorragend geeignet, den funktionellen Endpunkt einer Inhibitorwirkung darzustellen. Die Analyse von kinetischen Bindungsdaten gibt darüber hinaus Einblicke in die mechanistischen Grundlagen dieser Wirkung. Die hier erstmals angewendete Korrelation von *in vitro*-Daten mit kinetischen Parametern stellt ein neues Werkzeug bei der Inhibitorsuche dar.

Der Einfluss der Dissoziationskonstanten auf die Inhibitorfähigkeit von Heparin und anderen sulfatierten Polysacchariden ist eine Erklärung für die bekannte Wirkung des Heparins als antimetastatisches Agens im Rahmen der hämatogenen Metastasierung und verdeutlicht, dass dieser Parameter bei der Suche nach weiteren Selektininhibito-

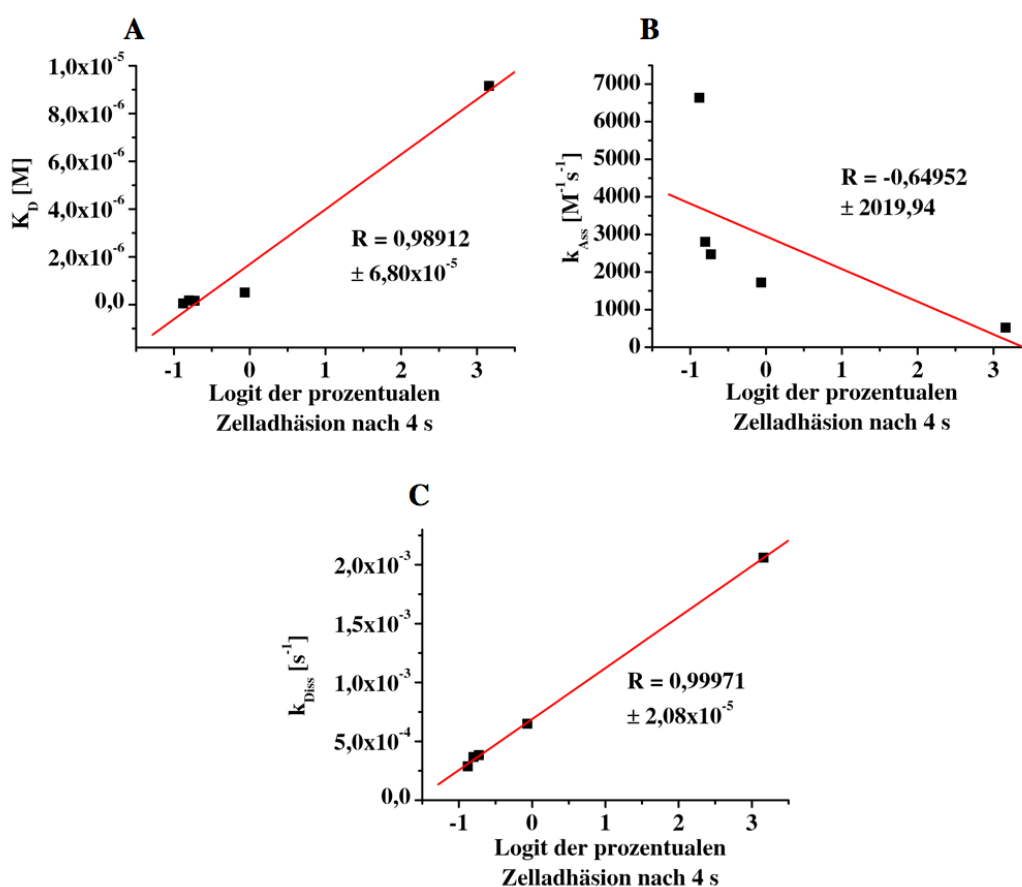


Abb. 4.6: Lineare Korrelation der Logit-Werte der relativen Zelladhäsion nach 4 s mit kinetischen Bindungskonstanten von Phys2 – Phys6. **A:** Die Logit-Werte der relativen Zelladhäsion nach 4 s korrelieren mit der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D mit $R \approx 0,99$. **B:** Der Logit-Wert der Assoziationskonstanten k_{Ass} zeigt die Tendenz, mit steigendem Sulfatierungsgrad abzunehmen. Ein linearer Zusammenhang zwischen Inhibitionspez und Assoziationskonstante lässt sich nicht nachweisen ($R \approx -0,65$). **C:** Die lineare Korrelation von K_D lässt sich vor allem über die lineare Korrelation der Dissoziationskonstanten k_{Diss} mit der Inhibitionspez erklären. Sie hängen linear mit $R \approx 1,0$ voneinander ab.

ren und bei der Optimierung bekannter Selektinantagonisten berücksichtigt werden muss.

4.2.2 Untersuchung von Heparinderivaten mit und ohne Selektin-Bindungsfähigkeit an mP-Sel-Fc-Chimären

In den vorangegangenen Kapiteln konnte die grundsätzliche Bindungsfähigkeit von UFH und LMWH an L- und P-Selektin nachgewiesen und der Einfluss verschiedener Strukturparameter anhand der Phys untersucht werden. Die Erweiterung dieser Erkenntnisse auf Heparinderivate, denen durch chemische Modifikation bestimmte Ei-

4.2 Herleitung von Struktur-Wirkungsbeziehungen durch Bindungsstudien mit sulfatierten Polysacchariden an hP-Selektin-Fc-Chimären

genschaften verliehen wurden, hilft bei der Übertragung der bisherigen Erkenntnisse auf die klinische Relevanz bei der Therapie und Prävention der Tumorzellmetastasierung. Die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Benito Casu vom Istituto di Ricerche Chimiche e Biochimiche „G.Ronzoni“ hat uns dankenswerter Weise verschiedene Heparinvariationen zur Verfügung gestellt. Synthese und Analytik der Heparinderivate sind ausführlich bei Naggi et al. [286] beschrieben. Dabei handelt es sich um die in Abbildung 4.7 dargestellten Verbindungen.

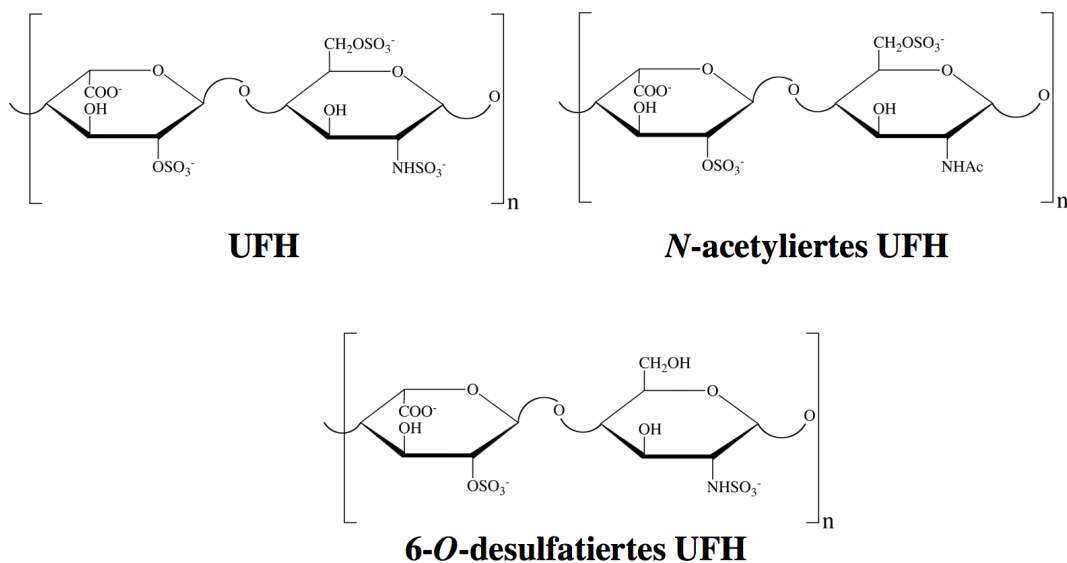


Abb. 4.7: Heparinderivate. Aus dem Standard-UFH (Ø MW 19,6 kD) wurden ein *N*-acetyliertes UFH (Ø MW 21 kD, *N*-Acetylierungsgrad ~ 58%) und ein 6-*O*-desulfatiertes UFH (Ø MW 11 kD) gewonnen.

Die Ergebnisse der Untersuchung der Bindungskinetik der verschiedenen Heparinderivate sind in Tabelle 4.7 dargestellt. Die Experimente wurden für diese Heparine an murinen P-Selektin-Fc-Chimären durchgeführt. Dies wurde erforderlich, um einen besseren Vergleich mit Literaturdaten für die Selektin-Inhibitionswirkung dieser Heparine ziehen zu können, da in anderen Arbeiten *in vitro*-Versuche mit mP-Sel-Fc-Chim. gemacht wurden. In der Literatur sind Unterschiede im Inhibitionsverhalten von Heparin an murinem und humanem Selektin beschrieben. Dabei konnten Bor-sig et al. zeigen, dass Heparin humanes P-Selektin besser bindet als murines [171]. Die Grundlage der Konzentrationsberechnung der eingesetzten Heparine bildete der Einsatz gleicher Massenkonzentrationen (33 µg/mL) wie in den vorangegangenen Untersuchungen zur Bindung kommerzieller UFH an hP-Sel-Fc-Chim. Folgende Konzentrationen wurden für die verschiedenen Heparine eingesetzt.

- UFH: $1,70 \cdot 10^{-6}$ M
- *N*-acetyliertes UFH: $1,58 \cdot 10^{-6}$ M

- 6-*O*-desulfatiertes UFH: $3,03 \cdot 10^{-6}$ M

Um einen Vergleich mit den vorher detektierten Bindungskonstanten von Heparin an hP-Sel-Fc-Chim. zu ziehen, wurde Liquemin N stellvertretend für die bisher verwendeten UFH an mP-Sel-Fc-Chimären vermessen. Es zeigte sich, dass Liquemin N mP-Selektin im QCM-Assay mit ca. 8fach schlechterer Affinität bindet als hP-Selektin ($4,84 \cdot 10^{-6}$ M vs. $0,61 \cdot 10^{-6}$ M). Die Unterschiede begründen sich mit der etwa 1,5fach langsameren Assoziationskonstanten, werden aber vor allem durch die etwa 8fach schnellere Dissoziation vom Rezeptor gesteuert. Dies gibt einen Hinweis, dass Unterschiede im Bindungsverhalten von Heparin an murinem und humanem P-Selektin vor allem durch Unterschiede in der Dissoziationskonstanten hervorgerufen werden.

Bei weiterer Betrachtung fällt auf, dass das UFH, welches als Ausgangsverbindung für die beiden Heparinderivate diente, mP-Selektin mit ca. 20fach höherer Affinität bindet als Liquemin N. Auch hier wird der Affinitätsunterschied vor allem durch die langsamere Dissoziationskonstante im Vergleich zu Liquemin N beeinflusst. Dieses UFH besitzt eine höhere durchschnittliche molare Masse als Liquemin N (\varnothing MW 15 kD). Damit ließe sich die schnellere Assoziationskonstante des UFH erklären. Bei der Analyse von LMWH an L- und P-Selektin ließ die geringere molare Masse keinen Rückschluss auf ein schnelleres Dissoziationsverhalten zu. Deshalb müssen andere strukturelle Parameter für die langsamere Dissoziation auch hier verantwortlich sein. Welche Parameter dies sein können, kann an dieser Stelle nicht weitergehend diskutiert werden, weil die genaue Molekülgrößenzusammensetzung weder für das UFH von Prof. Casu noch für Liquemin N bekannt sind.

Vom *N*-acetylierten UFH hingegen ist nicht nur die höhere durchschnittliche molare Masse bekannt (\varnothing MW 21 kD), sondern auch, dass bei etwa 58% aller Dissacharid-Einheiten der Stickstoff des Glucosamins acetyliert und nicht sulfatiert vorliegt. Auch nach *N*-Acetylierung ist eine gute mP-Selektin-Bindungsfähigkeit festzustellen. Dabei hat das verwendete Derivat eine etwas geringere Affinität als das UFH, aber eine dem Liquemin N vergleichbare. Die Affinitätsminderung wird gleichermaßen durch eine kleinere Assoziationskonstante wie durch eine größere Dissoziationskonstante hervorgerufen.

6-*O*-desulfatiertes Heparin wurde ausgewählt, weil die Sulfatierung an dieser Stelle als Selektin-Bindungsdeterminante bekannt ist. Im hier angewendeten QCM-Assay konnten keine Bindungsereignisse zwischen dieser Heparinvariation und immobilisierten mP-Sel-Fc-Chim. detektiert werden. Auf die Untersuchung unspezifischer Bindungen in höheren Konzentrationsbereichen musste aus Mangel an Testsubstanz verzichtet werden. Der Vergleich mit den anderen vermessenen Heparinen

4.2 Herleitung von Struktur-Wirkungsbeziehungen durch Bindungsstudien mit sulfatierten Polysacchariden an hP-Selektin-Fc-Chimären

zeigt aber deutlich den Verlust der P-Selektin-Bindungsfähigkeit im verwendeten Konzentrationsbereich.

Die hier erhobenen Bindungsdaten decken sich mit Untersuchungen in der Literatur, die gezeigt haben, dass bei *N*-Acetylierung des Glucosamins die P-Selektin-Bindungsfähigkeit erhalten bleibt, während 6-*O*-Desulfatierung zu einem Verlust dieser Fähigkeit führt. Gleichzeitig geht mit der *N*-Acetylierung eine massive Verringerung der antikoagulatorischen Aktivität einher (anti-Xa-Aktivität UFH > 4 I.E./mL vs. *N*-acetyliertes UFH ~ 0,1 I.E./mL). Gleichzeitig steigt bei *N*-acetylierten Heparinen die Freisetzung von EZM-gebundenem FGF-2³, während die Heparanaseaktivität bei diesen Heparinen um die Hälfte vermindert ist [169]. Gerade diese Eigenschaft macht *N*-acetyliertes Heparin zu einem potenten Werkzeug bei der Untersuchung der antimetastatischen Wirksamkeit von Heparin. Denn die Heparanaseinhibition scheint neben der Selektinhemmung der wichtigste Wirkmechanismus des Heparins bei der Metastasierungshemmung zu sein. Heparanase auf der Oberfläche von Tumorzellen ist in der Lage, Heparansulfate der EZM zu degradieren, um damit die Tumorzellmigration und Invasion zu forcieren. Heparin kann als „falsches“ Substrat der Heparanase erkannt werden, die dadurch in ihrer Wirkung gehemmt wird. Der Einfluss von Heparanase auf die Tumorzellmetastasierung ist ausführlich bei Vlodaysky et al. und Edovitsky et al. beschrieben [164, 287]. Durch den Einsatz von Heparinen, die nur einen der beiden genannten Mechanismen blockieren und gleichzeitig eine geringe antikoagulatorische Aktivität besitzen, kann der Einfluss der beschriebenen Faktoren isoliert untersucht werden.

Tab. 4.7: Kinetische Bindungskonstanten zur Bindung von UFH, *N*-acetyliertem UFH, 6-*O*-desulfatiertem UFH und Liquemin N an immobilisierten mP-Selektin-Fc-Chim.

	K_D [M]	k_{Ass} [M ⁻¹ s ⁻¹]	k_{Diss} [s ⁻¹]
UFH	$0,22 \cdot 10^{-6}$ $\pm 0,07 \cdot 10^{-6}$	$4,54 \cdot 10^3$ $\pm 1,26 \cdot 10^3$	$1,18 \cdot 10^{-3}$ $\pm 0,04 \cdot 10^{-3}$
<i>N</i> -acetyliertes UFH	$3,18 \cdot 10^{-6}$ $\pm 0,81 \cdot 10^{-6}$	$1,49 \cdot 10^3$ $\pm 0,33 \cdot 10^3$	$4,57 \cdot 10^{-3}$ $\pm 0,16 \cdot 10^{-3}$
6- <i>O</i> -desulfatiertes UFH	nicht detektierbar		
Liquemin N	$4,84 \cdot 10^{-6}$ $\pm 0,64 \cdot 10^{-6}$	$2,17 \cdot 10^3$ $\pm 0,47 \cdot 10^3$	$9,82 \cdot 10^{-3}$ $\pm 0,27 \cdot 10^{-3}$

³engl. Fibroplat Growth Factor-2

4.3 Biosensoruntersuchung Selektinligand-basierter Tumorzellmodelle

In den vorangegangenen Kapiteln wurde deutlich, dass das Verständnis der Selektin-Ligand-Wechselwirkung einen tieferen Einblick in die Selektin-vermittelte hämatogene Metastasierung ermöglicht. Die Detektion von kinetischen Bindungskonstanten mithilfe mathematischer Modelle war dabei eine wichtige Methode. Derartige Modelle müssen einfach und gut reproduzierbar sein. Gleichzeitig bedeutet eine geringe Anzahl an Parametern, dass komplexere physiologische Zusammenhänge nur unzureichend dargestellt werden können. Gerade die Selektin-Ligand-Interaktion unterliegt verschiedenen Mechanismen, die Affinität und Avidität steuern (siehe Kapitel 2.1.3). Eine Gruppe von Liganden für P-Selektin, die in dieser Hinsicht noch nicht untersucht wurden, stellt die Familie der Sulfatide dar [133]. Strukturell handelt es sich dabei um Cerebroside, deren physiologische Funktion darin besteht, eine geclusterte Verteilung von Na^+ - und K^+ -Kanälen in den Myelinscheiden von Säugetierneuronen aufrecht zu erhalten. Nachdem 1991 die Bindungsfähigkeit von Sulfatiden an P-Selektin bewiesen wurde, konnte in den darauffolgenden Jahren auch die Bindungsfähigkeit an L-Selektin gezeigt werden [288, 289]. Parallel zu diesen Erkenntnissen identifizierte man Sulfatide auf Brustkrebszelllinien und stellte fest, dass auf metastasierenden Tumorzellen ein höherer Anteil an Sulfatiden zu finden war als auf nicht-metastasierenden Zellen [290, 291]. Da zu dieser Zeit die Selektine ein recht neues Gebiet der wissenschaftlichen Forschung darstellten und eine Beteiligung von Selektinen an der Metastasierung noch nicht diskutiert wurde, konnte damals auch noch kein Zusammenhang zwischen Selektinen und der Sulfatid-vermittelten Metastasierung hergestellt werden. Erst 2007 konnten Garcia et al. zeigen, dass SM4-Sulfatid (Galaktocerebrosid, $\text{HSO}_3\text{-3Gal}\beta\text{-1-Cer}$, siehe Abbildung 4.8) der einzige P-Selektin-Ligand auf MC38-Kolonkarzinomzellen ist. Sie bewiesen, dass SM4 essentiell für die Metastasierung ist, indem sie die Sulfatgruppe des SM4 enzymatisch abtrennten, was zu einem Ausbleiben der Metastasierung führte. Dass die Sulfatid-Selektin-Wechselwirkung ausschlaggebend für die Metastasierung dieser Zelllinie ist, wurde mithilfe von P-Selektin-Knock-Out-Mäusen gezeigt, in denen MC38-Kolonkarzinomzellen keine Metastasen ausbilden konnten [169, 292].

Es sind noch keine Affinitätsdaten für die Bindung von SM4 an P-Selektin publiziert. Außerdem gibt es noch offene Fragen zur Inhibitionspotenz von Heparin bei dieser Wechselwirkung. Es ist aber anzunehmen, dass SM4 ähnlich wie sLe^X als Einzelepitop nur geringe Affinität zu P-Selektin besitzt. Durch Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Dr. Lubor Borsig von der Universität Zürich wurden statische

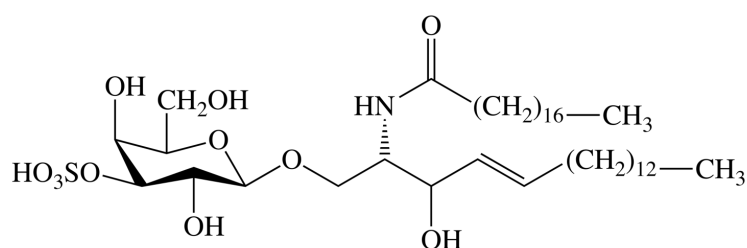


Abb. 4.8: SM4-Sulfatid. Struktur von SM4-Sulfatid (HSO₃-3Galβ-1-Cer)

Adhäsionsuntersuchungen durchgeführt, bei denen entweder sLe^X oder SM4 durch Adsorption immobilisiert wurden. Abbildung 4.9 A zeigt, dass die P-Selektin-Bindung sowohl an SM4 als auch an sLe^X durch Heparin inhibiert werden kann. Dabei wird die SM4-Bindung erst durch höhere Heparinkonzentrationen inhibiert als die sLe^X-Bindung. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass SM4 als Einzelepitop P-Selektin in diesem statischen Assay mit höherer Affinität bindet. Gleichzeitig ist zu berücksichtigen, dass sLe^X in diesem Assay als Polymer mit einem Polyacrylamidanker immobilisiert wurde. Dadurch kommt es zur multimeren Präsentation der Bindungsepitope, die Ähnlichkeit mit einem Clusterverhalten aufweist. SM4 wird dagegen als Einzelepitop vorliegen. Durch die Versuchsanordnung, bei der eine Ligand-haltige Lösung der beiden Epitope in eine Lochplatte eingebracht wurde, sind keine eindeutigen Vorhersagen zur wirklichen Ligandpräsentation möglich.

Wird der Adhäsionsassay mit sLe^X-tragenden LS180-Kolonadenokarzinomzellen und Sulfatid-exprimierenden MC38-Kolonkarzinomzellen durchgeführt, ergibt sich ein anderes Bild bei der Adhäsionsinhibition durch Heparin. Hier werden die SM4-Sulfatid-tragenden MC38-Zellen schon durch geringere Heparinkonzentrationen in ihrer Adhäsion gehemmt als dies für LS180-Zellen der Fall ist (Abbildung 4.9 B). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass LS180 die multimeren Präsentation von sLe^X nutzen, um mit höherer Avidität zu binden.

Diese Unterschiede zwischen der Einzelepitop- und der Zellbindung weist auf Unterschiede in der Lateralverteilung der Liganden in den Zellmembranen hin. Für sLe^X-exprimierende Zelllinien ist die Ausbildung von Clusterstrukturen auf Zelloberflächen beschrieben. Im Rahmen der Zusammenarbeit mit Dr. Borsig und seinen Mitarbeitern konnte für MC38-Zellen ebenfalls gezeigt werden, dass sich SM4 in Clustern anreichert. Dazu wurden die Zellmembranen von MC38 fraktioniert und mittels HPLC-Analytik auf so genannte „Lipid rafts“ untersucht, in denen SM4-Anreicherungen nachgewiesen werden konnten.

Um die isolierte Wechselwirkung von SM4-Modellmembranen mit P-Selektin untersuchen zu können und dabei die Besonderheiten der Ligandpräsentation zu berücksich-

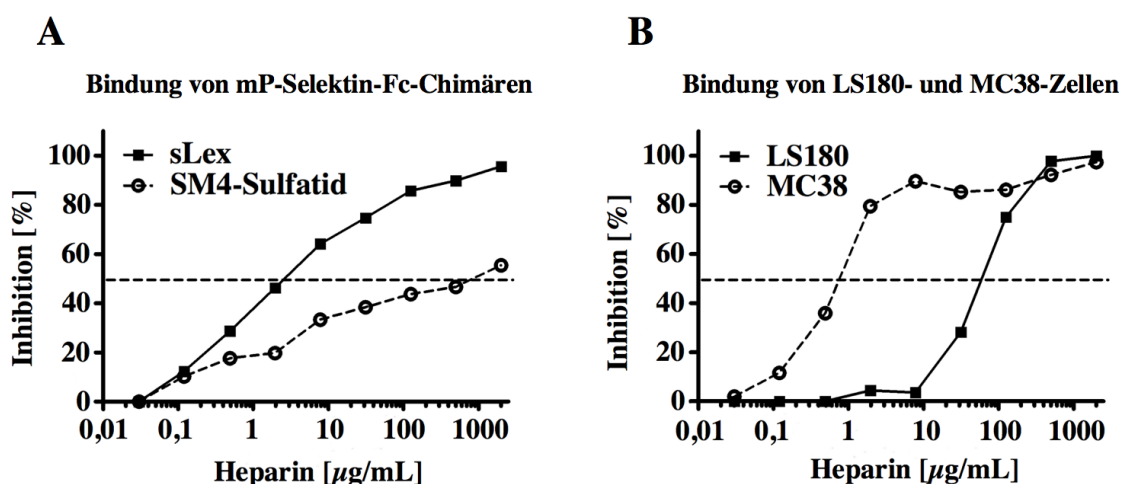


Abb. 4.9: Statischer Adhäsionsassay zur Bindung von sLe^X, SM4-Sulfatid, LS180-Zellen und MC38-Zellen an P-Selektin und Inhibition durch Heparin. **A:** Die Bindung von löslichem sLe^X kann durch geringere Heparinkonzentrationen gehemmt werden als die Bindung von SM4-Sulfatid. **B:** Für sLe^X-exprimierende LS180- und SM4-Sulfatid-exprimierende MC38-Zellen stellt sich die Inhibitionsfähigkeit durch Heparin genau umgekehrt dar. Dies gibt einen Hinweis auf unterschiedliche Lateralverteilungen der Liganden in den beiden Zelllinien. Die Adhäsionsuntersuchung wurden dankenswerter Weise im Labor von Dr. Lubor Borsig, Universität Zürich, durchgeführt. Der Versuchsaufbau ist bei Garcia et al. beschrieben [292].

tigen, war es daher wichtig, die Lateralverteilung des Liganden in Modellmembranen konzentrationsabhängig zu charakterisieren. Es war die Frage zu klären, ob Mechanismen der SM4-Multimerisierung zu einer Aviditätserhöhung bei der Selektinbindung führen können. Eine solche Ligandanhäufung in Form von Clustern kann durch mikroskopische Untersuchung der Lateralverteilung des Liganden in Modellmembranen nachgewiesen werden.

4.3.1 Untersuchung der Lateralverteilung von Selektinliganden mittels LSM

Analog zu den Arbeiten von Vogel et al. [94] wurde das SM4-Sulfatid in zwei verschiedene Lipidmatrices in unterschiedlichen Konzentrationen eingebaut und mittels Langmuir-Blodgett-Methode auf Glasplättchen übertragen. Mithilfe der LSM konnte dann die unterschiedliche Verteilung eines lipidverankerten Fluoreszenzlabels (DiO) in Matrix und geclusterten Arealen als Indikator einer lateralen Separation untersucht werden. Bei den Lipidmatrices handelte es sich um DSPC (1,2-Distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin) und POPC (Palmitoyl-2-oleyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin).

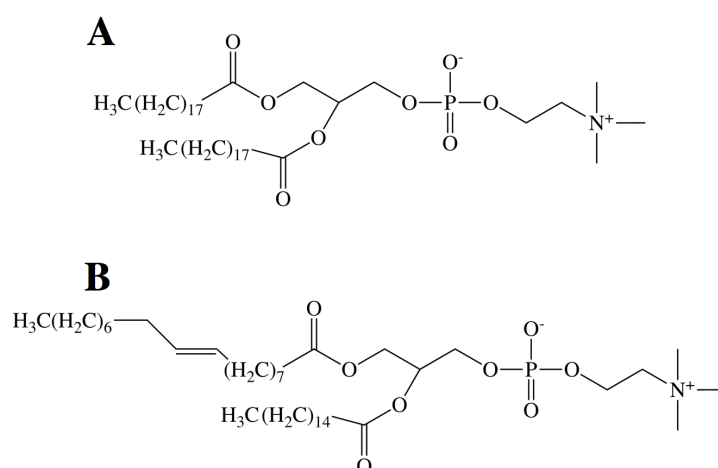


Abb. 4.10: Struktur von DSPC und POPC. **A:** DSPC ist ein rigides Matrixlipid, das neben dem Phosphocholinrest mit zwei Stearinsäuren am Glycerol verestert ist. **B:** POPC kann aufgrund seiner höheren Fluidität die Verhältnisse in biologischen Membranen besser simulieren. Neben dem Phosphocholinrest besitzt es Palmitin- und Ölsäure als Glycerolester.

DSPC weist mit seiner Phasenübergangstemperatur von 58 °C ein rigides Phasenverhalten auf. Daher bietet es sich als Modelllipid zur Darstellung von Phaseneigenschaften bestimmter Membrankomponenten an. Eine Konzentration von 0,5 mol% SM4-Sulfatid führt nicht zur sichtbaren Clusterbildung (nicht dargestellt). Der Fluoreszenzfarbstoff DiO ist homogen im Lipidfilm verteilt, so dass Helligkeitsunterschiede als Störungen des Lipidfilms durch den Kontakt mit Luft nach der Übertragung oder beim Fixieren des Glasplättchens auf dem Objektträger entstanden sein können. Der Einsatz von 5 mol% SM4-Sulfatid führt zu deutlicher Clusterbildung. Derartige Strukturen entstehen durch Entmischungsvorgänge einer oder mehrerer Membrankomponenten voneinander, die durch unterschiedliche physikochemische Eigenschaften der Lipide verursacht werden, wie sie zum Beispiel durch unterschiedliche Rigiditäten entstehen können. Die Mengenabhängigkeit der Clusterbildung ist in Abbildung 4.12 gut zu erkennen. Nach Überschreitung einer Mindestkonzentration nimmt die Größe der SM4-beinhaltenden Areale konzentrationsabhängig zu. Die Zustände in biologischen Membranen werden durch DSPC nur ungenügend dargestellt, da sich physiologische Lipidfilme durch eine hohe Fluidität auszeichnen. POPC ist ein solches Modelllipid, das durch seine höhere Fluidität eine bessere Mischbarkeit mit anderen Lipiden erwarten lässt.

SM4 zeigt auch nach Einbau in POPC-Filme die Ausbildung von Clusterstrukturen. Der Einbau von 0,5 mol% und 2 mol% zeigt keine erkennbaren Clusterareale. Die Phasenseparation setzt erst ab einem SM4-Gehalt von 5 mol% und höher ein. Dabei

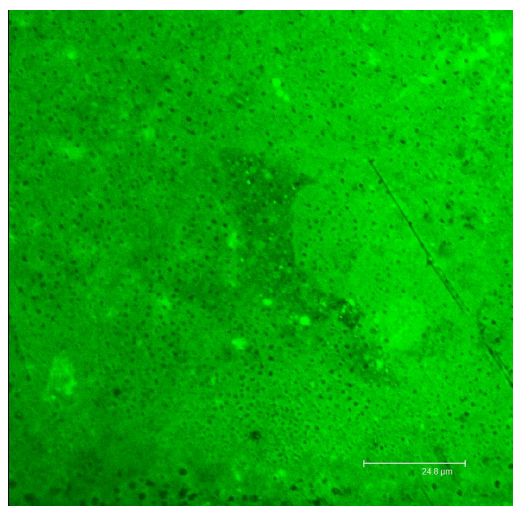


Abb. 4.11: DSPC + 10mol% SM4

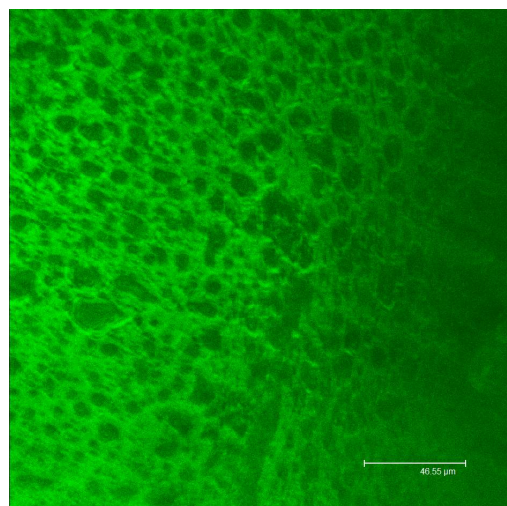


Abb. 4.12: DSPC + 20mol% SM4

unterscheiden sich Ausmaß und Erscheinung deutlich von den gleich konzentrierten DSPC-Filmen. Abbildung 4.13 und 4.14 zeigen, dass die SM4-Cluster in POPC bei 10 mol% SM4-Gehalt zwar etwas größer, gleichzeitig aber weniger zahlreich vorhanden sind. Unterschiede in der Clustergröße wie sie in der DSPC-Matrix für 10 mol% und 20 mol% gut zu erkennen sind, findet man in der POPC-Matrix nicht derart stark ausgeprägt wieder. In POPC-Filmen mit 20 mol% SM4 sind die Ligandcluster von hellen Rändern umgeben. Hier wird der Fluoreszenzfarbstoff offensichtlich auch aus der POPC-Membran verdrängt und reichert sich an der Phasengrenzfläche an. Im Vergleich zum gleich konzentrierten DSPC-Film sind die Cluster bei POPC in geringerer Anzahl vorzufinden. Gleichzeitig heben sie sich weniger stark vom Hintergrund ab. All dies deutet darauf hin, dass SM4 eine gewisse Restmischbarkeit in POPC besitzt, während es in DSPC in höherem Maße aus der Matrix herausgedrängt wird. Demnach wird ein gewisser SM4-Anteil in der POPC-Matrix verteilt vorliegen, wohingegen die dunklen Cluster ausschließlich SM4 beinhalten.

Um einen Vergleich mit dem physiologischen Selektinbindungsepitop sLe^X ziehen zu können, wurde ein sLe^X -Derivat, das von Dr. Christian Gege, Universität Konstanz, synthetisiert wurde, in steigenden Konzentrationen in POPC-Membranen eingebaut und mittels LSM untersucht [95].

Die Abbildungen 4.15 und 4.16 zeigen deutliche Clusterstrukturen. Im Gegensatz zu SM4-Clustern heben diese sich hell vom Untergrund ab. Im SM4 sorgen die im Vergleich mit sLe^X - TEG_{N2} kleinere Kopfgruppe und die höhere Rigidität des Ceramidankers gegenüber dem Dialkylglycerolanker für eine dichtere Anordnung der Bindungsepitope in den Clustern. Die höhere Rigidität ist auch mit dem Vorhandensein von Wasserstoffbrücken-Donor- und -Akzeptorgruppen wie NH oder CO im

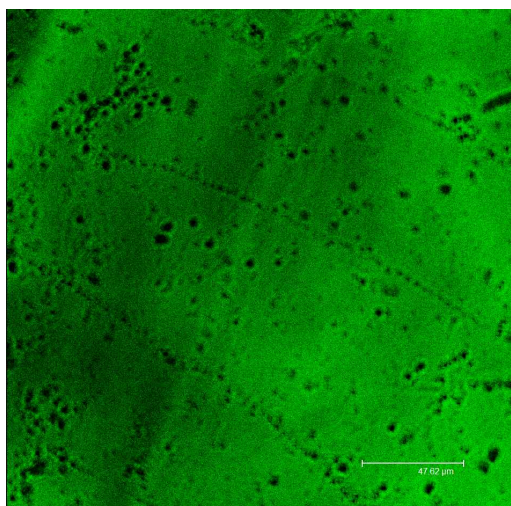


Abb. 4.13: POPC + 10mol% SM4

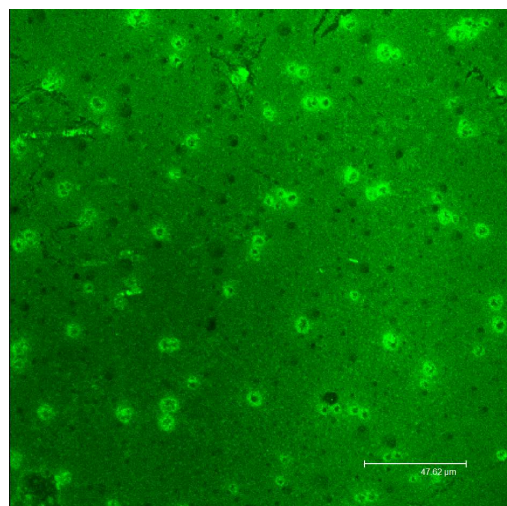


Abb. 4.14: POPC + 20mol% SM4

Ceramid zu erklären, so dass stärkere intermolekulare Wechselwirkungen eingegangen werden können als im sLe^X - TEG_{N2} . Es ist somit anzunehmen, dass DiO zwischen sLe^X - TEG_{N2} -Moleküle eingelagert werden kann (siehe Abbildung 4.18). sLe^X - TEG_{N2} besitzt eine geringere Restmischbarkeit in POPC als SM4, was durch die Größe der Cluster verdeutlicht wird. Die „Querstreifung“, die auf einigen Abbildungen zu erkennen ist, entsteht durch die Übertragung des Lipidfilms mithilfe der Langmuir-Blodgett-Methode. Der so genannte Filmlift, der dabei zum Einsatz kommt, wird zwar kontinuierlich bewegt, scheinbar kommt es aber doch zu übersetzungsbedingten Verzögerungen in der Bewegung, die ein verändertes Übertragungsverhalten des Lipidfilms als Folge haben.

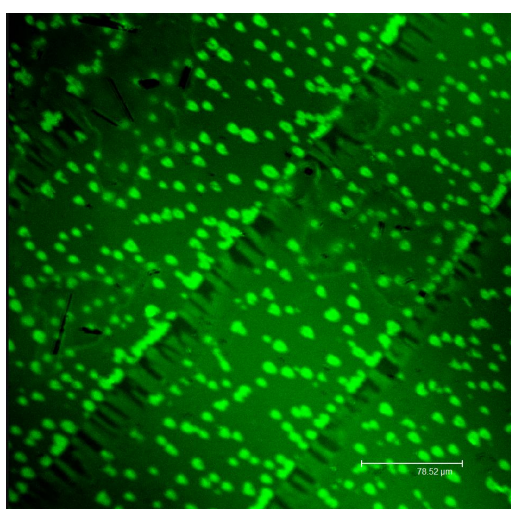


Abb. 4.15: POPC+10mol% sLe^X - TEG_{N2}

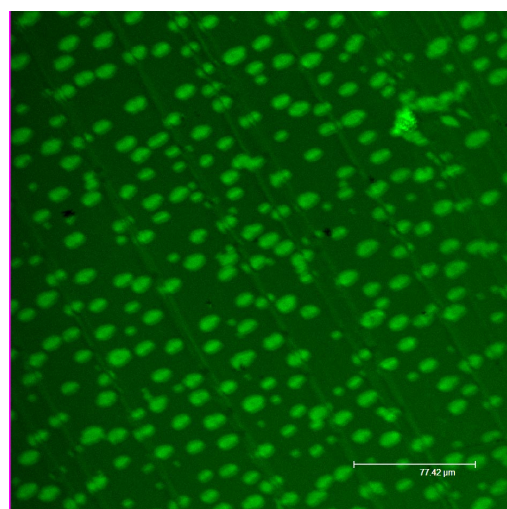


Abb. 4.16: POPC+20mol% sLe^X - TEG_{N2}

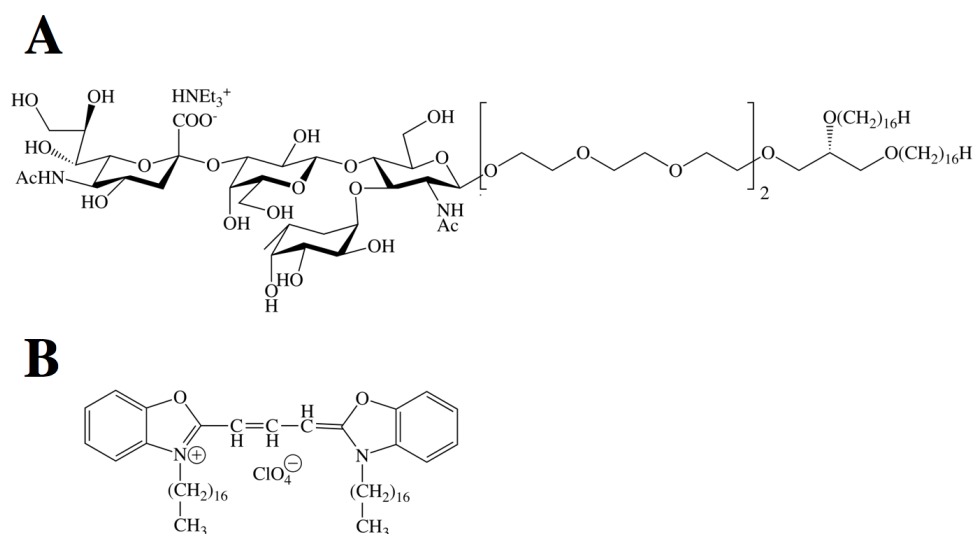


Abb. 4.17: Struktur von sLe^X -TEG_{N2} (A) und von DiO (B).

Das POPC-Modell zeigt, dass SM4 grundsätzlich in der Lage, ist konzentrationsabhängig Clusterstrukturen auszubilden. Ähnlich wie bei sLe^X -TEG_{N2} könnte dies zu einer deutlichen Aviditätserhöhung im Vergleich zum Einzelepitop führen. Vogel et al. konnten zeigen, dass die konzentrationsabhängige Clusterung von sLe^X das Rollverhalten von Selektinligand-haltigen Zellen *in vitro* stark beeinflusst (siehe Kapitel 2.1.3) [94]. Ähnliches ist für die Adhäsion von MC38-Zellen im Rahmen der hämatogenen Metastasierung zu erwarten. Die im Modell eingesetzten SM4-Konzentrationen, die zu einer Clusterung führten, sind unphysiologisch hoch. Die Untersuchungen mittels LSM sind nicht in der Lage, Mikrocluster von wenigen SM4-Molekülen zu detektieren. Es ist aber durchaus anzunehmen, dass auch derart kleine Ligandanhäufungen zu einer Aviditätserhöhung führen. Zellen haben andere Mechanismen als die bloße Konzentrationsabhängigkeit, um Membranbestandteile in Form von Clustern anzuordnen. Membranproteine können zum Beispiel die Zusammensetzung von biologischen Membranen stark beeinflussen und Membranbausteine in eine bestimmte Anordnung drängen.

Das hier vorgestellte Modell gibt einen ersten Einblick in die Möglichkeiten der Aviditätssteuerung des „neuen“ P-Selektin-Liganden SM4. Die anschließenden Biosensoruntersuchungen mit SM4-beihaltenden Modellmembranen wurden deshalb unter Berücksichtigung der konzentrationsabhängigen Clusterung des Liganden durchgeführt.

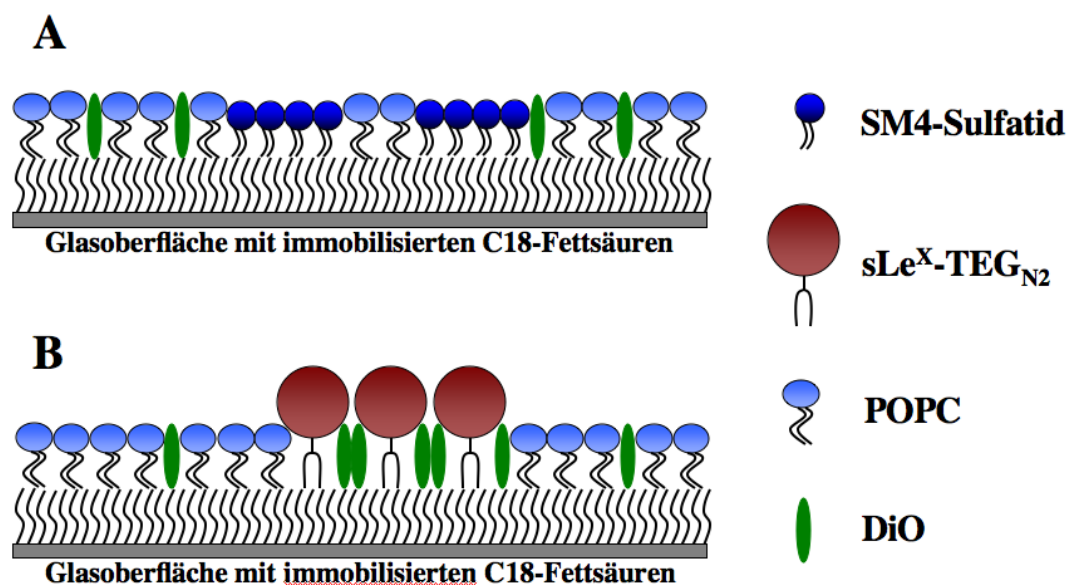


Abb. 4.18: Ausbildung von dunklen SM4-Clustern und hellen sLe^X-TEG_{N2}-Clustern durch unterschiedliche Einlagerungstendenz des Farbstoffs DiO. **A:** Die Kopfgruppe von SM4-Sulfatid wird durch sulfatierte Galaktose gebildet. Durch die vergleichsweise geringe Größe der SM4-Kopfgruppe und den intermolekularen Wechselwirkungen im Bereich des Ceramidankers wird der Fluoreszenzfarbstoff DiO nicht innerhalb der Clusterstrukturen eingelagert. Daher erscheinen sie dunkel. **B:** Die sLe^X-TEG_{N2}-Kopfgruppe ist größer und die Wechselwirkungen der Ankeranteile sind vergleichsweise gering. Dadurch werden die hydrophoben Anteile des Moleküls derart auf Abstand gehalten, dass sich der Fluoreszenzfarbstoff DiO zwischen die Kopfgruppen einlagern kann. Die Cluster erscheinen hell.

4.3.2 Bindung von mP-Selektin-Fc-Chimären an Ligand-haltigen Modellmembranen

Nach der Charakterisierung der Lateralverteilung der Selektinliganden in Modellmembranen wurden diese mithilfe der Langmuir-Blodgett-Methode auf Quarzsensoren übertragen, auf deren Oberfläche im Vorfeld Alkylketten immobilisiert wurden. Durch diese Technik erhält man so genannte „supported bilayer“. Mithilfe des QCM-Sensors sollte die Bindungskinetik von mP-Sel-Fc-Chim. an Sulfatiden bestimmt und der Einfluss der Clusterung auf die Avidität untersucht werden. Des Weiteren sollte überprüft werden, inwieweit diese Wechselwirkung im Modell durch Heparin inhibiert werden kann. Abbildung 4.19 A stellt die Frequenzänderungen der Bindung von hP-Sel-Fc-Chim. an immobilisierten DSPC-Lipidfilmen mit unterschiedlichen Konzentrationen an SM4-Sulfatid dar.

Die Daten zeigen, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen der Bindung an reinen Modellmembranen und SM4-Sulfatid-beihaltenden Lipidfilmen bestehen.

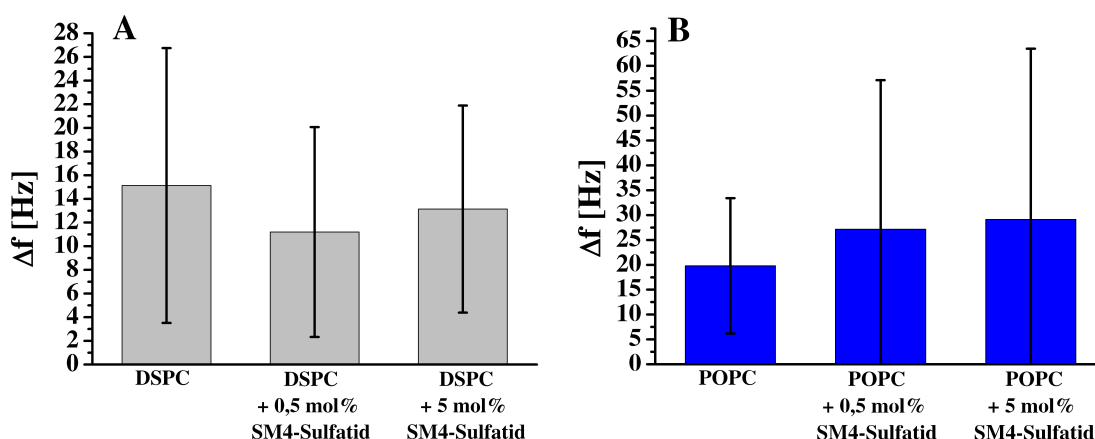


Abb. 4.19: Bindung von mP-Sel-Fc-Chim. an DSPC- und POPC-Modellmembranen. Nach Zugabe von $1,04 \cdot 10^{-8}$ M ($\cong 5 \mu\text{g}$ in 3 mL) mP-Sel-Fc-Chim. und Verschaltung der Analytlösung im Rundlauf, so dass P-Selektin die Modellmembran immer wieder passieren kann, ergaben sich nach Gleichgewichtseinstellung die abgebildeten Frequenzveränderungen durch Bindung von P-Selektin an den benannten Modellmembranen.

Unspezifische Wechselwirkungen scheinen im Vordergrund zu stehen. Die Messwerte besitzen eine sehr hohe Standardabweichung. Aus den nicht abgebildeten Frequenzverläufen lassen sich keine kinetischen Parameter extrahieren, da die zur Verfügung stehenden Modelle nicht adäquat angewandt werden können.

Für die Wechselwirkung von mP-Sel-Fc-Chim. mit Modellmembranen aus SM4 in POPC ergaben sich die absoluten Frequenzänderungen aus Abbildung 4.19 B. Mit steigender Sulfatid-Konzentration nimmt die Zahl der Bindungsereignisse entsprechend der größeren Frequenzveränderungen zu. Zwar lässt die ansteigende durchschnittliche Frequenzveränderung eine konzentrationsabhängige Tendenz erkennen, die Streuung der Messwerte ist aber auch hier so hoch, dass keine signifikanten Unterschiede resultieren. Die hohe Affinität von mP-Sel-Fc-Chim. zu reinen POPC-Membranen gibt einen Hinweis auf den großen Einfluss unspezifischer Bindungsereignisse. Es ist vorstellbar, dass es zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den SCR oder der EGF-Domäne des Selektins und der POPC-Membran kommt. Gleichzeitig kann auch der Fc-Teil des Selektins mit der Modellmembran in Wechselwirkung treten, da das Selektin gelöst in der mobilen Phase auf die Membran trifft und somit alle Richtungen im Raum einnehmen kann.

Durch Veränderung der Versuchsparameter wie Fließgeschwindigkeit, Selektinkonzentration, Ligandkonzentration, Pufferzusammensetzung oder durch Modulierung der Injektionsschemata konnten die dargestellten Ergebnisse nicht substantiell verbessert werden. Verschiedene weitere Gründe können für die hier beschriebenen Probleme verantwortlich sein. Es ist denkbar, dass in Lipidfilmen mit niedriger SM4-Konzentration die Affinität der Einzelbindung oder die Avidität bei einsetzender

Clusterung nicht ausreichen, um P-Selektin detektierbar zu binden. Bei höher konzentrierten Lipidfilmen könnte durch die Clusterung die Zugänglichkeit der SM4-Epitope für P-Selektin eingeschränkt sein. Auf technischer Seite bleibt festzuhalten, dass die Sensitivität der Quarzmikrowaage und die Reproduzierbarkeit gleicher Frequenzveränderungen für gleiche Versuchsbedingungen nicht ausreichen, mögliche Unterschiede zwischen Sulfatid-freien und Sulfatid-haltigen Modellmembranen aufzulösen.

4.3.3 Liposomen als Tumorzellmodelle

Die Bindung von löslichem P-Selektin an Ligand-haltigen Lipidmatrices brachte nicht die Erkenntnisse, die zum Verständnis der Sulfatid-vermittelten Selektinwirkung wünschenswert sind. Eine Umkehr des Messsystems, bei dem P-Selektin immobilisiert auf dem Biosensor vorliegt und SM4 in liposomale Membranen eingebaut als Modell für eine Tumorzelle diente, repräsentierte die Situation der Metastasierung besser. Dazu wurden SM4-haltige POPC-Liposomen mit der Filmhydratationsmethode hergestellt. Nach mehrfacher Extrusion konnte durch Photonenkorrelationsspektroskopie die Partikelgrößenverteilung analysiert werden. Dabei zeigte sich, dass die Liposomen eine durchschnittliche Größe von 100 nm und gleichzeitig ein enge Größenverteilung (Polydispersitätsindex $< 0,1$) aufwiesen.

Als Vergleichsmodell wurden POPC-Liposomen ohne SM4-Sulfatid hergestellt. Dadurch konnten spezifische SM4-vermittelte Bindungsereignisse von unspezifischen Bindungen unterschieden werden. Nach zahlreichen Voruntersuchungen wurde eine Menge von 0,03 μmol Liposomen für die weiteren Versuche verwendet. Bezogen auf die eingesetzten Volumina entsprach dies einer Konzentration von 10 μM . Die Selektin-Immobilisierungsstrategie wurde von den Heparin-Bindungsuntersuchungen übernommen. Während Liposomen mit 0,5 mol% bis 5 mol% SM4-Sulfatid zwar bereits tendenziell steigende Bindungswerte an P-Selektin aufwiesen, wurde der Unterschied jedoch erst ab 10 mol% SM4-Anteil signifikant im Vergleich zu Ligand-freien Liposomen (siehe Abbildung 4.20).

Ob die konzentrationsabhängige Bindungsfähigkeit der SM4-Liposomen in der Präsentation des Liganden in Form von Clustern begründet liegt oder nur im Mengenverhältnis von Bindungsepitopen zu Matrixlipiden, kann an dieser Stelle nicht geklärt werden. Die grundsätzliche Fähigkeit zur Separation von Membranbestandteilen aufgrund verschiedener physikochemischer Eigenschaften ist auch im Liposomenmodell anzunehmen. Die Verhältnisse in einem planaren Lipidfilm, der durch die Langmuir-Blodgett-Technik verdichtet und zu Separationsvorgängen forciert wird, sind nicht automatisch auf das Liposomenmodell übertragbar. Es bleibt aber festzuhalten, dass die Liposomenbindung erst in den Konzentrationsbereichen signifikant unterschiedlich

zum Blindwert wurde, bei denen auch im planaren Filmmmodell deutliche Cluster erkennbar wurden.

Um auch für dieses Modell einen direkten Vergleich zwischen SM4-Sulfatid und sLe^X ziehen zu können, wurden sLe^X -TEG_{N2}-haltige Liposomen nach der gleichen Methode hergestellt und die Bindung an mP-Sel-Fc-Chim. im Vergleich zu ligandfreien POPC-Liposomen bestimmt. Diese Liposomen zeigten die gleiche Größenverteilung wie SM4-Liposomen.

Die Bindung von sLe^X -TEG_{N2}-haltigen Liposomen unterscheidet sich signifikant von der Bindung reiner POPC-Liposomen an mP-Sel-Fc-Chim. Es fällt auf, dass der absolute Frequenzunterschied zwischen der Bindung von SM4-Liposomen und sLe^X -TEG_{N2}-Liposomen im Mittel etwa 40 Hz beträgt. Aus diesem Unterschied erkennt man, dass das SM4-Liposomenmodell eine höhere Avidität zu mP-Selektin aufweist als das sLe^X -TEG_{N2}-Modell. Die Unterschiede können nicht mit der Sauerbrey-Gleichung quantifiziert werden, da Liposomen aufgrund ihrer Größe nicht als Ganzes vom QCM-System erfasst werden. Die erhaltene Frequenzänderung nach Liposomenbindung stellt wegen der Eindringtiefe der akustischen Welle nur einen Teil der tatsächlichen Massenauflagerung dar. Wenn man aber davon ausgeht, dass SM4- und sLe^X -TEG_{N2}-Liposomen unter den gleichen Versuchsbedingungen mit mP-Selektin wechselwirken können, gibt der beschriebene Frequenzunterschied einen Hinweis auf die Bindungseigenschaften dieser beiden Epitope.

Die Daten zeigen, dass die Umkehr des Messsystems, in der Selektinliganden auf Liposomen präsentiert werden und mit immobilisiertem P-Selektin wechselwirken können, erstmalig ein Modell zur Aufklärung der Sulfatid-vermittelten Selektinbindung auf molekularer Ebene darstellt.

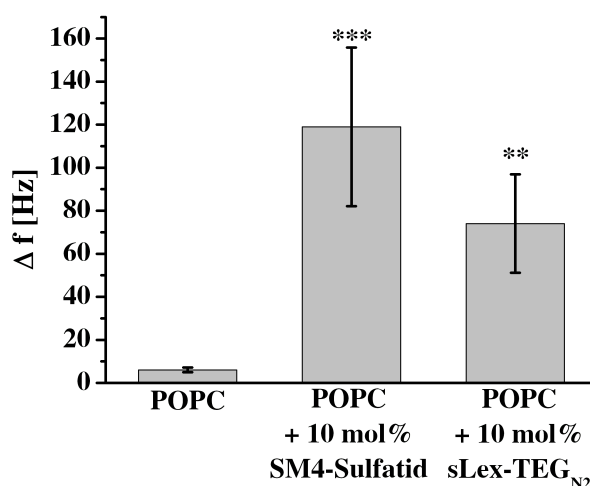


Abb. 4.20: Bindung von ligandfreien POPC-Liposomen und SM4- bzw. sLe^X -TEG_{N2}-haltigen Liposomen an mP-Selektin-Fc-Chimären.

4.3.4 Inhibition der Liposomenbindung durch Heparin

Die im vorhergehenden Kapitel vorgestellten Untersuchungen zur Bindungsfähigkeit Selektinligand-haltiger Liposomen waren wichtig, um die Anwendbarkeit dieses Tumorzellmodells auf die Inhibition der Sulfatid-vermittelten Selektinbindung durch Heparin zu überprüfen. Deshalb wurden die Liposomenzubereitungen unmittelbar vor der Injektion in den Biosensor mit unterschiedlichen Konzentrationen verschiedener Heparine versetzt. Diese Prozedur simuliert die physiologische Situation, bei der Tumorzellen in der Blutbahn zusammen mit Heparin um die Bindungsplätze endothelialen oder thrombozytären P-Selektins konkurrieren. Die experimentelle Anordnung dieses Modells ist in Abbildung 4.21 schematisch dargestellt.

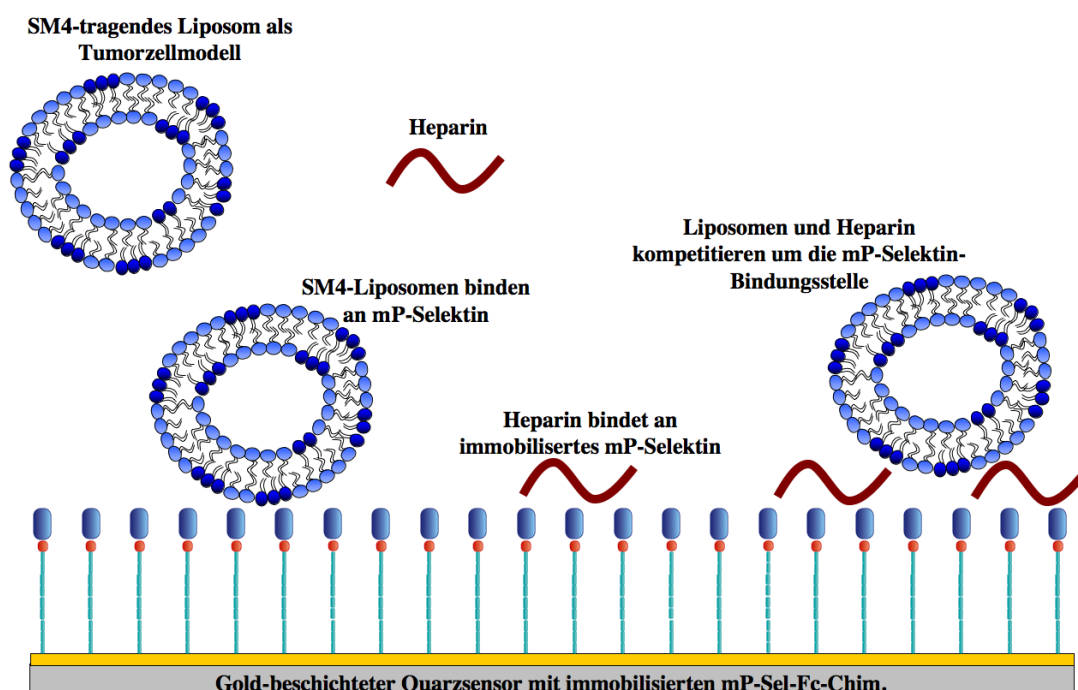


Abb. 4.21: Modell der experimentellen Inhibition der SM4-Liposomenbindung durch Heparin. SM4-haltige POPC-Liposomen können an immobilisierte mP-Sel-Fc-Chim. binden. Diese Bindung kann durch gleichzeitige Injektion von Heparin inhibiert werden. Geringere Liposomenbindung resultiert in einer geringeren Frequenzänderung der Quarzschwingung. Die Heparinbindung führt aufgrund der geringeren Masse zu niedrigeren Frequenzveränderungen als die Liposomenbindung.

Abbildung 4.22 zeigt die Inhibition der SM4-Liposomenbindung an immobilisierten mP-Sel-Fc-Chim. durch absteigende Liquemin N-Konzentrationen im Vergleich zu nicht-inhibierten SM4-Liposomen und reinen POPC-Liposomen. Es zeigt sich, dass die SM4-vermittelte Liposomenbindung an Selektin durch dieses UFH im niedrigen mikromolaren Bereich gehemmt werden kann. Auffällig ist die scheinbar geringere Inhibition durch die höchste der verwendeten Heparinkonzentrationen von $5,56 \cdot 10^{-6}$ M.

Aus isolierten Bindungsuntersuchungen von Liquemin N an P-Selektin ist bekannt, dass die Heparinbindung an P-Selektin selbst zu einer detektierbaren Massenveränderung auf der Quarzsensoroberfläche führt. Alle dargestellten Frequenzänderungen sind folglich als Summe aus Heparinbindung und Liposomenbindung an der Sensoroberfläche anzusehen. Für niedrigere Liquemin N-Konzentrationen scheint die Heparinbindung zwar stattzufinden, da die Liposomenbindung inhibiert werden kann, die dabei resultierenden Frequenzänderungen sind aber nicht mehr signifikant unterschiedlich zur unspezifischen Bindung der Liposomen, wie sie durch SM4-freie POPC-Liposomen hervorgerufen werden. Im Vergleich zur Inhibierbarkeit von MC38-Zellen durch Heparin an immobilisiertem P-Selektin zeigte sich auch im QCM-Modell ein ähnlicher Effekt. Durch die Minimierung der möglichen Bindungspartner in diesem Modell konnte erstmals die Inhibition der SM4-Sulfatid-P-Selektin-Wechselwirkung als Zielstruktur für Heparin nachgewiesen werden. Selbst wenn andere Heparineffekte im zellulären Modell einen Einfluss auf die Inhibition haben, zeigt sich, dass dieser Effekt auch durch die Selektinblockade alleine erklärbar ist.

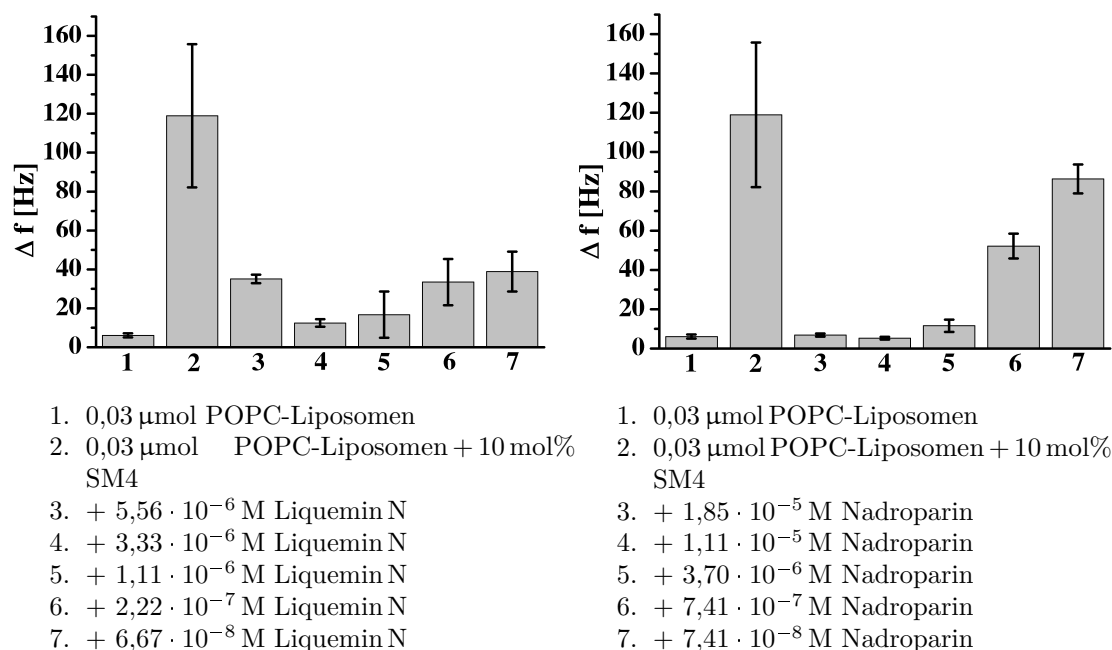


Abb. 4.22: Inhibition SM4-tragender Liposomen durch Liquemin N und Nadroparin.

Im Kapitel 4.1.5 zur Bestimmung der Bindungskonstanten von UFH und LMWH an P-Selektin wurde gezeigt, dass sich *in vivo*-Unterschiede zwischen diesen beiden Heparinvarietäten auf molekularer Ebene nicht so wiederfinden lassen, als dass die Überlegenheit der LMWH in der Klinik sich mit ihnen erklären ließe. Die Verwendung des LMWH Nadroparin sollte Aufschluss darüber geben, ob sich in einem erweiterten *in vitro*-Tumorzellmodell diese Unterschiede hingegen nachweisen lassen. Analog zu

den Kinetikuntersuchungen wurde Nadroparin mit gleicher Massenkonzentration wie Liquemin eingesetzt. Da Nadroparin eine um etwa zwei Drittel kleinere molare Masse besitzt als Liquemin N, wurden die 3fachen molaren Konzentrationen verwendet.

Es zeigte sich, dass auch Nadroparin in der Lage ist, die SM4-Liposomen durch Konzentrationen im hohen mikromolaren Bereich zu inhibieren. Die Eigenbindung von Nadroparin für die Konzentration von $1,85 \cdot 10^{-5}$ M lässt keine Unterscheidung zum POPC-Blindwert zu. Es fällt auf, dass die Inhibitionsfähigkeit bei den beiden geringsten Nadroparin-Konzentrationen abnimmt. Entsprechend bleibt festzuhalten, dass das UFH Liquemin N analog zu der höheren Affinität an isoliertem P-Selektin auch bessere Inhibitoreigenschaften besitzt. In Übereinstimmung mit Arbeiten verschiedener anderer Arbeitsgruppen kann postuliert werden, dass klinische Unterschiede in Studien nicht mit den *in vitro*-Eigenschaften der UFH-Selektin-Interaktion übereinstimmen. Vielmehr muss die Frage gestellt werden, ob die klinischen Studien, die als Vergleich der Inhibitorwirkung von UFH und LMWH angeführt werden, unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wurden. Es gibt bisher keine klinische Studie, bei der UFH zusammen mit LMWH unter gleichem Studiendesign untersucht wurden.

Einen tieferen Einblick in die Inhibition Selektin-vermittelter Bindungen im Tumorzellmodell sollte der Vergleich mit Inhibitionsdaten von sLe^X -TEG_{N2}-Liposomen ergeben. Bei der Inhibition durch Liquemin N zeigt sich für sLe^X -TEG_{N2}-Liposomen, dass Liquemin N-Konzentrationen im mikromolaren Bereich auch hier ausreichen, die Liposomenbindung auf das Niveau des Blindwertes zu reduzieren. Anders als bei SM4-Liposomen wird die Bindung durch die beiden niedrigsten verwendeten Konzentrationen weniger gut inhibiert. Diese Erkenntnis ist bemerkenswert, da sLe^X -TEG_{N2}-Liposomen ohne Inhibition Selektin weniger stark binden als vergleichbare SM4-Liposomen. Vergleicht man diese Daten mit den Daten des Adhäsionsassays von SM4 und sLe^X an immobilisiertem P-Selektin unter statischen Bedingungen (Abbildung 4.9), so lässt sich nun erklären, dass LS180 erst durch höhere Konzentrationen in ihrer Bindung gehemmt werden als MC38, obwohl isoliertes sLe^X durch geringere Heparinmengen inhibiert wird als SM4. Von sLe^X ist bekannt, dass es als Einzel-epitop nur eine geringe Affinität zu P-Selektin aufweist. Entsprechende SM4-Daten existieren nicht. Weiterhin ist beschrieben, dass sich die Bindungsdomänen für SM4 im P-Selektin und für sLe^X überschneiden, aber nicht deckungsgleich sind [293].

Die beschriebenen Daten zeigen, dass Selektinligand-haltige liposomale Tumorzellmodelle in der Lage sind, die Rolle der Selektine und die Inhibierbarkeit durch Heparin zu simulieren und zu verdeutlichen. Das Modell ist komplexer als die isolierte Betrachtung der Einzel-epitopbindung, da Prozesse der Ligandclusterung simuliert

werden können. Andererseits ist die Zahl der möglichen unspezifischen Wechselwirkungen geringer als im Zellmodell, so dass hier erstmals Heparin als Inhibitor der SM4-P-Selektin-Wechselwirkung zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte.

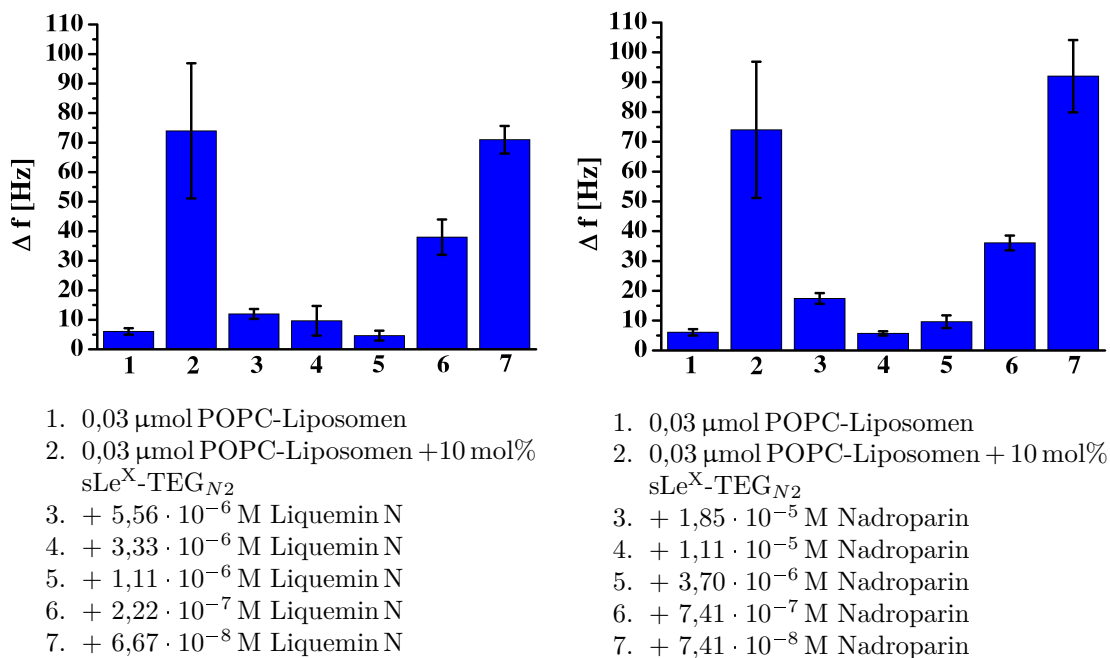


Abb. 4.23: Inhibition sLe^X-TEG_{N2}-tragender Liposomen durch Liquemin N und Nadroparin.

4.4 Untersuchung der VLA-4-Beteiligung an der Tumorzellmetastasierung mittels SAW-Biosensors

Grundlage für die Studien der folgenden Abschnitte bildeten die Vorarbeiten von Frau. Dr. Juliane Fritzsche, die mithilfe mikroskopischer Untersuchungen die Bindung von VLA-4 positiven B16F10-Melanomzellen an Endothelzellen und immobilisierten VCAM-1-Fc-Chimären untersucht hat. Dabei konnte sie als Effekt einer Heparininkubation die Inhibition der Zelladhäsion von B16F10-Zellen beobachten. Sie postulierte, dass die Inhibition durch die Interaktion von Heparin mit VLA-4 zu Stande kommt. Martin Schlesinger konnte die Erkenntnisse der murinen B16F10-Zelllinie auf die humane Melanomzelllinie MV3 übertragen. Auch für diese Zelllinie zeigte Heparin ein vielversprechendes Inhibitorpotential.

In den vorangegangenen Kapiteln erfolgte die Untersuchung der Adhäsionsrezeptor-Ligand-Wechselwirkung mittels Biosensoren auf molekularer Ebene, um die Bindungsmechanismen besser zu verstehen. Die Erweiterung dieser Modelle auf liposomale Tumorzellmodelle konnte zur Charakterisierung weiterer Einflussfaktoren herangezogen werden. Die meisten Zell-basierten experimentellen Ansätze können den Effekt einer Wechselwirkung sehr gut darstellen, geben aber meist nicht die Möglichkeit, den Prozess auf molekularer Ebene zu verfolgen. Die Kombination der Vorteile der Biosensorik mit der Anwendung von Zellmodellen stellt daher eine große Herausforderung für die Untersuchung molekularer Wechselwirkungen zwischen Rezeptoren, Liganden und potentiellen Inhibitoren dar. Die bisher vorgestellte QCM-Technik ist bei der Detektion zellulärer Adhäsionsprozesse verschiedenen Limitierungen unterworfen, wie sie in Kapitel 2.5.5 beschrieben sind. Dr. Matthias Höpfner aus unserer Arbeitsgruppe konnte in seiner Dissertation zeigen, dass bei der Detektion von zellulären Selektin-vermittelten Bindungen verschiedene Einflussfaktoren das Schwingungsverhalten der Quarzsensoren beeinflussten und dass nur ein sehr geringer Anteil der gemessenen Frequenzänderung der Selektin-Ligand-Wechselwirkung zuzuordnen war. Auf der anderen Seite wurde die Quarzschwingung durch die fluiden Eigenschaften der Zellen so stark gedämpft, dass die detektierte Masse scheinbar kleiner war als die tatsächlich anzunehmende [294].

Durch die erstmalige Anwendung der SAW-Technik zur Detektion Adhäsionsrezeptor-vermittelter Bindungsprozesse im Rahmen dieser Arbeit sollten die technischen Limitierungen der QCM-Technik umgangen werden. Die Anwendung der SAW-Methode zur Untersuchung der Rolle von Adhäsionsrezeptoren im Rahmen der hämatogenen Metastasierung sowie der Inhibitionspotenz durch Heparin sollten dadurch charakterisiert werden. Dabei wurde die Fragestellung der Inhibierbarkeit der VLA-4-

Interaktion durch Heparin auf verschiedenen Modellebenen bearbeitet. Es wurden sowohl zelluläre Untersuchungen als auch isolierte Rezeptor-Ligand-Bindungsstudien durchgeführt.

4.4.1 Optimierung der Messparameter für Zellbindungsuntersuchungen am SAW-Biosensor

VLA-4 vermittelte Adhäsionsrezeptorwechselwirkungen wurden bisher noch nicht mittels SAW oder einer anderen Biosensortechnik untersucht. Daher war es nötig, die verschiedenen experimentellen Parameter im Vorfeld zu optimieren. Da in einem ersten Schritt die Bindung VLA-4-exprimierende MV3-Melanomzellen untersucht werden sollte, wurde als immobilisierter Bindungspartner auf der Sensoroberfläche Natalizumab, ein humaner anti-VLA-4-mAb ausgewählt. Dieser Antikörper wird in der Therapie der Multiplen Sklerose eingesetzt. In den Vereinigten Staaten besitzt er darüber hinaus eine Zulassung zur Therapie von Morbus Crohn. In dieser Arbeit stellt er ein molekularbiologisches Werkzeug dar, um VLA-4-vermittelte Bindungsprozesse besser charakterisieren zu können. Natalizumab wurde uns dankenswerter Weise durch BiogenIdec, Ismaning, Deutschland, zur Verfügung gestellt.

Immobilisation von Natalizumab auf SAW-Sensoren

Die Immobilisation des Antikörpers auf der SAW-Sensoroberfläche erfolgte wie unter Kapitel 3.6.3 beschrieben. Abbildung 4.24 zeigt den Verlauf der Phasenveränderung während der Immobilisierungsroutine. Durch Vorarbeiten von Perpeet et al. ist bekannt, dass die Injektion einer Glycerollösung (5 % m/m) zu einer Phasenveränderung führt, die ausschließlich auf Viskositätseffekte an der Sensoroberfläche beruht [269]. Eine Glycerollösung dieser Konzentration führt dabei zu einem Ausmaß der Phasenveränderung wie sie auch durch eine immobilisierte Schicht aus Proteinen hervorgerufen wird. Die Computersoftware, die den Verlauf der Phasenveränderung verfolgt, ist in der Lage, mithilfe dieser Phasenverschiebung den Viskositätsanteil aus der Phasenverschiebung eines immobilisierten Proteins zu extrahieren. Die Protein-Phasenverschiebung wird demnach um einen Viskositätsanteil korrigiert. Anschließend kann die immobilisierte Proteinmenge anhand der verbleibenden Phasenverschiebung des Messsignals bestimmt werden. Hierzu untersuchte der Anbieter des SAW-Biosensors im Vorfeld sowohl fluoreszenzmarkierte als auch radioaktiv-markierte Proteine und immobilisierte diese auf der Sensoroberfläche. Die resultierenden Phasenverschiebungen wurden mit den Fluoreszenzintensitäten bzw. Radiosignalen der Proteine verglichen und korreliert. Sie zeigten darüber hinaus,

dass dieser Zusammenhang für strukturell verschiedene Proteine gilt und somit auch näherungsweise auf unbekannte Proteine übertragen werden kann. Gleichung 4.2 zeigt, dass 1 μg immobilisiertes Protein eine Phasenverschiebung von 515° bewirkt.

$$m \left[\frac{\text{g}}{\text{cm}^2} \right] = \frac{\Delta\phi [^\circ] \cdot 1 \cdot 10^{-6} \left[\frac{\text{g}}{\text{cm}^2} \right]}{515^\circ} \quad (4.2)$$

Für die Immobilisation von Natalizumab ergaben sich immobilisierte Proteinmassen von $15,3 \text{ ng/cm}^2 \pm 7,87 \text{ ng/cm}^2$ ($\cong 1,03 \cdot 10^{-13} \text{ mol/cm}^2 \pm 0,53 \cdot 10^{-13} \text{ mol/cm}^2$). Die genannten Mengen entsprechen nur einem Bruchteil der Proteinmengen, die zur Immobilisierung injiziert wurden (vgl. absolute injizierte Natalizumabmenge: $10 \mu\text{g}/160 \mu\text{L}$). Durch weitere Konzentrationserhöhungen konnten keine signifikant höheren Immobilisierungsmengen erreicht werden. Abbildung 4.24 zeigt, dass während des Injektionsprozess ein großer Anteil der injizierten Proteine unspezifisch an schon immobilisierte Proteine bindet, im anschließenden Pufferfluss aber weggespült wird. Die Verringerung der Konzentration führt hingegen zu signifikant geringeren immobilisierten Proteinmengen. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Ausbildung des NHS-Esters von der Proteinkonzentration abhängt und dass nur bei einer ausreichend hohen Konzentration eine Bedeckung der Goldschicht erreicht wird.

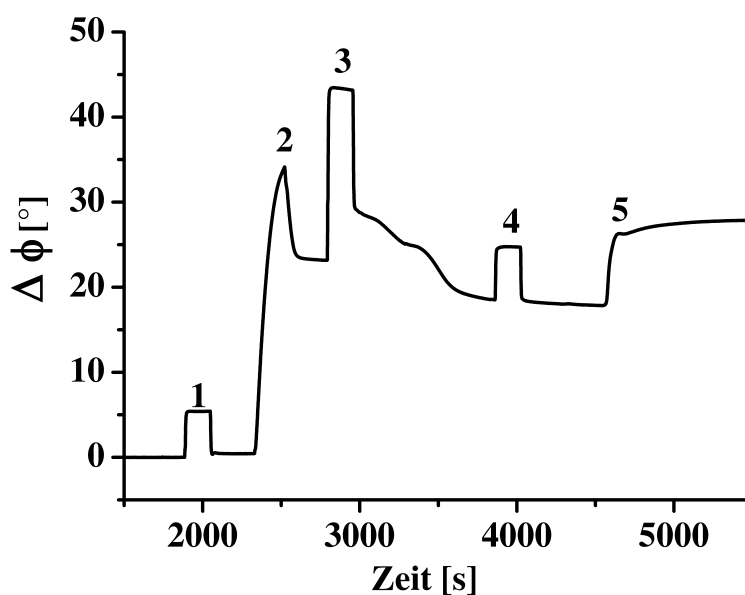


Abb. 4.24: Immobilisation von Natalizumab auf einem SAW-Sensorchip. Der mit MUA-beschichtete SAW-Sensor wird unter Pufferfluss äquilibriert und durch EDC/NHS-Injektion (**1**) aktiviert. **2:** Die Injektion der Natalizumab-Lösung führt zu einer starken Phasenverschiebung durch kovalente Bindung des Antikörpers an EDC/NHS. Unmittelbar nach Injektionsende werden unspezifisch gebundene Proteine durch den Pufferfluss abtransportiert. **3:** Die Injektion von Ethanolamin in Ammoniumacetat führt zur Absättigung verbliebener unspezifischer Bindungsstellen an EDC/NHS. **4:** Mithilfe der Injektion von Glycerol 5% kann im Anschluss der Viskositätsanteil der Phasenverschiebung im „Protein-signal“ extrahiert werden. Die dargestellte Phasenverschiebung für diese Injektion wird ausschließlich durch Viskositätseffekte hervorgerufen. **5:** Durch Wechsel des Fließmediums von Wasser zu PBS+ kommt es zur Veränderung der Basislinie aufgrund unterschiedlicher Viskositäten der Fließmedien.

Optimierung der Zellzahl

Durch Injektion steigender Zellzahlen wurde $1 \cdot 10^6$ als Zellzahl für alle weiteren Zellversuche am SAW-Sensor festgelegt. Wie Abbildung 4.25 A zeigt, steigt die Phasenverschiebung mit steigender Zellzahl. Um mögliche Inhibitionseffekte mit nicht-inhibierten Daten vergleichen zu können, wurde die Zellzahl so gewählt, um Unterschiede im Bindungsverhalten besser auflösen zu können. Die Verwendung noch höherer Zellzahlen ergab sich als problematisch, da die nötigen Volumina das maximale Injektionsvolumen von $300 \mu\text{L}$ überschritten. Kleinere Volumina führten bei Zellzahlen $> 10^6$ zur Verstopfung der Injektionsnadel.

Optimierung der Fließgeschwindigkeit

Die QCM-Untersuchungen durch Dr. Matthias Höpfner hatten gezeigt, dass bei der Bestimmung von Zellinteraktionen mittels QCM, Sedimentationserscheinungen der

Zellen zu Messsignalen führten, die spezifische Bindungen überlagerten. Durch Optimierung der Fließgeschwindigkeit während der SAW-Experimente wurde versucht, die Versuchsbedingungen so anzupassen, dass die Sedimentation als Störparameter zurückgedrängt wird und zugleich Zellen, die nur unspezifisch binden, von der Oberfläche entfernt werden. Abbildung 4.25 B zeigt, dass die Injektion von $1 \cdot 10^6$ MV3-Zellen ohne vorherige Stimulation mit Mn^{2+} mit steigender Fließgeschwindigkeit abnimmt. Während durch die ersten drei Schritte der Geschwindigkeitserhöhung noch deutliche Veränderungen der Phasenverschiebungen zu sehen sind, ist der Unterschied zwischen $100 \mu\text{L}/\text{min}$ und $200 \mu\text{L}/\text{min}$ weniger stark ausgeprägt. Um die injizierten Volumina in praktikablen Bereichen zu halten, wurde für alle folgenden Zellexperimente $100 \mu\text{L}/\text{min}$ als Fließgeschwindigkeit ausgewählt.

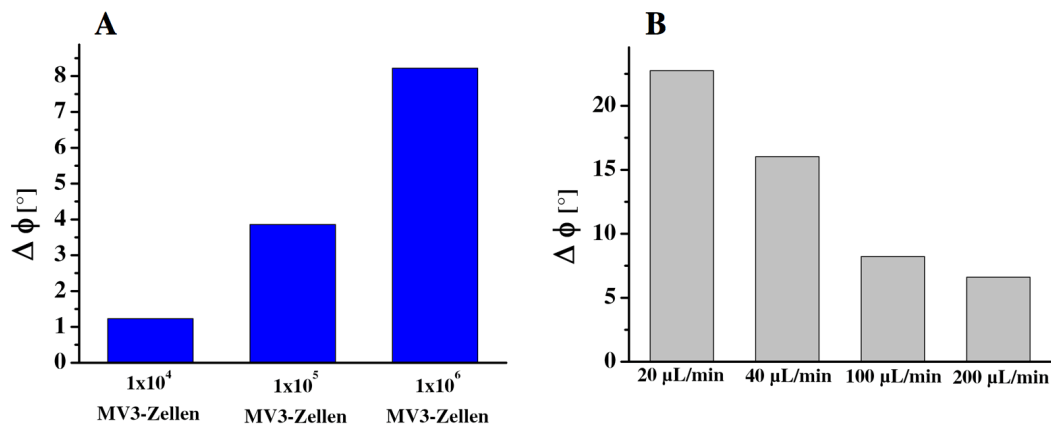


Abb. 4.25: Optimierung der Zellzahl und der Fließgeschwindigkeit für die Bindung von MV3-Zellen. **A:** Steigende Zellzahlen führen zu höheren Phasenverschiebungen aufgrund von häufiger stattfindenden Bindungsereignissen. Die Zellzahl von $1 \cdot 10^6$ erwies sich als bester Kompromiss zwischen Ausmaß der Phasenverschiebung und einfacher Applizierbarkeit. **B:** Die Injektion von $1 \cdot 10^6$ MV3-Zellen führt bei steigenden Fließgeschwindigkeiten zu einer Unterdrückung unspezifischer Bindungen und von Sedimentationsereignissen. Für die weiteren Versuche wurde eine Fließgeschwindigkeit von $100 \mu\text{L}/\text{min}$ gewählt. Eine statistische Betrachtung der Daten wurde wegen einer zu geringen Anzahl unabhängiger Experimente nicht durchgeführt.

4.4.2 Einfluss der Integrinaktivierung auf die Zellbindung an immobilisiertem VCAM-1 und Natalizumab

Affinität und Avidität der Integrine können durch unterschiedliche Stimuli gesteuert werden. Physiologisch erfolgt die Erhöhung der Affinität durch die Änderung der Konformation innerhalb der Ligandbindungsstelle des Integrins. Diese kann zum Beispiel durch Chemokine ausgelöst werden. Artifizuell kann eine derartige

Konformationsänderung durch monoklonale Antikörper, Phorbolster oder durch zweiwertige Kationen wie Mn^{2+} oder Ca^{2+} ausgelöst werden. Von isolierten αM -I-Domänen weiß man, dass sie in unterschiedlichen Konformationen kristallisieren können. Nach Anwesenheit oder Abwesenheit der genannten Kationen nennt man die entsprechenden Zustände „offene“ und „geschlossene“ Konformation [295]. Die Untersuchung der Integrinaktivierung durch Mn^{2+} für MV3-Zellen am SAW-Biosensor diente zwei Zielen. Erstens sollte durch die Detektion von Bindungsunterschieden für stimulierte und nicht-stimulierte MV3-Zellen der Nachweis erbracht werden, dass es sich bei den detektierten Phasenverschiebungen für die Bindung der Zellen an Natalizumab um spezifische Bindungen handelt. Zweitens wäre durch dieses Experiment sichergestellt, dass VLA-4, das auf MV3-Zellen exprimiert wird, in verschiedenen Affinitätszuständen vorliegen kann.

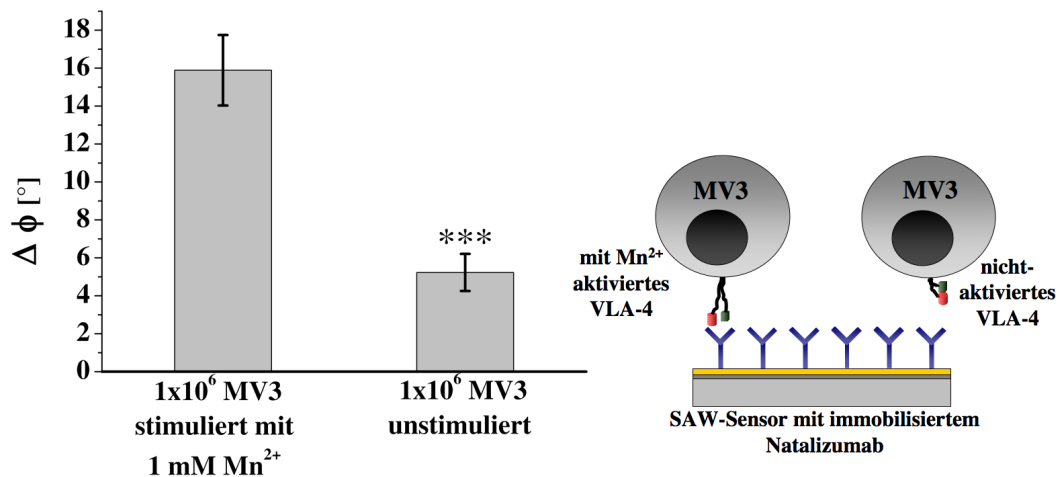


Abb. 4.26: Einfluss der Integrinaktivierung auf die Bindung von MV3-Zellen an immobilisiertem Natalizumab. Mit 1 mM Mn^{2+} stimulierte MV3-Zellen binden signifikant stärker an immobilisiertem Natalizumab als unstimulierte Zellen.

Aus Abbildung 4.26 geht hervor, dass unstimulierte MV3-Zellen im SAW-Experiment signifikant schlechter an immobilisiertem Natalizumab binden als stimulierte Zellen. Dies bestätigt zum einen die schon bekannte Affinitätserhöhung des VLA-4 durch entsprechende Stimulation, es zeigt aber vor allem, dass die gemessenen Phasenverschiebungen zum überwiegenden Teil auf spezifische Bindung zwischen VLA-4 und Natalizumab zurückzuführen sind. Die Bindung unstimulierter Zellen ergibt sich aus der Summe unspezifischer Wechselwirkungen und der Restaffinität des VLA-4 zu seinem Antikörper Natalizumab in der geschlossenen Konformation.

Darüber hinaus verdeutlicht dieses Experiment, dass die Phasenverschiebung, die durch die Bindung von Zellen am SAW-Sensor bestimmt wird, ähnlich wie beim QCM-Assay nicht die reelle Masse der Zelle repräsentiert. Der Sensor ist aber

deshalb umso mehr für die Detektion Adhäsionsrezeptor-vermittelter Bindungen geeignet, da Massenunterschiede zwischen verschiedenen Zellen, der Einfluss der Viskosität der Zellen oder die Fähigkeit der Zellen, mit der Oszillatorschwingung in Resonanz zu schwingen, in den Hintergrund treten. Möglich wird dies durch die geringe Eindringtiefe der Love-Welle in die aufgelagerte Masse kombiniert mit der hohen Schwingfrequenz von 150 MHz. Nach der Sauerbrey-Gleichung geht die Erhöhung der Schwingfrequenz des Quarzsensors mit einer massiven Erhöhung der Sensitivität einher. Deshalb können zelluläre, Rezeptor-vermittelte Wechselwirkungen bei 150 MHz detektiert werden, was bei 10 MHz im QCM-Assay nicht möglich ist.

Abbildung 4.27 verdeutlicht den Zusammenhang zwischen Eindringtiefe der akustischen Welle und den Folgen für die Messung von Zellbindungen.

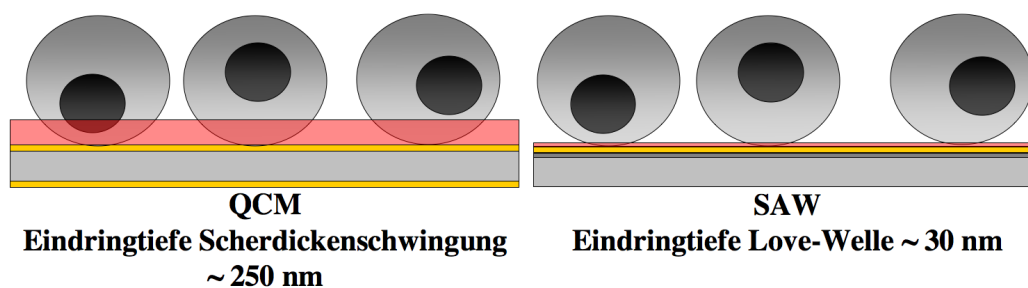


Abb. 4.27: Bedeutung der Eindringtiefen der akustischen Wellen bei QCM und SAW. Aufgrund der unterschiedlichen Ausbreitungsrichtung von Scherwellenschwingung und Love-Welle sind beide akustischen Wellen durch unterschiedliche Eindringtiefen in aufgelagerte Substrate charakterisiert. Diese ist von der Grundfrequenz der Quarzschwingung abhängig. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Geräten LiquiLab21[®] und S-sens[®] K5 liegen die Eindringtiefen der Scherwellenschwingung bei ~ 250 nm und die der Love-Welle bei ~ 30 nm. In beiden Ansätzen ist es nicht möglich, exakte Zellmassen zu bestimmen. Das SAW-Experiment eignet sich aber für die Detektion Adhäsionsrezeptor-vermittelter Bindungsprozesse, ohne dass die Eigenmasse der Zelle die erhaltenen Signale überdeckt.

4.4.3 Untersuchung der Wechselwirkung von Heparin mit VCAM-1 und Natalizumab

Aufbauend auf der grundsätzlichen Detektierbarkeit der Bindung von MV3-Zellen an immobilisiertem Natalizumab wurde unter den gleichen Versuchsbedingungen die Inhibitionsfähigkeit dieser Bindung durch Heparin untersucht. Im mikroskopischen Zelladhäsionsassay konnte die Blockade von VLA-4 durch Heparin belegt werden. Zusätzlich zeigten Versuche mit FITC⁴-gelabeltem Heparin, dass dieses sich an die VLA-4-positiven Zellen anlagert [242]. Um diese Ergebnisse zu verifizieren, wurden

⁴Fluoresceinisothiocyanat

VCAM-1-Fc-Chimären wie unter 3.5.2 beschrieben auf QCM-Sensoren immobilisiert. Die Immobilisation wurde mithilfe von anti-VCAM-1-mAb überprüft, wobei gleichzeitig erstmals die Bindungskinetik für diesen Antikörper an VCAM-1 bestimmt wurde. Heparin zeigte bei unterschiedlichen Konzentrationen im Bereich von $5,81 \cdot 10^{-8}$ M bis $5,81 \cdot 10^{-3}$ M keine Frequenzänderung, die auf eine Bindung an VCAM-1 hingewiesen hätte. Bei der Wiederholung der Versuche am SAW-Sensor, um dessen höhere Sensitivität zu nutzen, konnte ebenfalls keine Bindung im genannten Konzentrationsbereich detektiert werden. In letztgenannten Versuchen wurde das LMWH Tinzaparin verwendet, das sich im mikroskopischen Zelladhäsionsassay als besonders guter Inhibitor der MV3-Adhäsion an immobilisiertem VCAM-1 erwiesen hatte. Die Untersuchung der Bindung von Natalizumab an VCAM-1 zeigte im Konzentrationsbereich von 10^{-9} M bis 10^{-4} M keine detektierbaren Phasenverschiebungen. Ebenso konnte keine Heparinbindung an immobilisiertem Natalizumab für Konzentrationen $< 10^{-3}$ M detektiert werden.

Die hier beschriebenen Experimente zeigen deutlich, dass die Heparinwirkung im mikroskopischen Assay nicht durch eine Wechselwirkung mit VCAM-1 hervorgerufen worden sein kann. Für die anschließenden Biosensoruntersuchungen kann darüber hinaus eine Wechselwirkung mit dem VLA-4-bindenden Antikörper Natalizumab ausgeschlossen werden.

Tab. 4.8: Kinetische Bindungskonstanten zur Bindung von anti-VCAM-1-mAb an immobilisierten hVCAM-1-Fc-Chimären und Ausschluss der Bindung von Liquemin N, Tinzaparin und Natalizumab.

	K_D [M]	k_{Ass} [$M^{-1}s^{-1}$]	k_{Diss} [s^{-1}]
anti-VCAM-1-mAb	$9,51 \cdot 10^{-10}$ $\pm 0,07 \cdot 10^{-10}$	$2,83 \cdot 10^5$ $\pm 0,13 \cdot 10^5$	$2,70 \cdot 10^{-4}$ $\pm 0,03 \cdot 10^{-4}$
Liquemin N	nicht detektierbar		
Tinzaparin	nicht detektierbar		
Natalizumab	nicht detektierbar		

4.4.4 Inhibition der Bindung von MV3-Melanomzellen durch Heparin

Nach Optimierung und Validierung des SAW-Zellbindungsassays wurde im nächsten Schritt die Inhibitionsfähigkeit von Tinzaparin mit der von Natalizumab verglichen. Tinzaparin ist ein LMWH, das sich durch einen hohen Anteil längererkettiger Heparinmoleküle und zudem durch eine enge Molekülgrößenverteilung auszeichnet. In vorhergehenden Versuchen hatte sich Tinzaparin als potenter Inhibitor der VLA-4-vermittelten Adhäsion von MV3-Zellen erwiesen.

In einer ersten Versuchsreihe wurde die Inhibitionsfähigkeit von Tinzaparin bei der Bindung von MV3-Zellen an immobilisiertem Natalizumab untersucht. Die Versuchsbedingungen wurden so gewählt wie in Kapitel 3.6.6 beschrieben. Die Präinkubation der MV3-Zellen mit Tinzaparin führte zu einer signifikanten Reduktion der Phasenverschiebung bei der Bindung der Zellen (siehe Abbildung 4.28). Immobilisiertes Natalizumab bindet spezifisch die α -Untereinheit des VLA-4. Die Blockade dieser Bindung durch Tinzaparin zeigt, dass Heparin entweder selbst an der α -Untereinheit bindet und damit die Natalizumab-Bindungsstelle blockiert oder durch Bindung an einen anderen Molekülteil eine sterische Behinderung für die Antikörperbindung darstellt. Darüber hinaus ist ein allosterischer Inhibitionsmechanismus denkbar, bei dem durch Bindung von Tinzaparin an einer anderen als der Natalizumab-Bindungsdomäne die Konformation von VLA-4 so verändert wird, dass die Antikörperbindung nicht mehr möglich ist.

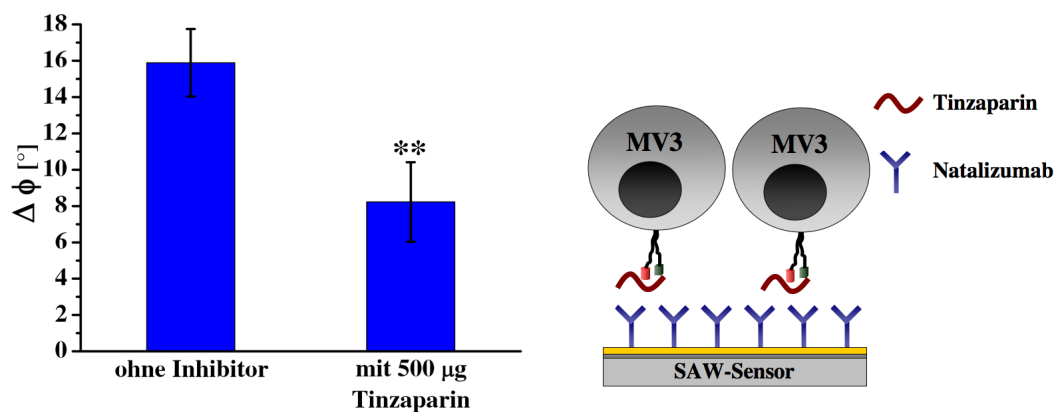


Abb. 4.28: Inhibition der MV3-Bindung an immobilisiertem Natalizumab durch Tinzaparin. Die Bindung von $1 \cdot 10^6$ MV3-Zellen nach vorheriger Stimulation mit 1 mM Mn^{2+} kann durch $500 \mu\text{g}$ Tinzaparin signifikant inhibiert werden.

Im Gegensatz zu Natalizumab ist die VLA-4-VCAM-1-Bindung nur möglich, wenn das Immunglobulin an den β -Propeller der α -Untereinheit und an die I-ähnliche Domäne der β -Untereinheit binden kann. Deshalb stellte die Untersuchung der

Inhibitionspotenz von Tinzaparin bei der Bindung von MV3-Zellen an immobilisierte VCAM-1-Fc-Chimären den nächsten Schritt zur Charakterisierung dar. Zum Vergleich wurden die Zellen mit Natalizumab inkubiert, um die Inhibitionspotenz des Tinzaparins quantifizieren zu können. Dabei zeigte sich, dass stimulierte MV3-Zellen im SAW-Assay an VCAM-1-Fc-Chimären binden konnten und dabei eine Phasenverschiebung von durchschnittlich $7,3^\circ$ hervorriefen. Auch hier war die Phasenverschiebung um ein Vielfaches zu klein, als dass die Zelle mit ihrer gesamten Masse detektiert worden wäre. Die Präinkubation der Zellen mit Tinzaparin und Natalizumab führte zu signifikanten Reduktionen der Zellbindungsfähigkeit. Trotzdem konnten auch inhibierte Zellen an VCAM-1-Fc-Chimären binden. Die resultierenden Phasenverschiebungen stellen die Summe aus unspezifischen Bindungen und Bindungen über VLA-4-VCAM-1 dar, die nicht durch die Inhibitoren blockiert werden konnten. Auffällig ist dabei, dass Tinzaparin die Bindung stärker inhibierte als Natalizumab. Dieses Phänomen ist nicht ohne Weiteres zu erklären, da vom spezifischen Antikörper gegen VLA-4 die höchste Inhibitorwirkung zu erwarten wäre. Die Untersuchung der zugehörigen Bindungskinetikdaten in Kapitel 4.5.3 wird zeigen, dass Natalizumab auch bei der isolierten Betrachtung keine signifikant höhere Affinität zu VLA-4 aufweist als Tinzaparin. Dies ist eine wahrscheinliche Erklärung für das Inhibitionsverhalten.

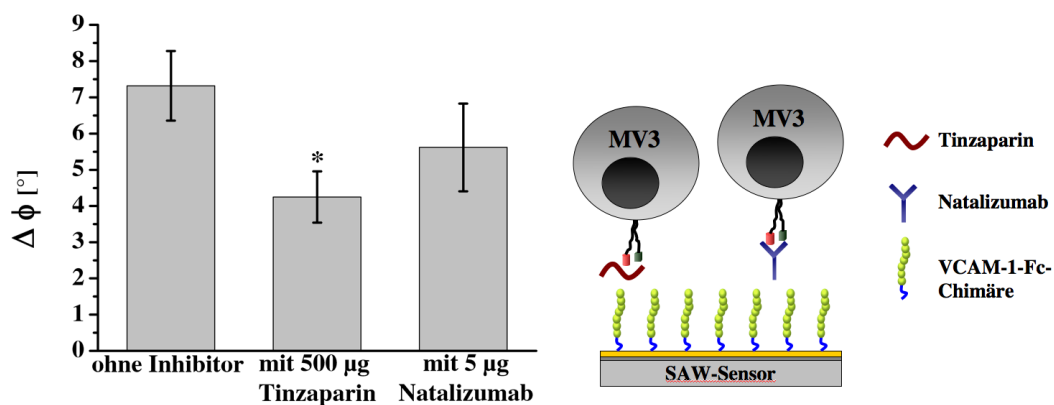


Abb. 4.29: Inhibition der MV3-Bindung an immobilisierten VCAM-1-Fc-Chimären durch Tinzaparin und Natalizumab. Die Bindung von $1 \cdot 10^6$ MV3-Zellen nach vorheriger Stimulierung mit 1 mM Mn^{2+} kann durch $500 \mu\text{g}$ Tinzaparin und durch $5 \mu\text{g}$ Natalizumab signifikant inhibiert werden. Dabei fällt die größere Inhibitionspotenz von Tinzaparin im Vergleich zu Natalizumab auf.

Mit der Etablierung eines SAW-Zellbindungsassays ist es erstmals gelungen, Adhäsionsrezeptor-vermittelte Bindungsvorgänge von Melanomzellen in Echtzeit mithilfe eines Biosensors zu charakterisieren. Die Limitierung der Messtechnik, die eine genaue Wägung oder Zählung der adhärenierten Zellen unmöglich macht, konnte

zur Detektion spezifischer Wechselwirkungen genutzt werden. Versuche mit stimulierten und unstimulierten Zellen dienen zum einen der Validierung des Messsystems, zum anderen konnte so die VLA-4-vermittelte Adhäsion der MV3-Zellen besser charakterisiert werden.

Die Inhibition der Melanomzellbindung an immobilisiertem Natalizumab sowie an VCAM-1-Fc-Chimären durch Tinzaparin belegt die potentielle antimetastatische Wirksamkeit von Heparin bei der Inhibition Integrin-vermittelter Adhäsionsvorgänge und unterstreicht den Wert weitergehender Versuche zu dieser Fragestellung. Neben Erkenntnissen aus einem mikroskopischen Assay konnte mithilfe der SAW-Technik die Wechselwirkung von Heparin mit VCAM-1 und Natalizumab ausgeschlossen werden, wohingegen mit hoher Wahrscheinlichkeit die Bindung an VLA-4 gehemmt wird. Trotzdem stellen die Zellversuche für diese Fragestellung keine endgültige Antwort dar, so dass die isolierte Betrachtung der Heparin-VLA-4-Interaktion in den folgenden Abschnitten näher betrachtet werden soll.

4.5 Isolierte Untersuchung der Bindung von Heparin an VLA-4

Um neben den Erkenntnissen über das zelluläre Adhäsionsverhalten von MV3-Zellen auch Einblicke in die Mechanistik der Heparin-VLA-4-Bindung zu erlangen, wurde mithilfe des SAW-Biosensors versucht, die isolierte Wechselwirkung von Heparin und VLA-4 zu detektieren. Durch Adhäsionsexperimente mit VLA-4-tragenden Zellen können keine kinetischen Bindungskonstanten abgeleitet werden, da die Wechselwirkung durch ein einfaches mathematisches Modell beschrieben werden muss, aus dem sich die kinetischen Parameter berechnen lassen. Die Bindung einer Zelle wird aber nicht durch eine isolierte Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung verursacht, sondern stellt die Summe verschiedener spezifischer und unspezifischer Bindungen dar. Die Zelladhäsion gibt demnach Auskunft über die Avidität einer Zellwechselwirkung, aber nicht über die Affinität der einzelnen Bindungsepitope. Die einfachste Versuchsanordnung zur Detektion ist die, bei der ein Bindungspartner immobilisiert auf einem Träger vorliegt, während der andere aus einer Lösung heraus mit dem immobilisierten Partner in Kontakt kommen kann. Das VLA-4-Heterodimer ist nicht käuflich zu erwerben. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Methoden der Membranaufbereitung von MV3-Melanomzellen angewandt. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Gewinnung VLA-4-haltiger Membranvesikel, deren Immobilisation auf SAW-Sensorchips und die Bindungsuntersuchungen von Natalizumab, VCAM-1 und Tinzaparin vorgestellt.

4.5.1 Gewinnung und Charakterisierung von VLA-4-haltigen Membranvesikeln

Die unterschiedlichen Methoden zur Gewinnung von Membranvesikeln sind in Kapitel 3.4 beschrieben. Ziel der durchgeführten Membranpräparationen war die Fraktionierung der Membranbestandteile von anderen Proteinen, Zellkompartimenten und dem Zellkern. Die Anwendung des Amidoschwarz-Assays bietet sich für die Bestimmung des Proteingehalts in Membranvesikeln an, da Lipide die Messung nicht stören [296]. Die Proteinbestimmung mittels Amidoschwarz-Assay ergab die Proteingehalte aus Tabelle 4.9.

Durch die einfache Membranpräparation werden lediglich die zytosolischen Proteine und der Zellkern abgetrennt. Intrazelluläre Membranen wie die der Mitochondrien oder anderer Kompartimente verbleiben in der Suspension zusammen mit ihren mem-

Tab. 4.9: Proteingehalt der Membranvesikel nach unterschiedlichen Präparationen.

	Proteingehalt [mg/mL]
Einfache Membranpräparation	2,50 ±0,34
Membranpräparation nach Lever	0,69 ±0,01
Oktylglucosid-Präparation	0,88 ±0,07

branären Funktionsproteinen. Dies erklärt den höheren Proteingehalt im Vergleich zu den anderen Präparationsmethoden.

Die Membranpräparation nach Lever weist einen geringeren Proteingehalt auf. Die Probenziehung bei den verschiedenen Zentrifugationsschritten und die Proteinbestimmung der erhaltenen Suspensionen zeigt, dass sich die Proteinmenge nach dem ersten Zentrifugationsschritt schon um 2/3 verringert hat. Nach dem letzten Ultrazentrifugationsschritt ist sogar nur noch 1/9 der Proteinmenge nach Erstzentrifugation enthalten. Durch die Verwendung von steigenden g -Zahlen und durch den Einsatz von Puffern mit Dichtegradienten werden nach und nach zytosolische Bestandteile abgetrennt. Die Membranvesikel am Ende der letzten Zentrifugation sollten hauptsächlich aus Lipiden und Proteinen der äußeren Membran bestehen.

Die Durchführung einer Membranpräparation mit Oktylglucosid als Detergens zielt darauf ab, bei der Bearbeitung der Zellen diese nicht zu zerstören, sondern ausschließlich Vesikel mit Funktionsproteinen aus der äußeren Membran heraus zu lösen. Die Bestimmung des Proteingehalts zeigt, dass durch diese einfache Bearbeitung der MV3-Zellen ein leicht höherer Proteingehalt erhalten wird als bei der wesentlich aufwändigeren Membranpräparation nach Lever. Abbildung 4.30 zeigt einen Überblick über die Größenverteilung der Proteine in den Membranvesikeln nach den verschiedenen Präparationsmethoden.

Die Auswertung des Acrylamidgels gibt einen Hinweis darauf, dass VLA-4 in allen durchgeführten Präparationen vorhanden ist. Am oberen Rand des Gels deuten die paarweise auftretenden Banden bei ~ 200 kD und > 116 kD darauf hin. Am stärksten sind diese beiden Banden bei der Präparation mit Oktylglucosid zu erkennen, während sie in den anderen Membranpräparationen nur schwach erscheinen. Der hohe Anteil weiterer Proteine in dieser Fraktion zeigt, dass die erhoffte Anreicherung von VLA-4 durch selektive Solubilisation der äußeren Membran nicht stattgefunden

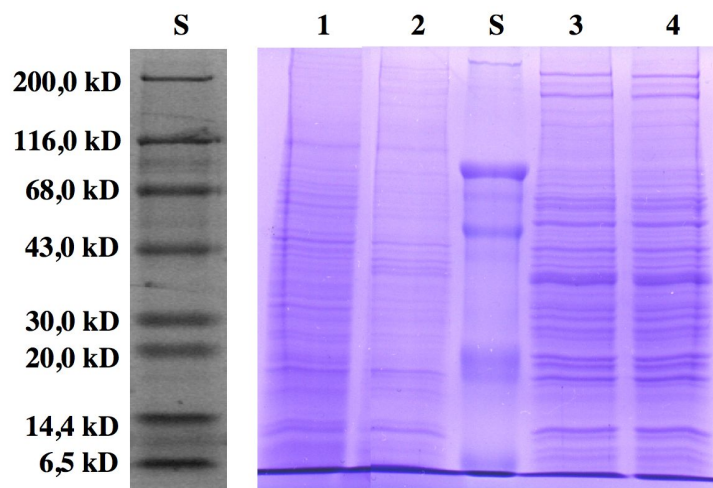


Abb. 4.30: SDS-Page der verschiedenen Membranpräparationen nach Coomassiefärbung. Die Banden des Proteinstandards (graue Abbildung links) stellen die Größenauftrennung der Proteine nach Herstellerangaben dar und sind nicht aus dem rechts dargestellten Experiment entnommen. Der Proteinstandard ist mit **S** gekennzeichnet. Die Membranpräparationen wurden jeweils so aufgetragen, dass die Proben einen Gesamtproteingehalt von 10 µg besaßen. **1:** Einfache Membranpräparation **2:** Membranpräparation nach Lever **3 und 4:** Präparation mit Oktylglucosid.

hat. Der hohe Anteil kleinerer Proteine könnte auch auf eine teilweise Fraktionierung größerer Proteine durch das Detergens zurückzuführen sein. In der Präparation nach Lever sind nicht nur die Banden für die erwarteten Molekülgrößen von VLA-4 schwächer ausgeprägt, sondern auch die aller weiterer Proteine. Bei der einfachen Membranpräparation findet eine Abtrennung anderer Proteine praktisch nicht statt.

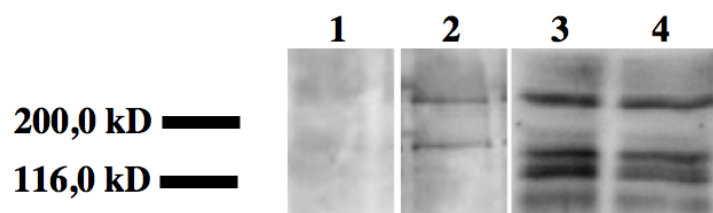


Abb. 4.31: Western-Blot zur Detektion von Natalizumab in Membranpräparationen. Die Abbildung wurde aus drei unabhängigen Western-Blot-Experimenten zusammengestellt. Der Proteinstandard wird bei dieser Technik nicht angefärbt, da nur VLA-4, das mit Natalizumab eine Bindung eingegangen ist, durch den Sekundär-Antikörper erkannt wird. Die eingezeichneten Banden des Größenstandards wurden durch Überinandenlegen eines SDS-Gels mit Coomassiefärbung und der Membran erhalten. **1:** Einfache Membranpräparation **2:** Membranpräparation nach Lever **3 und 4:** Präparation mit Oktylglucosid.

Das Vorhandensein von VLA-4 ließ sich durch Western-Blot nachweisen wie Abbildung 4.31 zeigt. Es wurden Banden > 200 kD und zwischen 116 kD und 200 kD

sichtbar. In der Lever-Präparation sind zwei Banden gut sichtbar, während eine dritte nur sehr schwach erscheint. Für die einfache Membranpräparation sind die Banden noch schwächer ausgeprägt.

Das Erscheinen von drei Banden zeigt, dass die Natalizumab-bindende α -Untereinheit in unterschiedlichen Formen vorliegt. Das intakte VLA-4-Heterodimer besitzt eine Masse von etwa 280 kD und würde damit durch die oberste Bande repräsentiert. Die dissoziierte α -Domäne besitzt eine Masse von etwa 150 kD. Die zweite Bande stellt demnach mit hoher Wahrscheinlichkeit diese Struktur dar. Von Clark und Mitarbeitern ist ein *N*-terminales Ende der α -Untereinheit mit einer Masse von etwa 80 kD beschrieben, die hier durch die dritte Bande repräsentiert werden könnte [297]. Weitere sehr schwach ausgeprägte Banden können entweder durch unspezifische Bindung des Sekundär-Antikörpers oder durch weitere Bruchstücke der α -Untereinheit hervorgerufen werden.

Es bleibt festzuhalten, dass die verschiedenen Methoden der Membranpräparation es ermöglichen, VLA-4-haltige Vesikel zu erhalten. Dabei werden durch die Anwendung des Protokolls nach Lever und durch die Oktylglucosid-Methode die höchsten Ausbeuten erreicht, während die einfache Membranpräparation nicht zu einer Anreicherung membranärer Funktionsproteine führt. In allen drei Präparationsansätzen ist mit einer Vielzahl weiterer Proteine neben dem Zielprotein VLA-4 zu rechnen. Diese Erkenntnisse dienen als Grundlage zur anschließenden Immobilisation der Membranvesikel auf SAW-Biosensorchips, die im folgenden Kapitel vorgestellt werden soll.

4.5.2 Immobilisation von VLA-4-haltigen Membranvesikeln auf SAW-Sensorchips

Die Immobilisation von VLA-4-haltigen Membranvesikeln auf SAW-Sensorchips muss in erster Linie drei Anforderungen erfüllen:

1. Die Membranvesikel müssen dauerhaft auf der Sensoroberfläche verbleiben, um die massenmäßig kleineren Phasenveränderungen durch Rezeptor-Ligand-Interaktionen erfassen zu können.
2. VLA-4 muss für potentielle Liganden und Inhibitoren räumlich erreichbar sein.
3. VLA-4 muss als intaktes Heterodimer vorliegen, um die volle Bindungsfähigkeit entfalten zu können.

Abbildung 4.33 zeigt wie sich Membranvesikel nach Injektion auf einer blanken Goldoberfläche anlagern und dort auch unter beständigem Pufferfluss verbleiben.

Ein ähnliches Bild ergibt sich, wenn die Goldoberfläche mit Poly-L-Lysin präinkubiert wurde. Dabei lagert sich Lysin mit seiner endständigen Aminogruppe an die Goldoberfläche, während sich die Carbonyl- und die zweite Aminofunktion in Richtung des Fließmediums orientieren. Dies führt zu einer Hydrophilisierung der hydrophoben Goldoberfläche. Beiden Immobilisierungsmethoden ist gemein, dass die anschließende Injektion von VCAM-1-Fc-Chimären oder Natalizumab nur zu sehr geringen Phasenverschiebungen auch bei hohen Konzentrationen ($> 10^{-6}$ M) führte. Entsprechend kann angenommen werden, dass VLA-4 entweder nicht mehr funktionstüchtig oder räumlich ungünstig angeordnet ist, so dass die Anzahl der zu detektierenden Bindungsereignisse sehr gering ist. Eine weitere Erklärung ist, dass durch die Dicke der Poly-L-Lysinschicht und die anschließende Auflagerung der Membranvesikel, Bindungsereignisse zwischen VLA-4 und seinen Liganden derart weit von der Sensoroberfläche entfernt stattfinden, dass sie nur noch stark vermindert erfasst werden können.

Eine weitere Methode zur Hydrophilisierung der Goldoberfläche ist die Immobilisation von 1-Thio- β -D-Glucose auf der Goldoberfläche (siehe Abbildung 4.32). Dabei bindet die *SH*-Gruppe der Thioglucose kovalent an Gold, während der Rest des Thioglucosemoleküls einen definierten Monolayer auf der Goldoberfläche ausbildet. Die Dicke dieser hydrophilen Schicht ist wesentlich geringer als die einer Poly-L-Lysin-Schicht, da Poly-L-Lysinmoleküle auch stark miteinander unter Ausbildung eines Polylayers in Wechselwirkung treten. Für Thioglucose ist keine Anlagerung an eine erste Schicht zu erwarten, da ungebundene Thioglucosemoleküle in der wässrigen Lösung verbleiben. An Membranvesikeln, die auf Thioglucose immobilisiert wurden, sind sowohl Bindungsereignisse von VCAM-1-Fc-Chimären als auch von Natalizumab nach deren Injektion in niedrig mikromolaren Konzentrationen zu detektieren. Für alle nachfolgenden Versuche wurden daher die Membranvesikel auf einer Schicht aus Thioglucose aufgebracht.

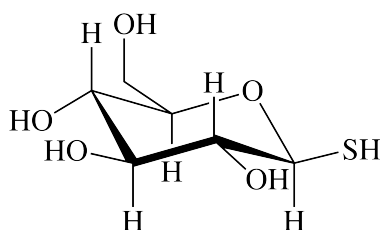


Abb. 4.32: 1-Thio- β -D-Glucose. Durch die *SH*-Gruppe kann 1-Thio- β -D-Glucose (Thioglucose) kovalent an der Goldoberfläche des SAW-Sensorchips binden. Für weitere Immobilisationsschritte ist die Oberfläche dadurch hydrophilisiert.

Der SAW-Sensor erlaubt die genaue Bestimmung von immobilisierten Proteinmengen (siehe Kapitel 4.4.1). Die Bestimmung immobilisierter Massen von Membranvesikeln kann aber nur näherungsweise erfolgen, da deren durchschnittliche molare Masse nicht genau bekannt ist. Unter der Annahme, dass neben verschiedenen großen Proteinen ein erheblicher Anteil an Phospholipiden die Membranvesikel charakterisiert, kann für die Immobilisierung auf Thioglucose von einer Massenbeladung im Bereich von $\sim 1 \cdot 10^{-8} \text{ g/cm}^2$ ausgegangen werden.

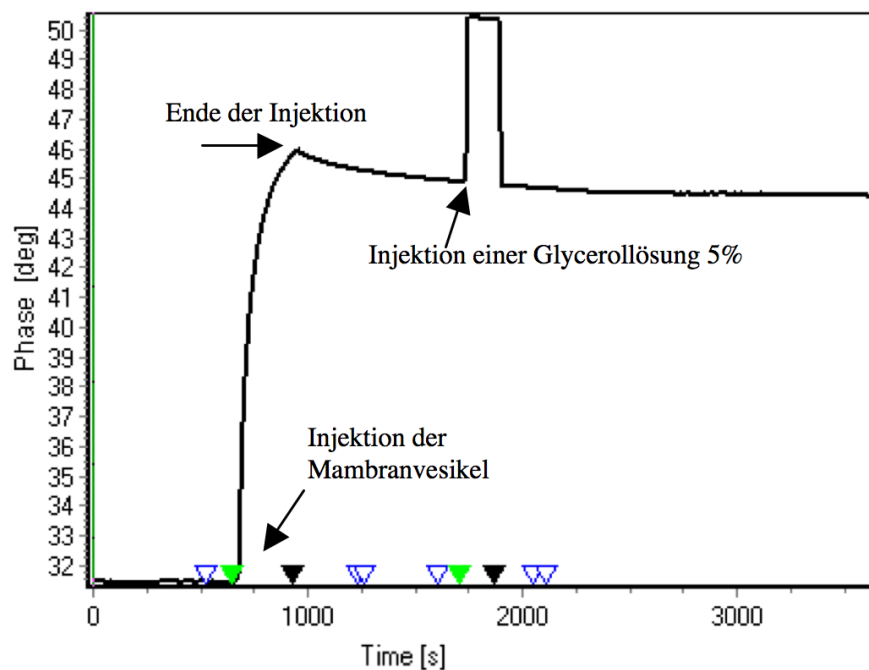


Abb. 4.33: Phasenverlauf zur Immobilisierung von Membranvesikeln auf SAW-Sensorchips. Dieses Bildschirmfoto (BiosensK12) der Echtzeitanzeige der Immobilisierung von Membranvesikeln zeigt, dass die Injektion der Membranvesikel zu einer Phasenverschiebung und einer Stabilisierung der Phasenlinie durch „feste“ Auflagerung der Vesikel auf dem SAW-Sensor führt. Die Auswertung der Phasenverschiebung der anschließenden Glycerolinjektion erlaubt die Korrektur der Phasenverschiebung um den Viskositätsanteil des Signals.

4.5.3 Detektion und kinetische Betrachtung der Bindung von LMWH an membrangebundenem VLA-4

Alle bisher vorgestellten Versuche untermauern die Annahme, dass die Inhibition Integrin-vermittelter Adhäsionsvorgänge von Tumorzellen durch Heparin durch eine Wechselwirkung des Inhibitors mit VLA-4 zu Stande kommt. Die Gewinnung VLA-4-haltiger Membranvesikel und deren Immobilisation auf SAW-Sensoren eröffnete die Möglichkeit, VLA-4 Bindungen isoliert zu betrachten. Dazu wurde die Anwesenheit

von VLA-4 auf der Sensoroberfläche mit Natalizumab überprüft. Gleichzeitig konnten erstmals kinetische Bindungskonstanten für die Bindung dieses Antikörpers an sein Antigen bestimmt werden.

Da Natalizumab auch isolierte α -Untereinheiten des VLA-4-Heterodimers zu binden vermag, konnte durch Bindungsstudien mit VCAM-1-Fc-Chimären darüber hinaus auch gezeigt werden, dass VLA-4 in ausreichender Zahl als intaktes Heterodimer vorlag.

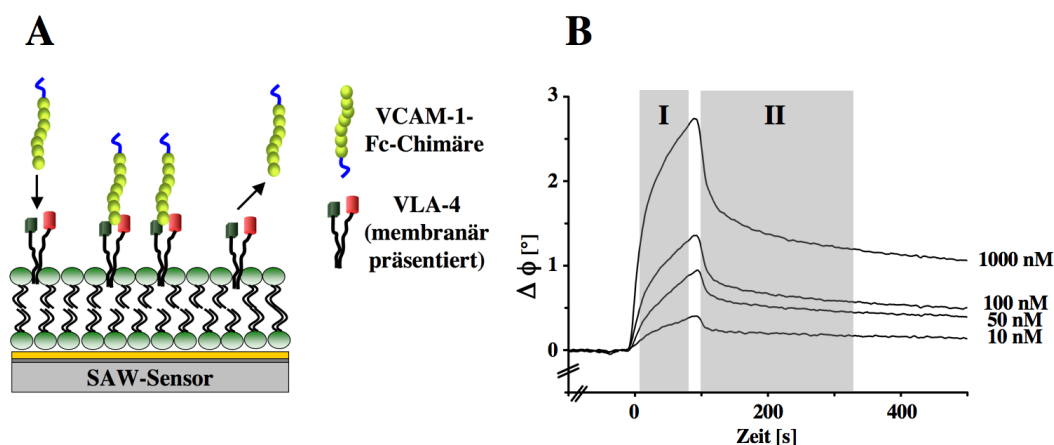


Abb. 4.34: Extraktion kinetischer Bindungsparameter eines SAW-Experiments über nicht-lineares Kurvenfitting. **A:** Aus dem Bindungsexperiment mit aufsteigenden Konzentrationen von VCAM-1 an VLA-4 kann, wie in **B** dargestellt, durch Übereinanderlegen der Phasenverschiebungen die Extraktion von k_{obs} im Bereich **I** und von k_{Diss} im Bereich von **II** erfolgen.

Im letzten Schritt wurde die Bindungsfähigkeit des LMWH Tinzaparin an membranär präsentem VLA-4 durch Injektion steigender Konzentrationen und Auswertung der erhaltenen Phasenverschiebungen mit den vorgestellten Methoden aus Kapitel 2.5.4 überprüft. Abbildung 4.35 verdeutlicht an einem beispielhaften Bindungsexperiment die Extraktion der kinetischen Parameter durch das Auftragen der erhaltenen k_{obs} -Werte gegen die zugehörige Konzentration von Tinzaparin.

Tabelle 4.10 zeigt die kinetischen Bindungskonstanten für die Wechselwirkung zwischen VLA-4 und Natalizumab. Für die VLA-4-Natalizumab-Interaktion sind bisher keine Bindungsdaten bekannt. Mit einem K_D -Wert von $1,25 \cdot 10^{-6}$ M liegt die Gleichgewichtsdissoziationskonstante im unteren Bereich, den man für eine Antikörper-Antigen-Wechselwirkung annehmen würde. Ob die Kombination einer moderaten Assoziationskonstanten und einer Dissoziationskonstanten, die die Freigabe des Rezeptors nach einer gewissen Zeit erwarten lässt, ein gewolltes Wirkcharakteristikum bei der Behandlung von Morbus Crohn oder Multipler Sklerose zur Umgehung einer

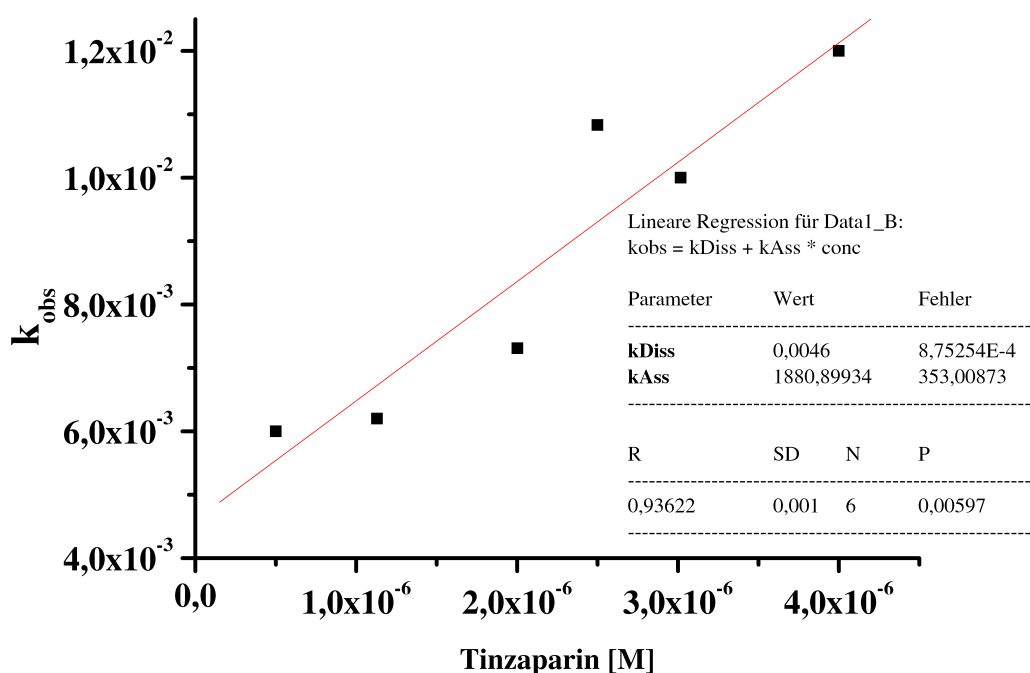


Abb. 4.35: Extraktion von kinetischen Bindungsdaten aus dem linearen Zusammenhang von k_{obs} und zugehöriger Tinzaparinkonzentration. Die *in situ* auf Thio-glucose immobilisierten Membranvesikel der Oktylglucosid-Präparationsmethode erlauben die Detektion der Phasenverschiebung durch steigende Tinzaparinkonzentrationen. Wird k_{obs} gegen die injizierten Konzentrationen aufgetragen, kann mit Gleichung 2.17 die Dissoziationskonstante k_{Diss} aus dem y -Achsenabschnitt und k_{Ass} aus der Steigung der Geraden bestimmt werden.

Totalblockade von VLA-4 ist, kann an dieser Stelle nicht mit Literaturdaten belegt werden.

Für VCAM-1 wurden durch Chigaev und Mitarbeiter Gleichgewichtsdissoziationskonstanten bei der Bindung an zelluläres VLA-4 mithilfe einer durchflusszytometrischen Methode bestimmt. Dabei zeigten sie, dass die Affinität der Wechselwirkung vom Aktivierungsgrad der Bindung durch Ca^{2+} und Mn^{2+} abhängt und ermittelten, je nach Aktivierungszustand, K_D -Werte zwischen $3,31 \cdot 10^{-8}$ M und $48,9 \cdot 10^{-8}$ M. Sie postulierten darüber hinaus, dass VLA-4 jeden beliebigen Aktivierungszustand, der zwischen diesen Extremwerten liegt, einnehmen kann und dass Aviditätsunterschiede bei der VLA-4-Bindung vor allem auf die multiplen Affinitätszustände zurück zu führen sind. Stimuli für Affinitätsveränderungen können demnach neben der schon genannten Aktivierung durch zweiwertige Kationen auch Scherstress und Stimuli aufgrund der Signalkaskade im Zellinneren sein [298]. Im hier vorgestellten Biosensor-Assay kann nur ein einziger Aktivierungszustand des VLA-4 erfasst werden, da keine intrazelluläre Signalweiterleitung möglich ist und die Bindungspartner in gelöster Form mit VLA-4 in Kontakt kommen, so dass Scherkräfte als Einflussfaktor

Tab. 4.10: Kinetische Bindungskonstanten zur Bindung von VCAM-1Fc-Chimären, Natalizumab, Tinzaparin und Fondaparinux an membrangebundenem VLA-4.

	K_D [M]	k_{Ass} [$M^{-1}s^{-1}$]	k_{Diss} [s^{-1}]
VCAM-1	$1,01 \cdot 10^{-8}$ $\pm 0,90 \cdot 10^{-8}$	$3,53 \cdot 10^5$ $\pm 0,57 \cdot 10^5$	$3,40 \cdot 10^{-3}$ $\pm 2,95 \cdot 10^{-3}$
Natalizumab	$1,25 \cdot 10^{-6}$ $\pm 0,98 \cdot 10^{-6}$	$1,74 \cdot 10^3$ $\pm 0,40 \cdot 10^3$	$2,12 \cdot 10^{-3}$ $\pm 1,59 \cdot 10^{-3}$
Tinzaparin	$4,61 \cdot 10^{-6}$ $\pm 2,68 \cdot 10^{-6}$	$1,27 \cdot 10^3$ $\pm 0,58 \cdot 10^3$	$5,13 \cdot 10^{-3}$ $\pm 1,56 \cdot 10^{-3}$
Fondaparinux	nicht detektierbar		

ausgeschlossen werden können. Mit einer Gleichgewichtsdissoziationskonstanten von $1,01 \cdot 10^{-8}$ M liegt der hier vorgestellte Wert in dem Bereich, den Chigaev et al. für den nicht aktivierten Rezeptor gefunden haben. Die Werte unterstreichen die Rolle von VLA-4 als Rezeptor, der physiologisch sowohl Rollbewegungen von Leukozyten vermitteln kann als auch feste Adhäsionen. Die schnelle Assoziationskonstante im Bereich von $10^5 M^{-1}s^{-1}$ hat die VLA-4-Bindung mit der Selektinbindung an ihre natürlichen Liganden gemein. Die 100fach geringere Dissoziationskonstante im Vergleich zu Selektinen unterstreicht dagegen die Fähigkeit, Zellen zum Arrest zu zwingen. Auch hierbei spielen Aktivierungszustand des VLA-4 und äußere Bedingungen wie die Geschwindigkeit der Leukozyten und die daraus resultierenden Scherkräfte eine Rolle.

Für die Bestimmung von Bindungskonstanten des Heparins an VLA-4 spielt die Betrachtung des Aktivierungszustandes insofern keine Rolle, als dass die entsprechenden Werte mit denen anderer bekannter VLA-4-Bindungs epitope verglichen werden sollen. Dabei zeigt sich, dass das LMWH Tinzaparin VLA-4 mit einer Affinität im mikromolaren Bereich bindet. Ähnlich wie bei der Heparin-Selektin-Wechselwirkung trägt vor allem die langsame Dissoziation vom Rezeptor zur hohen Affinität bei. Die Assoziationskonstante ist kleiner als die des natürlichen Liganden VCAM-1, aber ähnlich der des Natalizumab. Diese isolierte Betrachtung belegt erstmals die Bindungsfähigkeit von Heparin an VLA-4 und gibt so einen Einblick in die antimetastatische Potenz dieses Inhibitionsmechanismus. Die kinetischen Daten decken sich mit der Beobachtung aus Kapitel 4.4.4, bei der die MV3-Bindung an immobilisierten

VCAM-1-Fc-Chimären durch Tinzaparin etwas stärker inhibiert wurde als durch Natalizumab.

Ein Vergleich zu den einzigen bisher veröffentlichten kinetischen Bindungskonstanten für die Heparin-Wechselwirkung mit einem anderen Integrin ($\alpha X\beta 2$) durch Vorup-Jensen et al., die eine Gleichgewichtsdissoziationskonstante von $1,3 \cdot 10^{-6}$ M ermittelten, gibt einen Hinweis darauf, dass Heparin verschiedene Integrine mit ähnlichen Affinitäten zu binden vermag. Dabei scheint es sich aber nicht um eine unspezifische oder lediglich ladungsvermittelte Wirkung zu handeln, da das Pentasaccharid Fondaparinux, welches der kleinste antikoagulatorisch wirksame „Baustein“ des Heparins ist, keine Bindung an membrangebundenem VLA-4 aufweist.

Der gewählte Versuchsaufbau mit VLA-4, das in membranärer Umgebung präsentiert wird, kann eine Bindung des Heparins an andere Strukturen neben VLA-4 nicht gänzlich ausschließen. Verschiedene Charakteristika sprechen aber gegen einen dominanten Einfluss unspezifischer Wechselwirkungen.

- Heparin zeigt auch in hohen Konzentrationen keine unspezifische Affinität zu Proteinen wie VCAM-1 oder Natalizumab.
- Die Wechselwirkung mit vielen verschiedenen Proteinen und dadurch mit verschiedenen kinetischen Bindungsparametern hätte dazu geführt, dass das kinetische 1:1-Bindungsmodell nicht auf die erhaltenen Phasenverschiebungen hätte angewandt werden können. Abbildung 4.35 zeigt aber, dass das detektierte Bindungsverhalten diesem Modell sehr gut folgt.
- Vorherige Untersuchungen zur Bindung von Heparin an planaren Lipidfilmen mittels QCM zeigten kein ausgeprägtes Bindungsverhalten des Polysaccharids an Modellmembranen. Eine derartige Wechselwirkung ist demnach auch nicht für non-proteinogene Membranbestandteile der MV3-Zellen zu erwarten.
- Die Anwesenheit anderer Heparin-bindender Integrine wie $\alpha X\beta 2$ wurde nicht experimentell ausgeschlossen. Ihr Vorhandensein auf Melanomzellen ist nicht in der Literatur beschrieben. Da es sich um ein typisches Leukozyten-Integrin handelt, ist nicht von seiner Anwesenheit auf MV3-Melanomzellen auszugehen.

In unserer Arbeitsgruppe konnte Martin Schlesinger den Effekt der aufgeführten Substanzen in einem mikroskopischen Adhäsionsassay zur Bindung von MV3-Zellen an immobilisiertem VCAM-1 detektieren. Dabei zeigte sich, dass Tinzaparin ein potenter Inhibitor der MV3-Adhäsion ist, während Fondaparinux keinen Inhibitionseffekt zeigte [299].

Die Kombination von mikroskopischen Adhäsionsuntersuchungen mit Zellexperimenten am SAW-Biosensor und der Untersuchung der isolierten VLA-4-Heparin-

Bindung liefert wichtige Erkenntnisse als Grundlage für weitere Arbeiten. Mit diesen Methoden konnte gezeigt werden, dass VLA-4-Integrin ein interessantes neues Target für die Behandlung der hämatogenen Tumorzellmetastasierung ist. Damit erweitert sich das Spektrum der potentiellen Zielstrukturen von den Selektinen auf eine weitere Adhäsionsrezeptorfamilie. Gleichzeitig unterstreichen die Daten, dass Heparin, dessen Selektin-vermittelte Inhibitionspotenz schon bekannt war, auch an dieser Stelle der metastatischen Kaskade einen Einfluss ausüben kann. Die Aufklärung der Diskrepanz zwischen anti- und prometastatischen Effekten einer VLA-4-Wechselwirkung wie sie in Kapitel 2.3.4 beschrieben wurde, muss weitergehend untersucht werden. Nach den vielversprechenden *in vitro*-Untersuchungen müssen in einem nächsten Schritt tierexperimentelle Studien die Beteiligung von VLA-4 bei der hämatogenen Metastasierung und die potentielle Wirkung von Heparin belegen. Dabei werden, ähnlich wie bei der Selektinblockade durch Heparin, der Dosierung, dem Applikationszeitpunkt und der Risiko-Nutzen-Abschätzung besonderes Augenmerk zu Teil werden.

Gleichzeitig wird durch die vorgestellten Erkenntnisse ein neues Forschungsgebiet für die Wirkung von Natalizumab eröffnet. Es ist zu prüfen, ob es neben der Behandlung der schubförmig-verlaufenden remittierenden Multiplen Sklerose und Morbus Crohn eine antimetastatische Wirkung durch VLA-4-Blockade *in vivo* besitzt.

Die Heparinbehandlung von solchen Krebspatienten, die noch nicht unter Metastasen leiden, wie sie zur Vorbeugung einer VTE in den Leitlinien vorgeschlagen wird [149], scheint im Lichte der hier vorgestellten Erkenntnisse als konsequent und richtig.

5 Zusammenfassung

Selektine und Integrine übernehmen als Adhäsionsrezeptoren eine wichtige Rolle bei der hämatogenen Tumorzellmetastasierung. Die Hemmung derartiger Adhäsionsrezeptor-vermittelter Bindungsvorgänge stellt demnach eine große Herausforderung für die Therapie dieses Krankheitsgeschehens dar. Im Rahmen dieser Arbeit konnten die bisherigen Erkenntnisse zur Wirkung von Heparin als Inhibitor der Selektin-vermittelten Zelladhäsion um verschiedene Aspekte erweitert werden. Kinetische Bindungskonstanten für die Wechselwirkung von UFH und LMWH an P- und L-Selektin konnten erstmals mithilfe akustischer Biosensoren bestimmt werden. Dabei zeigte sich, dass verschiedene Heparinzubereitungen beide Selektinvertreter mit Affinitäten binden, die die aller bisher bekannten Selektin-Antagonisten übertreffen. P- und L-Selektin wurden etwa gleich gut von Heparin gebunden. UFH zeigten höhere Affinitäten als LMWH.

Durch die Untersuchung definierter Glucansulfate und Korrelation der erhaltenen kinetischen Parameter mit Daten aus einem Zellrollassay konnte belegt werden, dass die Inhibitionsintensität durch die Dissoziationskonstante gesteuert wird, während die Assoziationskonstante die Inhibition weniger stark beeinflusst. Dieses Erkenntnis erklärt, warum viele sLe^X-Mimetika trotz vergleichsweise guter Gleichgewichtsdissoziationskonstanten keinen klinisch relevanten Effekt zeigen. Trotz schneller Assoziationskonstanten bei der Bindung an Selektin sind die Dissoziationskonstanten ähnlich schnell wie die des sLe^X.

Es wurden Heparinderivate untersucht, die partialsynthetisch so abgewandelt waren, dass ihre Selektin-Bindungsfähigkeit von der antikoagulatorischen Aktivität und von der Heparanase-Bindungsfähigkeit getrennt waren. In Bindungsstudien konnten kinetische Parameter der Selektinblockade ermittelt und strukturelle Einflüsse verdeutlicht werden.

SM4-Sulfatid konnte durch Laser-Scanning-Mikroskopie und durch Aufstellung eines Liposomen-basierten Tumorzellmodells am QCM-Sensor als Selektinligand bei der hämatogenen Metastasierung näher charakterisiert werden. Dabei zeigte sich, dass SM4 ähnlich wie sLe^X seine Avidität zu P-Selektin durch die Ausbildung von Clusterstrukturen steuern kann. Erstmals konnte darüber hinaus belegt werden, dass

auch die SM4-vermittelte Tumorzellmetastasierung *in vitro* durch Heparin gehemmt werden kann, wobei auch hier UFH potenter waren als LMWH.

Verschiedene Vorarbeiten aus der Arbeitsgruppe haben das Integrin VLA-4 als potentielle Zielstruktur einer Heparin-vermittelten antimetastatischen Wirkung in den Fokus der aktuellen Forschung gerückt. Die Eigenschaften eines SAW-Biosensors konnten erstmals genutzt werden, VLA-4-vermittelte Zellbindungen an seinen natürlichen Liganden VCAM-1 und an den monoklonalen Antikörper Natalizumab zu detektieren. Dabei konnten Aviditätsunterschiede zwischen stimulierten und unstimulierten MV3-Melanomzellen ebenso detektiert werden wie die Inhibitionspez von Heparin bei der Bindung von MV3-Zellen sowohl an VCAM-1 als auch an Natalizumab.

Durch die Gewinnung VLA-4-haltiger Membranvesikel, deren Immobilisation auf SAW-Sensorchips und die anschließenden Bindungsstudien mit VCAM-1 und Natalizumab war die erste Biosensor-gestützte Detektion von kinetischen Bindungskonstanten an VLA-4 möglich. Vor allem konnte erstmals die These einer direkten Heparinbindung an VLA-4 bewiesen werden. Dabei zeigte sich, dass Tinzaparin VLA-4 mit ähnlich hoher Affinität bindet wie der Antikörper Natalizumab. Die detaillierte Betrachtung der kinetischen Parameter legt ähnlich wie bei der Heparin-Selektin-Interaktion einen besonderen Einfluss der Dissoziationskonstanten nahe.

Mit den vorgestellten Daten konnte gezeigt werden, dass Heparin an unterschiedlichen Zielstrukturen der hämatogenen Metastasierung als Inhibitor wirken kann. Aus den bisher bekannten klinischen Daten bleiben viele Fragen zum Wirkmechanismus offen. Die Anwendung von Tierversuchen und zellulären *in vitro*-Modellen kann die komplexen Mechanismen der Adhäsionsrezeptor-vermittelten Wirkung vereinfacht darstellen. Durch diese Methoden kann vor allem der Effekt der Heparinwirkung nachvollzogen werden. Die Anwendung von akustischen Biosensoren stellt eine potente Möglichkeit dar, die zu Grunde liegenden Mechanismen auf molekularer Ebene zu untersuchen. Die Verwendung von zellulären oder liposomalen Modellen an akustischen Biosensoren stellt ein Bindeglied zwischen der rein molekularen Betrachtungsweise und den Effekt-detektierenden Assays dar.

Tabellenverzeichnis

2.1	Kinetische Daten der Selektin-Ligand-Interaktion	18
2.2	Anwendungsmöglichkeiten QCM	59
2.3	Anwendungsmöglichkeiten SAW	60
3.1	Geräte	67
3.2	Chemikalien	68
3.3	Antikörper	70
3.4	Testsubstanzen	71
3.5	Sonstige Materialien	71
3.6	Mischungsschema für Phosphatpuffer nach Sørensen zum Erhalt der angegebenen pH Werte	78
3.7	Pipettierschema der BSA-Kalibriergeraden	88
3.8	Pipettierschema für Trenn- und Sammelgel	89
4.1	Kinetische Bindungskonstanten zur Bindung von rPSGL-1 und anti- P-Sel-mAb an immobilisierten hP-Selektin-Fc-Chimären	114
4.2	Kinetische Bindungskonstanten zur Bindung von Calciparin, Lique- min N und Heparin Ratiopharm an immobilisierten hP-Selektin-Fc- Chimären.	116
4.3	Kinetische Bindungskonstanten zur Bindung von P-Selektin an immo- bilisiertem Heparin mittels SPR nach Wang et al.	118
4.4	Kinetische Bindungskonstanten zur Bindung von Liquemin N an im- mobilisierten hL-Selektin-Fc-Chimären.	120
4.5	Kinetische Bindungskonstanten zur Bindung von Enoxaparin und Nadroparin an immobilisierten hL- bzw. hP-Selektin-Fc-Chimären. . .	122
4.6	Allgemeine Strukturformel der Phycarin(sulfate) und ihre Bindungs- konstanten an hP-Selektin-Fc-Chimären.	126
4.7	Kinetische Bindungskonstanten zur Bindung von UFH, <i>N</i> -acetyliertem UFH, 6- <i>O</i> -desulfatiertem UFH und Liquemin N an immobilisierten mP-Selektin-Fc-Chim.	135

4.8	Kinetische Bindungskonstanten zur Bindung von anti-VCAM-1-mAb an immobilisierten hVCAM-1-Fc-Chimären und Ausschluss der Bindung von Liquemin N, Tinzaparin und Natalizumab.	158
4.9	Proteingehalt der Membranvesikel nach unterschiedlichen Präparationen.	163
4.10	Kinetische Bindungskonstanten zur Bindung von VCAM-1Fc-Chimären, Natalizumab, Tinzaparin und Fondaparinux an membrangebundenem VLA-4.	170

Abbildungsverzeichnis

2.1	Aufbau der Selektine.	4
2.2	Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen in der Adhäsionskaskade der Leukozyten.	5
2.3	Sialyl Lewis ^X	7
2.4	Zusammenhang zwischen ausgeübter Kraft und Lebensdauer für die Bindung zwischen PSGL-1 und P-Selektin (AFM-Experiment).	15
2.5	Einfluss der Kräfte auf einen Leukozyten im Prozess des „Tethering“ unter Scherstress.	17
2.6	Bimosiamose (TBC1269).	21
2.7	Schematische Darstellung der hämatogenen Metastasierung.	22
2.8	Potentielle Selektin-Tumorzellinteraktionen.	27
2.9	Heparin.	34
2.10	Schematischer Aufbau der Integrine	39
2.11	Integrin-Kombinationen und Ligandklassen.	43
2.12	Schematischer Aufbau von Biosensoren und beispielhafte Anwendungsgebiete	50
2.13	Schematische Darstellung des piezoelektrischen Effekts	52
2.14	Schematische Darstellung des Scher-Dickenschwingmodus.	53
2.15	Schematische Darstellung von Welleneigenschaften.	57
2.16	Schematische Darstellung von Love- und Rayleigh-Welle.	58
2.17	Modelle zur Errechnung kinetischer Bindungskonstanten aus einem SAW-Experiment.	63
3.1	Aufbau einer Messkammer im LiquiLab 21 [®]	96
3.2	Ober- und Unterseite der verwendeten Quarzsensoren	96
3.3	Kopplungsreaktionen von Cyanurchlorid	98
3.4	Übertragung eines komprimierten Lipidfilms mithilfe eines Langmuir-Trogs auf einen Quarzsensoren mit vorimmobilisierten Alkylketten	99
3.5	Messeinheit des S-sens [®] K5 mit Kolben-Gewindepumpe.	101

3.6	Mikroflusszelle zum Einbau von Quarzsensoren mit meanderförmiger Pufferflussführung und separater Kontaktierung der 5 Messkanäle.	101
3.7	S-sens [®] K5-Gesamtsystem mit Messeinheit, Pumpensystem und Autosampler	102
3.8	Reaktionsmechanismus der Immobilisation von Proteinen über EDC und NHS	109
4.1	Optimierung der Biosensor-Funktionalisierung.	112
4.2	Beispielhafter Kurvenverlauf der Bindung von Liquemin N an hP-Selektin-Fc-Chim.	116
4.3	Vergleich der Inhibitionsdaten im Zellrollassay mit den kinetischen Bindungsparametern von Calciparin, Liquemin N und Heparin Ratiopharm an hP-Selektin-Fc-Chimären.	129
4.4	Inhibitionsdaten eines Zellrollassays von PhyS1 – PhyS6 an hP-Selektin-Fc-Chimären.	130
4.5	Logit-Transformation.	131
4.6	Lineare Korrelation der Logit-Werte der relativen Zelladhäsion nach 4s mit kinetischen Bindungskonstanten von PhyS2 – PhyS6.	132
4.7	Heparinderivate.	133
4.8	SM4-Sulfatid.	137
4.9	Statischer Adhäsionsassay zur Bindung von sLe ^X , SM4-Sulfatid, LS180-Zellen und MC38-Zellen an P-Selektin und Inhibition durch Heparin.	138
4.10	Struktur von DSPC und POPC.	139
4.11	DSPC+10mol% SM4	140
4.12	DSPC+20mol% SM4	140
4.13	POPC+10mol% SM4	141
4.14	POPC+20mol% SM4	141
4.15	POPC+10mol% sLe ^X -TEG _{N2}	141
4.16	POPC+20mol% sLe ^X -TEG _{N2}	141
4.17	Struktur von sLe ^X -TEG _{N2} und von DiO.	142
4.18	Ausbildung von dunklen SM4-Clustern und hellen sLe ^X -TEG _{N2} -Clustern durch unterschiedliche Einlagerungstendenz des Farbstoffs DiO.	143
4.19	Bindung von mP-Sel-Fc-Chim. an DSPC- und POPC-Modellmembranen.	144
4.20	Bindung von ligandfreien POPC-Liposomen und SM4- bzw. sLe ^X -TEG _{N2} -haltigen Liposomen an mP-Selektin-Fc-Chimären.	146
4.21	Modell der experimentellen Inhibition der SM4-Liposomenbindung durch Heparin.	147
4.22	Inhibition SM4-tragender Liposomen durch Liquemin N und Nadroparin.	148

4.23	Inhibition sLe ^X -TEG _{N2} -tragender Liposomen durch Liquemin N und Nadroparin.	150
4.24	Immobilisation von Natalizumab auf einem SAW-Sensorchip.	154
4.25	Optimierung der Zellzahl und der Fließgeschwindigkeit für die Bindung von MV3-Zellen.	155
4.26	Einfluss der Integrinaktivierung auf die Bindung von MV3-Zellen an immobilisiertem Natalizumab.	156
4.27	Bedeutung der Eindringtiefen der akustischen Wellen bei QCM und SAW.	157
4.28	Inhibition der MV3-Bindung an immobilisiertem Natalizumab durch Tinzaparin.	159
4.29	Inhibition der MV3-Bindung an immobilisierten VCAM-1-Fc-Chimären durch Tinzaparin und Natalizumab.	160
4.30	SDS-Page der verschiedenen Membranpräparationen nach Coomassiefärbung.	164
4.31	Western-Blot zur Detektion von Natalizumab in Membranpräparationen.	164
4.32	1-Thio-β-D-Glucose.	166
4.33	Phasenverlauf zur Immobilisierung von Membranvesikeln auf SAW-Sensorchips.	167
4.34	Extraktion kinetischer Bindungsparameter eines SAW-Experiments über nicht-lineares Kurvenfitting.	168
4.35	Extraktion von kinetischen Bindungsdaten aus dem linearen Zusammenhang von k_{obs} und zugehöriger Tinzaparinkonzentration.	169

Literaturverzeichnis

- [1] T. F. Tedder, D. A. Steeber, A. Chen und P. Engel, The selectins: vascular adhesion molecules., *FASEB J* **1995**, *9*, 866–873.
- [2] D. Vestweber und J. E. Blanks, Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands., *Physiol Rev* **1999**, *79*, 181–213.
- [3] K. C. Chou, The convergence-divergence duality in lectin domains of selectin family and its implications., *FEBS Lett* **1995**, *363*, 123–126.
- [4] W. D. Hanley, D. Wirtz und K. Konstantopoulos, Distinct kinetic and mechanical properties govern selectin-leukocyte interactions., *J Cell Sci* **2004**, *117*, 2503–2511.
- [5] B. J. Graves, R. L. Crowther, C. Chandran, J. M. Rumberger, S. Li, K. S. Huang, D. H. Presky, P. C. Familletti, B. A. Wolitzky und D. K. Burns, Insight into E-selectin/ligand interaction from the crystal structure and mutagenesis of the lec/EGF domains., *Nature* **1994**, *367*, 532–538.
- [6] F. Kolbinger, J. T. Patton, G. Geisenhoff, A. Aenis, X. Li und A. G. Katopodis, The carbohydrate-recognition domain of E-selectin is sufficient for ligand binding under both static and flow conditions., *Biochemistry* **1996**, *35*, 6385–6392.
- [7] U. T. Phan, T. T. Waldron und T. A. Springer, Remodeling of the lectin-EGF-like domain interface in P- and L-selectin increases adhesiveness and shear resistance under hydrodynamic force., *Nat Immunol* **2006**, *7*, 883–889.
- [8] M. Disdier, J. H. Morrissey, R. D. Fugate, D. F. Bainton und R. P. McEver, Cytoplasmic domain of P-selectin (CD62) contains the signal for sorting into the regulated secretory pathway., *Mol Biol Cell* **1992**, *3*, 309–321.
- [9] G. S. Kansas, K. Ley, J. M. Munro und T. F. Tedder, Regulation of leukocyte rolling and adhesion to high endothelial venules through the cytoplasmic domain of L-selectin., *J Exp Med* **1993**, *177*, 833–838.
- [10] T. A. Springer, Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration., *Annu Rev Physiol* **1995**, *57*, 827–872.
- [11] G. Bendas, Inhibitors of membrane receptors involved with leukocyte extravasation., *Mini Rev Med Chem* **2005**, *5*, 575–584.
- [12] M. P. Bevilacqua, S. Stengelin, M. A. J. Gimbrone und B. Seed, Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins., *Science* **1989**, *243*, 1160–1165.
- [13] U. Schindler und V. R. Baichwal, Three NF-kappa B binding sites in the human E-selectin gene required for maximal tumor necrosis factor alpha-induced expression., *Mol Cell Biol* **1994**, *14*, 5820–5831.
- [14] W. M. Gallatin, I. L. Weissman und E. C. Butcher, A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes., *Nature* **1983**, *304*, 30–34.

- [15] A. Hafezi-Moghadam und K. Ley, Relevance of L-selectin shedding for leukocyte rolling in vivo., *J Exp Med* **1999**, *189*, 939–948.
- [16] T. K. Kishimoto, M. A. Jutila, E. L. Berg und E. C. Butcher, Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors., *Science* **1989**, *245*, 1238–1241.
- [17] B. Schleiffenbaum, O. Spertini und T. F. Tedder, Soluble L-selectin is present in human plasma at high levels and retains functional activity., *J Cell Biol* **1992**, *119*, 229–238.
- [18] J. G. Geng, M. P. Bevilacqua, K. L. Moore, T. M. McIntyre, S. M. Prescott, J. M. Kim, G. A. Bliss, G. A. Zimmerman und R. P. McEver, Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140., *Nature* **1990**, *343*, 757–760.
- [19] R. P. McEver, Regulation of expression of E-Selectin and P-Selectin., *The Selectins* **1997**, Hrsg. R. P. McEver, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 31–47.
- [20] H. Setiadi, M. Disdier, S. A. Green, W. M. Canfield und R. P. McEver, Residues throughout the cytoplasmic domain affect the internalization efficiency of P-selectin., *J Biol Chem* **1995**, *270*, 26818–26826.
- [21] C. Foxall, S. R. Watson, D. Dowbenko, C. Fennie, L. A. Lasky, M. Kiso, A. Hasegawa, D. Asa und B. K. Brandley, The three members of the selectin receptor family recognize a common carbohydrate epitope, the sialyl Lewis(x) oligosaccharide., *J Cell Biol* **1992**, *117*, 895–902.
- [22] G. S. Jacob, C. Kirmaier, S. Z. Abbas, S. C. Howard, C. N. Steininger, J. K. Welply und P. Scudder, Binding of sialyl Lewis x to E-selectin as measured by fluorescence polarization., *Biochemistry* **1995**, *34*, 1210–1217.
- [23] R. M. Cooke, R. S. Hale, S. G. Lister, G. Shah und M. P. Weir, The conformation of the sialyl Lewis X ligand changes upon binding to E-selectin., *Biochemistry* **1994**, *33*, 10591–10596.
- [24] K. Handa, E. D. Nudelman, M. R. Stroud, T. Shiozawa und S. Hakomori, Selectin GMP-140 (CD62; PADGEM) binds to sialosyl-Le(a) and sialosyl-Le(x), and sulfated glycans modulate this binding., *Biochem Biophys Res Commun* **1991**, *181*, 1223–1230.
- [25] E. L. Berg, M. K. Robinson, O. Mansson, E. C. Butcher und J. L. Magnani, A carbohydrate domain common to both sialyl Le(a) and sialyl Le(X) is recognized by the endothelial cell leukocyte adhesion molecule ELAM-1., *J Biol Chem* **1991**, *266*, 14869–14872.
- [26] J. Perez-Vilar und R. L. Hill, The structure and assembly of secreted mucins., *J Biol Chem* **1999**, *274*, 31751–31754.
- [27] J. M. Rhodes, Mucins and inflammatory bowel disease., *QJM* **1997**, *90*, 79–82.
- [28] P. Mehta, R. D. Cummings und R. P. McEver, Affinity and kinetic analysis of P-selectin binding to P-selectin glycoprotein ligand-1., *J Biol Chem* **1998**, *273*, 32506–32513.
- [29] P. Hensley, P. J. McDevitt, I. Brooks, J. J. Trill, J. A. Feild, D. E. McNulty, J. R. Connor, D. E. Griswold, N. V. Kumar und K. D. Kopple, The soluble form of E-selectin is an asymmetric monomer. Expression, purification, and characterization of the recombinant protein., *J Biol Chem* **1994**, *269*, 23949–23958.
- [30] A. Levinovitz, J. Mühlhoff, S. Isenmann und D. Vestweber, Identification of a glycoprotein ligand for E-selectin on mouse myeloid cells., *J Cell Biol* **1993**, *121*, 449–459.
- [31] L. W. Burrus, M. E. Zuber, B. A. Lueddecke und B. B. Olwin, Identification of a cysteine-rich receptor for fibroblast growth factors., *Mol Cell Biol* **1992**, *12*, 5600–5609.

- [32] J. O. Gonatas, Z. Mourelatos, A. Stieber, W. S. Lane, J. Brosius und N. K. Gonatas, MG-160, a membrane sialoglycoprotein of the medial cisternae of the rat Golgi apparatus, binds basic fibroblast growth factor and exhibits a high level of sequence identity to a chicken fibroblast growth factor receptor., *J Cell Sci* **1995**, *108* (Pt 2), 457–467.
- [33] C. J. Dimitroff, L. Descheny, N. Trujillo, R. Kim, V. Nguyen, W. Huang, K. J. Pienta, J. L. Kutok und M. A. Rubin, Identification of leukocyte E-selectin ligands, P-selectin glycoprotein ligand-1 and E-selectin ligand-1, on human metastatic prostate tumor cells., *Cancer Res* **2005**, *65*, 5750–5760.
- [34] M. Lenter, A. Levinovitz, S. Isenmann und D. Vestweber, Monospecific and common glycoprotein ligands for E- and P-selectin on myeloid cells., *J Cell Biol* **1994**, *125*, 471–481.
- [35] R. C. Fuhlbrigge, J. D. Kieffer, D. Armerding und T. S. Kupper, Cutaneous lymphocyte antigen is a specialized form of PSGL-1 expressed on skin-homing T cells., *Nature* **1997**, *389*, 978–981.
- [36] M. Matsumoto, K. Atarashi, E. Umemoto, Y. Furukawa, A. Shigeta, M. Miyasaka und T. Hirata, CD43 functions as a ligand for E-Selectin on activated T cells., *J Immunol* **2005**, *175*, 8042–8050.
- [37] C. J. Dimitroff, J. Y. Lee, S. Rafii, R. C. Fuhlbrigge und R. Sackstein, CD44 is a major E-selectin ligand on human hematopoietic progenitor cells., *J Cell Biol* **2001**, *153*, 1277–1286.
- [38] P. Kotovuori, E. Tontti, R. Pigott, M. Shepherd, M. Kiso, A. Hasegawa, R. Renkonen, P. Nortamo, D. C. Altieri und C. G. Gahmberg, The vascular E-selectin binds to the leukocyte integrins CD11/CD18., *Glycobiology* **1993**, *3*, 131–136.
- [39] R. Alon, T. Feizi, C. T. Yuen, R. C. Fuhlbrigge und T. A. Springer, Glycolipid ligands for selectins support leukocyte tethering and rolling under physiologic flow conditions., *J Immunol* **1995**, *154*, 5356–5366.
- [40] L. J. Picker, R. A. Warnock, A. R. Burns, C. M. Doerschuk, E. L. Berg und E. C. Butcher, The neutrophil selectin LECAM-1 presents carbohydrate ligands to the vascular selectins ELAM-1 and GMP-140., *Cell* **1991**, *66*, 921–933.
- [41] O. Zöllner, M. C. Lenter, J. E. Blanks, E. Borges, M. Steegmaier, H. G. Zerwes und D. Vestweber, L-selectin from human, but not from mouse neutrophils binds directly to E-selectin., *J Cell Biol* **1997**, *136*, 707–716.
- [42] S. Gout, C. Morin, F. Houle und J. Huot, Death receptor-3, a new E-Selectin counter-receptor that confers migration and survival advantages to colon carcinoma cells by triggering p38 and ERK MAPK activation., *Cancer Res* **2006**, *66*, 9117–9124.
- [43] S. D. Rosen, Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond., *Annu Rev Immunol* **2004**, *22*, 129–156.
- [44] J. P. Girard und T. A. Springer, High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration., *Immunol Today* **1995**, *16*, 449–457.
- [45] J. L. Gowans und E. J. Knight, The route of re-circulation of lymphocytes in the rat., *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **1964**, *159*, 257–282.
- [46] S. D. Rosen, M. S. Singer, T. A. Yednock und L. M. Stoolman, Involvement of sialic acid on endothelial cells in organ-specific lymphocyte recirculation., *Science* **1985**, *228*, 1005–1007.
- [47] L. A. Lasky, Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response., *Annu Rev Biochem* **1995**, *64*, 113–139.

- [48] S. T. Hwang, M. S. Singer, P. A. Giblin, T. A. Yednock, K. B. Bacon, S. I. Simon und S. D. Rosen, GlyCAM-1, a physiologic ligand for L-selectin, activates beta 2 integrins on naive peripheral lymphocytes., *J Exp Med* **1996**, *184*, 1343–1348.
- [49] W. J. Sanders, T. R. Katsumoto, C. R. Bertozzi, S. D. Rosen und L. L. Kiessling, L-selectin-carbohydrate interactions: relevant modifications of the Lewis x trisaccharide., *Biochemistry* **1996**, *35*, 14862–14867.
- [50] C. Mitsuoka, M. Sawada-Kasugai, K. Ando-Furui, M. Izawa, H. Nakanishi, S. Nakamura, H. Ishida, M. Kiso und R. Kannagi, Identification of a major carbohydrate capping group of the L-selectin ligand on high endothelial venules in human lymph nodes as 6-sulfo sialyl Lewis X., *J Biol Chem* **1998**, *273*, 11225–11233.
- [51] P. R. Streeter, B. T. Rouse und E. C. Butcher, Immunohistologic and functional characterization of a vascular addressin involved in lymphocyte homing into peripheral lymph nodes., *J Cell Biol* **1988**, *107*, 1853–1862.
- [52] U. Samulowitz, A. Kuhn, G. Brachtendorf, R. Nawroth, A. Braun, A. Bankfalvi, W. Böcker und D. Vestweber, Human endomucin: distribution pattern, expression on high endothelial venules, and decoration with the MECA-79 epitope., *Am J Pathol* **2002**, *160*, 1669–1681.
- [53] E. L. Berg, L. M. McEvoy, C. Berlin, R. F. Bargatze und E. C. Butcher, L-selectin-mediated lymphocyte rolling on MAdCAM-1., *Nature* **1993**, *366*, 695–698.
- [54] R. F. Bargatze, M. A. Jutila und E. C. Butcher, Distinct roles of L-selectin and integrins alpha 4 beta 7 and LFA-1 in lymphocyte homing to Peyer's patch-HEV in situ: the multistep model confirmed and refined., *Immunity* **1995**, *3*, 99–108.
- [55] R. A. Clark, R. C. Fuhlbrigge und T. A. Springer, L-Selectin ligands that are O-glycoprotease resistant and distinct from MECA-79 antigen are sufficient for tethering and rolling of lymphocytes on human high endothelial venules., *J Cell Biol* **1998**, *140*, 721–731.
- [56] K. L. Moore, N. L. Stults, S. Diaz, D. F. Smith, R. D. Cummings, A. Varki und R. P. McEver, Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells., *J Cell Biol* **1992**, *118*, 445–456.
- [57] K. E. Norgard, K. L. Moore, S. Diaz, N. L. Stults, S. Ushiyama, R. P. McEver, R. D. Cummings und A. Varki, Characterization of a specific ligand for P-selectin on myeloid cells. A minor glycoprotein with sialylated O-linked oligosaccharides., *J Biol Chem* **1993**, *268*, 12764–12774.
- [58] P. P. Wilkins, R. P. McEver und R. D. Cummings, Structures of the O-glycans on P-selectin glycoprotein ligand-1 from HL-60 cells., *J Biol Chem* **1996**, *271*, 18732–18742.
- [59] D. Sako, K. M. Comess, K. M. Barone, R. T. Camphausen, D. A. Cumming und G. D. Shaw, A sulfated peptide segment at the amino terminus of PSGL-1 is critical for P-selectin binding., *Cell* **1995**, *83*, 323–331.
- [60] G. Vachino, X. J. Chang, G. M. Veldman, R. Kumar, D. Sako, L. A. Fouser, M. C. Berndt und D. A. Cumming, P-selectin glycoprotein ligand-1 is the major counter-receptor for P-selectin on stimulated T cells and is widely distributed in non-functional form on many lymphocytic cells., *J Biol Chem* **1995**, *270*, 21966–21974.
- [61] K. L. Moore, K. D. Patel, R. E. Bruehl, F. Li, D. A. Johnson, H. S. Lichenstein, R. D. Cummings, D. F. Bainton und R. P. McEver, P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin., *J Cell Biol* **1995**, *128*, 661–671.

- [62] M. Martinez, M. Joffraud, S. Giraud, B. Baisse, M. P. Bernimoulin, M. Schapira und O. Spertini, Regulation of PSGL-1 interactions with L-selectin, P-selectin, and E-selectin: role of human fucosyltransferase-IV and -VII., *J Biol Chem* **2005**, *280*, 5378–5390.
- [63] K. L. Moore, S. F. Eaton, D. E. Lyons, H. S. Lichenstein, R. D. Cummings und R. P. McEver, The P-selectin glycoprotein ligand from human neutrophils displays sialylated, fucosylated, O-linked poly-N-acetyllactosamine., *J Biol Chem* **1994**, *269*, 23318–23327.
- [64] P. S. Frenette, C. V. Denis, L. Weiss, K. Jurk, S. Subbarao, B. Kehrel, J. H. Hartwig, D. Vestweber und D. D. Wagner, P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo., *J Exp Med* **2000**, *191*, 1413–1422.
- [65] P. da Costa Martins, J.-J. Garcia-Vallejo, J. V. van Thienen, M. Fernandez-Borja, J. M. van Gils, C. Beckers, A. J. Horrevoets, P. L. Hordijk und J.-J. Zwaginga, P-selectin glycoprotein ligand-1 is expressed on endothelial cells and mediates monocyte adhesion to activated endothelium., *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2007**, *27*, 1023–1029.
- [66] T. Akashi, T. Shirasawa und K. Hirokawa, Gene expression of CD24 core polypeptide molecule in normal rat tissues and human tumor cell lines., *Virchows Arch* **1994**, *425*, 399–406.
- [67] S. Aigner, Z. M. Sthoeger, M. Fogel, E. Weber, J. Zarn, M. Ruppert, Y. Zeller, D. Vestweber, R. Stahel, M. Sammar und P. Altevogt, CD24, a mucin-type glycoprotein, is a ligand for P-selectin on human tumor cells., *Blood* **1997**, *89*, 3385–3395.
- [68] M. W. Nicholson, A. N. Barclay, M. S. Singer, S. D. Rosen und P. A. van der Merwe, Affinity and kinetic analysis of L-selectin (CD62L) binding to glycosylation-dependent cell-adhesion molecule-1., *J Biol Chem* **1998**, *273*, 763–770.
- [69] R. P. McEver, Selectin-carbohydrate interactions during inflammation and metastasis., *Glycoconj J* **1997**, *14*, 585–591.
- [70] G. Kaplanski, C. Farnarier, O. Tissot, A. Pierres, A. M. Benoliel, M. C. Alessi, S. Kaplanski und P. Bongrand, Granulocyte-endothelium initial adhesion. Analysis of transient binding events mediated by E-selectin in a laminar shear flow., *Biophys J* **1993**, *64*, 1922–1933.
- [71] G. I. Bell, Models for the specific adhesion of cells to cells., *Science* **1978**, *200*, 618–627.
- [72] R. Alon, D. A. Hammer und T. A. Springer, Lifetime of the P-selectin-carbohydrate bond and its response to tensile force in hydrodynamic flow., *Nature* **1995**, *374*, 539–542.
- [73] A. Pierres, A. M. Benoliel, P. Bongrand und P. A. van der Merwe, Determination of the lifetime and force dependence of interactions of single bonds between surface-attached CD2 and CD48 adhesion molecules., *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**, *93*, 15114–15118.
- [74] R. Alon, S. Chen, K. D. Puri, E. B. Finger und T. A. Springer, The kinetics of L-selectin tethers and the mechanics of selectin-mediated rolling., *J Cell Biol* **1997**, *138*, 1169–1180.
- [75] R. Merkel, P. Nassoy, A. Leung, K. Ritchie und E. Evans, Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy., *Nature* **1999**, *397*, 50–53.
- [76] M. Dembo, D. C. Torney, K. Saxman und D. Hammer, The reaction-limited kinetics of membrane-to-surface adhesion and detachment., *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **1988**, *234*, 55–83.
- [77] B. T. Marshall, M. Long, J. W. Piper, T. Yago, R. P. McEver und C. Zhu, Direct observation of catch bonds involving cell-adhesion molecules., *Nature* **2003**, *423*, 190–193.

- [78] W. S. Somers, J. Tang, G. D. Shaw und R. T. Camphausen, Insights into the molecular basis of leukocyte tethering and rolling revealed by structures of P- and E-selectin bound to SLe(X) and PSGL-1., *Cell* **2000**, *103*, 467–479.
- [79] K. Konstantopoulos, W. D. Hanley und D. Wirtz, Receptor-ligand binding: 'catch' bonds finally caught., *Curr Biol* **2003**, *13*, R611–3.
- [80] W. E. Thomas, E. Trintchina, M. Forero, V. Vogel und E. V. Sokurenko, Bacterial adhesion to target cells enhanced by shear force., *Cell* **2002**, *109*, 913–923.
- [81] W. E. Thomas, V. Vogel und E. Sokurenko, Biophysics of catch bonds., *Annu Rev Biophys* **2008**, *37*, 399–416.
- [82] E. B. Finger, K. D. Puri, R. Alon, M. B. Lawrence, U. H. von Andrian und T. A. Springer, Adhesion through L-selectin requires a threshold hydrodynamic shear., *Nature* **1996**, *379*, 266–269.
- [83] S. Chen und T. A. Springer, An automatic braking system that stabilizes leukocyte rolling by an increase in selectin bond number with shear., *J Cell Biol* **1999**, *144*, 185–200.
- [84] J. Fritz, A. G. Katopodis, F. Kolbinger und D. Anselmetti, Force-mediated kinetics of single P-selectin/ligand complexes observed by atomic force microscopy., *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**, *95*, 12283–12288.
- [85] W. Hanley, O. McCarty, S. Jadhav, Y. Tseng, D. Wirtz und K. Konstantopoulos, Single molecule characterization of P-selectin/ligand binding., *J Biol Chem* **2003**, *278*, 10556–10561.
- [86] P. Pawar, P. K. Shin, S. A. Mousa, J. M. Ross und K. Konstantopoulos, Fluid shear regulates the kinetics and receptor specificity of Staphylococcus aureus binding to activated platelets., *J Immunol* **2004**, *173*, 1258–1265.
- [87] E. Y. H. Park, M. J. Smith, E. S. Stropp, K. R. Snapp, J. A. DiVietro, W. F. Walker, D. W. Schmidtke, S. L. Diamond und M. B. Lawrence, Comparison of PSGL-1 microbead and neutrophil rolling: microvillus elongation stabilizes P-selectin bond clusters., *Biophys J* **2002**, *82*, 1835–1847.
- [88] T. Yago, A. Leppänen, H. Qiu, W. D. Marcus, M. U. Nollert, C. Zhu, R. D. Cummings und R. P. McEver, Distinct molecular and cellular contributions to stabilizing selectin-mediated rolling under flow., *J Cell Biol* **2002**, *158*, 787–799.
- [89] M. Yoshida, W. F. Westlin, N. Wang, D. E. Ingber, A. Rosenzweig, N. Resnick und M. A. Gimbrone, Leukocyte adhesion to vascular endothelium induces E-selectin linkage to the actin cytoskeleton., *J Cell Biol* **1996**, *133*, 445–455.
- [90] S. Toppila, J. Lauronen, P. Mattila, J. P. Turunen, L. Penttilä, T. Paavonen, O. Renkonen und R. Renkonen, L-selectin ligands in rat high endothelium: multivalent sialyl Lewis x glycans are high-affinity inhibitors of lymphocyte adhesion., *Eur J Immunol* **1997**, *27*, 1360–1365.
- [91] R. P. McEver und R. D. Cummings, Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment., *J Clin Invest* **1997**, *100*, 97–103.
- [92] M. Yoshida, B. E. Szente, J. M. Kiely, A. Rosenzweig und M. A. Gimbrone, Phosphorylation of the cytoplasmic domain of E-selectin is regulated during leukocyte-endothelial adhesion., *J Immunol* **1998**, *161*, 933–941.
- [93] K. Krauss und P. Altevogt, Integrin leukocyte function-associated antigen-1-mediated cell binding can be activated by clustering of membrane rafts., *J Biol Chem* **1999**, *274*, 36921–36927.

- [94] J. Vogel, G. Bendas, U. Bakowsky, G. Hummel, R. R. Schmidt, U. Kettmann und U. Rothe, The role of glycolipids in mediating cell adhesion: a flow chamber study., *Biochim Biophys Acta* **1998**, *1372*, 205–215.
- [95] C. Gege, J. Vogel, G. Bendas, U. Rothe und R. R. Schmidt, Synthesis of the sialyl Lewis X epitope attached to glycolipids with different core structures and their selectin-binding characteristics in a dynamic test system., *Chemistry* **2000**, *6*, 111–122.
- [96] L. Poppe, G. S. Brown, J. S. Philo, P. V. Nikrad und B. H. Shah, Conformation of sLex Tetrasaccharide, Free in Solution and Bound to E-, P-, and L-Selectin., *J Am Chem Soc* **1997**, *119*, 1727–1736.
- [97] M. K. Wild, M. C. Huang, U. Schulze-Horsel, P. A. van der Merwe und D. Vestweber, Affinity, kinetics, and thermodynamics of E-selectin binding to E-selectin ligand-1., *J Biol Chem* **2001**, *276*, 31602–31612.
- [98] P. Compain und O. R. Martin, Carbohydrate mimetics-based glycosyltransferase inhibitors., *Bioorg Med Chem* **2001**, *9*, 3077–3092.
- [99] M. L. Mitchell, F. Tian, L. V. Lee und C.-H. Wong, Synthesis and evaluation of transition-state analogue inhibitors of alpha-1,3-fucosyltransferase., *Angew Chem Int Ed Engl* **2002**, *41*, 3041–3044.
- [100] B. W. Murray, S. Takayama, J. Schultz und C. H. Wong, Mechanism and specificity of human alpha-1,3-fucosyltransferase V., *Biochemistry* **1996**, *35*, 11183–11195.
- [101] T. De Vries, M. P. Palcic, P. S. Schoenmakers, D. H. Van Den Eijnden und D. H. Joziase, Acceptor specificity of GDP-Fuc:Gal beta 1->4GlcNAc-R alpha 3-fucosyltransferase VI (FucT VI) expressed in insect cells as soluble, secreted enzyme., *Glycobiology* **1997**, *7*, 921–927.
- [102] D. J. Becker und J. B. Lowe, Leukocyte adhesion deficiency type II., *Biochim Biophys Acta* **1999**, *1455*, 193–204.
- [103] A. Seekamp, M. van Griensven, E. Dhondt, M. Diefenbeck, I. Demeyer, G. Vundelinckx, N. Haas, U. Schaechinger, L. Wolowicka, S. Rammelt, J. Stroobants, I. Marzi, A. M. Brambrink, P. Dziurdzik, J. Gasiorowski, H. Redl, M. Beckert und J. Khan-Boluki, The effect of anti-L-selectin (aselizumab) in multiple traumatized patients—results of a phase II clinical trial., *Crit Care Med* **2004**, *32*, 2021–2028.
- [104] A. E. R. Hicks, S. L. Nolan, V. C. Ridger, P. G. Hellewell und K. E. Norman, Recombinant P-selectin glycoprotein ligand-1 directly inhibits leukocyte rolling by all 3 selectins in vivo: complete inhibition of rolling is not required for anti-inflammatory effect., *Blood* **2003**, *101*, 3249–3256.
- [105] R. Scalia, R. Hayward, V. E. Armstead, A. G. Minchenko und A. M. Lefer, Effect of recombinant soluble P-selectin glycoprotein ligand-1 on leukocyte-endothelium interaction in vivo. Role in rat traumatic shock., *Circ Res* **1999**, *84*, 93–102.
- [106] T. P. Kogan, B. Dupre, H. Bui, K. L. McAbee, J. M. Kassir, I. L. Scott, X. Hu, P. Vanderslice, P. J. Beck und R. A. Dixon, Novel synthetic inhibitors of selectin-mediated cell adhesion: synthesis of 1,6-bis[3-(3-carboxymethylphenyl)-4-(2-alpha-D-mannopyranosyloxy)phenyl]hexane (TBC1269)., *J Med Chem* **1998**, *41*, 1099–1111.
- [107] A. Koenig, K. Norgard-Sumnicht, R. Linhardt und A. Varki, 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* **1998**, *101*, 877–889.

- [108] M. E. Beauharnois, K. C. Lindquist, D. Marathe, P. Vanderslice, J. Xia, K. L. Matta und S. Neelamegham, Affinity and kinetics of sialyl Lewis-X and core-2 based oligosaccharides binding to L- and P-selectin., *Biochemistry* **2005**, *44*, 9507–9519.
- [109] D. Hanahan und R. A. Weinberg, The hallmarks of cancer., *Cell* **2000**, *100*, 57–70.
- [110] L. A. Liotta, J. Kleinerman und G. M. Saidel, Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation., *Cancer Res* **1974**, *34*, 997–1004.
- [111] W. Guo und F. G. Giancotti, Integrin signalling during tumour progression., *Nat Rev Mol Cell Biol* **2004**, *5*, 816–826.
- [112] S. A. Eccles und D. R. Welch, Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies., *Lancet* **2007**, *369*, 1742–1757.
- [113] L. A. Liotta und E. Kohn, Anoikis: cancer and the homeless cell., *Nature* **2004**, *430*, 973–974.
- [114] P. Friedl und E. B. Brocker, The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix., *Cell Mol Life Sci* **2000**, *57*, 41–64.
- [115] I. J. Fidler und G. L. Nicolson, Fate of recirculating B16 melanoma metastatic variant cells in parabiotic syngeneic recipients., *J Natl Cancer Inst* **1977**, *58*, 1867–1872.
- [116] P. Jurasz, D. Alonso-Escolano und M. W. Radomski, Platelet–cancer interactions: mechanisms and pharmacology of tumour cell-induced platelet aggregation., *Br J Pharmacol* **2004**, *143*, 819–826.
- [117] G. P. Gupta und J. Massague, Platelets and metastasis revisited: a novel fatty link., *J Clin Invest* **2004**, *114*, 1691–1693.
- [118] G. E. Rice und M. P. Bevilacqua, An inducible endothelial cell surface glycoprotein mediates melanoma adhesion., *Science* **1989**, *246*, 1303–1306.
- [119] A. Takada, K. Ohmori, N. Takahashi, K. Tsuyuoka, A. Yago, K. Zenita, A. Hasegawa und R. Kannagi, Adhesion of human cancer cells to vascular endothelium mediated by a carbohydrate antigen, sialyl Lewis A., *Biochem Biophys Res Commun* **1991**, *179*, 713–719.
- [120] N. Matsuura, T. Narita, N. Hiraiwa, M. Hiraiwa, H. Murai, T. Iwase, H. Funahashi, T. Imai, H. Takagi und R. Kannagi, Gene expression of fucosyl- and sialyl-transferases which synthesize sialyl Lewisx, the carbohydrate ligands for E-selectin, in human breast cancer., *Int J Oncol* **1998**, *12*, 1157–1164.
- [121] W. D. Hanley, M. M. Burdick, K. Konstantopoulos und R. Sackstein, CD44 on LS174T colon carcinoma cells possesses E-selectin ligand activity., *Cancer Res* **2005**, *65*, 5812–5817.
- [122] W. D. Hanley, S. L. Napier, M. M. Burdick, R. L. Schnaar, R. Sackstein und K. Konstantopoulos, Variant isoforms of CD44 are P- and L-selectin ligands on colon carcinoma cells., *FASEB J* **2006**, *20*, 337–339.
- [123] D. Morgan, U. Forssmann und M. Nakada, Cancer and Inflammation, **2004**, Birkhäuser Verlag; Basel, Schweiz.
- [124] O. V. Glinskii, J. R. Turk, K. J. Pienta, V. H. Huxley und V. V. Glinsky, Evidence of porcine and human endothelium activation by cancer-associated carbohydrates expressed on glycoproteins and tumour cells., *J Physiol* **2004**, *554*, 89–99.
- [125] M. H. R. Eichbaum, T. M. de Rossi, S. Kaul und G. Bastert, Serum levels of soluble E-selectin are associated with the clinical course of metastatic disease in patients with liver metastases from breast cancer., *Oncol Res* **2004**, *14*, 603–610.

- [126] J. J. Yin, C. B. Pollock und K. Kelly, Mechanisms of cancer metastasis to the bone., *Cell Res* **2005**, *15*, 57–62.
- [127] K. S. Nair, R. Naidoo und R. Chetty, Expression of cell adhesion molecules in oesophageal carcinoma and its prognostic value., *J Clin Pathol* **2005**, *58*, 343–351.
- [128] Y. J. Kim, L. Borsig, N. M. Varki und A. Varki, P-selectin deficiency attenuates tumor growth and metastasis., *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**, *95*, 9325–9330.
- [129] R. J. Ludwig, B. Boehme, M. Podda, R. Henschler, E. Jager, C. Tandi, W.-H. Boehncke, T. M. Zollner, R. Kaufmann und J. Gille, Endothelial P-selectin as a target of heparin action in experimental melanoma lung metastasis., *Cancer Res* **2004**, *64*, 2743–2750.
- [130] S. Aigner, C. L. Ramos, A. Hafezi-Moghadam, M. B. Lawrence, J. Friederichs, P. Altevogt und K. Ley, CD24 mediates rolling of breast carcinoma cells on P-selectin., *FASEB J* **1998**, *12*, 1241–1251.
- [131] B. Monzavi-Karbassi, J. S. Stanley, L. Hennings, F. Jousheghany, C. Artaud, S. Shaaf und T. Kieber-Emmons, Chondroitin sulfate glycosaminoglycans as major P-selectin ligands on metastatic breast cancer cell lines., *Int J Cancer* **2007**, *120*, 1179–1191.
- [132] Y. Q. Ma und J. G. Geng, Heparan sulfate-like proteoglycans mediate adhesion of human malignant melanoma A375 cells to P-selectin under flow., *J Immunol* **2000**, *165*, 558–565.
- [133] A. Aruffo, W. Kolanus, G. Walz, P. Fredman und B. Seed, CD62/P-selectin recognition of myeloid and tumor cell sulfatides., *Cell* **1991**, *67*, 35–44.
- [134] M. Yamada, K. Yanaba, M. Hasegawa, Y. Matsushita, M. Horikawa, K. Komura, T. Matsushita, A. Kawasuji, T. Fujita, K. Takehara, D. A. Steeber, T. F. Tedder und S. Sato, Regulation of local and metastatic host-mediated anti-tumour mechanisms by L-selectin and intercellular adhesion molecule-1., *Clin Exp Immunol* **2006**, *143*, 216–227.
- [135] A. Izycka, E. Jablonska, T. Izycki und E. Chyczewska, Expression of adhesion molecules LFA-1 and L-selectin on PMN and level of soluble sE-selectin and sL-selectin in the serum of patients with small cell lung cancer, *Pneumonol Alergol Pol* **2002**, *70*, 403–408.
- [136] P. Radhakrishnan, M. Lin und P. Cheng, Elevated expression of L-selectin ligand in lymph node-derived human prostate cancer cells correlates with increased tumorigenicity., *Glycoconj J* **2008**, *26*, 75–81.
- [137] G. Mannori, P. Crottet, O. Cecconi, K. Hanasaki, A. Aruffo, R. M. Nelson, A. Varki und M. P. Bevilacqua, Differential colon cancer cell adhesion to E-, P-, and L-selectin: role of mucin-type glycoproteins., *Cancer Res* **1995**, *55*, 4425–4431.
- [138] Y. J. Kim, L. Borsig, H. L. Han, N. M. Varki und A. Varki, Distinct selectin ligands on colon carcinoma mucins can mediate pathological interactions among platelets, leukocytes, and endothelium., *Am J Pathol* **1999**, *155*, 461–472.
- [139] H. Laubli, J. L. Stevenson, A. Varki, N. M. Varki und L. Borsig, L-selectin facilitation of metastasis involves temporal induction of Fut7-dependent ligands at sites of tumor cell arrest., *Cancer Res* **2006**, *66*, 1536–1542.
- [140] L. Borsig, Selectins facilitate carcinoma metastasis and heparin can prevent them., *News Physiol Sci* **2004**, *19*, 16–21.
- [141] C. Boccaccio, G. Sabatino, E. Medico, F. Girolami, A. Follenzi, G. Reato, A. Sottile, L. Naldini und P. M. Comoglio, The MET oncogene drives a genetic programme linking cancer to haemostasis., *Nature* **2005**, *434*, 396–400.

- [142] A. Falanga und A. Piccioli, Effect of anticoagulant drugs in cancer., *Curr Opin Pulm Med* **2005**, *11*, 403–407.
- [143] F. R. Rickles und A. Falanga, Molecular basis for the relationship between thrombosis and cancer., *Thromb Res* **2001**, *102*, 215–24.
- [144] J. W. Blom, C. J. M. Doggen, S. Osanto und F. R. Rosendaal, Malignancies, prothrombotic mutations, and the risk of venous thrombosis., *JAMA* **2005**, *293*, 715–722.
- [145] M. P. Schön, T. Krahn, M. Schon, M.-L. Rodriguez, H. Antonicek, J. E. Schultz, R. J. Ludwig, T. M. Zollner, E. Bischoff, K.-D. Bremm, M. Schramm, K. Henninger, R. Kaufmann, H. P. M. Gollnick, C. M. Parker und W.-H. Boehncke, Efomycine M, a new specific inhibitor of selectin, impairs leukocyte adhesion and alleviates cutaneous inflammation., *Nat Med* **2002**, *8*, 366–372.
- [146] N. R. Bijsterveld, R. Hettiarachchi, R. Peters, M. H. Prins, M. Levi und H. R. Buller, Low-molecular weight heparins in venous and arterial thrombotic disease., *Thromb Haemost* **1999**, *82*, 139–147.
- [147] A. Y. Y. Lee, M. N. Levine, R. I. Baker, C. Bowden, A. K. Kakkar, M. Prins, F. R. Rickles, J. A. Julian, S. Haley, M. J. Kovacs und M. Gent, Low-molecular-weight heparin versus a coumarin for the prevention of recurrent venous thromboembolism in patients with cancer., *N Engl J Med* **2003**, *349*, 146–153.
- [148] G. Meyer, Z. Marjanovic, J. Valcke, B. Lorcerie, Y. Gruel, P. Solal-Celigny, C. Le Maignan, J. M. Extra, P. Cottu und D. Farge, Comparison of low-molecular-weight heparin and warfarin for the secondary prevention of venous thromboembolism in patients with cancer: a randomized controlled study., *Arch Intern Med* **2002**, *162*, 1729–1735.
- [149] K. M. J. Brose und A. Y. Y. Lee, Cancer-associated thrombosis: prevention and treatment., *Curr Oncol* **2008**, *15*, 58–67.
- [150] L. R. Zacharski und D. L. Ornstein, Heparin and cancer., *Thromb Haemost* **1998**, *80*, 10–23.
- [151] B. Lebeau, C. Chastang, J. M. Brechot, F. Capron, B. Dautzenberg, C. Delaisements, M. Mornet, J. Brun, J. P. Hurdebourcq und E. Lemarie, Subcutaneous heparin treatment increases survival in small cell lung cancer. "Petites Cellules"Group., *Cancer* **1994**, *74*, 38–45.
- [152] S. M. Smorenburg, R. J. Hettiarachchi, R. Vink und H. R. Buller, The effects of unfractionated heparin on survival in patients with malignancy—a systematic review., *Thromb Haemost* **1999**, *82*, 1600–1604.
- [153] R. J. Hettiarachchi, S. M. Smorenburg, J. Ginsberg, M. Levine, M. H. Prins und H. R. Buller, Do heparins do more than just treat thrombosis? The influence of heparins on cancer spread., *Thromb Haemost* **1999**, *82*, 947–952.
- [154] S. Siragusa, B. Cosmi, F. Piovella, J. Hirsh und J. S. Ginsberg, Low-molecular-weight heparins and unfractionated heparin in the treatment of patients with acute venous thromboembolism: results of a meta-analysis., *Am J Med* **1996**, *100*, 269–277.
- [155] M. Z. Wojtukiewicz, L. Kozlowski, K. Ostrowska, A. Dmitruk und L. R. Zacharski, Low molecular weight heparin treatment for malignant melanoma: a pilot clinical trial., *Thromb Haemost* **2003**, *89*, 405–407.
- [156] A. K. Kakkar, M. N. Levine, Z. Kadziola, N. R. Lemoine, V. Low, H. K. Patel, G. Rustin, M. Thomas, M. Quigley und R. C. N. Williamson, Low molecular weight heparin, therapy with dalteparin, and survival in advanced cancer: the fragmin advanced malignancy outcome study (FAMOUS)., *J Clin Oncol* **2004**, *22*, 1944–1948.

- [157] C. P. W. Klerk, S. M. Smorenburg, H.-M. Otten, A. W. A. Lensing, M. H. Prins, F. Piovella, P. Prandoni, M. M. E. M. Bos, D. J. Richel, G. van Tienhoven und H. R. Buller, The effect of low molecular weight heparin on survival in patients with advanced malignancy., *J Clin Oncol* **2005**, *23*, 2130–2135.
- [158] M. Altinbas, H. S. Coskun, O. Er, M. Ozkan, B. Eser, A. Unal, M. Cetin und S. Soyuer, A randomized clinical trial of combination chemotherapy with and without low-molecular-weight heparin in small cell lung cancer., *J Thromb Haemost* **2004**, *2*, 1266–1271.
- [159] T. M. H. Niers, C. P. W. Klerk, M. DiNisio, C. J. F. Van Noorden, H. R. Buller, P. H. Reitsma und D. J. Richel, Mechanisms of heparin induced anti-cancer activity in experimental cancer models., *Crit Rev Oncol Hematol* **2007**, *61*, 195–207.
- [160] L. R. Zacharski, W. G. Henderson, F. R. Rickles, W. B. Forman, C. J. J. Cornell, R. J. Forcier, R. Edwards, E. Headley, S. H. Kim, J. R. O'Donnell, R. O'Dell, K. Tornoyos und H. C. Kwaan, Effect of warfarin on survival in small cell carcinoma of the lung. Veterans Administration Study No. 75., *JAMA* **1981**, *245*, 831–835.
- [161] S. M. Smorenburg, R. Vink, H. M. Otten, F. Swaneveld und H. R. Buller, The effects of vitamin K-antagonists on survival of patients with malignancy: a systematic analysis., *Thromb Haemost* **2001**, *86*, 1586–1587.
- [162] S. M. Smorenburg und C. J. Van Noorden, The complex effects of heparins on cancer progression and metastasis in experimental studies., *Pharmacol Rev* **2001**, *53*, 93–105.
- [163] A. E. Lee, L. A. Rogers, J. M. Longcroft und R. E. Jeffery, Reduction of metastasis in a murine mammary tumour model by heparin and polyinosinic-polycytidylic acid., *Clin Exp Metastasis* **1990**, *8*, 165–171.
- [164] I. Vlodaysky, M. Mohsen, O. Lider, C. M. Svahn, H. P. Ekre, M. Vigoda, R. Ishai-Michaeli und T. Peretz, Inhibition of tumor metastasis by heparanase inhibiting species of heparin., *Invasion Metastasis* **1994**, *14*, 290–302.
- [165] J. L. Stevenson, S. H. Choi und A. Varki, Differential metastasis inhibition by clinically relevant levels of heparins—correlation with selectin inhibition, not antithrombotic activity., *Clin Cancer Res* **2005**, *11*, 7003–7011.
- [166] R. J. Ludwig, S. Alban, R. Bistrrian, W.-H. Boehncke, R. Kaufmann, R. Henschler und J. Gille, The ability of different forms of heparins to suppress P-selectin function in vitro correlates to their inhibitory capacity on bloodborne metastasis in vivo., *Thromb Haemost* **2006**, *95*, 535–540.
- [167] D. L. Ornstein und L. R. Zacharski, Cancer, thrombosis, and anticoagulants., *Curr Opin Pulm Med* **2000**, *6*, 301–308.
- [168] I. Vlodaysky, G. Abboud-Jarrous, M. Elkin, A. Naggi, B. Casu, R. Sasisekharan und N. Ilan, The impact of heparanase and heparin on cancer metastasis and angiogenesis., *Pathophysiol Haemost Thromb* **2006**, *35*, 116–127.
- [169] N. Hostettler, A. Naggi, G. Torri, R. Ishai-Michaeli, B. Casu, I. Vlodaysky und L. Borsig, P-selectin- and heparanase-dependent antimetastatic activity of non-anticoagulant heparins., *FASEB J* **2007**, *21*, 3562–3572.
- [170] R. Lever und C. P. Page, Novel drug development opportunities for heparin., *Nat Rev Drug Discov* **2002**, *1*, 140–148.
- [171] L. Borsig, R. Wong, J. Feramisco, D. R. Nadeau, N. M. Varki und A. Varki, Heparin and cancer revisited: mechanistic connections involving platelets, P-selectin, carcinoma mucins, and tumor metastasis., *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**, *98*, 3352–3357.

- [172] M. P. Skinner, D. J. Fournier, R. K. Andrews, J. J. Gorman, C. N. Chesterman und M. C. Berndt, Characterization of human platelet GMP-140 as a heparin-binding protein., *Biochem Biophys Res Commun* **1989**, *164*, 1373–1379.
- [173] M. P. Skinner, C. M. Lucas, G. F. Burns, C. N. Chesterman und M. C. Berndt, GMP-140 binding to neutrophils is inhibited by sulfated glycans., *J Biol Chem* **1991**, *266*, 5371–5374.
- [174] Europäisches Arzneibuch 6.0, Niedermolekulare Heparine, *Monographie 6.0/0828* **2008**, elektronische Ausgabe.
- [175] R. J. Linhardt und N. S. Gunay, Production and chemical processing of low molecular weight heparins., *Semin Thromb Hemost* **1999**, *25*, 5–16.
- [176] R. M. Nelson, O. Cecconi, W. G. Roberts, A. Aruffo, R. J. Linhardt und M. P. Bevilacqua, Heparin oligosaccharides bind L- and P-selectin and inhibit acute inflammation., *Blood* **1993**, *82*, 3253–3258.
- [177] K. E. Norgard-Sumnicht, N. M. Varki und A. Varki, Calcium-dependent heparin-like ligands for L-selectin in nonlymphoid endothelial cells., *Science* **1993**, *261*, 480–483.
- [178] Y. Gao, N. Li, R. Fei, Z. Chen, S. Zheng und X. Zeng, P-Selectin-mediated acute inflammation can be blocked by chemically modified heparin, RO-heparin., *Mol Cells* **2005**, *19*, 350–355.
- [179] L. Wang, J. R. Brown, A. Varki und J. D. Esko, Heparin's anti-inflammatory effects require glucosamine 6-O-sulfation and are mediated by blockade of L- and P-selectins., *J Clin Invest* **2002**, *110*, 127–136.
- [180] M. Wei, G. Tai, Y. Gao, N. Li, B. Huang, Y. Zhou, S. Hao und X. Zeng, Modified heparin inhibits P-selectin-mediated cell adhesion of human colon carcinoma cells to immobilized platelets under dynamic flow conditions., *J Biol Chem* **2004**, *279*, 29202–29210.
- [181] J.-G. Wang und J.-G. Geng, Affinity and kinetics of P-selectin binding to heparin., *Thromb Haemost* **2003**, *90*, 309–316.
- [182] C. Pfarrer, P. Hirsch, M. Guillomot und R. Leiser, Interaction of integrin receptors with extracellular matrix is involved in trophoblast giant cell migration in bovine placentomes., *Placenta* **2003**, *24*, 588–597.
- [183] J. D. Humphries, A. Byron und M. J. Humphries, Integrin ligands at a glance., *J Cell Sci* **2006**, *119*, 3901–3903.
- [184] B.-H. Luo, C. V. Carman und T. A. Springer, Structural basis of integrin regulation and signaling., *Annu Rev Immunol* **2007**, *25*, 619–647.
- [185] M. Stewart, M. Thiel und N. Hogg, Leukocyte integrins., *Curr Opin Cell Biol* **1995**, *7*, 690–696.
- [186] A. P. Mould, Getting integrins into shape: recent insights into how integrin activity is regulated by conformational changes., *J Cell Sci* **1996**, *109*, 2613–2618.
- [187] M. Shimaoka, J. Takagi und T. A. Springer, Conformational regulation of integrin structure and function., *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **2002**, *31*, 485–516.
- [188] M. L. Dustin und T. A. Springer, T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1., *Nature* **1989**, *341*, 619–624.
- [189] N. Beglova, S. C. Blacklow, J. Takagi und T. A. Springer, Cysteine-rich module structure reveals a fulcrum for integrin rearrangement upon activation., *Nat Struct Biol* **2002**, *9*, 282–287.

- [190] T. Kinashi, Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes., *Nat Rev Immunol* **2005**, *5*, 546–559.
- [191] C. V. Carman und T. A. Springer, Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized?, *Curr Opin Cell Biol* **2003**, *15*, 547–556.
- [192] R. O. Hynes, Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion., *Cell* **1992**, *69*, 11–25.
- [193] G. Bazzoni und M. E. Hemler, Are changes in integrin affinity and conformation overemphasized?, *Trends Biochem Sci* **1998**, *23*, 30–34.
- [194] C. D. Buckley, D. Pilling, N. V. Henriquez, G. Parsonage, K. Threlfall, D. Scheel-Toellner, D. L. Simmons, A. N. Akbar, J. M. Lord und M. Salmon, RGD peptides induce apoptosis by direct caspase-3 activation., *Nature* **1999**, *397*, 534–539.
- [195] J.-P. Xiong, T. Stehle, R. Zhang, A. Joachimiak, M. Frech, S. L. Goodman und M. A. Arnaout, Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand., *Science* **2002**, *296*, 151–155.
- [196] T. Xiao, J. Takagi, B. S. Coller, J.-H. Wang und T. A. Springer, Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics., *Nature* **2004**, *432*, 59–67.
- [197] E. A. Wayner, A. Garcia-Pardo, M. J. Humphries, J. A. McDonald und W. G. Carter, Identification and characterization of the T lymphocyte adhesion receptor for an alternative cell attachment domain (CS-1) in plasma fibronectin., *J Cell Biol* **1989**, *109*, 1321–1330.
- [198] V. H. Tselepis, L. J. Green und M. J. Humphries, An RGD to LDV motif conversion within the disintegrin kistrin generates an integrin antagonist that retains potency but exhibits altered receptor specificity. Evidence for a functional equivalence of acidic integrin-binding motifs., *J Biol Chem* **1997**, *272*, 21341–21348.
- [199] N. Marrakchi, S. Guerhazi und M. El Ayeb, The anti-platelet aggregation drugs: new approaches based on snake venom polypeptides], *Arch Inst Pasteur Tunis* **1997**, *74*, 9–15.
- [200] J. M. Clements, P. Newham, M. Shepherd, R. Gilbert, T. J. Dudgeon, L. A. Needham, R. M. Edwards, L. Berry, A. Brass und M. J. Humphries, Identification of a key integrin-binding sequence in VCAM-1 homologous to the LDV active site in fibronectin., *J Cell Sci* **1994**, *107*, 2127–2135.
- [201] T. Maeda, R. Oyama, K. Ichihara-Tanaka, F. Kimizuka, I. Kato, K. Titani und K. Sekiguchi, A novel cell adhesive protein engineered by insertion of the Arg-Gly-Asp-Ser tetrapeptide., *J Biol Chem* **1989**, *264*, 15165–15168.
- [202] M. Shimaoka, T. Xiao, J.-H. Liu, Y. Yang, Y. Dong, C.-D. Jun, A. McCormack, R. Zhang, A. Joachimiak, J. Takagi, J.-H. Wang und T. A. Springer, Structures of the alpha L I domain and its complex with ICAM-1 reveal a shape-shifting pathway for integrin regulation., *Cell* **2003**, *112*, 99–111.
- [203] J. Emsley, C. G. Knight, R. W. Farndale, M. J. Barnes und R. C. Liddington, Structural basis of collagen recognition by integrin alpha2beta1., *Cell* **2000**, *101*, 47–56.
- [204] R. O. Hynes, Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines., *Cell* **2002**, *110*, 673–687.
- [205] M. E. Hemler, C. F. Ware und J. L. Strominger, Characterization of a novel differentiation antigen complex recognize by a monoclonal antibody (A-1A5): unique activation-specific molecular forms on stimulated T cells., *J Immunol* **1983**, *131*, 334–340.

- [206] M. E. Hemler, C. Huang und L. Schwarz, The VLA protein family. Characterization of five distinct cell surface heterodimers each with a common 130,000 molecular weight beta subunit., *J Biol Chem* **1987**, *262*, 3300–3309.
- [207] Y. Takada, C. Huang und M. E. Hemler, Fibronectin receptor structures in the VLA family of heterodimers., *Nature* **1987**, *326*, 607–609.
- [208] L. M. Amzel und R. J. Poljak, Three-dimensional structure of immunoglobulins., *Annu Rev Biochem* **1979**, *48*, 961–997.
- [209] T. A. Springer, Adhesion receptors of the immune system., *Nature* **1990**, *346*, 425–434.
- [210] M. Tessier-Lavigne und C. S. Goodman, The molecular biology of axon guidance., *Science* **1996**, *274*, 1123–1133.
- [211] T. A. Springer, Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm., *Cell* **1994**, *76*, 301–314.
- [212] T. M. Carlos und J. M. Harlan, Leukocyte-endothelial adhesion molecules., *Blood* **1994**, *84*, 2068–2101.
- [213] G. E. Rice, J. M. Munro und M. P. Bevilacqua, Inducible cell adhesion molecule 110 (INCAM-110) is an endothelial receptor for lymphocytes. A CD11/CD18-independent adhesion mechanism., *J Exp Med* **1990**, *171*, 1369–1374.
- [214] L. Osborn, C. Hession, R. Tizard, C. Vassallo, S. Luhowskyj, G. Chi-Rosso und R. Lobb, Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes., *Cell* **1989**, *59*, 1203–1211.
- [215] M. S. Diamond und T. A. Springer, The dynamic regulation of integrin adhesiveness., *Curr Biol* **1994**, *4*, 506–517.
- [216] E. C. Butcher und L. J. Picker, Lymphocyte homing and homeostasis., *Science* **1996**, *272*, 60–66.
- [217] M. J. Elices, L. Osborn, Y. Takada, C. Crouse, S. Luhowskyj, M. E. Hemler und R. R. Lobb, VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site., *Cell* **1990**, *60*, 577–584.
- [218] G. E. Rice, J. M. Munro, C. Corless und M. P. Bevilacqua, Vascular and nonvascular expression of INCAM-110. A target for mononuclear leukocyte adhesion in normal and inflamed human tissues., *Am J Pathol* **1991**, *138*, 385–393.
- [219] T. Kawano, S. Yanoma, Y. Nakamura, O. Shiono, T. Kokatu, A. Kubota, M. Furukawa und M. Tsukuda, Evaluation of soluble adhesion molecules CD44 (CD44st, CD44v5, CD44v6), ICAM-1, and VCAM-1 as tumor markers in head and neck cancer., *Am J Otolaryngol* **2005**, *26*, 308–313.
- [220] H. C. Silva, F. Garcao, E. C. Coutinho, C. F. De Oliveira und F. J. Regateiro, Soluble VCAM-1 and E-selectin in breast cancer: relationship with staging and with the detection of circulating cancer cells., *Neoplasma* **2006**, *53*, 538–543.
- [221] Y.-B. Ding, G.-Y. Chen, J.-G. Xia, X.-W. Zang, H.-Y. Yang und L. Yang, Association of VCAM-1 overexpression with oncogenesis, tumor angiogenesis and metastasis of gastric carcinoma., *World J Gastroenterol* **2003**, *9*, 1409–1414.
- [222] T.-C. Wu, The role of vascular cell adhesion molecule-1 in tumor immune evasion., *Cancer Res* **2007**, *67*, 6003–6006.

- [223] C. Wong, T. Bray und E. Ho, Induction of proinflammatory response in prostate cancer epithelial cells by activated macrophages., *Cancer Lett* **2008**, *276*, 38–46.
- [224] K.-i. Shioi, A. Komiya, K. Hattori, Y. Huang, F. Sano, T. Murakami, N. Nakaigawa, T. Kishida, Y. Kubota, Y. Nagashima und M. Yao, Vascular cell adhesion molecule 1 predicts cancer-free survival in clear cell renal carcinoma patients., *Clin Cancer Res* **2006**, *12*, 7339–7346.
- [225] K. Sasaki, A. D. Pardee, H. Okada und W. J. Storkus, IL-4 inhibits VLA-4 expression on Tc1 cells resulting in poor tumor infiltration and reduced therapy benefit., *Eur J Immunol* **2008**, *38*, 2865–2873.
- [226] P. Mattila, M. L. Majuri und R. Renkonen, VLA-4 integrin on sarcoma cell lines recognizes endothelial VCAM-1. Differential regulation of the VLA-4 avidity on various sarcoma cell lines., *Int J Cancer* **1992**, *52*, 918–923.
- [227] D. B. Taichman, M. I. Cybulsky, I. Djaffar, B. M. Longenecker, J. Teixido, G. E. Rice, A. Aruffo und M. P. Bevilacqua, Tumor cell surface alpha 4 beta 1 integrin mediates adhesion to vascular endothelium: demonstration of an interaction with the N-terminal domains of INCAM-110/VCAM-1., *Cell Regul* **1991**, *2*, 347–355.
- [228] I. Martin-Padura, R. Mortarini, D. Lauri, S. Bernasconi, F. Sanchez-Madrid, G. Parmiani, A. Mantovani, A. Anichini und E. Dejana, Heterogeneity in human melanoma cell adhesion to cytokine activated endothelial cells correlates with VLA-4 expression., *Cancer Res* **1991**, *51*, 2239–2241.
- [229] M. Klemke, T. Weschenfelder, M. H. Konstandin und Y. Samstag, High affinity interaction of integrin alpha4beta1 (VLA-4) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) enhances migration of human melanoma cells across activated endothelial cell layers., *J Cell Physiol* **2007**, *212*, 368–374.
- [230] H. Okahara, H. Yagita, K. Miyake und K. Okumura, Involvement of very late activation antigen 4 (VLA-4) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) in tumor necrosis factor alpha enhancement of experimental metastasis., *Cancer Res* **1994**, *54*, 3233–3236.
- [231] A. Garofalo, R. G. Chirivi, C. Foglieni, R. Pigott, R. Mortarini, I. Martin-Padura, A. Anichini, A. J. Gearing, F. Sanchez-Madrid und E. Dejana, Involvement of the very late antigen 4 integrin on melanoma in interleukin 1-augmented experimental metastases., *Cancer Res* **1995**, *55*, 414–419.
- [232] A. Higashiyama, H. Watanabe, K. Okumura und H. Yagita, Involvement of tumor necrosis factor alpha and very late activation antigen 4/vascular cell adhesion molecule 1 interaction in surgical-stress-enhanced experimental metastasis., *Cancer Immunol Immunother* **1996**, *42*, 231–236.
- [233] D. Schadendorf, J. Heidel, C. Gawlik, L. Suter und B. M. Czarnetzki, Association with clinical outcome of expression of VLA-4 in primary cutaneous malignant melanoma as well as P-selectin and E-selectin on intratumoral vessels., *J Natl Cancer Inst* **1995**, *87*, 366–371.
- [234] F. Qian, D. L. Vaux und I. L. Weissman, Expression of the integrin alpha 4 beta 1 on melanoma cells can inhibit the invasive stage of metastasis formation., *Cell* **1994**, *77*, 335–347.
- [235] S. Liang und C. Dong, Integrin VLA-4 enhances sialyl-Lewisx/a-negative melanoma adhesion to and extravasation through the endothelium under low flow conditions., *Am J Physiol Cell Physiol* **2008**, *295*, 701–707.
- [236] D. R. Coombe, S. M. Watt und C. R. Parish, Mac-1 (CD11b/CD18) and CD45 mediate the adhesion of hematopoietic progenitor cells to stromal cell elements via recognition of stromal heparan sulfate., *Blood* **1994**, *84*, 739–752.

- [237] T. Vorup-Jensen, C. V. Carman, M. Shimaoka, P. Schuck, J. Svitel und T. A. Springer, Exposure of acidic residues as a danger signal for recognition of fibrinogen and other macromolecules by integrin alphaXbeta2., *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, *102*, 1614–1619.
- [238] T. Vorup-Jensen, L. Chi, L. C. Gjelstrup, U. B. Jensen, C. A. Jewett, C. Xie, M. Shimaoka, R. J. Linhardt und T. A. Springer, Binding between the integrin alphaXbeta2 (CD11c/CD18) and heparin., *J Biol Chem* **2007**, *282*, 30869–30877.
- [239] M. Sobel, W. R. Fish, N. Toma, S. Luo, K. Bird, K. Mori, S. Kusumoto, S. D. Blystone und Y. Suda, Heparin modulates integrin function in human platelets., *J Vasc Surg* **2001**, *33*, 587–594.
- [240] M. S. Da Silva, J. A. Horton, J. M. Wijelath, L. W. Blystone, W. R. Fish, E. Wijelath, K. Strand, S. D. Blystone und M. Sobel, Heparin modulates integrin-mediated cellular adhesion: specificity of interactions with alpha and beta integrin subunits., *Cell Commun Adhes* **2003**, *10*, 59–67.
- [241] K. Park, Y.-S. Kim, G. Y. Lee, R.-W. Park, I.-S. Kim, S. Y. Kim und Y. Byun, Tumor Endothelial Cell Targeted Cyclic RGD-modified Heparin Derivative: Inhibition of Angiogenesis and Tumor Growth., *Pharm Res* **2008**, *25*, 2786–2798.
- [242] J. Fritzsche, D. Simonis und G. Bendas, Melanoma cell adhesion can be blocked by heparin in vitro: Suggestion of VLA-4 as a novel target for antimetastatic approaches., *Thromb Haemost* **2008**, *100*, 1166–1175.
- [243] D. R. Thevenot, K. Toth, R. A. Durst und G. S. Wilson, Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification., *Biosens Bioelectron* **2001**, *16*, 121–131.
- [244] T. Endo, S. Yamamura, K. Kerman und E. Tamiya, Label-free cell-based assay using localized surface plasmon resonance biosensor., *Anal Chim Acta* **2008**, *614*, 182–189.
- [245] R. L. Rich und D. G. Myszka, Survey of the year 2000 commercial optical biosensor literature., *J Mol Recognit* **2001**, *14*, 273–294.
- [246] D. Myszka und R. Rich, Implementing surface plasmon resonance biosensors in drug discovery., *Pharm Sci Technolo Today* **2000**, *3*, 310–317.
- [247] M. A. Cooper, Optical biosensors in drug discovery., *Nat Rev Drug Discov* **2002**, *1*, 515–528.
- [248] R. L. Rich und D. G. Myszka, Higher-throughput, label-free, real-time molecular interaction analysis., *Anal Biochem* **2007**, *361*, 1–6.
- [249] T. M. A. Gronewold, Surface acoustic wave sensors in the bioanalytical field: recent trends and challenges., *Anal Chim Acta* **2007**, *603*, 119–128.
- [250] M. A. Cooper und V. T. Singleton, A survey of the 2001 to 2005 quartz crystal microbalance biosensor literature: applications of acoustic physics to the analysis of biomolecular interactions., *J Mol Recognit* **2007**, *20*, 154–184.
- [251] J. Curie und C. P., Contractions et dilatations produites par des tensions dans les cristaux hémihédres à faces inclinées, *C R Acad Sci Gen* **1880**, *93*, 1137–1140.
- [252] J. Curie und C. P., Développement, par pression, de l'électricité polaire dans les cristaux hémihédres à faces inclinées, *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* **1880**, *91*, 294–295.
- [253] Degreen, Wikipedia Foundation, Piezoelektrizität, http://de.wikipedia.org/wiki/Piezoelektrischer_Effekt, Veröffentlichung unter der GNU-Lizenz für freie Dokumentation, zuletzt geändert am 26.08.2008, abgerufen am 05.09.2008.

-
- [254] A. Janshoff, H. Galla und C. Steinem, Piezoelectric Mass-Sensing Devices as Biosensors-An Alternative to Optical Biosensors?, *Angew Chem Int Ed Engl* **2000**, *39*, 4004–4032.
- [255] G. Sauerbrey, Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung, *Zeitschrift für Physik* **1959**, *155*, 206–222.
- [256] C. K. O’Sullivan und G. G. Guilbault, Commercial quartz crystal microbalances - theory and applications, *Biosensors and Bioelectronics* **1999**, *14*, 663–670.
- [257] R. Borngräber, Quarzresonanzsensoren für flüssige Medien, Sensordesign und Interfaces, Dissertation, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg **2001**.
- [258] K. Kanazawa und J. G. Gordon, The oscillation frequency of a quartz resonator in contact with liquid, *Analytica Chimica Acta* **1985**, *175*, 99–105.
- [259] K. K. Kanazawa und J. G. Gordon, Frequency of a quartz microbalance in contact with liquid, *Analytical Chemistry* **1985**, *57*, 1770–1771.
- [260] Wikipedia Foundation, Love wave, http://en.wikipedia.org/wiki/File:Love_wave.jpg, Urheber: Regierung der Vereinigten Staaten von Amerika; Veröffentlichung unter den Maßgaben der „public domain“, **zuletzt geändert am 24.03.2007, abgerufen am 12.01.2009**.
- [261] Wikipedia Foundation, Rayleigh wave, http://en.wikipedia.org/wiki/File:Rayleigh_wave.jpg, Urheber: Regierung der Vereinigten Staaten von Amerika; Veröffentlichung unter den Maßgaben der „public domain“, **zuletzt geändert am 24.03.2007, abgerufen am 12.01.2009**.
- [262] A. Shons, F. Dorman und J. Najarian, An immunospecific microbalance., *J Biomed Mater Res* **1972**, *6*, 565–570.
- [263] B. König und M. Gratzel, A novel immunosensor for herpes viruses., *Anal Chem* **1994**, *66*, 341–344.
- [264] J. Stair, M. Watkinson und S. Krause, Sensor materials for the detection of proteases., *Biosens Bioelectron* **2008**, *24*, 2113–2118.
- [265] N. Lassalle, A. Roget, T. Livache, P. Mailley und E. Vieil, Electropolymerisable pyrrole-oligonucleotide: synthesis and analysis of ODN hybridisation by fluorescence and QCM., *Talanta* **2001**, *55*, 993–1004.
- [266] M. Hopfner, U. Rothe und G. Bendas, Biosensor-based evaluation of liposomal behavior in the target binding process., *J Liposome Res* **2008**, *18*, 71–82.
- [267] K. Christ, I. Wiedemann, U. Bakowsky, H.-G. Sahl und G. Bendas, The role of lipid II in membrane binding of and pore formation by nisin analyzed by two combined biosensor techniques., *Biochim Biophys Acta* **2007**, *1768*, 694–704.
- [268] T. M. A. Gronewold, A. Baumgartner, E. Quandt und M. Famulok, Discrimination of single mutations in cancer-related gene fragments with a surface acoustic wave sensor., *Anal Chem* **2006**, *78*, 4865–4871.
- [269] M. Perpeet, S. Glass, T. Gronewold, A. Kiwitz, A. Malave, I. Stoyanov, M. Tewes und E. Quandt, SAW Sensor System for Marker-Free Molecular Interaction Analysis, *Anal Letters* **2005**, *39*, 1747–57.
- [270] J. Andra, A. Bohling, T. M. A. Gronewold, U. Schlecht, M. Perpeet und T. Gutschmann, Surface acoustic wave biosensor as a tool to study the interaction of antimicrobial peptides with phospholipid and lipopolysaccharide model membranes., *Langmuir* **2008**, *24*, 9148–9153.

- [271] A. L. Schofield, T. R. Rudd, D. S. Martin, D. G. Fernig und C. Edwards, Real-time monitoring of the development and stability of biofilms of *Streptococcus mutans* using the quartz crystal microbalance with dissipation monitoring., *Biosens Bioelectron* **2007**, *23*, 407–413.
- [272] D. M. Gryte, M. D. Ward und W. S. Hu, Real-time measurement of anchorage-dependent cell adhesion using a quartz crystal microbalance., *Biotechnol Prog* **1993**, *9*, 105–108.
- [273] N. Moll, E. Pascal, D. H. Dinh, J.-P. Pillot, B. Bennetau, D. Rebiere, D. Moynet, Y. Mas, D. Mossalayi, J. Pistre und C. Dejous, A Love wave immunosensor for whole *E. coli* bacteria detection using an innovative two-step immobilisation approach., *Biosens Bioelectron* **2007**, *22*, 2145–2150.
- [274] I. A. Casalnuovo, D. Pierro, E. Bruno, P. Francesco und M. Coletta, Experimental use of a new surface acoustic wave sensor for the rapid identification of bacteria and yeasts., *Lett Appl Microbiol* **2006**, *42*, 24–29.
- [275] S. Hong, E. Ergezen, K. Barbee und R. Lec, BAEC adhesion analysis using Thickness Shear Mode sensor., *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* **2005**, *1*, 1047–1050.
- [276] G. N. van Muijen, K. F. Jansen, I. M. Cornelissen, D. F. Smeets, J. L. Beck und D. J. Ruiter, Establishment and characterization of a human melanoma cell line (MV3) which is highly metastatic in nude mice., *Int J Cancer* **1991**, *48*, 85–91.
- [277] J. E. Lever, Active amino acid transport in plasma membrane vesicles from Simian virus 40-transformed mouse fibroblasts. Characteristics of electrochemical Na⁺ gradient-stimulated uptake., *J Biol Chem* **1977**, *252*, 1990–1997.
- [278] M. D. Schlensog, T. M. A. Gronewold, M. Tewes, M. Famulok und E. Quandt, A Love-wave biosensor using nucleic acids as ligands, *Sens Actuat B* **2004**, *101*, 308 – 315.
- [279] H. Kim, D.-Y. Kang, H.-J. Goh, B.-K. Oh, R. P. Singh, S.-M. Oh und J.-W. Choi, Analysis of direct immobilized recombinant protein G on a gold surface., *Ultramicroscopy* **2008**, *108*, 1152–1156.
- [280] M. Minunni, M. Macini, G. G. Guilbault und B. Hock, The quartz crystal micorbalance as biosensor. A Status Report on its Future., *Anal Letters* **1995**, *28*, 749–764.
- [281] S. Alban und S. Lühn, Prothrombin time for detection of contaminated heparins., *N Engl J Med* **2008**, *359*, 2732–2734.
- [282] S. Alban und G. Franz, Partial synthetic glucan sulfates as potential new antithrombotics: a review., *Biomacromolecules* **2001**, *2*, 354–361.
- [283] J. Fritzsche, S. Alban, R. J. Ludwig, S. Rubant, W.-H. Boehncke, G. Schumacher und G. Bendas, The influence of various structural parameters of semisynthetic sulfated polysaccharides on the P-selectin inhibitory capacity., *Biochem Pharmacol* **2006**, *72*, 474–485.
- [284] S. Alban, R. Ludwig, G. Bendas, M. Schon, G. Oostingh, H. Radeke, J. Fritzsche, J. Pfeilschifter, R. Kaufmann und W. Boehncke, PS3, A Semisynthetic beta-1,3-Glucan Sulfate, Diminishes Contact Hypersensitivity Responses Through Inhibition of L- and P-Selectin Functions., *J Invest Dermatol* **2008**, , elektronische Veröffentlichung vor Drucklegung.
- [285] D. Urban, Logit Analyse, Lucius & Lucius, Stuttgart, **1998**.
- [286] A. Naggi, B. Casu, M. Perez, G. Torri, G. Cassinelli, S. Penco, C. Pisano, G. Giannini, R. Ishai-Michaeli und I. Vlodavsky, Modulation of the heparanase-inhibiting activity of heparin through selective desulfation, graded N-acetylation, and glycol splitting., *J Biol Chem* **2005**, *280*, 12103–12113.

-
- [287] E. Edovitsky, M. Elkin, E. Zcharia, T. Peretz und I. Vlodavsky, Heparanase gene silencing, tumor invasiveness, angiogenesis, and metastasis., *J Natl Cancer Inst* **2004**, *96*, 1219–1230.
- [288] Y. Suzuki, Y. Toda, T. Tamatani, T. Watanabe, T. Suzuki, T. Nakao, K. Murase, M. Kiso, A. Hasegawa und K. Tadano-Aritomi, Sulfated glycolipids are ligands for a lymphocyte homing receptor, L-selectin (LECAM-1), Binding epitope in sulfated sugar chain., *Biochem Biophys Res Commun* **1993**, *190*, 426–434.
- [289] L. K. Needham und R. L. Schnaar, The HNK-1 reactive sulfoglucuronyl glycolipids are ligands for L-selectin and P-selectin but not E-selectin., *Proc Natl Acad Sci U S A* **1993**, *90*, 1359–1363.
- [290] A. M. Makhlof, M. M. Fathalla, M. A. Zakhary und M. H. Makarem, Sulfatides in ovarian tumors: clinicopathological correlates., *Int J Gynecol Cancer* **2004**, *14*, 89–93.
- [291] X. Zhong Wu, K. Honke, Y. Long Zhang, X. Liang Zha und N. Taniguchi, Lactosylsulfatide expression in hepatocellular carcinoma cells enhances cell adhesion to vitronectin and intrahepatic metastasis in nude mice., *Int J Cancer* **2004**, *110*, 504–510.
- [292] J. Garcia, N. Callewaert und L. Borsig, P-selectin mediates metastatic progression through binding to sulfatides on tumor cells., *Glycobiology* **2007**, *17*, 185–196.
- [293] J. Bajorath, D. Hollenbaugh, G. King, W. J. Harte, D. C. Eustice, R. P. Darveau und A. Aruffo, CD62/P-selectin binding sites for myeloid cells and sulfatides are overlapping., *Biochemistry* **1994 Feb 15**, *33*, 1332–1339.
- [294] M. Höpfner, Untersuchungen zur Anwendbarkeit der Quarzmikrowaage für pharmazeutisch analytische Fragestellungen, Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg **2005**.
- [295] J. O. Lee, L. A. Bankston, M. A. Arnaout und R. C. Liddington, Two conformations of the integrin A-domain (I-domain): a pathway for activation?, *Structure* **1995**, *3*, 1333–1340.
- [296] B. Okutucu, A. Dincer, O. Habib und F. Zihnioglu, Comparison of five methods for determination of total plasma protein concentration., *J Biochem Biophys Methods* **2007**, *70*, 709–711.
- [297] K. Clark, P. Newham, L. Burrows, J. A. Askari und M. J. Humphries, Production of recombinant soluble human integrin alpha4beta1., *FEBS Lett* **2000**, *471*, 182–186.
- [298] A. Chigaev, G. Zwartz, S. W. Graves, D. C. Dwyer, H. Tsuji, T. D. Foutz, B. S. Edwards, E. R. Prossnitz, R. S. Larson und L. A. Sklar, Alpha4beta1 integrin affinity changes govern cell adhesion., *J Biol Chem* **2003**, *278*, 38174–38182.
- [299] M. Schlesinger, D. Simonis, P. Schmitz, J. Fritzsche und G. Bendas, Binding between heparin and the integrin VLA-4., *Thromb Haemost* **2009**, *submitted*.

Publikationsliste

Wissenschaftliche Originalarbeiten

D. Simonis, J. Fritzsche, S. Alban und G. Bendas, Kinetic analysis of heparin and glucan sulfates binding to P-Selectin and its impact on the general understanding of selectin inhibition., *Biochemistry* **2007**, *46*, 6156–6164

D. Simonis, K. Christ, S. Alban und G. Bendas, Affinity and kinetics of different heparins binding to P- and L-selectin., *Semin Thromb Haemost* **2007**, *33*, 534–539

J. Fritzsche, D. Simonis und G. Bendas, Melanoma cell adhesion can be blocked by heparin in vitro: Suggestion of VLA-4 as a novel target for antimetastatic approaches., *Thromb Haemost* **2008**, *100*, 1166–1175

M. Schlesinger, D. Simonis, P. Schmitz, J. Fritzsche und G. Bendas, 2009 , Binding between heparin and the integrin VLA-4. *Thromb Haemost* **2009**, *submitted*

Poster und Kongressbeiträge

J. Fritzsche, D. Simonis, S. Alban und G. Bendas, Sulfated polysaccharides as effective selectin inhibitors – correlation between structures and binding kinetics., *Minisymposium des GRK 677 in Bonn* **2006**, (Poster)

D. Simonis, J. Fritzsche, S. Alban und G. Bendas, Oligosaccharides as efficient selectin inhibitors – detection of binding kinetics by QCM biosensor., *Internationales Symposium des GRK 677 in Bonn* **2006**, (Poster)

D. Simonis, J. Fritzsche, S. Alban und G. Bendas, Oligosaccharides as efficient selectin inhibitors – detection of binding kinetics by QCM biosensor., *DPhG-Jahrestagung in Marburg* **2006**, (Poster)

D. Simonis, K. Christ, S. Alban und G. Bendas, Affinity and kinetics of different heparins binding to P- and L-selectin and their detection by QCM biosensor., *3rd Glycan Forum in Berlin* **2007**, (Poster)

D. Simonis, M. Schlesinger, S. Alban, U. Rothe und G. Bendas, The detection of kinetic binding constants confirms the potency of heparin as selectin inhibitor., *DPhG-Jahrestagung in Erlangen* **2007**, (Poster)

D. Simonis, Kinetic analysis of heparins and glucan sulfates binding to P-selectin and its impact on the general understanding of selectin inhibition., *Vernetzungstreffen des Graduiertenkollegs 677 aus Bonn mit dem Graduiertenkolleg 760 aus Regensburg in Nürnberg 2007*, (Vortrag)

D. Simonis, P. Schmitz, M. Schlesinger, J. Fritzsche und G. Bendas, Examination of adhesion receptor interactions with heparin using a SAW biosensor., *DPhG-Jahrestagung in Bonn 2008*, (Poster)