

**Der Einfluss von Cyr61 auf die
Adhäsionsfunktion von Integrinen
und dessen Hemmung durch Heparin
als Beitrag für eine antimetastatische Wirkung**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Patrick Schmitz

aus Köln-Porz

Bonn, im Januar 2013

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

1. Gutachter: Prof. Dr. G. Bendas
2. Gutachter: Prof. Dr. G. König

Tag der Promotion: 22.04.2013

Erscheinungsjahr: 2013

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulserver der ULB Bonn
(http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
2 Theoretische Grundlagen.....	3
2.1 Prozess der hämatogenen Metastasierung.....	3
2.2 Der Einfluss von Heparin auf den Verlauf von Krebserkrankungen...6	
2.2.1 Struktur und Vorkommen von Heparin.....	6
2.2.2 Klinischer Einsatz bei onkologischen Patienten.....	11
2.2.3 Heparin und seine Auswirkungen auf den Verlauf der metastatischen Kaskade.....	14
2.3 Zelladhäsionsmoleküle im Fokus der Metastasierung.....	17
2.3.1 Selektine.....	18
2.3.2 Integrine.....	21
2.3.3 Heparin als potentieller Integrinligand.....	32
2.3.4 Heparansulfat-Proteoglykane als Co-Rezeptoren der Integrine. .	34
2.4 Extrazelluläre Matrix und die CCN-Familie.....	40
2.4.1 Bestandteile der extrazellulären Matrix	40
2.4.2 Die CCN-Familie.....	41
2.4.3 Cyr61.....	43
2.4.4 Cyr61 Signalling.....	48
3 Ziel der Arbeit.....	51
4 Material und Methoden.....	52
4.1 Verwendete Materialien.....	52
4.1.1 Geräte.....	52
4.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	53
4.1.3 Chemikalien.....	55
4.1.4 Antikörper.....	57
4.1.5 Proteine und Testsubstanzen.....	58
4.1.6 Nukleinsäuren.....	59
4.1.7 Herstellung von Stammlösungen und Puffern.....	60

4.1.8	Software.....	66
4.1.9	Statistik.....	66
4.2	Arbeiten mit adhärent wachsenden Zellen.....	67
4.2.1	Kulturbedingungen und Nährmedien.....	68
4.2.2	Inkulturnahme von Zellen.....	69
4.2.3	Kultivierung.....	69
4.2.4	Kryokonservierung von Zellen.....	70
4.2.5	Bestimmung der Zellzahl mittels CASY® 1 Modell TT.....	70
4.3	Transfektion.....	71
4.3.1	Aufreinigung von Plasmid-DNA.....	73
4.3.2	Lipid-basierte Transfektion eukaryotischer Zellen.....	74
4.3.3	Selektion shRNA-transfizierter Zellen.....	76
4.4	Durchflusszytometrische Untersuchungen.....	77
4.4.1	Untersuchung von intrazellulären Strukturen.....	78
4.4.2	Untersuchung von extrazellulären Strukturen.....	79
4.5	Proteinanalytik.....	80
4.5.1	Anfertigung von Zellysaten.....	80
4.5.2	Proteinquantifizierung mittels Amido-Schwarz-Assay.....	81
4.5.3	Proteinaufreinigung über Heparin-Agarose.....	83
4.6	Elektrophoretische Verfahren.....	84
4.6.1	SDS-PAGE.....	85
4.6.2	Western-Blot.....	86
4.6.3	Silberfärbung.....	89
4.7	Mikroskopische Verfahren.....	90
4.7.1	Fluoreszenzmikroskopie.....	90
4.7.2	Zelladhäsion unter physiologischen Flussbedingungen.....	93
4.7.3	Zellmigration.....	97
4.8	Biosensorische Methoden.....	99
4.8.1	Charakterisierung und Reinigung der Quarzsensoren.....	99
4.8.2	Beschichtung der Quarzsensoren.....	101
4.8.3	Messung mit dem S-Sens® K5.....	108
5	Ergebnisse und Diskussion.....	111
5.1	Charakterisierung der shRNA-transfizierten PC-3 Zellen.....	111
5.1.1	Cyr61 Expression in der Zelllinie PC-3.....	112

5.1.2	Untersuchung des Integrinstatus transfizierter PC-3 Zellen....	117
5.2	Migrationsverhalten der transfizierten PC-3 Zellen.....	120
5.2.1	Bestimmung der Migrationsgeschwindigkeiten.....	120
5.2.2	Migration der Zelllinie PC-3.....	123
5.2.3	Zusammenfassende Beurteilung der transfizierten PC-3 Zellen	130
5.3	Charakterisierung der shRNA-transfizierten MV3 Zellen.....	131
5.3.1	Cyr61 Expression in der Zelllinie MV3.....	131
5.3.2	Untersuchung der Cyr61 Expression und zelluläre Lokalisation mittels fluoreszenzmikroskopischer Techniken.....	135
5.3.3	Untersuchung des Integrinstatus transfizierter MV3 Zellen....	139
5.3.4	Migration der Zelllinie MV3.....	141
5.3.5	Zusammenfassende Beurteilung der transfizierten MV3-Zellen	152
5.4	Biosensor-Charakterisierung der Cyr61-Wechselwirkungen.....	153
5.4.1	Isolierte Untersuchung der Bindung von Heparin an Cyr61....	153
5.4.2	Untersuchung der Bindung von Heparin an VLA-4.....	159
5.4.3	Immobilisation von Kopfgruppen-modifizierten Lipidmembranen auf SAW-Sensorquarzen.....	160
5.4.4	Untersuchung der Bindung von Cyr61 an VLA-4.....	165
5.4.5	Untersuchung der Bindung von Cyr61 an Syndekan-4.....	167
5.4.6	Zusammenfassende Beurteilung der kinetischen Bindungsdaten.....	173
5.5	Untersuchung des Zelladhäsionsverhalten unter Flussbedingungen.....	174
5.5.1	Adhäsion Cyr61-herunterregulierter MV3-Zellen.....	174
5.5.2	Einfluss von exogen zugefügtem Cyr61 auf Cyr61-defiziente MV3-Zellen.....	176
5.5.3	Einfluss von Heparin und Heparinderivaten auf die Adhäsion Cyr61-defizienter MV3-Zellen.....	181
5.5.4	Zusammenfassende Beurteilung der Zelladhäsion.....	188
5.5.5	Charakterisierung der Syndekan-4 Expression in MV3-Zellen	189
5.5.6	Adhäsion Syndekan-4-defizienter MV3-Zellen.....	193

5.5.7 Zusammenfassende Beurteilung des Syndekan-4-defizienten Klons.....	195
6 Zusammenfassung.....	197
7 Literaturverzeichnis.....	200
8 Anhang.....	224
8.1 Abbildungsverzeichnis.....	224
8.2 Tabellenverzeichnis.....	226

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

°C	Grad Celsius
Å	Ångström, $1\text{Å} = 10^{-10}\text{m}$
Abb.	Abbildung
Akt	Proteinkinase B der Onkogene AKT1/2/3
Aqua dem.	Aqua demineralisata
BMP	bone morphogenetic proteins
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ERK	extracellular-signal regulated Kinase
et al.	et alii = „und andere“
EZM	Extrazelluläre Matrix
FAK	focal adhesion kinase
Fc	fragment crystallizable
FKS	Fötales Kälberserum
Gl.	Gleichung

h	Stunde
HEPA-Filter	high efficiency particulate air-Filter
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethanolsulfonsäure
i.d.R.	in der Regel
I.E.	Internationale Einheiten
i.v.	intravenös
ILK	Integrin-linked kinase
INR	International Normalized Ratio
K_D	Gleichgewichtsdissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
k_{off}	Dissoziationskonstante
k_{on}	Assoziationskonstante
LFA-1	lymphocyte function associated antigen-1
LMWH	low molecular weight heparin
LRP	LDL receptor-related protein
M	Molarität
MAPK	Mitogen-activated protein Kinase
MHz	Megahertz
min	Minute
MMP	Matrixmetalloproteinase
MW	molecular weight
NHS	N-Hydroxy-Succinimid
NSCLC	non small cell lung cancer, engl.: nicht kleinzelliges Bronchialkarzinom
o.g.	oben genannt
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PAP	Probenauftragspuffer
PBS	Phosphatgepufferte-Salzlösung
pH	Potentia Hydrogenii
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PP	Polypropylen
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.c.	subcutan
SAM	self assembled monolayer
SAW	surface acoustic wave
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat

sog.	sogenannt
Src	Tyrosinkinase des Protoonkogens c-SRC (Akronym aus <u>cellular</u> und <u>sarcoma</u>)
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF	transforming growth factor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	und andere
UE	Untereinheit
UFH	unfraktioniertes Heparin
V	Volumen
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VLA-4	very late activation antigen-4
vs.	versus, lat.: gegenübergestellt
VTE	venöse Thromboembolie
x g	Erdbeschleunigung
z.B.	zum Beispiel
$\Delta\varphi$	Phasenveränderung

1 Einleitung

Jedes Jahr erkranken in Deutschland 490.000 Menschen neu an Krebs, davon sind etwas mehr Männer als Frauen betroffen. 218.000 sterben jährlich mit der Diagnose Krebs. Laut Expertenschätzungen wird die Zahl der Krebsneuerkrankungen bis zum Jahr 2050 um 30% zunehmen. Der Grund hierfür liegt in der Tatsache, dass die Menschen immer älter werden. Krebs ist eine Erkrankung, von der insbesondere ältere Menschen betroffen sind.

Mit ca. 67.600 Neuerkrankungen pro Jahr ist Prostatakrebs die häufigste Krebsart beim Mann, dicht gefolgt von Darm- und Lungenkrebs. Bei Frauen ist der Brustkrebs mit 74.500 Neuerkrankungen pro Jahr die häufigste Krebsart, ebenfalls gefolgt von Darm- und Lungenkrebs. Von den 67.600 erkrankten Prostatakrebs-Patienten sterben in etwa 12.700 Männer jedes Jahr an dieser Diagnose.

Die Inzidenzrate von Hautkrebserkrankungen liegt im oberen Mittelfeld der Zahl der Neuerkrankungen. Dabei erkranken jährlich 26.000 Menschen neu an dem besonders gefährlichen schwarzen Hautkrebs (malignes Melanom), rund 3.000 sterben jährlich an dieser Diagnose. Dabei sind Männer und Frauen gleichermaßen betroffen¹.

Das maligne Melanom ist ein hochgradig bösartiger Tumor, der seinen Ausgang von den pigmentproduzierenden Melanozyten nimmt. Zu seiner bedeutenden Rolle in der Onkologie gelangt dieser Tumor nicht nur durch seine Häufigkeit, sondern vor allem aufgrund seines aggressiven Wachstumsverhaltens und seiner ausgeprägten Therapieresistenz bei eingetretener Metastasierung.

Früh erkannt, ist das maligne Melanom heilbar, im metastasierenden Zustand aber therapeutisch und pharmakologisch kaum beeinflussbar. Im

Verlauf der Metastasierung infiltrieren die gestreuten Metastasen lebenswichtige Organe und führen somit zum Tod. Die steigende Inzidenz des malignen Melanoms machen die Dringlichkeit der Suche nach weiteren Therapieoptionen deutlich.

Im Prozess der Metastasierung über das Blutssystem spielen Adhäsionsmoleküle eine entscheidende Rolle. Tumorzellen sind in der Lage derartige Rezeptoren oder die entsprechenden Liganden zu exprimieren und können somit kompetent an einem derartig komplexen Vorgang teilnehmen.

Nach Erkenntnissen unserer Arbeitsgruppe leistet die Interaktion des Integrins VLA-4 auf Tumorzellen mit seinen endothelialen Liganden VCAM-1 einen wesentlichen Beitrag zur Adhäsion von Tumorzellen an das Gefäßendothel mit sich anschließender Extravasation der Zellen. Das Integrin muss für die Kontaktaufnahme mit seinem Liganden in einem aktivierten Zustand vorliegen. Eine Aktivierung kann dabei über verschiedene zelluläre aber auch extrazelluläre Mechanismen erfolgen. In letzter Zeit sind besonders matrizelluläre Proteine im Prozess der Tumorphysik in den Fokus gerückt. Ein besonders interessanter Vertreter aus dieser Klasse ist Cyr61. Innerhalb der metastatischen Kaskade sind bereits verschiedene Interaktionspartner des Cyr61 identifiziert worden, die Interaktion mit VLA-4 ist aber noch nicht beschrieben.

Durch das Glykosaminoglykan Heparin konnte in experimentellen Studien die VLA-4/VCAM-1 Wechselwirkung geblockt und die Adhäsion der Tumorzellen an das Endothel verhindert werden. Cyr61 verfügt strukturell ebenfalls über Heparinbindestellen. Im Rahmen dieser Arbeit soll die Wechselwirkung des Heparins mit VLA-4 weiter charakterisiert und die potentielle neue Wechselwirkung VLA-4/Cyr61 analysiert, sowie deren Beeinflussung durch Heparin zur Inhibition der Adhäsion untersucht werden.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Prozess der hämatogenen Metastasierung

Maligne Neoplasien lassen sich typischerweise mit sechs Kennzeichen charakterisieren, dazu zählen Immortalität, abnormale Wachstumsregulierung, autarkes Wachstum, Umgehung der Apoptose, fortwährende Angiogenese sowie die Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung². Die Verbreitung von Tumorzellen eines Primärtumors an andere Orte des Körpers umfasst einen hoch regulierten Prozess, der bis heute nicht vollständig aufgeklärt und verstanden ist. Dieser diffizile Vorgang beginnt mit dem Ablösen einzelner Zellen vom Primärtumor als eine Folge des Verlusts von Zell-Zell-Kontakten. Diese mobilen Tumorzellen durchwandern nun die Extrazelluläre Matrix (EZM) indem sie einen Cocktail degradierender Enzyme wie bspw. Matrixmetalloproteinase (MMPs) oder Heparanase sezernieren, um somit die EZM und die Basalmembran angrenzender Gewebe abzubauen³. Die Produktion dieser Enzyme korreliert eng mit der resultierenden Invasivität des Tumors. Dem Auflösen der EZM folgt der Vorgang der Migration (Zellwanderung), dabei weisen Tumorzellen häufig gegenüber anderen Zellen eine gesteigerte Fluidität der Zellmembran auf^{4,5}, womit dieser Vorgang zusätzlich erleichtert wird. Eine Polarisierung der Zelle in eine Vorder- und Rückseite sorgt für eine gerichtete Migration⁶. Für die Zellwanderung werden an der Vorderseite der Zelle fortwährend Lamellipodien und Filopodien ausgebildet und durch Integrin-vermittelte Adhäsion an die EZM kommt es dann zur Myosin II-vermittelten Kontraktion des Zelleibes⁷. Im hinteren Teil der Zelle

müssen parallel die Kontakte durch proteolytische oder mechanische Kräfte wieder abgelöst werden, um ein Vorwärtskommen zu gewährleisten⁸. Die nachfolgende Degradierung der Gefäßwände eröffnet den Zellen den nächsten Schritt und es schließt sich die Intravasation in das Blut- oder Lymphgefäßsystem an. Eine Tumorzellmetastasierung über das Lymphsystem ist allgemein wenig untersucht, so dass in dieser Arbeit ausschließlich die hämatogene Metastasierung, also die Absiedlung von Tumorzellen über das Blutgefäßsystem, im Vordergrund steht.

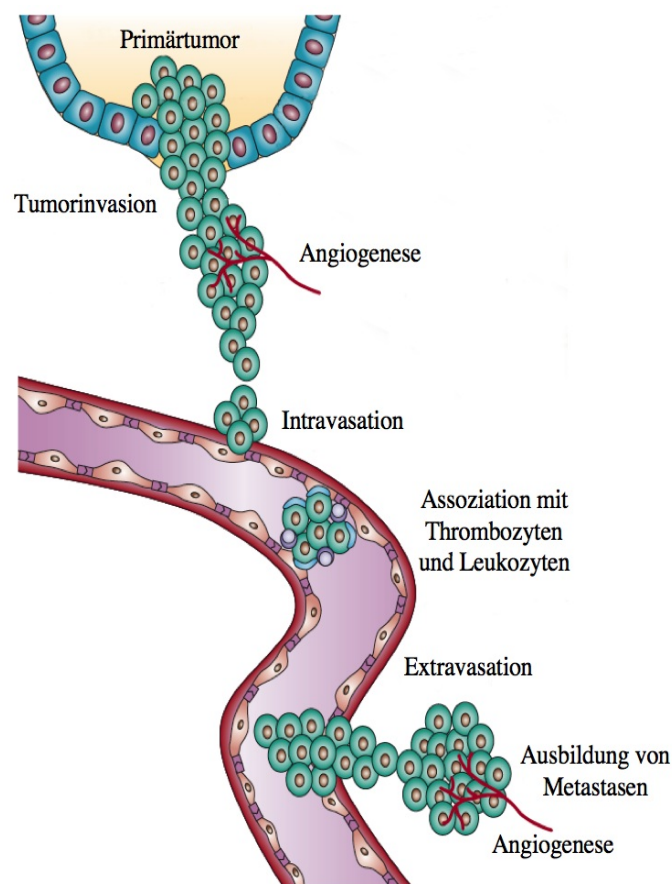


Abbildung 1: **Schematische Darstellung der hämatogenen Metastasierung.** Die einzelnen Schritte der metastatischen Kaskade werden im Text erläutert. Abbildung modifiziert nach Guo und Giancotti¹⁴².

Die Dissemination der Zellen durch das Gefäßsystem des Blutkreislaufes stellt aus Sicht der Tumorzelle einen der anfälligsten Prozesse dar. Verschiedene Stressfaktoren, wie bspw. das Komplementsystem, Immunzellen oder

Scherstress wirken auf die Zellen ein und versuchen die Verteilung zu unterbinden⁹. Die Tumorzellen nutzen daher auch Mechanismen um sich vor dem Immunsystem zu schützen (diese werden später noch detailliert erläutert). Nach erfolgter Umgehung der Immunantwort schließt sich die Transmigration an, also das Verlassen des Gefäßbettes an entfernten Orten. Durch übliche Zellteilungsmechanismen etabliert sich eine Metastase, welche unter günstigen Bedingungen sogar einen Anschluß an das Gefäßsystem erhält. Dies wird durch Wachstumsfaktoren wie den „*vascular endothelial growth factor*“ (VEGF) und die daraus resultierende Angiogenese hervorgerufen.

Nur wenn alle diese Schritte perfekt von der Tumorzelle durchlaufen werden kann sich eine Metastase bilden, dies erklärt warum nur in etwa 0,01 % der zirkulierenden Tumorzellen tatsächlich zu einer Metastasenbildung beitragen¹⁰.

An dieser Stelle ist ebenfalls erwähnenswert, dass es Zellen normalerweise nicht möglich ist außerhalb ihres eigenen Zellverbandes zu überleben. Eine Sonderform der Apoptose, die Anoikis, greift hier regulierend aufgrund des Verlustes der Zelladhäsion mechanistisch ein¹¹. Krebszellen fehlt diese Eigenschaft, sie sind somit in der Lage ihren Primärtumor zu verlassen und in fremder Umgebung zu proliferieren. Molekular ist dies mit einer massiven Überexpression des Tyrosinkinase-Rezeptors TrkB zu erklären. Dieser Rezeptor ist als eine Art Gegenspieler der Anoikis für einen metastasierenden Phänotyp und invasive Eigenschaften verantwortlich¹². Mittlerweile werden aber auch andere Kinasen für eine ausbleibende Anoikis verantwortlich gemacht¹³.

2.2 Der Einfluss von Heparin auf den Verlauf von Krebserkrankungen

Für onkologische Patienten besteht ein erhöhtes Risiko, eine venöse Thromboembolie (VTE), insbesondere tiefe Beinvenenthrombosen oder Lungenembolien, zu erleiden und an den Folgen zu versterben. Patienten mit Metastasen haben ein 15fach höheres Thromboserisiko als Patienten in frühen Erkrankungsstadien. Die VTE ist die zweithäufigste Todesursache bei Krebspatienten. Tumorpatienten mit einer VTE haben ein etwa doppelt so hohes Risiko innerhalb des nächsten Jahres zu versterben als Tumorpatienten ohne Thrombose. Bei onkologischen Patienten ist daher eine Thrombosetherapie und -prophylaxe unerlässlich. Heparine sind bereits seit den frühen 1920er Jahren als antithrombotische Wirkstoffe bekannt¹⁴. Bei der Gabe von Heparin bei Krebspatienten mit thromboembolischen Ereignissen stellte sich der Zusammenhang eines antimetastatischen Effektes mit einer resultierenden Lebenszeitverlängerung heraus. Es zeigt sich damit ein wachsender Beweis dafür, dass die Kaskade der Blutgerinnung verbunden ist mit dem Prozess der Angiogenese und Metastasierung¹⁵. Dabei scheinen die antikoagulatorischen Eigenschaften der Heparine nicht den alleinigen Effekt auf die antimetastatische Wirkung auszuüben, was durch Applikation von Heparinderivaten mit reduzierten antikoagulatorischen Eigenschaften gezeigt werden konnte. Außerdem zeigen Faktor Xa-Inhibitoren keinen antimetastatischen Effekt. Seitdem sind UFHⁱ und LMWHⁱⁱ in den Fokus für den positiven Verlauf von Krebserkrankungen gerückt.

2.2.1 Struktur und Vorkommen von Heparin

Heparin ist ein lineares Glykosaminoglykan. Die wichtigsten Bausteine sind alternierend aufgebaut. Der kleinste Baustein beinhaltet sulfatiertes

i Unfraktioniertes Heparin

ii engl. = low molecular weight heparins

D-Glucosamin und eine Uronsäure. Die Uronsäure lässt sich in die D-Glucuronsäure und sein Epimer die L-Iduronsäure unterteilen. Die Hydroxyl- und Aminogruppen werden mit Schwefelsäure verestert, wodurch polyanionische Biopolymere entstehen. Natürliche Heparine werden aus der Mucosa von Schweinedärmen gewonnen. Diese sogenannten unfaktionierten Heparine (UFH) weisen Kettenlängen von 200-300 Zuckereinheiten auf und besitzen eine molare Masse zwischen 4-40 kDa, mit einem Häufigkeitsgipfel von 15 kDa. Fraktionierte Heparine, sogenannte niedermolekulare Heparine (= LMWH) bestehen aus Ketten, die i.d.R. nicht mehr als 18 Zuckereinheiten umfassen und molare Massen von 3-6 kDa aufweisen. Sie lassen sich beispielsweise aus dem nativen Heparin mittels enzymatischer Spaltung durch Heparinasen und nachfolgendem Aussalzen gewinnen. Seit Mitte der 1980er Jahre finden sie vermehrt Anwendung, da in der Regel eine einmal tägliche Applikation ausreichend ist und sie über ein besseres therapeutisches Fenster bei der Behandlung von Thrombosen verfügen^{16,17}.

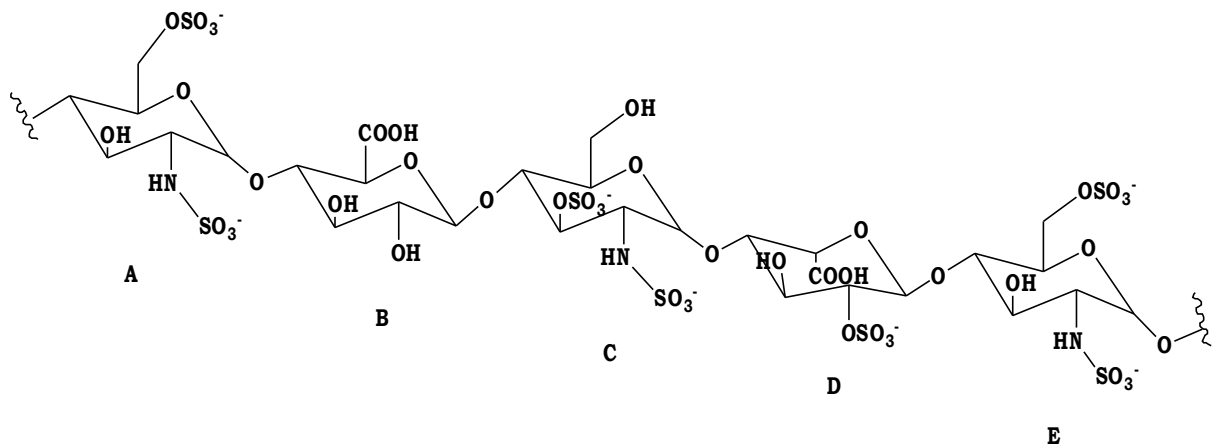


Abbildung 2: **Heparin-Teilstruktur eines UFH.** Die möglichen Bausteine sind hier A) D-Glucosamin (C-6 und N sulfatiert), B) D-Glucuronsäure, C) D-Glucosamin (C-3 und N sulfatiert), D) L-Iduronsäure (C-2 sulfatiert) und D-Glucosamin (C-6 und N sulfatiert).

Pharmakologisch wird Heparin aufgrund seiner antikoagulatorischen Wirkung verwendet. Physiologisch liegt es zusammen mit Histamin in Vesikeln der Gewebe-Mastzellen vor. Seine physiologische Bedeutung ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es greift in die plasmatische Blutgerinnung ein,

indem es sich über seine „*antithrombin binding site*“, einer spezifischen Pentasaccharidabfolge, an Antithrombin III anlagert. Auf molekularer Ebene ist für die Bindung des polyanionischen Heparins eine Region mit positiv geladenen Lysin-Gruppen an der Exosite des Antithrombin entscheidend. Der gebildete Heparin/Antithrombin III-Komplex erhöht die Anlagerungsgeschwindigkeit an aktivierte Gerinnungsfaktoren um das 1000fache und fordert damit die Gerinnungshemmung. Für die Inhibition des Thrombin muss Heparin sowohl mit Antithrombin III als auch Thrombin selbst in Wechselwirkung treten. Für eine erfolgreiche Inhibition des Faktors Xa ist die Kontaktaufnahme über die Pentasaccharideinheit mit Antithrombin III ausreichend.

2.2.1.1 Unfraktionierte Heparine (UFH)

Das häufig unter der Bezeichnung „Standardheparin“ bekannte UFH weist die unter 2.2.1 beschriebenen Eigenschaften auf. Es wurde lange Zeit als Standard in der Thromboseprophylaxe und -therapie eingesetzt, bis bekannt war, dass niedermolekulare Heparine genau so sicher und effektiv sind¹⁸. Aufgrund der inhomogenen Kettenlängen wird die Wirksamkeit zur Standardisierung auf ein Vergleichspräparat (anti Xa) mit Internationalen Einheiten (I.E.) bezogen. Zur Thromboseprophylaxe wird es subcutan bis zu dreimal täglich injiziert. Bei vorhandenen Thrombosen muss es in höheren Tagesdosen intravenös infundiert werden.

Als Besonderheit geht aus dem UFH die synthetische Pentasaccharideinheit Fondaparinux hervor. Hierbei stand der für die eigentliche Wirkung essentielle Pentasaccharid-Baustein des Heparins Pate. Auch hier ist die Effektivität und Wirkung in Bezug auf Thromboembolien gewährleistet, allerdings liegen wenig Erfahrungswerte zum Einsatz bei Krebspatienten vor.

Allgemein kann die Wirkung von Heparin im Körper durch ein polyanionisches Protein, welches aus Lachs-Sperma gewonnen wird, in Form eines

Antidots inaktiviert werden. Dieses unter dem Namen Protamin bekannte Protein entfaltet allerdings keine Wirkung gegen Fondaparinux.

In dieser Arbeit wird das UFH-Natrium „Heparin-Natrium 25.000-ratio-pharm[®]“ verwendet. Es wird aus Schweinedarm-Mukosa extrahiert¹⁹.

2.2.1.2 Enoxaparin

In dieser Arbeit findet das LMWH Enoxaparin Verwendung. Dabei handelt es sich um fraktioniertes Heparin mit einem mittleren Molekulargewicht von von 4500 g/mol. Der nicht ganz homogene Heparinanteil ist ein Gemisch mit Glykosaminoglykanketten aus bis zu 24 Monomeren. Als Fertigarzneimittel Clexane[®] kommt Enoxaparin auf den Markt und wird aus der intestinalen Mukosa von Schweinen Heparin-Benzylestern gewonnen, die einer alkalischen β -Elimination und Depolymerisation unterworfen werden.

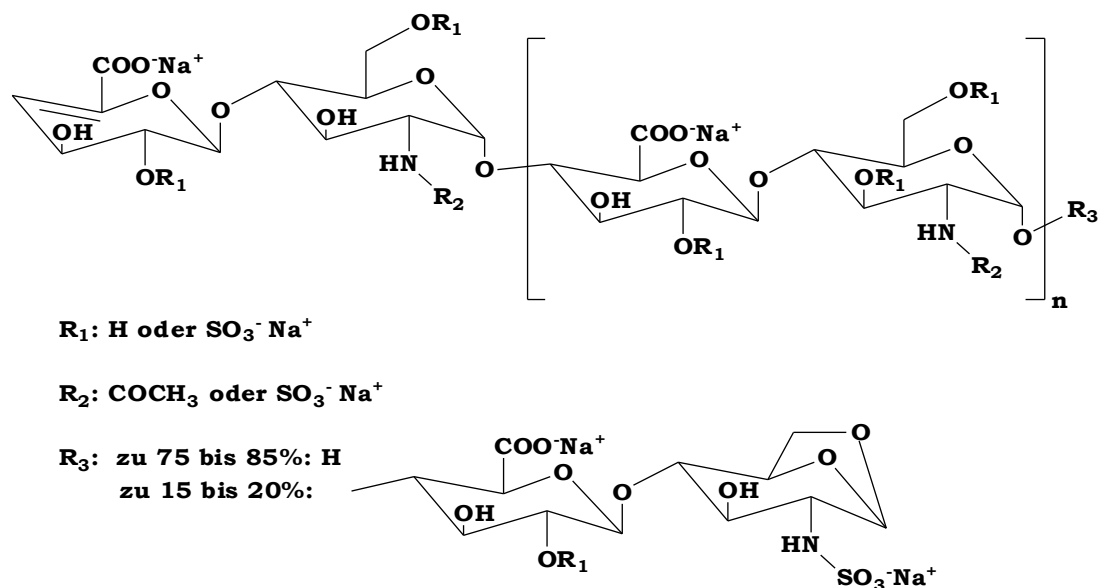


Abbildung 3: **Struktur des LMWH Enoxaparin-Natrium.**

Charakteristisch für die Polysaccharidkette des Enoxaparin ist eine 2-O-sulfo-4-enopyranosuronsäure-Gruppe am nichtreduzierenden Ende (daher auch der Name Enoxaparin) und eine 2-N,6-O-disulfo-D-glucosamin-Rest am reduzierenden Ende. Durch die alkalische Behandlung kann

bei 15-20 % der Enoxaparin-Struktur am reduzierenden Ende der Kette ein 1,6-Anhydro-Derivat entstehen²⁰.

2.2.1.3 Tinzaparin und Tinzaparin-Derivate

Tinzaparin wird über enzymatische β -Elimination durch Heparinase aus *Flavobacterium heparium* ausgehend von UFH gewonnen. Eingesetzt wird es als Natriumsalz, die durchschnittliche molare Masse liegt zwischen 5,5-7,5 kDa. Es besitzt eine 2-O-Sulfo-4-desoxy-4- α -L-threohex-4-enopyranosuronsäure-Struktur am nichtreduzierenden und ebenfalls eine 2-N,6-O-Disulfo-D-glucosamin-Struktur am reduzierenden Kettenende^{21,22}.

Dieses Heparin weist durch die Verkürzung eine relativ einheitliche Kettenlänge mit einem Häufigkeitsgipfel von 18 Saccharideinheiten und eine enge Massenverteilung auf. An der Heparin-Originalstruktur ändert sich mit Ausnahme der oben genannten Strukturen nichts und auf Grund des Sulfatierungsmusters ähnelt es daher stark einem UFH. Tinzaparin erwies sich in klinischen Studien als effektives LMWH in der Prophylaxe und Therapie von VTE²³⁻²⁵.

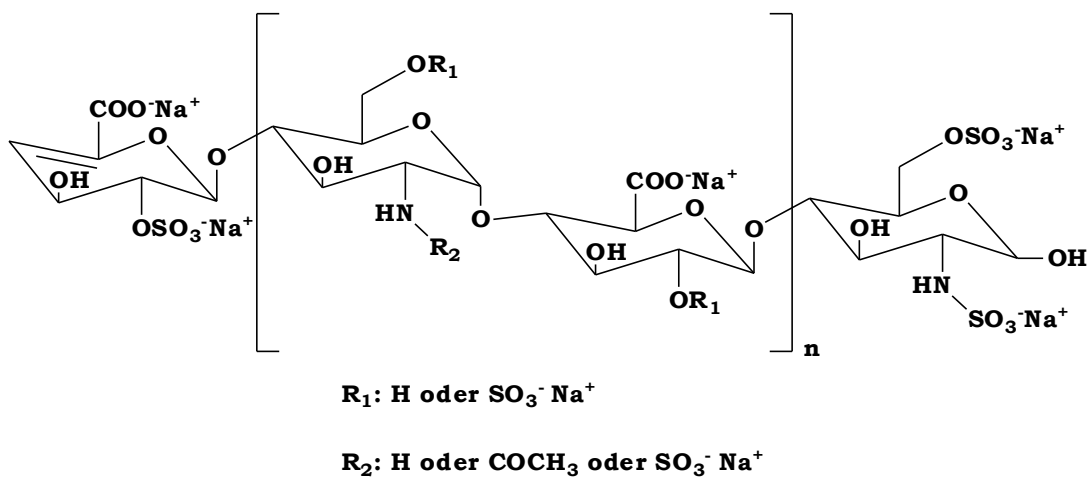


Abbildung 4: **Struktur des LMWH Tinzaparin-Natrium.**

Tinzaparin diente in dieser Arbeit weiterhin als Ausgangssubstanz für einige modifizierte Heparinderivate, die uns dankenswerter Weise vom „G.Ronzoni“ Institute, Milano durch die Arbeitsgruppe von Herrn Prof Dr.

B. Casu zur Verfügung gestellt wurden. Die nachfolgende Tabelle soll die neuen Strukturmerkmale der geschaffenen Derivate darstellen.

Heparinderivat	Strukturmerkmal
2O-DS-LMWH	
6O-DS-LMWH	
NAc-LMWH	
RO-LMWH	

Tabelle 2.1: **Modifizierte Tinzaparinderivate**. Dargestellt ist jeweils ein modifizierter Baustein der Kette. Entnommen und modifiziert aus [26].

Diese Heparinderivate zeigten bereits eindrucksvolle Effekte in Bezug auf die Bindungsfähigkeit bestimmter Adhäsionsmoleküle. Die antikoagulatorischen Eigenschaften gehen dabei auch hier meist verloren, spielen aber für die beobachteten Effekte der Bindungsfähigkeit keine Rolle¹³⁻¹⁵.

2.2.2 Klinischer Einsatz bei onkologischen Patienten

Onkologische Patienten weisen häufig eine Überaktivierung des Gerinnungssystems auf und einhergehend damit ein deutlich höheres Risiko eine venöse Thromboembolie zu erleiden^{27,28}. Aus diesem Grund erfolgt die Therapie einer VTE standardmäßig initial mit Heparin wie UFH, LMWH oder Fondaparinux, gefolgt von einer Langzeitgabe oraler Antikoagulantien zur Rezidivprophylaxe. Diese Empfehlung wird auch in der aktuellen S3-Leitlinie

der AWMFⁱ berücksichtigt. Dabei werden auch neuere orale Antikoagulantien wie das Rivaroxaban oder das Dabigatranetexilat in Betracht gezogen²⁹.

LMWH und Fondaparinux gelten als sicherer und genau so wirksam wie UFH. In der fortgeführten Behandlung über einen Zeitraum von drei bis sechs Monaten zeigten sich die LMWH dem UFH sogar überlegen. Eine der unerwünschten und akut lebensbedrohlichen Arzneimittelwirkungen im Zusammenhang mit der Heparin-gabe ist das Auftreten einer Heparin-induzierten Thrombozytopenie (HIT). Diese tritt in der Applikation von LMWHs deutlich seltener als bei Gabe von UFH auf, wodurch die Attraktivität gegeben über einer Administration von LMWH weiter gesteigert wird¹⁸.

Interessanterweise führte die Prophylaxe und Therapie thromboembolischer Ereignisse nicht nur zur Vermeidung tödlich verlaufender Embolien, sondern es äußerten sich ebenfalls antineoplastische Effekte, die sich in einer Lebenszeitverlängerung der Patienten niederschlugen.

Tabelle 2.2: Klinische Studien zum Einfluss von LMWHs auf den Verlauf von Krebserkrankungen.

Studiendesign	Behandlung	Ergebnisse	Referenz
MALT-Studie, metastasierende oder lokal fortgeschrittene solide Tumore ohne VTE; doppelblind; Endpunkt: Tod durch Embolie; Sicherheitsendpunkt: schwerwiegende Blutungen	3800-7600 I.E. Nadroparin /2 x tgl. s.c. in den ersten 2 Wochen, dann für 4 Wochen 3800-7600 I.E./d über 6 Wochen vs. Placebo (148 Verum, 154 Placebo)	mittleres Gesamtüberleben 8,0 vs. 6,6 Monate; in Patientensubgruppe mit einer Lebenserwartung von > 6 Monaten zu Studienbeginn mittlere Überlebensrate 15,4 vs 9,4 Monate	Klerk et al. ³⁰
CLOT-Studie ³¹ , solide Tumore und VTE; multizentrisch, unverblindet, randomisiert, kontrolliert; Endpunkt: rezidivierende, symptomatische VTE; 150 Patienten ohne Metastasen und 452 mit Metastasen	200 I.E./kg/d Dalteparin s.c. Für 1 Monat, dann 150 I.E./kg/d für 5 Monate vs. 200 I.E./kg/d Dalteparin s.c. für 1 Woche, dann Cumarinderivat mit INR 2,0-3,0 insgesamt für 6 Monate (296 Patienten Gruppe I, 306 Patienten Gruppe II)	Mortalitätswahrscheinlichkeit nach 12 Monaten bei Patienten ohne Metastasen 20% vs. 36%; kein Unterschied bei Patienten mit bestehenden Metastasen	Lee et al. ³²

i Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.

Studiendesign	Behandlung	Ergebnisse	Referenz
PROTECHT-Studie, Chemotherapie bei metastasierenden oder lokal fortgeschrittenen soliden Tumoren; randomisiert, doppelblind; Endpunkt: symptomatische venöse oder arterielle thromboembolische Ereignisse	3800 I.E./d Nadroparin während der gesamten Chemotherapie aber maximal 120 Tage vs. Placebo und Chemotherapie (779 Verum, 387 Placebo)	thromboembolische Ereignisse in 2 % der Verumgruppe vs. 4 % in Placebogruppe, Nadroparin halbiert das Risiko ein thromboembolisches Ereignis während einer ambulanten Therapie zu erhalten, Blutungsrisiko allerdings erhöht	Agnelli et al. ³³
FAMOUS-Studie ³⁴ , metastasierende und/oder lokal fortgeschrittene solide Tumore ohne VTE; doppelblind, multizentrisch, randomisiert; Endpunkt: Sterblichkeit 1 Jahr nach Therapie; Sicherheitsendpunkt: schwerwiegende Blutungen	5000 I.E./d Dalteparin s.c. für 1 Jahr unter der jeweiligen Standardtherapie vs. Placebo unter der jeweiligen Standardtherapie (190 Verum, 184 Placebo)	keine Verbesserung der 1 Jahresmortalität (46 vs. 41 %), höhere Überlebensraten nach 2 und 3 Jahren in Subgruppe mit besserer Prognose zu Beginn der Therapie (78 % vs. 55 %, 60 % vs. 36 %)	Kakkar et al. ³⁵
SAVE-ONCO-Studie, Chemotherapie bei metastasierenden oder lokal fortgeschrittenen soliden Tumoren; doppelblind, multizentrisch; Endpunkt: symptomatische venöse thromboembolische Ereignisse oder tödliche VTE; Sicherheitsendpunkt: schwerwiegende Blutungen	20 mg/d Semuloparin bis zu einer Änderung der Chemotherapie vs. Placebo mittlere Behandlungszeit 3,5 Monate (1608 Verum, 1604 Placebo)	Semuloparin reduziert das Auftreten thromboembolischer Ereignisse (1,2 % vs. 3,4 %) bei Chemotherapie ohne deutliche Blutungen hervorzurufen (klinisch relevante Blutungen 2,8 % vs. 2,0 %, schwerwiegende Blutungen 1,2 % vs. 1,1 %)	Agnelli et al. ³⁶

Die dargestellten Studien zeigen, dass die LMWHs einen positiven Effekt auf die thromboembolischen Ereignisse haben, die allgemeine Mortalität bei den in den Studien eingeschlossenen Krebspatienten aber nicht immer gesenkt werden konnte. So konnte insbesondere bei der CONSORT-Studie, die sich der Fragestellung widmete, ob Tumorpatienten durch Nadroparin

und einem vermuteten anti-Tumor-Effekt der niedermolekularen Heparine einen Überlebensvorteil hätten, kein Effekt festgestellt werden³⁷. Insgesamt sind die Studien sehr heterogen, insbesondere hinsichtlich der Einschlusskriterien der Tumore und der oft auch nur kleinen Patientenkollektive aufgebaut. Hier sind nur LMWHs bzw. ein ultra-LMWH (Semuloparin) in den Studien berücksichtigt. Semuloparin war für eine Zulassung der EMA und FDA für die Prävention der venösen Thromboembolien bei Krebspatienten vorgesehen und erwies sich in der SAVE-ONCO Studie als nützliches Heparin bei paralleler Chemotherapie^{38,39}. Im Juni 2012 hat der Hersteller Sanofi-Aventis allerdings seinen zentral gestellten Zulassungsantrag bei der EMA zurückgenommen, obwohl man sich gegenüber den Wettbewerbern ein Alleinstellungsmerkmal mit dieser Indikation gesichert hätte.

In der CORTES-Studie wurde auch ein UFH gegen LMWH untersucht, allerdings nur auf das Auftreten rezidivierender Thromboembolien bei Patienten mit tiefer-Beinvenenthrombose. Hier zeigte sich das LMWH dem UFH überlegen und war mit einer 1 x tgl. Gabe auch patientenfreundlicher⁴⁰.

Der Nutzen einer Heparin-gabe bei Krebspatienten scheint belegt zu sein. Patienten mit einer besseren Prognose wie bspw. ohne bestehende Metastasen zu Beginn der Therapie, profitieren dabei deutlicher von der Heparin-intervention. Dies lässt auf den vermuteten Wirkmechanismus schließen, dass Heparin hemmend auf die Metastasierung einwirkt. Dieser Befund konnte durch eine Vielzahl von Tierexperimenten bereits bestärkt werden¹⁵.

2.2.3 Heparin und seine Auswirkungen auf den Verlauf der metastatischen Kaskade

Die in Kapitel 2.2.2 beobachteten Wirkungen beruhen nicht auf einer Inhibition im Wachstum des Primärtumors, sondern in einer Verminderung der Metastasen. Es stellt sich also die Frage, an welchen Punkten Heparin im Prozess der hämatogenen Metastasierung eingreifen und regulierend wirken kann.

Die metastatische Kaskade beginnt mit der Sezernierung enzymatisch aktiver Proteine. Die Endoglycosidase Heparanase, die durch Spaltung von Heparansulfat-Glykosaminoglykanen große Teile der EZM degradiert, ist durch Heparin direkt beeinflusst. Als Substratanalogon hemmt Heparin kompetitiv den EZM-Abbau und führt zu einer verminderten Invasivität und Angiogenese⁴¹⁻⁴⁴. Hohe Expressionsraten der Heparanase werden als prognostische Marker von z.B. Pankreas-Karzinom herangezogen⁴⁵, auch findet man bei Lymphom- oder Melanompatienten erhöhte Heparanasespiegel^{43,46}. Hier könnte Heparin durch Hemmung der Migration den Verlauf der Erkrankung positiv beeinflussen.

Der basische Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGFⁱ) ist an der Basalmembran der Gefäße gebunden und wird durch Heparansulfat-degradierende Enzyme aktiviert. Es wird dann durch bFGF die Angiogenese durch die Ausbildung neuer Blutgefäße gefördert. Heparin-Oligosaccharide mit weniger als 12 Monomeren sind in der Lage durch Blockade dieses Faktors die Zellteilung und Migration der Tumorzellen zu hemmen⁴⁷. Ebenso kann die Angiogenese durch die Inhibition von VEGF erreicht werden. Dieser vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor fördert ebenfalls die Gefäßneubildung. Enoxaparin erwies sich als potenter Hemmstoff dieses Proteins und zeigte sich dem UFH überlegen⁴⁸.

Eine physiologische Freisetzung des Proteins TFPIⁱⁱ aus Endothelzellen hemmt direkt die Blutgerinnung über die Bindung an aktiviertem Faktor X und nachfolgend den Komplex aus *tissue factor* und aktiviertem Faktor VII. Eine Inhibierung der Angiogenese, die unabhängig über FXa erfolgt, konnte in diesem Zusammenhang für Tinzaparin gezeigt werden⁴⁹. Über die Effekte der Gerinnungskaskade erklärt sich nachgeschaltet auch eine Reduktion der Thrombinaktivierung. Ausbleibendes Thrombin kann Fibrinogen nicht in Fibrin umwandeln; weiterhin werden wichtige Tumorzell-Signalkaskaden der Angiogenese und Metastasierung inhibiert. Die Heparin-vermittelte

i engl.: basic fibroblast growth factor

ii engl.: tissue factor pathway inhibitor

Hemmung des Thrombin stellt somit auch ein Eingriff in das Tumorgeschehen dar^{50,51}.

Der wahrscheinlich komplexeste Vorgang ist die Bindung des Heparins an Adhäsionsrezeptoren und deren Inhibition. Die bekanntesten beeinflussbaren Adhäsionsmoleküle, die in der metastatischen Kaskade als relevant eingestuft werden können sind die Selektine und Integrine. Während der Aufbau und die Funktionen dieser im folgenden Kapitel erläutert werden, soll hier deren Wechselwirkung mit Heparin fokussiert werden.

Heparine können die Bindung von P- und L-Selektin an ihre Liganden aufheben. Diese Heparin-bedingte Blockade konnte durch zahlreiche Tiermodelle belegt werden. Studien wurden diesbezüglich zu Kolonkarzinom-, Melanom-, Lungenkarzinom- und Mammakarzinomzelllinien durchgeführt⁵². Im Studiendesign wurden die Tumorzellen direkt in das venöse Blutsystem gespritzt, somit ist die Heparinwirkung zunächst auch tatsächlich auf das Geschehen im Blutkreislauf konzentriert. Betrachtet man dabei die klinisch relevanten Heparindosierungen, so kann durch die Heparingabe eine antimetastatische Wirkung nachgewiesen werden. Niers und Mitarbeiter fassen in einer Übersichtsarbeit die antimetastatische Wirkung von verschiedenen Heparinen und unterschiedlichen Tiermodellen ausführlich zusammen¹⁵.

Weitere Adhäsionsmoleküle werden im Rahmen von Entzündungsreaktionen durch die Klasse der Integrine gestellt. Insbesondere leukozytäre Integrine wie $\alpha_4\beta_7$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_L\beta_2$ und $\alpha_M\beta_2$ werden durch endothelial freigesetzte Mediatoren exprimiert und ermöglichen den darauf folgenden Kontakt mit ihren endothelialen Liganden (MadCAM-1, VCAM-1, ICAM-1 und ICAM-2) für die Extravasation. In der Literatur sind Wechselwirkungen von Heparin mit diesen leukozytären Integrinen beschrieben⁵³⁻⁵⁵. Für den Verlauf von Krebserkrankungen und die metastatische Kaskade tritt besonders das Integrin $\alpha_4\beta_1$ in Erscheinung. Es wird von verschiedenen Melanomzellen exprimiert und ist an der Metastasierung maßgeblich beteiligt⁵⁶⁻⁵⁸. In unserem Arbeitskreis konnte erstmals eine Interaktion von Heparin mit dem Integrin $\alpha_4\beta_1$ gezeigt werden⁵⁹. UFH und Enoxaparin erweisen sich als potente Inhibitoren dieses Bindungsweges.

Heparine stechen angesichts der vorgenannten Effekte als multifunktionelle Biopolymere hervor, die weitaus mehr als bloße Gerinnungshemmer sind. Adhäsionsrezeptoren stellen aufgrund der oben genannten Erkenntnisse eine der naheliegendsten Zielstrukturen für eine Heparinbindung und -wirkung dar. Da sie im Prozess der hämatogenen Metastasierung sowohl während der Migration als auch bei den zahlreichen Wechselwirkungen im Gefäßsystem eine Schlüsselrolle spielen, sollen im folgenden Kapitel die Zusammenhänge näher beleuchtet werden.

2.3 Zelladhäsionsmoleküle im Fokus der Metastasierung

Zelladhäsionsmoleküle sind in zahlreiche Interaktionen von Zellen mit Strukturen des Körpers involviert. Dabei vermitteln sie, wie der Name vermuten lässt, nicht nur klassisch die Adhäsion, sondern tragen auch maßgeblich zu Entwicklung und Aufrechterhaltung von Gewebestrukturen bei. Die Steuerung von Bewegung und Wachstum ist gerade im Prozess der Metastasierung von entscheidender, pathologischer Bedeutung. Weiterhin sind sie in vielfältige Signalkaskaden involviert. Ihre Verteilung und Aufgaben machen sie also zu ubiquitären Spielern des Organismus.

Die Klasse der Zelladhäsionsmoleküle lässt sich in die Subfamilien der Selektine, Integrine, Moleküle der Immunglobulin-Superfamilie und Cadherine einteilen. Letztere sind transmembrane Glykoproteine, vermitteln überwiegend feste Zellkontakte in soliden Geweben, und sind an der Signaltransduktion benachbarter Zellen beteiligt. Ein besonderer Fokus soll in den folgenden Kapiteln auf die Selektine und Integrine geworfen werden, da sie wesentlich in die metastatische Kaskade involviert sind.

2.3.1 Selektine

Selektine gehören zur Klasse der Lektine, einer Proteinspezies, die mit ihren Liganden über Kohlenhydratstrukturen in Wechselwirkung treten. Sie besitzen darüber hinaus keine Enzymaktivität. Man unterscheidet drei humane Mitglieder der Selektinfamilie, nach ihrer zellulären Lokalisation als E-Selektin (Endothel), L-Selektin (Leukozyten) und P-Selektin (Plättchen und Endothel). Bereits 1989 wurden sie erstmalig als „*lectin cell adhesion molecules*“ (LECAMs) beschrieben und weisen somit auf ihre Funktion hin, eine selektive Bindung an Liganden über eine aminoternale Lektindomäne zu ermöglichen. Diese Domäne ist aus ungefähr 120 Aminosäuren aufgebaut und besitzt innerhalb der drei Selektine eine ca. 65 %ige Sequenzhomologie⁶⁰. Aufgrund des hohen Verwandtschaftsgrades von E-, L- und P-Selektin wurde eine einheitliche Nomenklatur festgelegt und ihre Kristallstruktur aufgeklärt^{61,62}. Auffällig ist, dass sich im Zuge der phylogenetischen Entwicklung die bindenden Lektindomänen von murinen, humanen oder bovinen Selektinen kaum verändert haben, so dass dieser Bereich als hochkonserviert angesehen werden kann⁶³.

Im strukturellen Aufbau unterscheiden sich die Selektine überwiegend über die Anzahl ihrer sogenannten „*short consensus repeats*“ (SCR). Dabei handelt es sich um sich wiederholende Einheiten aus ca. 60 Aminosäuren, deren funktionelle Bedeutung noch nicht eindeutig geklärt ist. L-Selektin besitzt zwei, sechs SCR finden sich am E-Selektin und neun am P-Selektin, wodurch eine erklärable räumliche Reichweite zur Präsentation der Lektindomäne geschaffen wird. Von der luminalen Seite ausgehend schließt sich an die Lektindomäne zunächst eine dem „*epidermal growth factor*“ (EGF) ähnliche Region an. Es folgen die SCR und eine transmembranäre Domäne, wodurch die Selektine in der Zellmembran verankert sind. Intrazellulär schließt sich ein, auf das Gesamtmolekül bezogen, sehr kleiner zytoplasmatischer Rest an, der mit dem Zytoskelett der Zelle in Kontakt steht⁶⁴.

Proteine müssen spezifische Kohlenhydratstrukturen exponieren, um mit den Selektinen als Liganden in Wechselwirkung treten zu können. Dabei

handelt es sich um mucinähnliche Glykoproteine. Mucine sind Glykoproteine aus einer zentralen Proteinkette an die eine Vielzahl von Oligosacchariden seitenkettenartig angeknüpft sind. Diese Zuckerstrukturen schützen das Proteingrundgerüst vor enzymatischem Abbau und verleihen dem Protein einen stark hydrophilen Charakter. Die Zuckerreste sind meist O-glykosidisch, häufig beginnend mit N-Acetylgalaktosamin, an Threonin oder Serin des Peptidgerüsts geknüpft. Die Polysaccharide machen i.d.R. einen Massenanteil von 60-80 % am Mucin aus.

Der am besten charakterisierte Selektinligand ist das PSGL-1ⁱ, der bereits 1992 von Moore und Mitarbeitern beschrieben wurde. Es handelt sich um ein langgestrecktes, über Disulfidbrücken verbundenes Homodimer mit einer Masse von 250 kDa⁶⁵. PSGL-1 konnte auf verschiedenen Krebszelllinien nachgewiesen werden, so auch auf Hautkrebszellen⁶⁶. Für die Bindung des P-Selektins an PSGL-1 sind fucosylierte und sialysierte Kohlenhydratstrukturen, wie Sialyl Lewis^x, notwendig⁶⁷. Diese hochspezifische Struktur stellt einen Liganden für alle drei Selektine dar⁶⁸. Durch Modifikation des PSGL-1-Proteingrundgerüsts mit weiteren Kohlenhydraten entsteht eine variable Affinität zu den drei Selektinen⁶⁹.

i PSGL-1 = engl.: P-selectin glycoprotein ligand-1

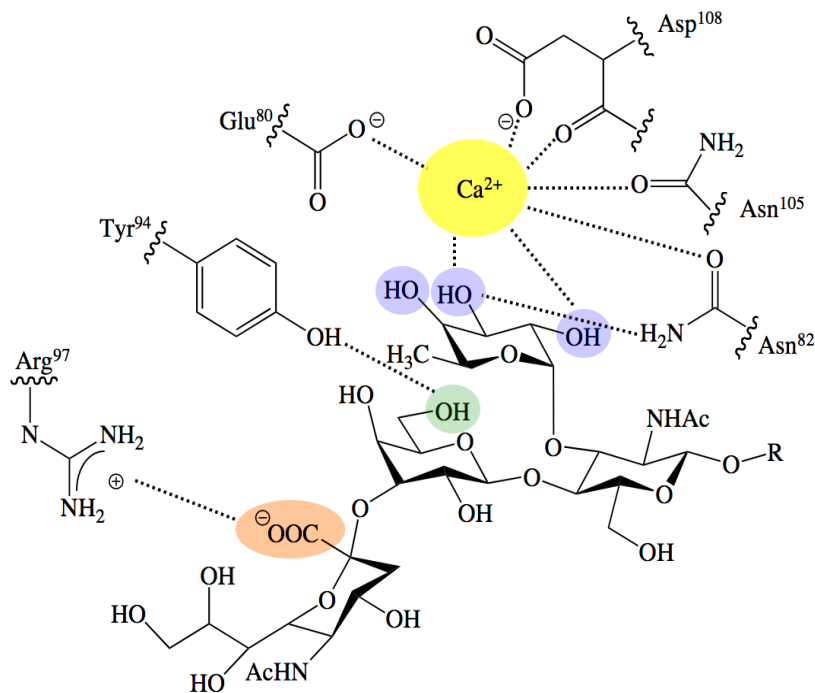


Abbildung 5: **Sialyl Lewis^x**. Ein Tetrasaccharid bestehend aus Fucose, Galaktose, N-Acetylglucosamin und Sialinsäure stellt das kleinste Bindungsepitop der drei Selektine dar. Dargestellt ist die Bindungstasche von E-Selektin, in der sLe^x über die negative Ladung der Sialinsäure, sowie die 2-,3- und 4-ständige Hydroxygruppe der Fucose und die 6-ständige Hydroxygruppe der Galaktose koordiniert wird. Die Bindung erfolgt bei allen Selektinen Ca²⁺ abhängig. Abbildung entnommen aus [274].

Die physiologische Funktion der Selektine besteht in einer initialen Kontaktaufnahme zwischen im Blut zirkulierenden Leukozyten und dem Gefäßendothel. In der Folge dieser Wechselwirkung wird ein als Adhäsionskaskade der Leukozyten bezeichneter Prozess durch Selektine und Integrine kontrolliert. Die Selektinliganden sind also im Entzündungsgeschehen für das „*tethering*“ und „*rolling*“ der Leukozyten verantwortlich⁷⁰. Da sie auch von Tumorzellen exprimiert werden, kann von einem gleichartigen Prozess im Verlauf der hämatogenen Metastasierung ausgegangen werden.

Die Administration des Glycosaminoglykans Heparin und seiner Derivate führt zu einer Hemmung der oben beschriebenen Mechanismen. Die inhibitorische Leistung des Heparins gegenüber Adhäsionsrezeptoren wie den Selektinen ist bereits durch einigen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe gezeigt⁷¹⁻⁷⁴. In Form von Struktur-Wirkungsbeziehungen sind sowohl unterschiedliche Kettenlängen als auch Strukturmerkmale des Heparins auf ihre inhibitorische

sche Potenz gegenüber Selektinen untersucht^{59,75}. Auch andere Arbeitsgruppen konnten Beiträge dazu leisten, so dass dieses Gebiet weitestgehend beleuchtet ist⁷⁶⁻⁷⁸. Da in der vorliegenden Arbeit Selektine nicht im Fokus der Untersuchung stehen, soll der Aufbau und die Physiologie der Selektine hiermit ausreichend skizziert sein.

2.3.2 Integrine

Integrine stellen die größte Gruppe von Adhäsionsmolekülen dar. Sie kommen in allen tierischen Zellen vor. Dabei verbinden sie Zellen miteinander und liefern über den Kontakt mit der EZM wichtige Informationen über das zelluläre Umfeld⁷⁹. Sie sind an Zell-Matrix- wie auch an Zell-Zell-Wechselwirkungen beteiligt und vermitteln Gewebeentwicklung und -differenzierung sowie Immunantworten. Neben der Thrombozytenadhäsion und -aggregation sind sie auch an pathologischen Prozessen, wie beispielsweise dem Krebszellwachstum und der Metastasierung, beteiligt^{80,81}.

Integrine sind Heterodimere, die aus einer α - und β -Untereinheit (UE) aufgebaut sind⁸². Beim Menschen sind bislang 18 α - und 8 β -Untereinheiten bekannt, durch spezifische Kombination ergeben sich 24 funktionelle Integrine⁸³. Ihre Expression und Aktivierung kann sehr rasch reguliert werden. Die Ligandspezifität beruht auf der jeweiligen Kombination der Untereinheiten. Die Untereinheiten dieser Heterodimere sind im Verhältnis 1:1 und nicht-kovalent assoziiert. Jede UE lässt sich in eine große extrazelluläre Domäne, eine transmembranäre Domäne und einen kleinen zytoplasmatischen Bereich ohne Enzymaktivität einteilen⁸⁴. Die UE unterscheiden sich in ihrer Größe und ihren Strukturmerkmalen.

Da in der vorliegenden Arbeit das Integrin VLA-4 untersucht wird, soll an dieser Stelle vornehmlich auf die Strukturmerkmale dieses Vertreters eingegangen werden.

Die α -Untereinheit ist, beginnend am aminoterminalen Ende, aus dem β -Propeller, der Stelzenregion, dem transmembranären Bereich und einer

zytoplasmatischen Domäne aufgebaut. Der β -Propeller wird aus insgesamt sieben gleichartigen, aus jeweils 60 Aminosäuren bestehenden Segmenten einer scheibenförmigen Struktur gebildet. Dieses Strukturmerkmal scheint direkt an der Ligandbindung zu partizipieren⁸⁵. Abweichend zu anderen Integrinen besitzt diese Struktur bei VLA-4 keine I-Domäne. Die I-Domäne trägt ihren Namen, da sie zwischen den β -Faltblattstrukturen zwei und drei des Propellers eingefügt ist (engl.: *inserted*). Normalerweise übernimmt sie regulierende Aufgaben bei der Ligandwechselwirkung.

An den Propeller schließt sich ein etwa 500 Aminosäuren umfassender Bereich an, der als Stelzenregion bezeichnet wird. Seine Aufgabe besteht in der Exposition der Ligandenbindungsstelle.

Der Transmembranbereich wird von jeder UE nur einmal durchspannt und dient der Verankerung des Integrins in der Zellmembran.

Die zytoplasmatische Domäne wird aus 15-77 Aminosäuren zusammengesetzt und weist nur eine geringe Homologie innerhalb der α -Untereinheiten auf. Überall findet sich jedoch eine hochkonservierte Aminosäuresequenz, das GFFKR-Motiv. Diesem wird eine wesentliche Rolle bei der Fähigkeit zur Ligandbindung und der Signalweiterleitung eingeräumt^{86,87}.

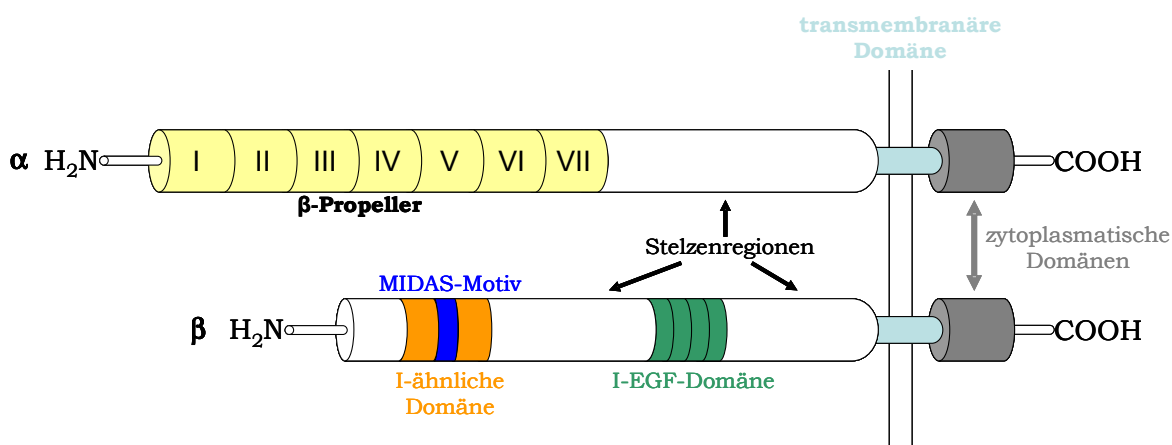


Abbildung 6: **Integrin VLA-4**. Schematisch dargestellt ist das Heterodimer mit Bezeichnung der jeweiligen Domänen. Nähere Erläuterungen siehe Text. Abbildung modifiziert nach Mould und Shimaoka et al.^{88,135}.

Die β -Untereinheit besitzt am N-Terminus einen großen Loop. Nahe ihres aminoterminalen Endes enthält sie einen Abschnitt aus 250 Aminosäuren,

der aufgrund eines vorhandenen MIDAS-Motivs, einer ähnlichen Sekundärstruktur und einer gewissen Sequenzhomologie der I-Domäne der α -Untereinheit ähnelt und daher als I-ähnliche Domäne bezeichnet wird⁵⁹. Das „*metal ion-dependent adhesion site*“ (MIDAS)-Motiv stellt eine konservierte Bindungsstelle für bivalente Kationen, insbesondere Mg^{2+} und Mn^{2+} dar⁸². Diese Domäne übernimmt mit dem β -Propeller die Funktion der Ligandbindung.

In der β -Untereinheit schließt sich ebenfalls eine Stelzenregion an, die aber von der sogenannten I-EGF-Domäne unterbrochen wird. Es handelt sich dabei um vier Cystein-reiche Segmente, die ähnlich zu der Sequenz eines „*epidermal growth factor*“ sind und aufgrund ihres Vorkommens im Integrin als I-EGF-Modul bezeichnet werden⁸⁸.

Auch in den β -Untereinheiten wird die Membran nur einmal durchspannt. Es schließt sich die zytoplasmatische Domäne an. Diese besteht aus 46-60 Aminosäuren und weist deutlich mehr Homologien auf. Ein hochkonserviertes Motiv ist dabei für die Interaktion mit der konservierten Sequenz auf der α -Untereinheit verantwortlich⁸⁹.

Insgesamt weisen die Integrine unterschiedliche Strukturmerkmale auf, die für die verschiedenen Funktionen während einer Ligandbindung verantwortlich sind. Die β_1 -Integrine bilden die größte Subfamilie und sind an Zell-Matrix-Wechselwirkungen beteiligt. Die α -Untereinheit bestimmt, ob der zu bindende Ligand der EZM den Kollagenen, Lamininen oder Fibronectin zugehörig ist.

β_2 -Integrine stellen Leukozyten-spezifische Rezeptoren dar. Sie spielen eine entscheidende Rolle im Prozess der Adhäsionskaskade der Leukozyten im Entzündungsgeschehen. Mit Hilfe der β_2 -Integrine sind Leukozyten in der Lage, nachdem sie durch das Selektin-spezifische Rollen abgebremst wurden, das Gefäßbett zu verlassen und an den Herd der Entzündung in der EZM vorzudringen. Weiterhin sind sie maßgeblich am „*homing*“ der Lymphozyten in die Lymphknoten verantwortlich. Dies bezeichnet die Rezirkulation von immunkompetenten Leukozyten in die Lymphknoten, welche sich dann zu jenen Immunzellen entwickeln, die spezifisch gegen die aufgespürten

Antigene gerichtet sind. Ein wichtiger Vertreter dieser Subfamilie ist das „*lymphocyte function associated antigen-1*“ (LFA-1; $\alpha_L\beta_2$). Die „Leukozytenintegrine“ werden auf nicht stimulierten Leukozyten im strömenden Blut nur in geringem Ausmaß exprimiert. Ihre Expression wird u.a. durch chemotaktische Faktoren hochreguliert, gleichzeitig werden die Integrine aktiviert, d.h. ihre Bindungsstärke gegenüber den Liganden wird deutlich erhöht. Die Liganden dieser Subfamilie stellen die „*intercellular cell adhesion molecules*“, die sog. ICAMs dar. Diese sind wiederum in Subfamilien zu trennen, je nachdem, ob sie konstitutiv vorhanden oder durch Zytokine induzierbar sind⁸³.

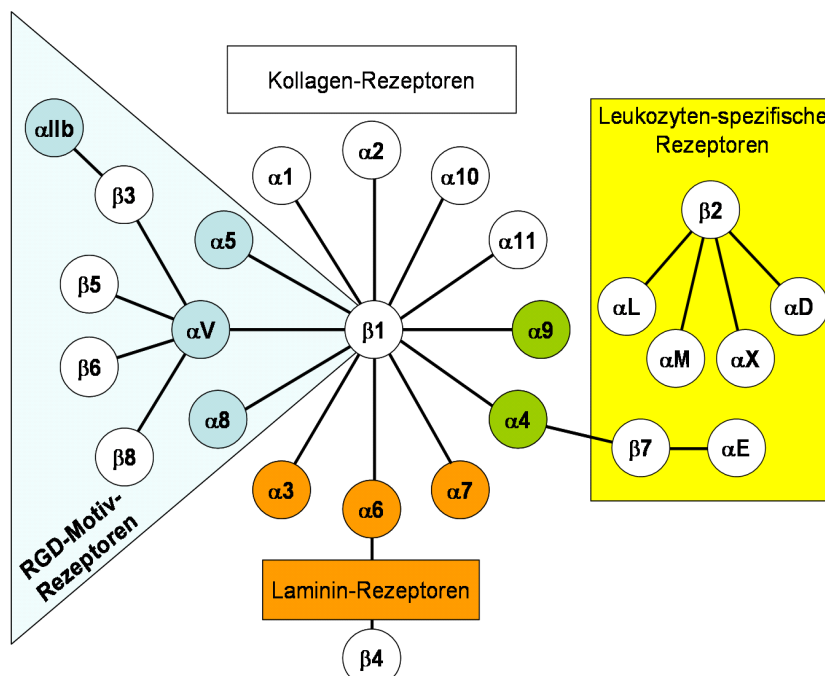


Abbildung 7: **Integrin-Kombinationen und Ligandklassen.** Die Einteilung der Integrin-Subfamilien beruht auf evolutionärer, Ligand-spezifischer und im Falle der β_2 - und β_7 -Integrine Leukozyten-limitierter Expression. Weiß dargestellte α -Untereinheiten besitzen eine I-Domäne. Orange dargestellte α -Untereinheiten besitzen eine Spezifität für Laminin, während blau dargestellte α -Untereinheiten eine Spezifität für das RGD-Aminosäuremotiv aufweisen. Abbildung modifiziert nach [83].

Eine physiologisch/pathologische Funktion wird von $\alpha_{Ib}\beta_3$ bei der Thrombozyten-vermittelten Adhäsion von Tumorzellen an das Endothel und die EZM im Rahmen der metastatischen Kaskade wahrgenommen^{90,91}.

In die Tumorzellmetastasierung sind viele Integrine involviert und übernehmen unterschiedlichste Funktionen. Martin Schlesinger konnte im Rahmen seines Dissertationsprojektes zeigen, dass die Melanomzelllinie MV3 VLA-4 konstitutiv auf ihrer Oberfläche exprimiert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird ausschließlich das auf MV3-Zellen exprimierte VLA-4 betrachtet⁹² und soll im folgenden Kapitel näher charakterisiert werden.

2.3.2.1 Die Wechselwirkung des VLA-4 mit seinem Liganden VCAM-1

Die Integrine der „*very late activation antigens*“ (VLA)-Familie tragen ihre Bezeichnung, da sie erst spät nach der T-Zell-Aktivierung auf der Zelloberfläche erscheinen. Bereits 1987 konnten Hemler und Mitarbeiter zeigen, dass allen Mitgliedern der VLA-Familie eine identische β -Untereinheit gemeinsam ist, sie sich aber in ihrer α -Untereinheit voneinander unterscheiden⁹³.

Synonyme für VLA-4 sind Integrin $\alpha_4\beta_1$ oder CD49d/CD29ⁱ. Es wurde zunächst auf Leukozyten und Monozyten nachgewiesen. Das Molekulargewicht wurde mit 150 kDa für die α - und 130 kDa für die kleinere β -Einheit bestimmt⁹⁴.

VLA-4 ist neben der Matrixbindung über Fibronectin auch an Zell-Zell-Wechselwirkungen beteiligt und unterscheidet sich dadurch von den anderen Mitgliedern der VLA-Familie, die ausschließlich β_1 -typische Zell-Matrix-Bindungen vermitteln⁵⁹. Die Wechselwirkung VLA-4/VCAM-1 wird allerdings nicht über die Fibronectin-Bindungsstelle des VLA-4 vermittelt⁹⁵. VLA-4 bindet an die Domänen 1 und 4 an VCAM-1⁹⁶. Weiterhin sind beide Untereinheiten des VLA-4 gleichermaßen an der Bindung beteiligt.

VLA-4 wurde aber nicht nur auf Leukozyten gefunden, sondern wird auch von verschiedenen Krebszelllinien exprimiert. Damit kann deren Adhäsion an das Endothel und die Extravasation im Verlauf einer Metastasierung erklärt werden⁹⁷.

i CD = engl.: cluster of differentiation

Eine interessante Eigenschaft aller Integrine ist deren Aktivierungsmuster, welches in unterschiedlichen Zeiten erfolgen kann. Die Aktivierung kann dabei durch Affinitätserhöhung aber auch Aviditätserhöhung erfolgen, wobei beide Prozesse simultan verlaufen können. Sie befähigen zur verstärkten Ligandbindung und werden durch intrazelluläre Signalmoleküle in einem als „*inside-out-signalling*“ bezeichneten Vorgang verursacht (siehe auch Kapitel 2.3.2.2).

VCAM-1 (CD106) wird aufgrund seiner Ig-Domäne der Immunglobulin-Superfamilie zugeordnet und ist ein 110 kDa großes transmembranäres Glykoprotein. Auf Endothelzellen wird es präsentiert nach erfolgter Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , IL-1 β , IL-4 oder INF- γ ⁹⁸. Es ist daher nicht verwunderlich VCAM-1 auf vaskulären Endothel auch nur im Bereich von Entzündungen oder Tumoren zu finden, nicht aber im gesunden Gefäßsystem^{99,100}. Weiterhin findet man VCAM-1 aber auch in den Kupfferzellen der Leber, in epithelialen Zellen der Niere und in dendritischen Zellen lymphoider Gewebe⁹⁹.

Aufgrund einer alternativen Spleißvariante desselben Gens kann VCAM-1 sowohl als Molekül mit sechs als auch mit sieben Ig-Domänen (6d-VCAM-1 oder 7d-VCAM-1) vorliegen¹⁰¹. Das 7d-VCAM-1 besitzt dabei neben der am N-terminalen Ende eine zusätzliche, aber wenig affine Integrinbindestelle¹⁰².

Im Rahmen der Leukozytenrekrutierung ist VCAM-1 direkt im Entzündungsgeschehen beteiligt und kann neben VLA-4 auch weitere leukozytäre Integrine wie $\alpha_4\beta_7$, $\alpha_D\beta_2$ und $\alpha_M\beta_2$ binden^{95,102-104}.

Aus dem membranständigen VCAM-1 kann ebenfalls eine lösliche Form hervorgehen. Diese wird durch proteolytische Spaltung der extrazellulären Domäne nahe der Oberfläche freigesetzt¹⁰⁵. Der Sinn dieses als „*shedding*“ bezeichneten Vorgangs ist physiologisch nicht eindeutig geklärt. Möglicherweise wird hiermit eine Art von dualer Regulation vorgenommen. Zum einen besitzt lösliches VCAM-1 weiterhin seine Integrinbindungsfähigkeit und kann damit als endogener Inhibitor wirken. Zum anderen nimmt die endotheliale Rezeptordichte ab und die adhäsiven Eigenschaften des Endothels verringern sich.

Die VLA-4/VCAM-1-Wechselwirkung im Metastasierungsprozess wird kontrovers diskutiert. Viele Erkrankungen gehen mit einer erhöhten Konzentration löslichen VCAM-1 einher¹⁰⁶, daher kann es als prognostischer bzw. diagnostischer Marker herangezogen werden^{107,108}. Hohe Serumspiegel an VCAM-1 stehen bei Krebspatienten in Beziehung mit einer schlechten Prognose des Krankheitsverlaufs^{109,110}. Andererseits scheint gerade die VCAM-1/VLA-4 vermittelte Interaktion für die Rekrutierung zytotoxischer T-Zellen in Melanome oder Nierentumore verantwortlich zu sein^{111,112}. Das Eingreifen des Immunsystems soll hier die Metastasierung vermindern oder frühzeitig durch gezieltes „*homing*“ unterbinden. Bisher ist bekannt, dass VLA-4 auf verschiedenen Tumorzellen exprimiert wird und bei der Einschleusung von zirkulierenden Tumorzellen aus dem Gefäßsystem beteiligt sein kann^{113,114}.

Aktuelle Literatur und die bisherige Datenlage messen der VLA-4-Beteiligung einen vielversprechenden Ansatz zum Verständnis der hämatogenen Tumorzellmetastasierung bei. Trotzdem sind in diesem Zusammenhang bis heute nur wenige Arzneistoffe gegen VLA-4 oder allgemein gegen Integrine in klinischer Erprobung bzw. auf dem Markt. Als Antikörper-basierte Arzneistoffe sind momentan nur Natalizumab (Tysabri®) und Efalizumab (Raptiva®) zu nennen. Natalizumab ist ein monoklonaler Antikörper gegen das α_4 -Integrin und wurde zur Behandlung hochaktiver, schubförmig verlaufender Multipler Sklerose zugelassen. In den USA liegt ebenfalls eine Indikationserweiterung gegen Morbus Crohn vor, die von der EMA aufgrund unzureichender Datenlage bezüglich der Wirksamkeit abgelehnt wurde¹¹⁵. Efalizumab führt zu einer selektiven Blockade der CD11a-Untereinheit des LFA-1 und wirkt dadurch entzündungshemmend bei der Behandlung bestimmter Patienten mit mittelschwerer bis schwerer Psoriasis vulgaris vom Plaque-Typ. Bei beiden Therapien wurde das Auftreten progressiver multifokaler Leukenzephalopathien (PML) beobachtet^{116,117}. Diese schwerwiegende opportunistische Virusinfektion des Gehirns wird bei Patienten mit Immunschwäche durch das JC-Virus ausgelöst und verläuft oft tödlich oder mit schweren bleibenden Schäden. Die Marktzulassung der Antikörper wurde

daraufhin widerrufen. Natalizumab wurde infolge positiver Nutzen-Risiko-Abwägungen unter erhöhten Sicherheitsauflagen, wie z.B. vorheriger JCV-Antikörpernachweis, im Frühjahr 2006 erneut zugelassen¹¹⁸.

In der klinischen Phase III befindet sich ein zyklisches Pentapeptid mit dem Namen Cilengitide (Impetreve[®]). Dieses kleine Peptid hemmt die Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ und soll eine Indikation als Angiogenesehemmer bei Glioblastom erhalten^{119,120}. Auch bei anderen Tumoren wie metastasierendem Prostatakrebs (Phase II)^{121,122}, fortgeschrittenes nicht-kleinzelliges Bronchiolalkarzinom (Phase II)¹²³ und fortgeschrittenes Plattenepithelkarzinom des Kopfes und Halses (Phase I/II)¹²⁴ ist es in der klinischen Testung.

Die Antikörper Vitaxin und Velociximab befinden sich in der klinischen Phase II und richten sich gegen die Integrine $\alpha_v\beta_3$ (Vitaxin) und $\alpha_5\beta_1$ (Volociximab)^{125,126}. Dabei wird dem Volociximab auch eine antiangiogenetische Wirkung zugeschrieben¹²⁷⁻¹²⁹.

Eine Übersicht zum derzeitigen Stand der Entwicklung, Fortschritte, aber auch zu überwindende Schwierigkeiten fassten Cox und Mitarbeiter zu Integrininhibitoren zusammen¹³⁰.

2.3.2.2 Integrinsignalling

Zellen stehen über viele mögliche Strukturen im gegenseitigen Kontakt und „signalisieren“ sich gegenseitig die unterschiedlichsten Effekte oder Antworten auf bspw. äußere Reize. Integrine stellen in diesem Zusammenhang innerhalb der Zelle einen wichtigen Knotenpunkt von mechanischen Kräften, biochemischen Signalen und Adhäsion zwischen intra- und extrazellulären Effekten dar. Als bidirektionale Signalling-Rezeptoren empfangen sie Signale, verarbeiten Umgebungsreize, aktivieren Signalkaskaden und können diverse Zellantworten abgeben. Diese Vorgänge werden in Prozessen zusammengefasst, die als *inside-out*- oder *outside-in*-Signalling verstanden werden.

In diesem Kapitel soll der Übersichtlichkeit wegen auf die wesentlichen Integrin-vermittelten Signalprozesse im Vorgang der metastatischen Kaskade, also Migration und Adhäsion eingegangen werden.

Einer der einfachsten und gerade von Integrinen häufig praktizierter Signalling-Prozess ist eine Einflussnahme auf die Bindungsfähigkeit. Dies kann sowohl über eine Steigerung der Affinität des einzelnen Integrins vorgenommen werden, als auch über eine Erhöhung der Avidität.

Durch Aktivierung der Zelle durch äußere Stimuli kommt es im Rahmen des „*inside-out signalling*“ zur Erhöhung der Bindungsfähigkeit. Diese Affinitätsänderung kann physiologisch durch Chemokine, die Bindung eines T-Zell-Rezeptors an einen MHC-Komplex¹³¹ oder artifiziell mittels bivalenter Kationen wie Mg^{2+} und Mn^{2+} sowie durch monoklonale Antikörper oder Phorbolster vermittelt werden. Dabei erfährt das jeweilige Integrin eine Konformationsänderung innerhalb der Ligandbindungsstelle. Bereits 1995 konnten Lee et al. zeigen, dass α_M -I-Domänen in zwei verschiedenen Konformationen kristallisieren¹³². Dies war von der Anwesenheit bivalenter Kationen abhängig. Eine Benennung erfolgte in offene oder geschlossene Konformation. Das Ausmaß dieser Aktivierung kann durch den K_D -Wert beschrieben werden. So nimmt dieser bei der geschlossenen Konformation Werte von 2 mM und in der offenen Konformation Werte von 200 nM an¹³³. Die Werte legen den Unterschied innerhalb der unterschiedlichen Aktivierungszustände dar, lassen aber erkennen, dass auch ein nicht aktiviertes Integrin zur Ligandenbindung befähigt ist. Die energetisch bevorzugte Konformation ist die geschlossene, sie stellt somit vermutlich die Standardkonformation inaktiver Integrine dar. Im postulierten „*switchblade-like-model*“ⁱ wird ein Aufrichten des Integrinmoleküls durch eine Bewegung im Bereich der I-EGF-Module II und III diskutiert. Dies führt zu einem Auseinanderweichen der Stelzenregion und der zytoplasmatischen Regionen. Eine Zugbewegung innerhalb der Untereinheiten legt die Ligandbindungsstelle weiter frei. Diese Kombination aus klappmesserähnlicher Bewegung und dem Öffnen der

i engl. = Klappmesser-artiges Model

geknickten Integrinstruktur ermöglicht es der Kopfgruppe, mit dem Liganden in Interaktion zu treten^{59,134,135}.

Die Aktivierung ist dabei rasch und innerhalb einer Sekunde möglich, kann aber auch bis zu mehreren Minuten dauern. Eine Assoziation von intrazellulären Proteinen wie Talin oder Kindlin an den zytoplasmatischen C-Terminus der Integrin β -Untereinheit bewirkt eine Erhöhung der Affinität¹³⁶.

Die Avidität kann durch räumliche Annäherung einzelner Integrine über sogenannte Mikrocluster zu Clustern erhöht werden. Diese Anordnung ermöglicht eine multivalente Interaktion mit Liganden, eine sogenannte Valenzsteigerung tritt ein¹³⁷. Zytoskelettale Bestandteile ermöglichend dabei diese Anordnung¹³⁸. Die Affinitäts- und Valenzregulation wird als Integrinavidität bezeichnet.

Im *outside-in* Signalling ist die eigentliche Ligandbindung für ein Signal verantwortlich, welches zur Aktivierung von intrazellulären Proteinen wie bspw. der „Fokalen Adhäsionskinase“ (FAK) führt. Die Aktivierung der FAK oder der Src-Tyrosinkinase führen zu einer Einleitung der Adhäsion. Dabei wird nicht nur die Zelladhäsion davon beeinflusst, sondern weitere Proteine involviert und Signalkaskaden wie auch die Genexpression in der Zelle angestoßen. Eine Aktivierung von Ras/Raf/Erk beeinflusst die Zelldifferenzierung und Proliferation, PI3K/Akt-Aktivierung fördert das allgemeine Zellüberleben und eine Rho/Rac/cdc42-Aktivierung wirkt sich direkt auf die Organisation des Zytoskeletts und dadurch auf Zelladhäsion und Beweglichkeit der Zellen aus^{139,140}. Das Signalling über die fokale Adhäsion kann auch die Apoptose auslösen und für solche Zellen, die auf die Verankerung auf einer stabilen Oberfläche angewiesen sind, den Zellzyklus steuern¹⁴¹. Auch eine Reihe von proliferativen, prometastatischen oder antiapoptotischen Signalen werden so ins Zellinnere geleitet und tragen zur Malignität der Zellen bei^{142,143}.

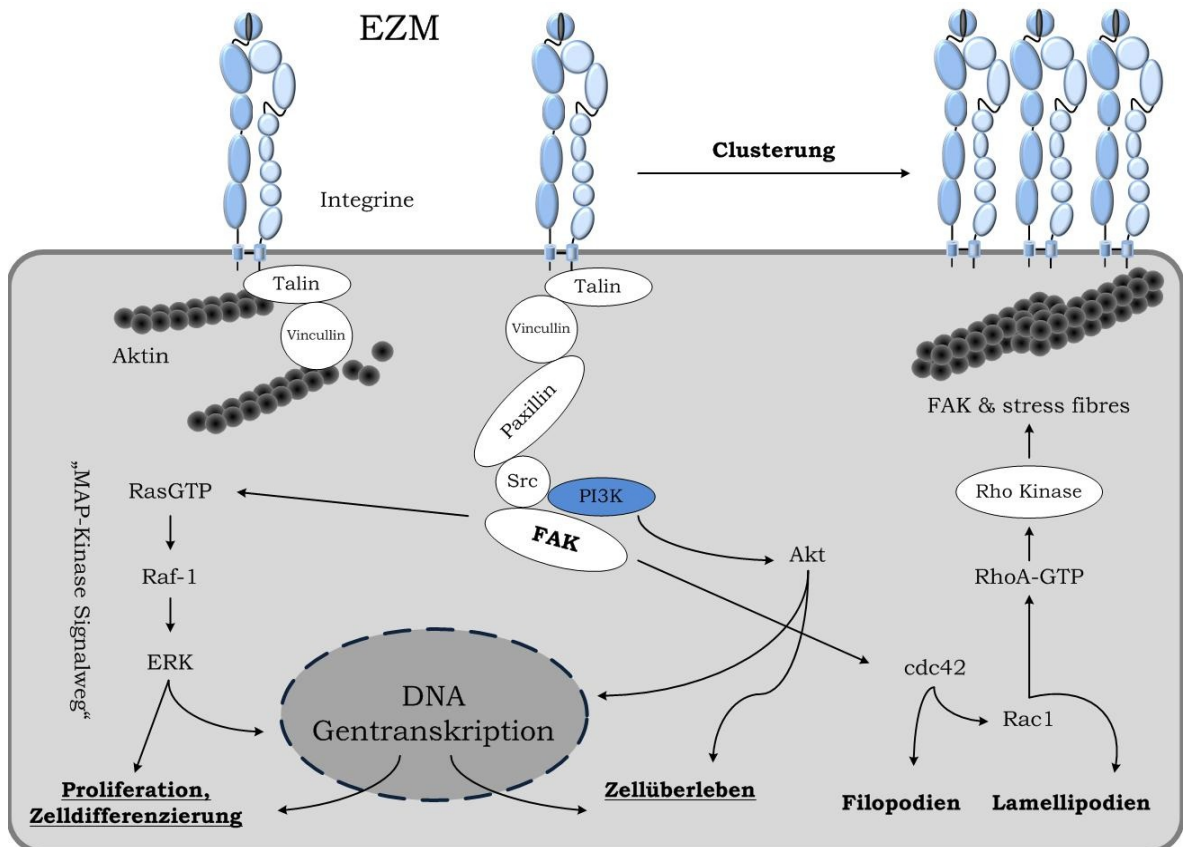


Abbildung 8: **Integrin vermitteltes Signalling.** Die Rekrutierung der Proteine des Adhäsionskomplexes erfolgt in der Regel über die α -Untereinheit der Integrine. Hingegen wird die Zusammenlagerung des f-Aktin über die β -Untereinheit gesteuert²⁷⁷. Abbildung modifiziert nach [250].

Die Signalling Vorgänge *inside-out* und *outside-in* sind nicht immer klar voneinander abzugrenzen bzw. liegen oft auch dynamisch nebeneinander vor.

Eine weitere wichtige Signallingfunktion übernehmen zytoskelettale Proteine und Bestandteile. So sind die β -Untereinheiten der Integrine über Talin direkt mit dem Aktin-Zytoskelett der Zelle verbunden. Über den Kontakt mit Talin wird ebenfalls eine indirekte Bindung über das Strukturprotein Vincullin mit Paxillin, α -Actinin und schließlich zu Aktin ermöglicht. Dies erklärt die „Integrierung“ während der Migration und Adhäsion von Integrinen in einen hochkomplexen Prozess, bei dem die Morphologie zur Bewegung über ein Substrat maßgeblich verändert wird und verändert werden muss.

Den Signalling-Vorgängen schließt sich meist eine Integrin-Ligand-Wechselwirkung an. Integrin-Ligand-Paare lassen sich am Besten aufgrund der strukturellen Gemeinsamkeiten dieser Wechselwirkung und gemäß Abbildung 7 auf Seite 24 einteilen. Demnach findet eine Bindung von Integrinen an Proteine über eine bestimmte Mindest-Erkennungssequenz statt. Nennenswert sind die RGD-bindenden Integrine wie alle α_V -Integrine, zwei β_1 -Integrine ($\alpha_5\beta_1$ und $\alpha_8\beta_1$) und $\alpha_{IIb}\beta_3$. RGD ist dabei die Mindestamino-säuresequenz Arginin-Glycin-Asparaginsäure im Einbuchstabencode der Aminosäuren¹³⁹. Das RGD-Motiv findet sich überwiegend in Proteinen der EZM, wie z.B. Fibronectin, Vitronectin, von-Willebrand-Faktor und Thrombospondin. Grundsätzlich bindet das Arginin des RGD an den β -Propeller der α -Untereinheit und Aspartat über eine kationische koordinative Bindung an die I-ähnliche Domäne der β -Untereinheit^{144,145}. Unterschiede in der Affinität beruhen dann auf Unterschieden in der Präzision der Bindung an das RGD-Motiv¹⁴⁶. Weiterhin gibt es noch die LDV-bindenden Integrine, also einer Erkennungssequenz des Tripeptids Leucin-Aspartat-Valin, wie es am bekanntesten in einer Spleißvariante des Fibronectins vorkommt. Hier binden bevorzugt VLA-4¹⁴⁶, $\alpha_4\beta_7$, $\alpha_9\beta_1$, alle vier Mitglieder der β_2 -Familie und $\alpha_E\beta_7$. Homologe des LDV-Motivs finden sich auch bei Vertretern der Immunglobulin-Superfamilie wie bspw. VCAM-1¹⁴⁷. Der genaue Bindungsort bzw. -modus ist noch nicht gänzlich aufgeklärt, man vermutet aber eine ähnliche Konstellation wie bei der Bindung des RGD-Motiv.

Der Abbildung 7 zu entnehmen sind weiterhin die I-Domänen- β_1 -Integrine mit ihrer Laminin- und Kollagen-Bindungs-fähigkeit¹⁴⁸ und die Laminin-bindenden Integrine ohne I-Domäne¹⁴⁶.

2.3.3 Heparin als potentieller Integrinligand

In Kapitel 2.3.2.2 wurden bereits Integrinliganden und mögliche Bindungsmotive beschrieben. In diesem Kapitel sollen die Integrinliganden um das Biopolymer Heparin erweitert werden, da in der vergangenen Zeit

verschiedene Ansätze eine direkte Wechselwirkung von Integrinen mit Heparin aufzeigen konnten.

Bereits im Jahr 1995 konnte Diamond mit Mitarbeitern Heparin als einen Bindungspartner des leukozytären Integrins Mac-1 ($\alpha_M\beta_2$) identifizieren. Außerdem konnte *in vitro* die Bindungsfähigkeit von Leukozyten an immobilisiertes Heparin nachgewiesen werden. Hier wurde eine Bindung über die I-Domäne postuliert, ebenfalls konnte die N- und O-Sulfatierung des Heparins als essentiell für die Bindung ausgemacht werden⁵⁴. Weitere Arbeitsgruppen konnten sogar die hohe Affinität dieser Bindung und einer weiteren an Integrin $\alpha_X\beta_2$ bestimmen^{149,150}. Beide Integrine spielen eine entscheidende Rolle bei der Adhäsion und Migration myeloider Leukozyten.

Exprimiert man durch Transfektion das Integrin $\alpha_X\beta_2$ auf Makrophagen, so erlangen diese Zelllinien plötzlich eine Heparin-Bindungsfähigkeit¹⁵⁰.

Bereits erwähnt ist das Integrin $\alpha_{Ib}\beta_3$ auf Plättchen, welches effektiv durch Heparin und nicht-antikoagulative Heparinderivate geblockt werden kann¹⁵¹. Daraus ergibt sich *in vitro* eine wirksame Reduktion der Plättchenadhäsion mit Melanomzellen und auch die Metastasierungsrate konnte *in vivo* gesenkt werden.

In unserer eigenen Arbeitsgruppe konnte durch vorangegangene Arbeiten gezeigt werden, dass Heparin die Integrin-vermittelte Melanomzelladhäsion ans Endothel verhindert⁵⁹. Dabei stellte sich das Integrin VLA-4 als das relevante Integrin heraus, welches durch Heparin im kleinen mikromolaren Konzentrationsbereich in seiner Bindung zu VCAM-1 inhibiert wurde¹⁵². Diese Bindung ist sowohl von der Kettenlänge des Heparins als auch vom Sulfatierungsgrad abhängig⁷⁵.

Die in diesem Kapitel zusammengefassten Daten stellen Integrine, aber auch die Selektine, als wichtige Knotenpunkte in der metastatischen Kaskade dar. Interessanterweise bietet sich in diesem Zusammenhang Heparin geradezu perfekt für eine inhibitorische Interaktion an. Welchen Beitrag das Glykosaminoglykan leisten kann, ist dabei aber abhängig vom jeweiligen Tumortyp und den exprimierten Liganden. Die Effektivität dieser relativ einfachen Interaktion in einem komplexen Prozess wie dem der Meta-

stasierung, muss allerdings noch weiter *in vivo* erforscht werden. Weitere Struktur-Wirkungsbeziehungen und Modifikationen am Heparin könnten somit zukünftig zu einem auf die vorgefundenen Gegebenheiten zugeschnittenen Heparin führen, welches sich in Bezug auf Sicherheit und zu erwartende Nebenwirkungen auch durch die jahrelangen klinischen Erfahrungen mit Heparin als sehr vorteilhaft erweisen kann.

2.3.4 Heparansulfat-Proteoglykane als Co-Rezeptoren der Integrine

In der Literatur werden Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) als Co-Rezeptoren der Integrine kontrovers diskutiert. Dieses Kapitel soll einen Überblick über die Physiologie der HSPG und die möglichen Effekte auf bzw. Wechselwirkungen mit Integrinen geben.

Proteoglykane besitzen ein Kernprotein, an das über die Aminosäuren Serin oder Threonin kovalent Glykosaminoglykan(GAG)-Ketten wie Heparansulfat, Dermatansulfat oder Hyaluronsäure gebunden sind. Heparansulfat-Proteoglykane sind, wie der Name vermuten lässt, glykosidisch mit dem linearen Polysaccharid Heparansulfat verknüpft. Dieses setzt sich aus 1,4-glykosidisch verknüpften Disaccharid-Einheiten bestehend aus D-Glucosamin und D-Glucuronsäure oder L-Iduronsäure zusammen. Ähnlich wie bereits beim Heparin können die funktionellen Gruppen in einem unterschiedlich hohen Maße sulfatiert vorliegen und sorgen somit für eine hohe Heterogenität unter den HSPG¹⁵³.

Als Besonderheit lassen sich die HSPG in die „*full-time*“ und „*part-time*“ HSPG unterscheiden, je nachdem ob der Proteinkern dauerhaft mit GAG-Ketten dekoriert ist oder dies nur unter bestimmten Umständen vollzogen wird¹⁵⁴.

HSPG sind ubiquitär in jedem Säugetierorganismus verbreitet und äußerst heterogen aufgebaut. An der Zelloberfläche gebunden liegen Syndekane und Glypikane vor. Syndekane sind transmembranär aufgebaut und existieren in vier Isoformen, die Heparansulfatketten sind luminal am extra-

zellulären Proteinkern exponiert; gegebenenfalls finden sich noch Chondroitinsulfate nahe der Zellmembran. Glypikane hingegen sind nicht transmembranär sondern über Glykosylphosphatidylinositol an die Zelloberfläche gebunden¹⁵⁵. Sie tragen Heparansulfat-Seitenketten nahe der Plasmamembran und oftmals eine zusätzliche Zuckerkette nahe des Endes der Ektodomäne. Insgesamt existieren hiervon sechs Isoformen¹⁵⁶. Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass in der EZM drei weitere HSPG vorliegen: Agrine, meist reichlich vorhanden in den Basalmembranen, Perlekane, perizellulär verbreitet und Typ XVIII Kollagen, welches ebenfalls in den Basalmembranen lokalisiert ist¹⁵⁷.

Strukturelle Unterschiede und Vorkommen der HSPG sorgen für eine breite Heterogenität und Interaktionsfläche mit verschiedenen Proteinen wie z.B. Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Chemokinen, Proteasen, Lipasen und Zelladhäsionsmolekülen wie den Integrinen. In der vorliegenden Arbeit wurde der Fokus auf das transmembrane Syndekan-4 gerichtet. Dieses ist direkt mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden und bekannt für eine von anderen Molekülen auf der Zelloberfläche unabhängige Signalgenerierung und Cofaktor-Funktion von Integrinen.

2.3.4.1 Syndekane

Syndekane sind die am besten charakterisierten Plasmamembran-Proteoglykane, obwohl selbst in dieser Untergruppe der HSPG ein hohes Maß an struktureller Variabilität besteht. Die transmembranäre (TM) Domäne und Teile der zytoplasmatischen Domänen (C1 und C2) sind hochkonserviert und bei allen vier Isoformen einheitlich¹⁵⁸. Diese Hauptdomänen zeigen alle eine Tendenz zur Dimerisierung, wobei die TM-Domäne die treibende Kraft darstellt^{159,160}. Die Monomere werden dabei nicht kovalent, sondern über Wasserstoffbrücken oder hydrophobe Wechselwirkungen miteinander assoziiert. Die C1 Domäne ist für die zytoskelettale Anbindung über Aktin verantwortlich, während die C2-Domäne zur Bindung von PDZⁱ-Gerüstproteinen

i Die PDZ-Domäne ist eine spezifische, modular aufgebaute Proteininteraktionsdomäne.

dient. Die extrazelluläre Aminosäuresequenz des Kernproteins unterscheidet sich bei den vier Syndekan-Isoformen sehr voneinander und wird als variable Domäne bezeichnet. Einheitlich sind jeweils die Bindungsstellen der drei bis fünf GAG-Ketten und die Erkennungspunkte für Proteasen. Neben der Dekoration mit Heparansulfat-Ketten finden sich bei den längeren Proteinkernen der beiden Vertreter Syndekan-1 und -3 nahe der transmembranären Region auch Chondroitinsulfatketten.

Einen schematischen Überblick über die Syndekan Familie soll die nachfolgende Abbildung geben.

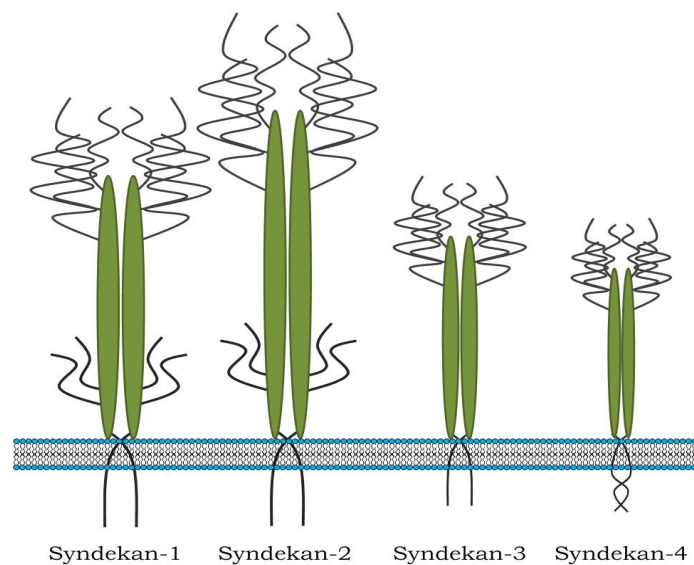


Abbildung 9: **Die Familie der Syndekane.** ¹⁶¹

Die Syndekane sind, mit Ausnahme des Syndekan-4 welches ubiquitär verbreitet ist, mit ihrem Vorkommen auf bestimmte Gewebearten beschränkt. Syndekan-1 findet sich so auf vielen Epithelgeweben und manchen Leukozyten wie Plasmazellen. Syndekan-2 ist vorhanden auf Mesenchymzelltypen, aber auch auf sich entwickelnden Nervenfasern. Syndekan-3 ist vermehrt auf Nervenfasern und in der Entwicklung befindenen Skelettmuskulatur anzutreffen¹⁶¹.

Die funktionellen Aufgaben lassen sich in vier Kategorien einteilen. Zum einen tragen sie zur Wachstumsfaktor-Rezeptor-Aktivierung bei, indem Wachstumsfaktoren wie bFGF oder VEGF an den GAG-Ketten akkumuliert werden. Überhaupt stellen sich die GAG-Ketten als ideale Rezeptoren für

gelöste oder von der Zellmembran weit entfernte Liganden dar. Weiterhin ist die Matrix-Adhäsion über bspw. Kollagen und Thrombospondin eine Kernfunktion während der Adhäsion, ebenso auch die Zell-Zell-Adhäsion, welche ebenfalls über bspw. Syndekan-4 zusammen mit Integrinen vollzogen wird¹⁶²⁻¹⁶⁴. Zudem können Syndekane in die Tumorsuppression wie auch -progression eingreifen, indem sie über ihre Ektodomäne auf das Wachstum von epithelialen Zellen oder Myeloma-Zellen regulatorischen Einfluss nehmen¹⁶⁵.

2.3.4.2 Syndekan-4 als Co-Rezeptor der Integrine

Syndekan-4 stellt im Kontext dieser Arbeit den interessantesten Vertreter der Syndekanfamilie dar, da er sowohl über die fokale Adhäsion als auch über die direkte Wechselwirkung mit Zellen und EZM an Zellmigration und Adhäsion beteiligt ist¹⁶⁶.

Syndekan-4 (auch Ryudocan oder Amphiglycan genannt) wird von Zellen exprimiert, die vornehmlich stabile Adhäsionen ausbilden. Es bildet selbst Homodimere, die ihrerseits durch Clusterung, ähnlich den Integrinen, zu einer Affinitätssteigerung führen. Die Bindung zweier Syndekan-4 Moleküle ist von entscheidender Bedeutung für einen Signalling-Effekt. So konnte in Studien zur Bindung mit vollständigem Syndekan-4 und einem um die Zytoplasmadomäne gekürzten Syndekan-4 gezeigt werden, dass die fokale Adhäsion von CHO-K1ⁱ Zellen an die EZM-Bestandteile Fibronectin und Vitronectin erniedrigt und die Zytoskelettorganisation gestört war¹⁶⁷. Das Signalling über Syndekan-4 ist also abhängig von den zytoplasmatischen Domänen, in der die V-Region liegt. Diese komplexiert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂), welches wiederum die Zytoplasmadomänen im Zustand von Dimeren oder Oligomeren stabilisiert¹⁶⁸. Der Komplex aus Syndekan-4 und PIP₂ aktiviert die Protein Kinase C α (PKC α), über die die Ausbildung von Aktin-Myosin-Interaktionen in Fibrillenbündeln („*stress fibres*“) und fokaler Adhäsion organisiert wird¹⁶⁹. Über weitere intrazelluläre

ⁱ Ovarien-Fibroblastenzellen des chinesischen Hamsters

Proteine wie Paxillin, das Adaptorprotein der FAK, und α -Aktinin wird das Signalling des Syndekan-4 fortgeführt^{170,171}.

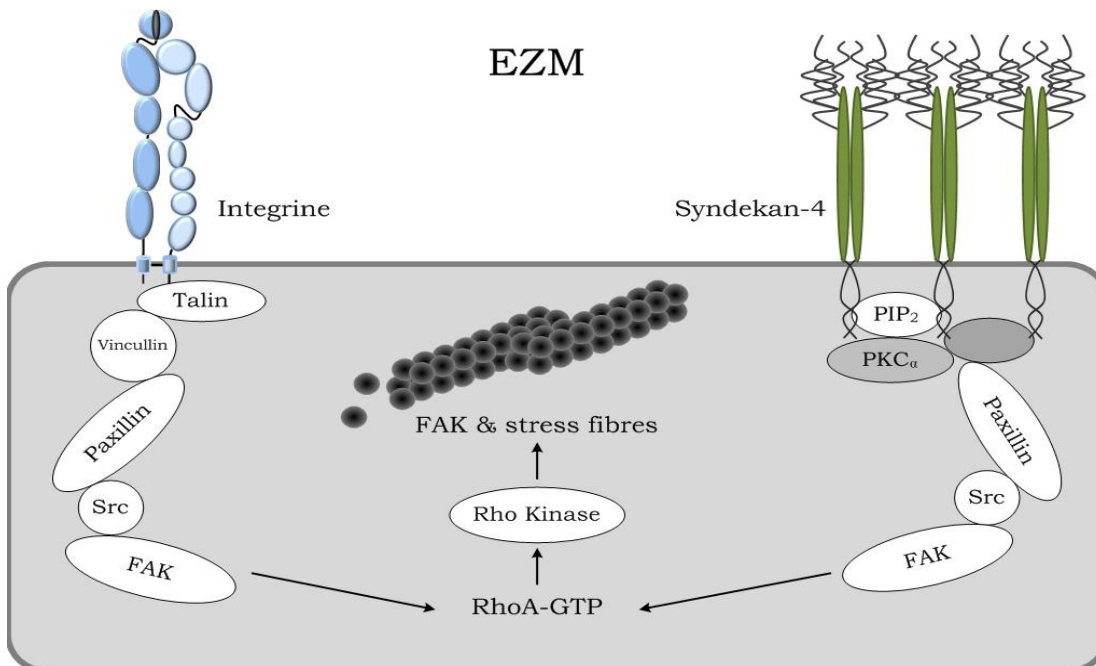


Abbildung 10: **Syndekan-4 und Integrin-abhängiges Signalling** und Ausbildung der Fokalen Adhäsion sowie „stress fibres“. Abbildung modifiziert nach [170].

In der Literatur wird Syndekan-4 als Co-Rezeptor von Mitgliedern der Integrinfamilie beschrieben¹⁷²⁻¹⁷⁴. Es ist dabei nicht eine direkte Assoziation eines Integrins mit Syndekan-4 zu verstehen, sondern vielmehr eine Art von Synergismus der gemeinsam in der fokalen Adhäsion endet. Vereinfacht lässt sich dieser Vorgang wie folgt beschreiben: Eine Ligandbindung am Integrin führt zu einer intrazellulären Aktivierung von Tyrosinkinase wie bspw. der PIP5-Kinase¹⁷⁵. Diese lässt den Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat Level der Zelle ansteigen. PIP₂ bindet an zytoskelettale Proteine wie α -Aktinin und bewirkt so eine Zytoskelettorganisation¹⁷⁶. Es bindet aber auch gleichzeitig an Syndekan-4 und induziert die Dimerisierung die wie bereits beschrieben in der FAK endet¹⁷⁷. Die gemeinschaftliche Ausbildung der fokalen Adhäsion und Migration wird durch eine deutliche PKC α -Aktivierung erreicht. Da sowohl Integrine als auch Syndekan-4 die Aktivierung der PKC α und der kleinen GTPase *Ras-homolog-gene-family, member A* (RhoA) bewirken, wird die Aktivierung zusätzlich verstärkt. Diese Synergie wurde

insbesondere für das $\alpha_5\beta_1$ mit Syndekan-4 auf dem EZM Bestandteil Fibronektin in den letzten Jahren genau untersucht¹⁷⁸.

Für Vorgänge wie Migration und Adhäsion ist dies für das VLA-5 ($\alpha_5\beta_1$) dezidiert beschrieben, nicht jedoch für das VLA-4¹⁷⁹. Integrin $\alpha_4\beta_1$ kann aber ebenfalls mit Syndekan-4 assoziieren und dieser Komplex über Tenascin, ein extrazelluläres Matrixglykoprotein, kann die Apoptose in hämatopoetischen Tumorzellen auslösen^{180,181}.

Die gemeinschaftliche Ausbildung der fokalen Adhäsion und Migration wird durch eine deutliche PKC α -Aktivierung erreicht. Da sowohl Integrine als auch Syndekan-4 die Aktivierung der PKC α und der kleinen GTPase *Ras-homolog-gene-family, member A* (RhoA) bewirken, wird die Aktivierung zusätzlich verstärkt.

Um die Zelladhäsion zu regulieren, müssen aber nicht zwingend Integrine mitwirken, da Syndekan-4 in der Lage ist auch ein unabhängiges Signalling auszulösen¹⁶⁷. Die Aktivität eines eigenständigen Signalling über PKC α kann dabei über die Phosphorylierung eines Serinrestes in der C1 Region gesteuert werden. Ist dieses Serin phosphoryliert, so kann Syndekan-4 nicht mehr Oligomerisieren und die Aktivierung der PKC α bleibt aus^{182,183}.

Über ihre Signalwirkung hinausgehend, können ebenso die Heparansulfatketten der Syndekane einen geeigneten Liganden darstellen. So kann bspw. Fibronektin über seine Heparin-bindende Domäne mit den GAG-Ketten interagieren¹⁸⁴.

Heparanase ist ebenfalls befähigt über ihr enzymatisches Zentrum an Heparansulfatketten zu binden und führt somit zu einer „exogenen-vermittelten Clusterung“ der Syndekane und über die nun zusammengeführten Proteinkerne einer nachgeschalteten Aktivierung des PKC Signalweges und der kleinen GTPase Rac1. Die Fokale Adhäsion wird über Paxillin aktiviert und die Zellen beginnen mit vermehrtem Spreiten auf dem jeweiligen Substrat¹⁸⁵.

2.4 Extrazelluläre Matrix und die CCN-Familie

2.4.1 Bestandteile der extrazellulären Matrix

Die extrazelluläre Matrix umfasst alle Gewebe im sogenannten Interzellularraum, also solche die zwischen den Zellen liegen. Die Zusammensetzung ist äußerst heterogen und lässt sich grob in Faser-bildende Komponenten und Grundsubstanz einteilen. Funktionell lässt sich diese Heterogenität ebenfalls erkennen, da sie sowohl zur Formgebung, Elastizität, aber auch Zugfestigkeit von Geweben beitragen, weiterhin aber auch zur Signaltransduktion oder als Zytokinreservoir dienen¹⁸⁶. Die EZM-Bestandteile sind alle in der Lage über verschiedene Erkennungssequenzen Integrine zu binden.

Bei den Faser-bildenden Substanzen ist stellvertretend das Kollagen zu nennen, da es im weiteren Verlauf dieser Arbeit von Bedeutung innerhalb der Migrationsversuche sein wird.

Innerhalb der Grundsubstanzen spielen Kohlenhydrate eine wichtige Rolle, so finden sich dort vermehrt Glykosaminoglykane, die an Proteine gebunden werden und die Proteoglykane bilden. Auch Adhäsionsproteine in Form von Glykoproteinen werden bspw. durch Laminine oder Fibronectin gestellt.

Die sogenannten matrizellulären Proteine sind strukturell sehr unterschiedliche, EZM-assoziierte Glykoproteine die von Gewebe- aber auch Tumorzellen sekretiert werden. Sie haben regulatorische Aufgaben und modulieren Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Wechselwirkungen, ohne einen strukturellen Beitrag zur EZM zu leisten¹⁸⁷.

2.4.2 Die CCN-Familie

Die CCN-Familie gehört zu den matrizellulären Proteinen, übt aber keine strukturelle Aufgabe aus, sondern vermittelt vornehmlich Zell-EZM-Interaktionen. Die Familie setzt sich aus insgesamt sechs verschiedenen Proteinen zusammen: Cyr61 (*cysteine-rich 61*, CCN1), CTGF (*connective tissue growth factor*, CCN2), NOV (*nephroblastoma overexpressed*, CCN3), *Wnt-inducible secreted protein* (Wisp-1,CCN4), Wisp-2 (CCN5) und Wisp-3 (CCN6). Das Akronym CCN bildet sich aus den Anfangsbuchstaben der ersten drei entdeckten Vertretern dieser Klasse¹⁸⁸.

Generell bestehen alle Mitglieder (mit Ausnahme von CCN 5) aus vier charakteristischen Domänen und nehmen an unterschiedlichen biologischen Prozessen wie bspw. Gewebeentwicklung, Wundheilung, Angiogenese oder Entzündungsvorgängen teil. Im Krebsgeschehen nehmen sie aber zum Teil antagonistische Wirkungen auf zelluläre Funktionen wahr. So können sie sowohl inhibierende, wie auch stimulierende pathologische Effekte auslösen¹⁸⁹. Cyr61 und CTGF regen die Zelladhäsion und Migration an, während CCN3, 4 und 5 als Tumorsuppressoren fungieren können¹⁹⁰.

Die nachfolgende Abbildung zeigt den grundsätzlichen Domänenaufbau der CCN-Proteine.

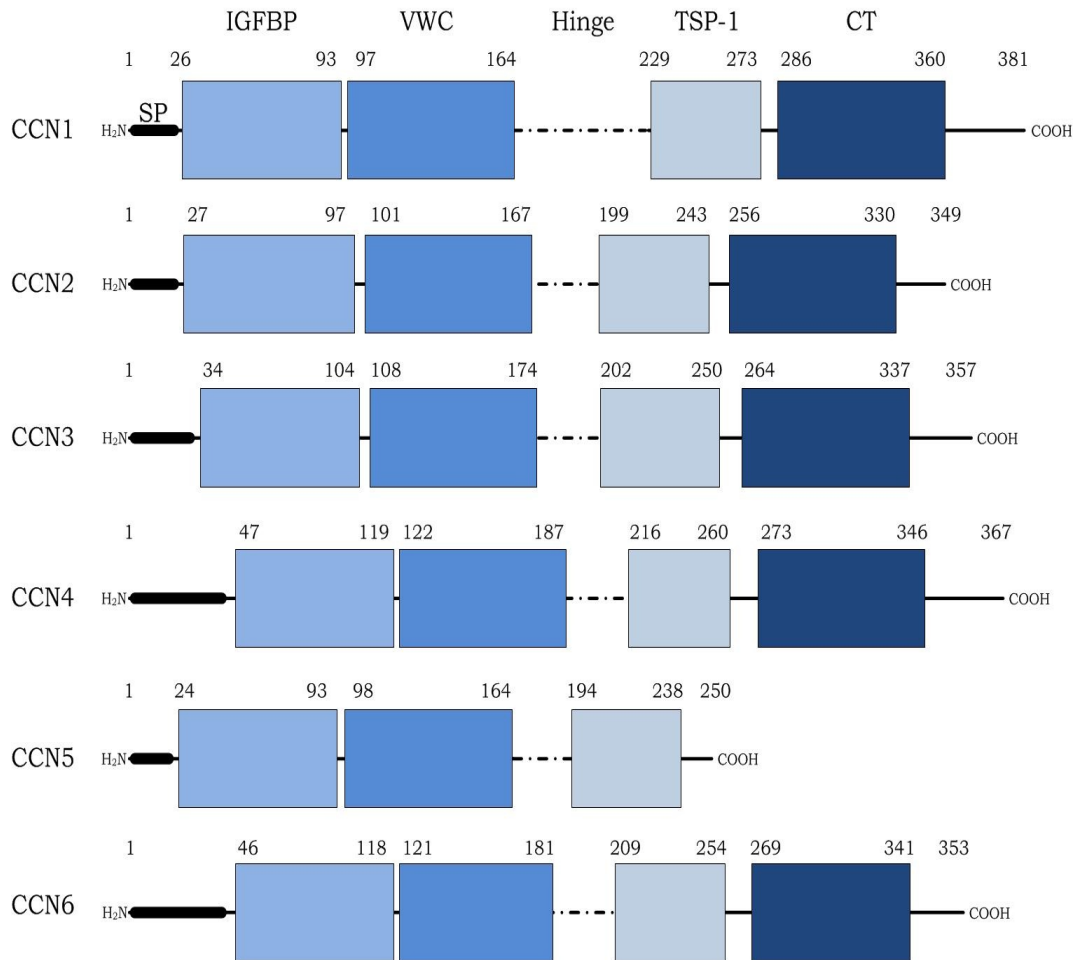


Abbildung 11: **Strukturen der CCN-Familie.**¹⁸⁹

Der Abbildung ist zu entnehmen, dass die unterschiedlichen Vertreter insgesamt sehr ähnlich aufgebaut sind. Die einzelnen Domänen unterscheiden sich meist nur durch wenige Aminosäuren voneinander und besitzen alle eine charakteristische Abfolge von Aminosäuren, wie sie bei den jeweiligen namensgebenden Proteinen zu finden sind. Das Signalpeptid am N-Terminus ist nach der Proteinbiosynthese entscheidend für den Verbleib des Proteins verantwortlich, dies ist im Regelfall die schnelle Sekretion. Es schließen sich die Module „*Insulin-like growth factor binding protein*“ (IGFBP) und Von-Willebrand Faktor Typ C (VWC) an. Dann folgt eine Aminosäuresequenz, die in Länge und Sequenz bei den verschiedenen Vertretern sehr variabel erscheint. An diesem sogenannten „*Hinge*“ greifen bevorzugt Proteinasen an und sorgen für eine schnelle Inaktivierung des Proteins. Die Variabilität in diesem Bereich ist für die Funktion und das Vorkommen des jewei-

ligen Proteins von Bedeutung. Die Thrombospondin Typ 1 (TSP-1) und eine C-terminale (CT) Domäne folgen als weitere Domänen in Richtung C-Terminus. Alle Vertreter sind reich an Cysteinen. Weiterhin findet sich in der CT-Domäne ein Bereich der aufgrund seines Reichtums an aufeinanderfolgenden Cysteinen auch als „*cysteine knot*“ bezeichnet wird. Bei Von-Willebrand Faktor und Thrombospondin-1 handelt es sich außerdem um Glykoproteine, somit ist auch an CCN-Proteinen eine gewisse Glykosylierung nicht ausgeschlossen. CCN5 fehlt die CT-Domäne und ist deshalb ca. 100 Aminosäuren kleiner als die anderen CCN-Mitglieder^{191,192}.

Die unterschiedlichen Domänen lassen die Beteiligung von CCN-Proteinen an verschiedenen Prozessen für die namensgebenden Proteine erahnen. Da die N-terminale Domäne des *insulin-like growth factor binding proteins* große Übereinstimmungen mit der IGFBP-Domäne der CCN hat, wird die CCN-Familie auch in die Superfamilie der IGFBP eingruppiert. CCN-Proteine können darüber hinaus auch tatsächlich IGF binden, wenn auch mit geringer Affinität^{191,193,194}. Von-Willebrand Faktor ist an der Blutgerinnung und Thrombospondin an Plättchenaggregation, Angiogenese und Zelladhäsion beteiligt; wenig überraschend werden diese Funktionen auch von CCN-Proteinen wahrgenommen.

Neben den mannigfachen Interaktionen sind insbesondere die rasche Sekretion und die schnelle Inaktivierung durch Proteinasen elementare Eigenschaften der CCN-Proteine in Bezug auf ihre Wirkung.

Eine ganze Reihe von Untersuchungen wurden zu den CCN-Proteinen durchgeführt. Dabei ist das CCN1 am besten untersucht und ganz besonders seine Beteiligung am Krebsgeschehen. Nachfolgend soll also dieses Mitglied der CCN-Familie weiter fokussiert werden.

2.4.3 Cyr61

Der zuerst beschriebene Vertreter der gesamten Familie war bereits im Jahre 1985 das Cyr61. Fibroblasten der Maus wurden mittels Nährmedium,

bzw. Wachstumsfaktoren wie bFGF, PDGF oder TGF- β stimuliert und die Expression von Proteinen daraufhin untersucht^{195,196}. Man fand ein Protein, welches sehr schnell aktiviert wurde und dessen cDNA den Namen 3CH61 trägt. Später wurde dieses Protein als Cyr61 betitelt und die Bezeichnung „*immediate-early gene*“ geprägt¹⁹⁷.

In dieser Arbeit werden die Begriffe Cyr61 oder CCN1 verwendet, obgleich es eine ganze Reihe von Bezeichnungen für dieses Protein gibt.

Tabelle 2.3: Synonyme für CCN1.

Synonyme	
CCN1	Cyr61, IGFBP-rP4, IGFBP-10, CTGF-2, CEF10

2.4.3.1 Physiologische und pathologische Funktionen

Cyr61 nimmt vielfältige physiologische Funktionen wahr, die sehr stark vom jeweiligen Gewebe abhängig sind. Beispielsweise wird in einigen Geweben durch CCN1 die Integrin-vermittelte Proliferation, Migration und Adhäsion angeregt¹⁹⁸. Auch eine gerichtete Zellbewegung, die Chemotaxis, kann durch Cyr61 als „*Chemoattractant*“ indirekt bewirkt werden^{199,200}. Eine große Rolle wird Cyr61 während der Vaskularisierung in der Embryonalgenese, bei Angiogenese und Wundheilung, aber auch Skelettbildung und Entstehung des neuronalen Systems zuteil^{191,201,202}.

Bei Umgestaltungsprozessen der EZM ist es ebenfalls von Bedeutung. Eine indirekte Wirkung wird über die Cyr61-abhängige Regulierung von angiogenetischen Faktoren wie VEGF, bFGF, aber auch MMPs oder Gewebeinhibitoren der MMPs ausgeübt²⁰³.

In der Wundheilung und bei Entzündungsereignissen wirkt Cyr61 vermittelnd auf die EZM-Bildung durch Fibroblasten oder bei der durch TNF- α induzierten Apoptose^{204,205}.

Die breite Beteiligung an den genannten Prozessen zeigt die Bedeutung des weit verbreiteten, matrizellulären Proteins auf.

Bei den pathologischen Funktionen soll besonders die Wirkungen im Zusammenhang mit malignen Neoplasien fokussiert werden. Die durch Cyr61 bewirkten Effekte im Tumorgewebe sind auch hier stark von der jeweiligen Gewebeart und dem Stadium der Erkrankung abhängig, sodass keine allgemeine Aussage bzgl. Expression und Wirkung getroffen werden kann. Die nachfolgende Tabelle soll einen beispielhaften Überblick geben.

Tabelle 2.4: Wirkungen einer Cyr61 Überexpression bei verschiedenen Tumorentitäten.

Tumorentität/Referenz	Wirkung/Effekt
Prostatakarzinom ²⁰⁶	verstärktes Tumorwachstum, Migrationszunahme, gesteigerte Metastasierung
Mammakarzinom ²⁰⁷	vermehrte Vaskularisierung der Tumore, gesteigerte Zellproliferation, Migrationszunahme, allg. Steigerung der Tumorgenität
Gliom ²⁰⁸	gesteigerte Zellproliferation, Migrationszunahme über ILK
Plattenepithelkarzinom ²⁰⁹	verstärktes Tumorwachstum, Zunahme des Tumorstadium
Pankreaskarzinom ²¹⁰	Bildung peritoneale Metastasen, schlechte Prognose
NSCLC ²¹¹	Verlangsamung der Zellproliferation, weniger Metastasen, bessere Prognose
Endometriumkarzinom ²¹²	Verlangsamung der Zellproliferation, gesteigerte Apoptose

Ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer Cyr61-Überexpression und Stadium des Krebses, Tumorgröße, Lymphknotenbefall und schlechter Überlebensprognose kann also für Krebsarten wie Brustkrebs, Gliom und Plattenepithelkarzinom festgestellt werden^{207,209,213,214}. Eine Cyr61 Expression kann aber auch in verschiedenen Krebsarten zu einer geringeren Tumorgenität und Prognosenverbesserung führen^{211,215}.

Bei einigen Krebsarten gibt es aber auch konträre Erkenntnisse, so konnten bei Gebärmutterkrebs unterschiedliche Gruppen bei einer Überexpression sowohl ein gesteigertes, als auch verlangsamtes Zellwachstum mit

der entsprechend einhergehenden Prognose feststellen^{212,216}. Bei Magenkrebs verhielt es sich ähnlich. Einige Wissenschaftler konnten hier eine verminderte Expression des Cyr61 im fortgeschrittenen Stadium des Krebses feststellen, während bei anderen eine höhere Expression von MMP-7 und der damit trotzdem verstärkten Tumorgenität korreliert. Auf der anderen Seite wurde eine Überexpression mit einer vermehrten Tumorzellinvasion über einen neu beschriebenen HIF-1 α - und PAI-1-Weg beschrieben^{217,218}. Es lässt sich also keine allgemeine Aussage über die Zusammenhänge einer Cyr61-Expression und die resultierenden Wirkungen treffen. Vielmehr ist es von entscheidender Bedeutung den genauen Subtyp der Zellen auf das Ansprechen des CCN1 zu kennen, bzw. weiter zu charakterisieren.

Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die Regulation der CCN1 Genexpression. Auffällig sind Cyr61-vermittelte Effekte insbesondere bei hormonabhängigen Tumoren. Hier konnte ein Zusammenhang zwischen der Existenz von Estrogen-Rezeptoren und CCN1-Expression in unabhängigen Studien festgestellt werden. Dabei bindet Estrogen an seinen Rezeptor und induziert über eine Signalkaskade die Cyr61 Proteinbiosynthese^{207,219}.

Ähnliche Effekte rufen auch Vitamin D3, Cortisol, Dexamethason, die bereits erwähnten Wachstumsfaktoren, HIF-1 α , Zytokine wie IL-1, IL-2, IL-6, aber auch UV-Licht hervor²²⁰.

2.4.3.2 Struktur und potentielle Bindungspartner

Der mosaikartige Aufbau der CCN-Familienmitglieder ist bereits in Kapitel 2.4.2 gezeigt, hier sollen nun am Cyr61-Molekül potentielle Bindungsstellen für andere Moleküle oder Substanzen aufgezeigt werden.

Aufgrund der umfangreichen Beteiligung des Cyr61 an Vorgängen des allgemeinen Zellzyklus', Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten soll hier nur eine Auswahl der Bindungspartner und die jeweilige Bindungsregion im Molekül aufgezeigt werden.

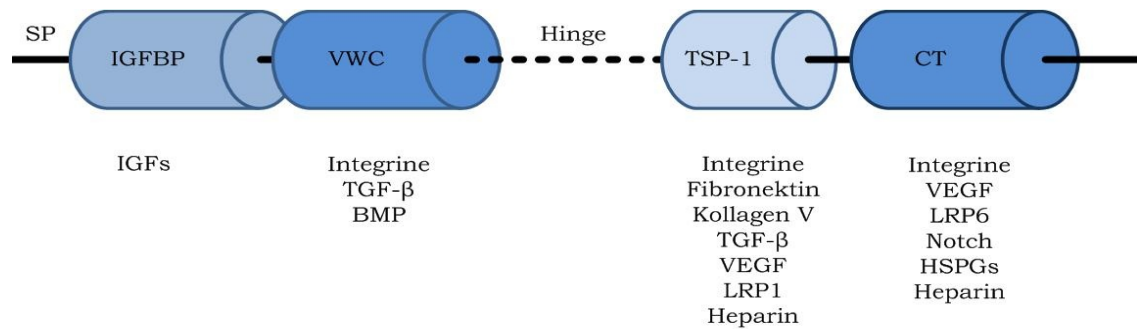


Abbildung 12: **Struktur des Cyr61 und ausgewiesene Bindungsstellen für bekannte Bindungspartner.** Abbildung nach^[255,273]

Die IGFBP-Domäne spielt eine wichtige Rolle in den CCN-Vertretern, zumal sie auch alle als IGFBP eingeordnet werden. Es ist daher nicht verwunderlich, dass in dieser Domäne des Cyr61 auch entsprechend IGF gebunden wird.

Die Von-Willebrand Faktor C-Domäne ist in über 500 EZM-Bestandteilen enthalten²²¹. Es ist ein weit verbreitetes und sehr bekanntes Motiv und findet sich in vielen Molekülen mit den unterschiedlichsten Funktionen wieder, wie z.B. in Prokollagen, Kollagen, dem als Trägerprotein des Hämostasefaktors VIII fungierenden Von-Willebrand-Faktor sowie in Integrinen. Diese Domäne zeigt eine hohe Bindung an andere Strukturen, wodurch scheinbar auch CCN1 seine Wirkungen vermitteln kann.

Ebenfalls weit verbreitet ist das TSP-1 Motiv, welches sich in der gleichnamigen Domäne wiederfindet. Hier binden Proteine wie Fibronektin, Kollagen V, TGF-β, aber auch Heparin und Heparansulfat-Proteoglykane.

Die Haupt-Heparinbindestelle ist allerdings auf der CT-Domäne von Aminosäure 279 bis 315 detektiert worden. Die gesamte CT-Domäne ist ebenfalls in anderen Proteinen, insbesondere EZM-Proteinen vertreten. Auch hier ist es aufgrund der engen strukturellen Verwandtschaft zu anderen EZM-Proteinen eine breite Integrin-Bindefähigkeit nicht verwunderlich. Die gesamte Domäne wird auch als „Cystein-Knoten“ bezeichnet, da sie strukturell sechs Cysteine in Folge aufweist und diese Stelle als Knotenpunkt zur Dimerisierung genutzt wird. In Studien zum matrizellulären Liganden NOV konnte sogar eine Heterodimerisierung beobachtet werden²²².

Cyr61 wird von den Zellen rasch nach der Expression sekretiert, ist aber trotzdem auch nach Stimulation *in vitro* im Nährmedium nicht in größeren Mengen nachzuweisen. Dies kann sowohl auf die baldige Inaktivierung durch Proteinasen zurückgeführt werden, als auch auf die Tatsache, dass es größtenteils an zelloberflächliche Strukturen oder EZM-Bestandteile gebunden wird^{198,223}. Es kann sich seine Heparin-bindende Eigenschaft zunutze machen, um beispielsweise an Heparansulfat-Proteoglykane zu adhären²²⁴. Dabei ist insbesondere Syndekan-4 beteiligt, welches quasi als Rezeptor und Reservoir für extrazelluläres Cyr61 angesehen werden kann^{225,226}.

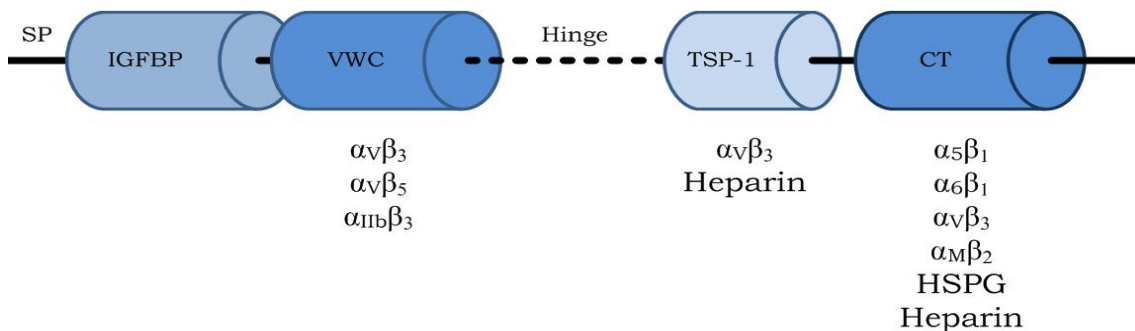


Abbildung 13: **Struktur des Cyr61 mit Bindungsmotiven für ausgewiesene Integri-** ne. Abbildung nach [228,255,270-273].

2.4.4 Cyr61 Signalling

Zunächst wurde angenommen, dass es sich bei Cyr61 um einen Wachstumsfaktor handelt und es auch entsprechend wirkt. Bis heute konnte allerdings kein klassischer Wachstumsfaktor-Rezeptor für Cyr61 entdeckt werden¹³⁹. Neben seinen sonstigen umfangreichen Wirkungen an EZM-Substraten¹⁹⁸ rücken zunehmend Integri-ne als Interaktionspartner des CCN1 in das Interesse der Forschung²²⁷. Im Folgenden soll daher auf das Signalling des Cyr61 in Bezug auf Adhäsion und Migration und die Wechselwirkung mit daran beteiligten zellständigen Molekülen eingegangen werden.

In Fibroblasten vermittelt Cyr61 die Zelladhäsion über die Bindung an HSPG und das Integrin $\alpha_6\beta_1$ ²²⁸. Die Fokale Adhäsion wird aktiviert und Filopodien sowie Lamellipodien ausgebildet²²⁹. Die Zellmigration wird über $\alpha_v\beta_5$ und eine gesteigerte Zellproliferation über $\alpha_v\beta_3$ angeregt²⁰⁴. Abbildung 14 zeigt die entsprechenden intrazellulären Wege. Weiterhin sind aber auch viele andere Signalwege mit den entsprechenden Kinasen wie beispielsweise PI3K/Akt, ERK, ILK, FAK und Src involviert^{208,229,230}.

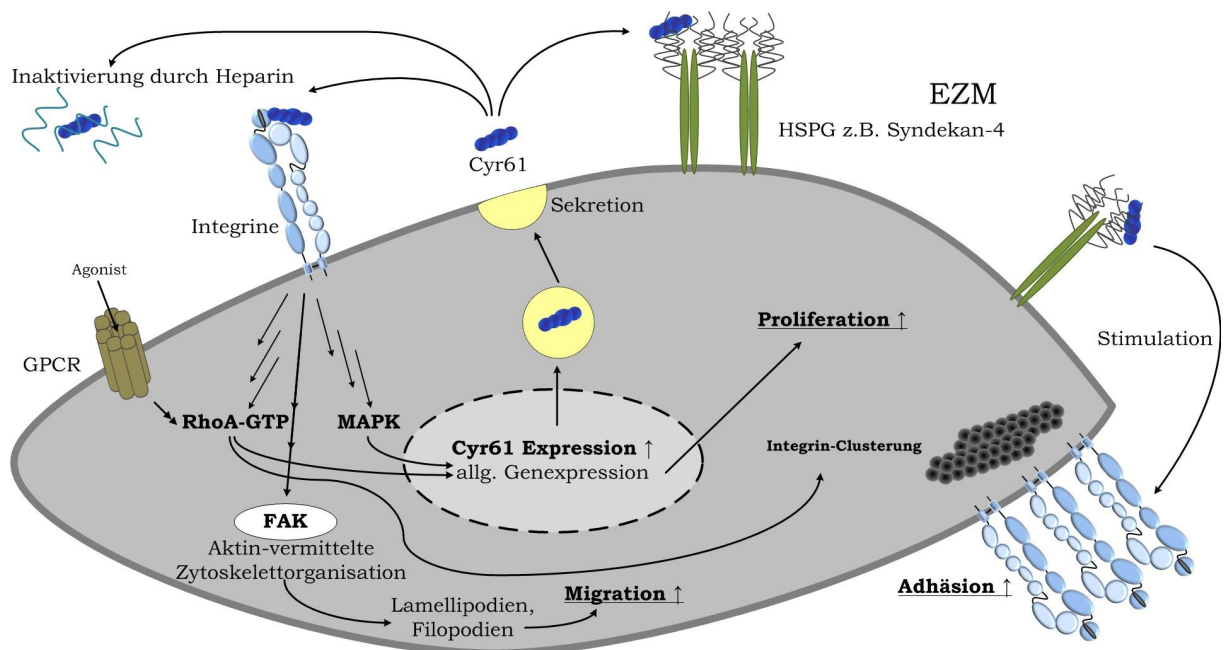


Abbildung 14: **Signalwege des Cyr61**. Abbildung modifiziert nach [250,255].

Neben einer autokrinen Stimulation wurde auch ein parakrines Signalling registriert, so konnte *in vitro* sekretiertes Cyr61 von Brustkrebszellen in kokultivierten Fibroblasten die Sekretion von MMP-1 anregen²³¹. HSPG können dabei als Reservoir für sekretiertes Cyr61 wirken und es zeitverzögert wieder abgeben bzw. mit anderen Molekülen über ihre langen Heparansulfatketten und daran gebundenen Cyr61 wechselwirken²²⁶.

Die Cyr61-Expression kann auch über die Bindung von Liganden wie Thrombin oder Lysophosphatidylsäure (LPA) an ihre entsprechenden G-Protein gekoppelten Rezeptoren und deren Signalling über RhoA-GTP

angeregt werden²³²⁻²³⁴. Der gesamte Vorgang der Cyr61-Expression und der autokrinen Stimulation kann somit noch weiter verstärkt werden.

Auf der anderen Seite kann eine Bindung von sekretiertem Cyr61 an Heparin oder vergleichbare Strukturen der EZM zu einer Inaktivierung seiner Stimulationsleistung führen²²⁰.

In diesem Zusammenhang sind die teilweise überlappenden Signalkaskaden zu dem bereits vorgestellten Integrin-Signalling evident. Wie Cyr61 zu einer Integrin-Affinitätserhöhung beiträgt, ist dabei noch nicht abschließend geklärt. Die intrazellulären Signalwege liefern einen ersten Beitrag dazu. Extrazellulär ist die Bindung von CCN1 an die Integrine noch wenig charakterisiert. Bindungsdomänen zu entsprechenden Integrinen sind zwar auf dem CCN-Molekül beschrieben, aber ob nun eine feste Bindung oder lediglich wenig spezifische Wechselwirkungen zu einer Untereinheit des Integrins die Affinitätssteigerung bewirken, bleibt offen.

Die Tatsache, dass sowohl Integrine durch Heparin in Ausübung ihrer Funktionen beeinträchtigt sind, aber auch Cyr61 über eine Heparinbindestelle verfügt, ermöglicht es die bisherigen Erkenntnisse über die Heparinwirkung an Integrinen neu zu überdenken. Neben einer direkten Wechselwirkung und Beeinflussung des Heparins mit Integrinen, könnte nun über einen indirekten Mechanismus, ebenfalls eine Hemmwirkung auf die Adhäsion beobachtet werden. Dieser Mechanismus könnte eine Inaktivierung des freien Cyr61 durch Heparin bedeuten und damit weniger Stimulation durch Cyr61 an Integrinen hervorrufen.

Wenn diese Mechanismen parallel vorhanden sind, so stellt sich weiterhin die Frage, in wie weit sie durch unterschiedliche Heparine zu beeinflussen sind, bzw. ob jedes kommerzielle Heparin gleichermaßen inhibierend wirken kann.

3 Ziel der Arbeit

Adhäsionsrezeptoren spielen im Prozess der Metastasierung eine entscheidende Rolle, dabei konnte insbesondere dem Integrin VLA-4 ein wesentlicher Beitrag zur Adhäsion von Tumorzellen an das Endothel beigemessen werden. Diese Wechselwirkung ist durch Heparin direkt beeinflussbar.

Cyr61 stellt sich neuesten Erkenntnissen zufolge als stimulierender Faktor von Integrinen dar. In der Literatur sind dazu bereits verschiedene Integrine als Bindungspartner des Cyr61 identifiziert. Eine Wechselwirkung mit VLA-4 ist bisher nicht beschrieben.

Diese Arbeit soll eine potentielle Interaktion des Cyr61 mit VLA-4 erstmalig charakterisieren. Weiterhin soll die direkte Wechselwirkung des VLA-4 mit Heparin weiter analysiert werden.

Cyr61 weist strukturell ebenfalls Heparinbindestellen auf, die nach Bindung von Heparin zur Inaktivierung des Cyr61 führen. Hier liegt eine Beeinflussung der Stimulation von Integrinen über indirekte Mechanismen auf der Hand. Neben der direkten Heparin-vermittelten Inhibition des Integrins VLA-4 soll ebenfalls erstmalig die Heparinwirkung auf Adhäsionsrezeptoren über Cyr61 untersucht werden.

Hier erscheint die Biosensorik und die Einführung eines massesensitiven Biosensors ideal geeignet, um die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen isoliert und dezidiert zu analysieren. Zelluläre Wechselwirkungen können so artifiziell nachgestellt und im Kontext charakterisiert werden. Durch Kombination dieser Untersuchungen mit Adhäsionsversuchen unter Flussbedingungen kann auch mechanistisch eine potentielle Wirkungs-Beziehung analysiert werden.

4 Material und Methoden

4.1 Verwendete Materialien

4.1.1 Geräte

Gerät/Bezeichnung

Absaugvorrichtung, Biochem-VacuuCenter BVC 21
Analysenwaage, Sartorius Basic BA210S
Biosensor, S-sens[®] K5 surface acoustic wave biosensor
Blottingapparatur, Mini-Protean II

CO₂-Inkubator, AutoFlow 5500 Air Jacketed CO₂ Incubator
Durchflussszytometer, FACSCalibur mit BD™ High Troughput Sampler
Einfrierbehältnis, Cryo 1°C Freezing Container

Elektrophorese-Stromgeber, Bio-Rad PowerPac 300
Elektrophoreseapparatur, Mini-Protean[®] Tetra Cell und Mini-Trans Blot Modul
Eppendorf-Mischer, Thermomixer Comfort
Fluoreszenzmikroskop, invers Axiovert 200
Geldokumentationssystem, ChemiDoc™ XRS+ System
Horizontalschüttler, Kompaktschüttler KS-15B
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop, Nikon Eclipse Ti
Kraftaufnehmer und Steuerung der Langmuir-Filmwaage
Labormikroskop, invers; Wilovert 30

Langmuir-Filmwaage

Hersteller

Vacuubrand GmbH & Co., Wertheim, Deutschland
Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
SAW Instruments GmbH, Bonn, Deutschland
Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
NuAire, Inc., Plymouth, MN, USA

BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

Nalge Nunc International, Hereford, Großbritannien
Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland
Nikon Corporation, Tokyo, Japan

Riegler & Kirstein GmbH, Potsdam, Deutschland
Helmut Hund GmbH, Wetzlar, Deutschland
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle/Saale, Deutschland

Gerät/Bezeichnung

Magnetrührer, IKAMAG[®] RCT basic

Mehrfachdispenser, Handystep[®] electronic

Mehrkanalpipette, Transferpette[®] S-12

Mikroliter-Pipette Research[®] (variabel),
0,5-10 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL

Mikroliter-Pipette Transferpette[®] S,
2-20 µL, 20-200 µL, 500-5000 µL

Mikroliterzentrifuge, 5415R

Multiwell-Platten Zentrifuge,
AllegraTM 25R Zentrifuge

PH-Meter, SevenEasy[®]

Pipettierhelfer, Accu-Jet[®]

Schüttelinkubator, Modell 4520

Sicherheitswerkbank, Holten Safe 2010

Trockenschrank

Ultraschallbad, Bandelin Sonorex RK 102 H

UV-VIS-Photometer, UltrospecTM 2100 pro

UV/Visible Spectrophotometer

Videokamera, CSC-795 (PAL)

Vortexer, MS 2 Minishaker

Wasseraufbereitungsanlage, Millipore Elix

Zellinkubator, DH Autoflow, CO₂ Air-Jacketed

Zellzählgerät, Casy[®] 1 Modell TT Cell Counter

Zentrifuge, Universal 320R

Hersteller

IKA[®]-Labortechnik GmbH & Co. KG,
Karlsruhe, Deutschland

Brand GmbH & Co. KG, Wertheim,
Deutschland

Brand GmbH & Co. KG, Wertheim,
Deutschland

Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Brand GmbH & Co. KG, Wertheim,
Deutschland

Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Beckman Coulter GmbH, Krefeld,
Deutschland

Mettler-Toledo GmbH, Giessen, Deutsch-
land

Brand GmbH & Co. KG, Wertheim,
Deutschland

Forma Scientific Inc., Marietta, OH, USA

Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham,
MA, USA

Heraeus, Hanau, Deutschland

Bandelin electronic, Berlin, Deutschland

Amersham Bioscience Europe GmbH,
Freiburg, Deutschland

Pacific Corporation, Tokio, Japan

IKA-Labortechnik GmbH & Co. KG,
Lauda-Königshofen, Deutschland

Millipore Corporation, Billerica, MA, USA

NuAire, Inc, Plymouth, MA, USA

Schärfe System GmbH, Reutlingen,
Deutschland

Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tutt-
lingen, Deutschland

4.1.2 Verbrauchsmaterialien**Verbrauchsmaterialien/Bezeichnung**

6-, 24-Loch-Platte für die Zellkultur, Cellstar[®]

Zellkultur Multiwell Platten

96-Loch-Platte transparent mit V-Boden,
unsteril; Kat.-Nr. 651 101

Blottingpads, Mini Trans-Blot[®] Blotting Pads

Cellulose-Blottingpapier; 70 x 100 mm,
Item No 10427806

Deckgläser; rund, Ø 18 mm, Stärke 1

Deckgläser; eckig, 18 x 18 mm, Stärke 1

Hersteller

Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen,
Deutschland

Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen,
Deutschland

Bio-Rad Laboratories GmbH, München,
Deutschland

Whatman Inc., Sanford, ME, USA

Marienfild GmbH & Co. KG, Lauda-
Königshofen, Deutschland

Marienfild GmbH & Co. KG, Lauda-
Königshofen, Deutschland

Verbrauchsmaterialien/Bezeichnung

Deckgläser; rund, Ø 18 mm, Stärke 3

Dichtscheibe; G8-Sil/rot-weiß

Dispensierspitzen 2,5 mL bzw. 12,5 mL;
Plastibrand® PD-Tips

Duranglasflasche; komplett mit Deckel G45
und Ausgießrand, verschiedene Volumina

Einmalpipette; 10 mL bzw. 25 mL, steril

Einmalspritze; Injekt 10 mL

Feder; S15

Flasche; G1, klar

Glasperlen; Ø 1 mm

Halbmikro-Küvette; PMMA

Hamiltonspritze

Impföse; I 612-9355

Kryoröhrchen; Nunc CryoTubes™
Kat.-Nr. 377224

Kulturflasche; Cellstar® Filter Top, 25 cm²,
75 cm², 175 cm²

Mikroeinsatz; G30

Mini Protean® TGX™ Fertiggele;
10 % Resolving Gel bzw. 4-15 % Resolving Gel
Objektträger; geschnitten, mit Mattrand

Pasteurpipette; 145 mm bzw. 225 mm aus Glas

Petrischale; 90 x 14 mm

pH-Papier

Pipettenspitze; TipOne® Tips 10 µL, 200 µL,
1000 µL

Pipettenspitze 5 mL

Plastibrand® Universalspitze

Plasmid-Aufreinigungskit;
GenElute™ HP Plasmid Maxiprep Kit

Polycarbonatfilter, Porengröße 100 µm;
Isopore® Membranfilter VCTP 02500

PP-Röhrchen 15 mL bzw. 50 mL

PVDF-Membran; Roti® PVDF,
Porengröße 0,45 µm

Quarz-Biosensoren; S-sens® K5 Quarzsensoren

Reaktionsgefäß 0,5 mL, 1,5 mL, 2,0 mL

Hersteller

Labor- und Medizintechnik Dr. J. Rost,
Leipzig, Deutschland

CS-Chromatographie Service GmbH,
Langerwehe, Deutschland

Brand GmbH & Co. KG, Wertheim,
Deutschland

Schott AG, Mainz, Deutschland

Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutsch-
land

B. Braun Melsungen AG, Melsungen,
Deutschland

CS-Chromatographie Service GmbH,
Langerwehe, Deutschland

CS-Chromatographie Service GmbH,
Langerwehe, Deutschland

Sartorius GmbH, Göttingen, Deutsch-
land

Brand GmbH & Co. KG, Wertheim,
Deutschland

Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz,
Schweiz

VWR International GmbH, Darmstadt,
Deutschland

Nalge Nunc International, Hereford,
Großbritannien

Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen,
Deutschland

CS-Chromatographie Service GmbH,
Langerwehe, Deutschland

Bio-Rad Laboratories GmbH, München,
Deutschland

Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe,
Deutschland

Brand GmbH & Co. KG, Wertheim,
Deutschland

VWR International GmbH, Darmstadt,
Deutschland

Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Starlab GmbH, Ahrensburg, Deutschland

Brand GmbH & Co. KG, Wertheim,
Deutschland

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Tauf-
kirchen, Deutschland

Millipore Corporation, Billerica, MA, USA

Nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe,
Deutschland

Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe,
Deutschland

SAW Instruments GmbH, Bonn,
Deutschland

Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutsch-
land

Verbrauchsmaterialien/Bezeichnung

Schraubkappe; G8-L

Sterilfilter; FP 30/0,2 CA-S
Ultra-Mikro-Küvette aus Quarzglas;
Hellma Präzisionsküvette 105.020-QS 10 mm
Zellschaber, steril

Zellzählgefäß; CASY® Cups

HerstellerCS-Chromatographie Service GmbH,
Langerwehe, Deutschland
Whatman GmbH, Dassel, Deutschland
Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim,
Deutschland
Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen,
Deutschland
Schärfe System GmbH, Reutlingen,
Deutschland**4.1.3 Chemikalien****Chemikalie**

11-Mercaptoundecansäure

Amidoschwarz

Ammoniaklösung 26%
Ammoniumpersulfat

Ampicillin-Natriumsalz

Bacillol AF
Bovines Serumalbumin, Fraktion V $\geq 96\%$

BSA-StammLösung

Calciumchlorid-Dihydrat
CASY®ton-LösungChloroform
D-(+)-Trehalose-dihydrat

DAPI

di-Natriumhydrogenphosphat
Dimethylsulfoxid
EDTA-Lösung (0,02%) E8008

Essigsäure >99,5%

Ethanol 96%ig (V/V), technisch, vergällt mit PE

Ethanol, absolut

FACS clean™, flow™, rinse™
Fluoromount™ Aqueous Mounting MediumFormaldehyd Lösung 37%
Fötale Kälberserum E7524

Fugene® 6

HerstellerSigma-Aldrich Chemie GmbH, Tauf-
kirchen, Deutschland
AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutsch-
land
Riedel-de Haen, Seetze, Deutschland
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Tauf-
kirchen, Deutschland
AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutsch-
land
Bode Chemie, Hamburg, Deutschland
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Tauf-
kirchen, Deutschland
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Tauf-
kirchen, Deutschland
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Schärfe System GmbH, Reutlingen,
Deutschland
Riedel-de Haen, Seetze, Deutschland
VWR BDH Prolabo International, Darm-
stadt, Deutschland
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Tauf-
kirchen, Deutschland
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
ACROS Organics, Geel, Belgien
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Tauf-
kirchen, Deutschland
Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen,
Deutschland
Hofmann Chemie Import-Export GmbH,
Hamburg, Deutschland
Malinckrodt Baker BV, Deventer, Nieder-
lande
BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Tauf-
kirchen, Deutschland
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Tauf-
kirchen, Deutschland
Roche Diagnostics GmbH, Mannheim,
Deutschland

Chemikalie

Glucose-Monohydrat
 GlutaMAX™-I 100x (L-Alanyl-L-Glutamin)
 Glycerol (wasserfrei)
 Glycin
 Heparin-Agarose
 HEPES Puffer, 1M
 Immersionsöl, fluoreszenzfrei
 Isopropanol
 Kaliumchlorid
 Kaliumhydrogenphosphat
 Lysotracker® Red DND-99
 Magnesiumchlorid-Hexahydrat
 Mangan(II)-chlorid-Dihydrat
 Melsept SF
 Methanol
 N-Hydroxysuccinimid
 Natriumacetat-Lösung 3M, pH 5,2
 Natriumazid
 Natriumchlorid
 Natriumdodecasulfat (SDS)
 Natriumhydroxid
 Penicillin-Streptomycin-Lösung P0781
 PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid)
 Precision Plus Protein™WesternC™Standard
 Proteaseinhibitor-Cocktail
 Puromycin-dihydrochlorid
 RPMI 1640 Nährmedium
 RPMI-1640-Medium R8785
 Salzsäure 37%
 Schwefelsäure 95%ig-97%ig
 Standardpuffer pH 4,01, pH 7,00, pH 9,21
 Stickstoff
 Trichloressigsäure

Hersteller

Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
 Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
 AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
 AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
 AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
 Riedel-de Haen, Seetze, Deutschland
 Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
 Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
 Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
 Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
 Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
 B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
 Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
 AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
 ACROS Organics, Geel, Belgien
 Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
 AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
 ACROS Organics, Geel, Belgien
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
 AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
 Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
 AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
 PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
 Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
 Mettler-Toledo GmbH, Giessen, Deutschland
 Praxair GmbH, Bonn, Deutschland
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

Chemikalie

Tris

Trypsin/EDTA-Lösung, 0,05/0,02% in PBS (m/V)

Tween® 20

Wasserstoffperoxid 30%ig

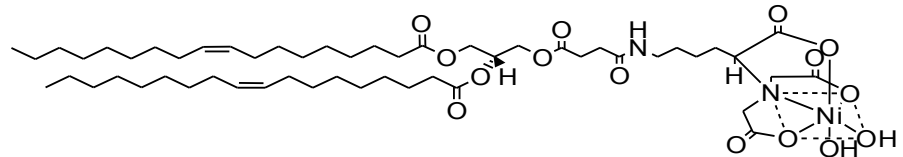
Hersteller

AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

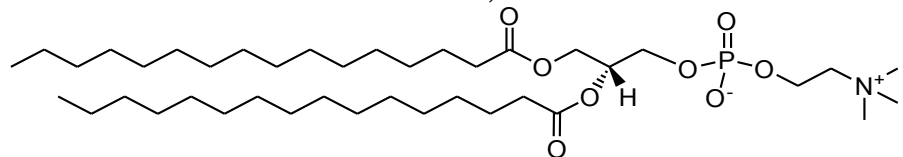
PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland

AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

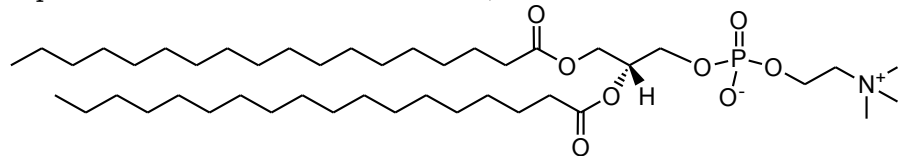
Fluka, Neu-Ulm, Deutschland

4.1.3.1 Lipide**Abkürzung**DOGS-NTA
(Ni²⁺)**Bezeichnung**1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-
[[N-(5-amino-1-carboxypentyl)
iminodiessigsäure)succinyl] Nickel-
Salz**Hersteller und Struktur**Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster,
AL, USA

DPPC

1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phos-
phocholineAvanti Polar Lipids Inc., Alabaster,
AL, USA

DSPC

1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phos-
phocholineAvanti Polar Lipids Inc., Alabaster,
AL, USA**4.1.4 Antikörper****Primärantikörper**

anti-human Cyr61/CCN1,

Monoclonal Mouse IgG1

anti-human Cyr61/CCN1,

Monoclonal Mouse IgG1 (A-10)

anti-human Integrin β3/CD61

Monoclonal Mouse IgG2A, Klon 256809

anti-human Integrin α₁/CD49a,

Polyclonal Sheep IgG

anti-human Integrin α₅/CD49e,

Monoclonal Mouse IgG1, Klon 238307

HerstellerR&D Systems GmbH, Wiesbaden-
Nordenstadt, DeutschlandSantaCruz Biotechnology Inc.,
Santa Cruz, CA, USAR&D Systems GmbH, Wiesbaden-
Nordenstadt, DeutschlandR&D Systems GmbH, Wiesbaden-
Nordenstadt, DeutschlandR&D Systems GmbH, Wiesbaden-
Nordenstadt, Deutschland

Primärantikörper

anti-human Integrin α_v /CD51 subunit ectodomain,
Monoclonal Mouse IgG1, Klon P2W7
anti-human N-Terminus des organic cation transporters 1, OCT1 (N-12),
Polyclonal Goat
anti-human Syndecan-4,
Monoclonal Mouse IgG2A (5G9)
anti-human Syndecan-4,
Polyclonal Goat IgG
anti-human Zytoplasmadomäne des trans-golgi network proteins 2, TGN38 (C-15),
Polyclonal Goat
anti-human β -Actin,
Monoclonal Mouse IgG1 (4E8H3)
Tysabri® anti-human Integrin α_4 /CD49d (Natalizumab, human)
anti-human VCAM-1,
Monoclonal Mouse IgG1

Hersteller

R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland

SantaCruz Biotechnology Inc.,
Santa Cruz, CA, USA

SantaCruz Biotechnology Inc.,
Santa Cruz, CA, USA
R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
SantaCruz Biotechnology Inc.,
Santa Cruz, CA, USA

SantaCruz Biotechnology Inc.,
Santa Cruz, CA, USA
Elan Pharma International Ltd.,
Monksland, Irland
R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland

Sekundärantikörper

anti-goat IgG-HRP, polyclonal Donkey IgG
Konjugat: Peroxidase
anti-goat IgG-NL557, NorthernLights™
Donkey (H+L)
Absorption Maximum: 557 nm
Emission Maximum: 574 nm
anti-human IgG-FITC, Goat Fc
Absorption Maximum: 485 nm
Emission Maximum: 514 nm
anti-mouse IgG-CFS, Polyclonal Goat F(ab')₂
Absorption Maximum: 490 nm
Emission Maximum: 520 nm
anti-mouse IgG-HRP, H+L, chain specific, Goat Fc
Konjugat: Peroxidase
anti-sheep IgG-NL493, NorthernLights™ Donkey (H+L)
Absorption Maximum: 493 nm
Emission Maximum: 514 nm

Hersteller

R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland

Calbiochem® by Merck4Biosciences,
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland

4.1.5 Proteine und Testsubstanzen

Bezeichnung

Arixtra® 2,5 mg/0,5 mL, Fondaparinux

Clexane® 60 mg = 6000 I.E./0,6 mL, Enoxaparin-Natrium

Hersteller

GlaxoSmithKline GmbH & Co. KG,
München, Deutschland
SanofiAventis Deutschland GmbH,
Frankfurt am Main, Deutschland

Bezeichnung

Kollagen, Typ I

Fibronektin

Heparin-Natrium-25000-ratiopharm® 25000 I.E./5 mL, Heparin-Natrium (Schweine-darm-Mucosa)

Innohep® 20000 Anti-Xa I.E./mL, Tinzaparin-Natrium

Modifizierte Tinzaparin Fraktionen (2-O-Desulfatierung, 6-O-Desulfatierung, N-Acetylierung, Glykol-Split-Oxidation)

rhCyr61 als Fc-Chimäre (isoliert aus einer Baculovirus transfizierten Insektenzelllinie) sowie rhCyr61 Modul I-III als Fc-Chimäre und Fc-Chimäre²³⁵

rhSyndekan-4 Histag

VCAM-1 Fc-Chimäre (rekombinant, human)

Hersteller

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland

ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland

Leo Pharmaceutical Products Ltd., Neu-Isenburg, Deutschland

Dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt durch AG von Herrn Prof Dr. B. Casu, „G.Ronzoni“ Institute, Milano, Italien

Dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt durch AG von Herrn Prof Dr. N. Schütze, Orthopädisches Zentrum für Muskuloskeletale Forschung, Universität Würzburg, Deutschland

R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland

R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland

4.1.6 Nukleinsäuren

Bezeichnung	Insert	Vektor	Produkt und Hersteller
GFP	eGFP	pcDNA3	
	zur Verfügung gestellt durch AG Kassack, Institut für Pharmazeutische Chemie, Universität Düsseldorf, Deutschland		
Cyr61-shRNA Klon 1	CCGGCCCTTCTACAGG- CTGTTCAATCTCGAGAT- TGAACAGCCTGTAGAA- GGGTTTTTG	pLKO.1-puro	Mission® shRNA
	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland		
Cyr61-shRNA Klon 2	CCGGCGAACCAGTCAG- GTTTACTTACTCGAGTA- AGTAAACCTGACTGGT- TCGTTTTTG	pLKO.1-puro	Mission® shRNA
	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland		
Cyr61-shRNA Klon 3	CCGGGCAAACAGAAAT- CAGGTGTTTCTCGAGA- AACACCTGATTTCTGTT- TGCTTTTTG	pLKO.1-puro	Mission® shRNA
	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland		
Cyr61-shRNA Klon 4	CCGGCGCATCCTATAC- AACCCTTACTCGAGTA- AAGGGTTGTATAGGAT- GCGTTTTTG	pLKO.1-puro	Mission® shRNA
	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland		

Bezeichnung	Insert	Vektor	Produkt und Hersteller
Cyr61-shRNA Klon 5	CCGGCCGAACCAGTC- AGGTTTACTTCTCGAGA- AGTAAACCTGACTGGT- TCGGTTTTTG Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	pLKO.1-puro	Mission® shRNA
Syndecan-4-shRNA Klon 1	CCGGCCTGATCCTACT- GCTCATGTACTCGAGT- ACATGAGCAGTAGGAT- CAGGTTTTTG Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	pLKO.1-puro	Mission® shRNA
Syndecan-4-shRNA Klon 2	CCGGCCCGTTGAAGAG- AGTGAGGATCTCGAGA- TCCTCACTCTCTCAAC- GGGTTTTTG Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	pLKO.1-puro	Mission® shRNA
Syndecan-4-shRNA Klon 3	CCGGCCTGATCCTACT- GCTCATGTACTCGAGT- ACATGAGCAGTAGGAT- CAGGTTTTTG Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	pLKO.1-puro	Mission® shRNA
Syndecan-4-shRNA Klon 4	CCGGGCCAGGTTCTTC- TTGAGCTTCTCGAGA- AAGCTCAAGAAGAACC- TGGCTTTTTG Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	pLKO.1-puro	Mission® shRNA
Syndecan-4-shRNA Klon 5	CCGGGCTATGACCTGG- GCAAGAAACCTCGAGG- TTTCTTGCCCAGGTCA- TAGCTTTTTG Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	pLKO.1-puro	Mission® shRNA
nonTarget-shRNA Klon	CCGGCAACAAGATGA- AGAGCACCAACTCG- AGTTGGTGCTCTTCAT- CTTGTTGTTTTT Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	pLKO.1-puro	Mission® Non-Target shRNA Control Vector (SHC002)

4.1.7 Herstellung von Stammlösungen und Puffern

Amidoschwarz-Elutionslösung

125 µL	EDTA-Na pH 8,0
0,5 g	Natriumhydroxid
ad 500 mL	50 % (V/V) Ethanol

Amidoschwarz-Entfärbelösung

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

Amidoschwarz-Färbelösung

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

Bromphenolblau-Lösung

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

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

Coomassieblau-Färbelösung

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

Die Coomassieblau-Färbelösung wird in einer lichtgeschützten Duranglasflasche bei RT gelagert.

Einfriermedium zur Kryokonservierung

2 mL DMSO
 ad 20 mL FKSⁱ nicht i.a.

Das Einfriermedium wird kurz zuvor in der jeweiligen Menge, die benötigt wird um je eine Mio. Zellen/mL Einfriermedium pro Kryo-Röhrchen zu konservieren, frisch hergestellt.

i Fötales Kälberserum, nicht Hitze-inaktiviert

4 Material und Methoden

Elektrophoresepuffer-Stammlösung 10-fach

144 g Glycin

30 g Tris

10 g SDS

ad 1000 mL Aqua dem.

Die Elektrophoresepuffer-Stammlösung wurde bis zur weiteren Verwendung in einer 1000 mL Duranglasflasche bei 4-8°C gelagert. Zur Elektrophorese wird diese Stammlösung 1:10 in Aqua dem. verdünnt.

Entwicklungslösung für Silberfärbung

3 g Natriumcarbonat

150 µL Formaldehyd-Lösung 37%

ad 150 mL Aqua dem.

Diese Lösung wird unmittelbar vor Verwendung hergestellt.

Fixierlösung für Silberfärbung

200 mL Ethanol absolut

40 mL Eisessig

200 mL Aqua dem.

Die so hergestellte Lösung kann in einer Duranglasflasche für mehrere Monate aufbewahrt werden.

LB-Flüssigmedium (nach Luria/Miller) pH 7,0

25 g LB-Medium

ad 1 L Aqua dem.

Das Medium wird umgehend nach Herstellung auf zwei Schott-Flaschen aufgeteilt, im Autoklaven sterilisiert und anschließend vor Licht geschützt aufbewahrt. Unmittelbar vor Verwendung des Mediums wird Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/mL als Selektionsmarker zugesetzt.

Mn²⁺-Lösung 0,1 M

1,62 g MnCl₂ x 2H₂O

ad 100 mL Aqua dem.

Phosphatgepufferte-Salzlösung (PBSⁱ)-20fach-Konzentrat

4 g Natriumchlorid

0,1 g Kaliumchlorid

0,9 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat

i PBS = engl.: phosphate buffered saline

Phosphatgepufferte-Salzlösung (PBS)-20fach-Konzentrat

0,12 g Kaliumdihydrogenphosphat
ad 500 mL Aqua dem.

Das Pufferkonzentrat wird bei 4-8°C gelagert.

Phosphatgepufferte-Salzlösung (PBS)-gebrauchsfertige-Lösung

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

Dieser Puffer wird als Laufpuffer in SAW-Experimenten zuvor durch Anlegen eines Vakuums für 30 min entgast. Die Lagerung erfolgt bei 4-8°C.

Phosphatpuffer nach Sørensen

pH 7,4

Lösung A:

9,078 g Kaliumdihydrogenphosphat
ad 1000 mL Aqua dem.

Lösung B:

11,876 g Dinatriumhydrogenphosphat x 2H₂O
ad 1000 mL Aqua dem.

Zur Herstellung des Phosphatpuffers mit dem entsprechenden pH werden die Lösungen A und B gemäß einer Vorgabe miteinander gemischt. Für den hier verwendeten pH von 7,4 werden 81,8 mL der Lösung B mit Lösung A ad 100 mL aufgefüllt. Der resultierende pH von 7,4 wird anschließend am pH-Meter kontrolliert.

Primärantikörperlösung für Western-Blot

10 mg Natriumazid
500 mg BSA
10 µg Primärantikörper (hier bspw. antiCyr61)
10 mL TBS-Tⁱ

Das enthaltene Natriumazid schützt vor mikrobiologischer Kontamination, die fertige Lösung kann somit für mehrere Monate bei 4°C aufbewahrt und verwendet werden. Die verwendeten Primärantikörper werden nach Herstellerangaben in konkreter Konzentration oder Verdünnung zugesetzt.

Probenauftragspuffer (PAP)

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

ⁱ engl.: Tris buffered saline with Tween20

4 Material und Methoden

Der Probenaufragpuffer wird in einem 15 mL PP-Röhrchen hergestellt, aliquotiert und in 1,5 mL PP-Reaktionsgefäßen bei -20°C gelagert.

TBSⁱ-StammLösung pH 7,3 bei RT

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

Die pH-Wert Einstellung erfolgt mit HCl 1M. Die fertige Lösung wird in einer Duranglasflasche bei 4-8°C gelagert.

TBST-Lösung

80 mL TBS-StammLösung
1,6 mL Tween20
720 mL Aqua dem.

TBST-Blocking-Lösung

5 g Magermilchpulver
ad 100 mL TBST-Lösung

Die TBST-Blockierungs-Lösung wird am Versuchstag frisch hergestellt. Bis zum vollständigen Lösen des Milchpulvers in ungefähr 70 mL Lösung muss ca. 20 min intensiv gerührt werden, erst dann wird ad 100 mL aufgefüllt.

Transferpuffer pH 8,2-8,4 bei RT

28,80 g Glycin
6,06 g Tris
ad 2000 mL Aqua dem.

Der Transferpuffer wird am Versuchstag vor der Durchführung des Western-Blots hergestellt. Nach dem Lösen der Substanzen sollte der pH im Bereich von 8,2-8,4 liegen. Die Lösung wird dann bis zur Verwendung bei 4-8°C gelagert.

Trichloressigsäure (TCA)-Lösung 100 % (m/V) in Wasser

100 g TCA
ad 100 mL Aqua dem.

Die Lagerung erfolgt in 100 mL Medizinalgläsern bei 4-8°C.

Tris-HCl-Lösung pH 7,5 10 mM

121 mg Tris
ad 100 mL Aqua dem.

Die pH-Wert Einstellung erfolgt mit HCl 1M. Die fertige Lösung wird in einer Duranglasflasche bei 4-8°C gelagert.

i engl.: Tris buffered saline

Tris-HCl 10 mM mit NaCl 1,5 M Lösung		pH 7,5
121 mg	Tris	
8,76 g	Natriumchlorid	
ad 100mL	Aqua dem.	
Die pH-Wert Einstellung erfolgt mit HCl 1M. Die fertige Lösung wird in einer Duranglasflasche bei 4-8°C gelagert.		
Tris-SDS-Lösung		pH 7,5 bei RT
12,1 g	Tris	
2 g	Natriumdodecylsulfat (SDS)	
ad 100 mL	Aqua dem.	
Die Lagerung der Tris-SDS-Lösung erfolgt bei RT in einem 100 mL Medizinalgas.		
Waschpuffer für die Durchflusszytometrie		0,5 %ig
500 mg	BSA	
ad 100 mL	PBS - gebrauchsfertige Lösung	
Der Waschpuffer wird vor Verwendung sterilfiltriert um etwaige Schwebeteilchen zu entfernen, die ein Verstopfen der feinen Kapillare des FACS verursachen könnten.		
Zellextraktions-Puffer (Lysepuffer)		von Invitrogen™
10 mM	Tris	pH 7,4
100 mM	Natriumchlorid	
1 mM	EDTA	
1 mM	EGTA	
1 mM	Natriumfluorid	
20 mM	Tetranatriumdiphosphat	
2 mM	Natriumorthovanadat	
1 %	Triton X-100	
10 %	Glycerol	
0,1 %	SDS	
0,5 %	Deoxycholat	
Der Zellextraktions-Puffer wird unmittelbar vor Verwendung noch durch Zusatz eines Proteaseinhibitor-Cocktails und PMSF fertig gestellt.		

4.1.8 Software

Zur Durchführung der Versuche wurden folgende Programme verwendet:

- CellQuest™ Pro Version 5.2.1 (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland)
- BD™ Plate Manager Version 1.0.1 (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland)
- Biosens K12 (SAW Instruments GmbH, Bonn, Deutschland)
- Sequence Master 6 (SAW Instruments GmbH, Bonn, Deutschland)

Zur Auswertung und graphischen Darstellung der Versuchsergebnisse kamen folgende Programme zum Einsatz:

- Microsoft Excel 2010 für Windows (Microsoft Corporation, Redmount, WA, USA)
- GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA)
- WinMDI 2.8 (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA)
- NIS-Elements (Nikon Instruments Inc., Kawasaki (Kanagawa), Japan)
- Imagoquant MultiTrack-AVI-2 (Mediquant GmbH, Lützen, Deutschland)
- Origin™ 7.5 (Additive, Friedrichsdorf, Deutschland)
- FitMaster (SAW Instruments GmbH, Bonn, Deutschland)

Schematische Zeichnungen und Abbildungen wurden mit den folgenden Programmen erstellt:

- Microsoft Powerpoint 2010 für Windows (Microsoft Corporation, Redmount, WA, USA)
- Microsoft Visio 2010 für Windows (Microsoft Corporation, Redmount, WA, USA)
- Adobe® Photoshop® (Adobe Sytems GmbH, München, Deutschland)

Chemische Formeln wurden mit ChemDraw® Pro 12 (PerkinElmer Informatics Inc., Waltham, MA, USA) gezeichnet und erstellt.

Die Dissertationsschrift wurde mit StarOffice Writer 9 (Sun Microsystems, Santa Clara, CA, USA) verfasst.

4.1.9 Statistik

Die Werte dieser Arbeit repräsentieren Mittelwerte aus (soweit nicht anders angegeben) mindestens drei identischen Experimenten \pm Standardabweichung. Signifikante Unterschiede wurden mithilfe des ungepaarten

Studentischen t-Tests ermittelt. Das Signifikanzniveau ist der jeweiligen Darstellung zu entnehmen, wobei gilt: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.2 Arbeiten mit adhärent wachsenden Zellen

Die verwendete Zelllinie mit der Bezeichnung „MV3“ wurde dankenswerter Weise von Herrn Dr. Reiner Zeisig, MDC (Max-Delbrück-Centrum für molekulare Medizin), Berlin zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um eine humane Melanomzelllinie, welche auf ihrer Zelloberfläche das Protein VLA-4 in hohem Maße konstitutiv exprimiert⁹².

Ausgehend von einem malignen Melanom eines 76jährigen Krebspatienten wurden Zellfragmente einer frischen Melanommetastase Nacktmäusen subcutan (s.c.) injiziert. Nach drei Passagen war die MV3-Zelllinie etabliert. Innerhalb der Mäuse zeigt sie hohes metastatisches Potential. Nach i.v.-Injektion von $2 \cdot 10^6$ MV3-Zellen entwickelten sich bei 95 % der Nacktmäuse (n=20) innerhalb von 6 Wochen Lungenkolonien. Nach s.c.-Injektion von $2 \cdot 10^6$ MV3-Zellen konnte innerhalb von 7 Wochen bei 95 % der Nacktmäuse (n=20) ein Tumorwachstum festgestellt werden. Desweiteren entwickelten sich bei 90 % der erkrankten Tiere spontane Lungenmetastasen. Histologische und immunhistologische Befunde zwischen diesen, dem Original-Tumor des Krebspatienten und der Zelllinie *in vitro* zeigen Übereinstimmungen²³⁶.

Bei Zellen der Bezeichnung „PC-3“ handelt es sich um humane epitheliale Prostatakarzinomzellen (ATCC® CRL-1435™). Diese Zelllinie wurde aus der Knochenmetastase eines Grad IV Prostataadenokarzinoms entwickelt, welches bei einem 62 Jahre alten Kaukasier diagnostiziert worden war²³⁷. Diese Zelllinie wurde uns dankenswerter Weise von Herrn Prof. Dr. Roman Blaheta (Forschungslabor, Urologie und Kinderurologie, Klinikum Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt) zur Verfügung gestellt. Im Gegensatz zur Melanomzelllinie MV3 zeichnet sich diese Zelllinie durch eine geringe Expression der Integrinuntereinheit α_4 aus.

In den durchgeführten Experimenten wurden diese beiden Zelllinien verwendet und miteinander verglichen. Weiterhin wurden aus diesen Zellen durch Transfektion mit shRNA-Plasmiden ebenfalls Klone geschaffen. Diese unterscheiden sich vom jeweiligen Wildtyp durch eine verminderte Cyr61 Expression oder eine reduzierte Expression des membranständigen Proteoglykans Syndekan-4.

4.2.1 Kulturbedingungen und Nährmedien

Alle Arbeiten mit lebenden Zellen finden zur Vermeidung von Kontaminationen mit Hefen, Bakterien und weiteren Fremdkeimen unter aseptischen Bedingungen statt. Die Arbeiten mit offenen Zellkulturflaschen wurden daher unter einer Werkbank mit laminarem Luftstrom und HEPA-Filtern durchgeführt. Alle benötigten Materialien wurden vor Gebrauch 20 Minuten bei 121°C autoklaviert. Die nicht autoklavierbaren Materialien wurden vor Einschleusen in die Werkbank mit Desinfektionsmittel behandelt, ebenso wurde die Arbeitsfläche zuvor mit Bacillo1® AF desinfiziert.

Die Nährmedien werden bei 2-8°C gelagert und vor Verwendung auf Raumtemperatur erwärmt.

Die MV3-Zellen werden in RPMI 1640 Medium mit 10%igem fötalem Kälberserum-Zusatz im Inkubator bei 37°C und einem CO₂-Anteil von 5 % (V/V) und einer relativen Luftfeuchte von 96 % kultiviert.

Entsprechend werden die PC-3 Zellen kultiviert, allerdings findet ein zusammengesetztes Nährmedium aus RPMI 1640 Medium mit 10%igem fötalem Kälberserum-, 2%igem HEPES-Puffer 1M-, 1%igem GlutaMax™- und 1%igem Penicillin/Streptomycin-Zusatz Verwendung.

Die durch stabile Transfektion erhaltenen Zelllinien MV3 aCyr61shRNA und MV3 aSDC4shRNA sowie PC-3 aCyr61shRNA werden wie ihre jeweiligen Wildtyp-Zelllinien kultiviert. Zur Selektion der Plasmid-tragenden Zellen wird das jeweilige Nährmedium mit Puromycin (2,5 µg/µL) versetzt.

4.2.2 Inkulturnahme von Zellen

Dauerhaft gelagert werden die Zellen als Suspension in flüssigem Stickstoff. Die Inkulturnahme der Zellen erfolgt durch zügiges Erwärmen des Inhaltes eines Kryoröhrchen in der Hand. Durch Zugabe von Nährmedium wird die erhaltene Zellsuspension aufgenommen und das Kryoröhrchen nachgespült. Das gesamte Medium wird, um die Zellen von dem zytotoxisch wirkenden DMSO des Kryomediums zu befreien, bei 4°C und 312 x g für 4 Minuten zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wird in Nährmedium resuspendiert und vollständig in eine T25-Zellkulturflasche mit bereits vorgelegtem Nährmedium gegeben. Anschließend erfolgt die Kultivierung unter oben genannten Bedingungen.

4.2.3 Kultivierung

Alle ein bis zwei Tage werden die Zellkulturflaschen kontrolliert und mikroskopisch betrachtet. Das Nährmedium wird gewechselt, sobald der Farbindikator Phenolrot eine Sättigung des Nährmediums mit sauren Stoffwechselprodukten anzeigt und ein Konfluenzgrad von 90 % nicht überschritten wurde. Liegt ein Konfluenzgrad von 90 % oder höher vor, so wird die Population subkultiviert („gesplittet“). Dazu werden frisches Nährmedium und eine 0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA-Lösung im Wasserbad auf 37°C temperiert.

Das Nährmedium wird aus der Zellkulturflasche abgesaugt und der Zellrasen mit sterilem PBS gespült und ebenfalls abgesaugt. Somit soll eine Inaktivierung von anhaftendem FKS bzw. ein Ablösen von sehr lose und evtl. schadhaften Zellen gewährleistet sein. Anschließend werden die anhaftenden Zellen mit 0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA-Lösung benetzt und die Flasche so lange im Inkubator aufbewahrt, bis das Ablösen der Zellen beobachtet werden kann. Durch Zugabe von Nährmedium wird das Trypsin inaktiviert und nur noch lose anhaftende Zellen werden durch Spülen mit Nährmedium

komplett vom Boden abgelöst. Die resultierende Zellsuspension wird in ein PP-Röhrchen überführt und bei 4°C und 312 x g für vier Minuten zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wird das Pellet in Medium resuspendiert. Jeweils $1/5$ bis $1/20$ der Zellen können dann in eine neue Zellkulturflasche mit frischem Nährmedium ausgesät und bis zur erneuten Konfluenz unter o.g. Bedingungen weiterkultiviert werden.

4.2.4 Kryokonservierung von Zellen

Zur dauerhaften Lagerung der Zellen werden diese in Einfriermedium überführt und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert. Es werden $1 \cdot 10^6$ vitale Zellen nach dem waschen und Ablösen vom Boden der Zellkulturflasche mit 1 mL des Einfriermediums in ein steriles Kryoröhrchen gegeben. Dieses wird unter Verwendung des Cryo 1°C Freezing Containers über Nacht im -80°C Kühlschrank gelagert. Dieses Behältnis erlaubt die kontrollierte Abkühlung des Mediums um 1°C pro Minute. Am nächsten Tag werden die Kryoröhrchen zur endgültigen Lagerung in den Stickstofftank überführt.

4.2.5 Bestimmung der Zellzahl mittels CASY® 1 Modell TT

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgt nach Zentrifugation und Resuspension des Zellpellets im entsprechenden Nährmedium. Dazu wird die zu vermessende Zellsuspension im Verhältnis 1:500 in sterilfiltrierter CASY®-ton Lösung suspendiert.

Das CASY® 1 Modell TT ist als Coulter Counter aufgebaut. An einer Kapillare mit bekannten Ausmaßen liegt eine Spannung an. Für den Fall, dass diese Kapillare mit Elektrolytlösung gefüllt ist und somit einen elektrischen Leiter mit definiertem Widerstand darstellt, resultiert ein konstanter Stromfluss. Für die Messung wird die Zellsuspension durch die eingebaute Kapillare mit bekanntem Durchmesser gesaugt. Passiert eine Zelle die Öffnung, so

registriert das Gerät einen kurzfristigen Anstieg des elektrischen Widerstandes gegenüber dem reinen Elektrolyten. Intakte Zellen werden als Isolatoren betrachtet. Verringert sich beim Durchtritt von Zellen durch die Kapillare der Länge l deren Querschnittsfläche A , so steigt der elektrische Widerstand R der Lösung an.

$$R = \rho \frac{l}{A} \qquad \rho = \text{spezifischer Widerstand} \qquad \text{Gl. 1}$$

Die Höhe der Widerstandsänderung ist ein Maß für das Zellvolumen. Das CASY® 1 Modell TT integriert das Messsignal und gibt eine volumenlineare Originalverteilung und eine durchmesserlineare Größenverteilung aus. Es lassen sich somit Aussagen sowohl zur Zellzahl als auch zur Zellgröße und damit Zellviabilität treffen. Als weiteres Ergebnis erhält man die Konzentration der eingesetzten Zellsuspension in Zellen/mL.

Die vorgenommenen Messeinstellungen sind: Kapillare Ø 150 µm, 2 Messzyklen à 400 µL Einzelhubvolumen, Partikelgröße 12,5-32,5 µm.

4.3 Transfektion

In der Zellbiologie versteht man unter Transfektion das Einbringen von fremder DNA oder RNA in eukaryotische Zellen, um kurzzeitig oder dauerhaft die Proteinexpression zu beeinflussen. Je nach Dauer des Effektes spricht man somit von transienter oder stabiler Transfektion. In dieser Arbeit wurde eine Plasmid-DNA verwendet, welche für eine shRNA kodiert und spezifisch gegen Cyr61 oder Syndekan-4 gerichtet ist. Die Expression des jeweiligen Proteins wird somit auf dem Level der Translation von der mRNA zum Protein verhindert.

Der shRNA-kodierende Vektor wird als Plasmid lipidbasiert in die Zelle eingeschleust. Das Plasmid gelangt in den Zellkern und wird mittels *RNA-Polymerase III (Pol III)* konstant transkribiert, welche am U2 Promotor

des Plasmides angreift. Das Enzym *Drosha* spaltet die entstehenden RNA-Stücke und es entstehen kurze, ca. 65-70 Basenpaare lange shRNA-Moleküle, die eine charakteristische Haarnadelstruktur aufweisen; daher der englische Name *small hairpinRNA*. Über das Transportprotein *Exportin-5* gelangt die shRNA ins Zytosol der Zelle und wird dort durch das Enzym *Dicer* zu einer etwa 20 Nukleotiden langen, doppelsträngigen siRNA prozessiert. Ein Enzymkomplex aus Argonautenproteinen, der *RNA-induced silencing complex*, bindet die doppelsträngige siRNA und bildet mit dieser den sog. Prä-*RISC*-Komplex. In diesem wird die siRNA entwunden und zu zwei einzelsträngigen RNA umgewandelt. Der Leitstrang (*guide*-Strang) verbleibt im Enzymkomplex während der Folgestrang (*passenger*-Strang) durch Proteasen abgebaut wird. Mithilfe des *guide*-Strang erkennt der Effektor-Komplex *RISC* die komplementäre Ziel-mRNA, bindet sie und lässt sie durch die Argonautenproteine mit Endonucleaseaktivität katalytisch spalten. Die Translation der mRNA in das entsprechende Protein kommt somit zum Erliegen und das Zielprotein wird faktisch nicht mehr exprimiert. Die auf zellulärer Ebene ablaufenden Vorgänge veranschaulicht ebenfalls Abbildung 15.

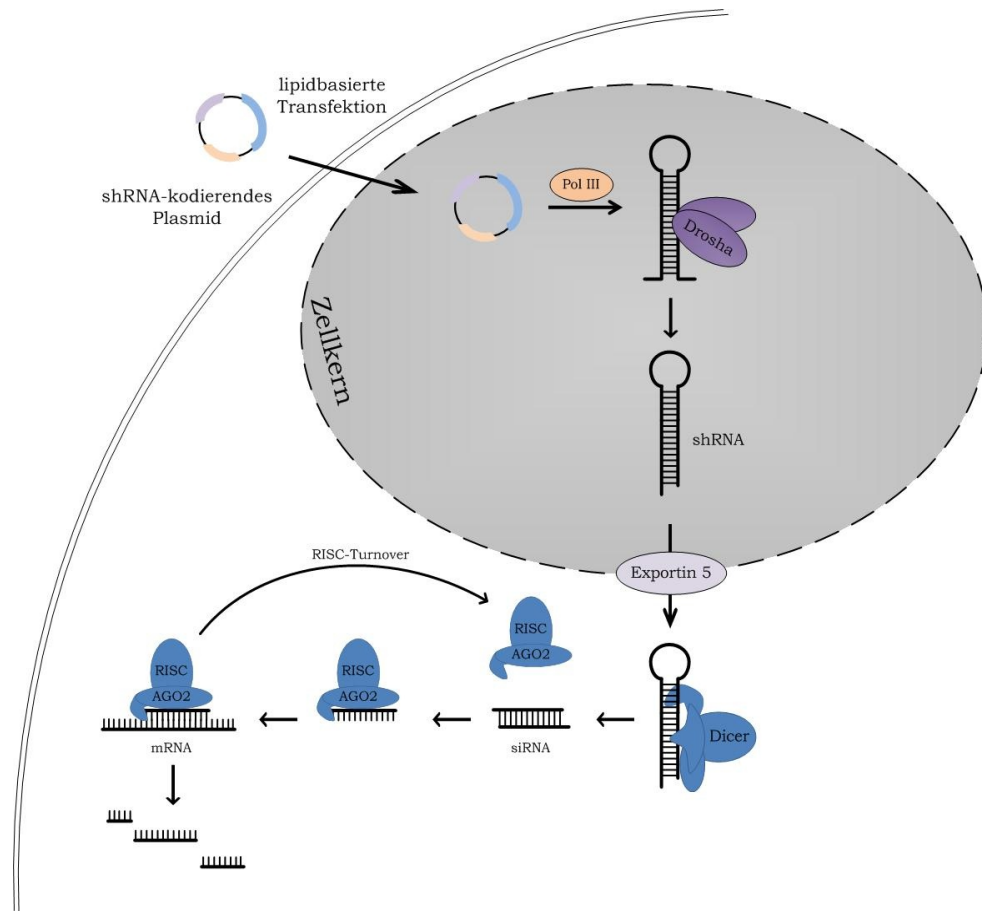


Abbildung 15: **Die Abbildung zeigt die Prozessierung der shRNA zur siRNA und den Abbau der Ziel-mRNA.** Nachdem das shRNA-kodierende Plasmid durch lipidbasierte Transfektion in den Nucleus gelangt ist, erfolgt die Prozessierung durch Pol III und Drosha zur shRNA. Diese wird nach Export in das Zytoplasma rasch von dem Enzymkomplex Dicer zur siRNA umgewandelt. RISC nimmt die siRNA auf und wird zur komplementären mRNA geführt, welche nun endonukleolytisch durch den RISC-Enzymkomplex gespalten wird. Modifiziert nach [275].

4.3.1 Aufreinigung von Plasmid-DNA

Die kommerziell als Glycerolkultur erhältlichen transformierten E.coli-Stämme wurden zunächst revitalisiert. Dazu wurde eine kleine Menge der gefrorenen Glycerolkultur in 12 mL steriles LB-Medium überführt und für 8 h bei 200 U/min und 37 °C auf dem Schüttelinkubator inkubiert. Diese Vorkultur wird in einem sterilem 2 L-Erlenmeyerkolben mit LB-Medium auf 250 mL aufgefüllt und die Inkubation über Nacht fortge-

setzt. Aus diesen Übernachtskulturen wird eine Plasmidaufreinigung unter Zuhilfenahme des GenElute™ HP Plasmid Maxiprep Kit nach Herstellerangaben durchgeführt. Abzentrifugierte Bakterienzellen werden mit einem SDS-haltigen alkalischen Puffer lysiert und der Rückstand über einen Filter abgetrennt. Das Plasmid findet sich anschließend im Lysat wieder und kann an die beigefügte Silicagel-Membran in Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen adsorbieren. Nach zwei Waschschritten zur Entfernung etwaiger anhaftender Kontaminationen, kann die Plasmid-DNA mit dem mitgelieferten Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) wieder von der Membran eluiert werden.

Die anschließende Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgt durch Messung der optischen Dichte im Photometer. Die gewonnene DNA wird in Elutionspuffer verdünnt und in eine Quarz-Präzisionsküvette pipettiert. Die Absorption wird im Programm „Nukleinsäuren“ bei 260 nm sowie 280 nm automatisch erfasst. Die Absorption des Elutionspuffers wurde als Nullwert angenommen. Die DNA-Konzentration der Ausgangslösung wird unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors in $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ausgegeben. Weiterhin

wird als Qualitätsmerkmal der Quotient $\frac{OD_{260}}{OD_{280}}$ angezeigt. Dieser deutet auf Verunreinigungen der Probe durch Proteine hin und sollte im Idealfall zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

4.3.2 Lipid-basierte Transfektion eukaryotischer Zellen

Die Transfektion der betreffenden Zielzellen wurde in 6-Loch-Platten durchgeführt, welche mit 20.000 Zellen pro Vertiefung versehen wurden. Nach erfolgtem Anwachsen der Zellen über Nacht unter den in Kapitel 4.2.3 beschriebenen Bedingungen wurden die Zellen mikroskopisch auf Viabilität geprüft, das Medium gegen frisches gewechselt und die Transfektion durchgeführt.

Das Einbringen des shRNA-Plasmides erfolgte mit dem kommerziell erhältlichen Lipid-basierten Transfektionsreagenz Fugene® 6 nach Herstellerangaben. Um das optimale Verhältnis von Plasmid-DNA zu Transfektionsreagenz zu ermitteln wurde zunächst für die zu transfizierenden Zelllinien eine Transfektion mittels GFPⁱ und verschiedenen DNA/Lipid-Mischungen durchgeführt. Dazu wurde das GFP-Plasmid in Verhältnissen von 1:3, 2:3 und 1:6 mit der Lipidmischung versetzt und die Zellen entsprechend der Herstellerangabe transfiziert. Die Transfektionseffizienz wurde drei Tage später am Durchflusszytometer durch Aufnahme der grünen Fluoreszenz des gebildeten Proteins beurteilt, welche mit der tatsächlich eingebrachten DNA-Menge korreliert. Sowohl für die hier verwendeten MV3- wie auch PC-3 Zellen stellte sich ein Verhältnis von 1:3 (DNA : Lipid) als günstig heraus. Ausgehend von diesem Befund konnte nun das shRNA-Plasmid im gleichen Verhältnis in die Zellen eingeschleust werden.

In jede Vertiefung werden 100 µL Transfektionsmischung gegeben, welche sich wie folgt zusammensetzt:

Komponente	[µL]
Fugene® 6	3
Plasmid-DNA 1 µg	x
FKS-freies Medium	97-x

Tabelle 4.1: Transfektionsmischung

Zu vorgelegtem, auf Raumtemperatur temperiertem FKS-freien Medium wird die Fugene® 6-Lösung pipettiert, vorsichtig gemischt und für 5 min inkubiert. Die Plasmid-DNA wird hinzugefügt, erneut gemischt und für insgesamt 45 min inkubiert. Die kationischen Lipide und andere Komponenten des Transfektionsreagenzes ordnen sich nun mit der DNA zu Transfektions-aktiven Komplexen an. Die so gewonnene Mischung kann nun tropfenweise unter leichtem Schwenken der Platte auf die Zellen (20.000 Zellen/1,9 mL Medium) gegeben werden. Anschließend werden die Zellen unter den o.g. Bedingungen für drei Tage im Inkubator belassen.

i GFP = engl.: green fluorescent protein (grün fluoreszierendes Protein)

4.3.3 Selektion shRNA-transfizierter Zellen

Das verwendete shRNA-codierende Plasmid trägt neben einer Ampicillin-Resistenz zur Selektion der Plasmid-positiven E.coli Bakterien ebenfalls eine Puromycin-Resistenz um auch im eukaryotischen Organismus eine Selektion der Plasmid-positiven Zellen zu gewährleisten. Puromycin (siehe auch Abbildung 16) inhibiert zum Einen die Translation der Proteine am Ribosom und zum Anderen den Proteinimport in Mitochondrien.

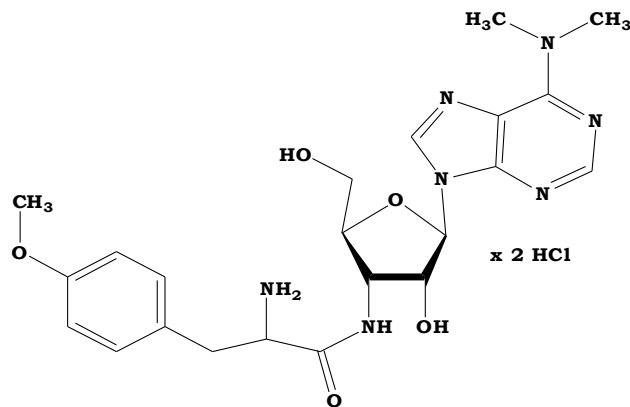


Abbildung 16: **Puromycin-dihydrochlorid**. Bei Puromycin handelt es sich um ein aus Streptomycceten gewonnenes Nucleosid-Antibiotikum, welches die Proteinbiosynthese hemmt.

Drei Tage nach erfolgter Transfektion wird mit der Puromycin-Selektionierung begonnen. Man strebt dabei die niedrigste Konzentration an, die 100 % der nicht-transfizierten Zellen innerhalb von 3-5 Tagen nach Puromycin-Zugabe abtötet. Dazu wurde zuvor an den jeweiligen Wildtyp-Zellen die Puromycinkonzentration im Bereich von 1-10 µg/mL Nährmedium austriert. Für die in dieser Arbeit verwendeten Zellen liegen die ermittelten Selektionskonzentrationen bei 2,5 µg/mL. Die transfizierten Zellen werden nun sukzessive mit steigenden Puromycinkonzentrationen im drei Tage Rhythmus versetzt, beginnen mit 25 % der für die Wildtyp-Zellen letalen Dosis. Die Steigerung der Dosis erfolgt in 10 % Schritten, dabei wird das verbrauchte Medium mit etwaigen abgetöteten Zellen abgesaugt und durch frisches Nährmedium ersetzt. Zur Steigerung des Selektionsdruckes kann ebenfalls noch eine Subkultivierung auf größere Zellkulturflaschen erfolgen. Niedrig passagierte Zellen werden für die dauerhafte Lagerung, wie in Kapitel

4.2.4 beschrieben, vorbereitet. Die derart gewonnenen Zellen werden im folgenden als Klone, mit der jeweiligen Bezeichnung des Plasmides, gegenüber dem Wildtyp abgegrenzt.

4.4 Durchflusszytometrische Untersuchungen

Der theoretische Hintergrund der Durchflusszytometrie wurde bereits in vielen vorangegangenen Arbeiten detailreich erläutert, weshalb an dieser Stelle auf die Beschreibung von Einzelheiten verzichtet und auf einschlägige Fachliteratur verwiesen wird. Die Funktionsweise des hier verwendeten Durchflusszytometers zur Bestimmung von fluoreszenzmarkierten Zellen und Zellbestandteilen sollen die folgenden Informationen kurz darstellen.

Die Zellen werden mittels einer Vakuumpumpe in einen konstanten Flüssigkeitsstrom gebracht. Dabei durchlaufen sie in einer feinen Kapillare perlenschnurartig aufgereiht das Licht eines 15 mW Argon-Lasers mit einer Wellenlänge von 488 nm. Parallel zur Einstrahlungsrichtung wird auf der gegenüberliegenden Seite der Kapillare das gestreute Licht durch einen Detektor – auch *Forward Scatter* (FSC) genannt – erfasst und somit Aussagen zur Oberfläche und Größe der Zellen gewonnen. Durch eine Sammellinse gebündelt und über verschiedene Spiegel abgelenkt wird das Seitwärtsstreulicht im 90°-Winkel zum Laserstrahl erfasst. Dieser sogenannte *Side Scatter* (SSC), an dem sich auch die Fluoreszenzdetektoren befinden, erlaubt Rückschlüsse auf intrazelluläre Strukturen wie z.B. die Granularität der Zelle. In dieser Arbeit werden die so untersuchten Zellen ausschließlich fluoreszenzmarkiert und die Fluoreszenzintensität über die entsprechenden Detektoren erfasst. Je nach Zelltyp wird das Analysefenster entsprechend der Zellgröße und Zellgranularität eingestellt und ausgewählt.

4.4.1 Untersuchung von intrazellulären Strukturen

Die Expression des Cyr61 Proteins lässt sich über die Durchflusszytometrie nur über die Anfärbung des intrazellulär vesikulär, gespeicherten Cyr61 durchführen. Um möglichst viel Cyr61 mit Fluoreszenzantikörpern zu erfassen, erfolgt zunächst eine Stimulation der Zellen. Somit lässt sich die Expression aller Zellen auf ein Maximum bringen und eine interzelluläre Vergleichbarkeit der Expressionsleistung ist gewährleistet. In dieser Arbeit wurde eine Nährmediumsaktivierung durchgeführt, indem die Zellen zunächst für 48 Stunden in einem Nährmedium mit geringem FKS-Anteil von 0,5 % kultiviert (sog. Hungermedium) und unmittelbar vor dem jeweiligen Versuch mit normal zusammengesetzten Nährmedium (10 % FKS-Anteil) für jeweils 1, 2, 3 oder 4 Stunden inkubiert wurden. Für die Untersuchung werden die Zellen gewaschen, abgelöst und in Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Blocken unspezifischer Bindungswerten auf bzw. an den Zellen mittels 0,5 % BSA-PBS-Lösung erfolgt die Zellfixierung mit 3,7 %igem Formaldehyd und kalter, 90 %iger Methanol-PBS-Lösung für jeweils 10 Minuten. Die Zellmembrandestabilisierung wird mit dem Tensid Tween[®]20 in einer 0,01 %igen Lösung erreicht. Nun ist es auch größeren Proteinen wie z.B. fluoreszenzmarkierten Antikörpern möglich in das Zellinnere zu gelangen, um spezifisch an die jeweilige Zielstruktur zu binden. Die so präparierten Zellen werden nun entsprechend einem Pipettierschema in eine 96-well-Platte zu jeweils $1 \cdot 10^5$ Zellen pro Vertiefung überführt. Bei 4°C und 1580 x g werden die Zellen für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es erfolgt die Zugabe des primären Antikörpers in einer Konzentration von 0,5 µg pro $1 \cdot 10^5$ Zellen. Nach einer 40 minütigen Inkubation auf Eis unter Ausschluss von Licht und erneutem Verwerfen des Überstandes nach erfolgter Zentrifugation, erfolgt die Zugabe des sekundären Antikörpers in einer Konzentration von 0,025 µg pro Vertiefung. Nachdem erneut 40 min unter o.g. Bedingungen inkubiert wurde folgen zwei Waschschrte mit 0,01 %iger Tween[®]20-PBS-Lösung um überflüssigen und unspezifisch gebundenen Antikörper abzulösen. Daran schließt sich die Vermessung der

Proben im Durchflusszytometer an. Eine etwaige unspezifische Bindung des sekundären Antikörpers (F_{sekAK}), mögliche Eigenfluoreszenzen der Zellen (F_{Zelle}) oder des eingesetzten Primärantikörpers (F_{primAK}) werden ebenfalls ermittelt indem die Zellen mit dem jeweiligen Reagenz solistisch versetzt und die Werte ebenfalls erfasst werden. Zur Versuchsauswertung werden die Daten folgendermaßen behandelt: Die Fluoreszenz der Zellen, die mit Primär- und Sekundärantikörper versetzt wurden ($F_{\text{primsekAK}}$), wird bereinigt (F_{ber}) von der unspezifischen Fluoreszenz des sekundären Antikörpers und der möglichen Eigenfluoreszenz des Primärantikörpers (siehe auch Gleichung Gl.2)

$$F_{\text{ber}} = F_{\text{primsekAK}} - F_{\text{sekAK}} - (F_{\text{primAK}} - F_{\text{Zelle}}) \quad \text{Gl.2}$$

4.4.2 Untersuchung von extrazellulären Strukturen

Die Expression extrazellulärer Strukturen lässt sich ebenfalls nach erfolgter Antikörpermarkierung durchflusszytometrisch bestimmen. Das Verfahren dazu gestaltet sich einfacher, da die Permeabilisation der Zellmembran entfällt. In dieser Arbeit sollen auf diese Weise die Zellen auf verschiedene Integrin-Untereinheiten sowie das Proteoglykan Syndekan-4 hin untersucht werden.

Die Zellen werden unter Verwendung von EDTA-Lösung 0,02 % ohne Trypsin Zusatz abgelöst, um eine Beschädigung der Oberflächenproteine durch die Protease Trypsin auszuschließen. Nach waschen mit Waschpuffer werden $1 \cdot 10^5$ Zellen pro Vertiefung in eine 96-well-Platte eingebracht. Die Primärantikörper werden nach Herstellerangaben in den folgenden Konzentrationen eingesetzt:

Antikörper	Konzentration
anti- α_1 , - α_4 , - α_V , - β_3	0,25 $\mu\text{g/well}$
anti- α_5	0,1 $\mu\text{g/well}$
anti-Syndekan-4	0,1 $\mu\text{g/well}$

Tabelle 4.2: verwendete Antikörperkonzentrationen

Unter Ausschluss von Licht wird auf Eis für 30 min mit der jeweiligen Antikörperlösung inkubiert. Nach Zentrifugation, Verwerfen des Überstandes und einem Waschschrift erfolgt die Zugabe des jeweils passenden Sekundärantikörpers ebenfalls nach Herstellerangabe. Die Bindung erfolgt nun unter den o.g. Bedingungen ebenfalls für 30 min und ist gefolgt von einem weiteren Waschschrift. Nach Aufnahme des Pellets in Waschpuffer erfolgt die Messung der Fluoreszenzintensität.

4.5 Proteinanalytik

4.5.1 Anfertigung von Zellysaten

Die Gewinnung von Zellysaten erfolgt mittels eines kommerziell erhältlichen Puffers. Dieser enthält die unter Kapitel 4.1.7 aufgeführten Substanzen und ist in der Lage Zellen aufzubrechen (lysieren) und die gewonnenen Proteine zu solubilisieren. Nach Herstellerangaben wird der Puffer zusätzlich noch mit 1 mM des Proteaseinhibitors PMSFⁱ versetzt. Dieser spezifische Serin-Proteaseinhibitor soll beim Aufschluss der kultivierten Zellen unerwünschten Proteinabbau durch im Lysat befindliche Serin-Proteasen verhindern. Ebenfalls wird nach Herstellerangabe ein Protease-Inhibitor-Cocktail zugesetzt, welcher gegen gängige Serin-, Cystein- und Threonin-Peptidasen gerichtet ist und ebenfalls den enzymatischen Abbau des resultierenden Lysates verhindern soll.

Zunächst werden die Zellen bis zur Konfluenz in T175 Zellkulturflaschen kultiviert, nach Waschen des Zellrasen mit sterilem PBS werden die Zellen mit 0,02 % EDTA-Lösung benetzt und die Flasche so lange im Inkubator aufbewahrt, bis das Ablösen der Zellen beobachtet werden kann. Durch Zugabe von sterilem PBS wird die Flasche gespült und nur noch lose anhaf-

ⁱ PMSF = Phenylmethylsulfonylfluorid

tende Zellen werden komplett vom Boden abgelöst. Die resultierende Zellsuspension wird in ein PP-Röhrchen überführt und bei 4°C und 312 x g für vier Minuten zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wird das Pellet in kaltem, sterilem PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert, um die Zellen zu waschen und von verbleibendem FKS zu befreien. Das erhaltene Pellet wird nun mit dem fertiggestellten Lysepuffer resuspendiert. Dabei sollte das Volumen so gewählt werden, dass sich in einem mL des Puffers nicht mehr als $1 \cdot 10^8$ Zellen befinden. Die eigentliche Zellyse erfolgt nun für 30 min unter ständiger Bewegung auf einem automatischen Schüttler bei 1000 U/min und 4°C. Das resultierende Zellysate wird in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt und 4°C und 13.000 rpm für zehn Minuten zentrifugiert. Um Zellbestandteile wie z.B. Mitochondrien, Lysosomen und Zellkernfragmente abzutrennen, wird das Pellet nun verworfen und der Überstand kann als Zellysate nun bei -80°C dauerhaft gelagert oder direkt für Versuche verwendet werden.

4.5.2 Proteinquantifizierung mittels Amido-Schwarz-Assay

Bei dieser Methode erfolgt die Bestimmung des Proteingehaltes einer Probe nach der Methode von Kaplan et al.²³⁸. Der Assay beruht auf der Adsorption des Farbstoffs Amidoschwarz 10B an Proteinen.

Die Lösungen mit dem zu bestimmenden Protein werden in 1,5 mL Reaktionsgefäßen vorgelegt. Dabei werden Volumina gewählt, die einen Proteingehalt zwischen 5-10 µg erwarten lassen. Außerdem wird mit einer BSA-Stammlösung (200 µg Protein/mL) eine Kalibriergerade in Aqua dem. erstellt, die mit ihren Werten um den erwarteten Proteingehalt liegt.

Die Proteine werden durch Zugabe von einer wässrigen Lösung aus 1 M Tris-HCl und 2 % SDS solubilisiert. Durch Versetzen mit eiskalter 100%iger TCA-Lösung werden die Proteine präzipitiert. Diese Mischung wird auf dem Vortexschüttler gemischt und für mindestens zwei Minuten bei RT inkubiert. Zur Vorbereitung des Vakuumblocks muss zunächst ein passend zuge-

schnittenes Stück einer PVDFⁱ-Membran für 15 s in Methanol äquilibriert und anschließend für zwei Minuten im Wasserbad befeuchtet werden. Ein mit Wasser getränktes Stück Filterpapier wird passend in den Vakuumblock eingelegt. Darauf wird die vorbereitete PVDF-Membran vorsichtig platziert und anschließend das Gerät vollständig zusammengebaut. An diesen Vakuumblock wird durch eine Membranpumpe ein Unterdruck von 500 mbar angelegt. Die o.g. Proben können nach einem vorbereiteten Pipettierschema in die Kammern des Blocks eingefüllt werden. Die Reaktionsgefäße werden zur Steigerung der Ausbeute mit eiskalter 6%iger TCA-Lösung nachgespült und diese Spüllösung ebenfalls in die entsprechenden Kammern des Blocks pipettiert. Eine letzte Spülung der Probenkammern wird erneut mit 6%iger TCA-Lösung durchgeführt. Der Vakuumblock kann nun demontiert und die Membran vorsichtig entnommen werden.

Die nachfolgenden Färbe- und Entfärbeschritte zur Quantifizierung der Proteinmenge werden unter ständigem Schütteln der mit der jeweiligen Flüssigkeit bedeckten Membran auf dem Horizontalschüttler bei RT durchgeführt. Dazu wird die Membran zu Beginn für 20 Minuten in Amidoschwarz-Färbelösung inkubiert. Die Membran wird entnommen und überschüssige Färbelösung wird durch Schütteln im Wasserbad für eine Minute abgewaschen. Unspezifisch gebundener Farbstoff wird anschließend durch Inkubation der Membran in Entfärbelösung für drei Minuten entfernt. Der Vorgang wird anschließend unter Erneuerung der Entfärbelösung zweimal wiederholt. Etwaige Reste der Entfärbelösung können durch eine nachfolgende dreiminütige Inkubation der Membran in Wasser abgewaschen werden. Die Membran wird dann bei RT getrocknet.

i PVDF = Polyvinylidendifluorid

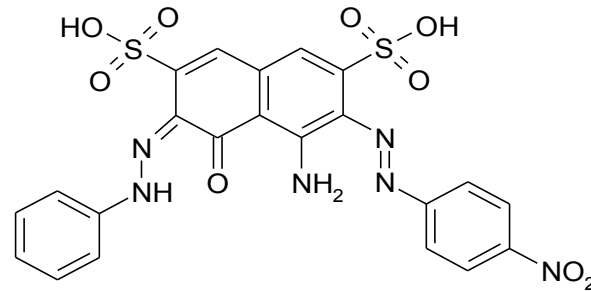


Abbildung 17: **Amidoschwarz**. Der saure Farbstoff Amidoschwarz bindet an freie Aminogruppen der Proteine und bildet mit ihnen saure Komplexe. Diese Komplexe lösen sich im Basischen wieder und die Amidoschwarzkonzentration lässt sich photometrisch bestimmen.

Die einzelnen Proben wurden mittels einer Einlochzange aus der Membran ausgestanzt und in vorbereitete Pyrex-Glasröhrchen mit 1 mL Elutionslösung eingebracht. Der Farbstoff wird innerhalb von 15 Minuten unter regelmäßigem Schütteln in der Elutionslösung gelöst. Die Absorption der Proben wird schließlich bei 630 nm gegen Wasser als Referenz vermessen.

4.5.3 Proteinaufreinigung über Heparin-Agarose

Die gewonnenen Zellysate aus Kapitel 4.5.1 sind Ganzzellysate und zeichnen sich dadurch aus, dass sie das Gesamtprotein der Zelle repräsentieren. Kleine Signalling-Proteine oder chemokinartige-Proteine nehmen in diesem Gesamtproteinlysat nur einen prozentualen kleinen Anteil ein und sind unter Umständen nur schwer nachzuweisen. Das Protein Cyr61 wird in den in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien exprimiert, über das genaue Ausmaß liegen allerdings keine Studien vor. Da Cyr61 über eine Heparin-Bindestelle verfügt, liegt hier der Versuch nahe dieses Protein über Heparin aufzureinigen bzw. im Lysat anzureichern, um somit einen positiven Nachweis im Westernblot zu erhalten.

Eine kommerzielle Heparin-Sepharose wird in einem Reaktionsgefäß zentrifugiert und das erhaltene Pellet vom Lagerungs-Puffer separiert. Der Niederschlag wird in 10 mM Tris-HCl pH 7,5 aufgenommen und für 15 min bei 4°C auf dem Thermomixer bei 1000 U/min geschüttelt. Dabei wird die Heparin-Sepharose äquilibriert und für Protein-Wechselwirkungen aktiviert.

In die so vorbehandelte Sepharose wird nun das Proteinlysate bekannter Konzentration zugefügt und die Mischung für 30 min auf dem Thermomixer bei 4°C und 1000 U/min geschüttelt. Nach einer Zentrifugation bei 13.000 rpm, 4°C und 10 min kann der Überstand verworfen werden und das Pellet wird mit einem Elutionspuffer bestehend aus 10 mM Tris-HCl pH 7,5 mit 1,5 M NaCl erneut für 30 min auf dem Thermomixer unter o.g. Einstellungen geschüttelt. Es erfolgt eine weitere Zentrifugation unter den o.g. Einstellungen. Heparin-gebundene Proteine sollten nun wieder in den Überstand überführt worden sein und gegenüber anderen im Lysat befindlichen Proteinen eine Anreicherung erfahren haben. Das Pellet kann verworfen werden und der Überstand wird alsbald für eine SDS-PAGE verwendet.

4.6 Elektrophoretische Verfahren

Bei der Elektrophorese wandern elektrisch geladene Teilchen durch ein Trägermaterial in einem elektrischen Feld. Die Wanderungsgeschwindigkeit bzw. Entfernung zum Startpunkt diverser Stoffe ist proportional zur Feldstärke und der Ionenladung und umgekehrt proportional zum Teilchenradius und der Viskosität des Trägermaterials. Dieses ist in den meisten Fällen ein Gel mit definierter Porenweite, welches als Molekularsieb fungiert. Ein größerer Teilchendurchmesser wirkt sich also stärker hemmend auf die Wanderungsgeschwindigkeit aus. Durch unterschiedliche Ionenladung und Teilchendurchmesser bewegen sich verschiedene Stoffe unterschiedlich schnell und erreichen eine Auftrennung entsprechend ihrer elektrophoretischen Mobilität und ihres Molekulargewichts. Zur Trennung von Stoffgemischen, wie in diesem Fall von einem Proteingemisch mit Membranbestandteilen, eignet sich die Elektrophorese daher gut.

4.6.1 SDS-PAGE

Zur Auftrennung von Proteinen wird in dieser Arbeit ein Polyacrylamidgel verwendet. Das gesamte Verfahren wird SDS-PAGE (sodium-dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis) genannt. Die Zugabe von SDS denaturiert die Raumstruktur der Proteine und fördert die Solubilisierung. SDS als negativ geladenes Detergens heftet sich mit seinem aliphatischen Rest an die Proteinmoleküle. Mit der negativ geladenen Seite stößt es sich von benachbarten negativen SDS-Molekülen ab und führt somit zu einer Linearisierung der Proteinmoleküle. Da mehrere hundert negativ geladene SDS-Moleküle in Folge der Reaktion an die Proteinmoleküle binden, wird die Eigenladung der Proteine maskiert und kann vernachlässigt werden.

Zur Durchführung der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden die zu untersuchenden Proteinproben auf eine einheitliche Konzentration von $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ eingestellt. Diese Proben, ein Proteingrößenstandard und ein Aliquot Probenauftragspuffer werden bis zur Verwendung auf Eis gelagert bzw. aufgetaut. Die Auftrennung der Proben erfolgt in dieser Arbeit mittels TGX™-Fertiggelen der Firma Bio-Rad. Diese verwendeten Gele besitzen eine Gradientenmatrix von 4-15 % und erlauben somit eine saubere und reproduzierbare Auftrennung der Proben.

Die Gele werden in die Elektrophoresekammer eingesetzt, der Elektrophoresepuffer wird aus 100 mL der entsprechenden Stamm-Lösung mit Wasser zu einem Volumen von 1 L verdünnt und die o.g. Kammer damit befüllt. Alle Probentaschen werden nach Entfernen des Kammes zur Gestaltung der Probentaschen anschließend vorsichtig mit Elektrophoresepuffer gespült.

Die Proteinproben können nun mit einer Konzentration von 25-50 μg Gesamtprotein pro Bahn auf dem Gel aufgetragen werden. Dazu werden sie zuvor mit PAP im Verhältnis 1:1 versetzt, wobei auf das maximale Fassungsvermögen der Taschen von 35 μL zu achten ist. Ebenso wird auch der Größenstandard mit PAP versetzt. Anschließend werden alle Proben für 30 Minuten bei 37°C im Thermostat inkubiert. Dabei werden die Disulfidbrücken der Proteine reduziert. Anschließend erfolgen die Beladung der

Probentaschen und die elektrophoretische Trennung durch Anlegen einer Spannung von 200 V. Die Elektrophorese wird beendet, sobald die Bromphenolblaubande das Ende des Gels erreicht hat, i.d.R. aber nach 50 Minuten.

Das Gel wird anschließend aus der Apparatur entnommen und das Sammelgel mit einem Skalpell abgetrennt. Nun besteht die Möglichkeit, entweder alle Proteine mittels Silberfärbung einzufärben, um einen Überblick über die enthaltenen Proteine zu erhalten, oder einzelne Proteine mittels Western-Blot-Technik spezifisch nachzuweisen.

4.6.2 Western-Blot

Beim Western-Blot, auch Immunblot genannt, werden Proteine auf eine Trägermembran übertragen (engl.: *blotting*). Anschließend können sie über unterschiedliche Reaktionen nachgewiesen werden. Die Übertragung wird in diesem Fall durch elektrischen Strom gewährleistet, so dass auch hier von Elektrophorese gesprochen wird.

Bei diesem Blot wird ein elektrisches Feld senkrecht zur Auftrennung im Polyacrylamid-Gel angelegt, so dass die Proteine aus dem Gel auf eine PVDF-Membran wandern können. An der Membranoberfläche bleiben sie nach dem Muster ihrer elektrophoretischen Auftrennung aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften. Darüber hinaus kann das an den Proteinen angelagerte SDS wieder ausgewaschen werden, so dass die Proteine teilweise renaturieren und ihre Sekundär- und Tertiärstruktur wieder einnehmen können.

Nach Immobilisation der Proteine auf dieser Membran kann ein gesuchtes Protein mit einem spezifischen Antikörper markiert werden. Der so gebundene Antikörper wird schließlich mittels eines zweiten Antikörpers nachgewiesen, der gegen den Fc-Bereich des primären Antikörpers gerichtet ist.

Durch eine Enzymreaktion kann der gesamte Antikörperkomplex schließlich optisch detektiert werden.

Das Trenngel muss vor der Durchführung des Western-Blots für mindestens 5 min in Transferpuffer äquilibriert werden. Währenddessen wird eine auf Trenngelgröße zugeschnittene PVDF-Membran, 20 s mit Methanol benetzt und bis zur Verwendung in Transferpuffer aufbewahrt. Der Blotting-Tank wird mit einem gefrorenen Kühlakku versehen, mit Transferpuffer gefüllt und ein Magnet-Rührfisch zugefügt. Die so zusammengesetzte Apparatur wird auf einem Magnetrührer platziert. Die nächsten Arbeitsschritte erfolgen unter Luftausschluss in einer mit Transferpuffer gefüllten Entwicklerschale. Das Gel und die Membran werden gemäß der Herstellerangabe in die Blot-Kassette eingesetzt und evtl. eingeschlossene Luftblasen zuvor sorgfältig durch Ausstreichen mit einem Glasstab entfernt. Die fertige Kassette wird in die vorbereitete Apparatur eingesetzt und fehlender Transferpuffer bis zur vollständigen Bedeckung aufgefüllt. Nach Verschließen der Apparatur werden bei einer Spannung von 100 V und einer Stromstärke von 350 mA innerhalb von 60 min die Proteine vom Gel auf die Membran übertragen.

Nach Vollendung des Elektroblobs wird zur Visualisierung die Antigen-Antikörper-Reaktion durchgeführt. Dazu wird die Membran abwechselnd in verschiedenen Lösungen bei RT auf dem Horizontalschüttler inkubiert. Zunächst wird die Membran für eine Stunde in Blockierungslösung belassen, dabei wird die Membranoberfläche mit Milchproteinen abgesättigt, um eine spätere unspezifische Antikörperbindung zu minimieren. Überschüssige Blockierungslösung wird anschließend mehrmals mit jeweils frischer TBST-Lösung abgewaschen. Im Anschluss daran wird die Membran mit der Primärantikörperlösung inkubiert. Dies erfolgt in 15 mL der entsprechenden Lösung für eine Stunde bei RT unter stetigem Schütteln. Über Nacht wird die Inkubation des Blots in der Antikörperlösung im Kühlschrank fortgesetzt. Am nächsten Morgen wird die Membran erneut mit TBST-Lösung gespült. In einer Lösung von 10 mL 5 %igem (m/V) Magermilchpulver in TBST wird der sekundäre Antikörper im Verhältnis 1:20.000

verdünnt und die Membran für 1,5 h bei RT inkubiert. Der sekundäre Antikörper richtet sich gegen den Fc-Bereich des primären Antikörpers und ist mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRPⁱ) konjugiert. Daran anschließend wird die Membran erneut in TBST gewaschen und die Antikörperlösung verworfen.

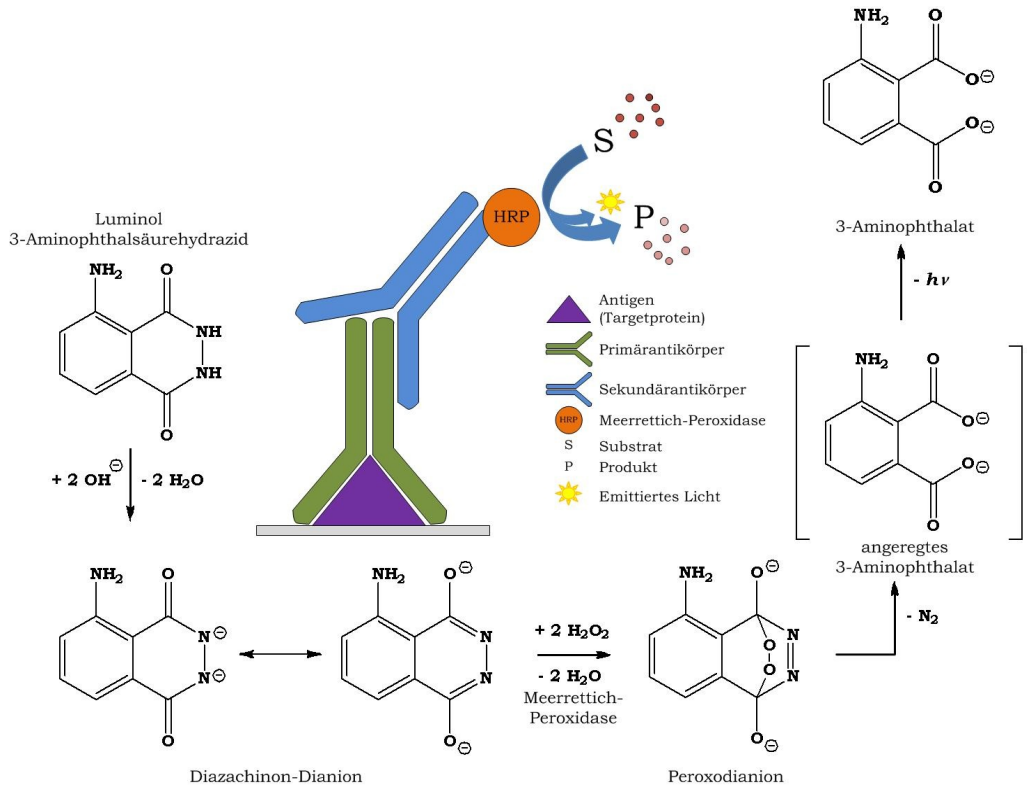


Abbildung 18: **Schematische Darstellung der Immundetektion.** Der primäre Antikörper bindet das Epitop seines Antigens, welches auf einer Membran fixiert ist. An das Fc-Fragment des primären Antikörpers bindet ein sekundärer Antikörper. Dieser ist mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (engl.: *horseradisch peroxidase* = HRP) gekoppelt. HRP katalysiert die Reaktion von Luminol in seine oxidierte Form. Im Basischen kommt es zunächst zur Deprotonierung unter Entstehung eines Diazachinon-Dianions. Unter HRP-Katalyse reagiert das Molekül zum Peroxodianion, welches rasch unter Abspaltung von N_2 in ein angeregtes 3-Aminophthalat übergeht. Unter detektierbarer Emission von Chemilumineszenz fällt dieses Molekül in seinen Grundzustand zurück. Abbildung modifiziert nach [276].

Zur Detektion bzw. Visualisierung des Antigen-Antikörperkomplexes wird ECL-Reagenzⁱ gemäß den Herstellerangaben hergestellt. Die TBST-Lösung wird abgeschüttet und 2 mL der ECL-Lösung gleichmäßig auf die Membran pipettiert. Dieser Ansatz wird für mindestens 15 min inkubiert. Die an den

i HRP = engl.: horseradish peroxidase

i ECL = engl.: enhanced chemiluminescence

sekundären Antikörper konjugierte Peroxidase katalysiert eine Reaktion mit dem ECL-Reagenz, die zur Chemilumineszenz führt (siehe auch Abb. 18) und mittels der Geldokumentationseinheit zeitnah detektiert und ausgewertet werden kann.

4.6.3 Silberfärbung

Die Silberfärbung vermittelt einen Überblick über die Verteilung einzelner Proteine und ihrem Anteil am Gesamtprotein. Dabei werden die Proteine zunächst durch die Entfernung von SDS im Gel fixiert und anschließend durch Silbersalze sichtbar gemacht. Dabei bindet ionisches Silber an Aminosäure-Seitenketten und wird nach Reduktion der Silberionen zu elementarem Silber sichtbar. Durch die vorherige Reduktion der Seitenketten mittels DTT wird die Bindungsfähigkeit für Ag^+ noch weiter erhöht. Silber bindet mit einer Nachweisgrenze im Bereich von 0,1-1 ng die meisten Proteine, damit ist die Silberfärbung sehr sensitiv.

Das zu färbende Trenngel wird mindestens für 1 h in Fixierlösung unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wird das Gel mit einer 1:1 in Aqua dem. verdünnten Fixierlösung für 15 min geschwenkt, gefolgt von einer Behandlung in Aqua dem. gleicher Zeit. Es folgen 15 minütige Inkubationen unter Schwenken mit frisch hergestellten Lösungen in DTT-Lösung 325 μM und in 0,1%iger Silbernitrat-Lösung.

In der eigentlichen Entwicklungsreaktion werden nun die Banden sichtbar. Dafür wird das präparierte Gel kurz in Wasser gewaschen und anschließend Entwicklungslösung zugegeben. Nach einer ersten Dunkelfärbung der Lösung wird diese sofort abgegossen, durch frische ersetzt und das Gel bis zur gewünschten Farbintensität der Banden geschwenkt. Die Farb-reaktion wird durch Abgießen der Entwicklungslösung und zügiges Ersetzen durch 5%ige Essigsäure gestoppt. Nach einer Behandlung von mindestens 5 min in dieser Lösung kann das Gel in eine 3%ige Glycerol-Lösung überführt und bis zur Dokumentation aufbewahrt werden.

4.7 Mikroskopische Verfahren

4.7.1 Fluoreszenzmikroskopie

Die konventionelle Fluoreszenzmikroskopie ist eine Sonderform der Lichtmikroskopie, die sich das Fluoreszenzphänomen zu Nutze macht. Fluoreszenzfarbstoffe werden hierbei durch Licht im Bereich ihrer Anregungswellenlänge angeregt und strahlen unmittelbar danach Licht einer anderen Wellenlänge ab, welches durch spezielle Filter beobachtet werden kann.

Die hier getätigten Untersuchungen wurden ausschließlich an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop durchgeführt. Bei dieser Technik ist der Strahlengang zunächst durch eine Anregungslochblende auf einen Punkt im Objekt fokussiert, welcher vom Laserlicht abgetastet wird. Als Objektiv wie auch als Kondensator dient eine Linse, wodurch der Abgleich zweier Linsen entfällt. Das verwendete Laserlicht tritt durch die Apertur und wird auf einem halbdurchlässigen (dichroitischen) Spiegel konzentriert, den es passiert. Von hinten trifft es nun auf das Objektiv und wird durch dieses auf die Probe gestrahlt. Hier erfolgt die spezifische Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe innerhalb der Probe. Die verwendeten Wellenlängen zur Anregung werden erzeugt durch einen Argon-Laser und einen Festkörperlaser, der mit der Strahlung von Diodenlasern gepumpt wird (DPSSⁱ). Die verwendeten Anregungswellenlängen betragen 405 nm (Laserdiode), 488 nm (Argon-Laser) und 561 nm (Festkörperlaser). Zur Emissionserfassung stehen verschiedene Filter zur Auswahl, die im Bereich der entsprechenden Emissionsmaxima der sekundären Antikörper liegen (450±50 nm, 482±35 nm, 525±25 nm, 595±50 nm).

i DPSS engl.: *diode pumped solid state*

Das emittierte Licht wird zurück geleitet, kann den Strahlenteiler aber nicht durchdringen und wird nun vom ihm reflektiert und auf eine weitere Linse geleitet. Dort ist eine Lochblende (engl. *Pinhole*) angebracht die sämtliche optischen Informationen abschirmt, die nicht aus der Fokusebene des Präparates stammen. Da man somit lediglich Licht aus einem Punkt der Probe erhält, muss das Präparat in allen drei Raumrichtungen abgetastet werden, um einen ausreichend großen Bildausschnitt zu erhalten. Über die Bewegung des Objektisches wird dies bewerkstelligt. Die eigentliche Information und Darstellung des Bildausschnittes wird anschließend über die Digitalisierung der Einzelpunktinformationen an einem angeschlossenen Rechner ermöglicht, somit entsteht eine dreidimensionale Abbildung.

4.7.1.1 Anfärbung von Zellstrukturen

Etwaige Unterschiede im Expressionsmuster zwischen Wildtyp und transfizierten Zellen lassen sich durch Antikörpermarkierung und die resultierende Fluoreszenzintensität des Proteins Cyr61 und verschiedener Zellorganellen kenntlich machen. Es soll die Cyr61-Expressionsmenge, eine mögliche Veränderung der Lysosomenanordnung bzw. etwaige Internalisierung des Cyr61 in den Lysosomen und die Anordnung des Cyr61 zu den Golgi-Vesikel untersucht werden. Cyr61 und die Golgi-Vesikel werden dabei im Sandwichverfahren zunächst mit einem Primärantikörper und anschließend mit einem Sekundärantikörper markiert, welcher gegen den ersten Antikörper gerichtet und mit einem Fluoreszenzlabel versehen ist. Die Lysosomen lassen sich mit einem speziellen Farbstoff anfärben, dabei handelt es sich um LysoTracker[®]Red DND-99. Dieser Fluorophor ist mit einer schwachen Base verbunden, welche die Zellmembran durchdringen kann und sich bevorzugt in sauren Bereichen, den Lysosomen, anlagert. Als Besonderheit gegenüber anderen Farbstoffen muss der verwendete von lebenden Zellen aufgenommen und verstoffwechselt werden.

Von den zu untersuchenden Zellarten werden $1,25 \cdot 10^5$ Zellen pro Vertiefung in einer 6-well-Platte auf runden Deckgläsern eingebracht und bis zum

nächsten Tag unter den unter Kapitel 4.2.1 beschriebenen Bedingungen im Inkubator belassen. Jeder bewachsene Glasträger wird für 15 min mit einer 0,1 μM LysoTracker-Nährmedium-Lösung inkubiert. Nachdem der Glasträger zweimal mit PBS-Puffer gewaschen wurde, werden die Zellen mit 3,7 %igem Formaldehyd in PBS für 15 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach Entfernung des Formaldehyds wird eine 0,01 %ige Tween[®]20-PBS-Lösung auf die Zellen gegeben und für 15 min inkubiert. In dieser Zeit bewirkt das Tensid die Bildung von Poren in den Zellmembranen, wie sie später für die Antikörper benötigt werden, um intrazelluläre Strukturen zu erreichen. Nach einem weiteren Waschschrift werden durch die Zugabe von 1 %iger BSA-PBS-Lösung für 60 min bei Raumtemperatur unspezifische Bindungen verhindert. Das Aufbringen der primären Antikörper kann nach einem erneuten Waschschrift erfolgen. Es werden etwa 0,83 μg des gegen Cyr61 gerichteten und ebenso 1 μg des gegen die Golgi-Vesikel gerichteten Antikörpers auf die Zellen gebracht. Durch Auflegen eines zweiten, eckigen Deckglases wird die Verteilung zwischen der Zellschicht optimal gewährleistet. Für 90 min wird den Antikörpern im Inkubator die Möglichkeit gegeben an ihre Zielstruktur zu binden, danach werden ungebundene Antikörper abgewaschen und die passenden sekundären Antikörper nach Herstellerangaben den Zellen zugesetzt. Nach weiteren 90 min Inkubation werden die Deckgläser gewaschen und für 5 min mit der Substanz DAPI versetzt, um in der DNA der Zellen Adenin-Thymin-reiche Regionen zu markieren. Zur Dehydratation der Zellen und Steigerung der Farbbrillanz erfolgen Waschschriffe mit steigenden Ethanol Konzentrationen, bevor die Deckgläser zum Trocknen gelegt werden.

Identisch präpariert und angefärbte Deckgläser werden zum Vergleich in Wildtyp und transfizierter Variante zusammen auf einem Objektträger mithilfe von Fluoromount[®] fixiert und für 24 h bei Raumtemperatur gelagert, ehe sie am Fluoreszenzmikroskop (Nikon Ti Eclipse) vermessen werden.

4.7.2 Zelladhäsion unter physiologischen Flussbedingungen

Unter Flussbedingungen wurde die Bindungsfähigkeit von Zellen an immobilisierten Rezeptorproteinen untersucht. Eine spezielle Flusskammer erlaubt es dabei die Verhältnisse in einer postkapillaren Venole zu simulieren. Bei der Auswahl des Rezeptorproteins wurde VCAM-1 gewählt, um die physiologisch wichtige Bindung mit seinem Partnerprotein VLA-4 auf den verwendeten Zellen zu charakterisieren. Unter konstantem Pufferfluss kann im Folgenden die Zelladhäsion unter Einfluss von Stimulantien oder Inhibitoren beobachtet werden.

4.7.2.1 Aufbau der Durchflussapparatur

Bei der verwendeten Apparatur handelt es sich um einen transparenten Polyacrylblock, in den die eigentliche Flusskammer hineingefräst ist. Der konkrete Aufbau ist in einer Publikation von Bendas et al.²³⁹ detailliert beschrieben. Die Flusskammer wird einseitig von einem Glasplättchen, mit dem jeweils immobilisierten Rezeptorprotein, mittels eines Dichtungsringes und Schrauben verschlossen (siehe auch Abb. 19). In dieser geschaffenen Kammer kann nun durch Ein- und Auslassöffnungen das Fließmedium laminar fließen. Die Fließgeschwindigkeit des verwendeten Puffers wird über den hydrostatischen Druck auf 2 mL/min eingestellt und entspricht unter Berücksichtigung der Kammerabmessungen einer in den Venolen vorherrschenden Scherrate von 200/s²³⁹. Der eigentlichen Kammer direkt vorgeschaltet ist eine Blasenfalle, die zum Einen Luftblasen aus dem System fernhalten soll und zum Anderen als Injektionshilfe für die Zellen und verwendeten Testsubstanzen dient.

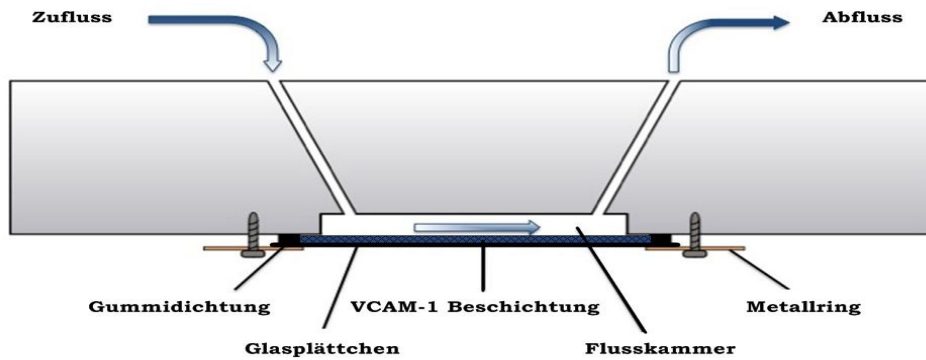


Abbildung 19: **Schematische Zeichnung der Durchflusskammer.** Die Darstellung zeigt den Querschnitt der verwendeten Durchflussapparatur. An der Unterseite befindet sich das mit VCAM-1 beschichtete Glasplättchen, welches die Flusskammer mithilfe einer Gummidichtung und eines Metallringes einseitig verschließt. Abbildung modifiziert nach [239].

4.7.2.2 Reinigung und Beschichtung der Glasplättchen

Die verwendeten Glasplättchen der Stärke 3 und eines Durchmessers von 18 mm müssen vor Verwendung einem Reinigungs- und Beschichtungsprozess unterzogen werden. Im ersten Schritt wird die Oberfläche derart gereinigt, dass lediglich freie Silanolgruppen des Glases für die weitere Funktionalisierung zur Verfügung stehen. Dazu werden die Plättchen zunächst in einem Gemisch aus sieben Teilen Schwefelsäure 95-97 % und drei Teilen Wasserstoffperoxid 30 % unter Ultraschalleinfluss bei 80°C behandelt. Nach sorgfältigem Waschen in Aqua dem. erfolgt eine weitere Reinigung in einem Gemisch aus einem Teil Ammoniaklösung 26 %, einem Teil Wasserstoffperoxidlösung 30 % und fünf Teilen Aqua dem. unter den o.g. Bedingungen. Nach erneutem Waschen in Aqua dem. werden die Deckgläschen einzeln im Trockenschrank getrocknet. Die Funktionalisierung erfolgt nun durch Cyanurchlorid als Kopplungspartner zwischen der Glasoberfläche und den verwendeten Proteinen. In einer Mischung aus trockenem Chloroform und Cyanurchlorid 1 mg/mL werden die Plättchen unter Ultraschalleinfluss behandelt. Die Hydroxylgruppen der Silanole reagieren unter diesen Bedingungen unter Abspaltung von Chlorwasserstoff mit dem Cyanurchlorid. Nach erfolgtem Spülen der Deckgläschen in trockenem Chloroform werden

sie erneut getrocknet und können dann für mehrere Wochen aufbewahrt werden.

Die so vorbereitete Oberfläche ist nun für eine kovalente Bindung von Proteinen zugänglich. Das Rezeptorprotein VCAM-1 wird zu 0,2 µg in einer Lösung aus 10 µL BSA 4% und 60 µL Boratpuffer pH 8,8 auf ein Plättchen aufgebracht und für mindestens 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Freie, reaktive Gruppen des Cyanurchlorids reagieren bei diesem pH-Wert nun mit freien Aminogruppen des Proteins unter Abspaltung von Chlorwasserstoff. Nach vorsichtigem Abspülen mit Aqua dem. hat sich ein Monolayer aus VCAM-1 auf dem Glasplättchen ausgebildet, welches nun in die Flusskammer eingebaut und für die Versuche verwendet werden kann.

4.7.2.3 Durchführung von Zelladhäsionsexperimenten

Bei den Adhäsionsuntersuchungen eingesetzte Zellen werden unmittelbar vor dem eigentlichen Versuch wie unter Kapitel 4.2.3 beschrieben aus den Zellkulturflaschen abgelöst. Es wird dabei auf den Zusatz von Trypsin verzichtet, um dessen enzymatischer Aktivität gegenüber extrazellulären Proteindomänen und der etwaig resultierenden Funktionseinschränkung vorzubeugen. Nach Waschen mit PBS und Zählen der Zellen, werden diese in einer Konzentration von 1 Mio. Zellen pro 50 µL FKS-freiem Nährmedium resuspendiert.

Die fertig zusammengesetzte Flusskammer wird auf dem inversen Mikroskop Axiovert 200 installiert, dabei befindet sich der beschichtete Glasträger im Strahlengang (siehe auch Abbildung 20). Das Fließmittelvorratsgefäß wird mit auf Raumtemperatur temperiertem PBS-Puffer gefüllt und über den hydrostatischen Druck die unter 4.7.2.1 beschriebene Fließgeschwindigkeit eingestellt. Bei Untersuchungen am Integrin VLA-4 erfolgt zunächst eine fünf minütige Vorinkubation bei 37°C von $1 \cdot 10^6$ Zellen mit 1 mM MnCl_2 und den evtl. zu testenden Substanzen. Bei den Kontrollexperimenten fehlt die jeweilige Manganstimulation. Über die Blasenfalle werden die stimulierten/unstimulierten Zellen alsbald in die Durchflusskammer gespült bis

sie im Mikroskop zu erkennen sind. Der Pufferfluss wird gestoppt und den Zellen für fünf Minuten Zeit zum Sedimentieren und zur Interaktion mit dem Rezeptorprotein gegeben. Anschließend wurde eine Videosequenz aufgenommen und dabei der Pufferfluss wieder eingesetzt, so dass das Verhalten der Zellen optisch erfasst wurde.

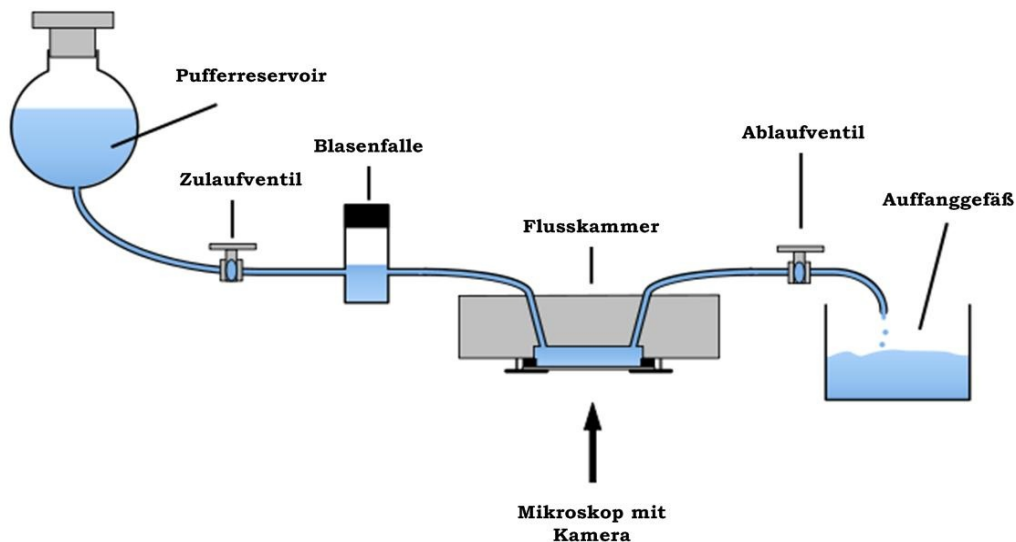


Abbildung 20: **Versuchsaufbau zur Untersuchung der Zelladhäsion unter physiologischen Flussbedingungen.** Aus einem Pufferreservoir wird Fließmedium über eine Blasenfalle in die Flusskammer geleitet. Zulauf- und Ablaufventile erlauben die Unterbrechung des Pufferflusses. Die Blasenfalle erlaubt das Einbringen von Zellen und Testsubstanzen über den Fluss in die Durchflusskammer. Über eine an das Mikroskop angeschlossene Videokamera können die Wechselwirkungen zwischen den Tumorzellen und dem immobilisierten VCAM-1 aufgezeichnet werden. Abbildung modifiziert nach [269].

In der anschließenden Auswertung wurde die Anzahl der auf der VCAM-1 Schicht anhaftenden Zellen zu den Zeitpunkten $t = 0, 1, 2, 3$ und 4 s nach einsetzenden Pufferfluss durch manuelles Zählen bestimmt. Das Ausmaß der jeweiligen Adhäsion wurde als prozentualer Wert bezogen auf den Wert $t = 0$ angegeben.

4.7.3 Zellmigration

Die Zellmigration (von latein. *migrare* = wandern) ist die aktive Ortsveränderung von Zellen. Dabei lässt sich nicht zwischen einer ungerichteten Spontanbewegung und einer gerichteten, chemotaktischen Bewegung unterscheiden. In dieser Arbeit wird zur Untersuchung der Migration und dem Einfluss des Proteins Cyr61 sowie verschiedener Heparine ein Scratch-Assay durchgeführt. Eine modifizierte Version der von Liang et al.²⁴⁰ beschriebenen Methodik wird dabei angewandt.

Die Durchführung der Experimente erfolgt in 6- oder 24-well-Platten. Die Vertiefungen bleiben unbeschichtet oder werden mit Collagen (10 µg/mL) bzw. Fibronectin (20,8 µg/mL) vorab behandelt. Dazu werden die entsprechenden Lösungen im well für 1 h bei 37°C inkubiert. Der flüssige Überstand wird danach durch eine BSA-Lösung mit einer Konzentration von 2 mg/mL ersetzt und erneut für 1 h im Inkubator behandelt. Nach einem Waschschrift mit sterilem PBS werden die bereits parallel abgelösten Zellen (siehe auch Kapitel 4.2.3) zu $1-2,5 \cdot 10^5$ Zellen pro Vertiefung im 6-well- und $1,25 \cdot 10^5$ Zellen pro Vertiefung im 24-well-System hinzugegeben und die Platten im Inkubator aufbewahrt. Den Zellen wird zum Adhärenz mindestens 8 h Zeit gegeben, bevor der weitere Versuchsablauf begonnen wird.

Im Folgenden sollen verschiedene Fragestellungen behandelt werden, so dass die Versuchsausrichtung jeweils angepasst werden muss.

- Vergleich des aCyr61-Klones mit dem Wildtyp

In dieser Variante soll untersucht werden, in wie weit eine verringerte Cyr61-Expression Einfluss auf die Migration der Zellen hat. In der 6-well-Platte befinden sich im direkten Vergleich die entsprechenden Klon und Wildtypzellen. Mit einer 200 µL Pipettenspitze wird dreimal pro Vertiefung parallel zueinander durch die Zellschicht gekratzt ohne die Beschichtung zu beschädigen. Die entstandenen Zellreste werden in einem Waschschrift mit sterilem PBS entfernt und anschließend frisches Nährmedium zugesetzt.

Direkt im Anschluss wird die erste Aufnahme (0 h-Wert) angefertigt und zu festgelegten Zeiten weitere Aufnahmen durchgeführt.

- Zugabe von exogenem Cyr61-Protein

Hier ist der Versuchsaufbau ähnlich wie in der vorangegangenen Untersuchung, allerdings wird dem aCyr61-Klon zuvor rekombinantes Cyr61-Protein exogen supplementiert. Nach erfolgtem Scratch und Zugabe von frischem Nährmedium werden noch vor der ersten Aufnahme je 1, 2 oder 5 µg Cyr61 pro mL Nährmedium jeweils in Triplikaten zugesetzt.

- Zugabe von Heparin

Der Einfluss von verschiedenen Heparinen auf Klon- bzw. Wildtyp-Zellen wird hierbei untersucht. Nach Umsetzung des Scratches wird zur Testung unfraktioniertes Heparin, Enoxaparin-Natrium und Tinzaparin-Natrium zu je 0,5 ng pro Zelle dem Nährmedium zugesetzt und die Aufnahmen durchgeführt.

- Zugabe von Heparinase II

Das Enzym Heparinase II wird in einer Konzentration von 0,25 SigmaUnits (etwa $4,17 \cdot 10^{-4}$ IU) pro Vertiefung bereits vier Stunden vor dem eigentlichen Scratch auf die Zellen gegeben und inkubiert. Nach erfolgtem Scratch wird das Nährmedium auf den Zellen belassen und die Aufnahmen durchgeführt.

6-well-Platten werden am Mikroskop Axiovert 200 vermessen und die Versuche in den 24-well-Platten am Konfokalmikroskop Nikon Eclipse Ti. Die Auswertung erfolgt in unterschiedlichen Modi, so werden bei den 6-well-Platten drei verschiedene Zellfrontabstände („Breite des Scratches“) pro Aufnahme vermessen. Es wird darauf geachtet bei jeder Aufnahmezeit stets denselben Ausschnitt aufzunehmen und auszuwerten.

Die Aufnahmen am Konfokalmikroskop erfolgen durch Einbringen der 24-well-Platte in die Klimakammer, in der die Platten über den gesamten Versuchszeitraum unter optimalen Bedingungen (37°C, 5 % CO₂-Sättigung, Luftfeuchtigkeit von 96 %) verbleiben können. Bei jeder Aufnahme wird

weiterhin derselbe Ausschnitt automatisch angefahren und aufgenommen. Die Analyse der Scratches erfolgt im Anschluss durch das dazugehörige Programm mittels Parallelen-Anlegung.

Die abschließende Auswertung der Daten vergleicht die jeweiligen Geschwindigkeiten der Migration und untersucht sie auf ihre signifikanten Unterschiede (p -Wert).

4.8 Biosensorische Methoden

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten „*surface acoustic wave*“-Biosensor handelt es sich um einen hochsensitiven Massedetektor. Ein Bindungsereignis an einer immobilisierten Struktur führt über die resultierende Massenzunahme zu einem auswertbaren Signal. Im Rahmen dieser Arbeit wird auf die Verwendung des SAW zur Detektion von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen in der Biosensorik eingegangen. Molekulare Interaktionen, wie die eines Adhäsionsrezeptors mit seinem Liganden, können ohne aufwändige Markierung in „*real-time*“ erfasst und angezeigt werden²⁴¹. Kinetische Daten können mit Hilfe einer Software extrahiert werden. Der Vorteil dieses Biosensors für die vorliegende Arbeit liegt in der Variabilität der Sensoroberfläche. Durch chemische Reaktionen kann eine vielfältige Funktionalisierung der Sensoroberfläche erreicht werden. So ist es möglich, verschiedenste Rezeptor-Ligand-Interaktionen zu detektieren und zu quantifizieren.

4.8.1 Charakterisierung und Reinigung der Quarzsensoren

Der S-Sens® K5 verwendet planare, quadratische Quarzscheiben als Einkristall. Sie werden vom Hersteller durch einen ST-Schnitt in einem Winkel von $-42,5^\circ$ zur optischen Achse aus einem Urkristall (α -Quarz) geschnitten. Als Charakteristikum dieser Schnittart ist die Entstehung des Guiding Layers zu nennen. Auf diese Schicht wird unter Reinraumbedin-

gungen eine 150 nm dünne Goldschicht (Cr/Au) in Form der in Abb. 21 dargestellten Struktur aufgedampft.

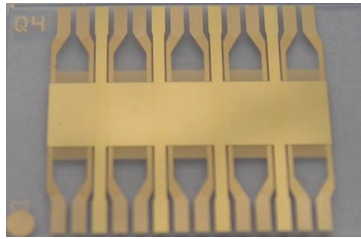
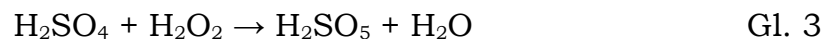


Abbildung 21: **Oberseite der verwendeten Quarze mit Goldkontakten.**

Außerdem gewährleistet dieser Schnitt eine ausgesprochene Temperaturstabilität der entstehenden Schwingung. Die Resonanzfrequenz des Quarzes liegt zwischen 145 und 155 MHz. Die Abmessungen betragen 14 x 19 mm, die Dicke des gesamten Sensors 0,5 mm und die aktive Sensoroberfläche beträgt pro Kanal 7,45 mm², also insgesamt 37,25 mm² für den gesamten Sensor.

Zum Reinigen der Oberfläche der Quarze wird diese mit frisch hergestellter Piranha-Lösung (= Carosche Lösung) benetzt. Dazu werden ein Teil 30 %iger Wasserstoffperoxidlösung mit drei Teilen 95-97 %iger Schwefelsäure unter Wasserkühlung gemischt. Es entsteht Peroxomonoschwefelsäure, die auch Carosche Säure genannt wird.



Der Carosche Lösung wird nach Herstellung kurz im Wasserbad belassen, damit sie abkühlen kann. Für die Reinigung der Quarze wird deren Oberfläche für zwei Minuten mit dieser Lösung bedeckt und anschließend mit Aqua dem. abgespült. Der Quarz wird im Luftstrom getrocknet und der gesamte Vorgang noch zwei weitere Male wiederholt. Danach sind alle Thiolverbindungen auf der Quarzoberfläche oxidativ aufgebrochen. Ein Waschschritt mit Aceton wird zwischen der zweiten und dritten Reinigung mit der Säure durchgeführt, damit auch organische Verunreinigungen wie bspw. anhaftende Lipide entfernt werden.

Nach erneutem Spülen mit Ethanol und anschließendem Trocknen mit synthetischer Luft sind die Quarze wieder in ihrem Urzustand und können für eine erneute Immobilisierung direkt verwendet oder trocken im Kühlschrank gelagert werden.

4.8.2 Beschichtung der Quarzsensoren

Für die Beschichtung der Quarze stehen je nach Anwendung verschiedene Methoden zur Verfügung. Dabei wird zunächst einmal unterschieden, ob die Beschichtung des Quarzes außerhalb der Messeinheit (*ex-situ*) oder innerhalb der Messeinheit, während der Aufzeichnung eines Sensorgrammes (*in-situ*) geschieht. Weiterhin ist die erste Schicht, die Funktionalisierung, auf der Oberfläche des Quarzes entscheidend für die entsprechende Anwendung.

4.8.2.1 *Ex situ*-Immobilisierung von Membranen

In der vorliegenden Arbeit werden ausschließlich Modellmembranen (definierte Phospholipid-Bilayer) über diese Immobilisationsmethode auf den Quarz aufgebracht. Gereinigte Quarze werden für mindestens 12 Stunden in einer Chloroformlösung mit 1 mM Hexadecan-1-thiol eingelegt. Dabei bildet sich ein lückenloser Monolayer durch Reaktion des Thiols mit der Goldoberfläche aus. Dieses Verfahren wird auch „self assembling“ genannt und es entsteht ein sogenannter SAM (engl.: „*self assembled monolayer*“). Nach der Inkubation wird der Quarz mit Ethanol gespült und im Luftstrom getrocknet.

Die Übertragung der Membran erfolgt über die Langmuir-Blodgett-Technik mittels einer Filmwaage. Dazu muss im Vorfeld für jedes Phospholipid bzw. deren Mischungen eine individuelle Bruchkurve ermittelt werden. Die Bruchkurven geben an, bei welchem Kollapsdruck ein komprimierter Lipidfilm seine Ordnung verliert und die Lipide lateral übereinander geschoben werden. Hierzu wird die Langmuir-Blodgett-Filmwaage mit Wasser gefüllt

und das in Chloroform gelöste Lipid mittels Hamiltonspritze in einem Volumen von 10 μL auf die Wasseroberfläche gegeben. In einer Ruhezeit von 10 min verdunstet das Chloroform und den Phospholipiden wird die Möglichkeit gegeben sich entsprechend ihrer Polarität auf der Luft-Wasser-Grenzfläche anzuordnen. Durch die Bewegung einer Barriere mit einer Geschwindigkeit von ca. $330 \mu\text{m s}^{-1}$ wird computergestützt durch die Software Ruk Trough Control der Kollapsdruck ermittelt. Die Lateraldruckänderung wird dabei von einem frei hängenden Kraftaufnehmer als Änderung der Oberflächenspannung verfolgt. Nach Abzug einer gewissen Toleranz erhält man den individuellen Kompressionsdruck für das verwendete Lipid oder eine Lipidmischung. Für die hier verwendeten Lipide und deren Mischungen konnten folgende Kompressionsdrücke ermittelt werden:

Lipid/Lipidmischung	Mol-Verhältnis	Kompressionsdruck
DSPC	100 %	54,0 mN/m
DPPC/DOGS-NTA	80 %/20 %	54,1 mN/m

Tabelle 4.3: Kompressionsdrücke der verwendeten Lipide/Lipidmischungen.

Für die eigentliche Übertragung der Membran wird also nun das gewünschte Membranlipid auf die Wasseroberfläche aufgebracht und entsprechend seinem individuellen Kompressionsdruck der Lipidfilm komprimiert. Ist der Lateraldruck erreicht wird der vorbereitete Quarz senkrecht mit einer Geschwindigkeit von $170 \mu\text{m s}^{-1}$ durch den Lipidfilm in die Wasserphase getaucht. In diesem Vorgang treten Interaktionen in Form von Van-der-Waals-Kräften und hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den hydrophoben Alkanketten der Phospholipiden und der Hexadecanthiolschicht auf, wodurch eine Monolayer-Phospholipid-Schicht komplettiert wird. Verstärkt durch den eingestellten Lateraldruck, welcher in diesem Vorgang auch computergestützt nachjustiert wird, kommt es zur Ausbildung eines hochorganisierten Phospholipidlayers auf der Quarzsensoroberfläche.

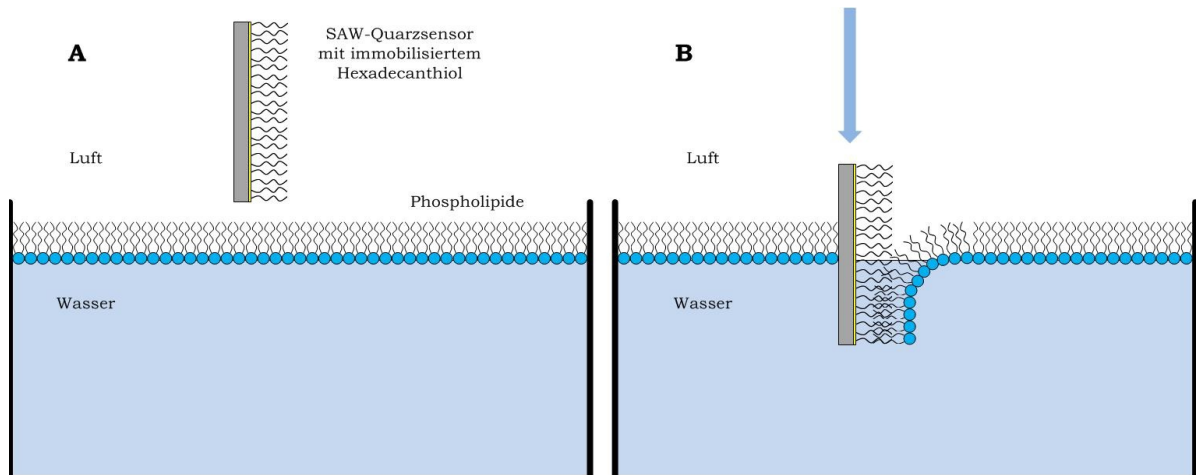


Abbildung 22: **Immobilisierung einer definierten Phospholipidschicht auf die Oberfläche eines SAW-Sensorquarzes mittels Langmuir-Blodgett-Technik.** A) Die Phospholipide haben sich ihrer Polarität entsprechend an der Luft-Wasser-Grenzfläche angeordnet. B) Nach Kompression der Phospholipide taucht der vorbereitete Sensorquarz senkrecht zur Wasseroberfläche in den Langmuir-Trog ein und bindet die Phospholipide über hydrophobe Wechselwirkungen. Es entsteht ein künstlicher Phospholipid-Bilayer auf der Sensoroberfläche. Modifiziert nach^[274].

Der in das Auffanggefäß eingefahrene Quarz wird dem Langmuir-Trog erst entnommen, wenn die restlichen Lipide auf der Oberfläche entfernt wurden.

Der SAW erfordert für den Einbau in die Messzelle absolut trockene Quarze um Beschädigungen an der Messeinrichtung oder Kurzschlüsse während des Messprogrammes zu verhindern. Die mittels Langmuir-Blodgett-Technik übertragenen Membranen dürfen jedoch nicht mit Luft in Kontakt kommen, da dies zum Kollabieren des Phospholipidlayers führen kann. Um diese Situation zu umgehen wird eine besondere Trocknungstechnik des o.g. beschichteten Quarzes angewandt, welche sich aus der Kryopräservierung verschiedener Pflanzen und Bakterien ableitet^{242,243}. Dazu wird das im Auffanggefäß befindliche Wasser weitestgehend entfernt, so dass der Quarz noch nass bleibt und durch eine 1,66 μM Trehalose-Lösung ersetzt. Der Quarz verbleibt für 15 min in dieser Lösung und wird anschließend bei Raumtemperatur getrocknet. In diesem Prozess lagert sich die Trehalose (siehe auch Abb. 23) zwischen die Phospholipidköpfe des Lipidlayers ein. Während des Trocknens stabilisiert das Disaccharid den Lipidfilm und schützt ihn vor dem zu erwartenden Kollaps²⁴⁴. Der so getrocknete

Quarz kann unter trockenen Bedingungen mehrere Tage gelagert werden und lässt sich in die Sensoreinheit des SAW-Sensors einbauen. Durch den Pufferfluss wird die Trehalose ausgespült und die Membran wieder rehydriert.

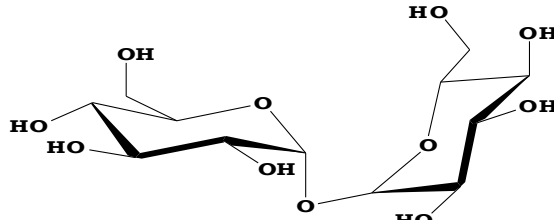


Abbildung 23: **Strukturformel der Trehalose.** Trehalose ist ein Disaccharid, welches aus zwei α, α' -1,1-glykosidisch verknüpften Glucose Molekülen besteht. Beide anomere C-Atome sind an der O-glycosidischen Bindung beteiligt, damit gehört Trehalose zu den nicht-reduzierenden Zuckern.

Bei den SAW-Messungen finden diese Membran-beschichteten Quarze eine besondere Verwendung. Durch den Einbau des Kopfgruppen modifizierten Chelator-Lipids DOGS-NTA (siehe auch Struktur unter Kapitel 4.1.3.1 auf Seite 57) können bspw. His-getaggte Proteine an die Lipidoberfläche gebunden werden. Die Abbildung 24 zeigt schematisch die Bindung der His-Sequenz an das im NTAⁱ chelatisierte Nickel-Ion. Somit ergibt sich im Verlauf der Messung, nach Zugabe des jeweiligen Protein-Histags eine nahezu naturgemäße Darstellung von exponierten Proteinen auf einer Lipidmembran wie sie bspw. auch zell- oder endothelständig zu finden sind.

i NTA = engl.: *Nitrilotriacetic acid* (Nitrilotriessigsäure)

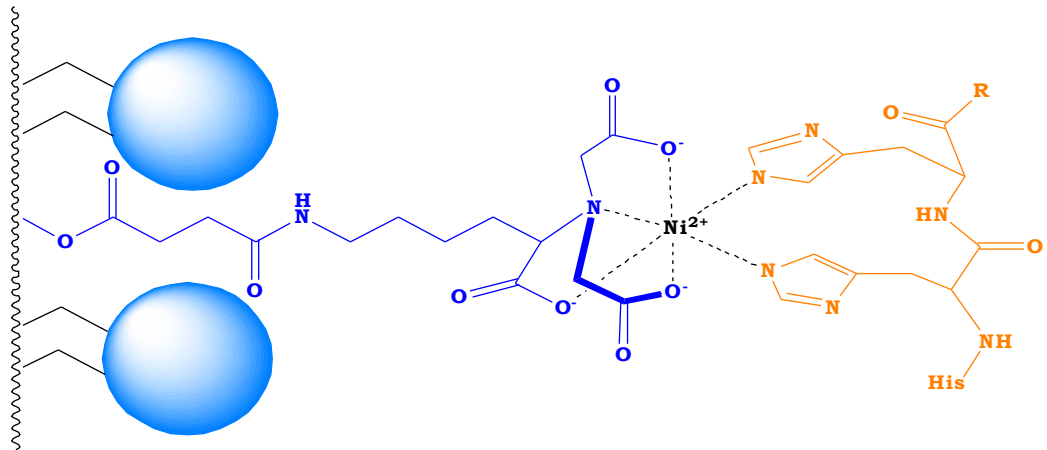


Abbildung 24: **Die Abbildung zeigt die Bindung des His-Sequenz (orange) über NTA-Ni²⁺ (dunkelblau).** Das Nickel-Ion wird über das Kopfgruppen-Chelatorlipid DOGS-NTA über den anderen Phospholipidköpfen (schematisch, hellblau) der Membran exponiert. Abbildung modifiziert nach [268].

Bisher konnten Messungen an Membranen nur über die Herstellung von Membranpräparationen aus Ganzzelllysaten oder Liposomen erfolgen. Die aufgereinigten Präparationen wurden dann als Membranfraktion vesikulär auf dem Sensor immobilisiert⁷⁵. Dazu wurde die Sensoroberfläche zuvor mit einer 10 mM Lösung Thioglucose behandelt. Diese bindet mit ihrem Thiol an die Goldoberfläche und hydrophilisiert die Oberfläche nach außen mit ihren Hydroxygruppen. Membranvesikel lagern sich dann gemäß ihrer Polarität an den hydrophilen Gruppen bzw. an der hydratisierten Oberfläche an. Der Ordnungsgrad dieser Anlagerung ist allerdings nicht hoch und variiert auch je nach proteinogener Zusammensetzung der Membranfraktion.

4.8.2.2 *In situ*-Immobilisierung von Proteinen

Die gereinigten Quarze werden für die *in situ*-Immobilisation zuvor mindestens 12 Stunden in einer ethanolischen Lösung (wasserfrei) aus Mercaptoundecansäure mit einer Konzentration von 200 mM bei RT eingelegt. Dabei bildet sich ebenfalls wie bereits oben beschrieben ein lückenloser Monolayer aus.

Der Quarz wird anschließend aus der Thiollösung entnommen und mit 96%igem Ethanol abgespült, im Luftstrom getrocknet und trocken im Kühlschrank bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Zur eigentlichen Immobilisierung wird ein Quarz mit Carboxylat-SAM-Beschichtung in die Messzelle des Biosensors eingebaut. Die weitere Beschichtung des Sensors gliedert sich in die folgenden Teilschritte:

- 1) Aktivierung der Säurefunktion mit Hilfe von EDC/NHS
- 2) Schaffung von stabilen Säureamidbindungen zwischen dem zu immobilisierenden Protein und EDC/NHS
- 3) Absättigung freier Bindungsstellen durch eine Mischung von Ethanolamin und Ammoniumacetat.

Eine 400 mM EDC-Lösung in Phosphatpuffer wird mit einer 100 mM NHS-Lösung in Phosphatpuffer unmittelbar vor dem Versuch zu gleichen Teilen in einem Probengefäß miteinander gemischt.

Das zu immobilisierende Protein sollte in Lösung möglichst hochkonzentriert vorliegen. Als Puffer bieten sich hier sowohl der o.g. Phosphatpuffer als auch PBS-Puffer oder auch Wasser an.

Zur Absättigung frei gebliebener Bindungsstellen an der aktivierten Carbonylfunktion wird eine Mischung aus gleichen Teilen einer 2 M Ammoniumacetat-Lösung und einer 2 M Ethanolamin-Lösung (pH 8,5) verwendet.

Die ablaufenden Vorgänge auf molekularer Ebene soll Abbildung 25 verdeutlichen.

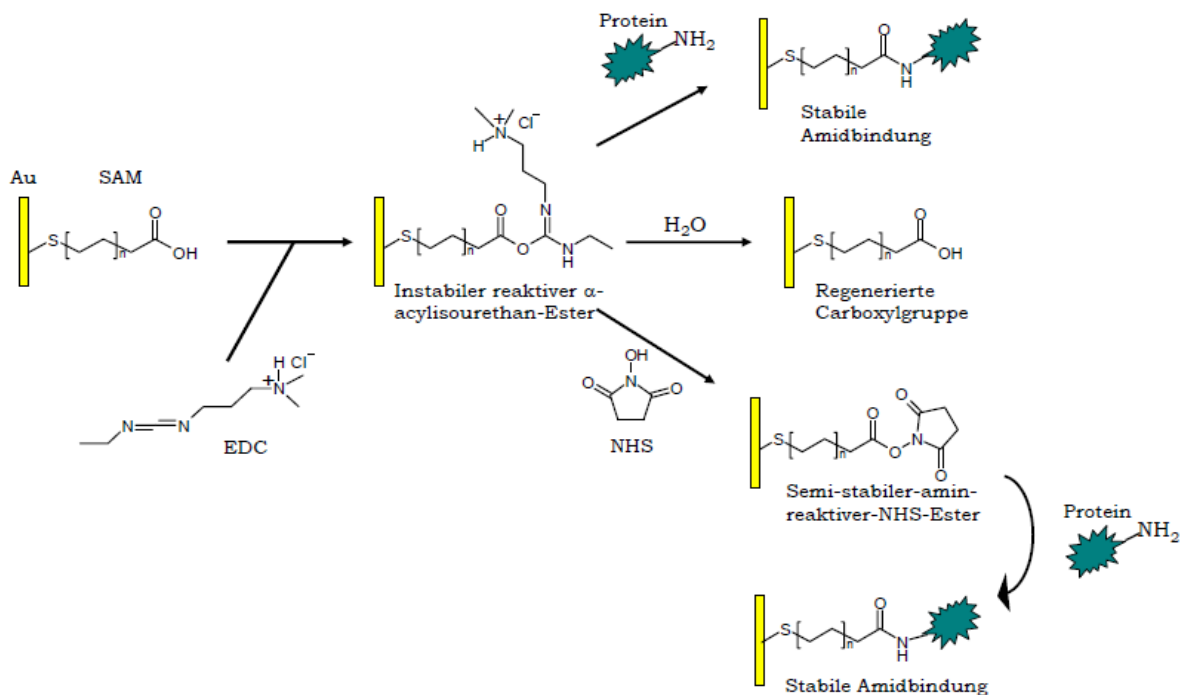


Abbildung 25: **Schematische Darstellung der Reaktionen während einer Protein-Immobilisierung mit EDC/NHS.** Die Carbonylfunktion wird durch das EDC zu einem reaktiven Ester aktiviert. Dieser reagiert entweder direkt mit Aminofunktionen eines Proteins oder reagiert weiter mit NHS zu einem reaktiven NHS-Ester. Der NHS-Ester kann durch Aminofunktionen der Proteine substituiert werden. Der reaktive EDC-Ester kann auch hydrolysiert werden, wodurch wieder die Carboxylgruppe vorliegt.

Nach erfolgter Immobilisierung des Proteins kann außerdem noch eine 5 %ige wässrige Glycerol-Lösung injiziert werden. Mit dieser kann bei Proteinimmobilisationen ein Gehalt an tatsächlich an der Oberfläche gebundenem Protein errechnet werden. Dazu macht man sich die Eigenschaft des Glycerols zu Nutze, nur einen Viskositätseffekt ohne Masseffekt bei der Messung mit dem SAW hervorzurufen (siehe Kapitel 4.8.3).

Nach der Immobilisierung kann der Puffer gewechselt werden. Üblicherweise werden Messungen mit dem Biosensor in PBS-Puffer durchgeführt. Allerdings muss sich nach erfolgtem Pufferwechsel das System zunächst äquilibrieren. Dies ist in der Amplitude durch die Viskositätsänderung optisch erkenntlich. Die Frequenz ändert sich durch eine in verschiedenen Puffern veränderte Hydratisierung der jeweiligen Proteine ebenfalls. Die

eigentliche Messung mit Injektion von Bindungspartnern kann demnach erst erfolgen, wenn sich ein gleichmäßiger Frequenzverlauf eingestellt hat.

4.8.3 Messung mit dem S-Sens[®] K5

Wie bereits in Kapitel 4.8.1 beschrieben, besitzt jeder Quarz auf Grund seiner natürlichen Kristallstruktur ein ganz individuelles Schwingungsverhalten mit eigenem Frequenzoptimum. Zur Ermittlung dieses Frequenzoptimums wird nach Einbau des Quarzes in die Messeinheit zunächst ein Spektrum aufgenommen. Dabei wird an den Quarz eine steigende Frequenz von 142-155 MHz angelegt und die Phasenverschiebung sowie die Amplitude des Quarzes aufgezeichnet. Die Flussrate des Puffers wird mit 40 $\mu\text{L}/\text{min}$ ebenso wie die Temperatur mit 22°C konstant gehalten. Anhand des aufgenommenen Spektrums kann der Zustand des eingelegten Quarzes bestimmt werden. Diese kann durch kleine Kratzer auf der Sensoroberfläche oder durch unsachgemäße Reinigung variieren. Nach Festlegung des Frequenzoptimums für diesen Quarz kann mit der eigentlichen Messung begonnen werden.

Durch die Aufzeichnung in Echtzeit ist es möglich, dem Phasenverlauf direkt anzusehen, ob ein Bindungsereignis stattfindet. So lässt sich auch verfolgen, ob die Immobilisationsroutine für Proteine erfolgreich verläuft und tatsächlich Protein auf dem Sensor immobilisiert wird. Abbildung 47 zeigt den typischen Verlauf einer derartigen Immobilisationsroutine. Zunächst schwingt der Quarz ein, bis er einen konstanten Frequenzverlauf aufweist. Es folgt die Injektion der EDC/NHS-Lösung zur Aktivierung der Carboxylgruppe. Im Anschluss daran wird die Proteinlösung injiziert. Die Basislinie verändert ihre Lage und weist nach der Injektion eine größere Phase auf. Somit lässt sich feststellen, dass auf der Sensoroberfläche Protein gebunden hat und der Quarz nun mit einer vergrößerten Masseauflagerung schwingt. Die aktivierten, aber noch freien Bindungsstellen werden dann durch die Injektion von Ammoniumacetat/Ethanolamin geblockt. Auch dies ist im Frequenz-Verlauf ersichtlich.

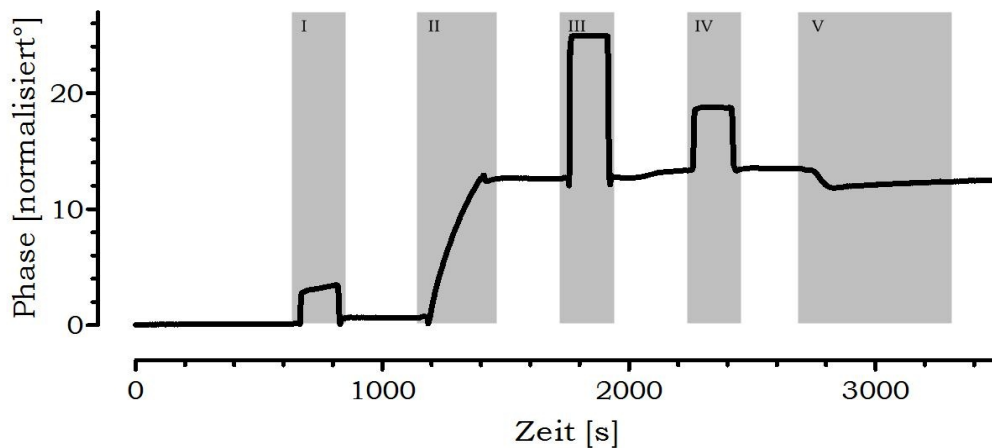


Abbildung 26: **Darstellung des Frequenzverlaufs bei einer typischen Immobilisationsroutine.** Bei I erfolgt die Aktivierung der Carbonylfunktion durch Injektion von EDC/NHS. Daran schließt sich die Injektion des Proteins an (II), so dass es im Verlauf der Injektion zu einem charakteristischen Peak kommt. Unter III werden die unspezifischen und freien Bindungsstellen durch Ammoniumacetat/Ethanolamin abgeblockt. Unter IV folgt die Injektion einer 5 %igen (m/V) Glycerollösung. Nach der Immobilisationsroutine folgt das Umpuffern des Laufpuffers von Wasser auf PBS, dies wird am Peak bei V deutlich.

Nach erfolgter Immobilisationsroutine besteht die Möglichkeit, das Ausmaß an gebundenem Protein zu quantifizieren. Dazu injiziert man eine 5 %ige Lösung von Glycerol im jeweiligen Laufpuffer. Durch die Biosensorsoftware kann dieser Viskositätseffekt mathematisch von anderen Peaks abgezogen werden, so dass deren Intensität um das Viskositätssignal vermindert wird. Nach dieser Operation bleiben Peaks übrig, die nur durch eine Masseänderung hervorgerufen wurden. Die tatsächliche Phasenveränderung durch die Proteinimmobilisation wird ermittelt. Diese Frequenzänderung kann in die Gleichung 4 eingesetzt werden, und man erhält die tatsächlich auf dem Quarz immobilisierte Menge an Protein.

$$m[\text{g}/\text{cm}^2] = \frac{\Delta\phi * 0,000001}{515} \quad \begin{array}{l} m = \text{Masse an Protein} \\ \Delta\phi = \text{Frequenzänderung} \end{array} \quad \text{Gl. 4}$$

Gleichung 4 wurde von Gronewold et al. zusammengestellt, nachdem sie fluoreszenzgelabelte Proteine immobilisiert und deren Frequenzänderung gemessen hatten. Anschließend wurden die so immobilisierten Proteine fluoreszenzspektroskopisch ausgezählt. Aus dem gefundenen Zusammenhang

geht hervor, dass 1 μg Protein pro cm^2 Sensoroberfläche eine Frequenzänderung von 515 Einheiten bewirkt²⁴⁵.

Die Ermittlung von Bindungskonstanten erfolgt bei Anwendung des SAW-Biosensors durch die Vermessung von Konzentrationsreihen. Bindungsereignisse können dadurch in Abhängigkeit der Konzentration des Analyten bestimmt werden. Durch nicht-lineare Kurvenregression werden Bindungskurven aus mathematischen Modellen an den tatsächlichen Kurvenverlauf angepasst. Grundlage bildet ein einfaches 1:1-Bindungsmodell. Die verwendete Software ermittelt u.a. die sogenannte k_{obs} , also eine Assoziationskonstante bei einer ganz bestimmten Konzentration. Der Wert, den k_{obs} annimmt, ist linear abhängig von der Konzentration $[X]$ des Analyten. Trägt man die für die verschiedenen Konzentrationen ermittelten k_{obs} gegen die Konzentration selber auf, so erhält man durch lineare Regression der erhaltenen Punkte eine Geradengleichung gemäß Gleichung 5.

$$k_{obs} = k_{Ass} [X] + k_{Diss} \quad \text{Gl. 5}$$

Aus der Steigung der erhaltenen Geraden kann man k_{Ass} ableiten, der y-Achsenabschnitt liefert k_{Diss} . Die Gleichgewichtsbindungskonstante ergibt sich dann aus Gleichung 6.

$$K_D = \frac{k_{Diss}}{k_{Ass}} \quad \text{Gl. 6}$$

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Charakterisierung der shRNA-transfizierten PC-3 Zellen

Die Prostatakarzinomzelllinie PC-3 eignet sich durch ihr breites Integrinspektrum gut, um Untersuchungen zum Migrationsverhalten auf verschiedenen Substraten durchzuführen. Aus der Literatur ist bekannt, dass diese Zelllinie Cyr61 in hohen Maßen exprimiert und die Produktion von außen durch verschiedene Stimuli zu beeinflussen ist^{205,246}. Die Herunterregulation des Cyr61 in den Zellen sollte somit einen Einblick geben können, in wie weit Cyr61 modulierend auf die Integrinfunktion während der Migration einwirken kann.

Das Einbringen von artifizieller DNA in einen Organismus stellt einen massiven Eingriff in das natürliche Gleichgewicht des Zellzyklus dar. Das hier eingebrachte Plasmid zur shRNA gesteuerten Herunterregulation bestimmter Proteine wird während des üblichen Zellzyklus exprimiert und transkribiert. Zelluläre Proteine sind somit mit dieser fremden genetischen Information „beschäftigt“ und der gewöhnliche zelluläre Ablauf wird beeinträchtigt. Dieses Kapitel soll, neben der eigentlichen Charakterisierung der Transfektionseffizienz und dem tatsächlichen Ausmaß der Ziel-Protein-Herunterregulation, auch einen Einblick in die Folgen für die eigentliche Proteinexpression einiger ausgewählter Integrine und Kinasen eröffnen. Es

soll somit die Möglichkeit gegeben werden, das komplexe Zusammenspiel der einzelnen Proteine im Zell- und Signalling-Prozess besser zu verstehen.

5.1.1 Cyr61 Expression in der Zelllinie PC-3

Das kommerziell erhältliche shRNA-Plasmid wird, nachdem es aus dem E. Coli-Stamm amplifiziert, gewonnen und gereinigt wurde, lipidbasiert in die PC-3-Zelllinie transfiziert. Nach erfolgter Puromycin-Selektion werden die positiven Plasmidträger unter optimalen Bedingungen kultiviert und für die durchflusszytometrischen Untersuchungen präpariert, bzw. konfluente Zellkulturflaschen einer Zellyse unterzogen, um die Proteine für die SDS-PAGE mit anschließendem Westernblot zu gewinnen. Die Cyr61 Expression des so geschaffenen Klones soll somit im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp untersucht werden.

Es wurden insgesamt fünf verschiedene Plasmide transfiziert, die sich in ihrer Basenabfolge teilweise minimal unterscheiden. Es soll somit gewährleistet sein, eine perfekt passende Basenpaarung zur Ziel-mRNA zu erhalten um den RISC-Enzymkomplex optimal zur komplementären mRNA zu führen. Die Proteinexpression wird also unterschiedlich stark von den einzelnen Plasmiden beeinflusst. Ziel dieser ersten Untersuchungen ist es also, das Plasmid mit der höchsten Effizienz in Bezug auf die Herunterregulation des Cyr61-Proteins in der verwendeten PC-3-Zelllinie ausfindig zu machen.

5.1.1.1 Durchflusszytometrische Untersuchungen

In Kapitel 2.4.3 ist beschrieben, dass es sich bei Cyr61 um das Genprodukt eines *immediate-early gene* handelt, also dass, das CCN1-Protein erst nach bestimmten Stimuli exprimiert wird. In den hier getätigten Versuchen wurde eine Nährmediumsaktivierung von einer Stunde durchgeführt. Dafür wurden die kultivierten Zellen mit einem sogenannten „Hungermedium“ versetzt, welches nur 0,5 % FKS enthält. In diesem Medium erfolgte die Kultivierung für mindestens 24 Stunden, i.d.R aber für 48 Stunden, bevor

dann ein Mediumswechsel zu einem mit 10 % FKS-Anteil versehenen Medium (Vollmedium) durchgeführt wurde. Dieses wurde für eine Stunde auf den Zellen belassen und die Zellen dann für den Versuch präpariert.

Die Ergebnisse kennzeichnen in der PC-3 Zelllinie Klon 5 als den vielversprechendsten in Bezug auf die reduzierte intrazelluläre Cyr61 Konzentration. Bei diesen Zellen ist die Cyr61 Expression auf etwa 30 % der Expression von Wildtypzellen herabgesetzt. Von den erschaffenen Klonen zeigt dieser also die höchste Transfektionseffizienz (Daten der anderen Klone hier nicht weiter gezeigt) und wird für die nachfolgenden Versuche weiter kultiviert. Dieser Klon wird in der vorliegenden Arbeit weiterhin als PC-3 aCyr61 Klon bezeichnet.

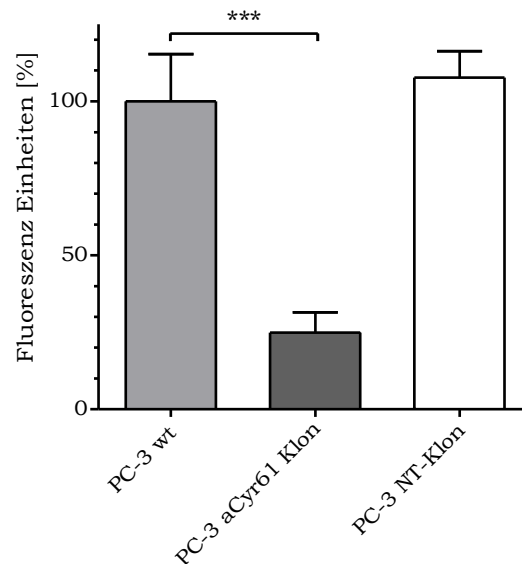


Abbildung 27: **Cyr61 Expression des PC-3 Wildtyp, PC-3 aCyr61 Klon 5 und PC-3 NT-Klon nach einer Stunde Mediumstimulation.**

Nach seiner Expression wird Cyr61 vesikulär gespeichert und zum größten Teil rasch sekretiert. Es muss daher ermittelt werden, zu welchem Zeitpunkt nach Beginn der Stimulation eine ausreichende Proteinmenge in der Zelle vorliegt, um eine Aussage über die maximal mögliche Produktion der Zellen treffen zu können. Die Produktion des intrazellulären Cyr61 kann dann mit der sekretierten Menge korreliert werden. Im Rahmen der Untersuchungen wurde daher auch überprüft, ob die Aktivierung mit Vollmedium für eine Stunde ausreichend ist und verschiedene Zeitspannen in der Nähr-

mediumsaktivierung miteinander verglichen. Es wurden Versuche, in denen die Inkubationszeiten zwischen 1, 2, 3 und 4 Stunden variiert wurden, unter ansonsten gleichen Bedingungen zur Kontrolle durchgeführt.

Es zeigt sich, dass eine Nährmediumsaktivierung von einer Stunde die sicherste Aussage liefert, da der Wildtyp zu diesem Zeitpunkt bereits massiv Cyr61 produziert hat und die Klonzellen nur auf ca. $\frac{1}{3}$ dieser Proteinmenge kommen (siehe Abbildung 28). Für die nachfolgenden Untersuchungen ist genau diese große Differenz in der Cyr61 Expression relevant, um überhaupt Aussagen zum Cyr61-Einfluss treffen zu können.

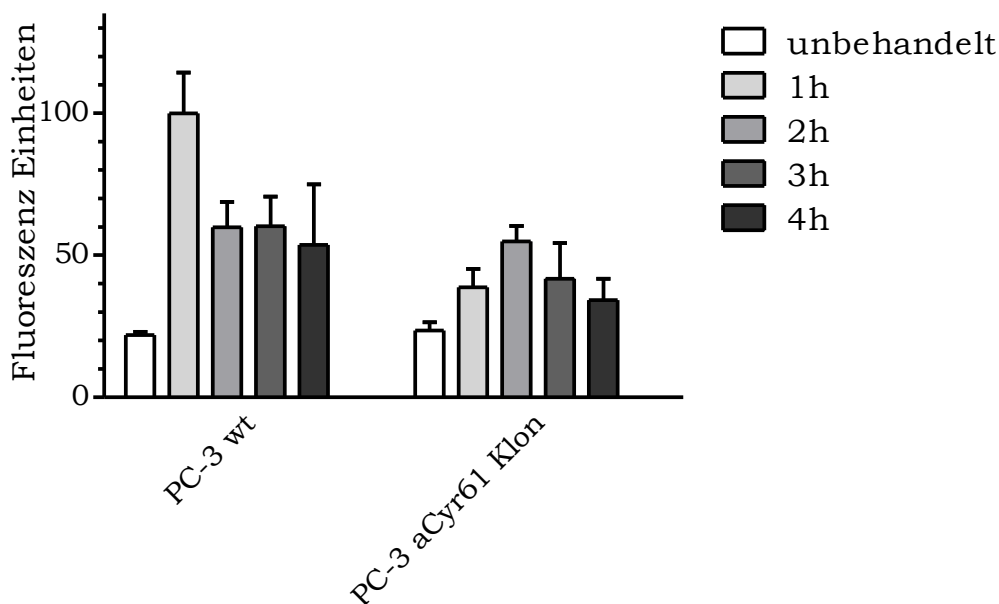


Abbildung 28: **Cyr61 Expression des PC-3 Wildtyp und PC-3 aCyr61 Klon nach verschiedenen Stimulationszeiten.**

Der Abbildung kann man weiterhin entnehmen, dass der unbehandelte Zustand sehr variabel in seiner Cyr61 Expression erscheint. So könnte der Klon in diesem Fall sogar mehr Cyr61 als der Wildtyp aufweisen. Diese Erkenntnis legt nahe, dass es sehr wichtig ist, die Zellen vorher absolut gleichmäßig zu behandeln und eine Stimulation durchzuführen. Die Reproduzierbarkeit ist sonst nicht gegeben, da man nicht weiß in welchem Zustand oder Zellzyklus sich die Zellen gerade befinden und somit der Cyr61 Status stark variieren kann.

5.1.1.2 Proteinbestimmung durch SDS-PAGE und Western-Blot

Eine weitere Untersuchung des Cyr61-Status der Zellen erfolgte durch SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot. Dazu wurden zuvor von den kultivierten Zellen Ganzzelllysate wie unter Kapitel 4.5.1 beschrieben angefertigt. Damit die Ergebnisse untereinander vergleichbar sind, wurde eine Proteinbestimmung zur Quantifizierung des Gesamtproteingehaltes der Lysate durchgeführt. Die einzelnen Gelbahnen wurden dann jeweils mit den Wildtypzellen, den aCyr61 Klonzellen und den NT-Klonzellen sowie einen Proteingrößenstandard versehen und entwickelt.

Da der Proteinanteil des Cyr61 im Gesamtprotein der Zelle nur einen geringen Anteil ausmacht, wurde eine Proteinaufreinigung mittels Heparin-Agarose durchgeführt. Cyr61 soll somit nach der Aufreinigung einen größeren Anteil im verbleibenden Lysat ausmachen und durch die spezifische Antikörperreaktion detektiert werden können.

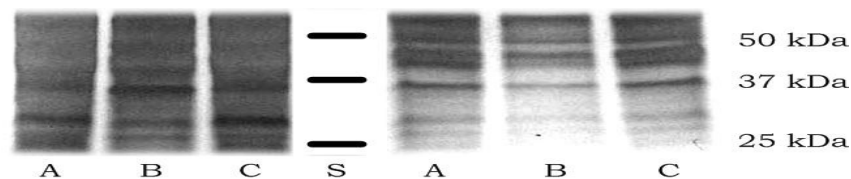


Abbildung 29: **Silberfärbung des SDS-PAGE Gels stimulierter PC-3 Zellen.**

A) PC-3 Wildtypzellen B) PC-3 aCyr61 Klonzellen C) PC-3 NT-Klonzellen S) Proteinstandard

Dargestellt ist der Molekularbereich von 25 kDa bis ca. 55 kDa, links des Proteinstandards (S) sind die unbehandelten Ganzzelllysate, rechts dargestellt sind die Lysate nach Aufreinigung über Heparin-Agarose. Die Darstellung der Silberfärbung erfolgt hier in Graustufen, um Intensitäten besser ausmachen zu können.

Abbildung 29 zeigt im direkten Vergleich die Ganzzelllysate unbehandelter und über Heparin-Agarose „aufgereinigte“ Zelllysate im entsprechenden Molekulargrößenbereich des Cyr61. Es resultieren deutlich schärfere Banden durch die Aufreinigung und das Gesamtprotein scheint wirklich auf heparinbindende Moleküle angereichert zu sein. In der dargestellten Silberfärbung sind allerdings optisch keine Unterschiede in der Expression bestimmter Moleküle innerhalb der unterschiedlichen Zellarten zu erkennen. Dennoch ermöglicht die Anfärbung des Gesamtproteins eine ungefähre

Vorstellung wie Proteine von Interesse im Vergleich zum Gesamtprotein größenmäßig verteilt bzw. exprimiert werden. Hier dargestellt sind die Lysate der Zellen, die zuvor eine Mediumstimulation erfahren haben. Gegenüber den unstimulierten Zellen ergibt sich in der Darstellung des Gesamtprotein-gehaltes über die Silberfärbung allerdings kein Unterschied.

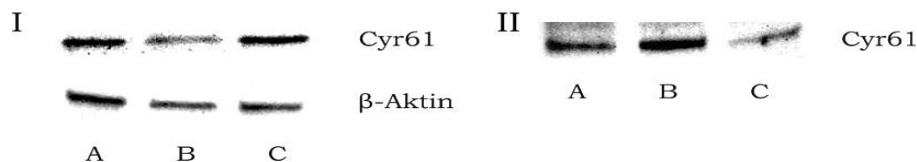


Abbildung 30: **Western-Blot stimulierter PC-3 Zellen.** Aufgetragen sind die Ganzzelllysate I) stimulierter PC-3 Zellen, II) stimulierter PC-3 Zellen nach Aufreinigung über Heparin-Agarose.

A) PC-3 Wildtypzellen B) PC-3 aCyr61 Klonzellen C) PC-3 NT-Klonzellen

Die Molekulargrößen und Intensitäten der Banden nach halbquantitativer Auswertung in Abbildung 30 I verhalten sich nach Normalisierung der Bande der Wildtypzellen auf 100 % wie folgt: A = 39,3 kDa, 100 %, B = 39,1 kDa, 40,1 %, C = 39,2 kDa, 112,3 %

Im Western-Blot wird die Proteinmenge über die Chemilumineszenz-Reaktion sichtbar. Cyr61 wird von den aCyr61-Klonzellen nach vorheriger Mediumstimulation weniger exprimiert als von ihren entsprechenden Wildtypzellen (100 % zu 40,1 %). Die homogen erscheinende β -Aktin Bande zeigt, dass gleiche Mengen Gesamtprotein in den Laufbahnen aufgetragen wurden. Die detektierten Banden im Blot der zuvor über Heparin-Agarose aufgereinigten Lysate zeigen, dass Cyr61 die Prozedur überstanden hat und mit der Antikörperreaktion zu erfassen ist (siehe Abbildung 30 II). Es ist allerdings nach der Aufreinigung kein Unterschied in der Expression in den unterschiedlichen Zelltypen mehr auszumachen. Die Agarose scheint die unterschiedlichen Mengen an Cyr61 zu binden, allerdings bei der nachfolgenden Elution aber nur in einem identischen Maße, unabhängig von der zuvor aufgenommenen Menge, wieder frei zu setzen. Eine Differenzierung der Expressionsraten ist somit nicht möglich.

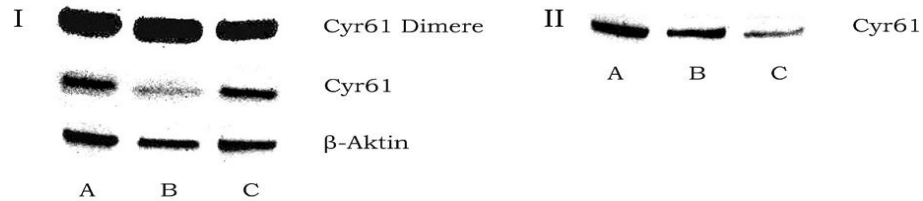


Abbildung 31: **Western-Blot unstimulierter PC-3 Zellen.** Aufgetragen sind die Ganzzelllysate I) unstimulierter PC-3 Zellen, II) unstimulierter PC-3 Zellen nach Aufreinigung über Heparin-Agarose.

A) PC-3 Wildtypzellen B) PC-3 aCyr61 Klonzellen C) PC-3 NT-Klonzellen

Die Molekulargrößen und Intensitäten der Banden nach halbquantitativer Auswertung in Abbildung 31 I verhalten sich nach Normalisierung der Bande der Wildtypzellen auf 100 % wie folgt: A = 42,8 kDa und 83,2 kDa, 100 %, B = 41,7 kDa und 80,4 kDa, 62,3 %, C = 40,9 kDa und 79,3 kDa, 150,2 %

Der Western-Blot unstimulierter PC-3 Zellen (zuvor keine Mediumsstimulation durchgeführt) zeigt neben den Banden bei ca. 40 kDa weitere Banden bei ca. 80 kDa. Neben dem Cyr61 Monomer wird demnach auch ein entsprechendes Dimer vorliegen und ebenfalls mit dem Antikörper reagieren. Diese Beobachtung konnte ausschließlich bei den PC-3 Zellen im unstimulierten Zustand gemacht werden, alle anderen durchgeführten Western-Blots haben ausnahmslos eine Bande im Molekulargrößenbereich des Cyr61 Monomer zeigen können. Auffällig ist die Intensität bei den Banden des Dimeres, so ist auch hier kein Unterschied in den Zelltypen zu erkennen, obwohl das Monomer nach halbquantitativer Auswertung nur 62,3 % zu der Intensität des Wildtyps aufweisen kann.

5.1.2 Untersuchung des Integrinstatus transfizierter PC-3 Zellen

Die Migration der Zellen erfolgt über ein komplexes Zusammenspiel von Zell- und EZM-Bestandteilen (siehe Kapitel 2.4.1). Es ist in diesem Zusammenhang interessant, das Expressionsmuster der Integrine auf den Zellen zu bestimmen um mögliche Bindungspartner des Cyr61 oder der verwendeten EZM-Bestandteile zu charakterisieren. Es wurde daher für die PC-3 Zelllinie der Integrinstatus einiger ausgewählter Integrine, wie in Kapitel 4.4.2 beschrieben, bestimmt. Es wird jeweils der Wildtyp mit dem

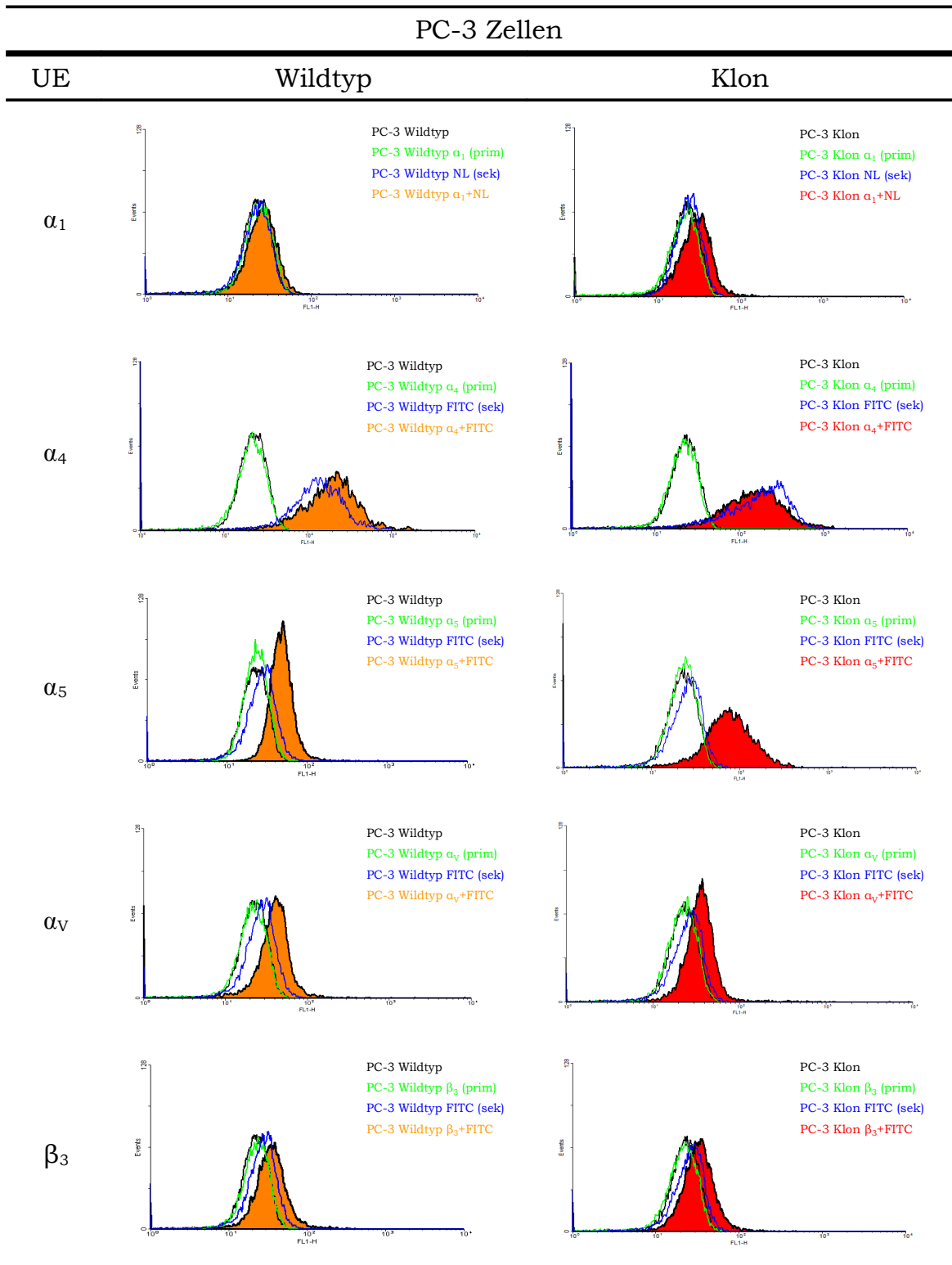
Cyr61-defizienten-Klon verglichen. Die dargestellten Graphen wurden aus mindestens drei verschiedenen Fluoreszenzspektren ausgewählt, wobei der Repräsentativste stellvertretend für alle drei unabhängigen Experimente gezeigt wird.

In den Graphen sind die Fluoreszenzen von Zellen ohne Antikörperbindung (schwarz), von Zellen mit primären Antikörpern (grün) und mit sekundären Antikörper (blau) gezeigt. Der orange bzw. rot ausgefüllte Graph zeigt die Wildtyp- oder Klonzellen mit spezifischer Markierung der Zielstruktur durch Primär- und Sekundärantikörper.

Die Graphen teilen auf ihrer X-Achse die Fluoreszenzintensität in dekadischen Logarithmen ein und auf ihrer Y-Achse ist die durch das Durchflusszytometer registrierte Anzahl an Fluoreszenzereignissen aufgetragen. Eine Rechtsverschiebung der Kurve bedeutet somit, dass höhere Fluoreszenzintensitäten gemessen wurden, d.h. in diesem Fall das vermessene Integrin in höherer Konzentration/Expression registriert worden ist. Eine Linksverschiebung kommt demzufolge einer verminderten Expression gleich.

Die Überprüfungen der unspezifischen Fluoreszenzen der Primär- und Sekundärantikörper sind ein wichtiges Mittel, um die Aussagekraft der Messung zu überprüfen. In den meisten Fällen ist die Fluoreszenzintensität des primären Antikörpers ebenso groß wie die Eigenfluoreszenz der Zellen. Dahingegen weisen die Fluoreszenzen der sekundären Antikörper ein inhomogenes Bild auf. Zum einen zeigen sie eine ähnlich niedrige Fluoreszenzintensität wie die des primären Antikörpers bzw. der Eigenfluoreszenz der Zellen. Zum anderen liegt sie, vor allem bei der Vermessung der α_4 Integrin-UE annähernd so hoch wie die der Messung von Primär- und Sekundärantikörper. Für die Untersuchung der α_4 UE wurde ein sekundärer Antikörper verwendet, der an die Fc-Chimäre der IgG-Struktur des Natalizumab bindet.

Tabelle 5.1: Integrinstatus der PC-3 Zelllinie, Wildtyp und Cyr61-defizienter Klon.



Die PC-3 Zellen sollen in den nachfolgenden Untersuchungen einem Migrationsversuch unterzogen werden, es ist daher von Interesse welche

Integrine tatsächlich und in welchem Ausmaß exprimiert werden. Die Migrationsfähigkeit auf den unterschiedlichen Substraten kann somit mit den entsprechenden Integrinen korreliert werden. Ebenso kann eine mögliche Auswirkung der Transfektion durch die Cyr61 Downregulation einen Einfluss auf das Integrinmuster haben.

Auffällig ist zunächst eine sehr weite Rechtsverschiebung, also hohe Fluoreszenz, im Graph der α_4 -Untereinheit welche sich weder durch die Eigenfluoreszenz der Zellen noch durch die des primären Antikörpers erklären lässt. Jedoch zeigt der verwendete sekundäre Antikörper, der gegen humanes IgG gerichtet ist, eine sehr hohe unspezifische Fluoreszenz.

Die PC-3 Zellen weisen die Integrin-Untereinheiten α_1 und α_4 nicht auf und exprimieren nur im geringen Maße die Untereinheiten α_V und β_3 . Die Untereinheit α_5 wird hingegen auf der Zelloberfläche dargestellt, wobei in den Klonzellen sogar von einer stärkeren Expression gegenüber den Wildtypzellen ausgegangen werden kann.

5.2 Migrationsverhalten der transfizierten PC-3 Zellen

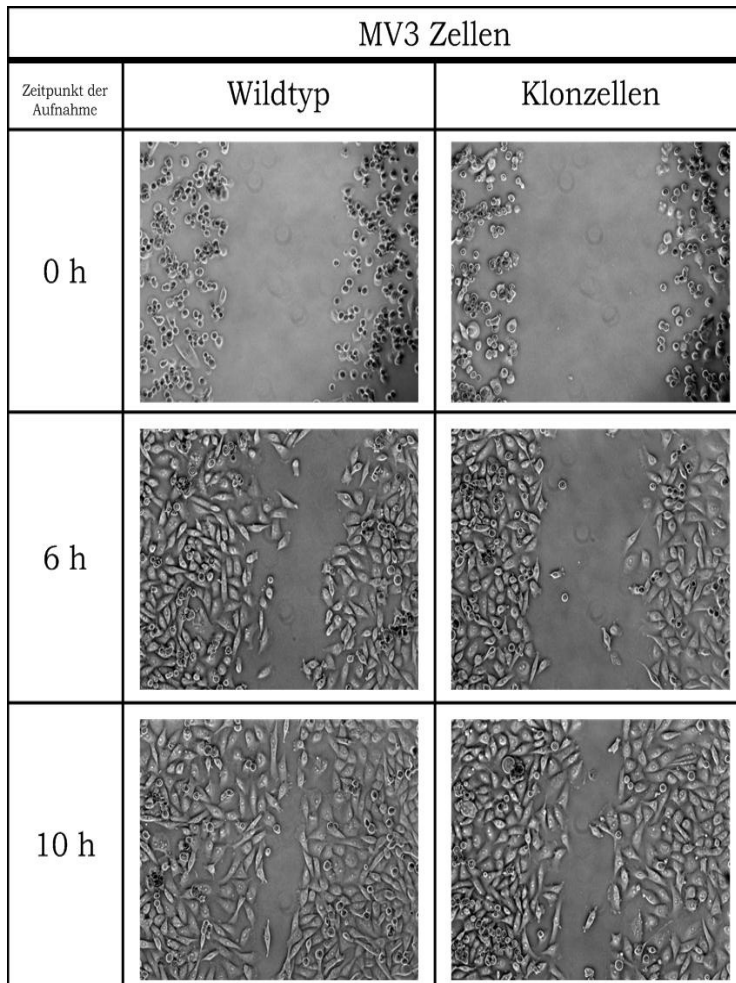
Die Untersuchung des Migrationsverhalten der PC-3 Zellen ist eine interessante Möglichkeit, um die Zelllinie weiter zu charakterisieren und Einblicke in die metastatische Kaskade zu erhalten. Die Schaffung von Cyr61-defizienten-Klonen ermöglicht es so den Einfluss des Proteins CCN1 auf die Migration zu beurteilen. Durch die vorangegangenen Untersuchungen zum jeweiligen Integrinstatus der Zellen sind hier wissenswerte Erkenntnisse zu gewinnen.

5.2.1 Bestimmung der Migrationsgeschwindigkeiten

Die Migration der Zellen wurde anhand des Scratch-Assay untersucht (wie in Kapitel 4.7.3 beschrieben). Die Auswertung eines solchen Scratch-Assays ist über mehrere Möglichkeiten gegeben, so können sowohl die Scratch-

breiten zu verschiedenen Zeiten als auch allgemein die benötigte Zeit bis zum vollständigen Verschließen der geschaffenen „Wunde“ (*Scratch*) herangezogen werden. In der Praxis stellte sich jedoch sehr bald heraus, dass die so ermittelten Daten miteinander wenig vergleichbar waren. Dies ist zum einen auf die meist wenig reproduzierbare Schaffung von gleichförmigen Kratzspuren, insbesondere deren Breite, als auch auf die Zellkonfluenz des jeweiligen Versuches zurückzuführen. In den hier getätigten Untersuchungen wurde daher das Zusammenwachsen der Kratzspur über die Zeit beobachtet und die Geschwindigkeit der Zellen für dieses Unterfangen gemessen. Es ergeben sich somit Daten, die von der eigentlichen Breite der geschaffenen Ritze unabhängig und damit untereinander vergleichbar sind.

Beispielhaft werden in der nachfolgenden Abbildung die Aufnahmen eines Scratches von MV3 Zellen auf Fibronektin zu verschiedenen Zeiten gezeigt, um die Vorgehensweise in der Geschwindigkeitsbestimmung zu erläutern.

Abbildung 32: **Migration von MV3-Zellen auf Fibronektin.**

Die Scratchweite bei 0 h stellt den Ausgangspunkt der Geraden dar und gibt gleichzeitig den Zeitpunkt der ersten Aufnahme an, unmittelbar nach durchgeführtem Scratch. Da die Abstände im Verlauf der Untersuchung immer kleiner werden, ergibt sich somit ein negatives Vorzeichen der Geschwindigkeiten. Die Migrationsgeschwindigkeiten aus den einzelnen Versuchen, in μm pro Stunde [$\mu\text{m}/\text{h}$] angegeben, werden nachfolgend in tabellarischer Form aufgeführt. Die Unterteilung erfolgt nach Versuchsaufbau, d.h. nach der jeweiligen Beschichtung oder Zusatz von Testsubstanzen. Zur Förderung der Übersichtlichkeit sind die Versuche nummeriert. Die entsprechenden Referenzmessungen (Wildtyp und Klon auf der gleichen Beschichtung bestehend aus Kollagen oder Fibronektin) können unter der zugehörigen Versuchsnummer gefunden werden und stellen bereits

Mittelwerte aus mindestens drei Versuchen/Messungen dar. Paarweise sind die Migrationsdaten von Wildtyp und Klon untereinander aufgeführt.

5.2.2 Migration der Zelllinie PC-3

Die Prostatakarzinom-Zelllinie PC-3 ist aufgrund ihres Integrinexpressionsmusters eine gut geeignete Zelllinie um Migrationsdaten zu erhalten. Hierbei wird stets der Wildtyp gegen den Cyr61-defizienten Klon untersucht und verglichen. Der Cyr61-Einfluss auf die Migration, vornehmlich über die Integrine, soll somit charakterisiert werden.

5.2.2.1 Migration der PC-3 Zellen auf unbeschichteten Untergrund

Die Versuche ohne eine Beschichtung des Untergrundes, also auf „normalem“, angerautem Untergrund der Zellkulturschalen lassen bereits Unterschiede in den Migrationsverhalten erkennen. Die Klonzellen migrieren so auf einem eher migrationsuntauglichen Untergrund langsamer als die Wildtypzellen.

Tabelle 5.2: Migrationsverhalten der PC-3 Zellen auf unbeschichteten Untergrund.

Versuch	1	2	3
PC-3 Wildtyp			
Scratchweite bei 0 h [μm]	306,4	384,8	334,8
Migrationsgeschwindigkeit [$\mu\text{m}/\text{h}$]	-18,18	-22,45	-11,08
PC-3 Klon			
Scratchweite bei 0 h [μm]	381,0	441,8	394,8
Migrationsgeschwindigkeit [$\mu\text{m}/\text{h}$]	-10,27	-20,21	-4,64

5.2.2.2 Migration der PC-3 Zellen auf beschichteten Untergründen

Die Migrationsgeschwindigkeiten beschleunigen sich im direkten Vergleich zwischen einer Beschichtung bestehend aus einem EZM-Bestandteil wie

bspw. Fibronektin oder Kollagen und der unbeschichteten Oberfläche. Als Kontrollversuch werden die Migrationen auf einem EZM-Bestandteil jedes Mal durchgeführt. Es fällt auf, dass die Geschwindigkeiten in verschiedenen Versuchen variieren. Aus diesem Grund können keine Absolutwerte ausgewertet werden, sondern muss auf die relative Beziehung der Experimente auf diese Kontrollversuche zurückgegriffen werden.

Bei Fibronektinbeschichtung (Tabelle 5.3) sind die Migrationsunterschiede zwischen Wildtyp und Klon nur marginal. Versuch 10 zeigt eine starke Abweichung von diesem Trend. In diesem Versuch bewegen sich die Klonzellen deutlich schneller als die Wildtypzellen.

Tabelle 5.3: Migrationsverhalten von PC-3 Zellen auf Fibronektin-Beschichtung.

Beschichtung	Fibronektin		
Versuch	1	5	6
PC-3 Wildtyp			
Scratchweite bei 0 h [μm]	481,8	315,4	351,1
Migrationsgeschwindigkeit [$\mu\text{m}/\text{h}$]	-15,35	-6,53	-23,42
PC-3 Klon			
Scratchweite bei 0 h [μm]	465,6	258,7	337,1
Migrationsgeschwindigkeit [$\mu\text{m}/\text{h}$]	-7,07	-6,60	-22,32

Beschichtung	Fibronektin	
Versuch	8	10
PC-3 Wildtyp		
Scratchweite bei 0 h [μm]	295,8	226,0
Migrationsgeschwindigkeit [$\mu\text{m}/\text{h}$]	-26,03	-17,68
PC-3 Klon		
Scratchweite bei 0 h [μm]	298,3	308,4
Migrationsgeschwindigkeit [$\mu\text{m}/\text{h}$]	-25,60	-27,73

Mit Kollagenbeschichtung zeigen sich sehr variable Konstellationen. In frühen Versuchen stellt sich eine schnellere Migration des Wildtyps heraus,

während sich in späteren Versuchen dieses Bild umkehrte, obwohl der Versuchsaufbau und seine Abfolge nicht verändert wurden.

Tabelle 5.4: Migrationsverhalten von PC-3 Zellen auf Kollagen-Beschichtung.

Beschichtung	Kollagen		
Versuch	2	3	4
PC-3 Wildtyp			
Scratchweite bei 0 h [μm]	818,6	265,5	386,4
Migrationsgeschwindigkeit [$\mu\text{m}/\text{h}$]	-38,63	-18,29	-4,50
PC-3 Klon			
Scratchweite bei 0 h [μm]	357,6	315,6	345,5
Migrationsgeschwindigkeit [$\mu\text{m}/\text{h}$]	-18,46	-5,03	-4,31

Beschichtung	Kollagen	
Versuch	7	9
PC-3 Wildtyp		
Scratchweite bei 0 h [μm]	373,0	205,1
Migrationsgeschwindigkeit [$\mu\text{m}/\text{h}$]	-25,39	-25,40
PC-3 Klon		
Scratchweite bei 0 h [μm]	333,7	295,5
Migrationsgeschwindigkeit [$\mu\text{m}/\text{h}$]	-29,32	-32,83

Insgesamt beschleunigt sich die Migration der Zellen auf diesen Untergründen gegenüber der Migration auf unbeschichteten Untergründen. Dies lässt sich dadurch erklären, dass durch die Adhäsion und anschließende Bindung z.B. des Fibronektins an Integrine wie $\alpha_5\beta_1$ eine Konformationsänderung bzw. Aktivierung der Integrine erfolgt^{247,248}. Auf der Zelloberfläche bilden sich vermehrt Integrincluster, die intrazellulär mit dem Aktin-Zytoskelett verknüpft sind^{249,250}. Eine dadurch gesteigerte Affinität und Avidität führt zu vermehrten Kontakten mit den EZM-Bestandteilen. Gleichzeitig wird die Migration durch intrazelluläres Signalling, welches u.a. durch

die Integrine ausgelöst wird, und einhergehenden Auf- und Abbau von Aktin beschleunigt²⁴⁸.

In Versuch 10 migrieren die Klonzellen auffällig und signifikant schneller als die Wildtypzellen (p -Wert $<0,0001$). Vor diesem Versuch erfolgte ein Systemwechsel von 6-well auf 24-well. Das Ergebnis könnte also auf eine Beeinflussung durch den Versuchsaufbau zurückzuführen sein. Während im 6-well System die Zellen für die Aufnahmen immer aus dem Inkubator genommen werden müssen, können sie im 24-well System unter dem Konfokalmikroskop dauerhaft unter optimalen Bedingungen in der Klimakammer verbleiben. Hier sollten zur Verifizierung der Ergebnisse weitere, gleich aufgebaute Versuche folgen.

Kollagen I und Fibronectin zeigen verschiedenartige Effekte auf PC-3 Zellen, das konnten bereits Docheva et al. zeigen²⁵¹. In ihren Untersuchungen wird deutlich, dass die Zellen auf einer mit Kollagen I beschichteten Oberfläche signifikant schneller anwachsen als auf Fibronectin. Weiterhin sind sie flacher und bilden mehr Filopodien mit Mikrospikes aus. Eine erhöhte Festigkeit der Zellen aufgrund einer erhöhten Menge an Aktinfibern zeigt eine direkte Beeinflussung des Aktin-Zytoskeletts vermittelt über die Kollagen-Integrine $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$ und $\alpha_3\beta_1$ ²⁵².

In Abhängigkeit von einer Kollagen- oder Fibronectinbeschichtung zeigen die Migrationsgeschwindigkeiten der durchgeführten Versuche eine deutliche Inhomogenität. Trotzdem lassen sich bei Versuchen, die am gleichen Tag durchgeführt wurden und deren Zellen im gleichen Zellzyklusabschnitt liegen (Versuche 6+7, 8+9), Tendenzen erkennen, dass PC-3 Zellen schneller auf Kollagen als auf Fibronectin migrieren. Dies trifft sowohl für die Wildtyp- als auch für die Cyr61-defizienten Klonzellen zu. Das vermehrte Spreiten der Zellen konnte ebenfalls festgestellt werden (siehe Abbildung 33).

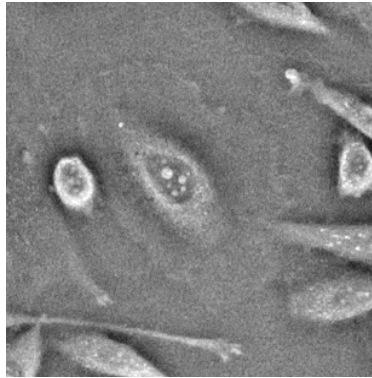


Abbildung 33: **Spreiten einer PC-3 Zelle auf Kollagen I Beschichtung.**

5.2.2.3 Migration der PC-3 Zellen auf beschichteten Untergründen und Heparin-Zusätzen

Zur Überprüfung, inwieweit die Cyr61 vermittelte Integrin-abhängige Migration der Zellen durch Heparin beeinflusst werden kann, wurden im Folgenden den migrierenden Zellen bestimmte Mengen an unterschiedlichen Heparinen zugesetzt. Um die Verträglichkeit der Heparinmengen auf die Zellvitalität zu testen, wurden im Rahmen der Masterarbeit von Ursula Gerber Toxizitätsuntersuchungen dazu durchgeführt²⁵³. Es wurden unfraktioniertes Heparin-Natrium (UFH), Enoxaparin-Natrium und Tinzaparin-Natrium auf ihre Toxizität auf die Zelllinien MV3 und PC-3 in einem MTT-Assay untersucht. Auf die Durchführung und detaillierte Funktionsweise dieses Assay soll hier nicht weiter eingegangen werden. Die untersuchten Konzentrationen innerhalb dieses Assay lagen im Bereich von 0 bis 0,65 ng Heparin pro Zelle und zeigten keinerlei toxischen Effekt. Für die nachfolgenden Scratch-Experimente wurde daher, in Anlehnung an bereits durchgeführte Versuche zur Zelladhäsion, eine Heparin-Konzentration von 0,5 ng pro Zelle gewählt.

In den Versuchen zur Migration zeigten die Heparin-Zusätze keine Verlangsamung der Zellen. Im Gegenteil, die Zellmigration konnte sogar über die normale Migration hinaus beschleunigt werden.

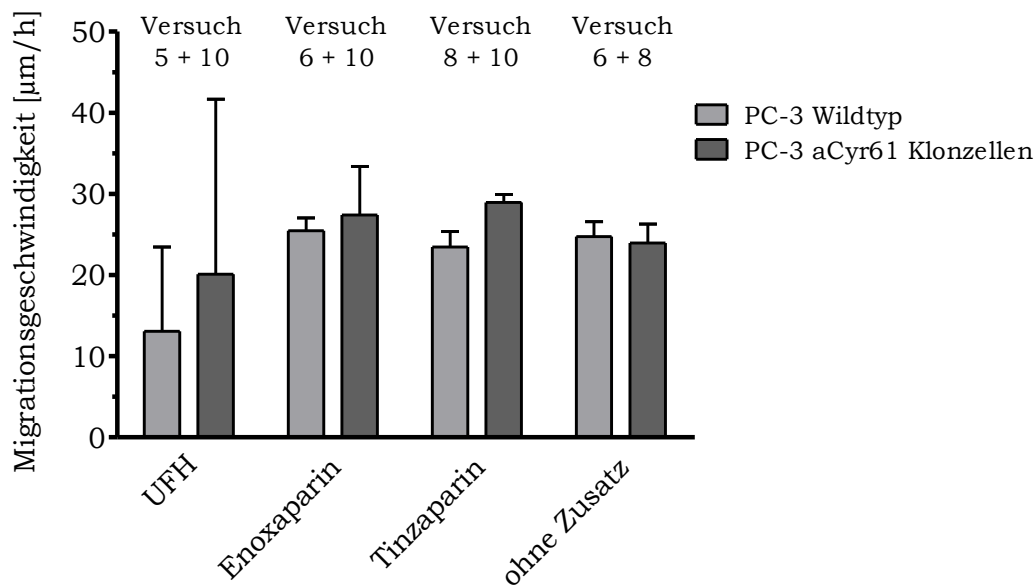


Abbildung 34: **Migrationsverhalten von PC-3 Zellen auf Fibronectin und Heparin-Zusatz.**

Die Zugabe von Heparin zeigt unabhängig vom jeweiligen Untergrund ein gemischtes Bild. Generell ist aber zu beobachten, dass sich die Wildtypzellen größtenteils langsamer fortbewegen als Klonzellen. Als Tendenz ist zu erkennen, dass vor allem Tinzaparin die Migration der Wildtypzellen verlangsamt. Enoxaparin oder UFH-Natrium lassen hingegen keinen Effekt erkennen. Ob diese Resultate nun auf einen direkten Integrineffekt oder die Heparin/Cyr61-Wechselwirkung zurückzuführen ist, bleibt an dieser Stelle unbeantwortet.

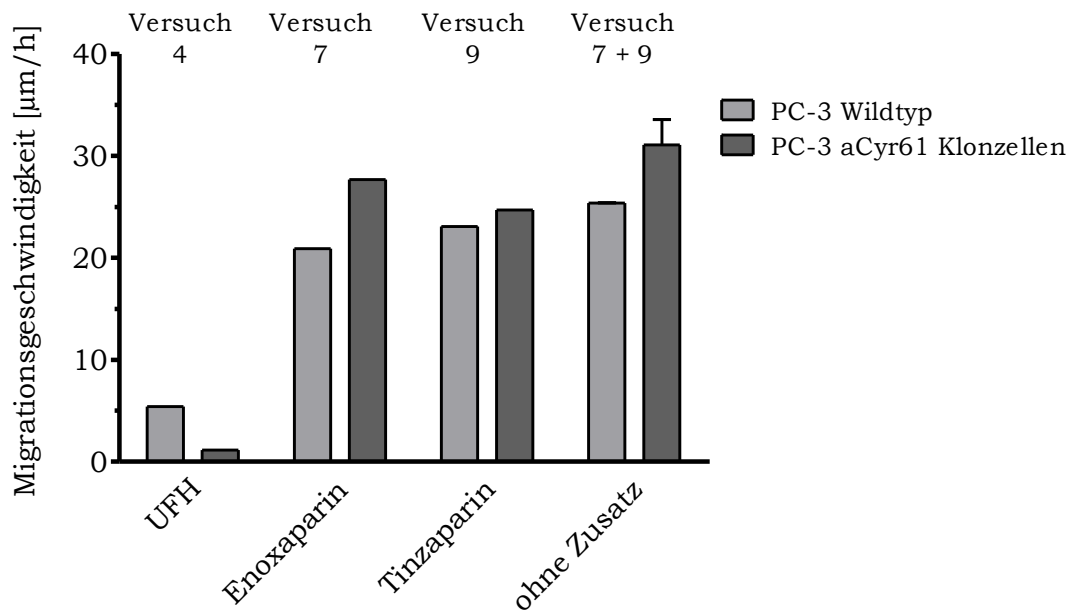


Abbildung 35: **Migrationsverhalten von PC-3 Zellen auf Kollagen und Heparin-Zusatz.**

Es tritt in den Versuchen 7 und 9 eine verlangsamte Migration der Wildtyp- und Klonzellen unter Heparinwirkung relativ zu den unbehandelten Zellen auf. Interessanterweise zeigt sich bei den Versuchen 7-10 eine beschleunigte Migration der Klonzellen gegenüber den Wildtypzellen. Dies könnte auf eine Folge der Überexpression der Integrin-Untereinheit α_5 zurückzuführen sein (siehe Tabelle 5.1). Einer fehlenden α_4 -Untereinheit und der Möglichkeit der Migrationsbeeinflussung durch die Bindung von Fibronectin und LDV-Motiv bindenden Integrinen wird durch die RGD-Motiv bindenden Integrine wie $\alpha_5\beta_1$ ausgeglichen. Diese scheinen durch eine Cyr61-Reduktion kaum beeinflusst; so konnte auch in bisher veröffentlichten Studien keine Mediatorfunktion des Cyr61-Signalling über VLA-5 festgestellt werden²²⁰.

Aus Untersuchungen von Franzen und Mitarbeitern ist bekannt, dass die Adhäsion von PC-3 Zellen an Cyr61 beschichteten Oberflächen u.a. über α_6 , β_1 , β_4 und HSPG erfolgt, nicht jedoch über das Integrin $\alpha_v\beta_3$ ²⁰⁵. Der Integrinstatus der PC-3 Zellen zeigt eine geringe Expression von α_v und β_3 . Somit ist es nicht verwunderlich, dass sie an der Adhäsion und Migration keinen Anteil haben.

5.2.3 Zusammenfassende Beurteilung der transfizierten PC-3 Zellen

In der PC-3 Zelllinie konnte mittels der shRNA Technologie eine effektive Herunterregulation des Cyr61 erzielt werden, sodass gegenüber den Wildtypzellen nur noch $\frac{1}{4}$ des Cyr61 exprimiert wird. Dies konnte auch durch Proteinanalytik im Westernblot bestätigt werden. Die Untersuchung des Integrinstatus lässt auf ein Fehlen der Integrinuntereinheiten α_1 und α_4 schließen, α_v und β_3 scheinen nur im geringen Maße exprimiert zu werden, wohingegen α_5 stark auf der Zelloberfläche vertreten ist. Interessanterweise ist die α_5 Expression auf den Klonzellen sogar etwas stärker ausgeprägt als auf den Wildtypzellen. Ob hierdurch der Cyr61-Mangel kompensiert wird, bleibt unbeantwortet.

Die Migrationsdaten zeigen ein gemischtes Bild. Abhängig vom jeweiligen Untergrund zeigen die Zellen hierbei kontroverse Effekte. Da VLA-5 dominant vertreten ist und vermutlich auch einen großen Teil der Migrationseffekte erklären könnte, werden die Daten stark nivelliert und lassen keine klare Aussage zu.

Die getätigten Untersuchungen an den PC-3 Zellen stellen somit ein erstes richtungsweisendes Projekt dar. Aufgrund des vermuteten vielfältigen Integrinmusters auch neben den hier getätigten Untersuchungen, eignet sich diese Zelllinie nicht für eine klare Aussage bzgl. eines Cyr61 Effektes auf die Migration. Weiterhin wird VLA-4, dessen Wechselwirkungen mit seinem physiologischen Bindungspartner VCAM-1 oder auch Heparin bereits bekannt sind, nicht exprimiert. Es wird daher auf eine Zelllinie übergegangen, die in hohem Maße VLA-4 konstitutiv exprimiert und die sich neben Untersuchungen zur Migration auch zu Adhäsionsuntersuchungen eignet. Die Melanomzelllinie MV3 wurde ebenfalls zur Herunterregulation des Cyr61 transfiziert und wird nachfolgend charakterisiert.

5.3 Charakterisierung der shRNA-transfizierten MV3 Zellen

5.3.1 Cyr61 Expression in der Zelllinie MV3

Die Melanomzelllinie MV3 wurde, wie in Kapitel 4.3.2 für PC-3 Zellen beschrieben mit den kommerziell erhältlichen shRNA-Plasmiden lipidbasiert transfiziert. Auch hier wurden die transfizierten Zellen nach erfolgter Puro-mycin-Selektion unter optimalen Bedingungen kultiviert, bzw. einer Zellyse unterzogen.

5.3.1.1 Durchflusszytometrische Untersuchungen

Die MV3-Zelllinie wurde gleichermaßen mit fünf verschiedenen Plasmiden transfiziert und alle fünf so geschaffenen Klone auf die höchste Effizienz in Bezug auf die Herunterregulation des Cyr61-Proteins hin untersucht.

Wie bereits in der PC-3 Zelllinie festgestellt, konnte auch auf die MV3 Zelllinie eine Mediumsstimulation von einer Stunde als optimal auf die Cyr61 Expression ermittelt und die Ergebnisse entsprechend übertragen werden (Daten nicht weiter gezeigt). Bei Gegenüberstellung der einzelnen Klone zeigt sich bei den Melanomzellen der Klon 3 in Bezug auf seine verminderte Cyr61 Expression den anderen Klonen überlegen (siehe Abbildung 36).

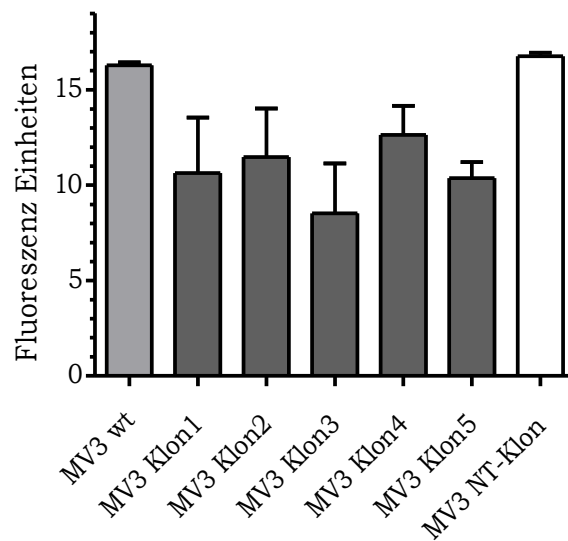


Abbildung 36: **Cyr61 Expression des MV3 Wildtyp, MV3 Cyr61 Klon 1-5 und MV3 NT-Klon nach einer Stunde Mediumstimulation.**

Die direkte Gegenüberstellung des Klon 3 mit dem Wildtyp und dem Klon welcher ein nicht-Targetiertes Plasmid trägt, zeigt deutlich den shRNA-Effekt in Bezug auf die Cyr61 Expression (siehe Abbildung 37). Die Cyr61 Expression des Wildtyp wurde anhand der gemessenen Fluoreszenz normalisiert und auf 100 % gesetzt. Die Transfektion mit einem nicht targetierten Plasmid zeigt keinen Effekt auf die Cyr61 Expression. Dieser Versuch dient als Kontrolle, ob und wie weit das alleinige Einbringen eines Plasmides zu unerwarteten Ereignissen führen kann.

Für die nachfolgenden Versuche wird der Klon 3 weiter kultiviert und in der vorliegenden Arbeit als MV3 aCyr61 Klon bezeichnet.

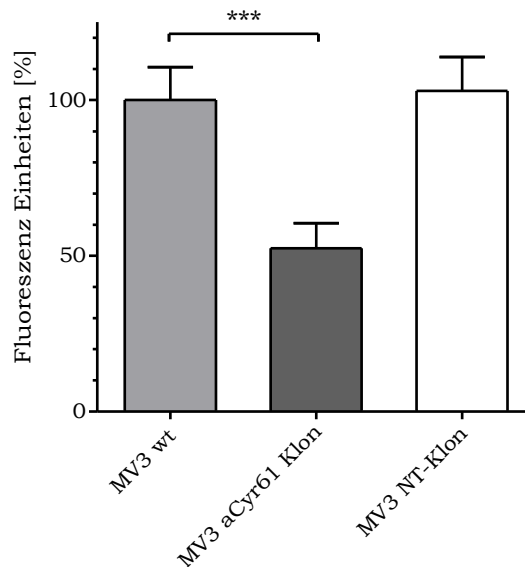


Abbildung 37: **Cyr61 Expression des MV3 Wildtyp, MV3 aCyr61 Klon 3 und MV3 NT-Klon im Vergleich.**

5.3.1.2 Proteinbestimmung durch SDS-PAGE und Western-Blot

Neben der durchflusszytometrischen Untersuchung der Cyr61 Expression der MV3 Zellen wurden auch von diesen sowohl nach vorheriger Mediumstimulation wie auch im unstimulierten Zustand Ganzzelllysate angefertigt und via SDS-PAGE und Western-Blot ausgewertet. Auch hier soll zunächst durch die Silberfärbung des entwickelten Geles ein Blick auf die Verteilung des Proteins von Interesse zum Gesamtprotein geworfen werden.

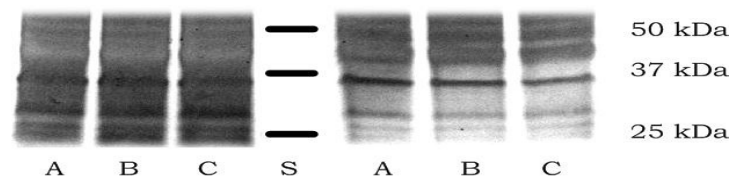


Abbildung 38: **Silberfärbung des SDS-PAGE Geles stimulierter MV3 Zellen.**

A) MV3 Wildtypzellen B) MV3 aCyr61 Klonzellen C) MV3 NT-Klonzellen S) Proteinstandard

Dargestellt ist der Molekularbereich von 25 kDa bis ca. 55 kDa, links des Proteinstandards (S) sind die unbehandelten Ganzzelllysate, rechts dargestellt sind die Lysate nach Aufreinigung über Heparin-Agarose. Die Darstellung der Silberfärbung erfolgt hier in Graustufen, um Intensitäten besser ausmachen zu können.

Der Unterschied zwischen der Aufreinigung durch Heparin-Agarose und den unbehandelten Ganzzelllysaten ist hier ersichtlich. Es werden, wie

bereits bei den PC-3 Zelllinien, deutlich schärfere Banden erzielt und die Gesamtmenge an Protein scheint reduziert gegenüber einer optisch leichten Erhöhung der heparinbindenden Moleküle.

Der Western-Blot der zuvor stimulierten Zellen zeigt ein deutliches Bild. Der MV3 aCyr61 Klon ist deutlich in seiner Proteinexpression gegenüber seinem Wildtyp reduziert (siehe Abbildung 39 I). Diese Ergebnisse decken sich mit den Untersuchungen am Durchflusszytometer.

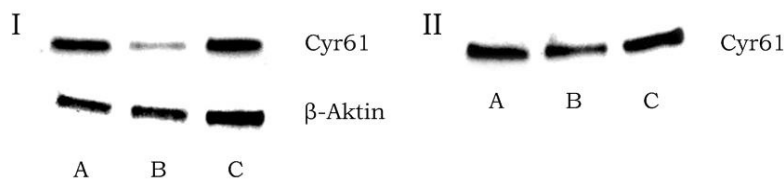


Abbildung 39: **Western-Blot stimulierter MV3 Zellen.** Aufgetragen sind die Ganzzelllysate I) stimulierter MV3 Zellen, II) stimulierter MV3 Zellen nach Aufreinigung über Heparin-Agarose.

A) MV3 Wildtypzellen B) MV3 aCyr61 Klonzellen C) MV3 NT-Klonzellen

Die Molekulargrößen und Intensitäten der Banden nach halbquantitativer Auswertung in Abbildung 39 I verhalten sich nach Normalisierung der Bande der Wildtypzellen auf 100 % wie folgt: A = 40,0 kDa, 100 %, B = 39,7 kDa, 43,1 %, C = 40,0 kDa, 118,3 %.

Die Aufreinigung über die Heparin-Agarose zeigt ein ähnliches Ergebnis wie bereits bei den Untersuchungen an den PC-3 Zellen. Cyr61 scheint zwar optisch insgesamt deutlich stärker vorhanden zu sein, allerdings wird eine verminderte Expression in den aCyr61-Klonzellen durch die Heparin-Agarose nivelliert und kann nicht mehr ausgemacht werden.

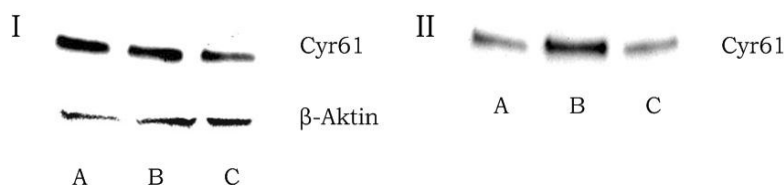


Abbildung 40: **Western-Blot unstimulierter MV3 Zellen.** Aufgetragen sind die Ganzzelllysate I) unstimulierter MV3 Zellen, II) unstimulierter MV3 Zellen nach Aufreinigung über Heparin-Agarose.

A) MV3 Wildtypzellen B) MV3 aCyr61 Klonzellen C) MV3 NT-Klonzellen

Die Molekulargrößen und Intensitäten der Banden nach halbquantitativer Auswertung in Abbildung 40 I verhalten sich nach Normalisierung der Bande der Wildtypzellen auf 100 % wie folgt: A = 43,1 kDa, 100 %, B = 40,9 kDa, 102,2 %, C = 40,0 kDa, 70,6 %.

Die Auswertung der unstimulierten MV3 Zellen über den Western-Blot zeigt ein unerwartetes Ergebnis. So zeigen sowohl die Wildtypzellen als auch die aCyr61-Klonzellen nahezu die gleiche Cyr61 Expression. Das wird auch anhand der halbquantitativen Auswertung deutlich (siehe Abbildung 40 I). Dies lässt sich nur mit der Tatsache erklären, dass die unstimulierten Zellen zum Zeitpunkt der Lysatanfertigung sich in einem beliebigen Zustand der Cyr61 Expression befinden. Dieser Zustand kann durch jeden äußeren aber auch inneren Zellstimulus beeinflusst sein und wird somit nahezu willkürlich zu diesem Zeitpunkt fixiert.

Nach Aufreinigung über Heparin-Agarose scheint der eigentlich Cyr61-defiziente Klon plötzlich deutlich mehr Cyr61 aufzuweisen. Auch hier kommt die Methode der Proteinaufreinigung über Heparin-Agarose an ihre Grenzen. Es lässt sich zwar das gewünschte Protein im Vergleich zum Gesamtprotein tatsächlich anreichern, allerdings gehen bei einer anschließenden quantitativen Auswertung Informationen über die tatsächlich vorhandene Menge verloren.

Die vorliegenden Daten zeigen eindrucksvoll, dass es unabdingbar ist, die Zellen vor Verwendung einheitlich zu behandeln und einem definierten Stimulus zu unterwerfen. Nur so lassen sich die resultierenden Werte in Bezug auf die Cyr61 Effekte miteinander vergleichen.

5.3.2 Untersuchung der Cyr61 Expression und zelluläre Lokalisation mittels fluoreszenzmikroskopischer Techniken

Die vorangegangenen Untersuchungen zeigen, dass Cyr61 von den Wildtypzellen exprimiert bzw. von den Klonzellen weniger stark produziert wird. Durch das Durchflusszytometer ist es allerdings nicht möglich, eine Aussage über die Lokalisation des Cyr61 innerhalb der Zellen zu treffen. Mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskopes und spezifischer Antikörpermarkierung können die Strukturen sichtbar gemacht werden.

Abbildung 41 zeigt den MV3 Wildtyp in der Durchsicht. Der Nucleus ist mit DAPI blau markiert und das zelluläre Cyr61 durch einen spezifischen Antikörper mit FITC-Konjugat grün dargestellt.

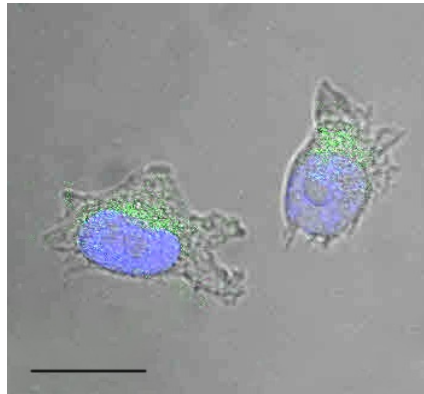


Abbildung 41: **MV3 Wildtypzellen in Durchsichtmikroskopie.** Blau dargestellt ist der Zellkern unter DAPI-Färbung, grün zu sehen ist vesikulär gespeichertes Cyr61 unter FITC-Fluoreszenz. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μm .

Deutlich ist die Cyr61 Anreicherung um den Zellkern zu sehen, aber auch eine Verteilung im gesamten Zytoplasma der Zelle ist ersichtlich. Dies erklärt sich dadurch, dass die Expression von Proteinen um den Zellkern stattfindet, wobei die mRNA aus dem Zellkern direkt an die das endoplasmatische Retikulum angelagerten Ribosomen durchlaufen kann und zum finalen Protein translatiert wird. Grüne Spots stellen somit auch kein einzelnes Cyr61-Protein dar, sondern eine Cyr61-reiche Region, bspw. vesikulär gespeichertes Protein.

Eine Kollokalisierung der Lysosomen und des Cyr61 ist in Abbildung 42 zu sehen. Dafür wurde das FITC markierte CCN1 Protein mit dem Argon-Laser bei 488 nm, DAPI mit der Laserdiode bei 405 nm und die Lysosomen mit dem Festkörperlaser angeregt. Die Emission wurde durch den jeweils passenden Filter registriert.

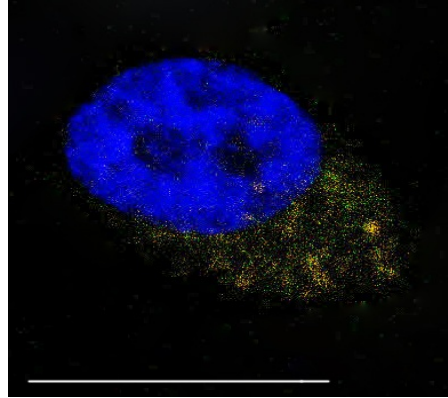


Abbildung 42: **MV3 Wildtypzellen in Fluoreszenzmikroskopie.** Blau dargestellt ist der Zellkern unter DAPI-Färbung, grün zu sehen ist vesikulär gespeichertes Cyr61 unter FITC-Fluoreszenz, rot sind die Lysosomen angefärbt. Eine gelb/orange Fluoreszenz entsteht durch Überlagerung der grünen und roten Fluoreszenz unter Kolo-kalisation. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μm .

Aus dem aufgenommenen Fluoreszenzbild lässt sich eine Überlagerung der Cyr61- und Lysosomen-Anfärbung erkennen. Es wird ersichtlich, dass bei ausbleibender Sekretion des Cyr61 dieses in den Lysosomen abgebaut wird und die Zellen anscheinend nur einen minimalen Speichervorrat bereit halten.

Ein direkter Vergleich zwischen MV3 Wildtyp- und MV3 aCyr61-Klonzellen in Bezug auf Cyr61 Expression und Lokalisation soll stellvertretend für alle anderen untersuchten Zellen mit der nachfolgenden Abbildung erfolgen. Dabei sind der Nucleus mit DAPI blau, zelluläres Cyr61 mittels spezifischem Antikörper und FITC-Konjugat grün und das Golgivesikel-Netzwerk rot dargestellt. Die Aufnahmen wurden jeweils für jeden Zelltyp im selben Ausschnitt aufgenommen und schließlich eine Überlagerung der einzelnen Kanäle durchgeführt.

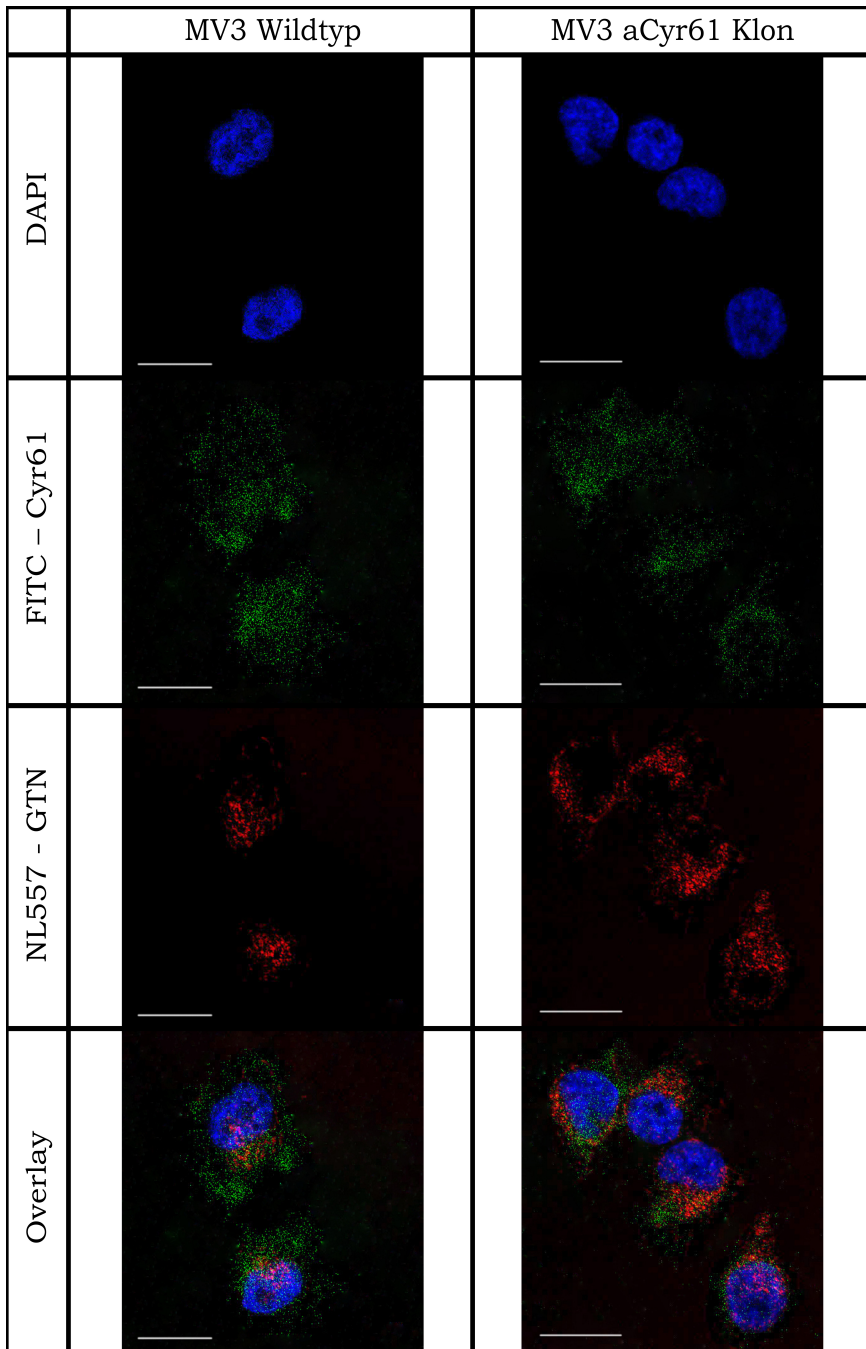


Abbildung 43: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Zellkern, Cyr61 und Golgivesikeln in MV3 Wildtypzellen und MV3 aCyr61 Klonzellen im Vergleich. Der Maßstabsbalken entspricht 20 µm. Weitere Erklärungen siehe Text.

Die Abbildung zeigt eine leicht erhöhte Cyr61 Expression des Wildtyps im direkten Vergleich zum dargestellten Klon. Die optische Auswertung gestaltet sich allerdings dahingehend schwierig, als dass durch Veränderung der Verstärkung und Intensität des Lasers die Ergebnisse verzerrt oder derart

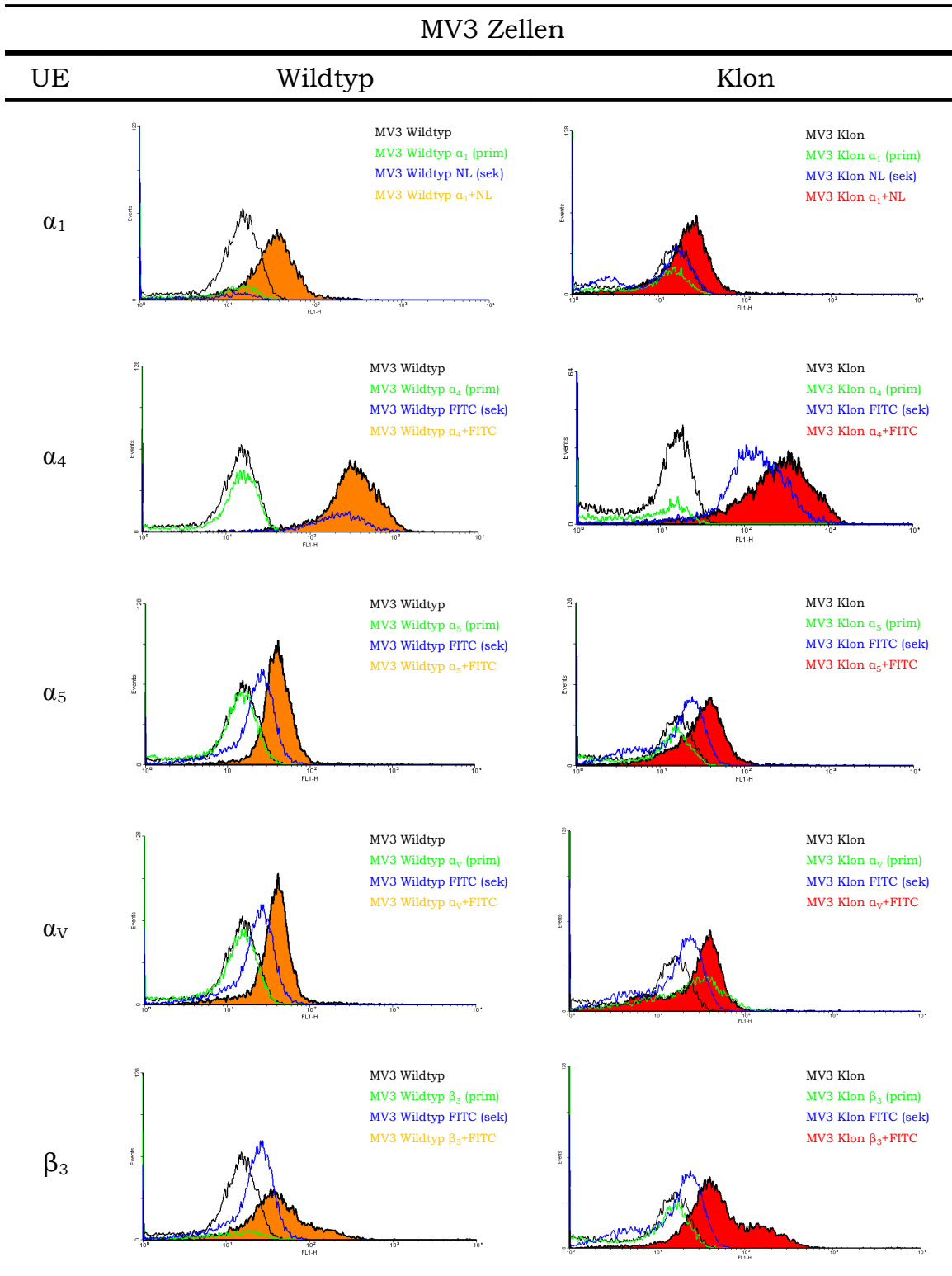
nivelliert worden sein können, dass eine Auswertung nicht möglich ist. Es wurde weitestgehend versucht die gleichen Einstellungen auf vergleichbare Proben anzuwenden. Allerdings musste je nach Schnittebene hier zur scharfen Darstellung korrigierend eingegriffen werden. Das Golgivesikel-Netzwerk ist als Struktur zwar gut zu erkennen, allerdings lassen sich nur schwerlich Rückschlüsse auf die Lokalisation des Cyr61 relativ zum Golgiapparat ziehen. Gerade diese Kolo-kalisation hätte hier einen Erkenntnisgewinn über den Verbleib des CCN1 in der Zelle oder dessen Sekretionstendenzen liefern können.

Der aufwendige Präparationsprozess der Proben zur intrazellulären Anfärbung von Strukturen kann ebenfalls zu einem Verlust relevanter und anzu-färbender Proteine führen.

5.3.3 Untersuchung des Integrinstatus transfizierter MV3 Zellen

Auch die MV3 Zellen wurden in einem gleichen Versuchsaufbau wie die PC-3 Zellen untersucht. Ebenso wie bei der Beschreibung des PC-3 Integrinstatus tritt bei der Vermessung der α_4 Integrin-UE dieselbe Problematik des Sekundärantikörpers auf. In der Bestimmung der übrigen MV3 Integrine liegt die unspezifische Fluoreszenz der Sekundärantikörper des öfteren höher als die der Zellen oder des Primärantikörpers, zu sehen bei α_5 , α_V und β_3 Integrin-UE. Die Primärantikörper zeigen erfreulicherweise kaum Eigenfluoreszenz.

Tabelle 5.5: Integrinstatus der MV3 Zelllinie, Wildtyp und Cyr61-defizienter Klon.



Alle untersuchten Integrin-Untereinheiten konnten auf der Zelloberfläche der MV3-Zellen detektiert werden. Die Abweichung in der unspezifisch

hohen Fluoreszenz bei Untersuchung der α_4 -Untereinheit kann hier wie bereits bei den PC-3 Zellen festgestellt werden. Ansonsten finden sich im Vergleich der Wildtyp- mit den Klonzellen weitestgehend keine Unterschiede, mit Ausnahme einer etwas höheren Expression der α_1 -Untereinheit auf den Wildtypzellen. Dieser Fakt würde einen Einfluss auf das Migrationsverhalten der MV3-Zellen auf Kollagen haben, da $\alpha_1\beta_1$ sowie die nicht untersuchten $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_{10}\beta_1$ und $\alpha_{11}\beta_1$, die Kollagen-bindenden Integrine sind²⁵⁴.

Der Einfluss der reinen plasmidischen Transfektion wurde ebenfalls bei allen Zelllinien untersucht und Klonzellen mit dem nicht-targetierten Plasmid ebenfalls auf ihre Integrinexpression hin untersucht und diese bei den Experimenten parallel zu den anderen bestimmt. Da sich allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen Klonzellen und dem jeweiligen Wildtyp zeigten, wurde aus Gründen der Vereinfachung hier der NT-Klon bei den anderen Darstellungen nicht weiter aufgeführt.

5.3.4 Migration der Zelllinie MV3

Im Vergleich zu der PC-3 Zelllinie wurde die Zelllinie MV3 in gleicher Weise untersucht, wobei aufgrund der verschiedenen Integrinexpressionsmuster unterschiedliche Migrationsverhalten zu erwarten sind.

5.3.4.1 Migration der MV3 Zellen auf unbeschichteten Untergrund

Ein Unterschied in den Migrationsgeschwindigkeiten zwischen Wildtyp und transfizierten-Zellen ist auch bei den MV3 Zellen schon bei unbeschichtetem Untergrund zu erkennen.

Tabelle 5.6: Migrationsverhalten der MV3 Zellen auf unbeschichteten Untergrund.

Versuch	1	2	3
MV3 Wildtyp			
Scratchweite bei 0 h [μm]	518,2	341,5	440,5
Migrationsgeschwindigkeit [$\mu\text{m}/\text{h}$]	-10,31	-20,25	-24,39
MV3 Klon			
Scratchweite bei 0 h [μm]	335,7	441,2	475,0
Migrationsgeschwindigkeit [$\mu\text{m}/\text{h}$]	-7,60	-18,30	-21,04

5.3.4.2 Migration der MV3 Zellen auf beschichteten Untergründen

Die Kontrollversuche des Wildtyps und Klon auf Fibronectin oder Kollagen wurden mit den MV3 Zellen bei jedem Versuch durchgeführt. Es ergibt sich hieraus der Vorteil, dass eine hohe Datenmenge gewonnen wurde, die analysiert werden kann.

Bei den auf Fibronectin kultivierten Zellen zeigt sich in den meisten Versuchen, dass die Klonzellen langsamer als ihr Wildtyp migrieren.

Tabelle 5.7: Migrationsverhalten von MV3 Zellen auf Fibronectin-Beschichtung.

Beschichtung	Fibronectin			
Versuch	1	2	4	5
MV3 Wildtyp				
Scratchweite bei 0 h [μm]	307,4	283,8	383,7	395,7
Migrationsgeschwindigkeit [$\mu\text{m}/\text{h}$]	-13,00	-24,78	-28,54	-26,90
MV3 Klon				
Scratchweite bei 0 h [μm]	205,1	360,5	313,6	369,6
Migrationsgeschwindigkeit [$\mu\text{m}/\text{h}$]	-8,24	-28,76	-22,53	-27,30

Beschichtung	Fibronektin			
Versuch	6	10	11	11
MV3 Wildtyp				
Scratchweite bei 0 h [μm]	470,1	206,8	277,5	296,3
Migrationsgeschwindigkeit [$\mu\text{m}/\text{h}$]	-21,18	-29,57	-39,72	-35,13
MV3 Klon				
Scratchweite bei 0 h [μm]	440,7	228,8	298,6	210,6
Migrationsgeschwindigkeit [$\mu\text{m}/\text{h}$]	-18,85	-28,85	-38,49	-34,15

Beschichtung	Fibronektin			
Versuch	12	13	14	15
MV3 Wildtyp				
Scratchweite bei 0 h [μm]	378,7	235,4	263,2	303,6
Migrationsgeschwindigkeit [$\mu\text{m}/\text{h}$]	-28,27	-25,65	-31,16	-41,09
MV3 Klon				
Scratchweite bei 0 h [μm]	274,9	217,7	241,6	289,8
Migrationsgeschwindigkeit [$\mu\text{m}/\text{h}$]	-24,88	-18,74	-21,51	-33,43

In den meisten Fällen zeigten sich die zwischen Wildtyp- und Klonzellen bestehenden Geschwindigkeitsunterschiede deutlicher (Versuche 1 und 2), d.h. die Differenz zwischen den Geschwindigkeiten stieg gegenüber unbeschichtetem Untergrund an. Die reduzierte Cyr61-Expression und die damit einhergehende Migrationsverlangsamung sind an einer Erniedrigung der Geschwindigkeiten zu erkennen. Ebenso ist die Migration durch den EZM-Bestandteil Fibronektin beeinflusst, dies zeigt sich im Vergleich zu der unbeschichteten Versuchsvariante, bei der die Differenz nicht derart ausgeprägt vorlag wie mit Fibronektinbeschichtung.

Im Falle der auf Kollagen kultivierten Zellen sind die Klonzellen immer schneller als die Wildtypzellen. Die Größenordnung der Differenzen variiert dabei zwischen geringfügigen Unterschieden zwischen Klon und Wildtyp wie bspw. in Versuch 8 bis zu deutlichen Abweichungen in Versuch 7.

Tabelle 5.8: Migrationsverhalten von MV3 Zellen auf Kollagen-Beschichtung.

Beschichtung	Kollagen			
	Versuch	3	7	8
MV3 Wildtyp				
Scratchweite bei 0 h [μm]	304,6	339,6	328,5	309,5
Migrationsgeschwindigkeit [$\mu\text{m}/\text{h}$]	-27,62	-35,74	-29,63	-26,81
MV3 Klon				
Scratchweite bei 0 h [μm]	375,7	363,1	284,2	441,9
Migrationsgeschwindigkeit [$\mu\text{m}/\text{h}$]	-30,08	-42,07	-30,97	-30,45

Auf den Kollagen-beschichteten Untergründen migrieren die Klonzellen schneller als ihre Wildtypzellen. Dies scheint bei Betrachtung der Tabelle 5.5 zunächst paradox, da die Klonzellen gegenüber den Wildtypzellen eine verminderte Expression der α_1 -Untereinheit aufweisen. Hier liegt nur die Erklärung nahe, dass die ermittelte Migration über ein anderes Kollagen-bindendes Integrin wie z.B. $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_{10}\beta_1$ oder $\alpha_{11}\beta_1$ verlaufen sein muss.

Durch die lediglich hervorgerufene Reduktion der Cyr61-Expression, nicht aber einem vollständigen Knockout in den untersuchten Zelllinien, sind viele Versuche nötig, um signifikante Unterschiede sichtbar zu machen. Dies ist bei den hier getätigten Versuchen im Falle des Vergleichs von MV3-Wildtyp- und Klonzellen auf Fibronectin im 24-well System möglich. Dabei zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Zelltypen (p -Wert: 0,0028).

Tabelle 5.9: Migrationsverhalten von MV3 Wildtypzellen und aCyr61 Klon auf Fibronectin.

Beschichtung	Fibronectin	
	MV3 Wildtyp	MV3 Klon
Scratchweite bei 0 h [μm]	306,3	266,1
Migrationsgeschwindigkeit [$\mu\text{m}/\text{h}$]	-36,62	-28,11

Die signifikant reduzierte Migrationsfähigkeit der aCyr61-Klonzellen ist hierbei besonders sichtbar, da MV3 Zellen auch im unstimulierten Zustand eine gewisse Menge an Cyr61 produzieren. So ist selbst ohne vorherige Stimulation der Zellen ein Effekt auf die Migration durch Herunterregulation der Cyr61-Expression mittels der verwendeten shRNA erkennbar.

5.3.4.3 Migration der MV3 Zellen auf beschichteten Untergründen und Heparin-Zusätzen

Die Versuche mit Heparin-Zusätzen erfolgten in gleicher Weise wie bei den PC-3 Zellen. Die Zellen wurden mit den Heparinen UFH-Natrium, Enoxaparin-Natrium und Tinzaparin-Natrium in einer Konzentration von 0,5 ng pro Zelle inkubiert und auf ihr Migrationsverhalten untersucht. Die nachfolgende Abbildung soll stellvertretend die beschriebenen durchgeführten Migrationsversuche optisch darstellen.

In verschiedenen Veröffentlichungen wurde bereits eine direkte Beeinflussung von Integrinen, insbesondere dem Integrin $\alpha_4\beta_1$ durch Heparine belegt⁷⁵. Auch wird in Publikationen beschrieben, dass Cyr61 von Heparin gebunden wird^{220,223,224}. Man erwartet hier, dass die Heparine Cyr61 binden und den resultierenden Effekt von Cyr61 auf die Migration vermindern, also dass unter Heparinwirkung die Migrationsgeschwindigkeiten von Wildtyp und Klon wieder angenähert werden.

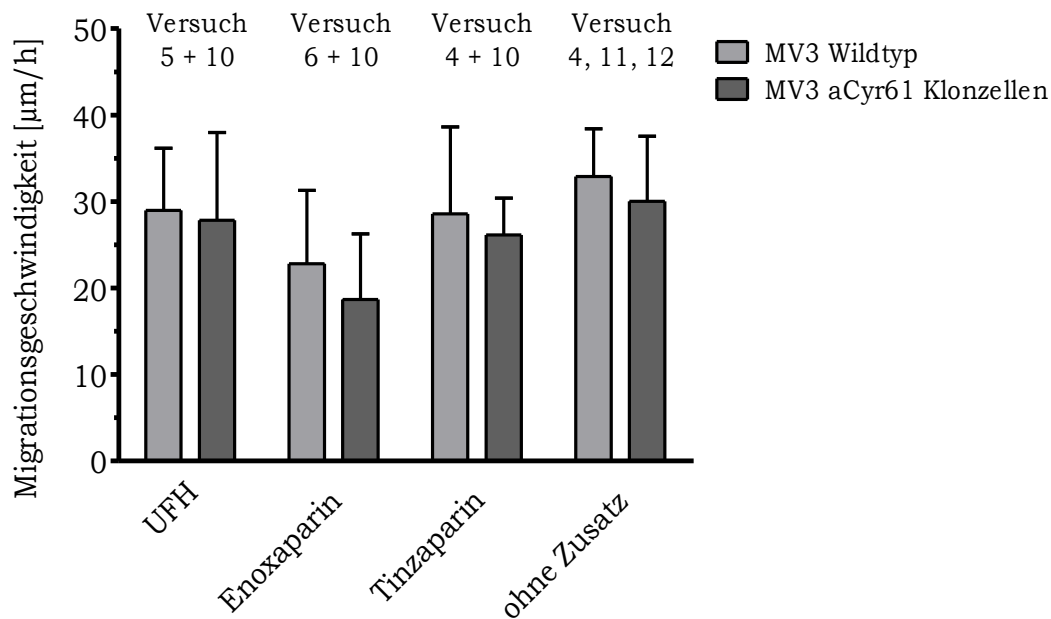


Abbildung 44: **Migrationsverhalten von MV3 Zellen auf Fibronectin und Heparin-Zusatz.**

In einigen Versuchen zeigten sich Unterschiede durch die Cyr61-Defizienz in der Migration der Zellen deutlich. Der Effekt der Heparin-induzierten Cyr61-Reduzierung ist, vergleicht man die Geschwindigkeiten mit denen ohne Heparinzusatz (siehe auch Tabelle 5.9), ebenfalls zu erkennen. Allerdings verhalten sich die UFH-Natrium und Tinzaparin-Natrium Zusätze nahezu gleichwertig. Enoxaparin-Natrium stellt hier die Ausnahme dar, da sich hier die Geschwindigkeiten gegenüber den Zellen ohne weiteren Zusatz deutlich verlangsamt haben. Dies lässt sich auch optisch erkennen, wenn man die Aufnahmen zum Zeitpunkt 0 und 10 Stunden später betrachtet (siehe Abbildung 45).

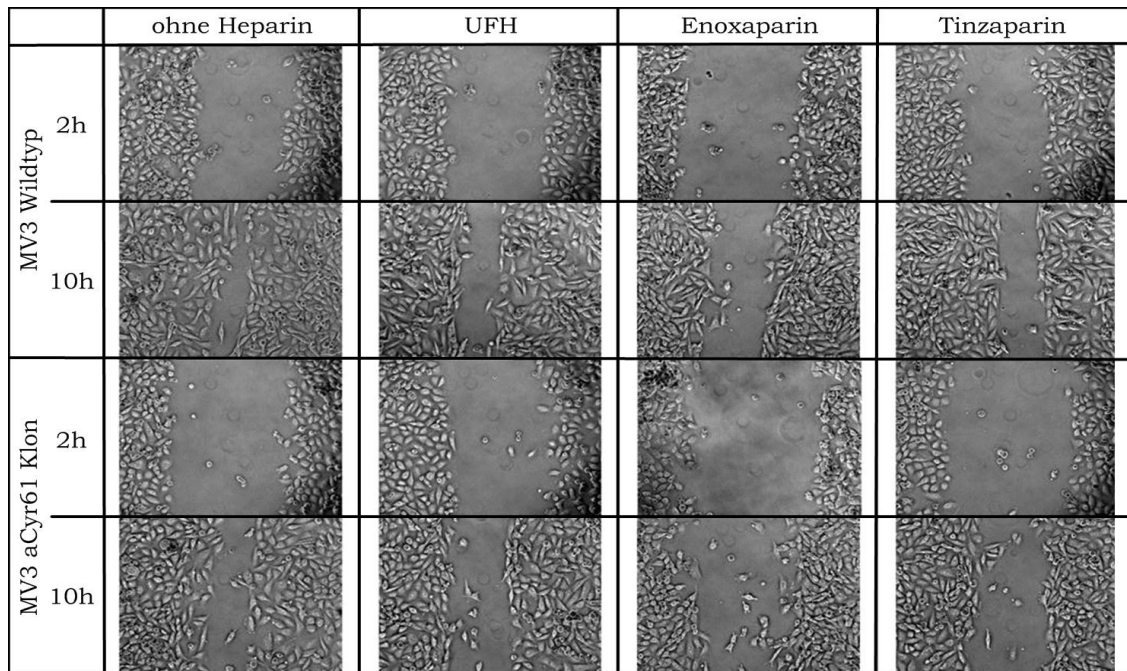


Abbildung 45: **Migration von MV3 und MV3 aCyr61 Klonzellen auf Fibronektin mit und ohne Zusatz von Heparin.**

Die Ergebnisse aus den Experimenten auf Fibronektin sind nicht auf die Kollagenbeschichtung übertragbar. In den Kontrollversuchen migrieren die Klonzellen immer schneller als die Wildtypzellen; die Zellen verändern dieses Verhalten mit Heparin-Zusätzen nur im Falle des Tinzaparin-Natrium nicht. Bei UFH-Natrium und Enoxaparin-Natrium zeigt sich zumindest die schnellere Migration des Wildtypes im Gegensatz zum Klon. Eine Reduzierung der Migration im Vergleich zu normal behandelten Klon- oder Wildtypzellen kann nicht beobachtet werden.

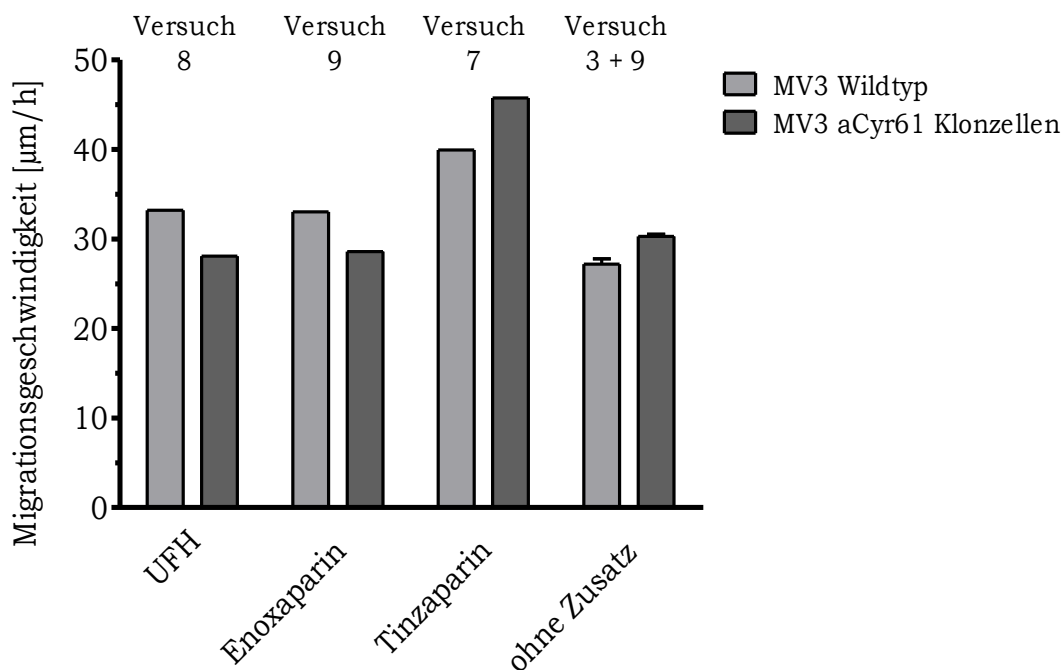


Abbildung 46: **Migrationsverhalten von MV3 Zellen auf Kollagen und Heparin-Zusatz.**

Die hier verwendeten Heparine zeigen keinen signifikanten Effekt auf die Migration. Bei Fibronectinbeschichtung sind Tendenzen zu erkennen, dass die Heparin-Zugabe sowohl bei Klon-, als auch bei Wildtypzellen zu einer Reduktion der Geschwindigkeit führt. Enoxaparin fällt besonders auf, da in beiden durchgeführten Experimenten auf Fibronectin die Zellen mit Enoxaparin Zusatz im Vergleich zu MV3-Zellen ohne Zusätze eine deutlich verlangsamte Migration aufweisen.

Dahingegen war die Zugabe bei auf Kollagen kultivierten Zellen eher migrationsanregend als -hemmend, allerdings nicht statistisch signifikant. Die eingesetzten Heparine wurden in so geringen Konzentrationen eingesetzt, um Cyr61 zu binden aber die Integrine nicht direkt zu inhibieren. Es sollte daher kein Effekt bzw. nur eine zufällige Abweichung von der normalen Migration vorliegen.

Zur Klärung dieser Sachverhalte wären weitere Experimente sinnvoll, in denen die Heparinkonzentration erhöht wird. Dadurch könnte die Migrati-

onsbeeinflussung über Cyr61 und die effektive Bindung desselbigen durch Heparine besser eingeschätzt werden.

5.3.4.4 Migration der MV3 Zellen auf Fibronectin und Cyr61-Zugabe

Die Kontrolle, ob die Migrationsbeeinflussung durch den Cyr61 Knock-down reversibel ist, wurde mit den nachfolgenden Experimenten geklärt. Dabei wurde Cyr61 in den Konzentrationen von 1, 2 und 5 μg pro mL Nährmedium exogen zugeführt.

Es zeigt sich schon bei der Zugabe von 1 μg Cyr61 pro mL eine Beschleunigung der Migration im Vergleich mit den Migrationsgeschwindigkeiten des Klons und des Wildtyps ohne Zusätze. In Versuch 13 steigt die Geschwindigkeit der Klonzellen bei einer Cyr61 Konzentration von 5 μg pro mL fast bis auf die Geschwindigkeit der Wildtypzellen an.

Tabelle 5.10: Migrationsverhalten von MV3 Zellen auf Fibronectin und Cyr61-Zusatz.

Beschichtung	Fibronectin			
Versuch	12	13	12	13
Cyr61 Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	1		2	
	MV3 Wildtyp			
Scratchweite bei 0 h [μm]	388,5	246,2	391,6	246,0
Migrationsgeschwindigkeit [$\mu\text{m}/\text{h}$]	-31,85	-26,99	-63,86	-39,15
	MV3 Klon			
Scratchweite bei 0 h [μm]	276,3	189,9	195,4	188,6
Migrationsgeschwindigkeit [$\mu\text{m}/\text{h}$]	-40,8	-22,23	-33,81	-20,77

Beschichtung	Fibronektin	
	12	13
Versuch	12	13
Cyr61 Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	5	
	MV3 Wildtyp	
Scratchweite bei 0 h [μm]	354,3	233,7
Migrationsgeschwindigkeit [$\mu\text{m}/\text{h}$]	-51,06	-27,87
	MV3 Klon	
Scratchweite bei 0 h [μm]	238,8	208,8
Migrationsgeschwindigkeit [$\mu\text{m}/\text{h}$]	-46,00	-24,35

Die exogene Zugabe von rekombinantem Cyr61 zu MV3-Zellen lässt die Geschwindigkeit der Cyr61-defizienten Klonzellen mit steigender Cyr61 Konzentration auf die des Wildtypes ohne Cyr61-Zusatz ansteigen. Dies beweist eindrucksvoll die Cyr61-Abhängigkeit bei der Integrin-vermittelten Zellmigration und somit die Funktionsfähigkeit der erzeugten Zellklone. Interessanterweise reagieren die Wildtypzellen ebenfalls mit beschleunigter Migration, d.h. die Migration ist auch hier durch Cyr61 steigerbar. Dieser Effekt lässt sich dadurch erklären, dass nicht stimulierte Zellen lediglich über einen geringen Cyr61 Vorrat verfügen, welcher im Bedarfsfall durch äußere Stimuli rasch gesteigert werden kann. Die hier vorliegenden Zellen scheinen also nicht von einer gesteigerten Expression, sondern in diesem Fall von dem exogen im Überfluss vorliegenden Cyr61 Gebrauch gemacht zu haben.

5.3.4.5 Migration der MV3 Zellen auf Fibronektin und Heparinase III-Zugabe

Der Effekt von zelloberflächlich gebundenem Cyr61 wurde im nachfolgenden Versuch eruiert. Dabei wurde über Heparinase III-Zusatz die HSPG von der Zelloberfläche entfernt, bzw. in ihrer Funktion deutlich eingeschränkt. Heparinase III ist eine Heparin-Lyase und spaltet vorwiegend

Heparansulfate zwischen Hexosaminen und Glucuronsäure unter Ausbildung einer Doppelbindung.

Die Migration der Wildtypzellen ist durch diesen Eingriff deutlich erniedrigt. Ebenso ist die der Klonzellen verlangsamt, allerdings in einem geringeren Ausmaß.

Tabelle 5.11: Migrationsverhalten von MV3 Zellen auf Fibronectin und Heparinase III-Zusatz.

Beschichtung	Fibronectin	
Versuch	14	15
Heparinase III Konzentration	0,25 SigmaUnits/well	
	MV3 Wildtyp	
Scratchweite bei 0 h [μm]	306,1	323,7
Migrationsgeschwindigkeit [$\mu\text{m}/\text{h}$]	-25,40	-30,89
	MV3 Klon	
Scratchweite bei 0 h [μm]	217,3	473,6
Migrationsgeschwindigkeit [$\mu\text{m}/\text{h}$]	-23,56	-28,82

Es zeigt sich bei beiden Zellvarianten ausgehend von der „Grundgeschwindigkeit“ auf Fibronectin eine Abnahme in der Migrationsgeschwindigkeit. Deutlicher stellt sich dieser Effekt bei den Wildtypzellen heraus. Wenn man die HSPG, insbesondere das Syndekan-4, als extrazelluläre Speicher für die oberflächliche Bindung von CCN1 versteht, erklären sich der Verlust dieser Speicher und die damit einhergehende Migrationsverlangsamung durch Wegfall des Stimulus Cyr61. Bei Wildtypzellen ist im unbehandelten Zustand mehr Cyr61 vorhanden, weswegen dieser Verlust hier ausgeprägter ist.

Durch die vorherige Heparinase III Behandlung kann es natürlich auch zu einer Einschränkung der Funktion der HSPG und deren Zellsignalling und Wechselwirkung mit den Integrinen kommen. Ob und inwiefern dies einen Einfluss auf die hier bemerkte Migration hat, oder ob die Effekte sich sogar überlagern, lässt sich allerdings nur schwer erfassen.

Zur Verifizierung dieser Befunde könnten weitere Versuche mit Heparinase III vorbehandelten Zellen und anschließender exogener Cyr61 Zufuhr

durchgeführt werden. Ebenfalls könnte in diesem Versuchsaufbau ein Syndekan-4-defizienter MV3 Klon eingebracht und untersucht werden.

5.3.5 Zusammenfassende Beurteilung der transfizierten MV3-Zellen

Die MV3-Zellen konnten ebenfalls erfolgreich durch die shRNA Technik in ihrer Cyr61 Expression beeinflusst werden. Die geschaffenen Klonzellen weisen nur noch knapp die Hälfte Cyr61 im Vergleich zu ihren Wildtypzellen auf; im Westernblot fällt dieser Unterschied sogar noch etwas größer auf. Eine vorhergehende Stimulation ist ebenfalls wichtig, um die Zellen auf einen vergleichbaren Stand zu bringen. Durch die Kombination der durchflusszytometrischen mit den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen ist eine Aussage über den Cyr61-Status und dessen Auswirkung auf die Expression weiterer wichtiger Proteine der jeweiligen Zellen möglich.

Das Integrinmuster der MV3-Zellen zeichnet sich vor allem durch ein massives Vorkommen des VLA-4 aus. Die Integrinuntereinheiten α_5 und α_v sind nur gering vorhanden. Eine Beeinflussung durch VLA-5 in Migrationsuntersuchungen sollte also nur eine untergeordnete Rolle spielen. Der Effekt der Heparinase III-Behandlung während der Migration ist insbesondere mit der Auswirkung auf die Migration des Wildtyps beeindruckend. Hier wird deutlich, dass HSPG neben den Integrinen eine entscheidende Rolle im Prozess der Zellwanderung einnehmen. Der Einsatz einer Syndekan-4 defizienten Zelle könnte hier weiteren Erkenntnisgewinn liefern.

Der Heparinzusatz während der Migration zeigt wiederum kontroverse Ergebnisse. Je nach Untergrund und Zelltyp wirkt er sich sogar paradoxerweise migrationssteigernd aus. Weiterhin ist nicht zu eruieren, ob das Heparin direkt an den Integrinen oder über die Inaktivierung von freiem Cyr61 seine Wirkung entfaltet. Zur weiteren Charakterisierung der Cyr61-Wirkungen auf Integrine und Heparin sollen nun zunächst biosensorische Untersuchungen folgen, bevor die beschriebenen MV3-Zellen auf ihre Adhäsion unter Flussbedingungen untersucht werden.

5.4 Biosensor-Charakterisierung der Cyr61-Wechselwirkungen

Biosensorische Methoden stellen ein potentes Werkzeug dar, um Wechselwirkungen auf molekularer Ebene zu detektieren. Ein Partner der zu beobachtenden Interaktion wird dafür als Erkennungseinheit auf der eigentlichen Sensoroberfläche einer möglichen Wechselwirkung durch chemische Immobilisation zugänglich gemacht. Der andere Partner, bzw. das zu untersuchende Molekül, wird in räumlichen Kontakt gebracht und das resultierende Signal aufgezeichnet und ausgewertet. In Abhängigkeit des jeweiligen Wechselspiels lassen sich somit Aussagen zum Gesamtausmaß der Bindung treffen als auch Bindungskonstanten ermitteln.

5.4.1 Isolierte Untersuchung der Bindung von Heparin an Cyr61

Die vorangegangenen Untersuchungen zur Zellmigration lassen eine Wechselwirkung des Heparins mit zellständigen Molekülen und/oder dem sekretierten Cyr61 vermuten. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass Cyr61 über eine Heparinbindestelle verfügt. Bisher liegen jedoch keine Informationen darüber vor, welche strukturellen Anforderungen das jeweilige Heparin erfüllen muss, um ein guter Bindungspartner zu sein, bzw. ob sich Unterschiede in der Bindung durch verschiedene Heparine ergeben. Dieses Kapitel soll einen Beitrag dazu leisten, indem eine direkte Wechselwirkung zwischen gelöstem Heparin und an die Sensoroberfläche gebundenem Cyr61 untersucht wird.

5.4.1.1 Bindung und kinetische Betrachtung von Heparin an immobilisiertem Cyr61

Für die Untersuchungen wird Cyr61 als Fc-Chimäre wie in Kapitel 4.8.2.2 beschrieben an die Sensoroberfläche gebunden. Die aufgeführten kommerziellen Heparine werden in dem jeweiligen Laufpuffer als Konzentrationsreihen mit aufsteigender Konzentration zugefügt. Detektierte Bindungsereignisse

werden dann mittels FitMaster ausgewertet und über lineare Regression die relevanten Bindungskonstanten ermittelt (siehe auch Kapitel 4.8.3).

In Tabelle 5.12 sind gängige Heparine, wie sie in der Klinik zur Therapie und Vorbeugung von Thromboembolien Verwendung finden, auf ihr Bindungspotential gegenüber Cyr61 untersucht.

Tabelle 5.12: Kinetische Konstanten zur Bindung von Heparin an immobilisierten Cyr61-Fc-Chimären.

	K_D [M]	k_{Ass} [$M^{-1}s^{-1}$]	k_{Diss} [s^{-1}]
UFH	$0,37 \cdot 10^{-5}$ $\pm 0,06 \cdot 10^{-5}$	$21,8 \cdot 10^2$ $\pm 1,90 \cdot 10^2$	$7,97 \cdot 10^{-3}$ $\pm 0,61 \cdot 10^{-3}$
Enoxaparin	$9,14 \cdot 10^{-5}$ $\pm 0,66 \cdot 10^{-5}$	$0,89 \cdot 10^2$ $\pm 0,02 \cdot 10^2$	$8,22 \cdot 10^{-3}$ $\pm 0,78 \cdot 10^{-3}$
Tinzaparin	$1,66 \cdot 10^{-5}$ $\pm 0,34 \cdot 10^{-5}$	$3,97 \cdot 10^2$ $\pm 0,81 \cdot 10^2$	$6,51 \cdot 10^{-3}$ $\pm 1,52 \cdot 10^{-3}$
Fondaparinux	nicht detektierbar		

Die Tabelle zeigt, dass eine direkte Wechselwirkung mit und Bindung des Heparins an Cyr61 stattfindet. Das unfraktionierte Heparin zeigt dabei die günstigste Gleichgewichtsbindungskonstante im kleinen mikromolaren Bereich. Die beiden LMWH liegen, offensichtlich bedingt durch ihre strukturellen Unterschiede, mit ihrer Gleichgewichtsbindungskonstante um einen Faktor 5 auseinander. Auffällig ist hierbei, dass sich die Bindungskonstanten nur über ihre Assoziationskonstante definieren. Bei allen verwendeten Heparinen zeigt die Dissoziationskonstante nahezu vergleichbare Werte, wohingegen die Assoziationskonstante 5- bis 24-fach höher liegen. Die synthetische Pentasaccharideinheit Fondaparinux zeigt keinerlei Bindungsaffinität zum CCN1-Protein.

5.4.1.2 Bindung und kinetische Betrachtung von Heparinderivaten an immobilisiertem Cyr61

Eine direkte Wechselwirkung zwischen Heparin und Cyr61 findet statt, scheint aber von strukturellen Parametern des Heparins abhängig zu sein. Modifizierte Heparine, wie sie von der Arbeitsgruppe um Benito Casu geschaffen werden, können hier erste Struktur-Wirkungsbeziehungen in dieser Interaktion ermöglichen. Die verwendeten Heparine haben bereits dazu beigetragen, Einblicke in das Heparin-Selektin Wechselspiel zu gewinnen und sollen nun auf ihre Bindungsfähigkeit am CCN1-Protein untersucht werden.

Tabelle 5.13: Kinetische Konstanten zur Bindung von Heparinderivaten an immobilisierten Cyr61-Fc-Chimären.

	K_D [M]	k_{Ass} [$M^{-1}s^{-1}$]	k_{Diss} [s^{-1}]
2O-DS-LMWH	$1,72 \cdot 10^{-6}$ $\pm 0,35 \cdot 10^{-6}$	$6,60 \cdot 10^3$ $\pm 0,07 \cdot 10^3$	$1,13 \cdot 10^{-2}$ $\pm 0,22 \cdot 10^{-2}$
6O-DS-LMWH	$6,25 \cdot 10^{-6}$ $\pm 0,24 \cdot 10^{-6}$	$1,33 \cdot 10^3$ $\pm 0,12 \cdot 10^3$	$0,83 \cdot 10^{-2}$ $\pm 0,11 \cdot 10^{-2}$
NAc-LMWH	$0,84 \cdot 10^{-6}$ $\pm 0,11 \cdot 10^{-6}$	$14,2 \cdot 10^3$ $\pm 0,21 \cdot 10^3$	$1,20 \cdot 10^{-2}$ $\pm 0,17 \cdot 10^{-2}$
RO-LMWH	$3,08 \cdot 10^{-6}$ $\pm 0,19 \cdot 10^{-6}$	$5,71 \cdot 10^3$ $\pm 0,20 \cdot 10^3$	$1,76 \cdot 10^{-2}$ $\pm 0,17 \cdot 10^{-2}$

Die Werte zeigen, dass sich alle Tinzaparin-Modifikationen in einem gesteigerten Bindungsverhalten gegenüber dem Ausgangsheparin niederschlagen. Die ermittelten Kinetiken zeigen kaum Unterschiede in ihren Dissoziationskonstanten, so dass auch hier eine Differenzierung über die jeweilige Assoziation vorgenommen werden muss. Hier sind jedoch teilweise erhebliche Unterschiede auszumachen, welche sich dann in den resultierenden Gleichgewichtsbindungskonstanten widerspiegeln. 2O- wie auch 6O-Desulfatierungen am Heparin werden weitestgehend toleriert, hingegen führt eine N-Acetylierung zu einer deutlich gesteigerten Bindungsaffinität,

welche sich dann in einem K_D -Wert im hohen nanomolaren Bereich äußert. Gegenüber dem gewöhnlichen Tinzaparin liegt hier eine Steigerung um den Faktor 20 vor. Eine verbesserte Flexibilität des Heparingerüst durch den durchgeführten Glycol-Split (RO-Heparin) führt ebenfalls zu einer fünffach verbesserten Bindung am Cyr61.

Diese Werte lassen abschätzen, dass es sich bei der Bindung von Heparin an Cyr61 nicht um eine ladungsinduzierte-Bindung handelt, da sonst die desulfatierten Derivate schlechter gegenüber ihrer Ausgangssubstanz abgeschnitten hätten. Lässt Tabelle 5.12 noch vermuten, dass die Länge der Glykosaminoglykanketten die entscheidende Rolle spielt und das unfraktionierte Heparin somit gegenüber den LMWH eine bessere Kinetik zeigt, kann das durch diese Untersuchungen und den Einsatz homogener Kettenlängen nicht bestätigt werden.

5.4.1.3 Bindung und kinetische Betrachtung von Heparin an immobilisiertem Cyr61 MI-III

Strukturelle Anforderungen können auch nicht nur auf der Seite des Heparins gesucht werden. Auch das Cyr61 Molekül mit seinen vier Modulen kann über verschiedene potentielle Bindungsstellen mit Heparin interagieren. In der Literatur ist beschrieben, dass die „Haupt-Heparinbindestelle“ auf Modul IV lokalisiert ist. Durch den Einsatz eines rekombinant mutierten Cyr61, welches um sein Modul IV gekürzt ist, soll nun ein Fokus auf mögliche Heparinbindestellen gelegt werden.

Damit die resultierenden Daten an den Cyr61 M I-III Fc-Chimären vergleichbar mit denen an den Cyr61 Fc-Chimären sind, werden beide Proteine in äquimolarer Konzentration eingesetzt. Die tatsächlich auf der Sensoroberfläche immobilisierte Proteinmenge lässt sich dann mit der unter Kapitel 4.8.3 beschriebenen Methode und unter Anwendung von Gl. 4 errechnen (siehe Tabelle 5.14).

Tabelle 5.14: Immobilisierte Proteinmengen auf der Sensoroberfläche.

	ng/cm ²	fmol/cm ²
Cyr61	15,60	229,31
Fc-Chimäre	± 2,79	± 41,03
Cyr61 M I-III	10,78	191,19
Fc-Chimäre	± 0,80	± 14,17

Tabelle 5.14 ist zu entnehmen, dass die Massenkonzentration der auf der Sensoroberfläche immobilisierten Proteinmenge nicht identisch ist. Dies ist nicht verwunderlich, da den Cyr61 M I-III Fc-Chimären die komplette CT-Domäne fehlt. Bezogen auf die molare Konzentration des jeweiligen Proteins resultieren allerdings annähernd äquivalente Mengen.

Tabelle 5.15: Kinetische Konstanten zur Bindung von Heparin an immobilisierten Cyr61 MI-III-Fc-Chimären.

	K_D [M]	k_{Ass} [M ⁻¹ s ⁻¹]	k_{Diss} [s ⁻¹]
UFH	$4,64 \cdot 10^{-5}$ ± $0,67 \cdot 10^{-5}$	$9,74 \cdot 10^1$ ± $2,43 \cdot 10^1$	$4,44 \cdot 10^{-3}$ ± $0,47 \cdot 10^{-3}$
Enoxaparin		nicht detektierbar	
Tinzaparin	$6,88 \cdot 10^{-5}$ ± $1,02 \cdot 10^{-5}$	$9,16 \cdot 10^1$ ± $1,42 \cdot 10^1$	$6,24 \cdot 10^{-3}$ ± $0,05 \cdot 10^{-3}$

Ohne Anwesenheit der funktionell beschriebenen „Haupt-Heparinbindestelle“ in Domäne IV ändern sich die Gleichgewichtsbindungskonstanten der untersuchten Heparine deutlich. Das UFH verliert seine Affinität gegenüber Cyr61 MI-III um den Faktor 12 (siehe Tabelle 5.15). Dies ist über die signifikant schlechtere Assoziation zu erklären, die in etwa um einen Faktor 20 abnimmt. Das LMWH Enoxaparin ist in seiner Bindung gegenüber Cyr61 gar nicht mehr zu detektieren und verliert ohne Modul IV scheinbar völlig seine Tendenz zum CCN1-Protein. Die Bindung von Tinzaparin wird ebenfalls beeinträchtigt, verliert aber nur leicht an Affinität und verbleibt in etwa in der gleichen Größenordnung.

Diese Bindungsdaten lassen erneut eine Diskussion über strukturelle Anforderungen des Heparins aufkommen, um zu klären ob sich diese als

günstige oder ungünstige Voraussetzungen als Bindungspartner gegenüber dem Cyr61 verhalten.

5.4.1.4 Bindung und kinetische Betrachtung von Heparinderivaten an immobilisiertem Cyr61 MI-III

Nachdem mögliche strukturelle Anforderungen an das Heparin bereits mit den kommerziellen Heparinen an dem um Modul IV gekürzten Cyr61 untersucht wurden, kann nun mit den Heparinderivaten ein weiteres Werkzeug in die Untersuchung mit einbezogen werden.

Tabelle 5.16: Kinetische Konstanten zur Bindung von Heparinderivaten an immobilisierten Cyr61 MI-III-Fc-Chimären.

	K_D [M]	k_{Ass} [$M^{-1}s^{-1}$]	k_{Diss} [s^{-1}]
2O-DS-LMWH	$5,44 \cdot 10^{-6}$ $\pm 1,75 \cdot 10^{-6}$	$2,17 \cdot 10^3$ $\pm 0,42 \cdot 10^3$	$1,14 \cdot 10^{-2}$ $\pm 0,16 \cdot 10^{-2}$
6O-DS-LMWH	$4,44 \cdot 10^{-6}$ $\pm 1,02 \cdot 10^{-6}$	$1,11 \cdot 10^3$ $\pm 0,07 \cdot 10^3$	$0,49 \cdot 10^{-2}$ $\pm 0,08 \cdot 10^{-2}$
NAc-LMWH	$52,4 \cdot 10^{-6}$ $\pm 11,3 \cdot 10^{-6}$	$0,13 \cdot 10^3$ $\pm 0,02 \cdot 10^3$	$0,65 \cdot 10^{-2}$ $\pm 0,08 \cdot 10^{-2}$
RO-LMWH	$7,28 \cdot 10^{-6}$ $\pm 1,11 \cdot 10^{-6}$	$1,86 \cdot 10^3$ $\pm 0,04 \cdot 10^3$	$1,35 \cdot 10^{-2}$ $\pm 0,20 \cdot 10^{-2}$

Interessanterweise zeigen sich die Heparinderivate in ihrer Bindungsaffinität weniger beeinflusst von dem fehlenden Modul IV als die natürlichen Heparine. Lediglich das N-acetylierte Derivat verliert mit seiner Gleichgewichtsbindungskonstante an Affinität gegenüber einer Bindung am vollständigen Cyr61. Die Gründe hierfür könnten in der Tatsache begründet sein, dass dieses Derivat aufgrund seiner 50 %igen N-Acetylierung sehr dem Aufbau eines allgemeinen Heparansulfats ähnelt. Fehlt am Cyr61 die *cysteine knot* C-terminale Domäne (Modul IV), so fehlen neben der eigentlichen „Haupt-Heparinbindestelle“ auch zwei in der Literatur beschriebene Heparansulfat-Proteoglykan-Bindestellen²⁵⁵. Das N-acetylierte Heparinderivat wird also faktisch um mindestens drei potentielle Bindungsstellen ärmer.

Auf Modul III, der TSP-1 Domäne, ist ebenfalls eine Heparinbindestelle sowie eine Bindestelle für Heparansulfat-Proteoglykane beschrieben. Diese Region scheint also, im Falle einer fehlenden CT-Domäne, für die Heparinbindung verantwortlich zu sein. In wie weit sie auch im Falle eines intakten Cyr61 parallel zur Heparinbindung neben der „Haupt-Heparinbindestelle“ mitwirkt, lässt sich auf diesem Wege nicht ergründen.

5.4.2 Untersuchung der Bindung von Heparin an VLA-4

In unserer Arbeitsgruppe wurde bereits durch Dr. Juliane Fritzsche eine Wechselwirkung von Heparin an VLA-4 postuliert und im mikroskopischen Zellassay untersucht⁵⁹. Dr. Dirk Simonis konnte später durch erste kinetische Untersuchungen das Postulat dieser Interferenz bestätigen¹⁵².

Damit das Wechselspiel von Heparin mit Cyr61 und VLA-4 besser miteinander verglichen werden kann, sollen in diesem Kapitel nun kinetische Bindungsuntersuchungen am VLA-4 mit einigen ausgewählten Heparinen und Derivaten durchgeführt werden. Diese Untersuchungen werden an sensorimmobilisierten Membranpräparationen der VLA-4-haltigen MV3 Melanomzellen durchgeführt. Da es sich um die aufgereinigte Membranfraktion eines Ganzzellysates handelt, kann nicht ausgeschlossen werden, auch andere proteinogene Moleküle oberflächlich zu präsentieren und einer Wechselwirkung damit ebenfalls zugänglich zu machen. Andererseits spiegelt diese membranäre Umgebung des VLA-4 aber auch in perfekter Weise die wahren Gegebenheiten an der Zelloberfläche wieder.

Die Membranpräparation wird in Form von Vesikeln auf einen mit Thioglucose derivatisierten Quarz immobilisiert. Es folgt eine Anordnung der vesikulären Strukturen gemäß ihrer Polarität zu den oberflächlich exponierten Hydroxylgruppen der Thioglucose. Im günstigsten Falle bildet sich eine Bilayer-artige Struktur aus und proteinogene Strukturen wie bspw. das VLA-4 werden frei im Pufferfluss exponiert. Es erfolgt die Injektion der

entsprechenden Testsubstanzen in Konzentrationsreihen und die anschließende kinetische Betrachtung und Auswertung.

Tabelle 5.17: Kinetische Konstanten zur Bindung ausgewählter Heparine an Vesikel-immobilisierter Membranpräparation.

	K_D [M]	k_{Ass} [$M^{-1}s^{-1}$]	k_{Diss} [s^{-1}]
Tinzaparin	$4,61 \cdot 10^{-6}$ $\pm 2,68 \cdot 10^{-6}$	$1,27 \cdot 10^3$ $\pm 0,58 \cdot 10^3$	$5,13 \cdot 10^{-3}$ $\pm 1,56 \cdot 10^{-3}$
Enoxaparin	$2,22 \cdot 10^{-6}$ $\pm 0,76 \cdot 10^{-6}$	$1,45 \cdot 10^3$ $\pm 0,30 \cdot 10^3$	$3,09 \cdot 10^{-3}$ $\pm 0,63 \cdot 10^{-3}$
2O-DS- LMWH	$11,6 \cdot 10^{-6}$ $\pm 3,60 \cdot 10^{-6}$	$0,28 \cdot 10^3$ $\pm 0,10 \cdot 10^3$	$3,33 \cdot 10^{-3}$ $\pm 1,42 \cdot 10^{-3}$
6O-DS- LMWH	$5,89 \cdot 10^{-6}$ $\pm 4,12 \cdot 10^{-6}$	$0,42 \cdot 10^3$ $\pm 0,06 \cdot 10^3$	$2,32 \cdot 10^{-3}$ $\pm 1,51 \cdot 10^{-3}$
NAc- LMWH	$5,18 \cdot 10^{-6}$ $\pm 3,30 \cdot 10^{-6}$	$0,47 \cdot 10^3$ $\pm 0,29 \cdot 10^3$	$7,47 \cdot 10^{-3}$ $\pm 5,26 \cdot 10^{-3}$
RO- LMWH	$2,71 \cdot 10^{-6}$ $\pm 2,63 \cdot 10^{-6}$	$1,19 \cdot 10^3$ $\pm 0,25 \cdot 10^3$	$4,45 \cdot 10^{-3}$ $\pm 3,39 \cdot 10^{-3}$

Bei den Betrachtungen spielt der Aktivierungszustand des VLA-4 keine besondere Rolle, sodass die entsprechenden Werte untereinander verglichen werden sollen. Es zeigt sich, dass Tinzaparin VLA-4 mit einer Affinität im mikromolaren Bereich bindet. Ebenso verhalten sich die weiteren Testsubstanzen mit Ausnahme des 2O-desulfatierten Derivates, welches keine besondere Rezeptoraffinität zu zeigen vermag (siehe Tabelle 5.17). Eine äußerst langsame Dissoziation vom Rezeptor ist hier maßgeblich für die relativ hohen Gleichgewichtsbindungskonstanten.

5.4.3 Immobilisation von Kopfgruppen-modifizierten Lipidmembranen auf SAW-Sensorquarzen

Im vorhergehenden Kapitel und in weiteren Untersuchungen wurde bereits die Bindungsfähigkeit von Heparin an VLA-4 untersucht¹⁵². Diese konnte allerdings nur an Vesikel-immobilisierten Membranen erfolgen, die

aus Ganzzelllysaten gewonnen oder über Liposomen auf dem Sensor aufgebracht wurden. Dabei stellten sich andere in den Ganzzelllysaten enthaltene Integrine, Proteoglykane oder sonstige Proteine als problematisch dar um eine dezidierte Bindungsaffinität des Heparins an VLA-4 zu bestimmen. Auch die Liposomen erwiesen sich aufgrund massiver Dämpfungseignisse oder der Bildung mehrerer Membranschichten übereinander als unvorteilhaft. Einen Ausweg bilden dabei über Langmuir-Blodgett-Technik übertragene Modell-Membranen, bzw. Phospholipidschichten wie sie bereits an der Quarzmikrowaage seit vielen Jahren verwendet werden. Einer SAW-Messung konnten diese Modell-Membranen bisher aber nicht zugänglich gemacht werden. Die Gründe hierfür liegen zum einen in der Labilität der geschaffenen Membranen gegenüber Luft und zum anderen in der Tatsache, dass nur trockene Quarze in die Messzelle des Sensors eingebaut werden können. Einen Ausweg soll die Trocknung der übertragenen Membranen mit dem Disaccharid Trehalose (wie in Kapitel 4.8.2.1 beschrieben) ermöglichen. So getrocknete Membranen sind „pseudohydratisiert“ und können über längere Zeiträume ohne Funktionseinschränkungen trocken gelagert werden.

Die ablaufenden Vorgänge während des Trocknens, bzw. bei der späteren Rehydratation soll Abbildung 47 schematisch darstellen. Der Prozess der Rehydratation lässt sich am Biosensor in *real-time* verfolgen.

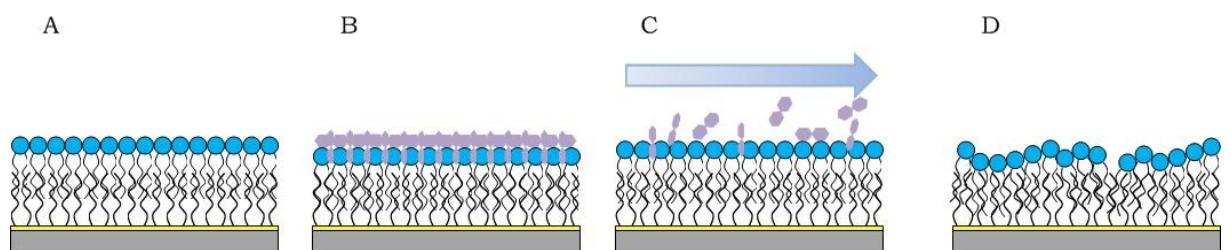


Abbildung 47: **Schematische Darstellung des Trocknungs- und Rehydratisierungsprozesses mittels Trehalose.** A) Gezeigt ist eine mittels Langmuir-Blodgett Technik übertragene Membran auf der Sensoroberfläche unter wässrigen Bedingungen. B) Die übertragene Membran wird unter Zusatz des Disaccharides Trehalose (hier violett dargestellt) getrocknet. Dabei lagern sich die Saccharid-Einheiten um die polaren Phospholipid-Kopfgruppen an und stabilisieren die Membran während der Trocknung. C) Der in die Flusskammer eingebaute Quarz wird unter Puffereinfluss rehydratisiert. Trehalose wird über den Pufferfluss ausgewaschen, die Membran „richtet“ sich wieder auf und gewinnt an Fluidität. D) Schematische Darstellung einer luftgetrockneten Membran. Der Phospholipidlayer ist kollabiert und die Membran in ihrer Funktion eingeschränkt, bzw. zerstört.

5.4.3.1 Detektion und kinetische Betrachtung der Bindung an modellierten Membranproteinen

Die hier übertragenen und nun verwendeten Membranen sind Kopfgruppen-modifiziert, es handelt sich also nicht um eine Membran reiner Phospholipidköpfe, sondern es befindet sich mit 20 mol% ein Chelatorlipid beigemischt. Dieser Chelator bindet zentral ein Nickel-Atom und präsentiert es oberflächlich. An diesem Nickel-Atom kann dann über eine Komplexbindung Histidin erkannt und gebunden werden (siehe auch Abbildung 24 auf Seite 105). Dieses Werkzeug ist somit in idealer Weise dafür geeignet Histidin-getaggte Proteine oberflächennah und -orientiert zu fixieren.

Das Trehalose-Verfahren, welches bei der Trocknung von Liposomen zum Erhalt der vollen Integrität schon seit Jahren Verwendung findet, soll nun auch erstmals zur Trocknung von Modellmembranen auf Biosensorquarzen angewandt und in diesem Kapitel gezeigt werden.

Bereits nach Einbau des Trehalose-getrockneten Quarzes und Einschalten des Pufferflusses wird eine Frequenzabnahme ersichtlich. Ausgewaschene Saccharideinheiten „erleichtern“ den Quarz, die Frequenz fällt ab. Die Frequenzabnahme fällt jedoch erwartungsgemäß nicht so groß aus, da zeitgleich durch den Puffereinfluss eine Hydratisierung der Membran und Einlagerung von Ionen wie Calcium und Magnesium erfolgen wird. Die Amplitude verändert sich ebenfalls dahingehend, dass durch ihren Anstieg von einer Rigidisierung der Membran ausgegangen werden kann. Dies spricht für den weiterhin hoch-geordneten Zustand der Lipide innerhalb der Membran.

Die Injektion eines His-getaggtten Proteins führt dann zu einer massiven Frequenzzunahme, eine Bindung an das Nickel-Ion ist erfolgt und der Quarz schwingt aufgrund der Masseauflagerung bei einer höheren Frequenz. Abbildung 48 zeigt die molekular ablaufenden Reaktionen anhand des aufgezeichneten Sensorgrammes.

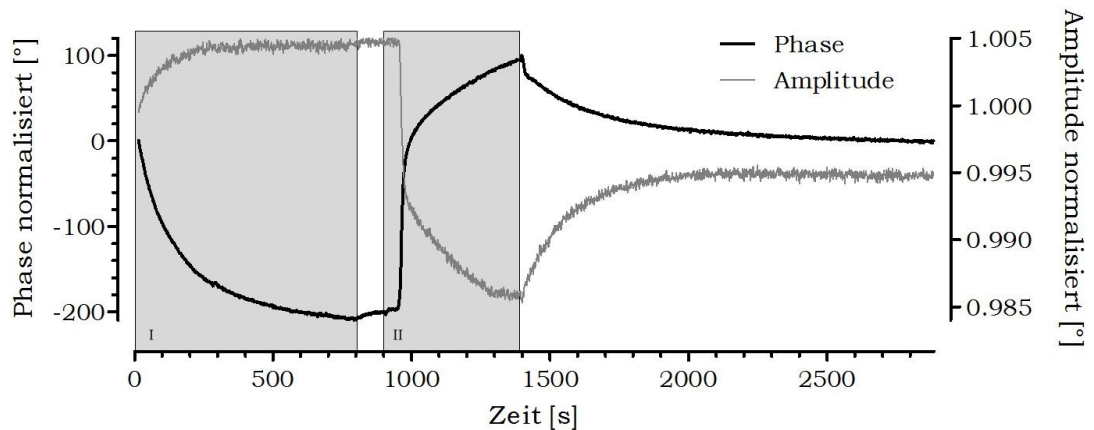


Abbildung 48: **Typischer Frequenz- und Amplitudenverlauf während der Rehydratisierung der Membran und nach Injektion eines His-getaggtten Proteins.** I) Das Auswaschen der Trehalose führt zu einer Frequenzabnahme, der Quarz wird scheinbar „leichter“, parallel dazu signalisiert der leicht steigende Amplitudenverlauf eine zunehmende Rigidisierung der Membran. II) Die Injektion des His-getaggtten Proteins führt zu einem massiven Anstieg der Frequenz bei gleichzeitiger Abnahme der Amplitude. Eine bedeutet eine deutliche Masseauflagerung, die mit einer erhöhten Dämpfung der Amplitude einhergeht.

Wird anstelle des beigemischten DOGS-NTA eine reine DPPC-Membran verwendet, führt die Injektion eines His-getaggtten Proteins zu keiner Masseauflagerung (Daten nicht gezeigt). Eine unspezifische Bindung des Histag oder des Proteins an die Membran kann somit ausgeschlossen werden.

Das metastasierungsrelevante Integrin VLA-4 soll auf seine Bindungsaffinität gegenüber Cyr61 und Heparin untersucht werden. Da es mittlerweile kommerziell als His-getaggttes Protein erhältlich ist, bietet sich die oben vorgestellte Methode der Immobilisation an. Zur anschließenden Testung, ob VLA-4 nicht nur räumlich vorhanden, sondern auch funktionstüchtig immobilisiert ist, wird sein physiologischer Ligand VCAM-1 einer Bindungsuntersuchung zugesetzt. Tabelle 5.18 veranschaulicht die erhaltenen Messdaten.

Tabelle 5.18: Kinetische Konstanten zur Bindung von VCAM-1 an membranimmobilisierten VLA-4-Histag.

	K_D [M]	k_{Ass} [$M^{-1}s^{-1}$]	k_{Diss} [s^{-1}]
VCAM-1	$2,48 \cdot 10^{-9}$ $\pm 0,41 \cdot 10^{-9}$	$2,55 \cdot 10^5$ $\pm 0,45 \cdot 10^5$	$6,42 \cdot 10^{-4}$ $\pm 2,16 \cdot 10^{-4}$

Integrine können physiologisch unterschiedliche Affinitätszustände annehmen; es kann auch über eine Erhöhung der Avidität eine vermehrte Bindung an Liganden herbeigeführt werden. Im hier durchgeführten Versuch kann nur ein einziger Aktivierungszustand des VLA-4 erfasst werden, da eine intrazelluläre Signalweiterleitung und eine damit verbundene Aktivitätssteigerung nicht möglich ist. Berücksichtigt man dies bei der hiesigen Betrachtung, so findet sich die Gleichgewichtsbindungskonstante von $2,48 \cdot 10^{-9}$ in dem Bereich, den Chigaev und Mitarbeiter für den nicht aktivierten Rezeptor gefunden haben²⁵⁶. Ebenso ist der Wert mit bereits am SAW-Biosensor ermittelten Kinetiken an VLA-4 vergleichbar, dabei wurde der Rezeptor allerdings aus Membranpräparationen gewonnen und diese nativ auf dem Sensor immobilisiert. Für eine Betrachtung von Bindungskonstanten unterschiedlicher Heparine oder des CCN1-Proteins an VLA-4 spielt der vorliegende Aktivierungszustand eigentlich keine Rolle, sodass die entsprechenden Werte mit denen anderer bekannter VLA-4 Bindungsepitope verglichen werden sollen.

An dem rekombinanten VLA-4 sollen nun auch ausgewählte Heparine vermessen werden, um einen Vergleich der Bindung am VLA-4 in membranärer Umgebung zu ermöglichen.

Tabelle 5.19 zeigt die Daten für die Bindung von Tinzaparin an isolierten VLA-4. Diese Werte sind vergleichbar mit den Angaben die aus den Untersuchungen an Membranvesikel-immobilisierten VLA-4 hervorgegangen sind. Das unfraktionierte Heparin zeigt eine etwas schwächere Gleichgewichtsbindungskonstante, die aufgrund einer langsameren Assoziation und schnelleren Dissoziation resultiert. Hier könnte die voluminöse Größe bzw. die

Größenverteilung eines unfraktionierten Heparins eine entscheidende Rolle spielen.

Tabelle 5.19: Kinetische Konstanten zur Bindung von Heparin an membranimmobilisierten, isolierten VLA-4-Histag.

	K_D [M]	k_{Ass} [$M^{-1}s^{-1}$]	k_{Diss} [s^{-1}]
UFH	$33,5 \cdot 10^{-6}$ $\pm 2,38 \cdot 10^{-6}$	$0,49 \cdot 10^3$ $\pm 0,04 \cdot 10^3$	$16,4 \cdot 10^{-3}$ $\pm 0,30 \cdot 10^{-3}$
Tinzaparin	$4,99 \cdot 10^{-6}$ $\pm 0,23 \cdot 10^{-6}$	$1,66 \cdot 10^3$ $\pm 0,16 \cdot 10^3$	$8,26 \cdot 10^{-3}$ $\pm 0,42 \cdot 10^{-3}$

Heparin scheint in der Lage zu sein, verschiedene Integrine mit ähnlichen Affinitäten zu binden. So konnten auch Vorup-Jensen und Mitarbeiter eine Gleichgewichtsbindungskonstante von $1,3 \cdot 10^{-6}$ M bei der Interaktion von Heparin mit dem Integrin $\alpha_x\beta_2$ ermitteln⁵³. Interessanterweise scheinen diese Effekte auch nicht ladungsvermittelt zu sein, da sonst die desulfatierten Derivate gegenüber ihren regulär substituierten Derivaten deutlich schlechtere Affinitäten zeigen müssten. Außerdem zeigt die synthetische Pentasaccharideinheit des Heparinanalogs Fondaparinux keine Bindung am VLA-4. Weiterhin können die Effekte auch nicht ausschließlich über unspezifische Bindungen erklärt werden. Dagegen sprechen eine nicht-detectierbare Bindung von Heparin an die verwendeten Membranlipide und die Tatsache, dass selbst hohe Konzentrationen Heparin nicht an Proteine wie bspw. VCAM-1 oder Syndekan-4 zu binden vermögen. Andere Integrine können insbesondere in der verwendeten Membranpräparation nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden. Allerdings ist das Vorhandensein des oben genannten Integrins $\alpha_x\beta_2$ auszuschließen, da es sich um ein typisches Leukozyten-Integrin handelt.

5.4.4 Untersuchung der Bindung von Cyr61 an VLA-4

Nachdem VLA-4 funktionell auf den Membranen immobilisiert und exponiert dargestellt werden kann, soll nun eine kinetische Betrachtung einer

möglichen direkten Bindung des Cyr61 an das Integrin erfolgen. In der Literatur ist diese Wechselwirkung zwischen VLA-4 und Cyr61 bisher noch unerwähnt.

Tabelle 5.20: Kinetische Konstanten zur Bindung von Cyr61 an membranimmobilisierten VLA-4-Histag.

	K_D [M]	k_{Ass} [$M^{-1}s^{-1}$]	k_{Diss} [s^{-1}]
Cyr61	$3,43 \cdot 10^{-8}$	$3,33 \cdot 10^5$	$1,16 \cdot 10^{-2}$
Fc-Chimäre	$\pm 1,91 \cdot 10^{-8}$	$\pm 0,19 \cdot 10^5$	$\pm 0,70 \cdot 10^{-2}$
Cyr61 M I-III	$10,5 \cdot 10^{-8}$	$2,47 \cdot 10^5$	$2,58 \cdot 10^{-2}$
Fc-Chimäre	$\pm 1,70 \cdot 10^{-8}$	$\pm 0,31 \cdot 10^5$	$\pm 0,09 \cdot 10^{-2}$

Die Daten zeigen erstmalig eine direkte Bindung des Cyr61 an VLA-4, mit einer Gleichgewichtsbindungskonstante im mittleren nanomolaren Bereich. Auffällig sind hohe Assoziationskonstanten bei einer geringen Dissoziationskonstante, was für eine schnelle und affine Bindung steht, die schlecht wieder abgelöst wird.

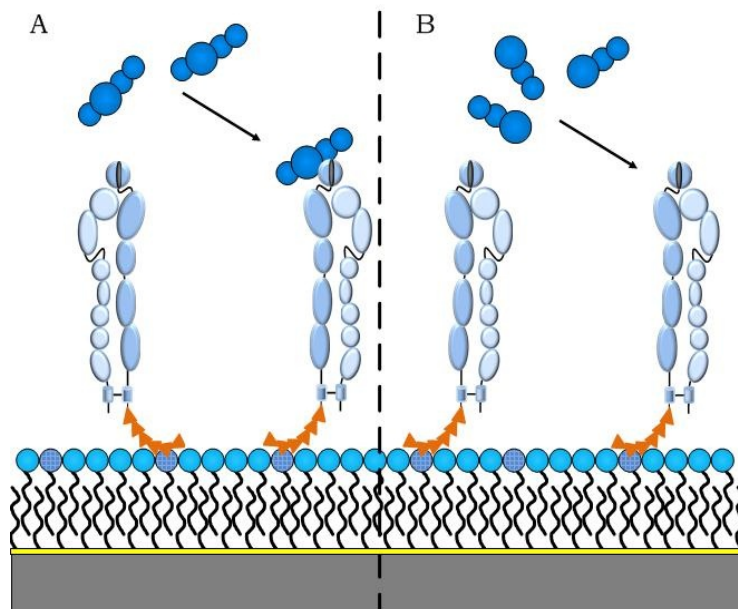


Abbildung 49: **Schematische Darstellung der Bindung von Cyr61 an membranständiges VLA-4.** VLA-4 wird über seine His-getaggte α -Untereinheit immobilisiert, die β -Untereinheit wird dann über nicht-kovalente Wechselwirkungen stabilisiert. A) Cyr61 zeigt Bindungsaffinität zu VLA-4. B) Cyr61-Mutante mit fehlendem Modul IV bindet an VLA-4.

Der Einsatz der verfügbaren Cyr61-Mutante, die um das Modul IV gekürzt ist, lässt gleichzeitig erste Struktur-Wirkungsbeziehungen zu. Demnach liegt ein mögliches Bindungsepitop des Cyr61 am VLA-4 nicht auf Modul IV, da sonst eine deutlich schlechtere bzw. keine Bindungsaffinität der Mutante zu beobachten wäre. Die TSP-1 Domäne oder die vWC-Domäne könnten ebenfalls einen potentiellen Bindungspartner des VLA-4 am Cyr61 darstellen. Dabei ist eine Beteiligung der vWC-Domäne aufgrund verschiedener Untersuchungen am wahrscheinlichsten. So konnte gezeigt werden, dass ein pro-Polypeptid des Von-Willebrand-Faktors (pp-VWC) über eine β_1 -vermittelten Mechanismus an das Integrin bindet. Später wurden α_4 , α_5 und α_9 als zweite Untereinheit des potentiellen Integrins identifiziert. *In vitro* konnten so selbst Melanomzellen zur Adhäsion an pp-VWC gebracht werden^{257,258}.

Trotz äquimolaren Einsatzes beider Cyr61 Varianten liegt ihre Gleichgewichtsbindungskonstante um den Faktor 3 auseinander, was an einer etwas langsameren Assoziation und schnelleren Dissoziation der Cyr61-Mutante liegt. Setzt man eine reine Fc-Chimäre ein, so ist keine Bindung detektierbar (Daten nicht gezeigt); eine unspezifische Bindung oder Wechselwirkung über das Fc-tag kann somit ausgeschlossen werden. Ob und wie stark das Fc-tag allerdings die Kinetik des gelösten Cyr61 beeinflusst, lässt sich hier nicht abschätzen. Es soll nur festgehalten werden, dass im physiologischen Cyr61 eine fehlende Fc-Chimäre zu weiterer Flexibilität und natürlich kleinerem Molekulargewicht führt.

5.4.5 Untersuchung der Bindung von Cyr61 an Syndekan-4

Cyr61 besitzt Bindungsstellen für Heparansulfat-Proteoglykane. Syndekan-4 ist ein prominenter Vertreter dieser Klasse und spielt eine wichtige Rolle im Metastasierungsgeschehen. Im Folgenden soll ein Einblick in die Bindungsaffinitäten des Cyr61 zu membranimmobilisierten Syndekan-4 gewonnen werden, um die komplexen Stimulationswege des Cyr61 besser verstehen zu können.

Syndekan-4 wird kommerziell als His-getaggetes Protein erworben und ähnlich dem VLA-4 auf der rehydratisierten Membran immobilisiert. Die Injektion des Cyr61 in Konzentrationsreihen dient dann einer kinetischen Betrachtung der Bindungsaffinitäten.

Tabelle 5.21: Kinetische Konstanten zur Bindung von Cyr61 an membranimmobilisiertem Syndekan-4-Histag.

	K_D [M]	k_{Ass} [$M^{-1}s^{-1}$]	k_{Diss} [s^{-1}]
Cyr61	$7,08 \cdot 10^{-9}$	$3,27 \cdot 10^6$	$2,22 \cdot 10^{-2}$
Fc-Chimäre	$\pm 1,49 \cdot 10^{-9}$	$\pm 1,21 \cdot 10^6$	$\pm 0,37 \cdot 10^{-2}$
Cyr61 M I-III	$33,1 \cdot 10^{-9}$	$0,41 \cdot 10^6$	$1,34 \cdot 10^{-2}$
Fc-Chimäre	$\pm 6,49 \cdot 10^{-9}$	$\pm 0,02 \cdot 10^6$	$\pm 0,19 \cdot 10^{-2}$

CCN1 zeigt eine hohe Gleichgewichtsbindungskonstante zu Syndekan-4 im niedrigen nanomolaren Bereich, herbeigeführt durch eine sehr schnelle Assoziationskonstante (siehe Tabelle 5.21). Diese starke Affinität lässt sich mit mehreren Tatsachen erklären. Zum Einen ist Syndekan-4 mit Heparansulfatketten dekoriert, die weit vom eigentlichen Protein-Core-Gerüst „ausgestreckt“ werden und somit zu einer deutlichen Oberflächenvergrößerung und Vergrößerung der Interaktionsfläche beitragen. Freie Proteine, Wachstumsfaktoren oder eben Cyr61 werden förmlich eingefangen und verbleiben in diesen Saccharidketten gebunden. Zum Anderen verfügt Cyr61 über mehrere literaturbekannte Bindungsstellen für HSPG. So können diese sowohl in der TSP-1 Domäne, wie auch in der *cysteine knot* C-terminale Domäne gebunden werden. Je nach Dekorationsmuster der Saccharide könnte sogar von einer Bindung in der Heparinbindestelle ausgegangen werden.

Dass eine Bindung der HSPG nicht ausschließlich über Modul 4 vermittelt wird, zeigt der Einsatz der um Modul 4 gekürzt und mutierten Cyr61 Variante. Hier konnte ebenfalls eine hohe Affinität im mittleren nanomolaren Bereich detektiert werden.

Wird das untersuchte System umgekehrt und Cyr61 auf der Sensoroberfläche immobilisiert, um den Effekt von gelöstem Syndekan-4 zu untersuchen, ergeben sich die in Tabelle 5.22 dargestellten Werte.

Tabelle 5.22: Kinetische Konstanten zur Bindung von Syndekan-4-Histag an immobilisierten Cyr61- und Cyr61 MI-III-Fc-Chimären.

Syndekan-4	K_D [M]	k_{Ass} [$M^{-1}s^{-1}$]	k_{Diss} [s^{-1}]
an Cyr61	$2,74 \cdot 10^{-7}$	$6,20 \cdot 10^4$	$1,70 \cdot 10^{-2}$
Fc-Chimäre	$\pm 0,23 \cdot 10^{-7}$	$\pm 0,12 \cdot 10^4$	$\pm 0,17 \cdot 10^{-2}$
an Cyr61 M I-III	$1,35 \cdot 10^{-7}$	$3,03 \cdot 10^4$	$0,41 \cdot 10^{-2}$
Fc-Chimäre	$\pm 0,19 \cdot 10^{-7}$	$\pm 0,03 \cdot 10^4$	$\pm 0,06 \cdot 10^{-2}$

Auffällig ist eine um ca. zwei Zehnerpotenzen geringere Assoziationskonstante, die somit die Gesamtaffinität in den hohen nanomolaren Bereich verlagert. Auch hier können beide Cyr61-Varianten mit einer Bindung gegenüber dem freien Syndekan-4 detektiert werden.

Die kleineren Gleichgewichtsbindungskonstanten des freien Syndekan-4 in Wechselwirkung mit immobilisiertem Cyr61 lassen sich dadurch erklären, dass es sich um ein relativ großes Molekül handelt, welches nur schlecht in räumliche Nähe zu fixierten Strukturen gebracht werden kann. Neben der Tatsache, dass dieses simulierte Szenario auch nicht den physiologischen Bedingungen entspricht, werden die Heparansulfatketten auch nicht derartig räumlich „ausgestreckt“ sein, wie sie im Falle der Syndekan Immobilisation in den Raum ragen.

Interessanterweise zeigt freies Syndekan-4 zur gekürzten Cyr61 Variante eine etwas höhere Affinität, hervorgerufen durch eine langsame Dissoziation. Dies bestärkt die Annahme, dass die Cyr61-Syndekan-4 Bindung vermehrt über die TSP-1 Domäne durchgeführt wird und ein fehlendes Modul IV zu einer räumlich besser zugänglichen Bindungsstelle für die Heparansulfatketten führt.

Um die Bindestellen des Cyr61 für Heparin und HSPG weiter zu charakterisieren soll der Versuchsaufbau wie in Abbildung 50 dargestellt beitragen.

Nach der Immobilisation von Syndekan-4 auf einer Membranoberfläche wird Cyr61 zugeführt und die Bindung detektiert. Durch steigende Konzentrationen Heparin soll in einer Art Wettbewerbsexperiment eine Verdrängung des Cyr61 am Syndekan-4 durch Heparin herbeigeführt werden.

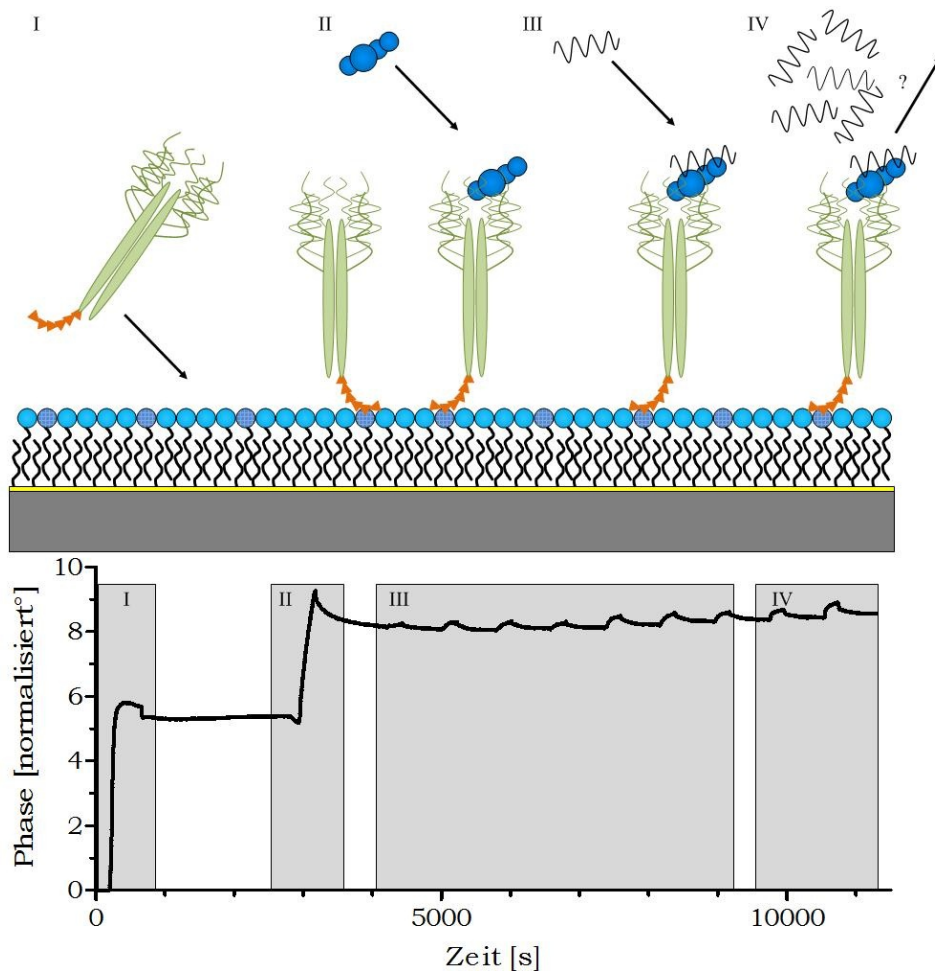


Abbildung 50: **Schematische Darstellung der Immobilisation von Syndekan-4 Histag an einer künstlichen Membran.** I) Syndekan-4 Histag wird an den Chelator in der Membranoberfläche gebunden und eine Phasenverschiebung wird detektiert. II) Die Bindung von Cyr61 an die Heparansulfatketten des Syndekan-4 kann durch eine positive Phasenverschiebung detektiert werden. III) Heparin wird in steigenden Konzentrationen dem Pufferfluss zugesetzt und bindet an die immobilisierten Strukturen. IV) Selbst hohe Konzentrationen an Heparin sind nicht in der Lage das am Syndekan-4 gebundene Cyr61 abzulösen oder zu verdrängen.

Der Phasenverlauf lässt erkennen, dass zunächst Syndekan-4 auf der Membran immobilisiert wird und daran anschließend auch Cyr61 gebunden wird. Steigende Konzentrationen an Heparin führen zu verstärkten

Bindungsereignissen. Allerdings lässt sich auch durch eine hohe Heparinkonzentration Cyr61 nicht aus seiner Bindung an Syndekan-4 lösen.

Die Konzentrationsreihe des eingesetzten Tinzaparins lässt auch eine kinetische Auswertung zu, die in Tabelle 5.23 zusammengefasst ist.

Tabelle 5.23: Kinetische Konstanten zur Bindung von Tinzaparin an am Syndekan-4-Histag gebundenen Cyr61.

Tinzaparin	K_D [M]	k_{Ass} [$M^{-1}s^{-1}$]	k_{Diss} [s^{-1}]
an Cyr61	$3,65 \cdot 10^{-5}$	$3,95 \cdot 10^2$	$1,45 \cdot 10^{-2}$
Fc-Chimäre	$\pm 0,55 \cdot 10^{-5}$	$\pm 0,19 \cdot 10^2$	$\pm 0,29 \cdot 10^{-2}$
an Cyr61 M I-III Fc-Chimäre	nicht detektierbar		

Tinzaparin bindet an Cyr61, welches selbst bereits am Syndekan-4 gebunden ist. Die Gleichgewichtsbindungskonstante ist mit der Affinität des Tinzaparins gegenüber einzeln immobilisierten Cyr61 vergleichbar und differiert nur geringfügig.

Cyr61 mit fehlendem Modul IV kann auch an Syndekan-4 binden. Jedoch zeigt Tinzaparin dann keine Affinität gegenüber dieser gebundenen Cyr61 Variante. Dies bestätigt die bereits vorher getätigte Annahme, dass die vorwiegende Bindungsdomäne für das verwendete Syndekan-4 außerhalb von Modul IV des Cyr61 liegen muss. Die CT-Domäne des Cyr61 bleibt von der Bindung des Syndekan-4 nahezu unbeeinflusst und erlaubt die additive Bindung bzw. Wechselwirkung mit Heparin. Eine Verdrängung des Cyr61 vom Syndekan ist somit durch Heparin nicht möglich, da es sich um unterschiedliche Bindungsorte handelt, die nicht in Konkurrenz um die beiden Bindungspartner miteinander stehen.

Eine Bindung des Heparins an die freie Fc-Chimäre oder an Syndekan-4, bzw. die Bindung der Fc-Chimäre an das Syndekan-4 konnte durch vorhergehende Untersuchungen ausgeschlossen werden.

Die verwendeten Heparinderivate zeigten teilweise unerwartete Ergebnisse in der Bindung zu Cyr61 (siehe Kapitel 5.4.1.2 und 5.4.1.3). Das N-acetylierte Derivat war dabei am auffälligsten und legte die Vermutung nahe,

seine Bindung nicht über die Heparinbindestelle auf der CT-Domäne des Cyr61 zu vermitteln. Da dieses Derivat aufgrund der N-Acetylierung der Struktur von Heparansulfat nahe kommt, könnte hier im durchgeführten Wettbewerbsexperiment tatsächlich eine Verdrängung erfolgen.

Tabelle 5.24: Kinetische Bindungskonstanten zur Bindung von NAc-LMWH an am Syndekan-4-Histag gebundenen Cyr61.

NAc-LMWH	K_D [M]	k_{Ass} [$M^{-1}s^{-1}$]	k_{Diss} [s^{-1}]
an Cyr61 Fc-Chimäre		nicht detektierbar	
an Cyr61 M I-III Fc-Chimäre		nicht detektierbar	

Diese Annahme konnte im Verdrängungsexperiment jedoch nicht bestätigt werden. Tabelle 5.24 zeigt auch, dass keine Bindung zu detektieren war und damit eine Berechnung von Konstanten entfällt. Trotzdem lässt sich für das N-acetylierte Heparinderivat festhalten, dass eine Bindung vermutlich nicht über die Heparinbindestelle in der CT-Domäne erfolgt. Ob die Bindung über die Bindestellen für die HSPG erfolgt, lässt sich mit diesen Untersuchungen nicht abschließend klären. Die Annahme, dass Syndekan-4 das Cyr61 in der TSP-1 Domäne bindet, bleibt bestehen, da auch die um Modul IV gekürzte Variante eine Bindungsaffinität zeigt. Eine Verdrängung dieser mutierten Variante konnte durch das N-acetylierte Derivat ebenfalls nicht herbeigeführt werden. Dies könnte auf eine zu große Variabilität in der Struktur von den Heparansulfatketten des Syndekan-4 gegenüber dem NAc-LMWH zurückzuführen sein, oder aber tatsächlich auf unterschiedliche Bindungsstellen, die somit einer Konkurrenz entgehen.

5.4.6 Zusammenfassende Beurteilung der kinetischen Bindungsdaten

Die biosensorischen Untersuchungen zeigen, dass Cyr61 an der Zelloberfläche mit unterschiedlichen Bindungspartnern interagieren kann. Erstmals konnte eine direkte Bindung des Cyr61 an VLA-4 nachgewiesen werden. Die Bindung ist darüber hinaus hochaffin und zeigt K_D -Werte im mittleren nanomolaren Bereich. Eine Wechselwirkung des Cyr61 mit Syndekan-4 konnte ebenfalls durch die Bindungsstudien bestätigt werden. Hier ist die Affinität sogar noch größer und die Bindung lang andauernd, was durch eine langsame Dissoziationskonstante bestätigt wird. Die Erklärung liegt hier an den verschiedenen Bindestellen des Cyr61 für Heparansulfat-Proteoglykane und den raumfüllenden und für Cyr61 strukturell attraktiven Heparansulfat-Seitenketten. Durch Einsatz einer Cyr61-Mutante, die um ihre CT-Domäne (Modul IV) gekürzt ist, konnte gezeigt werden, dass die Bindung an VLA-4 oder Syndekan-4 unabhängig von dieser Domäne ist.

Heparin bindet ebenfalls an Cyr61 im mittleren bis kleinen mikromolaren Bereich. Auch strukturabgewandelte Heparine binden in unterschiedlichem Ausmaß an Cyr61 und erlauben erste Struktur-Wirkungsbeziehungen dieser Bindung. So kann auch Modul IV des Cyr61 als Haupt-Heparinbindestelle ausgemacht werden. Die eingesetzten Heparine sind jedoch nicht in der Lage, bereits an VLA-4 oder Syndekan-4 gebundenes Cyr61 zu verdrängen. Dies liegt an der bis zu drei Zehnerpotenzen höheren Affinität des Cyr61 gegenüber Heparin zu den proteinogenen Strukturen.

Bezogen auf die physiologischen Vorgänge an der Zelloberfläche, kann für Heparin nur sekretiertes und freies Cyr61 als Bindungspartner fungieren. Ist Cyr61 bereits an Syndekanen oder Integrinen gebunden, ist Heparin nicht in der Lage als Effektor über Cyr61 zu wirken, sondern kann nur noch als direkter Inhibitor der Integrinwechselwirkungen mit Liganden wirken.

5.5 Untersuchung des Zelladhäsionsverhalten unter Flussbedingungen

Die Simulation der Adhäsion von Tumorzellen an endothelständige Liganden erfolgt mit der unter Kapitel 4.7.2.1 beschriebenen Durchflussapparatur. Die vorherrschenden Flussbedingungen erlauben die Übertragung der *in vitro* Ergebnisse an physiologische Verhältnisse. Für die hier getätigten Untersuchungen wurde ausnahmslos das Rezeptorprotein VCAM-1 auf den verwendeten Glaträgern immobilisiert. Dies ermöglicht den Bindungsmechanismus des VLA-4 an seinen physiologischen Liganden zu charakterisieren. Potentiell andere Adhäsionsmechanismen, wie sie *in-vivo* parallel dazu vorkommen, können somit ausgeschlossen werden.

Nach dem Einbau des VCAM-1-beschichteten Glasplättchen in die Durchflussapparatur wurde diese zunächst mit PBS-Puffer gespült. Dem Einspülen der Zellen in die Flusskammer folgt eine fünfminütige Sedimentationsphase, die den Kontakt zwischen Zellen und dem immobilisierten Protein erlaubt. Im Anschluss wurde der Fluss erneut gestartet und das Verhalten der Zellen aufgezeichnet und ausgewertet. Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Kapiteln dargestellt.

5.5.1 Adhäsion Cyr61-herunterregulierter MV3-Zellen

Die verwendeten MV3 Melanomzellen zeigten bereits in vorangegangenen Untersuchungen bei anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Bendas feste Adhäsion gegenüber VCAM-1^{59,75}. Die Stimulation der Zellen erfolgte ebenfalls bereits optimiert durch eine vorhergehende fünfminütige Stimulation mit 1 mM Mangan-Ionen. VLA-4 wird dabei über die Bindung des Mangans an das MIDAS-Motiv der I-ähnlichen Domäne der β -Untereinheit und über eine damit einhergehende Konformationsänderung in einen hochaffinen Zustand versetzt²⁵⁹.

In der folgenden Abbildung ist der Adhäsionsverlauf stimulierter und unstimulierter MV3 Wildtypzellen dargestellt. Zusätzlich ist die Zelladhäsion der Cyr61-defizienten MV3 Klonzellen aufgezeichnet.

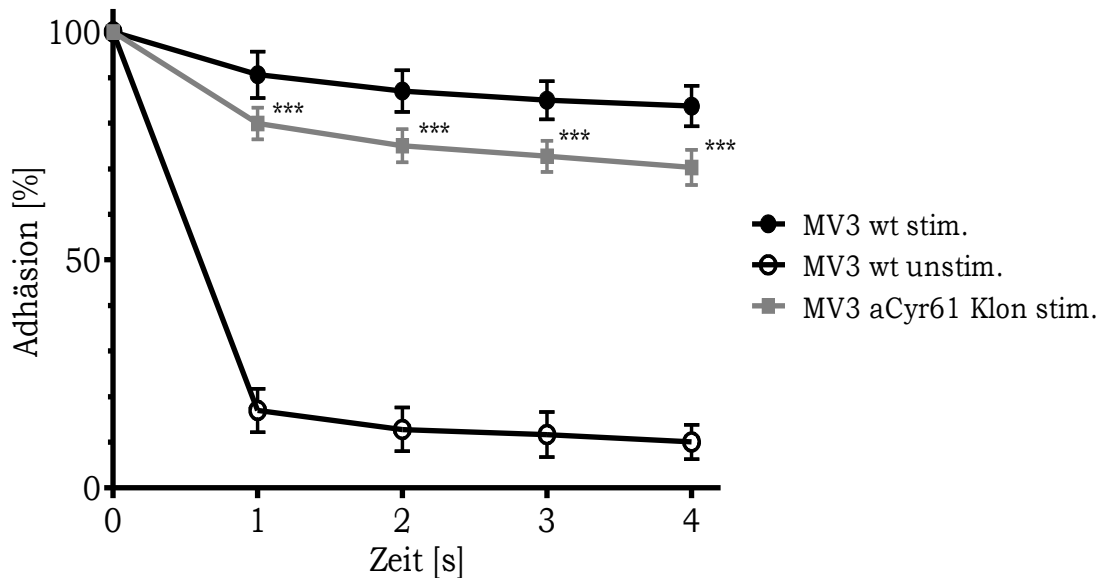


Abbildung 51: **Vergleich der Zelladhäsion von MV3 Wildtypzellen gegenüber MV3 aCyr61 Klonzellen nach 5 min. Manganstimulation.**

In Abbildung 51 wird deutlich, dass die Manganstimulation eine deutliche Steigerung der Zelladhäsion zur Folge hat. Der hier erstmalig untersuchte MV3 aCyr61 Klon zeigt gegenüber seinen Wildtypzellen eine geringfügige, aber statistisch signifikante Adhäsionsminderung im stimulierten Zustand. Dies zeigt erstmals den funktionellen Zusammenhang zwischen dem Cyr61 Protein und dem Integrin VLA-4. Die verminderte Cyr61 Expression scheint mit einer geringeren Zelladhäsion des VLA-4 an seinen physiologischen Liganden VCAM-1 korreliert zu sein. Der Abstand der beiden Kurven im stimulierten Zustand kann also, bei sonst gleichartigen Zellen, als der Cyr61-Effekt herausgestellt werden.

Unstimulierte MV3-aCyr61 Klonzellen verhalten sich wie ihr unstimulierter Wildtyp und sind der Vereinfachung halber hier nicht weiter dargestellt.

5.5.2 Einfluss von exogen zugefügtem Cyr61 auf Cyr61-defiziente MV3-Zellen

Aus dem vorangegangenen Unterkapitel ist der Cyr61-Einfluss auf die VLA-4 vermittelte Zelladhäsion hervorgegangen. Um diesen Einfluss weiter charakterisieren zu können, soll nun untersucht werden, ob exogen zugefügtes, rekombinantes Cyr61 die verminderte Zelladhäsion des Cyr61-defizienten Zellklones gegenüber seinem Wildtyp wiederherstellen kann.

5.5.2.1 Einfluss der Stimulationszeit

In der Literatur sind keine detaillierten Stimulationsmengen oder -zeiten zur Adhäsionssteigerung von Zellen an bestimmte Substrate mittels CCN1 genannt. Dies musste im Rahmen der hier getätigten Untersuchungen zunächst eruiert werden.

Da Cyr61 das Genprodukt eines *immediate-early gene* ist und somit schnell exprimiert werden kann, ist auch von einer raschen Sekretion und Wirkung an seinen Zielstrukturen zu rechnen. Unstimulierte MV3 Zellen zeigen in der Zelladhäsion nur geringe prozentuale Werte. Aus diesem Grund soll an der parallelen Manganstimulation weiter festgehalten werden. Die Manganstimulation des VLA-4 und sein damit verbundener hochaffiner Zustand ist aber ebenfalls nur von kurzer, unbekannter Dauer. Die nachfolgende Grafik soll den Einfluss der Stimulationszeit mit 1 mM Mangan auf die resultierende Zelladhäsion der MV3 Wildtyp und Klonzellen verdeutlichen.

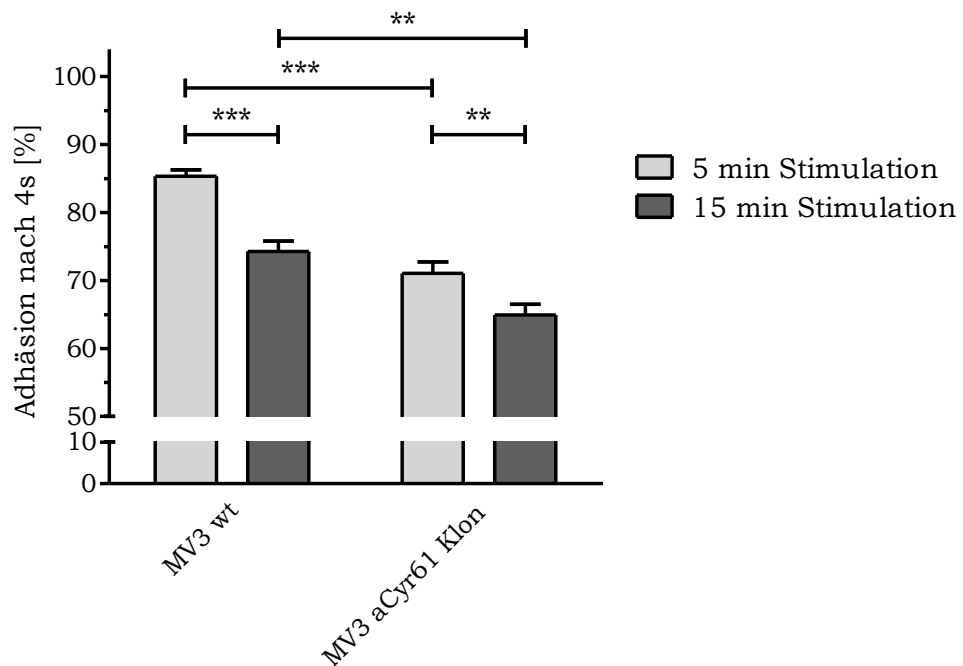


Abbildung 52: **Einfluss der Stimulationszeit auf die Zelladhäsion nach 4 s.** Die Abbildung zeigt den Einfluss der Manganstimulation nach 5 und 15 Minuten auf das Zelladhäsionsverhalten nach 4 s.

In Abbildung 52 wird deutlich, dass eine dreifach gesteigerte Stimulationszeit die Adhäsion der Wildtypzellen höchst signifikant zu mindern vermag. Der hochaffine Zustand des Integrins scheint also bereits wieder in einen weniger affinen übergegangen zu sein. Die Gesamtadhäsion liegt aber weiterhin über der Zelladhäsion der Cyr61-defizienten Klonvariante. Auch der Klon wird durch eine verlängerte Manganstimulation in seiner Adhäsion gegenüber VCAM-1 heruntersetzt.

Eine Stimulation mit 1 mM Mangan sollte dieser Betrachtung nach weiterhin für fünf Minuten erfolgen. Eine mögliche Stimulation mit exogen zugesetzten Cyr61 sollte also ebenfalls im gleichen zeitlichen Rahmen erfolgen, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten und nicht durch zeitlich unterschiedliche Manganstimulationszeiten Störfaktoren einzubringen.

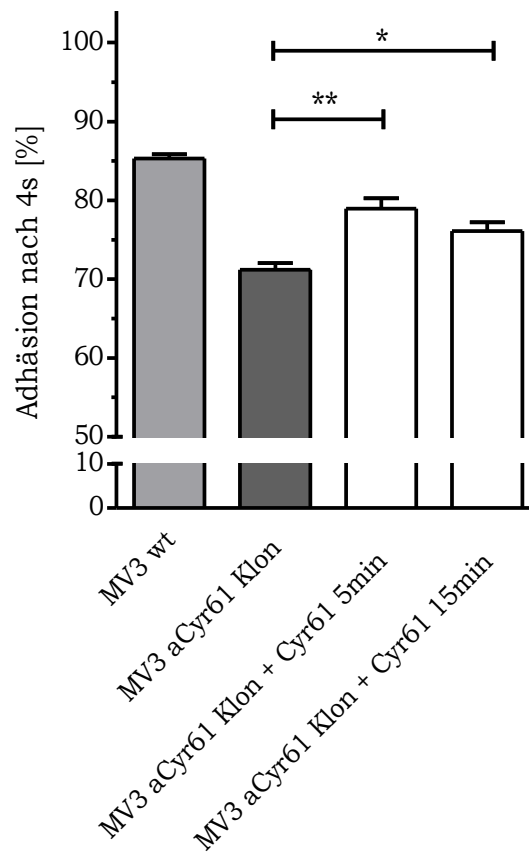


Abbildung 53: **Einfluss der Stimulationszeit mit exogen zugeführten Cyr61 (1µg/1 Mio. Zellen) auf die Zelladhäsion nach 4 s.** Die Abbildung zeigt den Einfluss der Cyr61-Stimulation nach 5 und 15 Minuten unter gleichzeitiger Manganstimulation auf das Zelladhäsionsverhalten nach 4 s.

Die vorstehende Abbildung zeigt den Einfluss des Proteins CCN1 auf die Zelladhäsion des Cyr61-defizienten Klonen. Dabei wurde die Adhäsion nach 4 Sekunden als Kriterium einer dauerhaften Bindung herangezogen. Es wurde mit jeweils 1 µg exogenem Cyr61/1 Mio. Zellen für 5 bzw. 15 Minuten unter gleichzeitiger 1 mM Manganstimulation inkubiert. Der Abbildung ist zu entnehmen, dass exogen zugeführtes Cyr61 zu dem in seiner Expressionsleistung abgeschwächten Klon zu einer signifikanten Steigerung der Gesamtzelladhäsion führt. Eine Stimulation für fünf Minuten erzielt dabei ein höheres Ausmaß im hochsignifikanten Niveau in der Adhäsion, als eine dreifach längere Stimulationszeit. Dies könnte mit der Tatsache zu erklären sein, dass das CCN1 Protein für eine schnelle und kurzzeitige Stimulation

am Zielprotein gedacht ist. Eine Protease-sensitive Stelle zwischen Modul II und III könnte im Zuge der raschen Inaktivierung ebenfalls durch Proteasen angegriffen werden. Das gespaltete Protein ist somit in der Ausübung seiner Funktion blockiert und wird komplett abgebaut. Dies könnte bereits in einem Stimulationszeitraum von 15 Minuten beginnen und die damit einhergehende verminderte Adhäsionsleistung erklären.

Auffällig ist, dass die Gesamtadhäsion der manganstimulierten Wildtypzellen nicht erreicht wird. Hier sind also möglicherweise höhere Cyr61-Spiegel von Nöten.

Stellt man beide Stimulationswege gegenüber, so erzielen sowohl eine fünfminütige Mangan- als auch eine fünfminütige Cyr61-Stimulation höhere Adhäsionswerte als längere Zeitintervalle. Für die nachfolgenden Untersuchungen wird daher jeweils die Stimulation für fünf Minuten durchgeführt.

5.5.2.2 Einfluss der zugesetzten Cyr61-Menge

Exogen zugeführtes Cyr61 hat einen Effekt auf die Cyr61-defizienten Klonzellen, was bereits aus den vorstehenden Untersuchungen hervorgeht. Inwieweit diese Auswirkung auf die Adhäsion durch eine höhere Konzentration noch zu steigern ist, soll über eine Variation in der zugesetzten Cyr61 Konzentration ermittelt werden. Dazu werden jeweils $1 \cdot 10^6$ Zellen mit steigenden Konzentrationen an exogenem Cyr61 versetzt und für fünf Minuten parallel mit 1 mM Mangan stimuliert. Die so präparierten Zellen werden in die Flusskammer gespült und für fünf Minuten sedimentieren gelassen. Nach Einschalten des Pufferflusses wird das Zellverhalten aufgezeichnet und die adhärennten Zellen quantifiziert.

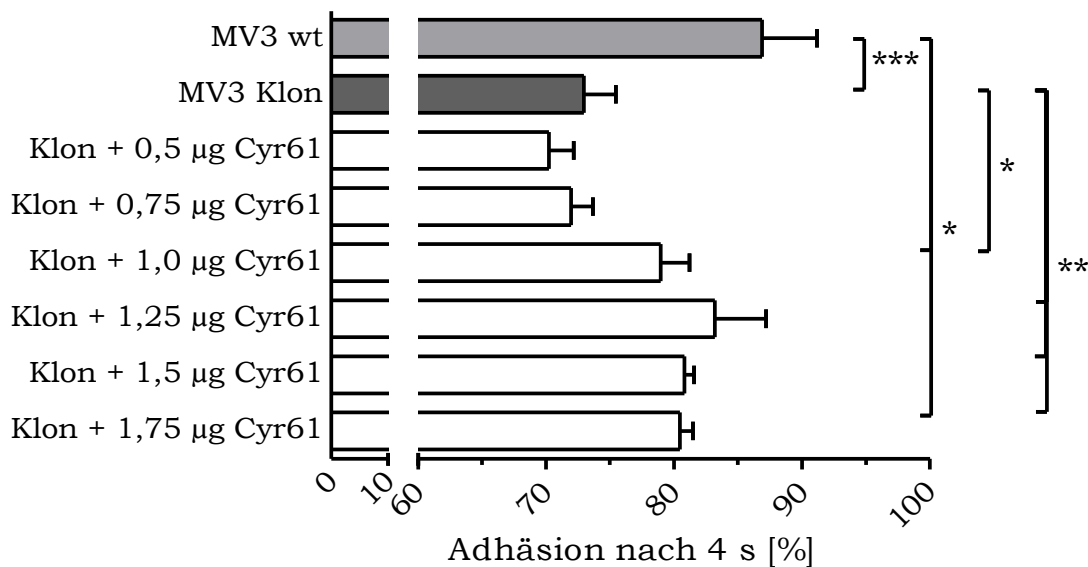


Abbildung 54: **Einfluss des exogen zugesetzten rekombinanten Cyr61 auf die Zelladhäsion nach 4 s.** Der Graph zeigt die Zelladhäsion der MV3 Wildtypzellen im Vergleich mit den Cyr61-defizienten MV3 Zellen nach 5 min Manganstimulation und gleichzeitig exogen zugesetzten Cyr61 in unterschiedlicher Konzentrationen zu jeweils 1 Mio. Zellen berechnet.

Abbildung 54 zeigt den Einfluss des zum Cyr61-defizienten Zellklon exogen zugesetzten rekombinanten Cyr61 bei gleichzeitiger Manganstimulation auf die Zelladhäsion. Es fällt auf, dass bis zu einer Cyr61-Konzentration von 0,75 µg/1 Mio. Zellen die Adhäsion des Klones, ohne zusätzliches CCN1 nicht gesteigert wird. Ab 1,0 µg/1 Mio. Zellen kann von einer deutlichen Zunahme in der Bindungsfähigkeit zum VLA-4 gesprochen werden, was durch weitere 0,25 µg sogar noch weiter gesteigert werden kann. Die Variabilität nimmt bei 1,25 µg allerdings ebenfalls stark zu, sodass hier die Ergebnisse weniger klar sind. Eine exogene Zufuhr von 1,5 µg Cyr61 führt zu keiner weiteren signifikanten Steigerung in der Gesamtadhäsion. Die Fähigkeit am VCAM-1 in einem Ausmaß zu binden wie es der stimulierte Wildtyp zeigt, konnte mit keiner der untersuchten Cyr61 Konzentrationen erzielt werden. Ebenso kann mit exogen zugesetzten Cyr61 zu den Wildtypzellen kein Effekt in der Adhäsion festgestellt werden.

5.5.3 Einfluss von Heparin und Heparinderivaten auf die Adhäsion Cyr61-defizienter MV3-Zellen

Der Einfluss von Heparin auf die Adhäsion von Melanomzellen, speziell auf die Bindung des VLA-4 am VCAM-1 konnte bereits gezeigt werden. Dabei wurde bisher die direkte Rezeptorwechselwirkung des Heparins am VLA-4 betrachtet. Cyr61 besitzt Heparinbindestellen und eine Inaktivierung des freien Cyr61 durch Heparin ist in der Literatur beschrieben. Durch die in dieser Arbeit getätigten Biosensoruntersuchungen ist eine direkte Bindung von Heparin an Cyr61 bewiesen. Ebenfalls zeigt sich eine direkte und hoch-affine Bindung des Cyr61 an VLA-4. Ein indirekter Einfluss des Heparins über die Bindung des Cyr61 und die damit einhergehende ausbleibende Aktivierung des VLA-4 liegt somit auf der Hand.

Die Wirkung des Heparins auf Cyr61 soll mit den Cyr61-defizienten Klonzellen im Vergleich zu den Wildtypzellen herausgestellt und unter physiologischen Flussbedingungen ermittelt werden.

5.5.3.1 Einfluss fraktionierter Heparine

Cyr61 wird als nahezu zytokinartige Substanz in geringen Mengen sekretiert und vermag bereits in diesen Konzentrationen einen Effekt über VLA-4 auszulösen. Heparin kann sowohl über eine direkte Rezeptorwechselwirkung am VLA-4 wie auch über Cyr61 mit seiner Heparinbindestelle interferieren. Es stehen demnach ein direkter als auch ein indirekter Weg der Adhäsionsbeeinflussung offen. Die größten Effekte des Heparins konnten bisher bei Konzentrationen von 250 und 500 $\mu\text{g}/1$ Mio. Zellen beobachtet werden. In dieser Konzentration läuft man allerdings Gefahr, den Cyr61-Effekt durch ein Überangebot an Heparin zu nivellieren. Bei den Untersuchungen wird daher mit der bisher geringsten Menge Heparin, entsprechend 50 $\mu\text{g}/1$ Mio. Zellen, gearbeitet. Man erhofft sich dadurch den direkten Weg über eine Inhibition am Rezeptor zu unterdrücken.

Zunächst soll Tinzaparin auf sein Inhibitionsvermögen am Cyr61 untersucht werden. Mit seiner relativ einheitlichen Kettenlänge mit einem Häufigkeitsgipfel von 18 Saccharideinheiten befindet es sich im oberen Größenbereich der fraktionierten Heparine. Aufgrund seines Sulfatierungsmusters ähnelt es aber eher einem UFH. Diese beiden Eigenschaften machen es interessant für die nachfolgenden Untersuchungen.

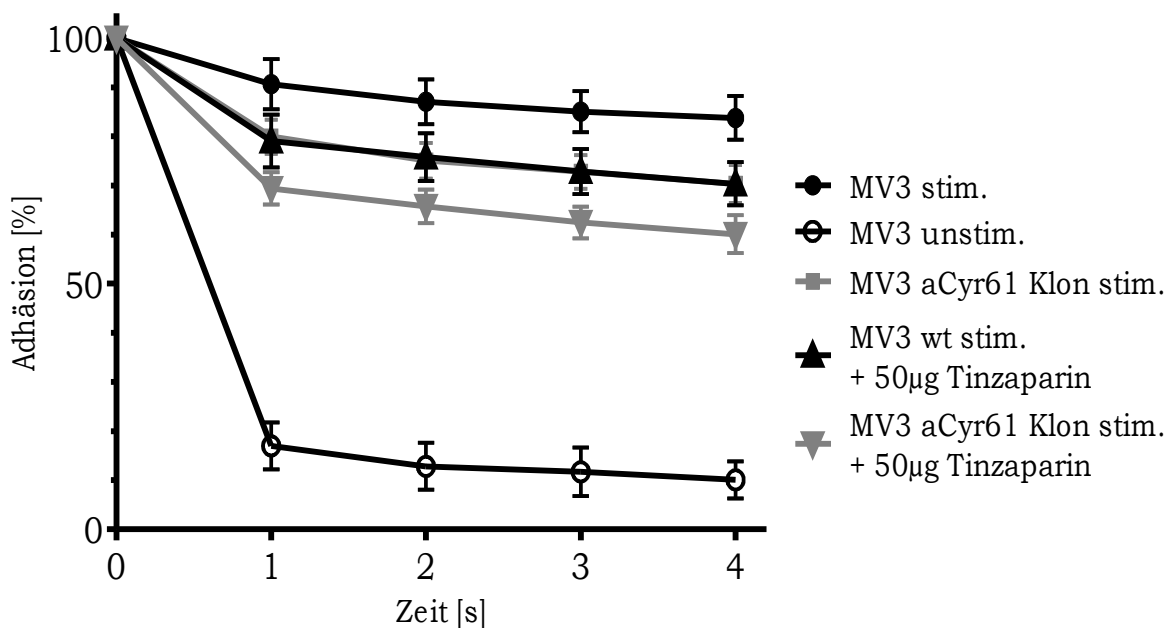


Abbildung 55: **Zelladhäsion von MV3 Wildtyp und Klonzellen unter 5 minütiger Manganstimulation und dem Einfluss von 50 µg Tinzaparin.**

Abbildung 55 zeigt das Zelladhäsionsverhalten von MV3 Wildtyp- und Cyr61-defizienter Klonzellen unter dem Einfluss von jeweils 50 µg Tinzaparin. Diese Tinzaparinmenge vermag die Adhäsion des stimulierten Wildtyps auf die Gesamtzelladhäsion des stimulierten Cyr61-defizienten Klons signifikant herabzusetzen. Dieser wird in seiner Bindungsfähigkeit zu VCAM-1 durch die zugesetzten 50 µg Tinzaparin um den gleichen Betrag beeinflusst.

Aus Tabelle 5.12 geht hervor, dass Tinzaparin eine ausreichend hohe Affinität zu Cyr61 mit einem K_D -Wert von $1,66 \cdot 10^{-5}$ besitzt. Die Affinität des Tinzaparins gegenüber VLA-4 ist hier etwa 3,6-fach größer. Trotzdem liegt

bei Betrachtung des Graphen die Vermutung nahe, dass genau diese zugesetzten 50 µg den eigentlichen Cyr61 Effekt ausmachen. Ob und inwieweit parallel zu einer Bindung des Cyr61 bereits eine Rezeptorblockade durch das Heparin erfolgt, bleibt hier unbeantwortet. Diese Frage lässt sich ansatzweise erklären, wenn zum Vergleich ein Heparin Verwendung findet, welches nur eine schlechte Bindungsaffinität zu Cyr61 aber eine gute zu dem Integrin VLA-4 aufweist. Aus den Tabellen 5.17 und 5.12 geht hervor, dass Enoxaparin diese Voraussetzungen erfüllt. Daher wurde der Versuch unter den gleichen Bedingungen unter Zusatz von nun 50 µg Enoxaparin wiederholt.

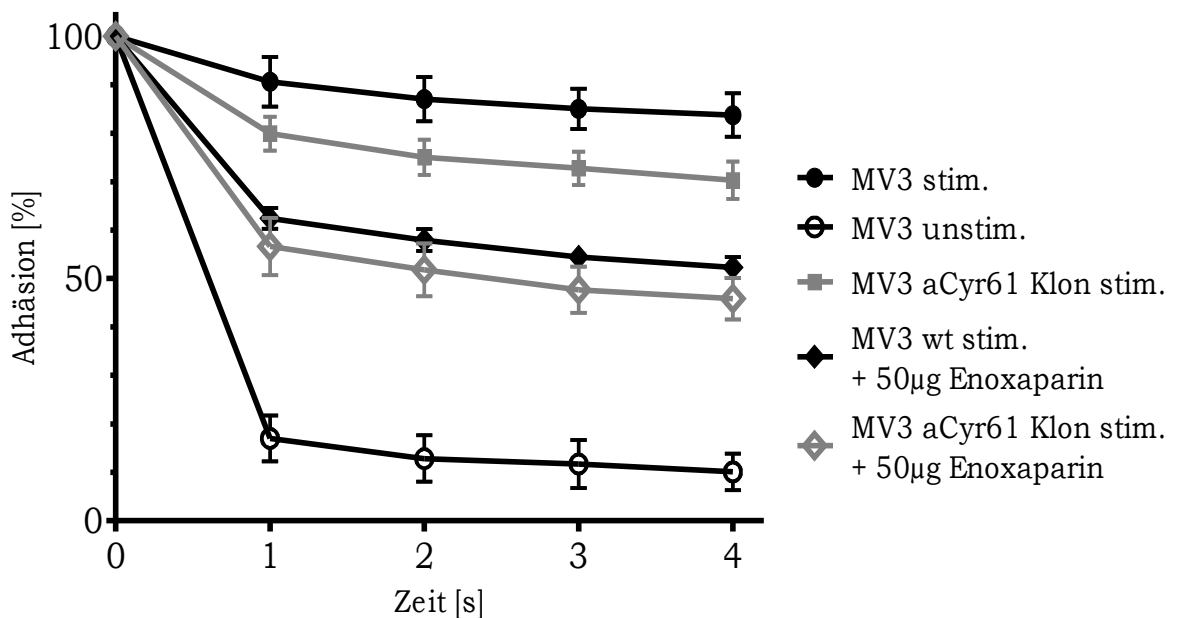


Abbildung 56: **Zelladhäsion von MV3 Wildtyp und Klonzellen unter 5 minütiger Manganstimulation und dem Einfluss von 50 µg Enoxaparin.**

Die Abbildung 56 zeigt, dass das überwiegend rezeptoraffine Enoxaparin bei gleicher Konzentration sowohl die MV3 Wildtypzellen als auch ihren Cyr61-defizienten Klon in ihrer Adhäsion stärker beeinflussen kann. Wenn man von einer dominanten Bindung an VLA-4 ausgehen kann, so stellt der Weg über die direkte Rezeptorblockade im Zuge der Adhäsionsminderung den potenteren Weg dar.

Bei äquivalent eingesetzter Menge an Heparin vermag Tinzaparin sowohl sekretiertes, freies Cyr61 zu binden als auch parallel dazu eine Rezeptorblockade durchzuführen. Enoxaparin blockiert aufgrund seiner deutlich stärkeren Affinität zu VLA-4 direkt und vermutlich ausschließlich den Rezeptor, wodurch der Effekt insgesamt größer ausfällt.

5.5.3.2 Einfluss Struktur-modifizierter Heparine

Der Einsatz Struktur- und Kettenlängen-modifizierter Heparine konnte bereits dazu beitragen die Wirkungsweise des Heparins an P- und L-Selektin zu beleuchten. In diesem Kapitel soll nun auf strukturelle Eigenschaften der Heparine eingegangen werden, um die Cyr61- und VLA-4-vermittelte Adhäsion der verwendeten Melanomzellen an VCAM-1 zu untersuchen.

Untersuchungen Struktur-modifizierter Heparine an manganstimulierten MV3-Zellen im Flusskammerassay von Schlesinger et al. konnten unterschiedliche Effekte auf die Gesamtadhäsion der Zellen zeigen⁷⁵. So wurde von einem N-acetylierten Heparin die Zelladhäsion nicht signifikant beeinflusst, während das über den Glycol-Split behandelte Heparin (RO-Heparin) die stärkste Beeinflussung der Adhäsion zeigte und stimulierte Zellen auf das Level der unstimulierten Zellen versetzen konnte. Korreliert man diese Daten nun mit den kinetischen Bindungsdaten aus Tabelle 5.17 fällt auf, dass die Gleichgewichtsbindungskonstanten nicht vollständig mit den Adhäsionsdaten in Einklang zu bringen sind. Das RO-Heparin zeigt zwar die beste Inhibitionsleistung in der Adhäsion und weist die günstigste Kinetik auf; allerdings ist die Kinetik des NAc-LMWH nicht mit seinen Adhäsionsdaten zu erklären. Hier scheinen also wiederum neben der direkten Beeinflussung des Rezeptors noch andere Mechanismen parallel beteiligt zu sein.

Schlesinger und Mitarbeiter setzten in diesem Versuch die Heparine in einer Konzentration von 500 µg/1 Mio. Zellen ein, wobei im Falle einer hohen Affinität von einer Totalblockade des Integrins ausgegangen werden kann. Einen möglichen Effekt von freiem Cyr61 wird man bei derartig hohen

Konzentrationen nicht feststellen können, da Heparin im Überfluss Cyr61 abfangen und die Effekte nivellieren wird.

Wiederholt man den Versuch mit geringeren Konzentrationen der verwendeten Heparine unter sonst gleichen Bedingungen, stellt sich das Ergebnis anders dar (siehe Abbildung 57).

Die eingesetzten 25 µg Heparin/1 Mio. Zellen zeigen, dass sowohl NAc-Heparin als auch das 2O-desulfatierte Heparin den MV3 Wildtyp in seiner Adhäsion auf das Niveau seines Cyr61-defizienten Klones herabsetzen können. RO-Heparin erzielt auch bei 25 µg wiederum die stärkste Beeinflussung in der Zelladhäsion. Diese ist sogar durch die 20-fache Menge der bei Schlesinger et al. verwendeten weiter zu erhöhen.

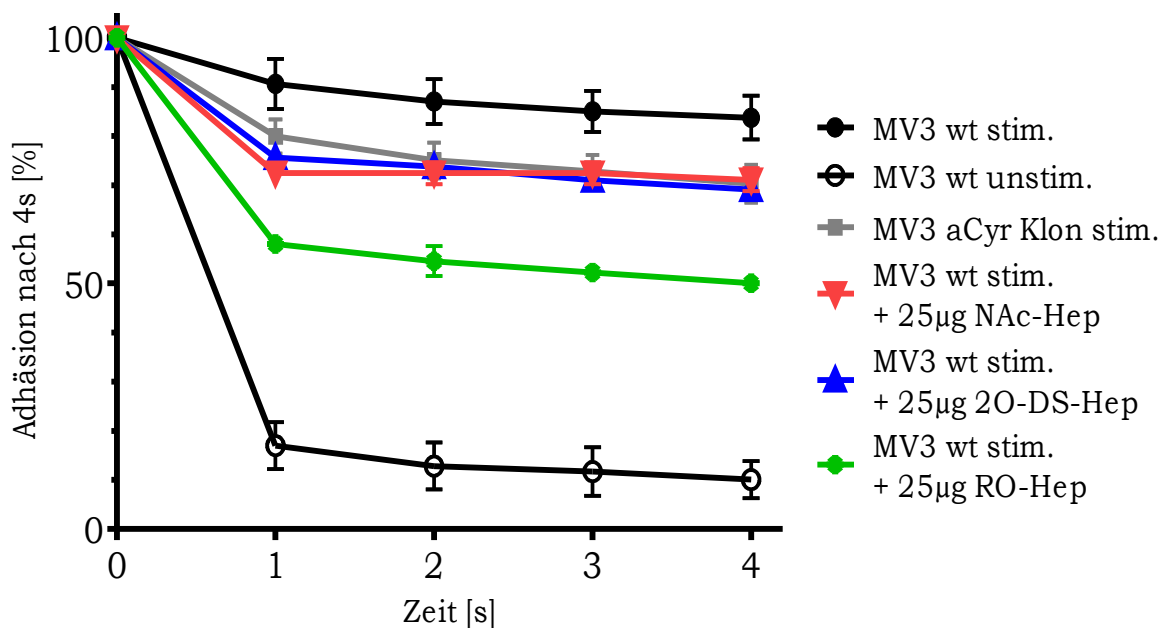


Abbildung 57: **Zelladhäsion von MV3 Wildtyp unter 5 minütiger Manganstimulation und dem Einfluss von jeweils 25 µg strukturmodifizierter Heparine.**

Das 2O-desulfatierte- und NAc-Heparin kehren ihre Inhibitionsleistung nach 2 Sekunden, wenn auch nur leicht und nicht signifikant, im Vergleich zu der vorhergehenden Untersuchung um. Die kinetischen Bindungsdaten der Heparine am VLA-4 korrelieren somit mit den Adhäsionsdaten.

Der Betrachtungsweise können auch die kinetischen Bindungsdaten der jeweiligen Heparine am Cyr61 angefügt werden (siehe Tabelle 5.13). Das

N-acetylierte Derivat zeigt eine ca. 6-fach stärkere Affinität zu Cyr61 verglichen mit VLA-4. In diesen geringen Mengen eingesetzt kann somit von einer vollständigen Bindung des freien Cyr61 ausgegangen werden, der Rezeptor bleibt vermutlich unbeeinflusst. Dies würde erklären, dass mit 25 µg NAc-Heparin die Adhäsion des Cyr61-defizienten Klonen erreicht wird. Eine Stimulation über freies Cyr61 ist somit nicht mehr möglich. In dem hier verwendeten geringen Konzentrationsbereich verhält sich das NAc-Derivat nach seiner ermittelten Gleichgewichtsbindungskonstante erwartungsgemäß am Cyr61. Setzt man es 20-fach höher konzentriert ein, ist das Verhalten jedoch nicht mit den hier ermittelten Kinetiken zu erklären. Neben der direkten Beeinflussung des VLA-4 und einem möglichen Abfangen des freien Cyr61, müssen hier noch weitere Mechanismen im Zuge der Adhäsion eine Rolle spielen. Das RO-Heparin zeigt sowohl zum Integrin als auch zum Cyr61-Protein eine vergleichbare Kinetik, sodass hier vermutlich ein dualer Inhibitionsmechanismus vorliegt. Eine prinzipiell eher ungünstige Kinetik am VLA-4 aber eine ebenfalls 6-fach stärkere Affinität zu Cyr61 weist das 2O-desulfatierte Derivat auf. In den verwendeten, geringen Konzentrationen verhält es sich wie das N-acetylierte Derivat; in höherer Konzentration zeigt es aber keine vermehrte Rezeptoraffinität.

Diese Adhäsionsdaten und die dazugehörigen Kinetiken erlauben nun den eigentlichen Cyr61-Effekt durch Heparine erklären zu können. Das 2O-desulfatierte Derivat bietet sich als ein Heparin mit marginaler Rezeptoraffinität, aber guter Tendenz zum Cyr61 in idealer Weise an, um die intrinsische Cyr61-Aktivität der Zellen herauszustellen. Das N-acetylierte Derivat zeigt zwar eine stärkere Affinität zu Cyr61, allerdings würde der simultane Rezeptoreffekt die Ergebnisse hier nivellieren.

5.5.3.3 Einfluss des 2O-DS-LMWHs

Die intrinsische Cyr61-Aktivität der Zellen soll mit dem 2O-desulfatierten Derivat gegenüber Tinzaparin herausgestellt werden. Dazu werden steigende

Konzentrationen des jeweiligen Heparins gegen die ermittelte Zelladhäsion der MV3 Wildtypzellen im Vergleich zu ihren Cyr61-defizienten Klonzellen aufgetragen.

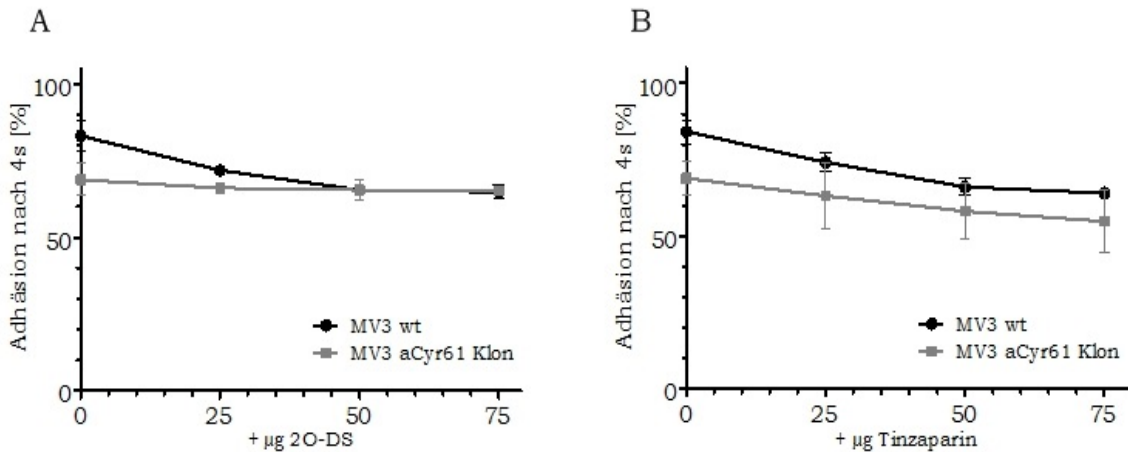


Abbildung 58: **Zelladhäsion der MV3 Wildtypzellen und MV3 aCyr61 Klonzellen nach 4 s unter Einfluss von steigenden Konzentrationen an A) 2O-DS-LMWH und B) Tinzaparin.**

Die Cyr61-defizienten Klonzellen zeigen, wie zu erwarten, gegenüber dem Wildtyp eine geringere Adhäsion nach 4 Sekunden. Interessanterweise lässt sich die Adhäsion der Klonzellen unter dem Einfluss von 2O-desulfatierten Heparin auch bei steigenden Konzentrationen nicht beeinflussen (siehe Abbildung 58). Die Wildtypzellen erreichen dieses Level ebenfalls bereits nach Zugabe von 50 µg Heparin/1 Mio. Zellen und auch hier wird der Wert dann nicht weiter beeinflusst. Dies spricht für das Postulat, dass lediglich ein Cyr61-Effekt durch das 2O-desulfatierte Heparin beglichen wird, der Rezeptor aber dadurch unbeeinflusst bleibt.

Unter dem Einfluss von Tinzaparin verhalten sich beide Zellarten ähnlich. Durch die bereits zum Nullwert geringere Adhäsion der Klonzellen bilden sich somit nahezu parallel verlaufende Kurven aus. Freies Cyr61 wird anfangs von Tinzaparin abgefangen bevor übriges Tinzaparin nahtlos in eine Rezeptorblockade übergeht. Ein Heparin mit dualem Mechanismus lässt keine direkte Aussage über den Cyr61-Effekt zu.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine Heparinmenge von 50 µg/1 Mio. Zellen ausreichend scheint, um von den Zellen sekretiertes

Cyr61 abzufangen, zu binden und dadurch einer weiteren Stimulation von Zellen entgegenzuwirken.

5.5.4 Zusammenfassende Beurteilung der Zelladhäsion

Cyr61 hat einen Einfluss auf die VLA-4-vermittelte Adhäsion von MV3 Melanomzellen an VCAM-1. Cyr61-defiziente Klonzellen zeigen eine verminderte Adhäsion an VCAM-1, die durch exogen zugeführtes Cyr61 wieder kompensiert werden kann. Damit ist eine direkte Beteiligung des Cyr61 an der Bindung von VLA-4 an seinen Liganden VCAM-1 erstmalig erwiesen.

Heparin ist in der Lage die oben beschriebene Cyr61-vermittelte Adhäsion des VLA-4 zu beeinflussen. Die dazu nötigen Heparinkonzentrationen sind sehr gering. Dies wurde durch Einsatz des 2O-desulfatierten Heparins bewiesen, eines Heparins, das nur Cyr61-bindende Eigenschaften, aber keine kompetitive VLA-4 Blockade ausübt. Heparin verfolgt also in diesem Geschehen eine Art dualen Mechanismus; zum Einen eine Inaktivierung des Cyr61 und die damit einhergehende fehlende Aktivierung der Integrine durch Cyr61 und zum anderen die direkte Bindung und Inhibition der Integrine. Heparin in therapeutisch eingesetzten Dosierungen wird also sowohl die Cyr61-VLA-4 Achse, wie auch die Integrinblockade abdecken.

Der Einfluss von HSPG, in diesem Zusammenhang als Reservoir von Cyr61 zu dienen und somit ebenfalls stimulierend auf die Integrine einzuwirken, ist ungeklärt. Die Ergebnisse des Einsatzes der Heparinase III in den Migrationsuntersuchungen und die direkte, hochaffine Bindung des Cyr61 an Syndekan-4 in den biosensorischen Studien lassen allerdings auch im Adhäsionsgeschehen eine Beteiligung vermuten. Der Einsatz einer Syndekan-4-defizienten Zelllinie in der Zelladhäsion könnte hierüber Aufschluß geben.

5.5.5 Charakterisierung der Syndekan-4 Expression in MV3-Zellen

Die Melanomzelllinie MV3 wurde mit kommerziell erhältlichen shRNA-Plasmiden transfiziert, die die Expression des Proteoglykans Syndekan-4 herunterregulieren sollen. Auch hier wurden die transfizierten Zellen nach erfolgter Puromycin-Selektion unter optimalen Bedingungen kultiviert, bzw. einer Zellyse unterzogen.

5.5.5.1 Durchflusszytometrische Untersuchungen

Die Syndekan-4 Expression unterliegt keinem gesonderten, äußeren Stimulus bzw. lässt sich nicht durch eine Mediumsstimulation beeinflussen, da sie einem normalen Zellzyklus folgt²⁶⁰. Plasmid-tragende Zellen werden also weniger Syndekan-4 exprimieren und bereits vorhandenes, zelloberflächliches Syndekan-4 wird ebenfalls im normalen Zyklus regulär abgebaut. Die Zellen können daher jederzeit mit den entsprechenden Antikörpern markiert und durchflusszytometrisch untersucht werden.

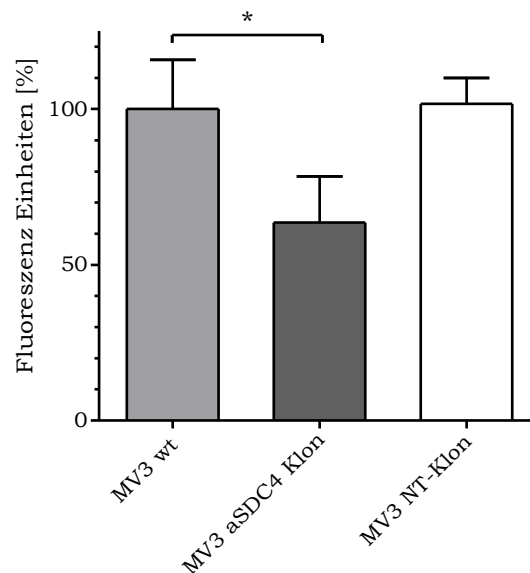


Abbildung 59: **Syndekan-4 Expression des MV3 Wildtyp, MV3 aSDC4 Klon 1 und MV3 NT-Klon im Vergleich.**

Die Syndekan-4 Expression des Wildtyps wurde anhand der gemessenen Fluoreszenz normalisiert und auf 100 % gesetzt. Plasmid 1 zeigte die effizienteste Downregulation des Syndekan-4 (siehe Abbildung 59, Daten der

Klone 2-5 nicht weiter gezeigt). Damit wird für die nachfolgenden Versuche der Klon 1 weiter kultiviert und in der vorliegenden Arbeit als MV3 aSDC4 Klon bezeichnet.

5.5.5.2 Proteinbestimmung durch SDS-PAGE und Western-Blot

Das Vorliegen des Proteoglykans Syndekan-4 wurde ebenfalls mittels spezifischer Antikörper im Western-Blot verifiziert. Dazu wurden zunächst die Ganzzelllysate der zu untersuchenden Zelllinien in verschiedenen Konzentrationen/Laufbahn des Geles aufgetragen, das Gel entwickelt und ein Western-Blot durchgeführt. Von den getesteten Proteinmengen erwies sich eine Beladung von 50 µg Gesamtprotein pro Tasche (Laufbahn) des Gels als günstig. Mehr oder weniger Protein führte zu weniger aussagekräftigeren Ergebnissen. Für die nachfolgenden Untersuchungen wurde sodann 50 µg Gesamtprotein von den MV3 Wildtypzellen, den MV3 aSDC4 Klonzellen und den MV3 NT-Klonzellen pro Bahn aufgetragen.

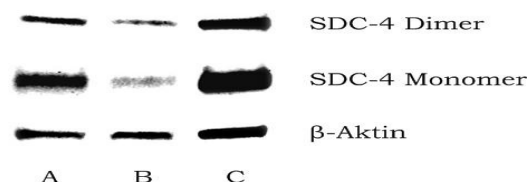


Abbildung 60: **Western-Blot gegen Syndekan-4 unstimulierter MV3 Zellen.**

Aufgetragen sind die Ganzzelllysate unstimulierter MV3 Zellen.

A) MV3 Wildtypzellen B) MV3 aCyr61 Klonzellen C) MV3 NT-Klonzellen

Die Molekulargrößen und Intensitäten der Banden nach halbquantitativer Auswertung in Abbildung 60 verhalten sich nach Normalisierung der Bande der Wildtypzellen für das Syndekan-4 Monomer auf 100 % wie folgt: A = 32,0 kDa und 68,2 kDa, 100 % und 98,0 %, B = 32,0 kDa und 68,8 kDa, 55,3 % und 71,2 %, C = 31,6 kDa und 70,7 kDa, 279,0 % und 123,2 %. Die β-Aktin Bande liegt exakt bei 43,0 kDa.

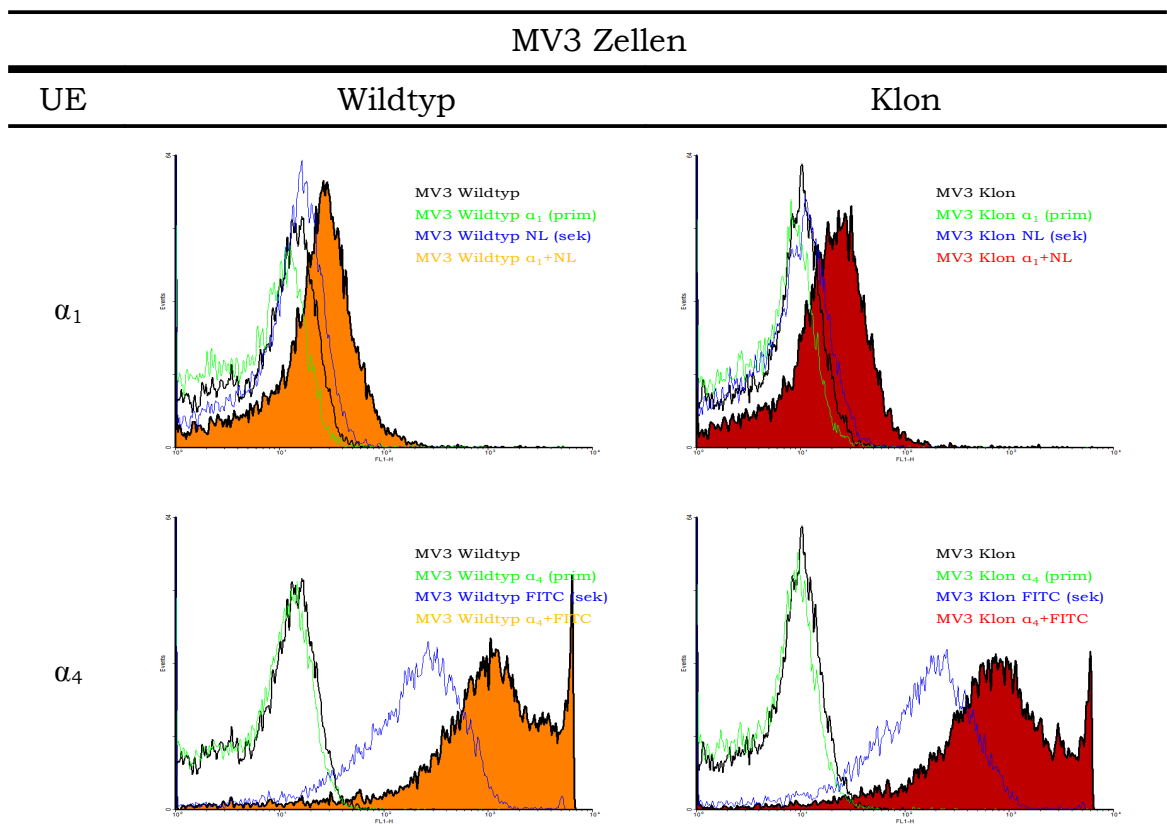
Der Western-Blot der untersuchten Proben zeigt, dass die Syndekan-4 Expression der Syndekan-4-defizienten MV3 Klonzellen deutlich gegenüber den Wildtypzellen herabgesetzt ist. Interessanterweise wurden ebenfalls Banden im doppelten Molekulargrößenbereich detektiert. Dabei könnte es

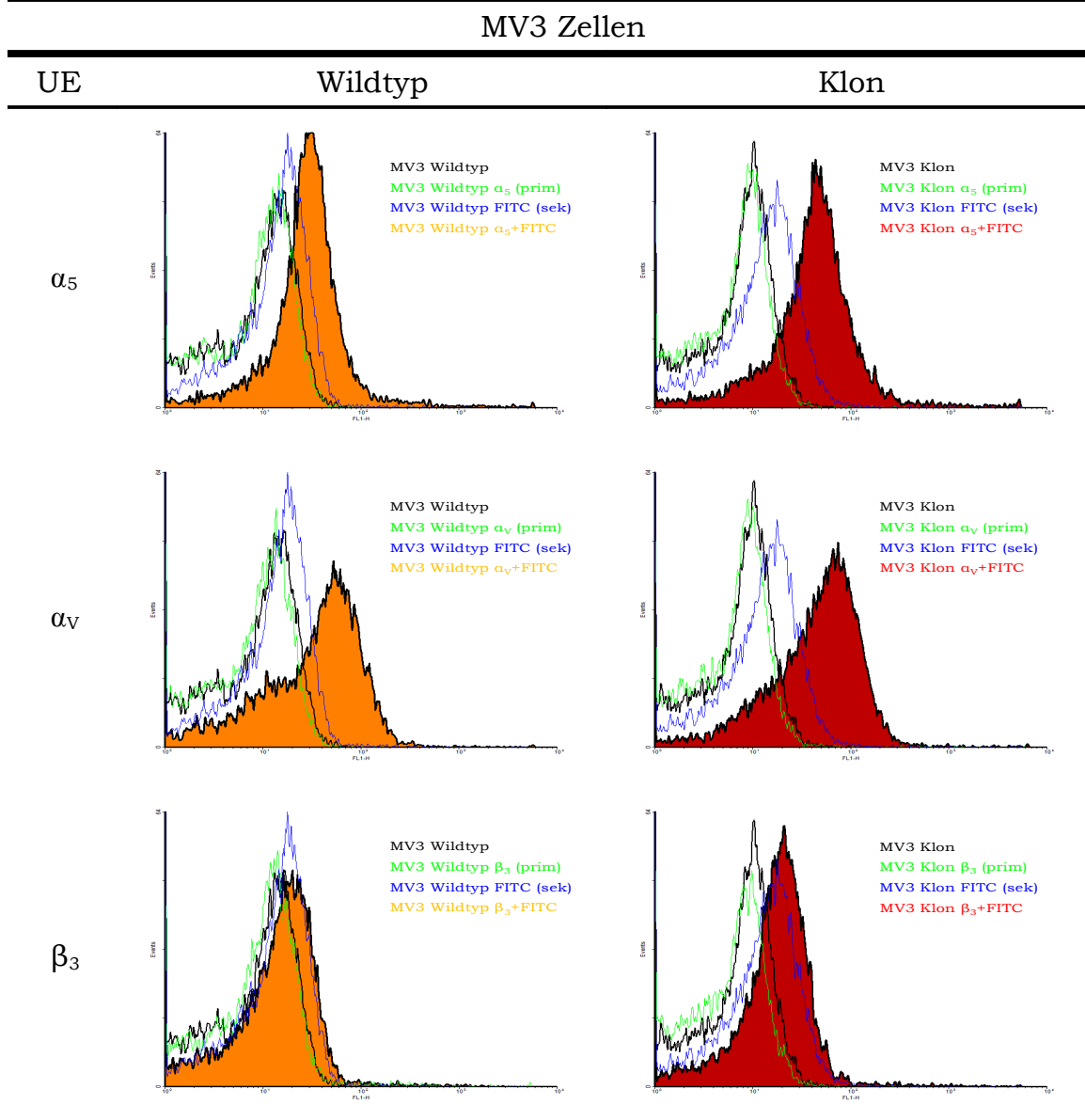
sich um vorliegende Syndekan-4 Dimere handeln. Auch bei den dreifach und vierfach höheren Molekulargewichten konnten Banden von geringer Intensität detektiert werden (hier nicht dargestellt). Diese Oligomere entsprechen der in der Literatur häufig diskutierten Tatsache, dass Syndekane zur Clustering neigen^{261–263}. Ähnlich den Monomeren zeigen auch die Dimere, dass die Intensitäten der beiden nicht in ihrer Syndekan-4 Expression beeinflussten Zellarten stärker ausgeprägt sind als bei den Syndekan-4 defizienten Zellen. Die densitometrische Analyse bestärkt diese Erkenntnis und zeigt deutlichere Tendenzen als die durchflusszytometrischen Untersuchungen zeigen konnten.

5.5.5.3 Integrinstatus der Syndekan-4 defizienten MV3 Zellen

Bei den Syndekan-4 herunterregulierten MV3 Zellen wurde ebenfalls der Integrinstatus durchflusszytometrisch bestimmt.

Tabelle 5.25: Integrinstatus der MV3 Zelllinie, Wildtyp und Syndekan-4-defizienter Klon.





Auch hier konnten alle untersuchten Untereinheiten auf den Zellen detektiert werden. Die Untereinheiten α_5 und β_3 scheinen bei den Syndekan-4-defizienten Klonzellen etwas stärker exprimiert zu sein, wohingegen alle anderen Untereinheiten keine Expressionsveränderung zwischen den Zelltypen aufweisen.

5.5.6 Adhäsion Syndekan-4-defizienter MV3-Zellen

Der Syndekan-4-defiziente Klon der Melanomzelllinie MV3 soll ebenfalls auf sein Adhäsionsverhalten gegenüber VCAM-1 hin unter Flussbedingungen untersucht werden. Prinzipiell sollten hier keine Adhäsionsminderung zu erwarten sein, da der Flusskammerassay auf einer direkten Interaktion des zellständigen VLA-4 mit VCAM-1 beruht. In der Literatur wird jedoch eine Beteiligung von Syndekanen bei der Aktivierung von Integrinen diskutiert^{178,264,265}.

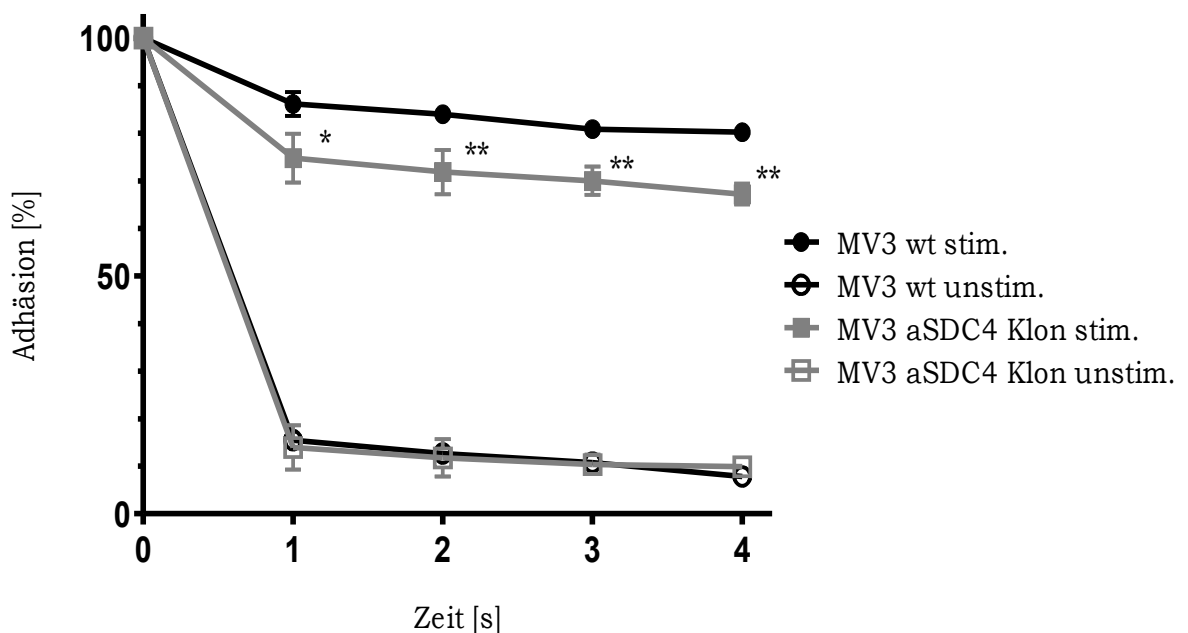


Abbildung 61: **Vergleich der Zelladhäsion von MV3 Wildtypzellen gegenüber MV3 aSDC4 Klonzellen nach 5 min. Manganstimulation und unstimuliert.**

Eine verminderte Adhäsion der manganstimulierten MV3 aSDC4 Klonzellen gegenüber ihren Wildtypzellen ist auszumachen (siehe Abbildung 61), während sich die unstimulierten Zellen auf einem ähnlich niedrigen Niveau verhalten.

Die Zellen unterscheiden sich in ihrer wesentlichen, oberflächlichen Ausbildung verschiedener Integrine oder Zellkontaktproteine, wie aus den vorangegangenen Untersuchungen in Kapitel 5.5.5.3 hervorgegangen, nur in ihrer Syndekan-4 Expression. Obwohl Syndekan-4 keine literaturbekannte

direkte Interaktion mit VLA-4 zugeschrieben wird, ist hier eine geringere Adhäsion von VLA-4-vermittelten Mechanismen am VCAM-1 evident. Syndekane sind auch mit G Protein-gekoppelten Rezeptoren verknüpft und vermögen über eine komplexe intrazelluläre Signalkaskade stimulierende Effekte auszulösen. Aus der Literatur ist weiterhin bekannt, dass Syndekane mit ihren Heparansulfatketten in der Lage sind, Wachstumsfaktoren und Chemokine zu akkumulieren und dass diese in konzentrierter Form wieder für Stimulationszwecke verwendet werden können^{266,267}. Es stehen somit also auch hier wieder zwei Mechanismen einer möglichen Stimulation des VLA-4 über Syndekan-4 zur Verfügung.

5.5.6.1 Einfluss von exogen zugefügtem Cyr61 auf Syndekan-4-defiziente Zellen

Cyr61 zeigt den Kinetikdaten zufolge eine hohe Affinität zu Syndekan-4. Eine Akkumulation von Cyr61 an den Heparansulfatketten des Syndekan ist zu erwarten. Ob parallel ein Stimulus für das intrazelluläre Signalling erfolgt ist nicht bekannt. Es liegt deshalb der Versuch nahe, den Syndekan-4-defizienten Klon mit exogenem Cyr61 zu stimulieren und die resultierenden Effekte zu analysieren.

Abbildung 62 zeigt die Zelladhäsion des manganstimulierten Syndekan-4-defizienten Klones mit und ohne exogen zugeführtem Cyr61. In Anlehnung an die Untersuchungen des Cyr61-defizienten Klones wurde mit 1 µg Cyr61/1 Mio. Zellen stimuliert. Interessanterweise lässt sich durch Zugabe von Cyr61 eine Steigerung in der Adhäsion der manganstimulierten Zellen beobachten, während die unstimulierten Zellen keinen Effekt zeigen. Dieser Effekt fällt allerdings nur sehr gering und statistisch nicht signifikant auf. Dennoch ließe sich dieser Fakt mit der Tatsache erklären, dass in den Klonzellen per se weniger Cyr61 an reduziert vorhandenen Syndekan-4 akkumuliert werden kann und ein möglicher Stimulus an VLA-4 somit geringer ausfällt. Fügt man nun exogen Cyr61 zu, so kann ein Stimulus verstärkt

werden und die VLA-4-vermittelte Adhäsion gesteigert werden. Auf der anderen Seite kann mehr freies, da weniger an die reduziert vorhandenen Syndekan-4-Proteoglykane gebunden wird, Cyr61 direkt den Kontakt zum Rezeptor suchen und dort zu einer vermehrten Stimulation beitragen.

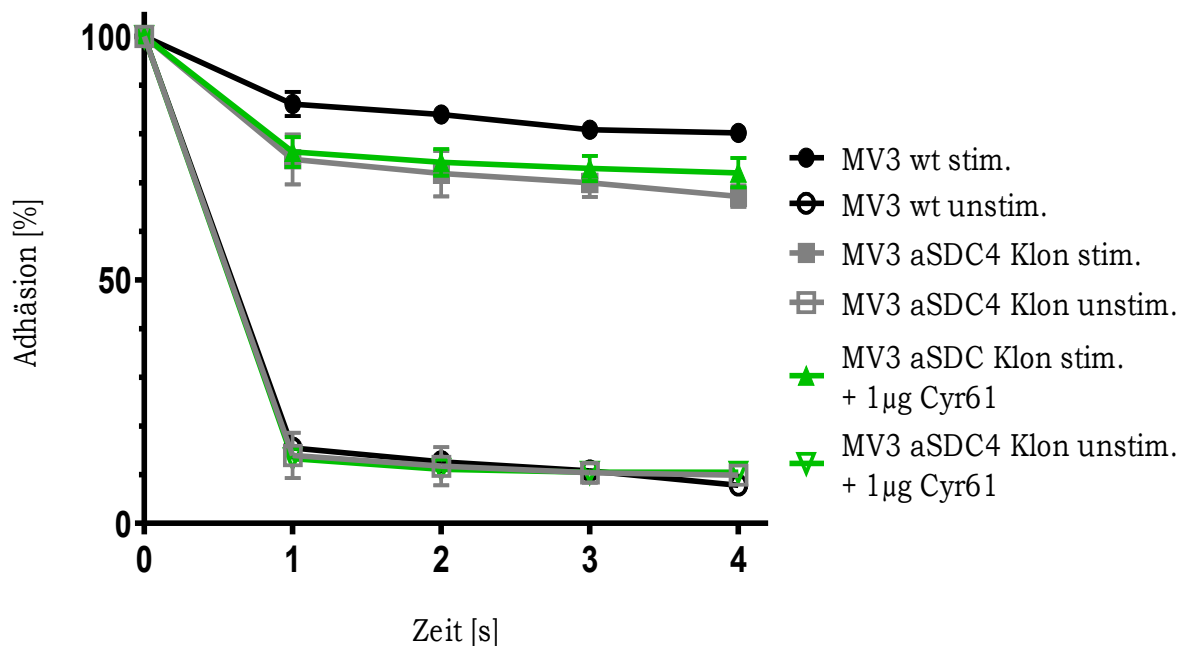


Abbildung 62: **Vergleich der Zelladhäsion von MV3 Wildtypzellen gegenüber MV3 aSDC4 Klonzellen nach 5 min. Manganstimulation und gleichzeitiger Stimulation mit 1 µg exogen zugeführtem Cyr61 sowie der unstimulierte Zustand.**

5.5.7 Zusammenfassende Beurteilung des Syndekan-4-defizienten Klons

Die nicht befriedigende Downregulation des Syndekan-4 von nur ca. 40 % erschwert die Aussage in den komplexen Geschehen der Adhäsion und erlaubt es hier nur Tendenzen aufzuzeigen.

Die Adhäsionsdaten zeigen die Rolle des Syndekan-4 als „Korezeptor“ von Integrinen, in diesem Fall VLA-4 zu fungieren. Eine geringere Syndekan-4-Expression führt bereits zu einer signifikant geringeren Adhäsion des VLA-4 am VCAM-1 im Vergleich zu Wildtypzellen. Die Zugabe von exogenem Cyr61

führt zu einer marginalen Steigerung der VLA-4 vermittelten Adhäsion an VCAM-1. Ob dies allerdings allein durch die Bindung des Cyr61 an Syndekan-4 und einer damit einhergehenden Auslösung von Signalkaskaden zur Aktivierung der fokalen Adhäsion begründet werden kann, bleibt offen. Hier könnte auch die Bildung eines ternären Komplexes, zwischen an den Heparansulfatketten des Syndekan-4 gebundenem Cyr61 und VLA-4 für eine Adhäsionssteigerung verantwortlich gemacht werden. Denn auch so lässt sich die FAK aktivieren und eine etwaige Integrinclusterung würde zur beobachteten Adhäsionszunahme führen.

6 Zusammenfassung

Die Krebszellmetastasierung ist die häufigste Todesursache der Patienten im Verlauf einer malignen Krebserkrankung. Adhäsionsrezeptoren spielen im Prozess der hämatogenen Metastasierung eine entscheidende Rolle. Neben den bisher intensiv untersuchten Selektinen sind auch Integrine in jeden Teilschritt der metastatischen Kaskade involviert. Durch Förderung der Zellmigration und Vermittlung zellulärer Kontakte im Blutsystem sind sie entscheidend am metastatischen Geschehen beteiligt. Die Aktivität der Integrine wird in diesen dynamischen Interaktionen durch vielfältige Zell-interne aber auch -externe Stimuli beeinflusst. Das Integrin VLA-4 auf Tumorzellen, insbesondere auf Melanomzellen, steht seit einiger Zeit im Fokus des Interesses, da es entscheidend die vaskuläre Adhäsion der Tumorzellen steuert.

Matrizelluläre Proteine wie Cyr61 wirken regulierend auf vielfältige molekulare Vorgänge und fördern die Tumorprogression. Cyr61 interagiert dabei direkt mit den Integrinen und wirkt darüber stimulierend auf Migration und Adhäsion.

Heparin ist in der Lage die Wechselwirkung zwischen Integrinen und ihren Liganden zu blockieren und führt somit zu einer reduzierten Zelladhäsion. Dies wird als Beitrag zur antimetastatischen Wirkung von Heparin mit angesehen. Cyr61 besitzt ebenfalls heparinbindende Eigenschaften und wird durch erfolgte Bindung inaktiviert.

Diese Arbeit fokussiert die Cyr61-vermittelte Stimulation der VLA-4/VCAM-1-Wechselwirkung im Adhäsionsgeschehen und ihre potentielle Inhibition durch Heparin.

Die Zellen einer Cyr61 positiven Prostatazelllinie sowie einer hoch-metastatischen Melanomzelllinie wurden mit shRNA-Plasmiden zur Herunter-

regulation des Cyr61 transfiziert. Durch Kombination von durchflusszytometrischen und fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen konnte eine Aussage über den Cyr61 Status und dessen Auswirkung auf die Expression weiterer zellulärer Proteine getroffen werden. Das Integrinmuster wurde ebenfalls analysiert, bevor diese Zelllinien auf den Cyr61-Einfluss in Migrationsversuchen untersucht wurden. Über eine Migrationsabnahme der Cyr61-defizienten Zellen ist ein Zusammenhang des Cyr61 mit migrationsfördernden Integrinen evident. Heparin ist in der Lage die Migration zu beeinflussen. Allerdings konnte in diesen Versuchen nicht unterschieden werden, ob die Heparinwirkung direkt über die Integrine oder über freies Cyr61 erfolgt.

Die Charakterisierung der Cyr61-Wirkung auf das metastasierungsrelevante VLA-4 wurde mit biosensorischen Untersuchungen analysiert. Erstmals konnte eine direkte und hochaffine Bindung des Cyr61 an VLA-4 gezeigt werden. Eine Wechselwirkung des Cyr61 mit dem Proteoglykan Syndekan-4 wurde ebenfalls durch die Bindungsstudien bestätigt. Durch Einsatz einer um ihre Domäne IV gekürzten Cyr61-Mutante konnte gezeigt werden, dass die Bindung an VLA-4 oder Syndekan-4 unabhängig von dieser Domäne ist.

Die literaturbeschriebene Heparinbindefähigkeit des Cyr61 wurde durch Biosensormessungen eindrucksvoll bestätigt. Darüber hinaus konnten auch hier durch den Einsatz strukturmodifizierter Heparine und der Cyr61-Mutante Erkenntnisse zu den Strukturanforderungen des Heparins gewonnen werden. Die Domäne IV kann demnach als Haupt-Heparinbindestelle angesehen werden. Keines der eingesetzten Heparine war jedoch in der Lage, bereits an VLA-4 oder Syndekan-4 gebundenes Cyr61 zu verdrängen. Auf die physiologischen Vorgänge an der Zelloberfläche bezogen, kann für Heparin damit nur sekretiertes und freies Cyr61 als Bindungspartner fungieren. Trotzdem zeigt Heparin einen direkten Einfluss auf die Bindefähigkeit von VLA-4 über Cyr61.

Die Cyr61-defizienten Melanomzellen wurden hinsichtlich ihrer Bindungsfähigkeit an VCAM-1 im Adhäsionsversuch unter Flussbedingungen unter-

sucht. Die Ergebnisse lassen die direkte Beteiligung des Cyr61 an der Bindung des VLA-4 an seinen Liganden VCAM-1 erstmalig deutlich werden. Heparin ist bereits in niedrigen Konzentrationen in der Lage die Cyr61-vermittelte Adhäsion des VLA-4 zu beeinflussen, bevor bei höheren Konzentrationen auch direkt eine Integrinblockade durch Heparin erfolgt. Syndekan-4 konnte als „Korezeptor“ für Integrine, in diesem Fall VLA-4 in bemerkenswerter Weise fungieren. So führt eine geringere Syndekan-4-Expression zu einer signifikant geringeren Adhäsion von VLA-4 an VCAM-1. Die Zugabe von exogenem Cyr61 führt wiederum zu einer Steigerung der VLA-4-vermittelten Adhäsion an VCAM-1.

Die Daten zeigen, dass Cyr61 eine wichtige aber bisher weitestgehend unbeachtete Rolle während der Migration und Adhäsion von Tumorzellen im metastatischen Prozess einnimmt. Das metastasierungssenkende Potential des Heparins kann somit um die von Cyr61 auf die Integrine vermittelten Adhäsionseffekte erweitert werden. Dabei wird eine völlig neue Heparin/Cyr61/VLA-4 Achse betrachtet, die nur in geringen Heparinkonzentrationen zum Tragen kommt und bisher durch höhere Heparinmengen faktisch überdeckt wurde. Das komplexe Zusammenspiel von Cyr61 und Integrinen mit Heparin sollte als neuer Ansatzpunkt in die Diskussionen um die antimetastatische Wirksamkeit von Heparin aufgenommen werden.

7 Literaturverzeichnis

- (1) Deutsche Krebshilfe, Krebs in Deutschland. *www.krebshilfe.de/krebszahlen* **2013**, Zugriff am 17.01.2013.
- (2) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **2000**, *100*, 57–70.
- (3) Westermarck, J.; Kähäri, V. M. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J.* **1999**, *13*, 781–792.
- (4) Friedl, P.; Bröcker, E. B. The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. *Cell. Mol. Life Sci.* **2000**, *57*, 41–64.
- (5) Mittelman, L.; Levin, S.; Verschueren, H.; De Baetselier, P.; Korenstein, R. Direct correlation between cell membrane fluctuations, cell filterability and the metastatic potential of lymphoid cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *203*, 899–906.
- (6) Lauffenburger, D. A.; Horwitz, A. F. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* **1996**, *84*, 359–369.
- (7) Jay, P. Y.; Pham, P. A.; Wong, S. A.; Elson, E. L. A mechanical function of myosin II in cell motility. *J. Cell. Sci* **1995**, *108 (Pt 1)*, 387–393.
- (8) Palecek, S. P.; Huttenlocher, A.; Horwitz, A. F.; Lauffenburger, D. A. Physical and biochemical regulation of integrin release during rear detachment of migrating cells. *J. Cell. Sci* **1998**, *111 (Pt 7)*, 929–940.
- (9) Fidler, I. J.; Nicolson, G. L. Fate of recirculating B16 melanoma metastatic variant cells in parabiotic syngeneic recipients. *J. Natl. Cancer Inst.* **1977**, *58*, 1867–1872.
- (10) Liotta, L. A.; Kleinerman, J.; Sidel, G. M. Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation. *Cancer Res* **1974**, *34*, 997–1004.
- (11) Liotta, L. A.; Kohn, E. Anoikis: cancer and the homeless cell. *Nature* **2004**, *430*, 973–974.
- (12) Douma, S.; Van Laar, T.; Zevenhoven, J.; Meuwissen, R.; Van Garderen, E.; Peeper, D. S. Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor TrkB. *Nature* **2004**, *430*, 1034–1039.

- (13) Horbinski, C.; Mojesky, C.; Kyprianou, N. Live free or die: tales of homeless (cells) in cancer. *Am. J. Pathol.* **2010**, *177*, 1044–1052.
- (14) Hedner, U. Development of tinzaparin: a heparinase-digested low-molecular-weight heparin. *Semin. Thromb. Hemost.* **2000**, *26 Suppl 1*, 23–29.
- (15) Niers, T. M. H.; Klerk, C. P. W.; DiNisio, M.; Van Noorden, C. J. F.; Büller, H. R.; Reitsma, P. H.; Richel, D. J. Mechanisms of heparin induced anti-cancer activity in experimental cancer models. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2007**, *61*, 195–207.
- (16) Mousa, S. A. The low molecular weight heparin, tinzaparin, in thrombosis and beyond. *Cardiovasc Drug Rev* **2002**, *20*, 199–216.
- (17) Petitou, M.; Van Boeckel, C. A. A. A synthetic antithrombin III binding pentasaccharide is now a drug! What comes next? *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, *43*, 3118–3133.
- (18) Bijsterveld, N. R.; Hettiarachchi, R.; Peters, R.; Prins, M. H.; Levi, M.; Büller, H. R. Low-molecular weight heparins in venous and arterial thrombotic disease. *Thromb. Haemost.* **1999**, *82 Suppl 1*, 139–147.
- (19) Ratiopharm GmbH, Fachinformation Heparin-Natrium-25000-ratiopharm. <http://www.fachinfo.de/data/fi/pdf/01/05/010543.pdf> **2007**, Zugriff am 03.01.2013.
- (20) Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Fachinformation Clexane 60 mg. <http://www.fachinfo.de/data/fi/pdf/00/72/007202.pdf> **2010**, Zugriff am 03.01.2013.
- (21) Amirkhosravi, A.; Mousa, S. A.; Amaya, M.; Francis, J. L. Antimetastatic effect of tinzaparin, a low-molecular-weight heparin. *J. Thromb. Haemost* **2003**, *1*, 1972–1976.
- (22) LEO Pharma GmbH, Fachinformation innohep 20.000 Anti-Xa I.E./ml. <http://www.fachinfo.de/data/fi/jsearch/FachInfo/data/fi/pdf/00/19/001906.pdf> **2010**, Zugriff am 03.01.2013.
- (23) Friedel, H. A.; Balfour, J. A. Tinzaparin. A review of its pharmacology and clinical potential in the prevention and treatment of thromboembolic disorders. *Drugs* **1994**, *48*, 638–660.
- (24) Nutescu, E. A.; Shapiro, N. L.; Feinstein, H.; Rivers, C. W. Tinzaparin: considerations for use in clinical practice. *Ann Pharmacother* **2003**, *37*, 1831–1840.
- (25) Cheer, S. M.; Dunn, C. J.; Foster, R. Tinzaparin sodium: a review of its pharmacology and clinical use in the prophylaxis and treatment of thromboembolic disease. *Drugs* **2004**, *64*, 1479–1502.

- (26) Naggi, A.; Casu, B.; Perez, M.; Torri, G.; Cassinelli, G.; Penco, S.; Pisano, C.; Giannini, G.; Ishai-Michaeli, R.; Vlodavsky, I. Modulation of the heparanase-inhibiting activity of heparin through selective desulfation, graded N-acetylation, and glycol splitting. *J. Biol. Chem* **2005**, *280*, 12103–12113.
- (27) Rickles, F. R.; Falanga, A. Molecular basis for the relationship between thrombosis and cancer. *Thromb. Res* **2001**, *102*, V215–224.
- (28) Falanga, A.; Piccioli, A. Effect of anticoagulant drugs in cancer. *Curr Opin Pulm Med* **2005**, *11*, 403–407.
- (29) AWMF-S3-Leitlinie Prophylaxe der venösen Thromboembolie (VTE), Stand 01.05.2010, gültig bis 31.12.2013. <http://www.awmf.org/leitlinien> **2013**, Zugriff am 03.01.2013.
- (30) Klerk, C. P. W.; Smorenburg, S. M.; Otten, H.-M.; Lensing, A. W. A.; Prins, M. H.; Piovella, F.; Prandoni, P.; Bos, M. M. E. M.; Richel, D. J.; Van Tienhoven, G.; Büller, H. R. The effect of low molecular weight heparin on survival in patients with advanced malignancy. *J. Clin. Oncol* **2005**, *23*, 2130–2135.
- (31) Lee, A. Y. Y.; Levine, M. N.; Baker, R. I.; Bowden, C.; Kakkar, A. K.; Prins, M.; Rickles, F. R.; Julian, J. A.; Haley, S.; Kovacs, M. J.; Gent, M. 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.
- (32) Lee, A. Y. Y.; Rickles, F. R.; Julian, J. A.; Gent, M.; Baker, R. I.; Bowden, C.; Kakkar, A. K.; Prins, M.; Levine, M. N. Randomized comparison of low molecular weight heparin and coumarin derivatives on the survival of patients with cancer and venous thromboembolism. *J. Clin. Oncol* **2005**, *23*, 2123–2129.
- (33) Agnelli, G.; Gussoni, G.; Bianchini, C.; Verso, M.; Mandalà, M.; Cavanna, L.; Barni, S.; Labianca, R.; Buzzi, F.; Scambia, G.; Passalacqua, R.; Ricci, S.; Gasparini, G.; Lorusso, V.; Bonizzoni, E.; Tonato, M. Nadroparin for the prevention of thromboembolic events in ambulatory patients with metastatic or locally advanced solid cancer receiving chemotherapy: a randomised, placebo-controlled, double-blind study. *Lancet Oncol* **2009**, *10*, 943–949.
- (34) Kakkar, A. K. An expanding role for antithrombotic therapy in cancer patients. *Cancer Treat. Rev.* **2003**, *29 Suppl 2*, 23–26.
- (35) Kakkar, A. K.; Levine, M. N.; Kadziola, Z.; Lemoine, N. R.; Low, V.; Patel, H. K.; Rustin, G.; Thomas, M.; Quigley, M.; Williamson, R. C. N. 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.

- (36) Agnelli, G.; George, D. J.; Kakkar, A. K.; Fisher, W.; Lassen, M. R.; Mismetti, P.; Mouret, P.; Chaudhari, U.; Lawson, F.; Turpie, A. G. G. Semuloparin for thromboprophylaxis in patients receiving chemotherapy for cancer. *N. Engl. J. Med.* **2012**, *366*, 601–609.
- (37) Van Doormaal, F. F.; Di Nisio, M.; Otten, H.-M.; Richel, D. J.; Prins, M.; Buller, H. R. Randomized trial of the effect of the low molecular weight heparin nadroparin on survival in patients with cancer. *J. Clin. Oncol.* **2011**, *29*, 2071–2076.
- (38) Gras, J. Semuloparin for the prevention of venous thromboembolic events in cancer patients. *Drugs Today* **2012**, *48*, 451–457.
- (39) Hull, R. D. ACP Journal Club. Semuloparin reduced venous thromboembolism in patients receiving chemotherapy for cancer. *Ann. Intern. Med.* **2012**, *156*, JC6–5.
- (40) Breddin, H. K.; Hach-Wunderle, V.; Nakov, R.; Kakkar, V. V. Effects of a low-molecular-weight heparin on thrombus regression and recurrent thromboembolism in patients with deep-vein thrombosis. *N. Engl. J. Med.* **2001**, *344*, 626–631.
- (41) Parish, C. R.; Coombe, D. R.; Jakobsen, K. B.; Bennett, F. A.; Underwood, P. A. Evidence that sulphated polysaccharides inhibit tumour metastasis by blocking tumour-cell-derived heparanases. *Int. J. Cancer* **1987**, *40*, 511–518.
- (42) Vlodaysky, I.; Mohsen, M.; Lider, O.; Svahn, C. M.; Ekre, H. P.; Vigoda, M.; Ishai-Michaeli, R.; Peretz, T. Inhibition of tumor metastasis by heparanase inhibiting species of heparin. *Invasion Metastasis* **1994**, *14*, 290–302.
- (43) Nakajima, M.; Irimura, T.; Nicolson, G. L. Heparanases and tumor metastasis. *J. Cell. Biochem.* **1988**, *36*, 157–167.
- (44) Vlodaysky, I.; Abboud-Jarrous, G.; Elkin, M.; Naggi, A.; Casu, B.; Sasisekharan, R.; Ilan, N. The impact of heparanase and heparin on cancer metastasis and angiogenesis. *Pathophysiol. Haemost. Thromb* **2006**, *35*, 116–127.
- (45) Garcea, G.; Neal, C. P.; Pattenden, C. J.; Steward, W. P.; Berry, D. P. Molecular prognostic markers in pancreatic cancer: a systematic review. *Eur. J. Cancer* **2005**, *41*, 2213–2236.
- (46) Vlodaysky, I.; Fuks, Z.; Bar-Ner, M.; Ariav, Y.; Schirmacher, V. Lymphoma cell-mediated degradation of sulfated proteoglycans in the subendothelial extracellular matrix: relationship to tumor cell metastasis. *Cancer Res.* **1983**, *43*, 2704–2711.
- (47) Jayson, G. C.; Gallagher, J. T. Heparin oligosaccharides: inhibitors of the biological activity of bFGF on Caco-2 cells. *Br. J. Cancer* **1997**, *75*, 9–16.

- (48) Marchetti, M.; Vignoli, A.; Russo, L.; Balducci, D.; Pagnoncelli, M.; Barbui, T.; Falanga, A. Endothelial capillary tube formation and cell proliferation induced by tumor cells are affected by low molecular weight heparins and unfractionated heparin. *Thromb. Res.* **2008**, *121*, 637–645.
- (49) Mousa, S. A.; Mohamed, S. Inhibition of endothelial cell tube formation by the low molecular weight heparin, tinzaparin, is mediated by tissue factor pathway inhibitor. *Thromb. Haemost* **2004**, *92*, 627–633.
- (50) Ismail, S. K.; Norris, L.; Muttukrishna, S.; Higgins, J. R. Thrombin generation post elective caesarean section: effect of low molecular weight heparin. *Thromb. Res.* **2012**, *130*, 799–803.
- (51) Rickles, F. R. Mechanisms of cancer-induced thrombosis in cancer. *Pathophysiol. Haemost. Thromb* **2006**, *35*, 103–110.
- (52) Borsig, L. Antimetastatic activities of heparins and modified heparins. Experimental evidence. *Thromb. Res* **2010**, *125 Suppl 2*, S66–71.
- (53) Vorup-Jensen, T.; Chi, L.; Gjelstrup, L. C.; Jensen, U. B.; Jewett, C. A.; Xie, C.; Shimaoka, M.; Linhardt, R. J.; Springer, T. A. Binding between the integrin alphaXbeta2 (CD11c/CD18) and heparin. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 30869–30877.
- (54) Diamond, M. S.; Alon, R.; Parkos, C. A.; Quinn, M. T.; Springer, T. A. Heparin is an adhesive ligand for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD1). *J. Cell Biol.* **1995**, *130*, 1473–1482.
- (55) Da Silva, M. S.; Horton, J. A.; Wijelath, J. M.; Blystone, L. W.; Fish, W. R.; Wijelath, E.; Strand, K.; Blystone, S. D.; Sobel, M. Heparin modulates integrin-mediated cellular adhesion: specificity of interactions with alpha and beta integrin subunits. *Cell Commun. Adhes.* **2003**, *10*, 59–67.
- (56) Garofalo, A.; Chirivi, R. G.; Foglieni, C.; Pigott, R.; Mortarini, R.; Martin-Padura, I.; Anichini, A.; Gearing, A. J.; Sanchez-Madrid, F.; Dejana, E. Involvement of the very late antigen 4 integrin on melanoma in interleukin 1-augmented experimental metastases. *Cancer Res* **1995**, *55*, 414–419.
- (57) Higashiyama, A.; Watanabe, H.; Okumura, K.; Yagita, H. 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.
- (58) Okahara, H.; Yagita, H.; Miyake, K.; Okumura, K. 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.
- (59) Fritzsche, J.; Simonis, D.; Bendas, G. 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.
- (60) Chou, K. C. The convergence-divergence duality in lectin domains of selectin family and its implications. *FEBS Lett.* **1995**, *363*, 123–126.
- (61) Geng, J. G.; Bevilacqua, M. P.; Moore, K. L.; McIntyre, T. M.; Prescott, S. M.; Kim, J. M.; Bliss, G. A.; Zimmerman, G. A.; McEver, R. P. Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature* **1990**, *343*, 757–760.
- (62) Graves, B. J.; Crowther, R. L.; Chandran, C.; Rumberger, J. M.; Li, S.; Huang, K. S.; Presky, D. H.; Familletti, P. C.; Wolitzky, B. A.; Burns, D. K. Insight into E-selectin/ligand interaction from the crystal structure and mutagenesis of the lectin/EGF domains. *Nature* **1994**, *367*, 532–538.
- (63) Tedder, T. F.; Steeber, D. A.; Chen, A.; Engel, P. The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J.* **1995**, *9*, 866–873.
- (64) Zarbock, A.; Ley, K. Mechanisms and consequences of neutrophil interaction with the endothelium. *Am. J. Pathol.* **2008**, *172*, 1–7.
- (65) Moore, K. L.; Stults, N. L.; Diaz, S.; Smith, D. F.; Cummings, R. D.; Varki, A.; McEver, R. P. Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells. *J. Cell Biol* **1992**, *118*, 445–456.
- (66) Groves, R. W.; Allen, M. H.; Ross, E. L.; Ahsan, G.; Barker, J. N.; MacDonald, D. M. Expression of selectin ligands by cutaneous squamous cell carcinoma. *Am. J. Pathol.* **1993**, *143*, 1220–1225.
- (67) Norgard, K. E.; Moore, K. L.; Diaz, S.; Stults, N. L.; Ushiyama, S.; McEver, R. P.; Cummings, R. D.; Varki, A. Characterization of a specific ligand for P-selectin on myeloid cells. A minor glycoprotein with sialylated O-linked oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 12764–12774.
- (68) Foxall, C.; Watson, S. R.; Dowbenko, D.; Fennie, C.; Lasky, L. A.; Kiso, M.; Hasegawa, A.; Asa, D.; Brandley, B. K. The three members of the selectin receptor family recognize a common carbohydrate epitope, the sialyl Lewis(x) oligosaccharide. *J. Cell Biol.* **1992**, *117*, 895–902.
- (69) Martinez, M.; Joffraud, M.; Giraud, S.; Baisse, B.; Bernimoulin, M. P.; Schapira, M.; Spertini, O. 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.
- (70) Bendas, G. Inhibitors of membrane receptors involved with leukocyte extravasation. *Mini Rev Med Chem* **2005**, *5*, 575–584.
- (71) Fritzsche, J.; Hünerbein, I.; Schumacher, G.; Alban, S.; Ludwig, R.; Gille, J.; Bendas, G. In vitro investigation on the selectin binding mechanisms in tumor cell metastasis and their inhibition by heparin. *Int J Clin Pharmacol Ther* **2005**, *43*, 570–572.
- (72) Fritzsche, J.; Alban, S.; Ludwig, R. J.; Rubant, S.; Boehncke, W.-H.; Schumacher, G.; Bendas, G. The influence of various structural parameters of semisynthetic sulfated polysaccharides on the P-selectin inhibitory capacity. *Biochem. Pharmacol.* **2006**, *72*, 474–485.
- (73) Simonis, D.; Fritzsche, J.; Alban, S.; Bendas, G. 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.
- (74) Simonis, D.; Christ, K.; Alban, S.; Bendas, G. Affinity and kinetics of different heparins binding to P- and L-selectin. *Semin. Thromb. Hemost.* **2007**, *33*, 534–539.
- (75) Schlesinger, M.; Schmitz, P.; Zeisig, R.; Naggi, A.; Torri, G.; Casu, B.; Bendas, G. The inhibition of the integrin VLA-4 in MV3 melanoma cell binding by non-anti coagulant heparin derivatives. *Thromb. Res.* **2012**, *129*, 603–610.
- (76) Koenig, A.; Norgard-Sumnicht, K.; Linhardt, R.; Varki, A. 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.
- (77) Hostettler, N.; Naggi, A.; Torri, G.; Ishai-Michaeli, R.; Casu, B.; Vlodavsky, I.; Borsig, L. P-selectin- and heparanase-dependent antimetastatic activity of non-anticoagulant heparins. *FASEB J* **2007**, *21*, 3562–3572.
- (78) Wei, M.; Tai, G.; Gao, Y.; Li, N.; Huang, B.; Zhou, Y.; Hao, S.; Zeng, X. 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.
- (79) Pfarrer, C.; Hirsch, P.; Guillomot, M.; Leiser, R. Interaction of integrin receptors with extracellular matrix is involved in trophoblast giant cell migration in bovine placentomes. *Placenta* **2003**, *24*, 588–597.

- (80) Varner, J. A.; Cheresch, D. A. Integrins and cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1996**, *8*, 724–730.
- (81) Kashiwagi, H.; Tomiyama, Y.; Tadokoro, S.; Honda, S.; Shiraga, M.; Mizutani, H.; Handa, M.; Kurata, Y.; Matsuzawa, Y.; Shattil, S. J. A mutation in the extracellular cysteine-rich repeat region of the beta3 subunit activates integrins alphaIIb beta3 and alphaVbeta3. *Blood* **1999**, *93*, 2559–2568.
- (82) Shimaoka, M.; Springer, T. A. Therapeutic antagonists and conformational regulation of integrin function. *Nat Rev Drug Discov* **2003**, *2*, 703–716.
- (83) Hynes, R. O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **2002**, *110*, 673–687.
- (84) Humphries, M. J.; Symonds, E. J. H.; Mould, A. P. Mapping functional residues onto integrin crystal structures. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, *13*, 236–243.
- (85) Humphries, M. J. Integrin structure. *Biochem. Soc. Trans.* **2000**, *28*, 311–339.
- (86) Kassner, P. D.; Alon, R.; Springer, T. A.; Hemler, M. E. Specialized functional properties of the integrin alpha 4 cytoplasmic domain. *Mol. Biol. Cell* **1995**, *6*, 661–674.
- (87) Löster, K.; Vossmeier, D.; Hofmann, W.; Reutter, W.; Danker, K. alpha1 Integrin cytoplasmic domain is involved in focal adhesion formation via association with intracellular proteins. *Biochem. J.* **2001**, *356*, 233–240.
- (88) Mould, A. P. Getting integrins into shape: recent insights into how integrin activity is regulated by conformational changes. *J. Cell. Sci.* **1996**, *109* (Pt 11), 2613–2618.
- (89) Van der Flier, A.; Sonnenberg, A. Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res.* **2001**, *305*, 285–298.
- (90) Dardik, R.; Savion, N.; Kaufmann, Y.; Varon, D. Thrombin promotes platelet-mediated melanoma cell adhesion to endothelial cells under flow conditions: role of platelet glycoproteins P-selectin and GPIIb-IIIa. *Br. J. Cancer* **1998**, *77*, 2069–2075.
- (91) Yu, Y.; Zhou, X.-D.; Liu, Y.-K.; Ren, N.; Chen, J.; Zhao, Y. Platelets promote the adhesion of human hepatoma cells with a highly metastatic potential to extracellular matrix protein: involvement of platelet P-selectin and GP IIb-IIIa. *J. Cancer Res. Clin. Oncol* **2002**, *128*, 283–287.
- (92) Klemke, M.; Weschenfelder, T.; Konstandin, M. H.; Samstag, Y. 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.

- (93) Hemler, M. E.; Huang, C.; Schwarz, L. 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.
- (94) Hemler, M. E.; Huang, C.; Takada, Y.; Schwarz, L.; Strominger, J. L.; Clabby, M. L. Characterization of the cell surface heterodimer VLA-4 and related peptides. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 11478–11485.
- (95) Elices, M. J.; Osborn, L.; Takada, Y.; Crouse, C.; Luhowskyj, S.; Hemler, M. E.; Lobb, R. R. 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.
- (96) Liang, S.; Dong, C. 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*, C701–707.
- (97) Taichman, D. B.; Cybulsky, M. I.; Djaffar, I.; Longenecker, B. M.; Teixidó, J.; Rice, G. E.; Aruffo, A.; Bevilacqua, M. P. 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.
- (98) Wu, T.-C. The role of vascular cell adhesion molecule-1 in tumor immune evasion. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 6003–6006.
- (99) Rice, G. E.; Munro, J. M.; Corless, C.; Bevilacqua, M. P. 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.
- (100) Kuzu, I.; Bicknell, R.; Fletcher, C. D.; Gatter, K. C. Expression of adhesion molecules on the endothelium of normal tissue vessels and vascular tumors. *Lab. Invest.* **1993**, *69*, 322–328.
- (101) Cybulsky, M. I.; Fries, J. W.; Williams, A. J.; Sultan, P.; Davis, V. M.; Gimbrone, M. A., Jr; Collins, T. Alternative splicing of human VCAM-1 in activated vascular endothelium. *Am. J. Pathol.* **1991**, *138*, 815–820.
- (102) Barthel, S. R.; Annis, D. S.; Mosher, D. F.; Johansson, M. W. Differential engagement of modules 1 and 4 of vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) by integrins alpha4beta1 (CD49d/29) and alphaMbeta2 (CD11b/18) of eosinophils. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 32175–32187.
- (103) Grayson, M. H.; Van der Vieren, M.; Sterbinsky, S. A.; Michael Gallatin, W.; Hoffman, P. A.; Staunton, D. E.; Bochner, B. S. alphadbeta2 integrin is expressed on human eosinophils and functions as an alternative ligand for

- vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1). *J. Exp. Med.* **1998**, *188*, 2187–2191.
- (104) Rüegg, C.; Postigo, A. A.; Sikorski, E. E.; Butcher, E. C.; Pytela, R.; Erle, D. J. Role of integrin alpha 4 beta 7/alpha 4 beta P in lymphocyte adherence to fibronectin and VCAM-1 and in homotypic cell clustering. *J. Cell Biol.* **1992**, *117*, 179–189.
- (105) Garton, K. J.; Gough, P. J.; Philalay, J.; Wille, P. T.; Blobel, C. P.; Whitehead, R. H.; Dempsey, P. J.; Raines, E. W. Stimulated shedding of vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) is mediated by tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM 17). *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 37459–37464.
- (106) Gearing, A. J.; Newman, W. Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol. Today* **1993**, *14*, 506–512.
- (107) Spronk, P. E.; Limburg, P. C.; Kallenberg, C. G. Serological markers of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Lupus* **1995**, *4*, 86–94.
- (108) Peter, K.; Weirich, U.; Nordt, T. K.; Ruef, J.; Bode, C. Soluble vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) as potential marker of atherosclerosis. *Thromb. Haemost.* **1999**, *82 Suppl 1*, 38–43.
- (109) Silva, H. C.; Garcao, F.; Coutinho, E. C.; De Oliveira, C. F.; Regateiro, F. J. 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.
- (110) Ding, Y.-B.; Chen, G.-Y.; Xia, J.-G.; Zang, X.-W.; Yang, H.-Y.; Yang, L. Association of VCAM-1 overexpression with oncogenesis, tumor angiogenesis and metastasis of gastric carcinoma. *World J. Gastroenterol.* **2003**, *9*, 1409–1414.
- (111) Shioi, K.; Komiya, A.; Hattori, K.; Huang, Y.; Sano, F.; Murakami, T.; Nakai gawa, N.; Kishida, T.; Kubota, Y.; Nagashima, Y.; Yao, M. Vascular cell adhesion molecule 1 predicts cancer-free survival in clear cell renal carcinoma patients. *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12*, 7339–7346.
- (112) Sasaki, K.; Zhu, X.; Vasquez, C.; Nishimura, F.; Dusak, J. E.; Huang, J.; Fujita, M.; Wesa, A.; Potter, D. M.; Walker, P. R.; Storkus, W. J.; Okada, H. Preferential expression of very late antigen-4 on type 1 CTL cells plays a critical role in trafficking into central nervous system tumors. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 6451–6458.
- (113) Mattila, P.; Majuri, M. L.; Renkonen, R. 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.

- (114) Martin-Padura, I.; Mortarini, R.; Lauri, D.; Bernasconi, S.; Sanchez-Madrid, F.; Parmiani, G.; Mantovani, A.; Anichini, A.; Dejana, E. Heterogeneity in human melanoma cell adhesion to cytokine activated endothelial cells correlates with VLA-4 expression. *Cancer Res.* **1991**, *51*, 2239–2241.
- (115) Europäische Arzneimittelagentur,, Questions and answers on recommendation for the refusal of the marketing authorisation for natalizumab Elan Pharma 300mg(19.07.2007). http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Medicine_QA/2009/11/WC500012381.pdf **2013**, Zugriff am 09.01.2013.
- (116) Bartt, R. E. Multiple sclerosis, natalizumab therapy, and progressive multifocal leukoencephalopathy. *Curr. Opin. Neurol.* **2006**, *19*, 341–349.
- (117) Europäische Arzneimittelagentur European Medicines Agency recommends suspension of the marketing authorisation of Raptiva (efalizumab) (19.02.2009). http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Press_release/2009/11/WC500014516.pdf **2013**, Zugriff am 09.01.2013.
- (118) U.S. Food and Drug Administration, FDA Approves Resumed Marketing of Tysabri Under a Special Distribution Program (05.06.2006). <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/2006/ucm108662.htm> **2013**, Zugriff am 09.01.2013.
- (119) Reardon, D. A.; Cheresch, D. Cilengitide: a prototypic integrin inhibitor for the treatment of glioblastoma and other malignancies. *Genes Cancer* **2011**, *2*, 1159–1165.
- (120) Desgrosellier, J. S.; Cheresch, D. A. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 9–22.
- (121) Bradley, D. A.; Daignault, S.; Ryan, C. J.; Dipaola, R. S.; Cooney, K. A.; Smith, D. C.; Small, E.; Mathew, P.; Gross, M. E.; Stein, M. N.; Chen, A.; Pienta, K. J.; Escara-Wilke, J.; Doyle, G.; Al-Hawary, M.; Keller, E. T.; Hussain, M. Cilengitide (EMD 121974, NSC 707544) in asymptomatic metastatic castration resistant prostate cancer patients: a randomized phase II trial by the prostate cancer clinical trials consortium. *Invest New Drugs* **2011**, *29*, 1432–1440.
- (122) Alva, A.; Slovin, S.; Daignault, S.; Carducci, M.; Dipaola, R.; Pienta, K.; Agus, D.; Cooney, K.; Chen, A.; Smith, D. C.; Hussain, M. Phase II study of cilengitide (EMD 121974, NSC 707544) in patients with non-metastatic castration resistant prostate cancer, NCI-6735. A study by the DOD/PCF prostate cancer clinical trials consortium. *Invest New Drugs* **2012**, *30*, 749–757.
- (123) Manegold, C.; Vansteenkiste, J.; Cardenal, F.; Schuette, W.; Woll, P. J.; Ulsperger, E.; Kerber, A.; Eckmayr, J.; Von Pawel, J. Randomized phase II study

- of three doses of the integrin inhibitor cilengitide versus docetaxel as second-line treatment for patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Invest New Drugs* **2012**.
- (124) Vermorken, J. B.; Guigay, J.; Mesia, R.; Trigo, J. M.; Keilholz, U.; Kerber, A.; Bethe, U.; Picard, M.; Brummendorf, T. H. Phase I/II trial of cilengitide with cetuximab, cisplatin and 5-fluorouracil in recurrent and/or metastatic squamous cell cancer of the head and neck: findings of the phase I part. *Br. J. Cancer* **2011**, *104*, 1691–1696.
- (125) Gutheil, J. C.; Campbell, T. N.; Pierce, P. R.; Watkins, J. D.; Huse, W. D.; Bodkin, D. J.; Cheresh, D. A. Targeted antiangiogenic therapy for cancer using Vitaxin: a humanized monoclonal antibody to the integrin alphavbeta3. *Clin. Cancer Res* **2000**, *6*, 3056–3061.
- (126) McNeel, D. G.; Eickhoff, J.; Lee, F. T.; King, D. M.; Alberti, D.; Thomas, J. P.; Friedl, A.; Kolesar, J.; Marnocha, R.; Volkman, J.; Zhang, J.; Hammershaimb, L.; Zwiebel, J. A.; Wilding, G. Phase I trial of a monoclonal antibody specific for alphavbeta3 integrin (MEDI-522) in patients with advanced malignancies, including an assessment of effect on tumor perfusion. *Clin. Cancer Res* **2005**, *11*, 7851–7860.
- (127) Almokadem, S.; Belani, C. P. Volociximab in cancer. *Expert Opin Biol Ther* **2012**, *12*, 251–257.
- (128) Tamaskar, I.; Garcia, J. A.; Elson, P.; Wood, L.; Mekhail, T.; Dreicer, R.; Rini, B. I.; Bukowski, R. M. Antitumor effects of sunitinib or sorafenib in patients with metastatic renal cell carcinoma who received prior antiangiogenic therapy. *J. Urol* **2008**, *179*, 81–86; discussion 86.
- (129) Kuwada, S. K. Drug evaluation: Volociximab, an angiogenesis-inhibiting chimeric monoclonal antibody. *Curr. Opin. Mol. Ther* **2007**, *9*, 92–98.
- (130) Cox, D.; Brennan, M.; Moran, N. Integrins as therapeutic targets: lessons and opportunities. *Nat Rev Drug Discov* **2010**, *9*, 804–820.
- (131) Dustin, M. L.; Springer, T. A. T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature* **1989**, *341*, 619–624.
- (132) Lee, J. O.; Rieu, P.; Arnaout, M. A.; Liddington, R. Crystal structure of the A domain from the alpha subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18). *Cell* **1995**, *80*, 631–638.
- (133) Shimaoka, M.; Lu, C.; Palframan, R. T.; Von Andrian, U. H.; McCormack, A.; Takagi, J.; Springer, T. A. Reversibly locking a protein fold in an active conforma

- tion with a disulfide bond: integrin alphaL I domains with high affinity and antagonist activity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, 98, 6009–6014.
- (134) Beglova, N.; Blacklow, S. C.; Takagi, J.; Springer, T. A. Cysteine-rich module structure reveals a fulcrum for integrin rearrangement upon activation. *Nat. Struct. Biol.* **2002**, 9, 282–287.
- (135) Shimaoka, M.; Takagi, J.; Springer, T. A. Conformational regulation of integrin structure and function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **2002**, 31, 485–516.
- (136) Moser, M.; Legate, K. R.; Zent, R.; Fässler, R. The tail of integrins, talin, and kindlins. *Science* **2009**, 324, 895–899.
- (137) Kinashi, T. Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nat. Rev. Immunol.* **2005**, 5, 546–559.
- (138) Carman, C. V.; Springer, T. A. Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized? *Curr. Opin. Cell Biol.* **2003**, 15, 547–556.
- (139) Lau, L. F.; Lam, S. C.-T. Integrin-mediated CCN functions. In *CCN proteins. A new family of cell growth and differentiation regulators*; Perbal, B. V.; Takigawa, M., Eds.; Imperial College Press: London; Hackensack, NJ, 2005; pp. 61–80.
- (140) Stupack, D. G.; Cheresch, D. A. Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *J. Cell. Sci.* **2002**, 115, 3729–3738.
- (141) Woods, A.; Couchman, J. R. Syndecan-4 and focal adhesion function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2001**, 13, 578–583.
- (142) Guo, W.; Giancotti, F. G. Integrin signalling during tumour progression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* **2004**, 5, 816–826.
- (143) Mitra, S. K.; Schlaepfer, D. D. Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr. Opin. Cell Biol* **2006**, 18, 516–523.
- (144) Xiao, T.; Takagi, J.; Collier, B. S.; Wang, J.-H.; Springer, T. A. Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics. *Nature* **2004**, 432, 59–67.
- (145) Xiong, J.-P.; Stehle, T.; Zhang, R.; Joachimiak, A.; Frech, M.; Goodman, S. L.; Arnaout, M. A. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science* **2002**, 296, 151–155.
- (146) Humphries, J. D.; Byron, A.; Humphries, M. J. Integrin ligands at a glance. *J. Cell. Sci.* **2006**, 119, 3901–3903.
- (147) Clements, J. M.; Newham, P.; Shepherd, M.; Gilbert, R.; Dudgeon, T. J.; Needham, L. A.; Edwards, R. M.; Berry, L.; Brass, A.; Humphries, M. J. Identifi

- cation of a key integrin-binding sequence in VCAM-1 homologous to the LDV active site in fibronectin. *J. Cell. Sci.* **1994**, *107 (Pt 8)*, 2127–2135.
- (148) Emsley, J.; Knight, C. G.; Farndale, R. W.; Barnes, M. J.; Liddington, R. C. Structural basis of collagen recognition by integrin alpha2beta1. *Cell* **2000**, *101*, 47–56.
- (149) Coombe, D. R.; Watt, S. M.; Parish, C. R. 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.
- (150) Vorup-Jensen, T.; Carman, C. V.; Shimaoka, M.; Schuck, P.; Svitel, J.; Springer, T. A. 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.
- (151) Zhang, C.; Liu, Y.; Gao, Y.; Shen, J.; Zheng, S.; Wei, M.; Zeng, X. Modified heparins inhibit integrin alpha(IIb)beta(3) mediated adhesion of melanoma cells to platelets in vitro and in vivo. *Int. J. Cancer* **2009**, *125*, 2058–2065.
- (152) Schlesinger, M.; Simonis, D.; Schmitz, P.; Fritzsche, J.; Bendas, G. Binding between heparin and the integrin VLA-4. *Thromb. Haemost* **2009**, *102*, 816–822.
- (153) Coombe, D. R.; Kett, W. C. Heparan sulfate-protein interactions: therapeutic potential through structure-function insights. *Cell. Mol. Life Sci.* **2005**, *62*, 410–424.
- (154) Iozzo, R. V. Heparan sulfate proteoglycans: intricate molecules with intriguing functions. *J. Clin. Invest.* **2001**, *108*, 165–167.
- (155) Elenius, K.; Jalkanen, M. Function of the syndecans--a family of cell surface proteoglycans. *J. Cell. Sci.* **1994**, *107 (Pt 11)*, 2975–2982.
- (156) Li, J.-P.; Vlodaysky, I. Heparin, heparan sulfate and heparanase in inflammatory reactions. *Thromb. Haemost.* **2009**, *102*, 823–828.
- (157) Iozzo, R. V. Basement membrane proteoglycans: from cellar to ceiling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, *6*, 646–656.
- (158) Kramer, K. L.; Yost, H. J. Heparan sulfate core proteins in cell-cell signaling. *Annu. Rev. Genet.* **2003**, *37*, 461–484.
- (159) Multhaupt, H. A. B.; Yoneda, A.; Whiteford, J. R.; Oh, E.-S.; Lee, W.; Couchman, J. R. Syndecan signaling: when, where and why? *J. Physiol. Pharmacol.* **2009**, *60 Suppl 4*, 31–38.
- (160) Choi, S.; Lee, E.; Kwon, S.; Park, H.; Yi, J. Y.; Kim, S.; Han, I.-O.; Yun, Y.; Oh, E.-S. Transmembrane domain-induced oligomerization is crucial for the functions of syndecan-2 and syndecan-4. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 42573–42579.

- (161) Couchman, J. R. Transmembrane signaling proteoglycans. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2010**, *26*, 89–114.
- (162) Couchman, J. R.; Chen, L.; Woods, A. Syndecans and cell adhesion. *Int. Rev. Cytol.* **2001**, *207*, 113–150.
- (163) Carey, D. J. Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. *Biochem J* **1997**, *327*, 1–16.
- (164) Bernfield, M.; Kokenyesi, R.; Kato, M.; Hinkes, M. T.; Spring, J.; Gallo, R. L.; Lose, E. J. Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *Annu. Rev. Cell Biol.* **1992**, *8*, 365–393.
- (165) Tkachenko, E.; Rhodes, J. M.; Simons, M. Syndecans: new kids on the signaling block. *Circ. Res.* **2005**, *96*, 488–500.
- (166) Woods, A.; Couchman, J. R. Syndecan 4 heparan sulfate proteoglycan is a selectively enriched and widespread focal adhesion component. *Mol Biol Cell* **1994**, *5*, 183–192.
- (167) Longley, R. L.; Woods, A.; Fleetwood, A.; Cowling, G. J.; Gallagher, J. T.; Couchman, J. R. Control of morphology, cytoskeleton and migration by syndecan-4. *J. Cell. Sci.* **1999**, *112 (Pt 20)*, 3421–3431.
- (168) Shin, J.; Lee, W.; Lee, D.; Koo, B. K.; Han, I.; Lim, Y.; Woods, A.; Couchman, J. R.; Oh, E. S. Solution structure of the dimeric cytoplasmic domain of syndecan-4. *Biochemistry* **2001**, *40*, 8471–8478.
- (169) Keum, E.; Kim, Y.; Kim, J.; Kwon, S.; Lim, Y.; Han, I.; Oh, E.-S. Syndecan-4 regulates localization, activity and stability of protein kinase C- α . *Biochem. J.* **2004**, *378*, 1007–1014.
- (170) Denhez, F.; Wilcox-Adelman, S. A.; Baciu, P. C.; Saoncella, S.; Lee, S.; French, B.; Neveu, W.; Goetinck, P. F. Syndesmos, a syndecan-4 cytoplasmic domain interactor, binds to the focal adhesion adaptor proteins paxillin and Hic-5. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 12270–12274.
- (171) Greene, D. K.; Tumova, S.; Couchman, J. R.; Woods, A. Syndecan-4 associates with alpha-actinin. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 7617–7623.
- (172) Ugarte, G.; Santander, C.; Brandan, E. Syndecan-4 and beta1 integrin are regulated by electrical activity in skeletal muscle: Implications for cell adhesion. *Matrix Biol.* **2010**, *29*, 383–392.
- (173) Saoncella, S.; Echtermeyer, F.; Denhez, F.; Nowlen, J. K.; Mosher, D. F.; Robinson, S. D.; Hynes, R. O.; Goetinck, P. F. Syndecan-4 signals cooperatively with integrins in a Rho-dependent manner in the assembly of focal adhesions and actin stress fibers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 2805–2810.

- (174) Beauvais, D. M.; Rapraeger, A. C. Syndecans in tumor cell adhesion and signaling. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2004**, *2*, 3.
- (175) McNamee, H. P.; Ingber, D. E.; Schwartz, M. A. Adhesion to fibronectin stimulates inositol lipid synthesis and enhances PDGF-induced inositol lipid breakdown. *J. Cell Biol.* **1993**, *121*, 673–678.
- (176) Fukami, K.; Endo, T.; Imamura, M.; Takenawa, T. alpha-Actinin and vinculin are PIP2-binding proteins involved in signaling by tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 1518–1522.
- (177) Couchman, J. R.; Woods, A. Syndecan-4 and integrins: combinatorial signaling in cell adhesion. *J. Cell. Sci.* **1999**, *112 (Pt 20)*, 3415–3420.
- (178) Morgan, M. R.; Humphries, M. J.; Bass, M. D. Synergistic control of cell adhesion by integrins and syndecans. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 957–969.
- (179) Mostafavi-Pour, Z.; Askari, J. A.; Parkinson, S. J.; Parker, P. J.; Ng, T. T. C.; Humphries, M. J. Integrin-specific signaling pathways controlling focal adhesion formation and cell migration. *J. Cell Biol.* **2003**, *161*, 155–167.
- (180) Saito, Y.; Imazeki, H.; Miura, S.; Yoshimura, T.; Okutsu, H.; Harada, Y.; Ohwaki, T.; Nagao, O.; Kamiya, S.; Hayashi, R.; Kodama, H.; Handa, H.; Yoshida, T.; Fukai, F. A peptide derived from tenascin-C induces beta1 integrin activation through syndecan-4. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 34929–34937.
- (181) Saito, Y.; Owaki, T.; Matsunaga, T.; Saze, M.; Miura, S.; Maeda, M.; Eguchi, M.; Tanaka, R.; Taira, J.; Kodama, H.; Goto, S.; Niitsu, Y.; Terada, H.; Fukai, F. Apoptotic death of hematopoietic tumor cells through potentiated and sustained adhesion to fibronectin via VLA-4. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 7006–7015.
- (182) Horowitz, A.; Simons, M. Phosphorylation of the cytoplasmic tail of syndecan-4 regulates activation of protein kinase Calpha. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 25548–25551.
- (183) Simons, M.; Horowitz, A. Syndecan-4-mediated signalling. *Cell. Signal.* **2001**, *13*, 855–862.
- (184) Ishiguro, K.; Kadomatsu, K.; Kojima, T.; Muramatsu, H.; Tsuzuki, S.; Nakamura, E.; Kusugami, K.; Saito, H.; Muramatsu, T. Syndecan-4 deficiency impairs focal adhesion formation only under restricted conditions. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 5249–5252.
- (185) Levy-Adam, F.; Feld, S.; Suss-Toby, E.; Vlodaysky, I.; Ilan, N. Heparanase Facilitates Cell Adhesion and Spreading by Clustering of Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans. *PLoS ONE* **2008**, *3*.

- (186) Ayad, S.; Boot-Hanford, R. P.; Humphries, M. J.; Kadler, K. E.; Shuttleworth, C. A. *The Extracellular Matrix (Facts Book)*; Academic Press (Harcourt Brace & Company, Publishers): Printed in Great Britain, 1998.
- (187) Chong, H. C.; Tan, C. K.; Huang, R.-L.; Tan, N. S. Matricellular proteins: a sticky affair with cancers. *J Oncol* **2012**, 351–89.
- (188) Lau, L. F.; Lam, S. C. The CCN family of angiogenic regulators: the integrin connection. *Exp. Cell Res* **1999**, 248, 44–57.
- (189) Brigstock, D. R. The connective tissue growth factor/cysteine-rich 61/nephroblastoma overexpressed (CCN) family. *Endocr. Rev* **1999**, 20, 189–206.
- (190) Perbal, B.; Takigawa, M. The CCN Family of Proteins: An Overview. In *CCN proteins. A new family of cell growth and differentiation regulators*; Perbal, B. V.; Takigawa, M., Eds.; Imperial College Press: London; Hackensack, NJ, 2005; pp. 1–18.
- (191) Holbourn, K. P.; Acharya, K. R.; Perbal, B. The CCN family of proteins: structure-function relationships. *Trends Biochem. Sci* **2008**, 33, 461–473.
- (192) Dhar, A.; Ray, A. The CCN family proteins in carcinogenesis. *Exp. Oncol.* **2010**, 32, 2–9.
- (193) Hwa, V.; Oh, Y.; Rosenfeld, R. G. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr. Rev.* **1999**, 20, 761–787.
- (194) Francischetti, I. M. B.; Kotsyfakis, M.; Andersen, J. F.; Lukszo, J. Cyr61/CCN1 displays high-affinity binding to the somatomedin B(1-44) domain of vitronectin. *PLoS ONE* **2010**, 5, e9356.
- (195) Lau, L. F.; Nathans, D. Identification of a set of genes expressed during the G0/G1 transition of cultured mouse cells. *EMBO J* **1985**, 4, 3145–3151.
- (196) Brunner, A.; Chinn, J.; Neubauer, M.; Purchio, A. F. Identification of a gene family regulated by transforming growth factor-beta. *DNA Cell Biol.* **1991**, 10, 293–300.
- (197) O'Brien, T. P.; Yang, G. P.; Sanders, L.; Lau, L. F. Expression of cyr61, a growth factor-inducible immediate-early gene. *Mol. Cell. Biol* **1990**, 10, 3569–3577.
- (198) Kireeva, M. L.; MO, F. E.; Yang, G. P.; Lau, L. F. Cyr61, a product of a growth factor-inducible immediate-early gene, promotes cell proliferation, migration, and adhesion. *Mol. Cell. Biol* **1996**, 16, 1326–1334.
- (199) Schütze, N.; Schenk, R.; Fiedler, J.; Mattes, T.; Jakob, F.; Brenner, R. E. CYR61/CCN1 and WISP3/CCN6 are chemoattractive ligands for human multipotent mesenchymal stroma cells. *BMC Cell Biol.* **2007**, 8, 45.

- (200) Lin, B.-R.; Chang, C.-C.; Chen, L.-R.; Wu, M.-H.; Wang, M.-Y.; Kuo, I.-H.; Chu, C.-Y.; Chang, K.-J.; Lee, P.-H.; Chen, W.-J.; Kuo, M.-L.; Lin, M.-T. Cysteine-rich 61 (CCN1) enhances chemotactic migration, transendothelial cell migration, and intravasation by concomitantly up-regulating chemokine receptor 1 and 2. *Mol. Cancer Res.* **2007**, 5, 1111–1123.
- (201) Dornbach, L. M.; Lyons Karen M. Genetic analysis of CCN gene function in mammalian development. In *CCN proteins. A new family of cell growth and differentiation regulators*; Perbal, B. V.; Takigawa, M., Eds.; Imperial College Press: London; Hackensack, NJ, 2005; pp. 135–152.
- (202) O'Brien, T. P.; Lau, L. F. Expression of the growth factor-inducible immediate early gene *cyr61* correlates with chondrogenesis during mouse embryonic development. *Cell Growth Differ* **1992**, 3, 645–654.
- (203) Brigstock, D. R. Regulation of angiogenesis and endothelial cell function by connective tissue growth factor (CTGF) and cysteine-rich 61 (CYR61). *Angiogenesis* **2002**, 5, 153–165.
- (204) Chen, C. C.; Mo, F. E.; Lau, L. F. The angiogenic factor Cyr61 activates a genetic program for wound healing in human skin fibroblasts. *J. Biol. Chem* **2001**, 276, 47329–47337.
- (205) Franzen, C. A.; Chen, C.-C.; Todorović, V.; Juric, V.; Monzon, R. I.; Lau, L. F. Matrix protein CCN1 is critical for prostate carcinoma cell proliferation and TRAIL-induced apoptosis. *Mol. Cancer Res* **2009**, 7, 1045–1055.
- (206) Sun, Z.-J.; Wang, Y.; Cai, Z.; Chen, P.-P.; Tong, X.-J.; Xie, D. Involvement of Cyr61 in growth, migration, and metastasis of prostate cancer cells. *Br. J. Cancer* **2008**, 99, 1656–1667.
- (207) Xie, D.; Miller, C. W.; O'Kelly, J.; Nakachi, K.; Sakashita, A.; Said, J. W.; Gornbein, J.; Koeffler, H. P. Breast cancer. Cyr61 is overexpressed, estrogen-inducible, and associated with more advanced disease. *J. Biol. Chem* **2001**, 276, 14187–14194.
- (208) Xie, D.; Yin, D.; Tong, X.; O'Kelly, J.; Mori, A.; Miller, C.; Black, K.; Gui, D.; Said, J. W.; Koeffler, H. P. Cyr61 is overexpressed in gliomas and involved in integrin-linked kinase-mediated Akt and beta-catenin-TCF/Lef signaling pathways. *Cancer Res.* **2004**, 64, 1987–1996.
- (209) Kok, S.-H.; Chang, H.-H.; Tsai, J.-Y.; Hung, H.-C.; Lin, C.-Y.; Chiang, C.-P.; Liu, C.-M.; Kuo, M. Y.-P. Expression of Cyr61 (CCN1) in human oral squamous cell carcinoma: An independent marker for poor prognosis. *Head Neck* **2010**, 32, 1665–1673.

- (210) Holloway, S. E.; Beck, A. W.; Girard, L.; Jaber, M. R.; Barnett, C. C., Jr; Brekken, R. A.; Fleming, J. B. Increased expression of Cyr61 (CCN1) identified in peritoneal metastases from human pancreatic cancer. *J. Am. Coll. Surg.* **2005**, *200*, 371–377.
- (211) Chen, P.-P.; Li, W.-J.; Wang, Y.; Zhao, S.; Li, D.-Y.; Feng, L.-Y.; Shi, X.-L.; Koeffler, H. P.; Tong, X.-J.; Xie, D. Expression of Cyr61, CTGF, and WISP-1 correlates with clinical features of lung cancer. *PLoS ONE* **2007**, *2*, e534.
- (212) Chien, W.; Kumagai, T.; Miller, C. W.; Desmond, J. C.; Frank, J. M.; Said, J. W.; Koeffler, H. P. Cyr61 suppresses growth of human endometrial cancer cells. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 53087–53096.
- (213) Evtimova, V.; Zeillinger, R.; Weidle, U. H. Identification of genes associated with the invasive status of human mammary carcinoma cell lines by transcriptional profiling. *Tumour Biol.* **2003**, *24*, 189–198.
- (214) Goodwin, C. R.; Lal, B.; Zhou, X.; Ho, S.; Xia, S.; Taeger, A.; Murray, J.; Laterra, J. Cyr61 mediates hepatocyte growth factor-dependent tumor cell growth, migration, and Akt activation. *Cancer Res* **2010**, *70*, 2932–2941.
- (215) Chen, Y.; Du, X.-Y. Functional properties and intracellular signaling of CCN1/Cyr61. *J. Cell. Biochem.* **2007**, *100*, 1337–1345.
- (216) Watari, H.; Xiong, Y.; Hassan, M. K.; Sakuragi, N. Cyr61, a member of ccn (connective tissue growth factor/cysteine-rich 61/nephroblastoma overexpressed) family, predicts survival of patients with endometrial cancer of endometrioid subtype. *Gynecol. Oncol.* **2009**, *112*, 229–234.
- (217) Maeta, N.; Osaki, M.; Shomori, K.; Inaba, A.; Kidani, K.; Ikeguchi, M.; Ito, H. CYR61 downregulation correlates with tumor progression by promoting MMP-7 expression in human gastric carcinoma. *Oncology* **2007**, *73*, 118–126.
- (218) Lin, M.-T.; Kuo, I.-H.; Chang, C.-C.; Chu, C.-Y.; Chen, H.-Y.; Lin, B.-R.; Sureshbabu, M.; Shih, H.-J.; Kuo, M.-L. Involvement of hypoxia-inducing factor- α -dependent plasminogen activator inhibitor-1 up-regulation in Cyr61/CCN1-induced gastric cancer cell invasion. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 15807–15815.
- (219) Sampath, D.; Winneker, R. C.; Zhang, Z. Cyr61, a member of the CCN family, is required for MCF-7 cell proliferation: regulation by 17 β -estradiol and overexpression in human breast cancer. *Endocrinology* **2001**, *142*, 2540–2548.
- (220) Walsh, C. T.; Radeff-Huang, J.; Matteo, R.; Hsiao, A.; Subramaniam, S.; Stupack, D.; Brown, J. H. Thrombin receptor and RhoA mediate cell proliferation through integrins and cysteine-rich protein 61. *FASEB J* **2008**, *22*, 4011–4021.

- (221) Zhang, J.-L.; Huang, Y.; Qiu, L.-Y.; Nickel, J.; Sebald, W. von Willebrand factor type C domain-containing proteins regulate bone morphogenetic protein signaling through different recognition mechanisms. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 20002–20014.
- (222) Perbal, B.; Martinerie, C.; Sainson, R.; Werner, M.; He, B.; Roizman, B. The C-terminal domain of the regulatory protein NOVH is sufficient to promote interaction with fibulin 1C: a clue for a role of NOVH in cell-adhesion signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 869–874.
- (223) Yang, G. P.; Lau, L. F. Cyr61, product of a growth factor-inducible immediate early gene, is associated with the extracellular matrix and the cell surface. *Cell Growth Differ* **1991**, *2*, 351–357.
- (224) Chen, N.; Chen, C. C.; Lau, L. F. Adhesion of human skin fibroblasts to Cyr61 is mediated through integrin alpha 6beta 1 and cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J. Biol. Chem* **2000**, *275*, 24953–24961.
- (225) Chen, C.-C.; Young, J. L.; Monzon, R. I.; Chen, N.; Todorović, V.; Lau, L. F. Cytotoxicity of TNFalpha is regulated by integrin-mediated matrix signaling. *EMBO J.* **2007**, *26*, 1257–1267.
- (226) Todorovic, V.; Chen, C.-C.; Hay, N.; Lau, L. F. The matrix protein CCN1 (CYR61) induces apoptosis in fibroblasts. *J. Cell Biol.* **2005**, *171*, 559–568.
- (227) Hackensack, N. J. CCN proteins. *Imperial College Press, London* **2005**.
- (228) Grzeszkiewicz, T. M.; Kirschling, D. J.; Chen, N.; Lau, L. F. CYR61 stimulates human skin fibroblast migration through Integrin alpha vbeta 5 and enhances mitogenesis through integrin alpha vbeta 3, independent of its carboxyl-terminal domain. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 21943–21950.
- (229) Chen, C. C.; Chen, N.; Lau, L. F. The angiogenic factors Cyr61 and connective tissue growth factor induce adhesive signaling in primary human skin fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 10443–10452.
- (230) Menendez, J. A.; Vellon, L.; Mehmi, I.; Teng, P. K.; Griggs, D. W.; Lupu, R. A novel CYR61-triggered “CYR61-alpha vbeta 3 integrin loop” regulates breast cancer cell survival and chemosensitivity through activation of ERK1/ERK2 MAPK signaling pathway. *Oncogene* **2005**, *24*, 761–779.
- (231) Nguyen, N.; Kuliopulos, A.; Graham, R. A.; Covic, L. Tumor-derived Cyr61(CCN1) promotes stromal matrix metalloproteinase-1 production and protease-activated receptor 1-dependent migration of breast cancer cells. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 2658–2665.

- (232) Pendurthi, U. R.; Allen, K. E.; Ezban, M.; Rao, L. V. Factor VIIa and thrombin induce the expression of Cyr61 and connective tissue growth factor, extracellular matrix signaling proteins that could act as possible downstream mediators in factor VIIa x tissue factor-induced signal transduction. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 14632–14641.
- (233) Kranenburg, O.; Poland, M.; Van Horck, F. P.; Drechsel, D.; Hall, A.; Moolenaar, W. H. Activation of RhoA by lysophosphatidic acid and Galpha12/13 subunits in neuronal cells: induction of neurite retraction. *Mol. Biol. Cell* **1999**, *10*, 1851–1857.
- (234) Seasholtz, T. M.; Majumdar, M.; Brown, J. H. Rho as a mediator of G protein-coupled receptor signaling. *Mol. Pharmacol.* **1999**, *55*, 949–956.
- (235) Schütze, N.; Kunzi-Rapp, K.; Wagemanns, R.; Nöth, U.; Jatzke, S.; Jakob, F. Expression, purification, and functional testing of recombinant CYR61/CCN1. *Protein Expr. Purif.* **2005**, *42*, 219–225.
- (236) Van Muijen, G. N.; Jansen, K. F.; Cornelissen, I. M.; Smeets, D. F.; Beck, J. L.; Ruiter, D. J. Establishment and characterization of a human melanoma cell line (MV3) which is highly metastatic in nude mice. *Int. J. Cancer* **1991**, *48*, 85–91.
- (237) Kaighn, M. E.; Narayan, K. S.; Ohnuki, Y.; Lechner, J. F.; Jones, L. W. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol* **1979**, *17*, 16–23.
- (238) Kaplan, R. S.; Pedersen, P. L. Determination of microgram quantities of protein in the presence of milligram levels of lipid with amido black 10B. *Anal. Biochem* **1985**, *150*, 97–104.
- (239) Bendas, G.; Vogel, J.; Bakowski, U.; Krause, A.; Müller, J.; Rothe, U. A liposome-based model system for the simulation of lectin-induced cell adhesion. *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1325*, 297–308.
- (240) Liang, C.-C.; Park, A. Y.; Guan, J.-L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc* **2007**, *2*, 329–333.
- (241) Perpeet, M.; Glass, S.; Gronewold, T.; Kiwitz, A.; Malavé, A.; Stoyanov, I.; Tewes, M.; Quandt, E. SAW Sensor System for Marker-Free Molecular Interaction Analysis. *Analytical Lett.* **2006**, *39*, 1747–1757.
- (242) Jain, N. K.; Roy, I. Effect of trehalose on protein structure. *Protein Sci.* **2009**, *18*, 24–36.
- (243) Tropis, M.; Meniche, X.; Wolf, A.; Gebhardt, H.; Strelkov, S.; Chami, M.; Schomburg, D.; Krämer, R.; Morbach, S.; Daffé, M. The crucial role of trehalose

- and structurally related oligosaccharides in the biosynthesis and transfer of mycolic acids in Corynebacterineae. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 26573–26585.
- (244) Iturriaga, G.; Suárez, R.; Nova-Franco, B. Trehalose metabolism: from osmo protection to signaling. *Int J Mol Sci* **2009**, *10*, 3793–3810.
- (245) Gronewold, T. M. A.; Glass, S.; Quandt, E.; Famulok, M. Monitoring complex formation in the blood-coagulation cascade using aptamer-coated SAW sensors. *Biosens Bioelectron* **2005**, *20*, 2044–2052.
- (246) Lee, Y.-J.; Lee, D. M.; Lee, C.-H.; Heo, S.-H.; Won, S. Y.; Im, J.-H.; Cho, M.-K.; Nam, H.-S.; Lee, S.-H. Suppression of human prostate cancer PC-3 cell growth by N-acetylcysteine involves over-expression of Cyr61. *Toxicol In Vitro* **2011**, *25*, 199–205.
- (247) Vestweber, D. Novel insights into leukocyte extravasation. *Curr. Opin. Hematol.* **2012**.
- (248) Singh, P.; Carraher, C.; Schwarzbauer, J. E. Assembly of fibronectin extracellular matrix. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2010**, *26*, 397–419.
- (249) Huttenlocher, A.; Horwitz, A. R. Integrins in cell migration. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2011**, *3*, a005074.
- (250) Sastry, S. K.; Burridge, K. Focal adhesions: a nexus for intracellular signaling and cytoskeletal dynamics. *Exp. Cell Res.* **2000**, *261*, 25–36.
- (251) Docheva, D.; Padula, D.; Schieker, M.; Clausen-Schaumann, H. Effect of collagen I and fibronectin on the adhesion, elasticity and cytoskeletal organization of prostate cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *402*, 361–366.
- (252) Kiefer, J. A.; Farach-Carson, M. C. Type I collagen-mediated proliferation of PC3 prostate carcinoma cell line: implications for enhanced growth in the bone microenvironment. *Matrix Biol.* **2001**, *20*, 429–437.
- (253) Gerber, U. Der Einfluss des Proteins CCN1 auf das Integrin-vermittelte Migrationsverhalten der Tumorzellen MV3 und PC-3, Thesis zur Erlangung des Master of Science Arzneimittelforschung (Drug Research) **2012**.
- (254) McCall-Culbreath, K. D.; Zutter, M. M. Collagen receptor integrins: rising to the challenge. *Curr Drug Targets* **2008**, *9*, 139–149.
- (255) Walsh, C. T.; Stupack, D.; Brown, J. H. G protein-coupled receptors go extracellular: RhoA integrates the integrins. *Mol. Interv.* **2008**, *8*, 165–173.
- (256) Chigaev, A.; Zwartz, G.; Graves, S. W.; Dwyer, D. C.; Tsuji, H.; Foutz, T. D.; Edwards, B. S.; Prossnitz, E. R.; Larson, R. S.; Sklar, L. A. Alpha4beta1 integrin affinity changes govern cell adhesion. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 38174–38182.

- (257) Isobe, T.; Hisaoka, T.; Shimizu, A.; Okuno, M.; Aimoto, S.; Takada, Y.; Saito, Y.; Takagi, J. Propolypeptide of von Willebrand factor is a novel ligand for very late antigen-4 integrin. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 8447–8453.
- (258) Takahashi, H.; Isobe, T.; Horibe, S.; Takagi, J.; Yokosaki, Y.; Sheppard, D.; Saito, Y. Tissue transglutaminase, coagulation factor XIII, and the pro-polypeptide of von Willebrand factor are all ligands for the integrins alpha 9beta 1 and alpha 4beta 1. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 23589–23595.
- (259) Zwartz, G.; Chigaev, A.; Foutz, T.; Larson, R. S.; Posner, R.; Sklar, L. A. Relationship between molecular and cellular dissociation rates for VLA-4/VCAM-1 interaction in the absence of shear stress. *Biophys. J.* **2004**, *86*, 1243–1252.
- (260) Keller-Pinter, A.; Bottka, S.; Timar, J.; Kulka, J.; Katona, R.; Dux, L.; Deak, F.; Szilak, L. Syndecan-4 promotes cytokinesis in a phosphorylation-dependent manner. *Cell. Mol. Life Sci.* **2010**, *67*, 1881–1894.
- (261) Utani, A. [Laminin alpha3 chain-derived peptide promotes keratinocyte migration and wound closure: clustering of syndecan-4 and integrin beta1]. *Seikagaku* **2010**, *82*, 327–331.
- (262) Gopal, S.; Bober, A.; Whiteford, J. R.; Multhaupt, H. A. B.; Yoneda, A.; Couchman, J. R. Heparan sulfate chain valency controls syndecan-4 function in cell adhesion. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 14247–14258.
- (263) Levy-Adam, F.; Ilan, N.; Vlodavsky, I. Tumorigenic and adhesive properties of heparanase. *Semin. Cancer Biol.* **2010**, *20*, 153–160.
- (264) Bass, M. D.; Morgan, M. R.; Humphries, M. J. Integrins and syndecan-4 make distinct, but critical, contributions to adhesion contact formation. *Soft Matter* **2007**, *3*, 372–376.
- (265) Byron, A.; Humphries, J. D.; Bass, M. D.; Knight, D.; Humphries, M. J. Proteomic analysis of integrin adhesion complexes. *Sci Signal* **2011**, *4*, pt2.
- (266) Hassan, H.; Greve, B.; Pavao, M. S. G.; Kiesel, L.; Ibrahim, S. A.; Götte, M. Syndecan-1 modulates β -integrin-dependent and interleukin-6-dependent functions in breast cancer cell adhesion, migration, and resistance to irradiation. *FEBS J.* **2013**.
- (267) Schneider, C.; Kässens, N.; Greve, B.; Hassan, H.; Schüring, A. N.; Starzinski-Powitz, A.; Kiesel, L.; Seidler, D. G.; Götte, M. Targeting of syndecan-1 by micro-ribonucleic acid miR-10b modulates invasiveness of endometriotic cells via dysregulation of the proteolytic milieu and interleukin-6 secretion. *Fertil. Steril.* **2012**.

- (268) Knecht, S.; Ricklin, D.; Eberle, A. N.; Ernst, B. Oligohis-tags: mechanisms of binding to Ni²⁺-NTA surfaces. *J. Mol. Recognit.* **2009**, *22*, 270–279.
- (269) Gerber, U.; Ross, T. VCAM-1 Knockdown in der Endothelzelllinie bEnd.3: Transfektion mit shRNA und funktionelle Untersuchung der transfizierten Mutanten, Bericht im Rahmen des Wahlpflichtfaches Pharmazeutische Chemie (unveröff.) **2010**.
- (270) Chen, N.; Leu, S.-J.; Todorovic, V.; Lam, S. C.-T.; Lau, L. F. Identification of a novel integrin α v β 3 binding site in CCN1 (CYR61) critical for pro-angiogenic activities in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 44166–44176.
- (271) Leu, S.-J.; Liu, Y.; Chen, N.; Chen, C.-C.; Lam, S. C.-T.; Lau, L. F. Identification of a novel integrin α 6 β 1 binding site in the angiogenic inducer CCN1 (CYR61). *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 33801–33808.
- (272) Jedsadayamata, A.; Chen, C. C.; Kireeva, M. L.; Lau, L. F.; Lam, S. C. Activation-dependent adhesion of human platelets to Cyr61 and Fisp12/mouse connective tissue growth factor is mediated through integrin α (IIb) β (3). *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 24321–24327.
- (273) Jun, J.-I.; Lau, L. F. Taking aim at the extracellular matrix: CCN proteins as emerging therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* **2011**, *10*, 945–963.
- (274) Simonis, D. Untersuchung der Heparinwirkung an Adhäsionsrezeptoren mithilfe akustischer Biosensoren, Bonn, 2009.
- (275) Cojocari Dan, Lentiviral delivery of shRNA expression construct for stable integration and expresion of shRNA. shRNA processing and inhibitory mechanisms. (10.12.2009). http://commons.wikimedia.org/wiki/File:ShRNA_Lentivirus.svg **2009**, Zugriff am 15.11.2012.
- (276) Marquette, C. A.; Blum, L. J. Applications of the luminol chemiluminescent reaction in analytical chemistry. *Anal Bioanal Chem* **2006**, *385*, 546–554.
- (277) Byron, A.; Humphries, J. D.; Craig, S. E.; Knight, D.; Humphries, M. J. Proteomic analysis of α 4 β 1 integrin adhesion complexes reveals α -subunit-dependent protein recruitment. *Proteomics* **2012**, *12*, 2107–2114.

8 Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der hämatogenen Metastasierung.....	4
Abbildung 2: Heparin-Teilstruktur eines UFH.....	7
Abbildung 3: Struktur des LMWH Enoxaparin-Natrium.....	9
Abbildung 4: Struktur des LMWH Tinzaparin-Natrium.....	10
Abbildung 5: Sialyl LewisX.....	20
Abbildung 6: Integrin VLA-4.....	22
Abbildung 7: Integrin-Kombinationen und Ligandklassen.....	24
Abbildung 8: Integrin vermitteltes Signalling.....	31
Abbildung 9: Die Familie der Syndekane.....	36
Abbildung 10: Syndekan-4 und Integrin-abhängiges Signalling.....	38
Abbildung 11: Strukturen der CCN-Familie.....	42
Abbildung 12: Struktur des Cyr61 und ausgewiesene Bindungsstellen für bekannte Bindungspartner.....	47
Abbildung 13: Struktur des Cyr61 mit Bindungsmotiven für ausgewiesene Integrine..	48
Abbildung 14: Signalwege des Cyr61.....	49
Abbildung 15: Prozessierung der shRNA zur siRNA und den Abbau der Ziel-mRNA....	73
Abbildung 16: Puromycin-dihydrochlorid.....	76
Abbildung 17: Amidoschwarz.....	83
Abbildung 18: Schematische Darstellung der Immundetektion.....	88
Abbildung 19: Schematische Zeichnung der Durchflusskammer.....	94
Abbildung 20: Versuchsaufbau zur Untersuchung der Zelladhäsion unter physiologischen Flussbedingungen.....	96
Abbildung 21: Oberseite der verwendeten Quarze mit Goldkontakten.....	100
Abbildung 22: Immobilisierung einer definierten Phospholipidschicht auf die Oberfläche eines SAW-Sensorquarzes mittels Langmuir-Blodgett-Technik.....	103
Abbildung 23: Strukturformel der Trehalose.....	104
Abbildung 24: Bindung der His-Sequenz über NTA-Ni ²⁺	105
Abbildung 25: Reaktionen während einer Protein-Immobilisierung mit EDC/NHS....	107
Abbildung 26: Frequenzverlaufs bei einer typischen Immobilisationsroutine.....	109
Abbildung 27: Cyr61 Expression des PC-3 Wildtyp.....	113
Abbildung 28: Cyr61 Expression des PC-3 Wildtyp und PC-3 aCyr61 Klon nach verschiedenen Stimulationszeiten.....	114
Abbildung 29: Silberfärbung des SDS-PAGE Geles stimulierter PC-3 Zellen.....	115
Abbildung 30: Western-Blot stimulierter PC-3 Zellen.....	116
Abbildung 31: Western-Blot unstimulierter PC-3 Zellen.....	117

Abbildung 32: Migration von MV3-Zellen auf Fibronectin.....	122
Abbildung 33: Spreiten einer PC-3 Zelle auf Kollagen I Beschichtung.....	127
Abbildung 34: Migrationsverhalten von PC-3 auf Fibronectin und Heparin-Zusatz....	128
Abbildung 35: Migrationsverhalten von PC-3 auf Kollagen und Heparin-Zusatz.....	129
Abbildung 36: Cyr61 Expression des MV3 Wildtyp.....	132
Abbildung 37: Cyr61 Expression des MV3 Wildtyp, MV3 aCyr61 Klon 3 und MV3 NT-Klon im Vergleich.....	133
Abbildung 38: Silberfärbung des SDS-PAGE Geles stimulierter MV3 Zellen.	133
Abbildung 39: Western-Blot stimulierter MV3 Zellen.....	134
Abbildung 40: Western-Blot unstimulierter MV3 Zellen.....	134
Abbildung 41: MV3 Wildtypzellen in Durchsichtmikroskopie.....	136
Abbildung 42: MV3 Wildtypzellen in Fluoreszenzmikroskopie.....	137
Abbildung 43: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von MV3 Wildtypzellen und MV3 aCyr61 Klonzellen im Vergleich.....	138
Abbildung 44: Migrationsverhalten von MV3 auf Fibronectin und Heparin-Zusatz....	146
Abbildung 45: Migration von MV3 und MV3 aCyr61 Klonzellen auf Fibronectin mit und ohne Zusatz von Heparin.....	147
Abbildung 46: Migrationsverhalten von MV3 auf Kollagen und Heparin-Zusatz.....	148
Abbildung 47: Darstellung des Trocknungs- und Rehydratisierungsprozedere mittels Trehalose.....	163
Abbildung 49: Darstellung der Bindung von Cyr61 an membranständiges VLA-4.....	166
Abbildung 50: Darstellung der Immobilisation von Syndekan-4 Histag an einer künstlichen Membran.....	170
Abbildung 51: Vergleich der Zelladhäsion von MV3 Wildtypzellen gegenüber MV3 aCyr61 Klonzellen.....	175
Abbildung 52: Einfluss der Stimulationszeit auf die Zelladhäsion nach 4 s.....	177
Abbildung 53: Einfluss der Stimulationszeit mit exogen zugeführten Cyr61 auf die Zelladhäsion nach 4 s.....	178
Abbildung 54: Einfluss des exogen zugesetzten Cyr61 auf die Zelladhäsion.....	180
Abbildung 55: Zelladhäsion von MV3 Wildtyp und Klonzellen unter dem Einfluss von 50 µg Tinzaparin.....	182
Abbildung 56: Zelladhäsion von MV3 Wildtyp und Klonzellen unter dem Einfluss von 50 µg Enoxaparin.....	183
Abbildung 57: Zelladhäsion von MV3 Wildtyp unter dem Einfluss von jeweils 25 µg strukturmodifizierter Heparine.....	185
Abbildung 58: Zelladhäsion der MV3 Wildtypzellen und MV3 aCyr61 Klonzellen unter Einfluss von steigenden Konzentrationen an 2O-DS-LMWH und Tinzaparin....	187
Abbildung 59: Syndekan-4 Expression des MV3 Wildtyp, MV3 aSDC4 Klon 1 und MV3 NT-Klon im Vergleich.....	189
Abbildung 60: Western-Blot gegen Syndekan-4 unstimulierter MV3 Zellen.	190
Abbildung 61: Vergleich der Zelladhäsion von MV3 Wildtypzellen gegenüber MV3 aSDC4 Klonzellen.....	193
Abbildung 62: Vergleich der Zelladhäsion von MV3 Wildtypzellen gegenüber MV3 aSDC4 Klonzellen bei gleichzeitiger Stimulation mit 1 µg exogen zugeführtem Cyr61.....	195

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Modifizierte Tinzaparinderivate.....	11
Tabelle 2.2: Klinische Studien zum Einfluss von LMWHs auf den Verlauf von Krebserkrankungen.....	12
Tabelle 2.3: Synonyme für CCN1.....	44
Tabelle 2.4: Wirkungen einer Cyr61 Überexpression bei verschiedenen Tumorentitäten.....	45
Tabelle 4.1: Transfektionsmischung.....	75
Tabelle 4.2: verwendete Antikörperkonzentrationen.....	79
Tabelle 4.3: Kompressionsdrücke der verwendeten Lipide/Lipidmischungen.....	102
Tabelle 5.1: Integristatus der PC-3 Zelllinie, Wildtyp und Cyr61-defizienter Klon....	119
Tabelle 5.2: Migrationsverhalten der PC-3 Zellen auf unbeschichteten Untergrund....	123
Tabelle 5.3: Migrationsverhalten von PC-3 Zellen auf Fibronectin-Beschichtung.....	124
Tabelle 5.4: Migrationsverhalten von PC-3 Zellen auf Kollagen-Beschichtung.....	125
Tabelle 5.5: Integristatus der MV3 Zelllinie, Wildtyp und Cyr61-defizienter Klon....	140
Tabelle 5.6: Migrationsverhalten der MV3 Zellen auf unbeschichteten Untergrund....	142
Tabelle 5.7: Migrationsverhalten von MV3 Zellen auf Fibronectin-Beschichtung.....	142
Tabelle 5.8: Migrationsverhalten von MV3 Zellen auf Kollagen-Beschichtung.....	144
Tabelle 5.9: Migrationsverhalten von MV3 Wildtypzellen und aCyr61 Klon auf Fibronectin.....	144
Tabelle 5.10: Migrationsverhalten von MV3 Zellen auf Fibronectin und Cyr61-Zusatz.....	149
Tabelle 5.11: Migrationsverhalten von MV3 Zellen auf Fibronectin und Heparinase III-Zusatz.....	151
Tabelle 5.12: Kinetische Konstanten zur Bindung von Heparin an immobilisierten Cyr61-Fc-Chimären.....	154
Tabelle 5.13: Kinetische Konstanten zur Bindung von Heparinderivaten an immobilisierten Cyr61-Fc-Chimären.....	155
Tabelle 5.14: Immobilisierte Proteinmengen auf der Sensoroberfläche.....	157
Tabelle 5.15: Kinetische Konstanten zur Bindung von Heparin an immobilisierten Cyr61 MI-III-Fc-Chimären.....	157
Tabelle 5.16: Kinetische Konstanten zur Bindung von Heparinderivaten an immobilisierten Cyr61 MI-III-Fc-Chimären.....	158
Tabelle 5.17: Kinetische Konstanten zur Bindung ausgewählter Heparine an Vesikel-immobilisierter Membranpräparation.....	160
Tabelle 5.18: Kinetische Konstanten zur Bindung von VCAM-1 an membranimmobilisierten VLA-4-Histag.....	164
Tabelle 5.19: Kinetische Konstanten zur Bindung von Heparin an membranimmobilisierten, isolierten VLA-4-Histag.....	165
Tabelle 5.20: Kinetische Konstanten zur Bindung von Cyr61 an membranimmobilisierten VLA-4-Histag.....	166
Tabelle 5.21: Kinetische Konstanten zur Bindung von Cyr61 an membranimmobilisiertem Syndekan-4-Histag.....	168
Tabelle 5.22: Kinetische Konstanten zur Bindung von Syndekan-4-Histag an immobilisierten Cyr61- und Cyr61 MI-III-Fc-Chimären.....	169

Tabelle 5.23: Kinetische Konstanten zur Bindung von Tinzaparin an am Syndekan-4-Histag gebundenen Cyr61.....	171
Tabelle 5.24: Kinetische Bindungskonstanten zur Bindung von NAc-LMWH an am Syndekan-4-Histag gebundenen Cyr61.....	172
Tabelle 5.25: Integrinstatus der MV3 Zelllinie, Wildtyp und Syndekan-4- defizienter Klon.....	191