

Der Einfluss latenter Heparanase
auf die Aktivität des Integrins VLA-4
bei Adhäsion und Migration von Melanomzellen

–

Ein neues Target für die antimetastatische Wirksamkeit
von Heparin

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Ursula Gerber

aus Köln

Bonn, August 2015

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

1. Gutachter: Prof. Dr. G. Bendas

2. Gutachter: Prof. Dr. C. E. Müller

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2015

Erscheinungsjahr: 2016

Do not go gentle into that good night,
Old age should burn and rave at close of day;
Rage, rage against the dying of the light.

Dylan Thomas

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	V
1 Einleitung	1
2 Theoretischer Teil	3
2.1 <i>Prozess der hämatogenen Metastasierung</i>	3
2.2 <i>Integrine</i>	7
2.2.1 Allgemeine Struktur und Aufbau der Integrine	7
2.2.2 Allgemeine Funktionen der Integrine.....	10
2.2.3 Integrine als therapeutische Zielstrukturen.....	11
2.2.4 Das Integrin VLA-4	12
2.2.5 VCAM-1 – Bindungspartner des VLA-4.....	13
2.2.6 Intrazelluläre Verknüpfung der Integrine	14
2.3 <i>Proteoglykane</i>	18
2.3.1 Allgemeine Struktur und Aufbau der Proteoglykane	18
2.3.2 Allgemeine Funktionen der Proteoglykane.....	21
2.3.3 Heparansulfat-Proteoglykane	21
2.3.3.1 Syndekane	23
2.3.3.2 Syndekan-4.....	25
2.4 <i>Das Syndekan-4/Integrin Interaktom</i>	28
2.5 <i>Heparanase</i>	29
2.5.1 Charakterisierung	30
2.5.2 Physiologische und pathologische Funktionen	30
2.5.3 Expression und Metabolismus.....	31
2.5.4 Latente Heparanase	32
2.5.5 Inhibitoren der Heparanase	33
2.6 <i>Heparine</i>	35
2.6.1 Erste medizinische Anwendungen	35
2.6.2 Struktur des Heparins	35
2.6.3 Antikoagulative Wirkung der Heparine	36
2.6.4 Niedermolekulare Heparine	37
2.6.5 Tinzaparin	38
2.6.6 Die Bedeutung von Heparin in malignen Tumorerkrankungen	39
3 Ziel der Arbeit	41

4	Material und Methoden	43
4.1	<i>Verwendete Materialien</i>	43
4.1.1	Geräte	43
4.1.2	Verbrauchsmaterialien	45
4.1.3	Chemikalien.....	46
4.1.4	Testsubstanzen	50
4.1.5	Lipide.....	51
4.1.6	Antikörper.....	51
4.1.7	Puffer und Lösungen.....	53
4.1.8	Software	57
4.1.9	Statistik.....	57
4.2	<i>Zellkultur.....</i>	58
4.2.1	Kulturpflege	58
4.2.1.1	MV3 Zellen	58
4.2.1.2	MV3 aSDC-4kd Zellen	58
4.2.2	Subkultivierung.....	59
4.2.3	Kryokonservierung der Zellen und Revitalisierung	60
4.2.4	Zellzahlbestimmung	60
4.3	<i>Zellmigration.....</i>	61
4.4	<i>Zelladhäsion unter physiologischen Flussbedingungen</i>	62
4.4.1	Reinigung und Vorbereitung der Deckgläser	62
4.4.2	Kovalente Bindung von rekombinantem VCAM-1 an die Oberfläche von präparierten Deckgläsern	63
4.4.3	Bestimmung der Zelladhäsion unter physiologischen Flussbedingungen	63
4.5	<i>Konfokale-Laserscanning-Mikroskopie</i>	64
4.5.1	Detektion von Vinculin in fokalen Adhäsionsclustern.....	64
4.6	<i>Durchflusszytometrie.....</i>	65
4.6.1	Bestimmung der Expression von Integrinen auf MV3 Zellen	66
4.6.2	Bestimmung der Expression von Syndekan-1 und 4 auf MV3 Zellen.....	66
4.6.3	Bestimmung der VCAM-1-Bindung zu dem Integrin VLA-4 auf MV3 Zellen	67
4.7	<i>Bestimmung von Bindungsaffinitäten mittels Surface Acoustic Wave Technologie</i>	68
4.7.1	Immobilisierung von Proteinen auf Quarzsensoren mittels EDC/NHS	69
4.7.1.1	Vorbehandlung des Quarzsensors.....	69
4.7.1.2	Immobilisierung des Proteins	70
4.7.2	Immobilisierung von Proteinen auf Quarzsensoren mittels Chelator.....	73
4.7.2.1	Vorbehandlung des Quarzsensors.....	73
4.7.2.2	Immobilisierung des Proteins	76
4.7.3	Vermessung von Verdünnungsreihen.....	77

4.7.4	Reinigung der sam [®] 5 Quarzsensoren	79
4.8	<i>Proteinanalytik</i>	81
4.8.1	Herstellung von Zelllysaten	81
4.8.2	Bestimmung des Proteingehaltes in Lysaten	81
4.8.3	Durchführung von Gel-Elektrophorese	82
4.8.3.1	Gel-Elektrophorese von Zelllysaten.....	82
4.8.3.2	Gel-Elektrophorese mit rekombinantem Syndekan-4.....	83
4.8.4	Anfertigung von Western Blots	83
4.8.5	Proteome Profiler [™] human Phospho-Kinase Antibody Array	85
5	Ergebnisse und Diskussion	87
5.1	<i>Charakterisierung der MV3 Zellen</i>	87
5.1.1	Erstellung einer transfizierten MV3 Zelllinie mit reduzierter Syndekan-4 Expression	87
5.1.2	Expression von Syndekan-1 auf der Oberfläche der MV3 Zelltypen	88
5.1.3	Expression von Integrinen auf der Oberfläche der MV3 Zelltypen.....	88
5.1.4	Aktivität der endogenen Heparanase in MV3 Zellen	90
5.1.5	Aufnahme von latenter Heparanase in MV3 Zellen.....	91
5.2	<i>Einfluss von latenter Heparanase auf die Adhäsion von MV3 Zellen</i>	92
5.2.1	Migrationsverhalten der MV3 Zelltypen	92
5.2.2	Einfluss von latenter Heparanase auf das Migrationsverhalten der MV3 Zelltypen... 93	
5.2.3	Einfluss des KKDC-Peptids auf das Migrationsverhalten der MV3 Zelltypen	94
5.2.4	Adhäsion von MV3 Zellen unter physiologischen Flussbedingungen	95
5.2.5	Einfluss von latenter Heparanase auf die Adhäsion der MV3 Zelltypen zu VCAM-1 unter physiologischen Flussbedingungen	96
5.2.6	Einfluss der Inkubationszeit latenter Heparanase auf das Bindungsverhalten von MV3 Zellen zu VCAM-1 in durchflusszytometrischen Untersuchungen	98
5.2.7	Einfluss der Menge an latenter Heparanase auf das Bindungsverhalten von MV3 Zellen zu VCAM-1 in durchflusszytometrischen Untersuchungen	100
5.2.8	Einfluss der Inkubationszeit des KKDC-Peptids auf das Bindungsverhalten von MV3 Zellen zu VCAM-1 in durchflusszytometrischen Untersuchungen	101
5.3	<i>Untersuchung der Bindungsaffinitäten von latenter Heparanase</i>	103
5.3.1	Bindung von latenter Heparanase zu Syndekan-4.....	104
5.3.1.1	Enzymatischer Abbau der Heparansulfat-Ketten von Syndekan-4 durch Heparinase III	105
5.3.1.2	Bindung von latenter Heparanase an Syndekan-4 nach Heparinase III Abbau.....	106
5.3.1.3	Enzymatischer Abbau der Heparansulfat-Ketten von Syndekan-4 durch Chondroitinase ABC	108

5.3.1.4	Bindung latenter Heparanase an Syndekan-4 nach Chondroitinase ABC Abbau	109
5.3.2	Bindung von latenter Heparanase zu Integrinen.....	111
5.3.2.1	Bindung von latenter Heparanase zu VLA-4.....	111
5.3.2.2	Bindung von latenter Heparanase zu α U β 5.....	111
5.3.3	Bindung von latenter Heparanase zu VCAM-1	113
5.4	<i>Intrazelluläre Vorgänge nach Inkubation mit latenter Heparanase</i>	115
5.4.1	Expression und Aktivität von ausgewählten Adhäsionskinasen nach Heparanase- Einfluss	116
5.4.2	Proteome Profiler™ Human Phospho-Kinase Array	119
5.4.2.1	Beeinflussung des ERK-Signalweges durch latente Heparanase	119
5.4.2.2	Beeinflussung des p53-Signalweges durch latente Heparanase	121
5.4.2.3	Beeinflussung von FAK und AKT durch latente Heparanase	122
5.4.2.4	Beeinflussung der Familie der Src-Kinasen durch latente Heparanase	123
5.4.3	Beeinflussung der Integrin-Aktivität durch latente Heparanase und Detektion durch fluoreszenzmikroskopische Markierung von Vinculin	124
5.5	<i>Interaktion von Heparinen mit latenter Heparanase und Verhinderung des Heparanase- Effekts</i>	126
5.5.1	Bindung von latenter Heparanase zu modifizierten Heparinen	126
5.5.2	Verdrängung von latenter Heparanase durch Heparin aus der Bindung zu Syndekan-4	128
5.5.3	Verhinderung der Bindung von latenter Heparanase zu Syndekan-4 durch eine vorherige Bindung zu Tinzaparin	129
5.5.4	Einfluss von latenter Heparanase und Heparinen auf das Bindungsverhalten von MV3 Zellen zu VCAM-1 in durchflusszytometrischen Untersuchungen	130
5.5.4.1	Simultane Zugabe von Heparinen und latenter Heparanase zu MV3 Zellen ..	130
5.5.4.2	Zeitlich versetzte Zugabe von Heparinen und latenter Heparanase zu MV3 Zellen.....	132
6	Zusammenfassung	135
7	Literaturverzeichnis	137
8	Anhang	153
8.1	<i>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</i>	153
8.2	<i>Publikationsliste</i>	157
8.3	<i>Verfassererklärung</i>	159
8.4	<i>Lebenslauf</i>	160
8.5	<i>Danksagung</i>	161

Abkürzungen

ADMIDAS	engl. adjacent to metal ion-dependent adhesion site
AKT	Proteinkinase B
aSDC-4kd	MV3 Zellen mit verminderter Syndekan-4 Expression (Knockdown)
AT	Antithrombin III
ATM	engl. ataxia telangiectasia mutated
ATR	engl. ATM- and RAD3-related
BCA	engl. bicinchoninic acid
BMDC	engl. Bone marrow derived cell
BSA	Bovines Serumalbumin
CAM	engl. Cell adhesion molecule
cAMP	engl. cyclic adenosine monophosphate
CFS	Carboxyfluorescein
Chk	Checkpoint-Kinase
CHO	engl. Chinese Hamster Ovary, immortalisierte Zelllinie aus Ovarien des chinesischen Hamsters
CREB	engl. cAMP response element binding protein
DAG	Diacylglycerin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMT	Epitheliale-mesenchymale Transition
ERK	engl. Extracellular-signal-regulated kinase
EZM	Extrazelluläre Matrix
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FGF	engl. Fibroblast growth factor
GAG	Glykosaminoglykan

Abkürzungen

GPCR	engl. G protein-coupled receptor
GPI	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol
HRP	engl. Horseradish peroxidase
HS	Heparansulfat
HSPG	Heparansulfat Proteoglykan
ICAM-1	engl. Intercellular Cell Adhesion Molecule 1
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ILK	engl. Integrin linked Kinase
K_D	Gleichgewichtsdissoziationskonstante
k_{off}	Dissoziationskonstante
k_{on}	Assoziationskonstante
LMWH	engl. Low-molecular-weight heparin
MAdCAM-1	engl. Mucosal Addressin Cellular Adhesion Molecule 1
MAPK	engl. Mitogen-activated Protein Kinases
MET	Mesenchymale-epitheliale Transition
MIDAS	engl. metal ion-dependent adhesion site
MMP	Matrix-Metalloproteinase
NHS	N-Hydroxysuccinimid
PBS	engl. Phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PDGF	engl. Platelet derived growth factor
PECAM-1	engl. Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule 1
PG	Proteoglykan
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RGD	Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Asparaginsäure, Integrin Bindungsmotiv
RNA	engl. Ribonucleic acid
rpm	engl. Revolutions per minute

RT	Raumtemperatur
SAM	engl. self assembled monolayer
SDC-4	Syndekan-4
SDS	engl. sodium dodecyl sulfate
shRNA	engl. small hairpin RNA
TBS	engl. Tris-buffered saline
TNF α	Tumornekrosefaktor α
UFH	unfraktioniertes Heparin
VCAM-1	engl. Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VEGF	engl. Vascular endothelial growth factor
VLA-4	engl. very late activation antigen 4
Wt	Wildtyp, MV3 Zellen ohne veränderte Expression
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Die Diagnose Krebs ereilt in den letzten Jahren prozentual betrachtet immer mehr Menschen weltweit. Die letzte Erhebung des Robert-Koch-Institutes aus dem Jahr 2010 bestätigte 477.300 Neuerkrankungen an bösartigen Neubildungen in Deutschland und infolge dessen 218.258 Todesfälle. Für das Jahr 2014 wurde weiterhin ein Anstieg der Neuerkrankungen auf über 500.000 Betroffene prognostiziert. Die zunehmende Inzidenz von Krebserkrankungen stellt eine Herausforderung an die Gesellschaft dar und fordert die genaue Erforschung der Krebsentstehung und -ausbreitung zur Auswahl von adäquaten Behandlungsoptionen. Die meisten Krebsarten manifestieren sich zunächst in einem Primärtumor, der chirurgisch entfernt oder mittels Chemo- oder Strahlentherapie behandelt werden kann. Falls dieser Tumor längere Zeit unbemerkt bleibt oder eine besonders aggressive Tumorentität vorliegt, kommt es zur Ablösung von Krebszellen, die über das Blut- sowie Lymphsystem zu anderen Geweben gelangen, in diese eindringen und einen neuen Tumor ausbilden können. Dieser Vorgang der Metastasierung ist sehr komplex, mechanistisch nur ansatzweise aufgeklärt und stellt so den eigentlichen Mortalitätsfaktor maligner Erkrankungen dar.

Das Enzym Heparanase ist in verschiedenen Tumorentitäten aktiv in den Metastasierungsvorgang involviert. Die Heparanase ermöglicht den vom Primärtumor abgelösten Tumorzellen die Migration durch das Gewebe, indem sie einerseits die enge Verflechtung der extrazellulären Matrix hydrolytisch spaltet und andererseits Wachstumsfaktoren aus ihrer Proteoglykanbindung freisetzt. Heparanase liegt nicht dauerhaft im Gewebe vor, sondern wird von den metastasierenden Zellen in einer latenten Proform sekretiert und u. a. von dem zelleigenen Enzym Cathepsin L aktiviert. Die Zellen sind somit in der Lage ihre Fähigkeit zur Transmigration und ihre Verbreitung eigenständig zu regulieren.

Neben dem prometastatischen Effekt der Heparanase wird die Metastasierung maßgeblich über die adhäsiven Wechselwirkungen der Krebszellen mit zellulären Komponenten des Blutes sowie der Endothelschicht der Blutgefäße gesteuert. In diese Bindungsprozesse sind mehrere Rezeptoren auf den Zelloberflächen involviert. Die Familie der Integrine spielt dabei eine entscheidende Rolle für die feste Anbindung und Invasion von Zellen und stellt daher einen interessanten Ansatzpunkt für die Hemmung der metastatischen Vorgänge dar. Beispielsweise wird die Metastasierungsfähigkeit von Melanomzellen durch die Inhibition der Bindung des Integrins VLA-4 zu seinem physiologischen Bindungspartner VCAM-1 erheblich verringert. In diesem Zusammenhang wurden niedermolekulare Heparine als Inhibitoren dieser Bindung identifiziert.

Heparin wird entsprechend der klinischen Leitlinie zur Thromboseprophylaxe bei Tumorpatienten verwendet und zeigte darüber hinaus in Studien mit Krebspatienten eine überlebensverlängernde Wirkung unabhängig vom gerinnungshemmenden Effekt. Bei der Suche nach den zugrundeliegenden molekularen Mechanismen erwies sich die Hemmung der VLA-4/VCAM-1-Bindung als ein mögliches Target. Inwieweit Heparin das Integrin VLA-4 direkt blockiert oder hemmend in die Bindungsaktivierung des Integrins eingreifen kann, ist nicht geklärt.

In dieser Arbeit wird der Effekt der Proheparanase in den stark zur Metastasierung neigenden MV3 Melanomzellen hinsichtlich einer Integrinaktivierung untersucht. Dabei wird besonderes Augenmerk auf die Aktivität des Integrins VLA-4 und die durch Proheparanase gesteigerte Affinität zu VCAM-1 gelegt und diese mechanistisch geklärt. So wird beispielsweise das Bindungs- und Adhäsionsverhalten der Melanomzellen unter Einfluss von Proheparanase in Abhängigkeit von der Zelloberflächenexpression des Heparansulfat-Proteoglykans SDC-4 aufgedeckt. Die Affinitäten der Proheparanase zu SDC-4, VLA-4 und VCAM-1 werden erstmals in Surface Acoustic Wave-Bindungsstudien vorgestellt. Neben der Untersuchung von Bindungen der Zelloberflächenstrukturen wird die Weiterleitung der Signale in die Zelle anhand der Aktivität von intrazellulären Kinasen genauer analysiert. Zuletzt wird die Beeinflussung und Inhibition der Bindungsvorgänge durch verschieden modifizierte Heparine erörtert und damit die latente Form der Heparanase als neue Targetstruktur der antimetastatischen Wirksamkeit des Heparins vorgestellt.

Die Arbeit gibt somit Einblick in das prometastatische Potential der latenten Form der Heparanase im Zusammenspiel mit Integrinen, zeigt die Abhängigkeit des Metastasierungsprozesses von SDC-4 und bestärkt die pharmakologische Bedeutung von Heparinen in der Prophylaxe von Metastasen.

2 Theoretischer Teil

2.1 Prozess der hämatogenen Metastasierung

Die Entstehung von Tumoren beruht auf der malignen Transformation von gesunden Zellen, die entweder durch genetische oder epigenetische Mutationen entsteht. Daraus resultiert oftmals ein unkontrolliertes Zellwachstum, das sich zum einen aus der Unabhängigkeit von wachstumsfördernden Signalen und zum anderen aus der Unbeeinflussbarkeit durch Wachstumshemmer zusammensetzt. Weitere wichtige Kennzeichen einer malignen Tumorzelle ist die Umgehung von Apoptose, ein unbegrenztes Replikationsvermögen, die Etablierung von neuen Blutgefäßen (Angiogenese) und nicht zuletzt das Bestreben, sich in anliegende oder entfernte Gewebe auszuweiten (Metastasierung)¹. Häufig wird die Überlebenswahrscheinlichkeit vom Grad der Metastasierung bestimmt, wobei sich Zellen vom Primärtumor ablösen und über die Blutbahn zu anderen, entfernten Geweben gelangen. Diese können derart infiltriert werden, dass die entstandenen Metastasen die Überlebenschancen des Erkrankten beträchtlich reduzieren. Dieser Vorgang der Metastasierung ist sehr komplex und wird an dieser Stelle auf die relevanten Zusammenhänge reduziert.

Je nach Tumorentität unterscheiden sich die Prozesse der metastatischen Kaskade in ihrem Zusammenspiel und ihrer Dynamik. Generell sind bei der hämatogenen Metastasierung die Vorgänge der Zellmigration, Invasion, Intravasation ins Blutgefäß, Verbreitung über den Blutstrom, Anhaftung an Endothelzellen, Extravasation aus dem Blutgefäß an einer vom Primärtumor entfernten Sekundärstelle, Anwachsen im fremden Gewebe und Proliferation zu einer klinisch detektierbaren Metastase involviert (siehe Abb. 2.1)². Im ersten Schritt wird die Ablösung der Tumorzellen vom Primärtumor durch eine geringere Expression von bestimmten Zelladhäsionsmolekülen (CAMs) wie Mitgliedern der Immunglobulin-Familie (Ig) oder der Calcium abhängigen Cadherin-Familie ermöglicht. Namentlich erwähnt sei hier die geringere Expression des Zelloberflächenproteins E-Cadherin, das auf Epithelzellen das am stärksten exprimierte Cadherin darstellt. Weitere Oberflächenproteine, die an der Ablösung beteiligt sind, sind die Adhäsionsproteine der Integrin-Familie, die für den Kontakt der Zellen mit der EZM verantwortlich sind. Zur weiteren Auflockerung des umliegenden Gewebes werden Enzyme wie Heparanase und Matrixmetalloproteinasen (MMPs) ausgeschüttet, die diverse Zelloberflächenstrukturen, die EZM und die Basalmembran abbauen³.

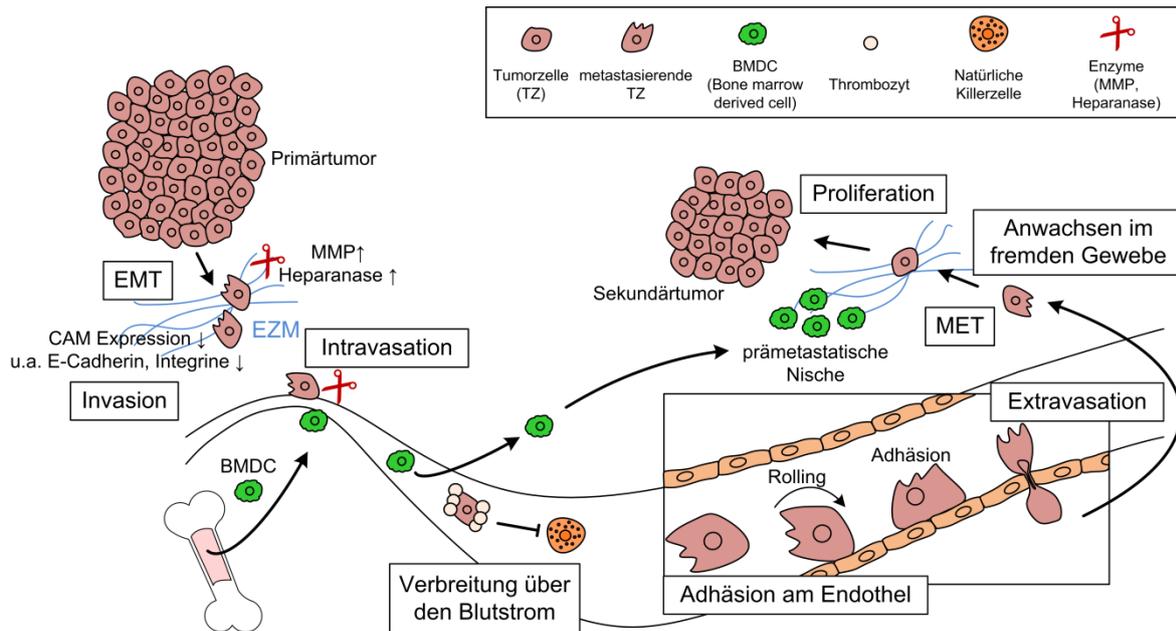


Abb. 2.1 Prozess der hämatogenen Metastasierung⁴

Der Verlust der Zell-Zell- und Zell-EZM-Kontakte ist Teil der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) der Zelle, wobei neben dem veränderten Expressionsmuster der Adhäsionsrezeptoren auch strukturelle Veränderungen der Zellen stattfinden, die eine optimale Migration gewährleisten. Diese erfordert zusätzlich die Einbeziehung des Zytoskeletts und einen Zellumbau, bei dem sich die Zelle polarisiert und Lamellipodien und Filopodien ausgebildet werden, die eine gerichtete Migration ermöglichen. An diesem Prozess sind die Integrine als Zelloberflächenrezeptoren wiederum maßgeblich beteiligt, indem sie Signale bidirektional sowohl von extra- nach intrazellulär als auch umgekehrt vermitteln⁵. Der stete Kontakt der Zelle zur umliegenden EZM über die Integrine ist für die Zelladhäsion und die gerichtete Migration unerlässlich. Auf diese Weise kann sich die Tumorzelle vom Primärtumor entfernen und migriert durch das angrenzende Gewebe in die Richtung von Blutgefäßen.

Wenn die Zelle in räumlichen Kontakt mit einem Blutgefäß gelangt, kommt es durch die erwähnten Enzyme zur Degradation der Basalmembran sowie der Durchdringung der Endothelzellschicht und somit zur Intravasation der malignen Zelle in den Blutkreislauf⁶. Entscheidend ist in diesem Stadium die vorangegangene Verlagerung der CAM-Expression zu einer höheren Konzentration von ausgewählten Mitgliedern der Ig-, Cadherin- und Integrin-Familie wie VLA-4. Im Blutstrom maskiert sich die Tumorzelle durch eine massive Wechselwirkung mit Thrombozyten und teilweise mit Leukozyten,

um von den Zellen des Immunsystems (z.B. natürliche Killerzellen) nicht erkannt zu werden. Diese zellulären Interaktionen werden insbesondere über die Adhäsionsrezeptoren der Selektinfamilie vermittelt.

Eine erneute Kontaktierung und Bindung an die Endothelschicht der Blutgefäße in sekundären Organen erfolgt in einem komplexen Zusammenspiel mit anderen Zellen. Insbesondere imitieren Tumorzellen hierbei die Leukozyten Adhäsionskaskade, die über Adhäsionsrezeptoren und verschiedene Signalmechanismen abläuft (siehe Abb. 2.2).

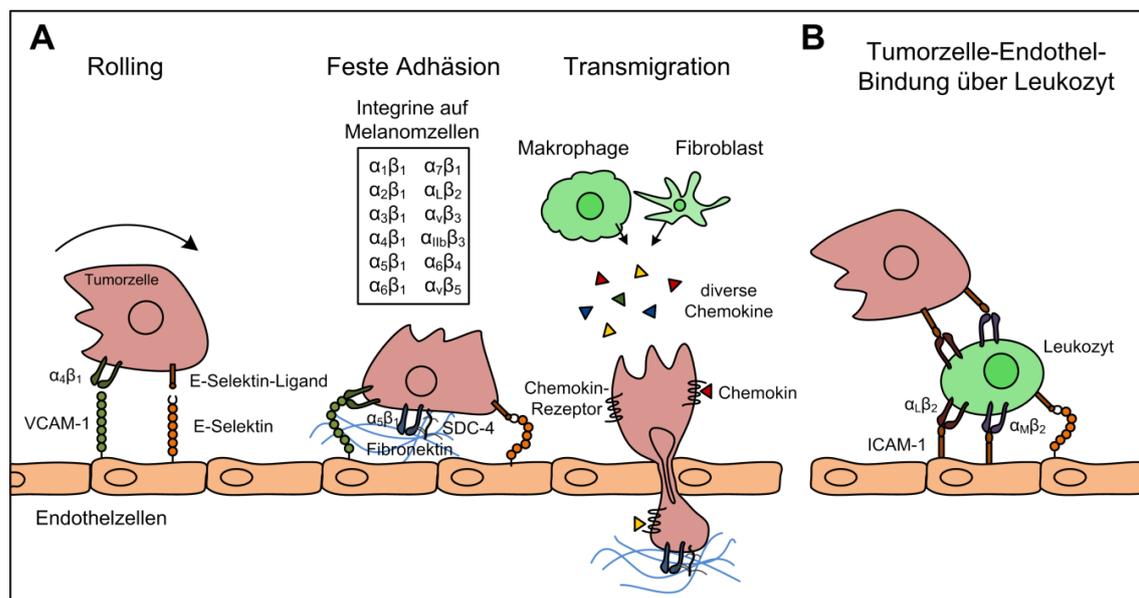


Abb. 2.2 Anhaftung der Tumorzelle am Endothel am Beispiel einer Melanomzelle modifiziert nach Lee et al.⁷ (A) Zunächst wird die Zelle von Selektinen lose gebunden und rollt über die Endothelzellschicht. Für eine feste Anbindung der Zelle an die Endothelschicht sorgen die aufgeführten Integrine, die mit Zelloberflächenproteinen der Endothelzellen interagieren. Der letzte Schritt ist die Transmigration und der Übergang in das Gewebe unter den Endothelzellen. Hier sind Chemokine maßgeblich beteiligt. Ebenso können die Tumorzellen über Leukozyten am Endothel gebunden werden (B).

Zusätzlich zu den Selektinen, die bereits die Interaktion der Tumorzellen mit den Thrombozyten bewirken und die ersten Zellkontakte mit dem Endothel herstellen, kommen hier verschiedene Integrine wie $\alpha\text{V}\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$ oder $\alpha_4\beta_1$ zum Einsatz. Sie bewirken eine feste Anhaftung der Tumorzellen am Endothel, aber auch die Rekrutierung von Monozyten in die metastatische Nische. Auf den Endothelzellen sind als Bindungspartner Adhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie vorhanden, zu denen u.a. ICAM-1, VCAM-1 und PECAM-1 gehören. Durch vielfältige Signalprozesse, die beispielsweise durch von Makrophagen und Fibroblasten freigesetzte Wachstumsfaktoren, Chemokine und Proteinasen angestoßen werden, wird die Extravasation der Tumorzellen in das Gewebe forciert^{8,9}. Dabei schiebt sich die Tumorzelle durch vorherige Auflockerung der interzellulären

ren Bindungen und unter Beteiligung bestimmter Bindungsmoleküle zwischen zwei Endothelzellen in den extrazellulären Raum.

Die Tumorzelle durchläuft die vorgestellten Etappen und bildet die treibende Kraft der Metastasierung. Besonders hervorgehoben sei an dieser Stelle nochmals die wichtige Rolle der umgebenden Zellen und des Gewebes. Aus diesem Grund metastasieren bestimmte Tumorentitäten vornehmlich in bestimmte Gewebe und Organe. Beispielsweise bilden Melanomzellen häufig in der Lunge und im Gehirn Metastasen aus. Diese sogenannte „seed and soil“ (Saat und Nährboden) Theorie wurde bereits 1889 von Stephen Paget aufgestellt und ist immer noch in ihren Grundzügen gültig¹⁰. Zur Vorbereitung des „Nährbodens“ sind im Knochenmark gebildete Zellen (BMDCs) bereits vor der Ankunft der zirkulierenden Tumorzelle im fremden Gewebe vorliegend, deren Implementierung durch Integrine wie $\alpha 4\beta 1$ gewährleistet wird¹¹. Diese bilden die sogenannte prä-metastatische Nische aus und der später eintreffenden Tumorzelle wird ermöglicht, sich im Gewebe zu verankern und zu proliferieren bis eine Metastase entsteht, die die Funktion des betroffenen Gewebes einschränken oder sogar aufheben kann.

2.2 Integrine

2.2.1 Allgemeine Struktur und Aufbau der Integrine

Integrine sind transmembranäre Proteine, die als Heterodimere vorliegen, wobei sie aus einer nicht-kovalent verbundenen α - und β -Untereinheit zusammengesetzt sind. Beide Untereinheiten bestehen aus jeweils drei Domänen, einer im Zytoplasma befindlichen Domäne, einer die Zellmembran durchdringenden transmembranären Domäne und einer extrazellulären Domäne, die jeweils in eine *Head*- und eine *Leg*-Region geteilt werden (Abb. 2.3). Über die kurze, intrazelluläre Domäne sind Integrine in der Lage, Signale in die Zelle weiterzuleiten (outside-in Signaling) oder die Impulse aus dem Inneren der Zelle an die Umgebung abzugeben u. a. durch Regulation ihrer Affinität zu extrazellulären Liganden (inside-out Signaling).

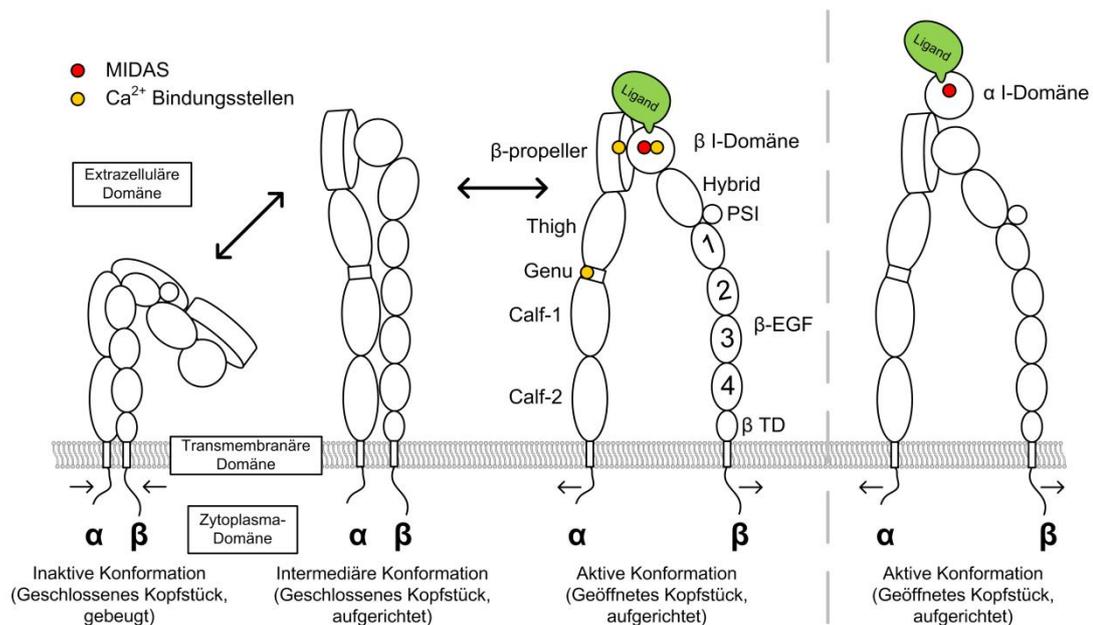


Abb. 2.3 Konformationen der Integrine auf der Zelloberfläche

Die Integrin-Untereinheiten sind in verschiedenen Aktivitätsstadien abgebildet. Links ist die inaktive und gebeugte Konformation zu sehen, die sich durch die Aufrichtung des Kopfstücks in einer intermediären Konformation stabilisieren kann (Mitte links). Bei der aktiven Form separieren sich die transmembranären Domänen der Untereinheiten und ermöglichen eine maximale Bindung des Liganden. Rechts ist die Konformation eines α I Integrins bei höchster Ligandenaffinität gezeigt.

Die Affinität zu ihren Liganden können Integrine durch Konformationsänderungen regulieren. Das im Folgenden vorgestellte Modell der korrelierenden Integrin-Konformationen

und Aktivitäten wird kontrovers diskutiert, ist jedoch als mögliche Variante anerkannt^{12,13}. In der inaktivsten Form liegen die α - und β -Untereinheiten eines Integrins demzufolge in einer kompakten und eingeknickten Form auf der Zelloberfläche vor. Die transmembranären und zytoplasmatischen Bereiche liegen dabei eng beieinander und die Bindungsaffinität zu Liganden ist gering. Nach Aktivierung können sie in einer Zwischenform vorkommen, bei der die α - und β -Einheiten aufgerichtet sind und die transmembranären Domänen der Untereinheiten leicht voneinander entfernt sind. Die aktivste Konformation mit der höchsten Bindungsaffinität zu entsprechenden Liganden entsteht durch weitere Separierung der transmembranären und zytoplasmatischen Bereiche und Freilegung der Ligandbindungsstelle an den extrazellulären Domänen^{12,14}.

Diese Aktivierung und Änderung der Integrinkonformation erfolgt in vivo hauptsächlich durch die Bindung von extrazellulären Liganden an bestimmte Rezeptoren und eine darauf folgende intrazelluläre Weiterleitung, so dass die Integrine von innen nach außen aktiviert werden. Diese Rezeptoren sind oftmals GPCRs, die durch bestimmte Chemokine aktiviert werden^{15,16}. Eine derartige Änderung der Integrin-Konformation ist nur möglich durch die intrazelluläre Verknüpfung der Integrine mit Kinasen und dem Zytoskelett. Eine konformative Änderung des Aktivierungsstatus kann aber ebenso extrazellulär durch zweiwertige Kationen induziert werden, wobei die Bindung von Mn^{2+} -Ionen die höchste Affinitätssteigerung verursacht¹⁷.

Es wurden bisher 18 α - und 8 β -Untereinheiten identifiziert, die sich in 24 Kombinationen verschiedener Integrine manifestieren. Je nach Kombination der Untereinheiten weisen die Integrine spezifische Affinitäten auf. So bindet das Integrin $\alpha 4\beta 1$ gezielt VCAM-1 während andere Integrine wie $\alpha 5\beta 1$ keine hohe Affinität zu diesem Liganden aufweisen¹⁸. Eine vereinfachte Beschreibung der Aufgaben der zwei unterschiedlichen Untereinheiten lässt sich folgendermaßen zusammenfassen: Die α -Untereinheit bestimmt die Spezifität der Ligandenbindung und die β -Untereinheit gewährleistet die Verbindung zum Zytoskelett und zu den nachgeschalteten Signalwegen¹⁹.

Die Diversität unter den Integrinstrukturen ist groß und zeigt sich in der weitreichenden und spezifischen Ligandenbindung. Manche Integrinkonstellationen ähneln sich und können in funktionelle Gruppen zusammengefasst werden. Auf diese Gruppen wird kurz eingegangen. So sind einige Integrine in der Lage Liganden mit der L-Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Asparaginsäure, kurz RGD, zu binden (siehe Abb. 2.4). Diese Integrine sind besonders wichtig für die Zell-EZM-Interaktionen, da die RGD-Sequenz ein häufiges Motiv in Proteinen der EZM darstellt^{20,21}. Zu den RGD-Proteinen gehören Fibronektin als ein Hauptbestandteil der EZM, sowie Vitronektin und Fibrinogen¹⁹.

Die Integrine werden weiterhin strukturell eingeteilt, in solche mit einer zusätzlichen sogenannten α I-Domäne an der extrazellulären Domäne der α -Untereinheit und in Integrine, denen diese Domäne fehlt. In Abb. 2.4 sind die α -Untereinheiten mit α I-Domäne in rot abgebildet. Diese Gruppe besteht aus Collagen bindenden Integrinen und solchen, die auf Leukozyten zu finden sind. Sie weisen durch die zusätzliche Domäne ein abweichendes Bindungsverhalten auf, wie es in Abb. 2.3 abgebildet ist. Die α I Integrine binden über diese ihre Liganden, wohingegen Integrine ohne α I-Domäne hauptsächlich über die β I-Domäne die Bindung vermitteln²². Entscheidend für die Ligandenbindung aller Integrine ist die metal ion-dependent adhesion site (MIDAS) oder der Bereich benachbart zur MIDAS (adjacent to MIDAS, ADMIDAS). Über diese Regionen werden positiv geladene Moleküle wie Mangan- oder Magnesium-Kationen gebunden, die wiederum die Affinität der Integrine zu ihren Liganden erhöhen²². Nicht alle zweiwertigen Kationen erhöhen die Aktivität der Integrine. Calcium-Kationen üben einen inhibierenden Effekt auf die Integrine aus, so dass durch eine Konzentration von 1 mmol/L Ca^{2+} und Mg^{2+} unter physiologischen Bedingungen im Blut die Integrine auf den Zellen in einem Equilibrium-Status vorliegen²³.

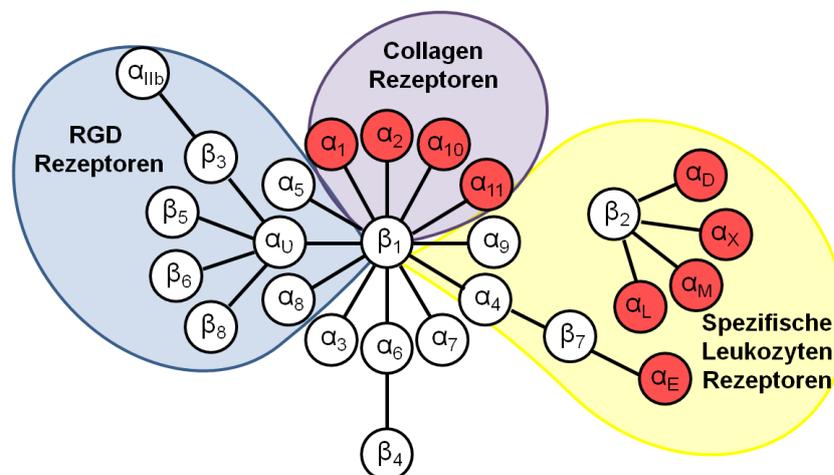


Abb. 2.4 Kombinationen der Integrin-Untereinheiten nach Hynes¹⁴

Die Integrin-Untereinheiten sind in drei Gruppen aufgeteilt: In Integrine, die Proteine mit RGD-Sequenz (blau) oder Collagen (lila) binden, und in Leukozyten spezifische Integrine (gelb). In rot dargestellt sind die α -Untereinheiten mit einer zusätzlichen α I-Domäne.

Neben der monomolekularen Affinitätssteigerung existiert ein weiterer polymolekularer Effekt der Integrine. Durch Aktivierung und Zusammenlagerung mehrerer Integrine entstehen sogenannte Integrin-Cluster, die stabile Bindungen zur EZM ausbilden, vermehrt intrazellulär Adaptor- und Signaling-Proteine aktivieren und das Actin-Zytoskelett in die Bindung einbeziehen. Diese Clusterbildung stellt eine wichtige Funktion der Integrine

während der Bildung von fokalen Adhäsionskomplexen dar und wird im Gegensatz zu der Affinität des einzelnen Integrins als Avidität bezeichnet²⁴.

Die Affinitätssteigerung des Integrins über Konformationsänderungen und die Steigerung der Avidität durch Bildung der Integrin-Cluster aus mehreren Integrinen laufen parallel ab und sind für die Bindung der Zelle zu extrazellulären Liganden essentiell²⁵.

2.2.2 Allgemeine Funktionen der Integrine

Integrine fungieren als Zelloberflächenrezeptoren, die aufgrund ihrer Struktur das Innere einer Zelle mit der extrazellulären Umgebung verknüpfen. Wie in den vorherigen Kapiteln angedeutet, spielen sie eine wichtige Rolle in der Adhäsion und Migration und dadurch in komplexen Prozessen wie Proliferation, Differenzierung, EZM-Remodeling und Invasion von Zellen, wobei ihre großen, extrazellulären Domänen mit verschiedenen Bestandteilen der EZM oder mit Zelladhäsionsproteinen in Wechselwirkung treten²⁶. Sie sind an der Formierung von fokalen Adhäsionskomplexen während der Migration maßgeblich beteiligt und verbinden das Zytoskelett mit der EZM²⁷.

Die gerichtete Zellmigration ist ein hochkomplexer Prozess, der koordinierte Änderungen der Zellmorphologie und ständigen Kontakt mit der EZM voraussetzt. Die folgenden Stadien werden dabei unterschieden (siehe Abb. 2.5): Zunächst polarisiert sich die Zelle in ein führendes („leading edge“) und ein folgendes Ende, wobei das führende Ende Ausstülpungen in Richtung der Migration ausbildet. Diese werden Filopodien und Lamellipodien genannt. An den neu entstandenen Berührungspunkten mit der EZM kommt es zu neuen Adhäsionen, die durch Einbeziehung des Zytoskeletts gegen Zugkräfte gefestigt werden. Nach Kontraktion des Zytoskeletts und Verlagerung des Zellkerns kommt es dann am folgenden Ende zur Lösung der bestehenden Adhäsionen²⁸. Die intrazellulär beteiligten Kinasen und Proteine bei der Bildung von Adhäsionen sind vielfältig und ihre Aktivierungen sind zeitlich genau geregelt. Es werden dabei verschiedene Stadien unterschieden: die erste Kontaktaufnahme, fokale Komplexbildung, fokale Adhäsion und fibrilläre Adhäsion.

Expressiert werden die Integrine von jeder Säugetierzelle, so dass die Integrin-Zusammenstellung für jede Zelle spezifisch ist. Durch die dynamische und schnelle Anpassung der Integrinexpression ist die Zelle überlebensfähig in einer sich laufend ändernden Zellumgebung, da bei ausbleibenden Zellkontakten die Apoptose eingeleitet wird. Diese Art der Apoptose aufgrund fehlendem Kontakt zur Umgebung wird Anoikis genannt²⁹.

Zusammengefasst stellen die Integrine wichtige Komponenten der physiologischen Zellprozesse dar. Die herausragende Rolle als Zellrezeptoren und Verbindungen zum extrazellulären Raum wird während Entzündungsprozessen von den Zellen des Immunsystems und von bösartigen Tumorzellen in pathologischen Vorgängen ausgenutzt⁵.

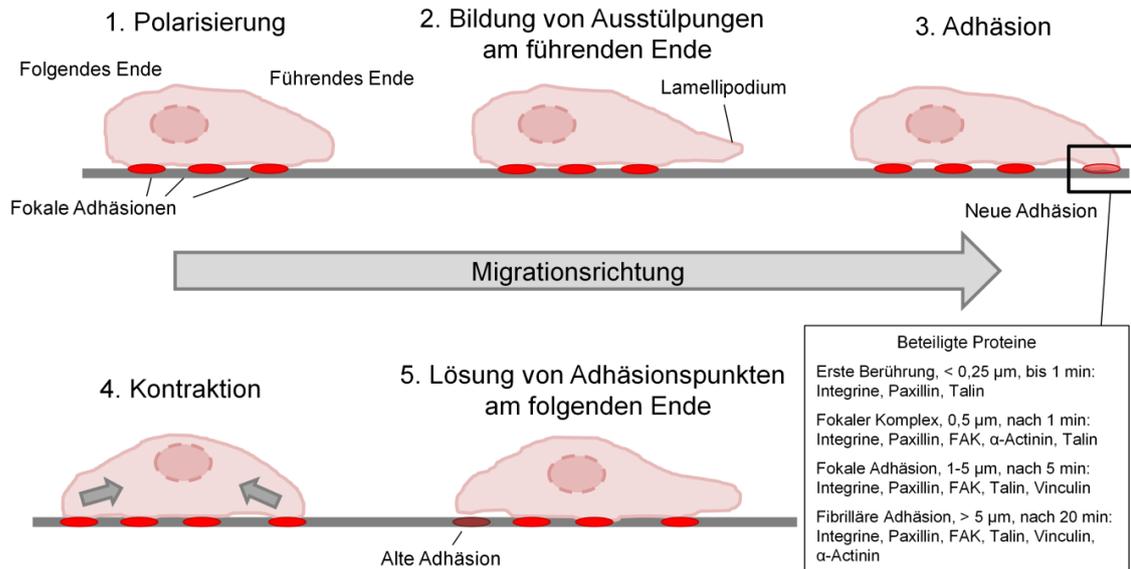


Abb. 2.5 Ablauf der gerichteten Zellmigration^{28,30,31}

2.2.3 Integrine als therapeutische Zielstrukturen

Die bedeutsame Aufgabe im menschlichen Organismus und das zellspezifische Verteilungsmuster der Integrine macht sie attraktiv für die Therapie von inflammatorischen und anderen Erkrankungen. Zur Verdeutlichung seien hier einige Beispiele erwähnt:

Im Prozess der Koagulation vermittelt das Integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$, besser bekannt als GPIIb/IIIa, die Thrombozytenaktivierung und wird als Zielstruktur für die Wirkstoffe Abciximab (ReoPro[®]), Eptifibatid (Integrilin[®]) und Tirofiban (Aggrastat[®]) genutzt, um die Blutgerinnung zu hemmen. Dabei verhindern diese Wirkstoffe die Anlagerung von Thrombin an das Integrin, welche die Adhäsion von Thrombozyten aneinander und an das Endothel zur Folge hätte, und blockieren ebenso die Bindung von Fibrinogen an das aktivierte Integrin³². Die Medikamente werden i.v. appliziert und beinhalten das Risiko von starken Blutungen, da die Blutgerinnung unabhängig vom Aktivierungsreiz der Thrombozytenaggregation gehemmt wird. Sie werden leitliniengerecht nur bedingt zur drastischen Reduktion der Blutkoagulation unter stationären Bedingungen eingesetzt^{33,34}.

Ein neuer Integrin-Antikörper wurde 2014 in der EU für die Behandlung der Colitis ulcerosa bzw. des Morbus Crohn zugelassen. Entyvio® (Vedolizumab) bindet gezielt $\alpha 4\beta 7$, welches bevorzugt von T-Helfer-Lymphozyten exprimiert wird, die in der Darmwand lokalisiert sind. Dadurch verhindert es die Bindung des physiologischen Bindungspartners MAdCAM-1, über den die Einwanderung von T-Lymphozyten in das entzündete Darmgewebe vermittelt wird. Durch das Ausbleiben der Transmigration wird die Entzündung reduziert und die Symptome werden schwächer³⁵. Mit Natalizumab wurde bereits 2006 ein weiterer Integrin-Antikörper zugelassen, der gegen das Integrin $\alpha 4\beta 1$ gerichtet ist und zur Behandlung schwerer Verlaufsformen der Multiplen Sklerose eingesetzt wird. Die Wirkweise wird im anschließenden Kapitel genauer beschrieben.

2.2.4 Das Integrin VLA-4

Das Integrin $\alpha 4\beta 1$ bzw. VLA-4 ist auf verschiedenen hämatopoetischen Zellen exprimiert und vermittelt beispielsweise im Verlauf von Immunabwehrvorgängen die Adhäsion und feste Bindung von Leukozyten an Endothelzellen. Darüber hinaus geht es Bindungen zu EZM-Bestandteilen wie Fibronectin oder Osteopontin ein und bildet somit Zell-Zell- aber auch Zell-EZM-Bindungen aus³⁶.

Aufgrund des Vorkommens von VLA-4 auf Leukozyten und der Beteiligung in Immunabwehrprozesse wurde ein Antikörper entwickelt, um chronische Entzündungsprozesse zu reduzieren. Natalizumab (Tysabri®) ist ein humaner Antikörper gerichtet gegen die $\alpha 4$ -Integrin-Untereinheit und ist seit 2006 für die Behandlung der Multiplen Sklerose in der EU zugelassen³⁷. In den USA wird Natalizumab darüber hinaus zur Behandlung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen eingesetzt^{38,39}. Bei der Behandlung mit Natalizumab wie auch bei anderen Immunmodulatoren trat bei einzelnen Patienten das Krankheitsbild einer progressiven multifokalen Leukenzephalopathie (PML) auf. Durch Reduktion der körpereigenen Immunabwehr können dabei JC-Adenoviren sehr stark proliferieren und lösen in der Folge eine systemische Entzündungserkrankung des ZNS aus, die unbehandelt zum Tode der Patienten führen kann⁴⁰. Die Krankheit äußert sich je nach betroffenem Areal in Sprachstörungen, Gesichtsfeldausfällen und Lähmungen, die sich bis zur Verwirrtheit und Demenz steigern können. Trotz des Auftretens dieser schwerwiegenden unerwünschten Arzneimittelwirkung wurde Natalizumab unter der Auflage eines engen JC-Virus-Monitorings für die Therapie beibehalten, was ein Zeichen für die Unersetzlichkeit der Therapieoption darstellt⁴¹.

Neben der Indikation Multiple Sklerose laufen Studien mit Natalizumab zur Behandlung des Morbus Crohn. Wie das vorgestellte Vedolizumab (Kapitel 2.2.3) bindet Natalizumab ebenfalls $\alpha 4\beta 7$ und verhindert die Bindung von MAdCAM-1 durch Blockade der $\alpha 4$ -Untereinheit. Einige Studien bestätigen Natalizumab als effiziente und sichere Therapieoption³⁸, wobei mit dem selektiveren Vedolizumab eine offensichtlich wirksamere Alternative vorhanden ist.

Der $\alpha 4$ -Antikörper Natalizumab wurde zudem in einer kleinen Studie zur Behandlung des multiplen Myeloms eingesetzt, jedoch aufgrund der geringen Studienteilnehmerzahl ($n = 6$) wieder eingestellt (zu finden unter ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00675428).

Wie bei der Beschreibung der Metastasierungskaskade erwähnt, nutzen Tumorzellen bestimmte Prozesse der Immunabwehr, um sich zu verbreiten. So wurde in malignen Tumorerkrankungen die Beteiligung von VLA-4 in der Metastasierung von Krebszellen festgestellt³⁶. Dabei werden die physiologischen Prozesse ausgenutzt, um die Bindung von malignen Zellen zum Endothel zu verstärken und die Transmigration ins Gewebe zu fördern. In vivo konnte die Bedeutung des VLA-4 bestätigt werden, indem eine Reduktion der VLA-4-Expression in stark metastasierenden Melanomzellen und anschließender Injektion dieser Zellen in Mäuse zu einer drastischen Verminderung der Metastasierungsrate in der Lunge führte⁴². Die Wechselwirkung zwischen VLA-4 und seinem physiologischen Bindungspartner VCAM-1 ist in diesem Zusammenhang eine wichtige Interaktion, die in vivo als prometastatisch identifiziert wurde⁴³. Alles in allem zeigen die voran geschilderten Befunde und Erkenntnisse, dass VLA-4 eine vielversprechende Zielstruktur für antimetastatische Therapieansätze darstellt.

2.2.5 VCAM-1 – Bindungspartner des VLA-4

Vascular Cell Adhesion Molecule 1, kurz VCAM-1 oder CD106, ist der physiologische Bindungspartner des VLA-4 und gehört zu den Proteinen aus der Ig-Superfamilie. Strukturell besteht es aus einem extrazellulären Teil, der aus sieben bzw. sechs Ig-ähnlichen Domänen zusammengesetzt ist, einer einfach transmembranären und einer zytoplasmatischen Domäne⁴⁴. Weitere Bindungspartner sind die weitaus seltener exprimierten Integrine $\alpha 4\beta 7$, $\alpha M\beta 2$ und $\alpha 9\beta 1$ oder Galectin-3^{45,46}.

Nach Zytokin-Stimulation wird VCAM-1 von Endothelzellen vermehrt exprimiert und vermittelt über VLA-4 die Adhäsion von zirkulierenden Zellen des Immunsystems wie Leukozyten an das Endothel⁴⁷. Dabei werden die Zellen im Blutgefäß über die Bindung von

VLA-4 zu VCAM-1 gestoppt und fest an das Endothel gebunden, um eine Transmigration in das darunterliegende Gewebe zu bewirken. Außer der Zytokin-Stimulation durch TNF α , IL-1 β , Homocystein oder andere reagieren die Zellen auf diverse weitere Stressfaktoren mit erhöhter VCAM-1-Expression⁴⁸. Zu diesen gehören ein hohes Niveau an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), ein erhöhter Scherstress durch turbulente Blutströmung ebenso wie eine Erhöhung von endothelialen Toll-like Rezeptoren⁴⁹.

Die physiologische Bindung von VLA-4 exprimierenden Zellen des Immunsystems zum VCAM-1 des Endothels wird von Tumorzellen ausgenutzt, die ebenso VLA-4 auf ihrer Zelloberfläche bilden⁵⁰. Desweiteren kommt der Bindung VLA-4/VCAM-1 eine wichtige Rolle in der Einbeziehung von myeloiden Zellen in die prämetastatische Nische zu⁵¹.

An dieser Stelle wird für eine detaillierte Beschreibung auf zwei Reviews über VCAM-1 verwiesen, die die Bedeutung von VCAM-1 im Verlauf von Entzündungsprozessen und Erkrankungen sowie während der Metastasierungskaskade hervorragend beschreiben^{44,49}.

2.2.6 Intrazelluläre Verknüpfung der Integrine

Integrine sind in der Lage zwischen intrazellulären und extrazellulären Vorgängen zu vermitteln. Hierzu können sie in der Zelle beispielsweise mit Zytoskelett-Proteinen wie Talin, Vinculin und Paxillin, mit Adaptor-Proteinen wie Crk und p130Cas, bestimmten Tyrosinkinase wie den Kinasen der Src-Familie, der fokalen Adhäsionskinase (FAK) und kleinen GTPasen wie Rho, Rac1 und Cdc42 in Kontakt treten¹⁴. Während die zytoplasmatischen Domänen der unterschiedlichen α -Untereinheiten der Integrine eine hohe Diversität in Struktur und Bindungsaffinitäten aufweisen, sind die β -Untereinheiten einheitlicher aufgebaut und zeigen gleiche Bindungsmotive⁵². Diverse Proteine treten intrazellulär mit der Zytoplasmadomäne der β -Untereinheit in Kontakt. So interagiert Talin mit den meisten β -Untereinheiten direkt und stabilisiert die Separation der zytoplasmatischen Domänen, so dass die extrazelluläre Konformation mit der höchsten Bindungsbereitschaft erreicht wird⁵³. Durch diese Konformationsänderung des Integrins kann Vinculin an Talin binden und ist indirekt mit dem Integrin verknüpft. Zusammen bewirken diese Bindungen die weitere Stabilisierung der aktiven Konformation des einzelnen Integrins und die Formation von fokalen Adhäsionskomplexen. Vinculin nimmt ebenso eine zentrale Rolle in der Verknüpfung von Integrinen zum Zytoskelett ein, indem es weitere Actin-bindende Proteine wie Filamin, Tensin und α -Actinin in ihrer Bindung zur β -Untereinheit bestärkt⁵⁴.

Eine weitere Integrin-assoziierte Kinase ist die Integrin linked Kinase (ILK), die in direkter Wechselwirkung mit der β 1- und β 3-Untereinheit steht und die Effekte von Kindlin als Regulator der Integrinaktivität vermittelt^{55,56}. Kindlin bindet dabei ebenso an die β -Untereinheit, wirkt als Ko-Aktivator und verstärkt die Bindung von Talin. Außerdem kann Kindlin intrazellulär an das Integrin gebundene Inhibitoren aus ihrer Bindung verdrängen und eine Aktivierung und Clusterbildung der Integrine ermöglichen⁵³.

Der ubiquitär vorkommende Signalweg über AKT nimmt eine zentrale Stelle für das Zellüberleben und die Proliferation ein. Er kann Integrin-abhängig beispielsweise über FAK und PIP3 aktiviert werden⁵⁷. Die FAK ist essentieller und zentraler Bestandteil einer Integrin-vermittelten Adhäsion, wobei sie entweder direkt oder indirekt über Talin mit der β -Untereinheit in Kontakt steht⁵⁸. Im Zusammenspiel mit FAK bildet die Kinase c-Src einen dualen Kinasekomplex, der durch Integrinaktivierung hervorgerufen wird und weitere Adaptorproteine phosphoryliert⁵⁹. Dabei vermittelt die aktivierte FAK je nach Integrin unterschiedliche Zellbewegungsmechanismen. FAK steuert bei α 5 β 1-vermittelter Migration die Zellstreckung und Ausdehnung und unter VLA-4-Beteiligung die Polarisierung der Zelle⁶⁰. Dies zeigt wiederum, dass die Familie der Integrine trotz hoher struktureller Homogenität durchaus divergente Funktionen vermittelt und eine gezielte Einflussnahme auf das Bindungsverhalten eines einzelnen Integrins eine große Wirkung auf Adhäsions- und Migrationsprozesse und damit auf die Metastasierung hat. Die beschriebenen Integrin-assoziierten Signalwege sind in der Abb. 2.6 dargestellt.

Die über VLA-4 initiierte Migration und die sich anschließenden intrazellulären Prozesse laufen zum Teil unterschiedlich zu denen der anderen Integrine ab. In diesem Zusammenhang wurde Paxillin als wichtiges Molekül identifiziert, das direkt an die α 4-Untereinheit des VLA-4 assoziiert vorliegt⁶¹. Über diese Verbindung wird die GTPase Rac1 reguliert, die für die Aktivierung anderer Kinasen und die Kontrolle des Zellwachstums und der Reorganisation des Zytoskeletts verantwortlich ist⁶². Bei der Bindung von VLA-4 an VCAM-1 vermittelt Paxillin die Verstärkung der Adhäsion unter Scherstress im Blutstrom^{63,64}. Eine weitere Besonderheit des VLA-4 besteht in der Aktivierung der Src-Kinasen vor allem von c-Src nach dem Clustern der α 4-Zytoplasma-Domänen. Diese Aktivierung erfolgt sowohl Paxillin als auch FAK unabhängig⁶⁵. Da der Prozess der Zellmigration sehr komplex ist und aus einem Gleichgewicht zwischen Adhäsion und Auflösung von Bindungen besteht, verhindert eine Phosphorylierung der α 4-Untereinheit durch die c-AMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) die Bindung von Paxillin und hebt deren adhäsionsverstärkenden Effekt auf⁶⁶. Dies ist entscheidend während der Polarisierung der Zelle zur gerichteten Migration, in der die Zelle sich in ein führendes und ein folgendes Ende polarisiert, Lamellipodien und Filopodien am führenden Ende („leading

edge“) formiert und fokale Adhäsionskomplexe gebildet werden, um sich anschließend wieder aufzulösen und an einer anderen Stelle über die Integrine neu gebildet zu werden. In diesem Zusammenhang ist die Aktivierung des cAMP/PKA Signalweges auch in anderen Bereichen des „leading edge“ entscheidend, da durch die Aktivierung Rac1 und Cdc42 aktiviert und die Rho-Aktivität inhibiert werden⁶⁷⁻⁶⁹. Die Aktivierung von Rac1 hat die Formierung von Lamellipodien zur Folge, wohingegen das Signaling über Cdc42 in der Bildung von Filopodien resultiert⁷⁰. Die beiden Arten der Zellfortsätze unterscheiden sich nicht nur durch ihre unterschiedliche Aktivierung, sondern auch in ihrer Involvierung von Actin und Mikrotubuli. Filopodien nehmen mit der Umgebung den ersten Kontakt auf und sind fingerförmige Ausstülpungen. Lamellipodien hingegen bilden stabile fokale Adhäsionen aus und sind breiter geformt.

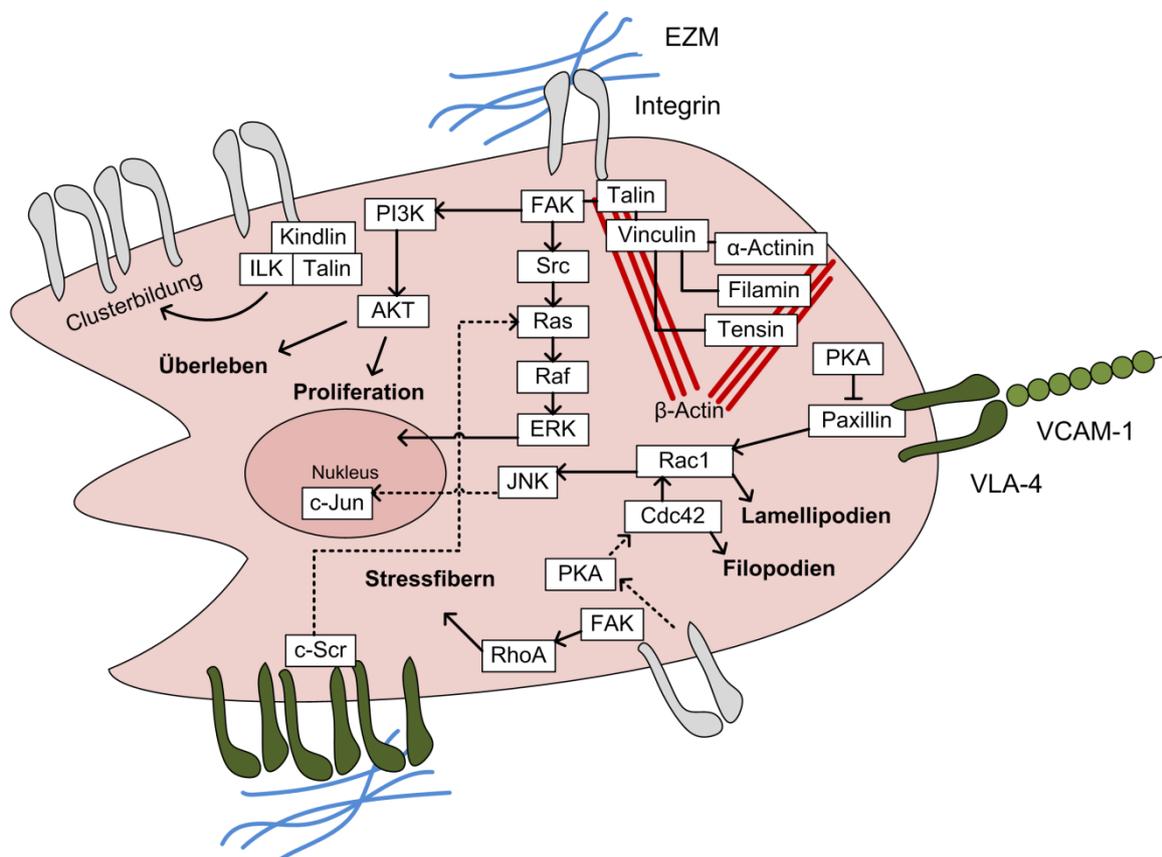


Abb. 2.6 Integrin vermittelte Signaltransduktion in Tumorzellen^{71,72}

Die weitreichende Vernetzung und Teilnahme der Integrine an intrazellulären Signalwegen ist sehr nützlich für die Zelle, da sie über die physikalische und chemische Beschaffenheit der angrenzenden Umgebung Informationen erhält und ihr so eine umgehende Adaption möglich ist. Andere Signalwege überschneiden sich mit denen der Integrin-assoziierten. Dazu zählen Signalwege, die auf der Aktivierung von Wachstumsfaktor-

Rezeptoren beruhen und die Proliferation fördern, Signalwege, die durch GPCR initiiert werden, und Signalwege, die die Etablierung von fokalen Adhäsionskomplexen unterstützen⁷³. In die letzteren Signalwege sind die Syndekane involviert, die zur Familie der Proteoglykane gehören. Diese sind ebenfalls transmembranäre Moleküle auf der Zelloberfläche und vermitteln u.a. im direkten oder indirekten Zusammenspiel mit den Integrinen multiple proadhäsive Funktionen. Die Überschneidung der Signalwege wird im Kapitel 2.4 nach der Vorstellung der Proteoglykane ausführlicher thematisiert.

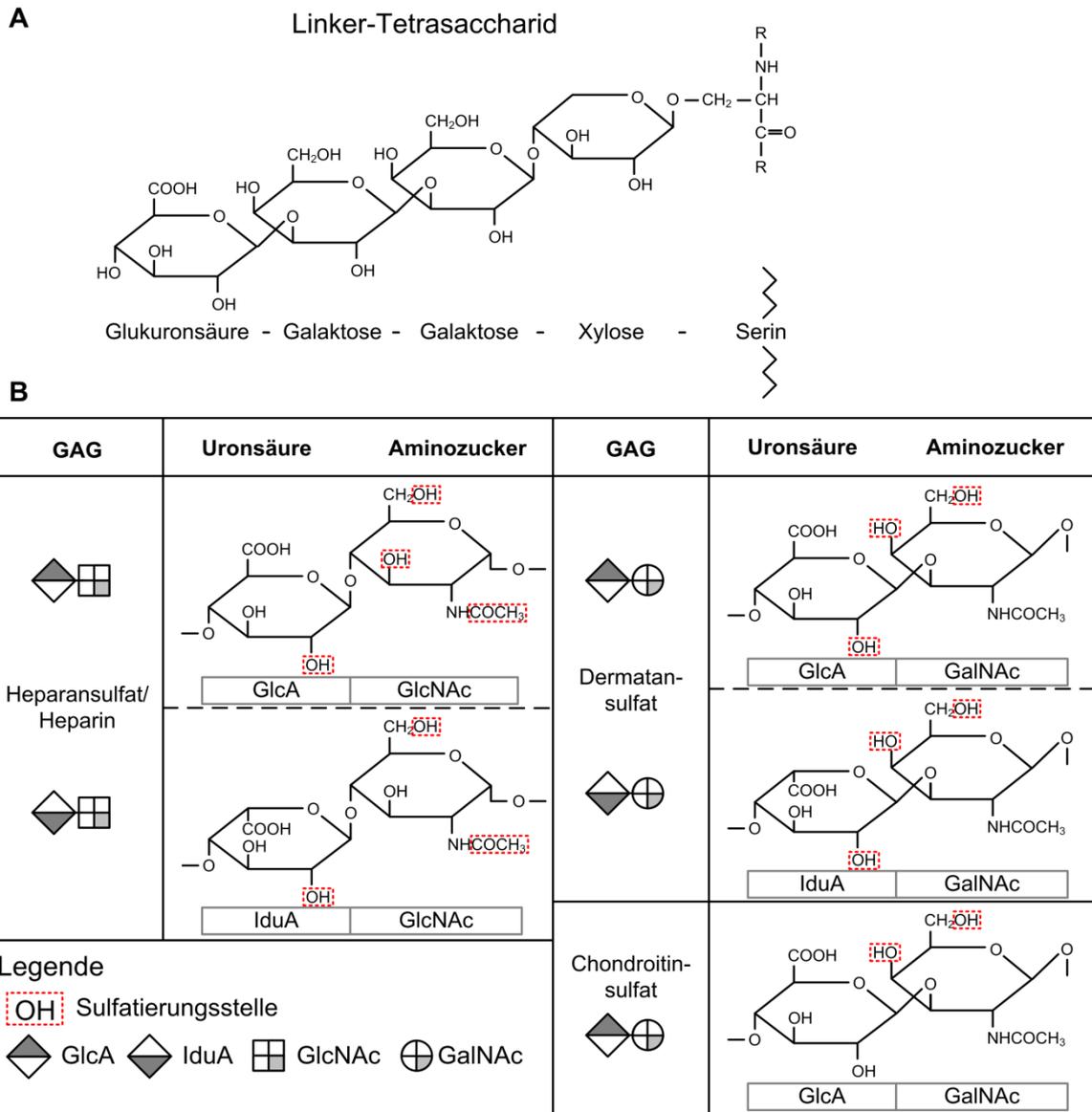
2.3 Proteoglykane

Die Proteoglykane (PG) bilden eine Familie von stark negativ geladenen EZM Bestandteilen, die aufgrund dieser chemischen Eigenschaft zu einer Gruppe zusammengefasst wurden. Eine hohe Diversität der PG ist die Folge, die sich zum einen in den mannigfaltigen Strukturen und zum anderen in ihrer Lokalisierung im Organismus widerspiegelt. Sie werden von allen Zellen exprimiert und liegen zum Teil wie die Integrine auf der Oberfläche von Zellen vor, wo sie als Bindungspartner vieler Proteine fungieren.

2.3.1 Allgemeine Struktur und Aufbau der Proteoglykane

Alle PG bestehen aus einem Proteinkern, der mit einer oder mehreren Glykosaminoglykan-Ketten (GAG) kovalent verbunden ist. Diese GAG setzen sich aus linearen Kohlenhydratgruppen zusammen, die je nach PG-Klasse zu verschiedenen Anteilen aus Chondroitin-, Dermatan-, Heparan- oder Keratansulfaten bestehen. Ihre Synthese erfolgt im Golgi-Apparat der Zellen, in dem zunächst zur Initiierung ein Linker-Tetrasaccharid bestehend aus den Zuckern Xylose-Galaktose-Galaktose-Glukuronsäure erstellt wird. Diese kurze Zuckerkette wird je nach resultierendem PG mit sich wiederholenden Disacchariden verlängert. Das Disaccharid ist stets zusammengesetzt aus einem Aminozucker und einer Glukuronsäure, wobei im Falle von Heparansulfaten (HS) der Aminozucker Glukosamin (GlcNAc) und bei Chondroitin- (CS) und Dermatansulfat (DS) der Aminozucker Galaktosamin (GalNAc) eingebaut wird. Der Glukuronsäure-Anteil unterliegt zu einem geringen Teil der Epimerisierung zur Iduuronsäure (IduA). Anschließend werden die Saccharide in verschiedenem Ausmaß und an verschiedenen Kohlenstoffen abhängig von dem entstehenden PG durch Sulfatierungen modifiziert⁷⁴. Ein Überblick über die involvierten Zucker bietet Abb. 2.7. Über die Aminosäure Serin in der Aminosäuresequenz des Proteinkerns wird die GAG-Kette gebunden, wobei die Anzahl der gebundenen GAG-Ketten bei den unterschiedlichen PG variiert.

Das Disaccharid HS ähnelt in seiner Struktur einem anderen Kohlenhydrat des Säugetierorganismus, dem Heparin. Sie unterscheiden sich in dem Grad ihrer Sulfatierung, wobei Heparin einen höheren, homogenen Sulfatierungsgrad aufweist und HS eher einer heterogenen Sulfatierung unterliegt, die sich durch Bereiche geringer und hoher Sulfatierung auszeichnet⁷⁵.

Abb. 2.7 Übersicht der GAG-Komponenten⁷⁴

(A) Aufbau des Linker-Tetrasaccharids und Verknüpfung zum Proteinkern. (B) Alternierende Disaccharid-Einheiten HS, DS und CS und ihre potentiellen Sulfatierungen.

GlcA: Glukuronsäure, IduA: Iduronsäure, GlcNAc: N-acetyliertes Glukosamin, GalNAc: N-acetyliertes Galaktosamin

Die Einteilung der PG erfolgt zum einen nach Charakteristika der GAG-Kette in HSPG, CSPG oder DSPG, obgleich Mischformen der Kohlenhydratketten vorkommen und sich die Bezeichnung in diesem Fall auf das dominanteste GAG bezieht. Zum anderen wird eine Einteilung nach Lokalisation vorgenommen, welche in intrazellulär, zelloberflächenständig, perizellulär und extrazellulär unterteilt wird. Die Tabelle 2.1 stellt die verschiedenen PG mit Lokalisation, Klassifizierung und vorwiegender GAG-Kette dar.

2 Theoretischer Teil

Lokalisation	Klassifizierung	Bezeichnung	Vorwiegende GAG
Intrazellulär	Sekretorische Granula	Seryglycin	Hep
Zelloberfläche	Transmembranär	Syndekan, 1-4	HS
		NG2	CS
		Betaglycan	CS/HS
		Phosphacan	CS
	GPI-verankert	Glypikan, 1-6	HS
Perizellulär	Basalmembran	Perlekan	HS
		Agrin	HS
		Collagen XVIII	HS
		Collagen XV	CS/HS
Extrazellulär	Hyalectan/ Lectican	Aggrecan	CS/KS
		Versican	CS
		Neurocan	CS
		Brevican	CS
	Canonical	Biglycan	CS
		Decorin	DS
		Asporin	
		ECM2	
		ECMX	
		Fibromodulin	KS
		Lumican	KS
		PRELP	
		Keratocan	KS
		Osteoadherin	KS
		Epiphycan	DS/CS
		Opticin	
	Osteoglycin		
	Non-Canonical	Chondroadherin	
		Nyctalopin	
		Tsukushi	
Podocan			
Podocan-Like 1			
Spock	Testican, 1-3	HS	

Tabelle 2.1 Übersicht der PG nach Lokalisation, Klassifizierung und vorwiegendem GAG⁷⁶
 CS: Chondroitinsulfat, DS: Dermatansulfat, GAG: Glykosaminoglykan, Hep: Heparin, HS: Heparansulfat, KS: Keratansulfat.

2.3.2 Allgemeine Funktionen der Proteoglykane

PG sind Bestandteile der extrazellulären Matrix und sorgen so für die Stabilisierung von Gewebeverbänden, da sie Bindungen zu anderen PG, Collagen und Fibronectin eingehen können. Aufgrund ihrer anionischen Struktur binden sie zudem Kationen und dienen als Bindungspartner für Chemokine, Zytokine und Heparin affine Wachstumsfaktoren wie FGF, VEGF oder TGF- β ⁷⁷. Durch diese Interaktionen bilden sie ein Reservoir in der EZM für zumeist proliferative Proteine, die im physiologischen aber auch pathologischen Geschehen durch Enzyme wie Heparanase freigesetzt werden. Die dadurch angeregte Adhäsion, Migration und Zellproliferation sind elementare Bestandteile der Zellhomöostase, von Entzündungsprozessen, Wundheilung und der Metastasierung von Tumorzellen.

In Anbetracht der Vielzahl von PG werden die Ausführungen an dieser Stelle auf die Gruppe der HSPG und konkret auf die zelloberflächenständigen Syndekane (SDC) beschränkt.

2.3.3 Heparansulfat-Proteoglykane

Die GAG-Ketten der HSPG bestehen per Definition vornehmlich aus Polymeren der HS-Disaccharide. Von den bisher identifizierten 17 HSPG sind die meisten membranständig, wobei sie entweder transmembranär (SDC 1 - 4, Betaglycan) oder über Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI) an der Zellmembran assoziiert vorliegen (Glypikan 1 - 6). Weitere werden in die EZM sekretiert (Collagen XVIII, Agrin, Perlekan), in der sie für Stabilität sorgen (siehe Tabelle 2.1 und Abb. 2.8). Mäuse, deren HS-Biosynthese durch genetische Modifizierung der benötigten Enzyme verhindert wurde, zeigten bereits in der embryonalen Entwicklung schwerwiegende Folgen, die zum Tod führten^{78,79}. Diese Ergebnisse heben die Bedeutung der HSPG deutlich hervor.

Alle HSPG sind durch ihre hohe Bindungsbereitschaft ideale Sensoren, die frühzeitig Änderungen in der EZM detektieren können. Allerdings sind nur die membran-durchspannenden Syndekane in der Lage, Signale direkt in die Zelle weiterzuleiten. Sie sind zudem wegen ihrem Zusammenspiel mit Integrinen von größerem Interesse.

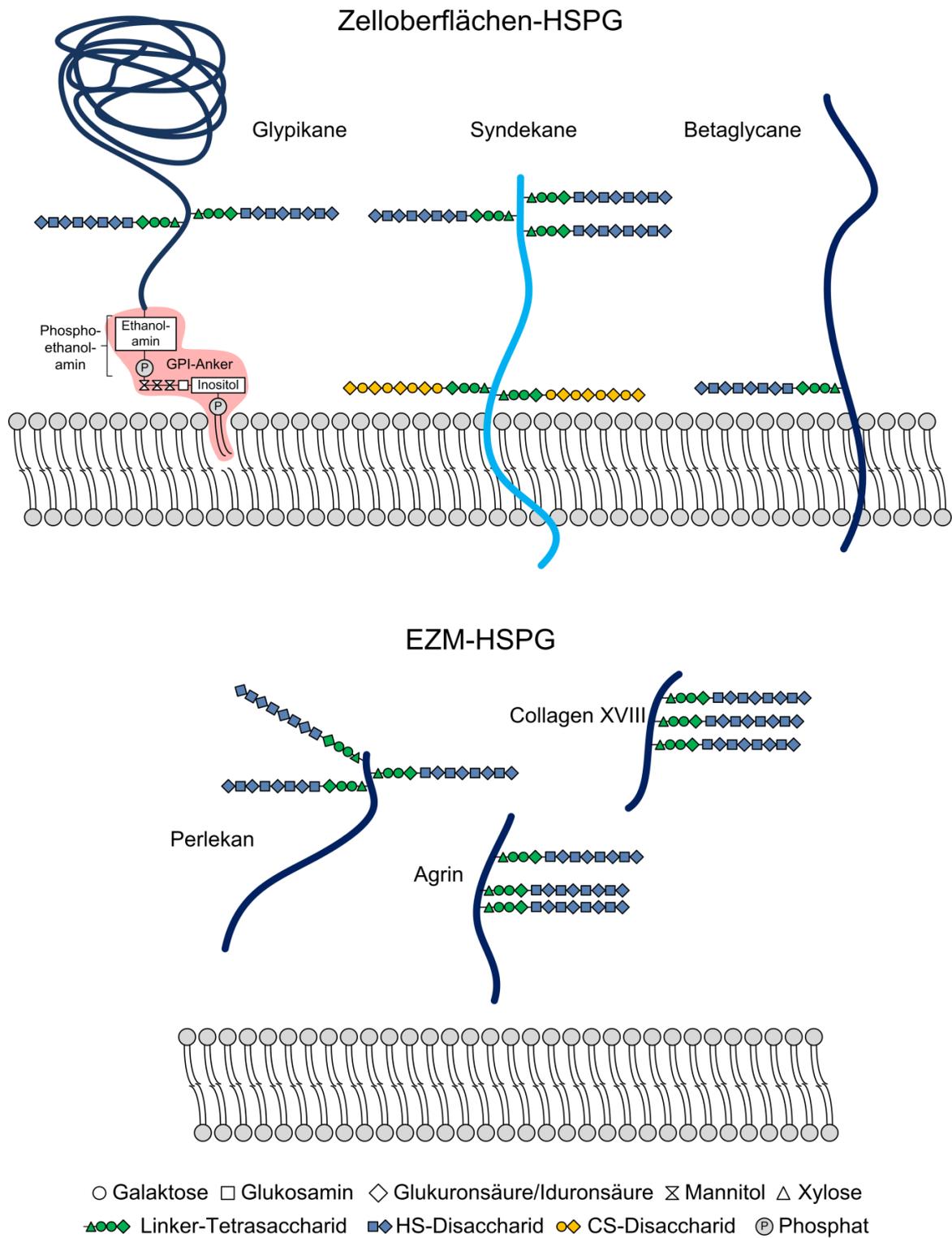


Abb. 2.8 Mitglieder der HSPG-Familie und ihre Lokalisation nach Esko et al.⁸⁰

2.3.3.1 Syndekane

Die transmembranären Syndekane (SDC) fungieren als Zelladhäsionsrezeptoren und Reservoirs für Chemokine und Wachstumsfaktoren, die an den GAG-Ketten gebunden vorliegen. Darüber hinaus vermitteln sie Signale in die Zelle und wirken als Korezeptoren von anderen Zelloberflächenproteinen wie den Integrinen. In Säugetieren wurden vier verschiedene SDC identifiziert. SDC-1 wird von Epithel- und Plasmazellen exprimiert und SDC-2 von Fibroblasten, Endothelzellen, Neuronen und glatten Muskelzellen. SDC-3 ist das vorherrschende SDC des Nervensystems und spielt in der Proliferation von Chondrozyten eine Rolle. SDC-4 ist ubiquitär auf allen Zellarten verbreitet⁸¹.

Die Proteinkerne der Syndekane haben Größen von 20-45 kDa und weisen eine große, extrazelluläre, eine transmembranäre und eine kurze, zytoplasmatische Domäne auf, wobei letztere keine intrinsische Kinase-Aktivität besitzt. Die an den Proteinkernen gebundenen GAG-Ketten bestehen aus den oben genannten Multimeren der HS-Disaccharide. Die extrazellulären Domänen von SDC-1, SDC-2 und SDC-4 unterliegen beispielsweise in Entzündungsprozessen einer Spaltung nahe der Zelloberfläche verursacht von Enzymen wie MMP („SDC shedding“)^{82,83}. Dabei verbleiben die großen extrazellulären Domänen nach der Abtrennung ohne Verbindung zur Zelloberfläche in der EZM und interagieren in einer auto- oder parakrinen Weise mit Tumor- oder Stromazellen. Sie binden Wachstumsfaktoren, Chemokine oder Zytokine und verhindern die Kontaktaufnahme derselben mit den membranständigen SDC^{82,84}.

Während der extrazelluläre Part sich unter den vier SDC in Bezug auf die Anzahl und Zusammensetzung ihrer GAG-Ketten stark unterscheidet, sind die transmembranären und zytoplasmatischen Teile größtenteils konserviert und einheitlich. Über die transmembranäre Domäne bilden SDC durch die Zusammenlagerung der Proteinkerne in unterschiedlichem Ausmaß nicht-kovalente Homo-Dimere oder Oligomere aus, deren Zustandekommen entscheidend für die Weiterleitung von extrazellulären Signalen ins Zellinnere ist⁸⁵. Die zytoplasmatische Domäne besteht aus einem an die Zellmembran angrenzenden C1-Bereich, einer V-Zwischendomäne und einem von der Membran distal gelegenen C2-Teil (siehe Abb. 2.9). C1 und C2 bilden zwei konservierte Bereiche, die sich in den verschiedenen SDC kaum unterscheiden und verantwortlich für die Bindung zu Proteinen des Zytoskeletts sind. Die V-Domäne ist ein variabler Bereich, der in jedem SDC unterschiedliche Funktionen übernimmt. In SDC-1 vermittelt sie die Zellausbreitung über die Ausbildung von Lamellipodien⁸⁶, in SDC-2 ist sie an der Bildung der Fibronektin-

und Laminin-Matrix beteiligt⁸⁷. Die SDC-4 V-Domäne bindet Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂), das die Homodimerisierung begünstigt und dadurch die Proteinkinase C α (PKC α) phosphoryliert und damit aktiviert⁸⁸. Durch die oben beschriebenen Mechanismen ist es den SDC möglich viele intrazelluläre Signalwege zu aktivieren bzw. zu regulieren. Relevant für den Säugetierorganismus sind diese Zelloberflächenrezeptoren sowohl in der embryonalen Entwicklung, als auch während der gesamten Lebensspanne, wobei ihre Expression den verschiedenen Umständen und Lebenszyklen angepasst wird⁸⁹.

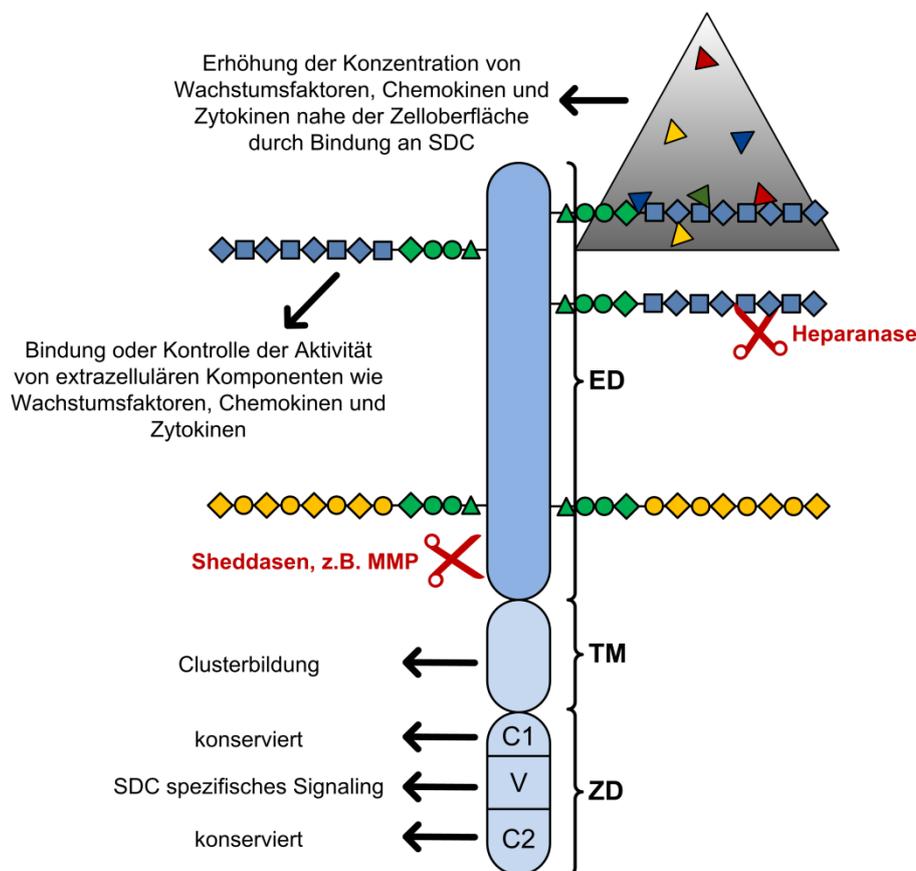


Abb. 2.9 Struktur und Funktionen der SDC^{81,90}

Der Proteinkern der SDC ist in blau abgebildet und unterteilt sich in eine große extrazelluläre Domäne (ED), eine transmembranäre Domäne (TM) und eine Zytoplasma-Domäne (ZD). Heparansulfat und Chondroitinsulfat-Ketten sind an den Proteinkern der SDC gebunden und dienen als Reservoir für Wachstumsfaktoren, Zytokine und Chemokine. Durch die Bindung an die SDC nahe der Zelloberfläche wird ihre Konzentration erhöht, so dass die Chance auf die Bindung zu einem benachbarten Rezeptor erhöht wird.

Trotz ihrer großen Einflussnahme auf diverse Zellprozesse zeigten SDC-1 und SDC-4 defiziente Mäuse keine schwerwiegenden Entwicklungsdefekte im Gegensatz zu der letalen Folge einer Stilllegung der HS-Expression⁹¹. Dies ist ein Hinweis auf die Über-

nahme der SDC-Funktionen durch andere PG, die jedoch nur stattfindet, wenn die SDC-Biosynthese gestört ist.

SDC sind in der Lage mit Integrinen in fokalen Adhäsionskomplexen zu kooperieren. Dies erfolgt je nach SDC und beteiligtem Integrin über verschiedene Mechanismen. Am besten charakterisiert sind die intra- und extrazellulären Interaktionen von SDC-4 mit verschiedenen Integrinen. Diese werden in Kapitel 2.4 ausführlicher beschrieben.

2.3.3.2 Syndekan-4

SDC-4 besteht wie andere HSPG aus einem Proteinkern, der kovalent mit HS-Ketten verbunden ist. Wie beschrieben ist es ein membrandurchspannendes PG, dessen extrazelluläre Domäne sich von denen der anderen SDC durch Anzahl, Lage und Länge der GAG-Ketten, die aus einem Gemisch aus HS- oder CS-Ketten bestehen, unterscheidet^{92,93}.

Wie andere HSPG fungiert es in der EZM als Rezeptor für Heparin affine Wachstumsfaktoren wie FGF, VEGF und PDGF. Die dadurch angeregten intrazellulären Signalwege laufen u. a. über die Kinasen AKT oder die Rho GTPasen ab⁹⁴. Unter den HSPG nimmt es darüber hinaus eine besondere Stellung ein, da es in sowohl wachsenden als auch differenzierten Geweben vorkommt und es als Korezeptor diverser Rezeptoren fungiert. Zum einen bewirkt es mit dem FGF-Rezeptor nach Ligandbindung eine verlängerte Aktivität und Verstärkung der nachgeschalteten Signalwege wie das Signaling über die Familie der MAPK/ERK⁹⁵. Zum anderen kooperiert es mit den Integrinen bei der Bildung von fokalen Adhäsionskomplexen unter Einbeziehung des Zytoskeletts und reguliert ihre Entfernung von der Zelloberfläche sowie ihren intrazellulären Abbau⁹⁶. Eine wichtige Eigenschaft des SDC-4 ist in diesem Zusammenhang die Bindungsfähigkeit von Fibronektin bzw. der Heparin-bindenden Domäne II des Fibronektins, das als EZM-Bestandteil den meisten Zellen als Migrationsuntergrund dient und eine Migration erst ermöglicht⁹⁷. SDC-4 fungiert dabei als Zelloberflächenrezeptor in direkter Kombination mit dem Integrin $\alpha 5\beta 1$ und leitet Signale in die Zelle und an das Zytoskelett weiter⁹⁸. VLA-4 ist zwar ebenfalls ein Fibronektin-bindendes Integrin und bildet fokale Adhäsionskomplexe aus, benötigt allerdings nicht die Beteiligung von SDC-4 in dieser Bindung⁹⁹. Intrazellulär verlaufen die zwei Aktivierungen des Zytoskeletts hervorgerufen durch Ligandbindung zu VLA-4 oder $\alpha 5\beta 1$ ebenso über verschiedene Signalwege.

Bei Homo-Dimerisierung oder Oligomerisierung von SDC-4 Molekülen auf der Zelloberfläche kommt es über die zyttoplasmatische Domäne und unter Beteiligung von PIP2 zu einer Aktivierung von PKC α ¹⁰⁰. Kontrovers diskutiert wird dabei die notwendige Beteiligung von PIP2. So wurde in Studien gezeigt, dass ein Fehlen von PIP2 die Aktivierung von PKC α durch SDC-4 nicht beeinflusst¹⁰¹. Es wird daher vermutet, dass PIP2 den Komplex aus SDC-4 und PKC α stabilisiert, aber kein notwendiger Bestandteil des Komplexes ist¹⁰².

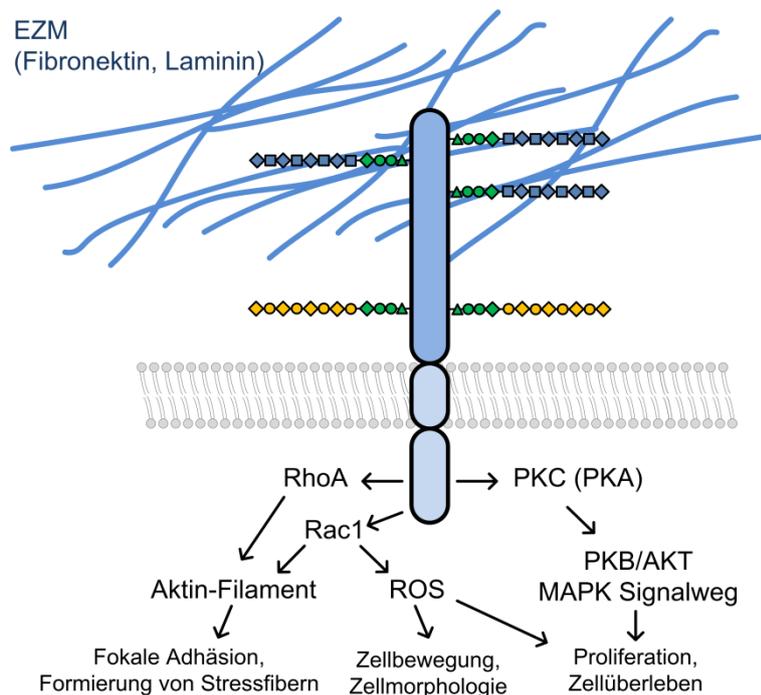


Abb. 2.10 Intrazelluläre Verknüpfung von SDC-4⁹⁰

Die PKC-Enzyme sind Serin/Threoninkinasen und wichtige Mediatoren der Signalweiterleitung oder der Aktivierung von Signalwegen durch Phosphorylierungen. Es wird unterschieden zwischen klassischen PKC wie PKC α , die über Diacylglycerin (DAG), Phospholipide oder Ca²⁺-Ionen aktiviert werden, neuen PKC wie PKC δ , die nur über DAG und Phospholipiden beeinflusst werden, jedoch nicht von Ca²⁺-Ionen, und der dritten Gruppe der atypischen PKC. Neben PKC α ist auch PKC δ eng verknüpft mit dem Signaling von SDC-4. Die Aktivierung der PKC δ führt zur Phosphorylierung von SDC-4, wodurch die Phosphorylierung bzw. Aktivierung von PKC α ausbleibt¹⁰³.

SDC-4 bindet über seine V-Domäne neben PIP2 und PKC α auch an α -Actinin und Syndesmos. Durch die Bindung eines Liganden an SDC-4 werden über die Aktivierung

der Kinasen RhoA, Rac1, AKT und des MAPK Signalweges die Bildung von fokalen Adhäsionen, Zellmigration, Proliferation und Zellüberleben stimuliert⁹⁰.

SDC-4 Knockout-Mäuse zeigten keine Beeinträchtigung in der Lebens- oder Reproduktionsfähigkeit, wiesen jedoch eine beeinträchtigte Wundheilung auf, die auf die Verringerung von Zellmigration und Angiogenese schließen lässt und die vorgestellten Funktionen des SDC-4 unterstreicht^{104,105}.

2.4 Das Syndekan-4/Integrin Interaktom

In den Kapiteln 2.2.6 und 2.3.3.2 wurde dargelegt, dass Integrine und SDC-4 als Mediatoren zwischen der extrazellulären Matrix und dem Zellinneren fungieren und sich ihre aktivierten Signalwege überlagern und teilweise verstärken. Die Interaktion der durch Integrine und SDC-4 aktivierten Signalwege wird als Interaktom bezeichnet. Als erstes sei hier die Kooperation von $\alpha 5\beta 1$ und SDC-4 erwähnt, die eine Besonderheit darstellt, da das Integrin und SDC-4 an der Zelloberfläche direkt in Kontakt treten und bei verminderter Expression einer der beiden Bindungsteilnehmer die Bindungsstärke zu Fibronectin oder Thy-1 reduziert wird¹⁰⁶. Über das Zusammenspiel der beiden transmembranären Strukturen wird die SDC-4-assoziierte PKC α aktiviert, die wiederum die kleine GTPase Rac1 phosphoryliert¹⁰⁷, während RhoA über die Aktivierung von c-Src inhibiert wird¹⁰⁸. Gleichzeitig fördert die Anlagerung von SDC-4 an $\alpha 5\beta 1$ die Aktivierung der RhoG, die u.a. die Endozytose von $\alpha 5\beta 1$ initiiert¹⁰⁹. Intrazellulär ist die Phosphorylierung von SDC-4 durch die Tyrosinkinase c-Src entscheidend, da diese Aktivierung zu einer Stabilisierung von fokalen Adhäsionen führt, die essentiell für die Zellmigration sind⁹⁶. Hier besteht eine Überschneidung mit dem Integrin-aktivierten Signalweg, da Integrine durch die fehlende eigene Kinase-Aktivität mit Tyrosinkinasen kooperieren können. Allerdings erfolgt die Aktivierung der FAK während des Integrin-Signalings nicht über PKC α ¹¹⁰.

Andere Integrine wie das VLA-4 können die Zellbewegung auch ohne FAK-Beteiligung in Abhängigkeit von c-Src vermitteln⁶⁵. VLA-4 benötigt SDC-4 nicht als Korezeptor zur Ausbildung von fokalen Adhäsionen und wirkt sich auch nach Aktivierung nicht auf die Aktivität der PKC α aus⁹⁸.

Trotz zahlreicher Überlappungen der Integrin und SDC-4 aktivierten Signalwege, gibt es intrazelluläre Moleküle, die jeweils einem Signalweg zugeordnet werden können^{111,112}.

2.5 Heparanase

Im direkten Zusammenhang mit HSPG steht das Enzym Heparanase, welches den Abbau und die Modifizierung von HS-Ketten vermittelt. Die zelloberflächenständigen HSPG SDC und Glypikane sind dabei bekannte Zielstrukturen der Heparanase, deren Abbau ein wichtiger Bestandteil von pathologischen Prozessen wie Entzündungsreaktionen und Tumorproliferation ist^{82,113}.

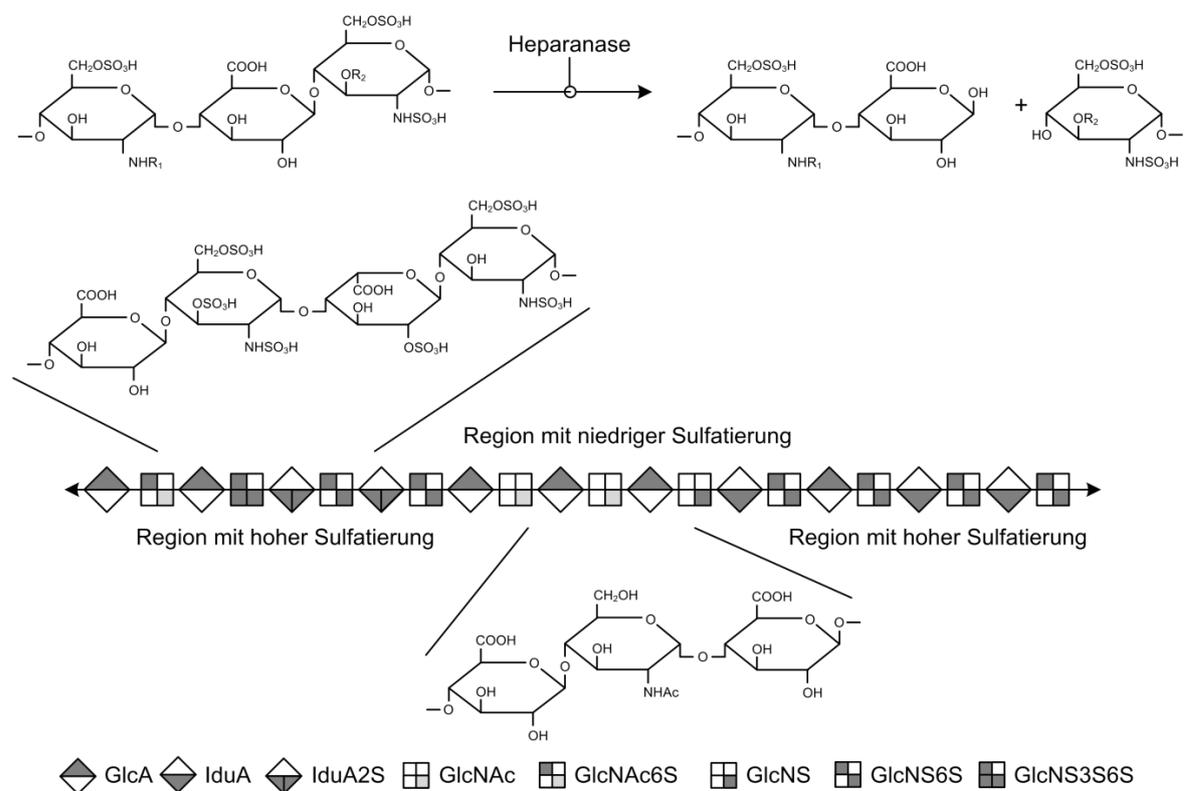


Abb. 2.11 Abbau von HS-Ketten durch Heparanase modifiziert nach Peterson und Liu¹¹⁴

Heparanase spaltet die GAG-Ketten an Stellen mit bestimmten Sulfatierungsmustern zwischen unsulfatierten und hochsulfatierten Bereichen. Dabei vollzieht sich die Spaltung zwischen einer Glukuronsäure-Einheit (GlcA) und einem N-sulfierten Glukosamin (GlcNS) mit entweder einer 3-O- (GlcNS3S) oder 6-O-Sulfatierung (GlcNS6S). Ebenso werden Bindungen zwischen GlcA und einem N-acetylierten Glukosamin mit 6-O-Sulfatierung (GlcNAc6S) aufgetrennt. Allerdings wird nicht zwangsläufig jede dieser Bindungen zwischen den genannten Sacchariden gelöst. Abhängig von den umgebenden Zucker-Resten kommt es zu einer Spaltung oder nicht, was auf eine allosterische Kontrolle der Heparanase hinweist.

IduA: Iduronsäure, IduA2S: an C2 sulfatierte Iduronsäure, GlcNAc: N-acetyliertes Glukosamin, GlcNS: N-sulfiertes Glukosamin; R₁: -Ac oder -SO₃H; R₂: -H oder -SO₃H

2.5.1 Charakterisierung

Heparanase ist eine Endo- β -D-glukuronidase, die HS in Fragmente von 10 bis 20 Zuckereinheiten von einer Größe von 5 bis 7 kDa spaltet. Sie ist als einziges Enzym im Organismus von Säugetieren in der Lage, die Bindungen innerhalb von HS-Ketten zu spalten¹¹⁵. Über Substratspezifitätsstudien mit synthetischen Polysacchariden konnten die bevorzugten Spaltbereiche der Heparanase untersucht werden¹¹⁴. Näheres zur Substratspezifität ist in Abb. 2.11 erläutert. Heparanase präferiert unter den HSPG die membranständigen und von diesen vor allem SDC als Bindungspartner¹¹⁶.

2.5.2 Physiologische und pathologische Funktionen

Eine wichtige Rolle spielt Heparanase im Remodeling der EZM oder bei der Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen aus den Reservoirs der HS-Ketten¹¹⁷. Dabei werden durch die Heparanase HS-Fragmente abgespalten, die in Wechselwirkung mit Wachstumsfaktoren, Chemokinen oder Zytokinen stehen. Durch Auflösung des HSPG-Reservoirs und Freisetzung der HS-gebundenen Wachstumsfaktoren wie bFGF, VEGF oder HGF können diese an ihre Rezeptoren binden und zellproliferationssteigernde Signale weiterleiten^{118,119}. Die HS-Fragmente dienen nicht nur als Bindungspartner und Reservoir, sondern können nach ihrer Freisetzung an Toll-like Rezeptoren binden und deren Signalweg aktivieren, über den weitere Zytokine freigesetzt werden¹²⁰. Begleitend mit diesen Fähigkeiten werden die Zellproliferation und Differenzierung gefördert und die Neugestaltung von Geweben veranlasst, was sie unter physiologischen Bedingungen in der Angiogenese und Zellmigration der embryonalen Entwicklung und der Wundheilung unentbehrlich macht.

Im Zusammenhang mit pathologischen Vorgängen ist eine erhöhte Heparanase-Aktivität z.B. in Entzündungsarealen festzustellen wie bei der durch Diabetes bedingten Nephropathie¹²¹. Bei der Entwicklung von malignen Tumoren werden die von Heparanase getriggerten Prozesse von Krebszellen instrumentalisiert, um die Vorgänge der Metastasierung wie Adhäsion, Migration und Invasion zu verstärken oder um die Versorgung wachsender Metastasen mit Blutgefäßen zu gewährleisten¹²². In mehreren klinischen Studien wurde ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Heparanase-Expression und einem aggressiveren, stark metastasierenden Krebsphänotyp festgestellt^{123–126}.

2.5.3 Expression und Metabolismus

Die Heparanase wird von Blutplättchen, den Zellen des Immunsystems oder Tumorzellen in einer 65 kDa großen Proform exprimiert und über Exozytose zum Teil aus der Zelle geschleust. Extrazellulär kann die Heparanase proteolytischen Spaltungen unterliegen, die sie in zwei Untereinheiten mit den Größen 8 kDa und 50 kDa trennen, die sich in einem Heterodimer zusammenlagern und das aktive Enzym bilden⁷⁵. Das für die Spaltung und Aktivierung der Proheparanase verantwortliche Enzym wurde als Cathepsin L identifiziert, welches intrazellulär in Lysosomen vorkommt oder von Makrophagen ausgeschüttet wird^{127,128}. Inwiefern ausschließlich Cathepsin L für die Aktivierung der Heparanase verantwortlich ist, ist noch nicht geklärt, jedoch wird aktuell von einer prädominanten Stellung des Cathepsins L in der Aktivierung der Heparanase ausgegangen. Die aktive Heparanase entfaltet ihre enzymatische Aktivität in einem schwach sauren pH-Bereich von 5,4 bis 6,8 und liegt bei physiologischem pH-Wert von 7,4 enzymatisch inaktiv vor^{129,130}. Die optimalen pH-Werte für die enzymatische Aktivität werden innerhalb der Zelle in den für den Abbau von zellfremden oder zelleigenen HSPG zuständigen Endosomen und Lysosomen erreicht. In diesen findet beispielsweise der Abbau von HS-Ketten der HSPG mithilfe von Heparanase statt^{131,132}. Extrazellulär liegen schwach saure pH-Werte nur in entzündeten Geweben oder im Umfeld von Tumoren vor¹²⁹. Durch die Senkung des pH-Werts können die malignen Zellen die Funktion der Heparanase bei optimalen Wirkbedingungen nutzen.

Eine weitere Funktion der aktiven Heparanase stellt die genregulierende Aktivität im Nukleus von Zellen dar¹³⁴. In Melanomzellen wurde die kompetitive Inhibition der Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA auf Heparanase zurückgeführt, und die ausbleibende Genexpression von prometastatischen Proteinen wie MMP-9 oder TNF- α detektiert.

Die Dualität der Heparanase, zum einen extrazellulär prometastatisch und zum anderen intrazellulär antimetastatisch zu wirken, zeigt eine komplexere Bedeutung der Heparanase in der Metastasierung als bisher angenommen. Die Vorbeugung von Metastasen würde nach den neuesten Erkenntnissen optimal erfolgen, wenn eine Erhöhung der Heparanase im Nukleus und eine Inhibition der Heparanase auf der Zelloberfläche erzielt werden könnte, um den Abbau der HS und prometastatische Folgen zu vermeiden.

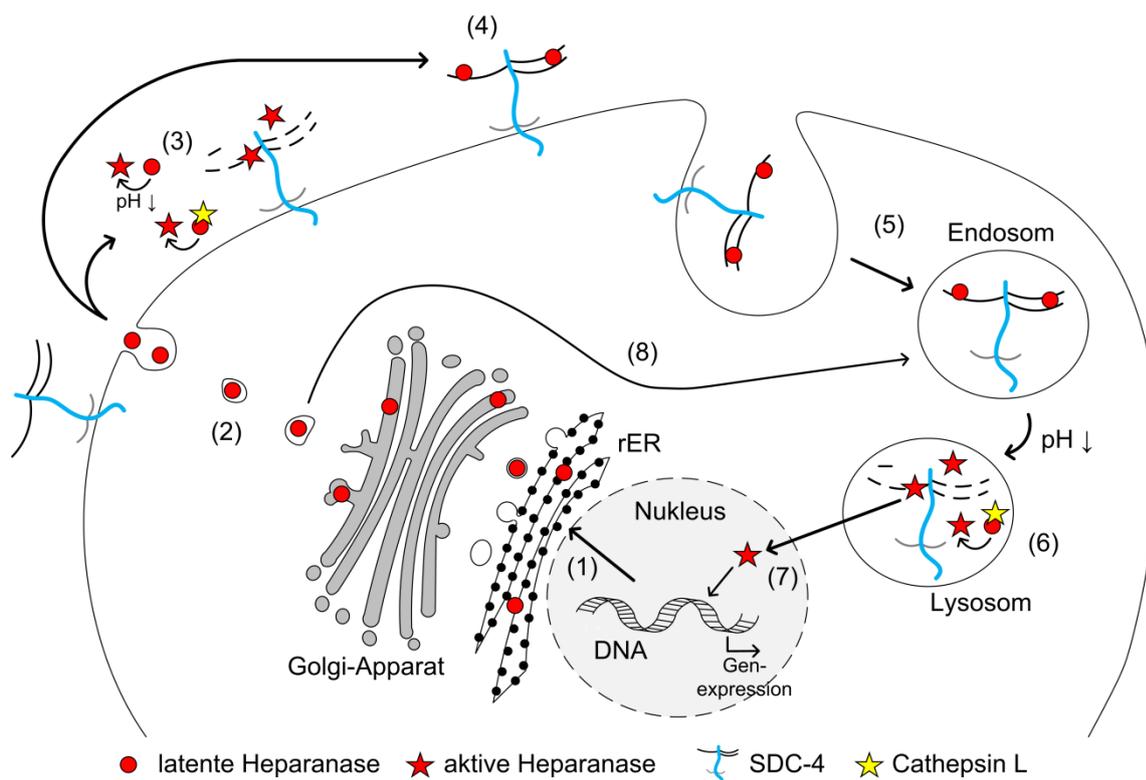


Abb. 2.12 Schematische Übersicht der Expression und des Metabolismus von Heparanase modifiziert nach Gingis-Velitski et al.¹³³

Die Preproheparanase wird nach ihrer Expression zum Endoplasmatischen Retikulum weitergeleitet (1). Dabei wird das Signalpeptid abgespalten. Die entstandene Proheparanase wird in Vesikeln, die sich vom Golgi-Apparat abspalten, sekretiert (2). Nach ihrer Freisetzung wird sie entweder durch Cathepsin L oder einen acidischen pH-Wert aktiviert und spaltet zelloberflächenständige HS-Ketten der HSPG ab (3) oder bindet in ihrer latenten Form an HSPG wie SDC-4 (4). Der Proheparanase-SDC-Komplex wird schnell internalisiert und reichert sich in Endosomen an (5). Diese werden in Lysosomen umgewandelt und durch die Reduktion des pH-Wertes und anwesende Enzyme wie Cathepsin L wird die Proheparanase gespalten und zur aktiven Heparanase umgeformt (6). In den Lysosomen ist die Heparanase an dem Abbau von HSPG beteiligt und spaltet die HS-Ketten. Eine weitere Translokation in den Nucleus und eine Beeinflussung der Genexpression kann sich anschließen (7). Ebenso kann die Ausschüttung der Vesikel ausbleiben und eine Umformung in Endosomen und später Lysosomen direkt erfolgen (8).

2.5.4 Latente Heparanase

Während Heparanase in ihrer enzymatischen Form bereits umfangreich untersucht wurde, wirft die Funktion der latenten Proheparanase im Tumorgeschehen noch vielfältige Fragen auf. Bislang bekannt ist lediglich ein proadhäsiver Effekt von Tumorzellen hämatopoetischen Ursprungs zur EZM, der vermittelt wird durch die nicht enzymatisch aktive Heparanase^{135,136}. Dabei fungieren auch für die latente Heparanase HSPG und vor allem SDC als potentielle Bindungspartner. Auch wenn die molekularen Mechanismen dieser proadhäsiven Effekte nicht umfassend verstanden sind und nicht für solide Tumorzellen gezeigt wurden, deutet dies doch auf eine potentielle Rolle der latenten

Heparanase im Metastasierungs-geschehen hin, die die deutlich prominentere enzymatische Funktion noch ergänzt.

In in vitro Versuchen wurde nach Zugabe exogener, latenter Heparanase die Anlagerung an SDC detektiert und die Entstehung von SDC-1 und SDC-4 Clustern auf der Zelloberfläche festgestellt. Innerhalb von 15 Minuten kam es mit Glioma-Zellen zur Internalisierung des entstandenen Heparanase-SDC-Komplexes¹³³, der innerhalb der Zelle die Aktivierung von Kinasen aus verschiedenen intrazellulären Signalwegen (AKT, p38, Src) zur Folge hatte^{116,137,138}. Über die Stimulation der p38- und Src-Signalwege folgt eine Freisetzung von VEGF, wodurch in vivo die Angiogenese in Tumoren angeregt wurde¹³⁹. Latente Heparanase bewirkt weiterhin eine stärkere Bindung der Zellen zu Endothelzellen¹¹³, was im Verlauf der hämatogenen Metastasierung die Beeinflussung eines entscheidenden Schrittes darstellt. Die für die höhere Bindungsaffinität verantwortlichen Zelloberflächenrezeptoren wurden in T-Lymphozyten als β 1-Integrine identifiziert, wobei im Detail eine Verstärkung der Bindung des Integrins α 4 β 1 zu seinem physiologischen Bindungspartner VCAM-1 festgestellt wurde¹⁴⁰. Inwiefern diese Eigenschaft auch von Tumorzellen und in diesem speziellen Fall von stark metastasierenden Melanomzellen ausgenutzt werden kann, ist Bestandteil der vorliegenden Dissertationsschrift.

2.5.5 Inhibitoren der Heparanase

Heparanase wurde erstmals 1999 erfolgreich kloniert und funktionell exprimiert^{141–143}. Durch die artifizielle Herstellung wurde eine breite Testung ermöglicht und die Heparanase-assoziierten Prozesse konnten offengelegt werden. Bereits 1984 wurde die Inhibition der enzymatischen Aktivität der Heparanase durch Heparin entdeckt¹⁴⁴. Seitdem wurden verschiedene Heparin-Modifikationen durchgeführt, um die prometastatischen Effekte der extrazellulären Heparanase zu vermindern. Potentielle Inhibitoren wurden in Anlehnung an das Substrat der Heparanase, den HS-Ketten, entwickelt, wobei an dieser Stelle eine kurze Zusammenfassung der Inhibitoren folgt, die Anwendung in klinischen Studien fanden.

Der Inhibitor PI-88, ein Oligosaccharid, wird von Progen Pharmaceuticals hergestellt und in verschiedenen Studien auf seine antimetastatische Wirkung gegenüber Tumorzellen wie Melanom, Prostatakrebs, Leberzell- oder nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom in Kombination mit Zytostatika wie Dacarbazin oder Docetaxel untersucht. Bisher wurde eine klinische Studie der Phase III für die Nachbehandlung des operativ entfernten Le-

berzellkarzinoms durchgeführt (PATRON), jedoch sind zunächst keine weiteren Studien in Planung, bis die statistischen Analysen abgeschlossen sind¹⁴⁵.

Ein weiterer Heparanase-Inhibitor der Firma Progen Pharmaceuticals ist PG545. PG545 besteht aus einem sulfatierten Tetrasaccharid, das mit der lipophilen Komponente Cholestanol verknüpft ist, um eine bessere in vivo Aktivität, längere Halbwertszeit und eine geringe antikoagulative Wirkung zu erzielen. Aufgrund seiner Struktur muss der Wirkstoff in die Blutbahn appliziert werden. In ersten Studien wurde die Anwendung subkutan durchgeführt, um die Injektion durch den Patienten zu gewährleisten. Dabei wurden jedoch lokale Hautirritationen am Applikationsort festgestellt, so dass nun eine intravenöse Gabe erforderlich ist. Präklinisch wurde eine antimetastatische Wirkung aufgrund der Inhibition von Heparanase sowie eine Angiogenese hemmende Wirkung durch VEGF und FGF-2 Inhibition nachgewiesen^{146,147}. Zurzeit wird PG545 in klinischen Studien der Phase I bei fortgeschrittenen soliden Tumoren auf Sicherheitsaspekte und Verträglichkeit getestet.

Das HS-Mimetikum M402 (Necuparanib) wurde von Momenta Pharmaceuticals aus unfraktioniertem Heparin entwickelt, wobei es derart modifiziert wurde, dass die antikoagulative Wirkung verloren ging. In vivo Studien mit B16F10 Melanomzellen in Mäusen belegten nach subkutaner Applikation von M402 eine Verringerung von Lungenmetastasen¹⁴⁸. Seit März 2015 werden an metastasierendem Pankreaskarzinom erkrankte Patienten in Phase I und II Studien aufgenommen, in denen Paclitaxel und Gemcitabin in Kombination mit M402 zunächst auf ihre Sicherheit, Verträglichkeit und Wirksamkeit getestet werden (CliniclaTrials.gov Identifier: NCT01621243).

SST0001 (Roneparstat) ist ein zu 100 % N-acetyliertes, hochmolekulares Heparin, das zu 25 % Glykospaltungen unterzogen wurde und geringe antikoagulative Wirkung aufweist. Die Firma Sigma Tau Research Switzerland SA rekrutiert derzeit Patienten, die an einem multiplem Myelom erkrankt sind, für eine Phase I Studie, in der die ersten Verträglichkeitstestungen mit eskalierenden Dosierungen durchgeführt werden. SST0001 wird subkutan appliziert und zeigte in der in vivo Testung mit Mäusen keine Reizung des Applikationsortes im Gegensatz zu PG545. Durch die Inhibition der Heparanase konnte in vitro eine Reduktion der VEGF, MMP-9 und HGF Expression sowie eine Verringerung des SDC-1 Abbaus festgestellt werden¹⁴⁹.

2.6 Heparine

2.6.1 Erste medizinische Anwendungen

Heparin wurde erstmals 1916 von William Henry Howell und Jay McLean aus der Leber eines Hundes isoliert und zeigte in *in vitro* Experimenten seine antikoagulative Wirkung¹⁵⁰. Seit den späten 1920er Jahren wird es zur antithrombotischen Therapie angewandt, wobei die steigende Patientenzahl einen erhöhten Bedarf an Heparin nach sich zog. Dieser wurde gedeckt durch die Aufreinigung des Heparins aus den Lebern, Lungen und Innereien von Rindern und Schweinen¹⁵¹. Die ersten klinischen Studien starteten in den 1930er Jahren, obwohl die Struktur des Heparins noch nicht aufgeklärt worden war. Erst in den 1960er und 1970er Jahren führten diverse Studien zur Aufklärung der komplexen Struktur und ermöglichten die chemische Herstellung und Optimierung des Heparins¹⁵². Seit den 1980er Jahren haben weitere Heparine neben dem unfraktionierten Heparin (UFH) die Arzneimittelmarkt-Zulassung erhalten. So bietet die neuere Gruppe der niedermolekularen Heparine (LMWH) eine zusätzliche Therapieoption, die im Gegensatz zu UFH eine stabile und vorhersagbare Pharmakokinetik aufweist, die die Heparinabgabe von einer bis zu dreimal täglichen Applikation des UFH auf eine ein- oder zweimal tägliche subkutane Applikation reduziert und so die Wirksamkeit des Arzneimittels durch eine gesteigerte Compliance des Patienten erhöht. Nach wie vor gehören Heparine zur Standardtherapie im Zuge der Thromboseprophylaxe und dienen in diesem Sinne zur Vorbeugung von tiefen Venenthrombosen und Lungenembolien.

2.6.2 Struktur des Heparins

Im menschlichen Körper wird Heparin als endogenes Molekül ausschließlich von Mastzellen produziert und steht im Zusammenhang mit Allergien und Entzündungen¹⁵³. Gewonnen wird UFH für die Anwendung am Menschen aus der Mukosa des Schweinedarms, wobei es chemisch ein Gemisch aus natürlichen GAG darstellt. Es sind mehrfach anionisch geladene Moleküle, die aus verschiedenen Aminosuktern aufgebaut sind, wobei diese stets aus der Grundstruktur eines Disaccharids aus D-Glukosamin und einer Uronsäure, entweder D-Glukuronsäure oder vornehmlich L-Iduronsäure, die zum Teil sulfatiert vorliegen, besteht (siehe Abb. 2.13).

Unfraktioniertes Heparin weist eine Molmasse von 6.000 bis 30.000 Dalton auf, was den uneinheitlichen Charakter des Heparins unterstreicht. Da das Zuckergemisch über den Gastrointestinaltrakt nicht an seinen Bestimmungsort, die Blutbahn, gelangen kann, müssen UFH und LMWH subkutan appliziert werden.

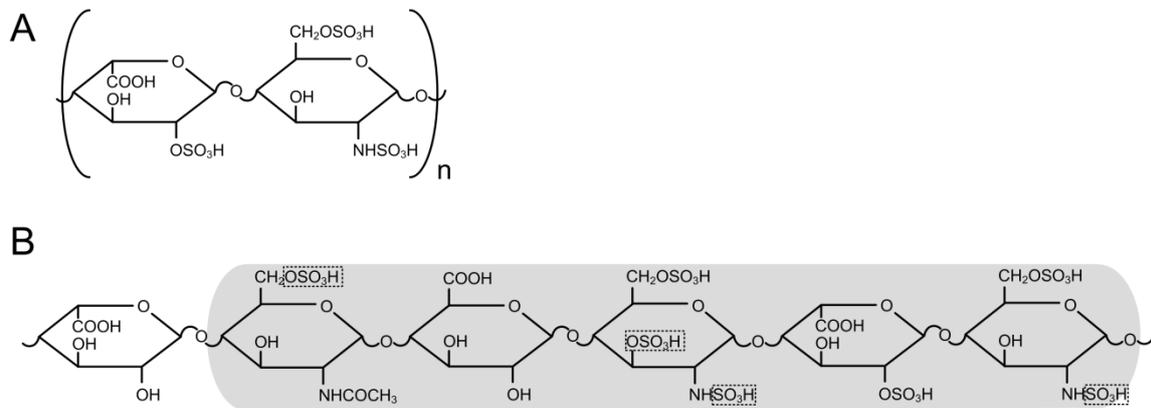


Abb. 2.13 Struktur des unfraktionierten Heparins¹⁵⁴

(A) Das dreifach sulfatierte Disaccharid bestehend aus den Zuckern Iduronsäure und Glukosamin bildet die Hauptkomponente des Heparins. (B) Das Hexasaccharid beinhaltet das grau hinterlegte Pentasaccharid, das für die Bindung zu Antithrombin verantwortlich ist und die antikoagulative Wirkung vermittelt. Die markierten Sulfat-Reste sind essentiell für die hohe Bindungsaffinität zu Antithrombin.

2.6.3 Antikoagulative Wirkung der Heparine

Die Hämostase ist ein komplexer Prozess, der im Falle einer Verletzung des Blutgefäßes lokal begrenzt schnell eintreten muss. Dabei setzt sich die Hämostase aus einer zellulären und einer plasmatischen Komponente zusammen. Die erstere besteht aus der Rekrutierung von Thrombozyten zum Ort der Verletzung und der Verengung des Blutgefäßes durch Beteiligung des Endothels und der glatten Muskelzellen. Dabei adhären die stimulierten Thrombozyten über das Integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$ am Endothel des Blutgefäßes und stabilisieren sich durch Aggregation zum primären Thrombus¹⁵⁵.

Der zweite Schritt ist die sekundäre Hämostase bzw. die Aktivierung der Blutgerinnungskaskade, die in der Stabilisierung des losen Thrombozytennetzes durch Fibrineinlagerungen gipfelt (siehe Abb. 2.14)¹⁵⁶. Durch diese Verstärkung werden weiterhin Erythrozyten in den weißen Thrombozyten-Fibrin-Thrombus einbezogen und es bildet sich ein roter, stabilerer Thrombus.

Die antikoagulative Wirkung des UFH beruht auf seiner Fähigkeit, Antithrombin (AT) zu binden und dessen Wirkung durch eine Konformationsänderung zu verstärken. AT ist ein Glykoprotein, das in der Leber gebildet wird und im Blutplasma vorliegt. Es entfaltet dort

seine hemmende Wirkung auf die Serinproteinasen Thrombin (IIa), die Faktoren Xa und IXa und in geringerem Maße auf die Faktoren XIa und XIIa der Gerinnungskaskade^{157,158}. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass Heparin seine gerinnungshemmende Wirkung nur bei ausreichender Menge an AT entfalten kann. Die AT-bindende Komponente des Heparins ist in Abb. 2.13 (B) dargestellt. In Bezug auf die Gerinnung und den primären Thrombus bedeutet die Behandlung mit Heparin, dass eine Stabilisierung ausbleibt und die Anhäufung von Thrombozyten nach kurzer Zeit ihre Stabilität verliert und vom Blutstrom mitgerissen wird. Die Prophylaxe von Thrombosen durch Heparin besteht somit aus der ausbleibenden Verstärkung der Thrombozyten mit Fibrin.

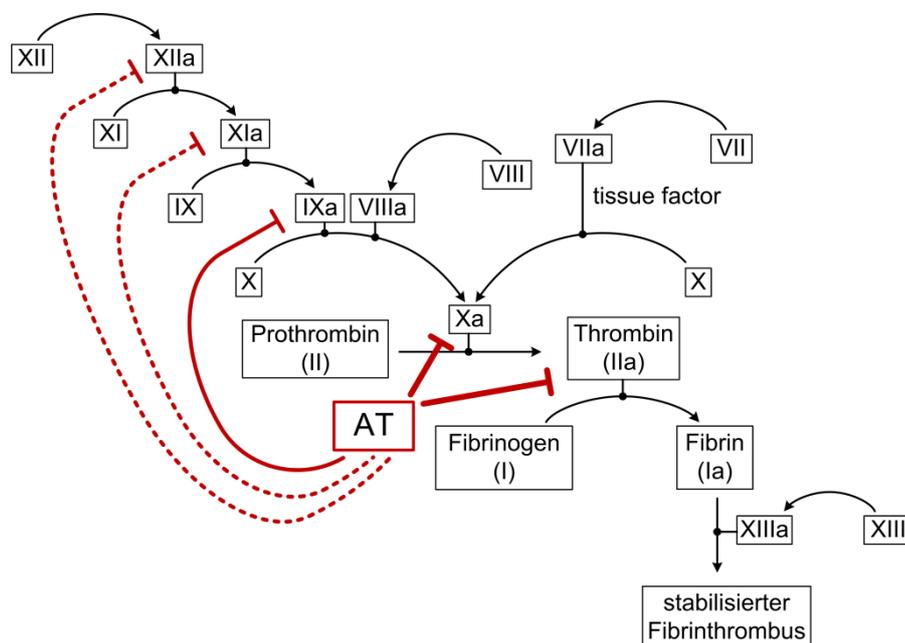


Abb. 2.14 Die sekundäre Hämostase

Die Blutgerinnungskaskade besteht aus verschiedenen Faktoren, die sich gegenseitig über ihre Serinprotease-Aktivität aktivieren. Sie mündet in der Umformung von Fibrinogen zu Fibrin, welches den bereits entstandenen Thrombus aus zusammengelagerten Thrombozyten verstärkt. Antithrombin (AT) fungiert in verschiedener Intensität als Inhibitor einzelner Faktoren und wird durch UFH in dieser Funktion unterstützt und seine Reaktionsfähigkeit beschleunigt.

2.6.4 Niedermolekulare Heparine

Nach Entdeckung des AT-bindenden Pentasaccharids in der Sequenz des UFH wurden LMWH mithilfe von Depolymerisationen des UFH hergestellt. Aufgrund ihrer reduzierten Molekulargröße von durchschnittlich unter 8.000 Da, wobei 60 % (m/m) ein Molgewicht von unter 8.000 Da aufweisen müssen, binden sie ebenso wie UFH an AT, aber unterstützen vornehmlich die Inhibition des Blutgerinnungsfaktors Xa und kaum die von

Thrombin^{159,160}. Zu den LMWH gehören Certoparin (Mono-Embolex[®]), Enoxaparin (Clexane[®]), Nadroparin (Fraxiparin[®]) und Tinzaparin (innohep[®]), die sich in ihren Molekulargewichten und Eigenschaften voneinander unterscheiden (siehe Tabelle 2.2). Als Alternative zu UFH haben die LMWH seit ihrer Arzneimittelzulassung einen festen Platz in der Prophylaxe von Thrombosen und ihr antimetastatisches Potential wird derzeit in verschiedenen Studien untersucht (siehe 2.6.6. und Tabelle 2.2).

2.6.5 Tinzaparin

Tinzaparin zählt mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 6.500 Da zu den LMWH und wird durch enzymatische Depolymerisation von UFH mittels des bakteriellen Enzyms Heparinase gewonnen. Seine Wirkung vermittelt es wie andere Heparine über die Bindung zu AT und die daraus resultierende Beschleunigung der inhibitorischen Wirkung auf den Gerinnungsfaktor Xa und in geringerem Ausmaß auf Thrombin. Die Standardtherapie mit Tinzaparin (innohep[®]) besteht in einer einmal täglichen subkutanen Applikation von 175 Anti-Xa I.E./kg Körpergewicht für mindestens 6 Tage.

Aufgrund seiner polyanionischen Struktur (siehe Abb. 2.15) bindet Tinzaparin diverse matrizelluläre Liganden wie Cyr61¹⁶¹, Wachstumsfaktoren wie VEGF¹⁶² sowie Zelloberflächenstrukturen wie Selektine¹⁶³ oder Integrine¹⁶⁴. Die direkte Bindung an die Zelloberfläche und dort an die Strukturen P- oder L-Selektin sowie an das Integrin VLA-4 blockiert weitere Interaktionen derselben mit anderen Bindungspartnern¹⁶⁵. In diesem Zusammenhang wurde die Metastasierung von Melanomtumorzellen in Mäusen durch Tinzaparin in Abhängigkeit von P- und L-Selektin sowie von VLA-4 signifikant reduziert und bestätigt den antimetastatischen Effekt der LMWH⁴².

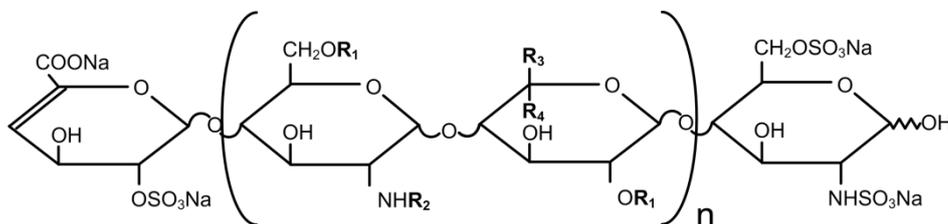


Abb. 2.15 Struktur des Tinzaparin-Natrium¹⁶⁶
 $n = 1$ bis 25 , $R_1 = H$ oder SO_3Na , $R_2 = H$, SO_3Na oder $COCH_3$, $R_3 = H$ und $R_4 = COONa$ oder $R_3 = COONa$ und $R_4 = H$

2.6.6 Die Bedeutung von Heparin in malignen Tumorerkrankungen

Bereits 1865 wurde von Armand Trousseau ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer Tumorerkrankung und Thrombosen beschrieben^{167,168}. In der heutigen Therapie von Tumorerkrankungen erhalten Patienten deshalb oftmals als Komedikation Heparine, um Hyperkoagulation oder prothrombotische Begleiterscheinungen vorzubeugen¹⁶⁹. Dabei wurde in retrospektiven Studien neben der antithrombotischen Aktivität von UFH eine antimetastatische Wirkung festgestellt, die sich jedoch in anderen Studien nicht bestätigte^{170,171}. Dahingegen zeigten klinische Studien bei der Behandlung von Tumorpatienten mit LMWH ein signifikant verlängertes Überleben, das nach einer langen Follow-up Phase beobachtet wurde, so dass ein antithrombotischer Effekt nicht der Grund für diese positive Auswirkung sein kann¹⁷²⁻¹⁷⁴. Das längere Überleben der Tumorpatienten wurde mit einem verminderten Auftreten von Metastasen verbunden, das in Metastasierungsexperimenten in Mäusen nachgewiesen wurde und dessen Gründe in verschiedenen Befunden gesucht werden^{175,176}. Erste Theorien über den antimetastatischen Effekt des Heparins rückten Oberflächenrezeptoren wie Integrine in den Vordergrund, die nach Bindung von Heparin blockiert würden und eine Anheftung der Tumorzelle im Gewebe hemmen sollen¹⁷⁷. Untersuchungen identifizierten nicht nur Integrine als Bindungspartner, sondern auch Selektine und das Enzym Heparanase^{176,178,179}. Darüber hinaus wirken LMWH auf unterschiedliche Tumorentitäten abweichend. Während ein Ansprechen auf LMWH bei Brustkrebszellen ausblieb¹⁸⁰, zeigten Studien mit Melanomzellen oder kleinzelligem Lungenkarzinom eine Reduktion der Sterblichkeit^{181,182}. Der genaue antimetastatische Wirkmechanismus der Heparine ist somit noch nicht vollständig aufgeklärt und bedarf weiterer Untersuchungen. Generell ist anzunehmen, dass der Effekt des Heparins ein Zusammenspiel aus diversen Interaktionen ist und sich auf bestimmte Tumorentitäten begrenzt.

2 Theoretischer Teil

Tabelle 2.2 Übersicht der zugelassenen LMWH und ihr antimetastatisches Potential

++ durch Studien am Menschen gesicherter Befund,

+ durch in vitro und Tiermodell-Studien gesicherter Befund,

- durch Studien am Menschen kein antimetastatischer Benefit durch LMWH-Behandlung,

? noch keine Studien zum antimetastatischen Potential vorhanden.

LMWH	Handelsname	durchschnittliches Molekulargewicht ¹⁸³	antimetastatisches Potential unabhängig von der anti-thrombotischen Wirkung
Bemiparin	keine deutsche Arzneimittel-Zulassung	3.600 Da	++ kleinzelliges Lungenkarzinom ¹⁸⁴
Nadroparin	Fraxiparin [®] , Fraxodil [®]	4.300 Da (4.000 - 5.000 Da)	++ fortgeschrittene oder metastasierende Tumorerkrankungen ¹⁷³
Reviparin	Clivarin [®] Clivarodi [®]	4.400 Da (3.150 - 5.150 Da)	+ Pross et al. (Kolon-Adenokarzinom in Ratten) ¹⁸⁵
Enoxaparin	Clexane [®]	4.500 Da	++ PROSPECT Studie ^{186,187} Pankreaskarzinom SYRINGES Studie ¹⁸⁸ nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00771563 ? laufende Studie kleinzelliges Lungenkarzinom ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00717938
Parnaparin	keine deutsche Arzneimittel-Zulassung	5.000 Da	?
Certoparin	Mono-Embolex [®]	5.400 Da (5.000 - 7.000 Da)	- CERTIFY-Studie ¹⁸⁹ - Brustkrebs ¹⁸⁰ ++ Unterleibskrebs ¹⁸⁰
Dalteparin	Fragmin [®]	5.000 Da (5.600 - 6.400 Da)	Review von Lazo-Langner et al. ¹⁹⁰ ++ kleinzelliges Lungenkarzinom ¹⁹¹ ++ FAMOUS-Studie ¹⁷² : fortgeschrittene oder metastasierende Tumorerkrankungen der Brust, Lunge, Pankreas, Leber, Gebärmutter, Eileiter, des Magen-Darm-Trakts oder Urogenitaltrakts - fortgeschrittene Tumorerkrankungen ¹⁹²
Tinzaparin	innohep [®]	6.500 Da (5.500 - 7.500 Da)	+ Kolonkarzinom, Melanomkrebszellen ^{42,163} ? laufende Studie Tumorerkrankungen der Lunge ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00475098

3 Ziel der Arbeit

Die Prozesse der Adhäsion und Migration von Tumorzellen sind entscheidend für die hämatogene Metastasierung. Eine wichtige Rolle nehmen dabei die Integrine als Zelloberflächenrezeptoren ein, die während der Migration eine stabile Bindung und Reorganisation der Zelle bewirken. Insbesondere die Wechselwirkung des Integrins VLA-4 mit seinem physiologischen Bindungspartner VCAM-1, der auf Endothelzellen exprimiert wird, unterstützt die Adhäsion und Transmigration von Melanomzellen. In dem komplexen Zusammenspiel von Tumorzelle und Umgebung beeinflusst darüber hinaus das Enzym Heparanase die Wirkung von Wachstumsfaktoren, Chemokinen und Zytokinen durch die Abspaltung von HS-Ketten von der Zelloberfläche und somit Freisetzung der Proteine aus ihrem Reservoir. Eine Erhöhung der Adhäsion beispielsweise über die Integrine und die Ausschüttung weiterer prometastatischer Proteine kann die weitere Folge sein. Inwiefern bereits eine Anlagerung der Proheparanase, die keine enzymatische Aktivität aufweist, einen proadhäsiven Effekt auf die Zelle vermittelt, ist eine wichtige Fragestellung für die Entwicklung antimetastatischer Therapieansätze.

In dieser Arbeit soll die Auswirkung von exogener enzymatisch inaktiver Heparanase auf die Adhäsion von Melanomzellen unter besonderer Berücksichtigung der VLA-4/VCAM-1-Wechselwirkung untersucht werden. Es wird die Bindungsaffinität von latenter Heparanase zu verschiedenen Zelloberflächenstrukturen mittels biosensorischer Methoden charakterisiert, um Zielstrukturen der latenten Heparanase zu identifizieren und ggf. zu blockieren. Desweiteren soll die Einflussnahme des HSPG SDC-4 auf Migration und Adhäsion und seine Bedeutung als Bindungspartner der latenten Heparanase evaluiert werden.

Die latente Heparanase ist in Tumorentitäten erst in letzter Zeit Gegenstand von Untersuchungen. Dahingegen laufen bereits klinische Studien mit HS-Mimetika zur Blockade von enzymatisch aktiver Heparanase als vielversprechende antimetastatische Prophylaxe für Tumorpatienten. Die mögliche Inhibition der latenten Proform wurde in diesen Studien nicht untersucht. Diese Arbeit trägt zur Klärung der Wechselwirkungen von verschiedenen Heparinen mit latenter Heparanase und zur Aufdeckung einer inhibitorischen Wirkung bei.

4 Material und Methoden

4.1 Verwendete Materialien

4.1.1 Geräte

Tabelle 4.1 Auflistung der verwendeten Geräte

Geräte	Hersteller
Analysenwaage Sartorius Basic BA210S	SartoriusAG, Göttingen, Deutschland
Biosensor sam [®] 5 Blue	SAW Instruments GmbH, Bonn, Deutschland
Durchflusszytometer BD FACSCalibur [™]	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Elektrophorese-Stromquelle Bio-Rad PowerPac 300	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Elektrophorese-Kammer Mini-Protean [®] Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Gel- und Western Blot-Dokumentationssystem ChemiDoc [™] XRS+	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Hamilton-Spritze Gastight 1002 LTN, stumpf	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
Inkubator DH Autoflow CO ₂ Air-Jacketed Nu-5500	NuAire Inc., Plymouth, MN, USA
Kompaktschüttler KS-15B mit Combifix KS Aufsatz	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop Nikon Eclipse Ti	Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Kraftaufnehmer und Steuerung der Langmuir-Filmwaage	Riegler & Kirstein GmbH, Potsdam, Deutschland
Langmuir-Filmwaage	Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle/Saale, Deutschland
Mehrfachdispenser Multipette [®] M4, 1 µL - 10 mL	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

4 Material und Methoden

Geräte	Hersteller
Mehrkanalpipette	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Mikroskopkamera AxioCam MRc	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Mr. Frosty™ Cryo 1°C Freezing Container	Thermo Scientific GmbH, Langenselbold, Deutschland
Multiskan® EX	Thermo Scientific GmbH, Langenselbold, Deutschland
pH-Meter SevenEasy®	Mettler-Toledo GmbH, Giessen, Deutschland
Pipette Finnpipette® 5000 µL	Thermo Scientific GmbH, Langenselbold, Deutschland
Pipetten Transferpipette® S 10, 100 µL	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Pipetten Eppendorf Research® 2, 20, 100, 200 und 1000 µL	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettierhelfer accu-jet® pro	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Pumpsystem Biochem-VacuuCenter BVC 21 NT	Vacuubrand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Reagiergefäß-Mischer, Thermomixer Comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Schüttelinkubator Unimax® 1010	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, Deutschland
Sterilwerkbank Holten safe 2010 Model 1.5	Heto Holten A/S, Allerød, Dänemark
Trockenschrank	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Ultraschallbad Bandelin Sonorex RK 102 H	Bandelin Electronic, Berlin, Deutschland
UV/VIS Spektrometer Ultrospec 4000	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Vortexer MS2 Minishaker	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Wasseraufbereitungsanlage Millipore Elix	Millipore GmbH, Billerica, MA, USA

Geräte	Hersteller
Western Blot Einsatz Mini Trans-Blot [®] Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Zellkulturmikroskop Wilovert 30	Helmut Hund GmbH, Wetzlar, Deutschland
Zellzähler CASY [®] 1 Model TT Cell Counter	Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland
Zentrifuge für Multiwell-Platten Allegra [™] 25R Zentrifuge	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Zentrifuge MiniSpin [®]	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Universal 320R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland

4.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4.2 Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
6, 24, 96-well-Platte, glasklar, CytoOne [®]	Starlab GmbH, Hamburg, Deutschland
96-well-Microplatte, V-Boden, glasklar	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
CASY [®] cups	Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland
Deckgläser, eckig, 18x18 mm, Stärke 1	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Deckgläser, rund, Ø 18 mm, Stärke 1 und 3	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Einmalspritzen NORM-JECT [®] 10 mL	Henke-Sass Wolf GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Kryokonservierungsgefäße Nunc Cryo Tubes [™] 1 mL	Nalge Nunc International, Hereford, Großbritannien
Mehrfachdispenser Aufsätze 1 mL, 2,5 mL und 5 mL	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

4 Material und Methoden

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Mini-PROTEAN [®] TGX [™] Fertiggele 10 %, 4-15 %	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Objektträger Menzel-Gläser 76 x 26 mm	Thermo Fisher Scientific GmbH, Langenselbold, Deutschland
Pasteurpipetten, Glas	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Pipettenspitzen, 10, 200, 1000 µL TipOne [®]	Starlab GmbH, Hamburg, Deutschland
PVDF-Membran, Roti PVDF T830 Porengröße 0.45 µm	Carl Roth GmbH & KG, Karlsruhe, Deutschland
Reaktionsgefäß 1 mL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Serologische Auslaufpipetten, steril 10 und 25 mL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Sterilfilter, Celluloseacetat 0,2 µm	Whatman GmbH, Dassel, Deutschland
Zellkulturflaschen Cellstar [®] mit Filter 75 und 175 cm ² Bewachungsfläche	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellschaber, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen, PP, steril 15 und 50 mL	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Quarz-Biosensoren, goldbeschichtet	SAW Instruments GmbH, Bonn, Deutschland

4.1.3 Chemikalien

Tabelle 4.3 Auflistung der verwendeten Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Aceton	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Ammoniaklösung (26 %)	Riedel-de Haën, Seetze, Deutschland
Ammoniumacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Chemikalien	Hersteller
Bacillo [®] AF	Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
Borsäure	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Bovines Serumalbumin, Fraktion V ≥ 96 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Calciumchlorid-Dihydrat	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
CASY [®] ton Lösung	Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland
Cell Extraction Buffer FNN0011	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Chloroform	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Clarity [™] ECL Western Blotting Substrate	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Cyanurchlorid	ACROS Organics, Geel, Belgien
D-(+)-Trehalose-dihydrat	VWR BDH Prolabo International, Darmstadt, Deutschland
4',6-Diamidin-2-phenylindol, DAPI	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Dimethylsulfoxid, DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure-Lösung, EDTA, 0,02 % in PBS (m/V)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Essigsäure	KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar, Deutschland
Ethanol 96 % (V/V)	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Ethanolamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
FACS clean	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FACS flow	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FACS rinse	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

4 Material und Methoden

Chemikalien	Hersteller
Fibronectin	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Fluoromount™ wässriges Mounting-Medium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Formaldehyd	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Fötales Kälberserum F7524, nicht inaktiviert	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Glycerol (wasserfrei)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Halt™ Protease Inhibitor Cocktail, 100x Konzentrat	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Hexadecan-1-thiol	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
Immersionsöl, fluoreszenzfrei	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Kohlenstoffdioxid	AIR LIQUIDE Deutschland GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Lämmli-Puffer, 2x Konzentrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Mangan(II)-chlorid-Dihydrat	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
6-Mercaptohexan-1-ol	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
11-Mercaptoundecansäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Nährmedium RPMI 1640	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Natriumacetat-Lösung 3 mol/L, pH 5,2	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

Chemikalien	Hersteller
Natriumazid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid	Grüssing GmbH, Filsum, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
N-Hydroxysuccinimid	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
Penicillin-Streptomycin-Lösung P0781, 100x Konzentrat (Penicillin 10.000 I.E./mL, Streptomycin 10 mg/mL)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Phenylmethansulfonylfluorid, PMSF	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Precision Plus Protein™ WesternC™ Standard	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Puromycin-Dihydrochlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure (1 mol/L)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Schwefelsäure 95 % - 97 %	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
Stickstoff	Linde AG, Düsseldorf, Deutschland
Tris-Base	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Triton® X 100	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Tween® 20	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Wasserstoffperoxid (30 %)	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland

4 Material und Methoden

4.1.4 Testsubstanzen

Tabelle 4.4 Auflistung der verwendeten Heparine

Heparine	Hersteller
innohep® 20.000 Anti-Xa I.E./mL (Tinzaparin-Natrium)	LEO Pharmaceutical Products Ltd. A/S, Ballerup, Dänemark
Modifizierte Heparine mit 2-O-Desulfatierung (2O-DS-H), 56 % 6-O-Desulfatierung (6O-DS-H), 100 % N-Acetylierung (NAc-H) und Glykol-Split-Oxidation (RO-H)	Dankenswerterweise zur Verfügung gestellt durch AG von Herrn Prof. Dr. B. Casu / Dr. G. Torri, „G. Ronzoni“ Institute, Milano, Italien

Tabelle 4.5 Auflistung der verwendeten Enzyme

Enzyme	Hersteller
latente Heparanase	Dankenswerterweise zur Verfügung gestellt durch Prof. Israel Vlodavsky, Rappaport Institute, Haifa, Israel
Chondroitinase ABC aus <i>Proteus vulgaris</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Heparinase III (Heparitinase I) aus <i>Flavobacterium heparinum</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Tabelle 4.6 Auflistung der rekombinanten Proteine

Rekombinante Proteine	Hersteller
KKDC-Peptid (KKFKNSTYSRSK(Biotin)SVDC)	United peptide, Herndon, VA, USA
Integrin $\alpha\text{U}\beta\text{5}$ (His-tag)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
Integrin $\alpha\text{4}\beta\text{1}$ (His-tag)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
Syndekan-4 (His-tag)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland

Rekombinante Proteine	Hersteller
VCAM-1 (Fc-Chimera, His-tag)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland

4.1.5 Lipide

Tabelle 4.7 Auflistung der verwendeten Lipide

Lipide	Hersteller
DOGS NTA (Ni ²⁺) 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-[(N-(5-amino-1-carboxypentyl)iminodiessigsäure)succinyl] Nickel-Salz	Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, USA
DPPC 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin	Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, USA

4.1.6 Antikörper

Tabelle 4.8 Auflistung der verwendeten primären und sekundären Antikörper

Primäre Antikörper	Hersteller
Proteome Profiler™ Human Phospho-Kinase Array	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
anti-humane Integrin-Untereinheit α1	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
anti-humane Integrin-Untereinheit α4	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
anti-humane Integrin-Untereinheit α5	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
anti-humane Integrin-Untereinheit αU	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
anti-humane Integrin-Untereinheit β1	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
anti-humane Integrin-Untereinheit β3	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland

4 Material und Methoden

Primäre Antikörper	Hersteller
anti-humanes Syndekan-1, Fluorescein-konjugiert	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
anti-humanes Syndekan-4	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
anti-humanes p-PKC α	SantaCruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA
anti-humanes p-PKC δ	SantaCruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA
anti-humanes PKC α	SantaCruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA
anti-humanes PKC δ	SantaCruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA
anti-humanes Vinculin	SantaCruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA
anti- β -Actin	SantaCruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA

Sekundäre Antikörper	Hersteller
anti-Maus IgG (F(ab') ₂), CFS-konjugiert	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
anti-His-tag, Alexa Fluor [®] 488-konjugiert	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
anti-Schaf IgG (H+L), NorthernLights [™] 493 (NL493)-konjugiert	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
anti-Ziege IgG (H+L), NorthernLights [™] 493 (NL493)-konjugiert	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
anti-Ziege (H+L), HRP-konjugiert	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
anti-Maus (H+L), HRP-konjugiert	Calbiochem [®] Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland

4.1.7 Puffer und Lösungen

Tabelle 4.9 Zusammensetzungen der verwendeten Puffer und Lösungen

Ammoniumacetat-Lösung (2 mol/L)	
Ammoniumacetat	154 mg
demineralisiertes Wasser	ad 1,0 mL
Antikörper-Lösung, HRP-konjugiert (1:20.000)	
HRP-konjugierter Antikörper	5,0 µL
Magermilchpulver	5,0 g
TBS-T-Lösung	ad 100,0 mL
Antikörper-Lösung, primär	
primärer Antikörper	nach Bedarf
Natriumazid	0,10 g
BSA	5 g
TBS-T-Lösung	ad 100,0 mL
Blocking-Lösung	
Magermilchpulver	5,0 g
TBS-T-Lösung	ad 100,0 mL
Boratpuffer (pH 8,8)	
Borsäure	618 mg
demineralisiertes Wasser	ad 100,0 mL
pH-Wert Einstellung mit 1 mol/L Natriumhydroxid	
Ca²⁺/Mg²⁺-Stammlösung (0,5 mol/L)	
Calciumchlorid-Dihydrat	0,735 g
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	1,017 g
demineralisiertes Wasser	ad 10,0 mL
Cyanurchlorid-Lösung (1 g/L)	
Cyanurchlorid	25 mg
Chloroform	25 mL

4 Material und Methoden

EDC-Lösung (0,4 mol/L)

1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid	15 mg
Phosphatpuffer nach Sørensen (pH 7,4)	ad 200 µL

Elektrophorese-Puffer

Glycin	14,4 g
Tris-Base	3,0 g
SDS	1,0 g
demineralisiertes Wasser	ad 1.000 mL

Ethanolamin-Lösung (2 mol/L, pH 8,5)

Ethanolamin	122 mg
demineralisiertes Wasser	ad 1,0 mL

Hungermedium MV3 aSDC-4kd

Penicillin-Streptomycin-Stammlösung, 100x Konzentrat	5 mL
Puromycin-Dihydrochlorid in destilliertem Wasser (5 µg/µL)	277,75 µL
RPMI 1640	500 mL
Endkonzentration Puromycin-Dihydrochlorid 2,75 µg/mL	

Hungermedium MV3 Wt

Penicillin-Streptomycin-Stammlösung, 100x Konzentrat	5 mL
RPMI 1640	500 mL

Lysepuffer

PMSF-Stammlösung	34 µL
Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (100x)	500 µL
Cell Extraction Buffer	10,0 mL

Medium zum Einfrieren von Zellen

DMSO	1 mL
FKS	ad 10 mL

Mn²⁺-Stammlösung (0,1 mol/L)

Mangan(II)-chlorid-Dihydrat	1,62 g
demineralisiertes Wasser	ad 100 mL

Nährmedium MV3 aSDC-4kd

Penicillin-Streptomycin-Stammlösung, 100x Konzentrat	5,5 mL
FKS	50 mL
Puromycin-Dihydrochlorid in destilliertem Wasser (5 µg/µL)	305,25 µL
RPMI 1640	500 mL
Endkonzentration Puromycin-Dihydrochlorid 2,75 µg/mL	

Nährmedium MV3 Wt

Penicillin-Streptomycin-Stammlösung, 100x Konzentrat	5,5 mL
FKS	50 mL
RPMI 1640	500 mL

NHS-Lösung (0,1 mol/L)

N-Hydroxysuccinimid	11,5 mg
Phosphatpuffer nach Sörensen (pH 7,4)	ad 1.000 µL

Phosphatgepufferte Salzlösung, 20x Konzentrat

Kaliumchlorid	2,0 g
Kaliumdihydrogenphosphat	2,0 g
Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	12,6 g
Natriumchlorid	80,0 g
demineralisiertes Wasser	ad 500,0 mL

Phosphatgepufferte Salzlösung, gebrauchsfertig (pH 7,4)

Phosphatgepufferte Salzlösung, 20x Konzentrat	25,0 mL
demineralisiertes Wasser	ad 500,0 mL

pH-Wert-Einstellung mit Salzsäure (1 mol/L) und Natronlauge (1 mol/L)

Phosphatpuffer nach Sörensen (pH 7,4)**Lösung A**

Kaliumdihydrogenphosphat	0,908 g
demineralisiertes Wasser	100 mL

Lösung B

Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	1,188 g
demineralisiertes Wasser	100 mL

Fertigstellung

Lösung A	18,2 mL
Lösung B	ad 100 mL

4 Material und Methoden

PMSF-Stammlösung (0,3 mol/L)

PMSF	250 mg
DMSO	4,783 mL

Rekonstitutionspuffer der Heparinase III

Tris-Base	121,14 mg	20 mmol/L
BSA	5 mg	0,1 mg/mL
Calciumchlorid-Dihydrat	29,4 mg	4 mmol/L
demineralisiertes Wasser	ad 50,0 mL	

TBS-Lösung, 10x Konzentrat

Natriumchlorid	40,0 g
Tris-Base	6,06 g
demineralisiertes Wasser	ad 500,0 mL

TBS-Lösung, gebrauchsfertig (pH 7,3)

TBS-Lösung 10x	100 mL
demineralisiertes Wasser	ad 1.000 mL

pH-Wert-Einstellung mit Salzsäure (1 mol/L)

TBS-T-Lösung

TBS-Lösung	80 mL
Tween® 20	1,6 mL
demineralisiertes Wasser	ad 1.000 mL

Transfer-Puffer (pH 8,2 - 8,4)

Glycin	14,4 g
Tris-Base	3,0 g
demineralisiertes Wasser	ad 1.000 mL

Waschpuffer für Durchflusszytometrieproben

BSA	0,5 g
Phosphatgepufferte Salzlösung, gebrauchsfertig	ad 100 mL

4.1.8 Software

Durchfluss-, Migrations- und Adhäsionsexperimente wurden aufgenommen mit CellQuest™ Pro Version 5.2.1, BD™ Plate Manager Version 1.0.1 (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland), NIS Elements (Nikon Instruments Inc., Kawasaki, Japan) und Imagoquant MultiTrack-AVI-2 (Mediquant GmbH, Lützen, Deutschland). Die weiterführende Analyse wurde mit GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) und WinMDI 2.8 (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA) durchgeführt. Die Durchführung und Auswertung der Bindungsexperimente mittels Biosensor sam®5 Blue erfolgten mit den Programmen SequenceMaster®, SensMaster® und FitMaster® (SAW Instruments GmbH, Bonn, Deutschland). Die Diagramme der biosensorischen Messungen wurden in dieser Arbeit mit Origin™ 8G (OriginLab Corp., Northampton, MA, USA) dargestellt.

Die Dokumentation und Auswertung der Western Blot und Proteome Profiler™ Array Ergebnisse wurden mit der Software Image Lab™ von Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland) realisiert.

Zur Erstellung von Grafiken und Schaubildern wurden Microsoft PowerPoint 2007 und Microsoft Visio 2010 für Windows (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) verwendet.

Die vorliegende Dissertationsschrift wurde mit Microsoft Word 2007 für Windows (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) und Zotero (Roy Rosenzweig Center for History and New Media, Fairfax, VA, USA) verfasst.

4.1.9 Statistik

Alle Experimente wurden mindestens dreimal identisch durchgeführt und die Mittelwerte mit der zugehörigen Standardabweichung angegeben. Die experimentell erworbenen Stichproben wurden verglichen und die Unterschiede mithilfe des ungepaarten Student t-Tests auf ihre Signifikanz getestet. Die Signifikanz wurden nach folgender Einteilung gekennzeichnet: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.2 Zellkultur

Alle Arbeiten mit lebenden Zellen wurden unter einer sterilen Laminar Air Flow-Werkbank durchgeführt, um Kontaminationen mit Bakterien oder Pilzen zu vermeiden. Durch regelmäßige Säuberungen der Arbeitsflächen mit 70 % (V/V) Isopropanol wurde die Sterilität sichergestellt. Jegliche Gegenstände, die für Arbeiten unter der sterilen Werkbank benötigt wurden, wurden vorab autoklaviert oder mit Desinfektionsmittel wie Bacillo® AF behandelt.

4.2.1 Kulturpflege

Die Haltbarkeit der Medien, Puffer und Lösungen wurde generell verlängert durch Aufbewahrung bei 2 bis 8°C und Erwärmung auf Raumtemperatur unmittelbar vor der Verwendung. In Wachstumsphasen wurden die Zellen in einem Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂ Luftgehalt gelagert.

4.2.1.1 MV3 Zellen

Die in dieser Arbeit vorgestellten Zellexperimente wurden mit der stark metastasierenden Melanom-Zelllinie MV3 durchgeführt. Diese Zelllinie stammt aus einer Lymphknotenmetastase eines 76-jährigen Mannes, der an einem amelanotischen Melanom erkrankt war, und wurde von van Muijen etabliert¹⁹³. Nach Entnahme der Metastase wurden kleine Teile derselben Nacktmäusen unter die Haut transplantiert und nach drei Passagen als MV3 Zelllinie isoliert. Diese Zellen zeigten nach einer i.v. Gabe in Mäusen eine hohe Lungenmetastasierungsrate (95 %). Darüber hinaus fiel die Wahl auf diese Zelllinie, da sie auf der Zelloberfläche das Integrin VLA-4 und das HSPG SDC-4 in hohem Maße exprimiert. Kultiviert wurden MV3 Zellen in RPMI 1640 mit 10 % (V/V) FKS-Zusatz.

4.2.1.2 MV3 aSDC-4kd Zellen

Dr. Patrick Schmitz erstellte in seiner Doktorandenzeit mittels shRNA Transfektion eine Version der MV3 Zellen, die eine verminderte Proteinexpression von SDC-4 aufweist. Diese Zellen wurden in den Experimenten dieser Dissertation verwendet und werden im

Folgenden als MV3 aSDC-4kd Zellen bezeichnet. Die Herstellung dieser veränderten Zelllinie sei hier nur kurz erwähnt. Das Plasmid mit dem shRNA-kodierenden Vektor wurde lipidbasiert in die MV3 Zellen geschleust (Plasmide von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim; Lipofektion mit Fugene[®] 6 von Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). Dort wird es fortlaufend transkribiert, wodurch in diesen Zellen dauerhaft die siRNA vorliegt, die eine entsprechende Ziel-mRNA erkennt, in diesem Fall SDC-4. In der Zelle bilden siRNA und mRNA einen Komplex, der durch Endonucleasen abgebaut wird. Somit wird die Expression des SDC-4 auf Proteinebene stillgelegt. Außer der shRNA-Sequenz beinhaltet der eingeschleuste Vektor u.a. eine Resistenz gegen das Antibiotikum Puromycin, die es ermöglicht, die erfolgreich transfizierten Zellen zu selektieren. Im Folgenden werden die nicht-transfizierten Zellen als Wildtyp (Wt) bezeichnet. Um einen generellen Einfluss der gewählten Transfizierungsmethode auf die Zellen und ihre Proteinexpression auszuschließen, wurde in einem Kontrollversuch ein Plasmid mit ungerichteter shRNA-Sequenz auf gleichem Weg in die Zellen geschleust (aNT). Das Nährmedium der aSDC-4kd und aNT Zellen wird zusätzlich mit der ermittelten Konzentration von 2,75 µg/mL Puromycin-Dihydrochlorid versetzt. Bei dieser Konzentration sterben Wt Zellen ab, während aSDC-4kd und aNT Zellen dank der Transfektion des Plasmids überleben können.

Die Charakterisierung der Zellen bezüglich ihrer Zelloberflächenexpression wird im Folgenden beschrieben. Darüber hinaus wurden die MV3 Wt und aSDC-4kd Zellen im Labor von Prof. Vlodavsky auf ihre endogene Heparanase Aktivität und die Aufnahme von exogener Heparanase untersucht.

4.2.2 Subkultivierung

MV3 Zellen sind adhärente Zellen, die bei zunehmender Konfluenz oder vor der Verwendung in einem Experiment abgelöst und in geringerer Konzentration in einer neuen Zellkulturflasche ausgesät werden müssen, um den Fortbestand der Kultur zu gewährleisten. Dazu wurde der Zellrasen am Boden der Zellkulturflasche zunächst mit 5 mL sterilem PBS gewaschen, damit nicht-adhärente oder tote Zellen von der vitalen Kultur abgetrennt wurden. Anschließend wurden bis zu 5 mL 0,02 % (m/V) EDTA in sterilem PBS zugeführt. Nach einer etwa fünf-minütigen Inkubationszeit bei 37°C wurden die Zellen durch Schwenken der Zellkulturflasche vom Boden abgelöst. Weiteres Nährmedium wurde zugesetzt, um die Zellen quantitativ zu erfassen und sie in ein Zentrifugenröhrchen zu überführen. Nach vier-minütiger Zentrifugation bei 1680 rpm und

4°C hatte sich ein Pellet aus lebenden Zellen am Boden des konischen Röhrchens gebildet, so dass das überstehende Gemisch aus EDTA und Nährmedium durch Absaugen entfernt werden konnte. Die Zellen wurden in einem adäquaten Nährmedium-Volumen aufgenommen und entweder für Versuche verwendet oder zur weiteren Kultivierung im Inkubator gelagert. Bei jedem Vorgang der Subkultivierung wurden die Zellen mit einer höheren Passage versehen, um das Alter der in Kultur befindlichen Zellen abschätzen zu können und um die Vergleichbarkeit der Experimente durch Verwendung von gleichpassagierten Zellen zu gewährleisten.

4.2.3 Kryokonservierung der Zellen und Revitalisierung

Eine längerfristige Lagerung von MV3 Zellen wurde ermöglicht durch Ablösung der adhärenten Zellen und anschließender Suspension in FKS mit einem 10 % Zusatz an DMSO, der das Auskristallisieren von Wasser in der Zelle verhindert. Nach Aliquotierung der Zellsuspension in Kryokonservierungsgefäße (2×10^6 Zellen in 1 mL) werden diese bei einer Temperatursenkung von 1°C pro Minute langsam und gleichmäßig im Tiefkühlschrank bei -80°C eingefroren. Nach 12 Stunden wurden die Zellen in einen Stickstofftank (-196°C) überführt. Dort können sie über längere Zeit ohne Vitalitätsverlust gelagert werden.

Bei erforderlicher Revitalisierung der Zellen wurde ein Kryokonservierungsgefäß dem Stickstofftank entnommen, zeitnah aufgetaut und zur Verdünnung des DMSO, das bei Raumtemperatur toxisch auf die Zellen wirkt, 5 mL Nährmedium zugesetzt. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (1680 rpm, 4°C, 5 min) und die überstehende Lösung entfernt. Nach Wiederaufnahme der Zellen in 15 oder 25 mL entsprechendem Zellmedium wurden sie in eine Zellkulturflasche mit 75 oder 175 cm² großer Wachstumsfläche überführt. Bis zur folgenden Ablösung verblieben die Zellen zum Wachstum und zur Teilung im Inkubator.

4.2.4 Zellzahlbestimmung

Für viele Versuche war eine definierte Anzahl an vitalen Zellen entscheidend, daher wurden die Zellen mithilfe des CASY[®] 1 Model TT quantifiziert. Dazu wurden sie nach dem Ablösen in CASY[®]ton Lösung in einer Verdünnung von 1:500 aufgenommen und vermessen. Die Zellen werden dabei durch eine Pore angesaugt und angelegte Elektroden bestimmen die Leitfähigkeit, die bei vitalen Zellen mit intakter Zellmembran kaum

vorhanden ist. Tote Zellen mit defekter Zellwand leiten den Strom hingegen gut. Diese Methode wird als Stromausschlussverfahren bezeichnet. In die Auswertung wurden alle Zellen einbezogen, deren Größe zwischen 9 und 40 μm lag. Die kleineren Partikel stellen tote Zellen oder Zellreste und die größeren Zellagglomerate dar. In beiden Fällen sind dies Zellreste, die nicht berücksichtigt werden sollen. Mit dieser Methode konnte zuverlässig die Zellgrößenverteilung und Zellanzahl bestimmt werden.

4.3 Zellmigration

Der Einfluss von latenter Heparanase auf MV3 Zellen wurde u.a. durch die Messung der Zellmigration auf Fibronectin bestimmt. Fibronectin vermittelt *in vivo* die Adhäsion der Zellen an die extrazelluläre Matrix über verschiedene Integrine und bietet somit die optimale Aussagekraft, ob latente Heparanase die Integrin-vermittelte Migration beeinflusst. Dazu wurde jede Vertiefung einer 24-well-Platte mit 200 μL einer 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konzentrierten Fibronectin-PBS-Lösung für mindestens zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Die überstehende Flüssigkeit wurde daraufhin entfernt und ein Waschschriff mit PBS durchgeführt. Bis zur Verwendung der beschichteten Platte wurde diese bei 2 bis 8°C gelagert und zur Vermeidung der Austrocknung mit 200 μL PBS pro well befüllt. Während sich die Fibronectinvernetzung bildete, wurden die Zellen, wie unter 4.2.2 beschrieben, vorbereitet und in der Konzentration von $1,25 \times 10^5$ pro 200 μL Nährmedium aufgenommen und in die Vertiefungen der vorbereiteten Platte pipettiert. Die Zellen konnten über Nacht anwachsen und bildeten eine konfluente Zellschicht ohne größere, unbewachsene Stellen. Um die Migration messen zu können, wurde mit einer Pipettenspitze ein etwa 500 μm breiter Spalt von Zellen befreit, ohne die darunterliegende Fibronectinbeschichtung zu beschädigen. Nachdem die abgelösten Zellen durch Mediumwechsel entfernt wurden, wurde die Platte unter Inkubationsbedingungen in das Mikroskop überführt. Alle 60 Minuten wurden über acht Stunden Standbilder der Zellen um den Scratch aufgenommen und die zellfreie Fläche anschließend auf jedem Bild vermessen. Die größte Fläche zu Beginn der Messungen wurde für Auswertungen auf 100 % normiert und jede weitere auf diese bezogen. Dadurch wurde die Vergleichbarkeit der Messungen gewährleistet.

4.4 Zelladhäsion unter physiologischen Flussbedingungen

Die Bindung von VLA-4-exprimierenden MV3 Zellen an immobilisierte VCAM-1-Moleküle wurde unter Flussbedingungen getestet, die vergleichbar mit den physiologischen Gegebenheiten in einer postkapillaren Venole sind. Diese Experimente lassen eine Aussage über die Integrin-vermittelte Adhäsion von Melanomzellen an das Endothel in vivo zu.

Die verwendete Apparatur wurde bereits in früheren Publikationen¹⁶⁵ und Dissertationen^{194–196} detailliert vorgestellt und wird daher in dieser Arbeit nicht genauer beschrieben. An dieser Stelle seien jedoch wichtige Messparameter und abweichende Ansätze vermerkt.

4.4.1 Reinigung und Vorbereitung der Deckgläser

Zur VCAM-1 Immobilisierung auf Deckgläsern mussten diese zunächst gereinigt und präpariert werden. Etwa 30 runde Glasplättchen mit einem Durchmesser von 18 mm und einer Dicke von 0,13 - 0,16 mm wurden in einer Mischung aus 15 mL Wasserstoffperoxid (30 %) und 35 mL konzentrierter Schwefelsäure (98 %) für 30 Minuten bei 80°C im Ultraschallbad behandelt. Die Lösung wurde anschließend entfernt und zehn Waschschrte mit demineralisiertem Wasser folgten. Eine weitere Behandlung im Ultraschallbad für 30 Minuten bei 80°C in einer Lösung von 50 mL demineralisiertem Wasser, 10 mL Wasserstoffperoxid (30 %) und 10 mL Ammoniaklösung (26 %) schloss sich an. Die Flüssigkeit wurde anschließend abgegossen und die Plättchen wiederum zehnmal mit demineralisiertem Wasser gespült. So wurde sichergestellt, dass alle Silanolgruppen des Glases in reduzierter Form vorliegen. Zur schnelleren Trocknung wurden die Plättchen mit einer Pinzette vereinzelt und bei 60°C im Trockenschrank getrocknet. Nachdem die Deckgläser vollständig getrocknet waren, wurde an die Silanolgruppen der Glasoberfläche Cyanurchlorid gebunden. Dieses dient in einem späteren Schritt als Linker zur VCAM-1-Fc-Chimäre. In etwa 25 mL wasserfreiem Chloroform wurde Cyanurchlorid in der Konzentration 1 mg/mL gelöst und zu den Deckgläsern gegeben. Nach 30 Minuten im Ultraschallbad bei Raumtemperatur wurde die Cyanurchlorid-Lösung entfernt und zum Spülen 25 mL wasserfreies Chloroform ergänzt. Dieser Ansatz wurde noch 20 Minuten im Ultraschallbad belassen, bevor die Glasplättchen im Trockenschrank (60°C) getrocknet wurden. Trocken gelagert konnten die präparierten Deckgläser für drei Monate verwendet werden.

4.4.2 Kovalente Bindung von rekombinantem VCAM-1 an die Oberfläche von präparierten Deckgläsern

Zur kovalenten Bindung von VCAM-1 wurde ein vorbereitetes Deckglas in die Vertiefung einer 6-well-Platte überführt und mit einer Lösung von 10 μL VCAM-1-Fc-Chimäre (0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 5 μL BSA-Lösung (4 % (m/V)) und 65 μL Boratpuffer (pH 8,8) für 12 Stunden bei 4°C inkubiert. Die überschüssige Lösung mit ungebundenen Molekülen wurde kurz vor der Verwendung mit PBS abgespült. Über die Cyanurchlorid-Bindung wurde so eine Proteinschicht bestehend aus VCAM-1-Proteinen kovalent an die Oberfläche des Deckglases gebunden. Das Deckglas konnte derart präpariert in die Apparatur eingebaut werden. Dies musste nach Entfernen der Proteinlösung zügig erfolgen, um die Austrocknung des Plättchens und somit die Zerstörung der Proteinschicht zu verhindern.

4.4.3 Bestimmung der Zelladhäsion unter physiologischen Flussbedingungen

Runde Deckgläser mit einem Durchmesser von 18 mm und einer Stärke von etwa 0,3 mm wurden wie unter 4.4.1 und 4.4.2 beschrieben über eine Cyanurchlorid-Bindung mit einer humanen, rekombinanten VCAM-1-Fc-Chimäre beschichtet. Nachdem das Deckglas in der Durchflusskammer eingebaut worden war, wurde diese im Mikroskop Axiovert 200 fixiert. Durch die Befüllung eines höher gelagerten Fließmittelvorratgefäßes wurde ein hydrostatischer Druck erzeugt, der in der Kammer eine Scherrate G von 200/s einstellte, wie sie in postkapillaren Venolen vorliegt. Mit 0,02 % EDTA (m/V in PBS) abgelöste Zellen wurden in den Flüssigkeitsfluss der Apparatur eingeschleust und zur Adhäsion über das beschichtete Glasplättchen geleitet. Der Fluss wurde gestoppt und die Zellen konnten für fünf Minuten über VLA-4 an die VCAM-1-Moleküle adhären. Unmittelbar vor Ende der Inkubationszeit wurde eine Videoaufnahme eines repräsentativen Ausschnittes des Deckglases gestartet und der Pufferfluss wieder aktiviert. Mithilfe des Videos wurde die Anzahl der Zellen zum Zeitpunkt „Null“, d.h. vor Aktivierung des Pufferflusses und sekundenweise bis vier Sekunden nach Aktivierung des Flusstroms aufgenommen. Als Kontrolle wurde die Adhäsion von unbehandelten MV3 Wildtypzellen ohne Stimulierung und nach Aktivierung der Integrine mit Mn^{2+} -Ionen (1 und 5 mmol/L) vermessen und mit der von MV3 Zellen mit verminderter SDC-4-Expression verglichen. Außerdem wurde der Effekt von latenter Heparanase auf die zwei Zelltypen in Abhängigkeit von der Einwirkzeit und der Konzentration untersucht.

4.5 Konfokale-Laserscanning-Mikroskopie

Die Aktivierung von Integrinen durch latente Heparanase wurde zum einen gemessen an der erhöhten Bindung des VLA-4 an seinen physiologischen Partner VCAM-1 und zum anderen an der Konzentrierung von Integrinen in Clustern an der Zelloberfläche. Die Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht, Strukturen in der Zelle mittels Antikörperbindung zu markieren und einen an den Antikörper gebundenen Fluorophor nach Anregung durch einen Laser mit bestimmter Wellenlänge zur Emission von längerwelligem Licht zu stimulieren. In dieser Arbeit wurde Vinculin in den MV3 Zellen kenntlich gemacht und die Veränderung der Vinculinspots nach Zusatz von latenter Heparanase untersucht.

4.5.1 Detektion von Vinculin in fokalen Adhäsionsclustern

MV3 Zellen wurden mit EDTA-Lösung abgelöst und $2,5 \times 10^5$ Zellen pro präpariertem Plättchen (siehe Kap. 4.4.2) in 2 mL Nährmedium ausgesät. Zum Anwachsen wurden die Zellen für 24 Stunden im Inkubator gelagert. Falls indiziert wurden die Zellen für 10 Minuten mit latenter Heparanase (2 $\mu\text{g/mL}$), KKDC-Peptid (50 $\mu\text{mol/L}$) oder Mn^{2+} -Ionen (1 mmol/L) versetzt. Anschließend wurden die Plättchen zweimal vorsichtig in PBS getaucht, um ungebundene Zellen abzulösen und die Zusätze zu entfernen. Zur Fixierung der Zellen wurde eine 6-well-Platte mit je 2 mL 3,7%iger Formaldehyd-Lösung (V/V) pro Vertiefung befüllt und ein Deckglas pro Well mit den Zellen nach oben für 15 Minuten bei Raumtemperatur eingelegt. Danach wurden drei Waschschrte mit PBS für fünf Minuten durchgeführt. Mit 2 mL 0,05%iger Triton[®] X 100-Lösung (V/V) wurden die Zellen auf den Plättchen permeabilisiert, damit der Antikörper durch die Zellmembran das intrazelluläre Vinculin erreichen kann. Nach zehn Minuten wurden die Plättchen mit der Zellseite nach unten in einen Tropfen von 40 μL BSA-Lösung (1 %, m/V) gelegt und für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer Kammer mit hoher Luftfeuchtigkeit zum Schutz vor Verdunstung der Lösung gelagert. Nach Absättigung unspezifischer Bindungen durch die BSA-Lösung wurden die Zellen auf den Deckgläsern mit der entsprechenden primären Antikörper-BSA-Lösung versetzt. Dafür wurden je 20 μL der Lösung auf ein Stück Parafilm pipettiert und die Plättchen wie im vorherigen Schritt in den Tropfen gelegt. Um die Verdunstung der Antikörper-Lösung zu vermeiden, wurde auch dieser Ansatz in eine Kammer mit hoher Luftfeuchtigkeit überführt und für eine Stunde unter Lichtschutz bei Raumtemperatur inkubiert. Überschüssige Lösung wurde durch dreimaliges Waschen für je fünf Minuten in einer 0,05%igen Tween[®] 20/PBS-Lösung (V/V) entfernt. Die Bindung des

sekundären Antikörpers erfolgte analog und wurde ebenfalls für eine Stunde unter Lichtschutz durchgeführt. Nach drei Waschschrritten mit Tween[®] 20-Lösung wurden die fixierten Zellen mit einer DAPI-Lösung angefärbt, die den Zellkern der Zelle bei Anregung blau fluoreszieren lässt, da sie an die Adenin-Thymin-reichen Regionen in der Zelle bindet. Hiernach wurden die Deckgläser zuerst zweimal für 5 Minuten mit PBS und abschließend mit demineralisiertem Wasser gewaschen. Objektträger wurden vorbereitet, indem zwei Tropfen Fluoromont[™] aufgetragen wurden und die Deckgläser mit der Zellseite nach unten in dieser Flüssigkeit fixiert wurden. So wird eine optimale Fluoreszenz und Haltbarkeit der Proben sichergestellt. Die Proben wurden für 24 Stunden getrocknet und anschließend die Ränder mit klarem Nagellack luftdicht verschlossen. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden am Konfokalmikroskop Nikon Eclipse Ti durchgeführt und zur repräsentativen Auswertung wurden die Flächen der Zellen ausgemessen und die Vinculinspots pro Zelle ausgezählt. Die Anzahl der Spots wurde durch die jeweilige Zellfläche geteilt, so dass die Ergebnisse zuerst in der Einheit Spots pro μm^2 bestimmt wurden. Je Versuch wurden die Werte für MV3 Wt Zellen in der Einheit Vinculinspots/ μm^2 auf 100 % normiert und die restlichen Ergebnisse auf diesen Wert bezogen.

4.6 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wurde in dieser Arbeit auf zweierlei Weise genutzt: zum einen als klassische Antigen-Antikörper-Reaktion und zum anderen zur Bestimmung der Bindungsaffinität des physiologischen Bindungspaares VLA-4 und VCAM-1. Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der Vermessung der Größe und Granularität einzelner Zellen. Darüber hinaus kann mit einer vorhergehenden Behandlung der Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern die Expression der Zielstruktur bestimmt werden. Hierzu werden die Zellen in einer Trägerflüssigkeit hintereinander durch einen Lichtstrahl definierter Wellenlänge geleitet. Durch Lichtbrechung des Laserstrahls je nach durchlaufender Zelle detektieren Forward und Sideward Scatter Dioden (FSC und SSC) zum einen die Größe und zum anderen die Granularität jeder Zelle. Über Spiegel, die nur bestimmte Wellenlängen passieren lassen, kann die spezifische emittierte Fluoreszenz gemessen werden. So ist es möglich jede Zelle auf ihre Vitalität und Expression der Zielstruktur zu untersuchen. Neben den Zellen, die mit primären und sekundären Antikörpern versetzt wurden, wurden bei jedem Experiment außerdem die Eigenfluoreszenz der Zellen und die unspezifische Bindung des primären und sekundären Antikörpers detektiert, um eine Verzerrung der Ergebnisse zu vermeiden. Da die eingesetzten primären Antikörper keine veränderte Fluoreszenz im Gegensatz zu unbehandelten Zellen zeigten, wurden

nur die Werte der unspezifischen Bindung des sekundären Antikörpers von den Messwerten subtrahiert.

4.6.1 Bestimmung der Expression von Integrinen auf MV3 Zellen

Das Nährmedium der Zellen wurde 24 Stunden vor der Vermessung gegen MV3 Hungermedium ausgetauscht, damit etwaige Effekte des FKS ausgeschlossen werden konnten. Die Zellen wurden am nächsten Tag wie zur Subkultivierung behandelt (siehe Kap. 4.2.2) und die Zellzahl bestimmt (siehe Kap. 4.2.4). Anschließend wurden die Zellen in 1 mL Waschpuffer resuspendiert, bei 500 rpm und 10°C für 5 Minuten zentrifugiert und der Puffer abgesaugt, so dass das Zellpellet am Boden des Reagiergefäßes verblieb. Ab diesem Punkt wurden die Zellen falls erforderlich nur noch mit den oben angegebenen Zentrifugationseinstellungen behandelt. Der Waschvorgang wurde noch ein weiteres Mal wiederholt. Am Ende des zweiten Waschschrilles wurden je 1×10^5 Zellen in 90 μL aufgenommen. Die Zellen wurden untersucht hinsichtlich ihrer Expression von Integrin Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, αU , $\beta 1$ und $\beta 3$. Dazu wurden je 0,25 μg ($\alpha 1$, $\alpha 4$, αU , $\beta 1$ und $\beta 3$) bzw. 1 μg ($\alpha 5$) primärer Antikörper nach Herstellerangaben zu je 1×10^5 Zellen gegeben und für 60 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen zentrifugiert, die überstehende Lösung mit ungebundenem Antikörper entfernt, einmal in 1 mL Waschpuffer gewaschen und zur Wiederaufnahme der Zellen 90 μL Waschpuffer zugeführt. Zu jedem Ansatz wurde entweder der sekundäre Antikörper anti-Maus in einer Endverdünnung von 1:20 ($\alpha 4$, $\alpha 5$, αU , $\beta 1$ und $\beta 3$) oder anti-Schaf in einer Endverdünnung von 1:100 ($\alpha 1$) zugegeben und für weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschrillen wurden die Zellen in 200 μL resuspendiert und am Durchflusszytometer vermessen. Die an die Antikörper konjugierten Fluoreszenzfarbstoffe CFS oder NL493 wurden durch den Argonlaser des Durchflusszytometers bei 488 nm angeregt und das emittierte Licht von der Fluoreszenzdiode 1 (530 nm) detektiert.

4.6.2 Bestimmung der Expression von Syndekan-1 und 4 auf MV3 Zellen

Ähnlich wie bei der Bestimmung des Integrinstatus wurde die Expression der Syndekane mittels Antikörpern bestimmt. Dazu wurden die Zellen zunächst behandelt wie in Kap. 4.6.1 beschrieben. Nach dem Waschen der Zellen wurden sie aliquotiert zu je 5×10^5 Zellen in 90 μL Waschpuffer. Je 1,25 μg SDC-4 Antikörper wurde zu drei Ansätzen pro Zelltyp pipettiert und für 45 Minuten bei Raumtemperatur gelagert. Nach zwei Wasch-

schritten wurden die Zellen in je 90 μL aufgenommen, mit einer Endkonzentration von 1:200 mit anti-Ziege Antikörpern versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtschutz inkubiert. Zwei weitere Waschschriffe folgten, bevor die Zellen in 250 μL resuspendiert und am Durchflusszytometer vermessen wurden.

Der mit dem Fluoreszenzfarbstoff direkt gekoppelte Antikörper für SDC-1 wurde ebenfalls zu 5×10^5 Zellen in 90 μL Waschpuffer gegeben und für 45 Minuten bei 2 bis 8°C lichtgeschützt inkubiert. Nach zwei Waschschriffen konnten die Zellen direkt am Durchflusszytometer vermessen werden.

4.6.3 Bestimmung der VCAM-1-Bindung zu dem Integrin VLA-4 auf MV3 Zellen

Die Zellen wurden wie unter 4.2.2 beschrieben abgelöst und in einem definierten Volumen MV3 Hungermedium aufgenommen. Je nach Versuchsansatz wurden die Zellen mit 2, 5 oder 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ latenter Heparanase und/oder 50 μg Heparinen/100.000 Zellen sowie mit 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ KKDC-Peptid für verschiedene Inkubationszeiten (5, 10, 15, 30 oder 60 Minuten) versetzt und während dieser Zeit im Inkubator bei 37°C gelagert. Durch eine schonende Zentrifugation bei 10°C und 500 rpm für fünf Minuten konnte das überstehende Medium mit dem nicht gebundenen Anteil an latenter Heparanase, KKDC-Peptid oder Heparinen entfernt werden. Das Zellpellet wurde danach zweimal gewaschen. Dazu wurde es in Waschpuffer resuspendiert und bei gleichbleibenden Bedingungen zentrifugiert. Nach dem zweiten Waschschriff wurden die Zellen zu je 1×10^5 pro 30 μL in Reagiergefäße aliquotiert. Drei Gefäße mit demselben Ansatz wurden anschließend mit je 10 μL rekombinantem VCAM-1 (0,04 g/L) für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschriffen wurde ein gegen die sechs Histidin-Reste (His-tag) des rekombinanten Proteins gerichteter sekundärer Antikörper zugegeben und für 30 Minuten auf Eis gelagert. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Proben weitestgehend unter Lichtausschluss behandelt. Zur durchflusszytometrischen Vermessung wurden die Zellen zweimal mit Waschpuffer gewaschen und im letzten Schriff in 250 μL Waschpuffer aufgenommen.

4.7 Bestimmung von Bindungsaffinitäten mittels Surface Acoustic Wave Technologie

Die Affinitäten zwischen latenter Heparanase und verschiedenen potentiellen Bindungspartnern wurden mittels der Surface Acoustic Wave Technologie bestimmt. Sie beruht auf der Detektion kleinster Masseunterschiede durch Phasen- und Amplitudenveränderung einer induzierten akustischen Oberflächenwelle. Um diese bestimmen zu können, sind piezoelektrische Biosensoren in diesem Fall aus Quarz notwendig, die mit einem der Bindungspartner beschichtet und mit dem anderen Partner in flüssiger Phase überspült werden. Wenn es zu einem Bindungsereignis kommt, kann dieses über die Masseauflagerung umgehend detektiert werden. Die resultierenden kinetischen Daten werden durch Formeln ermittelt, die den Verlauf der Phasenveränderungen während der Messung möglichst genau beschreiben. Da die Quarzsensoren für die Immobilisierung der Proteine verschieden behandelt wurden, wird dies in den folgenden Kapiteln genauer erläutert.

Generell sind die verwendeten Quarzsensoren mit einer dünnen Goldschicht beschichtet und werden in fünf Kanäle unterteilt, die nacheinander von der Analyt enthaltenden Pufferlösung überspült werden. Neben den mobilen Sensoren aus Quarz besteht der sam^{®5} aus der Mikroflusszelle, die mit ihren elektronischen Kontakten über die aufgedampfte Goldschicht eine Oberflächenwelle in der ersten Führungsschicht des Siliciumdioxids erzeugen kann. Darüber hinaus gibt sie den Fluss der Pufferlösung über die beschichteten Oberflächen vor und wird von einem Peltier-Element umgeben, das sicherstellt, dass die Temperatur auf $\pm 0,001$ K genau eingehalten wird. Der konstante Fluss der verwendeten Flüssigkeit wird durch ein Pumpsystem aufrecht erhalten, das das angeschlossene Laufmedium erst in ein Zwischenreservoir pumpt, um Luftblasen in der Messkammer zu vermeiden. Ein weiteres Pumpsystem durchspült eine Nadel, die aus einem Autosampler die flüssigen Proben aufzieht und sie zur Vermessung in den ersten Flüssigkeitskreislauf einströmen lässt. Nachdem ein Quarz luftblasenfrei eingebaut und der Pufferfluss auf die Flussgeschwindigkeit von 40 $\mu\text{L}/\text{min}$ eingestellt wurde, muss die für den jeweiligen Quarz ideale Wechselstromspannung ermittelt werden, bei der eine Masseauflagerung am sensitivsten detektiert werden kann. Dafür werden Spektren der Phasen- und Amplitudenverschiebung zwischen der Startfrequenz 144 MHz und der Stoppfrequenz 152 MHz aufgenommen. Diese Spektren zeigen das Frequenzoptimum und die Qualität des Sensorchips an, z.B. ob die Goldoberfläche durch unsachgemäßen Umgang oder fehlerhafte Reinigung beschädigt wurde.

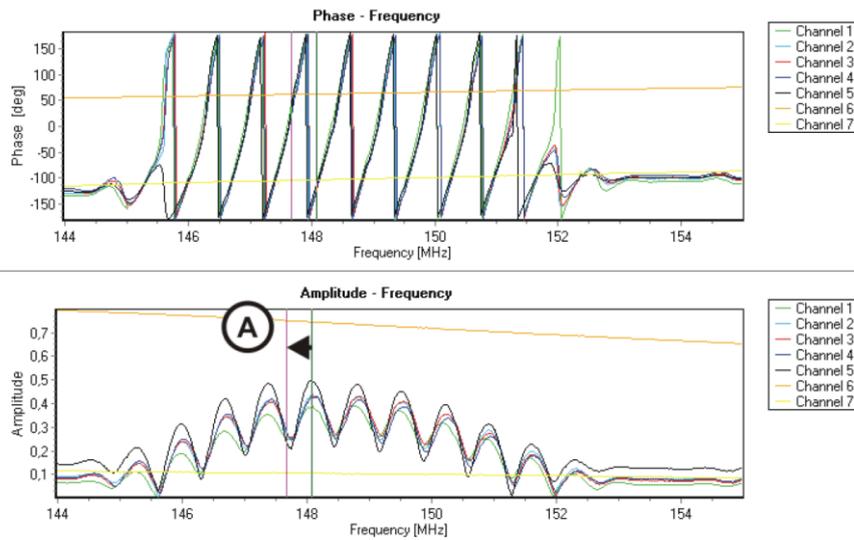


Abb. 4.1 Spektren der Phasen- und Amplitudenverschiebung während der Frequenzabtastung¹⁹⁷
 Bei der optimalen Frequenz ist die höchste Amplitudenverschiebung zu erkennen (A). Bedingt durch den Wechselstrom entsteht ein sinusförmiger Verlauf. Für die Messung werden zwei Frequenzen vermessen, zum einen die ermittelte Optimalfrequenz und zum anderen die Frequenz, die eine Phasendifferenz von 180° zur Optimalfrequenz aufweist. Diese Zwei-Frequenzen-Messmethodik garantiert die störungsfreiesten Aufzeichnungen.

Sofern der Quarzsensoren unbeschädigt ist und die Spektren wie in Abb. 4.1 einen gleichmäßigen Verlauf aufweisen, wird mit der ermittelten Frequenz die Messung gestartet. Während des Experimentes beträgt die Flussgeschwindigkeit weiterhin 40 $\mu\text{L}/\text{min}$, um die ermittelten Ergebnisse im Anschluss vergleichen zu können.

4.7.1 Immobilisierung von Proteinen auf Quarzsensoren mittels EDC/NHS

Zur Bindung der Proteine auf der Goldschicht des Quarzsensors wurden zwei unterschiedliche Verfahrensweisen genutzt. Die Immobilisierungen von latenter Heparanase und rekombinantem VCAM-1 wurden über Amidbindungen der Proteine zur Quarzoberfläche durchgeführt.

4.7.1.1 Vorbehandlung des Quarzsensors

Die gereinigten Sensoren wurden in 10 mL einer 1 mol/L 11-Mercaptoundecansäure-Lösung in absolutem Ethanol über Nacht gelagert. In dieser Zeit bildete sich über die Bindung der Thiol-Gruppen an der Goldmembran ein self assembled monolayer (SAM)

aus 11-Mercaptoundecansäure-Molekülen. Ungebundene Moleküle wurden mit absolutem Ethanol abgespült und die Oberfläche des Quarzes im Luftstrom getrocknet. Die derart aktivierten Quarze wurden bis zur Verwendung bzw. maximal drei Tage bei 2 bis 8°C gelagert.

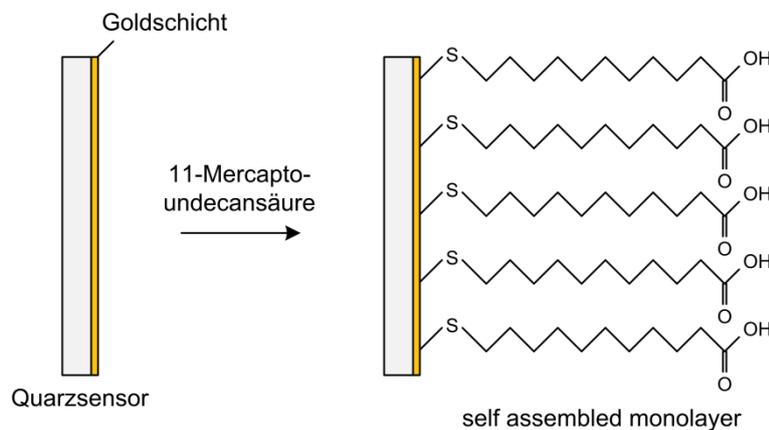


Abb. 4.2 Prinzip der Bildung des SAM von 11-Mercaptoundecansäure auf der goldbeschichteten Oberfläche des Quarzsensors

4.7.1.2 Immobilisierung des Proteins

Vor der eigentlichen Messung wurde der trockene Sensorchip in die Flusskammer des sam[®]5 eingebaut und die Kanäle luftblasenfrei mit demineralisiertem Wasser befüllt. Anschließend wurde die Flussrate auf die Geschwindigkeit von 40 µL/min eingestellt und die Aufnahme der Phasen- und Amplitudenveränderungen der Love-Scherwelle gestartet. Nach Äquilibration des Sensors durch Abspülen der ungebundenen Moleküle stabilisierten sich Phase und Amplitude und der Sensor war bereit für die Applikation der einzelnen Reagenzien zur Proteinimmobilisierung. Zwischen den Injektionen wurde die Oberfläche des Quarzes jeweils für fünf Minuten mit demineralisiertem Wasser gespült. Die erste Injektion enthielt eine 1:1 Mischung von insgesamt 120 µL EDC- und NHS-Lösung zur Aktivierung der Säurefunktion. Das zu immobilisierende Protein, z. B. latente Heparanase, wurde als nächstes über die Quarzoberfläche geleitet, wobei eine deutliche Erhöhung der Phase durch die Masseauflagerung detektiert wurde. Nach Beendigung der Injektion kehrte der Graph nicht auf das vorherige, niedrige Phasenniveau zurück, sondern verblieb auf dem erhöhten Phasenniveau, da das Protein weiterhin fest gebunden an der Quarzoberfläche vorlag. In diesem Schritt bildete die aktivierte Säurefunktion mit den Amingruppen des Proteins stabile Amidverbindungen aus. Dadurch wurde das Protein kovalent auf der Goldschicht gebunden. Um eine unspezifische Bindung des

Analyten durch potentiell noch ungebundene, reaktive Carboxylatgruppen zu vermeiden, wurden 120 μL einer 1:1 Mischung von Ethanolamin und Ammoniumacetat-Lösung appliziert, die die übrigen Säurefunktionen absättigten. Die bei dieser Immobilisierung ablaufenden chemischen Reaktionen sind in Abb. 4.4 erläutert. Die Immobilisierung ist in Abb. 4.3 als Graph der Phasenverschiebung nachzuvollziehen.

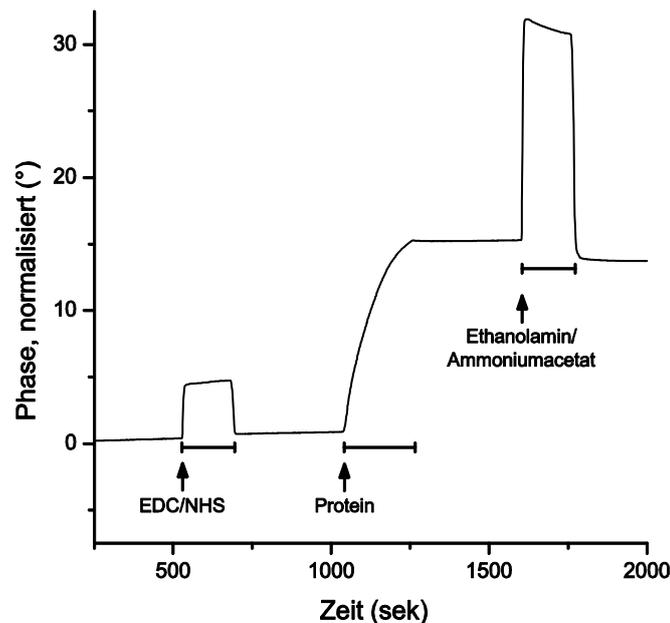


Abb. 4.3 Phasendiagramm der Immobilisierung eines Proteins mit EDC/NHS
Die vertikalen Pfeile kennzeichnen den Beginn der Injektion der angegebenen Lösungen zur Immobilisierung und die horizontalen Striche geben die Dauer der Injektion an. Die eckigen Graphverläufe während der Injektionen von EDC/NHS und Ethanolamin werden verursacht durch Viskositätsunterschiede. Eine konstante Masseauflagerung ist bei der Injektion des Proteins zu erkennen, so dass eine Erhöhung des Phasenniveaus die Folge ist.

Für diese Immobilisierung musste die injizierte Proteinmenge bei jedem untersuchten Protein individuell angepasst werden. Die in der Tabelle 4.10 angegebenen Mengen und Konzentrationen wurden für die Proteine latente Heparanase und VCAM-1 als Fc-Chimäre ermittelt und verwendet.

Tabelle 4.10 Immobilisierungsdaten von Proteinen auf Quarzsensoren mittels EDC/NHS

Protein	immobilisierte Menge
latente Heparanase	5 μg in 160 μL Sörensen-Phosphatpuffer (pH 8,5)
VCAM-1, Fc-Chimera	2,5 μg in 160 μL Sörensen-Phosphatpuffer (pH 8,5)

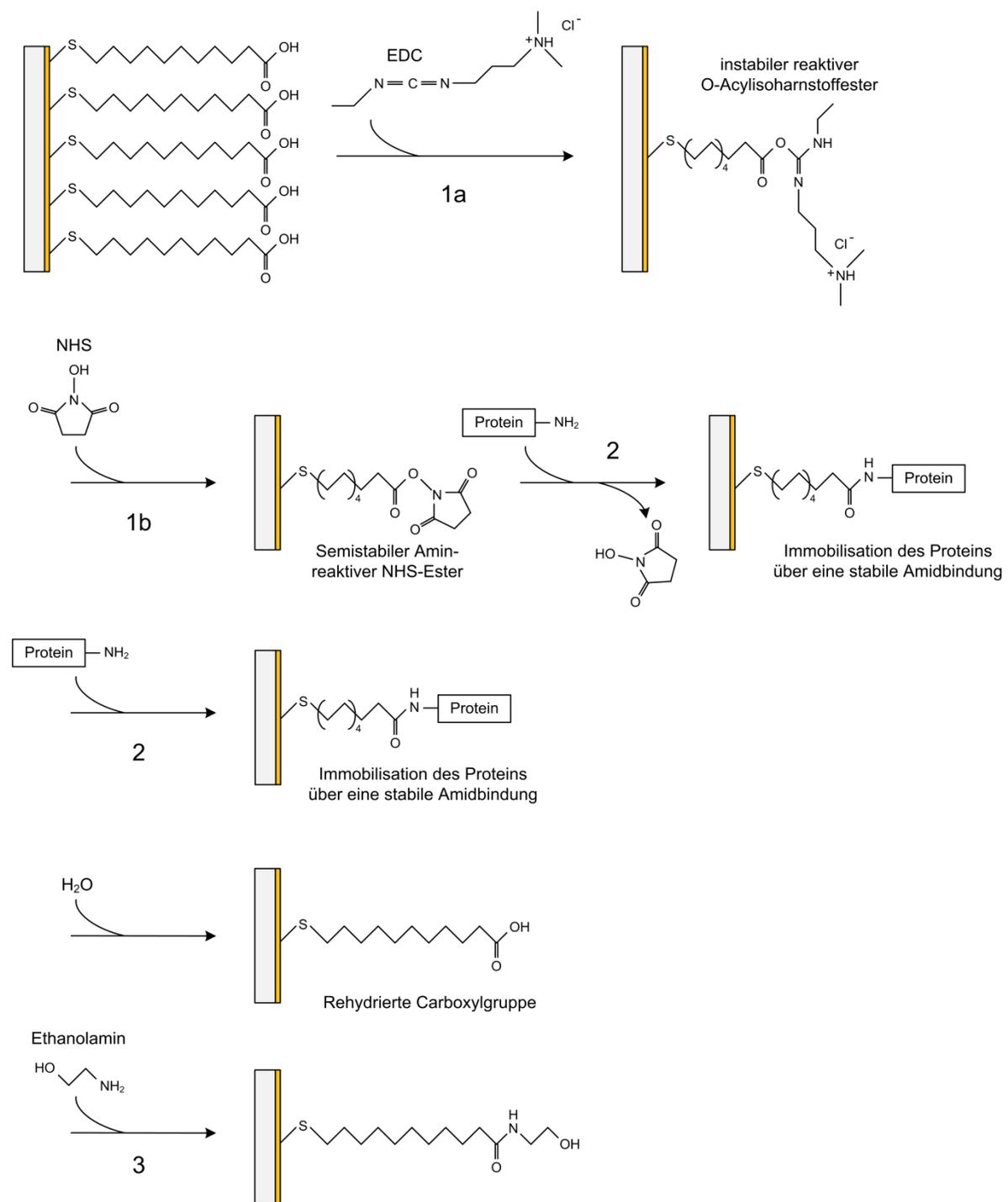


Abb. 4.4 Immobilisierung von Proteinen mit EDC/NHS

EDC bindet an das SAM über die Carbonsäurefunktion der 11-Mercaptoundecansäure und bildet einen instabilen O-Acylisoharnstoffester (1a). Dieser Ester reagiert entweder mit NHS zu einem Amin-reaktiven Ester (1b) und nach Zugabe des Proteins zu einer stabilen Amidbindung (2), oder geht direkt mit einer freien Aminfunktion des Proteins eine Amidbindung ein. Da die Reaktionen in einer wässrigen Umgebung stattfinden, kann es auch zu einer Hydrolyse und Wiederherstellung der Carbonsäurefunktion kommen. Um während der Zugabe des Analyten unspezifische Bindungen über die Carbonsäure oder den reaktiven O-Acylisoharnstoffester zu vermeiden, werden diese Verbindungen in einer weiteren Injektion mit Ethanolamin in eine inaktive Verbindung überführt (3).

Die hier verwendete Methodik gewährleistet eine zuverlässige Immobilisierung des Proteins auf der Goldoberfläche des Sensors, aber eine Aussage über räumliche Ausrichtung des Moleküls kann nicht getroffen werden. Mit der im folgenden Kapitel vorgestellten Methodik wurde es ermöglicht, die Orientierung des Moleküls auf der Goldmembran zu beeinflussen.

4.7.2 Immobilisierung von Proteinen auf Quarzsensoren mittels Chelator

4.7.2.1 Vorbehandlung des Quarzsensors

Die gereinigten Quarze wurden in einer 1 mmol/L Hexadecan-1-thiol Chloroformlösung über Nacht eingelegt, so dass sich durch Bindung der Thiol-Gruppen an die Goldmoleküle eine SAM ausbilden konnte (Abb. 4.5).

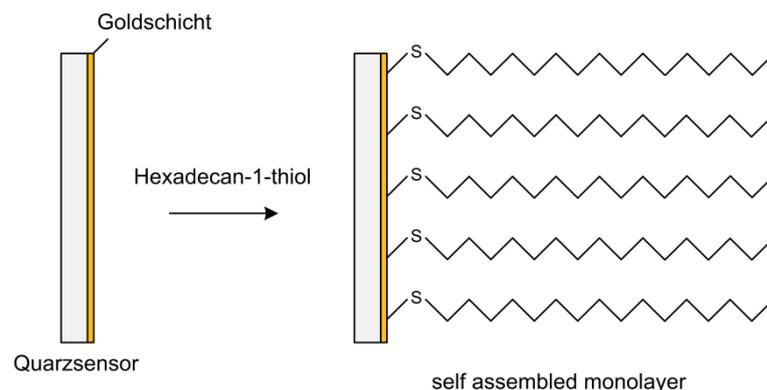


Abb. 4.5 Prinzip der Bildung des SAM von Hexadecan-1-thiol auf der goldbeschichteten Oberfläche des Quarzsensors

Die Quarze wurden anschließend mit Ethanol abgespült und im Druckluftstrom getrocknet. Zur Generierung einer weiteren Lipidschicht an die SAM wurde über die Langmuir-Blodgett-Technik eine zweite Membran erzeugt. Hierzu wurde eine Filmwaage verwendet, deren Wasserreservoir vor der Befüllung mit Ethanol gereinigt wurde, um etwaige Rückstände von Lipiden zu entfernen. Nach einem weiteren Waschschrift mit Wasser wurde es mit demineralisiertem Wasser gefüllt und mit etwa 10 μL einer bestimmten Lipidmischung überschichtet. In dieser Arbeit wurde eine Mischung aus 80 mol% DPPC (3 μL ; 10 mmol/L) und 20 mol% des Lipid-Nickelchelators DOGS-NTA (7,5 μL ; 1 mmol/L) verwendet. Die Lipide lagen in Chloroform gelöst vor, daher wurde nach der Applikation auf der Wasseroberfläche 10 Minuten gewartet, um die Verdunstung des Chloroforms

und die Orientierung der lipophilen Kohlenwasserstoffketten zur Luft und der hydrophilen Gruppen zur Wasserphase zu gewährleisten (Abb. 4.6). Diese Ausrichtung der Lipide nach ihrer Polarität ist ein wichtiger Vorgang, der vor einer Weiterführung der Beschichtung beendet sein muss.

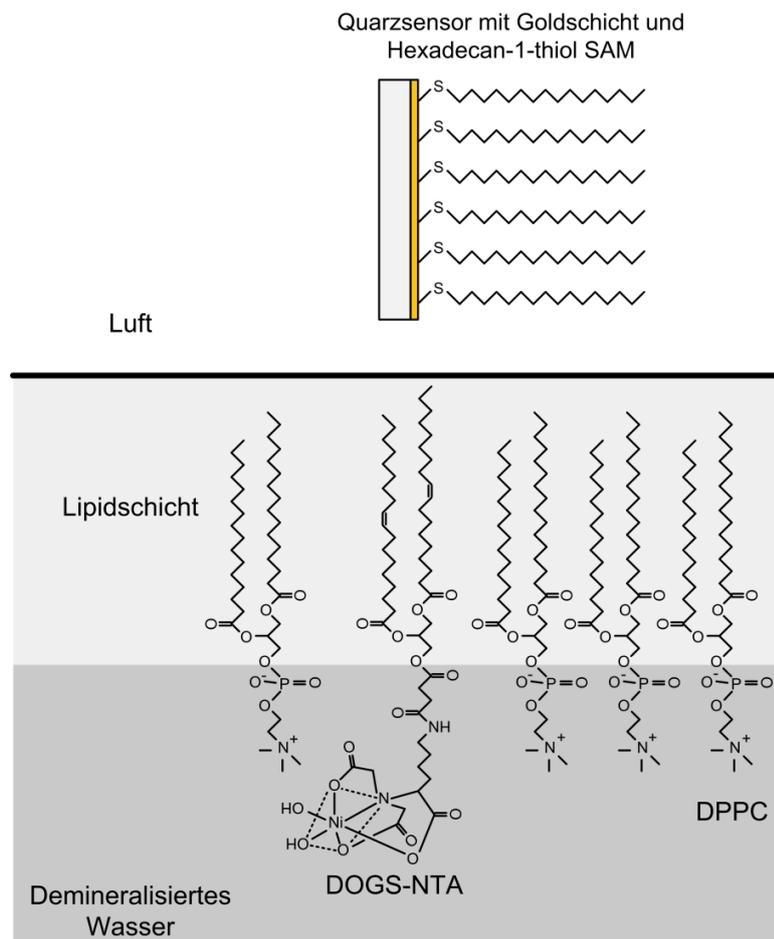


Abb. 4.6 Schema der Langmuir-Blodgett-Immobilisierung einer Membran auf einem goldbeschichteten Quarzsensoren

Nach Applikation des Lipidgemisches aus DPPC (80 mol%) und DOGS-NTA (20 mol%) auf der Wasseroberfläche orientieren sich die hydrophoben Strukturen der Moleküle zur Luft und die hydrophilen zum Wasser. Der beschichtete Quarzsensoren wird an einer Aufhängung unmittelbar über der Wasseroberfläche installiert und langsam durch die Lipidschicht geführt.

In vorherigen Experimenten wurde der Kollapsdruck der Lipidmischung bestimmt, d.h. der Druck, bis zu dem die Lipide auf der Wasseroberfläche verdichtet werden können, bevor der Lipidfilm bricht. Für die Beschichtung der Quarze müssen die Lipide sehr dicht auf der Wasseroberfläche vorliegen, nur dann ist eine gleichmäßige und ausreichende Beschichtung gewährleistet. Der Druck wird an der Filmwaage über einen frei hängenden Kraftaufnehmer detektiert. Der gemessene Kollapsdruck der DPPC/DOGS-NTA-Lipidmischung betrug etwa 60 mN/m. Um das Brechen des Lipidfilmes in jedem Fall zu

vermeiden, wurde der für die Beschichtung angewandte Kompressionsdruck bei 54,1 mN/m festgelegt. Dadurch wurde eine optimale Verdichtung des Lipidfilms für die Beschichtung gewährleistet. Eine Barriere erzeugte anschließend den gewünschten Druck durch langsames Komprimieren des Lipidfilms mit einer Geschwindigkeit von 350 $\mu\text{m/s}$. Sobald dieser erreicht wurde, wurde ein vorbehandelter Quarz an einem Lift installiert und langsam durch die Lipidschicht in das Wasser getaucht (Abb. 4.7). Während des Absenkens banden die lipophilen Kohlenwasserstoffketten des Hexadecan-1-thiol-SAM auf dem Quarzsensoren über hydrophobe Wechselwirkungen an die DPPC und DOGS-NTA-Moleküle auf der Oberfläche des Wasserfilms. Nachdem der Quarz vollständig benetzt war, wurde die Halterung gelöst und der Quarz fiel unter Wasser in ein Behältnis, mit dem er später entnommen werden konnte. Der Lipidfilm auf der Wasseroberfläche wurde mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und die Barriere zurückgefahren, so dass sich die Lipide wieder an der Wasseroberfläche ausrichten konnten. Nach einer weiteren Kompression wurde der restliche Lipidfilm entfernt und erst dann die Kammer mit dem beschichteten Quarz entnommen, um unspezifische Bindungen der Lipide an die entstandene Lipiddoppelschicht zu verhindern.

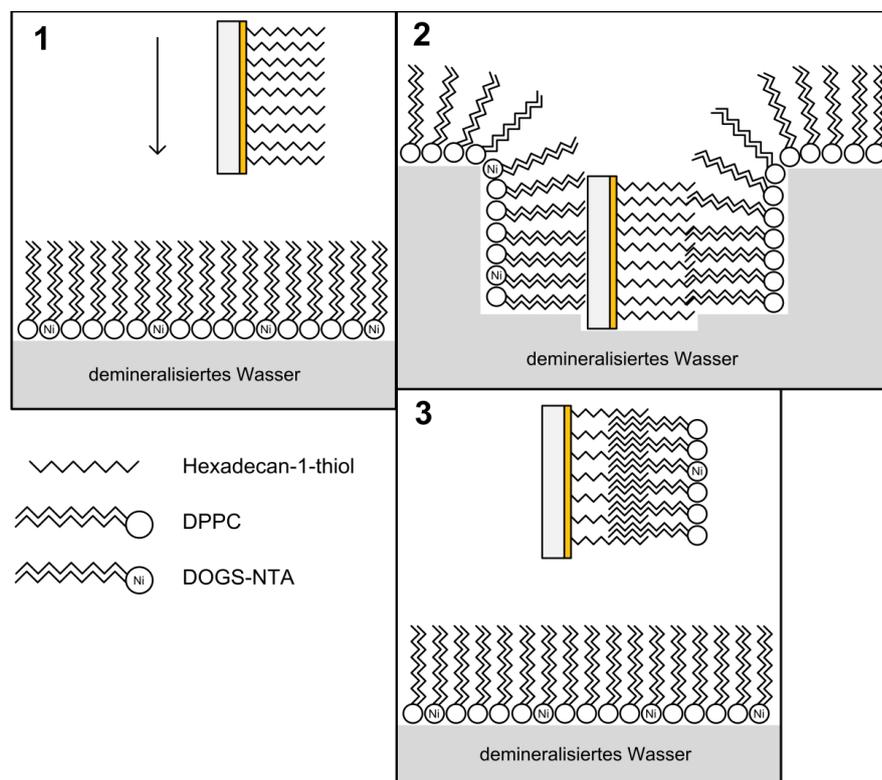


Abb. 4.7 Beschichtung des hydrophobisierten Quarzsensors mittels Langmuir-Blodgett-Technik. Der Quarzsensoren wird über der Lipidschicht fixiert (1) und langsam durch den Lipidfilm geführt (2). Über hydrophobe Wechselwirkungen bildet sich eine definierte Lipiddoppelschicht auf dem Sensorchip (3).

Zur Verwendung des Quarzes am sam[®]5 muss ein trockener Einbau des Sensors gewährleistet sein. Nach der Behandlung des Sensors an der Filmwaage liegt die erzeugte Doppelmembran noch hydratisiert vor und kann bei Kontakt mit Luft beschädigt werden. Um dem zu entgehen, wurde die Membran mithilfe des Zuckers Trehalose stabilisiert. Durchgeführt wurde dies wie folgt: Die Auffangkammer mit dem Quarz war von der vorherigen Behandlung noch mit Wasser gefüllt. Das Wasser wurde entfernt und bevor die Oberfläche der Membran austrocknen konnte, wurde eine 1,667 µmol/L Trehalose-Lösung zugegeben. Für 15 Minuten verblieb der Quarz in etwa 10 mL Trehalose-Lösung, bevor er aus der Kammer entnommen und bei Raumtemperatur getrocknet wurde.

4.7.2.2 Immobilisierung des Proteins

Der Sensor wurde in die Messeinheit des sam[®]5 eingebaut und die Flussgeschwindigkeit auf 40 µL Puffer pro Minute eingestellt. Die Lipide wurden rehydratisiert und die Trehalose ausgewaschen. Nach dieser Äquilibrierung wurde die Flussgeschwindigkeit auf 20 µL/min reduziert und das entsprechende rekombinante Protein mit His-tag wie in Tabelle 4.11 angegeben injiziert. Die verlangsamte Flussgeschwindigkeit sollte viele Bindungen zwischen den Lipid-Nickelchelatoren der Membran und der His-tag Funktion der Proteinmoleküle ermöglichen. In Abb. 4.8 ist das Phasendiagramm der Immobilisierung dargestellt. Nach abgeschlossener Injektion des Proteins wurde der Pufferfluss auf 40 µL/min erhöht und die Verdünnungsreihe injiziert.

Tabelle 4.11 Immobilisierungsdaten von Proteinen auf Quarzsensoren mittels Chelator

Protein	immobilisierte Menge	Immobilisierungspuffer
Syndekan-4	2,5 µg in 160 µL	PBS
Integrin α4β1	2 µg in 160 µL	PBS mit 1 mmol/L Ca ²⁺ und Mg ²⁺ , 0,5 mmol/L Mn ²⁺
Integrin αUβ5	2 µg in 160 µL	PBS mit 1 mmol/L Ca ²⁺ und Mg ²⁺ , 0,5 mmol/L Mn ²⁺

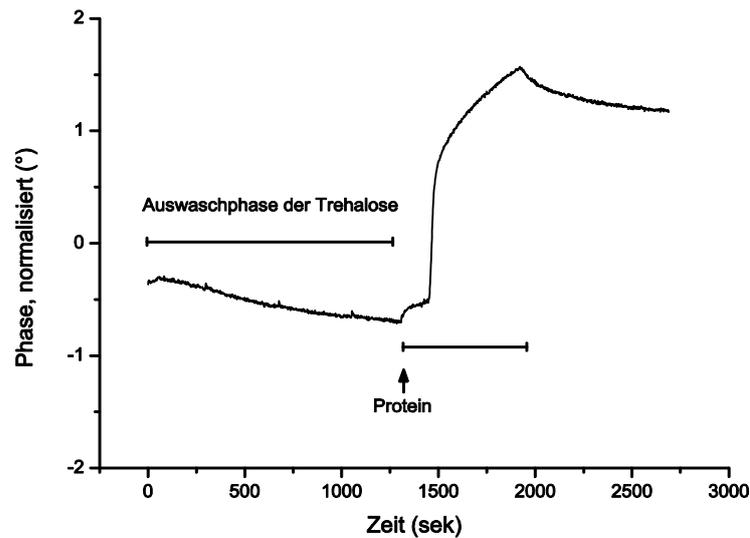


Abb. 4.8 Graph der Phasenverschiebung während der Immobilisierung eines Proteins durch Chelatierung der His-tag-Einheit

Direkt nach Einbau des Quarzsensors wurde eine längere Auswaschphase der Trehalose durchgeführt, bevor die erste Injektion stattfand. Der Pfeil kennzeichnet den Beginn der Proteininjektion, bei der eine Massbindung und -auflagerung stattfand.

4.7.3 Vermessung von Verdünnungsreihen

Sobald die Injektionen der Proteinimmobilisierung nach einer der vorab vorgestellten Methoden vollständig erfolgt waren, wurde die Geschwindigkeit des Pufferflusses auf 40 $\mu\text{L}/\text{min}$ erhöht und eine Injektionspause von mindestens fünf Minuten angeschlossen. Diese ermöglicht die Ablösung nicht fest gebundener Moleküle und verhindert mögliche Messverfälschungen. Anschließend wurden Verdünnungsreihen des Analyten mit steigender Konzentration über den proteinbeschichteten Quarzsensoren geleitet. Zwischen den einzelnen Injektionen wurde eine Wartezeit von mindestens fünf Minuten eingefügt, um eine ausreichende Auswaschphase für nur schwach gebundene Moleküle zu gewährleisten. Die Flussgeschwindigkeit von 40 $\mu\text{L}/\text{min}$ wurde im Verlauf der Experimente für die gesamte Messzeit beibehalten.

Die Phasenanstiege jeder Injektion wurden mit der Software FitMaster[®] analysiert. Dazu wurde der Graph der Phasenunterschiede 100 Sekunden vor einer Injektion und 400 Sekunden nach der entsprechenden Injektion zugeschnitten und mit diesen Ausschnitten weiterverarbeitet (siehe Abb. 4.9). Der Graphverlauf jeder Injektion wurde möglichst genau durch eine Assoziations- und Dissoziationskurve nachempfunden, die mit einer zugrundeliegenden Formel für eine 1:1 Bindung generiert wurden.

Assoziation, $t \leq t_{\text{stop}}$:

$$A(t) = A_{\text{eq}} \times [1 - e^{-(k_{\text{obs}} \times t)}]$$

Dissoziation, $t > t_{\text{stop}}$:

$$A(t) = A(t_{\text{stop}}) \times e^{-(k_{\text{diss}} \times (t - t_{\text{stop}}))}$$

Je nach Notwendigkeit konnten diese Formeln erweitert werden, um Puffereinflüsse oder Effekte bereits gebundener Analytmassse aus vorherigen Injektionen auszugleichen. Eine derartige Anpassung zeigt graphisch die Abb. 4.9.

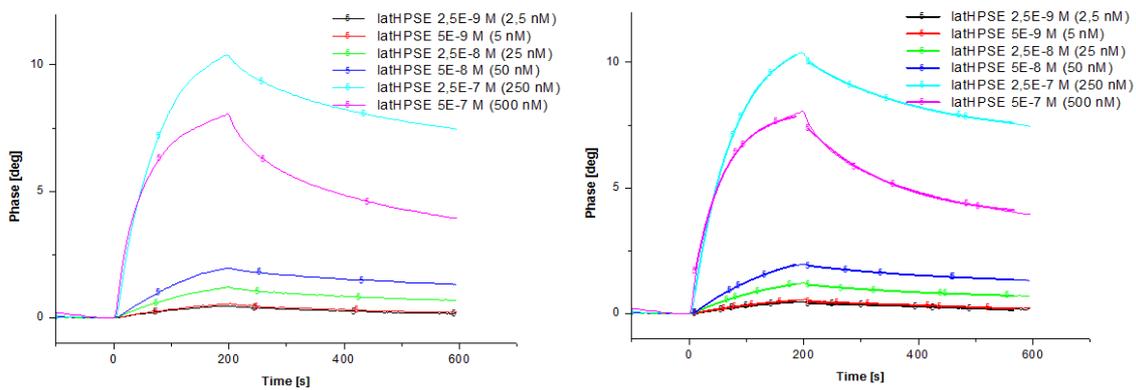


Abb. 4.9 Graphen der Phasenverschiebung während der Injektionen von ansteigenden Heparanase-Konzentrationen
Die Graphen der Injektionen wurden übereinander gelegt und zugeschnitten (links). Jede Konzentration wird dabei in einer anderen Farbe dargestellt. Der Graphverlauf wird durch Kurven, die durch Formeln mit einem zugrunde liegendem 1:1 Bindungsmodell bestimmt werden, möglichst genau nachempfunden (rechts).

Über das Modell „Konzentration gegen k_{obs} -Werte“ wurden die k_{obs} -Werte mit der Assoziationsformel zum jeweiligen Zeitpunkt τ bestimmt und gegen die jeweilige Konzentration der Injektionslösung aufgetragen (c : Konzentration).

Assoziation, $t = \tau$

$$A(\tau) = A_{\text{eq}} \times [1 - e^{-(k_{\text{obs}} \times \tau)}]$$

Mit den unten angegebenen Formeln wurden die Parameter k_{on} , k_{off} und K_D für die Bindung ermittelt und mit anderen Ansätzen verglichen werden. Somit ist k_{on} als Steigung und k_{off} als y-Achsenabschnitt abzulesen.

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{on}} \times c + k_{\text{off}}$$

$$K_D = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$$

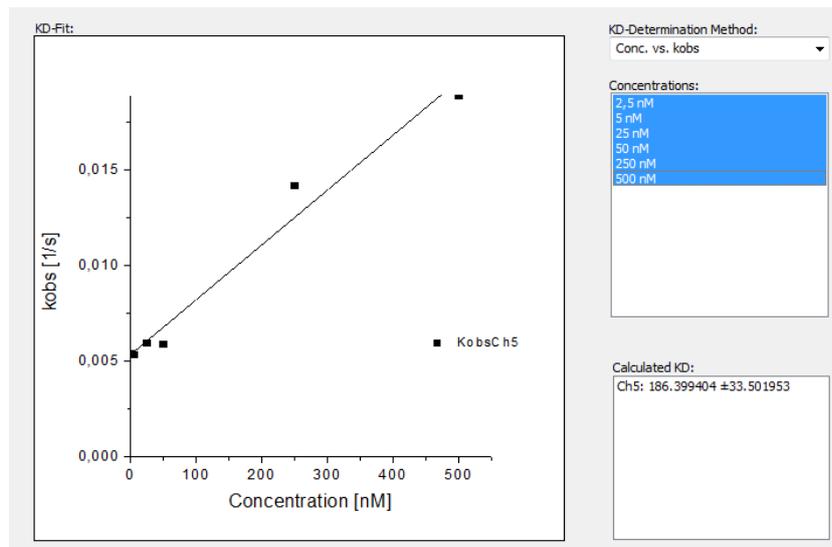
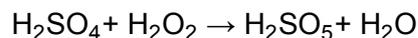


Abb. 4.10 Auswertung und Bestimmung der Bindungsparameter k_{on} , k_{off} und K_D
Die Parameter werden über die angegebenen Formeln aus den ermittelten k_{obs} -Werte und Konzentration bestimmt.

4.7.4 Reinigung der sam[®]5 Quarzsensoren

Die Quarzsensoren wurden mehrfach in Experimenten verwendet. Um die Goldoberfläche auf die nächste Beschichtung vorzubereiten, musste die Protein-Lipidschicht entfernt werden. Dies wurde mit der stark oxidierenden, instabilen Peroxomonoschwefelsäure durchgeführt. Vor jeder Reinigung musste diese aus konzentrierter Schwefelsäure und 30%iger Wasserstoffperoxid-Lösung im Volumenverhältnis 3:1 frisch hergestellt werden.



Die starke Hitzeentwicklung wurde mithilfe eines kalten Wasserbades abgeschwächt, damit die Lösung zeitnah verwendet werden konnte. Nachdem die Lösung Raumtemperatur erreicht hatte, wurden die zu reinigenden Quarze mit 2 - 3 mL Peroxomonoschwefelsäure auf der Goldseite benetzt. Dabei werden die Thiolbindungen zur Goldoberfläche abgebrochen, sodass die gebundenen Lipide entfernt werden können. Genau zwei Minuten wurden die Quarze in der Oxidationssäure belassen, bevor sie zügig in demineralisiertem Wasser abgewaschen wurden. Ein weiterer Waschschrift mit demineralisiertem Wasser wurde durchgeführt und der Quarz im Luftstrom getrocknet. Diese Schritte wurden wiederholt und nach der zweiten Wasserreinigung wurden die Quarze zusätzlich in Aceton und direkt im Anschluss in Ethanol geschwenkt, um die Lipide abzu-

lösen. Die dritte Wiederholung wurde wie beim ersten Mal durchgeführt und die Quarze zusätzlich mit Ethanol gespült. Nach einer gründlichen Trocknung der Quarze im Luftstrom wurden die gereinigten Sensoren bis zu ihrer Verwendung im Kühlschrank gelagert.

4.8 Proteinanalytik

4.8.1 Herstellung von Zelllysaten

Zur Messung der Expression oder Aktivität bzw. Phosphorylierung eines Proteins mussten zunächst die äußeren Zellmembranen der MV3 Zellen aufgelöst werden und Lysate angefertigt werden. Dazu konnten sich die Zellen bis zu einer Konfluenz von 80 % in einer Zellkulturflasche vermehren, bevor sie wie zur Subkultivierung mit EDTA-Lösung abgelöst wurden. Vor der Aufnahme der Zellen im Lysepuffer wurden die Zellen mit kaltem Phosphatpuffer gespült. Für herkömmliche Western Blots wurden zehn Millionen Zellen in 1 mL Lysepuffer von Invitrogen aufgenommen, der einen Zusatz an PMSF und einem Proteaseinhibitor-Cocktail enthielt. Für 30 Minuten wurden die Zellen auf 4°C temperiert und bei 800 U/min geschüttelt, um alle Zellmembranen aufzulösen. Nach einer weiteren Durchmischung wurden die festen Zellbestandteile durch Zentrifugation bei 4°C und 13.000 U/min für 10 Minuten abgetrennt. Die klare, überstehende Lösung wurde in Reagiergefäße aufgeteilt und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Ein weiteres Aus- und Einfrieren wurde durch die Aliquotierung vermieden.

4.8.2 Bestimmung des Proteingehaltes in Lysaten

Entscheidend für die Vergleichbarkeit von Proteinexpressionen in verschiedenen Zellansätzen ist die Auftragung gleicher Proteinmengen. Hierzu musste nach der Lyse zunächst der Gehalt der Proteine in den Zelllösungen bestimmt werden. Mittels der Biuret-Reaktion wurden Kupfer-(II)-Ionen in einer alkalischen Lösung durch Peptidbindungen zu Kupfer-(I)-Ionen reduziert und bildeten mit BCA einen rot-violettfarbenen Komplex, der proportional zu den vorhandenen Proteinen in der Lösung war und der bei 570 nm quantifiziert wurde. Ein nach 4.8.1 hergestelltes Zelllysate-Aliquot wurde zu diesem Zweck 1:20, 1:50 und 1:100 verdünnt. Zur korrekten Einordnung wurden Proteinstandards mit bovinem Serumalbumin erstellt, die einen Konzentrationsbereich von 0 bis 400 µg/mL abdeckten. Desweiteren wurden drei Qualitätskontrollen vermessen (150, 250 und 350 µg/mL), anhand derer die Genauigkeit der aus der Farbintensität der Proteinstandards errechneten Kalibriergerade überprüft wurde. Alle Ansätze wurden zu 40 µL in Reagiergefäße überführt und mit 20 µL Natronlauge (1 mol/L) versetzt. Nach Durchmischung und Zentrifugation wurden die Lösungen 30 Minuten bei Raumtemperatur belas-

und unabhängig von ihrer eigenen Ladung aufgetrennt werden. Zur Einordnung der Proteingröße wurde bei jedem Versuch ein Proteinstandard Precision Plus Protein™ WesternC™ zum Vergleich mit vermessen. Zur Auftrennung der Proteine des Zelllysates wurde an das beladene Fertiggel der Firma Bio-Rad für etwa 45 Minuten eine konstante Spannung von 200 V angelegt. Durch die farbliche Markierung des Proteinstandards und des Lämmli-Puffers konnte die Lauffront der Proteine beobachtet und wenn nötig die Gel-Elektrophorese früher gestoppt werden.

4.8.3.2 Gel-Elektrophorese mit rekombinantem Syndekan-4

Zur Charakterisierung der z. B. in SAW-Experimenten verwendeten humanen, rekombinanten SDC-4 Moleküle wurden die GAG-Ketten durch enzymatischen Abbau genauer untersucht. Heparinase III (11 SigmaU/mL \equiv 0,018 IU/mL) und Chondroitinase ABC (1 U/mL) wurden zu 0,25 µg Protein gegeben und für eine Stunde oder für 21 Stunden bei 37°C inkubiert. Diese Ansätze wurden wie die Zelllysate mit Lämmli-Puffer versetzt und je in eine Tasche des Gels appliziert. Als Kontrolle wurde das unbehandelte rekombinante SDC-4 verwendet.

4.8.4 Anfertigung von Western Blots

Die mittels Gel-Elektrophorese voneinander getrennten Proteine des Zelllysates wurden aus dem Gel auf eine PVDF-Membran übertragen und anschließend mit entsprechenden Antikörpern versetzt, um die Expression zu bestimmen. Vorab wurde die Membran zur Hydrophilisierung kurz in Methanol geschwenkt und danach bis zur Verwendung in Transfer-Puffer gelagert. Das Proteingel wurde ebenfalls nach der Gel-Elektrophorese bis zur Durchführung des Western Blots in Transfer-Puffer äquilibriert, um das Natriumdodecylsulfat auszuwaschen und so die Proteinstruktur wiederherzustellen. Da sich während dem Western Blotting Wärme entwickelt, wurden in die Blotting-Kammer ein gefrorenes Kühlelement und ein Rührmagnet gelegt, um den Puffer zu durchmischen und so in der gesamten Kammer gleichmäßig zu kühlen. Darüber hinaus wurde der Transfer-Puffer erst unmittelbar vor der Durchführung des Western Blots aus dem Kühlschrankschrank genommen. Die gesamte Apparatur wurde während des Stromflusses auf einem Magnetrührer belassen. Nach der dargelegten Vorbereitung wurde die Membran in Transfer-Puffer exakt auf dem Gel justiert, alle Luftblasen entfernt und in die Kammer eingebaut. Etwa eine Stunde lang wurde eine Stromstärke von 350 mA angelegt und die

Spannung möglichst bei 100 V gehalten, um die Proteine auf die Membran zu überführen. Nach erfolgter Übertragung wurde die Proteinmembran in TBS-Lösung geschwenkt. Vor der Antikörperbindung wurden unspezifische Bindungsstellen mit 20 mL Blocking-Lösung pro Membran gebunden und für eine Stunde bei Raumtemperatur unter gleichmäßigem Schwenken inkubiert. Die Membran wurde anschließend dreimal für 10 Minuten in TBS-T-Lösung gewaschen. Die primäre Antikörper-Lösung wurde in der Zwischenzeit vorbereitet und die Verdünnung je nach untersuchtem Protein angepasst (siehe Tabelle 4.12). Um die Membran komplett zu benetzen wurden mindestens 10 mL der Antikörper-Lösung hergestellt und für eine Stunde bei Raumtemperatur unter Schwenken auf der Membran belassen. Nach Ablauf dieser Zeit wurde das geschlossene Behältnis mit Membran und Lösung über Nacht bei 2 bis 8°C gelagert.

Tabelle 4.12 Konzentrationen der verwendeten Antikörper in Western Blot Experimenten

Antikörper	Verdünnung
anti-humanes p-PKC α	1:200
anti-humanes p-PKC δ	1:200
anti-humanes PKC α	1:200
anti-humanes PKC δ	1:200
anti- β -Actin	1:200
anti-humanes Syndekan-4	1:300

Die Antikörper-Lösung wurde nach der angegebenen Zeit von der Membran entfernt und dreimal ein Waschschriff mit TBS-T-Lösung für 10 Minuten durchgeführt, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Ein HRP-konjugierter Antikörper wurde anschließend der Membran zugesetzt, um den primären Antikörper in einer folgenden chemilumineszenten Reaktion sichtbar zu machen. Hierzu wurde die Antikörper-Lösung frisch hergestellt und zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen mit Magermilchpulver versetzt. Diese Lösung wurde für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur unter ständiger Bewegung auf der Membran belassen. Nach Entfernung des ungebundenen, sekundären Antikörpers wurde die Membran zweimal gewaschen und zur Vermessung im ChemiDocTM XRS+ positioniert. Als Substrat für die konjugierte HRP wurde 1 mL von jeder der zwei Komponenten des ClarityTM ECL Western Sets (Luminol- und Peroxid-Lösung) unmittelbar vor der Detektion vermischt und auf der Membran verteilt, ohne dass Luftblasen entstanden. Durch die enzymatisch-katalysiert ablaufende Oxidation des Substrates Luminol entsteht

an der Stelle des gebundenen Antikörpers eine detektierbare Lumineszenz. Diese wurde nach verschiedenen Inkubationszeiten von der zugehörigen Image Lab™ Software aufgezeichnet und das Bild mit dem optimalen Kontrast zur weiteren Analyse ausgewählt.

Um die Expression des untersuchten Proteins in verschiedenen Zelltypen vergleichen zu können, wurde jede Gel-Elektrophorese und anschließender Western Blot durch die Analyse eines konstitutiv exprimierten Proteins überprüft. Generell wurden gleiche Mengen an Zellysat untersucht. Zusätzlich wurde β -Actin als Kontrolle verwendet, wobei ausschließlich die Western Blots ausgewertet wurden, bei denen die Spots der β -Actin-Kontrollen gleiche Intensitäten aufwiesen.

Die Western Blots der intrazellulären Kinasen FAK, pFAK, AKT, pAKT und ILK wurden dankenswerterweise von Dr. Eva Jüngel (Universitätsklinikum Frankfurt) mit Antikörpern von Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland) durchgeführt.

4.8.5 Proteome Profiler™ human Phospho-Kinase Antibody Array

Der Einfluss von latenter Heparanase auf die intrazellulären Kinasen wurde mit einem Array-Kit des Herstellers R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) untersucht. Die allgemeine Durchführung ist analog der eines Western Blots und wurde laut Herstellerempfehlungen durchgeführt. Aus diesen Gründen wird an dieser Stelle auf eine detaillierte Beschreibung verzichtet. Für nähere Informationen wird auf die Herstellerangaben verwiesen¹⁹⁸. Es wurden die Lysate der zwei Zelltypen MV3 Wt und aSDC-4kd mit und ohne Zusatz von 5 μ g/mL latenter Heparanase für 10 Minuten auf Unterschiede in ihrem Phosphorylierungsmuster der intrazellulären Kinasen untersucht. Die zwei mit verschiedenen Antikörpern beschichteten Membranen wurden mit insgesamt 400 μ g des entsprechenden Zellysats inkubiert. Dieser Ansatz wurde abweichend von den Herstellerangaben über Nacht bei Raumtemperatur anstatt bei 2 bis 8°C geschwenkt. Alle weiteren Schritte wurden entsprechend der Herstellervorgaben durchgeführt.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Charakterisierung der MV3 Zellen

5.1.1 Erstellung einer transfizierten MV3 Zelllinie mit reduzierter Syndekan-4 Expression

Der Effekt von Heparanase auf Melanomzellen wird in Abhängigkeit von SDC-4 untersucht. Dazu wurden vor Beginn dieser Promotion die Melanomzellen MV3 von Dr. Patrick Schmitz mit kommerziell erhältlichen shRNA-Plasmiden von Sigma-Aldrich transfiziert, um die Expression von SDC-4 zu verringern. Durchflusszytometrische Untersuchungen der derart behandelten Zellen zeigten auf der Zelloberfläche eine SDC-4 Expression, die auf etwa 60 % der Expression von unbehandelten MV3 Wt Zellen reduziert worden war. Um die Expression des SDC-4 in der gesamten Zelle zu analysieren, wurden Western Blot Analysen des Zelllysates durchgeführt. Sie bestätigten ebenso eine um etwa 40 % verminderte Expression des SDC-4. Bei dieser transfizierten MV3 Zelllinie konnten keine Unterschiede in der SDC-4-Expression festgestellt werden. Genauere Angaben zur Herstellung und Charakterisierung der aSDC-4kd MV3 Zellen können in der Dissertationsschrift von Dr. Patrick Schmitz nachvollzogen werden¹⁹⁵.

Die stabile Downregulation des SDC-4 auf 60 % der Grundexpression und die Transfizierungsmethode, die sich nicht auf die zelluläre Proteinsynthese auswirkt, bestätigen, dass die aSDC-4kd MV3 Zellen als geeignetes Werkzeug verwendet werden können, um den Einfluss von latenter Heparanase in Abhängigkeit von SDC-4 zu bestimmen. Es wurden weitere Untersuchungen der Expression von relevanten Zelloberflächenstrukturen durchgeführt, um eine Beeinflussung durch die Transfizierung auch in diesen Fällen auszuschließen.

5.1.2 Expression von Syndekan-1 auf der Oberfläche der MV3 Zelltypen

Um zu überprüfen, inwieweit die MV3 Zellen eine Downregulation von SDC-4 durch eine Überexprimierung von SDC-1 kompensieren, um die Signalfunktionalität der Syndekane im Kontakt mit der EZM auszugleichen, sollte der Einfluss des SDC-4-Knockdown auf die SDC-1-Expression überprüft werden. Dies erscheint auch aus funktioneller Sicht essentiell, da SDC-1 ebenfalls eine Rolle bei der Weiterleitung von Heparanase-Effekten spielt¹⁹⁹. Aus diesen Gründen wurde die Expression von SDC-1 auf Wt und aSDC-4kd Zellen durchflusszytometrisch bestimmt und verglichen (Abb. 5.1). Je weiter die Graphen von Wt und aSDC-4kd von der grau unterlegten Kontrolle nach rechts verschoben sind, desto höher ist ihr Vorkommen auf der Zelloberfläche

Die Ergebnisse zeigen, dass beide MV3 Zelltypen keinen Unterschied in der Expression von SDC-1 aufweisen, womit eine Beeinflussung der Expression durch die Transfektion ausgeschlossen wird. Eine Interaktion von latenter Heparanase und SDC-1 in den nachfolgenden Versuchen wird zwar trotzdem stattfinden, allerdings fällt dieser Effekt durch die gleich hohe Expression an SDC-1 in beiden Zelltypen gleich hoch aus und ist somit eine Konstante, die in diesem Fall vernachlässigt wird.

5.1.3 Expression von Integrinen auf der Oberfläche der MV3 Zelltypen

Zur weiteren Charakterisierung der Zelltypen wurde die Expression der transmembranären Integrine bestimmt. Für die Adhäsion und Migration wichtige Integrinuntereinheiten wurden ausgewählt und ihre Expression auf den Zelloberflächen durchflusszytometrisch untersucht (Abb. 5.1). Wie in den Fluoreszenz-Diagrammen erkennbar ist, unterscheiden sich die Zelltypen nicht in der Quantität der Integrin-Untereinheiten, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Transfektion auch auf diese Proteinexpression keinen Einfluss hatte.

Der Integrinstatus der MV3 Zellen lässt sich wie folgt zusammenfassen: Sie weisen in geringen Mengen die Integrin-Untereinheit $\alpha 1$, in moderaten Mengen die Untereinheiten $\alpha 5$ und αU und in hohem Maße $\alpha 4$ und $\beta 1$ auf. Die Integrin-Untereinheit $\beta 3$ liegt auf den Zelloberflächen nicht vor.

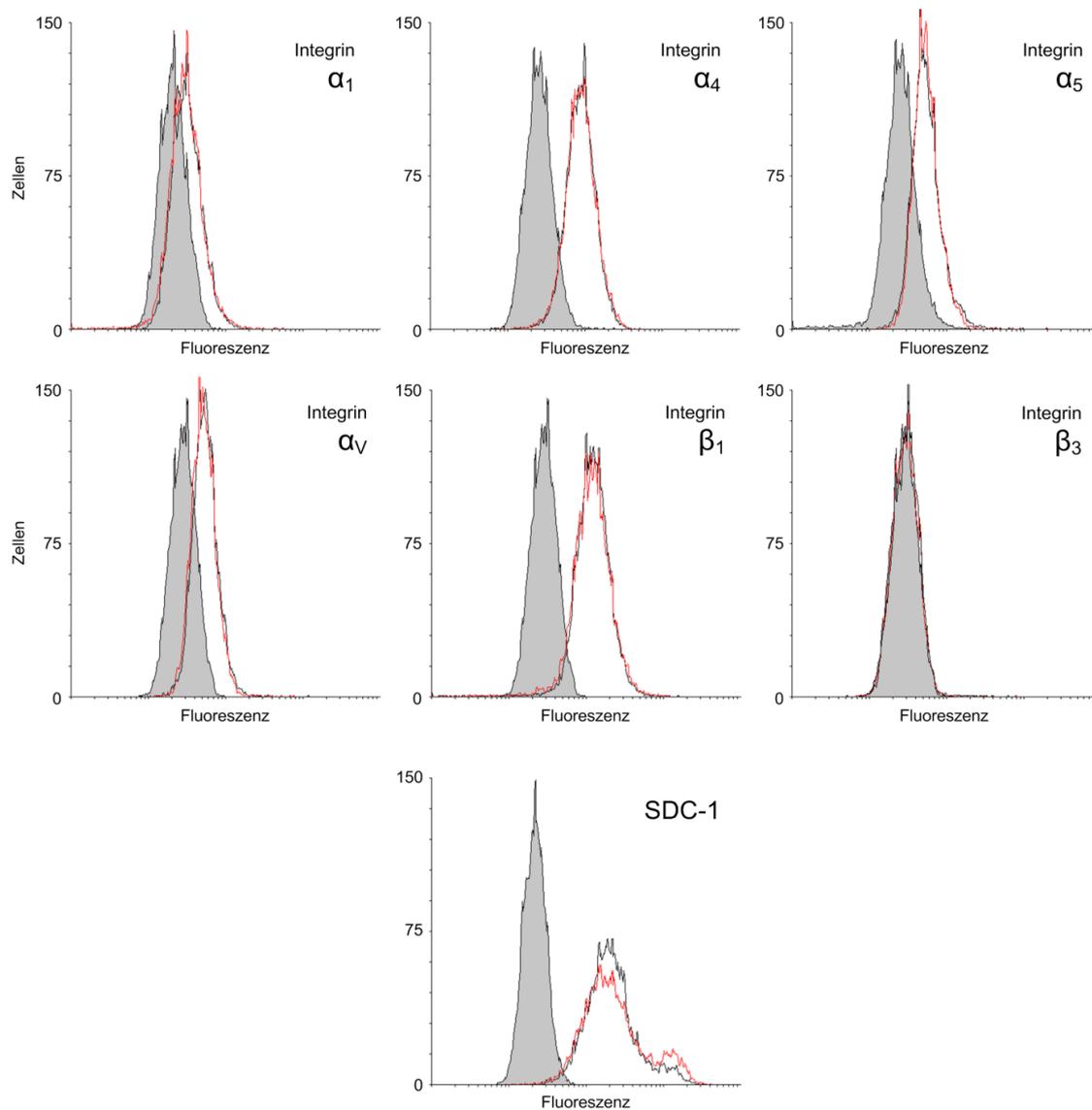


Abb. 5.1 Durchflusszytometrische Vermessung von Integrin-Untereinheiten und SDC-1 auf MV3 Zelltypen. Als Kontrolle ist die unspezifische Bindung des sekundären Antikörpers und die daraus resultierende Fluoreszenzintensität in grau dargestellt. Die Expression der untersuchten Proteine auf MV3 Wt (schwarz) und aSDC-4kd (rot) Zellen weicht nicht voneinander ab.

Wie im Kapitel 4.2.1 beschrieben, wurden die MV3 Melanomzellen für die Versuche ausgewählt, da sie VLA-4 und SDC-4 in erhöhtem Maße auf ihren Zelloberflächen aufweisen. Dies hat sich durch die Transfektion in aSDC-4kd Zellen nicht verändert und für MV3 Wt Zellen bestätigt, wie die vorgestellten Untersuchungen beweisen.

5.1.4 Aktivität der endogenen Heparanase in MV3 Zellen

In verschiedenen Krebszellarten, die ein hohes Metastasierungspotential zeigen, wurde eine erhöhte Bildung von enzymatisch aktiver Heparanase nachgewiesen²⁰⁰. Es liegen für die verwendete Melanomzelllinie noch keine Aktivitätsdaten der endogenen Heparanase vor, daher wurden die beiden MV3 Zelltypen von Prof. Israel Vlodavsky und seiner Arbeitsgruppe auf ihre Heparanase-Aktivität untersucht. Die Zelllysate wurden zu einer artifiziellen EZM gegeben, deren Schwefelatome radioaktiv markiert waren (³⁵S), und für 18 Stunden bei 37°C mit dieser inkubiert. Die Matrix wurde in dieser Zeit von Heparanase zersetzt und die radioaktivmarkierten Abbaufragmente konnten anschließend anhand ihrer Größe bestimmt werden (Abb. 5.2). Die ersten Fraktionen (3-12) stellen beinahe unversehrte HSPG dar und die von Heparanase abgebauten HS-Seitenketten werden in den Fraktionen 12 bis 22 eluiert. Sowohl in Wt als auch in aSDC-4kd Zellen liegt enzymatisch aktive Heparanase vor, aber es besteht kein Unterschied zwischen den beiden Zelltypen bezüglich der Aktivität.

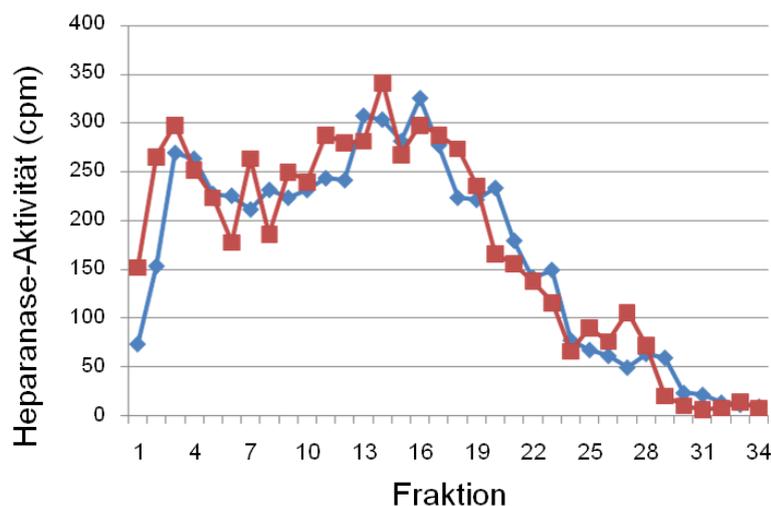


Abb. 5.2 Aktivität der endogenen MV3 Heparanase
MV3 Wt (blau) und Syndecan-4 Knockdown (rot) Zellen wurden lysiert und mit radioaktiv markiertem EZM versetzt. Markierte HS Abbaufragmente wurden in verschiedenen Fraktionen eluiert und konnten so dem Abbau durch Heparanase zugeordnet werden.

Eine unterschiedlich starke Beeinflussung der funktionellen Experimente und der Rolle der latenten Heparanase durch die endogene aktive Heparanase kann somit im Vergleich der beiden Zelltypen ausgeschlossen werden.

5.1.5 Aufnahme von latenter Heparanase in MV3 Zellen

Im Gegensatz zur endogenen Heparanase wurde auch die Aufnahme von exogen zugeführter Heparanase untersucht. Da die Heparanase zunächst an Zelloberflächenstrukturen wie die SDC bindet, um über Endozytose aufgenommen zu werden, wäre eine langsamere Aufnahme der Heparanase in aSDC-4kd Zellen zu erwarten. Zunächst wurde latente Heparanase (1 µg/mL) zu den Zellen gegeben. Nach zwei oder sechs Stunden wurden die Zellen lysiert und mittels Western Blot die intrazelluläre Heparanase bestimmt (Abb. 5.3). Nach zwei Stunden war die aufgenommene Heparanase nur in Wt Zellen, jedoch nicht in aSDC-4kd Zellen detektierbar. Dahingegen ist nach sechs Stunden nur noch ein geringer Unterschied zwischen der Heparanase-Aufnahme in Wt und aSDC-4kd Zellen erkennbar.

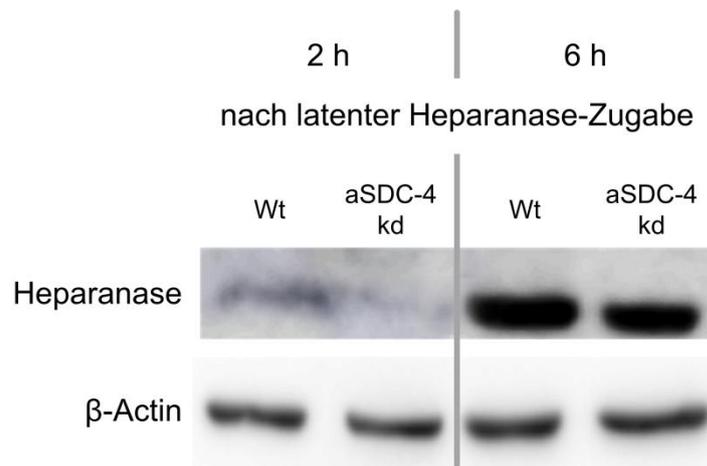


Abb. 5.3 Heparanase-Aufnahme in MV3 Wt und aSDC-4kd nach zwei und sechs Stunden
Latente Heparanase wurde den Zellen zugegeben und die Aufnahme und Umwandlung mittels Western Blot kontrolliert. Als konstitutiv exprimiertes Protein, das nicht durch den Versuchsansatz beeinflusst wird, wurde β-Actin als Mengenkontrolle untersucht.

Die langsamere Aufnahme und Umsetzung der latenten Heparanase in die aktive Form liegt somit wie erwartet an der reduzierten SDC-4-Expression und verifiziert damit einerseits die funktionellen Auswirkungen der reduzierten SDC-4-Expression und andererseits die bereits in vorangegangenen Arbeiten beschriebene Wechselwirkung von Heparanase und SDC-4¹³⁶.

5.2 Einfluss von latenter Heparanase auf die Adhäsion von MV3 Zellen

5.2.1 Migrationsverhalten der MV3 Zelltypen

Das Migrationsverhalten der MV3 Zellen wurde auf dem Migrationsuntergrund Fibronektin untersucht, welches als Bestandteil der EZM mit vielen Integrinen wie $\alpha 5\beta 1$ und $\alpha 4\beta 1$ in Wechselwirkung tritt. Die Migration wurde in Anlehnung an die Publikation von Liang et al.²⁰¹ durchgeführt, indem Zellen auf Fibronektin anwuchsen, durch einen „Scratch“ ein Teil der Zellen entfernt und die Migration der umgebenden Zellen aufgezeichnet wurde. Dabei wurden die Daten derart normalisiert, dass die Anfangsgröße der zellfreien Fläche als 100 % definiert und die Abnahme dieser Fläche ins Verhältnis gesetzt wurde. Die Migration der Wt und aSDC-4kd Zellen unterschied sich auf Fibronektin nicht, was in Anbetracht der gleichen Integrinexpression plausibel ist (Abb. 5.4). Die Interaktion von $\alpha 5\beta 1$ mit Fibronektin ist auf SDC-4 als Korezeptor angewiesen⁹⁸. Aus diesem Grund hätte sich ein abweichendes Migrationsverhalten der aSDC-4kd Zellen einstellen können. Anscheinend wird jedoch die Migration der aSDC-4kd Zellen in diesem Assay von anderen Integrinen wie VLA-4 ausgeglichen.

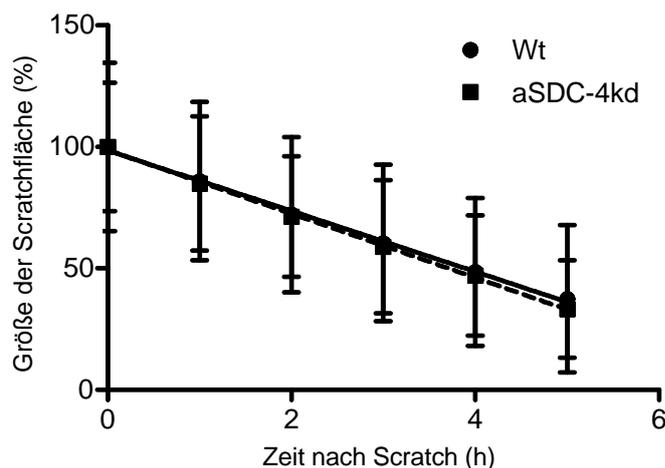


Abb. 5.4 Migration von MV3 Wt und aSDC-4kd auf Fibronektin
Die Anfangsgröße der zellfreien Fläche zum Zeitpunkt Null des Experimentes entspricht 100 %. (Wt: durchgezogene Linie, aSDC-4kd: gestrichelte Linie)

5.2.2 Einfluss von latenter Heparanase auf das Migrationsverhalten der MV3 Zelltypen

In weiteren Experimenten wurde die Wirkung der latenten Heparanase auf die Migration der zwei Zelltypen analysiert. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit latenter Heparanase (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) versetzt und der Migrationsassay wie zuvor durchgeführt. Während die aSDC-4kd Zellen kaum in ihrem Migrationsverhalten auf die zugesetzte Heparanase reagierten und konstant migrierten, wie die geringere Standardabweichung zeigt, war bei den Wt Zellen eine hohe Variabilität der Migration zu erkennen und die Heparanase schien nach zwei Stunden einen promigrativen Effekt zu vermitteln (Abb. 5.5). Diese beschleunigte Migration unterschied sich jedoch nicht signifikant von dem normalen Migrationsverhalten der MV3 Wt Zellen.

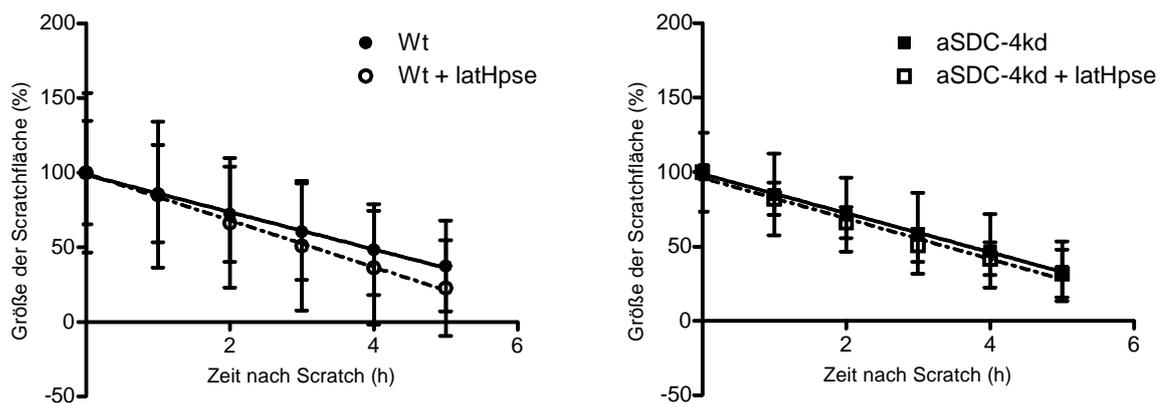


Abb. 5.5 Migration von MV3 Wt und aSDC-4kd während der Inkubation mit latenter Heparanase. Vor der Migration wurde den Zellen latente Heparanase (latHpse, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) zugesetzt.

Zumindest unter diesen Bedingungen scheint latente Heparanase die Agilität der Zellen in Abhängigkeit von SDC-4 positiv zu beeinflussen. Der Effekt der latenten Heparanase stellt sich wie erwähnt erst nach zwei Stunden ein. In Bezugnahme zu den Erkenntnissen zur exogen zugeführten Heparanase (Kap.5.1.5) könnte bereits aktive Heparanase in den Zellen vorliegen und die erhöhte Migration verursachen. Zur Überprüfung dieser Möglichkeit wurde den Zellen eine einzelne Domäne der Heparanase zugesetzt, die für die Heparinbindung entscheidend ist und die nicht von den Zellen internalisiert wird¹³⁶.

5.2.3 Einfluss des KKDC-Peptids auf das Migrationsverhalten der MV3 Zelltypen

Die Heparin-bindende Sequenz der Heparanase bestehend aus 16 Aminosäuren wird aufgrund der ersten und letzten zwei Aminosäure-Abkürzungen des Peptides KKDC-Peptid genannt. Das kommerziell synthetisierte Peptid wurde in der Konzentration 50 $\mu\text{mol/L}$ analog dem Vorgehen in den Experimenten mit latenter Heparanase den Zellen zugesetzt und im Scratch-Versuch für fünf Stunden die zellfreie Fläche quantifiziert (Abb. 5.6). Aus der Arbeit von Levy-Adam et al.¹³⁶, in der dieses Peptid zum ersten Mal verwendet wurde, ist bekannt, dass das KKDC-Peptid im Gegensatz zur Heparanase von den Zellen nicht internalisiert, sondern auf der Zelloberfläche an SDC-4 gebunden wird und zur Vernetzung und Zusammenlagerung der SDC-4-Moleküle führt. Die KKDC-Konzentration ist auf molarer Ebene etwa 1,7fach konzentrierter als die Heparanase-Konzentration in den Vergleichsversuchen. Da das KKDC-Peptid in dieser Konzentration in der Veröffentlichung von Levy-Adam et al. angewandt wurde und dabei eine Bindung stattfand, sowie ein erhöhtes Clustern von SDC-4 verursacht wurde, wird KKDC in der gleichen Konzentration (50 $\mu\text{mol/L}$) verwendet¹³⁶.

Wie in den Versuchen mit latenter Heparanase migrieren die Wt Zellen mit KKDC-Peptid Zusatz nach zwei Stunden etwas schneller als unbehandelte Zellen. Ebenso bleiben die aSDC-4kd Zellen unbeeinflusst durch das KKDC-Peptid.

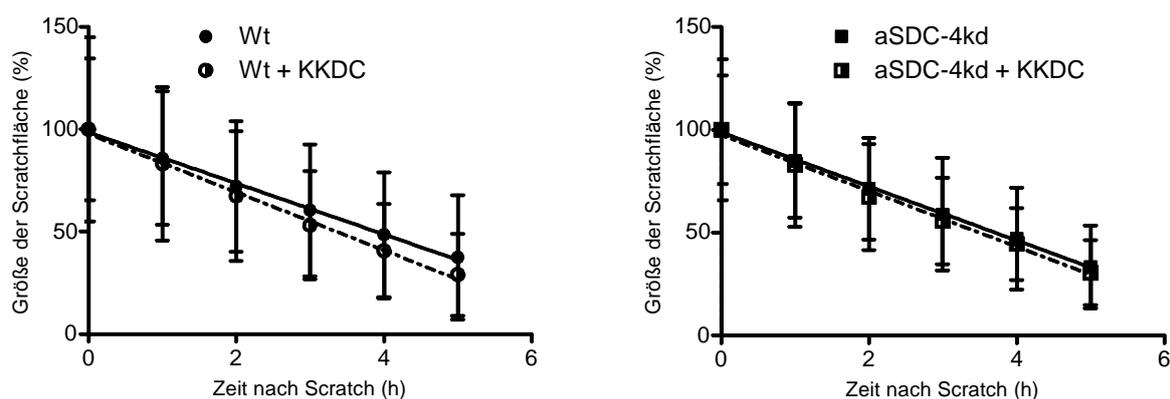


Abb. 5.6 Migration von MV3 Wt und aSDC-4kd während der Inkubation mit dem KKDC-Peptid. Vor der Migration wurde den Zellen KKDC-Peptid (50 $\mu\text{mol/L}$) zugesetzt.

Ein geringer promigrativer Effekt zeigt sich somit auch unter dem Einfluss der Heparin-bindenden Domäne „KKDC“ und dieser ist wie der Effekt der latenten Heparanase abhängig von SDC-4. Da die Ergebnisse der Migrationsversuche mit latenter Heparanase und KKDC-Peptid übereinstimmen, rührt die leicht gesteigerte Migration wahrscheinlich nicht von der Umwandlung der latenten in die aktive Form der Heparanase her, sondern wird verursacht von der Anlagerung an SDC-4.

Obwohl diese Untersuchungen erste Hinweise auf eine migrationsfördernde Integrinaktivierung der Zellen über SDC-4 durch die latente Heparanase erlauben, lässt dieses „Wound healing“-Modell keinen Rückschluss auf die Bindung zu einzelnen Integrinen zu. Deshalb wurde im Folgenden die Adhäsion am Integrin VLA-4 genauer untersucht.

5.2.4 Adhäsion von MV3 Zellen unter physiologischen Flussbedingungen

Wie in den Migrationsuntersuchungen erkennbar, war der Einfluss von latenter Heparanase vorhanden, allerdings relativ gering ausgeprägt. Um den Effekt der latenten Heparanase auf das VLA-4 als das dominanteste Integrin auf der Zelloberfläche der Melanomzellen zu quantifizieren, wurde die Bindung der Zellen zu immobilisiertem VCAM-1 untersucht. Durch die selektive Affinität der beiden physiologischen Bindungspartner VLA-4 und VCAM-1 kann unter diesen Bedingungen die spezifische Wirkung der Heparanase auf eine einzelne Integrinspezies abstrahiert werden. Die Zellen wurden zur Adhäsion für fünf Minuten auf der VCAM-1-Beschichtung belassen, bevor der Flüssigkeitsstrom gestartet wurde. Um die Ergebnisse der einzelnen Versuche zu vergleichen, wurden vor der Aktivierung des Zustroms die adhären Zellen ausgezählt und auf 100 % normiert. Sekundenweise wurde die Anzahl der Zellen detektiert und prozentual angegeben (Abb. 5.7). Die Integrine der Zellen wurden mit verschiedenen Mangan-Ionen-Konzentrationen stimuliert, so dass sie auf der Zelloberfläche in ihrer aktivsten Form vorlagen. In den Versuchen ist der Effekt des Mangans deutlich zu erkennen, wobei bei einer Stimulation mit 5 mmol/L Mn^{2+} alle Zelltypen gleich stark an VCAM-1 binden. Bei 1 mmol/L Mn^{2+} Aktivierung oder keiner externen Stimulation unterscheiden sich die Zellen leicht in ihrer Adhäsion, allerdings sind diese Abweichungen nicht signifikant. Diese Ergebnisse unterstreichen die äquivalente Expression von VLA-4 auf den verschiedenen Zelloberflächen, wie bereits in durchflusszytometrischen Untersuchungen eruiert, und darüber hinaus die Unabhängigkeit von SDC-4 als Korezeptor.

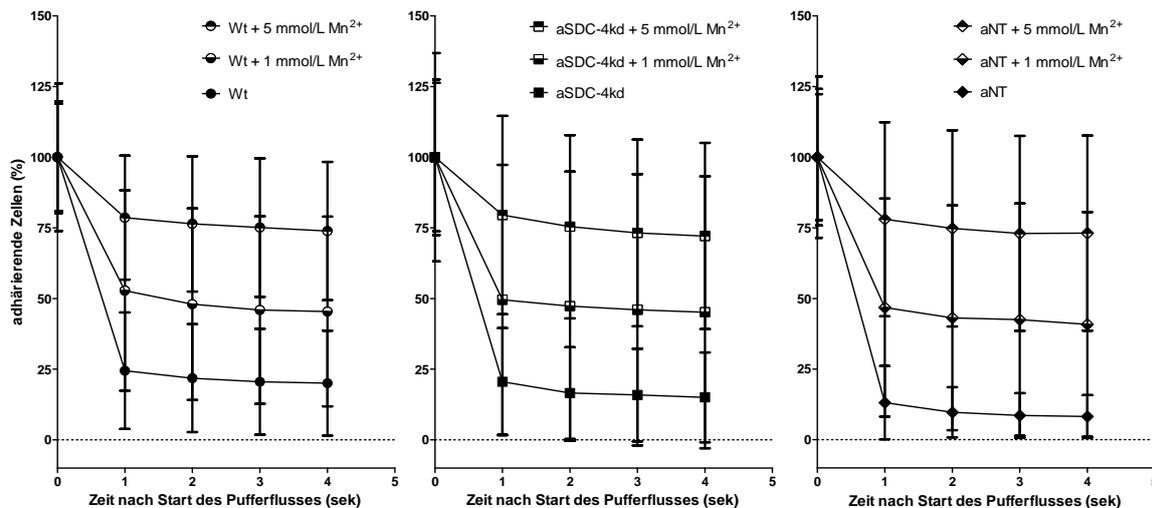


Abb. 5.7 Adhäsion von MV3 Wt, aSDC-4kd und aNT Zellen auf einer VCAM-1-Oberfläche unter physiologischen Flussbedingungen

Unbehandelte und mit zwei Konzentrationen von Mangan-Ionen stimulierte Zellen wurden für fünf Minuten zur Adhäsion auf der Oberfläche belassen. Danach wurde der Flüssigkeitsstrom gestartet und nach 1, 2, 3 und 4 Sekunden die adhärenen Zellen gezählt. Die Ergebnisse werden in Relation zu der Anzahl der Zellen auf der Oberfläche zum Zeitpunkt „Null“ (100 %) dargestellt.

5.2.5 Einfluss von latenter Heparanase auf die Adhäsion der MV3 Zelltypen zu VCAM-1 unter physiologischen Flussbedingungen

Die Zellen wurden in folgenden Experimenten vorab mit latenter Heparanase (2 µg/mL) für zehn Minuten versetzt und die Adhäsion untersucht. Dabei konnte, im Gegensatz zu den Experimenten mit unbehandelten Zellen, nach fünf Minuten Inkubation keine erhöhte Bindung festgestellt werden (Abb. 5.8). Sowohl bei Wt, als auch bei aSDC-4kd Zellen veränderte sich die Intensität der VLA-4-Bindung durch latente Heparanase nicht, bzw. wurde die Bindung an die VCAM-1-Oberfläche nicht derart durch Heparanase verstärkt, dass mehr Zellen entgegen der Scherkräfte adhären konnten.

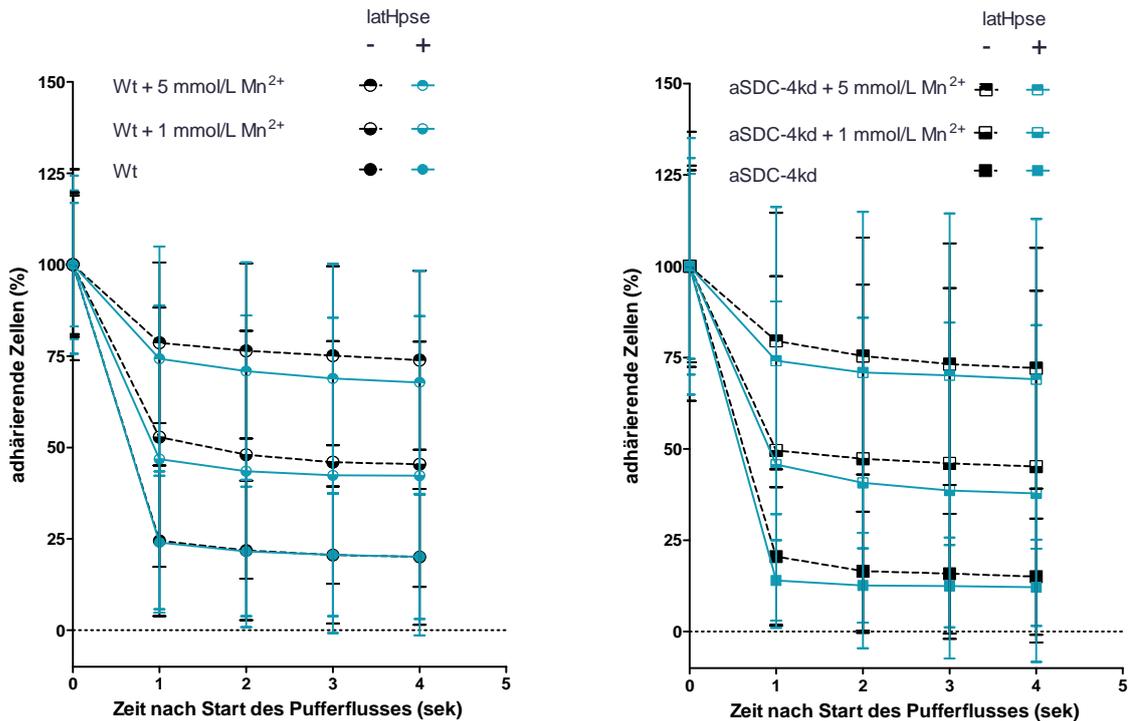


Abb. 5.8 Adhäsion von MV3 Wt und aSDC-4kd Zellen nach Inkubation mit latenter Heparanase auf einer VCAM-1-Oberfläche unter physiologischen Flussbedingungen. Unbehandelte, mit Mangan-Ionen (1 und 5 mmol/L, 5 Minuten) und/oder mit latenter Heparanase (2 µg/mL, 10 Minuten) behandelte Zellen wurden für fünf Minuten zur Adhäsion auf der Oberfläche belassen.

Um den VLA-4-Molekülen auf der Zelloberfläche mehr Zeit zur Ausbildung von festen Bindungen zu geben, wurde die Adhäsionsdauer von fünf auf 20 Minuten erhöht. Die verlängerte Adhäsion der Zellen auf der VCAM-1-Oberfläche zeigte eine tendenziell stärkere Bindung von Heparanase beeinflussten Zellen, die jedoch nicht signifikant ist. Es adhärten erwartungsgemäß bereits mehr unbehandelte Zellen nach 20 Minuten (ca. 30 %) als nach fünf Minuten (ca. 25 %). Während diese selbst nach einer längeren Adhäsionszeit keine stabilen Bindungen über VLA-4/VCAM-1 aufbauen konnten und nach Start des Flüssigkeitsstroms weggeschwemmt wurden, zeigten die mit Heparanase inkubierten Zellen ein uniformeres Verhalten und eine größere Anzahl von ihnen adhärte nach vier Sekunden weiterhin an der VCAM-1 Schicht (ca. 40 %). Diese Beobachtungen legen nahe, dass die latente Heparanase stabile Bindungen zwischen VLA-4 und VCAM-1 fördert und festigt.

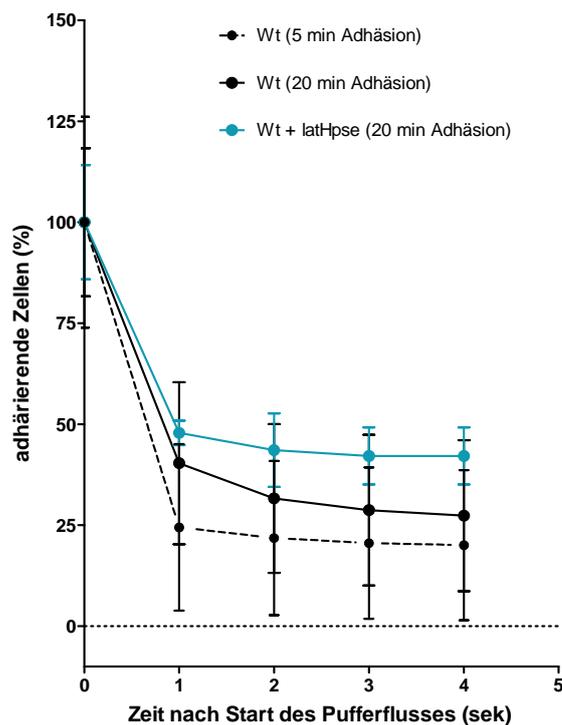


Abb. 5.9 Adhäsion von MV3 Wt nach Inkubation mit latenter Heparanase auf einer VCAM-1-Oberfläche unter physiologischen Flussbedingungen
 Unbehandelte und mit latenter Heparanase (2 µg/mL, 10 Minuten) behandelte Zellen wurden für 20 Minuten zur Adhäsion auf der Oberfläche belassen.

Ein entscheidender Faktor für eine erhöhte VCAM-1-Affinität der Zellen scheint dabei die Dauer der Heparanase-Inkubation zu sein. Um dies genauer zu untersuchen, wurde die Bindung von VCAM-1 an MV3 Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit im Durchflusszytometer ermittelt.

5.2.6 Einfluss der Inkubationszeit latenter Heparanase auf das Bindungsverhalten von MV3 Zellen zu VCAM-1 in durchflusszytometrischen Untersuchungen

Zur Klärung des Einflusses der zellulären Inkubation mit latenter Heparanase auf die VLA-4-vermittelte Adhäsion wurden die Zellen mit latenter Heparanase (2 µg/mL) versetzt, wobei die Einwirkung von fünf Minuten bis zu einer Stunde dauerte. Es zeigte sich ein klarer Zusammenhang zwischen der Dauer der Inkubation und der Bindung zu VCAM-1 (Abb. 5.10). Nach zehn Minuten erreichte die Bindungsfähigkeit der Wt Zellen zu VCAM-1 ein Maximum, das jedoch schon nach 15 Minuten wieder abnahm. Dennoch

wurde noch nach einer 15- und 30-minütigen Inkubationsspanne ein signifikanter Unterschied zu unbehandelten Zellen detektiert, der nach einer Stunde verschwunden war. Im Gegensatz dazu reagierten die aSDC-4kd Zellen innerhalb der Inkubationsstunde kaum auf die zugesetzte latente Heparanase. Die kurzfristig erhöhte Bindung der Zellen zu VCAM-1 ist somit eindeutig SDC-4-abhängig und ein transientser Effekt. Um die höhere Affinität zu VCAM-1 in Relation zu setzen, wurden die Versuche auch mit Mn^{2+} -Ionen durchgeführt, die wie in den Adhäsionsversuchen als Maximalstimulation herangezogen wurden. Unter Heparanase-Einfluss war die Adhäsion an VCAM-1 etwa 39 % höher als die der unbehandelten Zellen. Dahingegen steigerte die Stimulation mit Mangan-Ionen die Affinität um 90 %. Diese Experimente beweisen, dass eine durch Heparanase induzierte erhöhte Bindung existiert, aber mit einer Konzentration von 2 $\mu\text{g/mL}$ latenter Heparanase ggf. nur eine partielle Aktivierung erreicht wird.

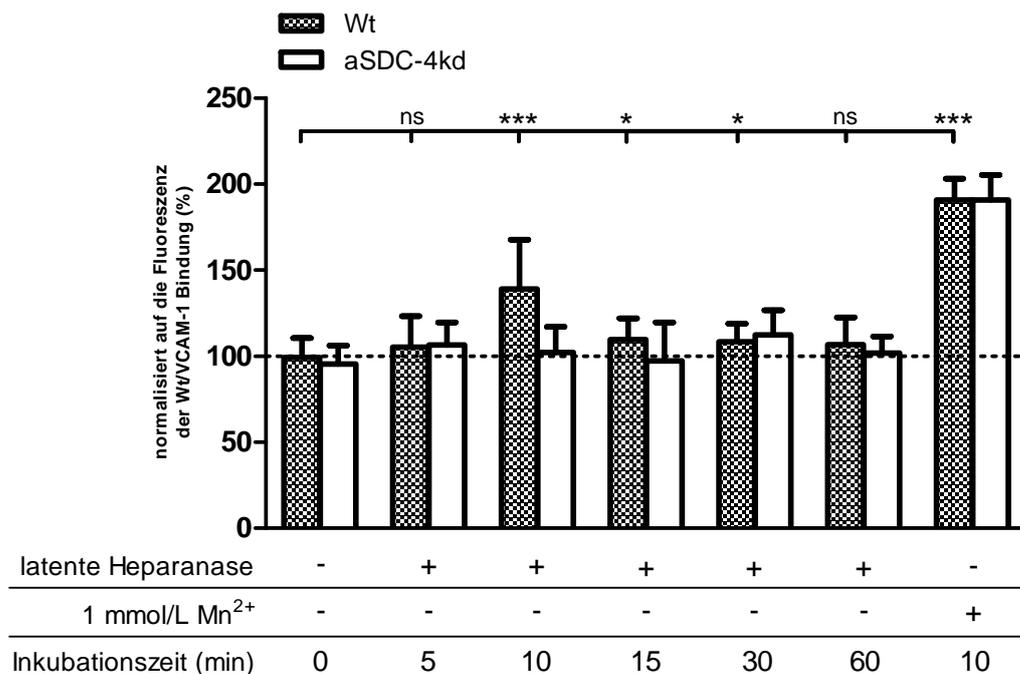


Abb. 5.10 Durchflusszytometrische Untersuchungen der VCAM-1-Bindung von MV3 Wt und aSDC-4kd Zellen nach Inkubation mit latenter Heparanase und Mangan-Ionen
Die Fluoreszenzintensität der VCAM-1-Bindung an unbehandelte Wt Zellen wurde nach Abzug der unspezifischen Fluoreszenz des sekundären Antikörpers auf 100 % normiert.

5.2.7 Einfluss der Menge an latenter Heparanase auf das Bindungsverhalten von MV3 Zellen zu VCAM-1 in durchflusszytometrischen Untersuchungen

Aus den vorherigen Experimenten kann man eine erhöhte Bindungsfähigkeit von VLA-4 zu VCAM-1, verursacht durch latente Heparanase, ableiten, die in Abhängigkeit von der SDC-4 Expression steht. Inwieweit diese Bindung durch höhere Mengen an latenter Heparanase weiter gesteigert werden kann, wurde nach dem oben bestimmten optimalen Inkubationszeitpunkt von 10 Minuten ebenfalls untersucht. Neben der bisher verwendeten Heparanase-Konzentration 2 µg/mL wurden noch zwei höhere Konzentrationen von 5 und 10 µg/mL untersucht und die Zellaffinität zu VCAM-1 vermessen (Abb. 5.11). Tatsächlich konnte die Bindung zu VCAM-1 durch Anhebung des Heparanase-Gehaltes weiter erhöht werden auf 53 % mit 5 µg/mL und auf 70 % mit 10 µg/mL latenter Heparanase.

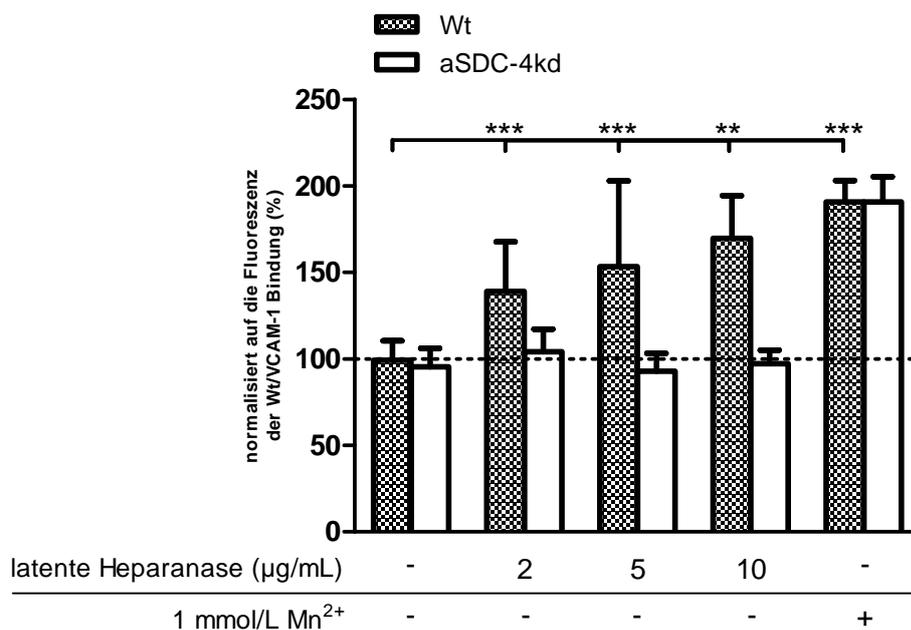


Abb. 5.11 Durchflusszytometrische Untersuchungen der VCAM-1-Bindung von MV3 Wt und aSDC-4kd Zellen nach 10-minütiger Inkubation mit verschiedenen Heparanase-Konzentrationen

Zehn Minuten nach Bindung der latenten Heparanase an die Zelloberfläche der MV3 Zellen durch SDC-4 kommt es zu einer erhöhten Bindungsaktivität des Integrins VLA-4, die mit zunehmenden Heparanase-Konzentrationen steigerbar ist. Gleichwohl ist diese Aktivierung nur für kurze Zeit beständig.

Wie in den vorgestellten Migrationsversuchen stellt sich die Frage nach der Effektvermittelnden Heparanase-Domäne, sowie nach einer ggf. notwendigen Internalisierung oder einer ausreichenden Anlagerung und Bindung der latenten Heparanase an SDC-4.

5.2.8 Einfluss der Inkubationszeit des KKDC-Peptids auf das Bindungsverhalten von MV3 Zellen zu VCAM-1 in durchflusszytometrischen Untersuchungen

Zur Differenzierung der Bindung von latenter Heparanase zu SDC-4 wurde, wie in den Migrationsversuchen, das rekombinante Peptid „KKDC“ verwendet (siehe Kap. 5.2.3). Der Einfluss des KKDC-Peptids wurde ebenso wie der der latenten Heparanase auf eine Zeitabhängigkeit von fünf bis 60 Minuten Inkubation getestet. Hierzu wurden die Zellen mit 50 $\mu\text{mol/L}$ des KKDC-Peptids versetzt und für die angegebenen Zeiten auf den Zellen belassen.

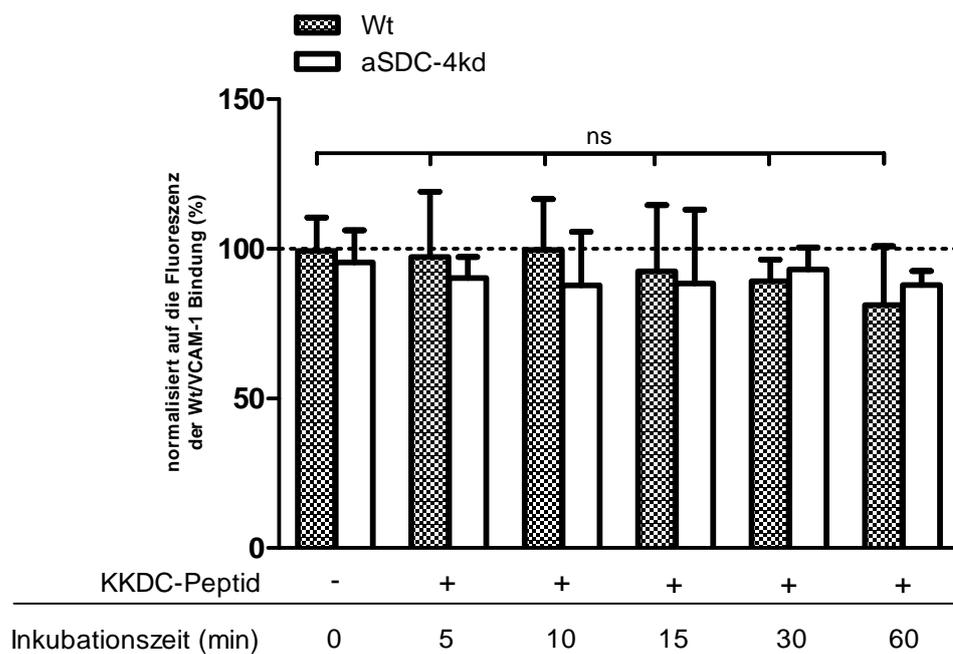


Abb. 5.12 Durchflusszytometrische Untersuchungen der VCAM-1-Bindung von MV3 Wt und aSDC-4kd Zellen nach verschiedenen Inkubationszeiten mit KKDC-Peptid

Eine erhöhte VCAM-1-Bindung durch KKDC-Zusatz wurde nach keiner der Inkubationszeiten detektiert. Folglich hat das KKDC-Peptid im Gegensatz zu latenter Heparanase keinen Einfluss auf die Aktivierung von VLA-4.

Es kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Integrinaktivierung wegen der ausbleibenden Internalisierung des SDC-4/“KKDC“-Komplexes oder wegen der unzureichenden Länge des Peptides ausbleibt.

Die bisher gewonnenen Erkenntnisse bestätigen, dass die latente Form der Heparanase einen aktivierenden Einfluss auf das VLA-4/VCAM-1-Bindungssystem entfalten kann und damit die Tumorzelle in einem entscheidenden Schritt der metastatischen Kaskade, der endothelialen Kontaktaufnahme, beeinflussen kann. Dies ergänzt den bisherigen Blickpunkt auf die Rolle der aktiven Heparanase und damit den enzymatischen Umbau des Gewebes im Metastasierungsgeschehen bedeutend. Desweiteren wird die notwendige vermittelnde Funktion von SDC-4 untermauert. Weitere molekulare Mechanismen, die während dieser Aktivierung intrazellulär ablaufen, sind weiterhin unklar und sollen Inhalt der nachfolgenden Untersuchungen sein.

5.3 Untersuchung der Bindungsaffinitäten von latenter Heparanase

Durch die gewählten Versuchsbedingungen in den Migrations- und Adhäsionsexperimenten ist nicht auszuschließen, dass die latente Heparanase nicht nur an SDC-4, sondern auch direkt an einen der Bindungsteilnehmer VLA-4 oder VCAM-1 bindet und diesen damit im Bindungsverhalten beeinflusst. Um diese möglichen Wechselwirkungen zu untersuchen, wurden Bindungsstudien zwischen den beteiligten Proteinen durchgeführt.

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse liegt folgender Zusammenhang nahe, graphisch dargestellt in der Abb. 5.13. Die freigesetzte oder im Gewebe vorliegende latente Heparanase bindet an SDC-4, fördert die Zusammenlagerung der SDC-4 Moleküle auf der Oberfläche und bewirkt über bisher ungeklärte intrazelluläre Vorgänge die Umsetzung von VLA-4 in einen aktiveren Zustand. Dadurch erhöht sich die Bindung zu VCAM-1, so dass die Tumorzelle über diese und weitere Bindungspartner fest am Endothel adhären kann.

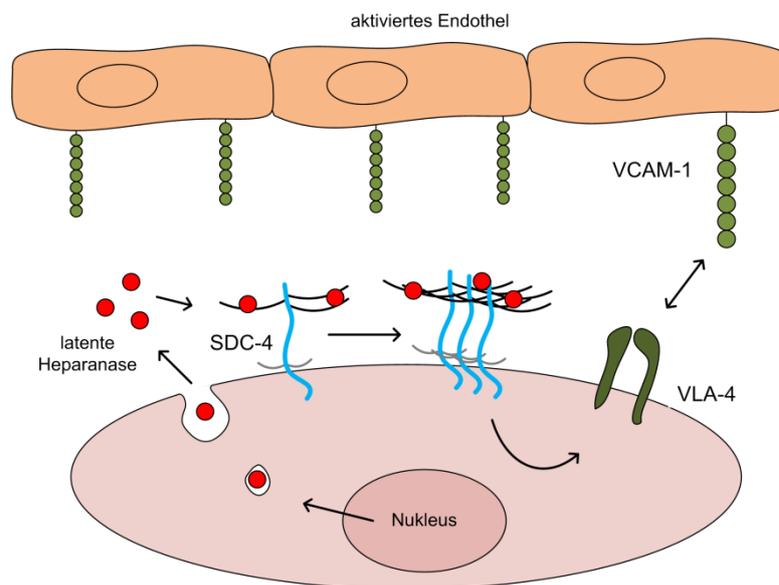


Abb. 5.13 Schematische Darstellung der Aktivierung von VLA-4 durch latente Heparanase
Aus der Melanomzelle freigesetzte latente Heparanase bindet an SDC-4 und bewirkt über intrazelluläre Signalwege die Aktivierung von VLA-4 und eine erhöhte Bindung zu VCAM-1.

Die Bindungsstudien wurden mit dem akustischen Biosensor sam[®]5 der Firma SAW Instruments GmbH erhoben. Wie im Kapitel 4.7.2 beschrieben wurden die goldbeschichteten Quarzsensoren mit den zu untersuchenden Proteinen beschichtet. Bei den im Fol-

genden vorgestellten Experimenten wurde die latente Heparanase jeweils als Verdünnungsreihe über die beschichtete Oberfläche geleitet.

5.3.1 Bindung von latenter Heparanase zu Syndekan-4

Das humane, rekombinante SDC-4 wurde auf der Oberfläche des Sensors mittels Chelator/His-tag-Bindung immobilisiert. In der Abb. 5.14 kennzeichnet der erste Anstieg des Graphen die Injektion und Immobilisierung des SDC-4. Der Beginn aller Injektionen an latenter Heparanase ist jeweils mit einem Pfeil markiert. Eine größere Phasenverschiebung bedeutet eine größere gebundene Masse wie in diesem Fall bei den Injektionen der Heparanase zu beobachten ist. Die Heparanase bindet bei jeder Injektion an SDC-4 und bleibt fest an dieses gebunden. Wenn der Ligand sich wieder ablösen würde, würde das Niveau bis zur Phasenverschiebung nach der SDC-4-Immobilisierung fallen. Hier zeigt sich jedoch ein Treppenverlauf mit ansteigender Bindung. Es konnte ein K_D -Wert von $33,7 \pm 14,19$ pmol/L bestimmt werden. Somit bestätigt sich die hohe Affinität von latenter Heparanase zu SDC-4 als Kontakt auf der Zelloberfläche und in Bezug auf die Adhäsionsversuche mit VCAM-1 seine vermittelnde Rolle der VLA-4-Aktivierung.

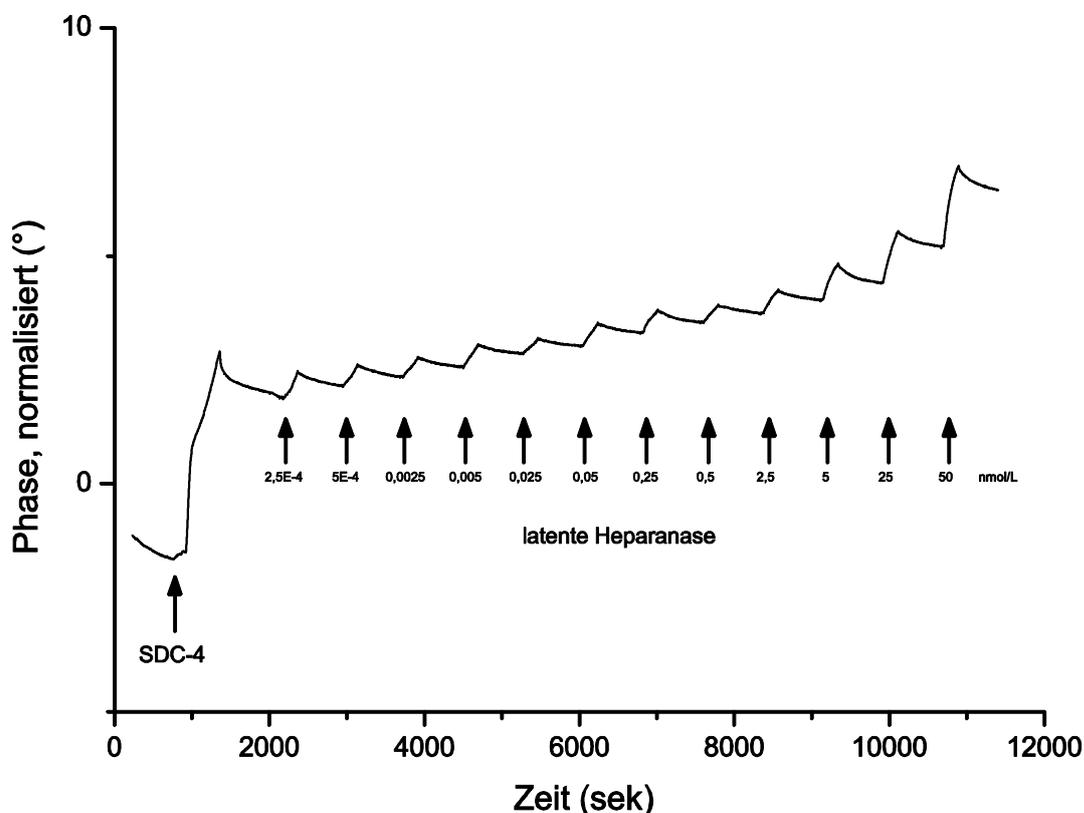


Abb. 5.14 Graph der Phasenverschiebung während der Bindung von latenter Heparanase an SDC-4. Der Beginn jeder Injektion ist mit einem Pfeil markiert.

SDC-4 wurde bereits 2008 als Bindungspartner von latenter Heparanase identifiziert¹³⁶. Obwohl man annehmen kann, dass die Wechselwirkung der Heparanase mit SDC-4 über dessen GAG-Seitenketten stattfindet, ist dieser Bindungsprozess experimentell bisher nicht explizit beschrieben worden. Daher wurde in weiteren Bindungsexperimenten darauf fokussiert, indem das rekombinante SDC-4 vorab mit den Enzymen Heparinase III und Chondroitinase ABC behandelt wurde. Diese bakteriellen Enzyme bauen verschiedene GAG-Ketten ab und SDC-4 verbleibt mit dem nicht abgebauten sauren Polysaccharid. Heparinase III ist ein bakterielles Enzym aus *Flavobacterium heparinum*, das bevorzugt HS-Ketten in Bereichen geringer Sulfatierung abspaltet. Dagegen spaltet die bakterielle Chondroitinase ABC aus *Proteus vulgaris* vornehmlich CS-Ketten.

Der Abbau der Seitenketten wurde über Western Blots nachgewiesen und das derart modifizierte SDC-4 wurde daraufhin auf einem Sensorchip immobilisiert und die Bindung der latenten Heparanase untersucht. Wenn Abweichungen zu dem Bindungsverhalten des unbehandelten SDC-4 existieren, kann das enzymatisch gespaltene GAG als Bindungspartner identifiziert werden.

5.3.1.1 Enzymatischer Abbau der Heparansulfat-Ketten von Syndekan-4 durch Heparinase III

SDC-4 wurde für zwei und 21 Stunden mit Heparinase III versetzt und zur Kontrolle in Western Blots untersucht (Abb. 5.15). Das rekombinante SDC-4 weist keine eindeutig markierte Proteinbande auf, sondern liegt fast über die gesamte Membranbahn verteilt vor. Durch die variierende Länge der GAG-Ketten, die an den Proteinkernen des SDC gebunden sind, bindet der Antikörper an die unterschiedlich retenierten Moleküle. Dies zeigt sich in einer „verschmierten“ Bande.

Nach zwei Stunden war der Abbau der HS-Ketten kaum fortgeschritten. Die gleichen Banden wie bei unbehandeltem SDC-4 sind zu erkennen, wenn auch etwas blasser. Dagegen war die Bindung des Antikörpers nach 21 Stunden deutlich reduziert. Es lag der dimerisierte Proteinkern bei einer Molekularmasse von etwa 40 kDa vor, den der Antikörper kaum detektieren konnte.

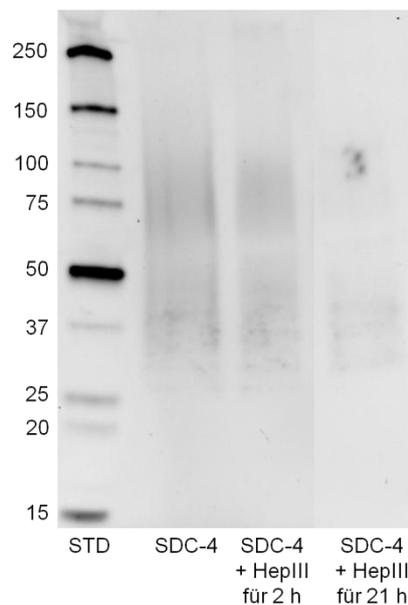


Abb. 5.15 Western Blot des enzymatischen Abbaus des rekombinanten SDC-4 durch Heparinase III. Die Zellen wurden für zwei oder 21 Stunden bei 37°C mit Heparinase III (HepIII) inkubiert. STD: Standard

Die Untersuchungen beweisen, dass das verwendete SDC-4 mit HS-Ketten dekoriert ist und der Abbau dieser Ketten mit Heparinase III nach 21 Stunden nahezu vollständig stattgefunden hat.

5.3.1.2 Bindung von latenter Heparanase an Syndekan-4 nach Heparinase III Abbau

Das modifizierte SDC-4 wurde immobilisiert und die Heparanase-Verdünnungsreihe injiziert. Die Diagramme zeigen in ihrem Verlauf zunächst eine Immobilisierung des modifizierten SDC-4 und danach die Injektionen der Heparanase. Während weniger Injektionen kam es zu einer transienten, hohen Phasenverschiebung (Abb. 5.16, Injektion von 0,005 nmol/L latente Heparanase). Eine derartige kurzfristige Verschiebung, die auf das Ausgangsniveau vor der Injektion zurückfällt, ist meist auf unterschiedliche Viskositäten der Lösungen zurückzuführen. Obwohl für die Verdünnungen der Heparanase und den Laufpuffer PBS (pH-Wert 7,4) mit derselben Temperatur verwendet wurde, kam es bei einigen Messungen zu diesen Peaks, die den Verlauf der Messungen nicht stören, aber eine Auswertung erschweren.

Eine zweistündige Heparinase III-Inkubation zeigte keine Veränderung im Bindungsprofil der Heparanase im Vergleich zu unverändertem SDC-4 (Abb. 5.16). Dahingegen unter-

schieden sich die ermittelten K_D -Werte bei einzelnen Wiederholungen erheblich. Von drei gleich durchgeführten Experimenten ergaben sich K_D -Werte in der Größenordnung von der festgestellten Bindungsaffinität zwischen unbehandeltem SDC-4 und latenter Heparanase (K_D -Wert von $42,0 \pm 0,58$ pmol/L) bis zu 360fach erhöhte K_D -Werte ($11.529,10 \pm 5.318,66$ pmol/L). Ein methodischer Fehler kann ausgeschlossen werden und legt die Vermutung nahe, dass je nachdem, an welcher Position der GAG-Ketten zuerst HS-Gruppen abgespalten werden, die latente Heparanase noch binden kann oder nicht. Aus diesem Grund kommen sehr unterschiedliche Affinitäten zustande. Mit der vorherigen Proteinanalytik stimmen die Ergebnisse überein, die nach zwei Stunden einen geringen Abbau des SDC-4 bestätigen (Abb. 5.15).

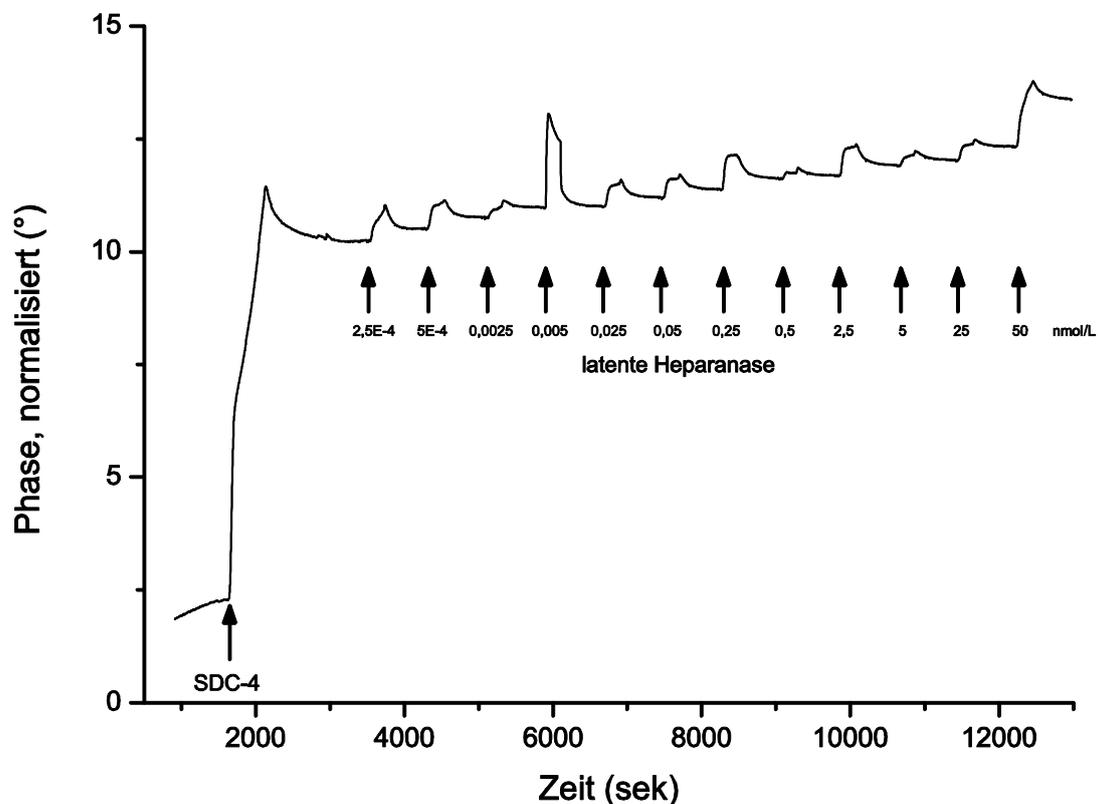


Abb. 5.16 Graph der Phasenverschiebung während der Bindung von latenter Heparanase an SDC-4, das zwei Stunden mit Heparinase III bei 37°C inkubiert wurde.

Im Gegensatz dazu war der Abbau nach 21 Stunden Inkubation mit Heparinase III so weit fortgeschritten (Abb. 5.15), dass eine Bindung von Heparanase nicht mehr detektierbar war. Das biosensorische Diagramm zeigte ebenso keine Masseauflagerungen der latenten Heparanase und die Bestimmung des K_D -Wertes war nicht mehr möglich (Abb. 5.17).

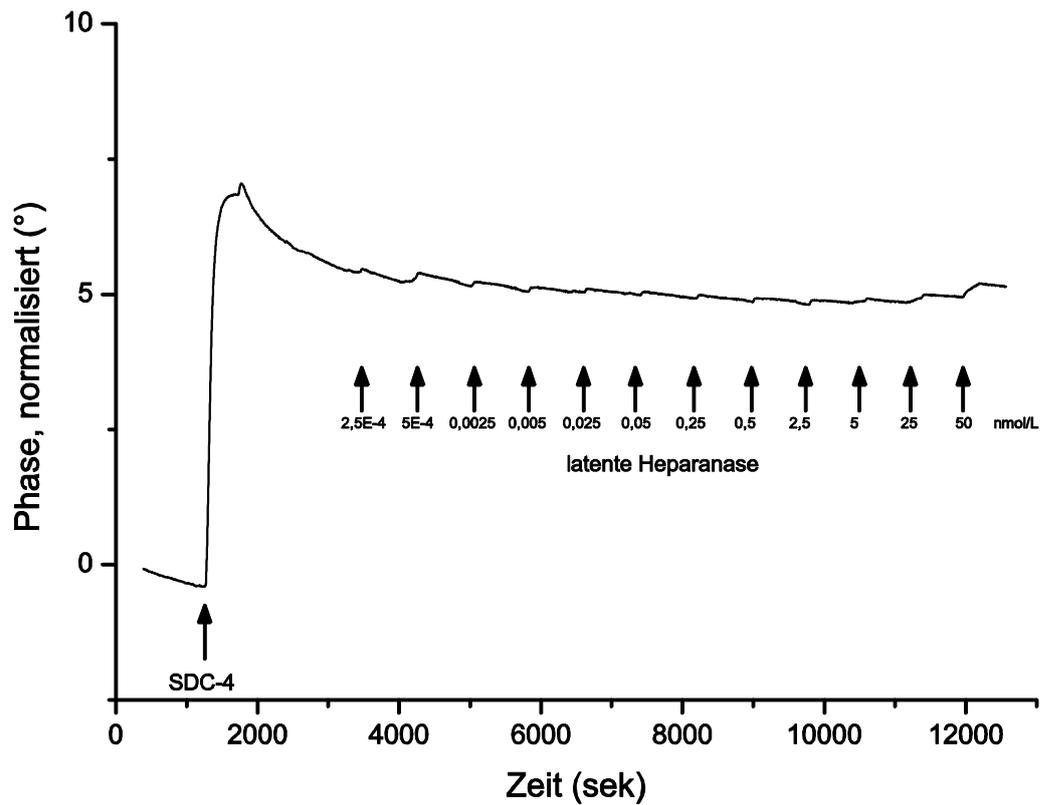


Abb. 5.17 Graph der Phasenverschiebung während der Bindung von latenter Heparanase an SDC-4, das für 21 Stunden mit Heparinase III bei 37°C inkubiert wurde.

5.3.1.3 Enzymatischer Abbau der Heparansulfat-Ketten von Syndekan-4 durch Chondroitinase ABC

Analog zu der Vorgehensweise wie im Kapitel 5.3.1.1 erläutert, wurde SDC-4 mit dem Enzym Chondroitinase ABC versetzt, um das rekombinante SDC-4 auf das Vorkommen von CS-Ketten neben HS-Ketten zu untersuchen. Bereits nach zwei Stunden Vorinkubation des SDC-4 konnte der Antikörper bedeutend weniger Signale im Western Blot detektieren, die nach 21 Stunden komplett verschwunden waren (siehe Abb. 5.18). Der Abbau funktionierte demnach auch mit Chondroitinase ABC und die Reaktion lief sogar schneller ab.

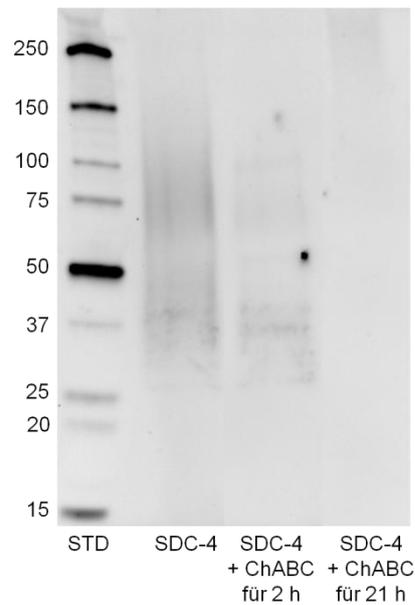


Abb. 5.18 Western Blot des enzymatischen Abbaus des rekombinanten SDC-4 durch Chondroitinase ABC. Die Zellen wurden für zwei oder 21 Stunden bei 37°C mit Chondroitinase ABC (ChABC) inkubiert. STD: Standard

5.3.1.4 Bindung latenter Heparanase an Syndekan-4 nach Chondroitinase ABC Abbau

Latente Heparanase wurde in ansteigenden Konzentrationen über das immobilisierte, modifizierte SDC-4 geleitet und es ergaben sich die Diagramme in Abb. 5.19 und Abb. 5.20. Eine zweistündige Vorabinkubation mit Chondroitinase ABC hat die Bindung der latenten Heparanase bereits negativ beeinträchtigt. Es kommt ebenfalls zu Masseauflagerungen nach jeder Injektion, aber die Phasenverschiebungen sind geringer ausgeprägt als bei Messungen mit unbehandeltem SDC-4. Der K_D -Wert konnte bestimmt werden, ist jedoch mit $309,39 \pm 55,03$ nmol/L bedeutend höher als die gemessene Affinität von latenter Heparanase zu unbehandeltem SDC-4.

Nach Behandlung des SDC-4 mit Chondroitinase ABC für 21 Stunden bei 37°C kommt es zu keinen Masseauflagerungen. Teilweise treten transiente Bindungen auf, aber die Phasenverschiebung verbleibt nach der Immobilisierung des modifizierten SDC-4 auf dem gleichen Niveau.

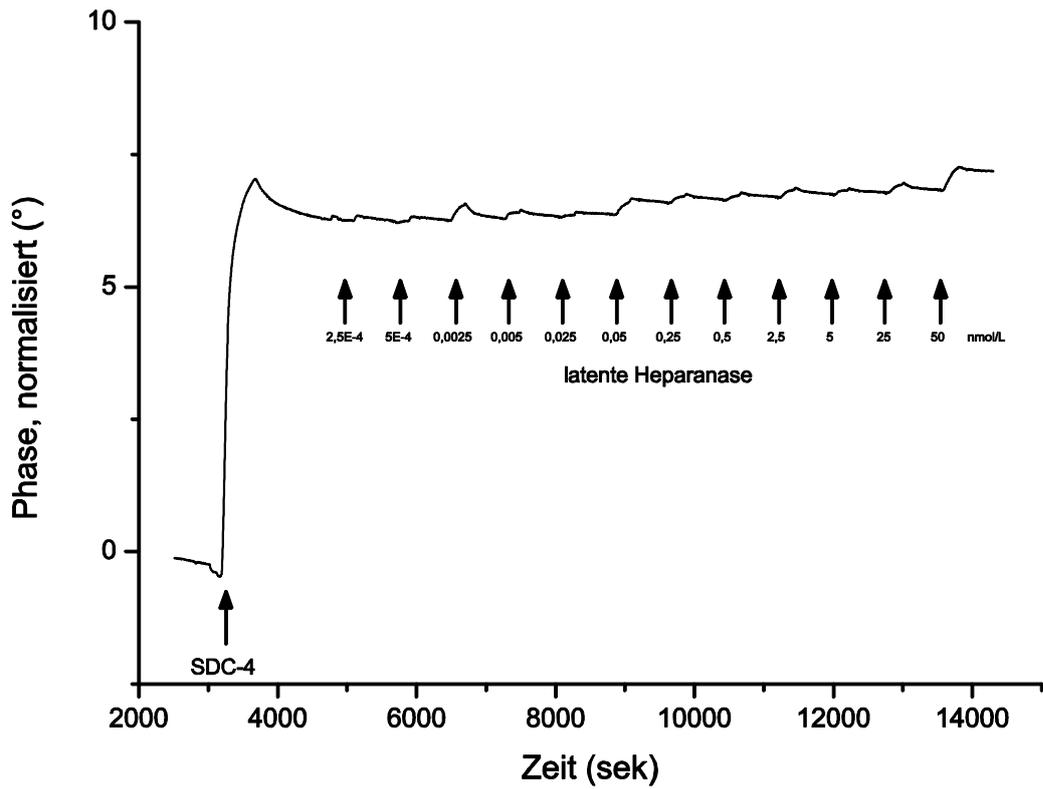


Abb. 5.19 Graph der Phasenverschiebung während der Bindung von latenter Heparanase an SDC-4, das für zwei Stunden mit Chondroitinase ABC bei 37°C inkubiert wurde.

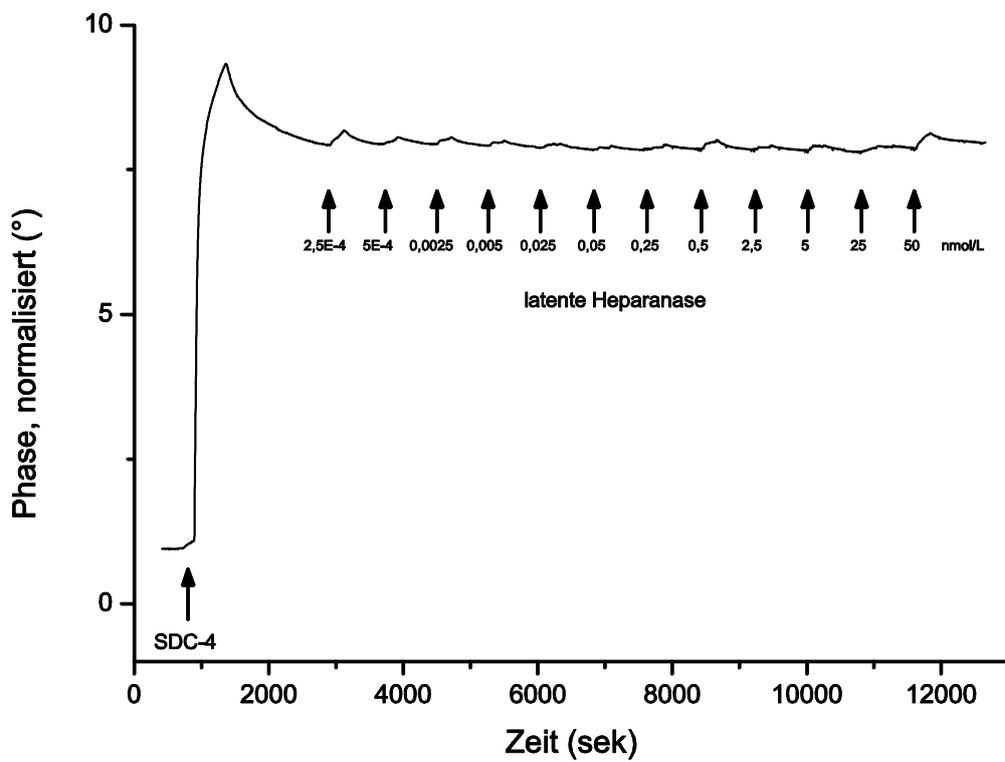


Abb. 5.20 Graph der Phasenverschiebung während der Bindung von latenter Heparanase an Syndekan-4, das für 21 Stunden mit Chondroitinase ABC bei 37°C inkubiert wurde.

Sowohl Heparinase III als auch Chondroitinase ABC konnten das SDC-4 derart abbauen bzw. verändern, dass die Bindungsaffinität zu latenter Heparanase geringer wurde und sogar ganz verschwand. Aufgrund der Modulationen konnten die GAG-Ketten des verwendeten SDC-4 identifiziert werden als HS- als auch CS-Polysaccharide. Weiterhin kann festgehalten werden, dass latente Heparanase zu beiden Strukturen Affinitäten aufweist.

5.3.2 Bindung von latenter Heparanase zu Integrinen

5.3.2.1 Bindung von latenter Heparanase zu VLA-4

Die Affinitätsmessung der latenten Heparanase zu VLA-4 wurde nach dessen Immobilisierung an der Modellmembranoberfläche über die Chelator/His-tag-Methodik durchgeführt (Abb. 5.21). Im Gegensatz zu den Versuchen mit SDC-4 bindet latente Heparanase deutlich schwächer an VLA-4, wie es an den ausbleibenden Phasenverschiebungen nach den ersten Injektionen zu erkennen ist. Dabei ist die niedrigste Konzentration bereits höher als in den Experimenten mit immobilisiertem SDC-4 (0,25 pmol/L im Gegensatz zu 10 pmol/L). Dennoch findet mit einer größeren Menge latenter Heparanase eine Bindung statt, deren Affinität sich in einem K_D -Wert von $223,53 \pm 107,16$ nmol/L zeigt. Wegen der hohen Konzentrationen wird von einer unspezifischen Bindung ausgegangen, die im Folgenden durch Vergleichsstudien genauer untersucht wurde.

5.3.2.2 Bindung von latenter Heparanase zu $\alpha U\beta 5$

Zur Überprüfung, inwieweit die oben gezeigte Heparanase-Bindung an VLA-4 eine unspezifische Bindung ist, die auch bei anderen Integrinen auftritt, wurde das Integrin $\alpha U\beta 5$ gleichermaßen immobilisiert und die Affinität der latenten Heparanase vermessen.

Ein ähnlicher Diagrammverlauf wie bei der Vermessung von VLA-4 zeigt sich auch für $\alpha U\beta 5$. Bei niedrigen Heparanase-Konzentrationen kommt es zu keiner Anlagerung am Integrin. Bei der Injektion höherer Heparanase-Konzentrationen finden jedoch starke Bindungen in Form von Masseauflagerungen statt. Der K_D -Wert der Bindung liegt bei $224,68 \pm 77,08$ nmol/L und ist somit fast identisch mit der Bindungsaffinität der latenten Heparanase zu VLA-4.

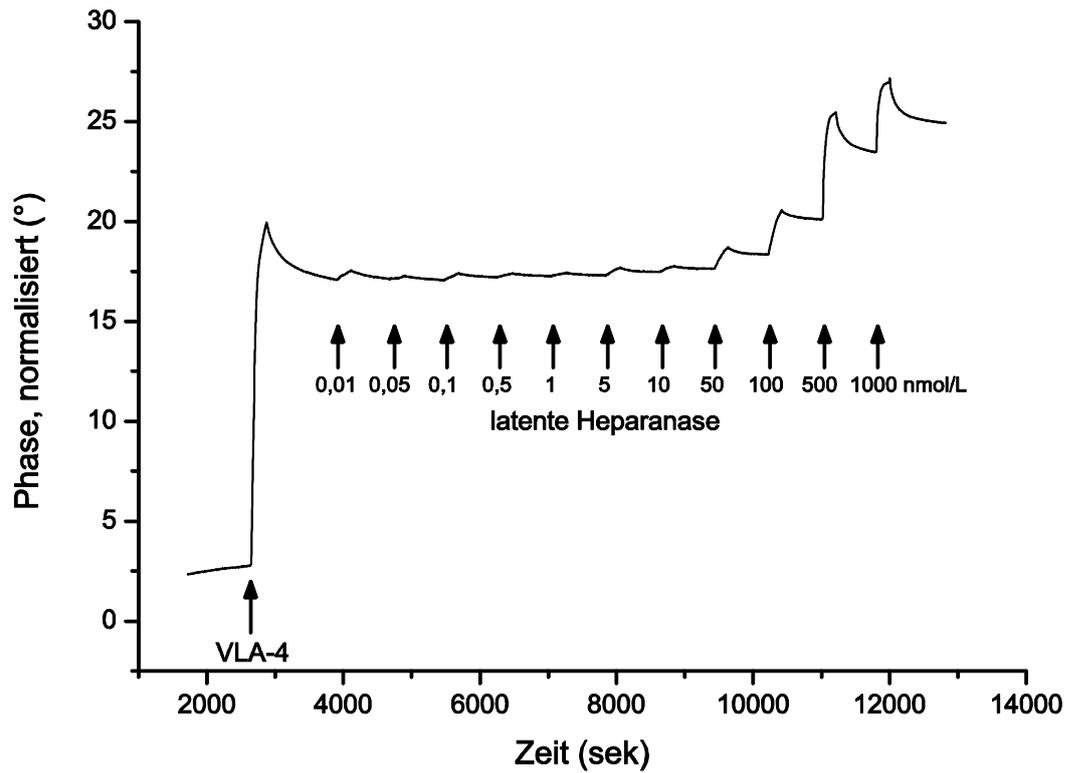


Abb. 5.21 Graph der Phasenverschiebung während der Bindung von latenter Heparanase an VLA-4

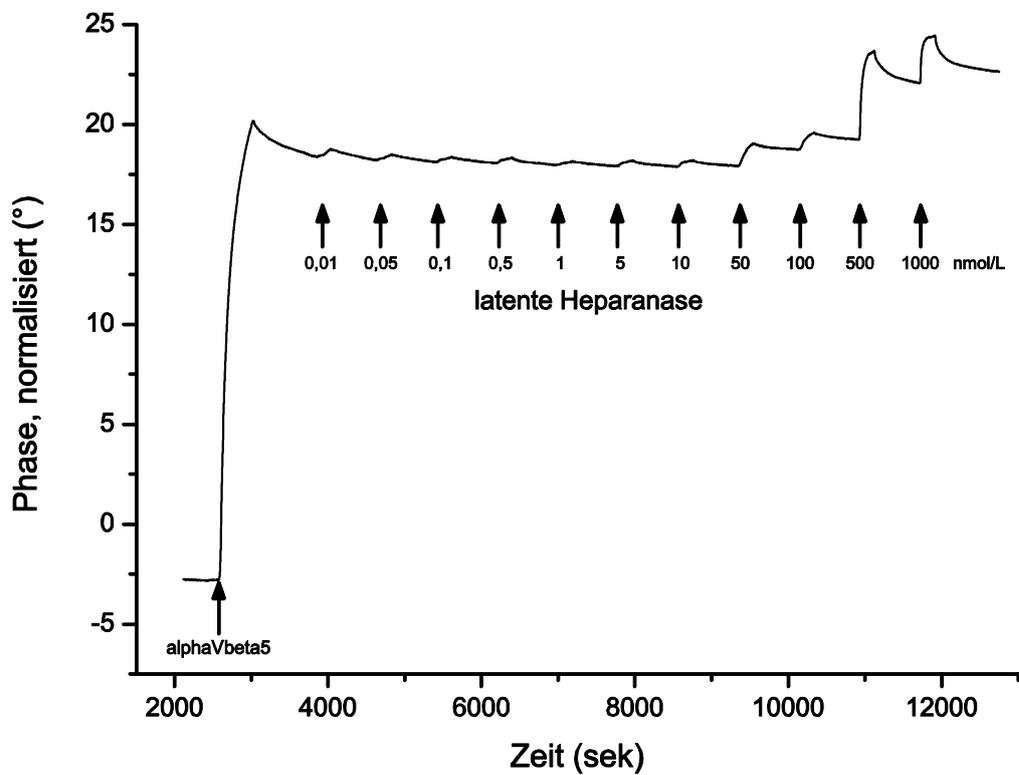


Abb. 5.22 Graph der Phasenverschiebung während der Bindung von latenter Heparanase an α V β 5

Aus den vorgestellten Ergebnissen ergibt sich eine Grundaffinität von latenter Heparanase zu Integrinen, die sich zumindest zwischen VLA-4 und $\alpha\text{V}\beta 5$ nicht unterscheidet.

Im Vergleich ist die Affinität der latenten Heparanase zu SDC-4 höher, d.h. die Heparanase würde in vivo zunächst an SDC-4 binden, bevor die Integrine als Bindungspartner in Frage kämen. In den durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden Konzentrationen verwendet, bei denen es nicht zu einer Absättigung von SDC-4 kommen würde und somit eine Wechselwirkung mit Integrinen nahezu ausgeschlossen werden kann. Dieser Befund wird zusätzlich von den Bindungsversuchen mit VCAM-1 unterstützt, in denen die aSDC-4kd Zellen nach einem Zusatz von latenter Heparanase kein verändertes Bindungsverhalten zeigten.

5.3.3 Bindung von latenter Heparanase zu VCAM-1

Neben der Bindung zu VLA-4 könnte der Gegenpart VCAM-1 eine Bindung zu latenter Heparanase herstellen und als Linker fungieren. Im biosensorischen Experiment wurde die EDC/NHS-Immobilisierung von VCAM-1 durchgeführt. Das charakteristische Profil der Immobilisierung ist zu Beginn des Laufes zu sehen und ist nach 4.000 Sekunden abgeschlossen. Die Phasenverschiebung vom Beginn der Messung bis zu diesem Zeitpunkt zeigt die Masseauflagerung durch die Immobilisierung des VCAM-1. Die Heparanase wurde nach der Immobilisierung und anschließender Phasenstabilisierung in steigender Konzentration zugegeben. Ähnlich wie bei Versuchen mit immobilisierten Integrinen fand bei geringen Heparanase-Konzentrationen keine Auflagerung oder permanente Bindung statt und erst bei höheren Konzentrationen band die latente Heparanase stark an VCAM-1. Die Bindungsaffinität ist im Vergleich zu denen der Integrine marginal niedriger (K_D -Wert $295,15 \pm 88,70$ nmol/L).

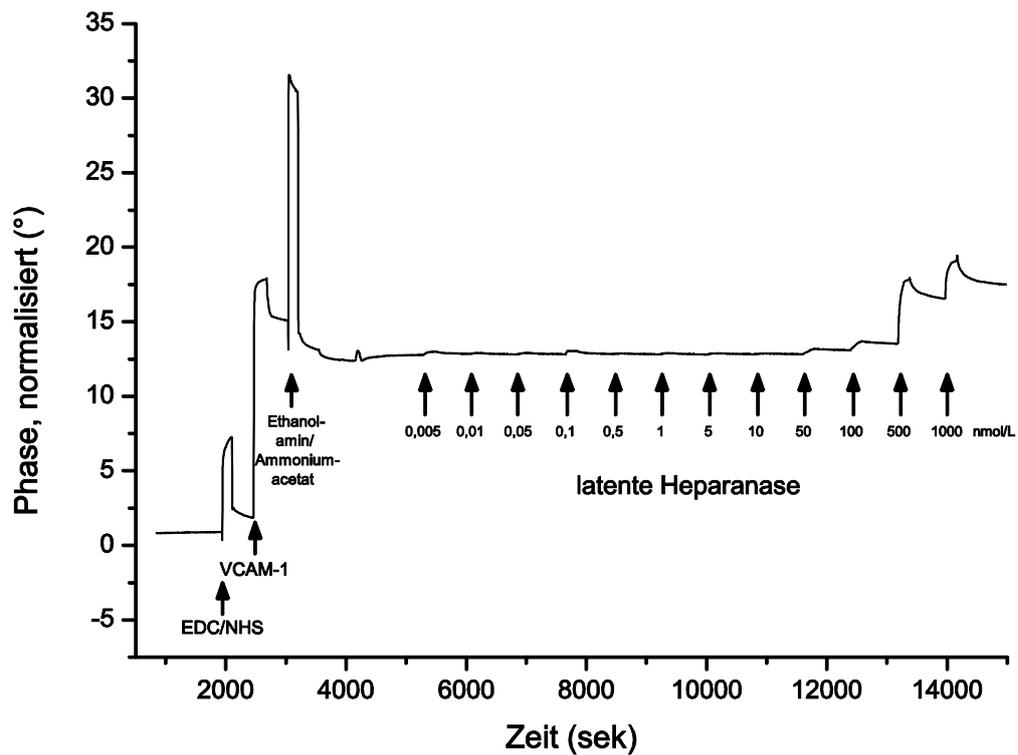


Abb. 5.23 Graph der Phasenverschiebung während der Bindung von latenter Heparanase an VCAM-1

Obwohl die durchgeführten Experimente eine gewisse Affinität der latenten Heparanase zu VCAM-1 und VLA-4 anzeigen, so ist doch die Bindungsaffinität zu SDC-4 um einige Größenordnungen höher und wird daher den entscheidenden Weg der VLA-4-Aktivierung über intrazelluläre Signalwege nach extrazellulärer Bindung von latenter Heparanase an SDC-4 darstellen.

5.4 Intrazelluläre Vorgänge nach Inkubation mit latenter Heparanase

Die präferierte Bindung von latenter Heparanase an SDC-4 und eine hieraus folgende erhöhte Affinität von VLA-4 zu seinem physiologischen Partner VCAM-1 konnten in den vorherigen Experimenten festgestellt werden. Die intrazellulären Vorgänge nach der Bindung von latenter Heparanase an SDC-4 und die Vermittlung der Konformationsänderung von VLA-4, die zur erhöhten VCAM-1-Bindung führt, sind nicht genauer bekannt. Enzymatisch inaktive Heparanase aktiviert in Zellen die Signaling-Proteine Src, PKC α , AKT und Rac1, die alle in der Zelladhäsion und Migration eine Rolle spielen¹³⁶. In MV3 Zellen wurden die beteiligten intrazellulären Kinasen und Proteine in Western Blots, Fluoreszenzmikroskopie und mittels eines für phosphorylierte Kinasen spezifischen Proteome Profiler™ Array Kits identifiziert.

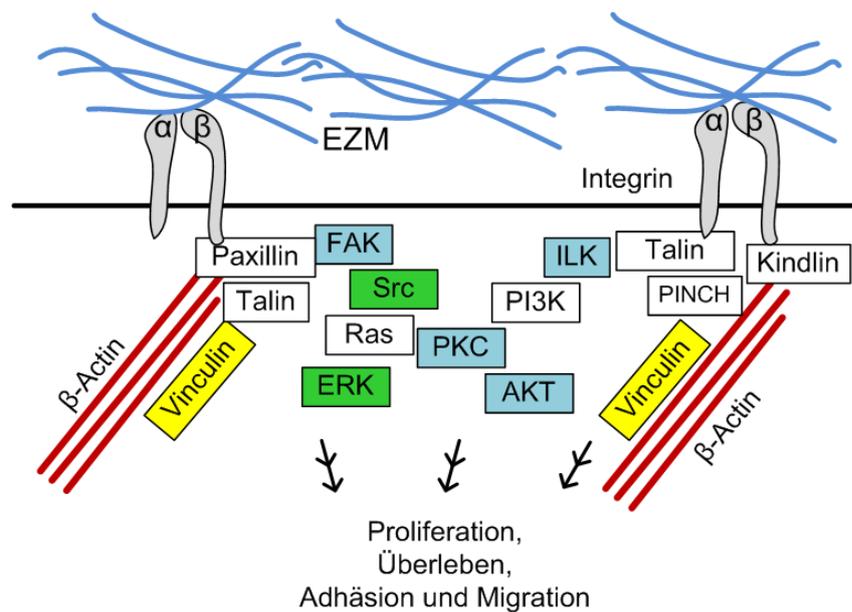


Abb. 5.24 Intrazelluläres Signaling von Integrinen²⁰²

In dieser Zeichnung sind die untersuchten Proteine farblich markiert. Dabei geben die unterschiedlichen Farben die Untersuchungsmethodik an: gelb: Fluoreszenzmikroskopie, blau: Western Blot, grün: Proteome Profiler™ Human Phospho-Kinase Array.

5.4.1 Expression und Aktivität von ausgewählten Adhäsionskinasen nach Heparanase-Einfluss

Wichtige Kinasen wie FAK, AKT und ILK, die in Adhäsions- und Migrationsprozesse der Integrine involviert sind, sowie die SDC-4-assoziierten Proteinkinasen PKC α und PKC δ wurden auf ihre Aktivität vor und nach 10-minütiger Inkubation mit latenter Heparanase (2 μ g/mL) mittels Western Blot analysiert.

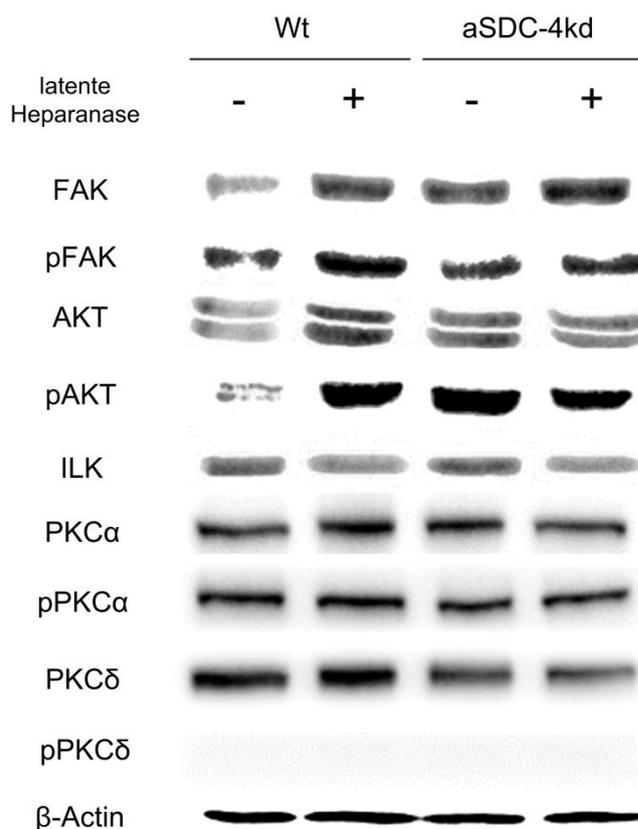


Abb. 5.25 Western Blots von intrazellulären Kinasen der MV3 Wt und aSDC-4kd Zellen. Als „housekeeping protein“ wurde das konstitutiv exprimierte β -Actin untersucht.

In Wt Zellen ist nach Behandlung mit latenter Heparanase die Expression von FAK sowohl in inaktiver als auch in phosphorylierter Form deutlich erhöht. Als zentrales Signalmolekül der Integrin-vermittelten Signaltransduktion ist ein erhöhtes Vorkommen Beweis für die intrazelluläre Aktivierung von Integrinen durch die Bindung latenter Heparanase an SDC-4. Zellen mit reduzierter SDC-4-Expression zeigten überraschenderweise ohne Heparanase bereits eine hohe FAK-Expression. Dies könnte ein Ausdruck der fehlenden Vernetzung zum extrazellulären Raum sein, die durch das Wegfallen des SDC-4 ent-

standen ist, und in einer Erhöhung der Integrinaktivität als Kontaktpunkte resultiert. Allerdings erhöht sich diese nur marginal durch die latente Heparanase, da nicht genügend SDC-4 zur Weiterleitung des Heparanase-Effektes vorhanden ist, um in 10 Minuten die FAK zu aktivieren. Die pFAK ist in aSDC-4kd Zellen nicht signifikant höher exprimiert als in Wt Zellen und nach Zugabe von Heparanase liegt keine höhere Phosphorylierung vor. Somit aktiviert latente Heparanase in 10 Minuten die FAK als Integrin-vernetzte Kinase, die für die Aktivierung der Integrine und Ausbildung stabiler Zelladhäsionen verantwortlich ist.

Während die FAK direkt mit den Integrinen interagiert und eine nachgeschaltete Kinase darstellt, ist AKT Teil einer anderen Signalkaskade, die über PI3K nach- aber auch vorgeschaltet agiert und Integrine aktivieren kann²⁰³. In MV3 Wt Zellen wird durch Heparanase sowohl die AKT als auch die pAKT stark erhöht. AKT ist ebenso wie FAK in aSDC-4kd Zellen generell höher exprimiert, erhöht sich jedoch nicht nach 10-minütiger Heparanase-Behandlung. Die Querverbindung zwischen SDC-4-Signaling und Integrinaktivierung könnte demnach auch über die Kinase AKT laufen.

Im Gegensatz zu FAK und AKT bleibt die ILK unbeeinflusst durch Heparanase. Somit kann die kurzfristige Aktivierung von VLA-4 über diesen Signalweg ausgeschlossen werden. Dieses Ergebnis ist konform zu vorherigen Publikationen, nach denen ILK nicht in Heparanase-vermitteltes Signaling involviert ist¹³⁸.

In CHO-Zellen wurde eine Aktivierung von PKC α nach Inkubation mit latenter Heparanase nachgewiesen¹³⁶, die sich jedoch in MV3 Zellen nicht zeigte (Abb. 5.25). Weder die inaktive, noch die aktive Form der PKC α liegt nach Behandlung mit Heparanase vermehrt vor. Die ausbleibende PKC α -Aktivierung ist verwunderlich, da das von der Heparanase vermittelte Clustern der SDC-4 Proteine in anderen Zelllinien zu einer aktivierten PKC α führt^{136,204}. Da diese Aktivierung SDC-4-spezifisch ist, ist das geringere Auftreten von PKC α und pPKC α in aSDC-4kd Zellen durch die geringere SDC-4 Expression zu erklären.

PKC δ ist bekannt als Gegenregulator von PKC α in der Zelle. Wenn PKC δ aktiv ist, wird SDC-4 am Ser¹⁸³ phosphoryliert und PKC α kann nicht an SDC-4 binden. Durch bestimmte Liganden/Aktivatoren erfolgen die Dephosphorylierung und eine Zusammenlagerung der SDC-4-Proteine an der Zelloberfläche mit anschließender Aktivierung der PKC α . Die PKC δ ist in beiden Zelltypen exprimiert, jedoch liegt sie nicht aktiviert vor und Heparanase hat keinen Einfluss auf die Expression. In aSDC-4kd Zellen ist sie geringer vorhanden vermutlich wegen der geringeren SDC-4-Menge. Die ausbleibende Aktivierung der PKC δ

befürwortet ein Clustern von SDC-4 auf der Zelloberfläche, das durch die latente Heparanase herbeigeführt wird.

Als Kontrolle wurde das konstitutiv exprimierte β -Actin untersucht, das unbeeinflusst von der latenten Heparanase in der Zelle vorliegt und bestätigt, dass gleiche Proteinmengen untersucht wurden.

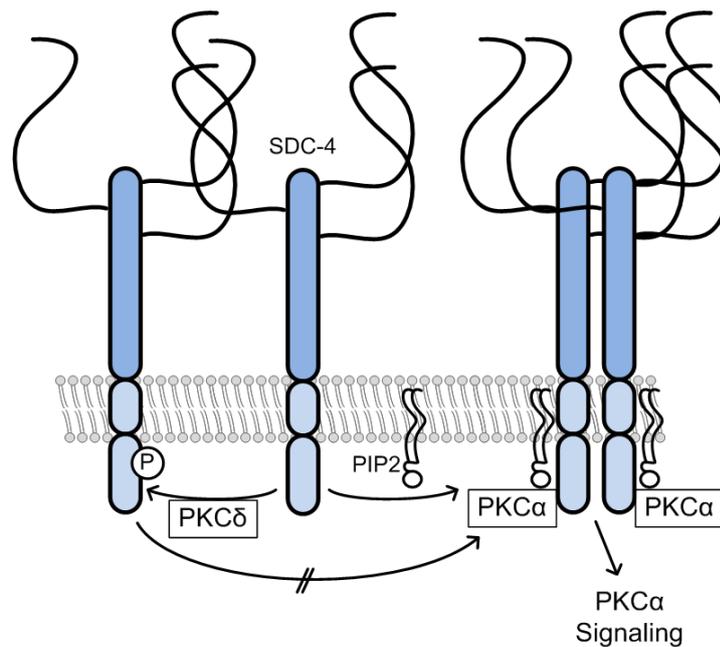


Abb. 5.26 PKC-Signaling von SDC-4²⁰⁴

Zur weiteren Aufklärung wurden die beiden MV3 Zelltypen mit einem Assay von Enzo[®] LifeSciences auf ihre PKC α Aktivität untersucht. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen der Phosphorylierung von PKC α in Wt und aSDC-4kd Zellen festgestellt. Darüber hinaus konnte keine Steigerung oder Abnahme der PKC α -Aktivität unter Beeinflussung durch latente Heparanase detektiert werden.

5.4.2 Proteome Profiler™ Human Phospho-Kinase Array

Zur Aufdeckung weiterer, durch Heparanase aktivierter Kinasen wurde ein Phospho-Kinase Array von R&D Systems mit Zelllysaten von MV3 Wt und aSDC-4kd Zellen durchgeführt. Insgesamt 45 Antikörper gegen Kinasen und Proteine waren auf der Membran punktuell aufgetragen und wurden untersucht. Die Auswertung erfolgte nach Normalisierung auf die Referenz-Pixeldichte und Festlegung des Nullwertes auf die Pixeldichte der Negativkontrolle (PBS) für jede Membran. Derart konnten die vier Ansätze MV3 Wt oder aSDC-4kd mit und ohne 10-minütiger Inkubation mit latenter Heparanase (5 µg/mL) verglichen werden.

5.4.2.1 Beeinflussung des ERK-Signalweges durch latente Heparanase

In diesem Assay wurde cAMP response element binding Protein (CREB) als das durch Inkubation mit latenter Heparanase am stärksten phosphorylierte Protein identifiziert. CREB ist ein Transkriptionsfaktor, der am Ende einer von ERK oder PKC angeregten Signaltransduktionkaskade steht²⁰⁵. Viele Prozesse laufen über CREB wie Signalwege, die durch Hormone oder Wachstumsfaktoren induziert werden. Es konnte anhand von Gehirnetastasen einer Melanomzelllinie gezeigt werden, dass CREB zu den Regulatoren gehört, die die Gentranskription der Heparanase und ihre Aktivität in Melanomzellen erhöhen²⁰⁶. Trotzdem ist nicht zu erwarten, dass eine alleinige Aktivierung von CREB auf eine spezifische Heparanase-Wirkung zurückzuführen ist.

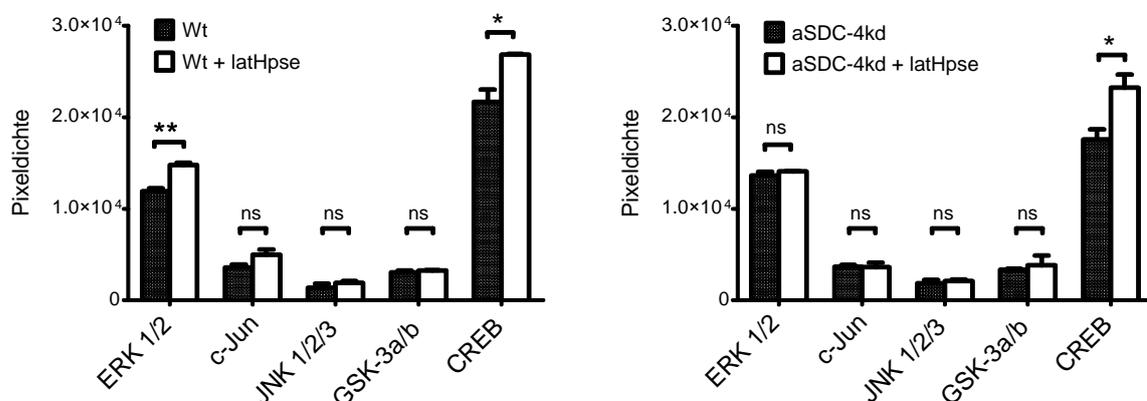


Abb. 5.27 Pixeldichten der Kinasen ERK1/2, c-Jun, JNK1/2/3, GSK-3α/β und CREB in Wt und aSDC-4kd Zellen mit und ohne latenter Heparanase-Behandlung (latHpse) im Proteome Profiler™ Assay

Im Proteome Profiler™ Array ist zu erkennen, dass die latente Heparanase in Wt als auch in aSDC-4kd Zellen aktivierend auf CREB wirkt. Allerdings war in unbehandelten Wt Zellen die phosphorylierte Form bereits signifikant höher exprimiert als in SDC-4-reduzierten Zellen, was auf eine Abhängigkeit von SDC-4 hindeutet. Für ein Signaling über ERK, das in der Aktivierung von CREB mündet, spricht die erhöhte Phosphorylierung von ERK 1 und 2 sowie von c-Jun in Wt Zellen unter Heparanase-Einfluss. Desweiteren ist keine Aktivierung der GSK-3 α oder β vorhanden, die inhibierend auf diesen Signalweg wirken würden.

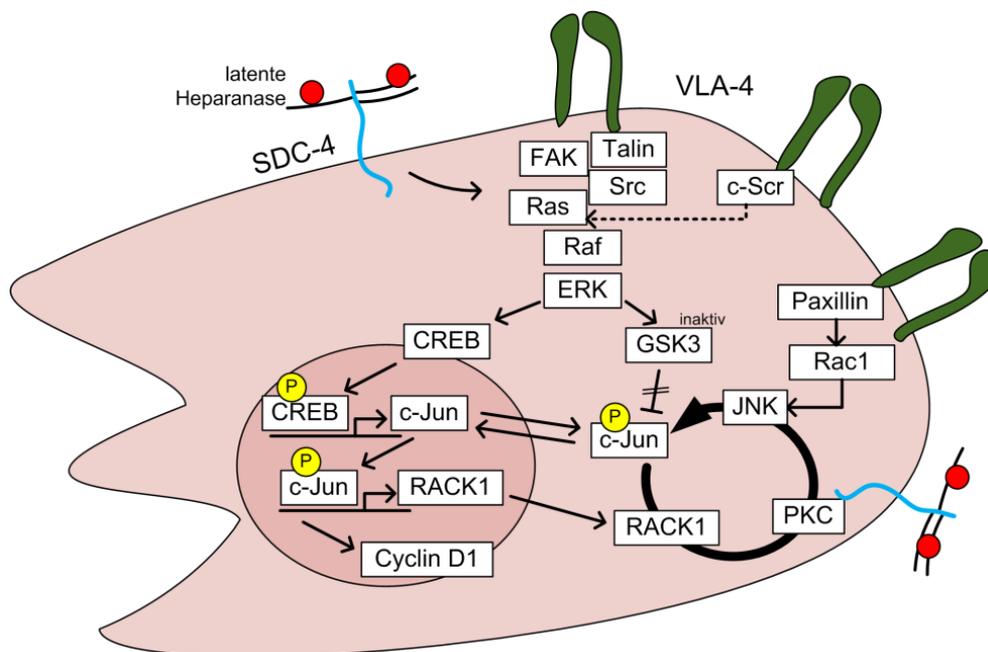


Abb. 5.28 Signaling in Melanomzellen über ERK-JNK nach Lopez-Bergami et al.²⁰⁷

Der ERK-Signalweg stellt in Melanomzelllinien den wichtigsten Signalweg bezüglich der Wachstumssignale, des Zellüberlebens oder der Invasion in Gewebe dar²⁰⁸. In aktuellen Studien wurde dargelegt, dass über diesen Signalweg die VEGF-Expression positiv von Heparanase beeinflusst und durch Heparanase-Inhibitoren unterbunden wird^{208,209}. Die Zusammenhänge zwischen Melanom, Heparanase und ERK-Signalweg werden durch die vorliegenden Daten auch für MV3 Zellen bewiesen und zeigen darüber hinaus bereits eine Aktivierung durch enzymatisch inaktive Heparanase und eine Abhängigkeit von der Expression des SDC-4 auf der Zelloberfläche.

5.4.2.2 Beeinflussung des p53-Signalweges durch latente Heparanase

Das Protein p53 ist in malignen Zellen ein besonderes und interessantes Protein, da es tumorsuppressiv wirkt und den Zellzyklus reguliert, DNA-Reparatur veranlasst, aber auch in letzter Konsequenz die Apoptose der Zelle einleiten kann. Es nimmt eine wichtige Rolle in der Vermeidung von unkontrolliert proliferierenden Zellen ein.

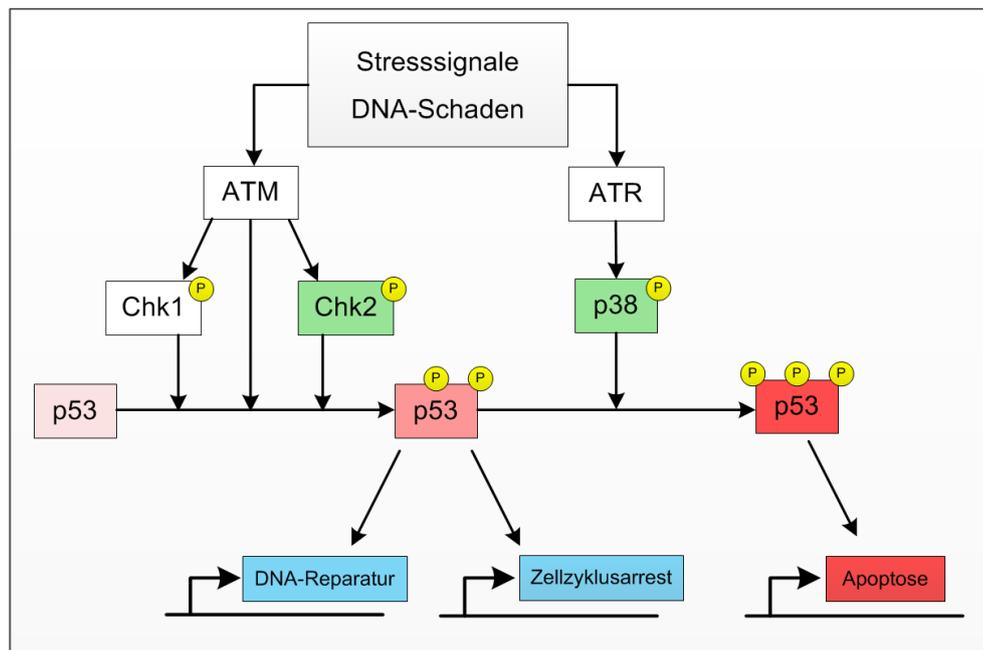


Abb. 5.29 Signaling über Chk2, p38 und p53

Das tumorsuppressive Protein p53 kann an drei Aminosäuren phosphoryliert werden (S15, S45 und S392) und beeinflusst je nach Grad der Phosphorylierung die Genexpression, um DNA-Reparaturen anzustoßen, den Zellzyklusarrest oder die Apoptose zu vermitteln²¹⁰.

ATM: ataxia telangiectasia mutated, ATR: ATM-and RAD3-related, Chk: Checkpoint Kinase

In vielen Krebsarten ist p53 mutiert, so dass ein wichtiger Kontrollmechanismus außer Kraft gesetzt ist und diese Krebszellen ungehindert wachsen können. MV3 Zellen wurden noch nicht auf eine Mutation des p53 untersucht und es wird hier von einem nicht mutierten p53 ausgegangen. Von dieser Annahme ausgehend, scheint die erhöhte Phosphorylierung des p53 an drei prominenten Serinresten (S15, S45 und S392) nach latenter Heparanase-Inkubation eine Gegenregulation darzustellen. Diese erfolgt jedoch nur in Wt Zellen, was wiederum ein Hinweis auf die notwendige Rolle des SDC-4 ist.

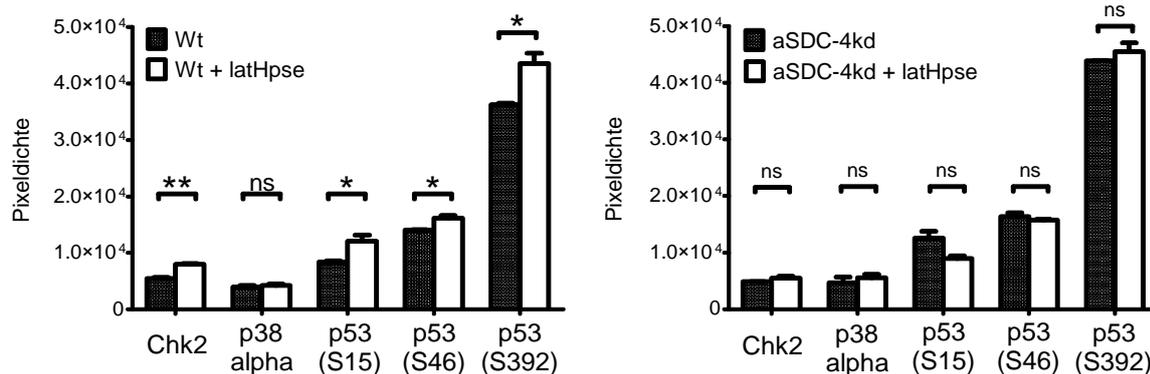


Abb. 5.30 Pixeldichten der Kinasen Chk2, p38 α und p53 in Wt und aSDC-4kd Zellen mit und ohne latenter Heparanase-Behandlung (latHpse) im Proteome ProfilerTM Assay

Die Zelle bindet die latente Heparanase und reagiert u. a. in einer erhöhten p53-Aktivierung, um die Transkription des Heparanase-Gens durch direkte Bindung an den Promotor zu stoppen, wie es bereits in anderen Zelllinien gezeigt werden konnte²¹¹. Für diese negative Rückkopplung spricht auch die aktivere Checkpoint-Kinase 2 (Chk2) in Heparanase behandelten Wt Zellen. Sie ist dem p53 vorgeschaltet und stabilisiert die phosphorylierte Form²¹². Die Kinase p38 α ist nach Heparanase-Inkubation nicht in höherem Maße phosphoryliert. Somit wurde die Genexpression von Apoptose-vermittelnden Proteinen nicht aktiviert.

Dieser Signalweg hat keine Relevanz für die Erhöhung von Integrin-Aktivität, stellt jedoch in der Zelle eine wichtige Gegenregulation zur latenten Heparanase dar.

5.4.2.3 Beeinflussung von FAK und AKT durch latente Heparanase

Im vorherigen Kapitel 5.4.1 wurden die Integrin-gekoppelten Kinasen FAK und AKT anhand von Western Blots untersucht. Dabei zeigte sich in Wt Zellen eine erhöhte Phosphorylierung der FAK und AKT durch latente Heparanase. Dahingegen waren mittels Proteome ProfilerTM Array nur minimale oder keine Unterschiede zwischen den Zelltypen oder nach Heparanase-Inkubation festzustellen. Wie in den Blots liegt die AKT in aSDC-4kd Zellen aktiver vor. Die signifikant geringere Phosphorylierung von AKT (S473) ist allerdings überraschend. In anderen Arbeiten wurde gezeigt, dass diese Aminosäure bevorzugt nach Heparanase-Inkubation phosphoryliert wurde¹³⁸. Um dieses Ergebnis zu verifizieren, sind weitere Untersuchungen angebracht, in denen dem VLA-4 ein Bin-

dungspartner zur Verfügung gestellt wird. Dadurch könnten die Kinasen differenzierter untersucht werden.

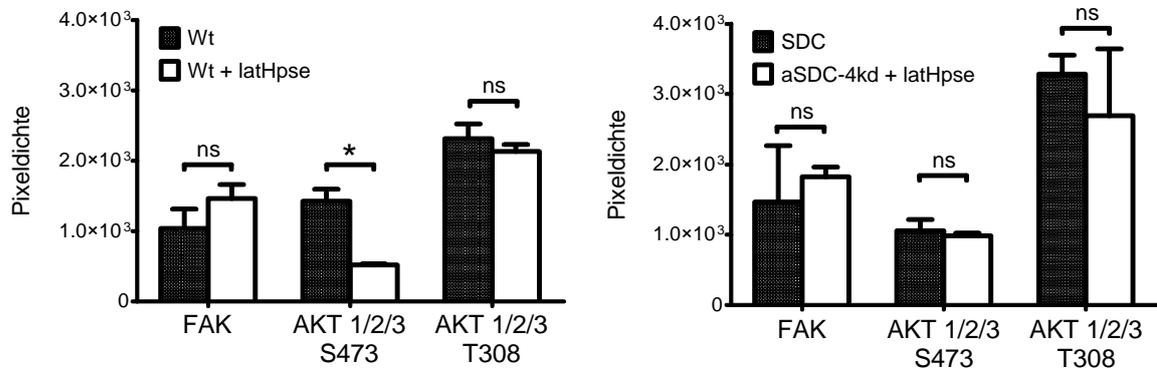


Abb. 5.31 Pixeldichten der Kinasen FAK und AKT in Wt und aSDC-4kd Zellen mit und ohne latenter Heparanase-Behandlung (latHpse) im Proteome Profiler™ Assay

5.4.2.4 Beeinflussung der Familie der Src-Kinasen durch latente Heparanase

Kinasen der Src-Familie sind nicht Rezeptor gebundene Tyrosinkinase, die die Hydroxygruppen von Tyrosin-Einheiten vieler zytosolischer Proteine phosphorylieren und somit stark in das Signaling der Zellen involviert sind. Die meisten untersuchten Kinasen dieser Familie sind unbeeinflusst von latenter Heparanase, nur phosphorylierte c-Src- und Lyn-Kinasen liegen in Wt Zellen mit Heparanase in größerer Menge vor. In aSDC-4kd zeigt sich lediglich eine höhere Aktivierung von Fyn, allerdings ist diese Erhöhung nicht signifikant.

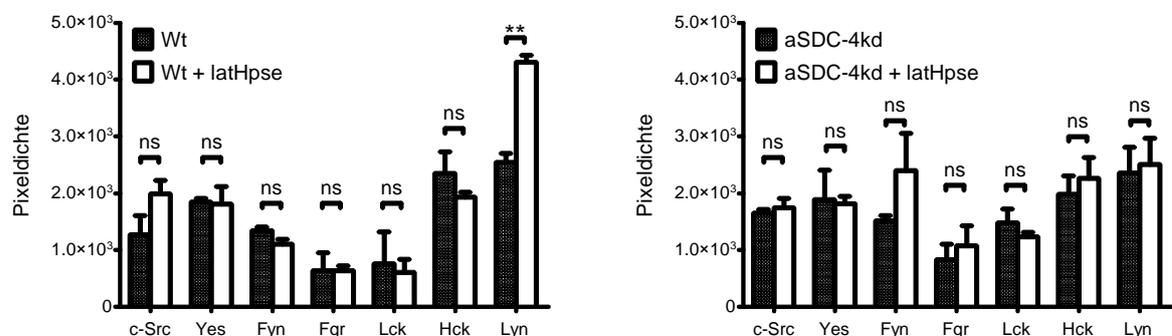


Abb. 5.32 Pixeldichten der Src-Kinasen c-Src, Yes, Fyn, Fgr, Lck, Hck und Lyn in Wt und aSDC-4kd Zellen mit und ohne latenter Heparanase-Behandlung (latHpse) im Proteome Profiler™ Assay

Diese vereinzelt aktiveren Kinasen c-Src, Fyn und Lyn werden mit dem Integrin-Signaling von Plättchen und der Phosphorylierung von SDC-4 in Zusammenhang gebracht^{96,213}. Die Aktivierung von c-Src in Wt Zellen zeigt eine erhöhte Aktivität von SDC-4 und VLA-4, die in einer Stabilisierung von fokalen Adhäsionen mündet. Das Ausbleiben in SDC-4kd Zellen unterstreicht diese SDC-4-Abhängigkeit. Eine Aktivierung der Kinasen deutet weiterhin auf die Einbeziehung von Integrinen hin und zeigt in den zwei Zelltypen die Nutzung verschiedener Kinasen. Dieses unterschiedliche Muster bedeutet die Aktivierung verschiedener Signalwege durch latente Heparanase beim Wegfall des Bindungspartner SDC-4. Lyn liegt durch die latente Heparanase zu einem höheren Anteil phosphoryliert vor. Eine erhöhte Phosphorylierung von Lyn steht im Zusammenhang mit der Aktivierung von β 1-Integrinen, die sich in einem Komplex mit F-Actin und Actin-bindenden Proteinen zusammenschließen²¹⁴.

Intrazellulär werden verschiedene Signalwege durch eine kurze Inkubation mit latenter Heparanase angeregt. Die Ergebnisse des Proteome ProfilerTM Array zeigen dabei die Aktivierung diverser Kinasen, die in Prozesse des Zellarrestes, der Adhäsion und Integrinaktivierung eingebunden sind.

5.4.3 Beeinflussung der Integrin-Aktivität durch latente Heparanase und Detektion durch fluoreszenzmikroskopische Markierung von Vinculin

Die Ergebnisse aus Western Blot und Phospho-Kinase Array-Analysen lassen die intrazelluläre Aktivierung von Integrinen erkennen. Um spezifischer die funktionellen Auswirkungen auf VLA-4 zu untersuchen, wurden Zellen auf VCAM-1 kultiviert und mit latenter Heparanase versetzt. Die Anfärbung des zwischen Integrin und Zytoskelett geschalteten Vinculins erlaubte die Detektion von stabilen Integrin-Clustern, die während dem Entstehen von fokalen Adhäsionsspots gebildet werden.

Latente Heparanase erhöhte die Anzahl der Vinculinspots und somit die Anzahl der fokalen Adhäsionskomplexe in MV3 Wt Zellen. In aSDC-4kd Zellen blieb diese Erhöhung aus und bestätigt wiederum die wichtige Rolle des SDC-4 als Bindungspartner der Heparanase. Die Stimulation der Integrine durch Mangan-Ionen zeigte keine Zunahme von Vinculinspots. Dies weist darauf hin, dass die Integrinaktivierung durch Mangan extrazellulär erfolgt und sich innerhalb von 10 Minuten nicht in einer intrazellulären, stabilen Vinculin-Bündelung fortsetzt. Ebenso verhält es sich mit dem rekombinanten KKDC-Peptid, das aus den Aminosäuren, die zur Heparin-Bindungseinheit der Heparanase gehören, besteht. Es war nicht in der Lage die Anzahl der Vinculinspots und somit die

Bindung von VLA-4 und VCAM-1 zu erhöhen. In vorangegangenen Publikationen wurde die Bindung von „KKDC“ an SDC-4 gezeigt, jedoch wurden diese Komplexe im Gegensatz zu denen bestehend aus Heparanase und SDC-4 nicht in die Zelle aufgenommen¹³⁶. Ob das KKDC-Peptid die gleiche Stimulation wie latente Heparanase wegen einer ausbleibenden Internalisierung des „KKDC“/SDC-4-Komplexes oder wegen dem Fehlen einer weiteren bindenden Aminosäuresequenz der latenten Heparanase nicht erreichen konnte, ist in diesem Versuch wie in den vorherigen Versuchen mit dem KKDC-Peptid (siehe Kapitel 5.2.3 und 5.2.8) nicht nachzuverfolgen.

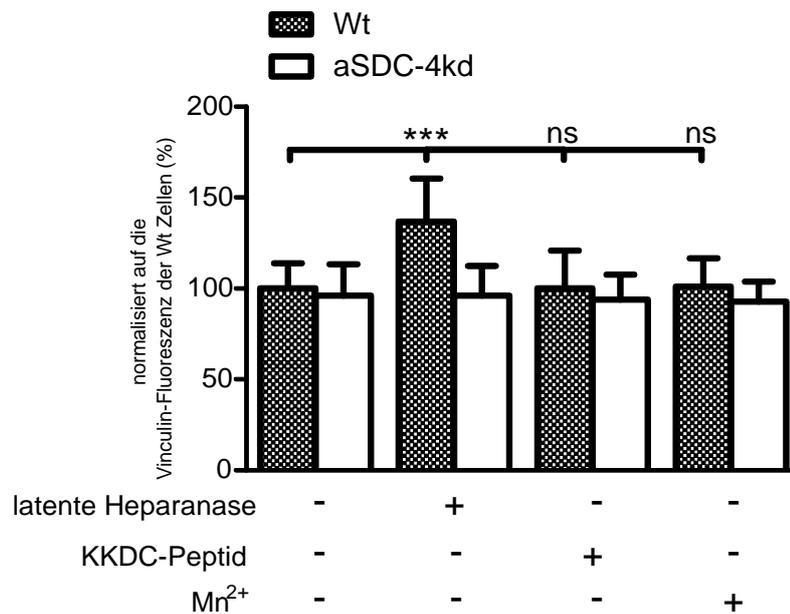


Abb. 5.33 Detektion von Vinculinspots in Wt und aSDC-4kd Zellen immobilisiert auf VCAM-1. Den Zellen wurde für 10 Minuten latente Heparanase (2 µg/mL), KKDC-Peptid (50 µmol/L) oder Manganionen (1 mmol/L) zugegeben. Es wurden die Vinculinspots pro Zellfläche vermessen und auf die Anzahl in unbehandelten Zellen bezogen (100 %).

Die Untersuchungen der intrazellulären Vorgänge nach Einflussnahme von exogen zugesetzter latenter Heparanase beweisen die spezifische Aktivierung von VLA-4 ausgehend von SDC-4 über die ERK- und AKT-Signalwege, die nachgeschaltete FAK-Aktivierung und die Beteiligung von Kinasen aus der Src-Familie. Die Detektion von Vinculin beweist, dass neben der Aktivierung einzelner VLA-4 Moleküle eine Zusammenlagerung von VLA-4 angeregt wird. Somit besteht eine Affinitäts- und Aviditätssteigerung des VLA-4 nach Stimulation mit latenter Heparanase. Desweiteren kommt es bereits nach 10-minütiger Heparanase-Behandlung zur Einleitung von regulatorischen Gegenmaßnahmen in Form von p53-Aktivierung und Zellarrest.

5.5 Interaktion von Heparinen mit latenter Heparanase und Verhinderung des Heparanase-Effekts

Enzymatisch aktive Heparanase spaltet bevorzugt HS-Ketten und zeigt zu diesen eine hohe Affinität. Als Substrat erkennt sie allerdings auch das strukturell verwandte Heparin, welches bereits Mitte der 1980er Jahre als Inhibitor der aktiven Heparanase identifiziert wurde¹⁴⁴. Eine hohe Bindung zwischen Heparin und latenter Heparanase wurde festgestellt, wobei eine Affinitätsbestimmung ausblieb¹³⁷. Im Folgenden wird geklärt, ob die Wirkung latenter Heparanase auf VLA-4 durch Zugabe von Heparinderivaten beeinflusst oder sogar gehemmt werden kann. Dabei könnte ein neues Target verifiziert werden, welches als weiterer Erklärungsansatz zur antimetastatischen Wirksamkeit von Heparin in vielfältigen präklinischen Studien dienen könnte.

5.5.1 Bindung von latenter Heparanase zu modifizierten Heparinen

In initialen Untersuchungen zur Heparin/Heparanase-Wechselwirkung wurden verschiedene semisynthetische Heparinderivate, die dankenswerterweise von Dr. Annamaria Naggi und Dr. Giangiacomo Torri zur Verfügung gestellt wurden, auf ihre Bindungsaffinität zu latenter Heparanase analysiert. Dazu wurde die Heparanase wie in Kapitel 4.7.1 beschrieben immobilisiert und Verdünnungsreihen der verschiedenen Derivate in ansteigender Konzentration injiziert.

Tinzaparin und die modifizierten Heparine wiesen alle mikromolare Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten (K_D -Werte) in ihren Wechselwirkungen mit latenter Heparanase auf. Dabei banden die modifizierten Heparine mit höherer Affinität an latenter Heparanase als es Tinzaparin vermochte. Sie unterschieden sich untereinander jedoch in ihren Assoziations- und Dissoziationskonstanten (k_{on} und k_{off}). Das über Glykolspaltung hergestellte Heparin (RO-H) weist die höchste Affinität zur latenten Heparanase auf. Allerdings ist die Geschwindigkeit der Dissoziation die höchste der untersuchten Heparine, weshalb es nicht in weiteren Versuchen verwendet wurde. Die Desulfatierungen, entweder an C2- oder C6-Position des Zuckergerüsts (2O- und 6O-DS-H), resultierten in mittleren Affinitäten und wurden aus diesem Grund ebenfalls nicht in weiteren Versuchen verwendet. Das zu 100 % N-acetylierte Heparin (NAc-H) wies die höchste Assoziations- und eine mittlere Dissoziationskonstante auf, weshalb es in den anschließenden Zellversuchen als Testsubstanz verwendet wurde.

Tabelle 5.1 Gleichgewichtsdissoziations-, Assoziations- und Dissoziationskonstanten der Heparine zu latenter Heparanase

Heparine	K_D ($\mu\text{mol/L}$)	k_{on} ($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\text{ s}^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})
Tinzaparin	$32,5 \pm 4,5$	$2,6 \times 10^2 \pm 0,7 \times 10^2$	$8,46 \times 10^{-3} \pm 2,89 \times 10^{-3}$
2O-DS-H	$11,6 \pm 4,12$	$1,67 \times 10^2 \pm 0,5 \times 10^2$	$2,05 \times 10^{-3} \pm 1,34 \times 10^{-3}$
6O-DS-H	$10,7 \pm 1,7$	$15,2 \times 10^2 \pm 2,8 \times 10^2$	$16,04 \times 10^{-3} \pm 2,24 \times 10^{-3}$
RO-H	$4,3 \pm 0,6$	$19,6 \times 10^2 \pm 2,1 \times 10^2$	$8,37 \times 10^{-3} \pm 1,28 \times 10^{-3}$
NAC-H	$8,2 \pm 1,1$	$6,7 \times 10^2 \pm 1,4 \times 10^2$	$5,45 \times 10^{-3} \pm 1,09 \times 10^{-3}$

Für weitere Versuche wurden Tinzaparin und NAc-H ausgewählt. Tinzaparin wird wie auch die anderen LMWH in der Thromboseprophylaxe von Tumorpatienten eingesetzt und wurde als VLA-4-bindendes Heparin identifiziert, das die Bindung zu VCAM-1 verhindert¹⁶⁵. Diese Eigenschaften kennzeichnen es als wichtige Kontrolle in den weiteren Zellversuchen. Neben Tinzaparin wurde NAc-H verwendet, da es zum einen ein günstiges Verhältnis zwischen Assoziations- und Dissoziationskonstante aufweist, sowie einen niedrigen K_D -Wert von $8,2 \pm 1,1 \mu\text{mol/L}$ besitzt. Es liegt dadurch länger an latente Heparanase gebunden vor und stellt ggf. eine effizientere Bindungsblockade für latente Heparanase und SDC-4 dar. Zum anderen beeinflusst NAc-H nicht die Wechselwirkung zwischen VLA-4 und VCAM-1¹⁶⁵. An dieser Stelle ist zu erwähnen, dass ähnliche Affinitätsabstufung für die Bindung modifizierter Heparine zu enzymatisch aktiver Heparanase bereits identifiziert worden sind²¹⁵. In diesen Studien zeigten sich N-acetylierte und Glykolspaltungs-Heparinvarianten als die effektivsten Inhibitoren der enzymatisch aktiven Heparanase. Diese Bindungsstellen sind ebenfalls in der Struktur der latenten Heparanase vorhanden, wie die hier dargelegten Ergebnisse der im Vergleich höheren Affinitäten der RO-H und NAc-H zu latenter Heparanase zeigen.

5.5.2 Verdrängung von latenter Heparanase durch Heparin aus der Bindung zu Syndekan-4

Zur weiteren Aufklärung der Heparinwirkung auf latente Heparanase wurden Bindungsstudien durchgeführt, die zum Ziel hatten, latente Heparanase aus der Bindung zu SDC-4 durch steigende Heparinzusätze zu lösen. Als Leitsubstanz der Heparine wurde Tinzaparin verwendet.

Heparanase wurde in hoher Menge an immobilisiertes SDC-4 kovalent gebunden, bevor steigende Tinzaparin-Konzentrationen injiziert wurden. Tinzaparin bindet aufgrund seiner Struktur und negativen Ladung nicht an das mit HS-Ketten dekorierte SDC-4, so dass eine Bindung nur zur gebundenen Heparanase wahrscheinlich ist.

Tatsächlich kam es nach der Bindung von latenter Heparanase und Injektion der Tinzaparin-Verdünnungen nicht zu einer Abnahme der Phasenverschiebung, sondern sogar zu zusätzlichen Masseauflagerungen (siehe Abb. 5.34). Aus den angegebenen Gründen war eine Tinzaparin/SDC-4-Bindung auszuschließen, was eine Bindung von Tinzaparin zu latenter Heparanase in den Vordergrund rückte. Bereits nach der Injektion der geringsten Heparin-Konzentration wurde eine hohe Phasenverschiebung und somit Masseauflagerung detektiert. Aufgrund des weiteren Phasenverlaufes lässt sich erkennen, dass die latente Heparanase nach der zweiten Tinzaparin-Injektion mit Heparin „abgesättigt“ vorliegt und eine weitere Zugabe von Heparin keine zusätzliche Masseauflagerung verursacht.

Eine Verdrängung der latenten Heparanase aus ihrer Bindung zu SDC-4 ist folglich nicht möglich. Dies ist auch mit Blick auf die unterschiedlichen Bindungsaffinitäten der latenten Heparanase zu SDC-4 sowie zu Heparin nachzuvollziehen. Daraus ergibt sich die Überlegung, ob vor dem Zustandekommen der SDC-4/Heparanase-Bindung eine Heparanase/Heparin-Wechselwirkung die Aktivierung der Zellen durch latente Heparanase verhindern kann.

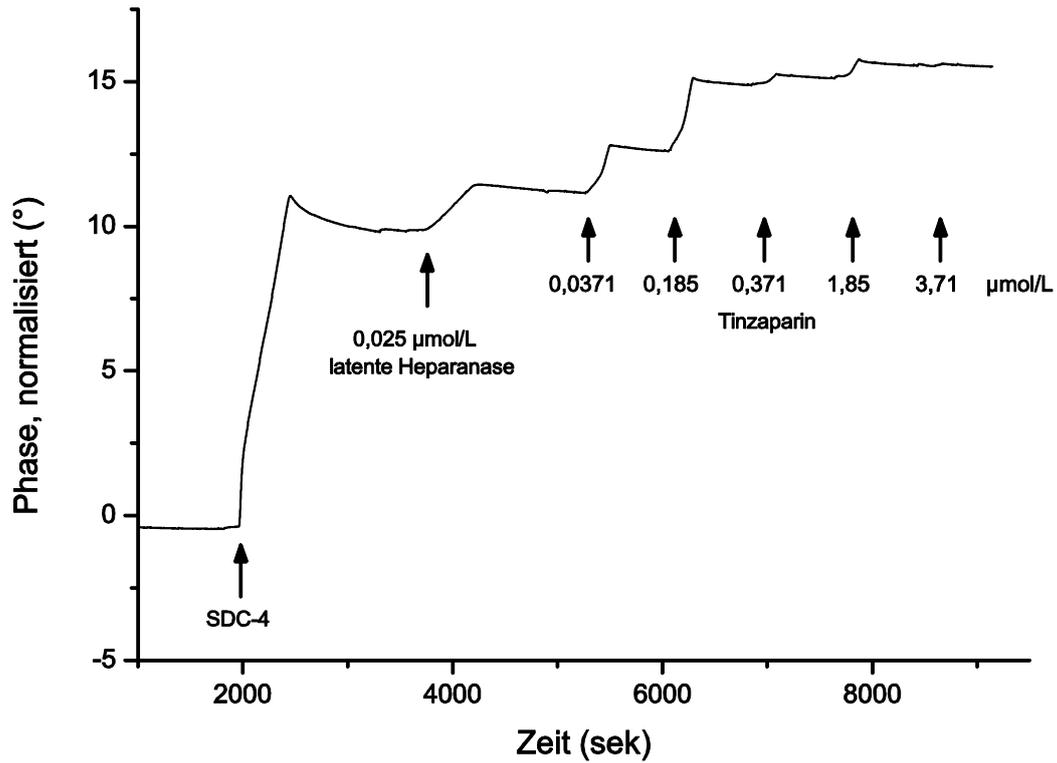


Abb. 5.34 Graph der Phasenverschiebung während der Bindung von an SDC-4 gebundener latenter Heparanase und nachfolgende Tinzaparin-Injektionen

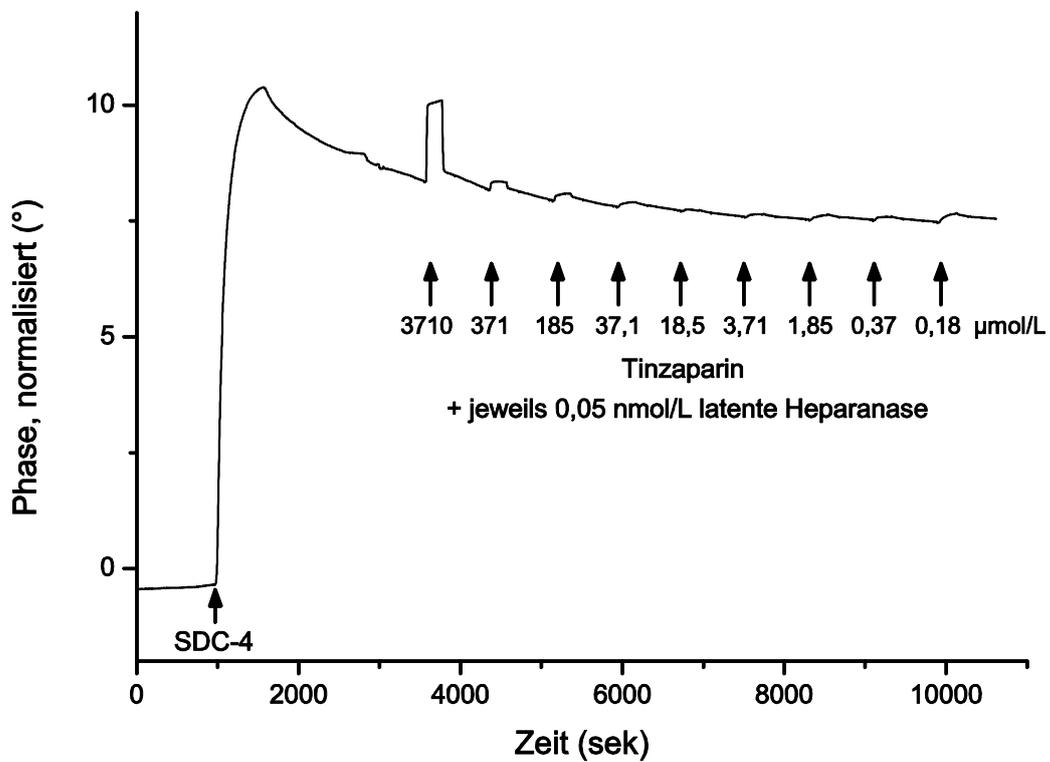


Abb. 5.35 Graph der Phasenverschiebung während der Bindung von SDC-4 und einem Gemisch aus konstanten Konzentrationen der latenten Heparanase mit abnehmenden Tinzaparin-Konzentrationen

5.5.3 Verhinderung der Bindung von latenter Heparanase zu Syndekan-4 durch eine vorherige Bindung zu Tinzaparin

Zur Klärung der Fragestellung, ob Heparine der Bindung von latenter Heparanase an SDC-4 zuvorkommen können, wurde eine definierte Konzentration an latenter Heparanase mit abnehmenden Tinzaparin-Konzentrationen inkubiert und anschließend im Biosensor zur Wechselwirkung mit SDC-4 gebracht.

Beginnend mit einem hohen Tinzaparin-Gehalt werden die Heparanase-Moleküle an einer Bindung zu SDC-4 gehindert (siehe Abb. 5.35). Die ersten Injektionen weisen eine transiente, hohe Phasenverschiebung auf, die sich durch die hohe Viskosität der konzentrierten Tinzaparin-Lösung erklären lässt. Mit zunehmender Verdünnung verschwinden diese kurzen Peaks. Ab einem Schwellenwert von etwa 1,85 $\mu\text{mol/L}$ kann Tinzaparin die 0,05 nmol/L konzentrierte latente Heparanase nicht mehr ausreichend inhibieren, so dass es mit jeder Injektion zunehmend zur Bindung von Heparanase und SDC-4 kommt. Dieser Versuch zeigt, dass Tinzaparin bis zu einer bestimmten Konzentration die Bindung von latenter Heparanase zum SDC-4 verhindern kann.

5.5.4 Einfluss von latenter Heparanase und Heparinen auf das Bindungsverhalten von MV3 Zellen zu VCAM-1 in durchflusszytometrischen Untersuchungen

Die Ergebnisse der Bindungsstudien wurden auf das Zellmodell übertragen und die Bindung zu VCAM-1 zum einen nach simultaner Zugabe von Heparin und latenter Heparanase und zum anderen nach zeitlich versetzter Zugabe durchflusszytometrisch untersucht.

5.5.4.1 Simultane Zugabe von Heparinen und latenter Heparanase zu MV3 Zellen

Beiden Zelltypen wurde vor der Vermessung am Durchflusszytometer für 10 Minuten eine Mischung aus Heparin (50 $\mu\text{g/mL}$) und latenter Heparanase (2 $\mu\text{g/mL}$) zugesetzt.

Die Bindung von VLA-4 zu VCAM-1 war sowohl in Wt, als auch in aSDC-4kd Zellen signifikant reduziert, wenn Tinzaparin 10 Minuten vorab hinzugegeben wurde (siehe Abb. 5.36). Der Zusatz von Heparanase konnte in beiden Zelltypen diese Reduktion nicht ver-

hindern und die VLA-4/VCAM-1-Bindung verblieb auf dem Level der mit Tinzaparin inkubierten Zellen. Da Tinzaparin mit VLA-4 direkt in Kontakt tritt und die Bindung von VCAM-1 inhibiert, war eine Verminderung unter die Adhäsion der unbehandelten Vergleichszellen in beiden Zelltypen zu erwarten und konnte in den Versuchen bestätigt werden.

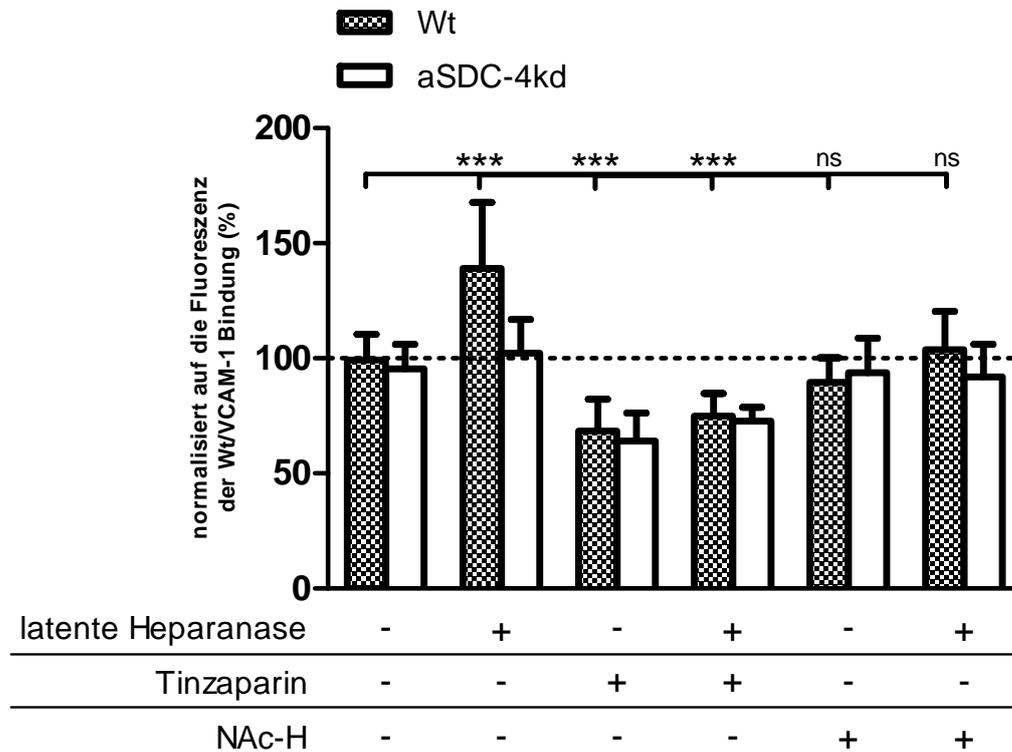


Abb. 5.36 Durchflusszytometrische Untersuchungen der VCAM-1-Bindung von Wt und aSDC-4kd Zellen nach 10-minütiger Inkubation mit Heparinen oder Heparin/Heparanase-Gemischen
NAc-H: N-acetyliertes Heparin

Im Gegensatz dazu wirkt sich eine alleinige Behandlung der Zellen mit NAc-H nicht auf die Bindung von VCAM-1 aus. Bemerkenswert ist die Nivellierung des latenten Heparanase-Effektes auf die VCAM-1/VLA-4-Bindung in Wt Zellen, wenn die Zellen gleichzeitig mit NAc-H versetzt werden. In diesem Fall steigt die Fluoreszenz nicht über die Intensität der unbehandelten Wt Zellen an. Das Heparin ist somit in der Lage den Effekt der latenten Heparanase auf VLA-4 zu verhindern, indem es die Heparanase abfängt, bevor sie an die Zelle binden kann.

Der aSDC-4kd Zelltyp bleibt, wie in den Kapiteln 5.2.6 und 5.2.7 beschrieben, von einer Heparanase-Behandlung unbeeinflusst. Die verminderte VCAM-1-Adhäsion nach einem Zusatz von Tinzaparin ist auch für aSDC-4kd Zellen schlüssig, da beide Zelltypen die

gleiche Menge an VLA-4 auf der Zelloberfläche exprimieren (siehe Kapitel 5.1.3) und Tinzaparin direkt mit diesem interagiert und somit die Bindung zu VCAM-1 verhindert.

Diese Experimente verdeutlichen, dass NAc-H in der Lage ist, den via SDC-4 vermittelten Effekt der latenten Heparanase auf die VLA-4-Aktivierung durch direkte Bindung an Heparanase zu blockieren. Die Hemmung der latenten Heparanase ist auch bei Tinzaparin ein Bestandteil der Wirkung, der jedoch durch die direkte Blockade der VLA-4-Bindung an VCAM-1 überdeckt wird und deshalb bisher nicht zur Kenntnis genommen wurde.

5.5.4.2 Zeitlich versetzte Zugabe von Heparinen und latenter Heparanase zu MV3 Zellen

In einem weiteren Ansatz wurde die Heparine (50 µg/mL) vorab für fünf Minuten zu den Zellen gegeben und erst anschließend die latente Heparanase (2 µg/mL) für 10 Minuten, um die Auswirkung auf die VLA-4/VCAM-1-Bindung nach zeitlich versetzter Zugabe zu untersuchen.

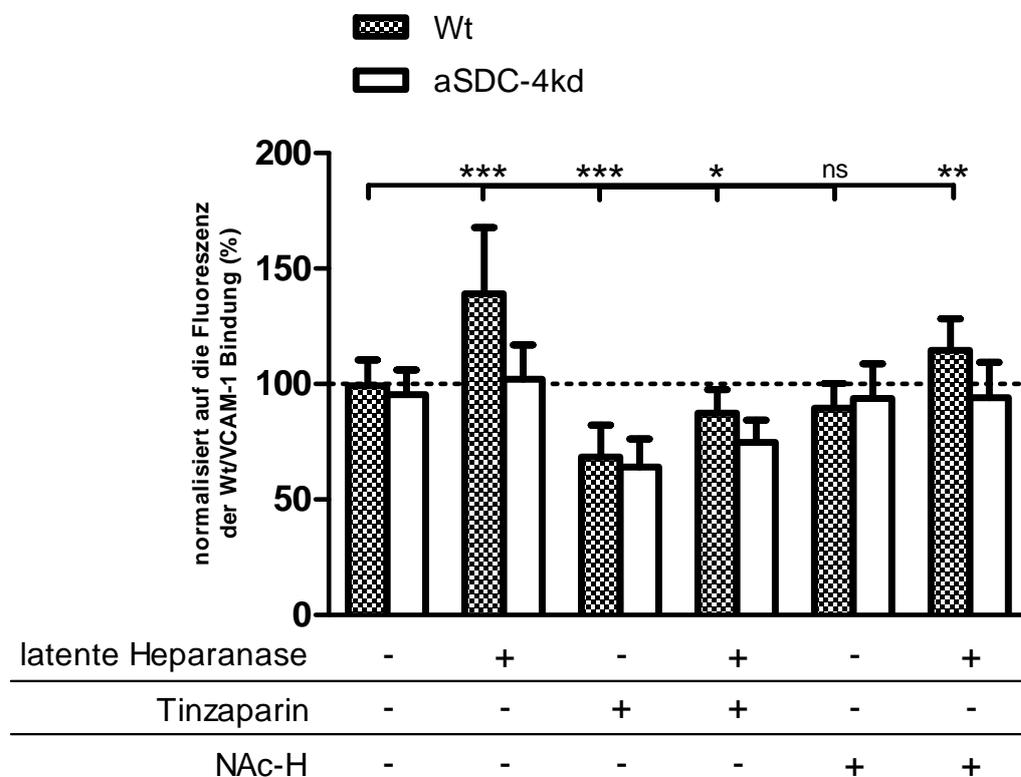


Abb. 5.37 Durchflusszytometrische Untersuchungen der VCAM-1-Bindung von MV3 Wt und aSDC-4kd Zellen nach zeitlich versetzter Inkubation mit Heparinen und Heparanase

Im Gegensatz zu der simultanen Heparin/Heparanase-Zugabe zeigte sich in diesem versetzten Ansatz eine höhere Bindung von VCAM-1 zu Wt Zellen, sowohl nach Tinzaparin- als auch nach NAc-H-Vorabbehandlung. Dieser Effekt resultiert aus der höheren Affinität der latenten Heparanase zu SDC-4 im Gegensatz zu den Bindungsaffinitäten der beiden Heparine. Aus diesem Grund wird latente Heparanase, wenn sie nicht vorab zusammen mit Heparin inkubiert wird, nur teilweise von diesem gebunden und der ungebundene Rest lagert sich an SDC-4 an. Durch diese Bindung wird der intrazelluläre Signalweg angestoßen, der in der Aktivierung des VLA-4 mündet.

6 Zusammenfassung

Das Enzym Heparanase nimmt in den Teilprozessen der hämatogenen Metastasierung von der Ablösung der Tumorzelle vom Primärtumor bis zur Extravasation in ein fremdes Gewebe eine wichtige Rolle ein. Es bewirkt die Degradation von Heparansulfat-Proteoglykanen wie dem Syndekan-4, die als Zelloberflächenstrukturen Reservoirs für Chemokine und Wachstumsfaktoren darstellen. Die Ausschüttung der latenten Proform der Heparanase durch die Tumorzelle und ihre Aktivierung im extrazellulären Raum sind Bestandteile eines komplexen Zusammenspiels von Zelloberflächenstrukturen der Tumorzelle und Enzymen sowie Chemokinen von rekrutierten Zellen der Immunabwehr. Dabei ist die Interaktion der Tumorzelle mit ihrer Umgebung in allen Abschnitten der Metastasierung elementar für ihr Überleben und die Ansiedlung in fremden Geweben. Um diese zu stoppen, bieten sich Zelloberflächenrezeptoren wie Integrine als Targetstrukturen an. Beispielsweise stellt die Hemmung der Bindungsfähigkeit des Integrins VLA-4 zu endotheliale VCAM-1 eine aussichtsreiche Interventionsmöglichkeit in der Metastasierungskaskade dar.

Die vorliegende Dissertationsschrift beschreibt die Beeinflussung der VLA-4/VCAM-1-Wechselwirkung durch die enzymatisch inaktive Proform der Heparanase. Durch biosensorische Experimente konnte die hohe Bindungsaffinität von latenter Heparanase zu Syndekan-4 verifiziert werden und ebenso die Affinitäten zu Integrinen und VCAM-1 gezeigt und quantifiziert werden. Aufbauend auf diesen Grundlagen wurde die Migration und Adhäsion von Melanomzellen in Abhängigkeit von VLA-4 und Syndekan-4 untersucht. Exogen zugeführte latente Heparanase vermag das Bindungsverhalten der Zellen über VLA-4 transient zu steigern, wobei der Inkubationsdauer und der Heparanase-Konzentration hohe Bedeutung zukommt. Diese Integrin-Aktivierung findet jedoch ausschließlich nach der Bindung von latenter Heparanase zu Syndekan-4 statt. Bei einer reduzierten Expression des Syndekan-4 erfolgt keine inside-out Aktivierung des VLA-4. Die Ausschüttung von latenter Heparanase durch die Melanomzelle kann als autoregulatorischer Effekt angesehen werden, da sie ihre Adhäsion durch Integrine über die eigene Ausschüttung von Heparanase steuert.

Die intrazelluläre Aktivierung des Integrins über diverse Kinasen wurde erfasst und zeichnet ein komplexes Bild auf. Fokale Adhäsionen werden aufgrund des Zusatzes von latenter Heparanase über VLA-4 gebildet und äußern sich in der Aktivierung der Kinasen FAK und AKT, sowie in der Bildung von Vinculinspots. Der ERK-Signalweg, der in die Prozesse der Zelldifferenzierung, des Wachstums und der Apoptose involviert ist, wird

durch die Bindung der latenten Heparanase aktiviert, ebenso wie der nachgeschaltete Weg über das tumorsuppressive p53.

Diese Erkenntnisse fügen sich zu einem Gesamtbild der möglichen Autoregulation der Tumorzelle im Prozess der Metastasierung zusammen. Da die enzymatische Aktivität der Heparanase pH-Wert abhängig ist und nur im leicht sauren Milieu des Tumors voll zum Tragen kommt, trägt dies entscheidend zum Abbau der extrazellulären Matrix und Forcierung der migrativen Fähigkeit der Tumorzellen im Metastasierungsprozess bei. In pH-neutraler Umgebung der EZM fördert dann die latente Form der Heparanase die Integrin-vermittelte Adhäsion und Migration der Zellen.

Desweiteren wurde gezeigt, dass die proadhäsive Wirkung der latenten Heparanase durch Heparine inhibiert werden kann. In biosensorischen Untersuchungen konnte die hohe Affinität der vermessenen Heparinderivate bestimmt werden und die Wechselwirkung der Heparine zu latenter Heparanase, die bereits an Syndekan-4 gebunden vorliegt. Eine bestehende Bindung zwischen den beiden Komponenten können die vermessenen Heparine zwar nicht auflösen, vermögen jedoch die latente Heparanase vor einer Wechselwirkung mit dem Heparansulfat-Proteoglykans zu binden und dadurch eine Syndekan-4-Anlagerung und eine resultierende inside-out Aktivierung des Integrins zu blockieren. Somit leistet diese Arbeit darüber hinaus einen Beitrag zur Aufklärung des antimetastatischen Wirkmechanismus von Heparinen, indem Heparine nicht nur die enzymatische Funktion der Heparanase unterbinden, sondern vorab bereits eine Bindung der latenten Proheparanase zur Tumorzelle verhindern.

7 Literaturverzeichnis

1. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
2. Pantel, K. & Speicher, M. R. The biology of circulating tumor cells. *Oncogene* (2015).
3. Rowe, R. G. & Weiss, S. J. Breaching the basement membrane: who, when and how? *Trends Cell Biol.* **18**, 560–574 (2008).
4. Quail, D. F. & Joyce, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat. Med.* **19**, 1423–1437 (2013).
5. Seguin, L., Desgrosellier, J. S., Weis, S. M. & Cheresh, D. A. Integrins and cancer: regulators of cancer stemness, metastasis, and drug resistance. *Trends Cell Biol.* **25**, 234–240 (2015).
6. Deryugina, E. I. & Quigley, J. P. Tumor angiogenesis: MMP-mediated induction of intravasation- and metastasis-sustaining neovasculature. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 94–112 (2015).
7. Lee, N., Barthel, S. R. & Schatton, T. Melanoma stem cells and metastasis: mimicking hematopoietic cell trafficking? *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **94**, 13–30 (2014).
8. Joyce, J. A. & Pollard, J. W. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 239–252 (2009).
9. Pollard, J. W. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 71–78 (2004).
10. Mendoza, M. & Khanna, C. Revisiting the seed and soil in cancer metastasis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 1452–1462 (2009).
11. Jin, H., Aiyer, A., Su, J., Borgstrom, P., Stupack, D., Friedlander, M. & Varner, J. A homing mechanism for bone marrow-derived progenitor cell recruitment to the neovasculature. *J. Clin. Invest.* **116**, 652–662 (2006).
12. Askari, J. A., Buckley, P. A., Mould, A. P. & Humphries, M. J. Linking integrin conformation to function. *J. Cell Sci.* **122**, 165–170 (2009).
13. Springer, T. A. & Dustin, M. L. Integrin inside-out signaling and the immunological synapse. *Curr. Opin. Cell Biol.* **24**, 107–115 (2012).
14. Hynes, R. O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**, 673–687 (2002).
15. Alon, R. & Shulman, Z. Chemokine triggered integrin activation and actin remodeling events guiding lymphocyte migration across vascular barriers. *Exp. Cell Res.* **317**, 632–641 (2011).
16. Anthis, N. J. & Campbell, I. D. The tail of integrin activation. *Trends Biochem. Sci.* **36**, 191–198 (2011).

17. Chen, J., Salas, A. & Springer, T. A. Bistable regulation of integrin adhesiveness by a bipolar metal ion cluster. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 995–1001 (2003).
18. Hart, R. & Greaves, D. R. Chemerin contributes to inflammation by promoting macrophage adhesion to VCAM-1 and fibronectin through clustering of VLA-4 and VLA-5. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **185**, 3728–3739 (2010).
19. Barczyk, M., Carracedo, S. & Gullberg, D. Integrins. *Cell Tissue Res.* **339**, 269–280 (2010).
20. Humphries, J. D., Byron, A. & Humphries, M. J. Integrin ligands at a glance. *J. Cell Sci.* **119**, 3901–3903 (2006).
21. Ruoslahti, E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **12**, 697–715 (1996).
22. Zhang, K. & Chen, J. The regulation of integrin function by divalent cations. *Cell Adhes. Migr.* **6**, 20–29 (2012).
23. Chen, L. L., Whitty, A., Scott, D., Lee, W. C., Cornebise, M., Adams, S. P., Petter, R. C., Lobb, R. R. & Pepinsky, R. B. Evidence that ligand and metal ion binding to integrin alpha 4beta 1 are regulated through a coupled equilibrium. *J. Biol. Chem.* **276**, 36520–36529 (2001).
24. Iwamoto, D. V. & Calderwood, D. A. Regulation of integrin-mediated adhesions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **36**, 41–47 (2015).
25. Kinashi, T. Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 546–559 (2005).
26. Hood, J. D. & Cheresch, D. A. Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 91–100 (2002).
27. Wehrle-Haller, B. Structure and function of focal adhesions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **24**, 116–124 (2012).
28. Gardel, M. L., Schneider, I. C., Aratyn-Schaus, Y. & Waterman, C. M. Mechanical integration of actin and adhesion dynamics in cell migration. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **26**, 315–333 (2010).
29. Paoli, P., Giannoni, E. & Chiarugi, P. Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochim. Biophys. Acta* **1833**, 3481–3498 (2013).
30. Huttenlocher, A. & Horwitz, A. R. Integrins in cell migration. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, a005074 (2011).
31. Tschumperlin, D. J. Fibroblasts and the ground they walk on. *Physiol. Bethesda Md* **28**, 380–390 (2013).
32. Millard, M., Odde, S. & Neamati, N. Integrin targeted therapeutics. *Theranostics* **1**, 154–188 (2011).
33. De Luca, G., Savonitto, S., Van't Hof, A. W. J. & Suryapranata, H. Platelet GP IIb-IIIa Receptor Antagonists in Primary Angioplasty: Back to the Future. *Drugs* **75**, 1229–1253 (2015).

34. Bledzka, K., Smyth, S. S. & Plow, E. F. Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$: from discovery to efficacious therapeutic target. *Circ. Res.* **112**, 1189–1200 (2013).
35. Rosario, M., Dirks, N. L., Gastonguay, M. R., Fasanmade, A. A., Wyant, T., Parikh, A., Sandborn, W. J., Feagan, B. G., Reinisch, W. & Fox, I. Population pharmacokinetics-pharmacodynamics of vedolizumab in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **42**, 188–202 (2015).
36. Schlesinger, M. & Bendas, G. Contribution of very late antigen-4 (VLA-4) integrin to cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* (2015).
37. Polman, C. H., O'Connor, P. W., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., Miller, D. H., Phillips, J. T., Lublin, F. D., Giovannoni, G., Wajgt, A., Toal, M., Lynn, F., Panzara, M. A., Sandroock, A. W. & AFFIRM Investigators. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **354**, 899–910 (2006).
38. Sakuraba, A., Keyashian, K., Correia, C., Melek, J., Cohen, R. D., Hanauer, S. B. & Rubin, D. T. Natalizumab in Crohn's disease: results from a US tertiary inflammatory bowel disease center. *Inflamm. Bowel Dis.* **19**, 621–626 (2013).
39. Juillerat, P., Wasan, S. K., Fowler, S. A., Friedman, S., Pabby, V. K., Coukas, J. A., Barto, A. E., Pellish, R., Germansky, K. A., Cheifetz, A. S., Korzenik, J. R., Farraye, F. A. & Yajnik, V. Efficacy and safety of natalizumab in Crohn's disease patients treated at 6 Boston academic hospitals. *Inflamm. Bowel Dis.* **19**, 2457–2463 (2013).
40. Berger, J. R. & Houff, S. Progressive multifocal leukoencephalopathy: lessons from AIDS and natalizumab. *Neurol. Res.* **28**, 299–305 (2006).
41. Bartt, R. E. Multiple sclerosis, natalizumab therapy, and progressive multifocal leukoencephalopathy. *Curr. Opin. Neurol.* **19**, 341–349 (2006).
42. Schlesinger, M., Roblek, M., Ortmann, K., Naggi, A., Torri, G., Borsig, L. & Bendas, G. The role of VLA-4 binding for experimental melanoma metastasis and its inhibition by heparin. *Thromb. Res.* **133**, 855–862 (2014).
43. 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.* **54**, 3233–3236 (1994).
44. Schlesinger, M. & Bendas, G. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)-An increasing insight into its role in tumorigenicity and metastasis. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **136**, 2504–2514 (2015).
45. Lee, S., Yoon, I.-H., Yoon, A., Cook-Mills, J. M., Park, C.-G. & Chung, J. An antibody to the sixth Ig-like domain of VCAM-1 inhibits leukocyte transendothelial migration without affecting adhesion. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **189**, 4592–4601 (2012).
46. Rao, S. P., Wang, Z., Zuberi, R. I., Sikora, L., Bahaie, N. S., Zuraw, B. L., Liu, F.-T. & Sriramarao, P. Galectin-3 functions as an adhesion molecule to support eosinophil rolling and adhesion under conditions of flow. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **179**, 7800–7807 (2007).

47. Luscinikas, F. W. & Gimbrone, M. A. Endothelial-dependent mechanisms in chronic inflammatory leukocyte recruitment. *Annu. Rev. Med.* **47**, 413–421 (1996).
48. Wang, C.-M., Guo, Z., Xie, Y.-J., Hao, Y.-Y., Sun, J.-M., Gu, J. & Wang, A.-L. Co-treating mesenchymal stem cells with IL-1 β and TNF- α increases VCAM-1 expression and improves post-ischemic myocardial function. *Mol. Med. Rep.* **10**, 792–798 (2014).
49. Cook-Mills, J. M., Marchese, M. E. & Abdala-Valencia, H. Vascular cell adhesion molecule-1 expression and signaling during disease: regulation by reactive oxygen species and antioxidants. *Antioxid. Redox Signal.* **15**, 1607–1638 (2011).
50. Chen, Q., Zhang, X. H.-F. & Massagué, J. Macrophage binding to receptor VCAM-1 transmits survival signals in breast cancer cells that invade the lungs. *Cancer Cell* **20**, 538–549 (2011).
51. Ferjancic, S., Gil-Bernabé, A. M., Hill, S. A., Allen, P. D., Richardson, P., Sparey, T., Savory, E., McGuffog, J. & Muschel, R. J. VCAM-1 and VAP-1 recruit myeloid cells that promote pulmonary metastasis in mice. *Blood* **121**, 3289–3297 (2013).
52. Morse, E. M., Brahme, N. N. & Calderwood, D. A. Integrin cytoplasmic tail interactions. *Biochemistry (Mosc.)* **53**, 810–820 (2014).
53. Calderwood, D. A., Campbell, I. D. & Critchley, D. R. Talins and kindlins: partners in integrin-mediated adhesion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 503–517 (2013).
54. Ciobanasu, C., Faivre, B. & Le Clainche, C. Integrating actin dynamics, mechanotransduction and integrin activation: the multiple functions of actin binding proteins in focal adhesions. *Eur. J. Cell Biol.* **92**, 339–348 (2013).
55. Hannigan, G. E., Leung-Hagesteijn, C., Fitz-Gibbon, L., Coppolino, M. G., Radeva, G., Filmus, J., Bell, J. C. & Dedhar, S. Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. *Nature* **379**, 91–96 (1996).
56. Huet-Calderwood, C., Brahme, N. N., Kumar, N., Stiegler, A. L., Raghavan, S., Boggon, T. J. & Calderwood, D. A. Differences in binding to the ILK complex determines kindlin isoform adhesion localization and integrin activation. *J. Cell Sci.* **127**, 4308–4321 (2014).
57. Khwaja, A., Rodriguez-Viciana, P., Wennström, S., Warne, P. H. & Downward, J. Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway. *EMBO J.* **16**, 2783–2793 (1997).
58. Lawson, C., Lim, S.-T., Uryu, S., Chen, X. L., Calderwood, D. A. & Schlaepfer, D. D. FAK promotes recruitment of talin to nascent adhesions to control cell motility. *J. Cell Biol.* **196**, 223–232 (2012).
59. Mitra, S. K. & Schlaepfer, D. D. Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**, 516–523 (2006).

60. Abshire, M. Y., Thomas, K. S., Owen, K. A. & Bouton, A. H. Macrophage motility requires distinct $\alpha 5\beta 1$ /FAK and $\alpha 4\beta 1$ /paxillin signaling events. *J. Leukoc. Biol.* **89**, 251–257 (2011).
61. Liu, S., Thomas, S. M., Woodside, D. G., Rose, D. M., Kiosses, W. B., Pfaff, M. & Ginsberg, M. H. Binding of paxillin to alpha4 integrins modifies integrin-dependent biological responses. *Nature* **402**, 676–681 (1999).
62. Rose, D. M., Alon, R. & Ginsberg, M. H. Integrin modulation and signaling in leukocyte adhesion and migration. *Immunol. Rev.* **218**, 126–134 (2007).
63. Alon, R., Feigelson, S. W., Manevich, E., Rose, D. M., Schmitz, J., Overby, D. R., Winter, E., Grabovsky, V., Shinder, V., Matthews, B. D., Sokolovsky-Eisenberg, M., Ingber, D. E., Benoit, M. & Ginsberg, M. H. Alpha4beta1-dependent adhesion strengthening under mechanical strain is regulated by paxillin association with the alpha4-cytoplasmic domain. *J. Cell Biol.* **171**, 1073–1084 (2005).
64. Manevich, E., Grabovsky, V., Feigelson, S. W. & Alon, R. Talin 1 and paxillin facilitate distinct steps in rapid VLA-4-mediated adhesion strengthening to vascular cell adhesion molecule 1. *J. Biol. Chem.* **282**, 25338–25348 (2007).
65. Hsia, D. A., Lim, S.-T., Bernard-Trifilo, J. A., Mitra, S. K., Tanaka, S., Hertog, J. den, Strelbow, D. N., Ilic, D., Ginsberg, M. H. & Schlaepfer, D. D. Integrin alpha4beta1 promotes focal adhesion kinase-independent cell motility via alpha4 cytoplasmic domain-specific activation of c-Src. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 9700–9712 (2005).
66. Lim, C. J., Kain, K. H., Tkachenko, E., Goldfinger, L. E., Gutierrez, E., Allen, M. D., Groisman, A., Zhang, J. & Ginsberg, M. H. Integrin-mediated protein kinase A activation at the leading edge of migrating cells. *Mol. Biol. Cell* **19**, 4930–4941 (2008).
67. Goldfinger, L. E., Tzima, E., Stockton, R., Kiosses, W. B., Kinbara, K., Tkachenko, E., Gutierrez, E., Groisman, A., Nguyen, P., Chien, S. & Ginsberg, M. H. Localized alpha4 integrin phosphorylation directs shear stress-induced endothelial cell alignment. *Circ. Res.* **103**, 177–185 (2008).
68. Howe, A. K. & Juliano, R. L. Regulation of anchorage-dependent signal transduction by protein kinase A and p21-activated kinase. *Nat. Cell Biol.* **2**, 593–600 (2000).
69. Howe, A. K. Regulation of actin-based cell migration by cAMP/PKA. *Biochim. Biophys. Acta* **1692**, 159–174 (2004).
70. Price, L. S., Leng, J., Schwartz, M. A. & Bokoch, G. M. Activation of Rac and Cdc42 by integrins mediates cell spreading. *Mol. Biol. Cell* **9**, 1863–1871 (1998).
71. Guo, W. & Giancotti, F. G. Integrin signalling during tumour progression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 816–826 (2004).
72. Tai, Y.-L., Chen, L.-C. & Shen, T.-L. Emerging Roles of Focal Adhesion Kinase in Cancer. *BioMed Res. Int.* **2015**, 690690 (2015).
73. Schwartz, M. A. & Ginsberg, M. H. Networks and crosstalk: integrin signalling spreads. *Nat. Cell Biol.* **4**, E65–68 (2002).

74. Prydz, K. & Dalen, K. T. Synthesis and sorting of proteoglycans. *J. Cell Sci.* **113**, 193–205 (2000).
75. Li, J.-P. & Vlodavsky, I. Heparin, heparan sulfate and heparanase in inflammatory reactions. *Thromb. Haemost.* **102**, 823–828 (2009).
76. Iozzo, R. V. & Schaefer, L. Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* **42**, 11–55 (2015).
77. Kjellén, L. & Lindahl, U. Proteoglycans: structures and interactions. *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 443–475 (1991).
78. Forsberg, E. & Kjellén, L. Heparan sulfate: lessons from knockout mice. *J. Clin. Invest.* **108**, 175–180 (2001).
79. Stickens, D., Zak, B. M., Rougier, N., Esko, J. D. & Werb, Z. Mice deficient in Ext2 lack heparan sulfate and develop exostoses. *Dev. Camb. Engl.* **132**, 5055–5068 (2005).
80. Esko, J. D., Kimata, K. & Lindahl, U. in *Essent. Glycobiol.* (eds. Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Freeze, H. H., Stanley, P., Bertozzi, C. R., Hart, G. W. & Etzler, M. E.) (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009). at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1900/>
81. Lambaerts, K., Wilcox-Adelman, S. A. & Zimmermann, P. The signaling mechanisms of syndecan heparan sulfate proteoglycans. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**, 662–669 (2009).
82. Barbouri, D., Afratis, N., Gialeli, C., Vynios, D. H., Theocharis, A. D. & Karamanos, N. K. Syndecans as modulators and potential pharmacological targets in cancer progression. *Front. Oncol.* **4**, 4 (2014).
83. Manon-Jensen, T., Multhaupt, H. A. B. & Couchman, J. R. Mapping of matrix metalloproteinase cleavage sites on syndecan-1 and syndecan-4 ectodomains. *FEBS J.* **280**, 2320–2331 (2013).
84. Manon-Jensen, T., Itoh, Y. & Couchman, J. R. Proteoglycans in health and disease: the multiple roles of syndecan shedding. *FEBS J.* **277**, 3876–3889 (2010).
85. 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.* **280**, 42573–42579 (2005).
86. Chakravarti, R., Sapountzi, V. & Adams, J. C. Functional role of syndecan-1 cytoplasmic V region in lamellipodial spreading, actin bundling, and cell migration. *Mol. Biol. Cell* **16**, 3678–3691 (2005).
87. Klass, C. M., Couchman, J. R. & Woods, A. Control of extracellular matrix assembly by syndecan-2 proteoglycan. *J. Cell Sci.* **113**, 493–506 (2000).
88. Lee, D., Oh, E. S., Woods, A., Couchman, J. R. & Lee, W. Solution structure of a syndecan-4 cytoplasmic domain and its interaction with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* **273**, 13022–13029 (1998).

89. Brauker, J. H., Trautman, M. S. & Bernfield, M. Syndecan, a cell surface proteoglycan, exhibits a molecular polymorphism during lung development. *Dev. Biol.* **147**, 285–292 (1991).
90. Kwon, M.-J., Jang, B., Yi, J. Y., Han, I.-O. & Oh, E. S. Syndecans play dual roles as cell adhesion receptors and docking receptors. *FEBS Lett.* **586**, 2207–2211 (2012).
91. Couchman, J. R., Gopal, S., Lim, H. C., Nørgaard, S. & Mulhaupt, H. A. B. Syndecans: from peripheral coreceptors to mainstream regulators of cell behaviour. *Int. J. Exp. Pathol.* **96**, 1–10 (2015).
92. Deepa, S. S., Yamada, S., Zako, M., Goldberger, O. & Sugahara, K. Chondroitin sulfate chains on syndecan-1 and syndecan-4 from normal murine mammary gland epithelial cells are structurally and functionally distinct and cooperate with heparan sulfate chains to bind growth factors. A novel function to control binding of midkine, pleiotrophin, and basic fibroblast growth factor. *J. Biol. Chem.* **279**, 37368–37376 (2004).
93. Shworak, N. W., Shirakawa, M., Mulligan, R. C. & Rosenberg, R. D. Characterization of ryudocan glycosaminoglycan acceptor sites. *J. Biol. Chem.* **269**, 21204–21214 (1994).
94. Partovian, C., Ju, R., Zhuang, Z. W., Martin, K. A. & Simons, M. Syndecan-4 regulates subcellular localization of mTOR Complex2 and Akt activation in a PKC α -dependent manner in endothelial cells. *Mol. Cell* **32**, 140–149 (2008).
95. Elfenbein, A. & Simons, M. Syndecan-4 signaling at a glance. *J. Cell Sci.* **126**, 3799–3804 (2013).
96. Morgan, M. R., Hamidi, H., Bass, M. D., Warwood, S., Ballestrem, C. & Humphries, M. J. Syndecan-4 phosphorylation is a control point for integrin recycling. *Dev. Cell* **24**, 472–485 (2013).
97. Mahalingam, Y., Gallagher, J. T. & Couchman, J. R. Cellular adhesion responses to the heparin-binding (HepII) domain of fibronectin require heparan sulfate with specific properties. *J. Biol. Chem.* **282**, 3221–3230 (2007).
98. 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.* **161**, 155–167 (2003).
99. Peterson, J. A., Sheibani, N., David, G., Garcia-Pardo, A. & Peters, D. M. Heparin II domain of fibronectin uses $\alpha 4 \beta 1$ integrin to control focal adhesion and stress fiber formation, independent of syndecan-4. *J. Biol. Chem.* **280**, 6915–6922 (2005).
100. Horowitz, A. & Simons, M. Phosphorylation of the cytoplasmic tail of syndecan-4 regulates activation of protein kinase C α . *J. Biol. Chem.* **273**, 25548–25551 (1998).
101. Oh, E. S., Woods, A. & Couchman, J. R. Syndecan-4 proteoglycan regulates the distribution and activity of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **272**, 8133–8136 (1997).

102. Lim, S.-T., Longley, R. L., Couchman, J. R. & Woods, A. Direct binding of syndecan-4 cytoplasmic domain to the catalytic domain of protein kinase C alpha (PKC alpha) increases focal adhesion localization of PKC alpha. *J. Biol. Chem.* **278**, 13795–13802 (2003).
103. Murakami, M., Horowitz, A., Tang, S., Ware, J. A. & Simons, M. Protein Kinase C (PKC) Regulates PKC Activity in a Syndecan-4-dependent Manner. *J. Biol. Chem.* **277**, 20367–20371 (2002).
104. Echtermeyer, F., Streit, M., Wilcox-Adelman, S., Saoncella, S., Denhez, F., Detmar, M. & Goetinck, P. Delayed wound repair and impaired angiogenesis in mice lacking syndecan-4. *J. Clin. Invest.* **107**, R9–R14 (2001).
105. Okina, E., Grossi, A., Gopal, S., Mulhaupt, H. a. B. & Couchman, J. R. Alpha-actinin interactions with syndecan-4 are integral to fibroblast-matrix adhesion and regulate cytoskeletal architecture. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44**, 2161–2174 (2012).
106. Fiore, V. F., Ju, L., Chen, Y., Zhu, C. & Barker, T. H. Dynamic catch of a Thy-1- $\alpha 5\beta 1$ +syndecan-4 trimolecular complex. *Nat. Commun.* **5**, 4886 (2014).
107. Bass, M. D., Roach, K. A., Morgan, M. R., Mostafavi-Pour, Z., Schoen, T., Muramatsu, T., Mayer, U., Ballestrem, C., Spatz, J. P. & Humphries, M. J. Syndecan-4-dependent Rac1 regulation determines directional migration in response to the extracellular matrix. *J Cell Biol* **177**, 527–538 (2007).
108. Bass, M. D., Morgan, M. R., Roach, K. A., Settleman, J., Goryachev, A. B. & Humphries, M. J. p190RhoGAP is the convergence point of adhesion signals from alpha 5 beta 1 integrin and syndecan-4. *J. Cell Biol.* **181**, 1013–1026 (2008).
109. Bass, M. D., Williamson, R. C., Nunan, R. D., Humphries, J. D., Byron, A., Morgan, M. R., Martin, P. & Humphries, M. J. A syndecan-4 hair trigger initiates wound healing through caveolin- and RhoG-regulated integrin endocytosis. *Dev. Cell* **21**, 681–693 (2011).
110. Wilcox-Adelman, S. A., Denhez, F. & Goetinck, P. F. Syndecan-4 modulates focal adhesion kinase phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **277**, 32970–32977 (2002).
111. Roper, J. A., Williamson, R. C. & Bass, M. D. Syndecan and integrin interactomes: large complexes in small spaces. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **22**, 583–590 (2012).
112. Song, Y., McFarland, D. C. & Velleman, S. G. Role of syndecan-4 side chains in turkey satellite cell apoptosis and focal adhesion formation. *Cell Biol. Int.* **36**, 433–440 (2012).
113. Lever, R., Rose, M. J., McKenzie, E. A. & Page, C. P. Heparanase induces inflammatory cell recruitment in vivo by promoting adhesion to vascular endothelium. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **306**, C1184–1190 (2014).
114. Peterson, S. B. & Liu, J. Multi-faceted substrate specificity of heparanase. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* **32**, 223–227 (2013).

115. McKenzie, E. A. Heparanase: a target for drug discovery in cancer and inflammation. *Br. J. Pharmacol.* **151**, 1–14 (2007).
116. Fux, L., Ilan, N., Sanderson, R. D. & Vlodavsky, I. Heparanase: busy at the cell surface. *Trends Biochem. Sci.* **34**, 511–519 (2009).
117. Vlodavsky, I., Ilan, N., Naggi, A. & Casu, B. Heparanase: structure, biological functions, and inhibition by heparin-derived mimetics of heparan sulfate. *Curr. Pharm. Des.* **13**, 2057–2073 (2007).
118. Meirovitz, A., Goldberg, R., Binder, A., Rubinstein, A. M., Hermano, E. & Elkin, M. Heparanase in inflammation and inflammation-associated cancer. *FEBS J.* **280**, 2307–2319 (2013).
119. Nadir, Y. & Brenner, B. Heparanase multiple effects in cancer. *Thromb. Res.* **133**, S90–S94 (2014).
120. Goodall, K. J., Poon, I. K. H., Phipps, S. & Hulett, M. D. Soluble heparan sulfate fragments generated by heparanase trigger the release of pro-inflammatory cytokines through TLR-4. *PLoS One* **9**, e109596 (2014).
121. Sidaway, P. Diabetic nephropathy: Heparanase mediates renal injury. *Nat. Rev. Nephrol.* **10**, 483 (2014).
122. Knelson, E. H., Nee, J. C. & Blobel, G. C. Heparan sulfate signaling in cancer. *Trends Biochem. Sci.* **39**, 277–288 (2014).
123. Chen, G., Dang, Y.-W., Luo, D.-Z., Feng, Z.-B. & Tang, X.-L. Expression of heparanase in hepatocellular carcinoma has prognostic significance: a tissue microarray study. *Oncol. Res.* **17**, 183–189 (2008).
124. Rivera, R. S., Nagatsuka, H., Siar, C. H., Gunduz, M., Tsujigiwa, H., Han, P. P., Katase, N., Tamamura, R., Ng, K. H., Naomoto, Y., Nakajima, M. & Nagai, N. Heparanase and vascular endothelial growth factor expression in the progression of oral mucosal melanoma. *Oncol. Rep.* **19**, 657–661 (2008).
125. Leiser, Y., Shilo, D., Abu El Naaj, I. & Rachmiel, A. Heparanase, a potential marker for premalignant oral cavity cancer. *Vivo Athens Greece* **28**, 769–777 (2014).
126. Tang, D., Piao, Y., Zhao, S., Mu, X., Li, S., Ma, W., Song, Y., Wang, J., Zhao, W. & Zhang, Q. Expression and correlation of matrix metalloproteinase-9 and heparanase in patients with breast cancer. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* **31**, 26 (2014).
127. Abboud-Jarrous, G., Rangini-Guetta, Z., Aingorn, H., Atzmon, R., Elgavish, S., Peretz, T. & Vlodavsky, I. Site-directed mutagenesis, proteolytic cleavage, and activation of human proheparanase. *J. Biol. Chem.* **280**, 13568–13575 (2005).
128. Lerner, I., Hermano, E., Zcharia, E., Rodkin, D., Bulvik, R., Doviner, V., Rubinstein, A. M., Ishai-Michaeli, R., Atzmon, R., Sherman, Y., Meirovitz, A., Peretz, T., Vlodavsky, I. & Elkin, M. Heparanase powers a chronic inflammatory circuit that promotes colitis-associated tumorigenesis in mice. *J. Clin. Invest.* **121**, 1709–1721 (2011).

129. Gilat, D., HersHKoviz, R., Goldkorn, I., Cahalon, L., Korner, G., Vlodavsky, I. & Lider, O. Molecular behavior adapts to context: heparanase functions as an extracellular matrix-degrading enzyme or as a T cell adhesion molecule, depending on the local pH. *J. Exp. Med.* **181**, 1929–1934 (1995).
130. Toyoshima, M. & Nakajima, M. Human heparanase. Purification, characterization, cloning, and expression. *J. Biol. Chem.* **274**, 24153–24160 (1999).
131. Cohen, E., Atzmon, R., Vlodavsky, I. & Ilan, N. Heparanase processing by lysosomal/endosomal protein preparation. *FEBS Lett.* **579**, 2334–2338 (2005).
132. Zetser, A., Levy-Adam, F., Kaplan, V., Gingis-Velitski, S., Bashenko, Y., Schubert, S., Flugelman, M. Y., Vlodavsky, I. & Ilan, N. Processing and activation of latent heparanase occurs in lysosomes. *J Cell Sci* **117**, 2249–2258 (2004).
133. Gingis-Velitski, S., Zetser, A., Kaplan, V., Ben-Zaken, O., Cohen, E., Levy-Adam, F., Bashenko, Y., Flugelman, M. Y., Vlodavsky, I. & Ilan, N. Heparanase uptake is mediated by cell membrane heparan sulfate proteoglycans. *J. Biol. Chem.* **279**, 44084–44092 (2004).
134. Yang, Y., Gorzelanny, C., Bauer, A. T., Halter, N., Komljenovic, D., Bäuerle, T., Borsig, L., Roblek, M. & Schneider, S. W. Nuclear heparanase-1 activity suppresses melanoma progression via its DNA-binding affinity. *Oncogene* (2015).
135. Goldshmidt, O., Zcharia, E., Cohen, M., Aingorn, H., Cohen, I., Nadav, L., Katz, B.-Z., Geiger, B. & Vlodavsky, I. Heparanase mediates cell adhesion independent of its enzymatic activity. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **17**, 1015–1025 (2003).
136. Levy-Adam, F., Feld, S., Suss-Toby, E., Vlodavsky, I. & Ilan, N. Heparanase Facilitates Cell Adhesion and Spreading by Clustering of Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans. *PLoS ONE* **3**, e2319 (2008).
137. Gingis-Velitski, S., Zetser, A., Flugelman, M. Y., Vlodavsky, I. & Ilan, N. Heparanase induces endothelial cell migration via protein kinase B/Akt activation. *J. Biol. Chem.* **279**, 23536–23541 (2004).
138. Riaz, A., Ilan, N., Vlodavsky, I., Li, J.-P. & Johansson, S. Characterization of heparanase-induced phosphatidylinositol 3-kinase-AKT activation and its integrin dependence. *J. Biol. Chem.* **288**, 12366–12375 (2013).
139. Zetser, A., Bashenko, Y., Edovitsky, E., Levy-Adam, F., Vlodavsky, I. & Ilan, N. Heparanase induces vascular endothelial growth factor expression: correlation with p38 phosphorylation levels and Src activation. *Cancer Res.* **66**, 1455–1463 (2006).
140. Sotnikov, I., HersHKoviz, R., Grabovsky, V., Ilan, N., Cahalon, L., Vlodavsky, I., Alon, R. & Lider, O. Enzymatically quiescent heparanase augments T cell interactions with VCAM-1 and extracellular matrix components under versatile dynamic contexts. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **172**, 5185–5193 (2004).
141. Hulett, M. D., Freeman, C., Hamdorf, B. J., Baker, R. T., Harris, M. J. & Parish, C. R. Cloning of mammalian heparanase, an important enzyme in tumor invasion and metastasis. *Nat. Med.* **5**, 803–809 (1999).

142. Kussie, P. H., Hulmes, J. D., Ludwig, D. L., Patel, S., Navarro, E. C., Seddon, A. P., Giorgio, N. A. & Bohlen, P. Cloning and functional expression of a human heparanase gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **261**, 183–187 (1999).
143. Vlodaysky, I., Friedmann, Y., Elkin, M., Aingorn, H., Atzmon, R., Ishai-Michaeli, R., Bitan, M., Pappo, O., Peretz, T., Michal, I., Spector, L. & Pecker, I. Mammalian heparanase: gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis. *Nat. Med.* **5**, 793–802 (1999).
144. Nakajima, M., Irimura, T., Di Ferrante, N. & Nicolson, G. L. Metastatic melanoma cell heparanase. Characterization of heparan sulfate degradation fragments produced by B16 melanoma endoglucuronidase. *J. Biol. Chem.* **259**, 2283–2290 (1984).
145. PI-88 clinical trial update.pdf. at <<http://www.progen-pharma.com/userfiles/files/news/pi-88%20clinical%20trial%20update.pdf>> letzter Zugriff am 23.08.2015
146. Dredge, K., Hammond, E., Handley, P., Gonda, T. J., Smith, M. T., Vincent, C., Brandt, R., Ferro, V. & Bytheway, I. PG545, a dual heparanase and angiogenesis inhibitor, induces potent anti-tumour and anti-metastatic efficacy in preclinical models. *Br. J. Cancer* **104**, 635–642 (2011).
147. Hammond, E., Handley, P., Dredge, K. & Bytheway, I. Mechanisms of heparanase inhibition by the heparan sulfate mimetic PG545 and three structural analogues. *FEBS Open Bio* **3**, 346–351 (2013).
148. Zhou, H., Roy, S., Cochran, E., Zouaoui, R., Chu, C. L., Duffner, J., Zhao, G., Smith, S., Galcheva-Gargova, Z., Karlgren, J., Dussault, N., Kwan, R. Y. Q., Moy, E., Barnes, M., Long, A., Honan, C., Qi, Y. W., Shriver, Z., Ganguly, T., Schultes, B., Venkataraman, G. & Kishimoto, T. K. M402, a novel heparan sulfate mimetic, targets multiple pathways implicated in tumor progression and metastasis. *PLoS One* **6**, e21106 (2011).
149. Ritchie, J. P., Ramani, V. C., Ren, Y., Naggi, A., Torri, G., Casu, B., Penco, S., Pisano, C., Carminati, P., Tortoreto, M., Zunino, F., Vlodaysky, I., Sanderson, R. D. & Yang, Y. SST0001, a chemically modified heparin, inhibits myeloma growth and angiogenesis via disruption of the heparanase/syndecan-1 axis. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **17**, 1382–1393 (2011).
150. McLean, J. The discovery of heparin. *Circulation* **19**, 75–78 (1959).
151. Murray, G. D. & Best, C. H. THE USE OF HEPARIN IN THROMBOSIS. *Ann. Surg.* **108**, 163–177 (1938).
152. Barrowcliffe, T. W. History of heparin. *Handb. Exp. Pharmacol.* 3–22 (2012).
153. Sala-Cunill, A., Björkqvist, J., Senter, R., Guilarte, M., Cardona, V., Labrador, M., Nickel, K. F., Butler, L., Luengo, O., Kumar, P., Labberton, L., Long, A., Di Gennaro, A., Kenne, E., Jämsä, A., Krieger, T., Schlüter, H., Fuchs, T., Flohr, S., Hassiepen, U., Cumin, F., McCrae, K., Maas, C., Stavrou, E. & Renné, T. Plasma contact system activation drives anaphylaxis in severe mast cell-mediated allergic reactions. *J. Allergy Clin. Immunol.* **135**, 1031–1043.e6 (2015).
154. Casu, B., Naggi, A. & Torri, G. Re-visiting the structure of heparin. *Carbohydr. Res.* **403**, 60–68 (2015).

155. Cho, M. J., Liu, J., Pestina, T. I., Steward, S. A., Thomas, D. W., Coffman, T. M., Wang, D., Jackson, C. W. & Gartner, T. K. The roles of alpha IIb beta 3-mediated outside-in signal transduction, thromboxane A2, and adenosine diphosphate in collagen-induced platelet aggregation. *Blood* **101**, 2646–2651 (2003).
156. Harter, K., Levine, M. & Henderson, S. O. Anticoagulation drug therapy: a review. *West. J. Emerg. Med.* **16**, 11–17 (2015).
157. Hepner, M. & Karlaftis, V. Antithrombin. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **992**, 355–364 (2013).
158. Suzuki, T., Ishii-Watabe, A., Hashii, N., Nakagawa, Y., Takahashi, T., Ebisawa, A., Nishi, S., Fujita, N., Bando, A., Sekimoto, Y., Miyata, K., Endo, T., Otsu, T., Sugimoto, S., Kondou, T., Fujita, Y., Miyanaga, N., Mashimo, M., Shimada, N., Yoden, H., Shimamura, H., Kurata, Y., Koyama, S. & Kawasaki, N. The establishment and validation of efficient assays for anti-IIa and anti-Xa activities of heparin sodium and heparin calcium. *Biol. J. Int. Assoc. Biol. Stand.* **41**, 415–423 (2013).
159. Hirsh, J. Low-molecular-weight heparin : A review of the results of recent studies of the treatment of venous thromboembolism and unstable angina. *Circulation* **98**, 1575–1582 (1998).
160. Boneu, B. Low molecular weight heparins: are they superior to unfractionated heparins to prevent and to treat deep vein thrombosis? *Thromb. Res.* **100**, 113–120 (2000).
161. Schmitz, P., Gerber, U., Schütze, N., Jüngel, E., Blaheta, R., Naggi, A., Torri, G. & Bendas, G. Cyr61 is a target for heparin in reducing MV3 melanoma cell adhesion and migration via the integrin VLA-4. *Thromb. Haemost.* **110**, 1046–1054 (2013).
162. Bauer, A. T., Suckau, J., Frank, K., Desch, A., Goertz, L., Wagner, A. H., Hecker, M., Goerge, T., Umansky, L., Beckhove, P., Utikal, J., Gorzelanny, C., Diaz-Valdes, N., Umansky, V. & Schneider, S. W. von Willebrand factor fibers promote cancer-associated platelet aggregation in malignant melanoma of mice and humans. *Blood* **125**, 3153–3163 (2015).
163. Stevenson, J. L., Choi, S. H. & Varki, A. Differential metastasis inhibition by clinically relevant levels of heparins--correlation with selectin inhibition, not antithrombotic activity. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **11**, 7003–7011 (2005).
164. Schlesinger, M., Simonis, D., Schmitz, P., Fritzsche, J. & Bendas, G. Binding between heparin and the integrin VLA-4. *Thromb. Haemost.* **102**, 816–822 (2009).
165. 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-anticoagulant heparin derivatives. *Thromb. Res.* **129**, 603–610 (2012).
166. Mousa, S. A. The low molecular weight heparin, tinzaparin, in thrombosis and beyond. *Cardiovasc. Drug Rev.* **20**, 199–216 (2002).
167. Donati, M. B. Thrombosis and cancer: Trousseau syndrome revisited. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **22**, 3–8 (2009).

-
168. Hoffman, R., Haim, N. & Brenner, B. Cancer and thrombosis revisited. *Blood Rev.* **15**, 61–67 (2001).
169. Farge, D., Deboudeau, P., Beckers, M., Baglin, C., Bauersachs, R. M., Brenner, B., Brilhante, D., Falanga, A., Gerotzafias, G. T., Haim, N., Kakkar, A. K., Khorana, A. A., Lecumberri, R., Mandala, M., Marty, M., Monreal, M., Mousa, S. A., Noble, S., Pabinger, I., Prandoni, P., Prins, M. H., Qari, M. H., Streiff, M. B., Syrigos, K., Bounameaux, H. & Büller, H. R. International clinical practice guidelines for the treatment and prophylaxis of venous thromboembolism in patients with cancer. *J. Thromb. Haemost.* **11**, 56–70 (2013).
170. Hettiarachchi, R. J., Smorenburg, S. M., Ginsberg, J., Levine, M., Prins, M. H. & Büller, H. R. Do heparins do more than just treat thrombosis? The influence of heparins on cancer spread. *Thromb. Haemost.* **82**, 947–952 (1999).
171. Lebeau, B., Chastang, C., Brechot, J. M., Capron, F., Dautzenberg, B., Delaisements, C., Mornet, M., Brun, J., Hurdebourcq, J. P. & Lemarie, E. Subcutaneous heparin treatment increases survival in small cell lung cancer. 'Petites Cellules' Group. *Cancer* **74**, 38–45 (1994).
172. 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. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **22**, 1944–1948 (2004).
173. Klerk, C. P. W., Smorenburg, S. M., Otten, H.-M., Lensing, A. W. A., Prins, M. H., Piovela, 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. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **23**, 2130–2135 (2005).
174. 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. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **23**, 2123–2129 (2005).
175. Lee, A. E., Rogers, L. A., Longcroft, J. M. & Jeffery, R. E. Reduction of metastasis in a murine mammary tumour model by heparin and polyinosinic-polycytidylic acid. *Clin. Exp. Metastasis* **8**, 165–171 (1990).
176. 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* **14**, 290–302 (1994).
177. Lemoine, N. R. Antithrombotic therapy in cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **23**, 2119–2120 (2005).
178. Bendas, G. & Borsig, L. Cancer cell adhesion and metastasis: selectins, integrins, and the inhibitory potential of heparins. *Int. J. Cell Biol.* **2012**, 676731 (2012).
179. Hostettler, N., Naggi, A., Torri, G., Ishai-Michaeli, R., Casu, B., Vlodaysky, I. & Borsig, L. P-selectin- and heparanase-dependent antimetastatic activity of non-

- anticoagulant heparins. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **21**, 3562–3572 (2007).
180. von Tempelhoff, G. F., Harenberg, J., Niemann, F., Hommel, G., Kirkpatrick, C. J. & Heilmann, L. Effect of low molecular weight heparin (Certoparin) versus unfractionated heparin on cancer survival following breast and pelvic cancer surgery: A prospective randomized double-blind trial. *Int. J. Oncol.* **16**, 815–824 (2000).
181. Amirkhosravi, A., Mousa, S. A., Amaya, M. & Francis, J. L. Antimetastatic effect of tinzaparin, a low-molecular-weight heparin. *J. Thromb. Haemost. JTH* **1**, 1972–1976 (2003).
182. Noble, S. Low-molecular-weight heparin and survival in lung cancer. *Thromb. Res.* **129**, S114–S118 (2012).
183. Gray, E., Mulloy, B. & Barrowcliffe, T. W. Heparin and low-molecular-weight heparin. *Thromb. Haemost.* **99**, 807–818 (2008).
184. Lecumberri, R., López Vivanco, G., Font, A., González Billalabeitia, E., Gúrpide, A., Gómez Codina, J., Isla, D., Galán, A., Bover, I., Domine, M., Vicente, V., Rosell, R. & Rocha, E. Adjuvant therapy with bempiparin in patients with limited-stage small cell lung cancer: results from the ABEL study. *Thromb. Res.* **132**, 666–670 (2013).
185. Pross, M., Lippert, H., Misselwitz, F., Nestler, G., Krüger, S., Langer, H., Halangk, W. & Schulz, H.-U. Low-molecular-weight heparin (reviparin) diminishes tumor cell adhesion and invasion in vitro, and decreases intraperitoneal growth of colonadeno-carcinoma cells in rats after laparoscopy. *Thromb. Res.* **110**, 215–220 (2003).
186. Dunn, A. S., Spyropoulos, A. C. & Turpie, A. G. G. Bridging therapy in patients on long-term oral anticoagulants who require surgery: the Prospective Peri-operative Enoxaparin Cohort Trial (PROSPECT). *J. Thromb. Haemost. JTH* **5**, 2211–2218 (2007).
187. Riess, H., Pelzer, U., Hilbig, A., Stieler, J., Opitz, B., Scholten, T., Kauschat-Brüning, D., Bramlage, P., Dörken, B. & Oettle, H. Rationale and design of PROSPECT-CONKO 004: a prospective, randomized trial of simultaneous pancreatic cancer treatment with enoxaparin and chemotherapy). *BMC Cancer* **8**, 361 (2008).
188. Robert, F., Busby, E., Marques, M. B., Reynolds, R. E. & Carey, D. E. Phase II study of docetaxel plus enoxaparin in chemotherapy-naive patients with metastatic non-small cell lung cancer: preliminary results. *Lung Cancer Amst. Neth.* **42**, 237–245 (2003).
189. Haas, S., Schellong, S. M., Tebbe, U., Gerlach, H.-E., Bauersachs, R., Melzer, N., Abletshauer, C., Sieder, C., Bramlage, P. & Riess, H. Heparin based prophylaxis to prevent venous thromboembolic events and death in patients with cancer - a subgroup analysis of CERTIFY. *BMC Cancer* **11**, 316 (2011).
190. Lazo-Langner, A., Goss, G. D., Spaans, J. N. & Rodger, M. A. The effect of low-molecular-weight heparin on cancer survival. A systematic review and meta-analysis of randomized trials. *J. Thromb. Haemost. JTH* **5**, 729–737 (2007).

191. Altinbas, M., Coskun, H. S., Er, O., Ozkan, M., Eser, B., Unal, A., Cetin, M. & Soyuer, S. A randomized clinical trial of combination chemotherapy with and without low-molecular-weight heparin in small cell lung cancer. *J. Thromb. Haemost.* **2**, 1266–1271 (2004).
192. Sideras, K., Schaefer, P. L., Okuno, S. H., Sloan, J. A., Kutteh, L., Fitch, T. R., Dakhil, S. R., Levitt, R., Alberts, S. R., Morton, R. F., Rowland, K. M., Novotny, P. J. & Loprinzi, C. L. Low-Molecular-Weight Heparin in Patients With Advanced Cancer: A Phase 3 Clinical Trial. *Mayo Clin. Proc.* **81**, 758–767 (2006).
193. 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 J. Int. Cancer* **48**, 85–91 (1991).
194. Schlesinger, M. Vorstellung neuartiger therapeutischer Strategien zur Hemmung des metastasierungsrelevanten Integrins VLA-4 an Melanomzellen. (2011). at <<http://hss.ulb.uni-bonn.de/2011/2492/2492.pdf>> letzter Zugriff am 23.08.2015
195. Schmitz, P. Der Einfluss von Cyr61 auf die Adhäsionsfunktion von Integrinen und dessen Hemmung durch Heparin als Beitrag für eine antimetastatische Wirkung. (2013). at <<http://hss.ulb.uni-bonn.de/2013/3178/3178.pdf>> letzter Zugriff am 23.08.2015
196. Fritzsche, J. In vitro-Stimulation der Funktion von Adhäsionsmolekülen im Prozess der hämatogenen Metastasierung von Tumorzellen und deren Inhibition durch Heparin. (2008). at <<http://hss.ulb.uni-bonn.de/2008/1596/1596.pdf>> letzter Zugriff am 23.08.2015
197. SAW instruments GmbH. Instruction Manual sam@5 system. (2010).
198. Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Array Kit - ary003b.pdf. at <<http://www.rndsystems.com/pdf/ary003b.pdf>> letzter Zugriff am 23.08.2015
199. Shteingauz, A., Ilan, N. & Vlodavsky, I. Processing of heparanase is mediated by syndecan-1 cytoplasmic domain and involves syntenin and α -actinin. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **71**, 4457–4470 (2014).
200. Barash, U., Cohen-Kaplan, V., Dowek, I., Sanderson, R. D., Ilan, N. & Vlodavsky, I. Proteoglycans in health and disease: new concepts for heparanase function in tumor progression and metastasis. *FEBS J.* **277**, 3890–3903 (2010).
201. 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.* **2**, 329–333 (2007).
202. Ozaki, I., Hamajima, H., Matsushashi, S. & Mizuta, T. Regulation of TGF- β 1-Induced Pro-Apoptotic Signaling by Growth Factor Receptors and Extracellular Matrix Receptor Integrins in the Liver. *Front. Physiol.* **2**, 78 (2011).
203. Somanath, P. R., Kandel, E. S., Hay, N. & Byzova, T. V. Akt1 signaling regulates integrin activation, matrix recognition, and fibronectin assembly. *J. Biol. Chem.* **282**, 22964–22976 (2007).

204. Tkachenko, E., Rhodes, J. M. & Simons, M. Syndecans: new kids on the signaling block. *Circ. Res.* **96**, 488–500 (2005).
205. Shaywitz, A. J. & Greenberg, M. E. CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 821–861 (1999).
206. Aucoin, R., Reiland, J., Roy, M. & Marchetti, D. Dominant-negative CREB inhibits heparanase functionality and melanoma cell invasion. *J. Cell. Biochem.* **93**, 215–223 (2004).
207. Lopez-Bergami, P., Huang, C., Goydos, J. S., Yip, D., Bar-Eli, M., Herlyn, M., Smalley, K. S. M., Mahale, A., Eroshkin, A., Aaronson, S. & Ronai, Z. Rewired ERK-JNK signaling pathways in melanoma. *Cancer Cell* **11**, 447–460 (2007).
208. Luan, Q., Sun, J., Li, C., Zhang, G., Lv, Y., Wang, G., Li, C., Ma, C. & Gao, T. Mutual enhancement between heparanase and vascular endothelial growth factor: a novel mechanism for melanoma progression. *Cancer Lett.* **308**, 100–111 (2011).
209. Winterhoff, B., Freyer, L., Hammond, E., Giri, S., Mondal, S., Roy, D., Teoman, A., Mullany, S. A., Hoffmann, R., von Bismarck, A., Chien, J., Block, M. S., Millward, M., Bampton, D., Dredge, K. & Shridhar, V. PG545 enhances anti-cancer activity of chemotherapy in ovarian models and increases surrogate biomarkers such as VEGF in preclinical and clinical plasma samples. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* **1990** **51**, 879–892 (2015).
210. Kitano, H. Cancer as a robust system: implications for anticancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 227–235 (2004).
211. Baraz, L., Haupt, Y., Elkin, M., Peretz, T. & Vlodavsky, I. Tumor suppressor p53 regulates heparanase gene expression. *Oncogene* **25**, 3939–3947 (2006).
212. Bartek, J., Falck, J. & Lukas, J. CHK2 kinase--a busy messenger. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 877–886 (2001).
213. Senis, Y. A., Mazharian, A. & Mori, J. Src family kinases: at the forefront of platelet activation. *Blood* **124**, 2013–2024 (2014).
214. Miller, L. A., Hong, J. J., Kinch, M. S., Harrison, M. L. & Geahlen, R. L. The engagement of beta1 integrins on promonocytic cells promotes phosphorylation of Syk and formation of a protein complex containing Lyn and beta1 integrin. *Eur. J. Immunol.* **29**, 1426–1434 (1999).
215. 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.* **280**, 12103–12113 (2005).

8 Anhang

8.1 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 2.1	Prozess der hämatogenen Metastasierung ⁴	4
Abb. 2.2	Anhaftung der Tumorzelle am Endothel am Beispiel einer Melanomzelle modifiziert nach Lee et al. ⁷	5
Abb. 2.3	Konformationen der Integrine auf der Zelloberfläche	7
Abb. 2.4	Kombinationen der Integrin-Untereinheiten nach Hynes ¹⁴	9
Abb. 2.5	Ablauf der gerichteten Zellmigration ^{28,30,31}	11
Abb. 2.6	Integrin vermittelte Signaltransduktion in Tumorzellen ^{71,72}	16
Abb. 2.7	Übersicht der GAG-Komponenten ⁷⁴	19
Abb. 2.8	Mitglieder der HSPG-Familie und ihre Lokalisation nach Esko et al. ⁸⁰	22
Abb. 2.9	Struktur und Funktionen der SDC ^{81,90}	24
Abb. 2.10	Intrazelluläre Verknüpfung von SDC-4 ⁹⁰	26
Abb. 2.11	Abbau von HS-Ketten durch Heparanase modifiziert nach Peterson und Liu ¹¹⁴	29
Abb. 2.12	Schematische Übersicht der Expression und des Metabolismus von Heparanase modifiziert nach Gingis-Velitski et al. ¹³³	32
Abb. 2.13	Struktur des unfractionierten Heparins ¹⁵⁴	36
Abb. 2.14	Die sekundäre Hämostase	37
Abb. 2.15	Struktur des Tinzaparin-Natrium ¹⁶⁶	38
Abb. 4.1	Spektralen Phasen- und Amplitudenverschiebung während der Frequenzabtastung ¹⁹⁷	69
Abb. 4.2	Prinzip der Bildung des SAM von 11-Mercaptoundecansäure auf der goldbeschichteten Oberfläche des Quarzsensors	70
Abb. 4.3	Phasendiagramm der Immobilisierung eines Proteins mit EDC/NHS	71
Abb. 4.4	Immobilisierung von Proteinen mit EDC/NHS.....	72
Abb. 4.5	Prinzip der Bildung des SAM von Hexadecan-1-thiol auf der goldbeschichteten Oberfläche des Quarzsensors	73
Abb. 4.6	Schema der Langmuir-Blodgett-Immobilisierung einer Membran auf einem goldbeschichteten Quarzsensor	74
Abb. 4.7	Beschichtung des hydrophobisierten Quarzsensors mittels Langmuir-Blodgett-Technik	75
Abb. 4.8	Graph der Phasenverschiebung während der Immobilisierung eines Proteins durch Chelatierung der His-tag-Einheit.....	77
Abb. 4.9	Graphen der Phasenverschiebung während der Injektionen von ansteigenden Heparanase-Konzentrationen	78

Abb. 4.10	Auswertung und Bestimmung der Bindungsparameter k_{on} , k_{off} und K_D	79
Abb. 4.11	Biuret-Reaktion	82
Abb. 5.1	Durchflusszytometrische Vermessung von Integrin-Untereinheiten und SDC-1 auf MV3 Zelltypen	89
Abb. 5.2	Aktivität der endogenen MV3 Heparanase.....	90
Abb. 5.3	Heparanase-Aufnahme in MV3 Wt und aSDC-4kd nach zwei und sechs Stunden	91
Abb. 5.4	Migration von MV3 Wt und aSDC-4kd auf Fibronektin	92
Abb. 5.5	Migration von MV3 Wt und aSDC-4kd während der Inkubation mit latenter Heparanase	93
Abb. 5.6	Migration von MV3 Wt und aSDC-4kd während der Inkubation mit dem KKDC-Peptid	94
Abb. 5.7	Adhäsion von MV3 Wt, aSDC-4kd und aNT Zellen auf einer VCAM-1-Oberfläche unter physiologischen Flussbedingungen	96
Abb. 5.8	Adhäsion von MV3 Wt und aSDC-4kd Zellen nach Inkubation mit latenter Heparanase auf einer VCAM-1-Oberfläche unter physiologischen Flussbedingungen	97
Abb. 5.9	Adhäsion von MV3 Wt nach Inkubation mit latenter Heparanase auf einer VCAM-1-Oberfläche unter physiologischen Flussbedingungen.....	98
Abb. 5.10	Durchflusszytometrische Untersuchungen der VCAM-1-Bindung von MV3 Wt und aSDC-4kd Zellen nach Inkubation mit latenter Heparanase und Manganolonen	99
Abb. 5.11	Durchflusszytometrische Untersuchungen der VCAM-1-Bindung von MV3 Wt und aSDC-4kd Zellen nach 10-minütiger Inkubation mit verschiedenen Heparanase-Konzentrationen	100
Abb. 5.12	Durchflusszytometrische Untersuchungen der VCAM-1-Bindung von MV3 Wt und aSDC-4kd Zellen nach verschiedenen Inkubationszeiten mit KKDC-Peptid	101
Abb. 5.13	Schematische Darstellung der Aktivierung von VLA-4 durch latente Heparanase	103
Abb. 5.14	Graph der Phasenverschiebung während der Bindung von latenter Heparanase an SDC-4.....	104
Abb. 5.15	Western Blot des enzymatischen Abbaus des rekombinanten SDC-4 durch Heparinase III	106
Abb. 5.16	Graph der Phasenverschiebung während der Bindung von latenter Heparanase an SDC-4, das zwei Stunden mit Heparinase III bei 37°C inkubiert wurde.	107
Abb. 5.17	Graph der Phasenverschiebung während der Bindung von latenter Heparanase an SDC-4, das für 21 Stunden mit Heparinase III bei 37°C inkubiert wurde.	108
Abb. 5.18	Western Blot des enzymatischen Abbaus des rekombinanten SDC-4 durch Chondroitinase ABC	109
Abb. 5.19	Graph der Phasenverschiebung während der Bindung von latenter Heparanase an SDC-4, das für zwei Stunden mit Chondroitinase ABC bei 37°C inkubiert wurde.....	110

Abb. 5.20	Graph der Phasenverschiebung während der Bindung von latenter Heparanase an Syndekan-4, das für 21 Stunden mit Chondroitinase ABC bei 37°C inkubiert wurde.....	110
Abb. 5.21	Graph der Phasenverschiebung während der Bindung von latenter Heparanase an VLA-4.....	112
Abb. 5.22	Graph der Phasenverschiebung während der Bindung von latenter Heparanase an $\alpha\text{U}\beta\text{5}$	112
Abb. 5.23	Graph der Phasenverschiebung während der Bindung von latenter Heparanase an VCAM-1	114
Abb. 5.24	Intrazelluläres Signaling von Integrinen ²⁰²	115
Abb. 5.25	Western Blots von intrazellulären Kinasen der MV3 Wt und aSDC-4kd Zellen	116
Abb. 5.26	PKC-Signaling von SDC-4 ²⁰⁴	118
Abb. 5.27	Pixeldichten der Kinasen ERK1/2, c-Jun, JNK1/2/3, GSK-3 α/β und CREB in Wt und aSDC-4kd Zellen mit und ohne latenter Heparanase-Behandlung (latHpse) im Proteome Profiler TM Assay	119
Abb. 5.28	Signaling in Melanomzellen über ERK-JNK nach Lopez-Bergami et al. ²⁰⁷	120
Abb. 5.29	Signaling über Chk2, p38 und p53	121
Abb. 5.30	Pixeldichten der Kinasen Chk2, p38 α und p53 in Wt und aSDC-4kd Zellen mit und ohne latenter Heparanase-Behandlung (latHpse) im Proteome Profiler TM Assay.....	122
Abb. 5.31	Pixeldichten der Kinasen FAK und AKT in Wt und aSDC-4kd Zellen mit und ohne latenter Heparanase-Behandlung (latHpse) im Proteome Profiler TM Assay	123
Abb. 5.32	Pixeldichten der Src-Kinasen c-Src, Yes, Fyn, Fgr, Lck, Hck und Lyn in Wt und aSDC-4kd Zellen mit und ohne latenter Heparanase-Behandlung (latHpse) im Proteome Profiler TM Assay	123
Abb. 5.33	Detektion von Vinculinspots in Wt und aSDC-4kd Zellen immobilisiert auf VCAM-1	125
Abb. 5.34	Graph der Phasenverschiebung während der Bindung von an SDC-4 gebundener latenter Heparanase und nachfolgende Tinzaparin-Injektionen	129
Abb. 5.35	Graph der Phasenverschiebung während der Bindung von SDC-4 und einem Gemisch aus konstanten Konzentrationen der latenten Heparanase mit abnehmenden Tinzaparin-Konzentrationen.....	129
Abb. 5.36	Durchflusszytometrische Untersuchungen der VCAM-1-Bindung von Wt und aSDC-4kd Zellen nach 10-minütiger Inkubation mit Heparinen oder Heparin/Heparanase-Gemischen	131
Abb. 5.37	Durchflusszytometrische Untersuchungen der VCAM-1-Bindung von MV3 Wt und aSDC-4kd Zellen nach zeitlich versetzter Inkubation mit Heparinen und Heparanase	132

Tabelle 2.1	Übersicht der PG nach Lokalisation, Klassifizierung und vorwiegendem GAG ⁷⁶	20
Tabelle 2.2	Übersicht der zugelassenen LMWH und ihr antimetastatisches Potential	40
Tabelle 4.1	Auflistung der verwendeten Geräte	43
Tabelle 4.2	Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	45
Tabelle 4.3	Auflistung der verwendeten Chemikalien.....	46
Tabelle 4.4	Auflistung der verwendeten Heparine.....	50
Tabelle 4.5	Auflistung der verwendeten Enzyme	50
Tabelle 4.6	Auflistung der rekombinanten Proteine.....	50
Tabelle 4.7	Auflistung der verwendeten Lipide.....	51
Tabelle 4.8	Auflistung der verwendeten primären und sekundären Antikörper.....	51
Tabelle 4.9	Zusammensetzungen der verwendeten Puffer und Lösungen.....	53
Tabelle 4.10	Immobilisierungsdaten von Proteinen auf Quarzsensoren mittels EDC/NHS	71
Tabelle 4.11	Immobilisierungsdaten von Proteinen auf Quarzsensoren mittels Chelator	76
Tabelle 4.12	Konzentrationen der verwendeten Antikörper in Western Blot Experimenten	84
Tabelle 5.1	Gleichgewichtsdissoziations-, Assoziations- und Dissoziationskonstanten der Heparine zu latenter Heparanase.....	127

8.2 Publikationsliste

Wissenschaftliche Originalarbeiten

Schlesinger M, Zeisig R, Ortmann K, Calin M, Gerber U, Roblek M, Borsig L, Bendas G. Inhibition of chemokine receptor CCR2 reduces sarcoma cell transendothelial migration and metastasis to the lungs.

Int J Clin Pharmacol Ther. 2015 Aug; im Druck

Gerber U, Hoß SG, Shteingauz A, Jüngel E, Jakubzig B, Ilan N, Blaheta R, Schlesinger M, Vlodayvsky I, Bendas G.

Latent heparanase facilitates VLA-4-mediated melanoma cell binding and emerges as a relevant target of heparin in the interference with metastatic progression.

Semin Thromb Hemost. 2015 Mar;41(2):244-54

Reder-Christ K, Schmitz P, Bota M, Gerber U, Falkenstein-Paul H, Fuss C, Enachescu M, Bendas G.

A dry membrane protection technique to allow surface acoustic wave biosensor measurements of biological model membrane approaches.

Sensors (Basel). 2013 Sep;13(9):12392-405

Schmitz P*, Gerber U*, Schütze N, Jüngel E, Blaheta R, Naggi A, Torri G, Bendas G.

Cyr61 is a target for heparin in reducing MV3 melanoma cell adhesion and migration via the integrin VLA-4.

Thromb Haemost. 2013 Nov;110(5):1046-54

Schmitz P*, Gerber U*, Jüngel E, Schütze N, Blaheta R, Bendas G.

Cyr61/CCN1 affects the integrin-mediated migration of prostate cancer cells (PC-3) in vitro.

Int J Clin Pharmacol Ther. 2013 Jan; 51(1):47-50

(*gleichberechtigte Erstautoren)

Posterbeiträge

Hoß SG, Gerber U, Jakubzig B, Schlesinger M, Ilan N, Vlodayksy I, Bendas G.

The impact of latent heparanase on integrin-mediated adhesion and migration of melanoma cells in metastatic spread - A novel target for therapeutic interference?

DPhG Jahrestagung 2014 Frankfurt am Main

Gerber U, Hoß SG, Naggi A, Ilan N, Vlodayksy I, Bendas G.

Stimulation of the melanoma cell integrin VLA-4 binding function by latent heparanase is mediated via the proteoglycan syndecan-4 – A novel pathway for heparin interference with metastatic progression.

CESAR Jahrestagung 2014 Bonn

Gerber U, Ilan N, Vlodayksy I, Bendas G.

Does latent heparanase stimulate the integrin-associated adhesion of melanoma cells via syndecan-4 as an auto-regulative process in metastasis?

CESAR Jahrestagung 2013 Tübingen

Gerber U, Ilan N, Vlodayksy I, Bendas G

Latent heparanase stimulates the integrin VLA-4 mediated melanoma cell adhesion via a syndecan-4 signaling pathway.

8th International Conference on Proteoglycans 2013 Frankfurt

Schmitz P, Gerber U, Schlesinger M, Naggi A, Torri G, Casu B, Bendas G

Novel insight into the CCN1-pathway: Activating integrin function in tumor cell metastasis and interference with heparin.

DPhG Jahrestagung 2011 Innsbruck

8.3 Verfassererklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit persönlich und selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche von mir kenntlich gemacht.

Bonn, den

Ursula Gerber