

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen-Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Ingenieur für Biotechnologie (FH) Claas Gronewold
aus Bruchsal

Tag der mündlichen Prüfung:

In vitro Untersuchungen zur Wirkung
von Saccharidmimetika auf
verschiedene Schritte der Metastasierung
von malignen Melanomzellen

Gutachter: Prof. Dr. Manfred Wießler
Prof. Dr. Nils Metzler-Nolte

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	1
1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	4
2 ZUSAMMENFASSUNG	8
3 SUMMARY	10
4 EINLEITUNG	12
4.1 Krebs und Metastasierung	12
4.2 Die Zelloberfläche	15
4.2.1 Lectine und ihre Liganden	17
4.2.2 Integrine und ihre Liganden	25
4.2.3 Die Adhäsion an das Endothel – ein Zusammenspiel der Oberflächenmoleküle	32
4.3 Die extrazelluläre Matrix	34
4.4 Matrix-degradierende Enzyme	39
4.4.1 Matrix-Metalloproteinasen	40
4.5 Das Melanome	43
4.5.1 Epidemiologie der Melanome	45
4.5.2 Biologie der Melanome	46
4.6 Zellmigration	49
4.7 Anti-metastatische Therapie	53
5 .AUFGABENSTELLUNG	57
6 EXPERIMENTELLER TEIL	58

6.1	Zellkultur Allgemein	58
6.1.1	Passagieren der Zellen	58
6.1.2	Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer	58
6.1.3	Kultivierung der Zelllinien B16F1 und B16F10	59
6.1.4	Kultivierung der Zelllinien WM-115 und WM-266-4	60
6.1.5	Einfrieren von Zellen	61
6.1.6	Auftauen von Zellen	61
6.1.7	Mykoplasmentest	62
6.1.8	Adhäsions-Assay	62
6.1.9	Zymographie zum Nachweis von MMP-Aktivität	65
6.1.10	Proteinbestimmung	69
6.1.11	Western Blot	70
6.1.12	Migrations-Assay	72
6.1.13	Zytotoxizität	72
6.1.14	Durchflußzytometrie	74
7	ERGEBNISSE	76
7.1	Adhäsions-Assays	76
7.1.1	Vorversuche zum Adhäsions-Assay	76
7.1.2	Auf Cyclohexan basierende Saccharidmimetika	82
7.1.3	Auf Furan basierende Saccharidmimetika	85
7.1.4	Charakterisierung des Integrinmusters auf der Zelloberfläche von humanen Melanom-Zellen	108
7.2	Untersuchung der Zytotoxizität der Saccharidmimetika	112
7.2.1	Bestimmung der Zytotoxizität der Cyclohexan-Derivate	112
7.2.2	Bestimmung der Zytotoxizität der Furan-Derivate	113
7.3	MMP-Assay	116
7.3.1	Inhibition der MMP-Aktivität durch 3,4-BGF	118
7.3.2	Inhibition der MMP-2 Aktivität durch GSF	121
7.4	Migrations-Assay	122
7.4.1	3,4-BGF	122
7.4.2	GSF	124
8	DISKUSSION	125
8.1	TMC-Derivate	125

Inhaltsverzeichnis	3
8.2 Furan-Derivate	129
8.3 Integrinmuster	141
8.4 Migration	142
9 SCHLUßFOLGERUNGEN UND AUSBLICK	145
10 LITERATUR	147
11 DANKSAGUNG	157

1 Abkürzungsverzeichnis

Dezimale Vielfache und Teile von Einheiten

n	nano	[1×10^{-9}]
μ	micro	[1×10^{-6}]
m	milli	[1×10^{-3}]
k	kilo	[1×10^3]

Physikalische Größen und Einheiten

A	Fläche
t	Zeit
d	Tag
h	Stunde
min	Minute
s	Sekunde
m	Meter
g	Gramm
V	Volumen
l	Liter
T	Temperatur
°C	Grad Celsius
g	Erdbeschleunigung
rpm	Umdrehungen pro Minute

Chemische und biologische Größen und Einheiten

M_G	Molekulargewicht
M	molar (Mol pro Liter)
kDa	kiloDalton
pH	pH-Wert
IC ₅₀	Konzentration bei welcher 50 % der gewünschten Wechselwirkungen inhibiert wird
t _d	Verdopplungszeit

Aminosäuren

A, Ala	Alanin	D, Asp	Asparaginsäure
E, Glu	Glutaminsäure	G, Gly	Glycin
I, Ile	Isoleucin	L, Lys	Lysin
P, Pro	Prolin	Q, Gln	Glutamin
R, Arg	Arginin	S, Ser	Serin
V, Val	Valin		

Saccharide

Fuc	Fucose	Gal	Galactose
GalNAc	N-Acetylgalactosamin	Glc	Glucose
GlcNAc	N-Acetylglucosamin	Man	Manose
Neu5Ac	N-Acetylneuraminsäure = Sialinsäure	sLe ^x	sialyl Lewis X
sLe ^y	sialyl Lewis Y		
Me-Gal	Methyl- β -D-galactopyranosid		

Saccharidmimetika

Di-Gal	1,3-Bis- β -D-galactopyranosyl-oxymethyl-5-hydroxymethyl-cyclohexan
Tri-Gal	1,3,5-Tris- β -D-galactopyranosyl-oxymethyl-cyclohexan
BGF	Bis- β -D-galactopyranosyl-oxymethyl-furan
FGF	3- β -L-Fucopyranosyl-oxymethyl-4- β -D-galactopyranosyl-oxymethyl-furan
GSF	3- β -D-Galactopyranosyl-oxymethyl-4-sulfatomethyl-furan

Sonstige

Abb.	Abbildung
act.	active
ASPG-R	Asialoglycoproteinrezeptor
APS	Ammoniumpersulfat
BHMF	Bishydroxymethyl-furan
BSA	bovine serum albumine
CD	cell-surface domain
Col	Collagen
CRD	carbohydrate recognition domain
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dubelcos minimum essential medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPM	desintegrations per minute

ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamin-tetra-acetat
EMT	epithelial to mesenchymal transition
et al.	und andere
EtOH	Ethanol
FACS	fluorescence assisted cell sorting = Durchfluß-Cytometrie
FCS	Fötale Kälberserum
Fib	Fibronectin
GAG	Glycosaminoglycan
HAc	Essigsäure
inact	inactive
intermed	intermediate
Ktr	Kontrolle
ICAM	intercellular adhesion molecule
Lam	Laminin
LM609	$\alpha_v\beta_3$ -Antikörper
Lsg.	Lösung
MEM	minimum essential medium
MeOH	Methanol
MIDAS	metal-ion-dependent adhesion side
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MT-MMP	membrangebundene Matrix-Metalloproteinase
MW	Mittelwert
NEA	nicht essentielle Aminosäuren
NSCLC	non small cell lung cancer
PAGE	polyacrylamid gel electrophoresis
PBS	phosphate puffered saline
PET	Polyethylen
R	Rest
RGP	radial growth phase
SDS	Natrium-dodecyl-sulfat
SFCM	serum-free conditioned medium
Siglec	sialic-acid-binding immunglobulin-like lectin
SRB	Sulforhodamin B
Stabw.	Standardabweichung
Tab	Tabelle
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TIMP-2	tissue inhibitor of MMP-2
TMC	Trishydroxymethyl-cyclohexan
TRIS	(Tris(hydroxymethyl)aminomethan)

UPAR	urokinase-type plasminogen activating receptor
UV	ultra-violett
Vitr	Vitronectin
VE	vollentsalzt
VGP	vertical growth phase

2 Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte das Potential synthetischer Saccharidmimetika getestet werden, verschiedene Schritte der metastatischen Kaskade *in vitro* zu hemmen. Dabei wurden an Melanomzellen einige ausgewählte Strukturen zweier Substanzbibliotheken auf ihre Wirkung gegenüber der Zell-Adhäsion und -Migration sowie der Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen untersucht.

Erste Versuche mit galactosylierten Cyclohexan-Derivaten haben gezeigt, daß sich die Adhäsion von B16F10-Mausmelanom-Zellen an Fibronectin in Anwesenheit von 40 mM 1,3-Bis- β -D-galactopyranosyl-oxymethyl-5-hydroxymethyl-cyclohexan um 80 % inhibieren läßt. Die Wirksamkeit von Galactose als aktives Element bestätigten Adhäsionsversuche mit digalactosylierten Furan-Derivaten, welche in äquivalenter Konzentration in der Lage waren die Adhäsion der B16F10-Zellen an Fibronectin (40 %), Vitronectin (50 %) und Laminin (50 %) signifikant zu reduzieren. Der Furanring als Grundgerüst der Saccharidbibliothek bietet dabei den Vorteil, daß das Saccharidmimetikum über eine Diels-Alder-Reaktion an Fluoreszenz-Farbstoffe gekoppelt werden kann. Auf diese Weise lassen sich Moleküle erzeugen, die als Marker zuckerbindender Strukturen zur Aufklärung des Wirkmechanismus der Saccharidmimetika genutzt werden können.

Die Substitution eines Galactoserestes am Furan-Ring gegen eine Fucoseeinheit ergab keine Verbesserung der inhibitorischen Eigenschaften. Auch eine Übertragung der Ergebnisse auf die humane Melanom-Zelllinie WM-115 ergab für 40 mM 3,4-Bis- β -D-galactopyranosyl-oxymethyl-furan nur noch einen geringen Rückgang der Adhäsion an Fibronectin (26 %) bzw. Fibrinogen (30 % ab 5mM). Ein Effekt der Substanz auf die Aktivität der Matrix-Metalloproteinase-2 bzw. das Migrationspotential der Zellen war nicht zu erkennen.

Die Addition einer geladenen Sulfatgruppe an den Furanring ergab schließlich die gewünschte Optimierung der Wirksamkeit des Saccharidmimetikums. 3- β -D-Galactopyranosyl-oxymethyl-4-sulfatomethyl-furan (GSF) ist in der Lage die Adhäsion des B16F10 Maus-Melanoms und der humanen WM-115-Linie an Fibronectin (40 mM) und Fibrinogen (20 bzw. 10 mM) vollständig zu unterdrücken. Es verminderte die Aktivierung der MMP-2 und inhibierte die Migration von Zellen in einer Konzentration von 5 mM. Ein Rückgang der Zellzahl um 50 % aufgrund cytotoxischer Effekte ist bei dieser Konzentration erst nach mehr als 60 h erkennbar und daher für die beschriebenen Versuche nicht relevant. Die vollständige Inhibition der Adhäsion, sowie die signifikanten Auswirkungen auf die Aktivierung von

MMP-2 und die Zell-Migration deuten auf eine Interaktion von GSF mit einem oder mehreren Mitgliedern der Integrinfamilie hin.

Anhand der vorliegenden Arbeit ist es gelungen zu zeigen, daß insbesondere geladene Saccharidmimetika das Potential besitzen die metastasierenden Eigenschaften von Melanomzellen *in vitro* zu unterdrücken.

Das Screening nach weiteren geladenen Saccharidmimetika auf Furanbasis, deren vergleichbare Wirkung in geringeren Konzentrationen vorhanden sein sollte, scheint erfolgsversprechend und die Substanzen sollten durch die Möglichkeit einer kombinatorischen Synthese zugänglich sein.

3 Summary

The aim of this work is to investigate the potential of synthetic saccharide mimics to interfere with different steps of the metastatic cascade *in vitro*. Different structures of two libraries of saccharid mimics were tested for their capacity to inhibit cell-adhesion and –migration as well as the activation of matrix-metalloproteinases (MMPs) of melanoma cells.

Treatment of the melanoma cells with galactosylated derivatives of cyclohexane had shown that cell-adhesion of murine B16F10 melanomas to fibronectin decreased about 80 % in presence of 40 mM 1,3-Bis- β -D-galactopyranosyl-oxymethyl-5-hydroxymethyl-cyclohexane. The inhibitory effect of saccharide mimics containing galactose in adhesion assays was confirmed by using di-galactosylated derivatives of furan which reduced the adhesion of B16F10 melanomas to fibronectin by about 40 % and to vitronectin and laminin by about 50 %. The furanoic core-structure of the library shows advantages over cyclohexane, because furan can thus react in a Diels-Alder reaction with fluorescent maleimides. Diagnostic tools can be generated to investigate the interaction of the saccharide mimic with the cell surface. Chemical exchange of galactose against fucose does not improve the inhibitory effect of the molecule.

The adhesion of human melanoma cell line WM-115 to fibronectin decreased by about 26 % and to fibrinogen by 30 % in the presence of 40 mM 4-Bis- β -D-galactopyranosyl-oxymethyl-furan. An effect of the saccharide mimic on the activation of MMP-2 or upon cell-migration was not observed.

Introduction of a sulfate-residue has led to a significant improvement of the inhibitory effect of the saccharide mimic. 3- β -D-Galactopyranosyl-oxymethyl-4-sulfatomethyl-furan (GSF) inhibited completely the adhesion of murine B16F10-cells and human WM-115-cell to fibronectin at 40 mM and to fibrinogen at 20 mM or rather 10 mM. GSF decreased the activation of MMP-2 and inhibited the migration of WM-115 and WM-266-4 cells at 5 mM. A significant reduction of the number of cells at 5 mM can only be seen after 60 hours due to cytotoxic effects. So cytotoxicity is not relevant for the shown assays. The complete inhibition of cell-adhesion as well as the inhibitory effect

of GSF on MMP-2 activation and cell-migration suggests an interaction with one or more members of the integrin family.


The current work shows the potential especially of charged saccharide mimics to suppress the metastatic properties of melanoma cells *in vitro*. Therefore the combinatorial synthesis and screening of further charged saccharide mimics based on the furan-core with comparable properties in lower concentrations seems to be promising.

4 Einleitung

4.1 Krebs und Metastasierung

Höher entwickelte Organismen sind aus einer wohlorganisierten Gemeinschaft von Zellen aufgebaut. Sie erfüllen an einem exakt festgelegten Platz innerhalb des Organismus ihre spezifische Aufgabe und unterliegen einer wechselseitigen Abhängigkeit. Durch molekulare Signalkaskaden kommunizieren Zellen miteinander und steuern auf diese Weise in einem gesunden Körper verschiedene lebenswichtige Prozesse, wie zum Beispiel die Zellteilung. Normalerweise teilen sich Zellen nur, wenn sie von benachbarten Zellen dazu aufgefordert werden, was gewährleistet, daß jedes Gewebe eine dem Körper angemessene Ausdehnung und Architektur behält.

Eine Ausnahme bilden pathogene Zellen, die die Wachstumskontrolle durch benachbarte Zellen durchbrochen haben und nun innerhalb des Organismus wild wuchernde Geschwüre bilden, indem sie ihrem eigenen unabhängigen Vermehrungsprogramm folgen. Der Oberbegriff für solche krankhaften Wucherungen ist „Krebs“, der allerdings keine einheitliche Krankheit darstellt, sondern die Gesamtheit für mehr als hundert verschiedene Formen des unkontrollierten Wachstums beschreibt. Nahezu jedes Gewebe unseres Körpers kann Tumoren hervorbringen, manchmal sogar mehrere unterschiedliche Typen, welche alle ihre individuellen Merkmale haben^[1.].

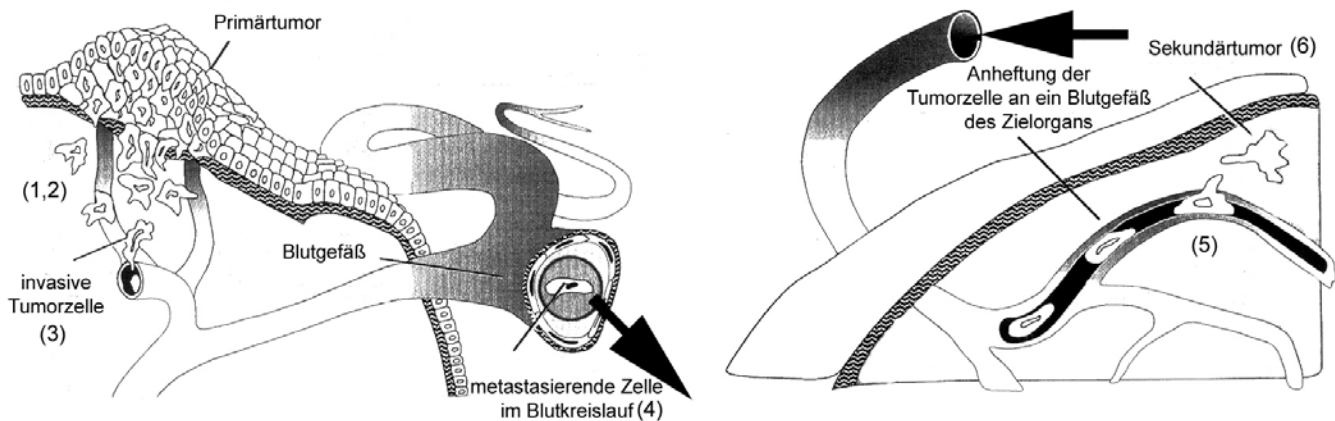
Allgemein unterscheidet man zwischen gutartigen (benignen) und bösartigen (malignen) Tumoren. Ob ein Tumor als gut- oder bösartig eingestuft wird, hängt von der Neigung der entarteten Zellen ab, in gesundes Gewebe einzuwandern und dort Tochtergeschwülste zu bilden. Erst die Bildung sogenannter Metastasen fernab vom Ursprungsort eines Primärtumors macht Krebs zu einer tödlichen Gefahr. Während sich nämlich der Primärtumor oft relativ einfach chirurgisch bekämpfen läßt  sind Metastasen zumeist so vielzählig und weiträumig innerhalb eines Organismus verstreut, daß eine rein operative Behandlung des Patienten nicht mehr möglich ist.

Wie man heute weiß, muß das Genom einer Zelle mehrere Mutationen erleiden, um von einer gesunden zu einer tumorigenen Zelle zu werden^[2.]. Insbesondere Veränderungen in sogenannten Proto-Onkogenen und Tumorsupressor-Genen ermöglichen einer Zelle ein unkontrolliertes Wachstum. Proto-Onkogene codieren für wachstumsfördernde



Proteine und stimulieren somit das Zellwachstum, während es durch Tumorsupressor-Gene gebremst wird. Verändern sich die von diesen beiden Genen codierten Proteine durch Mutationen in ihrer Funktion oder Quantität, kann dies zur stetigen Vermehrung der Zellen und damit zum fortwährenden Wachstum eines Tumors führen. Die Zellen eines solchen gutartigen Tumors vermehren sich zwar im Übermaß, dringen aber nicht in andere Gewebe ein.

Hierzu sind weitere Mutationen in Genen nötig, welche nicht für das Wachstum codieren, sondern den Tumorzellen durch Veränderungen ihrer Membranproteine und Enzyme ermöglichen, sich aus dem festen Zellverband zu lösen. Die abgelösten Zellen müssen durch Freisetzung matrixdegradierender Enzyme eine sie umgebende Proteinschicht verdauen, die als Extrazelluläre Matrix (ECM) bezeichnet wird und normalen Zellen als stützende Struktur dient. Sie durchwandern das umliegende Gewebe (Invasion) und durchbrechen schließlich die Basalmembran und das Endothel von Blut- oder Lymphgefäßen (Intravasation). Nun können sie mit dem Blut- oder Lymphkreislauf frei im Körper zirkulieren, müssen sich aber vor Angriffen des Immunsystems schützen und das Potential haben ihr intrazelluläres Selbstmordprogramm zu umgehen. Dieses verhindert bei normalen Zellen die freie Wanderung im Körper, indem es den programmierten Selbstmord der Zellen einleitet, nachdem diese sich aus ihrem festen Zellverband gelöst haben (Anoikis). Erst nach einer Wiederanheftung der metastasierenden Zellen an das Gefäßendothel und einer erneuten Einwanderung in das Gewebe des Zielorgans (Extravasation) können sie sich an einer neuen Stelle im Körper wieder ansiedeln. Hier induziert die Metastase, nachdem sie eine bestimmte Größe erreicht hat den Aufbau neuer Blutgefäße (Angiogenese), die den Tumor über das Blut mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgen (Abb.1).



Ablösen von Zellen aus dem festen Zellverband des Primärtumors

Degradierung und lokale Invasion der ECM

Intravasation in Blut oder Lymphgefäße

Überwindung immunologischer Angriffe und Überleben der Zellen im Blutkreislauf

Spezifische Wiederanheftung und Extravasation

Proliferation und Neoangiogenese innerhalb des Zielorgans

Abb. 1 Die metastatische Kaskade ^{[3],[1]}.

Schon früh haben Wissenschaftler beobachtet, daß sich im Blutkreislauf zirkulierende Tumorzellen bevorzugt in bestimmten Gewebearten des Körpers wieder ansiedeln. Bereits der Blutkreislauf erklärt teilweise, warum Metastasen der meisten Krebsformen vorzugsweise in bestimmten Organen wiederzufinden sind. Zirkulierende Tumorzellen bleiben häufig schon aufgrund ihrer Größe im ersten Kapillarnetz hängen, in das sie stromabwärts von ihrem Ursprungsort geraten.. So werden die abgelösten Tumorzellen der meisten Organe zuerst über den großen Blutkreislauf in die rechte Herzkammer und von dort mit dem kleinen Blutkreislauf in die Lunge transportiert, wo sie im feinen Kapillarnetz des Lungengewebes stecken bleiben. Lediglich vom Magen-Darm-Trakt gelangt das Blut über die Pfortader zunächst in die Leber, die ebenfalls von sehr feinen Kapillaren durchzogen ist.

Einige Krebsarten zeigen allerdings besondere Vorlieben für Organe, die nichts mit dem Abfließen des venösen Blutes aus dem Tumorgebiet zu tun haben. So neigen zum Beispiel Prostatakarzinome bevorzugt dazu, Knochenmetastasen zu bilden. Neben

weiteren Beobachtungen veranlaßte diese Tatsache L. Hood, H.V. Huang und W.J. Dreyer^[4.] dazu, ihre „Area-Code“ Hypothese aufzustellen, welche besagt, daß alle Zellen spezifische Membranrezeptoren besitzen, die wiederum spezifische Oberflächenmoleküle auf anderen Zellen erkennen und binden können. Durch diese Adressierung kann während des Wachstums und der Entwicklung jede Zelle an ihrem vorgesehenen Platz verankert werden. Überträgt man diese Hypothese auf die Migration von Tumorzellen, so kann eine spezifische Bindung von Oberflächenmolekülen auf der Krebszelle an spezifische Strukturen auf Endothelzellen, welche die Blutgefäße auskleiden, das Bestreben der Tumorzellen erklären, in das den Gefäßen benachbarte Gewebe einzuwandern^[1.].

Inzwischen wurden zahlreiche Adhäsionsmoleküle in der Zellmembran identifiziert, die eine spezifische Bindungsstelle für Strukturen der ECM oder angrenzende Zellen besitzen. Sie bestätigen zum einen die „Area-Code“-Hypothese und sind zum anderen potentielle Angriffspunkte für eine effektive antimetastatische Therapie. Gelingt es nämlich, die Anheftung zirkulierender Tumorzellen an das Gefäßendothel zu blockieren, verbleiben diese zunächst im Blutkreislauf, wo sie am verwundbarsten sind und früher oder später durch das Immunsystem erkannt und eliminiert werden.

4.2 Die Zelloberfläche

Eukaryotische Zellen grenzen sich durch die Plasmamembran von ihrer Umwelt ab. Sie umschließt die in das Cytosol eingebetteten Organellen der Zelle und erhält so die lebenswichtige Verschiedenartigkeit des intra- und extrazellulären Milieus. Eine dünne Schicht aus Lipid- und Proteinmolekülen, die vor allem durch nicht-kovalente Wechselwirkungen zusammengehalten werden, bilden die Grundstruktur der Plasmamembran. Die Lipidmoleküle, welche in tierischen Membranen etwa 50 % der Membranmasse ausmachen, sind amphiphil, d.h. sie besitzen ein hydrophiles (polares) und ein hydrophobes (unpolares) Ende. Diese Eigenschaft bewirkt, daß sich Lipide in wässrigem Milieu zu einer etwa 5 nm dicken Doppelschicht zusammenlagern, in welcher die polaren Köpfe dem Wasser zugewandt sind, während sich die unpolaren Enden dicht aneinanderreihen. In diese dynamische Lipid-Doppelschicht sind verschiedene Proteine eingebettet, welche bestimmte Funktionen für die Zelle erfüllen.

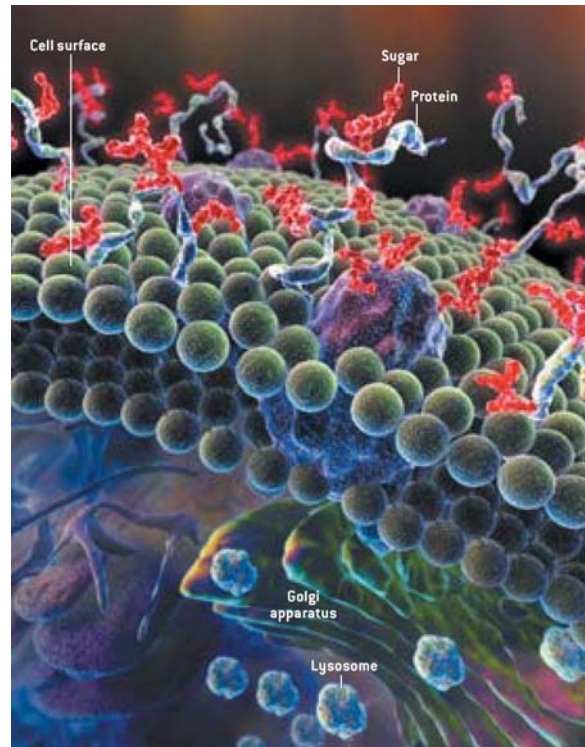


Abb. 2 Der Aufbau der Plasmamembran^[5.]

Da die Membran für die meisten wasserlöslichen Moleküle eine undurchdringliche Barriere darstellt, gewährleisten diese Membranproteine z.B. den aktiven Stofftransport und erzeugen einen Ladungsgradienten zwischen dem extrazellulären Raum und dem Cytosol. Einige Proteine durchdringen die Membran und verbinden das Cytoskelett der Zelle mit der Extrazellulären Matrix oder benachbarten Zellen. Diese Moleküle werden als Adhäsionsmoleküle bezeichnet und haben die zusätzliche Funktion extrazelluläre Signale über eine spezifische Kaskade in das Innere der Zelle zu leiten. Sie sind häufig glycosyliert, innerhalb der Lipid-Doppelschicht beweglich und besitzen als Oberflächenrezeptoren Bindungsdomänen für ihre spezifischen Liganden. Prinzipiell binden Zellen über vier verschiedene Klassen von Proteinen an die ECM oder an benachbarte Zellen:

- Lectine (binden Kohlenhydrate)
- Integrine (binden Aminosäure-Sequenzen)
- Cadherine (binden Cadherine)
- Immunglobuline

Diese Adhäsionsmoleküle verankern die Zellen fest an ihrer vorgesehenen Stelle im Körper, und da jede Zellart ein variierendes Muster an Adhäsionsmolekülen aufweist, das zudem vom Entwicklungsstadium der Zellen abhängt^[3.], kommt ihnen eine bedeutende Rolle in der Entwicklung und in der Metastasierung von Tumorzellen zu.

Im folgenden sollen einige Oberflächenrezeptoren, welche für die Adhäsion, Migration und Invasion von Tumorzellen von besonderer Bedeutung sind, genauer beschrieben werden.

4.2.1 Lectine und ihre Liganden

Lectine werden als kohlenhydratbindende Proteine definiert, die weder zu den Immunglobulinen zählen noch enzymatische Aktivität aufweisen^[6.]. Sie binden reversibel und mit hoher Spezifität Mono- und Oligosaccharide sowie verzuckerte, makromolekulare Strukturen wie Ribonukleoproteine, Phospholipide, Integrine oder Proteine der ECM.

Kohlenhydrate haben als Liganden in biologischen Systemen eine wichtige Rolle als Informationsträger, denn durch ihre Struktur können verknüpfte Zuckermoleküle eine weit höhere Informationsvielfalt erreichen als zum Beispiel Peptide. Zwei unterschiedliche Aminosäuren A und B, welche über peptidische Bindungen miteinander verknüpft werden, können maximal zwei unterschiedliche Moleküle, nämlich A-B und B-A, bilden. Eine Hexopyranose, kann hingegen über das C₁-Atom mit jeweils fünf verschiedenen Hydroxygruppen glycosidisch verknüpft werden. Hinzu kommt, daß jeder dieser Glycosylierungsschritte zwei verschiedene stereochemische Resultate haben kann, nämlich die Ausbildung einer α - und einer β - glycosidischen Bindung. Damit ergeben sich für die Verknüpfung zweier identischer Hexopyranosen A und A bereits elf verschiedene Strukturen. Die Bindung zweier unterschiedlicher Hexopyranosen A und B ergibt bereits 20 verschiedene Strukturmöglichkeiten für das Disaccharid AB und die Anzahl an Variationsmöglichkeiten steigt mit der Anzahl an Zuckerbausteinen weiter an, so daß Kohlenhydrate aufgrund ihrer Struktur geradezu prädestiniert erscheinen, biologische Information zu verschlüsseln.

Kohlenhydrate kommen im zellulären System als komplexe, verzweigte Oligosaccharide vor, die über ein Sauerstoff- (O-glycosidisch) oder ein Stickstoffatom (N-glycosidisch) an Lipide oder Proteine (=Glycokonjugate) gekoppelt sind und an der

Zelloberfläche eine dichte Schicht bilden, die als Glycocalix bezeichnet wird (siehe Abb. 3).



Abb. 3 Die elektronenmikroskopische Aufnahme der Glycocalix eines Erythrozyten. Die Dicke der Zuckerschicht beträgt etwa 140 nm^[7.]

Als monosaccharidische Bausteine der Oligosaccharide dienen hauptsächlich D-Glucose (Glc), D-Galactose (Gal), D-Mannose (Man), N-Acetyl-glucosamin (GlcNAc), N-Acetyl-galactosamin (GalNAc) sowie L-Fucose (Fuc) und N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac). Sie bilden in allen N-Glycoproteinen eine pentasaccharidische Kernregion mit der Struktur $\text{Man}(\alpha 1-6)[\text{Man}(\alpha 1-3)]\text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$ welche bereits in zwei Richtungen verzweigt ist (siehe Abb. 4). Eine weitere Verzweigung dieser Struktur führt bis zu pentaantennären Strukturen, welche später in der Lage sind, polyvalente Wechselwirkungen mit ihren Rezeptoren einzugehen^[7.].



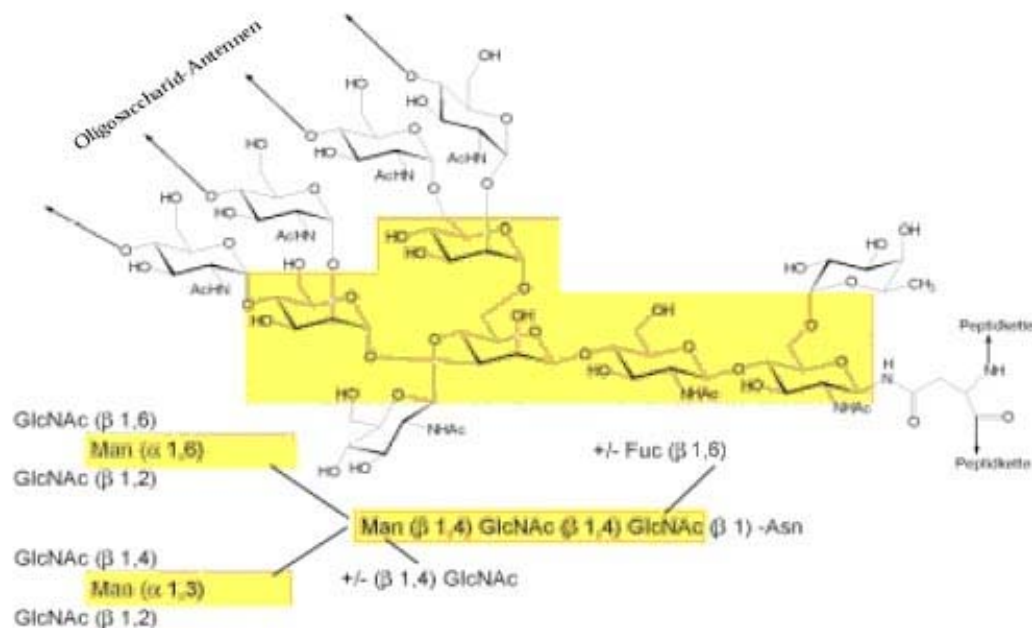


Abb. 4 Exemplarische Struktur eines N-Glycoprotein-Oligosaccharids. Die allen N-Glycoproteinen gemeinsame Core-Region ist grün hinterlegt.^[7.]

Die Proteinfamilie der Lectine übernimmt, wie bereits erwähnt, die Funktion, Saccharide zu erkennen und zu binden. Gemeinsames Merkmal aller Lectine ist das Vorhandensein von mindestens einer Kohlenhydraterkennungsdomäne (CRD: carbohydrate recognition domain). Die Tatsache, daß ihre Bindungsstärke an Monosaccharide sehr gering ist, aber mit zunehmender Anzahl gebundener Kohlenhydratbausteine ansteigt, erklärt zum einen, warum Lectine häufig mehr als eine CRD besitzen, und zum anderen, warum oligosaccharidische Strukturen vielfache Verzweigungen aufweisen. Die Ausbildung polyvalenter Wechselwirkungen zwischen Lectinen und Oligosacchariden führt zu einer drastischen Erhöhung ihrer Affinität.

Lectine werden aufgrund der peptidischen Homologie ihrer CRD's in vier Hauptgruppen unterteilt:

C-Typ-Lectine

Diese mit über 50 Mitgliedern zahlenmäßig größte Gruppe der Lectine benötigt als Cofaktor Ca^{2+} -Ionen zur Bindung ihrer Liganden. Grundsätzlich sind dies insbesondere Galactose- und Mannoseeinheiten, deren alleinige Affinität zum Rezeptor allerdings gering ist, so daß eine Festigkeit der Bindung erst durch Bindung weiterer benachbarter Zuckereinheiten zustande kommt^[6.]. C-Typ-Lectine kommen sowohl in membranständiger als auch in löslicher Form vor und können bis zu zehn CRDs besitzen. Sie werden aufgrund weiterer Bindungsspezifitäten nochmals in drei Untergruppen geteilt: die Endozytose vermittelnden Lectine, die Collectine und die Selectine.

Endozytose vermittelnde Lectine



Als klassisches Beispiel soll an dieser Stelle die Funktion des Asialoglycoproteinrezeptors (ASPG-R) beschrieben werden, der in großer Zahl an der Oberfläche von Hepatozyten vorkommt und der Entfernung alter Glycoproteine aus dem Blutkreislauf dient^[7.]. Viele Glycoproteine tragen Sialinsäure als endständigen Saccharidbaustein ihrer Oligosaccharid-Seitenketten, welche im Laufe der Zeit z.B. nach Abspaltung durch Exoglycosidasen verloren gehen. Bei diesen Glycokonjugaten liegen nach Abspaltung der Sialinsäure Galactosereste am Ende der Oligosaccharidketten frei, die nun vom ASPG-R gebunden und durch Endozytose ins Zellinnere aufgenommen werden können. Somit werden die alten, nicht mehr vollständig intakten Glycoproteine dem Blutkreislauf entzogen und von der aufnehmenden Zelle anschließend metabolisiert.

Collectine

Collectine weisen neben der C-terminalen CRD, N-terminal eine Collagenbindungsdomäne auf. Sie haben somit die Fähigkeit, bivalente Bindungen zwischen Saccharidstrukturen und der ECM zu knüpfen. Prominentestes Mitglied der Collectine ist wohl der Mannose-Rezeptor auf Makrophagen, welcher an der Regulation angeborener und adaptiver Immunprozesse beteiligt ist.

Selectine

Die L-Selectine (exprimiert auf Leukocyten), E-Selectine (ausschließlich exprimiert auf cytokin-aktivierten Endothel-Zellen) und P-Selectine (exprimiert auf Granulocyten und Endothelzellen) verbindet ihre Eigenschaft, Sialinsäure zu erkennen und zu binden. Für P-Selectine ist desweiteren eine Bindung an sulfatierte Proteoglycane, 3-sulfatierte Galactosylceramide und Heparin bekannt^[8.]. Häufig interagieren Selectine über die sialylierten Saccharidstrukturen mit Glycoproteinen aus der Familie der Mucine. Diese membranständigen Glycokonjugate können von mehreren Selectinen gleichzeitig gebunden werden und weisen eine Sensitivität für O-Sialoglycoproteasen auf, die die einzelnen Lectine selektiv wieder abspalten können. Damit ermöglichen sie eine Regulation der Adhäsionsstärke zwischen Zellen und der ECM.

Die Bindung der Selectine an die Oberflächenliganden sialyl Lewis X (sLe^x) und sialyl Lewis A (sLe^a) macht sie zu bedeutenden Molekülen der Zelladhäsion. sLe^x und sLe^a, die im Endzündungsprozeß (siehe 5.2.3) und der Metastasierung von Krebszellen eine wichtige Rolle spielen, wurden lange als Serum-Marker zur Diagnose von Krebs herangezogen. Ihr Vorkommen bei verschiedenen Arten von Krebs ist durch klinische Studien ausreichend belegt. sLe^x wird bevorzugt bei tumorartigen Erkrankungen der Lunge, der Eierstöcke, der Leber und der Niere exprimiert, während sLe^a gehäuft bei Dickdarm- und Bauchspeicheldrüsenkrebs vorkommt. Die Überexpression der beiden Liganden konnte schnell mit einer verstärkten Metastasenbildung und einer schlechten Prognose für betroffene Patienten korreliert werden (Kannagi R.). Eine erfolgreiche Wiederanheftung zirkulierender Zellen scheint, nach klinischen Studien zu urteilen, begünstigt, wenn das Gefäßendothel außerdem verstärkt E-Selectin exprimiert. Dies tut es allerdings nur nach Induktion durch Cytokine, wie zum Beispiel IL-1 β oder TNF- α . Die Menge an E-Selectinen auf ruhenden Endothelzellen steigt nach einer Stimulation mit Cytokinen innerhalb von 4 h signifikant an, verschwindet aber nach Ausbleiben der Stimulation innerhalb von 24 h wieder vollständig. Eine direkte Korrelation zwischen einem erhöhten E-Selektin-Spiegel und einer verstärkten Metastasenbildung wird daher zwar vermutet, konnte aber bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden^[9.].



S-Typ-Lectine oder Galectine

Galectine bilden eine Gruppe relativ kleiner (14-38 kDa), löslicher, Ca^{2+} -unabhängiger Lectine, die in vielzelligen Organismen weit verbreitet sind. Bislang zählt man aufgrund ihrer homologen Aminosäuresequenz innerhalb der Bindungsdomäne zwölf Lectine zur Familie der Galectine^[8.]. Sie besitzen eine oder zwei CRDs und kommen im Cytoplasma vor, von wo aus sie wahrscheinlich mittels Exocytose in den extrazellulären Raum freigesetzt werden^[10.]. Ein endständiger Galactoserest ist für eine Bindung der Galectine an Oligosaccharide notwendig, erbringt als alleiniger Zuckerbaustein allerdings nur eine geringe Bindungsstärke. Bevorzugt binden Galectine an Lactosamine (Gal β 1-3GlcNAc oder Gal β 1-4GlcNAc). Galectin-3 hat eine Präferenz für komplexe Oligosaccharid-Struktur^[11.] und erkennt das Epitop der menschlichen Blut-Gruppen A (GalNAc α 1-3[Fuc1-2]Gal β 1-4GlcNAc) als guten Liganden, während Galectin-1 das Epitop nicht bindet. ^[12.]

Sind die Galectine von der Zelle in den extrazellulären Raum exportiert worden, so können sie an die glycosilierten Seitenketten vieler Proteine binden, welche für die Zelladhäsion von Bedeutung sind. So binden z.B. Galectin-1 und -3 an Laminin, welches innerhalb der Basalmembran reich an Lactosaminen ist, und an tetraantennäre Saccharid-Strukturen des ECM-Proteins Fibronectin. Zudem konnte bewiesen werden, daß Galectin-3 und -8 an die glycosidische Seitenkette des Integrins $\alpha_3\beta_1$ binden^[11.],^[12.]. Es wurde gezeigt, daß sowohl Galectin-1 als auch Galectin-3 die Adhäsion an verschiedene Matrixproteine beeinflussen. Daß Galectin-1 die Affinität von humanen Smooth Muscle Cells (SMC) an Laminin senkt^[13.], während es die Affinität von humanen Melanomen an dasselbe Protein steigert^[14.], zeigt allerdings, neben zahlreichen anderen Beispielen, eine uneinheitliche Beeinflussung der Adhäsion. Dieser offensichtlich modulatorische Effekt der Galectine kann durch eine verschiedenartige Bindung an oben genannte Adhäsionsmoleküle erklärt werden (s. Abb. 5)



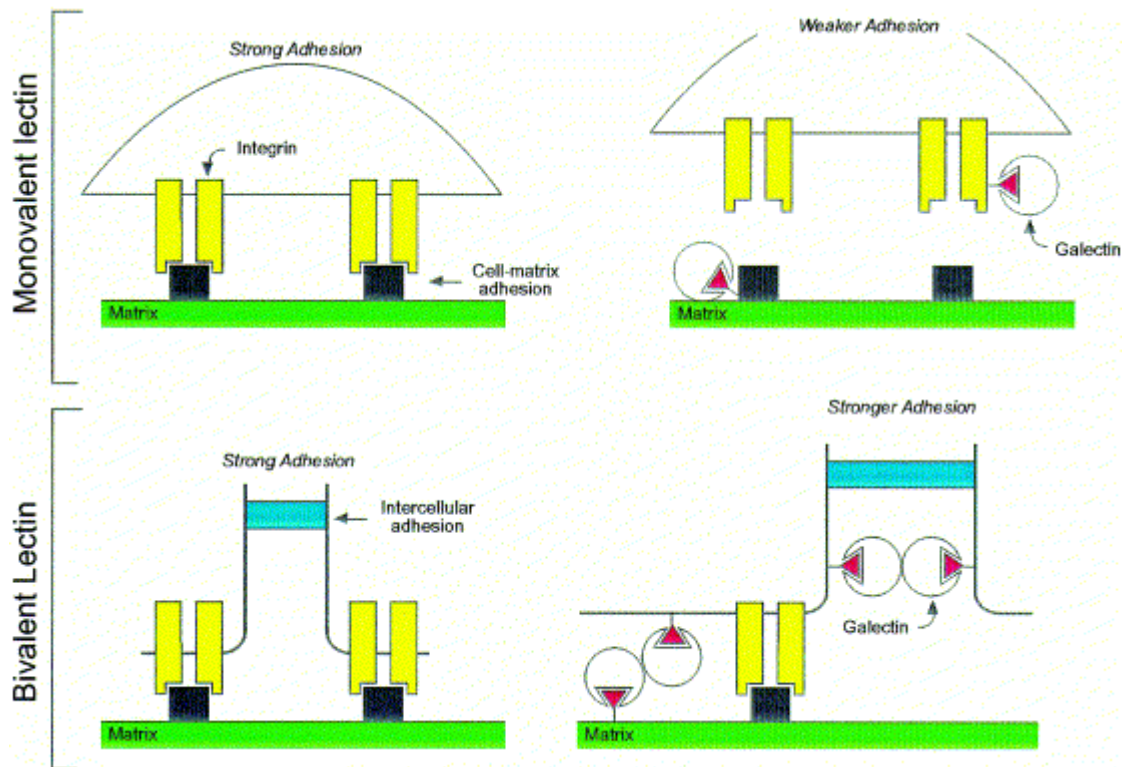


Abb. 5 Galectine als multifunktionale Modulatoren der Zell-Adhäsion^[10.]

Von besonderer Bedeutung scheint hierbei die für jedes Galectin charakteristische Anzahl an CRDs zu sein und damit die Fähigkeit, polyvalente Bindungen zu knüpfen. Während nämlich eine monovalente Bindung von Galectinen zu einer sterischen Hinderung der für die Adhäsion wichtigen Wechselwirkung führen kann, können bivalente Galectine zur zusätzlichen Ausbildung von Protein-Saccharid-Interaktionen zwischen der Zelle und der ECM führen. Ob eine mono- oder bivalente Bindung der verschiedenen Galectine möglich ist, hängt dabei neben ihrer Anzahl an CRDs von ihrer Konzentration im extrazellulären Raum ab. So wurde z.B. für das mit einer CRD ausgestattete Galectin-3 in mikromolaren Konzentrationen eine Zusammenlagerung zweier Moleküle zu einem Dimer nachgewiesen^{[15.], [16.]}, welches nun bivalent binden kann.

Galectin-3 scheint allgemein im Zusammenhang mit Krebs eine wichtige Rolle zu spielen. Es vermittelt z.B. eine Aggregation gleichartiger Zellen und kann somit zur Bildung von größeren Zellaggregaten beitragen, die leichter in engen Kapillaren des Gefäßsystems stecken bleiben, als vereinzelte Zellen. Es dient in Entzündungsprozessen als Lockstoff zur Rekrutierung von Monocyten und Makrophagen. Außerdem wurde

seine Fähigkeit zur Induktion der Neoangiogenese sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* nachgewiesen^[10.].

P-Typ-Lectine

Die membrangebundenen P-Typ-Lectine zeichnen sich dadurch aus, daß sie im Gegensatz zu anderen Lectinen phosphorylierte Mannosereste erkennen und binden können. Zu dieser Gruppe gehören die beiden transmembranen Mannose-6-phosphat-Rezeptoren, welche sowohl in der Plasmamembran als auch in der Membran des Trans-Golgi-Netzwerkes vorkommen. Sie erfüllen unter anderem eine Transportfunktion für den Wachstumsfaktor IGF-II durch die Plasmamembran.

I-Typ-Lectine

Die membranständigen I-Typ-Lectine werden der Immunglobulinsuperfamilie zugerechnet und verfügen zusätzlich über CRDs mit einer Spezifität für Sialinsäure, Mannose oder Glycosaminoglycane (GAG). Die Gruppe der Siglecs (sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectins) bindet negativ geladene N-Acetylneuraminsäure (=Sialinsäure), die insbesondere in der Zell-Zell-Erkennung eine große Rolle spielt. Als wichtiger Vertreter der GAG-bindenden Lectine ist das „intercellular adhesion molecule-1“ (ICAM-1) zu nennen.

Lectinvermittelte Zell-Zell und Zell-Matrix-Interaktionen

Aufgrund ihrer Eigenschaft als membrangebundene oder lösliche Moleküle im extrazellulären Raum vorzuliegen und ihrer Polyvalenz, können Lectine auf verschiedene Weisen mit Glycokonjugaten auf Zellen interagieren:

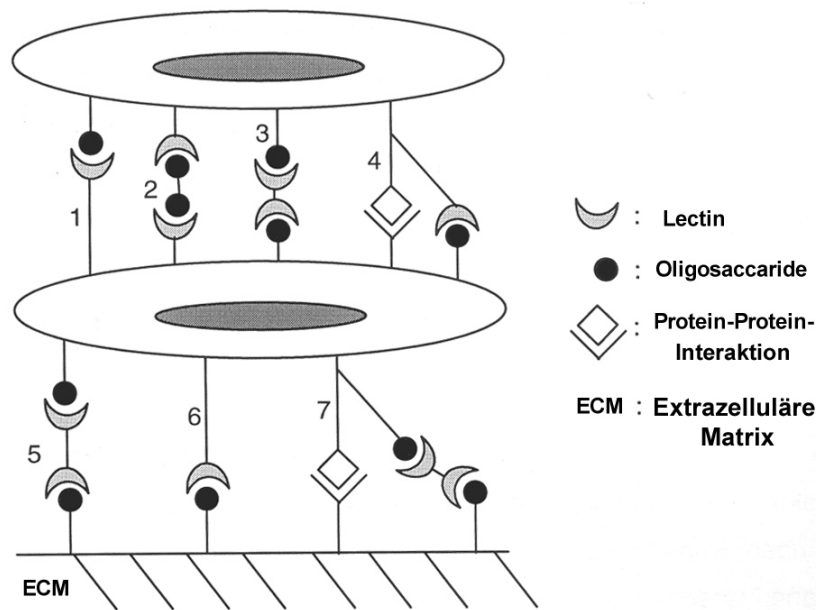


Abb. 6 Protein-Saccharid-Interaktionen zwischen Zellen und der ECM^[17.]

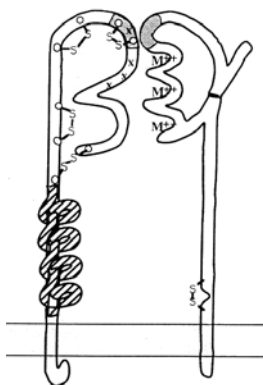
Eine direkte Bindung membranständiger Lectine (1) ist ebenso möglich, wie die Bindung eines bivalenten Oligosaccharid-Liganden zwischen zwei solchen Lectinen (2). Die Interaktion eines bivalenten, löslichen Lectins zwischen zwei Saccharidketten (3) kommt genauso vor, wie eine gekoppelte Protein-Protein-, Lectin-Oligosaccharid-Interaktion (4).



4.2.2 Integrine und ihre Liganden

Integrine sind transmembrane heterodimere Proteine, welche aus einer α - und einer β -Untereinheit bestehen. Die bisher bekannten 18 α -Untereinheiten variieren in ihrer Größe zwischen 120 und 180 kDa und sind nicht kovalent mit einer der 8 β -Untereinheiten, die zwischen 90 und 110 kDa groß sind, verknüpft. Bisher sind insgesamt 24 Integrin-Rezeptoren bekannt, die sich aus verschiedenen Kombinationen der beiden Untereinheiten ergeben (siehe Tab. 1) und die eine Vielzahl an ECM-Proteinen erkennen und binden können^[18.].





Untereinheiten		Liganden	Bindungsstellen (AS-Sequenz)	Expression auf Melanomzellen
β_1	α_1	Collagen, Laminin		++
	α_2	Collagen, Laminin	DGEA	+
	α_3	Fibronectin, Laminin	RGD	++
		Collagen		
	α_4	Fibronectin, VCAM-1	EILDV	
		++		
	α_5	Fibronectin	RGD	+/-
	α_6	Laminin		++
α_7	Laminin		++	
α_8	?		?	
α_v	Vitronectin, Fibronectin	RGD	++	
β_2	α_L	ICAM-1, ICAM-2		?
	α_M	C3b	GPRP	?
β_3	α_{IIb}	Fibrinogen, Fibronectin, von Willebrand Faktor, Vitronectin, Thrombospondin	RGD, KQAGDV	+
		α_v	Vitronectin, Fibrinogen, von Willebrand Faktor, Thrombospondin, Fibronectin, Osteopontin, Collagen	RGD
β_4	α_6	Laminin		-
β_5	α_v	Vitronectin	RGD	++
β_6	α_v	Fibronectin	RGD	++
β_7	α_4	Fibronectin, VCAM-2	EILDV	?

Tab. 1. Schematischer Aufbau eines Integrin-Rezeptors und Tabelle einiger Integrine und ihrer Liganden sowie ihrer Expression auf Melanomzellen (modifizierte Tabelle nach [19.], [20.]

Auch wenn eine Kombination aller α - und β -Untereinheiten theoretisch mehr als 100 verschiedene Rezeptoren ergeben würde, scheint die Zahl der existierenden Integrine



weit geringer zu sein. Viele α -Untereinheiten binden ausschließlich eine bestimmte β -Untereinheit. Die β -Untereinheiten werden hingegen oft von mehreren α -Untereinheiten als Partner akzeptiert. Wie die obige Tabelle zeigt, binden viele der Integrine mehrere Liganden und diese können auch häufig von mehr als einem Integrin erkannt werden. Die resultierende Protein-Protein-Interaktion ist verglichen mit der niederaffinen Protein-Saccharid-Interaktion um den Faktor 100 stabiler (siehe 5.2.3). Da die meisten der oben genannten Liganden Bestandteile der ECM sind, vermittelt die Protein-Protein-Bindung eine feste Zell-ECM-Interaktion.

Mit der vollständigen Darstellung der Kristallstruktur des extrazellulären Teils des Integrins $\alpha_v\beta_3$ gelang es Xiong J.-P. et al. 2002 wichtige Details über den Aufbau und die Funktionsweise von Integrinen zu veröffentlichen^[18.] (siehe Abb.7).

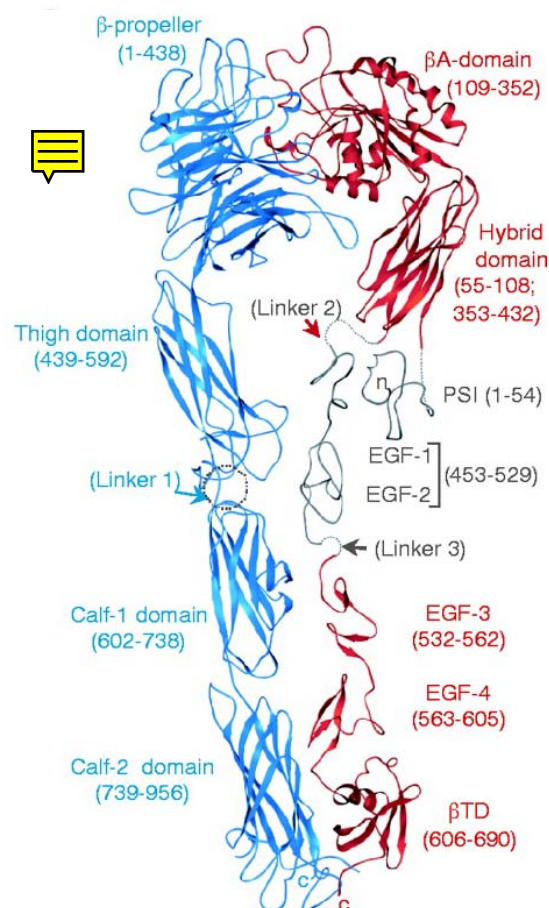


Abb. 7 Kristallstruktur des extrazellulären Segments des Integrins $\alpha_v\beta_3$ ^[18.]. Die α_v -Untereinheit ist blau, die β_3 -Untereinheit rot dargestellt.

Die hier im Bändermodell dargestellte gestreckte Struktur des extrazellulären Segments von $\alpha_v\beta_3$ zeigt, daß sich die beiden Untereinheiten (α_v = blau, β_3 = rot) in jeweils eine Kopf- und eine sogenannte Stelzenregion einteilen lassen. Die Stelzen durchdringen die Plasmamembran und enden in einer intrazellulären Region, die über weitere Proteine mit dem Cytoskelett der Zelle verbunden ist. Die gemeinsame Kopfreion des Heterodimers beinhaltet zwischen dem sogenannten β -Propeller der α -Untereinheit und der β A-Domäne der β -Untereinheit die $\alpha_v\beta_3$ -spezifische Bindungstasche für ein Tripeptid mit der Sequenz Arg-Gly-Asp (RGD) (s. Abb. 8).

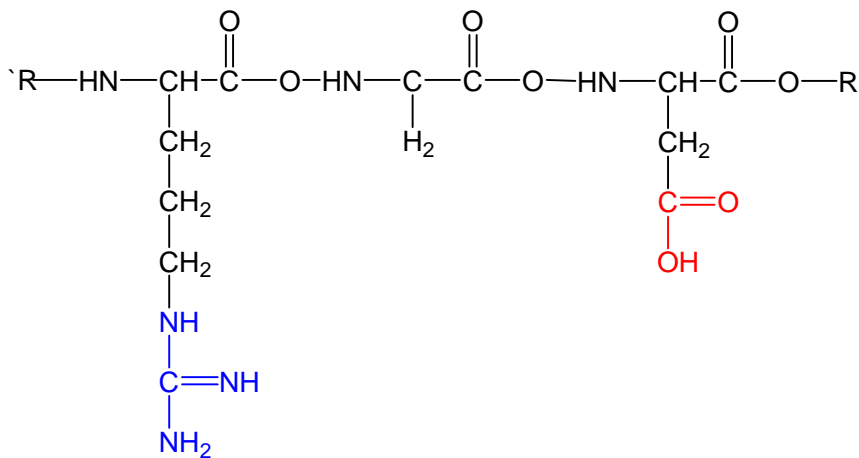




Abb. 8 Aminosäuresequenz des RGD-Liganden



Da die Interaktion mit dem Liganden Metallionen-abhängig ist wird die Ligandenbindungsdomäne auch als MIDAS-Region (metal ion-dependent adhesion site) bezeichnet. An die MIDAS-Region bindet der Ligand hauptsächlich über elektrostatische Wechselwirkungen der beiden geladenen Aminosäuren Arg und Asp, wobei Asp mit positiv geladenen Metallionen in der β -Untereinheit interagiert, während Arg mit zwei negativ geladenen Asparaginresten der α -Untereinheit wechselwirkt. Die Bindung wird zusätzlich über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Rückgrat des Proteins und dem Liganden stabilisiert. Obwohl während der Strukturanalyse im Kristall nach Bindung des Liganden keine Veränderung in der Gesamtstruktur des Integrins nachgewiesen werden konnte^[21.], geht man davon aus, daß eine Ligandenbindung *in vivo* eine funktionelle Konformationsänderung auslöst.

Neben ihrer Eigenschaft Zellen fest an ihrem Platz zu verankern kommt den Integrinen durch ihre transmembrane Struktur, eine wichtige Funktion als Schnittstelle für Signale



zu, die zwischen dem Zellinneren und dem extrazellulären Raum übermittelt werden. Man unterscheidet hierbei prinzipiell zwischen einem „inside-out“ - und einem „outside-in“-Signaling.

Unter dem „inside-out“-Signaling versteht man allgemein die Übertragung von Signalen aus dem Zellinneren nach außen, was sich im Falle der Integrine in einer Modulation ihrer Bindungs-Affinität und -Spezifität ausdrückt^[19.]. Zellen können ihre adhäsiven Eigenschaften durch eine selektive Expression von Integrinen verändern, oder durch Variation der Festigkeit des Liganden-Rezeptorkomplexes. Als Beispiel sei hier die Bindung des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ aufgeführt, welches auf zirkulierenden, jedoch in ihrer Funktion als Gerinnungsfaktoren ruhenden, Blutplättchen exprimiert wird und an keinen seiner löslichen Liganden bindet. Diese Bindung würde im gesunden Körper auch nur zur ungewollten Bildung von Emboli und  mit zu einer eventuell tödlichen Thrombose führen. Nach einer Aktivierung der Thrombocyten durch Thrombin oder andere Agonisten bindet das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ hingegen sehr effektiv an lösliches Fibrinogen oder andere Liganden^{[22], [23.]}. Immunologisch konnte bewiesen werden, daß dies an einer Strukturänderung des Integrins liegt^{[24.], [25.]}. Ausgelöst durch die Aktivierung von außen kommt die Konformationsänderung des Integrins letztendlich aus dem Zellinneren. Wie genau die Änderung aus dem Cytosol heraus gesteuert wird, ist bis heute nicht vollständig geklärt, allerdings wird eine Phosphorylierung des intrazellulären Integrinsegments oder eines weiteren assoziierten Proteins ebenso diskutiert, wie die Beteiligung von  n als Mediatoren^[19.].

Eine weitere Möglichkeit die Adhäsion von Zellen an  zu beeinflussen ist die Veränderung der Spezifität ihrer Integrine. Wie die Tabelle in Abb. 7 zeigt, binden Integrine häufig eine Vielzahl verschiedener ECM-Proteine. Allerdings ist nicht erwiesen, daß ein Integrin auf einer bestimmten Zellart immer alle potentiellen Liganden erkennen muß, sondern es scheint als könnten Integrine, abhängig von ihrem Umfeld ihre Spezifität steuern. Eine solche Steuerung kann  ebenfalls durch Lipide, als Modulatoren^[26.] oder verschiedene bivalente Kationen hervorgerufen werden.

Das „outside-in“-signaling leitet Reize von außerhalb der Zelle in ihren Innenraum. Die Reizweiterleitung ist dabei mit einer Konformationsänderung des Integrins verbunden, bei welcher das Signal durch eine scherenförmige Bewegung der beiden Stelzen des Integrins übertragen wird (s. Abb. 9).



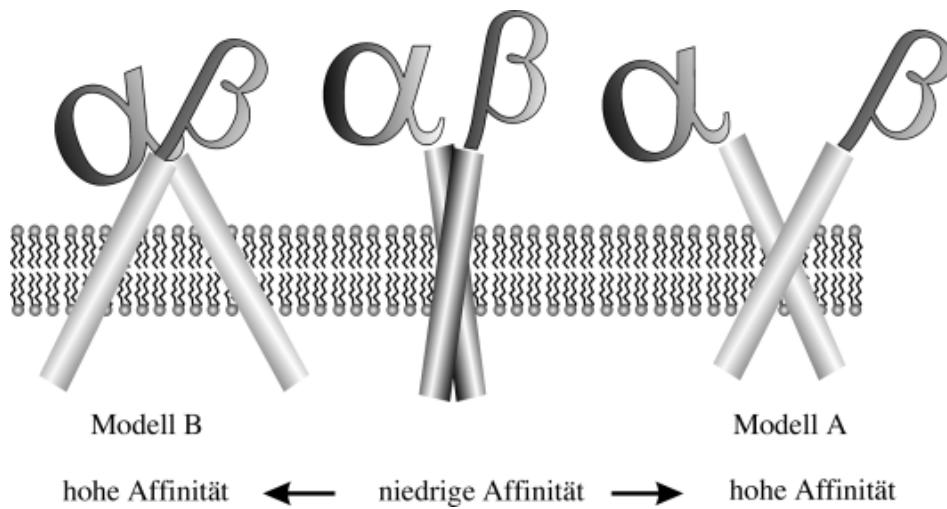


Abb. 9 Zwei Modelle der Signaltransduktion bei Integrinen: bei Modell A bleiben die transmembranen Teile der Integrin-Untereinheiten assoziiert, bei Modell B liegt das Gelenk der Schere hingegen im extrazellulären Bereich – die transmembranen Bereiche werden also getrennt.

Der gewöhnlich sehr kleine, etwa 50 Aminosäuren lange, intrazelluläre Teil der Integrine ist über verschiedene Proteine mit den Actinfilamenten des Cytoskeletts verknüpft^[27.]. Die Weiterleitung der Signale kann zum Beispiel über eine Phosphorylierung solcher Proteine erfolgen. Staatz et al. beschrieben erstmals 1989 eine solche Signalkaskade, welche nach Bindung von Collagen an den $\alpha_2\beta_1$ -Rezeptor eine Aktivierung verschiedener Phospholipasen und Proteinkinasen, sowie ein Anstieg des cytoplasmatischen pH-Werts und der Ca^{2+} -Ionenkonzentration nach sich zieht^[28.].

Die durch Integrine ausgelöste Alkalisierung des Cytoplasmas ist ein weiteres Beispiel, wie Sign[☒] innerhalb von Zellen übertragen werden können. Die Adhäsion von Fibroblasten, Endothel-Zellen und Lympho[☒] an Fibronectin erzeugt beispielsweise einen solchen pH-Anstieg im Cytosol und konnte mit einer parallelen Stimulation der Proliferation und des Wachstums korreliert werden^{[29.], [30.]}. Zumeist wirkt sich ein „outside-in“-signaling in der Veränderung der Zelladhäsion aus. Allerdings konnte auch eine nachfolgende Aktivierung der Proliferation von Lymphocyten, eine Veränderung in den sekretorischen Eigenschaften von Thrombocyten und eine Veränderung im Migrationsverhalten diverser maligner Tumorzellen gezeigt werden^[19.].



Ihre Funktion als Steuerelemente in der Zelladhäsion und Schnittstellen für eine zelluläre Signalweiterleitung machen Integrine zu wichtigen Faktoren bei Krebserkrankungen. Durch die Modulation der Adhäsion und einer Erleichterung der Migration und Invasion (siehe 5.4.1 und 5.6) können Tumorzellen durch ihr Profil an Integrinen nicht nur einen malignen Status erreichen, sondern Integrine sind als Modulatoren zahlreicher Signalkaskaden Verursacher eines tumorartigen Phänotyps. Es konnte gezeigt werden, daß, ausgelöst durch fehlerhafte Signaltransduktion und eine daran angeschlossene veränderte Genexpression, Integrine mitverantwortlich für ein unkontrolliertes Wachstum, die Umgehung der Apoptose und eine Neoangiogenese sind^[31.].

Die Abwesenheit des $\alpha_5\beta_1$ -Substrates Fibronectin in einer $\alpha_5\beta_1$ -positiven Variante des Colon Karzinoms HT29 halbierte beispielsweise die Wachstumsrate der Zellen, was auf ein Fehlen des Wiedereintritts in die S-Phase zurückzuführen war. Die fehlende Substratbindung an $\alpha_5\beta_1$ konnte in diesem Fall mit einer gesteigerten Transkription des Gens *gas-1*, welches innerhalb des Zellcyclus die G_0 -Phase einleitet, und einer Runx2-Regulation der wachstumsstimulierenden Gene *c-fos*, *c-jun* und *jun B* korreliert werden^{[32.], [33.]}. Desweiteren konnte die Überexpression der Integrine $\alpha_5\beta_1$ und $\alpha_v\beta_3$ auf verschiedenen Tumorzelllinien mit einem gesteigerten Wachstum und erhöhter Metastasenbildung in Verbindung gebracht werden. Eine Steigerung der Aggressivität von Melanomzellen wird dabei auf eine Steigerung der Migration^[35.] sowie die Assoziation des Integrins $\alpha_v\beta_3$ mit der Matrix-degradierenden Protease MMP-2^[34.] zurückgeführt.

Eine sehr wichtige Rolle in der Tumorentwicklung spielen die Integrine im Zusammenhang mit der Neubildung von Blutgefäßen. So geht die, durch Wachstumsfaktoren induzierte Expression des Integrins $\alpha_5\beta_1$ auf Endothelzellen beispielsweise mit einer Neubildung von Blutgefäßen einher. Die Neoangiogenese kann außerdem von Tumorzellen induziert werden, welche somit in der Lage sind den für lebenswichtigen Aufbau von Gefäßen zu steuern. Als Umkehrschluß dieser Beobachtung konnte mit einer antagonistischen Hemmung des $\alpha_v\beta_3$ -Rezeptors durch den Antikörper LM609 die Neoangiogenese gehemmt und das Tumorwachstum signifikant verringert werden^[35.].

4.2.3 Die Adhäsion an das Endothel – ein Zusammenspiel der Oberflächenmoleküle

Wie bereits erwähnt besitzen die meisten Zellen innerhalb des Körpers einen festgelegten Platz, welchen sie in der Regel nicht verlassen können ohne dadurch ihren programmierten Selbstmord (Anoikis) zu aktivieren. Eine Ausnahme hierbei bilden die weißen Blutkörperchen (Leukocyten), welche sich als Teile des körpereigenen Abwehrsystems frei durch den Organismus bewegen können. Auf ihrer Wanderung eliminieren sie mikrobielle Eindringlinge und schadhafte Gewebe und sorgen somit für die Unversehrtheit des gesamten Organismus.

Große Distanzen werden von Leukocyten über den Lymph- oder Blutstrom zurückgelegt, was schon aufgrund einer möglichst schnellen Mobilisierung des körpereigenen Abwehrsystems sinnvoll erscheint. Die festen Gewebestrukturen des Körpers müssen die weißen Blutkörperchen allerdings aus eigenem Antrieb durchdringen und durchwandern. Da die Leukocyten prinzipiell mit den gleichen Adhäsionsmolekülen ausgestattet sind, wie die adhären Zellen im Körper, kann man sich leicht vorstellen wie komplex der Ablöse- und Anheftungsprozeß der weißen Blutkörperchen auf molekularer Ebene ablaufen muß, um sie an ihren vorgesehenen Wirkungsort zu bringen.

Die Anheftung eines Leukocyten an das Endothel eines Blutgefäßes und seine anschließende Extravasation stellt einen gut erforschten dynamischen Prozeß dar, welcher das Zusammenspiel der verschiedenen Adhäsionsmoleküle eindrucksvoll widerspiegelt. Aufgrund seiner Bedeutung für sämtliche entzündliche Krankheiten sowie die Ausbreitung maligner Zellen in entfernte Regionen des Körpers soll die Anheftung zirkulierender Zellen an das Gefäßendothel an dieser Stelle beschrieben werden (s.Abb.10).

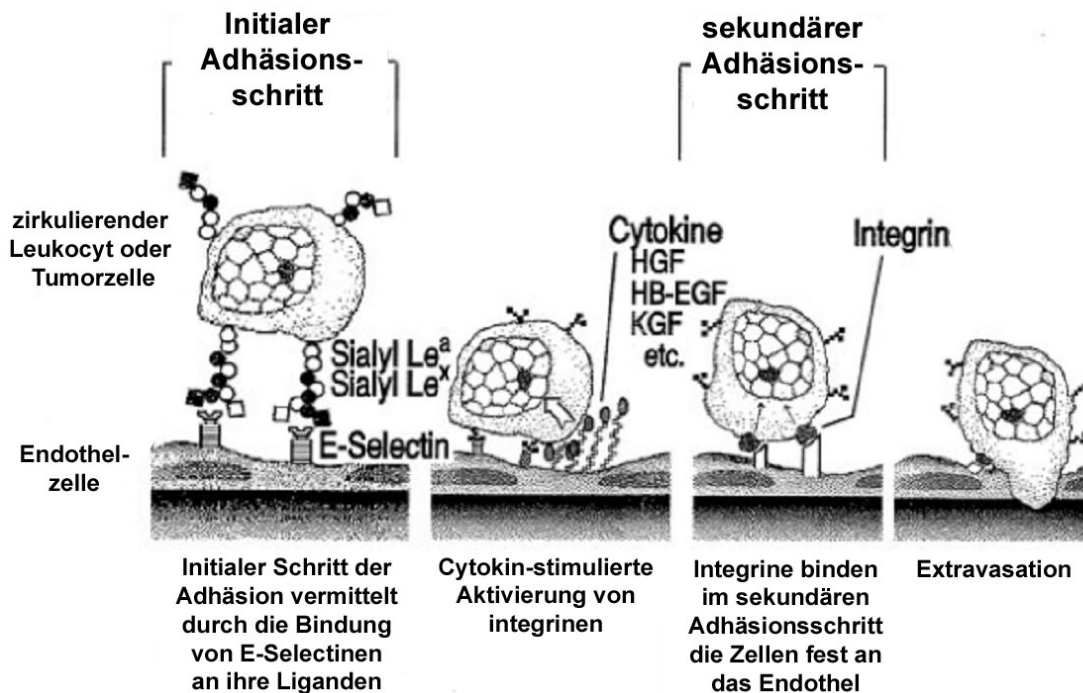


Abb. 10 Adhäsion einer Krebszellen an das Endothel einer Gefäßkapillare und Extravasation ins umliegende Gewebe (modifiziert nach^[9.])

Wie bereits in Abschnitt 5.2.1 beschrieben exprimieren verschiedene Arten von Tumorzellen an ihrer Oberfläche die Saccharidstrukturen sialyl Le^x oder sialyl Le^a. Endothelzellen tragen hingegen häufig E-Selectine als sLe^x/sLe^a erkennende Oberflächenrezeptoren. Das Erkennen und niedrig-affine Binden dieses Ligand-Rezeptor-Komplexes scheint sowohl in der Rekrutierung von Leukocyten als auch in der Metastasierung der initiale Schritt zur Adhäsion von Zellen an die Gefäßwände von Kapillaren zu sein^[9.]. Die angehefteten Zellen beginnen daraufhin abzuflachen und entlang der Gefäßwand zu rollen, wobei sowohl die Endothelzellen als auch die adhärenen Zellen, induziert durch verschiedene Cytokine ihre Integrinrezeptoren aktivieren. Die Ausbildung der Protein-Protein-Interaktion zwischen den Integrinen und ihren Liganden erzeugt eine wesentlich höhere Affinität der beiden Zellen zueinander als durch die bis dahin bestehende Kohlenhydrat-Protein-Bindung erzielt wurde. Während beispielsweise die Dissoziationskonstante für einen Lectin-Saccharid-Komplex bei ca. 1×10^{-6} M liegt, zerfällt der Integrin-Protein-Komplex lediglich mit 1×10^{-8} M^[103.], ^[104.]. Somit vermitteln die Integrine zum einen die Stabilität der adhärenen Zellen an das Endothel und aktivieren außerdem, wie im folgenden Kapitel

beschrieben, Matrix-degradierende Enzyme. Diese spalten bestehende Protein-Interaktionen zwischen den Endothelzellen und ermöglichen der migrierenden Zelle das Einwandern in das benachbarte Gewebe.

Es konnte gezeigt werden, daß sich der oben beschriebene Anheftungsprozeß migrierender Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beeinflussen läßt und zwar abhängig vom gewählten Inhibitor, in jedem seiner verschiedenen Schritte. Die initiale Anheftung von Tumorzellen an das Endothel läßt sich *in vitro* durch die Inkubation beider Zellarten mit Antikörpern gegen E-Selectine oder Saccaridstrukturen ebenso unterdrücken^[9.], wie die sekundäre Adhäsion durch Inkubation mit Integrinantikörpern oder peptidischen Strukturen^[35.]. *In vivo* führt eine Inkubation von Tumorzellen mit peptidischen Inhibitoren zu einer signifikanten Reduzierung von Lungenmetastasen im B16-Maus-Model^[36.]. In diesem Model werde stark metastasierende Melanomzellen aus der Maus nach Inkubation mit einem Inhibitor wieder in die Schwanzvene einer Maus injiziert, wo sie sich als Metastasen in der Lunge wieder ansiedeln.

Die gut erforschten Zusammenhänge des Anheftungsprozesses, machen ihn zu einem guten Target einer antimetastatischen Krebstherapie und die Testung des $\alpha_v\beta_3$ -Antikörpers LM609 in der klinischen Phase beweist die Richtigkeit des therapeutischen Ansatzes^[37.].

4.3 Die extrazelluläre Matrix

Die einzelnen Zellen eines vielzelligen Organismus sind von einer protein- und saccharidhaltigen Schicht umgeben, die als extrazelluläre Matrix (ECM) bezeichnet wird. Sie bildet sozusagen den Kitt zwischen den einzelnen Zellen und verleiht dem Organismus durch ihre Struktur sowohl Festigkeit als auch Elastizität (s. Abb. 12).

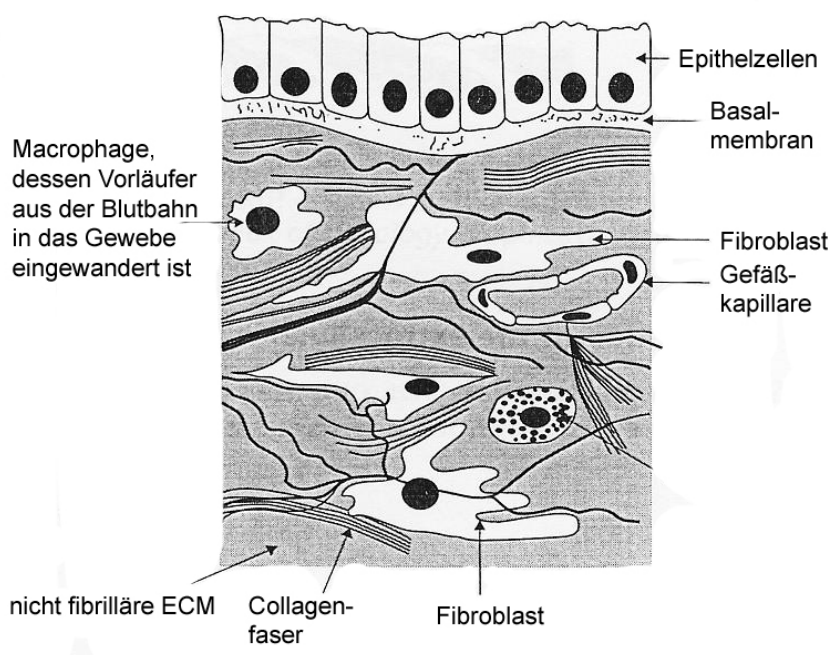




Abb. 11 Die extrazelluläre Matrix^[38.]

Die Matrix erfüllt viele lebenswichtige Funktionen im extrazellulären Raum, die mit der Differenzierung und Organentwicklung zu tun haben^[38.]. Zu den Bestandteilen der ECM werden heute definitionsgemäß all diejenigen Moleküle gerechnet, die von Zellen in den extrazellulären Raum sezerniert und dort immobilisiert werden. Im allgemeinen setzt sich die Matrix aus verschiedenen  fibrillären Glycoproteinen und Proteoglycanen zusammen, die durch wechselseitige Interaktionen zu einem dichten Netzwerk verbunden sind. Die Bestandteile dieses Netzwerkes beinhalten Liganden, die Signalkaskaden in benachbarten Zellen aktiv  können, und regulierende Eigenschaften für die Zellproliferation und das Überleben der Zellen besitzen. Desweiteren kann das Molekülgeflecht der ECM mit löslichen Faktoren, wie z.B. Cytokinen, interagieren, die ebenfalls lebenswichtige Signalkaskaden in Zellen auslösen.

Wollen sich Tumorzellen oder Leukocyten innerhalb des Körpers frei bewegen, müssen sie aktiv Bindungen zwischen ihrer Oberfläche und der ECM lösen und neu knüpfen. Da Matrixkomponenten bei der Ausbreitung von Krebs und entzündlichen Prozessen eine bedeutende Rolle zukommt, sollen im folgenden einige der Bestandteile detailliert beschrieben werden.

Fibronectin

Fibronectin ist ein aus zwei ähnlichen, wenn auch nicht vollständig identischen Monomeren bestehendes Glycoprotein, dessen Ketten in der Nähe des C-terminalen Endes über zwei Disulfid-Brücken miteinander verknüpft sind. Beide Monomere beinhalten als Bindungsmotive die von vielen Integrinen erkannte RGD-Sequenz (s. Tab. 1) und das für das Integrin $\alpha_4\beta_1$ spezifische Pentapeptid EILDV. Desweiteren ist für Fibronectin eine lectinartige Bindungsaktivität beschrieben, die das Protein mit Heparin und anderen Komponenten der ECM vernetzt. Es kommt sowohl in löslicher, als auch in immobilisierter Form im extrazellulären Raum vor und kann eine Bindung von Zellen an die ECM genauso vermitteln, wie eine Zell-Zell-Interaktion. Wie anhand von Versuchen mit Knock-out Mäusen gezeigt wurde, ist die Bindung von Zellen an Fibronectin lebensnotwendig und Fibronectin-negative Tiere sterben bereits innerhalb der ersten Tage nach der einsetzenden Embryoentwicklung^[38.].

Fibrinogen

Fibrinogen ist aus drei nicht identischen Untereinheiten zusammengesetzt, welche als α , β und λ bezeichnet werden und sich wie ein dreisträngiges Seil umwinden. Insgesamt hat Fibrinogen ein Molekulargewicht von 340 kDa, wird im menschlichen Körper ausschließlich von Hepatocyten synthetisiert und kommt hauptsächlich im Blut vor. Fibrinogen hat eine wichtige Funktion in der Blutstillung und Wundheilung, denn nach Aktivierung durch die Serinprotease α -Thrombin und die Transglutaminase Faktor XIII können Fibrinogen-Moleküle zu einem dichten Fibringerüst polymerisieren, welches nun die Wunde verschließt und die Wundheilung einleitet^[39.]

Als Ligand wird die RGD-Sequenz im Fibrinogen außer vom Blutplättchen-spezifischen Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ noch vom Integrin $\alpha_v\beta_3$ erkannt, welches auf Melanomzellen häufig überexprimiert ist (vergleiche 5.5.2).

Vitronectin

Das insbesondere im Blutplasma und in der ECM vorkommende 75 kDa große Glycoprotein besitzt neben dem Integrin-spezifischen RGD-Bindungsmotiv mehrere Bindungsstellen, die es mit Komponenten der ECM verknüpfen^[40.]. So bindet es z.B. an

Glycosaminoglycane, Heparin, Collagen und Plasminogen. Obwohl es auch häufig als $\alpha_v\beta_3$ -Ligand bezeichnet wird, kann es ebenso von den Integrinen $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_v\beta_6$ und $\alpha_v\beta_8$ erkannt und gebunden werden. Es konnte in hohen Konzentrationen in Tumorgeweben nachgewiesen werden und seit der Entdeckung, daß Vitronectin das matrixdegradierende Enzym MMP-2 aktiviert^[41.] wird ihm eine bedeutende Rolle in der Ausbreitung von Tumorzellen zugesprochen.

Laminin

Eine weitere große Gruppe von Glycoproteinen der ECM bilden die Laminine, welche aus α -, β - und γ -Untereinheiten aufgebaut sind und aufgrund ihrer spezifischen Zusammensetzung aus diesen drei Ketten, verschiedene Moleküle bilden. Ihre Masse variiert zwischen 150 und 400 kDa und sie sind ein wichtiger Bestandteil der Basalmembran, einer Proteinschicht an welche Epithel-, Nerven- und Muskelzellen adhäreren (s. Abb. 11). Die Zell-Bindung erfolgt über RGD-erkennende Integrine und die Vernetzung innerhalb der ECM erfolgt über eine Bindung an das Proteoglycan Perlecan und Typ IV Collagen^[38.].

Glycosaminoglycane (GAG) und Proteoglycane

Neben den Glycoproteinen, welche häufig über eine verzweigte Saccharidstruktur verfügen, kommen auch Proteine mit langgestreckten Zuckerketten, welche als Polymerer einer spezifischen Disacchariduntereinheit aufgebaut sind (siehe Abb. 12), im extrazellulären Raum vor. Diese Proteine werden als Proteoglycane bezeichnet, während man ihre kovalent gebundenen Zuckerketten Glycosaminoglycane nennt. Man unterscheidet heute vier Gruppen von GAGs, welche sich prinzipiell im Aufbau ihrer Disacchariduntereinheit voneinander unterscheiden.

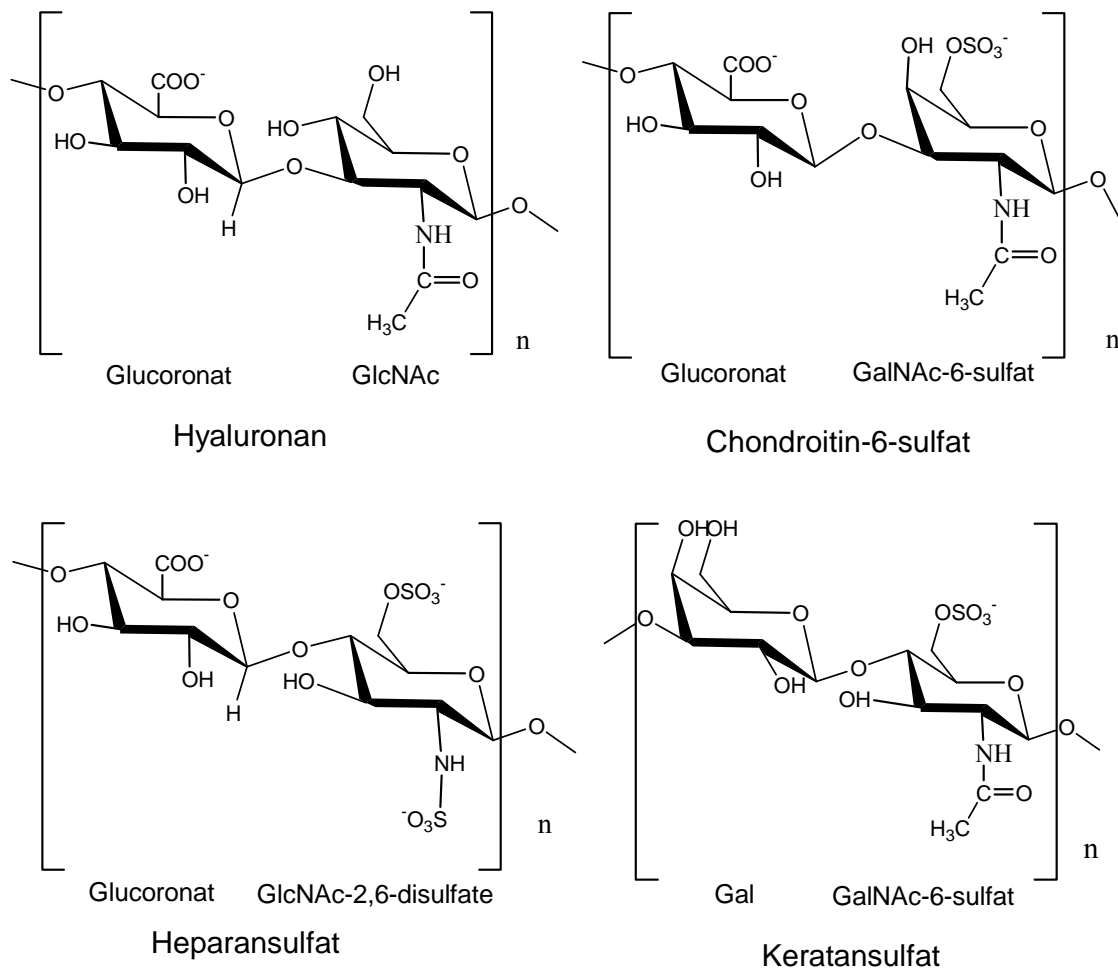


Abb. 12 Die vier Untergruppen der Glycosaminoglycane

Hyaluronan stellt unter den GAGs eine Ausnahme dar, denn es ist das einzige Polysaccharid, welches nicht an ein Proteinrückgrat gebunden ist. Es kann Ketten aus bis zu 25000 Disacchariduntereinheiten bilden, welche durch die Glucuronsäure negative Ladungen tragen. Aufgrund der hohen Kapazität Wasser zu binden bildet Hyaluronan im Körper eine geleeartige Masse, die zum einen als Füllsubstanz und zum anderen als Bindungspartner für membrangebundene Rezeptoren dient.

Die übrigen GAGs haben alle die gemeinsame Eigenschaft über das Tetrasaccharid $\text{GlcA}(\beta 3 \rightarrow 1)\text{Gal}(\beta 3 \rightarrow 1)\text{Gal}(\beta 4 \rightarrow 1)\text{Xyl}$ an eine Proteinkette gebunden zu sein und werden als Proteoglycane bezeichnet. Mit Ausnahme des Keratansulfates, welches stattdessen eine Galactose beinhaltet, bestehen alle GAGs aus einer Uronsäure und einem teilweise sulfatierten Aminozucker (siehe Abb. 12). Alle Proteoglycane werden intrazellulär synthetisiert, wobei zunächst die tetrasaccharidische Grundstruktur

o-glycosidisch über einen Serinrest mit dem Proteinerückgrat verknüpft wird, bevor die verschiedenen Zuckerbausteine über Glycosyltransferasen angeknüpft werden. Den letzten Schritt der Biosynthese stellt die Sulfatierung dar, nach welcher die Moleküle, in Vesikel verpackt, an die Zelloberfläche transportiert und in den extrazellulären Raum sezerniert werden. Manche Proteoglycane, wie z.B. Syndecan-1 sind über eine transmembrane Einheit in der Plasmamembran verankert und können neben einer Bindung von Wachstumsfaktoren auch die Zelladhäsion mit der ECM vermitteln. Als polyanionische Moleküle bilden GAGs desweiteren Ladungsbarrieren im extrazellulären Raum und beeinflussen auf diese Weise den allgemeinen Stofftransport innerhalb der ECM.

4.4 Matrix-degradierende Enzyme

Der Abbau der ECM durch Matrix-degradierende Enzyme und die anschließende Migration von Zellen kommt sowohl in physiologischen als auch in pathologischen Prozessen vor. Während der Embryogenese und Wundheilung kann eine erhöhte Aktivität von Proteasen und Glycosidasen ebenso festgestellt werden wie während der Tumormetastasierung^[42.]. Für den Abbau der extrazellulären Saccharidstrukturen sezernieren migrierende Zellen insbesondere Hyaluronidase und Heparanase, während zum Abbau der proteinhaltigen Moleküle sogenannte Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sowie Aspartyl-, Cystein- oder Serinproteinasen verwendet werden. MMPs weisen das größte Substratspektrum, welches hauptsächlich aus ECM-Proteinen besteht auf und sind in beinahe allen tierischen und menschlichen Tumoren, sowie deren isolierten Zelllinien überexprimiert^[43.]. Neben ihrer offensichtlichen Bedeutung in der Ausbreitung von Tumoren weiß man heute, daß MMPs durch ihre proteolytische Aktivität auch Einfluß auf das Zellwachstum, die Differenzierung, die Apoptose und die Neoangiogenese haben. Daher folgt hier ein Überblick über ihren Aufbau, ihr Struktur, sowie ihre Rolle bei Krebserkrankungen.



4.4.1 Matrix-Metalloproteinasen

Als Matrix-Metalloproteinasen wird eine, aktuell 24 Mitglieder zählende, Familie von zinkabhängigen Proteasen bezeichnet. Sie werden als enzymatisch nicht aktive Pro-Formen (Zymogene) an die Zelloberfläche transportiert. Je nach Art der MMP kommen sie extrazellulär als membrangebundene (MT-MMP) oder freie Enzyme vor und verrichten, nach Aktivierung durch Abspaltung eines kleinen Proteinsegments, ihre proteolytische Arbeit stets in Nähe der zellulären Plasmamembran. Freie MMPs werden häufig von anderen Oberflächenproteinen, wie z.B. Integrinen an der Zelloberfläche fixiert und bilden dort polymolekulare Proteinkomplexe, die unter anderem zur Regulierung der MMPs dienen. Als Beispiel für die Funktionsweise eines solchen Proteinkomplexes soll im folgenden die Aktivierung der Matrix-Metalloproteinase-2 (MMP-2 oder auch Gelatinase A) beschrieben werden (siehe Abb. 13).

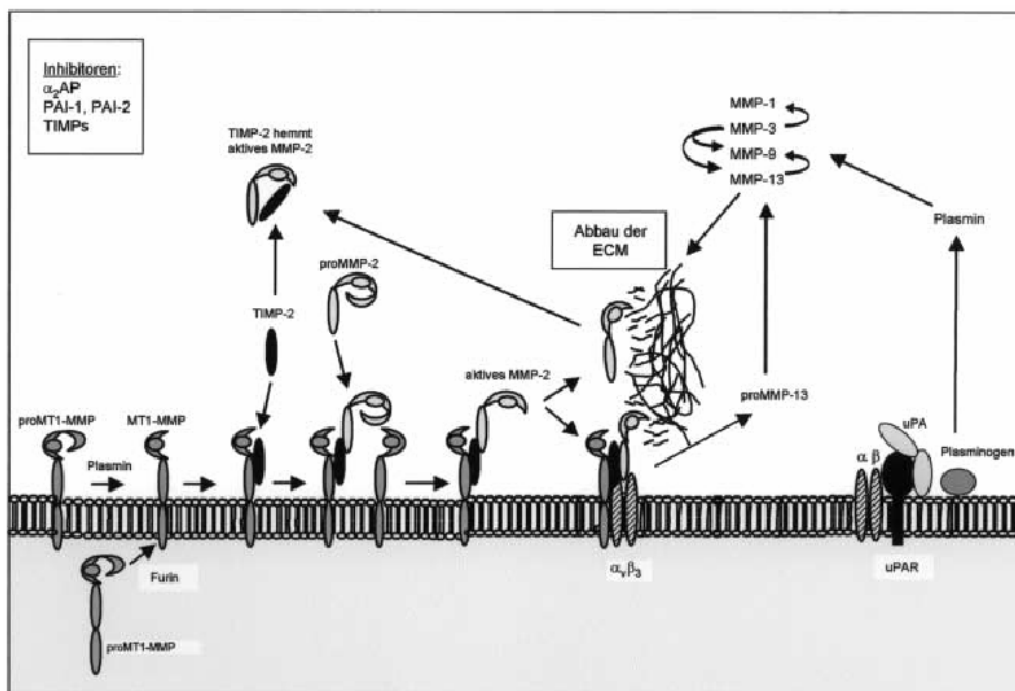


Abb. 13 Regulation der Aktivität von MMP-2 (modifiziert nach Hofmann, U.B.^[42.])

Zunächst wird membrangebundenes pro-MT1-MMP durch die Abspaltung eines kleinen Proteinsegments entweder intrazellulär durch Furin, oder extrazellulär durch Plasmin aktiviert. MT1-MMP bindet daraufhin den „tissue inhibitor of metalloproteinase 2“ (TIMP-2), welcher eine Bindungsdomäne für die inaktive MMP-2 Pro-Form besitzt. Unter Mithilfe eines weiteren MT1-MMP-Moleküls kann gebundenes

Pro-MMP-2 nun durch Abspaltung eines N-terminalen 10 kDA Fragments in proteolytisch aktives MMP-2 überführt werden^[44.], ^[45.]. Aktives MMP-2 kann entweder innerhalb des Komplexes gebunden bleiben, in den extrazellulären Raum abgegeben werden, oder durch weitere membranständige Proteine, wie das Integrin $\alpha_v\beta_3$ auf der Zelloberfläche fixiert werden^[46.]. Hier vermittelt es den direkten Abbau der ECM oder die proteolytische Spaltung weiterer Substrate, wie z.B. Wachstumsfaktoren, Cadherine oder pro-MMP-2. Die Bindung des MMP-2 Zymogens an einen solchen MMP-2 beinhaltenden Proteinkomplex führt somit zu einer Aktivierung des Enzyms^[47.].

Die Aktivität von MMPs wird von spezifischen Gewebeinhibitoren reguliert, welche als TIMP-1 bis -4 bezeichnet werden. Zwar hemmen stöchiometrisch gebundene TIMPs die proteolytische Aktivität von MMPs reversibel^[48.] jedoch scheint letztendlich das Verhältnis zwischen MMP und ungebundenen TIMPs für die resultierende Aktivität der Proteinase verantwortlich zu sein. So bewirken hohe Konzentrationen an TIMP-2 zwar eine Inhibition von MMP-2, niedere Konzentrationen bilden hingegen, wie oben beschrieben, einen Komplex mit MT1-MMP und pro-MMP-2, welcher zur Aktivierung der Matrix Metalloproteinase führt^[42.].

Wie bereits erwähnt exprimieren beinahe alle Tumoren und Tumor-Zelllinien MMPs, wobei innerhalb solider Tumoren auch Stromazellen in die Synthese der Proteinasen involviert sind. Klinische Daten bekräftigen die Korrelation zwischen gesteigerter MMP-Aktivität und einem erhöhten metastatischen Potential maligner Tumoren. Wegen der großen Bandbreite an MMP-Substraten, welche über ECM-Proteine, Wachstumsfaktoren und Chemokine hin zu diversen Adhäsionsmolekülen, wie z.B. Integrinen und E-Cadherinen reicht, wird heute davon ausgegangen, daß MMPs in der Krebsentwicklung eine weit größere Rolle zukommt als bisher angenommen. Ging man früher davon aus, daß die Enzyme durch ihre Matrix-degradierende Funktion insbesondere die Migration und Invasion von Tumorzellen erleichtern ist heute ihr Einfluß auf beinahe jeden essentiellen Schritt der Krebsentstehung nachgewiesen^[47.]. Da viele MMP-Substrate eine Funktion als Bestandteil wichtiger zellregulatorischer Signalkaskaden haben, bewirkt ihr proteolytischer Abbau eine Veränderung in der Information des ursprünglichen Signals. Dies kann sich im Zusammenhang mit Krebs sowohl in einer Stimulation als auch in einer Inhibition krebsfördernder Prozesse auswirken. Einige Beispiele hierfür sind das unkontrollierte Wachstum, die Umgehung



der Apoptose, das Erlangen maligner Eigenschaften und die Induktion der Neoangiogenese durch Krebszellen (siehe Abb. 14).

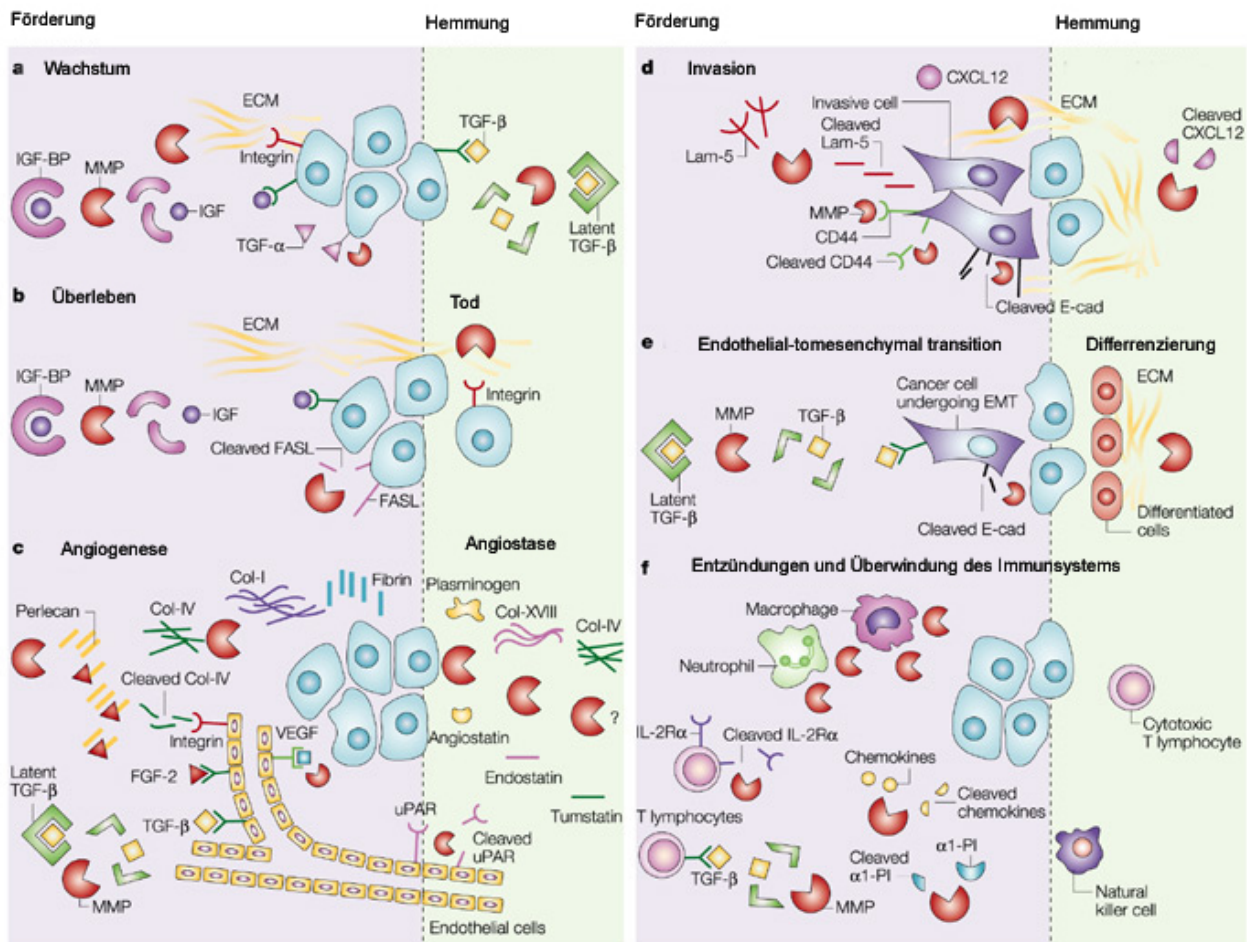


Abb. 14 Funktionen von MMPs in der Entwicklung von Krebs; MMPs können die Krebsentstehung sowohl stimulieren als auch inhibieren a: MMPs fördern das Wachstum von Tumorzellen durch die Spaltung des „insulin-growth-factor-binding protein (IGF-BP) und die daraus resultierende Freisetzung von IGF. Sowohl die Freisetzung transmembraner Vorstufen von Wachstumsfaktoren (z.B. TGF- α = „transforming growth-factor- α “) als auch die Regulation der Zell-ECM-Bindung über Integrine stimulieren das Zellwachstum. MMPs hemmen das Wachstum durch die Freisetzung des TGF- β aus seiner inaktiven Vorstufe. b: MMPs unterstützen das Überleben von Tumorzellen durch Freisetzung von IGF und der proteolytischen Spaltung von FASL, einem Liganden des FAS-„death-receptors“. Durch den Abbau der ECM und der damit verbundenen Ablösung von Zellen kann die Apoptose (Anoikis) eingeleitet werden. c: MMPs fördern die Neoangiogenese durch Erhöhung der Bioverfügbarkeit von pro-angiogenen Wachstumsfaktoren wie VEGF (vascular endothelial growth factor), FGF-2 (fibroblast growth-factor 2) oder TGF- β . Zusätzlich fördern MMPs die Invasion von endothelialen Zellen durch die Lyse von ECM-Bestandteilen wie Collagen Typ 1 (Col-I), Collagen Typ 4 (Col-IV) und Fibrin. Antiangiogen wirken MMPs indem sie Plasminogen und Col-XVIII spalten,

was zur Freisetzung der anti-angiogenen Faktoren Angiostatin und Endostatin führt. Da sie die Invasion endothelialer Zellen hemmt, hat die Spaltung des „urokinase-type plasminogen activator receptors“ (uPAR) auf der Oberfläche von Endothelzellen ebenfalls angiostatische Eigenschaften. d: Der Abbau vieler ECM-Proteine (z.B Laminin-5) durch MMPs erleichtert die Invasion. Neben den ECM-Proteinen können auch Adhäsionsmoleküle, wie CD44 und E-Cadherine gespalten werden. Ein Abbau des Chemokins CXCL-12, das die Ausbreitung von Brustkrebs fördert, kann zu anti-metastatischen Eigenschaften der MMPs führen. e: MMPs fördern den Übergang von endothelialen zu mesenchymalen Eigenschaften (epithelial-to-mesenchymal transition, EMT) durch Freisetzung von TGF- β und Spaltung von E-Cadherinen. Diese Veränderung ist mit der Zunahme maligner Eigenschaften verbunden. MMPs scheinen über einen bisher unbekanntem Mechanismus auch die Differenzierung von Tumorzellen zu fördern. f: Akute Entzündungen erzeugen für die Krebsentstehung wichtige MMPs und unterdrücken zusätzlich immunologische Reaktionen, indem sie die Proliferation von T-Lymphocyten durch Spaltung des Interleukin-2 Rezeptors- α (IL-2R α) unterdrücken. Außerdem setzen sie TGF- β , einen wichtigen Inhibitor für T-Zellen frei. MMPs spalten den α 1-Proteinase-Inhibitor (α 1-PI), was die Empfindlichkeit von Tumorzellen gegenüber „natural killer cells“ herabsetzt und Chemokine der CC und CXC Familie, die als Lockstoffe für Leukocyten dienen, was zu einer Überwindung des Immunsystems führt. (modifiziert nach Egeblad M. und Werb Z.[47.]).

Der therapeutische Einsatz effektiver MMP-Inhibitoren ist schwierig, da sie nicht nur die Entwicklung und Ausbreitung von Krebs hemmen, sondern auch das Gegenteil bewirken können.

4.5 Das Melanome



Melanome sind Entartungen von Melanocyten, pigmentierten Zellen, die die Fähigkeit besitzen den Farbstoff Melanin zu bilden. Die Pigmentierung der Zellen durch die Melaninsynthese ist kein konstitutiver Prozeß sondern hängt von ihrem Entwicklungsstand und stimulatorisch wirkenden Faktoren, wie z.B. der UV-Einstrahlung ab. Innerhalb ihrer Entwicklung wandern die Vorstufen der Melanocyten vom Neuralrohr in die Basal-Membran der Epidermis, die Haarwurzeln, die Aderhaut des Auges, verschiedene Schleimhäute und die Hirnhaut. Als ausdifferenzierte Zellen bilden sie eine Tyrosinaseaktivität aus, durch welche sie, von Tyrosin als Vorstufe ausgehend, Melanin synthetisieren, welches sie über Melanosomen zu benachbarten Keratinocyten transportieren können^[20.].

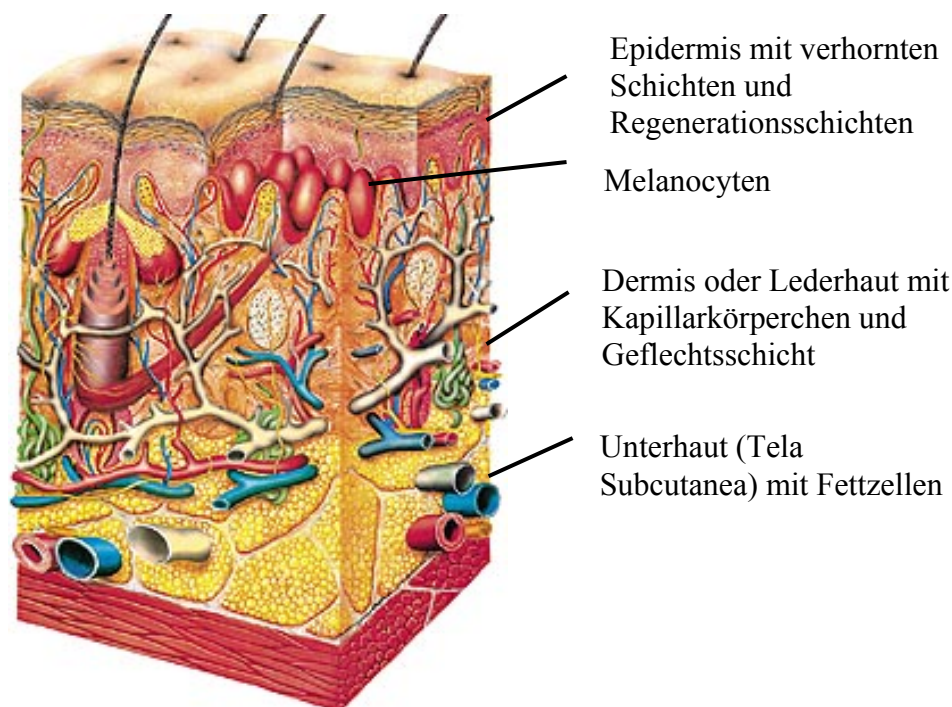



Abb. 15 Anatomie der Haut

Die Entwicklung maligner epidermaler Melanome ist ein mehrstufiger Prozeß, welcher von Muttermalen ausgeht. Diese sogenannten Nävi sind gutartig wachsende Zusammenschlüsse mikroskopisch normaler Melanocyten, die sich in der Haut zwischen Epidermis und Dermis befinden (siehe Abb. 15). Der Ausdruck „dysplastic nevus“ bezeichnet die nächste Stufe der Melanomentwicklung und ist als „Muttermal mit anatomischen Störungen“ definiert^[49.], welche sich durch ausgefranste Ränder, eine ungewöhnliche Färbung und einen Durchmesser von mindestens 5 mm auszeichnen. Sie sind innerhalb der Dermis häufig von Lymphocyten umgeben. Die „radial growth phase“ (RGP) stellt die nächste Stufe der Melanomentwicklung dar. Die entarteten Melanocyten weisen in dieser Phase eine Ähnlichkeit zu großen Epithelzellen auf und besitzen hyperchromatische Kerne. Ihre Nävi haben häufig Durchmesser von mehr als 10 mm. Mitotische Zellen können  dieser Phase nur in epidermalen Bereichen beobachtet werden und der so entstehende Tumor zeigt kein metastatisches Potential. Zwar wandern Zellen in den Bereich der Dermis vor, jedoch können sie nicht in das Gefäßsystem vordringen und Fernmetastasen bilden. Diese frühe Vorstufe der malignen Melanome kann in aller Regel leicht chirurgisch entfernt und damit geheilt werden. Im Gegensatz zu RG-Phase Melanomen haben Melanome der sogenannten „vertical

growth phase“ (VGP) das Potential erlangt sich auch innerhalb der Dermis auszubreiten und die Gefäßbarriere zum Blut- oder Lymphkreislauf zu überwinden und somit Metastasen zu bilden. Über die Bestimmung verschiedener Parameter ist es gelungen für Patienten mit VGP-Melanomen eine mit einer Wahrscheinlichkeit von 90 % gültige acht-jährigen Überlebensprognose aufzustellen^[50.]. Zu diesen Parametern gehören 1) die Wachstumsrate, 2) die Tumordicke, 3) die Anwesenheit von Tumorf infiltrierenden Lymphocyten, 4) der Entstehungsort des Primärtumors (Thorax oder Gliedmaßen), 5) das Geschlecht und 6) eine Regression des Tumors. Die durchschnittliche Überlebenschance von Patienten mit VGP-Melanomen liegt bei 71%^[20.]. Die letzte Stufe der Tumorentwicklung stellen die Metastasen dar, welche sich über das Blut-oder Lymphsystem ausbreiten und bevorzugt Lunge, Leber oder das Gehirn befallen. Melanom-Metastasen konnten jedoch bislang in beinahe jedem Gewebe des menschlichen Körpers beobachtet werden und sind schlecht therapierbar.

4.5.1 Epidemiologie der Melanome

Während der letzten Jahrzehnte ist die Zahl maligner Melanome weltweit drastisch angestiegen und die jährliche Zuwachsrate liegt bei hell-häutigen Menschen zwischen 3 und 7 %^[60.]. Die jährlichen Neuerkrankungen liegen, zwischen 40 Neuerkrankungen pro 100000 Einwohnern in Australien und weniger als fünf Neuerkrankungen pro 100000 Einwohnern in Skandinavien. Generell ist eine weit geringere Zahl an Neuerkrankungen bei Menschen mit dunkler Hautfarbe feststellbar, genauso wie bei Menschen, die in Regionen mit geringer Sonneneinstrahlung leben. In Australien und Neuseeland hat sich das maligne Melanom inzwischen zur vierthäufigsten Krebserkrankung entwickelt, während in Ländern des nördlichen Europa eine weit geringere Rolle spielt.

Die Zahl der auf Melanome zurückzuführenden Todesfälle steigt allerdings in weit geringeren Maße als die Anzahl der Neuerkrankungen. Sie liegen zwischen einem und drei von 100000 Todesfällen bei Bewohnern der nördlichen Hemisphäre und ungefähr zehn von 100000 Todesfällen bei Bewohner der südlichen Erdregionen. Zurückzuführen ist der Unterschied zwischen Neuerkrankungen und Sterblichkeit auf weitreichende Aufklärungskampagnen während der letzten Jahrzehnte, sowie die gute Diagnostizierbarkeit und relativ einfache operative Entfernung von Melanomen.

Heute werden ca. 5-10 % aller Melanomerkrankungen auf erbliche Faktoren zurückgeführt, wobei in diesem Zusammenhang insbesondere Veränderungen der Chromosomen 1,6,7,9 und 10 beobachtet wurden^[20.]. Ein erblich bedingtes Risiko ist die Anzahl an gefärbten Muttermalen, die als sehr frühe Tumorstufen angesehen werden. Das wichtigste Umweltcarcinogen für die Induktion von Melanomen ist das Sonnenlicht, wobei ein unterschiedlicher Einfluß von langwelliger UVA-Strahlung (320-400 nm) und kurzwelliger UVB-Strahlung (290-320) für den Menschen nicht nachgewiesen werden konnte^[61.]. Es gibt Vermutungen, wonach das Risiko an Melanomen zu erkranken in Gebieten mit vermindertem Schutz durch die Ozonschicht größer ist als in Gebieten mit intakter Ozonschicht. Da in diesen Regionen aber zusätzliche Parameter wie längere Sonnenzeiten, höhere Temperaturen und durchschnittlich längere Aufenthaltszeiten in der Sonne in eine Risikoabschätzung einbezogen werden müssen, bleibt ein direkter Zusammenhang zwischen dem Ozonloch und einem erhöhten Melanomrisiko fraglich. Letztendlich entscheidet wohl die Summe molekulargenetischer und umwelttoxikologischer Einflüsse, wie groß das individuelle Risiko ist an malignen Melanomen zu erkranken.

4.5.2 Biologie der Melanome

Das Expressionsmuster vieler Adhäsionsmoleküle an der Oberfläche von Melanomzellen verändert sich während der einzelnen Entwicklungsstufen^[51.] (siehe Abb. 16).



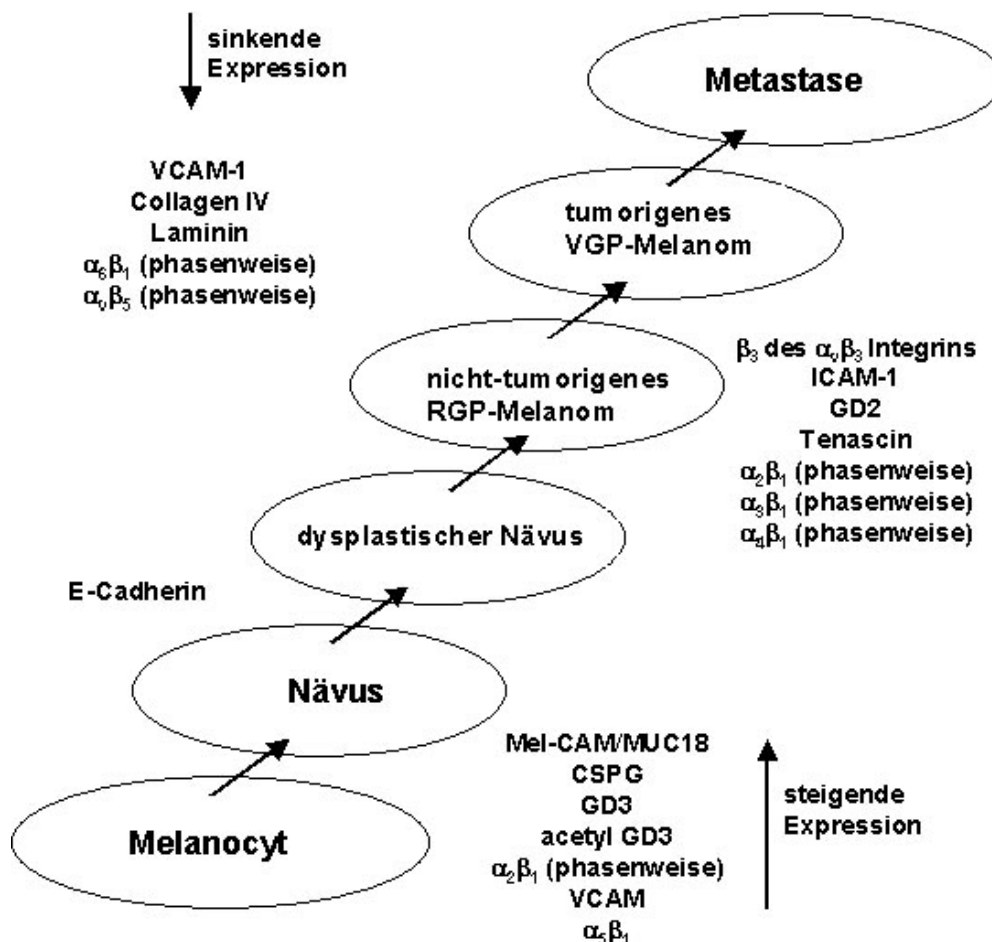


Abb. 16 Entwicklung von malignen Melanomen und Expression von Adhäsionsmolekülen während der einzelnen Entwicklungsstufen (modifiziert nach Nesbit M. und Herlyn M^[51.].)

Ein normaler Melanocyt in der Basalmembran hat über dendritische Strukturen engen Kontakt zu etwa 25-30 Keratinocyten, eine Eigenschaft, welche Melanome nicht mehr aufweisen. Dieser Verlust des Zell-Zell-Kontaktes geht auf einen drastischen Verlust der E-Cadherin-Expression zurück und kann als früher Marker einer entstehenden Tumorprogression gewertet werden^[52.]. Auch das Expressionsmuster der Integrine und damit die Bindung an verschiedene Liganden der ECM wechselt im Laufe der Melanomentwicklung; während manche Integrine in ihrer Expression vom benignen zum malignen Zellstatus nach unten reguliert werden, werden andere Integrine im Laufe dieses Prozesses aktiviert. Beim Vergleich von primären RGP-Melanomen mit metastasierenden VGP-Melanomen wurde beispielsweise ein signifikanter Anstieg des Integrins $\alpha_4\beta_1$ beobachtet, der mit einem steigenden Metastasierungspotential der Zellen korrelierte. Hingegen konnte auf den gleichen Zellen ein deutlicher Rückgang an $\alpha_6\beta_1$ -

Molekülen beobachtet werden^[53.]. Die Menge des Vitronectin-Rezeptors $\alpha_v\beta_3$ auf Melanomzellen korreliert mit ihrem Potential Tumoren in athymischen Nacktmäusen zu bilden^[54.], während metastasierende Melanome, deren Expression der α_v -Untereinheit unterdrückt wurde ihre metastasierenden Eigenschaften verlieren^[55.].

Die Entwicklung maligner Melanome geht also mit einer gut beschriebenen Veränderung ihrer Oberflächenstruktur einher, und da Melanome leicht zugängliche Tumoren bilden, die sich zude[☰]noch einfach *in vitro* kultivieren lassen sind sie ein ideales Model zur Testung antimetastatischer Therapeutika. Daher soll im folgenden kurz a[☰]ie gewählten Zellkultur-Modelle eingegangen werden.



Die Maus-Melanome B16F1 und B16F10

Die Zelllinien B16F1 und B16F10 stammen beide aus einer Serie der sogenannten B16-Maus-Melanome. I.J. Fidler selektierte die elterliche B16-Zelllinie aufgrund ihrer Eigenschaft mit zunehmender Zahl an *in vitro* Passagen mehr Lungenmetastasen in C57BL/6-Mäusen zu bilden^[56.]. Hierzu injizierte er die *in vitro* gewachsenen Zellen in die Schwanzvene eines Versuchstiers und nahm die Zellen der resultierenden Lungentumoren wieder in Kultur. Nach etlichen selektiven Durchläufen erhielt er so die schwach metastasierende Zelllinie B16F1 sowie die stark metastasierende Linie B16F10. Das entstandene *in vit*[☰]Model etablierte sich in den folgenden Jahren und bietet aufgrund seiner direkten Vergleichsmöglichkeiten zwischen stark und schwach metastasierenden Zellen ein ideales Werkzeug zur Erforschung molekularbiologischer Grundlagen der Metastasierung. Es findet desweiteren Anwendung in der Untersuchung anti-metastatischer Therapeutika, da sich *in vitro* erzielte Ergebnisse durch den oben beschriebenen Tierversuch einfach auf ein *in vivo* Model übertragen lassen.

Neben den unterschiedlichen metastasierenden Eigenschaften der beiden Zelllinien konnten im Laufe der Zeit einige phenomenologisch und molekularbiologisch interessante Eigenarten festgestellt werden, die im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit wichtig erscheinen: Anhand einer weiteren Selektion der Zelllinie B16F10 durch Ablösen mit EDTA wurde festgestellt, daß Zellen, welche *in vitro* ein stärkeres Anheften an ihr Kulturgefäß aufweisen auch vermehrt Lungenmetastasen bilden^[57.].



Eigene Beobachtungen zeigen das auch für beiden Linien B16F10 und B16F1, wobei B16F10-Zellen eine starke Adhäsion an ihre Kulturflasche aufweisen.

Innerhalb großer *in vivo*-Studien konnte beobachtet werden, daß B16F1-Zellen zwar ein vermindertes Potential besitzen Lungenmetastasen zu bilden, dafür aber in extrapulmonare Organe, wie die Leber, Lymphknoten und Eierstöcke metastasieren^[58.]. Vergleiche der zellulären Oberfläche stark und schwach metastasierender Zellen ergaben allerdings weder für Proteine noch für Glycokonjugate einen qualitativen Unterschied, der mit dem gesteigerten Metastasierungspotential zu korrelieren war^[58.]. Quantitative Differenzen in der Menge einzelner Adhäsionsmoleküle zwischen beiden Zelllinien wurden bis heute nicht untersucht.



Das humane Wistar-Melanom (WM)

M. Herlyn vom „Wistar Institute of Anatomy and Biology“ in Philadelphia schuf mit der sogenannten WM (=Wistar Melanoma)-Serie eine Reihe humane Melanomzelllinien, welche Modelle für die verschiedenen Wachstumsphasen der Melanomentwicklung (siehe Abb. 16) darstellen. Zusätzlich kultivierte er Pärchen aus Primärtumoren und Metastasen, die aus ein und demselben Patienten stammen^{[20.], [59.]}. Die Zelllinie WM-115 stellt den Primärtumor eines VGP-Melanoms dar, dessen zugehörige kutane Metastase die Zelllinie WM-266-4 ist. Dieses Pärchen erlaubt, ähnlich wie im Falle des B16-Melanoms einen Vergleich zwischen zwei Zelllinien, die sich in ihrer Entwicklung vom benignen zum malignen Status voneinander unterscheiden. Verglichen mit dem B16 Maus-Model hat es den Vorteil Zellen aus einem humanen System zu repräsentieren, die sich von Nagetierzellen teilweise unterscheiden. Der Nachteil der humanen Zellen ist, daß sich die *in vitro* erzielten Ergebnisse, *in vivo* nur auf athymische Tiermodelle übertragen lassen.



4.6 Zellmigration

Die Zellwanderung innerhalb vielzelliger Organismen spielt in zahlreichen biologischen Prozessen eine wichtige Rolle. Bereits während der Embryogenese ist die korrekte Migration von Zellen z.B. zur Ausbildung des intakten Nervensystems unbedingt notwendig, aber auch innerhalb eines ausgereiften Organismus ist die Zellwanderung

für das Überleben erforderlich. Beispielsweise stellt die Einwanderung von Gefäßendothel-Zellen und Fibroblasten bei der Wundheilung sowie die Migration von Leukozyten innerhalb entzündlicher Prozesse essentielle biologischen Vorgänge dar, durch welche letztendlich die Unversehrtheit des Organismus gewährleistet wird.

Die resultierende Bewegung von Zellen während der Migration muß als Zusammenspiel vieler extra- und intrazellulärer Moleküle betrachtet werden, die alle mehr oder weniger fest miteinander verbunden sind (siehe Abb.17).

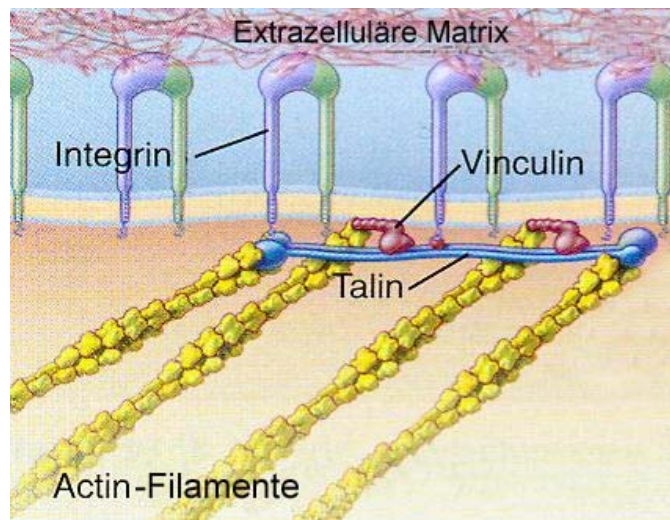


Abb. 17 Verbindung zwischen ECM-Proteinen und dem Cytoskelett (aus „Cell Biology“, Pollard, T.D. und Earnshaw, W.C.^[62.1.])

Erst eine regulierbare Bindung zwischen ECM-Molekülen, Oberflächenrezeptoren, Linker-Proteinen und Actin-Filamenten macht eine Bewegung der Zellen innerhalb des Organismus möglich. Die Actin-Filamente gehören zum Cytoskelett der Zelle und polymerisieren intrazellulär unter Mitwirkung von ATP und zweiwertigen Kationen wie Ca^{2+} und Mg^{2+} zu elastischen Bündeln, die wieder in ihre Monomere abgebaut werden können. Die Polymerisation der Actinfilamente verläuft am sogenannten „plus-Ende“, welches immer zur Plasmamembran hin ausgerichtet ist, bis zu zehn Mal schneller ab als am gegenüberliegenden „minus-Ende“. Als Schnittstellen zur Verknüpfung der Actin-Filamente mit der Zellmembran dienen kleine „Linker-Proteine“ wie Vinculin

oder Talin, welche das Cytoskelett unter anderem mit dem intrazellulären Teil der Integrine verbinden^[63.].



Bei der Migration bildet die Zelle einen Front-Bereich, der in Richtung der angestrebten Migration liegt und actin-reich ist und eine actin-arme Rückseite (siehe Abb.18). Diese unterschiedliche Actin-Verteilung innerhalb der Zelle wird als Polarisation bezeichnet^[63.]. Im Front-Bereich bilden sich an der Plasmamembran durch die Actin-Polymerisation Ausstülpungen, die frei von Zellorganellen sind und je nach Gestalt als Lamellipodia oder podia bezeichnet werden. Lamellipodia haben eine breite, flache und flächige Struktur, während Filopodia dünne, zylindrische oder nadelförmige Gebilde darstellen. Während der Wanderung bewegen sich diese Membranstrukturen vom Front-Bereich zur Rückseite der Zelle, indem sie durch die stetige Actin-Polymerisation  nach hinten geschoben werden. Integrine kommen ebenfalls gehäuft an der Front-Seite der Zelle vor, wo sie sogenannte „focal-adhesion-points“, komplexe Zusammenschlüsse aus diversen Adhäsionsmolekülen bilden, die zum einen neue Zell-ECM-Bindungen in Bewegungsrichtung knüpfen und zum anderen der Zelle einen festen Halt an der Matrix verschaffen. An der Rückseite der Zelle werden hingegen die Zell-Matrix Verbindungen, z.B. durch die Aktivierung von MMPs gelöst. Aus der Aktivierung intrazellulärer Actin-Myosin-Einheiten, welche die Zelle zusammenzieht, resultiert schließlich die kontraktile Bewegung der Zelle^[64.] zur Frontseite hin (s. Abb. 18).



Abb. 18 Mechanismus der Zellmigration^[65.]



Obwohl eine Vielzahl an Resultaten, die zur Aufklärung des Wanderungs-Mechanismus beitragen, aus zweidimensionalen *in vitro* Studien stammen geht man heute davon aus, daß die grundlegenden Ereignisse einer dreidimensionalen *in vivo*-Situation entsprechen^[63.]. *In vitro* kann der Einfluß von Reagenzien auf die Migration heute in sogenannten „scratch-Assays“, in welchen die zweidimensionale Zellwanderung beobachtet wird oder mit Hilfe sogenannter „Boyden-Invasion Chambers“ beobachtet werden (siehe Abb. 19).

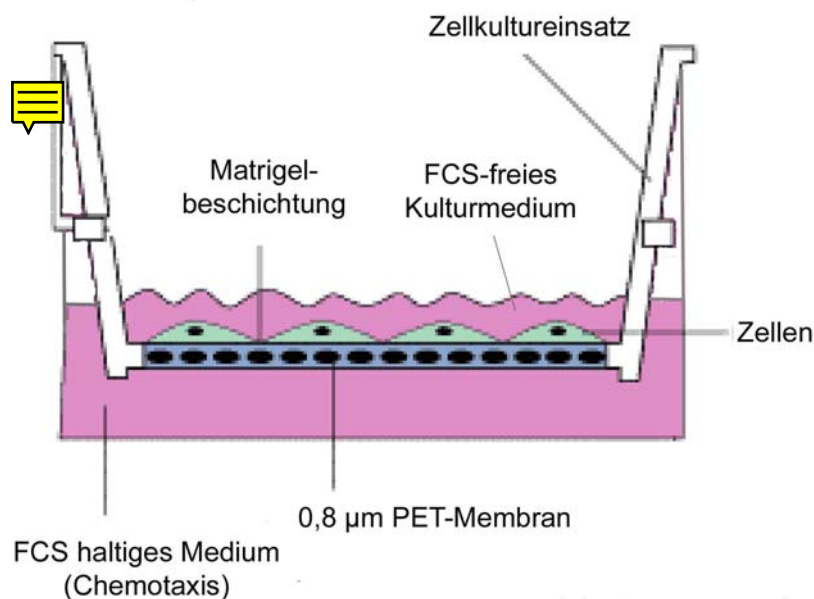


Abb. 19 Boyden-Invasion Chamber

„Scratch Assays“ machen eine Aussage über die Wanderungsgeschwindigkeit von Zellen in eine definierte Verwundung eines ansonsten intakten Zell-Monolayers. „Boyden-Invasion Chambers“ hingegen erlauben eine dreidimensionale Beobachtung der Zellwanderung. Zur erfolgreichen Migration müssen die Zellen, chemotaktisch gesteuert, aktiv eine sogenannte Matrigelschicht (= Mischung diverser ECM-Proteine) verdauen und durchwandern und eine poröse Membran passieren um in ein nährstoffreiches Milieu zu gelangen^[66.]. Hemmen dabei Reagenzien essentielle Oberflächenrezeptoren, matrixdegradierende Enzyme oder die Actin-Polymerisation, so verbleiben die Zellen auf der Matrigel-Schicht und damit auf der nährstoffarmen Seite.



4.7 Anti-metastatische Therapie

Etwa die Hälfte aller auf Krebs zurückzuführenden Todesfälle innerhalb der entwickelten Welt sind durch das Metastasieren solider Tumoren verursacht^[67.]. Bereits bei der Diagnose des Primärtumors haben sich häufig Metastasen aus Lungen-, Brust-, Magen-, Darm-, Blasen-, Prostata- und Hauttumoren so zahlreich innerhalb eines Organismus ausgebreitet, daß eine vollständige operative Entfernung der Krankheitsherde nicht mehr möglich ist. Neben der lokalen Bestrahlung kleiner Tochtergeschwüre bleibt Arzt und Patient meist nur eine systemisch wirkende medikamentöse Behandlung, welche allerdings immer auch gesunde Zellen angreift und daher mit zahlreichen Nebenwirkungen verbunden ist.

Die Entwicklung anti-metastatischer Medikamente, welche die Metastasierung unterdrücken und selektive therapeutische Effekte auf Sekundärtumoren ausüben, bleibt somit von oberster Priorität für die Pharmaforschung. Die Abschnitte 5.2 und 5.4 dieser Arbeit zeigen einige potentielle Angriffspunkte anti-metastatisch wirksamer Substanzen, deren Entwicklung heute teilweise bis in den klinischen Bereich fortgeschritten ist. Der folgende Überblick soll die Wirkungsweise, den Entwicklungsstand sowie die Problematik einiger antimetastatisch wirksamer Substanzen reflektieren:

MMP-Inhibitoren (MMPI)

Die Inhibition von MMPs erscheint, wenn man die metastatische Kaskade betrachtet, ein effektiver Ansatzpunkt zur Unterdrückung von Metastasen zu sein. Allerdings hat sich im Laufe einiger klinischer Studien gezeigt, daß eine generelle Hemmung von MMPs, aufgrund ihres unspezifischen Substratspektrums und ihrer daraus resultierenden pro- und anti-metastatischen Wirkung keinen Sinn macht^[47.].

Die meisten bisher in klinischen Studien verwendeten MMPIs sind peptidomimetische Hydroxamat-Derivate. „Batimastat“ war der erste getestete Inhibitor, der die klinische Phase III erreichte. Aufgrund seiner schlechten Wasserlöslichkeit wurde Batimastat intrapleural oder intraperitoneal verabreicht. Allerdings konnten selbst durch eine intraperitoneale Verabreichung, welche zudem abdominale Schmerzen verursacht, keine ausreichenden Plasmaspiegel erreicht werden und die Weiterentwicklung wurde schließlich eingestellt.

Ein optimaler Plasmaspiegel zur vollständigen Unterdrückung von MMPs des oral verfügbare Hydroxamats „Marimastat“ konnte aufgrund zahlreicher Nebenwirkungen ebenfalls nicht erzielt werden, jedoch erhöhte sich die 2-jährige Überlebensrate von Patienten mit Magenkrebs erheblich. Für Glioblastome und Ovarialkarzinome zeigte sich hingegen keine signifikante Verbesserung der Überlebensrate. Neben einer Optimierung für einen Einsatz bei Magenkrebs erfolgte eine Weiterentwicklung von Marimastat zum Einsatz bei bereits entfernten Bauchspeicheldrüsentumoren. Die Erforschung einiger nichtpeptidischer MMPis (BAY 12-9566, AG 3340) wurde aufgrund ihrer schlechten Bioverfügbarkeit und mangelnder Effektivität eingestellt. Lediglich das D-Tryptophan-Derivat „S-3304“ als Inhibitor von MMP-2, -8, -9, -12 und -13, welches sich durch eine hohe Verträglichkeit (2 x 800 mg/d) und eine Reduzierung neugebildeter Tumorgefäße auszeichnet, bleibt weiterhin in der klinischen Untersuchung. Auch Naturstoffe, wie der Hai-Knorpel-Extrakt „AE-941“ (Neavastat, AEterna, Quebec City, Canada) zeigen MMP-inhibitorische Wirkung. Die wasserlöslichen Komponenten mit einer maximalen Molmasse von 500 kDa hemmen MMP-1, -7, -9, -12 und -13 sowie die Neoangiogenese und haben die Phase III im Einsatz gegen Nierenkrebs und Nicht-kleinzellige Lungentumoren erreicht^[68.].



Zusammenfassend muß der bisherige Einsatz von MMPis kontrovers beurteilt werden. Aufgrund der Eigenart von MMPs eine Vielzahl von Proteinen als Substrate zu erkennen führt ihre Inhibition stets zu einer Beeinträchtigung normaler biologischer Funktionen. Insbesondere scheint das Gleichgewicht zwischen MMPs und ihren physiologischen Inhibitoren (TIMPs) eine entscheidende Rolle zu spielen. MMPis zeigen somit bisher nicht nur positive Ergebnisse in der Krebstherapie, sondern es konnte im Falle von Batimastat sogar das vermehrte Auftreten von Lebertumoren bei Patienten, die gegen Brustkrebs oder Lymphome behandelt wurden, beobachtet werden. Dennoch bleibt ihre weitere Erforschung in Labor und Klinik ein erfolgversprechender Bereich, der mit der Erfahrung aus vergangenen Studien zu effektiveren und weniger toxischen Substanzen führen wird^[68.].


Integrin-Inhibitoren

Integrine erscheinen, durch ihre Funktion bei fast allen Schritten der Metastasierung, als vielversprechende Targets einer anti-metastatischen Therapie. Etliche Integrine konnten



bereits erfolgreich durch Antikörper, Peptide oder Peptidomimetika inhibiert werden^[69.]
^[70.] und einige der Substanzen befinden sich momentan in der klinischen Testung.


„Vitaxin“ ist die humanisierte Form des Antikörpers „LM-609“, der gegen das Integrin $\alpha_v\beta_3$ gerichtet ist und 1994 von D. Cheresh patentiert wurde. Zur Zeit wird der Antikörper zu Behandlung von Leiomyosarkomen (malignen Tumoren der glatten Muskulatur) in einer Phase II Studie untersucht. Eine weitere mögliche Anwendung, welche aktuell in einer klinischen Phase I Studie getestet wird, findet er als   mmatorisches Therapeutikum bei rheumatoider Arthritis. „Cilengitide (EMD 121974)“ (Merck, Darmstadt) ist ein RGD-Sequenz beinhaltendes Pentapeptid, welches erstmals 2003, nach eindeutiger Diagnose von metastasierenden soliden Primärtumoren, eingesetzt wurde^[71.]. Cilengitide inhibiert die Integrine $\alpha_v\beta_3$ ($IC_{50} = 1 \text{ nM}$) und $\alpha_v\beta_5$ ($IC_{50} = 140 \text{ nM}$) ohne das innerhalb der Phase I-Studie eine dosislimitierende Toxizität festgestellt werden konnte. In zukünftigen Studien soll die antitumorale Wirksamkeit der Substanz als Einzelkomponente oder in Kombination gebräuchlicher Chemotherapeutika getestet werden.


Wie in Abschnitt 5.2.2 beschrieben haben Integrine neben ihrer Funktion als Adhäsionsmolek noch die Aufgabe der transmembranen Signalübermittlung. Daher können Integrine nicht nur antagonistisch sondern auch agonistisch angesprochen werden. Da Liganden (z.B. RGD) außerdem häufig an mehrere Integrine binden können, sind die systemischen Auswirkungen einer Integrininhibition allerdings schwer vorherzusagen und müssen in den nächsten Jahren ausführlich untersucht werden.

Sulfatierte Oligosaccharide

Heparin ist ein natürlich vorkommendes polysulfatiertes Glycosaminoglycan (siehe Abb. 12), welches heute standardmäßig als Antithrombin-III-Hemmer in der Klinik eingesetzt wird. Bereits vor 70 Jahren wurde beobachtet, daß Heparin, neben seiner antikoagulatorischen Wirkung, das *in vitro* Wachstum von Tumorzellen signifikant verringerte. Jedoch erst vor 12 Jahren wurde man im Zusammenhang mit großen, organisierten klinischen Studie wieder darauf aufmerksam, daß die Substanz einen Einfluß auf die Entwicklung von Tumoren hat. Innerhalb einer Thrombosestudie konnte nachgewiesen werden, daß sich die Lebenserwartung von Tumorpatienten, die mit niedermolekularem Heparin behandelt wurden, signifikant erhöhte (46 Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose und Hämostaseforschung e.V., 2002^[72.]). Seither ist

Heparin wieder sehr viel näher in das Blickfeld der Krebsforschung gerückt und seine therapeutische Wirkung auf Tumoren wird heute wieder systematisch erforscht und diskutiert^[73.].

„PI-88“ ist ein ursprünglich aus Hefezellen isoliertes Phosphomannopentose-sulfat, dessen antimetastatische und antiangiogene Effektivität zur Zeit in einer klinischen Phase II Studie untersucht wird. Sein Einfluß auf die Aktivität von matrixdegradierenden Heparanasen und verschiedenen Wachstumsfaktoren konnte bereits *in vitro* nachgewiesen werden^[74.]. Der Vorteil dieses und anderer therapeutisch wirksame  niedermolekularer Saccharidmimetika gegenüber Heparin, liegt in der erhöhten Homogenität der Moleküle, ihrer verminderten antikoagulatorischen Wirkung sowie ihrer oralen Verfügbarkeit.

Diese Aspekte, sowie die allgemein geringe Toxizität der Saccharide machen sie neben MMPis und Integrin-Inhibitoren zu vielversprechenden Kandidaten in der zukünftigen antimetastatischen Therapie. 

5 Aufgabenstellung

In dieser Arbeit soll das Potential synthetischer Saccharidmimetika verschiedene Schritte der metastatischen Kaskade *in vitro* zu inhibieren getestet werden. Als *in vitro* Model werden hierzu murine und humane Melanomzellen verwendet, die sich in ihrer Entwicklungsstufe zum malignen Melanom und damit in ihrem metastatischen Potential voneinander unterscheiden.

Zunächst soll der Einfluß saccharidhaltiger Konjugate auf die Adhäsion der Zellen an verschiedene Proteine der extrazellulären Matrix (ECM) getestet und ihr Target auf der Zelloberfläche bestimmt werden. Das durch diese Versuche erfolgende Screening einer Bibliothek von Saccharidmimetika soll geeignete nicht toxische Strukturen liefern, welche dann auf ihr Potential untersucht werden sollen sowohl die Aktivität ECM-degradierender Matrix-Metalloproteinasen (MMP) als auch die Migration der Melanom-Zellen zu inhibieren. Weiter soll anhand moderner Invasions-Assays gezeigt werden, ob die ausgewählten Saccharidmimetika in der Lage sind Melanom-Zellen am Durchwandern einer synthetischen extrazelluläre Matrix zu hindern.

Die Arbeit soll dazu dienen das Potential von Saccharidmimetika als Therapeutika innerhalb einer antimetastatischen Behandlung einzuschätzen. Sie stellt die Grundlage erster präklinischer *in-vitro* Untersuchungen dar und soll eine Aussage darüber machen, ob die Leitstruktur der Substanzbibliothek durch Veränderung ihrer funktionellen Einheiten in der Weise optimiert werden kann, daß eine Testung einzelner Substanzen *in vivo* praktikabel wird.

6 Experimenteller Teil

6.1 Zellkultur Allgemein

6.1.1 Passagieren der Zellen

Die adhären wachsenden Zellen wurden ein bis zwei Mal pro Woche mit Hilfe von Trypsin (PAA Laboratories GmbH, Cölbe) abgelöst, verdünnt und in eine neue Zellkulturflasche überführt. Dazu wurde zunächst das überstehende Medium abgezogen und der Zellrasen ein Mal mit 10 ml PBS-Lösung gewaschen. Der Zellrasen wurde mit 2 ml Trypsin-Lösung (0,025% Trypsin, 0,02% EDTA in PBS) bedeckt, das Trypsin sofort wieder abgezogen und die Zellen nach etwa 5-10 min vom Boden der Flasche abgeklopft. Die Zellen wurden in 10 ml frischem Kulturmedium suspendiert, die Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer (Abb.20) bestimmt und die benötigte Menge Zellen in eine neue Flasche ausgesät. Kulturflaschen mit einer Fläche von 75 cm² (BD FalconTM, Heidelberg) wurden dabei mit insgesamt 30 ml Medium befüllt, Kulturflaschen mit einer Fläche von 25 cm² (BD FalconTM, Heidelberg) mit 10 ml Medium.

6.1.2 Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer

Ein Aliquot der Zellsuspension wurde im Verhältnis eins zu eins mit Trypan-Blau (Biochrom, Berlin) gemischt und vorsichtig unter das Deckgläschen einer Neubauer-Zählkammer pipettiert (siehe Abb. 20)

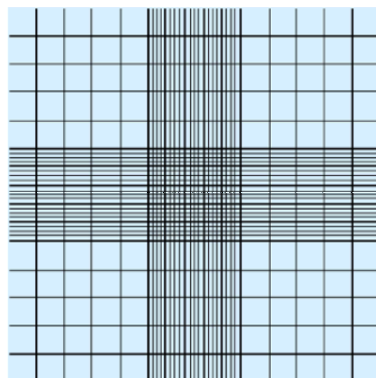


Abb. 20 Neubauer Zählkammer

Die Zellen in jeweils 4 x 4 Quadraten der Zählkammer wurden gezählt, wobei zwischen lebenden (ungefärbten) und toten (blau gefärbten) Zellen unterschieden wurde. Aus vier Werten wurde ein Mittelwert gebildet und die Zellzahl/ml nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Zellen/ml} = m' \cdot v \cdot K$$

wobei: m' = Mittelwert

v = Verdünnungsfaktor

$K = 1 \times 10^4$ = Konstante der Zählkammer

6.1.3 Kultivierung der Zelllinien B16F1 und B16F10

Medium für B16F1 und B16F10

Inhaltsstoffe:

DMEM Medium mit 4,5 g/l Glucose, 3,7 g/l NaHCO_3 , l-Glutamin- und Pyruvat-frei (Biochrom, Berlin),

4 mM L-Glutamin (PAA Laboratories GmbH, Cölbe) sterilfiltriert (10 ml einer 200 mM Stammlösung ad 500 ml Medium),

10 % fötales Kälber-Serum (FCS) (PANTM Biotech GmbH, Aidenbach),

Lot-No. P222401 bzw. P222501

10 ml der 200 mM L-Glutamin-Stammlösung wurden über einen 2 μm Sterilfilter in das DMEM-Medium gegeben, bevor 50 ml des Mediums gegen die gleiche Menge FCS ausgetauscht wurden. Das FCS war zuvor 1h bei 60°C hitzeinaktiviert, aliquotiert und bei -20°C gelagert worden. Bei Gebrauch wurde es aufgetaut und sterilfiltriert. Nach Erwärmen des Mediums auf 37°C war dieses gebrauchsfertig.

Beide Zelllinien stammen von der ATCC[®] (Manassas, VA, USA). Sie wurden zwei Mal pro Woche mittels Trypsin abgelöst und in eine neue Zellkulturflasche überführt. Für

einen dreitägigen Rhythmus wurden $2 \cdot 10^6$ Zellen, für einen viertägigen $1 \cdot 10^6$ Zellen ausgesät.

Beide Zelllinien haben zeitweise die Eigenschaft nach drei bis vier Tagen Wachstum Melanin zu exprimieren und ins Medium abzugeben. Dieses färbt sich somit tiefbraun bis schwarz.

6.1.4 Kultivierung der Zelllinien WM-115 und WM-266-4

Medium für WM-115 und WM-266-4

Inhaltsstoffe:

MEM-Medium mit Earles Salzen (Biochrom, Berlin),

2 mM L-Glutamin sterilfiltriert (5 ml einer 200 mM Stammlösung ad 500 ml Medium),

10 % FCS (PANTM Biotech GmbH, Aidenbach), Lot-No. bzw. P222501,

1 mM Na-Pyruvat (5ml 100 mM Stammlösung ad 500 ml Medium) (Biochrom, Berlin)

0,1 mM nicht essentielle Aminosäuren (NEA) (Biochrom, Berlin) (0,5 ml einer 100 mM Stammlösung ad 500 ml Medium),

0,325 g NaHCO₃ Feststoff (Biochrom, Berlin)

325 mg NaHCO₃ wurden in den, zuvor vereinigten Stammlösungen des L-Glutamins, des Na-Pyruvats sowie der NEA gelöst und durch einen 0,2 µm Sterilfilter in das MEM-Medium filtriert. Nach kräftigem Mischen wurden 50 ml des Mediums abgenommen und durch 50 ml hitzeinaktiviertes und sterilfiltriertes FCS ersetzt. Nach Erwärmen des Mediums auf 37°C war dieses gebrauchsfertig.

Beide Zelllinien stammen von der ATCC[®] (Manassas, VA, USA). Sie wurden ein Mal pro Woche mit Trypsin abgelöst und umgesetzt. Dazu wurden jeweils 1 Million Zellen in 30 ml Medium in eine 75 cm² Flaschen überführt. Nach 48h Wachstum wurden 2/3 des verbrauchten Mediums durch frisches Medium ersetzt.

Da stets ein Teil der WM-266-4 Zellen vital im Medium schwamm wurde das überstehende Medium abgezogen und die Zellen bei 120 g, 8 min abzentrifugiert. Das verbrauchte Medium wurde verworfen, die Zellen wurden in frischem Medium resuspendiert und anschließend der übrigen Kultur wieder zugeführt.

Sonstige Wachstumsbedingungen:

WM-115: Wachstumstemperatur: 34,5°C, bei 5% CO₂

WM-266-4 Wachstumstemperatur: 37°C, bei 5% CO₂

6.1.5 Einfrieren von Zellen

Zur Lagerung der Zellen wurden diese eingefroren. Dazu wurden die adhärent wachsenden Zellen mittels Trypsin vom Boden der Kulturflasche abgelöst und ihre Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden bei 120 g, 8 min. abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in ihrem jeweiligen Medium, welches ein Anteil von 10% DMSO (Sigma, Taufkirchen) enthielt, resuspendiert. Aliquote von $1-2 \cdot 10^6$ Zellen/ml Einfriermedium wurden in sterile Cryoröhrchen überführt und entweder im Isopropanol-Bad oder im Cryo-Automaten mit einer Temperaturdifferenz von $\Delta T = 1^\circ\text{C}/\text{min}$ eingefroren.

Die Zellen wurden bei -190°C in flüssigem Stickstoff oder bei -80°C im Tiefkühlschrank gelagert.

6.1.6 Auftauen von Zellen

Cryoröhrchen mit einer Zellsuspension von $1-2 \cdot 10^6$ Zellen/ml wurden aus dem Tiefkühlschrank genommen und umgehend in ein 37°C warmes Wasserbad gestellt, um ein zügiges Auftauen der Zellen zu gewährleisten. Nach Auftauen der Suspension wurde diese mit einer Pipette in 9 ml vorgewärmtes Nährmedium überführt und die Zellen 1x bei 120g, 8 min. abzentrifugiert. Das überstehende, DMSO-haltige Medium wurde abgenommen und verworfen. Die Zellen wurden in 10 ml Nährmedium resuspendiert und in eine kleine Zellkulturflasche ($A=25\text{cm}^2$) überführt. Die jeweiligen Zellen wurden unter den spezifischen Kulturbedingungen inkubiert, bis die Zellen einen konfluenten Monolayer bildeten. Nach zweimaligem Passagieren der Zellen wurden diese erstmals für weiterführende Versuche eingesetzt.

6.1.7 Mykoplasmentest

Um sicher zu gehen, daß die Kultur der jeweiligen Zelllinie keine Mykoplasmeninfektion aufweist wurde eine DNA-Färbung mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) gewählt.

Hierzu wurden autoklavierte Deckgläschen in die wells einer 6-well Platte gelegt, mit einigen Tropfen FCS-haltigem Kulturmedium überschichtet und die Lösung antrocknen gelassen. 5×10^4 Zellen wurden in einem Tropfen Kulturmedium auf das Deckgläschen pipettiert und 5 min antrocknen gelassen bevor das Deckgläschen vorsichtig mit 5 ml Kulturmedium überschichtet wurde. Nun wurde die Platte unter den üblichen Bedingungen solange kultiviert, bis die Zellen zu 75 % konfluent waren. Für die Färbung wurde das Medium abgenommen, die Zellen 1x mit PBS gewaschen und für 15 min mit einer Fixierlösung aus MeOH:HAc, 4:1 überschichtet. Gereinigte Objektträger wurden für die gleiche Zeit in der Fixierlösung gewaschen.

Nun wurden die Deckgläschen aus der Fixierlösung genommen und an der Luft getrocknet bevor sie für 2-4 min mit der DAPI-Lösung ($1 \mu\text{g/ml}$ in PBS) überschichtet wurden. Das Präparat wurde drei Mal mit H_2O bidest gewaschen, an der Luft getrocknet und mit den Zellen nach unten auf einen Objektträger gelegt. Als Deckmittel wurde stets ein Tropfen Elvanol verwendet.

Die Auswertung erfolgte visuell am Floureszenzmikroskop bei einer Extinktion von 353 nm. Hierbei ist ein Befall der Kultur mit Mykoplasmen durch die Floureszenz der Mykoplasmen-DNA erkennbar, die sich außerhalb des Kernbereichs der kultivierten Zellen befindet. Das Präparat gleicht bei starkem Mykoplasmen-Befall einem klaren Sternenhimmel.

6.1.8 Adhäsions-Assay

Puffer und Lösungen

Adhäsions-Puffer für Fibronectin und Laminin:

1% BSA in PBS, 1mM Ca^{2+} , 1mM Mg^{2+}

Adhäsions-Puffer für Fibrinogen und Vitronectin:

1% BSA in PBS, 1mM Mn^{2+}

Assay-Medium: serumfreies Kulturmedium:

0,25 mM Mn^{2+} , 0,1% BSA, 1 mM HEPES

Durchführung

Die wells einer flexiblen 96-well Platte (Falcon[®], Becton Dickinson, Heidelberg) wurden mit je 50 μ l der ECM- Proteinlösung befüllt und abgedeckt über Nacht bei 4°C gelagert. Aus Vorversuchen ergaben sich für die verschiedenen ECM-Proteine folgende Protein-Mengen pro well:

ECM-Protein	Hersteller	Menge pro 50 μ l
Fibronectin , Maus	Invitrogen, Karlsruhe	0,5 μ g
Fibronectin, human	Invitrogen, Karlsruhe	0,5 μ g
Fibrinogen, human	Calbiochem, Darmstadt	0,5 μ g
Vitronectin, Maus	ICN Biomedicals, Eschwege	0,5 μ g
Laminin, Maus	Invitrogen, Karlsruhe	1 μ g

Tab. 2. Proteinmenge verschiedener ECM-Proteine pro well zum Beschichten der Platten

Am nächsten Morgen wurde die Platte vorsichtig auf einem Stück Haushaltspapier ausgeklopft. Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurden die wells anschließend mit 200 μ l Adhäsions-Puffer befüllt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die benötigte Anzahl an Zellen wurde 48 h vor dem Versuch in einer kleinen Zellkulturflasche ($A=25\text{ cm}^2$) ausgesät und 16 h vor Versuchsbeginn mit 80 μ l Methyl- $[^3\text{H}]$ -Thymidin (Hartmann Analytic, Braunschweig) versetzt (Richtwert für die Radioaktive Markierung: 20 μ Ci/ $1 \cdot 10^6$ Zellen/ ml Medium). Nach 16 h Inkubation bei 37°C und 5% CO_2 wurden die Zellen mit 0,05 %-iger EDTA-Lösung abgelöst, drei Mal mit Assay-Medium gewaschen und ausgezählt. Die benötigte Anzahl an Zellen wurde in einem Eppendorf-Cup abzentrifugiert und in dem passenden Volumen der jeweiligen Testsubstanz, welche zuvor in Assay Medium gelöst worden waren, resuspendiert.

Parallel wurde eine Eichgerade für die aufgenommene Radioaktivität der Zellen in Abhängigkeit ihrer Anzahl aufgenommen. Die Zellen wurden in einem Eppendorf-Gefäß bei optimaler Wachstumstemperatur in einem temperierbaren Schüttler (Modell „Thermomixer compact“, Eppendorf, Hamburg) bei 1000 rpm inkubiert. 30 µl der Zellsuspension (entspricht $5 \cdot 10^4$ Zellen) wurden in die zuvor beschichtete Platte pipettiert und nochmals 1h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nicht anhaftenden Zellen wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und die adhärenen Zellen wurden unter dem Mikroskop visuell ausgewertet. Zur exakten Quantifizierung wurden die einzelnen Wells nun mit einer Schere auseinandergeschnitten und in Szintillationsröhrchen überführt. Die Vials wurden mit 5 ml Szintillationslösung (ULTIMA GOLD XR, Packard Bioscience, Groningen, Niederlande) befüllt und nach kräftigem Schütteln im Flüssig-Szintillator (Tri-Carb[®], Liquid Scintillator Analyzer, Modell 2200CA, Packard Instrument Company, Downers Grove, IL, USA) vermessen. Ein Aliquot der, mit den Testsubstanzen inkubierten Zellen wurde am Ende des Versuchs mittels Trypan-Blau auf seine Vitalität geprüft.

Auswertung

Die Anzahl adhärenter Zellen wurde über die Steigung der Eichgeraden aus dem Mittelwert der vierfach bestimmten Proben errechnet. Als Fehler wurde die Standardabweichung angegeben.

Als Darstellungsformen in den erstellten Säulendiagrammen wurde entweder „der Prozentuale Anteil der maximal möglichen Adhäsion“ welcher sich wie folgt errechnet

$$\% \text{ der Adhäsion} = \left(\frac{\text{Anzahl adhärenter Zellen}}{\text{Zahl der ausgesäten Zellen}} \right) \cdot 100$$

gewählt oder die „Adhäsion relativ zu Kontrolle“, welche sich aus

$$\text{Adhäsion relativ zur Kontrolle} = \left(\frac{\% \text{ der Adhäsion der Probe}}{\% \text{ der Adhäsion der Kontrolle}} \right)$$

ergibt. Zur Fehlerdarstellung der „Adhäsion relativ zu Kontrolle“ wurde die Methode nach Bishop et al^[75.] verwendet, bei welcher sich der Fehler aus

$$\text{Stabw.} \left(\frac{\text{MW X}}{\text{MW Y}} \right) = \sqrt{\frac{1}{[\text{MW(Y)}]^2} \cdot \frac{1}{n_{(X)}} \cdot [\text{Stabw. (X)}]^2 + \frac{[\text{MW(X)}]^2}{[\text{MW(Y)}]^4} \cdot \frac{1}{n_{(Y)}} \cdot [\text{Stabw. (Y)}]^2}$$

wobei

X = behandelte Zellen

Y = unbehandelte Kontrolle

Stabw. = Standardabweichung

MW = Mittelwert

n = Anzahl der einbezogenen Werte

ergibt.

Die Standardabweichung der Kontrolle geht somit in die Fehlerdarstellung der Ergebnisse ein.

6.1.9 Zymographie zum Nachweis von MMP-Aktivität

Unter der Zymographie versteht man eine Methode zum Nachweis von Gelatinase-Aktivität in serumfrei konditioniertem Zellkultur-Medium (SFCM). Gelatinehaltige Elektrophorese-Gele, in welchen Proteingemische unter nichtreduzierenden Bedingungen aufgetrennt werden und die proteolytische Aktivität von MMP-2 bzw. MMP-9 nach Renaturierung der Enzyme durch Abbau der Gelatine nachgewiesen werden, dienen hierbei der Visualisierung gelatinefreier Banden nach Coomassie-Färbung.

Durchführung:

Etwa $1 \cdot 10^6$ Zellen wurden in einer kleinen Zellkulturflasche ($A=25 \text{ cm}^2$) unter üblichen Bedingungen ausgesät und 24 h wachsen gelassen. Das serumhaltige Kulturmedium wurde abgenommen und der Zellrasen drei Mal mit serumfreiem Medium gewaschen. Die Zellen wurden daraufhin ca. 24 - 48 h unter serumfreien Bedingungen kultiviert,

wobei einigen Proben Saccharidmimetika zugesetzt wurden, um eine MMP-Aktivität zu beeinflussen. Nach der gewünschten Inkubationszeit wurde das gesammte SFCM abgenommen und bei 125 g, 8 min zentrifugiert, um etwaige Zelltrümmer abzutrennen.

Nun wurde der Proteingehalt des Mediums mittels Micro-Lowry bestimmt und das Medium mittels SDS-PAGE unter nichtreduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde in einer SE 260 Mighty Small II (Höfer/Pharmacia) Elektrophoresekammer durchgeführt. Die Gele haben hierbei eine Größe von 10 x 10.5 cm und sind 0,75 mm dick.

Das 7,5 %ige SDS-Gel mit 0,1 % Gelatine (Sigma, Taufkirchen) wurde analog einem SDS-Gel (Laemmli, 1970) gegossen, wobei die Gelatine bei 60°C in der benötigten Menge Wasser gelöst wurde bevor die restlichen Komponenten zupipettiert wurden.

Zusammensetzung der Gele (ausreichend für 2 Gele):

Trenngel (7,5 %):

10 mg	Gelatine
5,0 ml	H ₂ O
1,9 ml	40 %ige Bisacrylamid–Stammlsg. (Sigma, Taufkirchen)
2 ml	5-fach Trenngelpuffer
1 ml	1 % (w/v) SDS–Lsg. (Sigma, Taufkirchen)
100 µl	10 % (w/v) Ammoniumperoxidisulfat – Lsg. (Merck, Darmstadt)
10 µl	TEMED (Sigma, Taufkirchen)

Sammelgel (3 %), gelatinefrei:

3,4 ml	H ₂ O
600 µl	40 %-ige Bisacrylamid–Stammlsg.
1,5 ml	4-fach Sammelgelpuffer
600 µl	1 % (w/v) SDS – Lsg.
60 µl	10 % (w/v) Ammoniumperoxidisulfat – Lsg.
6 µl	TEMED

benötigte Lösungen und Puffer:

1 % (w/v)	SDS Lösung
10 % (w/v)	Ammoniumperoxidisulfat Lsg

Sammelgelpuffer 4-fach:

12g TRIS Base (Sigma, Taufkirchen)
96 ml 1 M HCl
ad 200 ml mit H₂O, pH 6,8 (HCl)

Trenngelpuffer 5-fach:

45,4 g TRIS Base
60 ml 1 M HCl
ad 200 ml mit H₂O, pH 8,8 (HCl)

Probenpuffer 2-fach:

200 mg SDS
1 g Glycerin
1 % (w/v) Bromphenolblaulösung
ad 10 ml mit H₂O

Laufpuffer 10-fach:

30,3 g TRIS Base
144 g Glycin
10 g SDS
ad 1000 ml mit H₂O, pH 8,3 (HCl)

Waschpuffer:

2,5 % (w/v) Triton-X-100

Puffer zum Entwickeln des Gels:

6,05 g TRIS Base
8,766 g NaCl
1,47 g CaCl₂
20 ml 1 % (w/v) Brij 35 Lösung (Sigma, Taufkirchen)
ad 1000 ml mit H₂O, pH 7,6 (HCl)

Coomassie Färbelösung:

0,1 % (w/v) Coomassie Serva blue R (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe)
in 45 % (v/v) Ethanol und 10 % (v/v) Essigsäure

Entfärbelösung:

10 % (v/v) Methanol
10 % (v/v) Essigsäure

Die Mischung für das Trenngel wurde nach Zugabe der beiden Starter APS und TEMED zügig zwischen zwei senkrecht stehende Glasplatten pipettiert und mit Wasser überschichtet. Nach ca. 15 min war das Gel auspolymerisiert, so daß nach Entfernen des Wassers das Sammelgel gegossen werden konnte. In dieses wurde ein Kamm geschoben, der Platz für die späteren Probestaschen aussparte.

Nach ca. 30 min konnte der Kamm aus dem polymerisierten Gel gezogen werden und die Taschen wurden umgehend mit Wasser nachgespült, um ein Nachpolymerisieren zu vermeiden. Die Platten wurden in die Laufkammer eingesetzt und umgehend mit 1 x Laufpuffer gefüllt. Proben des Mediums mit gleichem Proteingehalt wurden mit dem gleichen Volumen Probenpuffer gemischt und in die Probestaschen des Gels pipettiert. Die angelegte Spannung für eine Trennung lag zwischen 120 und 150 V. Beendet wurde die Elektrophorese, wenn der Markerfarbstoff etwa 1 mm vor dem unteren Rand der Glasplatten angekommen war.

Daraufhin wurden die Gele vorsichtig von den Glasplatten entfernt und zwei Mal für je 15 min mit Waschpuffer auf einem Taumler gewaschen. Nach weiterem viermaligen Waschen mit VE-Wasser unter Schütteln wurden die Gele bei 37°C im Brutschränk für 24-26 h in Entwicklungspuffer inkubiert bevor sie für ca. 20 min mit Coomasie-Blue R 250 (0,1 %) gefärbt wurden. Das Entfärben der Gele erfolgte mit Methanol:Essigsäure:Wasser (1:1:8). Auch diese beiden Färbeschritte erfolgten unter Schütteln auf einem Taumler.

Die proteolytische Aktivität der Gelatinasen war nun anhand farbloser Banden auf einem ansonsten tiefblau gefärbten Gel sichtbar. Die Qualität der Gele konnte durch mehrtägiges Waschen in VE-Wasser noch verbessert werden. Die Gele konnten durch

Scannen und anschließender Bildbearbeitung ausgewertet und durch Trocknen (1h bei 50°C) konserviert werden. Das Molekulargewicht der Banden wurde durch Auswertung des parallele getrennten Weight Markers „Sigmamarker Low Range, 6,5-66 kDa“ (Sigma, Taufkirchen) ermittelt.

6.1.10 Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung wurde die Methode nach Lowry verwendet.

Ein geeignetes Probenvolumen wurde ad 200 µl mit H₂O_{bidest} verdünnt und mit 1 ml Solubilisations-Reagenz versetzt. Dieses setzte sich aus folgenden Lösungen zusammen:

2 %-ige K-Na-Tartrat Lösung:	1 g K-Na-Tartrat in 50 ml H ₂ O _{bidest} .
1 %-ige CuSO ₄ * 6 H ₂ O Lösung:	0,5 g CuSO ₄ * 6 H ₂ O in 50 ml H ₂ O _{bidest} .
2 %-ige Na ₂ CO ₃ Lösung:	20 g Na ₂ CO ₃ in 1 l [0,1 M] NaOH

Das Reagenz wurde kurz vor dem Lösen der jeweiligen Proben zusammen pipettiert:

0,5 ml 2 %-ige K-Na-Tartrat Lösung,
0,5 ml 1 %-ige CuSO₄ * 6 H₂O Lösung,
ad 50 ml mit 2 %-ige Na₂CO₃ Lösung.

Es war darauf zu achten, daß das K-Na-Tartrat in etwas Na₂CO₃ vorgelegt wurde bevor das CuSO₄ zupipettiert und auf das gewünschte Volumen mit dem restlichen Na₂CO₃ aufgefüllt wurde, da sich sonst ein Niederschlag aus Cu(OH)₂ bildete.

Nach 15 min war das Protein gelöst und konnte mit 100 µl Folin-Lösung (1 ml Folin Cioculteus Phenol Reagenz (Merck, Darmstadt) + 1,5 ml H₂O_{bidest}) versetzt und gut geschüttelt werden.

Parallel zu den Proben wurde eine Eichgerade aufgenommen, welche als definierte Proteinmenge 400 µg BSA (Sigma, Taufkirchen) pro 1 ml 0,1 M NaOH beinhaltete.

Als Standardproben wurden folgende Lösungen verwendet:

10 µg BSA = 25 µl Standardlösung ad 200µl mit H₂O bidest

20 µg BSA = 50 µl Standardlösung ad 200µl mit H₂O bidest

30 µg BSA = 75 µl Standardlösung ad 200µl mit H₂O bidest

40 µg BSA = 100 µl Standardlösung ad 200µl mit H₂O bidest

50 µg BSA = 125 µl Standardlösung ad 200µl mit H₂O bidest

Jeder Wert wurde dreifach bestimmt und die Messung erfolgte nach 30 min im Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm.

Nach Berechnung der Geradengleichung der Eichgerade konnte die Proteinmenge der jeweiligen Probe berechnet werden.

6.1.11 Western Blot

Zur Identifikation der gelatinolytisch aktiven Banden aus der Zymographie wurde ein Western Blot durchgeführt.

Hierzu wurden je 5×10^5 Zellen der Zelllinien WM-115 und WM-266-4 in einer Kulturflasche mit 25 cm² Grundfläche ausgesät und 48 h unter den jeweiligen Kulturbedingungen inkubiert. Das serumhaltige Medium wurde daraufhin abgenommen und durch serumfreies Medium ersetzt, bevor die Zellen erneut 48 h inkubiert wurden. Nun wurde das überstehende Medium erneut abgenommen, die Zelltrümmer abzentrifugiert und SFCM mittels SDS Gelelektrophorese aufgetrennt. Das Molekulargewicht der Banden wurde durch parallele Trennung des Molecular Weight Markers (Sigmamarker Low Range, 6,5-66 kDa, Sigma, Taufkirchen) ermittelt. Bei dem Gel handelte es sich um ein 7,5 %-iges Gel, welches, wie in Abschnitt 7.1.9 beschrieben, aber ohne den Zusatz von Gelatine hergestellt wurde.

Parallel zu der Trennung wurde ein Zymogramm mit equivalenten Proben unter gleichen Bedingungen getrennt und anschließend wie oben beschrieben entwickelt. Das gelatinefreie Gel wurde dem Western Blot unterzogen:

benötigte Lösungen und Puffer**Blockierungspuffer:**

26,3 g Milchpulver in 500 ml PBS

Waschpuffer:

0,1 % TWEEN 20 in PBS

Blotpuffer:

8,55 g Glycin

3,03 g TRIS Base

MeOH 100 ml

ad 1000 ml mit H₂O, pH 8,9

0,5 % HSA (humanes Serumalbumin) in PBS:

1 ml HSA 20 % ad 40 ml mit PBS

primärer Antikörper:

Maus anti-MMP 2 (Chemicon, MAB 13431)

1:1000 verdünnt in 0,5 % HSA in PBS

sekundärere Antikörper:

Kaninchen anti-Maus gekoppelt mit alkalischer Phosphatase (DAKO, Glostrup, Dänemark)

1:500 verdünnt in 0,5 % HSA in PBS

Substratlösung:

BCIP/NBT-Blue (Sigma, Taufkirchen)

Für den Blot wurde eine Apparatur der Firma Hoefer (San Francisco, California), Model „Transphor Electrophoresis Unit TE 22“ benutzt. Zunächst wurden die Schwämme, das Filterpapier und das zugeschnittene Nitrocellulose-Papier (Schleicher & Schuell, Dassel) in Blotpuffer eingeweicht und schließlich zusammen mit dem Gel in folgender Reihenfolge in das Sandwich gelegt:

1: weißes Gitter, 2: Schwamm, 3: Filterpapier, 4: Nitrocellulose-Papier, 5: Gel, 6: Filterpapier, 7: Schwamm, 8: schwarzes Gitter

Die Blottkammer wurde mit Blotpuffer befüllt und das Sandwich so in die Blotkammer eingeschoben, daß das weiße Gitter zur Anode zeigte. Die Übertragung auf die Nitrocellulose erfolgte innerhalb einer Stunde bei 150 V und 500 mA. Nun wurde das Nitrocellulose Papier vorsichtig aus dem Sandwich genommen, 30 min mit Blockierungspuffer gewaschen und über Nacht bei Raumtemperatur in 20 ml der primären Antikörper-Lösung geschüttelt.

Am nächsten Morgen wurde die Lösung abgenommen, die Nitrocellulose vier Mal mit Waschpuffer gewaschen und weitere 4 h in wiederum 20 ml der sekundären Antikörper-Lösung geschüttelt. Nach Entfernen der Lösung wurde drei Mal mit Waschpuffer und drei Mal mit H₂O gewaschen, bevor 20 ml der Substratlösung auf die Nitrocellulose gegeben wurde. Die Färbung erfolgte, bis die Banden deutlich sichtbar und dennoch gut vom Hintergrund zu unterscheiden waren.

6.1.12 Migrations-Assay

5×10^5 Zellen wurden in ein well einer 12-well Platte ausgesät und unter den zellspezifischen Kulturbedingungen 24 h anwachsen gelassen. Zur Beobachtung der Migration wurde nun mit der Spitze eines 100 µl Eppendorf-Tips eine Wunde in einen etwa zu 90 % konfluent gewachsenen Zellrasen geritzt. Abgelöste Zellen wurden durch dreimaliges Waschen mit serumfreiem Medium aus der Wunde gespült und eine Saccharidmimetika enthaltende Lösung in serumhaltigem Medium wurde auf die Zellen gegeben. Die Zellwanderung in die Wunde des ansonsten intakten Zellrasens wurde mit Hilfe eines Mikroskops (Leica, Leitz DM IL, Bensheim) beobachtet und anhand von Fotoaufnahmen in Zeitintervallen von 2 h, 4 h, 8 h und 24 h dokumentiert.

6.1.13 Zytotoxizität

Die Bestimmung der Zytotoxizität der getesteten Saccharidmimetika erfolgte mittels Proteinfärbung durch den Farbstoff Sulforhodamin B (SRB, Sigma, Taufkirchen). Dieser färbt zuvor fixierte Membranproteine adhärent wachsender Zellen an und kann,

nach alkalischem Wiederablösen des Farbstoffs bei 546 nm direkt im Photometer vermessen werden.

benötigte Lösungen und Puffer:

Fixierlösung:

95% Ethanol, 5% Essigsäure

SRB-Lösung:

0,4% Sulforhodamin B-Lösung in 1% Essigsäure

Ablöse-Reagenz :

10 mM TRIS pH 10,5

Für den Zytotoxizitätstest wurden die adhärent wachsenden Zellen in verschiedenen Konzentrationen in die Wells einer 96-well Platte pipettiert und 24 h unter den zellspezifischen Kulturbedingungen inkubiert. Nachdem die Zellen innerhalb eines Tages fest angewachsen waren wurde das Medium gegen Medium ausgetauscht, in welchem die zu untersuchenden Saccharidmimetika in verschiedenen Konzentrationen gelöst waren. Nach der gewünschten Inkubationszeit wurden die Zellen unter dem Mikroskop auf ihre Vitalität überprüft und das Medium mitsamt nicht-adhären Zellen vorsichtig abgezogen. Adhären Zellen wurden nach Zugabe von 100 µl Fixierlösung innerhalb von 5 min bei -20 °C am Boden der Wells fixiert, bevor die Platte fünf mal mit Leitungswasser gewaschen und trocken gelassen wurde. Nun wurden 100 µl SRB-Lösung auf die fixierten Zellen gegeben und die Platte 30 min im Dunkeln bei RT stehen gelassen. Das Abspülen nicht gebundenen Farbstoffs erfolgte durch Waschen mit 1%iger Essigsäure, bis die Lösung klar erschien. Die Platte wurde auf Zellstoff ausgeklopft, an der Luft trocken gelassen und das SRB nach Zugabe von 100 µl TRIS-Puffer innerhalb von 5 min unter Schütteln wieder aus den Proteinen herausgelöst. Die Messung der Extinktion der rosafarbenen Lösung erfolgte bei 546 nm mittels Spektralphotometrie (µQuant, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VER, USA).

6.1.14 Durchflußzytometrie

Der Nachweis verschiedener Oberflächenstrukturen auf den Zelllinien WM-115 und WM-266-4 erfolgte durch fluoreszenzmarkierte Antikörperfärbung mit anschließender Detektion am Durchflußzytometer (FACS).

Hierzu wurden die Zellen zunächst mit Hilfe von EDTA vom Boden ihres Kulturgefäßes abgelöst, abzentrifugiert und mit einer 1:1000 Verdünnung des primären Antikörpers in PBS 1h bei 4 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nun wurden die Zellen erneut abzentrifugiert, 3 mal mit PBS gewaschen und in einer 1:100 Verdünnung des sekundären Antikörpers in PBS nochmals eine Stunde unter den oben genannten Bedingungen inkubiert. Nicht fest gebundener Antikörper wurde wiederum durch dreimaliges Waschen mit PBS von den Zellen gespült, bevor diese mit einer Dichte von ca. $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml in PBS resuspendiert und am FACS vermessen wurden.

Bei dem verwendeten Durchflußzytometer handelte es sich um ein das Model „FACSCALIBUR“ der Firma BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland).

Eine Probe der mit beiden Antikörpern inkubierten Zellen wurde, stets vergleichend zu Zellen, die mit jeweils nur einem der beiden Antikörper und zu Zellen, die ganz ohne Antikörper inkubiert wurden, vermessen.

Oberflächenantigen	Primärer Antikörper	Sekundärer Antikörper
Integrin $\alpha_v\beta_3$	MAB1976, Chemicon International, Temecula, CA	AQ300F Sheep x Mouse FITC, Chemicon International, Temecula, CA
Integrin α_5	Sc-13547, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA	AQ300F Shp x Ms FITC, Chemicon International, Temecula, CA
Integrin α_4	Sc-14008, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA	SJ29090, goat x rabbit FITC, NatuTec, Frankfurt a.M.
Integrin α_3	Sc-6588, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA	SJ31208, donkey x goat FITC, NatuTec, Frankfurt a.M.

Tab. 3. Verwendete Antikörper

7 Ergebnisse

7.1 Adhäsions-Assays

In der Abteilung wurden zwei Substanzbibliotheken mit Saccharidmimetika synthetisiert, welche entweder Trishydroxymethyl-cyclohexan oder Bishydroxymethylfuran als Verzweigungsmoleküle beinhalten. Berechnungen der möglichen Strukturkonformationen ausgewählter Moleküle der Bibliotheken mittels „Molecular Modelling“ ergaben eine strukturelle Verwandtschaft von 1,3,5-Tris- β -D-galactopyranosyl-oxymethyl-cyclohexan mit Lewis^y = (Fuc-(α 1->2)-Gal-(β 1->4)-Fuc-(α 1->3)-GlcNAc-R^[76.] sowie von Sialinsäure-(2->3)- β -D-glucopyranosyl-oxymethyl)-4-(α -L-fucopyranosyl-oxymethyl)-furan mit sLewis^x = NeuNAc-(α 2->3)-Gal-(β 1->4)-Fuc-(α 1->3)-GlcNAc-R^[77.]. Aufgrund der großen Ähnlichkeit der berechneten Moleküle mit den natürlichen Liganden postulieren wir eine mögliche Bindung einzelner Mitglieder beider Bibliotheken an sLewis^y oder sLewis^x-Rezeptoren oder andere tumorständige oder lösliche Lectine. Eine Bindung der Saccharidmimetika an Oberflächenrezeptoren der Zellmembran maligner Zellen könnte z.B. eine Verringerung der Zell-Adhäsion an verschiedene ECM-Proteine oder eine weitere Modulation der metastasierenden Eigenschaften der Zellen zur Folge haben.

7.1.1 Vorversuche zum Adhäsions-Assay

Der in dieser Arbeit verwendete Adhäsions-Assay stellt die Modifizierung einer vielfach in der Literatur beschriebenen Methode dar^{[78.], [79.]}. Zur Gewährleistung korrekter Ergebnisse wurden in folgenden Vorversuchen einige wichtige Parameter für das von uns gewählte *in vitro*-System bestimmt.

Bestimmung der Zellzahl mittels Methyl-[³H]-thymidin

Um sicher zu gehen, daß sich die Anzahl Zellen durch Messung der von ihnen aufgenommenen Radioaktivität nach 16-stündiger Inkubation mit Methyl-[³H]-thymidin bestimmen läßt, wurde die Abhängigkeit der Zellzahl von der gemessenen Radioaktivität bestimmt. Folgendes Diagramm zeigt anhand eines repräsentativen

Beispiels die lineare Beziehung zwischen der Anzahl an Zellen und der aufgenommenen Radioaktivität:

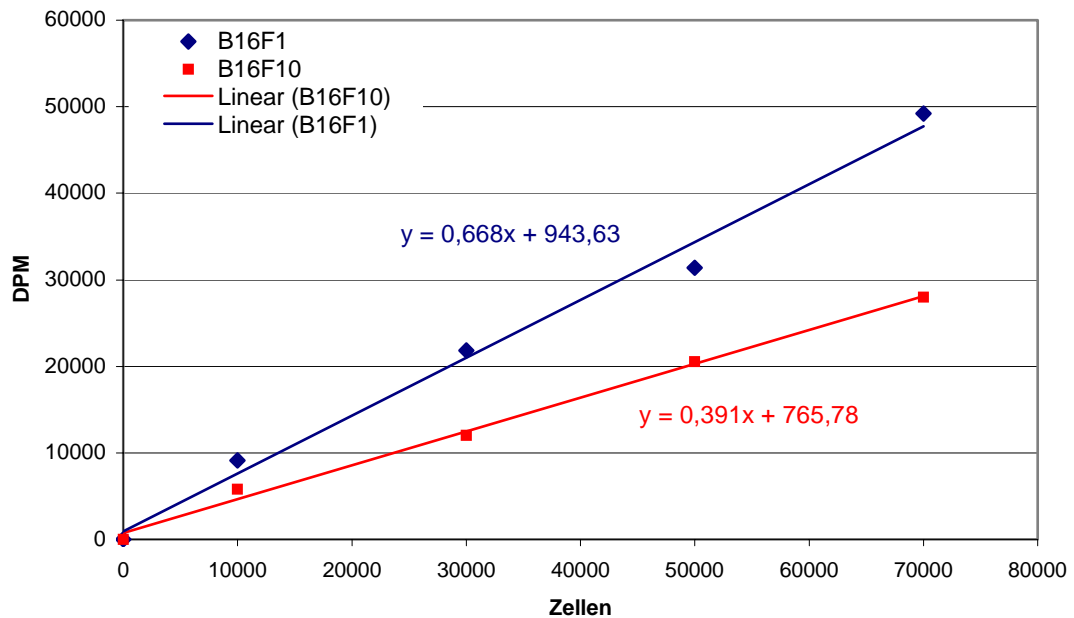


Abb. 21 Korrelation der Zellzahl mit der von den Zellen aufgenommenen Radioaktivität nach Inkubation mit Methyl- ^3H -thymidin

Da die Zellzahl und die gemessene Radioaktivität eine lineare Funktion darstellen, kann die Zellzahl direkt über die Geradengleichung berechnet werden. Anhand des Beispiels ist zu sehen, daß sich die beiden Kulturen der Melanomzellen in ihrer Aufnahme an Methyl- ^3H -thymidin deutlich voneinander unterscheiden. Die aufgenommene Radioaktivität stellt einen versuchsspezifischen Parameter dar, der von der Wachstumsphase sowie dem allgemeinen Zustand der Zellen abhängt. Für die folgenden Adhäsions-Assays wurde daher jeweils eine Eichgerade aufgenommen und die Anzahl adhärenter Zellen über die für den jeweiligen Assay spezifische Geradengleichung der gemessenen Radioaktivität errechnet.

Evaluierung eines geeigneten Ablöseverfahrens

Die in der Literatur beschriebenen Assays variieren in der Methode, mit welcher die Zellen vor dem Assay aus ihrem Kulturgefäß abgelöst wurden. Da wir mit den synthetisierten Saccharidmimetika zuckerbindende Oberflächenproteine adressieren wollen und es sich bei vielen gebräuchlichen Ablösereagenzien um proteolytische Enzymlösungen (z.B. Trypsin, Accutase) handelt, wollen wir für unser System ein Verfahren etablieren, das die Zellen ablöst, ohne ihre Oberflächenrezeptoren zu schädigen.

Hierzu bietet sich 0,05 %-ige EDTA-Lösung in PBS an. EDTA entzieht als Komplexbildner Oberflächenproteinen ihre metallischen Cofaktoren, wie zum Beispiel Ca^{2+} oder Mg^{2+} . Diese sind essentiell für cadherin-, integrin-, oder lectinvermittelte Interaktionen, da sie die Quartärstruktur der Proteine stabilisieren und damit ihre Funktion gewährleisten. Werden sie dem Zellmedium durch Komplexierung entzogen, lösen sich die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen. Durch spätere Zugabe der Cofaktoren können sich diese Interaktionen jedoch schnell wieder ausbilden, ohne daß die Oberflächenproteine neu synthetisiert werden müssen.

In einer Reihe von Vorversuchen, bei welchen Ablöseverfahren mit EDTA, Accutase und Trypsin verglichen wurden, bestätigte sich diese Überlegung. Die proteolytischen Ablöseverfahren zeigten bei einer nachfolgenden Adhäsion an ECM-Proteine einen signifikant geringeren Anteil adhärierender Zellen als die mit EDTA behandelten Zellen. Daher wurde für die Adhäsions-Assays stets die schonende Ablösung der Zellen durch EDTA verwendet.

Bestimmung der Menge an ECM-Protein pro well

Um die Menge an ECM-Proteinen pro well zu bestimmen, bei der sich die verschiedenen Zelllinien fest an die Matrix anheften, wurden wells einer flexiblen 96-well-Platte mit einer Menge von 0,15 - 2 μg ECM-Protein in 50 μl Lösung pro well beschichtet. Folgendes Diagramm zeigt den Anteil adhärenter B16-Zellen, die sich an verschiedenen Mengen ECM-Protein in den wells angeheftet haben.

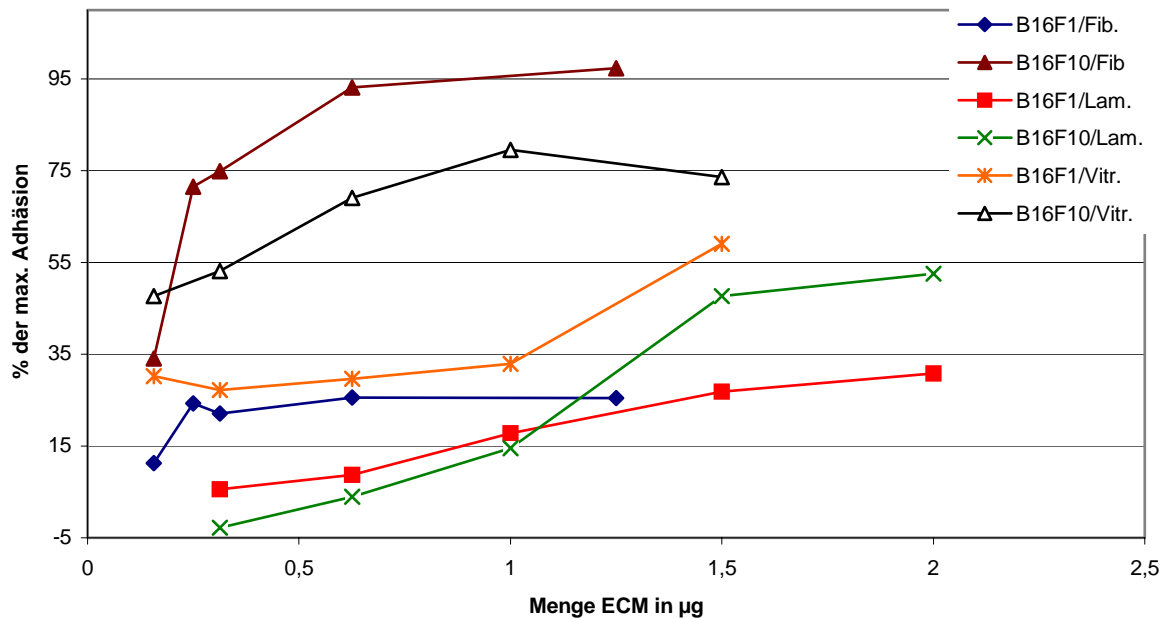


Abb. 22 Adhäsion von B16F1- und B16F10-Zellen an die ECM-Proteine Fibronectin (Fib.), Vitronectin (Vitr.) und Laminin (Lam.) nach Ablösen mit EDTA

Durch die hier beschriebenen Versuche sollte die geringste Konzentration an ECM-Proteinen ermittelt werden, bei welcher eine gut messbare Anzahl an Zellen in einem beschichteten well haften bleibt. Die Zellen der Linien B16F1 und B16F10 haften bereits in Mengen von 0,5 µg Fibronectin fest in den wells und auch durch Erhöhung der Proteinmenge läßt sich die Anzahl adhärenter Zellen nicht mehr signifikant steigern. Eine Menge von 0,5 µg Protein in 50 µl pro well wurde daher in den nachfolgenden Versuchen zum Beschichten der Platten gewählt.

Die Adhäsion der Zellen an Laminin steigt bis zu einer Konzentration von 2 µg Protein pro well noch deutlich an. Im Falle des ECM-Proteins Vitronectin haften die B16F10-Zellen in einer Konzentration von 0,5 µg Protein pro well bereits so fest in den wells, daß ihre Anzahl auch mit weiter ansteigender Menge an Protein nicht mehr signifikant steigt. Die Adhäsion der Zelllinie B16F1 steigt hingegen zwischen 1 und 1,5 µg Vitronectin pro well noch deutlich an.

Da die Proteine Vitronectin und Laminin jedoch einen erheblichen Teil der Kosten des Assays darstellen, wurde zugunsten der Wirtschaftlichkeit des Versuchs auf eine

Messung der Adhäsion im Optimalbereich verzichtet. Die Menge an Vitronectin wurde für beide Zelllinien auf 0,5 µg pro well und für Laminin auf 1 µg pro well festgelegt.

Die aus dem Diagramm abzulesende Aussage, daß die Zellen der Linie B16F10 stets fester an die ECM-Proteine binden als die B16F1-Zellen konnte in der Gesamtheit der durchgeführten Versuche nicht generell bestätigt werden. Die Adhäsion ist ein dynamische Parameter, der sich offensichtlich im Laufe der Zeit, abhängig von verschiedenen Einflüssen stetig verändert. Durch Einhalten von uns festgelegter Bedingungen haben wir zwar versucht diese Einflüsse weitgehend konstant zu halten, eine Veränderung der Adhäsion unbehandelter Kontrollzellen war aber dennoch stets zu beobachten. Für die Adhäsions-Assays wurden deshalb die Werte der Proben stets auf den Wert der Kontrolle bezogen (s. S. 81, Bemerkungen).

Bestimmung der geeigneten Zellzahl pro well

Der Adhäsions-Assay wird in 96-well-Platten, deren wells einen Durchmesser von 6 mm besitzen, durchgeführt. Um auf der einen Seite einen sinnvollen Wert an meßbarer Radioaktivität zu gewährleisten, auf der anderen Seite jedoch allen ausgesäten Zellen den nötigen Raum zur Verfügung zu stellen, um an den Boden des wells zu haften, muß eine geeignete Anzahl an Zellen für den Versuch ermittelt werden. Als Anhaltspunkt für diese Zellzahl diente der in der Literatur, angegebene Wert von ca. 50000 Zellen pro well.

Um zu prüfen, ob sich diese Angabe auf unser System übertragen läßt, wurden in einem Modellversuch zwischen 10000 und 100000 radioaktiv markierte B16F10 Zellen pro ECM-beschichtetes well ausgesät. Nach einstündiger Adhäsionszeit wurden die losen Zellen drei Mal mit PBS abgewaschen und die Anzahl haftender Zellen durch Messung der Radioaktivität bestimmt. Es ergab sich folgendes Diagramm:

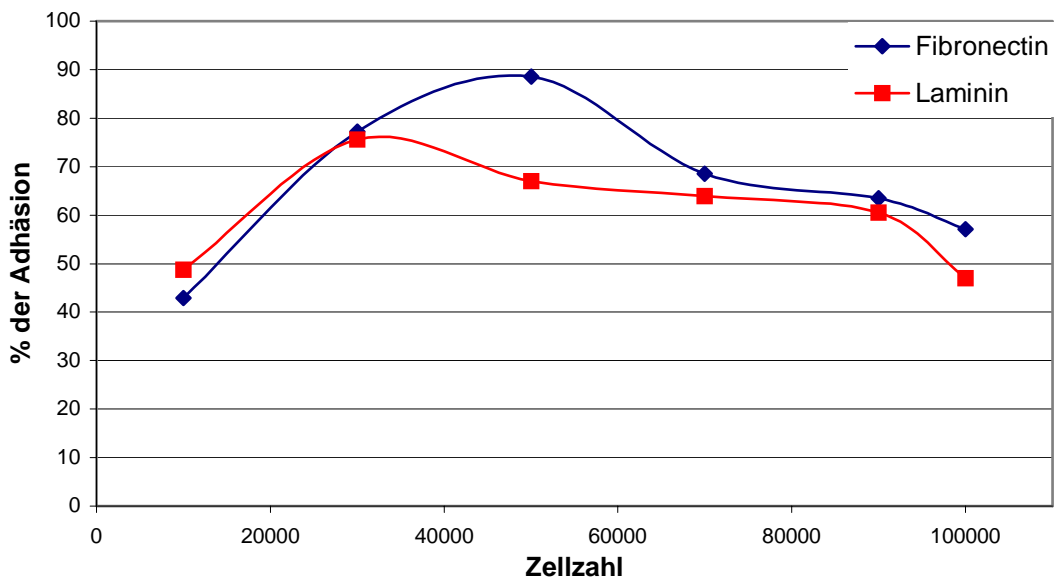


Abb. 23 Abhängigkeit der maximal möglichen Adhäsion von der Anzahl an ausgesäten Zellen

Trägt man den prozentualen Anteil adhärenter Melanomzellen gegen die Zahl der Zellen auf, die in ein well pipettiert wurden, so erhält man eine Kurve mit einem Optimum bei ca. 50000 zupipettierten Zellen pro well. Bei dieser Zellzahl ist der Anteil anhaftender Zellen am größten und sinkt mit weiter ansteigender Anzahl an Zellen wieder ab, was auf einen Platzmangel der Zellen innerhalb des wells zurückzuführen sein könnte. Die Zellen hätten mangels Kontaktfläche zur ECM keine Möglichkeit, eine Zell-ECM-Interaktion auszubilden und würden daher beim Waschen mit PBS wieder aus dem well gespült. Aus dem Vorversuch geht hervor, daß 50000 Zellen in 30 μ l Medium pro well eine geeignete Anzahl an Zellen darstellt.

Weshalb die maximal mögliche Adhäsion bei einer Zellzahl kleiner 50000 Zellen pro well nicht erreicht wird, sondern sogar noch unterhalb des Optimums liegt ist auf den ersten Blick nicht erkennbar und wurde in dieser Arbeit auch nicht näher untersucht.

Bemerkungen

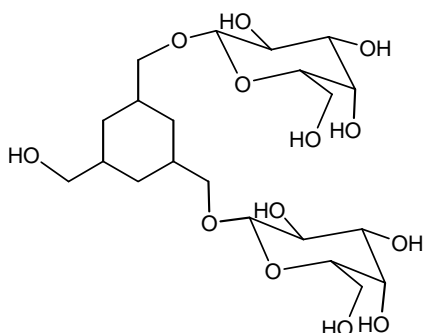
Im Verlauf einer Vielzahl an durchgeführten Adhäsions-Assays wurden einige Beobachtungen gemacht, welche im folgenden kurz geschildert werden und die bei der Auswertung der Ergebnisse berücksichtigt wurden:

Die maximale Adhäsion der Zellen an die ECM-Proteine variiert von Versuch zu Versuch teilweise sehr stark. Dies kann, da die Zellen vor den Versuchen nicht synchronisiert worden sind, an der unterschiedlichen Wachstumsphase der einzelnen Zellen, oder an der Anzahl ihrer Passagen liegen. Um diesen Parameter zu berücksichtigen, wurde die Adhäsion der mit Testsubstanzen inkubierten Zellen immer auf eine parallel zu der Werten aufgenommene substanzfreie Kontrolle bezogen.

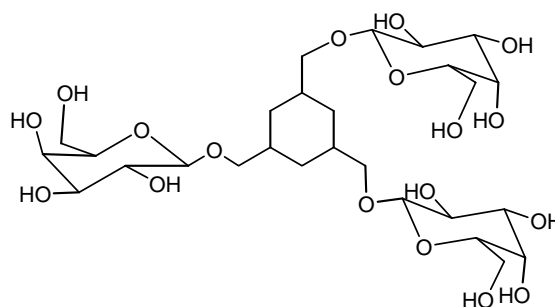
Bei ersten Adhäsions-Assays mit der Zelllinie WM-266-4 fiel auf, daß die Werte der maximalen Adhäsion stets sehr gering waren. In einer Versuchsreihe bestätigte sich schließlich die Vermutung, daß die Anzahl adhärenter Zellen mit steigender Anzahl an Waschschritten signifikant nachließ. Die Zellen entwickeln demnach eine weit geringere Affinität zur ECM als die übrigen getesteten Zelllinien. WM-266-4 läßt sich unter den von uns gewählten Bedingungen im Adhäsions-Assay nicht untersuchen. Da die Werte eines für WM-266-4 Zellen modifizierten Assays nicht mit den Werten der übrigen drei Zelllinien verglichen werden können, wurde von einer Untersuchung der Wirkung der Substanzen auf die Adhäsion von WM-266-4 Zellen abgesehen.

7.1.2 Auf Cyclohexan basierende Saccharidmimetika

Folgende Strukturen, welche Trishydroxymethyl-cyclohexan (TMC) als Verzweigeremolekül beinhalten, wurden auf ihren Einfluß auf die Adhäsion von B16-Melanomzellen an Fibronectin getestet:

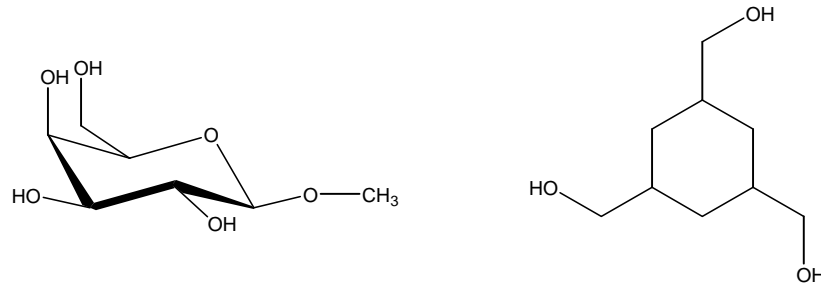


1,3-Bis- β -D-galactopyranosyl-oxymethyl-5-hydroxymethyl-cyclohexan (Di-Gal)



1,3,5-Tris- β -D-galactopyranosyl-oxymethyl-cyclohexan (Tri-Gal)

Als Kontrollsubstanzen dienten Methyl- β -D-galactopyranosid (Me-Gal) und 1,3,5-Trishydroxymethyl-cyclohexan (TMC).



Methyl- β -D-galactopyranosid (Me-Gal) 1,3,5-Trishydroxymethyl-cyclohexan (TMC)

Nach Inkubation der Zellen mit den angegebenen Substanzen wurden, wie in Abschnitt 7.1.8 ausführlich beschrieben, die Werte zur Erstellung der Diagramme errechnet, die die Adhäsion der Proben relativ zur Adhäsion der reagenzfreien Kontroll-Zellen darstellen.

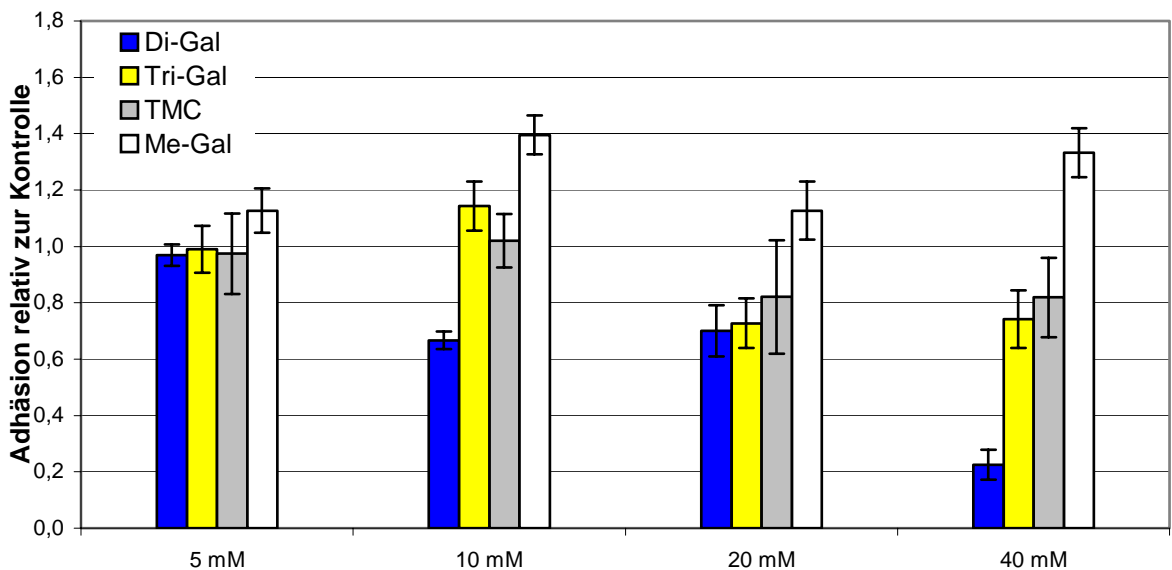


Abb. 24 Adhäsion der Zelllinie B16F10 an Fibronectin in Anwesenheit von galactosylierten Cyclohexan-Derivaten

Die Adhäsion der Zelllinie B16F10 verringert sich in Gegenwart von 40 mM Di-Gal um etwa 80 %. Tri-Gal zeigt nur geringe inhibitorische Effekte und verringert die Adhäsion

der B16F10-Zellen an Fibronectin in einer Konzentration von 40 mM um etwa 20 %. TMC zeigt mit steigender Konzentration keinen Effekt auf die Adhäsion von B16F10-Zellen an Fibronectin, wohingegen MeGal die Zelladhäsion sogar verstärkt.

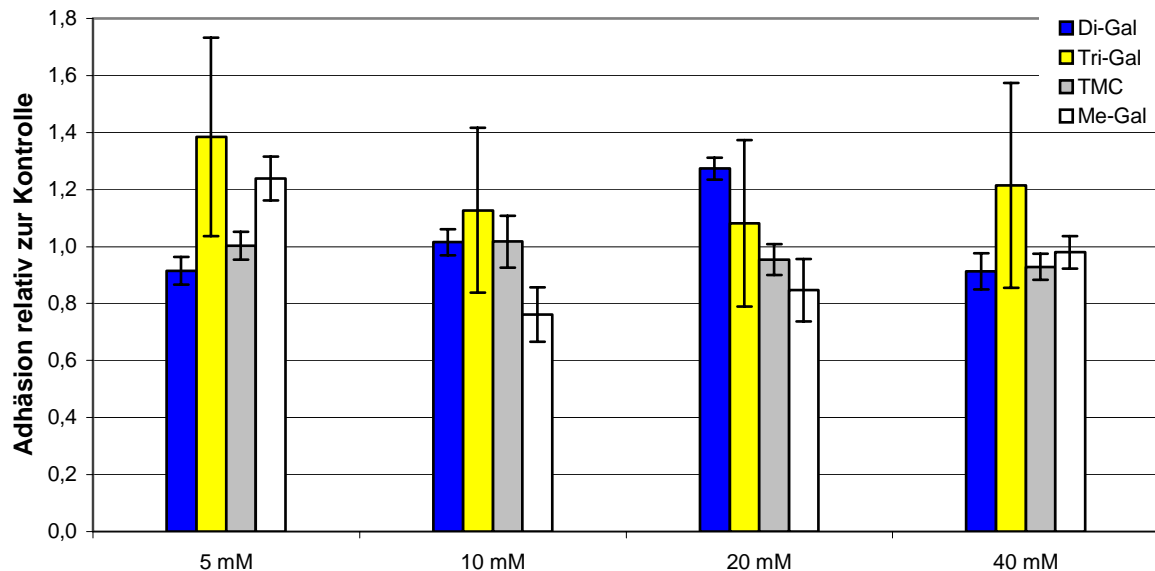


Abb. 25 Adhäsion der Zelllinie B16F1 an Fibronectin in Anwesenheit von galactosylierten Cyclohexan-Derivaten

Vergleicht man die Zelllinie B16F1 mit der stark metastasierenden Variante B16F10, so fällt auf, daß sich die schwach metastasierenden Zellen in ihrer Adhäsion an Fibronectin durch keine der getesteten Substanzen signifikant inhibieren lassen. Me-Gal hat bei B16F1-Zellen in 10 und 20 millimolarer Konzentration nur eine geringe inhibitorische Wirkung auf die Adhäsion. TMC zeigt ein Erhöhung der Zelladhäsion, allerdings mit auffällig hohen Standardabweichungen. Dieser Effekt wird auch im folgenden nach einer Inkubation mit Saccharid-Lösungen immer wieder zu beobachten sein und wird in Abschnitt 9 ausführlich diskutiert.

7.1.3 Auf Furan basierende Saccharidmimetika

7.1.3.1 Bis- β -D-galactopyranosyl-oxymethyl-furan (BGF) –Derivate

Als Grundbaustein für eine zweite saccharidhaltige Substanzbibliothek wurde Bishydroxymethyl-furan gewählt. An dieses Grundgerüst wurden mit Hilfe der Schmidt'schen Imidat-Methode^[80.] jeweils zwei Moleküle Galactose an die Hydroxymethyl-Gruppen eingefügt, die sich an verschiedenen Positionen des Furanringes befinden.

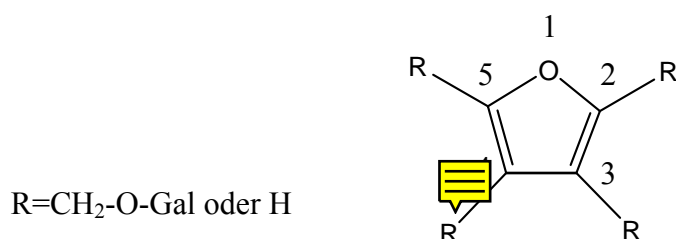


Abb. 26 Grundgerüst der Bis- β -D-galactopyranosyl-oxymethyl-furan-Derivate

Die resultierenden Isomere 2,3-Bis- β -D-galactopyranosyl-oxymethyl-furan (2,3-BGF), 3,4-Bis- β -D-galactopyranosyl-oxymethyl-furan (3,4-BGF), und 2,5-Bis- β -D-galactopyranosyl-oxymethyl-furan (2,5-BGF) wurden auf ihr Potential untersucht, die Adhäsion von B16-Maus-Melanomzellen an verschiedene ECM-Proteine zu hemmen.

Einfluß der BGF-Derivate auf die Adhäsion des B16F10-Maus-Melanoms

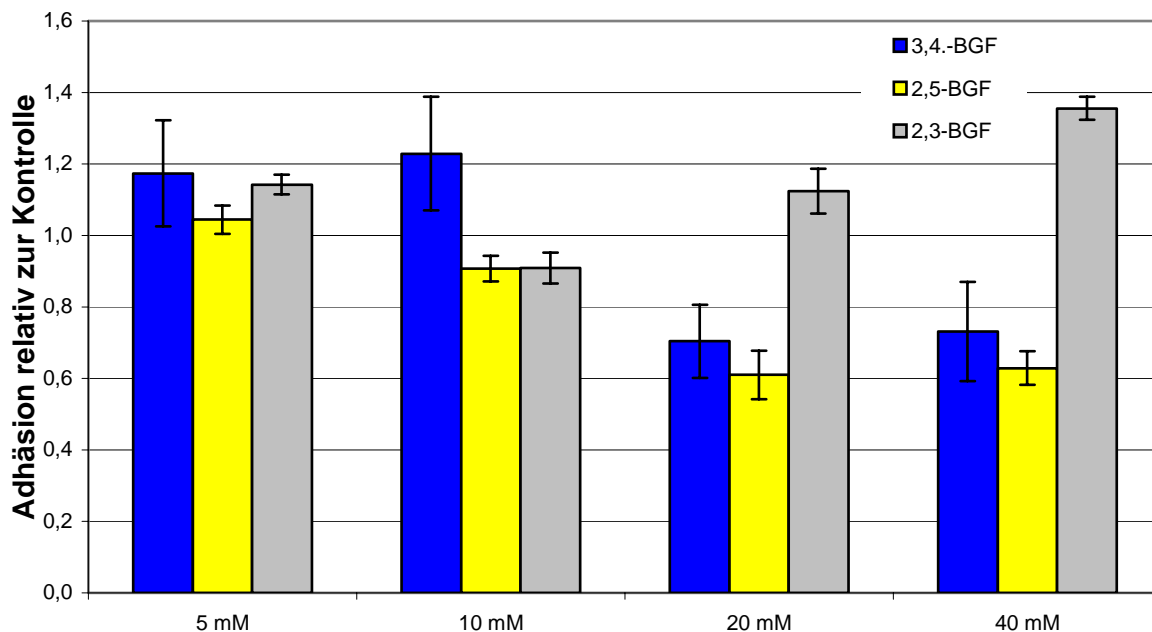


Abb. 27 Adhäsion der Zelllinie B16F10 an Fibronectin in Anwesenheit von Bis- β -D-galactopyranosyl-oxymethyl-furan-Derivaten

Sowohl 3,4-BGF als auch 2,5-BGF inhibieren die Adhäsion der Zelllinie B16F10 an Fibronectin in einer Konzentration von 20 mM um 30 % bzw. 40%. Auch eine Verdopplung der Konzentration verbessert die Inhibition nicht. Die Inkubation der Zellen mit 5 und 10 mM 3,4-BGF erhöht die Adhäsion an Fibronectin leicht, während die Inkubation mit gleichen Konzentrationen 2,5-BGF die Adhäsion, verglichen mit der saccharidfreien Kontrolle, nicht verändert.

2,3-BGF zeigt keine signifikante Inhibition der Adhäsion von B16F10-Zellen an Fibronectin, sondern steigert die Affinität der Zellen in hohen Konzentrationen von 40 mM an das ECM-Protein um etwa 35 %.

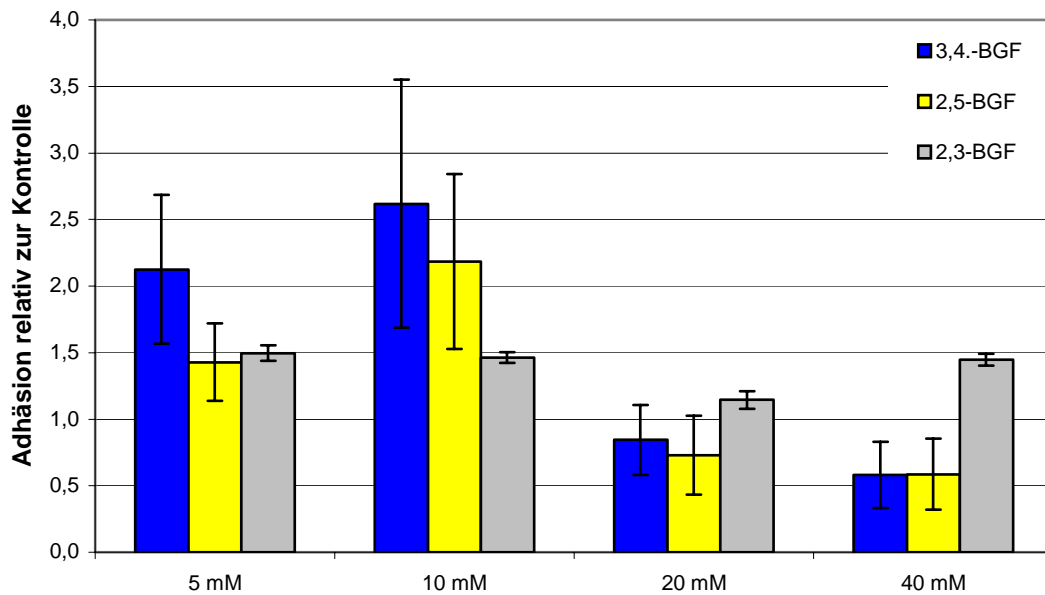


Abb. 28 Adhäsion der Zelllinie B16F10 an Vitronectin in Anwesenheit von Bis- β -D-galactopyranosyl-oxymethyl-furan-Derivaten

Beide BGF-Derivate zeigen im niederen millimolaren Bereich von 5 bzw. 10 mM einen adhäsionsstimulierenden Effekt. Durch eine sehr niedrige Adhäsion der reagenzfreien Kontrolle ist eine Zunahme der Adhäsion von über 100 % möglich (siehe 9). Obwohl die Steigerung der Adhäsion an die ECM zunächst ungewöhnlich erscheinen mag, wird aus zwei Gründen davon ausgegangen, daß dieser Effekt auf eine Inkubation mit den verwendeten BGF-Derivaten zurückgeht:

- Die Anzahl adhärenter Zellen wird in Anwesenheit von 3,4-BGF bzw. 2,5-BGF in einer Konzentration von 10 mM mehr als verdoppelt.

Die Standardabweichung der einzelnen Werte innerhalb eines Versuchs ist auffallend groß. Alle Zellen einer Versuchsreihe werden gemeinsam ein Stunde lang in der jeweiligen Saccharidlösung inkubiert, bevor sie zu je 50 000 Zellen in ein ECM-beschichtetes well pipettiert werden. Dort haben sie nun eine Stunde Zeit zu adherieren, bevor nicht anhaftende Zellen aus dem well gewaschen werden. Die hohe Standardabweichung innerhalb einer Versuchsreihe, deutet darauf hin, daß sich die Zellen innerhalb der Stunde, in welcher sie lokal getrennt sind, in ihren adherenten Eigenschaften verändern. Da verglichen mit den übrigen Zellen der Versuchsreihe kein

einheitlicher Effekt der Saccharidlösung gezeigt werden kann muß davon ausgegangen werden, daß es sich bei der Veränderung um einen Prozeß handelt, der nach einer Stunde Inkubationszeit noch nicht abgeschlossen ist. Hierbei könnte es sich zum Beispiel um eine Metabolisierung der Saccharidmimetika handeln (siehe 9), die in einer Veränderung der Oberflächenverzuckerung der Zellen und damit in einer Steigerung der Zelladhäsion an die ECM resultiert.

Eine Inkubation der Zellen mit 20 mM 3,4-BGF bzw. 2,5-BGF zeigt eine erste inhibitorische Wirkung der Substanzen auf die Adhäsion an Vitronectin um 20 bzw. 25 %. Die Inhibition ist dosisabhängig und in einer Konzentration von 40 mM inhibieren 3,4-BGF ebenso wie 2,5-BGF die Adhäsion an Vitronectin um etwa 50 %.

2,3-BGF inhibiert die Adhäsion der B16F10 Zellen an Vitronectin nicht, sondern zeigt dosisunabhängig, ähnlich wie im Falle von Fibronectin, eine leichte Steigerung der Affinität an die ECM.

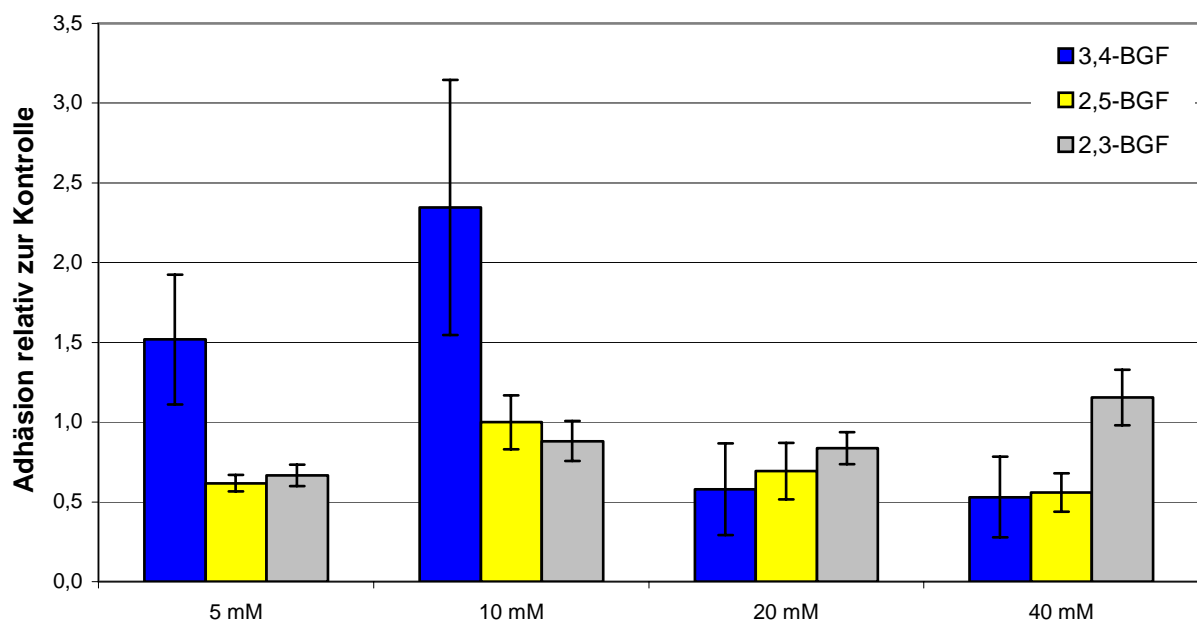


Abb. 29 Adhäsion der Zelllinie B16F10 an Laminin in Anwesenheit von Bis- β -D-galactopyranosyl-oxymethyl-furan-Derivaten

3,4-BGF stimuliert, wie auch schon im Falle von Vitronectin, die Adhäsion der B16F10 Zellen an Laminin in Konzentrationen von 5 und 10 mM. Verdoppelt man die Menge des 3,4-BGF, wird hingegen eine Inhibition der Adhäsion an die ECM von etwa 50 % erkennbar, die auch bei 40 mM Konzentration nicht größer wird.

2,5-BGF inhibiert die Adhäsion der Zelllinie B16F10 an Laminin in Konzentrationen ab 10 mM dosisabhängig. Bei einer Konzentration von 40 mM ist die Adhäsion im Vergleich zur Kontrolle um etwa 50 % zurückgegangen. Auch eine 5 mM Lösung des Reagens inhibiert die Adhäsion an das ECM-Protein mit 40 % bereits deutlich. Auffallend ist, daß die höchste Adhäsion der B16F10 Zellen auch in dieser Versuchsreihe bei einer Konzentration von 10 mM auftritt. Wie bei der Adhäsion der Zellen an Vitronectin führt eine Inkubation in diesem Konzentrationsbereich zu einem adhäsionsstimulierenden Effekt.

2,3-BGF inhibiert die Adhäsion an die ECM in 5 mM Konzentration um 30 %. Dieser Effekt läßt sich allerdings durch eine Vervielfachung der Konzentration nicht optimieren, sondern die Anzahl adhärenter Zellen entspricht in Anwesenheit höher konzentrierter 2,3-BGF-Lösungen und im Rahmen der Messgenauigkeit eher der reagenzfreien Kontrolle.

Einfluß der BGF-Derivate auf die Adhäsion des B16F1-Maus-Melanoms

Im folgenden sollen die wenn auch nur geringen so doch offensichtlich existierenden inhibitorischen Effekte der BGF-Derivate auf die stark metastasierende Zelllinie B16F10 mit der Wirkung der Substanzen auf die wenig metastasierende Zelllinie B16F1 verglichen werden:

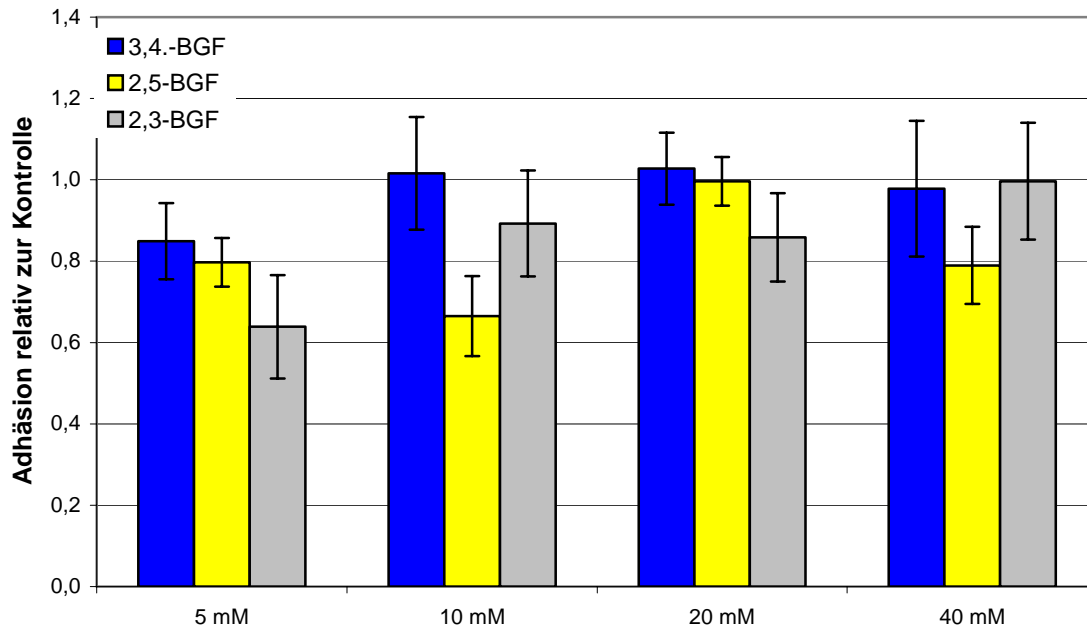


Abb. 30 Adhäsion der Zelllinie B16F1 an Fibronectin in Anwesenheit von Bis- β -D-galactopyranosyl-oxymethyl-furan-Derivaten

3,4-BGF inhibiert ebenso wie 2,3-BGF die Adhäsion der Zelllinie B16F1 an Fibronectin nur in unspezifischer Weise. Auch wenn in einer Konzentration von 5 mM eine geringe Inhibition von 15 % bzw 35 % im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten ist, kann durch eine Vervielfachung der BGF-Konzentration kein zunehmender inhibitorischer Effekt nachgewiesen werden. Im Rahmen der Fehlergenauigkeit des Assays entspricht die Adhäsion der B16F1 Zellen in Anwesenheit von 3,4-BGF und 2,3-BGF der Adhäsion der reagenzfreien Kontrolle.

Lediglich 2,5-BGF scheint einen leichten inhibitorischen Einfluß von etwa 20-30 % auf die Adhäsion der B16F1 Zellen an Fibronectin zu haben. Allerdings ist dieser Effekt ähnlich wie bei den beiden anderen BGF-Derivaten nicht konzentrationsabhängig.

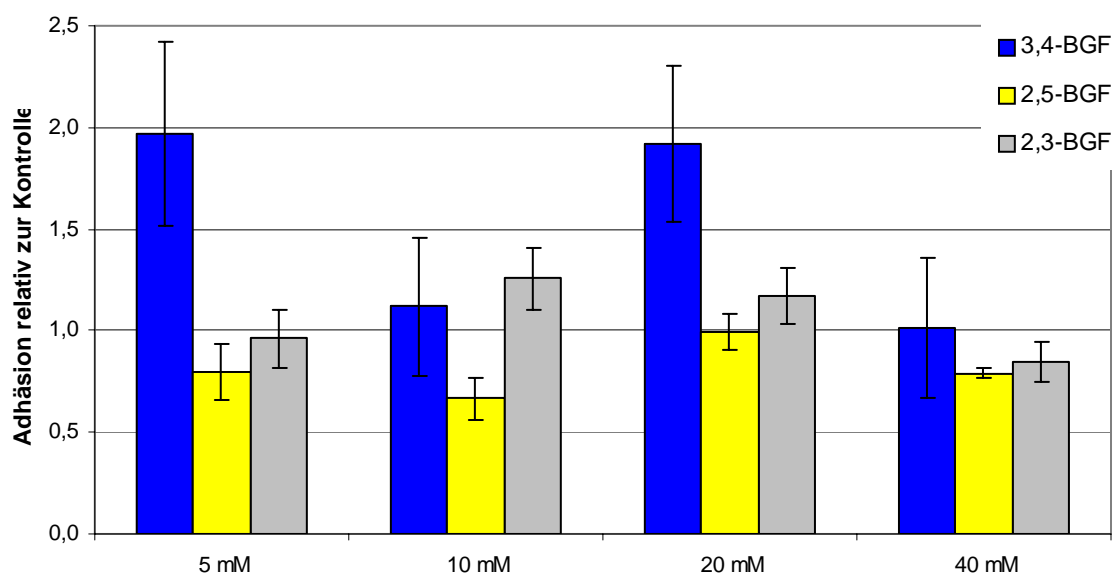


Abb. 31 Adhäsion der Zelllinie B16F1 an Vitronectin in Anwesenheit von Bis- β -D-galactopyranosyl-oxymethyl-furan-Derivaten

Die Inkubation der Zelllinie B16F1 mit allen drei getesteten BGF-Derivaten zeigt keine Dosisabhängigkeit und damit keine signifikante Beeinflussung der Adhäsion an Vitonectin. Die Werte der einzelnen Proben schwanken ohne eine offensichtliche Gesetzmäßigkeit um die Adhäsion der Kontrolle, wobei sich die teilweise sehr hohen Standardabweichungen beinahe immer überschneiden (siehe 9).

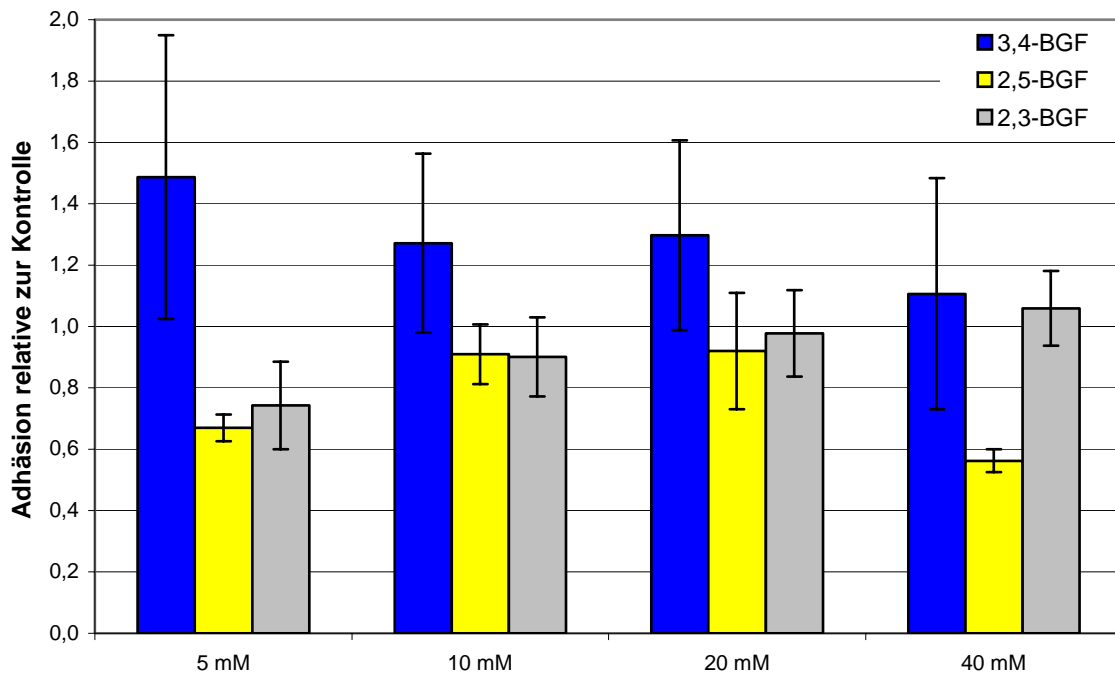


Abb. 32 Adhäsion der Zelllinie B16F1 an Laminin in Anwesenheit von Bis- β -D-galactopyranosyl-oxymethyl-furan-Derivaten

Tendenziell stimuliert 3,4-BGF die Adhäsion der Zelllinie B16F1 an Laminin in allen getesteten Konzentrationen, wobei auffällt, daß verglichen mit den übrigen BGF-derivaten auch hier die Standardabweichung der Werte sehr hoch ist. Diese Tatsache entspricht den Ergebnissen der Adhäsion von B16F1 Zellen an Vitronectin und könnte auf eine Metabolisierung des 3,4-BGF durch die Zellen zurückzuführen sein (siehe 9).

2,5-BGF beeinflusst die Adhäsion der B16F1 Zellen an Laminin, wie auch schon bei den anderen beiden getesteten ECM-Proteinen nur in vereinzelten Konzentrationen. Maximal ist die Inhibition bei 40 mM mit 40 %. 2,3-BGF vermag die Adhäsion der B16F1 Zellen an Laminin hingegen nicht signifikant zu beeinflussen.

Für die Zelllinie B16F1 ist damit keine Einfluß auf die Adhäsion an Fibronectin, Vitronectin oder Laminin durch die BGF-Derivate erkennbar, die einer offensichtlichen Gesetzmäßigkeit unterliegt. Eine geringe inhibitorische Wirkung und eine nicht dosisabhängige Stimulation der Adhäsion läßt sich zwar in vereinzelten Fällen

nachweisen, diese ist aber unspezifisch und damit für eine weitere Untersuchung nicht relevant.

Einfluß von 3,4-BGF auf die Adhäsion der humanen Zelllinie WM-115

Aus pharmazeutischer Sicht ist es zur Findung von Substanzen, welche zur humanen Krebstherapie eingesetzt werden sollen, notwendig, diese auch in einem menschlichen *in vitro*-System zu testen. Die anti-adhäsiven Eigenschaften von 2,5-BGF und 3,4-BGF sollen deshalb im folgenden für die humane Melanom-Zelllinie WM-115 untersucht werden. 3,4-BGF stellt von beiden Reagenzien die synthetisch leichter zugängliche Substanz dar. Da sie beinahe äquivalente Effekte verglichen mit 2,5-BGF auf den B16-Zellen aufwies, wurden die folgenden Adhäsions-Assays mit 3,4-BGF als Modellsubstanz durchgeführt.

Bei der Zelllinie WM-115 handelt es sich um ein gut charakterisiertes Modell, dessen molekulare Eigenschaften in der Literatur ausführlich beschrieben sind (siehe 5.5.2). Um die Anteile verschiedener Interaktionen an der gesamten Adhäsion und die Art der inhibierten Bindung detailliert charakterisieren zu können, wurden die ab jetzt durchgeführten Adhäsions-Assays nur noch an fibronectin- und fibrinogen-beschichteten Platten durchgeführt (siehe 9).

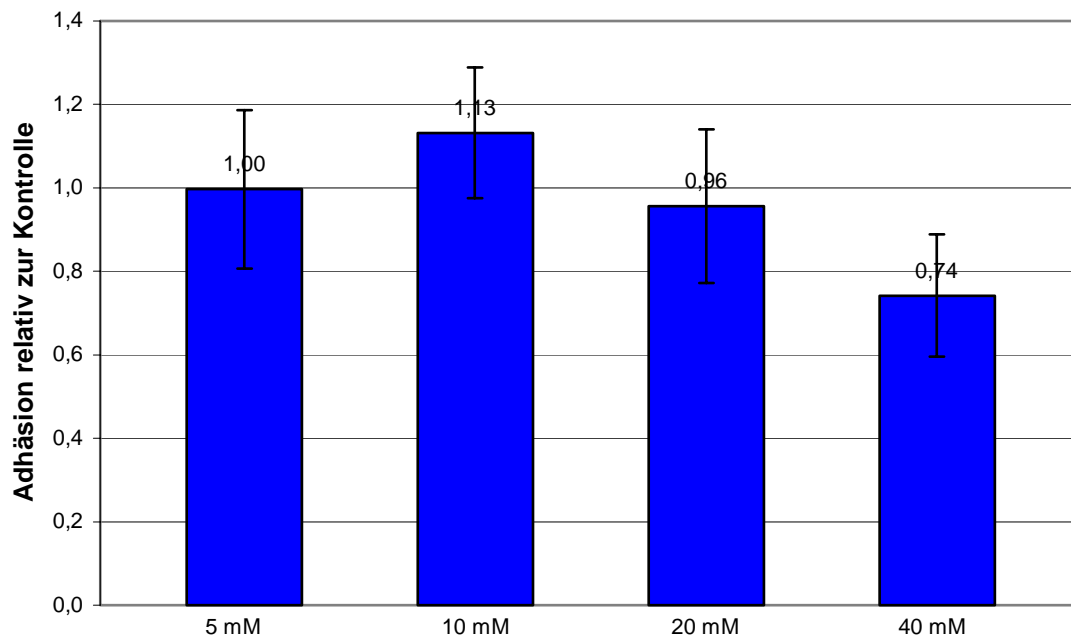


Abb. 33 Adhäsion der Zelllinie WM-115 an Fibronectin in Anwesenheit von 3,4-BGF

3,4-BGF inhibiert die Adhäsion der Zelllinie WM-115 an Fibronectin in 40 mM Konzentration um 26 %. Dieser wenn auch geringe Effekt entspricht der Inhibition der Zelllinie B16F10 an Fibronectin in Anwesenheit von 3,4-BGF. Damit ist das aus der Maus stammende Modell offensichtlich mit dem humanen Modell vergleichbar. Auffällig ist, daß in Anwesenheit einer 10 mM Lösung des Saccharidmimetikums die Adhäsion, wie auch schon die der B16-Mausmelanomlinie, am stärksten ist.

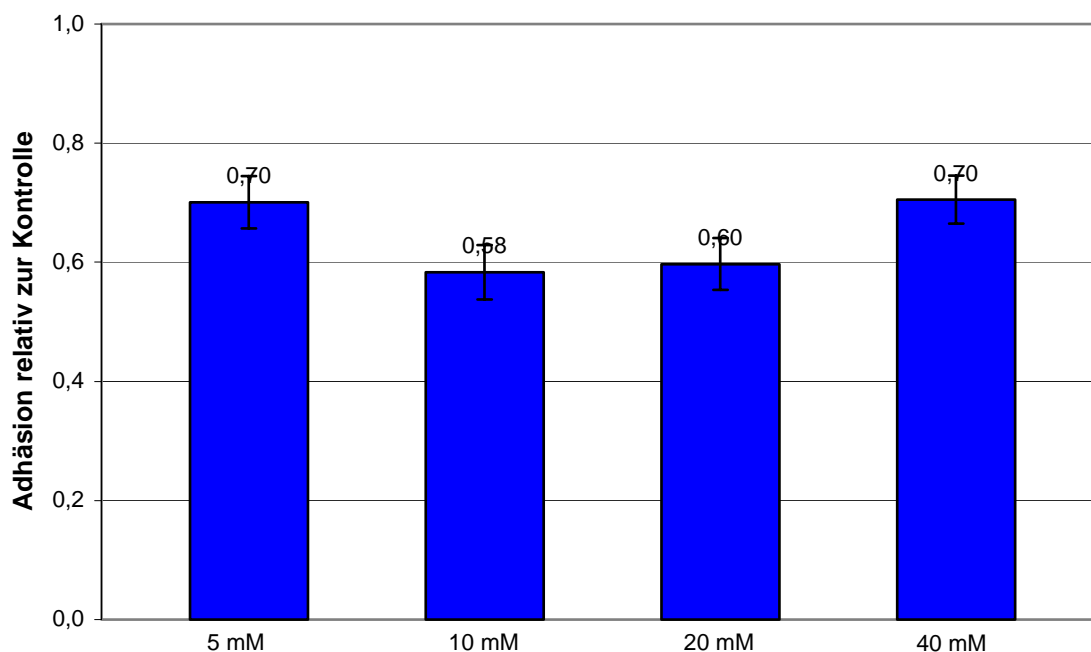
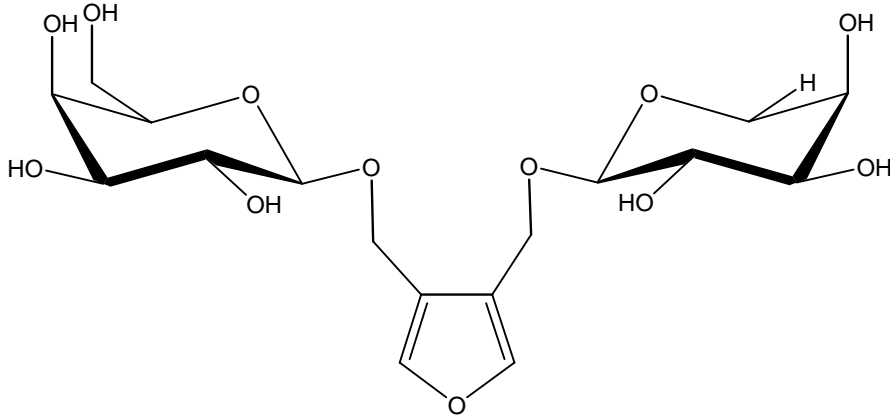


Abb. 34 Adhäsion der Zelllinie WM-115 an Fibrinogen in Anwesenheit von 3,4-BGF

3,4-BGF inhibiert bereits in niederen millimolaren Konzentrationen die Adhäsion der Zelllinie WM-115 an Fibrinogen um etwa 30 %. Im Rahmen der Meßgenauigkeit des Assays nimmt die Inhibition auch bei Erhöhung der Konzentration nicht mehr signifikant zu. Zur Findung einer Dosisabhängigkeit des anti-adhäsiven Effektes müßten Untersuchungen der Substanz in geringeren Konzentrationen durchgeführt werden.

3- β -L-Fucopyranosyl-oxymethyl-4- β -D-galactopyranosyl-oxymethyl-furan (FGF)



3- β -L-Fucopyranosyl-oxymethyl-4- β -D-galactopyranosyl-oxymethyl-furan (FGF)

Im folgenden soll getestet werden, ob sich durch Substitution eines Galactose-Restes durch eine Fucoseinheit die Bindung des furanbasierten Saccharidmimetikums an Oberflächenmoleküle, welche für eine Zell-Matrix-Interaktion von Bedeutung sind, erhöhen läßt.

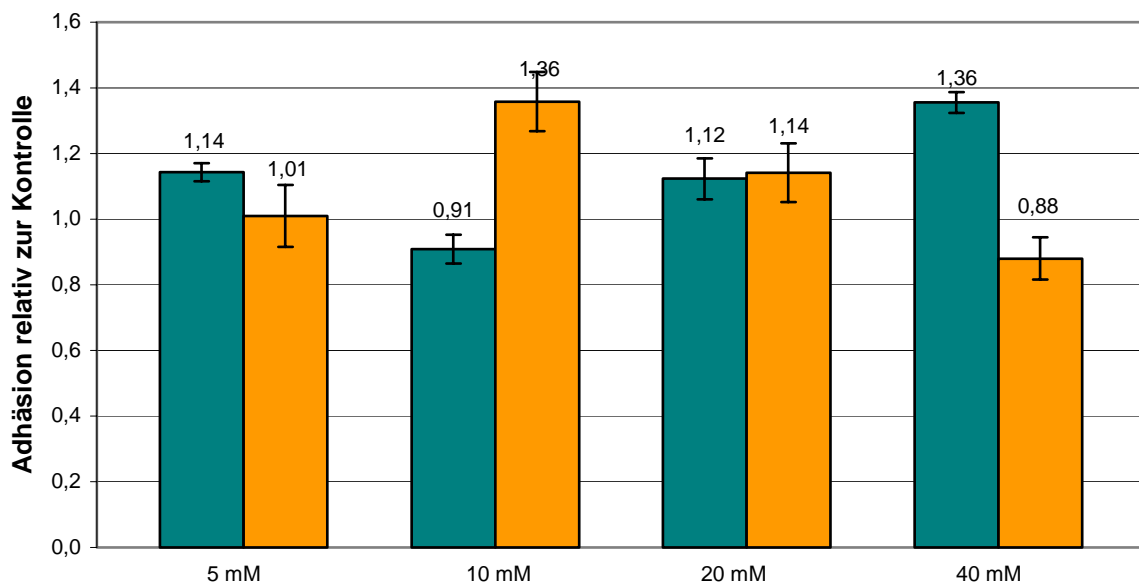


Abb. 35 Adhäsion der Zelllinien B16F1 (grün) und B16F10 (orange) an Fibronectin in Anwesenheit von 3- β -L-Fucopyranosyl-oxymethyl-4- β -D-galactopyranosyl-oxymethyl-furan

FGF ist nicht in der Lage, die Adhäsion der Zelllinien B16F1 oder B16F10 an Fibronectin signifikant zu hemmen. Lediglich eine gering gesteigerte Affinität einzelner Proben an die ECM ist erkennbar, welche jedoch nicht signifikant ist.

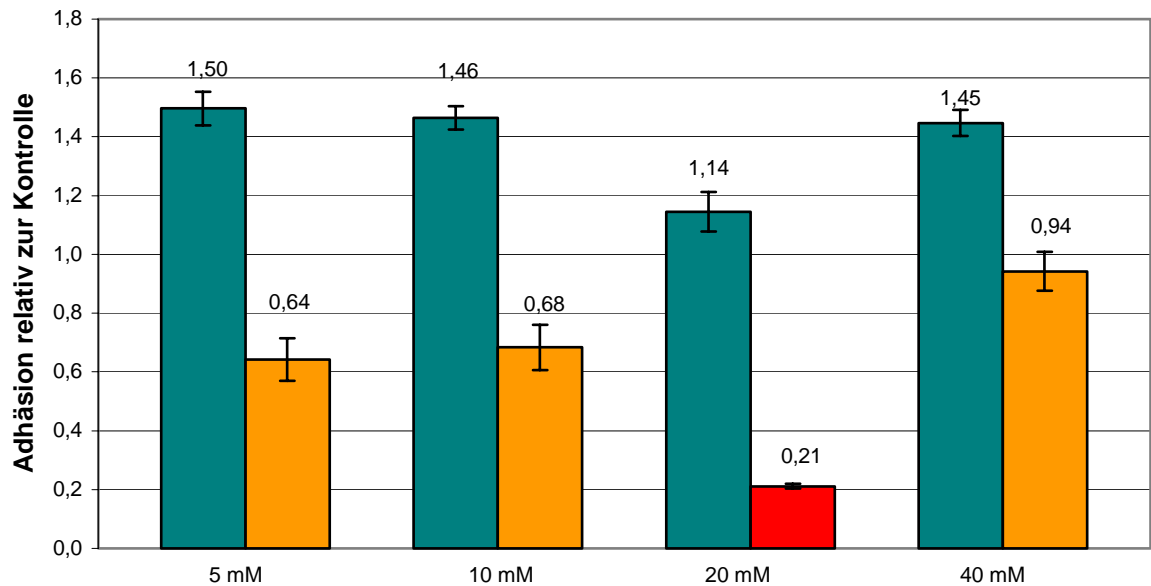


Abb. 36 Adhäsion der Zelllinien B16F1 (grün) und B16F10 (orange) an Vitronectin in Anwesenheit von 3-β-L-Fucopyranosyl-oxymethyl-4-β-D-galactopyranosyl-oxymethyl-furan. Der rote Balken zeigt einen „falschen“ Wert.

FGF erhöht die Affinität der Zelllinie B16F1 an das ECM-Protein Vitronectin um etwa 50 % in allen Konzentrationen außer in 20 wo nur eine leichte Steigerung der Adhäsion um 14 % zu erkennen ist.

Bei der Zelllinie B16F10 zeigt FGF allerdings ein geringes Inhibitionspotential und hemmt die Adhäsion der Zellen an Vitronectin um 30 %. Dieser Effekt ist jedoch nicht dosisabhängig und könnte somit auch auf eine Veränderung der Oberflächenstruktur der Zellen zurückzuführen sein.

Anhand eines falschen Wertes des Assays, soll an dieser Stelle kurz verdeutlicht werden, warum eine Vitalkontrolle der Zellen nach Beendigung des Assays unbedingt nötig ist: Der Wert für eine Inkubation mit 20 mM FGF zeigt eine geringe Adhäsion der Zellen. Es stellte sich aber bei der Vitalkontrolle der Proben heraus, daß die meisten Zellen dieser Probe tot waren. Zur Identifizierung solcher „falsch positiven“ Ergebnisse

wurden daher stets alle Proben der Adhäsions-Assays mittels Trypan-Blau auf ihre Vitalität überprüft.

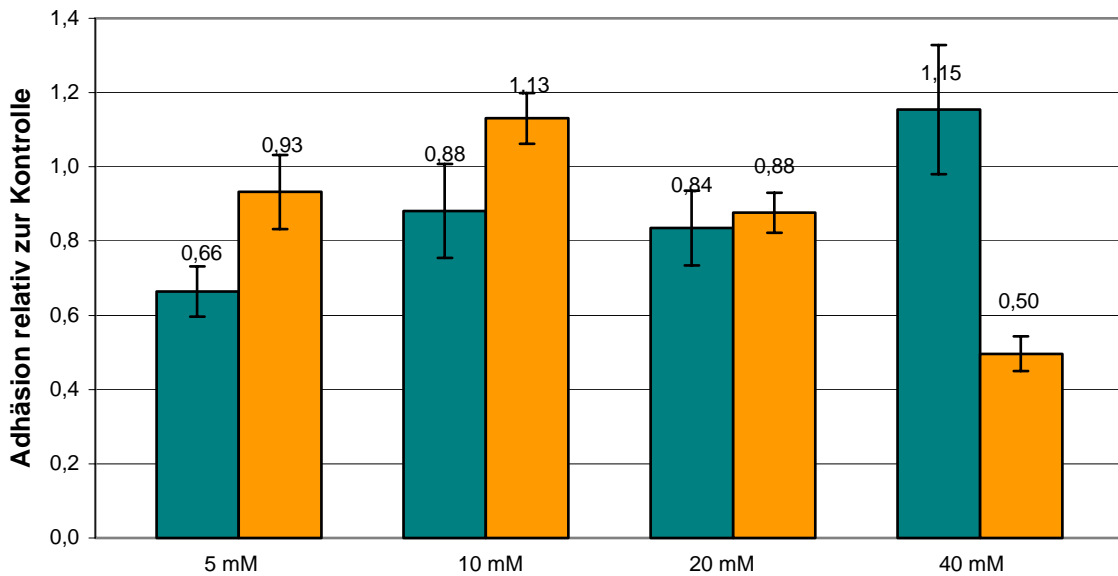


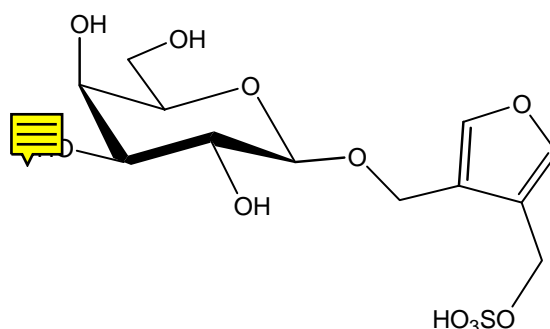
Abb. 37 Adhäsion der Zelllinien B16F1 (grün) und B16F10 (orange) an Laminin in Anwesenheit von 3-β-L-Fucopyranosyl-oxymethyl-4-β-D-galactopyranosyl-oxymethyl-furan

Auf die Adhäsion der Zelllinie B16F1 an Laminin zeigt FGF keinen signifikanten Einfluß. Zwar inhibiert eine Inkubation der Zellen mit 5 mM Saccharidlösung die Adhäsion um 34 %, eine Erhöhung der Konzentration ergibt jedoch wieder eine Affinität an die ECM, die mit der der Kontrolle vergleichbar ist.

Für einen Rückgang der Adhäsion der B16F10-Zellen auf 60 % der Adhäsion der Kontrolle, sorgt eine Inkubation mit 40 mM FGF. Niedrigere Konzentrationen haben hingegen keinen signifikanten Einfluß auf die Adhäsion der Zellen an Laminin.

3- β -D-Galactopyranosyl-oxymethyl-4-sulfatomethyl-furan (GSF)

Nachdem der Austausch einzelner Zuckerbausteine bzw. deren positionelle Variation am furanoiden Grundgerüst nur geringe Effekte auf die Adhäsion der Melanomzellen gezeigt hat, sollte als weiterer funktioneller Baustein eine ladungstragende Gruppe in das Molekül eingeführt werden. Diese besitzt das Potential, eine elektrostatische und damit starke Wechselwirkung zwischen dem Saccharidmimetikum und einem Rezeptor auszubilden und damit die Rezeptorfunktion zu blockieren. Als ladungstragende Einheit wurde von B. Meister^[77.] mit einem Sulfatrest eine funktionelle Gruppe gewählt, welche als Bestandteil von Oligosacchariden, Glycoproteinen und Glucosaminoglycanen auch in der Natur vorkommt.



3- β -D-Galactopyranosyl-oxymethyl-4-sulfatomethyl-furan (GSF)

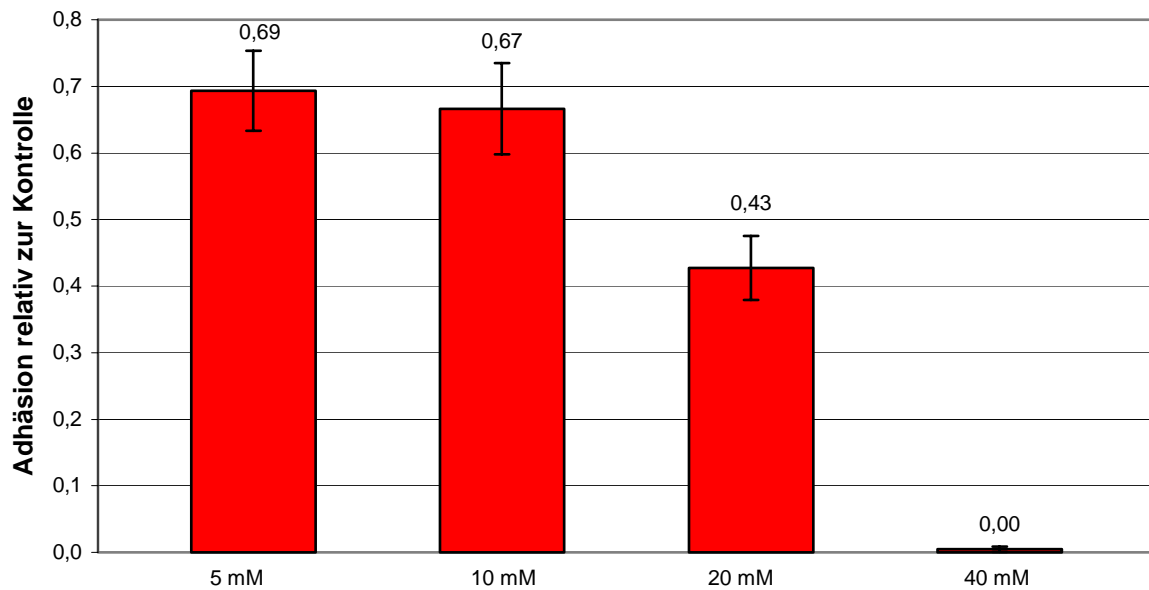


Abb. 38 Adhäsion der Zelllinie B16F10 an Fibronectin in Anwesenheit von 3-β-D-Galactopyranosyl-oxymethyl-4-sulfatomethyl-furan

GSF inhibiert die Adhäsion der Zelllinie B16F10 an Fibronectin bereits in einer Konzentration von 5 mM um etwa 30 %. Eine Vervielfachung der Konzentration zeigt eine Dosisabhängigkeit des anti-adhäsiven Effektes und verringert die Adhäsion der Zellen an Fibronectin in einer Konzentration von 20 mM bereits um 63 %. 40 mM GSF inhibiert die Adhäsion der Zellen an die ECM sogar vollständig, ohne bei der Vitalitätskontrolle einen akuten toxischen Effekt zu zeigen.

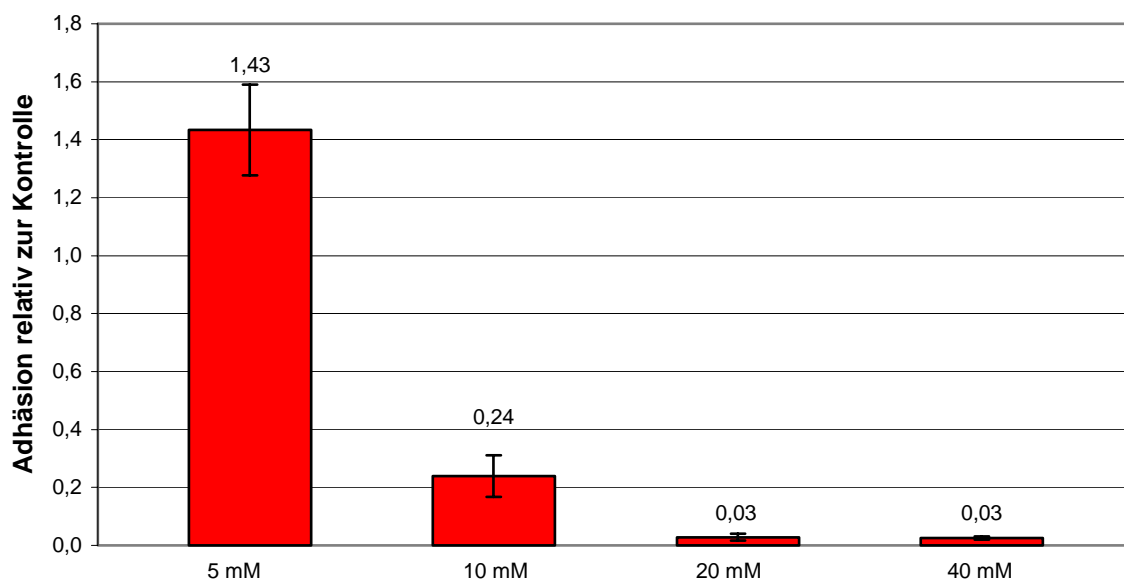


Abb. 39 Adhäsion der Zelllinie B16F10 an Fibrinogen in Anwesenheit von 3- β -D-Galactopyranosyl-oxymethyl-4-sulfatomethyl-furan

Während GSF in einer Konzentration von 5 mM noch keinen inhibitorischen Einfluß auf die Adhäsion der Zelllinie B16F10 an Fibrinogen aufweist, sondern diese sogar leicht stimuliert, inhibiert eine 10 mM Lösung die Adhäsion bereits um 76 %. Ab 20 mM ist eine vollständige Hemmung der Bindung an Fibrinogen erreicht, welche auch in der höheren Konzentration erhalten bleibt.

Die Beobachtung der vollständigen Inhibition der Adhäsion des B16F10 Maus-Melanoms führte zu einer intensiven Testung der Substanz an humanen WM-115 Zellen. Zum Nachweis der biologisch aktiven Komponente von GSF wurden 3,4-BGF, Bishydroxymethyl-furan (BHMF) und Methyl- β -D-galactopyranosid (Me-Gal) in die Untersuchung einbezogen. Zuckerfreies 3-Sulfatomethyl-furan ließ bereits nach 2 h Inkubationszeit eine akute Toxizität erkennen (siehe 8.2.2) und ist daher als weitere Kontroll-Substanz in den von uns getesteten Konzentrationen nicht von Bedeutung.

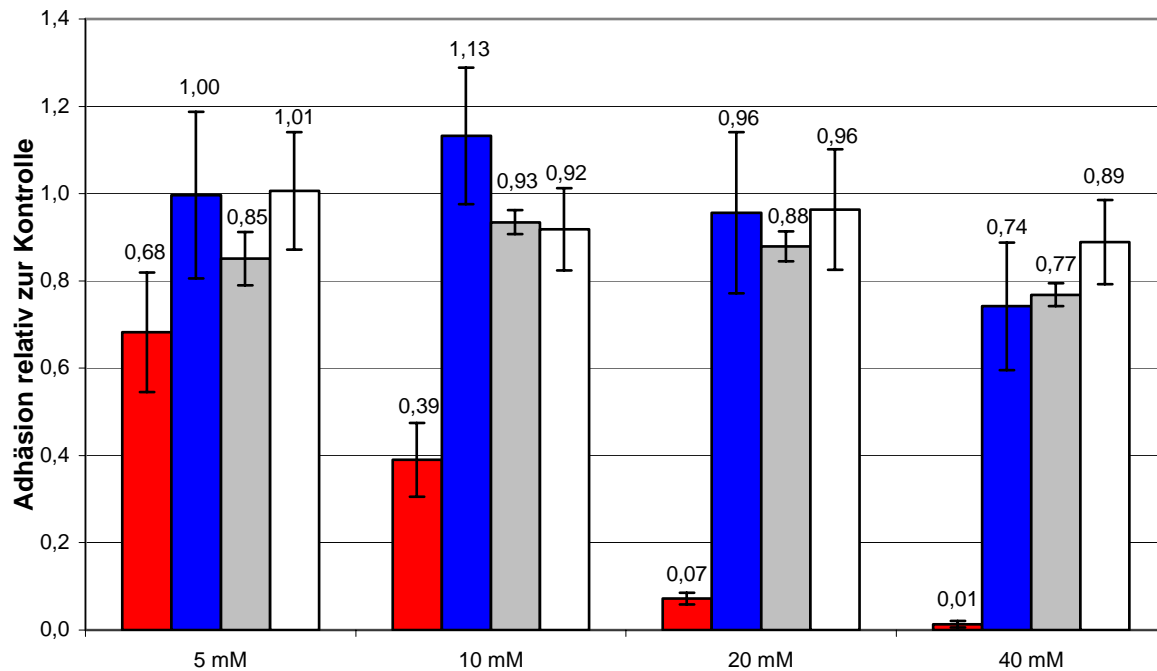


Abb. 40 Adhäsion der Zelllinien WM-115 an Fibronectin in Anwesenheit von GSF (rot), 3,4-BGF (blau), BHMf (grau) und Me-Gal (weiß)

GSF inhibiert die Adhäsion der humanen Melanom-Zelllinie WM-115 an Fibronectin in einer Konzentration von 5 mM um 32 %. Dieser inhibitorische Effekt läßt sich mit Verdopplung der Konzentration auf 61 % steigern und erreicht mit einer 93 %-igen Hemmung bei 20 mM und einer 100 %-igen Hemmung bei 40 mM seine Vollständigkeit.

Sowohl 3,4-BGF als auch BHMf und Me-Gal zeigen nach Berücksichtigung der Meßgenauigkeit des Assays keinen signifikanten Einfluß auf die Adhäsion der humanen Melanomzellen an Fibronectin.

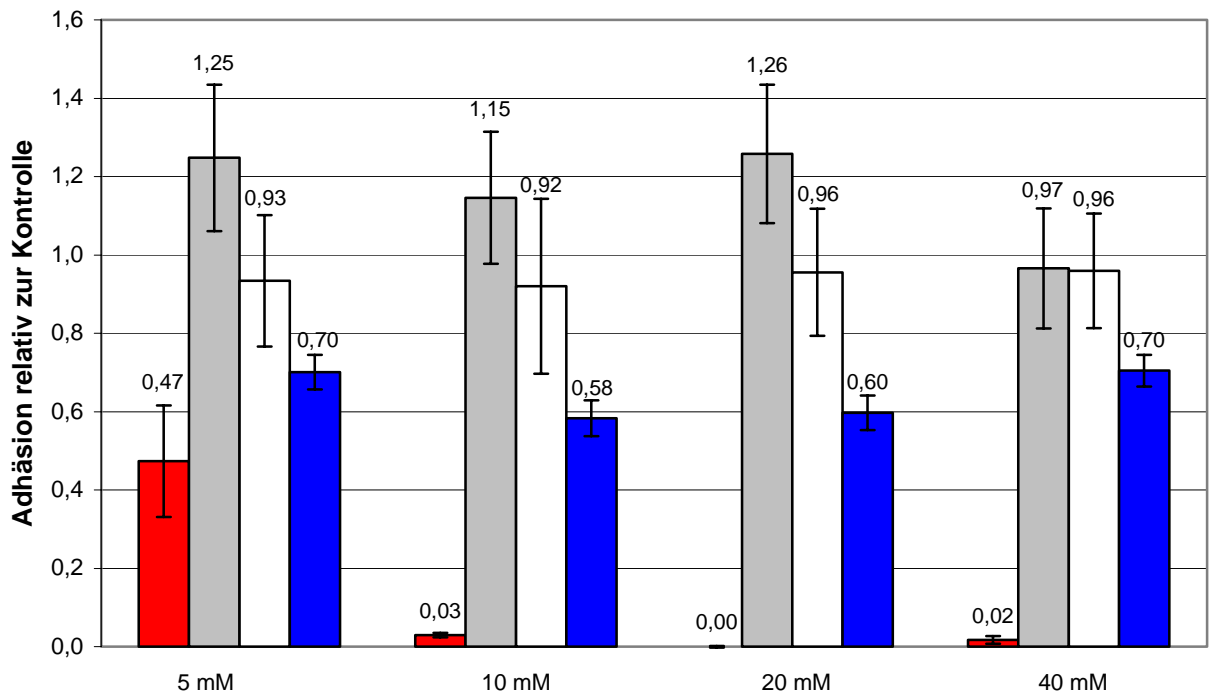


Abb. 41 Adhäsion der Zelllinien WM-115 an Fibrinogen in Anwesenheit von GSF (rot), 3,4-BGF (blau), BHMf (grau) und Me-Gal (weiß)

GSF inhibiert die Adhäsion von WM-115 Zellen an Fibrinogen in einer Konzentration von 5 mM bereits um 53 %. Eine Inkubation mit einer 10 mM Lösung hat den vollständigen Adhäsionsverlust der Zellen zur Folge, der auch in höheren Konzentrationen erhalten bleibt. 3,4-BGF zeigt unabhängig von den getesteten Konzentrationen eine Inhibition von etwa 35 %. BHMf und Me-Gal haben auf die Adhäsion der Zellen an Fibrinogen, wie auch schon im Falle des ECM-Proteins Fibronectin, keinerlei Einfluß.

Die vollständige Inhibition der Adhäsion der Zelllinie WM-115 an die beiden ECM-Proteine Fibronectin und Fibrinogen weist darauf hin, daß das geladene Saccharidmimetikum GSF neben einer Protein-Saccharid-Interaktion oder einer Saccharid-Saccharid-Interaktion auch Protein-Protein-Interaktionen auf der Zelloberfläche beeinflussen kann. Gingen wir bisher davon aus, daß durch die synthetischen Saccharidmimetika insbesondere lectinartige Rezeptoren angesprochen

werden, müssen wir nun annehmen, daß auch die ebenfalls an der ECM-Adhäsion beteiligten festeren Protein-Protein-Interaktionen von GSF inhibiert werden können. Diese werden durch eine Bindung von membranständigen Integrin-Rezeptoren an Peptidsequenzen in der ECM geknüpft und im Abschnitt 5.2.2 dieser Arbeit ausführlich beschrieben.

Mit Fibronectin und Fibrinogen fiel unsere Wahl auf zwei Bestandteile der ECM, deren peptidische Bindungsliganden und zugehörigen Integrin-Rezeptoren in der Literatur ausführlich beschrieben sind. Fibrinogen stellt hierbei ein sehr spezifisches Protein dar, dessen Tripeptid-Sequenz Arg-Gly-Asp (RGD) nur von den Integrinen $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_{IIb}\beta_3$ erkannt und gebunden werden kann^[78.]. Fibronectin hingegen enthält neben der RGD-Sequenz, ein weiteres Bindungsmotiv mit der Sequenz Glu-Ile-Leu-Asp-Val (EILDV). Diese Sequenz kann durch das Integrin $\alpha_4\beta_1$ erkannt und gebunden werden und hat, wie wir noch sehen werden, einen signifikanten Anteil an der Adhäsion der WM-115 Zellen an Fibronectin.

Im folgenden wurden Adhäsionsversuche mit künstlich hergestellten, peptidischen Integrin-Liganden und einer Kombination aus diesen und dem von uns synthetisierten GSF durchgeführt. Dies dient zum Einen der Identifizierung der von GSF adressierten Oberflächenrezeptoren und zum Anderen der Verringerung der relativ hohen GSF-Konzentration in einer kombinierten Behandlung der Zellen.

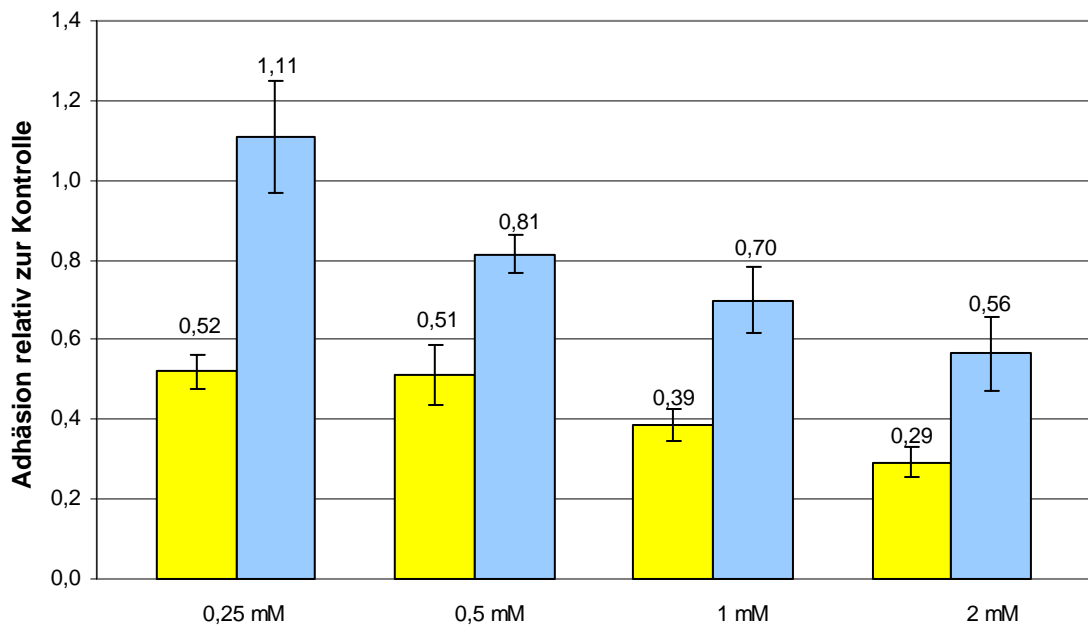


Abb. 42 Adhäsion der Zelllinie WM-115 an Fibronectin in Anwesenheit der synthetischen Integrin-Liganden GRGDSP (gelb) und EILDV (hellblau)

Das Pentapeptid EILDV, welches selektiv durch den Integrin-Rezeptor $\alpha_4\beta_1$ erkannt und gebunden wird, hemmt die Adhäsion der Zelllinie WM-115 an Fibronectin in einer Konzentration von 2 mM um 44 %. Die Inhibition ist zunächst dosisabhängig, läßt sich jedoch durch Inkubation mit Peptid-Konzentrationen, die größer als 2 mM sind, nicht weiter signifikant steigern. Daher wurde eine 2 mM Peptid-Lösung als geeignete Konzentration für die folgenden Adhäsions-Assays in Kombination mit GSF gewählt.

Das RGD-beinhaltende Hexapeptid GRGDSP inhibiert die Adhäsion der WM-115 Zellen an Fibronectin in einer Konzentration von 1 mM bereits um 61 %. Übereinstimmend mit Angaben aus der Literatur kann die Inhibition auch durch Steigerung der Peptid-Konzentration nicht mehr signifikant verbessert werden^[81]. Eine GRGDSP-Konzentration von 1 mM wurde daher als geeignete Konzentration für die Kombination mit GSF festgelegt.



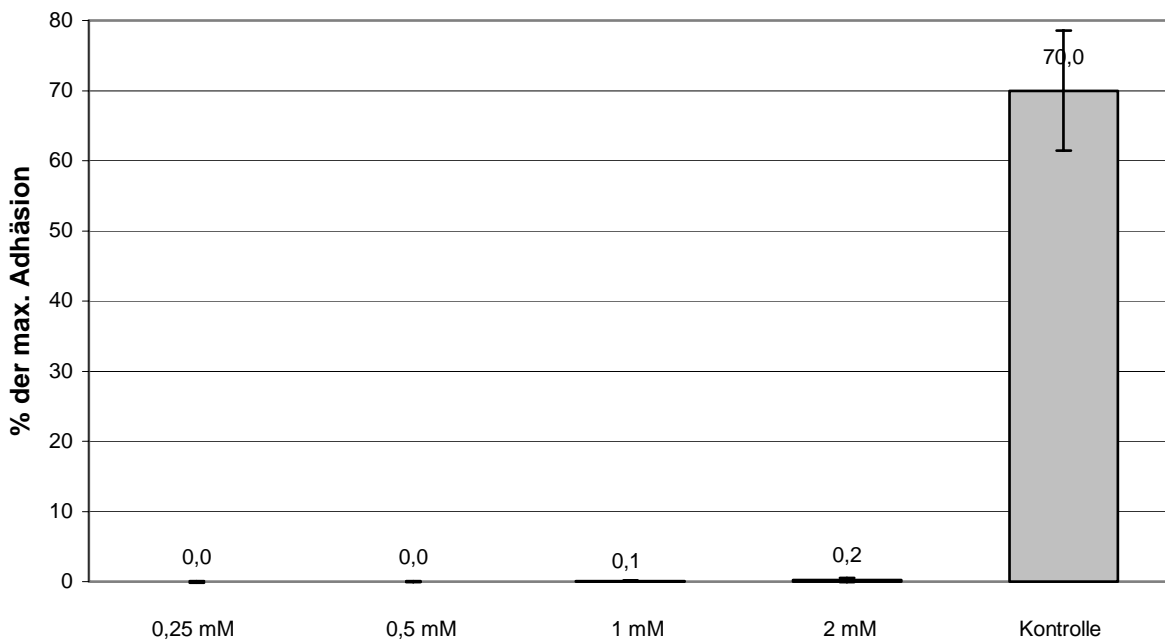


Abb. 43 Adhäsion der Zelllinie WM-115 an Fibrinogen in Anwesenheit des synthetischen Integrin-Liganden GRGDSP

Das Hexapeptid GRGDSP inhibiert die Adhäsion der Zelllinie WM-115 an Fibrinogen bereits in einer Konzentration von 250 μ M vollständig. Es blockiert damit das fibrinogenspezifische Integrin $\alpha_v\beta_3$ komplett und beweist, daß weitere Zell-ECM-Interaktionen für die Adhäsion der Zellen an Fibrinogen keine Rolle spielen.

Zur Charakterisierung der durch GSF adressierten Rezeptoren reicht somit eine Untersuchung der adhäsiven Eigenschaften von WM-115 Zellen an Fibronectin in Gegenwart der verschiedenen Inhibitoren aus.

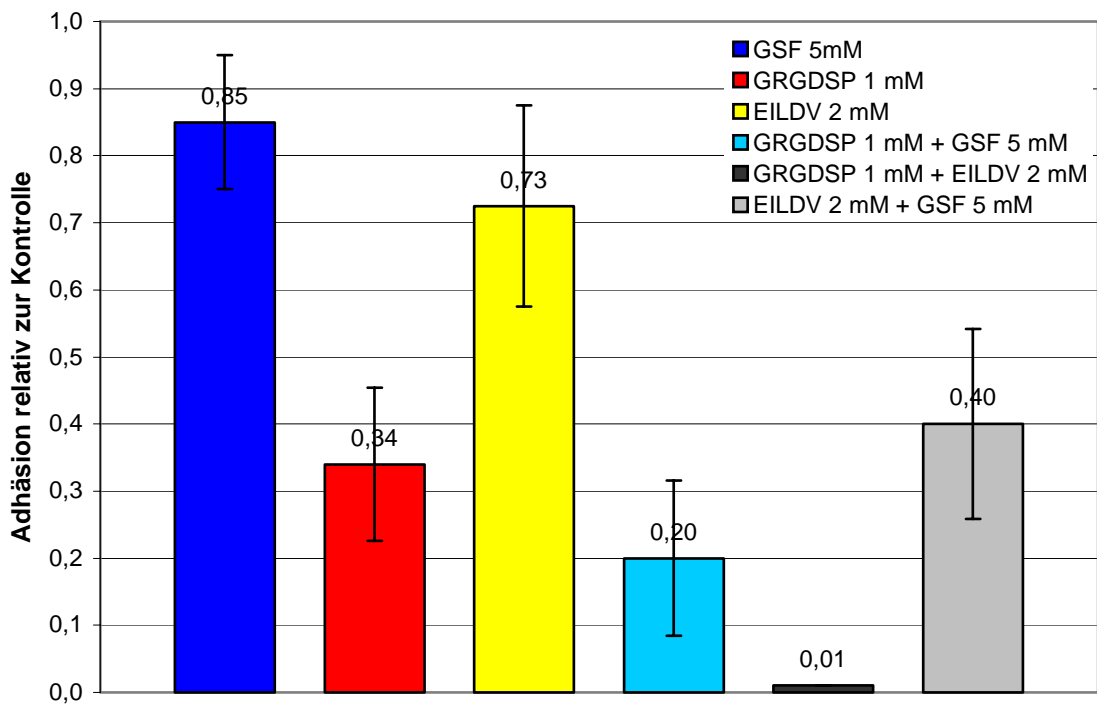


Abb. 44 Adhäsion der Zelllinie WM-115 an Fibronectin in Anwesenheit der synthetischen Integrin-Liganden EILDV und GRGDSP sowie des Saccharidmimetikums GSF und Kombinationen aller Komponenten

Das geladene Saccharidmimetikum GSF inhibiert die Adhäsion der WM-115 Zellen an Fibronectin in einer Konzentration von 5 mM lediglich um 15 %. Der $\alpha_4\beta_1$ -Ligand EILDV hemmt hingegen in 2 mM Konzentration die Adhäsion der Zellen um 27 % und 1 mM GRGDSP um 66 %.

Kombiniert man die einzelnen Inhibitoren in den angegebenen Konzentrationen erhält man für EILDV+GSF einen 60 %-igen, für GRGDSP+GSF einen 80 %-igen und für GRGDSP+EILDV einen 100 %-igen Rückgang der Adhäsion. Die Kombination aus RGD-Peptid und Saccharidmimetikum erzielt damit einen additiven Effekt, während EILDV+GSF sogar eine über-additive Wirkung haben. Somit verbessert sich die Wirksamkeit unseres Saccharidmimetikums durch Kombination mit peptidischen Integrin-Liganden erheblich.

Bemerkenswert ist, daß die beiden peptidischen Integrin-Liganden gemeinsam in unserem *in vitro*-Modell die Adhäsion der Zellen an Fibronectin vollständig hemmen.

Ein Anteil einer Zucker-Lectin-Interaktion an der Adhäsion der WM-115 Zellen an Fibronectin ist nicht mehr nachweisbar und kann somit auch nicht durch das geladene Saccharidmimetikum beeinflusst werden.

7.1.4 Charakterisierung des Integrinmusters auf der Zelloberfläche von humanen Melanom-Zellen

GSF zeigt als geladenes Saccharidmimetikum eine inhibitorische Wirkung auf die Adhäsion humaner Melanomzellen an verschiedene ECM-Proteine. Diese ist unter anderem, wie wir durch die Adhäsions-Assays bewiesen haben, auf einen Verlust der Bindung verschiedener Integrin-Rezeptoren an die ECM zurückzuführen. Die Adhäsion der Zellen an Fibrinogen und deren vollständige Inhibition durch das Tripeptid RGD beweisen zwar die Existenz des einzigen fibrinogenbindenden Integrins $\alpha_v\beta_3$ auf der untersuchten Zelllinie WM-115, allerdings sagt die Bindung der Zellen an Fibronectin nur wenig über das weitere Integrinmuster auf der Zelloberfläche aus. Fibronectin kann nämlich von verschiedenen Rezeptoren der Integrin-Familie erkannt und gebunden werden.

Desweiteren wurde ein offensichtlicher Unterschied der Zelllinien WM-115 und WM-266-4 in ihren adhären Eigenschaften beobachtet. Während WM-115-Zellen die aus einem Primärtumor isoliert wurden in ihrer Kulturflasche einen dichten Monolayer bilden, in dem die Zellen in engem Kontakt sind, besteht der konfluente Zellrasen der Zelllinie WM-266-4 eher aus einem chaotisch anmutenden, lose verknüpften Netzwerk einzelner Zellen. Die aus einer Metastase des WM-115 Melanoms isolierte Zelllinie WM-266-4 bindet außerdem schwächer an die ECM und die Zellen scheinen innerhalb ihres Kulturgefäßes sehr mobil zu sein. Dieser phänotypische Unterschied des Primärtumors und seiner Metastase könnte auf eine Differenz im Muster der ECM-bindenden Oberflächenrezeptoren zurückzuführen sein.

Mit Hilfe der Durchflußzytometrie soll daher im folgenden das Integrinmuster der Zelllinien WM-115 und WM-266-4 charakterisiert und verglichen werden.

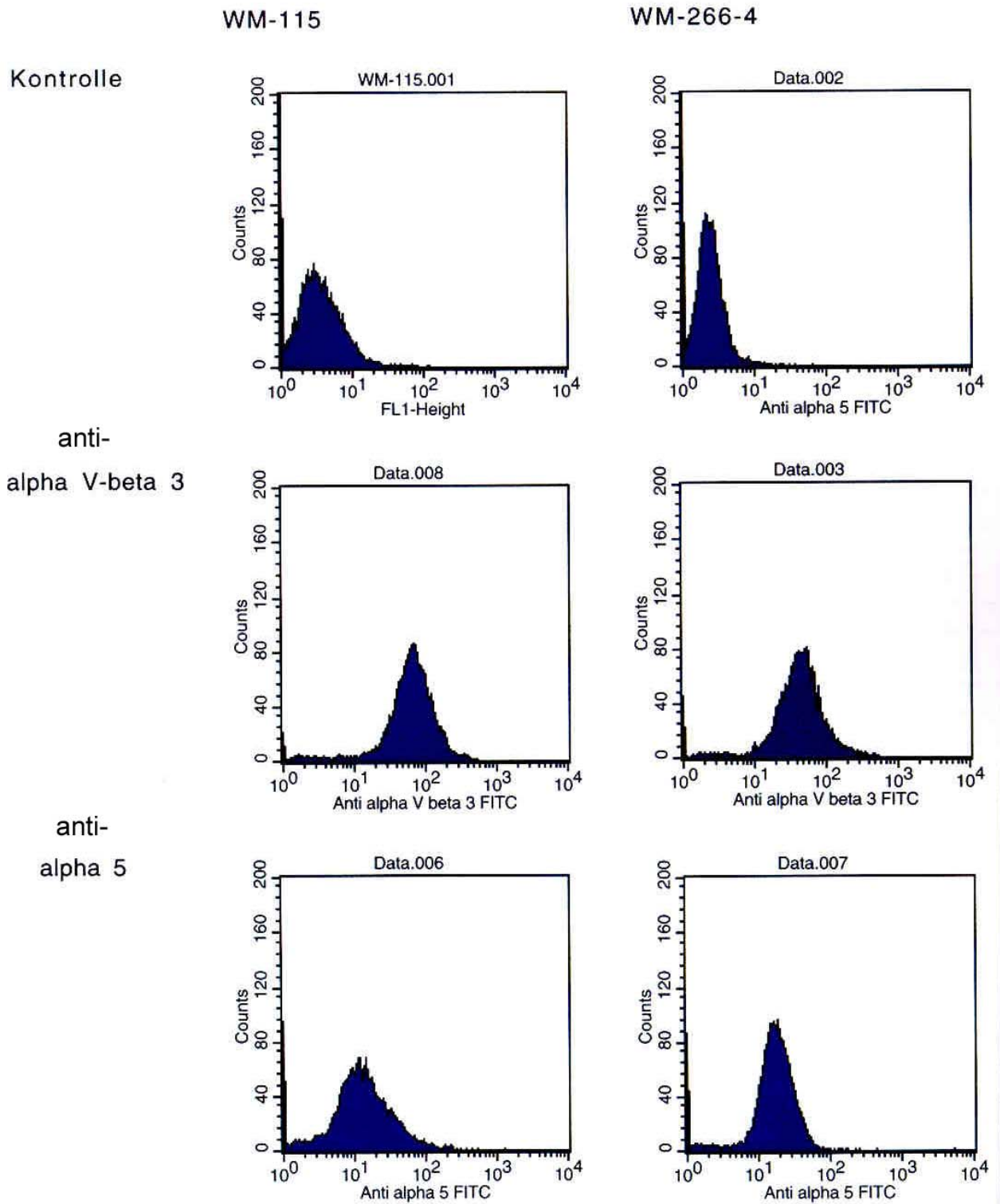


Abb. 45 Nachweis des Integrins $\alpha_v\beta_3$ sowie der α_5 -Integrin-Untereinheit auf der Zelloberfläche der Zelllinien WM-115 und WM-266-4 mittels FACS-Analyse

Die Zelllinien WM-115 und WM-266-4 binden beide eine signifikante Menge des Antikörpers gegen das Integrin $\alpha_v\beta_3$. Ein Unterschied in der Menge des membranständigen Integrins ist zwischen den beiden Zelllinien nicht erkennbar.

Ebenso binden Zellen beider Linien eine äquivalente Menge des Antikörpers gegen die α_5 -Integrin-Untereinheit. Diese bildet zusammen mit der β_1 -Untereinheit ein fibronectin-bindendes Heterodimer.

Eine spezifische Bindung von Antikörpern gegen die α_4 -Integrin-Untereinheit konnte mittels FACS für keine der beiden Zelllinien nachgewiesen werden. Dies widerspricht einer EILDV-spezifischen Hemmung der Adhäsion von WM-115 Zellen an Fibronectin (siehe Tab. 1)

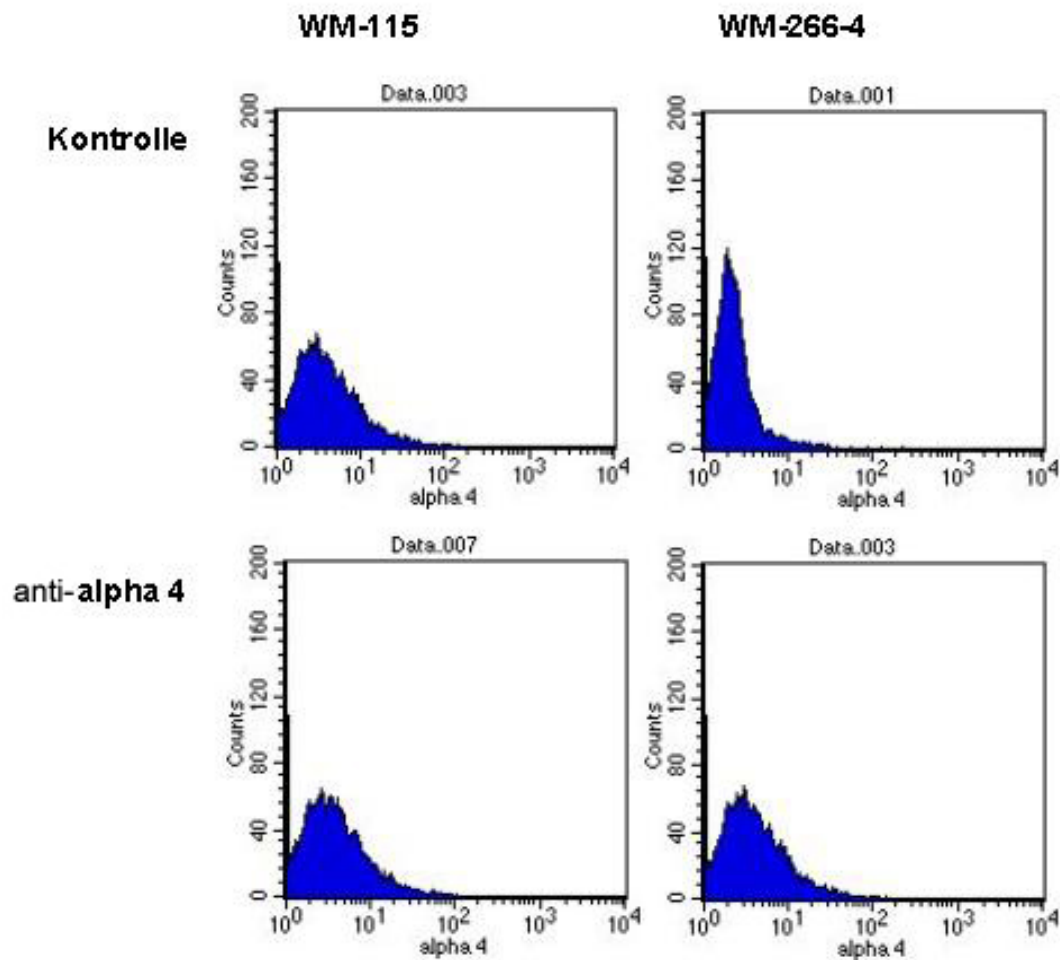


Abb. 46 Nachweis der α_4 -Integrin-Untereinheit auf der Zelloberfläche der Zelllinien WM-115 und WM-266-4 mittels FACS-Analyse

Eine Bindung von α_3 -spezifischen Antikörpern konnte für die beiden Zelllinien WM-115 und WM-266-4 mittels FACS ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Diese Untereinheit bildet zusammen mit der β_1 -Untereinheit ebenfalls ein RGD-erkennendes Integrin, welches an Fibronectin binden kann (siehe Tab. 1).

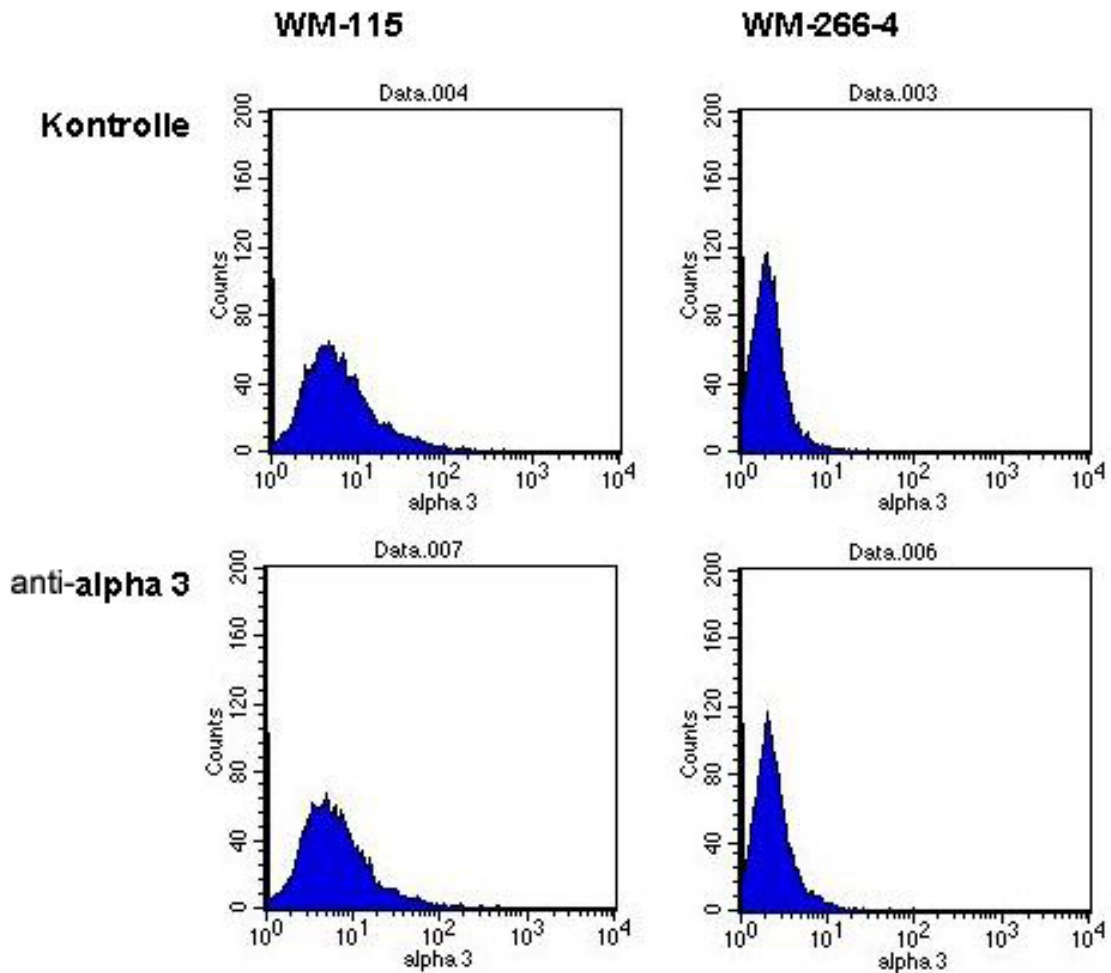


Abb. 47 Nachweis der α_3 -Integrin-Untereinheit auf der Zelloberfläche der Zelllinien WM-115 und WM-266-4 mittels FACS-Analyse

Damit konnte für die beiden Zelllinien WM-115 und WM-266-4 die Existenz der Integrine $\alpha_3\beta_3$ sowie der α_5 -Untereinheit auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Ein Unterschied in der Anzahl an Integrinrezeptoren ließ sich für die beiden Zelllinien nicht zeigen.

7.2 Untersuchung der Zytotoxizität der Saccharidmimetika

7.2.1 Bestimmung der Zytotoxizität der Cyclohexan-Derivate

Sowohl in Adhäsions-Assays (s. 8.1.2) als auch in Invasions-Assays^[82.], in welchen die auf Cyclohexan basierenden Saccharidmimetika Di-Gal und Tri-Gal untersucht wurden, war bisher keine akute Zytotoxizität der Substanzen erkennbar. Um diese Beobachtung zu verifizieren, wurde im folgenden die Wirkung der Substanzen auf das Zellwachstum untersucht. Hierzu wurden 2000 Zellen der Zelllinie B16F10 pro well einer 96-well-Platte ausgesät und 48 h bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurde das Medium gegen 100 µl einer je 40 mM Lösung der zu untersuchenden Substanz ausgetauscht und die Zellen wurden weitere 48 h inkubiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels SRB-Assay.

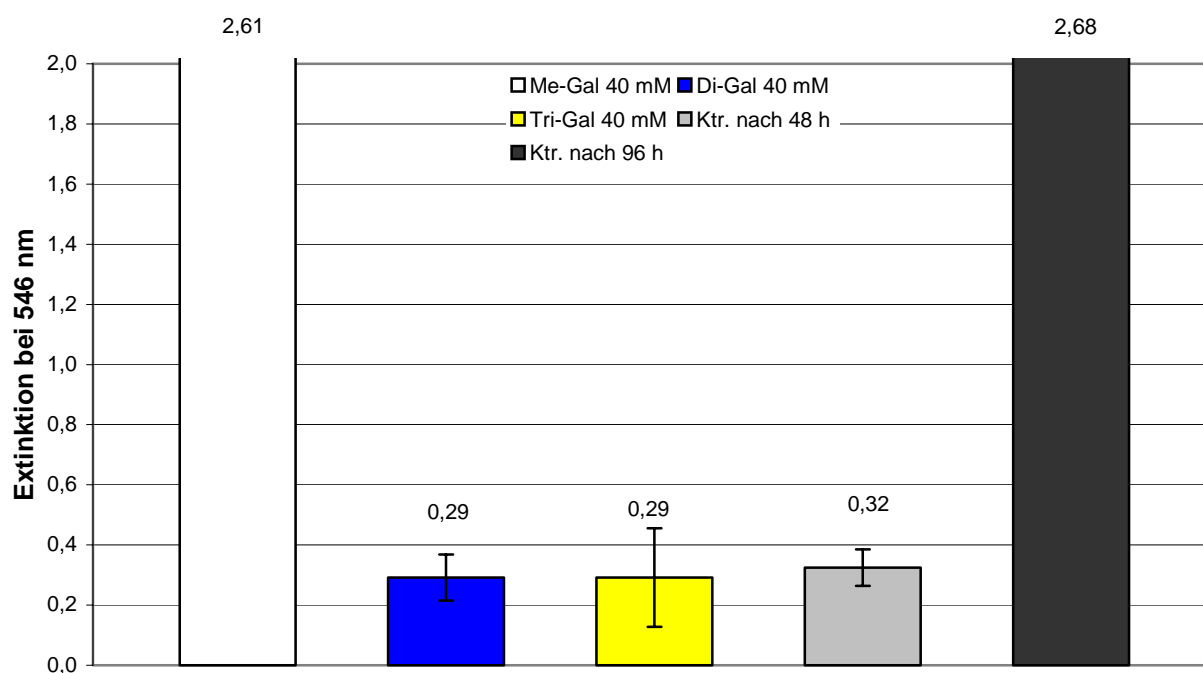


Abb. 48 Wachstum von B16F10 Zellen in Anwesenheit der Cyclohexan-Derivate Di-Gal und Tri-Gal und der Kontrollsubstanz Me-Gal

Nach 48 h Inkubationzeit haben die B16F10 Zellen eine Proteinmenge synthetisiert, welche nach Färbung mit SRB einer Extinktion von 0,32 entspricht. Nach weiteren

48 h Inkubation haben die reagenzfreien Zellen eine Extinktion größer 2 erreicht und sind, optisch beurteilt, konfluent.

Zellen, die 48 h lang mit einer 40 mM Lösung Methyl- β -D-galactopyranosid inkubiert wurden, zeigen nach insgesamt 96 h Wachstum eine der reagenzfreien Kontrolle äquivalente Menge an Protein. Die mit 40 mM Di-Gal bzw. Tri-Gal inkubierten Zellen zeigen hingegen eine Extinktion von 0,29 was ihrer Proteinmenge nach 48 h Wachstum entspricht. Die Zellen haben demnach ihr Wachstum nach Zugabe des jeweiligen Saccharidmimetikums eingestellt, was die mikroskopische Auswertung der Proben bestätigte, sind jedoch nicht abgestorben.

Di-Gal und Tri-Gal erzeugen somit in 40 mM Konzentration zwar eine Zytostase, aber keine Zytotoxizität. Methyl- β -D-galactopyranosid hat auch in einer Konzentration von 40 mM keinen Einfluß auf das Wachstum der Zelllinie B16F10.

7.2.2 Bestimmung der Zytotoxizität der Furan-Derivate

3-Galactopyranosyl-oxymethyl-4-sulfatomethyl-furan (GSF)

Zur Bestimmung der Zytotoxizität von (GSF) wurde die humane Melanom-Linie WM-115 verwendet. Während in den Adhäsions-Assays keine akute Toxizität der Substanz nach 2 h festgestellt werden konnte, war nach länger andauernder Inkubation ein Ablösen der Zellen erkennbar. Anhand des Wachstums der Zellen in Anwesenheit des Saccharidmimetikums soll im folgenden die Verträglichkeit der Substanz gegenüber adhärennten Zellen untersucht werden.

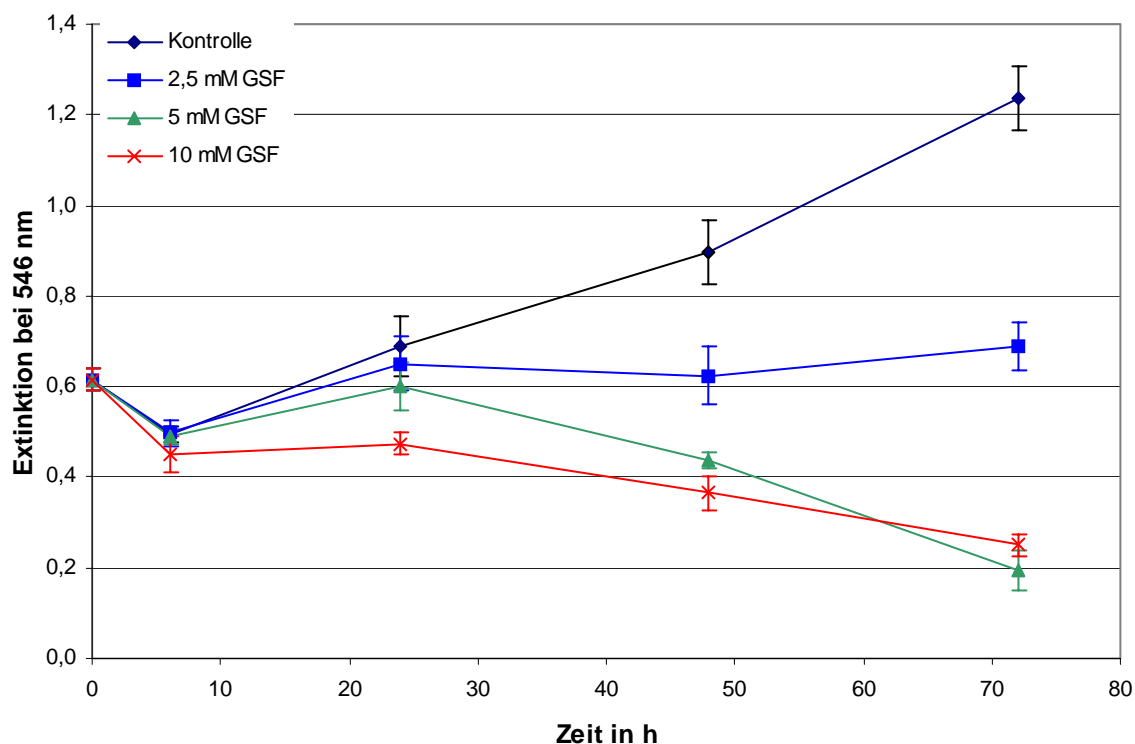


Abb. 49 Wachstum von WM-115 Zellen in Anwesenheit verschiedener GSF-Konzentrationen

Die reagenzfreie Kontrolle zeigt das Wachstum der Zelllinie WM-115 über 72 h. Der in diesem Assay offensichtlich versuchsbedingte Rückgang der Zellzahl nach 8 h verlängert die Verdopplungszeit der Zellen, welche bei einem idealen Versuch bei $t_d = 48$ h liegt, um ca. 22 h. Da dieser Rückgang der Proteinmenge allerdings in allen vier Proben auftritt, wird er als systematisch und daher für die zentrale Aussage der zytotoxischen Wirkung von GSF als unbedeutend angesehen.

2,5 mM GSF bewirkt eine Einstellung des Wachstums innerhalb von 72 h, ohne daß sich Zellen vom Boden des wells ablösen. Eine Verdopplung dieser Konzentration auf 5 mM bleibt innerhalb von 24 h zytostatisch und zeigt nach 48 h erste zytotoxische Effekte. Eine Inkubation mit 10 mM GSF führt zum Verlust intakter Zellen nach bereits 24 h und nach 72 h Inkubation hat sich die Zellzahl auf ein Drittel der ausgesäten Zellen reduziert.

3-Sulfatomethyl-furan

Als Kontrolle zu GSF wurde die saccharidfreie Substanz 3-Sulfatomethyl-furan synthetisiert und in dem oben beschriebenen Adhäsions-Assay auf ihr Potential getestet, die Adhäsion der WM-115 Zellen an Fibronectin und Fibrinogen zu inhibieren. Die Vitalitätskontrolle der Adhäsions-Assays zeigte allerdings bereits nach 2 h Inkubationszeit eine hohe Sterblichkeit der Zellen in den getesteten Konzentrationen. Im folgenden ist das Wachstum der WM-115 Zellen in Anwesenheit von 3-Sulfatomethyl-furan dargestellt.

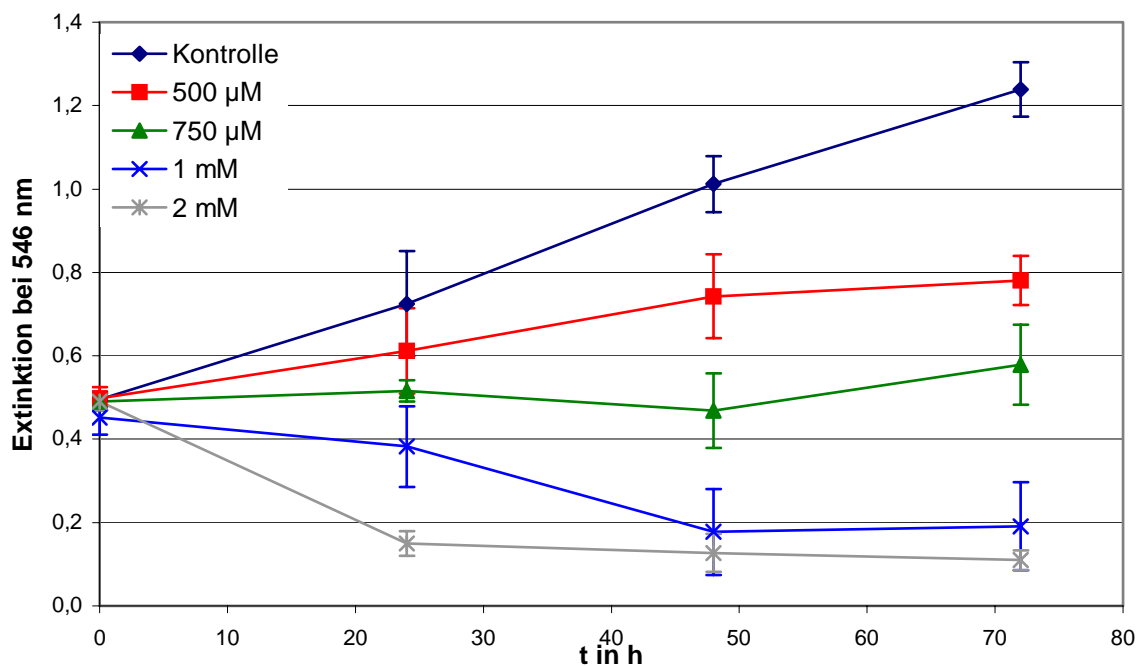


Abb. 50 Wachstum von WM-115 Zellen in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen an 3-Sulfatomethyl-furan

Die reagenzfreie Kontrolle der Zelllinie WM-115 zeichnet sich durch eine Verdopplungszeit von $t_d=48$ h aus. Schon in Anwesenheit von 500 µM 3-Sulfatomethyl-furan-Lösung geht das Wachstum der Zellen drastisch zurück und auch nach 72 h haben sich die Zellen noch nicht verdoppelt. 750 µM 3-Sulfatomethyl-furan bewirkt bei WM-115 Zellen eine Einstellung des Wachstums und eine Konzentration von 1 mM zeigt bereits nach 24 h einen signifikanten toxischen Effekt. Zellen, welche mit 2 mM

3-Sulfatomethyl-furan-Lösung inkubiert wurden sind nach 24 h bereits vollständig tot oder haben ihre Fähigkeit zur Adhäsion verloren.

Damit ist 3-Sulfatomethyl-furan als Vergleichssubstanz für das galactosylierte Furan-Derivat GSF, welches in Konzentrationen von 5-40 mM auf seine inhibitorische Wirkung auf die Adhäsion der WM-115 Zellen getestet wurde, nicht geeignet.

7.3 MMP-Assay

Die gelatinolytische Aktivität der beiden auch als Gelatinasen bekannten Matrix-Metalloproteinasen MMP-2 (auch Gelatinase A) und MMP-9 (Gelatinase B) läßt sich durch den Abbau von Gelatine in sogenannten Zymogrammen nachweisen. In einem gelatinehaltigen Gel werden dabei die in der Probe befindlichen Proteine elektrophoretisch aufgetrennt und renaturiert, so daß sie ihre enzymatische Aktivität wiedererlangen. Nach Inkubation mit einer geeigneten Pufferlösung degradieren die Gelatinasen nun die im Gel befindliche Gelatine und nach Anfärben der Gels mit Coomassie-Blue werden die gelatinefreien Bereiche des Gels als farblose Banden in einem blauen Gel sichtbar. Das Zymogramm des serumfreien konditionierten Mediums (SFCM) der Zelllinie WM-115 zeigt deutlich gelatinolytisch aktive Banden, welche aufgrund ihres Molekulargewichtes auf die Anwesenheit von aktivem MMP-2 schließen lassen. Dieselben Banden konnten auch für Proben aus dem SFCM der Zelllinie WM-266-4 nachgewiesen werden. Sowohl der Primär-Tumor als auch die Metastase des humanen Melanoms exprimieren somit die Pro-form des Matrix-degradierenden Enzyms, setzten es ins umliegende Milieu frei und aktivieren es nach dem in Abb. 14 beschriebenen Schema. Die gelatinolytische Aktivität der Proben steigt mit zunehmender Menge an aufgetragenem Protein (siehe Abb. 51)

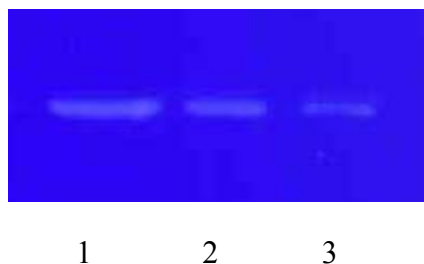


Abb. 51 Zymogramm des serumfreien konditionierten Mediums (SFCM) der Zelllinie WM-115, 1: 14,2 μg Protein, 2: 9,4 μg Protein, 3: 4,7 μg Protein

Um also die Inhibition der Matrix-Metalloprotease beurteilen zu können, ist es wichtig, stets die gleiche Menge an SFCM-Protein aufzutragen. Daher wurde für jede Probe der nachfolgenden Assays eine Proteinbestimmung nach Lowry durchgeführt. In diesem Zusammenhang fiel auf, daß die Proteinkonzentration der Proben aus SFCM der WM-115 Zellen stets etwas größer war als die der WM-266-4 Proben. Die Banden der Zelllinie WM-115 haben auch stets eine breitere Form als die Banden der Zelllinie WM-266-4 (siehe Abb.54), dies kann aber sowohl mit einer verstärkten MMP-Aktivität als auch mit einer vermehrten Diffusion der Proteine innerhalb des Gels erklärt werden. Es bleibt also fraglich, ob die Differenz der Proteinmenge zwischen den beiden Zelllinien auf eine vermehrte Sezernierung der MMP-2 Proform zurückgeht, oder ob es sich um sonstige Proteine handelt.

Wie bereits erwähnt, läßt das Molekulargewicht der gelatinolytischen Banden bei ca. 64 kD auf die aktive Form von MMP-2 schließen. Zur Identifizierung der Matrix-Metalloprotease wurde eine Antikörperfärbung mit dem aus der Maus stammenden MMP-2 Antikörper (MAB 13431) der Firma Chemicon durchgeführt und der Western Blot mit einem parallel behandelten Zymogramm derselben Proben verglichen.

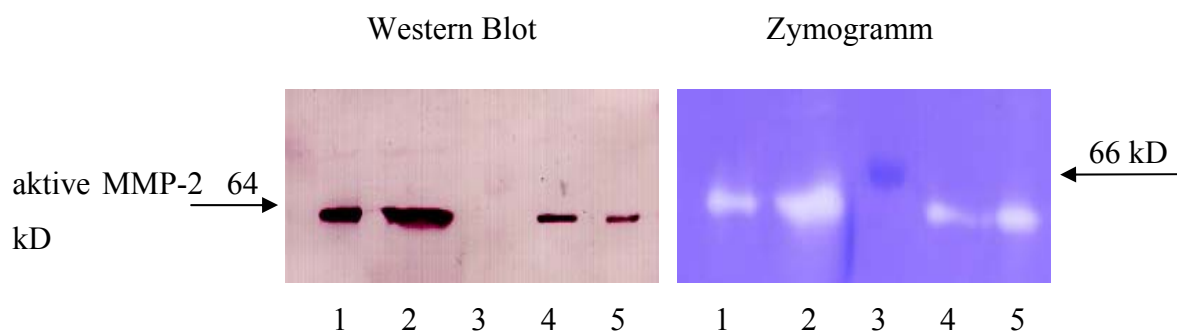


Abb. 52 Antikörperfärbung der gelatinolytisch aktiven MMP-2 Bande und parallel zum Western Blot erzeugtes Zymogramm, 1 und 2: SFCM aus WM-115 Kultur, 4 und 5: SFCM aus WM-266-4 Kultur, 3: Molekulargewichtsstandard

Der Western Blot zeigt eindeutig, daß es sich bei den gelatinolytisch aktiven Banden sowohl der Zelllinie WM-115 als auch der Zelllinie WM-266-4 um die aktive Form der Matrix-Metalloproteinase 2 (MMP-2) mit einem Molekulargewicht von 64 kDa handelt.

7.3.1 Inhibition der MMP-Aktivität durch 3,4-BGF

B16F10

In zahlreichen MMP-Assays konnte beobachtet werden, daß die Zelllinie B16F1 keine gelatinolytisch aktiven Enzyme sezerniert, während das SFCM der Zelllinie B16F10 mehrere farblose Banden innerhalb des gelatinehaltigen Gels erzeugt. Eine Auswertung der Banden über ihre Größe ergab eine aktive MMP-9 Bande bei 92 kDa, eine dem MMP-2-Intermediat entsprechende Bande bei 68 kDa, die aktive MMP-2-Form bei 64 kDa, sowie eine Bande bei 45 kDa, welche MMP-3, MMP-10 oder MMP-12 zuzuordnen ist (siehe Abb. 53, Bande 1).

Um zu testen, ob sich die MMP-Aktivität der Zelllinie B16F10 durch Inkubation mit dem Saccharidmimetikum 3,4-BGF beeinflussen läßt, wurde nach 24 h Wachstum der Zellen das Medium über einem nicht zu dicht gewachsenen Zellrasen durch serumfreies Medium mit 40 mM 3,4-BGF-Lösung ersetzt. Das Zymogramm zeigt die MMP-Aktivität des Mediums nach 16 stündiger Inkubation (siehe Abb.53).

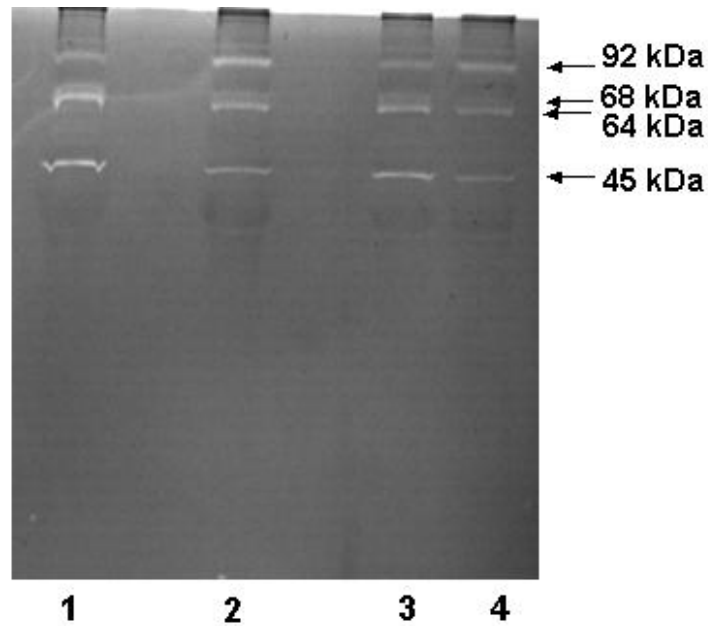


Abb. 53 MMP-Aktivität des 16h konditionierten serumfreien Mediums einer B16F10-Kultur in Anwesenheit von 40 mM 3,4-BGF, 1: reagenzfreie Kontrolle (50 µg Protein); 2: 40 mM 3,4-BGF (50 µg Protein); 3: reagenzfreie Kontrolle (25 µg Protein); 4: 40 mM 3,4-BGF (25 µg Protein);

Eine Vergleich der Banden 1 und 2 nach densitometrischer Auswertung (Herolab) ergab eine Erhöhung der MMP-9 Aktivität der inkubierten Zellen um das 2,7-fache, während die Aktivität aller MMP-2-Banden auf das 0,7-fache des ursprünglichen Wertes zurückgeht. Auch die Intensität der 45 kDa Bande geht auf das 0,3-fache der Kontrollwertes zurück. 3,4-BGF inhibiert also sowohl MMP-2 als auch die gelatinolytische Aktivität bei 45 kDa leicht, während sie die Aktivität von MMP-9 sogar mehr als verdoppelt.



An dieser Stelle muß erwähnt werden, daß die Zelllinie B16F10 in ihrer MMP-Aktivität abhängig von den Kulturbedingungen offensichtlich starken Schwankungen unterliegt. Während zu Beginn der hier beschriebenen Arbeit stets eine charakteristische MMP-Aktivität beobachtet werden konnte, ließ diese im Laufe der Zeit nach und verschwand schließlich ganz. Auch durch das Wiederauftauen konservierter Zellen ließ sich die MMP-Aktivität nicht vergleichbar wiederherstellen, so daß davon ausgegangen werden muß, daß die Zellen ihre ursprünglich charakteristische Eigenschaft MMPs zu exprimieren durch die gewählten Kulturbedingungen (Medium, Serum etc.) verloren haben. Daher wurde im weiteren Verlauf der Arbeit die Wistar-Melanome WM-115 und

WM-266-4, deren MMP-2 Expression konstant blieb, als geeigneteres Model für die MMP-Assays verwendet.

WM-115 und WM-266-4

Um zu testen ob 3,4-BGF einen Einfluß auf die MMP-2 Aktivität der beiden Wistar-Melanom-Linien hat, wurde nach 24 h Wachstum der Zellen das Medium über dem Zellrasen durch serumfreies Medium mit 40 mM 3,4-BGF-Lösung ersetzt. Das Zymogramm zeigt die Aktivität aus SFCM der WM-115 sowie der WM-266-4 Zellen nach 48 h Inkubation:

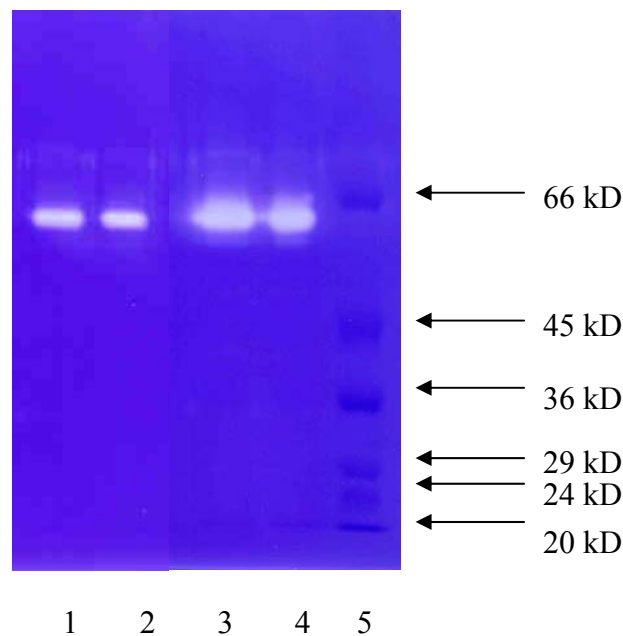


Abb. 54 MMP-2 Aktivität des 48h konditionierten serumfreien Mediums aus WM-266-4 und WM-115-Kulturen in Anwesenheit von 40 mM 3,4-BGF, 1: WM-266-4 + 3,4-BGF; 2: WM-266-4 Kontrolle; 3: WM-115 + 3,4-BGF; 4: WM-115 Kontrolle; 5: Molecular Weight Marker

Die MMP-2 Aktivität des SFCM der mit 3,4-BGF inkubierten Zellen unterscheidet sich nicht von der, der reagenzfrei inkubierten Kontrollzellen. Lediglich die Tatsache, daß die Banden aus dem SFCM der WM-115 Zellen stets diffuser erscheinen als die gelatinolytischen Banden der WM-266-4 Zellen, ist anhand des Zymogramms gut erkennbar.

7.3.2 Inhibition der MMP-2 Aktivität durch GSF

Wie anhand des Adhäsions-Assays (siehe Abb. 41) bewiesen wurde, läßt sich die $\alpha_v\beta_3$ -vermittelte Adhäsion der WM-115 Zellen an Fibrinogen durch Inkubation mit GSF vollständig inhibieren. Da das Integrin $\alpha_v\beta_3$ eine bedeutende Rolle im Aktivierungsprozeß der MMP-2 spielt, könnte die Blockierung des Rezeptors mit einem Aktivitätsverlust der MMP-2 einhergehen. Um diese Vermutung zu untersuchen, wurden im folgenden beide Zelllinien des humanen WM-Melanoms mit verschiedenen Konzentrationen an GSF inkubiert:

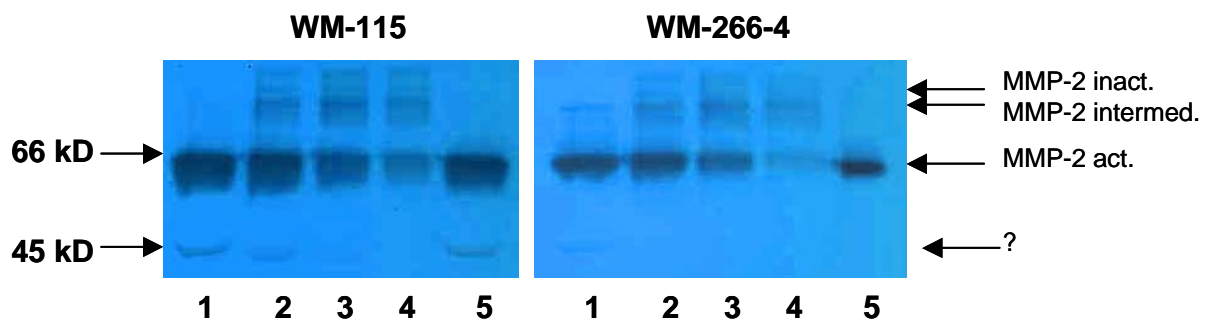


Abb. 55 MMP-2 Aktivität des SFCM aus WM-115 und WM-266-4-Kulturen in Anwesenheit steigender Konzentrationen von GSF nach 44 h Inkubation; 1: 1 mM GSF; 2: 5 mM GSF; 3: 10 mM GSF; 4: 20 mM GSF; 5: GSF-freie Kontrolle

Verglichen mit der reagenzfreien Kontrolle zeigt das Zymogramm bei gleicher aufgetragener Proteinmenge keinen signifikanten Verlust an MMP-2 Aktivität beider Zelllinien nach Inkubation mit 1 mM GSF-Lösung. Mit steigenden Konzentrationen an GSF verliert die aktive MMP-2 Form (64 kD) ihre Intensität, und Banden für das MMP-2 Intermediat (68 kD) sowie die inaktive MMP-2 Proform (72 kD) werden sichtbar. Bei einer Konzentration von 10 mM hat die Stärke der aktiven MMP-2 Bande bei beiden Zelllinien deutlich zugunsten der inaktiven Formen nachgelassen. Eine 20 mM Konzentration von GSF zeigt einen allgemeinen Rückgang der Aktivität, der allerdings auf erste zytotoxische Effekt des GSF zurückzuführen ist.

Die WM-115 Zellen zeigen erstmals auch eine unbekannte Bande mit gelatinolytischer Aktivität bei 45 kD. Diese geht mit steigender Konzentration an GSF ebenfalls zurück und ist bei 20 mM komplett verschwunden. Zu welcher Art von MMPs das

gelatinolytische Enzym mit einem Molekulargewicht von 45 kD gehört, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden, allerdings kommen aufgrund des Molekulargewichts MMP-3, MMP-10 oder MMP-12 als mögliche Kandidaten in Frage.

7.4 Migrations-Assay

Die Wanderung von Zellen stellt einen Prozeß dar, dessen molekulare Grundlage in der Funktion verschiedener Oberflächenproteine und deren Verknüpfung mit den Strukturen des Cytoskeletts zu finden ist (siehe 5.6). Integrine spielen für die Migration der Zellen eine bedeutende Rolle.

In sogenannten „Scratch“-Assays soll die Wirkung der untersuchten Saccharidmimetika auf die Zellwanderung untersucht werden. Hierzu wird mit Hilfe einer Pipettenspitze einem ansonsten intakten Zellrasen eine „Verletzung“ zugeführt, um das Migrationsverhalten der Zellen über die Zeit zu beobachten.

Dieser Versuch stellt ein stark vereinfachtes Modell für eine Zellwanderung *in vivo* dar. Während innerhalb des Assays die Zellen nur in zwei Dimensionen wandern können, erfolgt eine Wanderung von Zellen *in vivo* stets in einem dreidimensionalen System. Dennoch läßt das Ergebnis des Versuchs prinzipiell Rückschlüsse auf die Beweglichkeit der Zellen zu und macht eine Aussage darüber, ob das Migrationspotential der Zellen durch eine Inkubation mit Saccharidmimetika zu beeinflussen ist.

7.4.1 3,4-BGF

Die folgende Fotoserie zeigt die Wanderung der Zelllinien WM-115 und WM-266-4 in Anwesenheit einer 40 mM 3,4-BGF-Lösung. Die Wanderung der Zellen wurde mit einem Mikroskop beobachtet, und eine markierte Stelle innerhalb des wells wurde zur Dokumentation in bestimmten Zeitabständen fotografiert. Die zusammenfassende Fotoserie gibt die Wanderung der Zellen über einen Zeitraum von 21 Stunden wieder.

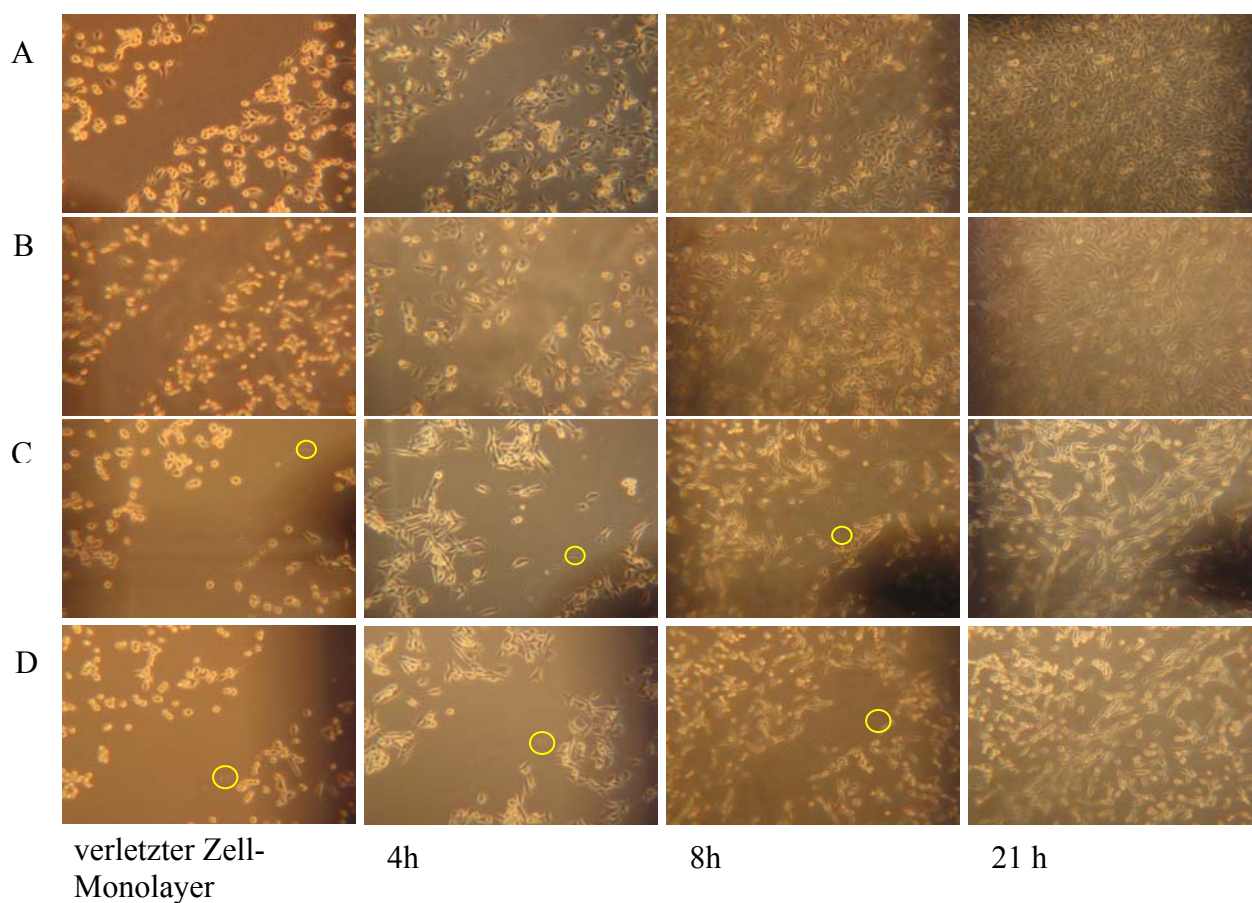


Abb. 56 Migration von WM-115 Zellen (Reihen A und B) und WM-266-4 Zellen (Reihen C und D) in die künstlich zugefügte Verletzung eines ansonsten intakten Zell-Monolayers. Die Reihen A und C zeigen unbehandelte Zellen, die Reihen B und D Zellen in Anwesenheit einer 40 mM 3,4-BGF-Lösung. Die gelben Kreise innerhalb einer Reihe markieren dieselbe Stelle in einem well.

3,4-BGF hat selbst in einer Konzentration von 40 mM, verglichen mit einer reagenzfreien Kontrolle, keinen Einfluß auf die Wanderung der WM-115- und WM-266-4-Zellen. Bereits nach 8 h hat sich die in dem Zellrasen zugefügte Verletzung weitgehend wieder geschlossen. Nach 21 h ist der Zell-Monolayer wieder konfluent gewachsen, und die ehemalige Verwundung ist nur noch durch die exakte Ausrichtung der Zellen entlang der Verletzung zu erkennen. Insbesondere die Zelllinie WM-266-4 zeigt eine strikte Polarisierung der einzelnen Zellen in der Richtung, in welcher die Verwundung in den Zellrasen gekratzt wurde.

7.4.2 GSF

Die folgende Fotoserie zeigt zusammenfassend die Wanderung der Zelllinien WM-115 und WM-266-4 in Anwesenheit einer 5 mM GFS über einen Zeitraum von 24 h.

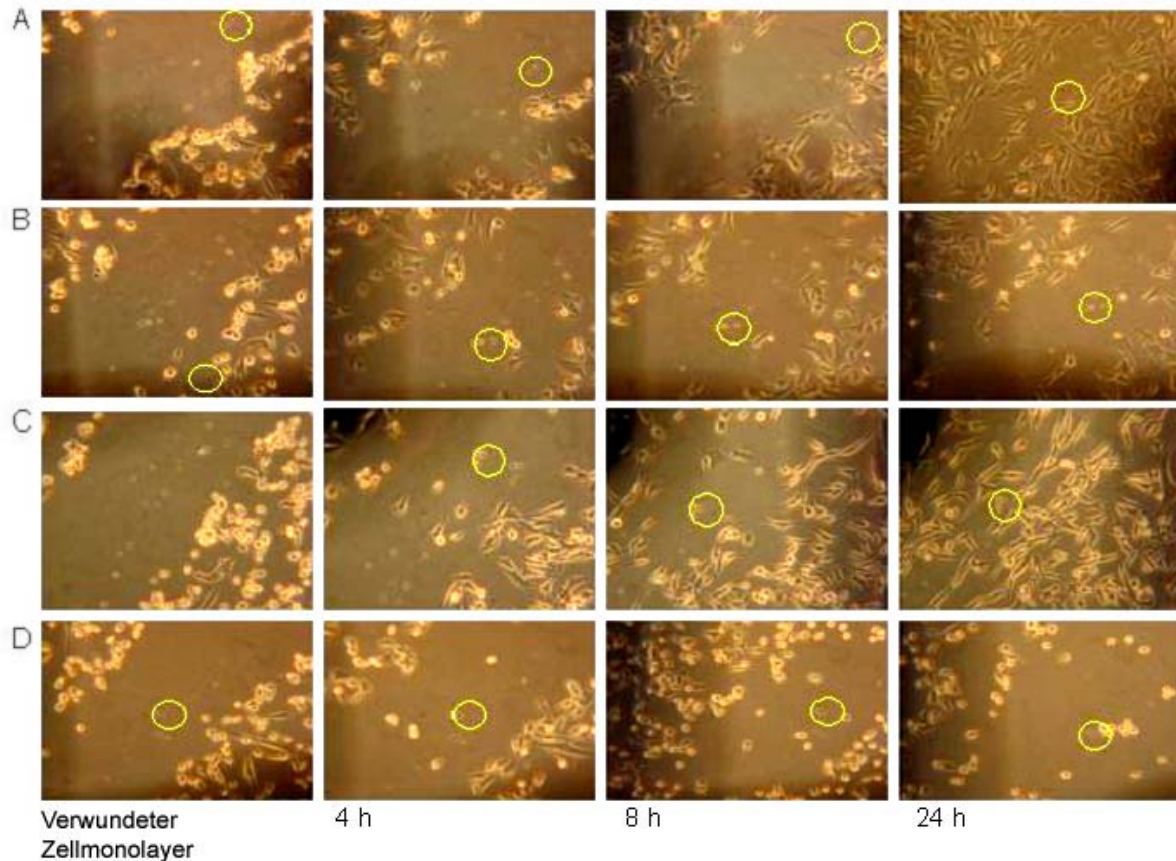


Abb. 57 Migration von WM-115 Zellen (Reihen A und B) und WM-266-4 Zellen (Reihen C und D) in die künstlich zugefügte Verletzung eines ansonsten intakten Zell-Monolayers. Die Reihen A und C zeigen unbehandelte Zellen, die Reihen B und D Zellen in Anwesenheit einer 5 mM GSF-Lösung. Die gelben Kreise innerhalb einer Reihe markieren dieselbe Stelle in einem well.




Eine Inkubation der WM-115 Zellen mit 5 mM GSF verringert die Anzahl der in die Wunde eingewanderten Zellen nach 24 h deutlich. Während sich der umliegende Zellrasen wieder geschlossen hat, ist eine aktive Wanderung der Zellen in den nicht mehr bewachsenen Streifen nur noch vermindert zu beobachten.

Für die Zelllinie WM-266-4 zeigen sich die Effekte des GSF noch wesentlich deutlicher, denn bereits nach 8 h verändern die Zellen ihre ansonsten spindelförmige Form und runden sich ab. Dieses Abrunden ist nicht mit einem Ablösen der Zellen vom Boden des

wells verbunden, sondern die Zellen bleiben in Trauben an ihrem Untergrund haften. Innerhalb dieser 8 h sind nur wenige der ansonsten sehr mobilen Zellen in die Verwundung des Zell-Monolayers eingewandert. Nach 24 h Inkubation haben sich alle Zellen vom Boden des wells abgelöst. Nach Überprüfung der schwimmenden Zellen mit Trypan-Blau zeigt sich allerdings, daß die Zellen vollständig vital sind und 5 mM GSF also nicht toxisch auf die WM-266-4-Zellen wirkt.

8 Diskussion

Durch oligosaccharidische Strukturen glycosylierte Proteine und Lipide stellen einen Großteil der Adhäsionsmoleküle einer Zelle dar. Neben dem aktiven Anteil, den Oligosaccharide durch Lectin-Kohlenhydrat- oder Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Interaktionen zur Bindungsstärke von Zellen an benachbarte Partner oder die ECM beitragen (vergleiche 5.2.1), kann die Adhäsion von Zellen durch eine Veränderung ihres Glycosylierungsmusters modifiziert werden^[83.].

Begründet durch die offensichtlich essentielle Funktion von Oligosacchariden für die Zelladhäsion wurden in dieser Arbeit zwei Substanzbibliotheken von Saccharidmimetika auf ihren Einfluß untersucht, verschiedene Schritte der Metastasierung *in vitro* zu beeinflussen. Neben ihrer strukturellen Verwandtschaft zu natürlich vorkommenden Lewis-Strukturen^[76.], ^[77.] und ihrer von uns postulierten Bindung an Lewis Rezeptoren weisen die von  synthetisierten Strukturen weitere pharmakologisch günstige Eigenschaften auf. So sind sie gut wasserlöslich, weitgehend untoxisch und können durch kombinatorische Ansätze in hoher Diversität synthetisiert werden. Die biologische Aktivität einiger ausgewählter Strukturen in Versuchen, welche *in vitro* Simulationen einzelner Schritte der metastatischen Kaskade darstellen, sollen im folgenden diskutiert werden.  

8.1 TMC-Derivate

Die Untersuchung der TMC-Derivate auf die Zelladhäsion von B16F10 Zellen an Fibronectin ergab einen Rückgang an adhärenenten Zellen um 80 % in Anwesenheit von 40 mM Di-Gal und einen Rückgang um 20 % in Anwesenheit von 40 mM Tri-Gal. Die Vitalitätskontrolle innerhalb der Adhäsions-Assays zeigte bereits, daß alle in dieser

Arbeit untersuchten Saccharimimetika nach einer Inkubationszeit von 2 h auch in hohen Konzentrationen (40 mM) keine akute Zytotoxizität besitzen. Die Cyclohexan-Derivate Di-Gal und Tri-Gal zeigten zwar beide bis 40 mM einen zytostatischen, aber keinen zytotoxischen Effekt auf B16F10-Zellen.

Galactose gebunden an 1,3,5-Trishydroxymethyl-cyclohexan zeigte sich damit prinzipiell als biologisch wirksame Gruppen zur Inhibition der Adhäsion an Fibronectin als geeignet, während TMC alleine keine Wirkung zeigt. TMC mit zwei Galactose-Resten zeigte den größten inhibitorischen Effekt, welcher durch die Einführung eines zusätzlichen Zucker-Restes nicht optimiert werden konnte.

Y.C. Lee beschrieb 1995 erstmals den sogenannten „glycoside cluster effect“, welcher besagt, daß multivalente Neoglycokonjugate mit einer höheren Affinität an ihre Rezeptoren binden als Monosaccharide der gleichen Zuckerfamilie^[84.]. Die physikalisch geringe Bindungsstärke einzelner Saccharide an ihre Carbohydrate Recognition Domain (CRD), läßt sich durch eine polyvalente Ligand-Rezeptorbindung sogar potenzieren. So bindet einfache Galactose beispielsweise mit einer Dissoziationskonstante von $K_D=1$ mM an Lectine, während mehrfach galactosylierte Oligosaccharidstrukturen je nach Verzweigung mit einer Dissoziationskonstante von $K_d=1$ μ M bis $K_d=1$ nM an die gleichen Rezeptoren binden können. Falls die Hemmung der Adhäsion durch die TMC-Derivate auf eine Interaktion mit Lectinen zurückgeht, zeigen meine Ergebnisse, daß die Einführung zusätzlicher Kohlehydrate jedoch auch kontraproduktive Effekte haben kann. Eine sterische Hinderung der Bindung an die CRD durch die zusätzliche Galactose könnte beispielsweise eine Bindung der beiden benötigten Galactosen verhindern. Denkbar ist auch, daß Tri-Gal eine zu geringe Flexibilität für die Anbindung der Zucker an polyvalente CRD's besitzt. Durch Verlängerung der Spacer zwischen dem Cyclohexan-Grundbaustein und den pharmakophoren Galactose-Resten könnte demnach eine Optimierung der Bindungsaffinität erreicht werden.

Methyl- β -D-galactopyranosid zeigt als Monosaccharid keinen inhibitorischen Effekt auf die Zelladhäsion, sondern scheint diese eher noch zu festigen. CRD's haben die Eigenschaft spezifische, aus mehreren verknüpften Zucker-Resten bestehende, Verästelungen von membranständigen Oligosacchariden zu erkennen und zu binden^[6.]. Eine einzelne Bindungstaschen eines Lectins, welches seinerseits wieder aus mehreren CRDs aufgebaut sein kann, erkennt häufig nicht nur einzelne Zuckerbausteine, sondern



es werden oft mehrere miteinander verknüpfte Zuckerreste, wie z.B. im Falle der C-Typ-Lectine, gebunden. Hierdurch wird neben der Erhöhung der Bindungsspezifität auch eine Erhöhung der Bindungsstärke erreicht. Komplexe eukaryotische Oligosaccharide enden häufig mit Mannose- oder N-Acetylneuraminsäure-Resten, die über Galactose-Einheiten an weitere Zuckerreste gebunden sind. Die galactosebindende Domäne der CRD liegt demnach häufig im Inneren einer relativ großen Bindungstasche. Diese ist entweder für das Monosaccharid Galactose schlecht zugänglich oder das Monosaccharid wird mit einer wesentlich geringeren Affinität gebunden als das optimale Polysaccharid, so daß ein Monosaccharid für die meisten Lectine keinen geeigneten Inhibitor darstellt. Um einen äquivalenten inhibitorischen Effekt zu erzielen, müssen daher höher konzentrierte Saccharidlösungen verwendet werden als beim Einsatz von Oligosacchariden^[85.].

Allerdings kann Galactose über geeignete Zuckertransportsysteme als monosaccharidischer Baustein in die Zelle aufgenommen und innerhalb des Golgi-Apparates in oligosaccharidische Strukturen eingebaut werden^[86.]. Diese werden über Vesikel wieder zur Plasmamembran der Zelle transportiert, wo sie nun ihre Aufgabe als Adhäsionsmoleküle erfüllen können (siehe Abb. 58). Wird das Angebot an Anaboliten durch eine Inkubation der Zellen in hoch konzentrierten Methyl-Galactose-Lösungen erhöht ist eine Veränderung der membranständigen Oligosaccharide denkbar, was zu einer Erhöhung der Zelladhäsion führen kann.



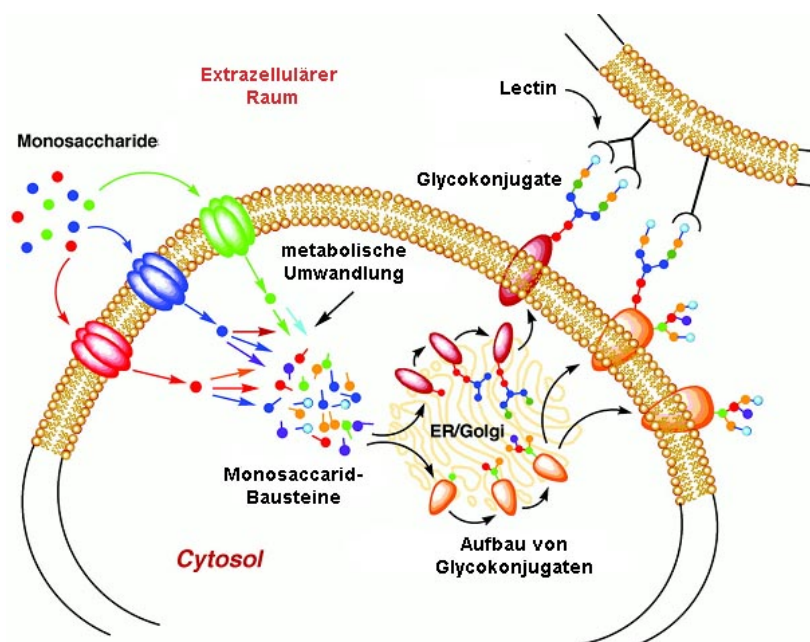


Abb. 58 Metabolismus und Wiederaufbau von Glycokonjugaten (modifiziert nach Betozzi, C.R. und Kiessling, L.L.^[86.]).

Auf die Adhäsion der Zelllinie B16F1 hatten die TMC-Derivate keinen signifikanten Einfluß. Die leichte inhibitorische Wirkung von Methyl- β -D-galactopyranosid in Konzentrationen von 10 und 20 mM kann, wie bereits oben beschrieben, auf eine Veränderung der saccharidischen Oberflächenstruktur nach einer Aufnahme und Metabolisierung des Monozuckers zurückzuführen sein. Tri-Gal zeigt ☰ die Adhäsion der Zelllinie B16F1 in allen Konzentrationen tendenziell eine leicht stimulatorische Wirkung, die allerdings auffälligen Schwankungen unterliegt. Geht man davon aus, daß das Tri-Gal eventuell von der Zelle aufgenommen und metabolisiert wird, so lassen sich die Schwankungen der einzelnen Werte durchaus erklären, denn Aufnahme, Abbau und eventueller Wiederaufbau neuer oligosaccharidischer Strukturen muß in den lokal getrennten Proben nicht gleich schnell ablaufen. Somit könnte sich das Saccharidmuster auf der Oberfläche von Zellen in den verschiedenen Proben unterscheiden und sich damit auch verschieden auf die Adhäsion auswirken. Widersprüchlich erscheint allerdings, warum eine zweistündige Inkubation mit Methyl- β -D-galactopyranosid nicht zu ähnlichen oder sogar noch stärker ausgeprägten Effekten führen sollte, zumal das Monosaccharid im anabolen Aufbau von Oligosacchariden wesentlich schneller wieder zur Verfügung steht als das oligosaccharidische Tri-Gal.

Vorwegnehmend sei an dieser Stelle gesagt, daß im Gegensatz zur Zelllinie B16F10, für die Zelllinie B16F1 nie eine signifikante Inhibition der Adhäsion an ECM-Proteine durch ungeladene Saccharidmimetika gezeigt werden konnte. Das unterschiedliche metastatische Verhalten beider Linien ist möglicherweise in der unterschiedlichen Beschaffenheit des Musters ihrer Adhäsionsmoleküle begründet. Ein direkter Vergleich der zellulären Oberflächestruktur von stark metastasierenden B16F10 Zellen und schwach metastasierenden B16F1 Zellen ergab allerdings keinen qualitativen Unterschied an Adhäsionsmolekülen, der mit dem gesteigerten Metastasierungspotential zu korrelieren ist^[58.]. Ein quantitativer Vergleich von Oligosacchariden und ihren Rezeptoren auf beiden Zelllinien wurden meines Wissens bisher nicht durchgeführt. Sollte allerdings eine signifikante Differenz zwischen beiden Zelllinien vorliegen und bedenkt man welche feine Regulation der Zelladhäsion von membranständigen Sacchariden und ihren Bindungspartnern ausgehen^{[87.], [88.]} ist durchaus anzunehmen, daß Substanzen, welche auf B16F10 eine anti-adhäsive Wirkung haben, nicht zwingendermaßen gegenüber B16F1 aktiv sein müssen.

8.2 Furan-Derivate

Mit Einführung des Furanringes als neues Verzweigeratom ist es gelungen im Vergleich zum Cyclohexanring eine weitere funktionelle Gruppe in das Saccharidmimetikum einzubauen ohne dessen räumliche Orientierung all zu stark zu verändern. Der Furanring stellt als Dien ein Edukt der Diels-Alder-Reaktion dar, welches mit Dienophilen zu einem Heterocyclus reagieren kann (siehe Abb.59).

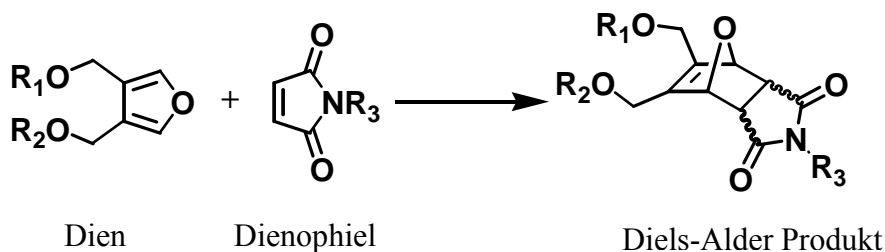


Abb. 59 Die Diels-Alder-Reaktion

Diese zusätzliche Funktion des Moleküls kann beispielsweise genutzt werden, um Fluoreszenzfarbstoffe an das Saccharidmimetikum zu koppeln, welche als Marker z.B. für diagnostische Zwecke eingesetzt werden können^{[76.], [82.]}.

BGF-Derivate

Die Testung der digalactosylierten Furan-Derivate als Inhibitoren zeigte das 3,4-BGF und 2,5-BGF die Adhäsion der Zelllinie B16F10 an Fibronectin in einer Konzentration von 20 mM um 30 % bzw. 40% hemmen. Der inhibitorische Effekt kann auch durch eine Verdopplung der Konzentration nicht optim^[82.] werden. Dies könnte auf eine Sättigung möglicher Interaktionspartner ab 20 mM schließen lassen, auch wenn bei geringeren Konzentrationen noch kein Einfluß auf die Adhäsion sichtbar wird. 2,3-BGF zeigt keine signifikante Inhibition auf die Adhäsion an Fibronectin, sondern in Konzentrationen von 40 mM sogar eine Stimulation. Obwohl die Strukturverwandschaft von 2,3-BGF zu 3,4-BGF wesentlich größer ist als die Strukturverwandschaft von 3,4-BGF zu 2,5-BGF zeigen die 3,4- und 2,5-Derivate einen ähnlichen biologischen Effekt, während 2,3-BGF keinen Einfluß auf die Adhäsion zeigt^[82.]. Auffallend ist, daß das 2,3-galactosylierte Derivat auch auf die Adhäsion der B16F10 Zellen an Vitronectin oder Laminin nie eine signifikante stimulatorische oder inhibitorische Wirkung hat während die Hemmung der Adhäsion durch 3,4-BGF und 2,5-BGF stets deutlich sichtbar ist.

Die Testung von 3,4-BGF und 2,5-BGF auf ihren Einfluß auf die Adhäsion der B16F10-Zellen an Vitronectin zeigte in Konzentration^[82.] von 5 bzw. 10 mM einen adhäsionsstimulierenden Effekt. Auffallend ist die hohe Standardabweichung der einzelnen Werte, was auf eine unspezifische Veränderung der zellulären Oberflächenstruktur in den einzelnen Proben hindeutet. Eine gegenüber der Kontrolle mehr als doppelt so hohe Bindung der mit BGF inkubierten Zellen an Vitronectin ist auf eine sehr geringe Adhäsion der reagenzfreien Kontrolle zurückzuführen. Wie bereits unter 8.1.1 bemerkt variierte die Zahl adhärenter Zellen von Versuch zu Versuch teilweise sehr stark. Dies fiel insbesondere im Falle der Adhäsion an Vitronectin auf. Eine starke Adhäsion der B16F10 Zellen an Vitronectin konnte während der Arbeit tendenziell dann festgestellt werden, wenn die Zellen nach dem Auftauen noch sehr niedrige Passagenzahlen aufwiesen. Mit steigendem Alter der Zellen ließ ihre Affinität

an das Protein deutlich nach. Wie wir im folgenden noch sehen werden ist die Bindung von Zellen an Vitronectin hauptsächlich durch das Integrin $\alpha_v\beta_3$ vermittelt (siehe Tab. 1), welches verstärkt auf Melanomen mit erhöhtem Metastasierungspotential exprimiert wird und unter dem Einfluß verschiedener Faktoren in seiner Aktivität reguliert werden kann. Wie jüngste fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen mit FITC-gekoppelten Diels-Alder Produkten der BGF-Derivate gezeigt haben kann 3,4-BGF neben Colon-Carzinom- und Brustkrebs-Zellen auch von WM-115-Melanomen aufgenommen werden (siehe Abb. 60)^[107.]

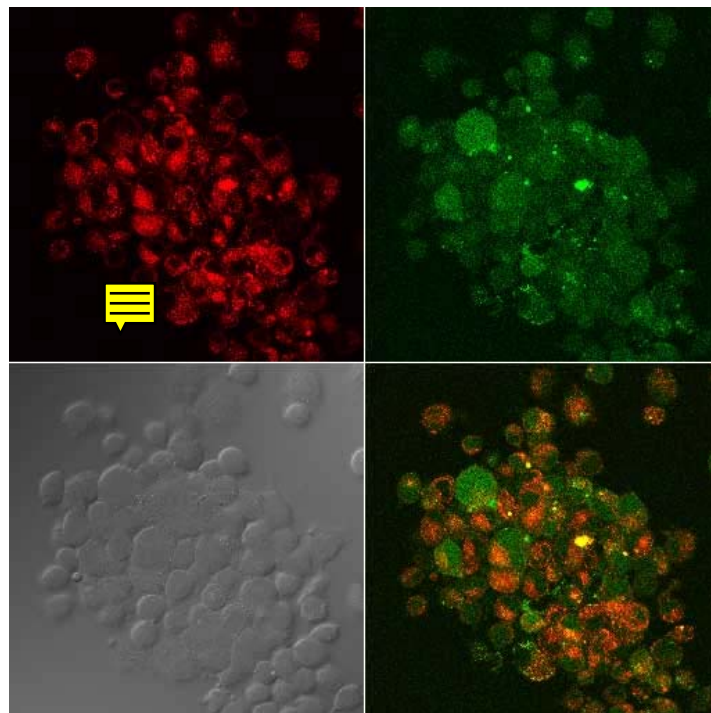


Abb. 60 Aufnahme von FITC-markiertem 3,4-BGF in WM-115-Zellen. Das Bild zeigt neben den ungefärbten Zellen, die lebenden Zellen nach 7 h Inkubation mit dem FITC-Diels-Alder Addukt von 3,4-BGF (grün) und nach 1h Inkubation mit LysoTracker-Red (rot), sowie die Überlagerung beider Färbungen. LysoTracker-Red färbt auf Grund ihres sauren pH's lediglich Lysosomen, welche teilweise diffus und teilweise als diskrete Strukturen innerhalb des Cytosols zu sehen sind. 3,4-BGF färbt ebenfalls diskrete Regionen innerhalb des Cytosols, welche mit den Lysosomen allerdings nur in geringem Maße kolokalisieren (gelb).

Ein solche Aufnahme des Moleküls mit anschließender Metabolisierung könnte beispielsweise einen regularorischer Effekt auf die Affinität des Integrins $\alpha_v\beta_3$ gegenüber Vitronectin haben, was möglicherweise zu einem Anstieg der Adhäsion der

Zellen führen kann. Mit steigender Konzentration an 3,4- bzw 2,5-BGF geht die Zahl adhärenter Zellen schließlich auf 50 % der Kontrolle zurück. Die Standardabweichung der Werte geht im Vergleich zu den niedrigen Konzentrationen stark zurück, was eher auf eine direkte Inhibition von Adhäsionsmolekülen als auf einen regulatorischen Effekt auf die Integrinaktivität hinweist.

Ähnlich wie im Falle der Adhäsion an Vitronectin stimuliert die Inkubation von B16F10-Zellen mit 3,4-BGF in Konzentrationen von 5 und 10 mM die Adhäsion an das ECM-Protein Laminin. Auffällig sind auch hier die hohen Standardabweichungen. Ab 20 mM sinkt die Adhäsion auf 50 % der Kontrolle - ein Effekt, der auch durch Verdopplung der Konzentration nicht mehr gesteigert werden kann. Die Inkubation mit 2,5- BGF zeigt auf diesem ECM-Protein überraschenderweise keinen stimulatorischen Effekt im niederen millimolaren Bereich, sondern die Adhäsion steigt, nach 40 %-iger Inhibition mit 5 mM 2,5-BGF, wieder auf die Adhäsion der reagenzfreien Kontrolle, bevor sie dosisabhängig auf 50 % zurückgeht.

Wie in Abschnitt 1.3 beschrieben bildet die extrazelluläre Matrix *in vivo* ein Geflecht aus Glycoproteinen und Glycosaminoglycanen. Die Adhäsion von Zellen an diese ECM erfolgt zum einen über Integrine, welche eine oder mehrere der Komponenten mit hoher Affinität erkennen und binden können und zum anderen über wesentlich schwächere Kohlenhydrat-Lectin- oder Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Interaktionen. Durch den Einsatz einzelner isolierter und aufgereinigter ECM-Proteine in den durchgeführten Adhäsions-Assays können im Falle einer vollständigen Inhibition, Rückschlüsse auf die zellulären Oberflächenmoleküle gezogen werden, die durch das eingesetzte Reagenz beeinflusst werden. Die oben verwendeten Proteine Fibronectin, Vitronectin und Laminin unterscheiden sich unter anderem indem sie von verschiedenen Gruppen der Integrine gebunden werden (siehe Tab.1). Die meisten ECM Proteine stellen recht unspezifische Integrinliganden dar, die von vielen Integrinen, manchmal sogar durch verschiedene Bindungssequenzen erkannt und gebunden werden. Zum Beispiel bindet Fibronectin an die Integrine $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_6$ und $\alpha_4\beta_7$ und Laminin an $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$ und $\alpha_7\beta_1$. Vitronectin stellt einen Liganden für Integrine mit der Untereinheit α_v dar, der durch $\alpha_v\beta_3$ -, $\alpha_v\beta_1$ -, $\alpha_v\beta_5$ - Integrine und durch

$\alpha_{11b}\beta_1$ gebunden werden kann. Vergleicht man die maximale Inhibition, die durch die einzelnen BGF-Derivate auf den verschiedenen ECM-Proteinen erreicht wurde, so fällt auf, daß maximal ein Rückgang von 50 % adhären Zellen erreicht wurde (vergl. Tab. 4).

	3,4-BGF	2,5-BGF	2,3-BGF
Fibronectin	30 %	40 %	10 %
Vitronectin	50 %	50 %	0 %
Laminin	50 %	50 %	40 %

Tab. 4. Maximale Inhibition der Adhäsion von B16F10-Zellen an verschiedene ECM-Proteine

Die maximale Inhibition ist im Falle von 3,4-BGF und 2,5-BGF meist schon in Konzentrationen ab 20 mM erreicht, ohne daß eine Steigerung der Konzentration nochmal einen signifikanten Effekt erzielt. Dies weist darauf hin, daß die durch die beiden BGF-Derivate beeinflussbaren Interaktionen ab 20 mM vollständig blockiert sind. Die adhäsiven Eigenschaften der übrigen Zellen können offensichtlich nicht mehr durch die Saccharidmimetika beeinflusst werden. Dies kann darauf zurückzuführen sein, daß lediglich Kohlenhydrat-Lectin- oder Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Interaktionen beeinflusst werden, während die Protein-Protein-Interaktionen zwischen Zellen und ECM-Proteinen weitgehend intakt bleiben.

Die größte erzielte Inhibition der Adhäsion durch das schwach wirksame 2,3-BGF wurde bei einer Konzentration von 5 mM auf Laminin erzielt. Dieser inhibitorische Effekt an Laminin ist allerdings nicht dosisabhängig, denn die Adhäsion steigt bei höheren Konzentrationen wieder an. 2,3-BGF zeigt also keine signifikante inhibitorische Wirkung auf die Adhäsion der B16F10-Zellen an die untersuchten ECM-Proteine.

Bei Betrachtung der Resultate aus den Adhäsions-Assays fällt auf, daß die größte Stimulation der Adhäsion der B16F10 Zellen durch 3,4- und 2,5-BGF meist bei einer Konzentration von 10 mM erreicht wird. Eine Steigerung der Affinität von HaCaT-

Zellen (Keratinocyten) an Fibronectin, Laminin und Collagen IV konnte auch nach deren Inkubation mit glycosylierten Lysophosphatidylcholin-Derivaten beobachtet werden^[89.]. Das Zustandekommen dieser Affinitätssteigerung ist bislang noch nicht vollständig geklärt, aber neben einem Integrin-vermittelten inside-out-signaling wird auch eine Veränderung der Zusammensetzung der Membran diskutiert, welche eine Aktivierung von Intergrinen durch Cluster-Bildung bewirkt.

Eine leichte Steigerung der Adhäsion an Fibronectin ist tendenziell auch nach Inkubation^[] der humanen Melanomzellen WM-115 mit 10 mM 3,4-BGF erkennbar. Erhöht man hingegen die Konzentration des Saccharidmimetikums auf 40 mM wird die Adhäsion um 26% inhibiert. Verwendet man Fibrinogen als ECM-Protein, so inhibiert bereits eine Konzentration von 5 mM die Adhäsion der Zelllinie WM-115 um etwa 30 %. Die Inhibition läßt sich durch Erhöhung der Konzentration nicht optimieren, so daß davon auszugehen ist, daß, wie bei den B16F10-Zellen, auch in diesem System die festen Protein-Protein-Bindungen nicht beeinträchtigt werden.

Fibrinogen stellt zur Untersuchung der Zell-Adhäsion ein vorteilhaftes Model dar, denn neben dem Integrin $\alpha_v\beta_3$ wird es nur noch von dem, hauptsächlich auf Blutplättchen exprimierten Integrin $\alpha_{IIb}\beta_1$ gebunden^[78.]. Die Adhäsion von Melanomzellen an Fibrinogen erfolgt neben der $\alpha_v\beta_3$ -Bindung über einige niederaffine Kohlenhydrat-Lectin- oder Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Interaktionen. Geht man davon aus, daß 3,4-BGF in der Lage ist diese saccharidvermittelten Interaktionen vollständig zu inhibieren müssen die verbleibenden 70 % der Adhäsion auf eine reine Protein-Protein-Wechselwirkung zurückgehen. Auch wenn man Fibronectin als ECM verwendet, verbleibt nach Inkubation mit 3,4-BGF^[] Adhäsion von etwa 70 %. Zur Inhibition der saccharidvermittelten Wechselwirkungen werden allerdings wesentlich höhere Konzentrationen benötigt als im Falle des Fibrinogen. Dies könnte an einer gehinderten Zugänglichkeit der Bindungsdomänen bei der Zell-Fibronectinbindung liegen. Ein weiteres Ergebnis, das vermuten läßt, daß 3,4-BGF ausschließlich einen Einfluß auf die Kohlenhydrat-Interaktionen der Zell-ECM Bindung hat ist die Tatsache, daß 3,4-BGF keinen Einfluß auf die MMP-2 Aktivität der Wistar-Melanom-Linien hat. Das läßt darauf schließen, daß die $\alpha_v\beta_3$ vermittelten Aktivierung von MMP-2 nach Inkubation mit 3,4-BGF vollständig funktionsfähig bleibt.

Vergleicht man das humane *in vitro* Model mit dem aus der Maus sieht man, daß 3,4-BGF in beiden Systemen einen inhibitorischen Effekt zeigt. Im Falle des Maus-Modells scheint entweder die Struktur des Oligosaccharidmimetikums besser zu passen als bei den humanen Zellen oder die Beiträge der Kohlenhydrat-Lectin- oder Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Interaktionen zur Adhäsion sind etwas stärker. Da sich jede Spezies unter anderem durch eine spezifische, für andere Spezies antigen wirkende Zuckerstruktur ihrer Zelloberfläche auszeichnet, erscheint die geringfügig bessere Wirkung des 3,4-BGF auf den Mauszellen durchaus erklärlich.

FGF

Ersetzt man einen der Galactosebausteine von 3,4-BGF durch eine Fucose und wiederholt die Adhäsions-Assays, so fällt zunächst auf, daß auch FGF auf die Adhäsion der Zelllinie B16F1 unabhängig vom ECM-Protein keinen signifikanten Einfluß hat. Vereinzelt ist zwar eine leichte Inhibition erkennbar (5 mM FGF inhibiert die Adhäsion an Laminin um 34 %), dieser Effekt verschwindet aber mit steigender Konzentration wieder. Nach Inkubation der B16F1 Zellen mit FGF ist eine dosisunabhängige Stimulation der Adhäsion an Vitronectin um maximal 50 % festzustellen. Verglichen mit den durch BGF hervorgerufenen Stimulationen fällt auf, daß die Standardabweichung der einzelnen Versuchsreihen sehr viel weniger schwanken, als im Falle von BGF. Sollte der stimulatorische Effekt auf eine Veränderung der Oberflächenglykosylierung zurückgehen, könnte die Konsistenz der Einzelwerte auf eine schnellere Aufnahme und Metabolisierung des fucosylierten Derivates schließen lassen. Während nämlich BGF nach zweistündiger Inkubation starke Unterschiede in der Adhäsion der einzelnen Proben verursacht, sind die Werte der Adhäsion einzelner Proben nach Inkubation mit FGF homogen, was auf eine Homogenität der Oberflächenbeschaffenheit zurückzuführen sein könnte. Eine Inkubation der BGF-sensitiven B16F10-Zellen zeigt, daß FGF eine geringere inhibitorische Wirkung auf die Adhäsion an Fibronectin und Vitronectin hat als BGF. Die Adhäsion der Zellen an Fibronectin kann durch Inkubation mit FGF nicht signifikant gehemmt werden, während sie an Vitronectin in Konzentrationen von 5 und 10 mM um etwa 35 % sinkt. Der Wiederanstieg der Adhäsion an Vitronectin auf den Wert der Kontrolle könnte

eventuell auch auf einen Fehler im Versuch hindeuten, was allerdings nicht weiter untersucht wurde.

Im Falle der Adhäsion an Laminin ist eine Inhibition erst in einer Konzentration von 40 mM signifikant erkennbar. Der Rückgang der Adhäsion auf 50 % der Kontrolle entspricht dabei der verbleibenden Zahl adhärenter B16F10 Zellen nach Inkubation mit 3,4-BGF.

Allgemein konnte durch Einführung des Fucoserestes in die Grundstruktur des Saccaridmimetikums keine verbesserte Inhibition der Adhäsion erreicht werden.

GSF

Sulfatierte Zuckerstrukturen bilden die Grundbausteine der Glycosaminoglycane und sind physiologischer Bestandteil der ECM. Mit Einführung eines Sulfatrestes in das furanoide Grundgerüst ist es gelungen das ladungstragende Saccharidmimetikum GSF zu kreieren^[77.], welches in seinem Aufbau dem Keratansulfat ähnelt.

GSF inhibiert die Adhäsion der Zelllinie B16F10 an Fibronectin bereits in einer Konzentration von 5 mM um etwa 30 %. Dieser Effekt läßt sich durch Erhöhung der Konzentration stetig steigern und ist bei 40 mM GSF vollständig. Die Adhäsion der B16F10-Zellen an Fibrinogen wird bereits bei einer Konzentration von 10 mM GSF um 76 % gehemmt und eine Verdopplung der Konzentration vervollständigt den inhibitorischen Effekt. Das geladene Saccharidmimetikum zeigt damit eine biologische Aktivität, die sich nicht nur auf einen Teil der Adhäsion beschränkt, sondern offensichtlich Protein-Protein-, Kohlenhydrat-Lectin- und Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Interaktionen blockiert ohne auf die Zellen akut zytotoxisch zu wirken. GSF zeigte bei 2,5 mM über 72 h zwar eine Zytostase der WM-115 Zellen aber zytotoxische Effekte sind erst nach 48-stündiger Inkubation in 5 mM GSF zu beobachten. Morphologische Veränderungen, wie das Abrunden der Zellen und das Ablösen vom Boden ihres Kulturgefäßes, konnten für die Zelllinie WM-266-4 nach acht-stündiger Inkubation mit 5 mM GSF beobachtet werden. Trotz des Ablöses der Zellen konnte mit Trypan-Blau jedoch kein Vitalitätsverlust der Zellen festgestellt werden. GSF stellt also eine nicht toxische Substanz mit einer IC_{50} über 10 mM nach 48 h dar. Generell zeichnen sich sowohl Saccharide, welche auch physiologisch in hohen Konzentrationen (3,6-5,6 mM

für Glucose^[94.]) vorkommen, als auch synthetische Saccharidmimetika durch eine gute Verträglichkeit aus^[7.].

Daß die Addition von Saccharidresten sogar eine deutliche Verminderung der toxischen Eigenschaften von Molekülen bewirkt, zeigt der Vergleich der Zytotoxizität von GSF und dem unverzuckerten 3-Sulfatomethyl-furan. Während die IC₅₀ für GSF mehr als 10 mM nach 48 h Inkubtion beträgt, liegt sie für 3-Sulfatomethyl-furan zwischen 1 und 2 mM. Worauf diese gesteigerte Zytotoxizität zurückgeht ist bisher unklar, denn aufgrund seiner Ladung positionieren wir sowohl für GSF als auch für 3-Sulfatomethyl-furan keine Aufnahme in das Cytosol der Zelle, sondern lediglich eine extrazelluläre Wirkung. Obwohl für 5-Sulfatomethyl-furfural eine mutagene Wirkung auf Bakterien und humane TK6 Lymphoblasten beschrieben ist^[95.] gehen wir davon aus, daß die Zytotoxizität, der von uns getesteten Sulfatester, nicht auf eine DNA-schädigende Wirkung, sondern auf ein Ablösen der Zellen und der damit verknüpften Apoptose zurückzuführen ist. Die Toxizität des 5-Sulfatomethyl-furfural geht zudem auf die Aldehyd Funktion des Moleküls zurück^[95.].

Auf die humanen Wistar-Melanom-Zellen hat GSF eine ähnliche Wirkung wie auf die B16-Maus-Melanome. Die Adhäsion der WM-115-Zellen an Fibronectin geht in Anwesenheit von 5 mM GSF bereits um 68 % zurück und sinkt in Anwesenheit von 20 mM GSF auf 8 % der Adhäsion der reagenzfreien Kontrolle. In Gegenwart von 40 mM GSF haften keine Zellen mehr an Fibrinogen. Die Adhäsion an Fibrinogen wird bei einer Konzentration von 5 mM sogar bereits um 53 % inhibiert und bei Verdopplung der Konzentration sind kaum noch adhärenente Zellen zu beobachten. Verglichen mit dem digalactosylierten 3,4-BGF, welches die Adhäsion an Fibronectin bei 40 mM um 26% und an Fibrinogen um 35% inhibiert und dem Monosaccharid Me-Gal, das keine signifikante Inhibition bewirkt, scheint der Sulfatrest das entscheidende Pharmakophor (= biologisch aktive Gruppe) zu sein. Bestätigt wird diese Annahme, da die nicht substituierte Grundstruktur BHMF die Adhäsion der Zellen an Fibronectin ebenfalls nur um 23 % reduziert, während sie auf die Adhäsion an Fibrinogen sogar wirkungslos bleibt.

GSF hemmt also die gesamte Zelladhäsion von Melanom-Zellen an verschiedene Proteine der ECM. Nicht nur die Kohlenhydrat-vermittelten Interaktionen werden

blockiert, wie es vermutlich in Anwesenheit des reinen Saccharidmimetikums 3,4-BGF der Fall ist, sondern auch die feste Protein-Protein-Interaktion zwischen verschiedenen Integrinen und der ECM wird vollständig aufgehoben, denn die Zellbindung an die beiden ECM-Proteine Fibronectin und Fibrinogen wird durch verschiedene Integrine vermittelt.

Um den Wirkmechanismus von GSF besser erklären zu können sollen im folgenden die Effekte von peptidischen Integrininhibitoren auf die Adhäsion der WM-115-Zellen, mit denen des GSF verglichen werden. Fibrinogen ist ein sehr spezifischer Integrin-Ligand, welcher an Melanom-Zellen ausschließlich durch das Integrin $\alpha_v\beta_3$ erkannt und gebunden werden kann. Vermittelt wird die Bindung über das Tripeptid mit der Sequenz RGD, und eine 100 %-ige Hemmung der Zellbindung an Fibrinogen erfolgt nach Blockade des Integrins mit dem synthetischen GRGDSP-Peptid^[78.]. Unsere Ergebnisse bestätigen dies, denn bereits in Konzentrationen von 250 μ M GRGDSP sind keine Fibrinogen-bindenden Zellen mehr erkennbar. Die gesamte Adhäsion an Fibrinogen geht also auf das Integrin $\alpha_v\beta_3$, dessen Vorkommen auf WM-115-Zellen durch Antikörperfärbung und anschließender FACS-Analyse bewiesen werden konnte, zurück.

Fibronectin stellt einen weitaus unspezifischeren Liganden dar, der von verschiedenen Integrinen gebunden werden kann. Der Großteil der Integrine erkennt dabei das Bindungsmotiv mit der Aminosäuresequenz RGD (siehe Tab. 1). Pierschbacher, M. und Ruoslahti, E. zeigten, daß das synthetische Fibronectinsegment GRGDSP die Adhäsion von NRK-Zellen (= Fibroblasten aus der Niere einer Ratte) an Fibronectin in Konzentrationen von 0,1 bis 3 mM dosisabhängig um maximal 80 % inhibiert^[81.]. Diese Beobachtung und insbesondere die Tatsache, daß auch eine weitere Erhöhung der Peptidkonzentration nicht zu einem vollständigen Rückgang der Adhäsion führen stimmen mit unseren Beobachtungen für die Zelllinie WM-115 überein. Deren Adhäsion an Fibronectin geht in Gegenwart des GRGDSP-Peptids ebenfalls dosisabhängig auf 29 % der Adhäsion der Kontrollzellen zurück. Da der Kurvenverlauf der adhären Zellen in Gegenwart ansteigender Mengen GRGDSP auf eine Sättigung der Rezeptoren hinweist muß die Anheftung des verbleibenden Anteils Zellen folglich über eine weitere Integrin-ECM-Interaktion oder über Kohlenhydratwechselwirkungen erfolgen. Tatsächlich befindet sich innerhalb der Aminosäurekette von Fibronectin ein zweites


Bindungsmotiv mit der AS-Sequenz EILDV, welches auf Melanomen ausschließlich vom Integrin $\alpha_4\beta_1$ gebunden wird. Werden WM-115-Zellen mit dem synthetischen Pentapeptide EILDV inkubiert, ist ein konzentrationsabhängiger Rückgang der Adhäsion auf 56 % der reagenzfreien Kontrolle zu beobachten. Überraschenderweise ist es nicht gelungen die Expression der α_4 -Untereinheit auf der Oberfläche von WM-115- oder WM-266-4 Zellen nachzuweisen. Die Inhibition der Adhäsion an Fibronectin durch EILDV zeigt aber, daß ein EILDV-bindender Rezeptor vorhanden ist.

Die Inkubation von WM-115 Zellen mit Medium, welches sowohl 1 mM des GRGDSP-Peptides als auch 2 mM EILDV enthielt, ergab einen vollständigen Adhäsionsverlust der Zellen an Fibronectin. Die Adhäsion an Fibronectin setzt sich demnach nur aus einem RGD- und einem EILDV-vermittelten Anteil zusammen, ohne daß innerhalb dieses *in-vitro* Models eine Kohlenhydrat-vermittelte Bindung sichtbar wird. Dies heißt nicht unbedingt, daß an der Adhäsion keine Kohlenhydrat-Lectin- oder Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen beteiligt sind. Diese können auch so niederaffin sein, daß sie, nach Blockade der festen Protein-Protein-Bindung, durch die Waschschriffe des Assays gelöst wurden.

Ist allerdings der größte Teil der Adhäsion an Fibronectin auf eine integrinvermittelte Bindung zurückzuführen und hemmt GSF die Adhäsion an Fibronectin und Fibrinogen vollständig, so ist es gelungen mit dem Saccharidmimetikum einen Integrininhibitor zu finden, der mehrere dieser Rezeptoren beeinflusst. Neben den Integrinen $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_4\beta_1$ ist dies der RGD-erkennende Fibronectin-Rezeptor $\alpha_5\beta_1$, dessen Vorkommen auf beiden humanen Melanomlinien mittels FACS-Analyse nachgewiesen wurde.

Für eine Interaktion von GSF mit dem Integrin $\alpha_v\beta_3$ sprechen neben den Ergebnissen der Adhäsion an Fibrinogen außerdem die Ergebnisse der MMP-Assays. Wie anhand der Zymogramme und parallel durchgeführter Western-Blot Analyse eindeutig bewiesen wurde sezernieren und aktivieren die Zelllinien WM-115 und WM-266-4 MMP-2. Die Aktivierung erfolgt über einen $\alpha_v\beta_3$ -beinhaltenden Proteinkomplex, welcher die MMP-2 Pro-Form fest an die Plasmamembran bindet und mit Hilfe der membranständigen Matrix-Metalloproteinase MT1-MMP das zymogene Proteinsegment abspaltet (siehe Abb. 13). Inkubiert man WM-Zellen mit dem sulfatierten Saccharidmimetikum GSF, so geht die Aktivität der 64 kDa Bande

konzentrationsabhängig ab 5 mM deutlich zurück und die Banden der 72 kDa Proform und des 68 kDa Intermediats erscheinen. Zusätzlich zur vollständigen Inhibition der Adhäsion von WM-115 Zellen an Fibronectin und Fibrinogen beeinflusst GSF also auch den Aktivierungsmechanismus von MMP-2. Die Inkubation der Wistar-Melanom-Linien mit dem galactosylierten 3,4-BGF hingegen hat keinen Einfluß auf die MMP-2 Aktivität. Obwohl 3,4-BGF einen leichten Rückgang der $\alpha_v\beta_3$ vermittelten Adhäsion an Fibrinogen bewirkt, steht diese Hemmung also in keinem Zusammenhang mit der ebenfalls $\alpha_v\beta_3$ vermittelten Aktivierung von MMP-2.

Teti A., et al. zeigten, daß die Inkubation von Knochtumorzellen (GCT23) mit dem löslichen synthetischen Integrinsubstrat GRGDSP eine Aktivierung von MMP-2 bewirkt^[97.]. Die Besetzung der Integrinbindungsdomäne durch Peptide verhindert die Aktivierung von MMP-2 nicht, sondern stimuliert diese sogar. In diesem Punkt unterscheidet sich die Wirkung und damit auch der Wirkmechanismus des Saccharidmimetikums GSF deutlich von der Wirkung des Peptids. Geht man nämlich n aus, daß die Bindung eines Substrats an die RGD-Bindungsdomäne des Integrins $\alpha_v\beta_3$ die Aktivierung von MMP-2 stimuliert, so deutet die durch GSF hervorgerufene Inhibition der MMP-Aktivierung auf einen Einfluß des Saccharidmimetikums abseits der RGD-Bindungsdomäne hin. Eine Bindung des GSF abseits der RGD-Bindungsdomäne kann einen allosterischen Effekt hervorrufen, welcher (1) zu einer Deformierung der RGD-Bindungsstelle und damit zu einer verminderten Bindung des Liganden und/oder (2) zu einer Verhinderung der Bildung des MMP-2 aktivierenden Proteinkomplexes führt.

WM-115 Zellen exprimieren neben MMP-2 ein weiteres gelatinolytisch aktives Enzym mit einem Molekulargewicht von 45 kD, welches nicht eindeutig identifiziert wurde. Aufgrund der Masse könnte es sich um die zu den Stromelysinen zählenden Matrixmetalloproteinasen MMP-3, MMP-10 oder MMP-12 handeln, welche innerhalb der MMPs das breiteste Substratspektrum besitzen und unter anderem Gelatine abbauen können^[98.], ^[99.]. Da auch diese Bande nach Inkubation mit GSF vollständig verschwindet, scheint das geladene Saccharidmimetikum auch eine Wirkung auf den Aktivierungsmechanismus dieser MMP zu haben.

Ob GSF allerdings unspezifisch mit allen oben genannten Integrinen interagiert bleibt fraglich. Auch eine spezifische Wirkung des GSF, die über intrazelluläre Signale



weitergeleitet wird und somit Auswirkungen auf weitere Oberflächenmoleküle hat, ist denkbar. Es konnte z.B. gezeigt werden, daß die Bindung des für $\alpha_v\beta_3$ spezifischen Antikörpers an dieses Integrin auch die $\alpha_5\beta_1$ -vermittelte Funktion in der Phagocytose und der Zell-Migration inhibiert^[90.]. Die gegenseitige Beeinflussung von Integrinen in ihrer Funktion ist für zahlreiche weitere Beispiele beschrieben^[91.] und ist wahrscheinlich auf die Signaltransduktion der Moleküle und möglicherweise einen Konkurrenzkampf, um mengenmäßig limitierte Bindungspartner zurückzuführen. Ein solches Zwiegespräch verschiedener Integrine könnte auch die unspezifische Wirkung des GSF auf die verschiedenen Schritte der metastatischen Kaskade erklären.

Eine Kombination des Saccharidmimetikums GSF mit dem peptidischen Integrininhibitor EILDV verstärkt den Effekt beider einzeln eingesetzter Inhibitoren überadditiv. Während innerhalb dieses Assays 5 mM GSF die Adhäsion der WM-115 Zellen an Fibronectin um 15 % und 2 mM des $\alpha_4\beta_1$ -Liganden EILDV diese um 27% inhibiert, führt die Kombination beider Inhibitoren zu einem Rückgang adhärenter Zellen um 60 %. Eine Kombination von GSF und GRGDSP erzielt hingegen nur einen additiven Effekt und bewirkt einen Rückgang der Adhäsion um 80 % verglichen mit 15 % Inhibition für GSF und 66 % für GRGDSP alleine.

8.3 Integrinmuster

Zur Bestätigung der gedanklichen Rückschlüsse, die aus den Ergebnissen der Adhäsions-Assays gezogen wurden, wurde mittels FACS-Analyse die Expression und Quantität einiger Integrine auf den humanen Melanomzellen untersucht. Dabei konnte das Vorkommen des Vitronectin-Rezeptors $\alpha_v\beta_3$ und der α_5 -Untereinheit, welche als funktionsfähiges Integrin ausschließlich an die β_1 -Untereinheit gebunden vorkommt, sowohl auf WM-115 als auch auf WM-266-4 Zellen nachgewiesen werden. Die Expression der α_3 -Untereinheit des Fibronectin-Rezeptors $\alpha_3\beta_1$ konnte auf beiden Zelllinien ebensowenig nachgewiesen werden wie die Präsentation der α_4 -Untereinheit auf der Zelloberfläche. Von einer Beteiligung des EILDV-bindenden Integrins $\alpha_4\beta_1$ an der Adhäsion der WM-115 Zellen an Fibronectin gehe ich dennoch aus, da sich die Adhäsion der Zellen an das ECM-Protein durch das synthetische EILDV-Peptid inhibieren ließ.

Ein Vergleich des Integrinmusters der WM-115- mit den WM-266-4 Zellen zeigte sowohl qualitativ als auch quantitativ keinen Unterschied. Zwar konnten innerhalb der Melanomentwicklung zumindest quantitativ deutliche Verschiebungen in der Integrinexpression gezeigt werden^[51.], ob diese jedoch in zwei aufeinander folgenden Entwicklungsstufen noch unterschieden werden können scheint fraglich. Die aus einem Primärtumor isolierte Zelllinie WM-115 wird in ihrer Entwicklung der „vertical growth phase“ zugeordnet, während WM-266-4 die zugehörige cutane Metastase darstellt^[59.]. Eventuell ist ein unterschiedliches phänotypisches Verhalten der Zellen aber auch nicht direkt mit einem Unterschied im Integrinprofil der Zellen zu erklären. Wie in der Einleitung beschrieben kann die Bindungsaffinität von Integrinen an ihre Liganden durch andere Faktoren gesteuert werden. Pochev et al. konnten zeigen, daß sich die Oligosaccharid-Seitenketten des Integrins $\alpha_3\beta_1$ während der Melanomprogression signifikant verändern^[92.]. So konnte das erhöhte metastatische Potential der Zelllinie A375 mit einem sialylierten tetraantennären Oligosaccharid auf der β_1 -Untereinheit korreliert werden. Ebenso wurde eine Affinitätssteuerung des Integrins $\alpha_5\beta_1$ durch polysialylierte Saccharidstrukturen diskutiert, nachdem durch enzymatische Abspaltung der Sialinsäure die Bindung des isolierten Integrins an Fibronectin-konjugierte Sepharose vollständig unterblieb^[93.]. Diese Beispiele zeigen, daß die Regulation phänotypischer Eigenschaften von Zellen vielleicht nicht unbedingt durch Proteine gesteuert wird, sondern eventuell aus der unterschiedlichen Verzuckerung der einzelnen Glycoproteine resultiert.

8.4 Migration

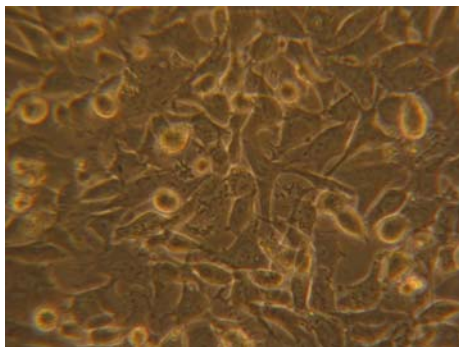
Integrine erfüllen neben ihrer Rolle als Stabilisatoren zwischen Zellen und ECM eine wichtige Aufgabe in der Fortbewegung von Zellen. Durch ihre regulierbare Affinität sind sie unter Mithilfe der proteolytischen Aktivität der MMPs in der Lage Bindungen zwischen Zelloberfläche und ECM zu lösen und wieder zu knüpfen^{[100.],[101.]}. Durch Integrin- und MMP-Inhibitoren kann auch das Migrationspotential wandernder Zellen beeinflußt werden.

Vergleicht man zunächst die normalen Wanderungsgeschwindigkeiten der beiden Zelllinien WM-115 und WM-266-4 innerhalb des Scratch Assays so fällt auf, daß die aus der Metastase isolierten WM-266-4 Zellen beinahe dreimal schneller wandern als



die WM-115 Zellen aus dem Primärtumor. Während unbehandelte WM-115-Zellen beinahe 24 h benötigen, um die in den Zellrasen geritzte Wunde zu schließen, benötigen die WM-266-4 Zellen lediglich 8 h. Diese Tatsache könnte auf die unterschiedliche Morphologie der Zellen zurückzuführen sein. Die Zelllinie WM-115 hat eine flache, breite und sternförmige Gestalt, während WM-266-4-Zellen, neben einem Anteil an schwimmenden Zellen in der Kultur, eine dünne spindelförmige und deutlich polarisierte Struktur aufweisen (s.Abb. 61).

WM-115



WM-266-4

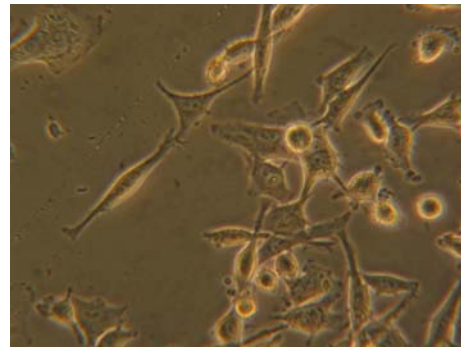



Abb. 61 Morphologie der Zelllinien WM-115 und WM-266-4

Die Punkte über welche Zellen fest an ihr Matrix gebunden sind, werden als „Fokalkontakte“ oder „Adhäsionsplaques“ bezeichnet. An diesen aus diversen Integrinen und anderen Proteinen bestehenden Bindungsstellen zwischen der Zellmembran und der ECM binden intrazellulär auch die Actinfilamente des Cytoskeletts. Die spindelförmige Morphologie der WM-266-4 Zellen weist auf eine weit geringere Zahl von Adhäsionsplaques, welche im Falle einer Fortbewegung der Zellen gelöst werden müssen, hin als die breite Form der WM-115 Zellen. Dies verschafft den Zellen der Metastase folglich eine weit größere Migrationsgeschwindigkeit, als den WM-115 Zellen.

Inkubiert man die beiden Wistar-Melanom-Zellen mit einer 5 mM Lösung des geladenen Saccharidmimetikums GSF, so zeigt sich eine deutliche Verringerung der Migration beider Linien, während eine Inkubation der Zellen mit 3,4-BGF keine Folgen auf die Migrationsgeschwindigkeit hat. Innerhalb der Zellmigration ist die Beteiligung

einer Vielzahl verschiedener Integrine beschrieben. Die Funktion der einzelnen Integrine scheint dabei nicht einheitlich zu sein, denn während beispielsweise das Integrin $\alpha_v\beta_3$ bei der Wanderung innerhalb der fokalen Adhäsionskomplexe lokalisiert bleibt, wandern $\alpha_5\beta_1$ Integrine mit einer Geschwindigkeit von etwa 6,5 $\mu\text{m/h}$ entlang des Cytoskeletts von der Zellfront zu deren Rückseite^[102.]. Eine solche direkte Beteiligung von Lectinen an der Zellmigration ist hingegen bisher nicht bekannt.

Dies bestätigt die Annahme, dass die durch eine Inkubation mit 3,4-BGF erzielte Hemmung der Adhäsion auf eine Blockade kohlenhydrat-vermittelter Interaktionen zurückgeht, während GSF die Integrin-ECM-Bindung inhibiert. Durch Lösen der Adhäsionsplaques wird bei WM-266-4-Zellen, welche ohnehin eine niedere Affinität zur ECM aufweisen, sogar ein Ablösen der Zellen innerhalb  acht Stunden erzielt, ohne dass die Zellen einen Vitalitätsverlust zeigen.

Betrachtet man die Zahl der Publikationen, welche sich mit der Erforschung der Invasion von Zellen mittels Boyden-Invasion Chambers beschäftigen (s. Abb. 19), sollte man davon ausgehen, dass es sich bei dieser Methode um ein etabliertes Modell handelt, welches aussagekräftige Ergebnisse liefert. Eigene Erfahrungen mit dem System zeigten allerdings, dass sich die Ergebnisse des bisherigen Versuchsaufbaus nicht zuverlässig quantifizieren lassen und lediglich eine Beschreibung der mikroskopischen Beobachtungen eine Aussage über die Wanderung der Zellen machen kann. Die Firma BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland) hat aufgrund dieser Tatsache so genannte „FluoroBlok™-Invasion Chambers“ entwickelt, deren PET-Membran mit einem Filter ausgestattet ist, der es erlaubt lediglich fluoreszenz-markierte Zellen, welche die Membran erfolgreich passiert haben mit einem „bottom-reading plate readers“ zu vermessen. Dies hat neben der Quantifizierbarkeit der Zellen den Vorteil, dass nicht gewanderte Zellen, welche sich noch auf dem Matrigel befinden nicht entfernt werden müssen. Versuche den Einfluss von GSF auf die Invasion der WM-Zellen mit Hilfe solcher „FluoroBlok™-Invasion Chambers“ zu beobachten, befinden sich derzeit noch in Arbeit und liefern zum aktuellen Zeitpunkt noch keine zuverlässigen Ergebnisse sollen jedoch in naher Zukunft realisiert werden.



9 Schlußfolgerungen und Ausblick

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß Saccharidmimetika prinzipiell dazu verwendet werden können verschiedene Schritte der metastatischen Kaskade *in vitro* zu inhibieren. Dieses Ergebniss bestätigt die Resultate anderer Arbeitsgruppen, welche teilweise ihre synthetischen Zuckerstrukturen schon erfolgreich *in vivo* getestet haben^{[105], [7]}. Die Wirksamkeit der Substanzen scheint dabei von der Polyvalenz der Oligosaccharide und der Wahl der saccharidischen Einheiten im Molekül abzuhängen. Es zeigt sich, daß die Aktivität reiner Glykokonjugate auf die Adhäsion durch Einführung weiterer funktioneller Gruppen deutlich gesteigert werden kann. Betrachtet man die Zell-Matrix-Bindung als Summe aller Interaktionen zwischen Zelloberfläche und ECM-Proteinen, wird klar, daß erst die Hemmung mehrerer Adhäsionsmoleküle die Affinität der Zellen an die ECM effektiv senken kann. Matsuda et al. kreierten bereits 2001 einen solch heterobifunktionalen Liganden, bestehend aus einer sLe^x-Einheit, die über einen Spacer kovalent an ein RGD-Peptid gebunden ist, und wiesen dessen Wirksamkeit sowohl an Selectinen als auch an Integrinen nach^[106].

Mit der Einführung der Sulfatgruppe am furanoiden Grundgerüst unserer Saccharidbibliothek ist es gelungen eine Bifunktionalität zu schaffen, die ebenfalls in der Lage ist mehrere Oberflächemmoleküle zu adressieren und damit die von ihnen gesteuerten biologischen Prozesse signifikant zu beeinflussen. GSF inhibiert *in vitro* sowohl die Zell-Adhäsion und -Migration als auch die Aktivierung von MMP-2, ohne dabei cytotoxisch zu sein. Der Sulfatrest, welcher auch physikalisch ein Bestandteil der polysulfatierten GAGs ist, scheint für die inhibitorischen Effekte das entscheidende Pharmakophor zu sein. Diese Aussage stimmt mit der klinischen Beobachtung überein, daß Tumorpatienten, die zusätzlich zu ihrer Tumorthherapie mit Heparin behandelt wurden, weniger häufig Metastasen zeigten als nicht-heparinisierte Patienten^[72]. Auch die klinische Testung des sulfatierten Oligosaccharids PI-88^[74] zeigt, daß mit der Wahl der geladenen Saccharidstruktur ein Schritt in die richtige Richtung gemacht wurde, um ein möglicherweise antimetastatisch wirkendes Therapeutikum zu entwickeln. Verglichen mit den oben erwähnten Substanzen Heparin und PI-88, bleibt für GSF die Frage nach einer anti-koagulierenden Wirkung und einer Hemmung von Heparinasen



zu klären. Gegenüber Heparin besteht der Vorteil von GSF oder von zukünftig optimierten Furan-Derivaten darin exakt definierte Substanz zu haben, welche sich chemisch synthetisieren lassen. Durch eine Kopplung fluoreszierender Farbstoffe an den Furanring mit Hilfe der Diels-Alder-Reaktion, sollte sich außerdem der genaue Wirkort der Furan-Derivate aufklären lassen.

Ein großer Nachteil des GSF besteht in den relativ hohen Konzentrationen, die benötigt werden, um die gewünschten biologischen Effekte zu erzielen. Wie anhand zahlreicher Beispiele belegt, ist der *in vitro* Einsatz von Oligosaccharidmimetika in mM Konzentrationen zwar praktikabel, ohne daß sich akut cytotoxische Effekte zeigen^[79.]^[85.], aber zur Durchführung sinnvoller *in vivo* Studien ist eine Steigerung der Aktivität unbedingt notwendig. Als Modifikation des GSF, unter Erhalt seiner bisherigen Eigenschaften, ist eine Substitution der Sulfatgruppe durch eine Phosphat-, Phosphonat- oder Acetat-Gruppe denkbar, sowie eine Verlängerung der Saccharideinheit am Furanring. Natürliche Beispiele oberflächenaktiver Oligosaccharidstrukturen sind dabei sLe^x, sLe^y oder sLe^a. Neben einer einfachen chemischen Synthese sollten für   natives biologisches Screening möglichst einfache Tests erdacht werden, die die parallele Untersuchung mehrerer Substanzen ermöglichen. Zur näheren Untersuchung potentieller Inhibitoren sind dann die in dieser Arbeit verwendeten Methoden unbedingt notwendig, um eine solide Basis für eine spätere *in vivo*-Testung zu bilden. Als etabliertes Tiermodell in der Erforschung anti-metastatischer Therapeutika eignet sich dabei entweder das B16-Mausmodell, bei welchem die Wiederansiedlung zuvor inkubierter und in C57BL/6-Mäuse injizierter B16F10-Zellen beobachtet wird^[56.] oder ein SCID-Maus Modell, in welchem auch die Wiederansiedlung intravenös injizierter humaner WM-Zellen untersucht werden kann.



10 Literatur

- [1.] Ruoslahti, E., „Wie Krebs sich ausbreitet“, Spektrum der Wissenschaft, Spezial 5, Krebsmedizin, **1996**, 18-23
- [2.] Weinberg R.A., „Wie Krebs entsteht“ Spektrum der Wissenschaft, Spezial 5, Krebsmedizin, **1996**, 7-17
- [3.] Ahmad A. und Hart, I.R., „Mechanisms of metastasis“, Critical Reviews in Oncology/Hemathology, **1997**, 26, 163-173
- [4.] Hood, L., Huang, H.V. und Dreyer, W.J., „The area-code hypothesis: the immune system provides clues to understanding the genetic and molecular basis of cell recognition during development.“, J. Supramol Struct. **1977**; 7(3-4):531-59.
- [5.] Maeder, T., „Sweet medicines“, Scientific American, July **2002**, 40-48
- [6.] Köttgen, E., Reutter, W. und Tauber, R., „Endogene Lectine des Menschen und ihre Zuckerliganden“, Medizinische Klinik, **2003**, 98, 717-738
- [7.] Lindhorst T.K., „Struktur und Funktion von Kohlenhydraten“, Chemie in unserer Zeit, **2000**, 34, 38-52
- [8.] Raz, A. et al., „Carbohydrate-binding proteins in cancer, and their ligands as therapeutic agents“, Trends in Molecular Medicine, **2002**, Vol.8, No. 4, 187-192
- [9.] Kannagi, R., „Carbohydrate-mediated cell adhesion involved in hematogenous metastasis of cancer“, Glycoconjugate Journal, **1997**, 14, 577-584
- [10.] Hughes R.C., „Galectines as modulators of cell adhesion“, Biochemie, **2001**, 83, 667-676
- [11.] Ochieng, J., Leite-Browning, M.L. und Warfield, P., „Regulation of cellular adhesion to extracellular matrix proteins by galectin-3“, Biochem. Biophys. Res. Commun., **1998**, 246, 788-791
- [12.] Hadari, Y.R. et al., „Galectin-8 binding to integrins inhibits cell adhesion and induces apoptosis“, J. Cell Sci , **2000**, 113, 2385-2397

- [13.] Moiseeva E.P. et al., "Galectin-1 modulates attachment, spreading and migration of cultured muscle cells via interactions with cellular receptors and components of extracellular matrix", *J. Vasc. Res.*, **1999**, 36, 47-58.
- [14.] Van der Brule, F.A. et al., "Galectin-1 modulates human melanoma cell adhesion to laminin", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1995**, 209, 760-767
- [15.] Hughes, R.C., et al., "NMR studies of hamster galectin-3: an electron microscopic visualisation of surface-absorbed complexes: evidence for interactions between the N- and C-terminal domains", *Biochemistry*, **2001**, 40, 4859-4866
- [16.] Le Marer N. und Hughes R.C., "Effect of the carbohydrate-binding protein galectin-3 on the invasiveness of the human breast carcinoma cells", *J. Cell Physiol.*, **1996**, 168, 51-58
- [17.] Kaltner, H. und Stierstorfer, B., "Animal lectins as Cell Adhesion Molecules", *Acta Anat.*, **1998**, 161, 162-179
- [18.] Xiong, J.-P., Stehle T., Diefenbach, B. et al., "Crystal Structure of the extracellular Segment of Integrin $\alpha_v\beta_3$ ", *Science*, **2001**, Vol 294, 339-345
- [19.] Hynes, R.O., "Integrins: Versatility, Modulation, and Signaling in Cell Adhesion", *Cell*, **1992**, 69, 11-25
- [20.] Herlyn, M., "Molecular and Cellular Biology of Melanoma", *Medical Intelligence Unit*, **1993**, Chapter 5, 44-92
- [21.] Gottschalk, K.-E. und Kessler H., "Strukturen von Integrinen und ihren Ligandkomplexen – Implikationen für das Medikamenten-Design und die Signaltransduktion", *Angew. Chem.*, **2002**, 114, 3919-3927.
- [22.] Kieffer, N. und Phillips, D.R., "Platelet membrane glycoproteins: functions in cellular interactions", *Annu. Rev. Cell Biol.*, **1990**, 6, 329-357
- [23.] Phillips, D.R., "GPIIb-IIIa: the responsive integrin", *Cell*, **1991**, 65, 359-362
- [24.] Shattil, S.J., "Changes in the platelet membrane glycoprotein Iib-IIIa-complex during platelet activation", *J. Biol. Chem.*, **1985**, 260, 11107-11114

- [25.] Gulino, D., „Identification of an monoclonal antibody against GPIIb that interacts with a calcium-binding site and induces aggregation”, *J. Biol.Chem.*, **1990**, 265, 9575-9581
- [26.] Conforti, G. et al., „Modulation of vitronectin receptor binding by membrane lipid composition“, *J. Biol. Chem.*, **1990**, 265, 4011-4019
- [27.] Pollard, T.D. und Earnshaw, W.C., „Cell Biology“, **2004**, Elsevier Science USA, Chapter 32, 518
- [28.] Staatz, W.D., „The membrane Protein Ia-Iib (VLA-2) mediates the Mg^{++} dependent adhesion of plateletes to collagen”, *J. Cell.Biol.*, **1989**, 108, 1917-1924
- [29.] Schwartz, M.A., „Effect of cell spreading on cytoplasmic pH in normal and transformed fibroblasts”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1989**, 86, 4525-4529
- [30.] Ingber, D.E., „Control of intracellular pH and growth by fibronectin in capillary endothelial cells”, *J. Cell. Biol.* , **1990**, 110, 1803-1811
- [31.] Varner, J.A., Emerson, D.A. und Juliano, R.L., “Integrin $\alpha_5\beta_1$ expression negatively regulates cell growth: reversal by attachment to fibronectin”, *Mol. Biol. Cell*, **1995**, 6, 725-740
- [32.] Del Sal, G., Ruaro, M.E., Philipson, L. et al., “The growth arrest-specific gene, gas-1, is involved in growth suppression”, *Cell*, **1992**, 70, 595-607
- [33.] Cheresh et al., „Requirement of the NPXY motif in the integrin β_3 subunit cytoplasmatic tail for melanoma cell migration in vitro and in vivo”, *J. Cell. Biol.*, **1995**, 130, 441-450
- [34.] Brooks, P.C., Stromblad, S., Sanders, L. et al., „Localization of Matrix-metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin $\alpha_v\beta_3$ ”, *Cell*, **1996**, 85, 683-693
- [35.] Varner, J.A. und Cheresh D.A., „Integrins and Cancer“, *Current Opinion in cell Biology*, **1996**, 8, 724-730
- [36.] Zhang, J., Naknyama, J., Ohyama, C. et al., “Sialyl Lewis X-dependent Lung Colonization of B16 Melanoma Cells through a Selectin-like Endothelial Receptor Distinct from E- or P-Selectin”, *Cancer Res*, **2002**, 62, 4194–4198

- [37.] Mikecz, K., „Vitaxin applied molecular evolution“, *Curr Opin Investig Drugs*, **2000**, Oct. 1(2), 199-203
- [38.] Brooks, S.A. et al., “Functional and molecular glycobiology”, **2002**, Oxford: BIOS Scientific Publ., 157-173
- [39.] Kreis, T. und Vale, R., „Guidebook to the extracellular matrix, anchor, and adhesion proteins” edited by Thomas Kreis and Ronald Vale, **1999**, Oxford University Press, NY.
- [40.] Schwartz, I., Seger, D. und Shaliel, S., „Molecules in Focus: Vitronectin“, *Int, J Biochem and Cell Biol*, **1999**, 31,539-544
- [41.] Bafetti, L.M., Young, T.N., Itoh, Y. et al., „Intact vitronectin induces matrix-metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression and enhance cellular invasion by melanoma cells”, *J Biol Chem*, **1998**, 273, 143-149
- [42.] Hofmann, U.B., „Bedeutung von Matrix-degradierenden Enzymen für die Melanomprogression“, *Der Hautarzt*, **2002**, 53, 587-595
- [43.] Coussens, L.M., Fingleton, B. und Matrisian L.M., „Matrix Metalloproteinase Inhibitors and Cancer : Trials and Tribulations“, *Science*, **2002**, 295, 2387-2392
- [44.] Butler, G.S., Butler, M.J., Atkinson, S.J. et al., “The TIMP-2 membrane type1 metalloproteinase receptor regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A. A kinetic study”, *J. Biol. Chem.*, **1998**, 273, 871-880
- [45.] Nagase, H. und Woessner, J.F., „Matrix metalloproteinases“, *J. Biol Chem*, **1999**, 274, 21491-21494
- [46.] Brooks, P.C., Strömblad, S., Sanders L.C. et al., “Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin $\alpha_v\beta_3$ ”, *Cell*, **1996**, 85, 683-693
- [47.] Egeblad, M. und Werb Z., „New Functions for the Matrix Metalloproteinases in Cancer Progression”, *Nature Reviews Cancer*, **2002**, 2, 161-174
- [48.] Edwards, D.R., „Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Cancer Therapy“, eds. Clendeninn, N.J. & Appelt, K., Human Press, Totowa, NJ, **2001**, 67-84

- [49.] Clark W.H. Jr., Elder, D.E., Guerry, D.I.V. et al., "A study of tumor progression: The precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma", *Hum Pathol*, **1984**, 15, 1147-1165
- [50.] Clark W.H. Jr., Elder, D.E., Guerry, D.I.V. et al., "Model predicting survival stage I melanoma based on tumor progression", *J Natl Cancer Inst*, **1989**, 82, 626-627
- [51.] Nesbit M. und Herlyn M., „Adhesion Receptors in Human Melanoma Progression“, *Invasion Metastasis*, **1994-95**, 14, 131-146
- [52.] Tang, A. et al., "E-cadherin is the major mediator of human melanocytic adhesion to keratinocytes in vitro", *J Cell Sci*, **1993**, 105, 179-190
- [53.] Schadendorf, D. et al., „Tumor progression and metastatic behaviour in vivo correlates with integrin expression on melanocytic tumors“, *J Pathol*, **1993**, 170, 429-434
- [54.] Kramer, R.H. et al., "Integrin expression in malignant melanoma", *Cancer Metastasis Rev*, **1991**, 10, 49-59
- [55.] Cheresch, D.A., „Structure, function and biological properties of integrin $\alpha_v\beta_3$ on human melanoma cells“, *Cancer Metastasis Rev*, **1991**, 10, 3-10
- [56.] Fidler, I.J., „Selection of successive tumor lines for metastases“, *Nature*, **1973**, 242, 148-149
- [57.] Briles, E.B. und Kornfeld, S., „Isolation and Metastatic Properties of Detachment Variants of B16 melanoma cells“, *J Natl Cancer Inst*, **1978**, 60, 1217-1222
- [58.] Raz, A., McLellan, W.L., Hart, I.R. et al., „Cell surface Properties of B16 melanoma variants with differing metastatic potential“, *Cancer Research*, **1980**, 40, 1645-1651
- [59.] Kath, R., Rodeck, U., Parmiter, A. et al., "Groth factor independence in vitro of primary melanoma cells from advanced but not early or intermediate lesions", *Cancer Therapy and control*, **1990**, 1, 179-191
- [60.] Marks, R., „Epidemiology of melanoma“, *Clin Exp Dermatol*, **2000**, 459-463

- [61.] Swerdlow, A.W. und Weinstock, M.A., „Do tanning lamps cause melanoma? An epidemiologic assessment”, *J Am Acad Dermatol*, **1998**, 38, 89-90
- [62.] Pollard, T.D. und Earnshaw, W.C., „Cell Biology“, **2004**, Elsevier Science USA, Chapter 32, 518
- [63.] Alberts, B., Bray, D., Lewis, J. et al., „Molekularbiologie der Zelle“, **1995**, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany, Chapter 16.5, 970-984
- [64.] Lauffenburger, D.A. und Horwitz, A.F., „Cell Migration: A physically integrated molecular process“, *Cell*, **1996**, 84, 359-369
- [65.] Hood, J.D. und Cheresch, D.A., “Role of integrins in cell invasion and migration”, *Nature Rev Cancer*, **2002**, 2, 91-100
- [66.] BD. 354165/354166 Guide rev. 1.0 Release Date: 1/2/01
- [67.] Gianni, S. und Bergamon, A., “Drug control of solid tumour Metastases: A critical view”, *Anticancer Research*, **1999**, 19, 1117-1124
- [68.] Ramnath, N. und Creaven, P., “Matrix Metalloproteinase Inhibitors”, *Curr Onco Reports*, **2004**, 6, 96-102
- [69.] Brooks, P.C. et al., “Antiintegrin alpha v beta 3 blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin”, *J Clin Invest.*, **1995** Oct;96(4):1815-22.
- [70.] Gruner, S.A.W., Locardi, E., Lohof, E. et al., „Carbohydrate-based mimetics in drug design: Sugar amino acids and carbohydrate scaffolds”, *Chem rev*, **2002**, 491-514
- [71.] Eskens, F.A.L.M., Dumez, H., Hoekstra, R. et al., „Phase I and pharmacokinetic study of continuous twice weekly intravenous administration of Cilengitide (EMD 121974), a novel inhibitor of the integrin $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ in patients with advanced solid tumours”, *European Journal of Cancer*, **2003**, 39, 917-926
- [72.] 46 Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose und Hämostasenforschung e.V., Erfurt, Februar **2002**,
<http://www.journalmed.de/pview.php?id=113&kat=aktuell>

- [73.] Engelberg, H., „Actions of heparin that may affect the malignant process“, *Cancer*, **1999**, 85, 257-227
- [74.] Parish, C.R., Freeman C., Brown, K.J. et al., “Identification of sulfated oligosaccharide-based inhibitors of tumor growth and metastasis using novel in vitro assays for angiogenesis and heparanase activity”, *Cancer Res*, **1999**, 59,3433-3441
- [75.] Bishoph, Y. et al, „Discrete multivariate analyses: Theory and Practice“, **1975**, MITPr, Cambridge, MA
- [76.] Kim E.Y-L., „Synthese von multivalenten Saccharidmimetika als Liganden für Zellmembran-Lectine und Inhibitoren der Zelladhäsion und Invasion“, Dez. **2002**, Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg, Fakultät für Pharmazie, Dissertation
- [77.] Meister, B., „Modellverbindungen zum Studium Sialinsäure-vermittelter Erkennungsprozesse: Synthese neuer Saccharide auf Basis von Carotinoiden und Furanen“, Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg, Fakultät für Pharmazie, Dissertation
- [78.] Wu, J.M., Rosser, M.P., Howlett, A.R. et al., „A cell-based adhesion assay for the characterization of integrin $\alpha_v\beta_3$ antagonists“, *Methods in Molecular Biology*, **1999**, Vol. 129: Integrin Protocols, Humana Press Inc., Totowa, NJ, 210-217
- [79.] Woynarowska, B., Skrincosky, D.M., Haag, A. et al., “Inhibition of lectin-mediated ovarian tumor cell adhesion by sugar analogs », *J. Biol Chem*, **1994**, 269, 22797-22803
- [80.] Schimdt R.R., Castro-Palomino J. und Retz O., „New aspects on glycoside bond formation“, *Pure and Applied Chemistry*, **1999**, 71, 729-744
- [81.] Pierschbacher, M. D. und Ruoslahti, E., „Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule“, *Nature*, **1984**, 309, 30-33
- [82.] Kim, E. Y.-L., Gronewold, C., Chatterjee, A. et al., „Oligosaccharide mimics containing galactose and fucose specifically label tumour cell surfaces and inhibit cell adhesion to fibronectin“, *ChemBioChem*, accepted 10.**2004**

- [83.] Hakomori, S., „Tumor malignancy defined by aberrant glycosylation and sphingoglycolipid metabolism”, *Cancer Res*, **1996**, 56, 5309-5318
- [84.] Lee, Y.C. und Lee, R.T., „Carbohydrate-Protein Interactions: Basis of Glycobiology”, *Acc. Chem. Res.* **1995**, 28, 321.
- [85.] Oguchi, H., Toyokuni, T., Dean, B. et al., „Effect of lactose derivatives on metastatic potential of B16 melanoma cells”, *Cancer Commun.*, **1990**, 2, 311-316
- [86.] Bertozzi, C.R. und Kiessling, L.L., “Chemical Glycobiology”, *Science*, **2001**, 291, 2357-2364.
- [87.] Zheng, M., Fang, H. und Hakomori, S., “Functional role of N-Glycosylation in $\alpha_5\beta_1$ Integrin Receptor”; *J. Biol. Chem.*, **1994**, 269, 12325-12331
- [88.] Akiyamam, S.K., Yamada, S.S. und Yamada, K.M., “Analysis of the role of glycosylation of the human fibronectin receptor”, *J. Biol. Chem.*, **1989**, 264, 18011-18018
- [89.] Danker, K., Fischer, A. und Reutter, W., „Modified and Modifying Sugars as a new tool for the development of therapeutic agents-Glycosylated Phospholipids as a new type of antiproliferative agents“,
- [90.] Simon, K.O. et al., “The $\alpha_v\beta_3$ integrin regulates $\alpha_5\beta_1$ -mediated cell migration toward fibronectin”, *J. Biol. Chem.*, **1997**, 272,29380-29389
- [91.] Hynes, R.O., „A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis“, *Nature Medicine*, **2002**, 8, 918-921
- [92.] Pochee, E., Litynska, A., Amoresano, A. et al., “Glycosylation profile of integrin $\alpha_3\beta_1$ changes with melanoma progression“, *Biochim Biophys Acta*, **2003**, 1643,113-123
- [93.] Nadanaka, S., Sato, C., Kitajima, K. et al., “Occurrence of oligosialic acids on integrin α_5 subunit and their involvement in cell adhesion to fibronectin“, *J. Biol. Chem*, **2001**, 276, 33657-33664
- [94.] Pschyrembel, *Klinisches Wörterbuch*, Nikol Verlagsgesellschaft mbH, **1994**, 257 Auflage

- [95.] Young-Choon, L., Shlyankevich, M, Jeong, H.-K. et al., "Bioactivation of 5-hydroxymethyl-fualdehyde to an electrophilic and mutagene allylic sulfuric acid ester", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **1995**, 209, 996-1002
- [96.] McDougall, J.R., Bani, M.R., Lin, Y. et al., "Proteolytic switching : opposite patterns of regulation of gelatinase B and its inhibitor TIMP-1 during human melanoma progression and consequences of gelatinsae B overexpression", *British Journal of Cancer*, **1999**, 80, 504-512
- [97.] Teti, A., Farina, A.R., Villanova, I. et al., "Activation of MMP-2 by human GCT23 giant cell tumour cells induced by osteopontin, bone sialoprotein, and GRGDSP peptides is RGD and cell shape Change dependent", *Int. J. Cancer*, **1998**, 77, 82-93
- [98.] Westermarck, J. und Kähäri, V.-M., „Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion“, *FASEB*, **1999**, 13, 781-792
- [99.] Khasigov P. Z., et al., „Matrix metalloproteinases of normal human tissues“, *Biochemistry* **2001**, 66, 130-140
- [100.] Melchiori, A. et al., "The $\alpha_3\beta_1$ integrin is involved in melanoma cell migration and invasion", *Exp. Cell. Res.*, **1995**, 219, 233-242
- [101.] Seiki, M., „The cell surface: the stage of matrix metalloproteinase regulation of migration“, *Curr Opin Cell Biol*, **2002**, 14, 624-632
- [102.] Yamada K.M., Pankov, R. und Cukierman, "Dimensions and dynamics in integrin function", *Braz J Med Biol Res*, **2003**, 36, 959-966.
- [103.] Mislovicova, D., Masarova, J., Mendichi, R. et al., "Neoglycoconjugates of mannan with bovine serum albumin and their Interaction with lectin concanavalin A", *Bioconjugate Chem.*, **2002**, 13,136-142.
- [104.] Hautanen, A., Gailit, J., Mann, D.M. et al., "Effects of modifications of the RGD sequence and its context on recognition by the fibronectin receptor", *J. Biol. Chem.*, **1989**, 264, 1437-1442

- [105.] Rojo, J., Diaz, V., De la Fuente, J.M.et al., “Gold Glyconanoparticles as new tools in antiadhesive therapy”, *ChemBioChem*, **2004**, 5, 291-297
- [106.] Matsuda, M., Nishimura, S.-I., Nakajima, F. et al., “Heterobifunktional ligands: practical chemoenzymatic synthesis of a cell adhesive glycopeptide that interacts with both selectins and integrins”, *J. Med. Chem.*, **2001**, 44, 715-724
- [107.] Frei E., persönliche Mitteilung

11 Danksagung

Herrn Prof. Dr. M. Wießler danke ich recht herzlich dafür, daß er mir die Möglichkeit gegeben hat dieses Projekt zu bearbeiten. Danke auch für die vielen interessanten Diskussionen sowie das Vertrauen, das er meiner bisherigen Ausbildung entgegengebracht hat eine derartige Aufgabenstellung zu bewältigen.

Frau Dr. E. Frei, der Betreuerin dieser Arbeit, danke ich für die interessante Themenstellung, daß sie mich bei der Lösung entstehender Probleme stets mit Rat und Tat unterstützte und daß sie mir auch bei menschlichen Schwierigkeiten stets freundschaftlich zur Seite stand.

Der Herrmann-Schlosser Stiftung danke ich für die Bereitstellung eines zweijährigen Promotionsstipendiums.

Herrn Prof. Dr. N. Metzler-Nolte danke ich für die freundliche Übernahme des zweiten Gutachtens dieser Arbeit.

Herrn Dr. Christian Kliem danke ich für die stetige Bereitschaft meine chemischen Kenntnisse aufzufrischen und mir neben Peter Lorenz und Ed Müller bei den synthetischen Arbeiten zu helfen.

Prof. Dr. A. Chatterjee many thanks for the very interesting introductions into many of the basic methods of this work and the yummy sweets.

Regine Garcia Boy und Michael Cornelius danke ich besonders für die Korrektur meiner Arbeit sowie ihre grenzenlose Geduld, mit welcher sie meiner zeitweiligen Nörgelei zugehört haben. Dies gilt auch für Evelyn Kim, Sonja Wolf, Andrea Breuer, Erwin Mark, und Bettina Meister. Neben den restlichen Mitgliedern der Abteilung PD Dr. Heinz Schmeiser, Chris Bieler, Ilse Schindler, Dirk Stach, Nadine Eschen, Marlis Herbert, Christoph Tacheci, Markus Schnopp, Hans-Herrmann Schrenk, Helene Boittin,..., und allen, die ich noch vergessen habe, habt Ihr immer für ein angenehmes und innovatives Arbeitsklima gesorgt.

Besonderen Dank auch an Prof. Dr. C. Granzow und Dr. M. Kopun-Granzow für die vielen guten Ratschläge bezüglich der Zellkultur, sowie die vielen anregenden Diskussionen.

Sabrina Ehnert, Claudia Baumann und Annette Kraus – den Diplomanden und Praktikanten, welche ich während meiner Arbeit betreut habe - danke ich für die engagierte Mitarbeit und das Interesse an dem Projekt.

Besonderen Dank möchte ich meinem früheren Ausbilder Dr. M. Kiefer sowie den Kollegen des damaligen Labors „114/115“ aus der AG von Prof. Helmchen sagen, denen es vor nunmehr 14 Jahren gelungen ist mein Interesse für die Naturwissenschaften zu wecken. Dank sei an dieser Stelle all denjenigen von denen ich daraufhin lernen durfte, namentlich Birgitt Schmauser, Maritha Grothus, Susanne Schwiening und Eva Frei. Hinzu kommen wahrscheinlich unzählige Personen, bei denen ich mir die wichtigen Kleinigkeiten fürs Leben und fürs Arbeiten abgeguckt habe.

Nicht zu vergessen sind an dieser Stelle meine Eltern, meine Geschwister, sowie meine Großeltern, denen ich bestimmt nicht nur finanziell öfter Sorgen bereitet habe. Danke auch an die gesamte Familie Hemberger für die vielen tollen Stunden die wir in den letzten Jahren gemeinsam verbracht haben und welche mir die Möglichkeit gegeben haben, die nötige Kraft für meine Arbeit zu tanken. Dank sei außerdem all meinen Freunden, welche mich bis hierher begleitet haben.