

**Vorstellung neuartiger therapeutischer Strategien zur
Hemmung des metastasierungsrelevanten Integrins VLA-4
an Melanomzellen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von
Martin Schlesinger
aus Köln

Bonn, Dezember 2010

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

1. Referent: Prof. Dr. G. Bendas

2. Referentin: Prof. Dr. G. König

Tag der mündlichen Prüfung: 06.04.2011

Erscheinungsjahr: 2011

Meiner Familie und meiner Frau My Loan gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
1 EINLEITUNG	1
2 THEORETISCHER TEIL	3
2.1 Prinzip der hämatogenen Metastasierung	3
2.2 Beteiligung von Adhäsionsrezeptoren bei der hämatogenen Metastasierung	4
2.2.1 Aufbau der Selektine.....	4
2.2.2 Rolle des P-Selektin bei der hämatogenen Metastasierung.....	5
2.2.3 Rolle des L-Selektin bei der hämatogenen Metastasierung.....	6
2.2.4 Rolle des E-Selektin bei der hämatogenen Metastasierung.....	8
2.2.5 Rolle des Integrins VLA-4 bei der hämatogenen Metastasierung.....	9
2.2.6 Rolle der Thrombozyten bei der hämatogenen Metastasierung.....	12
2.3 Antimetastatische Wirkung von Heparin	15
2.3.1 Klinische Erkenntnisse.....	15
2.3.2 Molekulare Mechanismen.....	16
2.4 Lysophosphatidylcholin	18
2.4.1 Vorkommen und physiologische Funktionen von Lysophosphatidylcholin.....	18
2.4.2 Lysophosphatidylcholinrezeptoren und deren Funktionen.....	20
2.4.3 Lysophosphatidylcholin und Krebs.....	21
2.4.4 Lysophosphatidylcholin und Metastasierung.....	23
2.5 Das Aktinzytoskelett und seine Bedeutung bei der Metastasierung	25
2.6 Histon-Deacetylase-Inhibitoren	26
2.6.1 Funktionsweise von Histon-Deacetylasen.....	26
2.6.2 Histon-Deacetylase-Inhibitoren und Krebs bzw. Metastasierung.....	27
2.7 Ziel der Arbeit	29
3 MATERIAL UND METHODEN	31
3.1 Verwendete Materialien	31
3.1.1 Geräte.....	31
3.1.2 Chemikalien.....	34
3.1.3 Antikörper.....	38
3.1.4 Testsubstanzen.....	38
3.1.5 Sonstiges.....	39
3.1.6 Puffer und Lösungen.....	41
3.1.7 Statistik.....	43

3.2 Zellkultur	43
3.2.1 Revitalisierung und Inkulturnahme der Zellen.....	43
3.2.2 Kryokonservierung von Zellen.....	44
3.2.3 Zellzahlbestimmung.....	44
3.3 Zelllinien	45
3.3.1 MV3 Melanomzellen.....	45
3.3.2 B16F10 Melanomzellen.....	45
3.3.3 bEnd3 Endothelzellen.....	45
3.3.4 U937.....	46
3.3.5 G361 Melanomzellen.....	46
3.3.6 HUVEC.....	46
3.3.7 AsPC-1 Pankreasadenokarzinomzellen.....	46
3.3.8 MIA PaCa-2 Pankreasadenokarzinomzellen.....	47
3.4 Isolierung von Thrombozyten	47
3.4.1 Isolierung und Quantifizierung von Thrombozyten.....	47
3.4.2 Markierung von Thrombozyten.....	48
3.4.3 Aktivierung von Thrombozyten.....	48
3.5 Zytotoxizitätsbestimmungen mittels MTT Assay	48
3.5.1 Prinzip des MTT Assays.....	48
3.5.2 Praktische Durchführung und Auswertung von MTT Assays.....	49
3.6 Durchflusszytometrie	50
3.6.1 Präparation der Zellen für die Durchflusszytometrie.....	50
3.6.2 Bestimmung verschiedener CD Antigene auf Zelloberflächen mittels Antikörper.....	50
3.6.3 Bestimmung der Interaktion von Tumorzellen mit Thrombozyten.....	51
3.7 Mikroskopische Zelladhäsionsbestimmungen unter physiologischen Fluss- bedingungen	51
3.7.1 Prinzip der Methode.....	51
3.7.2 Vorbereitung der Proben.....	52
3.7.3 Reinigung der Glasplättchen.....	52
3.7.4 Beschichtung der Glasplättchen mit Rezeptorproteinen.....	52
3.7.5 Präparation der Glasplättchen mit Endothelzellen.....	53
3.7.6 Aufbau der Durchflussapparatur.....	54
3.7.7 Durchführung von Zelladhäsionsexperimenten und Testung potentieller Inhibitoren.....	55
3.7.8 Auswertung mithilfe der Imagoquant MultiTrack-AVI-2 Software.....	55
3.8 Konfokale-Laserscanning-Mikroskopie	56
3.8.1 Prinzip der Methode.....	56
3.8.2 Vorbereitung der Proben.....	57
3.9 Rasterelektronenmikroskopie	57
3.9.1 Prinzip der Methode.....	57
3.9.2 Vorbereitung der Zellen.....	58
3.9.3 Kritisch-Punkt Trocknung der Zellen und Sputtern der Probe.....	59
3.10 SACED Motilitätsassay	59
3.10.1 Prinzip des SACED Motilitätsassays („stroboscopic analysis of cell dynamic“).....	59
3.10.2 Vorbereitung der Proben.....	60

3.10.3 Durchführung und Auswertung.....	60
3.10.4 Bestimmung der Zellgröße bzw. Oberflächenausdehnung als Parameter für die Zelladhäsion.....	61
3.11 Bestimmung Apoptose-relevanter Proteine mittels „Proteome Profiler Human Apoptosis Array Kit“.....	61
3.11.1 Gesamtproteinbestimmung von Zelllysaten mittels „Amido Black Protein Assay“ ..	61
3.11.2 Prinzip der Methode.....	62
3.11.3 Durchführung und Auswertung.....	63
3.12 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Interaktion von Thrombozyten mit Tumorzellen.....	63
3.12.1 Durchführung und Auswertung.....	63
3.13 Integrin Knockdown.....	64
3.13.1 VLA-4 Knockdown in MV3 Melanomzellen.....	64
3.14 Genexpressionsanalyse.....	65
3.14.1 Prinzip, Durchführung und Auswertung.....	65
3.15 Tierexperimentelle Simulation der hämatogenen Metastasierung.....	67
3.15.1 Durchführung der Experimente und Auswertung.....	67
4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	69
4.1 Bestimmung der Interaktion zwischen Heparinderivaten und VLA-4.....	69
4.1.1 Charakterisierung der Melanomzelllinie MV3 hinsichtlich metastasierungsrelevanter Adhäsionsrezeptoren und deren Liganden.....	69
4.1.1.1 Durchflusszytometrische Bestimmung des Integrins VLA-4 und der P- und L-Selektin-Liganden auf MV3 Melanomzellen.....	69
4.1.1.2 Bestimmung der Interaktion von Thrombozyten mit MV3 Melanomzellen.....	70
4.1.1.3 Untersuchung der Zelladhäsion an P-Selektin unter physiologischen Flussbedingungen.....	71
4.1.1.4 Bestimmung der VLA-4/VCAM-1-vermittelten Zelladhäsion unter physiologischen Flussbedingungen und deren siRNA-vermittelte Herabregulation.....	72
4.1.2 Die Inhibitionswirkung von strukturell modifizierten Heparinderivaten auf die VLA-4-vermittelte Zelladhäsion von MV3 Zellen unter physiologischen Flussbedingungen.....	74
4.1.2.1 Charakterisierung des Adhäsionsverhaltens von MV3 Melanomzellen an HUVEC unter physiologischen Flussbedingungen.....	74
4.1.2.2 Beeinflussung des VLA-4/VCAM-1-Bindungsweges durch unfraktioniertes und fraktioniertes Heparin und Antikörper.....	75
4.1.2.3 Beeinflussung des VLA-4/VCAM-1-Bindungsweges durch Heparinderivate definierter Größe.....	76
4.1.2.4 Beeinflussung des VLA-4/VCAM-1-Bindungsweges durch strukturell modifizierte Heparinderivate.....	77
4.1.2.5 Charakterisierung der Heparin Bindungsstelle am VLA-4.....	79
4.1.3 Untersuchung der Relevanz der VLA-4/VCAM-1-Interaktion in einem Mausmodell mit modifizierten Heparinderivaten.....	81

4.2 Untersuchung des Einflusses von Lysophosphatidylcholin auf das Metastasierungsverhalten verschiedene Krebszelllinien	84
4.2.1 LPC Metabolismus von B16F10 Melanomzellen.....	84
4.2.1.1 Aufnahme von LPC durch B16F10 Melanomzellen.....	84
4.2.1.2 Veränderung der Fettsäurekomposition von B16F10 Melanomzellen.....	86
4.2.2 Untersuchung von apoptoserelevanten Proteinen nach LPC Inkubation.....	86
4.2.3 Einfluss des LPC auf die Adhäsions- und Migrationseigenschaften der B16F10 Melanomzellen.....	88
4.2.3.1 Bestimmung der Expression von Adhäsionsrezeptoren nach Inkubation mit verschiedenen LPC Konzentrationen.....	88
4.2.3.2 Beeinflussung des VLA-4/VCAM-1-Bindungsweges durch verschiedene LPC Konzentrationen.....	90
4.2.3.3 Beeinflussung des VLA-4/VCAM-1-Bindungsweges durch verschiedene LPC Inkubationszeiträume.....	91
4.2.3.4 LPC-vermittelte Beeinflussung der Interaktion von Thrombozyten mit B16F10 Melanomzellen.....	93
4.2.3.5 Einfluss des LPC auf die Zellgröße und den Zelldurchmesser.....	94
4.2.3.6 Einfluss des LPC auf die Migrationseigenschaften von B16F10 Melanomzellen.....	95
4.2.4 Mikroskopische Untersuchungen verschiedener Membraneigenschaften nach LPC Inkubation.....	97
4.2.4.1 Bestimmung der Integrinverteilung auf B16F10 Melanomzellen nach LPC Inkubation.....	97
4.2.4.2 Rasterelektronenmikroskopische Betrachtung der Zellmorphologie nach LPC Inkubation.....	98
4.2.4.3 Quantifizierung der Filopodien auf B16F10 Melanomzellen.....	102
4.2.4.4 Betrachtung des Aktinzytoskeletts nach LPC Inkubation.....	104
4.2.5 Einfluss verschiedener Lipidderivate bzw. Lipidmetabolite auf die Zelladhäsion von B16F10 Melanomzellen.....	106
4.2.5.1 Beeinflussung des VLA-4/VCAM-1-Bindungsweges durch Hexadecylphosphocholin unter physiologischen Flussbedingungen.....	106
4.2.5.2 Beeinflussung des VLA-4/VCAM-1-Bindungsweges durch Glycerophosphocholin unter physiologischen Flussbedingungen.....	107
4.2.6 Beeinflussung des VLA-4/VCAM-1-Bindungsweges von B16F10 Melanomzellen durch Kombinationen aus LPC und Heparin.....	108
4.2.7 Beeinflussung des VLA-4/VCAM-1-Bindungsweges von MV3 Melanomzellen durch LPC unter physiologischen Flussbedingungen.....	110
4.2.8 Untersuchung des Transkriptom von MV3 Melanomzellen nach LPC Inkubation mittels Genexpressionsanalyse.....	112
4.2.9 In vivo Untersuchung des LPC Effektes auf B16F10 Melanomzellen in einem Mausmodell.....	116
4.2.10 Verallgemeinerung des LPC Effektes auf verschiedene Tumorentitäten.....	118

4.3 Untersuchung des Einflusses von Histon-Deacetylase-Inhibitoren auf die Adhäsionswirkung verschiedener Krebszelllinien als potentiell antimetastatischer Therapieansatz	122
4.3.1 Beeinflussung des VLA-4/VCAM-1-Bindungsweges von MV3 Zellen durch verschiedene Inkubationszeiten und verschiedene Konzentrationen an TSA/ST71 und HDACi x.....	122
4.3.2 Einfluss von TSA/ST71 und HDACi x auf die Expression des Integrins VLA-4.....	125
4.3.3 Beeinflussung des VLA-4/VCAM-1-Bindungsweges von G361 Melanomzellen durch TSA und HDACi x.....	126
4.3.4 Inhibition von krebsrelevanten Schlüsselenzymen zur Beeinflussung des VLA-4/VCAM-1-Bindungsweges.....	127
5 ZUSAMMENFASSUNG	131
6 LITERATURVERZEICHNIS	133
7 VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN	157
8 PUBLIKATIONSLISTE	161
9 VERFASSERERKLÄRUNG	165
10 LEBENSLAUF	167

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
Aqua dem.	Aqua demineralisata
ATP	Adenosintriphosphat
bEnd3	brain endothelioma cells
bFGF	basic fibroblast growth factor
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Calcein-AM	Calcein-Acetoxymethylester
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
D-MEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECM	extracellular matrix
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	epidermal growth factor
FACS	fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
ggf.	gegebenenfalls
HRP	Horseradish peroxidase
HUVEC	human umbilical vein endothelial cell
IGF	Insulin-like growth factor
IU	international unit

i. v.	Intravenös
kD	Kilodalton
K _D	Gleichgewichtsdissoziationskonstante
LPC	Lysophosphatidylcholin
LPA	Lysophosphatidic acid
min	Minute
Mio	Million
mL	Milliliter
mm	Millimeter
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
ng	Nanogramm
PBS	phosphate-buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
pN	Piconewton
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rpm	rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
s.	siehe
Std.	Stunde
TCA	Trichloroacetic acid
TNF- α	tumor necrosis factor alpha
TRAP-14	thrombin receptor agonist peptide-14
V	Volumen
VEGF	vascular endothelial growth factor
vWF	von-Willebrand-Faktor

1 Einleitung

Die Diagnose Krebs ereilt in Deutschland laut der deutschen Krebshilfe e. V. jedes Jahr mehr als 450.000 Menschen, 216.000 versterben an den Folgen der Erkrankung. Oft ist ein Primärtumor chirurgisch entfernbar oder durch Chemo- oder Radiotherapie behandelbar. Ursächlich für das Fortschreiten der Krankheit und letztendlich für das Sterben der Patienten ist die Bildung von Metastasen, die vom Primärtumor entfernte Organe infiltrieren und zerstören. Tumorzellen des Primärtumors verlassen beim Prozess der hämatogenen Metastasierung ihren Zellverband, migrieren zu Blutgefäßen, penetrieren diese und werden mit dem Blutfluss fortgetragen. Diese adhären dann am Gefäßendothel in entfernten Organen, beispielsweise im Gehirn oder in der Lunge, transmigrieren in das umgebende Gewebe und etablieren eine Metastase. Ein besseres Verständnis dieses bisher nur ansatzweise aufgeklärten Prozesses könnte daher die Möglichkeit pharmakologischer Interventionen bieten und ein potientes Feld antimetastatischer Therapien eröffnen.

An der Adhäsion von Tumorzellen an das Gefäßendothel sind nachweislich Adhäsionsrezeptoren aus den Familien der Selektine und Integrine beteiligt. Diese eigentlich von Zellen des Immunsystems genutzten Moleküle stellen daher interessante Ziele im metastatischen Geschehen dar. So konnte für das zur Antikoagulation verwendete Polysaccharid Heparin eine Adhäsionsrezeptor-blockierende Wirkung nachgewiesen werden. In der klinischen Praxis verlängert sich durch Heparinapplikation das Überleben von Krebspatienten.

Im Rahmen dieser Arbeit soll der Prozess der Adhäsion von Tumorzellen an Moleküle des Gefäßendothels durch verschiedene Strategien inhibiert werden. Dabei stehen die Wechselwirkung zwischen dem Integrin VLA-4 (very late activation antigen-4) und dem endothelialen VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) im Fokus der Untersuchungen. Einerseits werden neue pharmakologische Optionen evaluiert, andererseits soll ein besseres Verständnis der Rolle des VLA-4 beim metastatischen Geschehen gewonnen werden.

In der Arbeit werden grundsätzlich drei Strategien zur Beeinflussung der Funktionalität des VLA-4 verfolgt.

Zum einen werden die initialen Erkenntnisse, dass Heparin auch eine Bindungsfähigkeit an VLA-4 besitzt, ausgenutzt, um das Prinzip der kompetitiven Inhibition des VLA-4 durch verschiedene Heparinderivate zu realisieren. Durch den Einsatz neuartiger Heparinderivate werden ausführliche Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Heparinbindung an VLA-4 vorgestellt.

Desweiteren werden Einblicke zur antimetastatischen Wirksamkeit von gesättigten Phospholipiden auf die Fragestellung des VLA-4 als metastasierungsrelevanten Adhäsionsrezeptor übertragen. Es werden hierfür erstmals Erkenntnisse zur Beeinflussung der VLA-4 Funktion durch Lysophosphatidylcholin funktionell und mechanistisch vorgestellt.

Letztlich wird die Möglichkeit analysiert, inwieweit Hemmstoffe bekannter signalling pathways ebenfalls einen Einfluss auf die Adhäsionsfunktion des VLA-4 entfalten.

Die Arbeit bietet somit einen breiten Einblick in die potentielle pharmakologische Beeinflussbarkeit von Adhäsionsrezeptoren als vielversprechende Optionen für eine dringend notwendige antimetastatische Therapie.

2 Theoretischer Teil

2.1 Prinzip der hämatogenen Metastasierung

Die hämatogene Metastasierung ist ein hochregulierter, komplexer Prozess, der noch nicht in allen Einzelheiten verstanden ist. Eine Tumorzelle, die sich diesem Prozess unterwirft, muss alle Teilschritte dieser Kaskade erfolgreich durchlaufen, um schließlich einen Sekundärtumor in einem entfernten Organ etablieren zu können¹. Die erste Eigenschaft, die eine Tumorzelle aufweisen muss, ist die Fähigkeit, sich vom Primärtumor zu lösen. Dies geschieht beispielsweise durch eine verminderte Expression von E-Cadherin, das homophile Zell-Zell-Interaktionen vermittelt. So korreliert die verringerte Expression von E-Cadherin mit der Progression von Tumoren². Für manche Tumorentitäten kann auch ein Zusammenhang zwischen der Expression von Tight Junction Proteinen wie beispielsweise Claudin-1 und der Tumorpherung hergestellt werden³. Nach erfolgter Lösung von Zell-Zell-Kontakten kommt es zur Sezernierung verschiedener Enzyme, die die extrazelluläre Matrix degradieren. Als involvierte Enzyme sind die Matrixmetalloproteinasen, die Cathepsine und die Serinproteinasen zu nennen. Diese lassen sich anhand ihrer Substratspezifitäten in weitere Subgruppen unterteilen. Eine Involvierung dieser Enzyme in die Krebsprogression wurde bereits für viele unterschiedliche Tumore gezeigt⁴⁻⁶. So dient z. B. der Plasminogenaktivator vom Urokinasetyyp als Tumormarker bei Brustkrebs⁷. Nach erfolgter Herauslösung aus dem Zellverband und Degradierung der extrazellulären Matrix erfolgt die Zellmigration. Dazu findet eine Polarisierung der Zelle in Vorder- und Hinterseite statt, die eine gerichtete Migration erst möglich macht⁸. Nach Ausbildung von Lamellipodien und Filopodien an der Vorderseite der Zelle und Integrin-vermittelter Adhäsion an die extrazelluläre Matrix, kommt es zur Myosin II-vermittelten Kontraktion des Zelleibes⁹. Parallel dazu findet am hinteren Teil der Zelle eine proteolytische oder durch mechanische Kräfte bedingte Ablösung von der extrazellulären Matrix statt. Hierbei verbleiben Integrinfragmente auf der extrazellulären Matrix, so dass eine Migrationsspur entsteht¹⁰.

Nach enzymatisch erfolgter Degradation der Endothelzellschicht von Gefäßen kommt es zur Dissemination der Tumorzellen durch den Blutkreislauf. Die hieran beteiligten Mechanismen und Rezeptoren wie z. B. Proteine aus den Familien der Selektine und Integrine, werden in folgenden Kapiteln ausführlich erläutert. Nach Verlassen des Blutbettes durch Transmigration kommt es durch mitotische Teilung der Zelle zur Etablierung einer Metastase.

2.2 Beteiligung von Adhäsionsrezeptoren bei der hämatogenen Metastasierung

2.2.1 Aufbau der Selektine

Der Fokus der vorliegenden Arbeit soll auf der Rolle von Adhäsionsrezeptoren im metastatischen Geschehen liegen, daher werden diese zunächst näher beleuchtet. Erläuterungen zu molekularen Strukturen und Aufbauten unterschiedlicher Adhäsionsrezeptorklassen sowie deren physiologische Funktionen sollen zum besseren Verständnis der pathophysiologischen Situation beitragen. Zuerst soll auf die Familie der Selektine eingegangen und deren Beteiligung an einer Immunantwort skizziert werden.

Die Entdeckung der Selektine reicht in das Jahr 1983 zurück, als mithilfe eines Antikörpers L-Selektin auf der Oberfläche von Leukozyten charakterisiert werden konnte¹¹. Erst 1989 wurden die Selektine von Johnson und McEver als „lectin cell adhesion molecules“ (LECAMs) beschrieben und zu einer Familie zusammengefasst¹².

Die Familie der Selektine lässt sich in drei Klassen einteilen. E-Selektin, das auf den Endothelzellen der Blutgefäße zu finden ist, L-Selektin, das auf Leukozyten exprimiert wird und P-Selektin, das auf Blutplättchen und ebenso wie E-Selektin auf dem Gefäßendothel lokalisiert ist. Selektine sind in der Lage, bestimmte Kohlenhydratmuster z. B. auf Zelloberflächen zu erkennen und spezifisch zu binden. Vermittelt wird diese Calciumionen-abhängige Bindung durch die N-terminal angeordnete Lektin-Domäne, die unter den drei Selektinen eine hohe Sequenzhomologie von 60-65 % aufweist¹³. Auch im weiteren Aufbau sind sich alle Selektine sehr ähnlich¹⁴. An die Lektindomäne schließt sich eine wegen ihrer Ähnlichkeit nach dem „epidermal growth factor“ (EGF) benannte Region an. Sie übt einen allosterischen Effekt auf die Lektinbindungsdomäne aus¹⁵. Auch wird eine direkte Beteiligung an der Ligandbindung beschrieben¹³.

An die EGF-Domäne gebunden sind die „short consensus repeats“ (SCRs), die neben der Lokalisation eine weitere Unterscheidung der Selektine zulassen¹⁶. L-Selektin weist zwei, P-Selektin neun und E-Selektin sechs SCRs auf. Sie verleihen der Lektin- und der EGF-Domäne ihre exponierte Lage. Zudem sind sie an der Rezeptorstabilisierung und an der Signaltransduktion beteiligt. Auch wird eine Rolle bei der Liganderkennung und der Aktivität der Lektindomäne postuliert^{17,18}. Verankert in der Zellmembran sind die Selektine durch einen transmembranären Bereich, an den sich ein kurzer zytoplasmatischer Rest von 17 Aminosäuren anschließt. Für L-Selektin sind drei Interaktionspartner beschrieben, die an der Signaltransduktion über den zytoplasmatischen Rest beteiligt sind¹⁹. Auch wird über die zytoplasmatische Domäne die proteolytische Abspaltung (Shedding) des L-Selektin von der Leukozytenoberfläche gesteuert. Sowohl P- als auch E-Selektin können über ihre

zytoplasmatischen Reste die Tyrosinkinasen „spleen tyrosine kinase“ (Syk) und „Src-family tyrosine kinases“ (SFKs) aktivieren^{20,21}.

2.2.2 Rolle des P-Selektin bei der hämatogenen Metastasierung

P-Selektin (CD62P, PADGEM, GMP-140) wird in den α -Granula von Thrombozyten und in den Weibel-Palade-Körperchen von Endothelzellen dauerhaft vorrätig gehalten. Nach Stimulation der Zellen mit z. B. Thrombin, Proteinen des Komplementsystems oder ADP fusionieren die Vesikel mit der Zellmembran, so dass P-Selektin auf der Zelloberfläche präsentiert werden kann. Ca. 30 bis 60 min nach Stimulusentzug findet eine Endocytose des präsentierten P-Selektins statt, veranlasst durch bestimmte Aminosäuren im zytoplasmatischen Teil des P-Selektins^{14,22-25}. Auch kann durch TNF α oder LPS Stimulation eine Transkription von P-Selektin in Endothelzellen hervorgerufen werden, die nach vier Stunden ihr Maximum erreicht²⁶⁻²⁸.

Selektine erkennen und binden mucinähnliche Glykoproteine. Mucine bestehen aus einem Proteingrundgerüst, an das O-glykosidisch Kohlenhydratketten gebunden sind, die bis zu 75 % des gesamten Moleküls ausmachen können. Das minimale Bindungsmotiv für alle Selektine besteht aus der sialinisierten Blutgruppenderminante „sialyl-Lewis^x“ (sLe^x) und ihrem Isomer „sialyl-Lewis^a“ (sLe^a). Durch Akkumulation vieler sLe^x Epitope auf einem Proteingrundgerüst wird eine Affinitätssteigerung gegenüber den Selektinen erreicht²⁹.

Den am meisten erforschten Selektin-Liganden stellt das „P-Selectin glycoprotein ligand-1“ (PSGL-1) dar^{30,31}. Durch seine exponierte Lokalisation auf den Spitzen der Mikrovilli des Endothels kann PSGL-1 zum einen die Leukozytenrollen entlang des Endothels vermitteln, andererseits die homotypischen Leukozyt-Leukozyt-Interaktionen begünstigen, da auch L-Selektin PSGL-1 mit hoher Affinität bindet. Für die Bindung an P-Selektin ist eine Sulfatierung an bestimmten Tyrosinresten des Proteingrundgerüsts essentiell³². Neben der reinen Bindungsfunktion ist auch die PSGL-1-vermittelte Signaltransduktion Gegenstand aktueller Untersuchungen. Es konnte gezeigt werden, dass über den zytoplasmatischen Rest eine Aktivierung von Proteinkinasen (Scr) bei Bindung an P-Selektin erfolgt und dies zur Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade führen kann³³. Neben PSGL-1 wurden bereits CD24, GPIb α und die Gruppe der Sulfatide (sulfatierte Galactocerebroside) als P-Selektin-Liganden identifiziert³⁴⁻³⁶.

Der Beitrag des thrombozytären P-Selektins zur hämatogenen Metastasierung konnte in *in vitro* als auch in *in vivo* Untersuchungen herausgearbeitet werden (s. Kapitel 2.2.6). Die

Expression von endotheliale P-Selektin ermöglicht in physiologischer Weise das Rollen und Abbremsen von Leukozyten, wodurch erst eine Integrin-vermittelte, feste Adhäsion an das Gefäßendothel möglich wird. Auch Tumorzellen treten über ihre P-Selektin-Liganden mit dem Gefäßendothel in Wechselwirkung. Allerdings entspricht das vermittelte Zellrollen nicht dem von Leukozyten, denn die Tumorzellen exprimieren zwar mucine P-Selektin-Liganden aber zumeist kein PSGL-1³⁷⁻³⁹. Der P-Selektin-Ligand CD44v auf Kolonkarzinomzellen (LS174T) beispielsweise vermittelt eine Adhäsion der Zelle an P-Selektin, die einer Kraft von 125 pN standhält. Ein Polymorphkerniger Leukozyt hingegen lässt sich erst bei einer Kraftaufwendung von 175 pN von rekombinatem P-Selektin entfernen³⁹. Als weiterer P-Selektin-Ligand auf Tumorzellen konnte das sulfatierte Galactocerebrosid SM4 identifiziert werden, das zur Metastasierung von MC-38 Kolonkarzinomzellen maßgeblich beiträgt⁴⁰. Auch der Stammzellmarker CD24 wurde auf B16F10 und K1735 Melanomzellen als P-Selektin-Ligand identifiziert und dient als Tumormarker bzw. Prognosemarker bei nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom⁴¹.

Die Rolle von P-Selektin bei der hämatogenen Metastasierung konnte durch den Einsatz von Knockout ($P^{-/-}$)-Mäusen gezeigt werden. Hier war eine Verminderung der Metastasierung zu beobachten⁴². Allerdings kann bei P-Selektin defizienten Mäusen nicht zwischen thrombozytärem und endotheliale P-Selektin unterschieden werden.

Um den Beitrag von endothelial exprimiertem P-Selektin zur Metastasierung zu untersuchen, wurde C57BL/6J Mäusen das Knochenmark von P-Selektin Knockout ($P^{-/-}$)-Mäusen implantiert. Diese Tiere sind Träger endothelialen aber nicht thrombozytären P-Selektins. In den anschließend durchgeführten Metastasierungsuntersuchungen stellte sich heraus, dass die Zahl der Metastasen im Lungengewebe der Knochenmark-transplantierten Mäuse gegenüber den Wildtyp-Mäusen verringert war, allerdings nicht verglichen mit dem Ausmaß von P-Selektin Knockout ($P^{-/-}$)-Mäusen⁴³. Die metastasierungssteigernde Rolle des endothelialen P-Selektins konnte so herausgearbeitet werden.

2.2.3 Rolle des L-Selektin bei der hämatogenen Metastasierung

L-Selektin (CD62L, LECAM-1, gp90MEL-14) wird permanent von vielen Leukozytenpopulationen exprimiert. Es ist auf den Spitzen der Mikrovilli lokalisiert und dadurch - trotz seiner nur zwei SCR-Einheiten - Liganden gut zugänglich⁴⁴. Während der initialen Kontaktaufnahme zwischen Lymphozyten und Endothel der postkapillaren Venolen kommt es zu einer Aktivierung der Lymphozyten und einer nachgeschalteten, proteolytischen Abspaltung des L-Selektins (shedding). Daraus resultiert eine Rollbewegung des

Lymphozyten entlang der Endothelzelloberfläche, an die sich eine Integrin-vermittelte, feste Adhäsion anschließt⁴⁵. Diesem Prozess folgt die Diapedese der Leukozyten ins lymphatische Gewebe, wo u. a. die Antigenpräsentation stattfindet⁴⁶. Zu den L-Selektin-Liganden zählen das „glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1“ (GlyCAM-1), CD34 und Podocalyxin. GlyCAM-1 ist entgegen anderer L-Selektin-Liganden nicht membranständig, sondern wird im lymphatischen Gewebe sezerniert. Daher ist die genaue Rolle bei der Leukozytenrekrutierung nicht abschließend geklärt^{47,48}. CD34, das vor allem als Stammzellmarker bekannt ist, wird wie Podocalyxin auch auf vaskulärem Endothel exprimiert⁴⁹⁻⁵¹. Weitere L-Selektin-Liganden sind Nucleolin, Endomucin und „mucosal addressin cell adhesion molecule-1“ (MadCAM-1), das ebenfalls in der Lage ist, mit Integrinen zu interferieren ($\alpha_4\beta_7$)^{52,53}. Neben P-Selektin bindet auch L-Selektin an PSGL-1⁴⁶. Der Weg des L-Selektin-vermittelten Rollens von Leukozyten auf HEVs und anschließenden „homings“ in Lymphknoten kann ebenfalls von L-Selektin exprimierenden, malignen Lymphomen beschriftet werden. Hierbei kommt es zu einer verstärkten Metastasierung in den Lymphknoten, die sich durch Gabe von Antikörpern gerichtet gegen L-Selektin vermindern lässt⁵⁴. L-Selektin wird vor allem von Zellen leukozytären Ursprungs exprimiert. Krebszelllinien nicht-lymphozytären Ursprungs weisen keine L-Selektin-Expression auf, wohl aber eine L-Selektin-Ligand-Expression. Dadurch besteht die Möglichkeit der Wechselwirkung mit Leukozyten⁵⁵. Dies kann einerseits eine Bindung der Tumorzelle an zytotoxische T-Lymphozyten bedingen, was eine Abtötung der Tumorzelle zur Folge haben kann. Andererseits kann eine starke Leukozytenbindung auch prometastatisch wirken. Dies hängt von den Leukozytensubtypen und den Tumorentitäten ab⁵⁶. Das Wechselspiel von Leukozyten mit Tumorzellen und der daraus resultierende klinische Outcome sind Gegenstand aktueller Forschung. Erst 6 bis 12 Stunden nachdem die Tumorzellen die Blutbahn erreicht haben (oder in einem Experiment injiziert wurden), ist L-Selektin an der hämatogenen Metastasierung beteiligt. Dies konnte durch den Einsatz von L-Selektin defizienten Mäusen und Fucosyltransferase-7 (FucT7) defizienten Mäusen bewiesen werden. Durch die ausbleibende Expression des Enzyms FucT7 können endogene, potentielle L-Selektin-Liganden nicht mehr posttranslational modifiziert werden und interagieren aus diesem Grund nicht mehr mit L-Selektin. Auch kann die Bindung von Leukozyten an Mikrothromben bestehend aus Tumorzellen und Thrombozyten eine Aktivierung des Endothels und eine damit einhergehende Expression von Adhäsionsrezeptoren, z. B. durch CCL5, bedingen. Dadurch kommt es nachfolgend zur Rekrutierung von Monozyten zum metastatischen Mikromilieu⁵⁷.

2.2.4 Rolle des E-Selektin bei der hämatogenen Metastasierung

E-Selektin, auch als CD62E oder ELAM-1 bezeichnet, wird nach Kontakt des Gefäßendothels mit Entzündungsmediatoren wie TNF α oder IL-1 β per Genexpression nach zwei bis sechs Stunden auf der Zelloberfläche präsentiert⁵⁸. Hierbei wird die Expression über den Transkriptionsfaktor NF κ B gesteuert⁵⁹. Auch kann ein verlangsamter Blutfluss zur E-Selektin-Expression führen^{14,60}. In Venolen des Hautgewebes als auch in spezialisierten Gebieten des Knochenmarks ist eine konstitutive E-Selektin-Expression zu verzeichnen⁶¹.

Der prominenteste und best charakterisierte E-Selektin-Ligand ist ESL-1 (E-selectin ligand-1). Dieser ist ein 150 kD schweres Glykoprotein, das N-glykosidisch an Kohlenhydratketten gebunden ist. Damit er als E-Selektin-Ligand an der Zelloberfläche von Myeloiden dienen kann, ist eine Fucosylierung durch die Enzyme „ α -(1,3)-fucosyltransferases IV“ oder „VII“ (FucT4 and FucT7) von Nöten. Andernfalls ist er im Golgi-Apparat lokalisiert⁶². In der Vergangenheit konnte von Antoine et al. gezeigt werden, dass auch eine endoproteolytische Prozessierung durch die „furin-like proprotein convertase“ im Golgi-Komplex unabdingbar für eine Sekretion an die Zelloberfläche ist⁶³. Zu P- und L-Selektin weist ESL-1 keine Affinität auf^{64,65}. Auf der Zelloberfläche ist er in Randbereichen von Mikrovilli zu finden, wodurch er für E-Selektin erschwert zugänglich ist⁶⁶. Weitere E-Selektin-Liganden sind „P-Selectin glycoprotein ligand-1“ (PSGL-1), CD44, CD43, β_2 -Integrine und L-Selektin^{14,58,67-69}.

In einigen in vivo Untersuchungen konnte der Beitrag des E-Selektins zur hämatogenen Metastasierung gezeigt werden^{70,71}. Dabei interagieren die Tumorzellen E-Selektin-vermittelt mit dem Endothel und können nach erfolgter Adhäsion ins Gewebe transmigrieren und eine Metastase etablieren⁷²⁻⁷⁵. Auch zeigte sich, dass die Expression von E-Selektin-Liganden auf Tumorzellen mit der Adhäsion der Zellen an aktiviertem Endothel korreliert. Durch Inhibition des E-Selektins, entweder durch Zugabe von löslichem E-Selektin oder von Ligandmimetika, ließ sich die Metastasierung signifikant reduzieren⁷⁶⁻⁷⁸. Als Anfang der 90er Jahre die Involvierung von Selektinen im Prozess der hämatogenen Metastasierung entdeckt wurde, nahm man zunächst an, dass nur Kolonkarzinomzellen E-Selektin-vermittelt metastasieren⁷⁹. Später wurde jedoch auch die E-Selektin-Bindung für andere Tumorentitäten nachgewiesen⁸⁰. Neben mucinartigen Liganden wurde 2006 auch der „death receptor-3“ als E-Selektin-Ligand identifiziert. Die E-Selektin-vermittelte Adhäsion induziert in den Kolonkarzinomzellen allerdings keine Apoptose, sondern aktiviert die „mitogen-activated protein kinase“ (MAPK), dies trägt zu einer verstärkten Migration der Zellen bei⁸¹. Auch andere Arbeitsgruppen konnten Veränderungen in der Genexpression von Tumorzellen nach E-Selektin-Bindung

detektieren, die eine anti-apoptotische Wirkung aufweisen^{82,83}. Dass E-Selektin keinen Einfluss auf die Metastasierung in der Lunge hat, konnte in einem in vivo Metastasierungsversuch 2009 gezeigt werden⁸⁴. Durch diese kontroversen Resultate wird deutlich, dass die Rolle des E-Selektins noch nicht abschließend geklärt ist und es weiterer Untersuchungen bedarf.

2.2.5 Rolle des Integrins VLA-4 bei der hämatogenen Metastasierung

Integrine sind Zelloberflächenrezeptoren, die die Adhäsion zwischen Zellen, der extrazellulären Matrix (ECM) und Bestandteilen des Plasmas vermitteln. Alle Integrine bestehen aus einer α - und einer β -Untereinheit, die nicht-kovalent miteinander verbunden sind. Insgesamt wurden bisher 24 verschiedene Integrine in Vertebraten identifiziert⁸⁵. Die unterschiedlich möglichen Kombinationen sind in Abbildung 2.1 dargestellt.

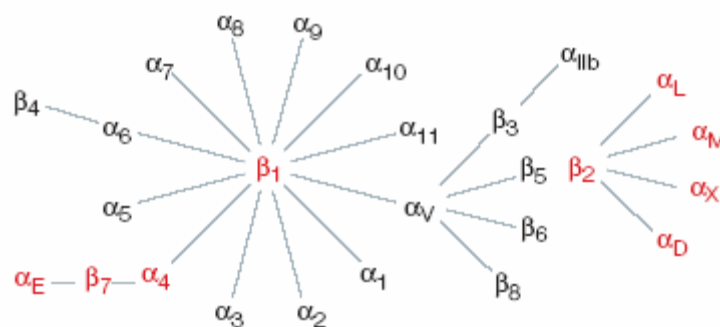


Abbildung 2.1: Überblick über Assoziationsmöglichkeiten von Integrinuntereinheiten. In rot dargestellt sind die leukozytären Integrine (entnommen aus Kinashi⁸⁶).

Durch die vermittelte Adhäsion sind Integrine essentiell für die strukturelle Entwicklung und Homeostase von Organismen⁸⁷. Im Immunsystem spielen sie bei vielen Prozessen eine Rolle, die hier jedoch nur ansatzweise erwähnt werden. Sie vermitteln die feste Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen und antigenpräsentierende Zellen. Hierdurch kann es nachfolgend zur Extravasation von Leukozyten in entzündetes Gewebe kommen. Vor allem die Integrine LFA-1 (lymphocyte function associated antigen-1, $\alpha_L\beta_2$), $\alpha_M\beta_2$, $\alpha_4\beta_1$ und $\alpha_4\beta_7$ sind essentiell für eine intakte Immunantwort. Die α_2 -Integrine binden an die endothelial exprimierte Immunglobuline ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1), ICAM-2 und ICAM-3. Die Liganden der α_1 -Integrine sind VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), MADCAM-1 (mucosal vascular addressin cell-adhesion molecule-1) und Fibronectin als Komponente der ECM⁸⁸. $\alpha_4\beta_1$ und $\alpha_4\beta_7$ interagieren zudem noch mit ADAM7 und ADAM28

(„a disintegrin and metalloprotease“). Diese sind auf Lymphozyten lokalisierte Metalloproteasen, die neben ihren enzymatischen Eigenschaften zusätzlich eine Integrinbindungsdomäne aufweisen⁸⁹. Die feste Adhäsion von Lymphozyten in peripheren Lymphknoten und an antigenpräsentierende Zellen wird durch die LFA-1-ICAM-Interaktion vermittelt. Die α_4 -Integrine hingegen spielen vornehmlich eine Rolle bei der Adhäsion von Lymphozyten an mukosale Lymphknoten (Peyer-Plaques) und in inflammatorischen Arealen⁸⁶. Der festen Adhäsion vorausgehend findet ein Selektin-vermitteltes „Rollen“ der Lymphozyten über die Endotheloberflächen statt. Integrine binden ihre Liganden allerdings nicht konstitutiv, sondern liegen in einem niedrig affinen Zustand vor. Erst durch eine Aktivierung der Zelle kommt es zu einer Erhöhung der Bindungsfähigkeit. Dies wird als „inside-out signalling“ bezeichnet und kann z. B. durch Chemokine oder Bindung eines T-Zell-Rezeptors an einen MHC-Komplex hervorgerufen werden⁹⁰. Die Aktivierung ist innerhalb einer Sekunde möglich, kann jedoch auch bis zu einer Minute dauern.

Bei genauerer Betrachtung wurde festgestellt, dass eine Forcierung der Ligandbindung durch Regulation der Affinität und auch der Avidität möglich ist. Die Avidität kann durch räumliche Annäherung einzelner Moleküle über sogenannte Mikrocluster zu Clustern erhöht werden. Dies wird durch zytoskeletale Bestandteile erreicht (s. Abbildung 2.2)⁹¹.

Zur Erläuterung der Affinitätserhöhung soll kurz der Aufbau eines Integrins beschrieben werden. Die α -Untereinheit des Integrins besteht aus einem apikalen β -Propeller, an den sich eine Stelzenregion anschließt, gefolgt von transmembranärer und zytoplasmatischer Domäne. In den β -Propeller ist bei den α -Untereinheiten 1, 2, 10, 11, D, E, L, M und X eine I-Domäne inseriert. Die I-Domäne ist Träger der Ligandbindungsstelle und der MIDAS (metal-ion-dependent adhesion site), einer Bindungsstelle für zweiwertige Kationen, die eine Rolle bei der Aktivierung des Integrins und der Ligandbindung spielt. Ist keine I-Domäne in der α -Untereinheit enthalten, so übernimmt der β -Propeller z. T. die Ligandbindung⁹². Die β -Untereinheit besteht apikal aus einer I-like-Domäne, die der I-Domäne der α -Untereinheit auf Grund hoher Sequenzhomologie recht ähnlich ist und auch eine MIDAS aufweist. Bei einer α -Integrinuntereinheit, die keine I-Domäne aufweist, ist die I-like-Domäne zusammen mit dem β -Propeller an der Ligandbindung beteiligt. Ist jedoch eine I-Domäne vorhanden, so übernimmt die I-like-Domäne einen regulatorischen Einfluss auf die Ligandbindung⁹¹. Der I-like-Domäne schließt sich proximal eine cysteinreiche Stelzenregion an, die durch transmembranäre und zytoplasmatische Domänen in der Zellmembran verankert ist.

Eine Erhöhung der Affinität eines Integrins wird einerseits durch eine Spreizung und einer damit verbundenen Aufrichtung der Integrin-Untereinheiten bewerkstelligt, andererseits durch

Zugbewegungen innerhalb der Untereinheiten, wodurch die Ligandbindungsstelle freigelegt wird⁹³. Bildlich dargestellt in Abbildung 2.2 sind sowohl die Affinitäts- als auch die Aviditätserhöhung. Das „inside-out signalling“ kann, wie bereits erwähnt, durch Chemokine erfolgen, jedoch auch artifiziell durch Mn^{2+} -Ionen herbeigeführt werden. Eine Assoziation von intrazellulären Proteinen wie Talin oder Kindlin an den zytoplasmatischen C-Terminus der Integrin β -Untereinheit bewirkt eine Erhöhung der Affinität⁹⁵.

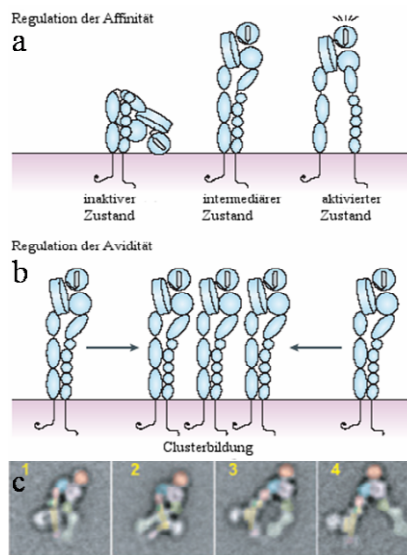


Abbildung 2.2: Affinitäts- und Aviditätserhöhung von Integrinen. a) Regulierung der Affinität durch Aufrichtung. b) Regulierung der Avidität durch Clusterung. c) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Aktivierung eines Integrins. Die Untereinheiten sind zur Unterscheidung eingefärbt. (Abbildungsteile a und b modifiziert nach Kinashi⁸⁶, Abbildungsteil c entnommen aus Luo⁹⁴).

Umgekehrt kann eine Ligandbindung ein Signal vermitteln, das zur Aktivierung von intrazellulären Proteinen wie z. B. der „Fokalen Adhäsionskinase“ (FAK) führt⁹⁶. Diese wiederum aktiviert zahlreiche weitere Proteine und Signalkaskaden in der Zelle. Neben der Aufrechterhaltung der Zellhomeostase können Integrine, die auf entarteten Zellen exprimiert werden zu deren Malignität beitragen. Sie vermitteln dann proliferative, prometastatische und antiapoptotische Signale ins Zellinnere^{97,98}. Auch korreliert eine verstärkte Expression mancher Integrine mit einer schlechten klinischen Prognose⁹⁹. Auf Melanomzellen werden beispielsweise die Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_5\beta_1$ verstärkt exprimiert^{100,101}. Daher haben sich Integrine als interessante und vielversprechende pharmakologische Targets bei vielen, bisher nur palliativ behandelbaren Tumorerkrankungen herausgestellt. Beispielsweise befindet sich momentan das zyklische Pentapeptid Cilengitide, das die Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ inhibiert in der klinischen Phase III bei Patienten mit Glioblastom⁹⁹. Gegen das maligne Melanom

befinden sich die Antikörper Vitaxin und Volociximab in der klinischen Phase II und richten sich gegen die Integrine $\alpha_v\beta_3$ (Vitaxin)^{102,103} und $\alpha_5\beta_1$ (Volociximab). Volociximab wird auch eine antiangiogenetische Wirkung zugeschrieben^{104,105}.

Neben den signaltransduktorischen Eigenschaften können auf Tumorzellen exprimierte Integrine auch die feste Adhäsion der Tumorzellen an vaskuläres Endothel vermitteln und damit eine Metastasierung begünstigen. Hier soll besonders das Integrin $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4) im Fokus stehen, dessen Expression auf Osteosarkom-, Rhabdomyosarkom- und Melanomzellen nachgewiesen wurde¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. Durch die Interaktion von VLA-4 mit dem endothelständigen VCAM-1 wird neben der Adhäsion auch die Transmigration verstärkt, was durch in vitro Versuche nachgewiesen werden konnte¹⁰⁹. Auch in vivo konnte schon zu Beginn der 90er Jahre die prometastatische Rolle der VLA-4/VCAM-1-Interaktion gezeigt werden. Durch IL-1 oder TNF- α Behandlung wurde eine verstärkte VCAM-1-Expression in murinen Blutgefäßen der Lunge erreicht, was mit einer verstärkten Metastasierung einherging¹¹⁰⁻¹¹². Auch klinische Untersuchungen verschiedener, an Hautkrebs erkrankter Patientengruppen zeigten eine Korrelation zwischen VLA-4 bzw. β_1 Integrin-Expression der Tumorzellen und der Metastasierungsrate in den Lymphknoten¹¹³⁻¹¹⁵.

Weitere Arbeitsgruppen berichteten hingegen, dass eine verstärkte VLA-4-Expression in Tumorzellen mit einer verminderten Metastasierungsrate einhergeht. Begründet wird dies durch homotypische Wechselwirkungen von VLA-4 Molekülen, die die Tumorzellen zusammenhalten und so eine Ablösung und Dissemination von bestehenden Tumoren verhindern¹¹⁶. Diese Theorie untermauert wurde 2008 im „New England Journal of Medicine“ von zwei Multiple-Sklerose-Patientinnen berichtet, die mit dem gegen VLA-4 gerichteten Antikörper Natalizumab behandelt wurden. Bei beiden Patientinnen wurden Leberflecke identifiziert, die sich nach Natalizumab-Gabe schnell in metastasierende Melanome verändert hatten¹¹⁷. Eine daraufhin durchgeführte Metaanalyse von Natalizumab-behandelten Patienten bestätigte diese Resultate allerdings nicht. Die Autoren schlussfolgern, dass VLA-4 in einem frühen Stadium der Tumorentwicklung eher den Zusammenhalt des Tumors fördert und deshalb nicht antagonisiert werden sollte, zu einem späteren Zeitpunkt hingegen zu einem prometastatischen und invasiven Phänotyp beiträgt¹¹⁸.

2.2.6 Rolle der Thrombozyten bei der hämatogenen Metastasierung

Nach Erreichen des Blutflusses kommt es zu einer schnellen Ummantelung der Tumorzelle mit Thrombozyten, wodurch sich die Tumorzelle einige Überlebensvorteile sichert. Sie schützt sich einerseits vor natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und zytotoxischen T-Zellen

und deren zytotoxischen Mediatoren wie $\text{TNF}\alpha$, Perforinen oder Granzymen. Im Jahre 2009 konnte gezeigt werden, dass der von Thrombozyten sezernierte „platelet-derived transforming growth factor- β “ die Zahl der NKG2D Rezeptoren auf NK-Zellen herunterregulieren kann¹¹⁹. Die Tumorzellen entziehen sich weiterhin dem im Blutstrom vorherrschenden Scherstress. Die Aggregate aus Tumorzellen und Thrombozyten können zusätzlich in kleinen Gefäßen stecken bleiben, was der Tumorzelle die Transmigration in umgebenes Gewebe ermöglicht¹²⁰. Die Thrombozyten setzten darüber hinausgehend Wachstumshormone frei, die u. a. die Angiogenese und Proliferation der sich etablierenden Metastasen fördern¹²¹.

Dieses Phänomen der Ummantelung der Tumorzellen mit Thrombozyten wurde schon 1865 von Trousseau beschrieben. An sich selbst und weiteren 182 Patienten beobachtete er eine Thrombophlebitis als Folge einer Krebserkrankung. Mikrothromben führten zu Entzündungen des Gefäßendothels im venösen und arteriellen Schenkel¹²². 1872 wurde durch Reiss schließlich gezeigt, dass Thrombozyten an der Mikrothrombenbildung beteiligt waren¹²³. Daher ist eine akute venöse Thromboembolie oft der Vorbote für die Diagnose einer malignen Entartung^{124,125}.

Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen dieses Geschehens sind vielfältiger Art. Eine Tumorzelle, die den Blutstrom erreicht hat, kann ADP sezernieren, das an purinerge Rezeptoren (P2Y1 und P2Y12) auf Thrombozyten binden und diese aktivieren kann¹²⁶. Als weiter proaggregatorische Mediatoren können Thromboxan A2 (TXA2) oder PAF genannt werden, die ebenfalls an thrombozytenständige Rezeptoren (PAFR) binden können^{127,128}. Auch die Freisetzung von „tissue factor“ durch die Tumorzelle kann über die Aktivierung von Faktor VII und Faktor X zu einer Aktivierung von Thrombin aus Prothrombin führen. Die Protease Thrombin spaltet einerseits Fibrinogen zu Fibrin, andererseits aktiviert sie die auf Thrombozyten befindlichen Thrombinrezeptoren PAR-1 und PAR-4 durch Abspaltung der N-terminalen Enden der Rezeptoren und Freilegung der aktivierenden Ligandstrukturen¹²⁹. Die Aktivierung der Thrombozyten hat eine Formänderung, die Freisetzung von TXA2 und eine verstärkte Präsentation von P-Selektin und von CD40 zur Folge.

Desweiteren kommt es zur Aktivierung der thrombozytären Integrine $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ und $\alpha_2\beta_1$ und zur Sezernierung von Fibronectin und „von-Willebrand-Faktor“ (vWF). Diese binden wiederum an $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$. Auch kann es durch Thrombin zur Aktivierung von tumorzellständigen Integrinen kommen. Neben den bereits genannten Adhäsionsrezeptoren, die zu einer Tumorzell-Thrombozyt-Assoziation führen können, ist noch der Glykoproteinkomplex $\text{Ib}\alpha\text{-IX-V}$ (GPIb α -IX-V) zu nennen. Dieser Komplex wird auf Thrombozyten exprimiert und bindet u. a. an vWF, P-Selektin, Thrombin, Integrin $\alpha_{\text{M}}\beta_2$, Thrombospondin-1 und die

Gerinnungsfaktoren XI und XII. Auch dadurch wird dem Tumorzell-Thrombozyten-Agglomerat die Adhäsion an das Gefäßendothel erleichtert. Ein weiteres thrombozytäres Glykoprotein ist GPVI. Es bindet an die ECM Komponente Kollagen und wirkt stark aktivierend auf die thrombozytären Integrine. Dabei ist es selbst zu einer festen Adhäsion eines Thrombozyten nicht befähigt und sollte daher eher in die Reihe der aktivierenden Rezeptoren eingegliedert werden¹²⁶. Eine Übersicht mit allen bis dato bekannten und beteiligten Rezeptoren ist in Abbildung 2.3 zu finden.

Der Beitrag von P-Selektin zur Adhäsion zwischen Thrombozyten und Tumorzellen kann als gesichert angesehen werden, da die Agglomeratbildung in P-Selektin defizienten Mäusen statistisch signifikant verringert war⁴².

Außerdem präsentieren Tumorzellen im Vergleich mit nicht-entarteten Zellen vermehrt Mucine auf ihrer Oberfläche¹³⁰. Auch konnte eine P-Selektin-vermittelte Ummantelung von Neuroblastomzellen und kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen mit Thrombozyten gezeigt werden, wobei das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ als Bindungspartner ausgeschlossen werden konnte¹³¹.

Andere Studien hingegen zeigen die Beteiligung von $\alpha_{IIb}\beta_3$ an der Tumorzellummantelung mit Thrombozyten¹³²⁻¹³⁷. Die Beteiligung beider Moleküle an der Interaktion zwischen Tumorzellen und Thrombozyten kann also angenommen werden, wobei es von der eingesetzten Tumorzelllinie abzuhängen scheint, welcher Mechanismus überwiegt.

Die Inhibition der dargestellten Mechanismen könnte sich positiv auf den Verlauf der Krebserkrankung auswirken. Allerdings muss hierbei die physiologische Rolle der Thrombozyten bei der Hämostase bedacht werden. Deswegen sind Inhibitoren, die gezielt die Interaktion von Thrombozyten mit Tumorzellen blockieren, unabdingbar.

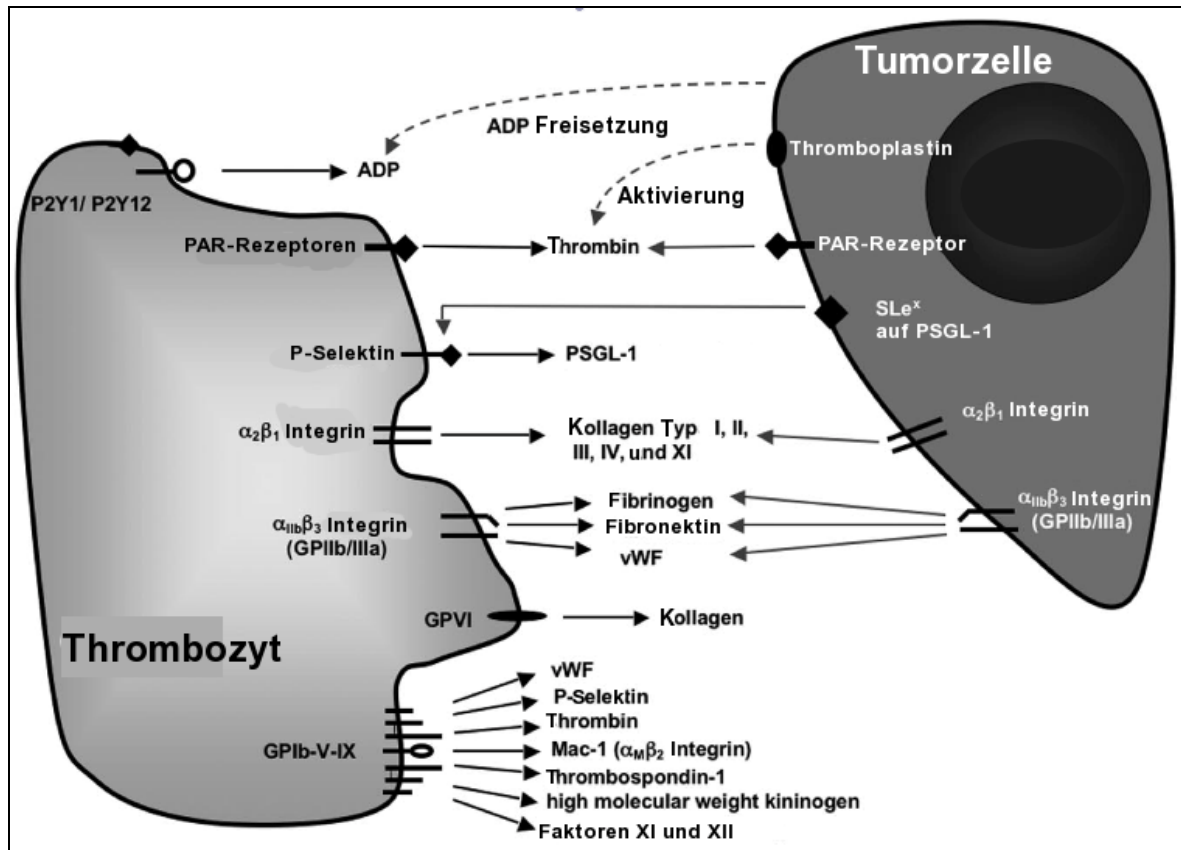


Abbildung 2.3: Thrombozyt-Tumorzell-Interaktion. Dargestellt sind die an der Thrombozyten Aktivierung beteiligten Moleküle und die verschiedenen Adhäsionsrezeptoren (modifiziert nach Erpenbeck et al.¹²⁶).

2.3 Antimetastatische Wirkung von Heparin

2.3.1 Klinische Erkenntnisse

Heparin ist ein Polysaccharid, das aus bis zu zehn verschiedenen Monosaccharid-Einheiten aufgebaut sein kann. Der größte Teil des Moleküls besteht aus periodischen Abschnitten, die aus (1,4)-verknüpften α -D-Glucosamin-N,6-disulfat- und α -L-Iduronsäure-2-sulfat-Einheiten aufgebaut sind. Im Organismus kommt es als Proteoglykan in basophilen Granulozyten und Mastzellen vor und wird durch Endoglykosidasen freigesetzt. Die physiologische Funktion von endogen freigesetztem Heparin ist allerdings bisher unbekannt. Es werden unfraktioniertes Heparin (UFH) mit einer Molekularmasse von ungefähr 5 bis 25 kDa und fraktioniertes Heparin (LMWH „low molecular weight heparin“) mit einer Molekularmasse von 4 bis 6 kDa unterschieden. Fraktioniertes Heparin wird durch Abbau von höhermolekularem Heparin mit salpetriger Säure oder durch Heparinasen gewonnen¹³⁸. Auf die pharmakologischen Mechanismen der Heparinwirkung wird in Kapitel 2.3.2 näher eingegangen.

Wie bereits in Kapitel 2.2.6 erläutert, haben Tumorpatienten ein erhöhtes Risiko eine Venenthrombose zu erleiden. Bei auftretenden thromboembolischen Ereignissen empfehlen die aktuellen Leitlinien der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. eine initiale Behandlung mit UFH, LMWH oder Fondaparinux. Dabei gelten LMWH und Fondaparinux als sicherer und genauso wirksam wie UFH¹³⁹⁻¹⁴⁴. Für die prolongierte Behandlung sollten laut Leitlinien über einen Zeitraum von drei bis sechs Monaten auch UFH, LMWH oder Fondaparinux eingesetzt werden. Durch Metaanalysen klinischer Daten konnte gezeigt werden, dass LMWH unfraktioniertem Heparin überlegen ist^{139,145}.

Schon 1964 konnte in Versuchen mit Ratten gezeigt werden, dass eine Heparinapplikation nach Tumorzellinjektion neben einer verminderten Koagulation auch zu einer verminderten Metastasierung und zu einem längeren Überleben führt¹⁴⁶. Ähnliche Befunde konnten später auch in retrospektiven klinischen Studien erhoben werden¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. Auch zeigte sich in Metaanalysen, bei denen die initiale Behandlung von venösen Thrombosen bei Krebspatienten mit UFH und LMWH durchgeführt wurde, eine Reduktion der Mortalität bei LMWH behandelten Patienten^{150,151}. Die beobachteten Vorteile beruhten nicht auf einer Reduktion von Pulmonalembolien. Die Durchführung prospektiver, randomisierter klinischer Studien konnte einen positiven Effekt von LMWH bestätigen. Allerdings bedarf es weiterer Untersuchungen, um sowohl den Zeitpunkt der LMWH Applikation, als auch Menge und Dauer der Verabreichung zu determinieren¹⁵²⁻¹⁵⁶.

2.3.2 Molekulare Mechanismen

Wie in zahlreichen Tiermodellen gezeigt werden konnte, äußert sich eine Heparinapplikation nicht in einer Inhibition des Wachstums des Primärtumors, sondern in einer Verminderung der Zahl der Metastasen¹⁵²⁻¹⁵⁵. Das meist verwendete Modell der Metastasierung, bei dem den Versuchstieren eine bestimmte Zahl an Tumorzellen in die Schwanzvene injiziert wird, kann den physiologischen Prozess der hämatogenen Metastasierung nur unzureichend simulieren. Allerdings lässt sich mit diesem Modell die Phase der Zirkulation der Tumorzellen im Blut gut nachahmen und auf molekularer Ebene beleuchten¹⁵⁷. So konnte gezeigt werden, dass die Heparinapplikation 24 Std. vor oder nach der Tumorzellinjektion keinen Einfluss auf die Metastasierung hat⁴³. Nur in einer einzigen Studie konnten Effekte bei einer Heparininjektion 24 Std. nach Tumorzellverabreichung detektiert werden¹⁵⁸. Dahingegen scheint der Applikationsweg der Heparinverabreichung keinen Einfluss auf die Tumorzellmetastasierung zu haben¹⁵⁹⁻¹⁶³. In den meisten tierexperimentellen Studien wurden hohe

Heparinkonzentrationen eingesetzt, welche die therapeutisch verwendeten Mengen übertreffen. Allerdings zeigte sich auch in Studien, in denen klinisch relevante Mengen Heparin verwendet wurden, eine Reduktion der Metastasierung^{164,159}.

Die folgenden Mechanismen, welche die beschriebenen Effekte hervorrufen, sind abhängig von der Tumorzellentität und treffen jeweils nur teilweise auf bestimmte Zelllinien zu.

Im Jahr 1993 wurde eine Bindung von Heparin an P- und L-Selektin beschrieben und in vivo konnte die immunmodulierende Wirkung gezeigt werden¹⁶⁵. Später konnte durch den Einsatz von P- bzw. L-Selektin defizienten Mäusen Heparin als Inhibitor von P- und L-Selektin bewiesen werden^{132,166}. Eine Heparinapplikation zur Zeit der Tumorzell-Administration äußert sich vornehmlich in einer Inhibition von thrombozytärem P-Selektin. Eine Heparininjektion 6 bis 18 Stunden nach Tumorzellgabe wirkt hauptsächlich über eine Blockade von leukozytärem L-Selektin¹⁶⁷. Durch den Einsatz von modifizierten Heparinderivaten konnten Struktur-Wirkungs-Beziehungen an P- und L-Selektin hergeleitet werden^{161,168,169}. Diese Derivate weisen teilweise keine oder nur verminderte antikoagulatorische Eigenschaften auf, haben aber trotzdem eine Selektin-Bindungsfähigkeit und reduzieren die Metastasierung in vivo¹⁶¹.

Neben der Inhibition von P- und L-Selektin kommt es durch die Gabe von Heparin auch zur Inhibition von tumorzellexprimierenden Enzymen wie beispielsweise der Heparanase. Durch die Sezernierung von Heparanase ist es Tumorzellen möglich, die ECM zu degradieren und so verstärkt zu migrieren¹⁷⁰.

Heparin inhibiert die Bildung von Thrombin, wodurch eine verminderte Generierung von Fibrin und damit einhergehend eine verringerte Entstehung von an der Metastasierung beteiligten Mikrothromben erfolgt. Desweiteren wird die Thrombin-vermittelte Aktivierung von Thrombozyten über PAR-Rezeptoren reduziert (s. Kapitel 2.6.6)¹²⁰.

Anhand des LMWH Tinzaparin wurde ein weiterer Mechanismus der antimetastatischen Aktivität postuliert. Durch Freisetzung von Tissue Factor pathway inhibitor (TFPI) aus Endothelzellen und der damit verbundenen Hemmung des Komplexes aus TFP und Faktor VIIa inhibiert Tinzaparin den Angiogeneseprozess¹⁷¹. Nachgeschaltet hat dies auch eine Reduktion der Thrombinaktivierung zur Folge.

Als weiterer Effekt wird die Bindung von Heparin an bFGF („basic fibroblast growth factor“) beschrieben. bFGF vermittelt über die Bindung und Agonisierung des bFGF-Rezeptors proliferative und migratorische Stimuli in Krebszellen, die somit durch Heparinbindung inhibiert werden¹⁷²⁻¹⁷⁴. Auch werden weitere Wachstumsfaktoren durch Heparin gebunden und inaktiviert, z. B. VEGF („vascular endothelial growth factor“) ¹⁷⁵. Ferner ist beschrieben,

dass UFH eine Doxorubicinresistenz bei MDA-231 Zellen aufheben konnte. Hier scheint Heparin eine chemosensitivierende Wirkung auf Krebszellen auszuüben¹⁷⁶.

Außerdem inhibiert Heparin Nucleasen im nanomolaren Bereich. Dies konnte sowohl für Endonucleasen als auch für extrazelluläre Nucleasen demonstriert werden^{177,178}. Die physiologische Relevanz dieser Interaktion im Rahmen der Metastasierung ist noch nicht geklärt und bedarf weiterer Untersuchungen.

In unserem Arbeitskreis konnte erstmals die Interaktion zwischen Heparin und dem Integrin VLA-4 beschrieben werden¹⁷⁹. Das Integrin VLA-4 wird von verschiedenen Melanomzellen exprimiert und ist an der Metastasierung maßgeblich beteiligt, was von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt werden konnte¹¹⁰⁻¹¹². Die in vitro Inhibition zwischen VLA-4 und endothelständigem VCAM-1 scheint also ein neues und vielversprechendes Target der Heparinwirkung bei der Unterdrückung der Metastasierung zu sein.

2009 konnte die chinesische Arbeitsgruppe um Xian Lu Zeng das thrombozytäre Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ als weiteres Heparin Target aufzeigen. Durch verschiedene Heparinderivate wurde die Interaktion zwischen Thrombozyten und Melanomzellen vermindert, dies drückte sich in einer reduzierten Metastasierung aus¹⁸⁰.

Heparin nimmt also zusätzlich zur Antikoagulation auf vielfältige, molekulare Weise Einfluss auf das Krebsgeschehen.

2.4 Lysophosphatidylcholin

2.4.1 Vorkommen und physiologische Funktionen von Lysophosphatidylcholin

Lipide sind in vielfältiger Weise an Signaltransduktionsprozessen im Organismus beteiligt. Dabei kommen ihnen viele physiologische Funktionen zu. Sie sind aber auch in eine Vielzahl pathophysiologischer Prozesse involviert. Gegenstand aktueller Forschung ist die Beteiligung von Lipidderivaten in der Proliferation und der Migration von Krebszellen^{181,182}. Neben Sphingosine-1-phosphat und Sphingosylphosphorylcholin sind aus der Gruppe der Phosphoglycerolipide die Lysophosphatidsäure und das Lysophosphatidylcholin (LPC) zu nennen, die näher beleuchtet werden.

Phosphatidylcholine (PC) bestehen aus einer polaren Phosphocholin Kopfgruppe und zwei unpolaren Fettsäureresten, die an Glycerol gebunden sind. Sie stellen den Hauptanteil an Membranlipiden in Säugetierzellen dar. Durch Abspaltung einer Fettsäure, entweder auf Grund einer spontanen Hydrolyse oder durch enzymatische Prozesse, wird LPC gebildet. Die beteiligten Enzyme sind die Phospholipase A₂ (PLA₂) und die Lecithin-Cholesterol-Acyl-

Transferase (LCAT), die eine Fettsäure vom Phosphocholin auf Cholesterol überträgt. Auch können endothelständige Triglyceridlipasen LPC erzeugen¹⁸³. In vitro konnte eine LPC Generierung auch durch Lipoxygenasen oder oxidativen Stress herbeigeführt werden^{184,185}. Die physiologische Konzentration von LPC im Blut wird mit 200 bis 300 μM angegeben, während andere Quellen von 300 bis 400 μM ausgehen¹⁸⁶⁻¹⁹⁰. Ein Großteil des LPCs liegt im Blut gebunden an Albumin, LDL oder Immunglobuline vor und wird so zu Organen wie beispielsweise dem Gehirn^{191,192} transportiert, die einen vermehrten Bedarf an bestimmten Lipiden aufweisen. Somit stellt LPC einerseits einen schnell verfügbaren Speicher an Fettsäuren im Blut dar. Andererseits hat LPC als Lokalhormon signaltransduktorische Eigenschaften, die in einer Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen eine Rolle spielen. Nachfolgend werden hier nur einige ausgesuchte Beispiele genannt:

Eine durch UV-Strahlung hervorgerufene Expression der sekretorischen PLA₂ in Keratinozyten der Haut und damit einhergehender Steigerung der LPC Konzentration vermittelt eine verstärkte Melaninexpression und Dendritenformation in Melanozyten^{193,194}.

LPC ist in der Lage Makrophagen zu aktivieren und zur Proliferation anzuregen. Dies äußert sich in einer verstärkten Phagozytose von antikörpermarkierten Antigenen¹⁹⁵⁻¹⁹⁷.

Monozyten und T-Zellen folgen einem LPC Gradienten in Richtung des entzündeten Gewebes und werden zur Sezernierung von aktivierten Sauerstoffspezies und „Monocyte chemoattractant protein-1“ angeregt, was mit einer Gewebsschädigung einhergeht. Vermittelt wird dies durch die „extracellular-signal regulated kinase“ (ERK)¹⁹⁸⁻²⁰¹.

LPC vermittelt eine verminderte Expression von Thromboplastin auf humanen Monozyten²⁰². Allerdings konnte durch LPC Gabe auch eine verstärkte Expression des „Plasminogen activator inhibitor-1“ in glatten Muskelzellen der Aorten von Ratten in vivo detektiert werden²⁰³. Daneben konnte eine Hochregulation der Expression von Urokinase und Urokinase-Rezeptoren auf Makrophagen gezeigt werden²⁰⁴. Die hier beschriebenen Mechanismen geben kein eindeutiges Bild der Funktion des LPC, da die beobachteten Effekte teilweise entgegengesetzte Wirkungen auf die Koagulation ausüben. Hier bedarf es weiterführender Untersuchungen.

LPC kann einen Einfluss auf die Funktionalität von Ionenkanälen entfalten und zu deren beschleunigter Dimerisierung führen²⁰⁵.

Durch die Beobachtung, dass monozytäre Schaumzellen im Rahmen einer beginnenden Artherosklerose am Gefäßendothel der Arterien adhären und dass erhöhte Level an oxidiertem LDL (enthält hohe Konzentration an LPC) diesen Prozess beschleunigen, wurde Anfang der 90er Jahre der Einfluss von LPC auf Endothelzellen des arteriellen Schenkels

untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass LPC eine verstärkte Expression von ICAM-1 und VCAM-1 auf dem Gefäßendothel vermittelt. E-Selektin hingegen wurde nicht verstärkt exprimiert. Dies konnte sowohl für humane als auch für Arterien aus Kaninchen gezeigt werden²⁰⁶. Bereits 1993 wurde dieser Effekt durch eine verstärkte Aktivität der Proteinkinase C in Schweinearterien mechanistisch untermauert²⁰⁷. Eine verstärkte Präsentation von P-Selektin wurde 1996 sowohl auf Blutplättchen als auch auf dem Gefäßendothel von Katzen nach LPC Kontakt beschrieben. Dies führte zu einer verstärkten Adhäsion von polymorphkernigen Leukozyten an das Endothel²⁰⁸. Bei allen hier beschriebenen Studien wurden LPC Konzentrationen von 5 bis maximal 100 μM verwendet. Im Blut liegen dagegen höhere LPC Konzentrationen vor. Die Ergebnisse der Untersuchungen bei diesen Konzentrationen bleiben die Autoren jedoch schuldig.

Die Mechanismen, die den hier beschriebenen Effekten zugrunde liegen, sind weitestgehend unbekannt. Jedoch wurden zwei G-Protein gekoppelte Rezeptoren für LPC identifiziert. Diese sind möglicherweise an der Vermittlung der Effekte beteiligt.

2.4.2 Lysophosphatidylcholinrezeptoren und deren Funktionen

Mit der Absicht, Rezeptoren für Lysophospholipide zu identifizieren, wurde 1996 von zwei Arbeitsgruppen parallel der G-Protein gekoppelte Rezeptor (GPCR) OGR1 auf Ovarialkarzinomzellen identifiziert. Dabei kamen PCR (polymerase chain reaction) basierte Klonierungsstrategien mit degenerierten Primern zum Einsatz. Allerdings wies dieser Rezeptor nur eine Affinität für Sphingosylphosphorylcholin (SPC) auf, nicht jedoch für LPC^{184,185}. Eine rezeptorvermittelte Wirkung von LPC wurde zu diesem Zeitpunkt dem „platelet activating receptor“ zugeschrieben²⁰⁹. Durch Sequenzvergleiche von OGR1 mit anderen GPCRs wurden die Rezeptoren G2A und GPR4 als hochaffine Rezeptoren für LPC im Jahr 2001 deorphanisiert^{210,211}. Sie sind an G_q , G_i , bzw. $G_{12/13}$ Proteine gekoppelt und aktivieren bei Stimulation die Phospholipase C, die durch Inositoltriphosphat (IP_3) die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern mediiert²¹². G2A wird u. a. in der Milz, im Thymus, auf T- und B-Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen exprimiert^{213,214}. Die Expression von G2A kann durch den Einsatz von DNA-schädigenden Agenzien forciert werden. Ein G2A Agonismus führt dann zum Zellzyklusarrest²¹⁴. Lin et al. konnten eine G2A-vermittelte Einleitung der Apoptose in HeLa Zellen bereits bei Konzentrationen von 0,01 bis 0,5 μM LPC zeigen²¹⁵. Kabarowski et al. konnten eine G2A-vermittelte Aktivierung der GTPase RhoA in transfizierten Fibroblasten mit einhergehender Bildung von Stressfibern demonstrieren. Auch wird RhoA-vermittelt eine Aktivierung des „Serum-Response-Faktor“

beobachtet, der einen Einfluss auf die Genexpression ausübt²¹⁶. In G2A überexprimierenden DO11.10 Zellen konnte LPC die Transmigration im Vergleich zu wildtyp Zellen stimulieren²¹⁷.

Der Rezeptor GPR4 wird in vielen Geweben, z. B. in der Leber, Lunge, Lymphknoten, Aorta, Plazenta, Milz und Prostata, exprimiert, um nur einige Beispiele zu nennen²¹⁸. Eine Aktivierung durch LPC oder SPC führt in GPR4 transfizierten HEK293 Zellen zu einer verstärkten Expression SRE-abhängiger (Serum Response Element) Gene. Auch konnte in Swiss 3T3 Zellen eine verstärkte GPR4-vermittelte DNA Synthese festgestellt werden, ebenso wie eine Chemotaxis²¹¹. Andererseits war durch eine GPR4 Überexpression eine ligand-unabhängige Inhibition der Aktivierung von ERK zu beobachten²¹⁹. Durch weitere, vielfältige, intrazelluläre Mechanismen, die GPR4 auslöst, wird vermutet, dass GPR4 mit verschiedenen G-Proteinen interagieren kann²¹⁸. Auch mutmaßen einige Arbeitsgruppen, dass LPC kein direkter Ligand von G2A und GPR4 ist, sondern vielmehr die Anreicherung der Rezeptoren an der Zelloberfläche vermittelt^{219,220}.

Neben der Aktivierung durch Lysolipide können sowohl G2A als auch GPR4 durch Protonen aktiviert werden. Dabei werden Histidin-Reste der Rezeptoren protoniert, wodurch Konformationsänderungen in den Rezeptoren herbeigeführt werden. Dies kann eine Rezeptoraktivierung nach sich ziehen. Welche Histidinreste für eine Aktivierung notwendig sind ist Gegenstand aktueller Forschung²²¹. Weiterhin werden Protonen-vermittelte, allosterische Wirkmechanismen diskutiert²¹⁸. Seit 2004 wird auch der Agonismus von LPC an G2A und GPR4 in Frage gestellt und LPC wird von mehreren Arbeitsgruppen als Antagonist beschrieben. Protonen werden hingegen als Agonisten erachtet^{222,223}.

2.4.3 Lysophosphatidylcholin und Krebs

Da, wie oben beschrieben, die Funktionen des LPC im Organismus mannigfaltig und noch nicht restlos aufgeklärt sind, sind auch die Funktionen bzw. die Beteiligung des LPC an Krebserkrankungen nur ansatzweise erforscht.

Neben seiner eigenen Funktion als Lokalhormon, das die GPCRs G2A und GPR4 bindet, dient LPC als Vorstufe für Lysophosphatidsäure (LPA). Diese wird durch das Enzym Autotaxin (Lysophospholipase D) - eine membranständige oder sezernierte Phosphodiesterase - aus LPC generiert und vermittelt zahlreiche Funktionen^{224,225}. Beispielsweise ist LPA für die embryonale Entwicklung entscheidend, was bereits in Autotaxin defizienten Mäusen gezeigt werden konnte^{226,227}.

So berichten die meisten Studien von LPC als Vorstufe des LPA, welches wiederum intensiver in seiner Involvierung im Krebsgeschehen untersucht wurde. Als gesichert anzusehen ist, dass LPA die Proliferation, Adhäsion, Migration, Invasion und Metastasierung von Krebszellen positiv beeinflusst²²⁸⁻²³². Auch konnten erhöhte LPA-Level im Blut von Ovarialkarzinompatientinnen detektiert werden^{233,234}. Seine Wirkung vermittelt LPA durch bis dato vier identifizierte GPCRs²²⁹.

Da Krebserkrankungen oft mit entzündlichem Geschehen einhergehen, und LPC in der Lage ist Zellen des Immunsystems und des Endothels zu aktivieren, liegt die Vermutung nahe, dass die Plasmalevel an LPC bei Krebspatienten erhöht sind. Paradoxe Weise ist dies jedoch nicht der Fall. Mehrere Autoren berichten von erniedrigten Konzentrationen an LPC, die mit dem Voranschreiten der Krankheit und erhöhten Entzündungsparametern einhergehen. Ein ähnlich paradoxes Bild konnte bei der Sepsis beobachtet werden¹⁹¹. Durch Massing und Mitarbeiter konnten 2007 gezeigt werden, dass eine erniedrigte LPC Konzentration im Blutplasma von Krebspatienten mit einer Erhöhung des Entzündungsmediators „C-reaktives Protein“ und einer verstärkten Kachexie der Patienten einhergeht²³⁵. Zhao et al. berichteten von erniedrigten LPC Spiegeln im Blutplasma bei einer Kolorektalkarzinom-Patientenpopulation und schlagen daraufhin LPC als Biomarker für die Diagnostik des Kolorektalkarzinoms vor. Ungesättigte LPCs mit einer oder zwei Doppelbindungen in der Acylkette scheinen hier die sensitivsten Marker zu sein und dies bereits schon für frühe Krankheitsstadien²³⁶. Generell konnte bei verschiedenen Tumorentitäten eine Verringerung der LPC Konzentration im Blutplasma detektiert werden, beispielsweise bei Leukämie, Lymphomen, Tumoren des Verdauungstraktes und bei Nierenzellkarzinomen^{186,187,237}. Bei Remission der Erkrankung ließ sich auch ein Anstieg der LPC Konzentration auf Normalwerte verzeichnen^{187,237}.

In Untersuchungen Ende der neunziger Jahre, in denen ebenfalls die Plasmalevel an LPC von Krebspatienten bestimmt wurden, stellte sich teilweise ein konträres Bild dar. So wurde ein erhöhter LPC Spiegel bei Ovarialkarzinom- und Myelompatienten detektiert^{238,239}.

Als Grund für verringerte LPC Konzentrationen wird einerseits ein verstärkter Lipidkonsum von Tumorzellen im Vergleich zu nicht-entarteten Zellen vorgeschlagen. So konnte für transfizierte HeLa Zellen eine verstärkte LPC Metabolisierung aus dem Kulturmedium beobachtet werden. Eine mit dem Onkogen Ras transfizierte Keratinozytenzelllinie zeigte eine Aktivitätssteigerung des für die Phospholipidbiosynthese verantwortlichen Enzyms Phosphocholin Cytidyltransferase²⁴⁰. Ähnliche Ergebnisse konnten bei einer Ras transfizierten, murinen Fibroblastenzelllinie erhalten werden. Hier waren die Cholin Kinase und die Phospholipid degradierende Phospholipase A₂ in ihren Aktivitäten hochreguliert²⁴¹.

Eine direkte Reacylierung von LPC zu PC und einer damit verbunden Größenzunahme der Zellen konnte anhand der Kolorektalkarzinom Zelllinie SW480 gezeigt werden²⁴².

Andererseits ist eine Überexpression von Autotaxin bzw. der Lysophospholipase D für viele Tumorzellen beschrieben²⁴³⁻²⁴⁵, so dass ein enzymatischer Abbau des LPC zu LPA durch diese Enzyme für die Konzentrationsabnahme des LPC angenommen wird²³⁶. Auch hier bedarf es weiterführender Untersuchungen.

2.4.4 Lysophosphatidylcholin und Metastasierung

Wie in Kapitel 2.4.3 beschrieben kann LPC die Migration von T-Zellen intensivieren. Eine Beeinflussung der Tumorzellmigration von LPC wird kritisch diskutiert, eine Studie zeigt eine Verminderung der Melanomzellmigration durch LPC. Neben dem Einsatz einer unphysiologisch geringen Konzentration an LPC wird von einer Aktivierung des Proteins G₁₃ ausgegangen²⁴⁶. Dies muss kritisch in Betracht gezogen werden, da die Funktionsweise von LPC-Rezeptoren momentan noch völlig unklar ist.

Als bewiesen angenommen werden kann hingegen, dass aus LPC entstandene LPA für die Migration und Invasivität von Tumorzellen verantwortlich ist²⁴⁷. Dies konnte für mehrere Tumorzellentitäten gezeigt werden. Dabei kommt dem Autotaxin eine entscheidende Rolle als LPA-produzierendes Enzym zu^{243,247}. Der Mechanismus der Autotaxin-vermittelten Metastasierung ist in Abbildung 2.4 zum besseren Verständnis schematisch für Glioblastomzellen dargestellt. Durch Gefäßrupturen gelangt LPC aus dem Blut in die extrazelluläre Matrix und wird dort von Autotaxin zu LPA katalysiert. Diesem LPA Gradienten folgen die Glioblastomzellen LPA-Rezeptor-vermittelt und erreichen so den Blutfluss²⁴³.

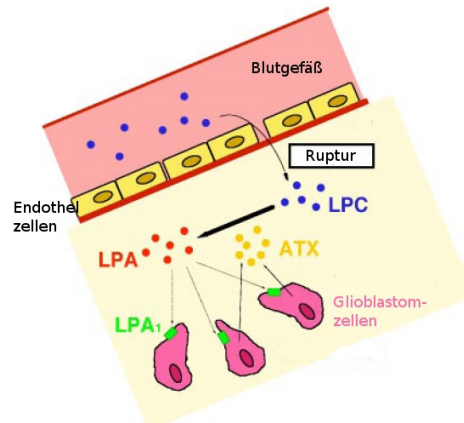


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der LPC-vermittelten Migration von Glioblastomzellen in die Blutbahn (entnommen aus Kishi et al.).

Zirkulieren die Tumorzellen im Blut, können sie über Adhäsionsrezeptoren wie ICAM-1 oder VCAM-1, die durch LPC verstärkt auf dem Gefäßendothel exprimiert werden, binden. Auch kann eine Ummantelung der Tumorzellen mit Thrombozyten stattfinden, da LPC eine Präsentation von P-Selektin auf der Thrombozytenoberfläche vermittelt (s. Kapitel 2.4.1 und 2.2.6). Bei diesem Schritt der metastatischen Kaskade ist LPC also direkt beteiligt.

Neben diesen prometastatischen Effekten können LPC bzw. Phospholipide auch eine antimetastatische Wirkung ausüben. Viele Krebszelllinien haben einen erhöhten Lipidstoffwechsel (s. Kapitel 2.4.3). In einem Versuch an tumortragenden Mäusen, bei dem die Wirkung von liposomal verpacktem Gemcitabin mit dem freien Wirkstoff verglichen wurde, zeigten auch die Mäuse mit applizierten leeren Liposomen eine signifikant verringerte Zahl an Metastasen²⁴⁸. Folgender Erklärungsansatz kann für diese Befunde herangezogen werden. Durch den „Enhanced Permeability and Retention“ (EPR) Effekt reichern sich die Liposomen vornehmlich im Tumorgewebe an. Die liposomalen Phospholipide werden enzymatisch zu LPC umgesetzt. Entstandenes LPC wird von den Tumorzellen konsumiert und in die Zellmembran inkorporiert. Dadurch kommt es je nach verwendeten Phospholipiden zu einer veränderten Membranzusammensetzung, die sich auch auf die Membraneigenschaften auswirkt. So ist beispielsweise eine Veränderung der Adhäsionsrezeptorfunktionen oder auch eine veränderte Verweildauer von membrangebundenen Proteinen denkbar.

2.5 Das Aktinzytoskelett und seine Bedeutung bei der Metastasierung

Neben Mikrotubuli sind Aktinfilamente an der Ausbildung des Zytoskeletts beteiligt. Aktinfilamente verleihen einer Zelle nicht nur mechanische Stabilität, sondern befähigen sie auch durch Ausbildung von Protrusionen zur Migration. Durch extrazelluläre, motogene Mediatoren, wie z. B. Zytokine kommt es innerhalb der Zelle zur Polymerisation von monomerem G-Aktin zu F-Aktinfilamenten, die ein schnell wachsendes Plus- und ein langsam wachsendes Minus-Ende aufweisen. Das schnell wachsende Plus-Ende ist in Richtung der Zellmembran orientiert und treibt diese durch Ausbildung von Protrusionen voran²⁴⁹. Dabei kann zwischen der Formation von Lamellipodien und Filopodien unterschieden werden. Die Ausbildung von Lamellipodien kann durch das „Dendritic Nucleation Model“ beschrieben werden^{250,251}. Danach lagert sich der Arp2/3 Komplex (Actin related Protein 2/3) an die Spitzen oder Seiten nahe der Spitzen bereits bestehender Aktinfilamente an und vermittelt dort eine Nucleation neuer Aktinmonomere in einem Winkel von 70° zum Ausgangsfilament²⁵². Beendet wird die Anfügung neuer Aktinmonomere durch Capping Proteine, die an die Spitze der entstandenen Filamente binden. Eine ausreichende Menge an Aktinmonomeren zur Nucleation wird durch Abspaltung am hinteren Ende des Lamellipodiums durch Proteine der Cofilin/ADF Familie erreicht²⁵³. So entsteht ein für Lamellipodien charakteristisches, stabiles Netzwerk, das in der Lage ist, die Plasmamembran voranzuschieben²⁵⁰.

Filopodien werden nach dem „Convergent Elongation Model“ gebildet. Dabei werden zwei Aktinfilamente des bestehenden Lamellipodiums zu einem Lambda Precursor vereint, der dann u. a. durch Proteine wie Fascin zu einem Filopodium verlängert wird²⁵⁴. Dabei ist der Arp2/3 Komplex wichtig für die initiale Bildung des Filopodiums aus Filamenten des Lamellipodiums²⁵⁴, wohingegen andere Gruppen den Proteinkomplex aus Mena und IRSp53 als Initiatoren der Filopodienformation vorschlagen²⁵⁵.

Aktiviert werden Arp2/3 bzw. Mena durch die Proteine WASP (Wiskot-Aldrich-Syndrom Protein) oder IRSp53. Diese wiederum werden in ihrer Aktivität durch Proteine, die zu den Rho-GTPasen (Ras homologue) gehören, reguliert. So haben Rho-GTPasen einen entscheidenden Einfluss auf die Formation des Zytoskeletts und damit auf die migratorischen Eigenschaften von Zellen. Rho-GTPasen gehören zur Familie der kleinen GTPasen der Ras Familie²⁵⁶. Die prominentesten und am genauesten untersuchten Rho-GTPasen sind Rho, Rac und Cdc42 (cell division cycle 42). Rho-GTPasen werden durch Guanin-Nucleotid Austausch Faktoren (GEFs) aktiviert und durch GTPase-Aktivierungsproteine durch Austausch von GTP gegen GDP desaktiviert. GDIs (Guanin-Nucleotid Dissoziationsinhibitoren) vermitteln einen

Arrest im inaktiven, GDP-gebundenem Zustand und verhindern eine spontane GTP-vermittelte Aktivierung²⁵⁷. Nur im aktivierten, GTP-gebundenem Zustand ist eine Interaktion mit, und Signalvermittlung an Effektorproteine möglich²⁵⁸. Für die kontrollierte Ausübung der Aktivierungsfunktion ist eine genau festgelegte Lokalisation der Rho-GTPasen von Nöten. So halten sich Rho-GTPasen vorzugweise an Plasma- oder intrazellulären Membranen auf. Erreicht wird dies durch posttranslationale Modifikationen. So werden Mitglieder der Rho-Familie am C-terminalen Ende enzymatisch je nach Subtyp an Geranyl-, Farnesyl- oder Palmitoyl-Reste gebunden. Auch sind mehrfache Modifikationen möglich. Mit diesen hydrophoben Modifikationen ist eine feste Adhäsion an Lipidbilayer möglich, die durch zusätzliche Wechselwirkungen geclusterter, polybasischer Aminosäuren mit Membranen verstärkt wird²⁵⁹. Eine Inhibition der an der posttranslationalen Modifikation beteiligten Enzyme zeigt einen Einfluss auf die Lokalisation und Funktionalität verschiedener Rho-Proteine²⁶⁰.

2.6 Histon-Deacetylase-Inhibitoren

2.6.1 Funktionsweise von Histon-Deacetylasen

Der Acetylierung bzw. Deacetylierung von Histonproteinen kommt eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Transkription in eukaryotischen Zellen zu. Vorgenommen wird die Übertragung eines Acetylrestes auf die Lysinreste von Histonproteinen durch Histon-Acetyltransferasen (HAT). Liegen die Lysinreste von Histonen acetyliert vor, sind sie ungeladen und können nicht mit den negativ geladenen Phosphatanionen der DNA interagieren. Dadurch ist die Chromatinstruktur geweitet und für RNA-Polymerasen gut zugänglich, die den Prozess der Transkription einleiten. Wird der Acetylrest von Lysinresten der Histonproteine allerdings durch Histon-Deacetylasen (HDAC) abgespalten, so wird der Lysinrest protoniert, liegt positiv geladen vor und kann in Folge dessen mit der negativ geladenen DNA interagieren. Dadurch hat die Chromatinstruktur eine hohe Packungsdichte und ist Enzymen, wie der RNA-Polymerase, schwer zugänglich.

Nicht nur nukleäre Proteine sind Substrate von HDAC und HAT, sondern auch Nichthistonproteine. Phylogenetisch betrachtet stellten Nichthistonproteine zuerst das Substrat von HDAC dar^{261,262}. Mittlerweile wurden weit mehr als 50 verschiedene Proteine als HDAC Substrate identifiziert²⁶². Die posttranslationale Acetylierung von zytosolisch lokalisierten Proteinen ist sehr wichtig für deren Funktion. So kann sowohl eine Überacetylierung als auch eine verminderte Acetylierung einen Funktionsverlust des

entsprechenden Proteins bedeuten. Zytosolisch lokalisierte Substrate von HDAC können beispielsweise Transkriptionsfaktoren, DNA-Reparatur-Enzyme, Chaperon- oder Strukturproteine sein²⁶¹. Bis dato sind bereits 18 verschiedene HDACs identifiziert, die in vier Klassen unterteilt werden. HDAC der Klasse I sind ausschließlich im Kern lokalisiert, HDAC der Klassen II und IV hingegen sind sowohl im Kern als auch im Zytosol zu finden. Die Klasse III der HDAC, die Sirtuine (silent mating type information regulation two), sind nukleär, mitochondrial und zytoplasmatisch positioniert. Mit zunehmender Zahl identifizierter Target Proteinen werden auch spezifische Funktionen einzelner HDAC erkannt. So konnte beispielsweise mithilfe von Knockout-Mäusen gezeigt werden, dass HDAC 4 essentiell für Knochen-, Muskel- und Retinaentwicklung ist²⁶³. HDAC 7 ist bedeutend für die Aufrechterhaltung der T-Zellfunktion und HDAC 5 und HDAC 9 sind wichtig für die Herzmuskelentwicklung²⁶⁴⁻²⁶⁶.

So werden HDAC auch im Rahmen vieler Erkrankungen als beteiligte Moleküle identifiziert. Dies führt zu der Konsequenz, dass aktuell große Anstrengungen zur Synthese subtypspezifischer HDAC Inhibitoren unternommen werden.

2.6.2 Histon-Deacetylase-Inhibitoren und Krebs bzw. Metastasierung

Neben genetischen Ursachen werden heute auch epigenetische Effekte für die Entstehung von Krebs verantwortlich gemacht. So muss die Diagnose der Kombination vieler Onkogene nicht zwangsläufig zur Entstehung von Krebs führen, wenn diese nicht exprimiert werden. An der Epigenese beteiligte Enzyme rücken somit immer stärker in den Fokus potentieller, neuartiger Therapieansätze gegen Krebs. Beispielsweise wird durch HDAC Inhibition gezielt versucht, Krebszellen in ihrem Verhalten zu beeinflussen. Es konnte für Kolonkarzinome ein erhöhtes Proteinlevel an HDAC 2 und 3 und für bestimmte Formen des Brustkrebs ein erhöhtes Level an HDAC 1 und 3 detektiert werden. Bei Patienten mit Lungenkrebs mit einer schlechten Prognose konnte eine verstärkte Expression von HDAC 5 und 10 nachgewiesen werden²⁶⁷. Neben einer veränderten Expression konnte auch eine veränderte HDAC Lokalisation gezeigt werden, beispielsweise zu Transkriptionsfaktoren für Onkogene. Der Einsatz von HDAC Inhibitoren (HDACi) ist daher ein vielversprechender Ansatz. Derzeit befinden sich 15 Kandidaten in verschiedenen Phasen der klinischen Prüfung. Sie alle inhibieren ein unterschiedliches Isoformen-Muster an HDAC mit verschiedenen Affinitäten. Das Hydroxamsäurederivat Vorinostat wurde als bisher einziges Molekül von der FDA in den USA zur Behandlung des kutanen T-Zelllymphoms zugelassen. Die vielfältigen Mechanismen, denen die antineoplastischen Wirkungen von HDACi zugrunde liegen, sollen

hier nur ansatzweise erläutert werden. Beispielsweise werden in Zellen der akuten Leukämie Fas Todesrezeptoren verstärkt exprimiert, was mit einer erhöhten Apoptoserate einhergeht²⁶⁸. Auch werden Proteine, die den Zellzyklus stoppen in ARP-1 Zellen vermehrt exprimiert, so z. B. das zu einem Arrest der Krebszellen in der G1 Phase führende p21²⁶⁹. Eine HDACi-vermittelte Degradierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 α kann auch zu einer verminderten Angiogenese beitragen²⁷⁰.

Neben den antiproliferativen, HDACi-vermittelten Effekten sind die antimetastatischen Effekte wenig erforscht. Bereits gezeigt werden konnte durch Kim und Mitarbeiter, dass es durch Trichostatin in der Leberkrebszelllinie HepG2 zu einer verstärkten Expression des Proteins Claudin-3 kommt, womit eine verminderte Migration und Invasion korrelierten²⁷¹. Zhang et al. zeigten, dass es durch den Einsatz von Trichostatin in Hela Zellen zu einer HDAC 6 Inhibition und dadurch vermittelt zu einer verstärkten Acetylierung des Proteins Cortactin kommt, was sich in einer verminderten Migration und einer damit einhergehenden verringerten Metastasierung äußert²⁷². Der Einfluss von HDAC bzw. HDACi auf Adhäsionsrezeptoren, die maßgeblich an der Metastasierung beteiligt sind, wurde in der Vergangenheit von mehreren Arbeitsgruppen untersucht, wobei der Fokus dabei eher auf entzündlichem Geschehen ruhte. Inoue et al. verwiesen auf eine verminderte Expression des Immunglobulins VCAM-1 auf HUVEC Zellen (Human umbilical vein endothel cells) nach TNF α Stimulation unter Wirkung des Trichostatin²⁷³. Hellebrekers et al. gelang es, die Expression von ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin auf Tumorendothelzellen durch die Gabe von HDACi und DNA Methyltransferase Inhibitoren signifikant zu steigern, dies äußerte sich in einer verstärkten Zelladhäsion von Leukozyten²⁷⁴. Diese konträren Ergebnisse lassen die Annahme zu, dass die beobachteten Effekte zelllinienspezifischer Natur und daher tendenziell nicht zu verallgemeinern sind.

Vorinostat bewirkte in verschiedenen Leukämiezelllinien eine verstärkte Expression von β_1 -Integrinen und eine damit einhergehende Adhäsionsverstärkung²⁷⁵. Gegenteiliges berichten Mahlkecht et al., sie konnten in Zellen der Akuten Myeloischen Leukämie, hämatopoetischen Stammzellen und Monozyten eine Downregulation von VLA-4 Molekülen sowohl nach Behandlung mit Vorinostat als auch mit dem HDACi Valproinsäure detektieren. Dies äußerte sich in einer verminderten Adhäsion²⁷⁶. Jüngel et al. zeigten, dass es durch eine Kombination aus Valproinsäure und dem Tyrosinkinaseinhibitor AEE788 zu einer verminderten Expression der Integrinuntereinheiten α_3 , β_3 , β_1 und β_4 in Nierenkarzinomzellen kommt, was zu einer verminderten Wechselwirkung mit Komponenten der extrazellulären Matrix führt. Allerdings konnten auch Unterschiede in der Expression verschiedener

Moleküle, die an der Integrinaktivierung beteiligt sind, festgestellt werden. So werden auch sie als Ursache für eine verminderte Adhäsion diskutiert²⁷⁷. Eine Rückführung des pathophysiologischen Integrinexpressionsmusters hin zur physiologischen Rezeptor-Ausstattung durch Valproinsäuregabe wird vermutet^{278,279}.

Die Erforschung der Rolle von HDACi bei der Inhibition von Integrinen im Rahmen der Tumorzellmetastasierung befindet sich gerade erst am Anfang und bedarf weiterer Untersuchungen, die sowohl die Integrin-Expression als auch die Rolle von Signalmolekülen betrachten.

2.7 Ziel der Arbeit

Adhäsionsrezeptoren sind maßgeblich am Prozess der hämatogenen Metastasierung von Tumorzellen beteiligt. Während die Beteiligung und Funktion der Selektine bei der hämatogenen Metastasierung in den letzten Jahren intensiv untersucht und aufgeklärt wurde, ist die Aktivität der Integrine im Kontext der Metastasierung weit weniger beforscht.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll die Rolle des Integrins VLA-4, das von verschiedenen Tumorentitäten exprimiert wird, im Prozess der Metastasierung näher untersucht werden. Es kann postuliert werden, dass es durch Bindung an den endothelialen Liganden VCAM-1 Tumorzellen bzw. tumorzellenthaltene Mikrothromben möglich ist, an das vaskuläre Endothel zu adhären als eine Voraussetzung für die nachfolgende Transmigration und Metastasenbildung. In der vorliegenden Arbeit soll ein tieferes Verständnis des VLA-4-vermittelten Beitrages zur Metastasierung erlangt werden, um das Integrin als pharmakologische Zielstruktur für neuartige antimetastatische Strategien zu erschließen.

Dafür sollen drei verschiedene Strategien zur Inhibition der VLA-4-vermittelten Adhäsion evaluiert werden. Kürzlich wurde die extrazelluläre Blockade des VLA-4 durch Heparin beschrieben. In dieser Arbeit sollen strukturell modifizierte, nicht antikoagulativ wirkende Heparinderivate auf ihre inhibitorischen Potenz untersucht werden, um hinsichtlich Struktur-Wirkungs-Beziehungen die Fähigkeit von Heparin als Inhibitor im Metastasierungsprozess umfassend zu charakterisieren.

Durch Veränderungen der Komposition von Zellmembranen durch Lysophosphatidylcholin soll weiterhin eine Einflussnahme auf die Funktion von Adhäsionsrezeptoren evaluiert werden. Hierbei wird der Fokus auf den molekularen Mechanismen der LPC-vermittelten Wirkung liegen.

Auch soll durch den Einsatz von hochselektiven Inhibitoren eine Ausschaltung verschiedener intrazellulärer Signalwege erfolgen. Die dadurch vermittelten Konsequenzen auf die Funktionalität von Adhäsionsrezeptoren sollen Aufschluss über potentielle, intrazelluläre Zielstrukturen liefern, die zukünftig eine dringend benötigte, antimetastatische Therapie ermöglichen könnten.

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Materialien

3.1.1 Geräte

Tabelle 3.1: Geräte

Gerät	Hersteller
Agilent 2100 BioAnalyzers	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Allegra™ 25 R Centrifuge	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Analysenwaage Sartorius Basic BA210S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
AxioCam MRc	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Axiovert 25	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Axiovert 200	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
BioRad Gel DOC 100	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
CASY® 1 Model TT Cell Counter + Analyser System	Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland
CO ₂ Air-Jacketed Incubator	NUAIRE, Fernwald, Deutschland
Cryo 1 °C Freezing Container	Nalge Nunc International, Hereford, Großbritannien
Eclipse TE 2000-E	Nikon, Düsseldorf, Deutschland
FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FORMA Universal-Wassermantel-Inkubator	ThermoQuest Analytische Systeme GmbH, Egelsbach, Deutschland
Holten LaminAIR	ThermoScientific, Braunschweig, Deutschland

Gerät	Hersteller
Illumina HumanHT-12 Expression BeadChip	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Illumina iScan	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Illumina [®] TotalPep [™] -96 RNA Amplification Kits	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Kamera COOL-1300I	VDS Vosskühler GmbH, Osnabrück, Deutschland
LSM 710	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Magnetrührer MR 3001	Heidolph Elektro GmbH & Co. KG, Kelheim, Deutschland
Minishaker MS1	IKA [®] Works da Brasil Ltda, Taquara, Brasilien
Multiscan Ex	Thermo Electron Corporation, Langenselbold, Deutschland
NanoDrop [®] ND-1000 [°] UV-Vis Photometer	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Nunc Kammer	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold, Deutschland
pH-Meter Φ 720	Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, CA, USA
Rasterelektronenmikroskop XL 30 S FEG	Phillips, Hamburg, Deutschland
RNA 6000 Nano Chip	Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA
RNeasy MicroElute spin column	Qiagen, Hilden, Deutschland
Schüttler KS-15 B	Johanna Otto GmbH, Hechingen, Deutschland
Sputter-Coater (208 HR)	Cressington Scientific Instruments Ltd., Watford, Großbritannien

Gerät	Hersteller
Trockenschrank T 5042	Heraeus, Hanau, Deutschland
Ultraschallbad Bandelin Sonorex RK 102 H	Bandelin electronic, Berlin, Deutschland
Universal 320R Zentrifuge	Hettich AG, Bäch, Schweiz
Vacubrand BVC 21 Pumpe	Vacubrand GmbH, Wertheim, Deutschland
Videokamera CSC-795 (PAL)	Pacific Corporation, Tokio, Japan
VX-95 Systec	Systec GmbH, Wettenberg, Deutschland
Wasserbad TW 12	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland
Zentrifuge 5417C	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Avanti™ J-25	Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, CA, USA
Zentrifuge mini Spin	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Universal 320 R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland

3.1.2 Chemikalien

Tabelle 3.2: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Aprotinin	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Bacillo [®] AF	Bode Chemie, Hamburg, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Borsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Bovines Serumalbumin, Fraktion V, $\geq 96\%$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Calcein-AM	Molecular Probes Europe BV, Leiden, Niederlande
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
CASY [®] ton Lösung	Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland
Chemiluminescence detection substrate	Pierce [®] , ThermoScientific, Bonn, Deutschland
Chloroform	Riedel-de Haën, Seelze, Deutschland
Cy3	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Cyanurchlorid	ACROS Organics, Geel, Belgien
1,2-Distearyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholin	Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, USA

Chemikalie	Hersteller
D-MEM Media - GlutaMAX™	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
D-MEM („low glucose“) D5546	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Dimethylsulfoxid	ACROS Organics, Geel, Belgien
EDTA-Lösung (0,02 %) E8008	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Ethanol 96 % (V/V), technisch	Hofmann Chemie Import-Export GmbH, Hamburg, Deutschland
FACS Clean™	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FACS Flow™	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FACS Rinse™	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Fetales Kälberserum	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Flexi Tube siRNA	Qiagen, Hilden, Deutschland
Fibronectin from bovine plasma	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
D-Glucose-Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
L-Glutamin 200 mM G7513	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Leupeptin	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
L-Selektin-Fc-Chimären (rekombinant, human)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland

Chemikalie	Hersteller
L-Selektin-Fc-Chimären (rekombinant, murin)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Mangan(II)-chlorid-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Mowiol®	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Natriumazid	Janssen Chimica, Beerse, Belgien
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar, Deutschland
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid	ACROS Organics, Geel, Belgien
Penicillin-Streptomycin-Lösung P0781	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Pepstatin	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Phalloidin, Fluorescein Isothiocyanate Labeled	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
P-Selektin-Fc-Chimären (rekombinant, human)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
P-Selektin-Fc-Chimären (rekombinant, murin)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
RLT Puffer	Qiagen, Hilden, Deutschland

Chemikalie	Hersteller
RPMI-1640-Medium R8758	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Schwefelsäure 95-97 %	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
Sepharose [®] 4B	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
siGLO Green Transfection Indicator	DpharmaconRNAi, ThermoScientific, Bonn, Deutschland
TNF- α	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
TRAP-14 (Trifluoracetat)	Bachem Distribution Services GmbH, Weil am Rhein, Deutschland
Trypsin-EDTA-Lösung (0,25 %) T4049	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Trypsin-EDTA-Lösung (1x) T3924	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
VCAM-1-Fc-Chimäre (rekombinant, murin)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
VCAM-1-Fc-Chimäre (rekombinant, human)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30 %	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
x-treme GENE Transfection Reagent	Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
Zitronensäure, wasserfrei	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

3.1.3 Antikörper

Tabelle 3.3: Antikörper

Antikörper	Hersteller
anti-Human-IgG, FITC-konjugiert	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
anti-Maus-CD49d (Integrin α 4-Kette)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden- Nordenstadt, Deutschland
anti-Human-CD62P (P-Selektin)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden- Nordenstadt, Deutschland
anti-Human-CD29 (Integrin β 1-Kette)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden- Nordenstadt, Deutschland
anti-Maus-IgG FITC-konjugiert	R&D Systems GmbH, Wiesbaden- Nordenstadt, Deutschland
Maus-IgG ₁ , Isotypkontrolle	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Natalizumab (anti-Human-CD49d; Integrin α 4-Kette)	Biogen Idec GmbH, Ismaning, Deutschland

3.1.4 Testsubstanzen

Tabelle 3.4: Verwendete Testsubstanzen

Testsubstanz	Hersteller
Enoxaparin-Natrium (Clexane [®] 20 mg/0,2 ml)	Sanofi-Aventis GmbH, Frankfurt/M., Deutschland
Glycerophosphocholin	Synthese: Arbeitsgruppe Prof. Dr. Massing, Universität Freiburg, Deutschland
Heparin-Natrium 5000 ratiopharm [®] (5000 I.E./0,2 ml)	Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
Hexadecylphosphocholin	Synthese: Arbeitsgruppe Prof. Dr. Massing, Universität Freiburg, Deutschland
HSP90 Inhibitor	
L- α -Lysophosphatidylcholin	Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama, USA

Testsubstanz	Hersteller
Modifizierte Heparin Derivate	Synthese: Arbeitsgruppe Prof. Dr. B. Casu, G. Ronzoni Institut für Chemische und Biochemische Forschung, Mailand, Italien
mTOR Inhibitor	
mTOR und PI3K Inhibitor	
Pan-HDAC Inhibitor	
ST71	Synthese: Arbeitsgruppe Prof. Dr. Jung, Universität Freiburg, Deutschland
Tinzaparin	LEO Pharma GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland
Trichostatin A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

3.1.5 Sonstiges

Tabelle 3.5: Sonstige verwendete Artikel

Artikel	Hersteller
Alkoholtupfer	B. Braun Petzold GmbH, Melsungen, Deutschland
CASY [®] cups	Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland
Cellstar [®] Kulturflasche 25, 75, 175 cm ² , mit Filter	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Cellstar [®] TC-Platte 6-Well, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Cellstar [®] TC-Platte 24-Well, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Cellstar [®] Zentrifugenröhrchen, PP-Röhrchen 15 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Cellstar [®] Zentrifugenröhrchen, PP-Röhrchen 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

3 Material und Methoden

Artikel	Hersteller
Deckgläser, rund, Durchmesser 18 mm, Stärke 3 (0,28-0,32 mm)	Labor- und Medizintechnik Dr. J. Rost, Leipzig, Deutschland
Einmalspritzen Injekt 10 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Human Apoptosis Array Kit	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
Immersionsöl TM 518 F	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Kryoröhrchen PP, mit Schraubverschluss, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Mullkompressen steril 5 x 5 cm, 8fach	Maimed GmbH & Co. KG, Neuenkirchen, Deutschland
Pipette 10 µL	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette 100 µL	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette 1000 µL	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette 1-5 ml Finnpipette [®]	Thermo Fisher Scientific GmbH, Langenselbold, Deutschland
Pipettenspitzen 1-200 µL, gelb	Starlab GmbH, Ahrensburg, Deutschland
Pipettenspitzen 101-1000 µL, natur	Starlab GmbH, Ahrensburg, Deutschland
Pipettenspitzen 5 ml Plastibrand [®]	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Reagiergefäß 2,0 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

Artikel	Hersteller
S-Monovette [®]	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Software AxioVision 4.6	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Software BD CellQuest [™] Pro 5.2.1	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Software Imagoquant MultiTrack-AVI-2	Mediquant GmbH, Lützen, Deutschland
Software Microscop Control	Phillips, Hamburg, Deutschland
Software WinMDI 2.8	The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA
Software ZEN40	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Sterilfilter FP 30/0,2 CA-S	Whatman GmbH, Dassel, Deutschland
Sterilfilter Millipore Express [™] Plus	Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland
Venenverweilkanüle Vasofix [®] Braunüle [®]	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Zählkammer Neubauer improved [®]	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland

3.1.6 Puffer und Lösungen

Amido Black Elutionslösung	125 µL EDTA-Na Lösung 200 mM pH 8,0 0,5 g Natriumhydroxid 25 mmol/l ad 500 ml Ethanol 50 % (V/V)
Amido Black Entfärbelösung	10 ml Eisessig 2 % (V/V) 450 ml Methanol 90 % (V/V) ad 500 ml Aqua dem.
Amido Black Färbelösung	1,25 g Amido Schwarz 10B 0,25 % (m/V) 50 ml Eisessig 10 % (V/V) 25 ml Methanol 45 % (V/V) ad 500 ml Aqua dem.

3 Material und Methoden

Boratpuffer pH 8,8	618 mg Borsäure ad 100,0 ml Aqua dem. pH-Einstellung auf 8,8 mit 1 M NaOH
Calcein-AM-Lösung	50 µg Calcein-AM ad 100 µL DMSO
Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -Lösung 500 mM	7,35 g CaCl ₂ · 2H ₂ O 10,16 g MgCl ₂ · 6 H ₂ O ad 100,0 ml Aqua dem.
KCl-Lösung 3 M	22,37 g KCl ad 100 ml Aqua dem.
MgCl ₂ -Lösung 1 M	20,33 g MgCl ₂ · 6H ₂ O ad 100 ml Aqua dem.
MnCl ₂ -Lösung 100 mM	1,62 g MnCl ₂ · 2H ₂ O ad 100,0 ml Aqua dem.
MnCl ₂ -Lösung 2 mM	1,0 ml MnCl ₂ -Lösung 100 mM ad 50,0 ml Aqua dem.
NaCl-Lösung 1,54 M (10x-Konzentrat)	90,0 g NaCl ad 1000,0 ml Aqua dem.
NaCl-Lösung 154 mM (isotonische Lösung)	100,0 ml NaCl-Lösung (10x-Konzentrat) ad 1000,0 ml Aqua dem.
NaOH 1 M	4,0 g NaOH ad 100,0 ml Aqua dem.
PBS (20x-Konzentrat)	2,0 g KCl 80,0 g NaCl 2,0 g KH ₂ PO ₄ 11,5 g Na ₂ HPO ₄ ad 500,0 ml Aqua dem.
PBS (gebrauchsfertige Lösung)	25,0 ml PBS (20x-Konzentrat) ad 500,0 ml Aqua dem. ggf. pH-Einstellung auf 7,4
PBS+ (gebrauchsfertige Lösung)	1,0 ml Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -Lösung 500 mM 25,0 ml PBS (20x-Konzentrat) ad 500,0 ml Aqua dem. ggf. pH-Einstellung auf 7,4
Plättchenpuffer (10x-Konzentrat)	42,4 g NaCl 11,9 g HEPES 0,35 g Na ₂ HPO ₄ 8,3 ml 3 M KCl-Lösung

	10,0 ml 1 M MgCl ₂ -Lösung ad 500,0 ml Aqua dem.
Plättchenpuffer (gebrauchsfertige Lösung)	50,0 ml Plättchenpuffer (10x-Konzentrat) 0,9 g D-Glucose-Monohydrat 1,5 g BSA ad 500,0 ml Aqua dem.
TCA-Lösung 100 %	100 g Trichloressigsäure (TCA) 100 % (m/V) ad 100 ml Aqua dem.
TCA-Lösung 6 %	6 ml TCA-Lösung 100 % (V/V) ad 100 ml Aqua dem.
TRAP-14-Lösung (2,5 mM)	5,0 mg TRAP-14 ad 1500 µL Plättchenpuffer
Tris-SDS-Lösung pH 7,5 bei RT	12,1 g Tris 1,00 mol/l 2,0 g Natriumdodecylsulfat (SDS) 2,0 % (m/V) ad 100 ml Aqua dem.
Waschpuffer	0,25 g BSA ad 50 ml PBS

3.1.7 Statistik

Die in dieser Arbeit angegebenen Werte repräsentieren Mittelwerte aus mindestens drei identischen Experimenten \pm Standardabweichung, wenn nicht anders angegeben. Mithilfe des ungepaarten Student'schen t-Tests wurden signifikante Unterschiede ermittelt. Die Signifikanzniveaus sind den jeweiligen Darstellungen zu entnehmen, dabei gilt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.2 Zellkultur

3.2.1 Revitalisierung und Inkulturnahme der Zellen

Um Kontaminationen der Zellen mit Bakterien oder Pilzen zu vermeiden, wurden alle Arbeiten unter aseptischen Bedingungen unter einer Laminar-Air-Flow-Werkbank durchgeführt. Alle verwendeten Gegenstände wurden vor Gebrauch autoklaviert oder mit einem Desinfektionsmittel abgesprüht. Die Kultivierung geschah in einem Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ Luftgehalt. Die in einem Kryogefäß in flüssigem Stickstoff gehaltenen Zellen wurden zur Revitalisierung in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut und unverzüglich in ein Zentrifugenröhrchen mit 8 mL, 37 °C warmem Zellkulturmedium

überführt. Eine Schädigung der Zellen durch das im Gefriermedium enthaltene DMSO wurde so vermieden. Nach Durchführung der Zentrifugation bei 1640 rpm und 4 °C für 4 min wurde das erhaltene Pellet in 1 mL Zellkulturmedium aufgenommen und in eine mit Medium befüllte Zellkulturflasche überführt.

Generell wurde ein Medienwechsel bei Farbumschlag des im Medium enthaltenen Farbstoffs Phenolrot durchgeführt. Bei ca. 90 %iger Konfluenz der Zellen wurden sie, wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben, gesplittet.

3.2.2 Kryokonservierung von Zellen

Zur Konservierung der Zellen wurde folgendermaßen vorgegangen: Die konfluent gewachsenen Zellen wurden durch Behandlung mit Trypsin- oder EDTA-Lösung für 5 min bei 37 °C vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst, mithilfe des CASY Coulter Counters gezählt und durch Zentrifugation für 4 min bei 1300 rpm zu einem Pellet verdichtet. Danach wurden sie mit Einfriermedium, das aus 90 % FKS (inaktiviert bei 56 °C, 30 min) und 10 % DMSO bestand, auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen eingestellt und in Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen wurden in den Cryo 1 °C Freezing Container überführt und bei -80 °C für mindestens 12 Stunde gelagert und anschließend in flüssigem Stickstoff deponiert.

3.2.3 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl wurde mithilfe des CASY[®]1 Modell TT nach dem Coulter Counter Prinzip durchgeführt. Beim Coulter Counter Verfahren wird zwischen zwei Platinelektroden, die in eine Kapillare eingearbeitet sind, eine Spannung angelegt. Da sich die Kapillare in einer Elektrolytlösung befindet, kommt es zu einem konstanten Stromfluss mit definiertem Widerstand.

Bei einem Messvorgang werden Partikel oder Zellen mit hoher Geschwindigkeit zwischen den beiden Elektroden hindurchgesaugt. Hierdurch kommt es zu einer Unterbrechung des Stromflusses und einem der Größe der Zelle bzw. Partikel proportionalen Anstieg des Widerstandes. So sind einerseits Aussagen über die Zellzahl und andererseits über die Zellgröße möglich.

Praktisch wurden 20 µL der zu quantifizierenden Zellsuspension in 10 mL Casy[®]ton Flüssigkeit überführt (Verdünnung 1 zu 500). In zwei Messzyklen mit je 400 µL Messvolumen wurden Zellgrößenverteilung und Zellanzahl bestimmt.

3.3 Zelllinien

3.3.1 MV3 Melanomzellen

Die Melanomzelllinie MV3 wurde 1991 von van Muijen und Mitarbeitern aus einem 76-jährigen Krebspatienten isoliert²⁸⁰. Die Zelllinie zeichnet sich durch eine Expression des Integrins VLA-4 aus. Außerdem exprimiert sie zahlreiche Proteoglykane und EGF-Rezeptoren. Durch mehrfache Injektion in Nacktmäuse wurde das metastatische Potential gesteigert. Kultiviert wurde die Zelllinie in RPMI-1640-Medium, das mit 10 % (V/V) nicht-desaktiviertem FKS versetzt war. Nach Farbänderung des mit Phenolrot versetzten Mediums bzw. bei 80-90 %iger Konfluenz der Zellen in den Zellkulturflaschen wurde das Medium von den Zellen entfernt. Anschließend wurden die Zellen mit 2 mL 0,2%iger EDTA-Lösung versetzt. Es folgte eine Inkubationszeit von 4 min bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt der Umgebungsluft. Durch Klopfen an den Rand der Zellkulturflasche und Spülen mit Medium wurden die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zentrifugation für 4 min bei 1640 rpm und 4 °C wurde das entstandene Pellet in 1 mL Medium resuspendiert, wovon je nach Bedarf bestimmte Volumina in neue Zellkulturflaschen überführt wurden.

3.3.2 B16F10 Melanomzellen

Die murine Melanomzelllinie B16 wurde durch wiederholte intravenöse Applikation und Isolation in Nacktmäusen zur Filialgeneration B16F10 herangezogen²⁸¹. Wie bei den humanen MV3 Melanomzellen konnte das Metastasierungspotential dadurch erhöht werden. Als Kulturmedium fand D-MEM („high glucose“) Medium unter Zusatz von 10 % (V/V) FKS (inaktiviert), 1 % (V/V) Penicillin-Streptomycin-Lösung und 2 mM L-Glutamin Verwendung. Gehandhabt wurden die Zellen wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben.

3.3.3 bEnd3 Endothelzellen

Die bEnd3 Zellen sind primäre Hirnendothelzellen der Maus, die durch Infektion mit einem onkogenetragenden Retrovirus zu hämangiomähnlichen Zellen verändert wurden²⁸². Sie exprimieren Adhäsionsrezeptoren wie VCAM-1 oder P-Selektin nach Zytokin-Stimulation. Die Kultivierung erfolgte in D-MEM („high glucose“) unter Zusatz von 10 % (V/V) FKS (inaktiviert), 1 % (V/V) Penicillin-Streptomycin-Lösung und 2 mM L-Glutamin. Die Subkultivierung geschah wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben.

3.3.4 U937

Die Zelllinie U937 leitet sich von einem Non-Hodgkin-Lymphom ab und wurde aus einem 37-jährigen Patienten isoliert. Sie exprimiert den P-Selektin-Liganden PSGL-1 konstitutiv.

Es handelt sich um eine Suspensionszelllinie, die mit RPMI-1640-Medium mit 10 % (V/V) FKS (inaktiviert) und 1 % (V/V) Penicillin-Streptomycin-Lösung kultiviert wurde. Dazu wurde bei Gelbfärbung des Mediums die Hälfte der Zellsuspension entfernt und durch frisches Medium ersetzt. Einmal wöchentlich wurde ein Teil der suspendierten Zellen in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1640 rpm bei 4 °C für 4 min zentrifugiert. Das Pellet wurde resuspendiert und in 20 mL neues Kulturmedium überführt.

3.3.5 G361 Melanomzellen

Die Zelllinie G361 ist eine humane Melanomzelllinie und wurde von Dr. Hinke Multhaupt vom „Department of Biomedical Sciences“ der Universität Kopenhagen zur Verfügung gestellt. Neben den Integrinen $\alpha_4\beta_1$ und $\alpha_9\beta_1$ exprimiert diese Zelllinie zahlreiche Proteoglykane²⁸⁴. Kultiviert wurden die Zellen in McCoy's 5A Medium, angereichert mit 10 % FKS. Die Subkultivierung erfolgte analog Kapitel 3.3.1.

3.3.6 HUVEC

HUVEC Zellen (Human Umbilical Vein Endothel Cells) sind humane, primäre Endothelzellen, isoliert aus Nabelschnüren. Nach Stimulation mit TNF α oder Interleukin-1 exprimieren sie vermehrt VCAM-1 und P-Selektin. Sie wurden käuflich von der Firma PromoCell GmbH erworben. Kultiviert wurden sie in „Endothelial Cell Growth Medium“ der Firma PromoCell[®], dieses war mit IGF und VEGF versetzt. Zur Ablösung der Zellen vom Boden der Kulturflaschen wurde das DetachKit - ebenfalls von der PromoCell GmbH - verwendet, das neben Trypsin auch EDTA enthielt. Durchgeführt wurde die Subkultivierung gemäß den Angaben des Herstellers.

3.3.7 AsPC-1 Pankreasadenokarzinomzellen

AsPC-1 Zellen sind Pankreasadenokarzinomzellen, die aus einer 62-jährigen Patientin isoliert werden konnten. Nach drei Passagen in Nacktmäusen wurden sie in Zellkulturflaschen überführt. Sie exprimieren zahlreiche Mucine²⁸⁵. Sie wurde von Prof. Dr. Massing vom Institut für Tumorbologie der Universität Freiburg zur Verfügung gestellt. Kultiviert wurden

sie in D-MEM-GlutaMAX™ Medium unter Zusatz von 10 % (V/V) FKS (inaktiviert) und 1 % (V/V) Penicillin-Streptomycin-Lösung. Die Subkultivierung erfolgte analog Kapitel 3.3.1.

3.3.8 MIA PaCa-2 Pankreasadenokarzinomzellen

Bei MIA PaCa-2 Zellen handelt es sich ebenfalls (wie bei AsPC-1 Zellen) um Pankreaskarzinomzellen. Isoliert wurden sie 1975 von A. Yunis aus einem 65-jährigen Patienten²⁸⁶. Sie zeichnen sich durch einen triploiden Chromosomensatz aus. Die Zellen wurden von Prof. Dr. Massing vom Institut für Tumorbilogie der Universität Freiburg zur Verfügung gestellt. Kultiviert wurden sie in D-MEM-GlutaMAX™ Medium unter Zusatz von 10 % (V/V) FKS (inaktiviert) und 1 % (V/V) Penicillin-Streptomycin-Lösung. Die Subkultivierung erfolgte analog Kapitel 3.3.1.

3.4 Isolierung von Thrombozyten

3.4.1 Isolierung und Quantifizierung von Thrombozyten

Die Thrombozyten wurden aus Vollblut junger, gesunder Spender isoliert. Nach der Abnahme befand sich das Blut in Kalium-EDTA haltigen S-Monovetten[®], um einer Koagulation durch Ca²⁺ Entzug vorzubeugen.

Nach Umfüllen des Blutes in Zentrifugenröhrchen wurde mit einer Beschleunigung von 224 g und 37 °C für 15 min zentrifugiert. Dadurch kam es zu einer Auftrennung der Blutbestandteile mit einer Anreicherung von thrombozytenreichem Plasma. Das Plasma wurde auf die trockene Oberfläche einer frisch vorbereiteten Säule bestehend aus Sepharose[®] 4B gegeben. Die Säule wurde zuvor mit 50 mL Plättchenpuffer gespült. Nachdem durch Öffnen des Hahns das Plasma vollständig in die Säule eingetreten war, wurden weitere 50 mL Plättchenpuffer auf die Säule gegeben, um den Transport der Probe durch die Säule voranzutreiben. Die thrombozytenreiche Fraktion des Eluates ließ sich durch eine leichte Trübung identifizieren. Die Säule wurde anschließend mit 400 mL isotonischer Kochsalzlösung (154 mM NaCl) gespült, um alle Blutbestandteile quantitativ zu entfernen. Danach wurde die Sepharose[®] 4B in Ethanol 20 % (V/V) für den nächsten Versuch resuspendiert.

Die isolierten Thrombozyten wurden bei 4 °C und unter Lichtausschluss gelagert. Quantifiziert wurden die Thrombozyten mithilfe der Neubauer improved[®]-Zählkammer, mit

der neben großen Blutbestandteilen wie Leukozyten auch kleine, wie Thrombozyten, gezählt werden können. Es wurden fünf diagonal angeordnete Quadrate, die jeweils wieder aus 16 Untereinheiten bestehen, ausgezählt. Durch bekanntes Volumen der Zählkammer konnte nach Bildung des Mittelwertes auf die Konzentration der Thrombozyten im Eluat geschlossen werden. Durch Zentrifugation des Eluates und Resuspension des Pellets konnte die Konzentration der Thrombozyten eingestellt werden.

3.4.2 Markierung von Thrombozyten

Für fluoreszenzmikroskopische oder durchflusszytometrische Untersuchungen wurden die Thrombozyten mit dem Fluoreszenzfarbstoff Calcein-Acetoxy-methylester (Calcein-AM) markiert. Dazu wurden 5 mL Thrombozytensuspension (mit einer Konzentration von 100 Mio. Thrombozyten/100 μ L) mit 10 μ L Calcein-AM ($c = 1$ mM) versetzt. Nach Passieren der Zellmembran wird die Esterstruktur im Zytoplasma durch unspezifische Esterasen gespalten und kann so die Zellmembran nicht mehr durchdringen. Durch Komplexbildung mit Calciumionen ist eine Anregung bei einer Wellenlänge von 485 nm möglich, die bei einer Wellenlänge von 520 nm grünes Licht emittiert.

3.4.3 Aktivierung von Thrombozyten

Eine Aktivierung der Thrombozyten wurde mit TRAP-14, einem Peptid bestehend aus 14 Aminosäuren, durchgeführt. Zu 100 μ L Thrombozytensuspension (100 Mio. Thrombozyten) wurden 10 μ L einer 2,5 mM TRAP-14 Lösung gegeben. Anschließend wurde für 5 min bei 37 °C gelinde geschüttelt.

3.5 Zytotoxizitätsbestimmungen mittels MTT Assay

3.5.1 Prinzip des MTT Assays

Mithilfe des MTT Assays (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) kann die Lebensfähigkeit von Zellen bzw. die Toxizität von Substanzen auf bestimmten Zellen untersucht werden. Eine Bestimmung der mittleren inhibitorischen/toxischen Konzentration (IC_{50}) ist möglich. Die Zellen werden über einen Zeitraum von 72 Stunden mit der zu untersuchenden Substanz bei 37 °C und 5 % CO_2 Luftgehalt inkubiert. Danach wurde den Zellen sowohl das Medium als auch die darin befindliche Substanz entzogen und es wurde eine schwach gelbe 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid Lösung

(MTT Lösung) hinzu pipettiert. Da vitale Zellen mitochondriale Aldehyddehydrogenasen besitzen, unabhängig davon in welchem Stadium des Zellzykluses sie sich zu diesem Zeitpunkt befinden, stehen mit NADPH (Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat) Reduktionsäquivalente zur Verfügung, die das schwach gelbe MTT in ein blau-violettes, wasserunlösliches Formazan überführen. Nach Zerstörung der Zellen und Freisetzung des Formazans können das Vorhandensein und die Menge colorimetrisch an einem Plattenreader ausgewertet werden. So kann der Konzentrationsbereich von Substanzen ermittelt werden, in dem diese nicht toxisch auf Zellen wirken.

3.5.2 Praktische Durchführung und Auswertung von MTT Assays

Im Rahmen dieser Arbeit wurden MTT Assays nach folgendem Schema durchgeführt:

Die zu untersuchenden Zellen wurden mit EDTA oder Trypsin von der Zellkulturflasche abgelöst (s. Kapitel 3.2.1) und im CASY Zellzählgerät (s. Kapitel 3.2.3) quantifiziert. Anschließend fand eine Einstellung der Zellkonzentration auf 5.000 Zellen pro 90 μL Nährmedium statt. 90 μL dieser Suspension wurden pro Well in 96-Well-Mikrotiterplatten mit flachen Böden pipettiert. Der äußere Rand der Platte wurde mit PBS Puffer befüllt, um Verdunstungseffekte zu vermeiden. Die Platten wurden für 24 Stunden im Inkubator bei einer Temperatur von 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5 % mit dem Ziel belassen, den Zellen eine Sedimentation auf und Adhäsion am Boden der Mikrotiterplatte zu ermöglichen. Parallel fand die Herstellung der Verdünnungsreihen der zu untersuchenden Substanzen statt. Nach 24 Stunden wurde das Medium aus der Platte entfernt, durch 90 μL neues Medium ersetzt und 10 μL der Verdünnungen pro Well zugegeben. Eine Reihe der Platte wurde als Kontrolle nur mit 10 μL PBS beimpft. Anschließend wurden die Platten für 71 Stunden im Brutschrank unter oben genannten Bedingungen inkubiert.

Das Medium mit den enthaltenen Substanzen wurde entfernt und 20 μL MTT Lösung pro Well zugegeben. Abermals wurde eine Stunde bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach Entfernen der MTT Lösung wurden 150 μL MTT Lyse Lösung pro Well zugegeben. Die Platten konnten so im Kühlschrank für mehrere Stunden verwahrt werden oder es fand direkt eine Vermessung im Platten Reader (Mutiscan Ex) bei Wellenlängen von 570 nm und 690 nm statt. Anhand der erhaltenen Daten konnte in einem logarithmisch aufgetragenen Diagramm ein sigmoidaler Kurvenverlauf festgestellt werden, an dessen Wendepunkt die jeweils substanzspezifische, mittlere inhibitorische Konzentration abzulesen war. Zur Auswertung wurde das Programm GraphPad Prism[®] 5.0 verwendet.

Zusammensetzung der Lösungen:

MTT Lösung: 5 mg MTT Feststoff gelöst in 1 mL PBS

MTT Lyse Lösung: DMSO

3.6 Durchflusszytometrie

3.6.1 Präparation der Zellen für die Durchflusszytometrie

Da der theoretische Hintergrund der Durchflusszytometrie schon in vielen Arbeiten sehr detailreich beleuchtet wurde, wird hier darauf verzichtet und auf einschlägige Literatur verwiesen.

Die Zellen für einen durchflusszytometrischen Versuch wurden in Kulturflaschen unter bekannten Bedingungen kultiviert (s. Kapitel 3.3.1). Nach Entfernen des Mediums, Waschen mit PBS Puffer und Ablösen mit 0,02%iger EDTA-Lösung wurden die Zellen mit dem CASY[®]1 Modell TT Zellzählgerät quantifiziert. Auf Trypsin zum Ablösen der Zellen wurde verzichtet, um eine Beschädigung der Oberflächenproteine zu vermeiden. Nach durchgeführter Subkultivierung wurden die Zellen erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 mL PBS Puffer in einem ersten Waschschrift aufgenommen. Nach wiederholter Zentrifugation wurden die Zellen in 5 mL PBS Puffer resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Abschließend wurde die Konzentration auf 1 Mio. Zellen pro 100 µL PBS Puffer eingestellt. Sofern die anschließende durchflusszytometrische Untersuchung in einer 96-Well-Platte durchgeführt wurde, wurden 100.000 Zellen in die entsprechenden Wells pipettiert. Bei einer Versuchsdurchführung in FACS-Röhrchen wurden 1 Mio. Zellen in 2 mL Reagiergefäße überführt.

3.6.2 Bestimmung verschiedener CD Antigene auf Zelloberflächen mittels Antikörper

Für die Arbeiten in 96-Well-Platten wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

Es wurden 2,5 µg Primärantikörper bzw. Ligand pro Well zugegeben, die an das zu untersuchende Antigen binden. Nach 30 min Inkubationszeit auf Eis wurden 100 µL Waschpuffer hinzugefügt.

In einer Platten-Zentrifuge wurde bei 2900 rpm und 4 °C für 4 min zentrifugiert und die Platte anschließend ausgeschlagen. Nach Resuspendierung in 100 µL Waschpuffer wurde der sekundäre, fluoreszenzgelabelte Antikörper hinzupipettiert, der gegen den Fc-Teil des ersten Antikörpers bzw. Liganden gerichtet ist. Es schloss sich eine Inkubationszeit von 30 min auf

Eis im Dunkeln an. Nach Zugabe von 100 µL Waschpuffer wurde erneut in der Platten-Zentrifuge zentrifugiert. Anschließend wurden zwei Waschschrte mit je 100 µL Waschpuffer vorgenommen, bevor nach abschließender Resuspendierung die durchflusszytometrische Analyse durchgeführt wurde.

Für die Arbeiten in 2 ml-Reagiergefäßen wurde wie folgt verfahren. Zu den 1 Mio. Zellen pro Gefäß wurden 5 µg Primärantikörper bzw. Ligand zugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurde zentrifugiert (2900 rpm, 4 min, 4 °C), der Überstand verworfen und in 100 µL Waschpuffer resuspendiert. Nach Zugabe des zweiten fluoreszenzgelabelten Antikörpers wurde erneut 30 min auf Eis und unter Lichtausschluss inkubiert. Nach dem anschließenden Zentrifugationsschritt folgte ein Waschschrte mit 2 mL Waschpuffer. Das Pellet wurde abschließend in 1 mL Waschpuffer aufgenommen und durchflusszytometrisch untersucht.

3.6.3 Bestimmung der Interaktion von Tumorzellen mit Thrombozyten

Zur Bestimmung der Interaktion von Thrombozyten mit Tumorzellen (B16F10, AsPC-1, MIA PaCa-2) wurden jeweils 200.000 Tumorzellen (Vorbereitung s. Kapitel 3.6.1) in Reagiergefäße überführt. Dazu wurden je nach Ansatz verschiedene Inhibitoren hinzupipettiert. Ein gegen P-Selektin gerichteter Antikörper (2,5 µg anti-human-CD62P), ein Isotyp Antikörper, der kein Epitop auf den Zellen oder Plättchen erkennt (2,5 µg), und unfraktioniertes Heparin (100 µg). Anschließend wurden die mit TRAP-14 aktivierten oder nicht aktivierten, markierten Thrombozyten (20 Mio.) hinzugefügt (s. Kapitel 3.4). Im Anschluss wurde das Probenvolumen mit PBS+ auf 1000 µL aufgefüllt. Nachfolgend wurden die Ansätze für 5 min auf einen Schüttler gestellt, damit die Tumorzellen mit den Thrombozyten in Wechselwirkung treten konnten. Abschließend wurden die Ansätze durchflusszytometrisch untersucht.

3.7 Mikroskopische Zelladhäsionsbestimmungen unter physiologischen Flussbedingungen

3.7.1 Prinzip der Methode

Unter Flussbedingungen wurde die Adhäsion von Zellen an immobilisierten Rezeptorproteinen oder Endothelzellschichten untersucht. Dadurch wird die physiologische Situation in einer postkapillaren Venole möglichst vergleichbar simuliert. Die Proteine bzw. Zellen werden dazu auf Glasplättchen immobilisiert, die in eine Durchflusskammer eingebaut

werden. Unter konstantem Pufferfluss kann die Zelladhäsion in Kombination mit Inhibitoren oder Stimulanzen mikroskopisch untersucht werden. Es wurden Videos des Geschehens in der Durchflusskammer aufgenommen und halbautomatisch ausgewertet. Es lassen sich wichtige Charakteristika des Adhäsionsgeschehens, wie z. B. die Anzahl adhärierter Zellen oder Rollgeschwindigkeiten determinieren.

3.7.2 Vorbereitung der Proben

Die bei Zelladhäsionsuntersuchungen eingesetzten Zellen wurden in Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO₂, versorgt mit dem jeweiligen Medium, im Brutschrank gehalten. Zu Versuchsbeginn wurde das überständige Medium entfernt, die konfluent wachsenden Zellen mit PBS Puffer gespült und mit einer 0,02%igen EDTA-Lösung abgelöst. Auf Trypsin wurde verzichtet, um eine Beschädigung der extrazellulär gelegenen Proteindomänen zu vermeiden. Anschließend wurden die Zellen mithilfe des CASY[®]1 Modell TT (s. Kapitel 3.2.3) gezählt und bei 2 °C und 1400 rpm zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde zu einer Konzentration von 1 Mio. Zellen pro 50 µL FKS-freiem Nährmedium resuspendiert. Darauf erfolgte ggf. eine Subkultivierung.

3.7.3 Reinigung der Glasplättchen

Zum Fixieren von Rezeptorproteinen oder Zellen für Adhäsionsuntersuchungen unter Flussbedingungen wurden Glasplättchen mit einem Durchmesser von 18 mm und einer Dicke von 0,28-0,32 mm verwendet. Gereinigt wurden die Glasplättchen in einer Mischung aus 15 mL Wasserstoffperoxid (30 %) und 35 mL Schwefelsäure (98 %) für 30 min bei 80 °C im Ultraschallbad. Anschließend wurde zehnmal mit demineralisiertem Wasser gewaschen. In einer Mischung aus 50 mL Wasser, 10 mL Wasserstoffperoxid-Lösung (30 %) und 10 mL Ammoniaklösung (26 %) wurde abermals für 30 min im Ultraschallbad auf 80 °C erhitzt. Nach abschließender zehnmaliger Spülung der Glasplättchen mit demineralisiertem Wasser wurden diese im Trockenschrank bei 80 °C getrocknet.

3.7.4 Beschichtung der Glasplättchen mit Rezeptorproteinen

Zur kovalenten Fixierung von Rezeptorproteinen auf der Oberfläche der Glasplättchen wurde Cyanurchlorid verwendet. Cyanurchlorid dient als Linker zwischen den Rezeptorproteinen und den Silanolgruppen der gereinigten Glasplättchen. Zur kovalenten Bindung des

Cyanurchlorids an die Silanolgruppen wurde eine Spatelspitze des Cyanurchlorids in 50 mL wasserfreiem Chloroform gelöst. Nach Zugabe der Glasplättchen wurde für 30 min im Ultraschallbad auf 80 °C erhitzt. Danach wurde für 20 min mit wasserfreiem Chloroform im Ultraschallbad gespült. Abschließend wurden die Glasplättchen bei 80 °C getrocknet. Die Glasplättchen konnten nun direkt verwendet oder unter wasserfreien Bedingungen für maximal zwei Monate gelagert werden.

Zur kovalenten Immobilisierung von Rezeptorproteinen wie Selektinen oder VCAM-1 wurden die Konzentrationen der jeweiligen Lösung auf 0,02 µg/µL eingestellt. Für die Beschichtung eines Glasplättchens wurden 10 µL verwendet und mit 10 µL BSA-Lösung 4 % (m/V) und 60 µL Boratpuffer (pH 8,8) gemischt. Dieses Gemisch wurde auf die Glasoberfläche aufgebracht. Unter diesen Bedingungen reagiert das an die Glasoberfläche gebundene Cyanurchlorid mit freien Aminogruppen des Rezeptorproteins unter Ausbildung einer kovalenten Bindung (s. Abbildung 3.1). Nach einer Inkubationszeit von 12 Stunden bei 4 °C wurden die Plättchen mit demineralisiertem Wasser gewaschen und für Zellrollversuche verwandt (s. Kapitel 3.7.7).

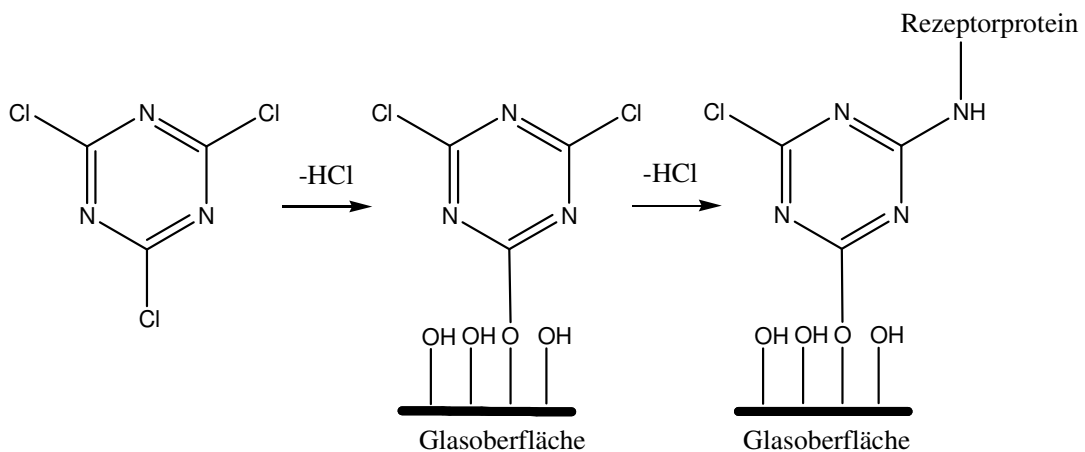


Abbildung 3.1: Kovalente Fixierung von Proteinen an Glasoberflächen. Cyanurchlorid bindet zuerst unter Abspaltung von Chlorwasserstoff an die freien Silanolgruppen des Glases. In einem zweiten Schritt kommt es zur Reaktion von freien Aminogruppen des zu immobilisierenden Proteins mit Cyanurchlorid. Hier wird unter wiederholter Abspaltung von Chlorwasserstoff eine kovalente Bindung zwischen Cyanurchlorid und Protein ausgebildet.

3.7.5 Präparation der Glasplättchen mit Endothelzellen

Zur Untersuchung der Interaktion von HUVEC bzw. bEnd3 Endothelzellen mit Tumorzellen unter Flussbedingungen wurden konfluent bewachsene Glasträger verwandt und in die Durchflussapparatur eingebaut.

Zunächst wurden die Glasplättchen kurz in Ethanol 96 % (V/V) getaucht, um Fettreste von den Oberflächen zu entfernen. Anschließend wurden sie autoklaviert und in die Vertiefungen

von einer 6-Well-Platte gelegt. Die Platte wurde mit 3 mL Medium pro Well befüllt, in die jeweils 100.000 Zellen pipettiert wurden. Durch Schwenken wurden die Zellen gleichmäßig verteilt und 48 Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach diesem Zeitraum war eine vollständige Konfluenz der Glasplättchen zu verzeichnen.

Sechs Stunden vor Versuchsbeginn wurden die Zellen mit rekombinantem, humanen bzw. murinen TNF- α versetzt, so dass in jedem Well eine Konzentration von 50 ng/mL vorlag. Hierdurch wurde eine verstärkte Expression von membranständigem VCAM-1 erreicht. Vor Einbau in die Durchflusskammer wurde das den Zellen anhaftende Medium vorsichtig mit einem Papiertuch am Rand der Plättchen abgetupft.

3.7.6 Aufbau der Durchflussapparatur

Die Durchflussapparatur besteht aus einem transparenten Polyacrylblock, in den eine Kammer mit den Maßen 11 mm \times 6 mm \times 0,45 mm gefräst wurde (s. Abbildung 3.2). Die Kammer ist an einer Seite geöffnet und kann mit einem Glasplättchen, das mit immobilisierten Rezeptorproteinen oder Zellen beschichtet ist, verschlossen werden. Um dem Austritt von Flüssigkeit vorzubeugen, wird das Glasplättchen mit Schrauben und Dichtungsring am Polyacrylblock fixiert. An der Vorder- und Hinterseite befinden sich jeweils Bohrungen, die als Ein- und Auslassöffnungen für das Fließmedium dienen. Die Ecken innerhalb der Kammer sind abgerundet, wodurch ein laminares Fließen ermöglicht wird. Der Durchflusskammer vorgeschaltet sind eine Blasenfalle, die zum Injizieren von Zellen und Substanzen verwendet wird, ein Dreiwegehahn und ein Vorratsgefäß mit Puffer. Nach Passieren der Durchflusskammer gelangt das Fließmittel über einen weiteren Dreiwegehahn in ein Abfallbehältnis.

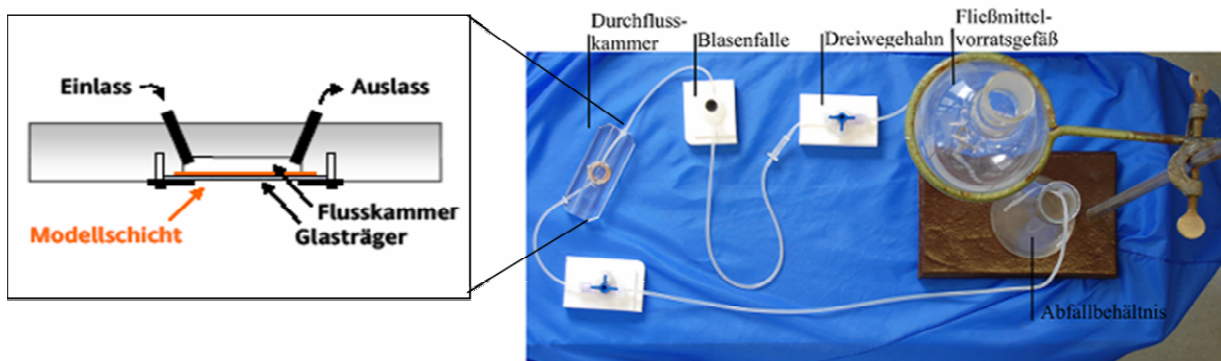


Abbildung 3.2: Aufbau der Durchflussapparatur. Aufgrund des hydrostatischen Drucks wird das Fließmittel aus dem Vorratsgefäß über einen Dreiwegehahn und eine Blasenfalle in die Durchflusskammer, wo Bindungsereignisse stattfinden, transportiert. Von dort gelangt es über einen weiteren Dreiwegehahn in das Abfallbehältnis. Links befindet sich eine schematische Darstellung der Durchflusskammer im Querschnitt (modifiziert nach J. Fritzsche).

3.7.7 Durchführung von Zelladhäsionsexperimenten und Testung potentieller Inhibitoren

Zur Durchführung eines Experiments wurde ein beschichteter Glasträger in die Durchflusskammer eingepasst und fixiert. Die nun verschlossene Kammer wurde auf dem inversen Mikroskop Axiovert 200 installiert. An der Seite des Mikroskops wurde eine Videokamera befestigt. Das Fließmittelvorratsgefäß wurde mit PBS Puffer (PBS+ bei Versuchen mit Selektinen), der vorher auf 20 °C temperiert wurde, befüllt und in erhöhter Lage positioniert. Aufgrund des nun vorherrschenden hydrostatischen Drucks wurde in der Durchflusskammer eine Scherrate G von 200/s erreicht, so wie sie auch in postkapillaren Venolen vorliegt. Die Kammer wurde dabei mit einem Volumen von 40 μL Puffer pro Sekunde durchströmt.

Bei Untersuchungen am Integrin VLA-4 wurden 1×10^6 Zellen in FKS freiem Medium mit MnCl_2 ($c = 1 \text{ mM}$) und den evtl. zu testenden Agenzien zu einem Gesamtvolumen von 100 μL versetzt und für 5 min bei 37 °C und leichtem Schwenken inkubiert. Als Kontrollexperiment dienten 1×10^6 Zellen ohne MnCl_2 Stimulation. Zellen, die auf ihre Selektin-Bindungsfähigkeit untersucht wurden, erhielten keine MnCl_2 -Behandlung.

Anschließend wurden die 1×10^6 Zellen und die evtl. zu testenden Agenzien in die Blasenfalle injiziert. Nach kurzem Öffnen der Dreiwegehähne wurden die Zellen mit der entsprechenden Substanz in die Durchflusskammer gespült. Dies wurde durch die Kamera optisch erfasst. Durch Schließen der Dreiwegehähne konnten die Zellen für fünf respektive zwei min in der Kammer sedimentieren und mit den immobilisierten Rezeptorproteinen oder Zellen interagieren.

Mit dem Beginn der Aufnahme einer Videosequenz von 15 s wurde der Fluss wieder gestartet und die Interaktion der Zellen mit den Rezeptorproteinen konnte optisch erfasst werden.

3.7.8 Auswertung mithilfe der Imagoquant MultiTrack-AVI-2 Software

Die Videos wurden unter Einsatz eines „long distance“ (LD)-Objektives mit 10facher bzw. 20facher Vergrößerung mit dem Kameramodell „CSC-795“ aufgenommen. Dabei betrug die Dauer eines Videos 15 s und es wurden 25 Bilder pro Sekunde aufgezeichnet. Die Kamera wurde mit der Software „Virtual Dub“ gesteuert. Mit dieser Software wurden ebenfalls die zu analysierenden Sequenzen aus den Videos herausgeschnitten und gespeichert.

Mit der Imagoquant MultiTrack-AVI-2 Software konnte nun die Zellzahl als Parameter der Adhäsion manuell durch Markieren erfasst werden (s. Abbildung 3.3). Hierbei wurde jeweils

nach 25 Bildern bzw. nach jeder Sekunde eine neue Zählung vorgenommen. Parallel zur Zellzahl wurde auch die Geschwindigkeit jeder markierten Zelle erfasst, ebenso wie die Durchschnittsgeschwindigkeit. Auch kann durch Festsetzen einer Geschwindigkeitsuntergrenze zwischen adhärennten und sich fortbewegenden Zellen diskriminiert werden. Durch das Parzellieren jeder Sequenz in fünf Teilsequenzen wird der Fehler, der durch das Verlieren von einzelnen Zellen durch das Programm auftreten würde, minimiert. Durch Bildung des Quotienten aus der Zellzahl vor Beginn des Durchflusses und jeweils im Sekundenabstand danach lässt sich eine Aussage über die Zelladhäsion treffen.

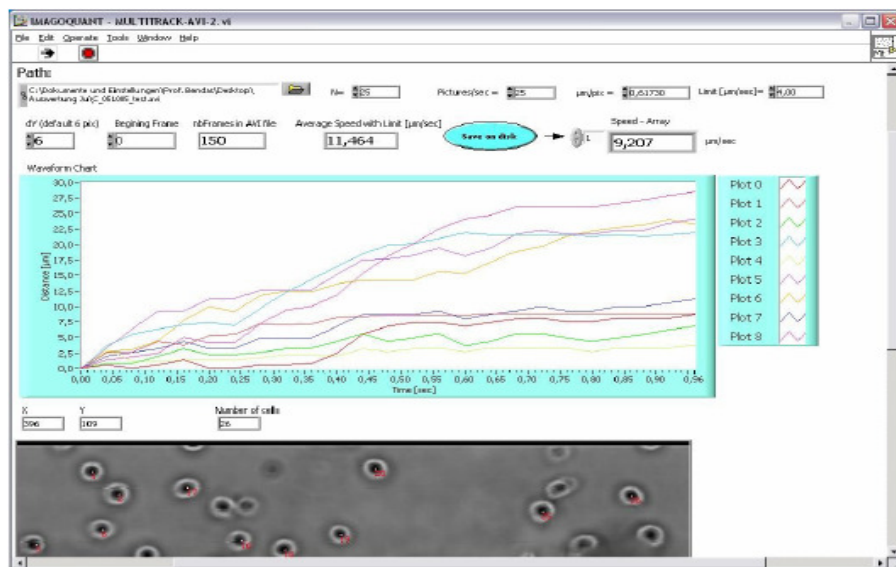


Abbildung 3.3: Auswertung mittels Imagoquant MultiTrack-AVI-2.

N	Anzahl der Bilder, die in die Auswertung eingehen
Pictures/sec	Aufnahmegeschwindigkeit der Videokamera
$\mu\text{m}/\text{pix}$	Verhältnis zwischen Pixeln und Distanz unter Verwendung des LD-Objektives mit 20facher Vergrößerung
Limit [$\mu\text{m}/\text{sec}$]	Geschwindigkeitslimit
Average Speed [$\mu\text{m}/\text{sec}$]	Durchschnittsgeschwindigkeit der Zellen pro N Bilder
Number of cells	Zellanzahl pro Bild

3.8 Konfokale-Laserscanning-Mikroskopie

3.8.1 Prinzip der Methode

Zur Untersuchung des Zytoskeletts von MV3 Melanomzellen wurde die Konfokale-Laserscanning-Mikroskopie angewandt. Dabei wird nicht die komplette Probe wie bei der Fluoreszenzmikroskopie mit Fluoreszenzlicht bestrahlt, stattdessen wird die Probe von einem Laser Punkt für Punkt abgerastert. Durch den Laser werden Fluorophore zur Emission von Licht angeregt, die von Photomultipliern detektiert werden. Durch den Gebrauch einer Lochblende (Pinhole) kann genau das Licht gemessen werden, das in der Fokusebene durch

Anregung entsteht. Streulicht und Licht, das nicht aus der Fokusebene kommt, können so ausgeschlossen werden. Am Computer kann aus den gemessenen Lichtintensitäten ein dreidimensionales Bild zusammengesetzt werden.

3.8.2 Vorbereitung der Proben

Zur Anfärbung des Aktinzytoskeletts von Lysophosphatidylcholin (LPC) inkubierten B16F10 Melanomzellen wurde wie folgt vorgegangen:

Die B16F10 Zellen (20.000) wurden in 6-Well-Platten, die jeweils mit 15 mm-Deckgläsern bestückt waren, für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Deckgläschen wurden vorher mit Ethanol (96 %) entfettet und autoklaviert.

Die im Folgenden verwendeten Agenzien wurden im Wasserbad auf eine Temperatur von 37 °C erwärmt. Danach wurde das Medium vorsichtig von den Zellen abgenommen und es wurde einmal mit 3 mL PBS Puffer 5 min gewaschen. Nach vollständiger Entfernung des PBS Puffers wurden die Zellen für 3 min vorsichtig mit 1 mL PEG-GTX pro Well versetzt. Anschließend wurden die Zellen abermals für 5 min mit 3 mL PBS (37 °C) gewaschen. Durch Zugabe von 1 mL PFA (4 %) pro Well für 10 min wurden die Zellen fixiert. Danach wurde dreimal für jeweils 2 min mit 3 mL PBS pro Well gewaschen.

Parallel wurden auf Objektträgern, die mit Parafilm überspannt waren, jeweils 50 µL Tropfen Phalloidin-FITC (c = 0,5 mg/mL) aufgebracht. In diese Tropfen wurden die Glasträger kopfüber gelegt, so dass die Zellen mit dem Phalloidin-FITC in Berührung kamen. Diese Ansätze wurden in eine feuchte, abgedunkelte Kammer verbracht, um Austrocknungs- oder Ausbleichungseffekte zu vermeiden. Nach 45 min Inkubation bei RT wurden die Glasträger dreimal mit jeweils 3 mL PBS für 2 min gewaschen. Abschließend wurde einmal mit Aqua dem. (3 mL) gewaschen. Eingebettet wurden die Glasplättchen in 5 µL Mowiol auf Objektträgern. Die Lagerung fand bei 4 °C unter Lichtausschluss statt.

3.9 Rasterelektronenmikroskopie

3.9.1 Prinzip der Methode

Bei einem REM handelt es sich um eine Weiterentwicklung des Elektronenmikroskops. Im Gegensatz zur Lichtmikroskopie werden anstelle von Lichtstrahlen punktförmige Elektronenstrahlen verwendet. Die Elektronen werden durch eine Feldemissionskathode, die aus einer feinen, erhitzbaren Wolframkristallspitze besteht, erzeugt. Durch Anlegen einer

Spannung emittiert diese Spitze Elektronen. Die zu vermessenden Proben werden in ein Vakuum eingebracht, da nur unter diesen Bedingungen Elektronen existieren können.

Der gebündelte, scharfe Elektronenstrahl rastert in einem bestimmten Muster die Probe ab. Dabei wird der Elektronenstrahl gradlinig entlang der Probenoberfläche und zum Ausgangspunkt zurückgeführt, bis die komplette Oberfläche abgerastert ist. Wechselwirkungen zwischen Probe und Elektronen führen zu einer Abbildung der Probenoberfläche.

Für die zu untersuchenden Proben wird mit einem an das Rasterelektronenmikroskop angeschlossenen Sekundärelektronendetektor gearbeitet (s. Abbildung 3.4). Die Beschleunigungsspannung beträgt für alle Proben 8 keV. Um die Leitfähigkeit der Proben sicherzustellen, werden diese mit einer Platin/Palladium Mischung in einer Argonatmosphäre gesputtert. Zusätzlich wird der Rand des Objektträgers mit einem Silberlack bestrichen, um Aufladungseffekte der Probe zu minimieren. Die computergestützte Auswertung wird mithilfe des Programms „Mctrl“ durchgeführt.

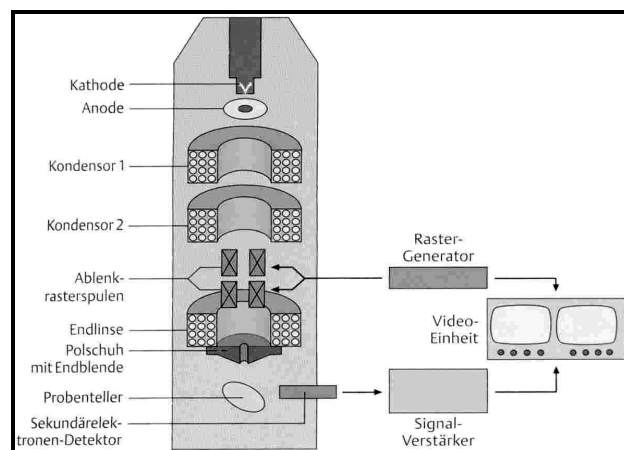


Abbildung 3.4: Schematischer Aufbau eines Rasterelektronenmikroskops

3.9.2 Vorbereitung der Zellen

Die mit verschiedenen LPC Konzentrationen versetzten B16F10 oder MV3 (jeweils 50.000) Melanomzellen wurden in 6-Well-Platten auf 15 mm-Deckgläsern ausgesät. Nach 24 Std. wurde das Medium entfernt und es wurde einmal mit 3 mL PBS für 5 min gewaschen. Zur Fixierung erfolgte eine Zugabe von 1 mL PFA (4 %) pro Well für 30 min bei RT. Danach wurde dreimal für jeweils 5 min mit 3 mL PBS pro Well gewaschen.

Anschließend wurden die Deckgläser in einer Metallhalterung fixiert und in einer Reihe aufsteigender Ethanolkonzentrationen getrocknet. Folgende Ethanolkonzentrationen und Inkubationszeiten wurden verwandt:

- Jeweils 5 min mit 10, 30, 50, 70 und 90 % Ethanol
- 2 mal für 10 min in 100 % Ethanol
- 2 mal für 10 min in 100 % Ethanol, der über Molekularsieb entwässert wurde

3.9.3 Kritisch-Punkt Trocknung der Zellen und Sputtern der Probe

Zur weiteren Entfernung von Wasser und Ethanol aus der Probe wurde eine Trocknung mit flüssigem CO₂ durchgeführt. Dazu wurden die Deckgläser achtmal nacheinander mit flüssigem CO₂ bei ca. 80 bar und 10 °C versetzt. Bei anschließendem Erhitzen auf über 40 °C wurde der Kritische Punkt erreicht. Nachfolgend wurden die Deckgläser vorsichtig auf Aluminium-Probenteller geklebt und am Rand mit Leitsilber bestrichen, wodurch ein besserer Elektronenabfluss ermöglicht wurde. Abschließend wurden die Proben im Sputter-Coater mit 2-2,2 nm Platin/Palladium gesputtert. Die Proben waren nun einer Betrachtung mit dem Rasterelektronenmikroskop zugänglich.

3.10 SACED Motilitätsassay

3.10.1 Prinzip des SACED Motilitätsassays („stroboscopic analysis of cell dynamic“)

Zur Bestimmung des Migrationsverhaltens und der Motilität von Zellen kann deren Lamellen- und Ruffledynamik mithilfe des SACED Assays ermittelt werden. Dazu wurden die zu untersuchenden Zellen auf Bestandteile der ECM (z. B. Fibronectin) gegeben und mittels Mikroskop über einen bestimmten Zeitraum hochauflösend gefilmt. Nach Bearbeitung der aufgenommenen Bilder lassen sich in die Lamellen der einzelnen Zellen ein-Pixel-dicke Linien legen. Für diesen Bereich ermittelt ein Programm die verschiedenen Graustufen für alle Bilder der aufgenommenen Serie. Diese Graustufen werden anschließend in einem „time-space-plot“ durch das Programm „SACED XP260“ hintereinander gelegt (s. Abbildung 3.5). In den „time-space-plots“ lässt sich die Lamellenprotrusion und -retraktion, sowie die Ruffledynamik erkennen. Durch Einzeichnen von Linien, die die Lamellendynamik beschreiben, ist die Ermittlung von motilitätsbeschreibenden Parametern, wie z. B. der Lamellengeschwindigkeit, Bewegungsstrecke und Bewegungsfrequenz möglich.

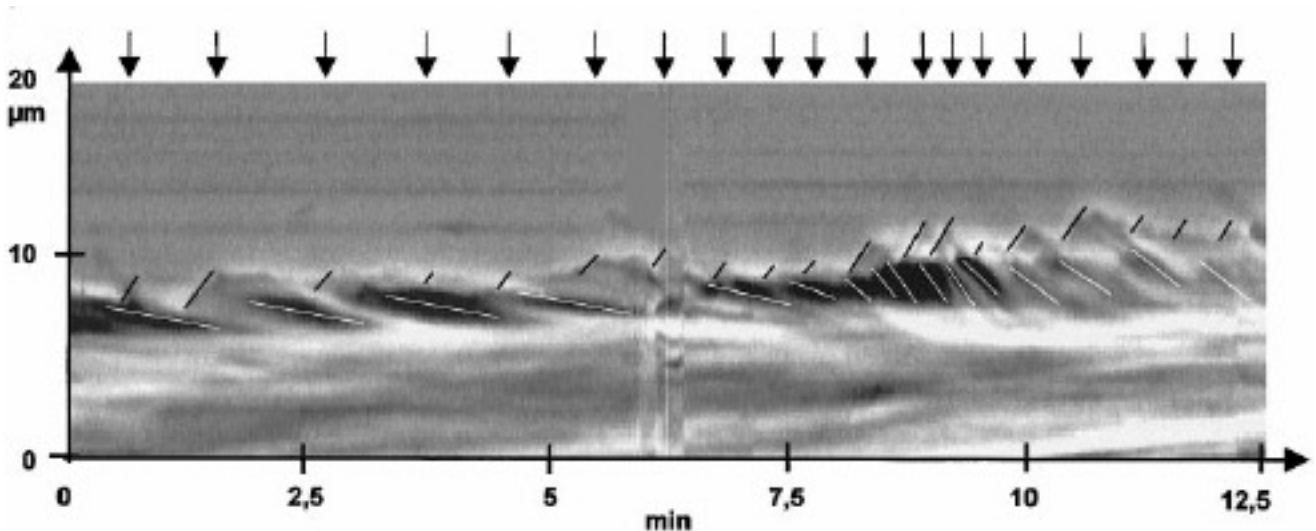


Abbildung 3.5: „time-space-plot“ des SACED Assays. Hier dargestellt die Lamellendynamik von Keratinozyten unter EGF Einfluss im „time-space-plot“ über eine Dauer von 12,5 min. Weiße Linien beschreiben die Rufflebewegung, dunkle Linien kennzeichnen die Lamellenbewegung. Die schwarzen Pfeile bezeichnen die Bildung neuer Lamellipodien (aus Hinz et al., 1999).

3.10.2 Vorbereitung der Proben

Zur Beschichtung der Nunc-Kammern mit Fibronectin als Komponente der ECM wurden 40 μL der Fibronectin Lösung ($c = 2,5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) mit 1610 μL Zellkulturmedium versetzt. 200 μL dieser Mischung wurden in eine Kammer gegeben und über den kompletten Boden verteilt. Nach 20 min Sedimentationszeit wurde das Medium vorsichtig abgenommen und durch 1 mL neues Medium ersetzt. In dieses wurden nun 5.000 B16F10 Melanomzellen, inkubiert mit LPC für 48 Std., gegeben. Nach 24 Std. Inkubationszeit konnte der Versuch durchgeführt werden.

3.10.3 Durchführung und Auswertung

Durchgeführt wurden die Untersuchungen am Mikroskop „Nikon Eclipse TE 2000-E“, in dem eine Temperierung der Proben auf 37 °C möglich ist. Mithilfe der Software „NIS Elements AR 2.30“ und einer 60fachen Vergrößerung konnten Videosequenzen einzelner B16F10 Zellen aufgezeichnet werden. Es wurden jeweils 14 Zellen mit und ohne LPC Inkubation für jeweils 10 min mit einer eingebauten Kamera (COOL-1300I) beobachtet. Nach Konvertierung der einzelnen Bilder der Videosequenzen konnte mit der Software „SACED XP260“ die Auswertung der Lamellen- und Ruffledynamik durchgeführt werden. Durch Kennzeichnung der Lamellen und Protrusionsbewegungen mit Linien erlaubt die Software einen Rückschluss auf Parameter wie Protrusions- oder Retraktionsgeschwindigkeiten.

3.10.4 Bestimmung der Zellgröße bzw. Oberflächenausdehnung als Parameter für die Zelladhäsion

Neben der Aufzeichnung von Videos und Bildern kann mit der „NIS Elements AR 2.30“ Software auch die Oberflächenausdehnung von Zellen in Aufsicht ermittelt werden. Ist zusätzlich auch der Durchmesser der entsprechenden Zellen bekannt, so lassen diese beiden Parameter indirekt einen Schluss auf die Zelladhäsion zu. Zellen, die nicht an einer Oberfläche, wie z. B. ECM adhären können, runden sich ab und haben in der Aufsicht eine kleinere Oberfläche als Zellen, die stark mit dem Untergrund wechselwirken.

3.11 Bestimmung Apoptose-relevanter Proteine mittels „Proteome Profiler Human Apoptosis Array Kit“

3.11.1 Gesamtproteinbestimmung von Zelllysaten mittels „Amido Black Protein Assay“

Bevor die Expression apoptoserelevanter Proteine untersucht werden konnte, mussten die Proteinmengen in den zu untersuchenden Zelllysaten mithilfe des Amido Black Protein Assays bestimmt werden.

Der Amido Black Protein Assay ermöglicht, in Gegenwart von Detergenzien mit großer Genauigkeit kleinste Mengen Protein zu quantifizieren. Dazu wird die Probe mit dem Farbstoff Amido Schwarz versetzt und UV-photometrisch vermessen. Parallel wird eine BSA Kalibrierreihe vermessen, die die Berechnung des Proteingehalts in der Probe ermöglicht.

Die Proben wurden so verdünnt, dass in den Ansätzen ungefähr 10 µg Protein enthalten waren. Mit Aqua dem. wurden sowohl die Proben (10 µL) als auch die Verdünnungen der Kalibrierreihe auf 225 µL aufgefüllt. Nach Zugabe von 30 µL 1 M Tris-HCl (pH 7,5 mit 2 % SDS) und kurzem Durchmischen wurden die Ansätze mit 50 µL eisgekühlter TCA-Lösung (100 %) versetzt und kurz bei RT inkubiert.

Parallel wurde eine PVDF-Membran zuerst kurz in Methanol und anschließend für 2 min in Aqua dem. getaucht. Ein gleich großes Filterpapier wurde ebenfalls mit Aqua dem. benetzt. Die Membran wurde bündig auf das Filterpapier gelegt und beide wurden in einen Vakuumblock eingebaut, an den durch eine Vakuumpumpe Unterdruck angelegt wurde. Alle Ansätze wurden in die Vertiefungen des Vakuumblocks pipettiert. Das Lösungsmittel passierte die Membran und das Filterpapier, die Proteine hingegen wurden durch die Membran retiniert. Zusätzlich wurden alle Probengefäße mit 180 µL TCA (6 %) gespült und auch diese Lösungen wurden in die entsprechenden Vertiefungen pipettiert. Nach Zugabe von weiteren 180 µL TCA (6 %) wurde die Membran für 20 min in eine Amido Schwarz Lösung

gelegt. Danach wurde die Membran 1 min in Aqua dem. gespült und dreimal in 25 mL Entfärbelösung für jeweils 3 min gelegt. Anschließend wurde sie abermals für 3 min in Aqua dem. getaucht. Die Proteinflecken wurden ausgestanzt und in jeweils 1 mL Elutionslösung in Glasröhrchen für 15 min gegeben. Dabei ging der Farbstoff in die Elutionslösung über und konnte UV-photometrisch bei einer Wellenlänge von 630 nm erfasst werden. Anhand der Kalibriergraden konnte auf die Proteinmenge in den Proben geschlossen werden.

3.11.2 Prinzip der Methode

Das zentrale Element des „Human Apoptosis Array Kit“ ist eine mit Antikörpern beschichtete Nitrocellulose-Membran. Die Antikörper sind auf 35 verschiedenen Positionen der Membran jeweils in Duplikaten fixiert und binden hochspezifisch und hochaffin Proteine, die bei der Apoptose einer Zelle exprimiert werden (s. Abbildung 3.6). Dabei ist es den Herstellern gelungen, jede Membran mit der gleichen Menge Antikörper pro Spot zu beschichten. So ist ein Vergleich der detektierten Proteinmengen zwischen zwei Membranen möglich und lässt quantitative Aussagen zu.

Nach Inkubation der Membran mit Zelllysaten, die potentiell apoptoserelevante Proteine enthalten, wird die Membran mit einem Antikörpercocktail inkubiert. Dieser Cocktail besteht aus Antikörpern, die auch an apoptoserelevante Proteine binden. Sollten durch die an die Membran gebundenen Antikörper nun apoptoserelevante Proteine fixiert sein, so bindet der zweite Antikörper rückseitig an das entsprechende Protein. Da der zweite Antikörper am Fc-Teil mit Biotin gelabelt ist, kann hieran ein Streptavidin-HRP Konjugat binden, das im nächsten Schritt zugegeben wird. Durch Zugabe von Luminol, das durch die Meerrettichperoxidase oxidiert und angeregt wird, werden Photonen emittiert, die in einer Dunkelkammer durch Auflegen von Röntgenfilmen sichtbar gemacht werden können. Diese Filme werden fixiert und an einem Reader mit entsprechender Software hinsichtlich ihrer Pixeldichte quantifiziert.

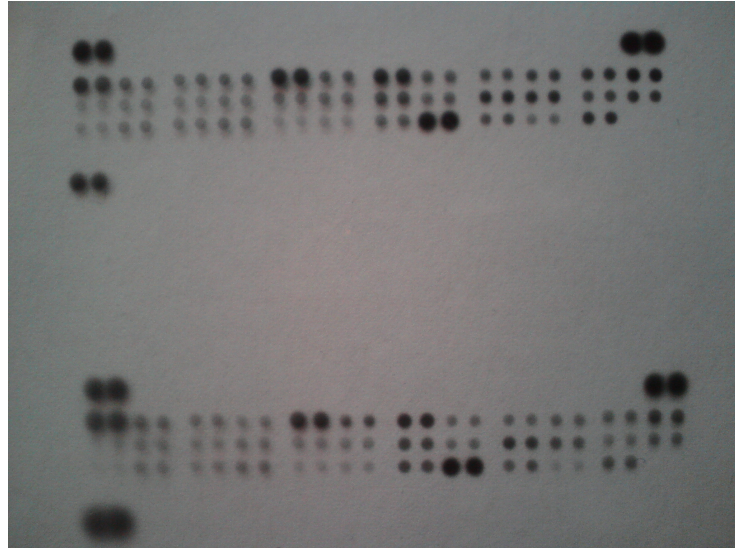


Abbildung 3.6: Röntgenfilm von zwei ausgewerteten Membranen. Jedes Protein wird in Duplikaten bestimmt. Die Pixeldichte wird durch eine spezielle Software erfassbar.

3.11.3 Durchführung und Auswertung

Untersucht wurde mit dem „Human Apoptosis Array Kit“, ob und welche apoptoserelevanten Proteine durch eine LPC Inkubation von MV3 Zellen hochreguliert wurden.

Durchgeführt wurde der Kit entsprechend der Anleitung des Herstellers „R&D Systems“. Zur Lyse der Zellen wurde der im Kit enthaltenen Lyse-Puffer unter Zusatz von jeweils 10 µg Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin pro mL Puffer verwendet. Darauf wurde die Membran mit 400 µg Gesamtprotein versetzt.

Als Chemiluminescence Substrat wurde „Super Signal West Dura Extended Duration Substrate“ der Firma Thermo Scientific verwendet. Der entwickelte Röntgenfilm wurde mithilfe des Readers „BioRad Gel DOC 100“ ausgelesen und mit der Software „Quantity One - 4.2.3“ von BIORAD ausgewertet.

3.12 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Interaktion von Thrombozyten mit Tumorzellen

3.12.1 Durchführung und Auswertung

Zur Bestimmung der Interaktion von B16F10 bzw. MV3 Melanomzellen mit Thrombozyten wurden 25.000 B16F10 respektive 50.000 MV3 Zellen in 1 mL Zellkulturmedium in 24-Well-Platten ausgesät. Es folgte eine Inkubationszeit von 48 Std. im Brutschrank, in der die Zellen den Boden der 24-Well-Platte konfluent bewachsen haben.

Am Versuchstag wurden die Thrombozyten wie in Kapitel 3.4 beschrieben isoliert, quantifiziert, markiert und z. T. aktiviert. Den Zellen wurde das Medium entzogen und sie wurden einmal mit 1 mL PBS+ gewaschen. Danach wurden 200.000 Thrombozyten und die entsprechenden Inhibitoren in jeweils 1 mL PBS+ zu den Zellen hinzugegeben. Eingesetzt wurden 2,5 µg P-Selektin Antikörper (anti-human-CD62P), sowie die entsprechende Menge Kontrollantikörper. Auch wurde der Einfluss einer LPC Inkubation der Tumorzellen, sowie verschiedene Heparinmengen getestet. Anschließend wurden die Platten für 15 min auf einen Schüttler gestellt. Während dieser Zeit fand eine Interaktion der adhärennten Tumorzellen mit den Thrombozyten statt. In einem letzten Schritt wurde zweimal mit 1 mL PBS+ gewaschen. Mit dem Mikroskop Axiovert 200 (LD-Objektiv, 10fache Vergrößerung) und der Kamera AxioCam MRc wurden unter Einsatz des FITC Filters Bilder von jedem Well aufgenommen, mithilfe derer die Thrombozytenzahl bestimmt wurde.

Da humanes P-Selektin dem murinen strukturell sehr ähnlich ist und auch an murine P-Selektin-Liganden bindet, ist es vertretbar, die Interaktion von murinen B16F10 Melanomzellen mit humanen Thrombozyten zu untersuchen.

3.13 Integrin Knockdown

3.13.1 VLA-4 Knockdown in MV3 Melanomzellen

Um die Anzahl an VLA-4 Molekülen in der Zellmembran von MV3 Zellen für Adhäsionsexperimente unter physiologischen Flussbedingungen zu minimieren, wurde siRNA (Flexi Tube siRNA) eingesetzt. Um den Knockdown des VLA-4 zu optimieren, wurden vier verschiedene siRNAs, die jeweils gegen andere mRNA Sequenzen des VLA-4 gerichtet waren, gemischt und verwendet. Um die siRNA in die Zellen einzubringen, wurde Transfektionsreagenz (x-treme GENE Transfection Reagent) benutzt, das die Zellmembran kurzfristig für diese durchlässig macht. Zuerst wurde die siRNA unter RNase-freien Bedingungen in serumfreies Medium eingebracht. Auch das Transfektionsreagenz wurde in serumfreies Medium pipettiert. Beide Ansätze wurden innerhalb von 5 min vereint und für 20 min bei RT inkubiert. Danach wurde diese Mischung zu 20.000 am Vortag in 24-Well-Platten ausgesäten Zellen hinzugegeben.

Da hier nur das Prinzip des Einsatzes von siRNA vorgestellt werden soll, können die genauen Mengen- und Konzentrationsangaben und einzelne Arbeitsschritte den Anleitungen der Hersteller entnommen werden. Um die optimale Zellzahl und die optimalen, nicht-toxischen Konzentrationen an siRNA und Transfektionsreagenz zu ermitteln, wurden Vorversuche mit

FITC gelabelter siRNA (siGLO Green Transfection Indicator) durchgeführt. Im Durchflusszytometer zeigte eine 5 nM Konzentration an siRNA und eine 0,5 % (V/V) Transfektionsreagenzkonzentration die größte Effektivität. Weiterhin wurde durchflusszytometrisch ermittelt, dass die stärkste Downregulation der VLA-4 Expression nach 72 Std. Inkubationszeit zu verzeichnen ist. Aus diesem Grund wurde dieser Zeitrahmen für die Zellen, die Adhäsionsuntersuchungen unter Flussbedingungen unterworfen werden sollten, gewählt.

3.14 Genexpressionsanalyse

3.14.1 Prinzip, Durchführung und Auswertung

Die Genexpressionsanalysen wurde von Dr. Michael Alexander (LIFE & BRAIN Center, Department of Genomics, Bonn) durchgeführt. Es sollten Unterschiede in der Genexpression, die auf LPC Behandlung von MV3 Melanomzellen beruhen, detektiert werden. Folgende Ansätze wurden untersucht (s. Tabelle 3.6).

Tabelle 3.6: Ansätze die mittels Genexpressionsanalyse untersucht wurden

50.000	50.000	50.000	50.000	50.000	50.000	50.000	50.000	50.000
MV3	MV3	MV3	MV3	MV3	MV3	MV3	MV3	MV3
wo	wo	wo	300 µM	300 µM	300 µM	450 µM	450 µM	450 µM
3 Tage	3 Tage	3 Tage	LPC	LPC	LPC	LPC	LPC	LPC
			3 Tage	3 Tage	3 Tage	3 Tage	3 Tage	3 Tage
20.000	20.000	20.000	20.000	20.000	20.000	20.000	20.000	20.000
MV3	MV3	MV3	MV3	MV3	MV3	MV3	MV3	MV3
wo	wo	wo	300 µM	300 µM	300 µM	450 µM	450 µM	450 µM
6 Tage	6 Tage	6 Tage	LPC	LPC	LPC	LPC	LPC	LPC
			6 Tage	6 Tage	6 Tage	6 Tage	6 Tage	6 Tage

Die angegebenen Zellzahlen wurden in 6-Well-Platten ausgesät und mit entsprechenden LPC Konzentrationen versetzt. Nach drei bzw. sechs Tagen Inkubationszeit wurde das Medium von den Zellen entfernt und die Zellen mit 300 µL RLT Puffer, versetzt mit 1 % β -Mercaptoethanol pro Well, lysiert. Die Lysate wurden unter RNase freien Bedingungen in Reagiergefäße überführt und bei -80 °C gelagert. Die komplette RNA wurde mithilfe des „RNeasy MicroElute spin column Kit“ nach Anleitung des Herstellers isoliert. Die RNA

Qualität wurde mithilfe des „Agilent 2100 BioAnalyzers“ unter Benutzung eines „RNA 6000 Nano Chips“ nach Vorgaben des Herstellers kontrolliert.

Quantifiziert wurde die RNA mit einem NanoDrop[®] ND-1000A UV-Vis Photometer unter Verwendung von jeweils 1,5 µL Probenvolumen. Unter Einbeziehung von Qualitätsmerkmalen wurden 500 ng RNA in Biotin-gelabelte cRNA unter Verwendung des „Illumina[®] TotalPep[™]-96 RNA Amplification Kits“ nach Angaben des Herstellers umgeschrieben. Als Resultat ergab sich zunächst einsträngige cDNA, die anschließend zu dsDNA ergänzt wurde. Nach Aufreinigung erfolgte die Umschreibung in Biotin-gelabelte cRNA. Nach erneuter Aufreinigung und Quantifizierung wurde die gelabelte cRNA in den Mikrochips (Illumina[®] HumanHT-12 Expression BeadChip) nach Anweisung des Herstellers für 16-20 Std. inkubiert. In dieser Zeit hybridisierte die cRNA an die komplementären beadfixierten Sonden. Über 48.000 Sonden kodieren für mehr als 25.000 Gene. Nach Zugabe von Wasch- und Blockierpuffern wurden die Mikrochips in einer Streptavidin-gelabelten Cy3 Farbstofflösung inkubiert. Hier fand die Markierung der an den Chip hybridisierten cRNA statt. Nach weiteren Waschschritten wurden die Mikrochips mit dem „Illumina[®] iScan“ Scanner ausgelesen. Mit der „BeadStudio/GenomeStudio“ Software wurde die Qualität der entwickelten Chips anhand von vier Kriterien gemäß dem Benutzerhandbuch überprüft. Nach abschließender Normalisierung der Daten konnte die Expression des gesamten Transkriptoms von LPC behandelten und unbehandelten MV3 Zellen verglichen werden. Zur Veranschaulichung der durchgeführten Schritte siehe Abbildung 3.7.

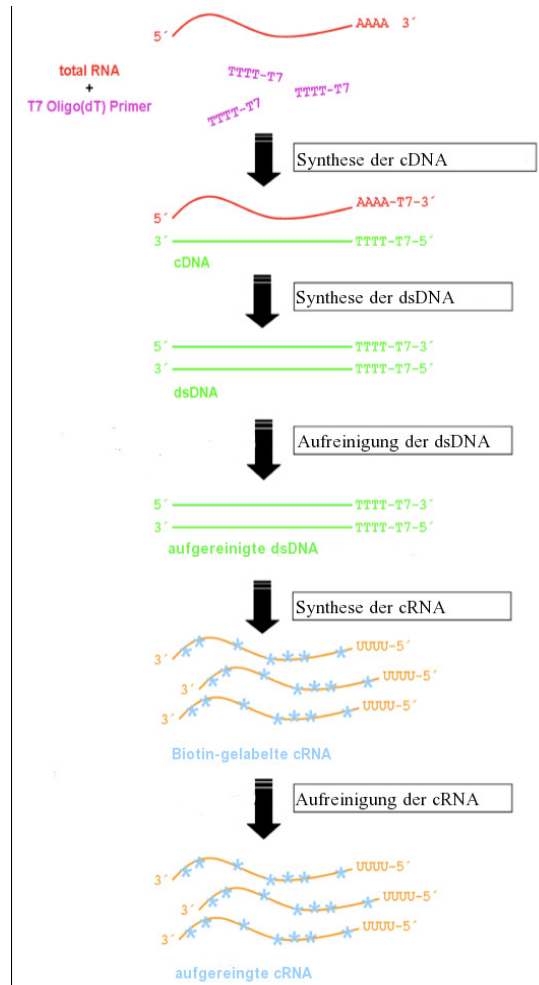


Abbildung 3.7: Prinzip der Genexpressionsanalyse schematisch dargestellt (modifiziert nach M. Alexander).

3.15 Tierexperimentelle Simulation der hämatogenen Metastasierung

3.15.1 Durchführung der Experimente und Auswertung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die antimetastatischen Wirkungen von Heparin bzw. Heparinderivaten und von LPC in Mausmodellen untersucht. Alle Tierversuche wurden entsprechend dem deutschen Tierschutzgesetz und nach Zustimmung der zuständigen Behörden durchgeführt.

Die Untersuchungen der Heparinderivate wurden von der „Epo GmbH“ im Max-Delbrück-Center für Molekulare Medizin in Berlin durchgeführt. Dazu wurden weiblichen Nacktmäusen (erworben von Taconic Europe, Dänemark), die unter keimarmen Bedingungen gehalten wurden, 1×10^6 MV3 Melanomzellen in 0,4 mL PBS gelöst, in die Schwanzvene injiziert. Je nach Versuch wurden die MV3 Zellen vorher mit 5 μ g Natalizumab (Antikörper

gegen VLA-4) inkubiert, oder der Antikörper wurde nach Tumorzellinjektion gespritzt (10 mg/kg Körpergewicht). Auch wurden verschiedene Heparinderivate zu verschiedenen Zeitpunkten appliziert. Nach 31 Tagen wurde die Metastasenzahl in der Lunge der Mäuse durch Auszählen ermittelt.

Die Untersuchungen der LPC Wirkung auf Tumorzellen wurde an C57Bl/6N Mäusen (Charles River Laboratories, Sulzfeld) im Institut für Tumorbiologie der Universität Freiburg durchgeführt. Hier wurden B16F10 Melanomzellen (transfiziert mit Luciferase), vorinkubiert mit 300 μ M LPC für 2 Tage oder mit 450 μ M LPC für 10 Tage, in die Schwanzvenen der Mäuse injiziert. Neben der LPC Wirkung wurde zusätzlich die Kombination mit unfraktioniertem Heparin (50 IU) untersucht. Nach 14 Tagen wurden die Mäuse euthanasiert und die Lungenhomogenate mithilfe eines Luciferase Assays hinsichtlich ihrer Metastasen analysiert.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Bestimmung der Interaktion zwischen Heparinderivaten und VLA-4

4.1.1 Charakterisierung der Melanomzelllinie MV3 hinsichtlich metastasierungsrelevanter Adhäsionsrezeptoren und deren Liganden

4.1.1.1 Durchflusszytometrische Bestimmung des Integrins VLA-4 und der P- und L-Selektin-Liganden auf MV3 Melanomzellen

Wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben, spielen Adhäsionsrezeptoren im Prozess der hämatogenen Metastasierung eine entscheidende Rolle. Es konnte bereits in Vorarbeiten gezeigt werden, dass Heparin an das metastasierungsrelevante Integrin VLA-4 auf murinen B16F10 Melanomzellen bindet und es funktionell inhibiert.

Um weitere Einblicke in diese erstmals beschriebene Wechselwirkung von Heparin und VLA-4 zu erlangen und dies auch auf das humane VLA-4 zu übertragen, sollen Struktur-Wirkungs-Beziehungen mittels verschiedener Heparinderivate unter Verwendung der humanen Melanomzelllinie MV3 hergeleitet werden. Primär ist dafür die genaue Kenntnis der von MV3 Melanomzellen exprimierten Adhäsionsrezeptoren wichtig. Die Charakterisierung der MV3 Zellen wurde durchflusszytometrisch mit Antikörpern und rekombinanten Adhäsionsrezeptoren auf Proteinebene durchgeführt, wie in Abbildung 4.1 detailliert erläutert. Es wurde die Expression des Integrins VLA-4 und die Existenz von P- und L-Selektin-Liganden nachgewiesen. Dies ist anhand der Rechtsverschiebungen der Kurven zu höheren Fluoreszenzintensitäten im Vergleich zu den Kontrollansätzen eindeutig erkennbar.

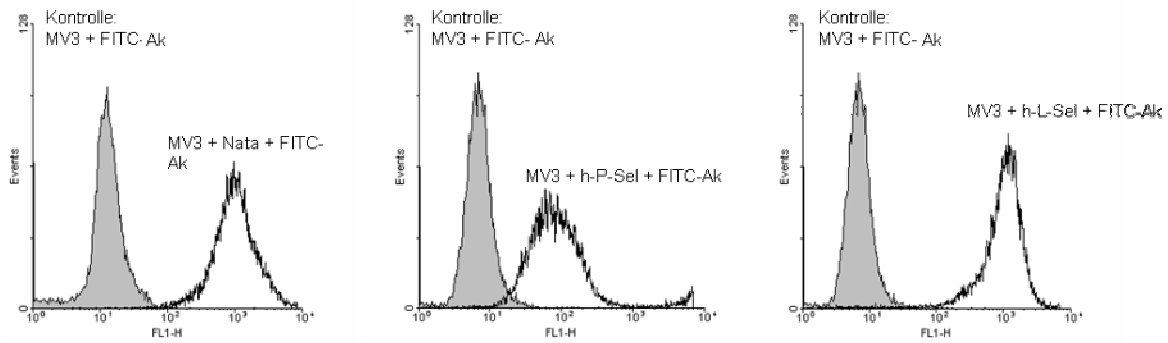


Abbildung 4.1: Durchflusszytometrischer Nachweis der VLA-4, P- und L-Selektin-Ligand-Expression auf MV3 Melanomzellen. Durch Verwendung des Antikörpers Natalizumab (Nata) gegen VLA-4 und rekombinanten P- und L-Selektin-Fc-Chimeren und FITC gelabelten, sekundären Antikörpern gegen Fc-Teile konnte die Expression der jeweiligen Moleküle gezeigt werden. Als Kontrolle dienten MV3 Zellen, die nur mit FITC gelabeltem Antikörper inkubiert wurden.

4.1.1.2 Bestimmung der Interaktion von Thrombozyten mit MV3 Melanomzellen

Die Ummantelung von Tumorzellen mit Thrombozyten nach Eintritt einer Tumorzelle in den Blutkreislauf besitzt eine zentrale Rolle im metastatischen Geschehen. Da, wie im vorherigen Abschnitt gezeigt werden konnte, MV3 Melanomzellen P-Selektin-Liganden exprimieren, wurde überprüft, ob auch eine Interaktion mit Thrombozyten erfolgt und welche Adhäsionsrezeptoren an diesem Prozess beteiligt sind. Dazu wurden FITC-markierte Thrombozyten auf konfluente MV3 Zellschichten gegeben und die Thrombozyten in einigen Ansätzen durch Zugabe von PAR-Rezeptoragonisten zur verstärkten P-Selektin-Expression stimuliert.

Nach Zugabe von Heparin in verschiedenen Mengen, P-Selektin-Antikörper bzw. Isotyp-Antikörper ohne spezifisches Target auf den Zellen wurde die Zahl der Thrombozyten in repräsentativen Bildausschnitten nach kurzem Schütteln und Abwaschen der nicht-adhärenen Thrombozyten bestimmt. Dabei zeigte sich eine Adhäsion, die durch Zugabe von PAR-Rezeptoragonisten gesteigert und durch Antikörper gegen P-Selektin verringert werden konnte. Der Isotyp Antikörper hatte keinen Effekt. Unfraktioniertes Heparin konnte die Interaktion bereits bei der kleinsten Menge (50 µg) signifikant verringern (s. Abbildung 4.2).

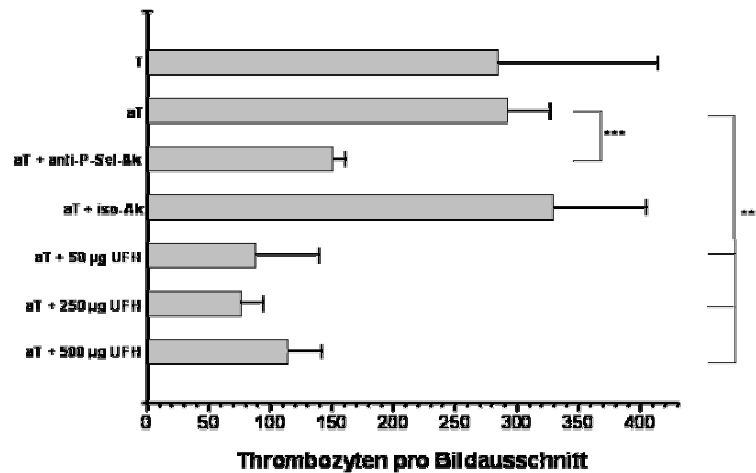


Abbildung 4.2: Interaktion von MV3 Melanomzellen mit Thrombozyten. PAR-Rezeptoragonisten verstärken die Bindung durch Aktivierung der Thrombozyten (aT), wohingegen P-Selektin-Antikörper (anti-P-Sel-Ak) die Bindung verringern, ebenso wie bestimmte Mengen an unfraktioniertem Heparin (UFH). Ein Isotyp-Antikörper (Iso-Ak) hat keinen Einfluss auf die Bindung.

4.1.1.3 Untersuchung der Zelladhäsion an P-Selektin unter physiologischen Flussbedingungen

Die Interaktion der MV3 Zellen mit immobilisiertem P-Selektin wurde unter physiologischen Flussbedingungen untersucht, um eine mögliche Bindung der MV3 Melanomzellen mit endotheliale P-Selektin als möglichen Schritt der Metastasierungskaskade zu simulieren. Zu diesem Zweck wurden die rekombinanten P-Selektin-Fc-Chimeren mit Cyanurchlorid auf Glasplättchen fixiert, und die in PBS Puffer+ suspendierten Zellen auf die Glasplättchen gegeben. Nach einer kurzen Sedimentations- und Interaktionsphase zwischen P-Selektin und MV3 Zellen wurde der Fluss gestartet und die adhärenierenden Zellen mithilfe eines Programms quantifiziert.

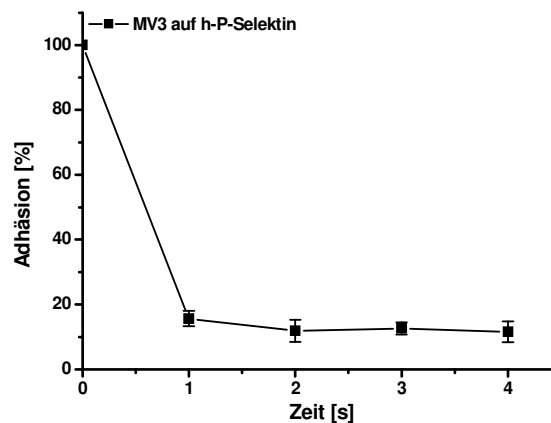


Abbildung 4.3: Interaktion von MV3 Melanomzellen mit P-Selektin. 90 % der Zellen werden schon nach 1 s nach Starten des Flusses abgerissen.

In der ersten Sekunde nach Beginn des Durchflusses wurden bereits 90 % der MV3 Melanomzellen von der immobilisierten P-Selektin Schicht abgerissen (s. Abbildung 4.3). Auch war kein typisches P-Selektin-vermitteltes Rollen zu verzeichnen. Es ist daher anzunehmen, dass endotheliales P-Selektin keinen Einfluss auf das Metastasierungsverhalten der MV3 Melanomzellen ausübt. Daraus kann weiterhin geschlossen werden, dass die vorhandenen P-Selektin-Liganden offensichtlich von geringerer Bindungsaffinität gegenüber dem Standardliganden PSGL-1 geprägt sind oder sterisch beeinflusst die Bindungskinetik für ein Zellrollen nicht erfüllen. Auch könnte eine zu geringe Anzahl an PSGL-1 basierten Liganden für das ausbleibende Zellrollen ursächlich sein.

4.1.1.4 Bestimmung der VLA-4/VCAM-1-vermittelten Zelladhäsion unter physiologischen Flussbedingungen und deren siRNA-vermittelte Herabregulation

Zur Bestimmung der VLA-4/VCAM-1-Interaktion unter physiologischen Flussbedingungen wurde rekombinantes VCAM-1 auf Glasplättchen immobilisiert. Nach Zugabe der Zellen und kurzer Sedimentationsphase wurde die Adhäsion nach Starten des Flusses gemessen. Ziel war es, die Adhäsionsfähigkeit von unstimulierten und mit Mn^{2+} in ihrer Integrinfunktion stimulierten MV3 Zellen gegenüberzustellen. Durch den Einsatz von siRNA sollte weiterhin die Expression von VLA-4 unterdrückt bzw. vermindert werden. Infolgedessen sollte gezeigt werden, dass die Bindung der MV3 Melanomzellen VLA-4-vermittelt ist und nicht durch andere VCAM-1-erkennende Integrine wie z. B. $\alpha_4\beta_7$, $\alpha_D\beta_2$ und $\alpha_M\beta_2$, resultiert²⁸⁷.

In durchflusszytometrischen Voruntersuchungen wurden mittels FITC-gelabelter siRNA die optimale Zellzahl, die optimale Konzentration des Transfektionsreagenz und der siRNA ermittelt. Sowohl mit siRNA, die gegen die mRNA von VLA-4 gerichtet ist als auch mit Kontroll-siRNA wurde die Abhängigkeit der VLA-4-Expression von der Inkubationsdauer bestimmt. Als optimal erwies sich eine Inkubationszeit von 72 Std., exemplarisch ist das Ergebnis der VLA-4-Expression nach diesem Zeitpunkt in Abbildung 4.4 dargestellt. Eine deutlich verminderte Fluoreszenzintensität, die für eine geringere VLA-4-Expression spricht, war bei den siRNA (gegen VLA-4) behandelten MV3 Zellen zu verzeichnen. Die Kontroll-siRNA hatte nur einen marginalen Einfluss auf die Expression, die Fluoreszenzintensitäten waren höher als für unbehandelte MV3 Zellen.

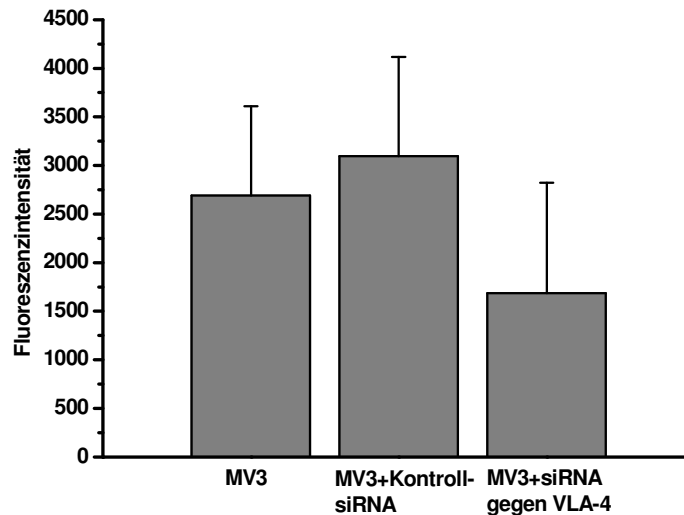


Abbildung 4.4: Durchflusszytometrische Bestimmung der VLA-4-Expression 72 Std. nach siRNA Zugabe. Eine verminderte Expression ist detektierbar.

Bei den anschließend durchgeführten Adhäsionsuntersuchungen zeigte sich, dass durch den Einsatz von Mn^{2+} -Ionen eine Verstärkung der Adhäsion durch Affinitäts- als auch durch Aviditätserhöhung des VLA-4 zu verzeichnen war (s. Abbildung 4.5). Der Einsatz von siRNA - gerichtet gegen VLA-4 mRNA - hatte eine starke Verminderung der Adhäsion der MV3 Zellen unter das Niveau der nicht aktivierten Zellen zur Folge, was eindrucksvoll die Dominanz des VLA-4 für die Bindungsfähigkeit der MV3 Zellen in diesem Assay unter Beweis stellt. Die mit Kontroll-siRNA behandelten MV3 Zellen zeigten zwar auch eine geringfügig verminderte Adhäsionsfähigkeit, die sich jedoch nicht signifikant von den unbehandelten Mn^{2+} stimulierten MV3 Melanomzellen unterschied.

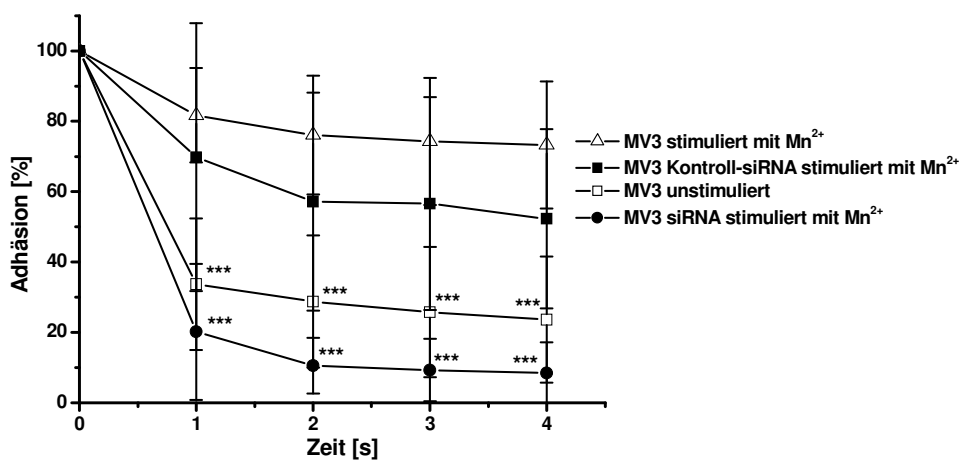


Abbildung 4.5: Einfluss von Mn^{2+} Stimulation und siRNA Behandlung auf die Zelladhäsion an VCAM-1. Mn^{2+} Stimulation erhöhte die Zahl adhärrierender Zellen, während siRNA sie signifikant verminderte.

4.1.2 Die Inhibitionswirkung von strukturell modifizierten Heparinderivaten auf die VLA-4-vermittelte Zelladhäsion von MV3 Zellen unter physiologischen Flussbedingungen

4.1.2.1 Charakterisierung des Adhäsionsverhaltens von MV3 Melanomzellen an HUVEC unter physiologischen Flussbedingungen

Um den Beitrag der VLA-4/VCAM-1-Wechselwirkung an der Melanomzelladhäsion an vaskulären Endothel zu charakterisieren und damit die Relevanz einer VLA-4 Inhibition für antimetastatische Prinzipien zu untersuchen, wurden MV3 Bindungsexperimente an (HUVEC) Endothelzellen durchgeführt. Dabei wurde die HUVEC 4 Std. vor Versuchsbeginn mit TNF- α (10 $\mu\text{g/ml}$) stimuliert. Dadurch wurde eine Expression von Adhäsionsrezeptoren bzw. deren Liganden auf der Endotheloberfläche forciert. Zur Inhibierung der Adhäsion kamen Antikörper gegen P-Selektin und VLA-4, fraktioniertes und unfraktioniertes Heparin sowie das synthetisch hergestellte Pentasaccharid Fondaparinux zum Einsatz.

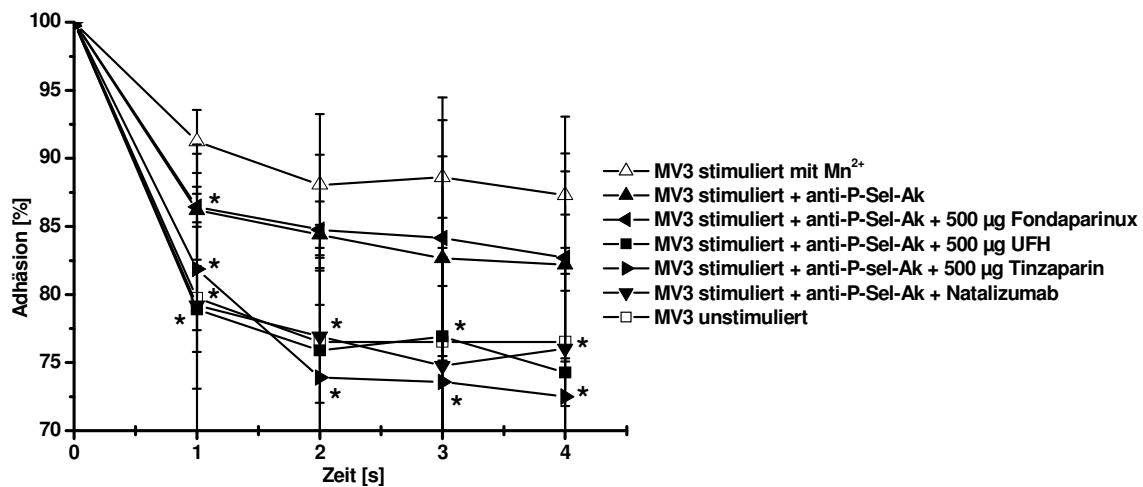


Abbildung 4.6: Interaktion zwischen MV3 Melanomzellen und HUVEC Endothelzellen unter physiologischen Flussbedingungen. Durch den Einsatz von Antikörpern und Heparin lässt sich die Adhäsion vermindern. Fondaparinux zeigte keinen Effekt.

Die Interaktion zwischen Mn^{2+} stimulierten MV3 Melanomzellen und HUVEC Endothelzellen ist nur teilweise P-Selektin-vermittelt, was sich durch den Einsatz von 10 μg Antikörper gegen P-Selektin zeigen ließ (s. Abbildung 4.6). Eine Kombination aus 10 μg P-Selektin-Antikörper und 5 μg Natalizumab (blockierender Antikörper gegen die α_4 -Untereinheit des Integrins VLA-4) reduzierte die Adhäsion auf das Niveau unstimulierter MV3 Zellen. Dies verdeutlicht die Involvierung des Integrins VLA-4 für die MV3-HUVEC-Interaktion. Eine Kombination des P-Selektin-Antikörpers (10 μg) mit 500 μg

unfraktioniertem bzw. fraktioniertem Heparin (Tinzaparin) führte ebenfalls zu einer Reduktion der Adhäsion auf das Niveau unstimulierter MV3 Zellen. Diese Reduktion der Adhäsion war signifikant verschieden von der Adhäsion Mn^{2+} stimulierter MV3 Melanomzellen und lässt den Schluss zu, dass Heparin und Natalizumab mit VLA-4 die gleiche Zielstruktur inhibieren. Interessanterweise zeigt Fondaparinux keinerlei inhibitorische Wirksamkeit. Zur Bestimmung des Einflusses verschiedener anderer Heparinderivate auf die VLA-4/VCAM-1-Interaktion wurden in den folgenden Untersuchungen statt HUVEC wiederum VCAM-1-Fc-Chimeren auf Glasplättchen immobilisiert, um eine isolierte Betrachtung der Wechselwirkung zu ermöglichen.

4.1.2.2 Beeinflussung des VLA-4/VCAM-1-Bindungsweges durch unfraktioniertes und fraktioniertes Heparin und Antikörper

Da in der klinischen Praxis zur Thromboseprävention bei Krebserkrankungen vor allem fraktioniertes Heparin eingesetzt wird, wurden zuerst die fraktionierten Heparine Tinzaparin und Enoxaparin auf ihre inhibitorischen Kapazitäten der VLA-4/VCAM-1-Wechselwirkungen hin untersucht und mit unfraktioniertem Heparin verglichen. Zu Kontrollzwecken wurde auch der Antikörper Natalizumab in die Untersuchung mit einbezogen. Wie in Abbildung 4.7 ersichtlich, reduzierten sowohl 500 μ g Enoxaparin als auch Tinzaparin die Adhäsion der stimulierten MV3 Zellen an VCAM-1 auf das Maß unstimulierter Zellen. Das gleiche Bild ergab sich für 5 μ g Natalizumab. Das unfraktionierte Heparin verminderte die Adhäsion der MV3 Zellen sogar noch unter das Niveau von unstimulierten Zellen und hat daher offenbar eine stärkere inhibitorische Potenz, die sich u. U. auch auf die Restaktivität der nicht stimulierten Zellen richtet.

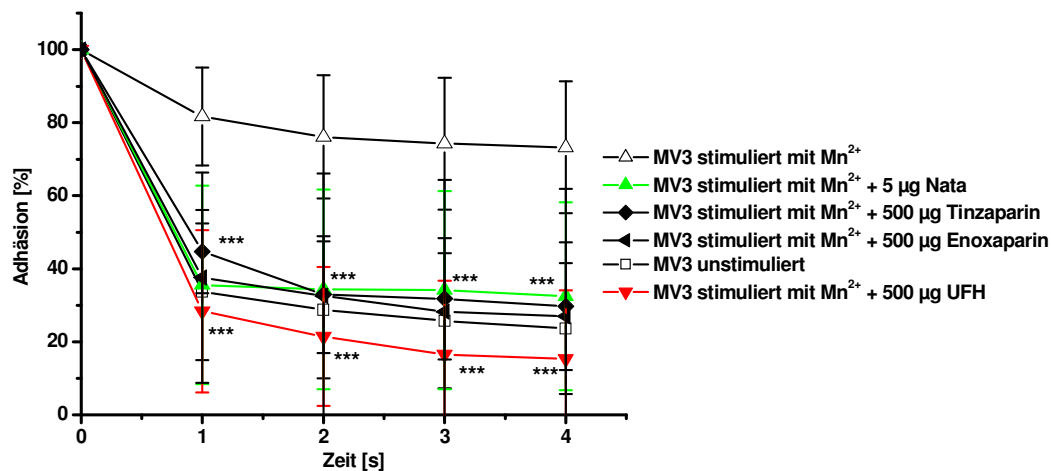


Abbildung 4.7: Inhibition der VLA-4/VCAM-1-Wechselwirkung durch fraktionierte und unfraktionierte Heparine und den Antikörper Natalizumab. Unfraktioniertes Heparin hat vergleichsweise eine höhere inhibitorische Potenz als fraktioniertes Heparin. Die Signifikanzangaben beziehen sich auf den Vergleich mit stimulierten MV3 Melanomzellen.

4.1.2.3 Beeinflussung des VLA-4/VCAM-1-Bindungsweges durch Heparinderivate definierter Größe

Die Befunde, dass unfraktioniertes Heparin eine stärkere Inhibition des VLA-4/VCAM-1-Bindungsweges als fraktioniertes Heparin verursachte, deuten einen Einfluss der Heparingröße auf diese Aktivität an. Deshalb wurden nun Heparinderivate mit definierten Kettenlängen verwendet. Diese, sowie auch die anderen hier verwendeten nicht antikoagulativen Derivate des Heparins, wurden von Frau Dr. Naggi aus dem Institut „G. Ronzoni“ in Mailand zur Verfügung gestellt. Die Derivate mit verschiedenen Kettenlängen wurden aus Tinzaparin isoliert. Wie in Abbildung 4.8 zu erkennen, hatten Derivate mit Kettenlängen von 8 bis 12 Saccharideinheiten kein inhibitorisches Potential auf die VLA-4-vermittelte Bindung der MV3 Melanomzellen. Auch das Pentasaccharid Fondaparinux vermochte die Bindung der MV3 Zellen nicht zu inhibieren. Hier bestätigten und erklärten sich die in Kapitel 4.1.2.1 erhaltenen Ergebnisse. Erst Derivate mit Kettenlängen von 14 bis 18 Saccharideinheiten zeigten ein geringes inhibitorisches Potential. Diese Kettenlängen scheinen also einen Schwellenwert für eine effektive Inhibition darzustellen. Für die Inhibition von P- und L-Selektin genügen hingegen bereits Heparinderivate mit einer Kettenlänge von mindestens vier Monosaccharideinheiten¹⁶⁵.

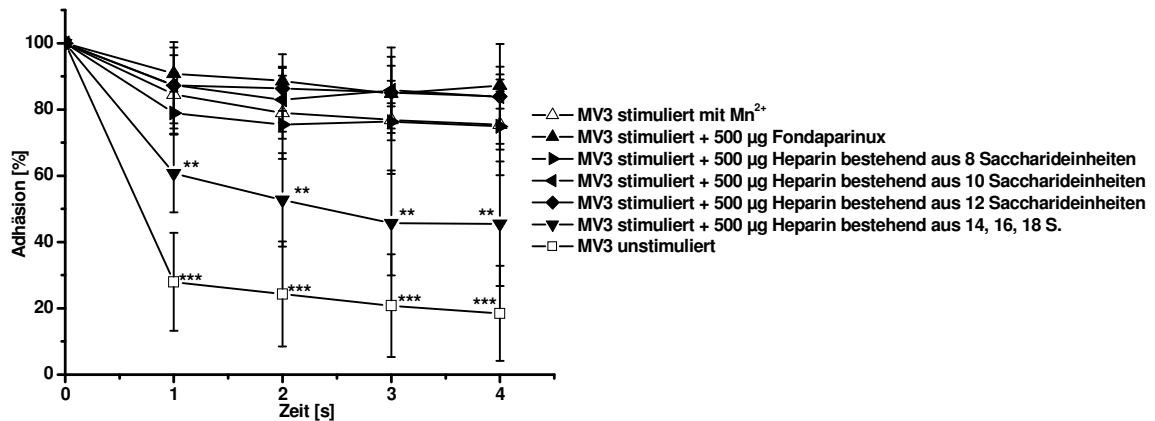


Abbildung 4.8: Einfluss der Kettenlänge auf die VLA-4/VCAM-1-Wechselwirkung. Erst Derivate mit einer Kettenlänge von 14-18 Saccharideinheiten vermochten die Adhäsion der MV3 Melanomzellen zu minimieren.

4.1.2.4 Beeinflussung des VLA-4/VCAM-1-Bindungsweges durch strukturell modifizierte Heparinderivate

Neben der Charakterisierung des Einflusses der Molekülgröße des Heparins auf die VLA-4/VCAM-1-Wechselwirkung wurden auch andere strukturell modifizierte Heparinderivate untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass unfraktioniertes Heparin, das an der Aminogruppe des Glucosamins acetyliert ist, kein inhibitorisches Potential entfaltet. Dies zeigte sich sowohl für 50 % acetylierte als auch für 100 % acetylierte Derivate (s. Abbildung 4.9). Diese Befunde stehen in einem interessanten Gegensatz zu bisherigen Erkenntnissen an Selektinen, da das zu 50 % acetylierte Derivat eine höhere inhibitorische Kapazität an P-Selektin als natives Heparin zeigte. Das zu 100 % acetylierte Heparin hingegen verliert seine Wirkung sowohl an P- als auch an L-Selektin¹⁶¹.

Auch wurde ein RO-Heparin Derivat (reduced oxyheparin), das zwischen der C₂-C₃-Kohlenstoffbindung im Saccharidgrundgerüst oxidativ gespalten ist, getestet. Durch diese offenkettige Form ist die Saccharidkette flexibler, was sich bei der Inhibition von P-Selektin in einem gesteigerten inhibitorischen Potential niederschlägt. Die VLA-4/VCAM-1-Wechselwirkung wurde zwar auch inhibiert, führte allerdings nicht zu demselben Ausmaß des unfraktionierten Heparins.

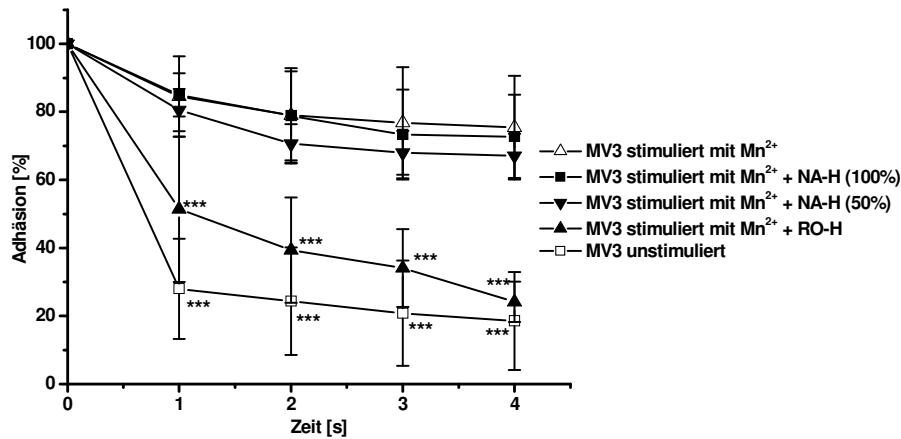


Abbildung 4.9: Einfluss von N-aceyliertem und RO-Heparin auf die Adhäsion von MV3 Melanomzellen. RO-Heparin konnte die Adhäsion minimieren, was N-acetylierte Derivate nicht vermochten. Für die Untersuchungen wurden jeweils 500 µg der jeweiligen Derivate verwendet.

Neben den hier beschriebenen Variationen am HeparinGrundgerüst wurden auch desulfatierte Derivate untersucht. Dabei kamen Verbindungen zum Einsatz, die in Position C₆ des SaccharidGrundgerüsts zu verschiedenen Graden desulfatiert waren (s. Abbildung 4.10). Eine 50 %ige Desulfatierung zeigte die gleiche inhibitorische Kapazität wie unfraktioniertes Heparin.

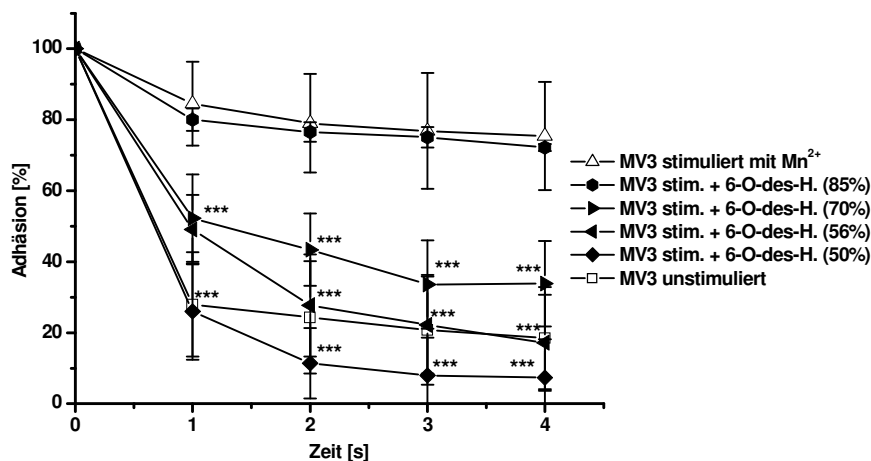


Abbildung 4.10: Einfluss der Desulfatierung in Position 6 des HeparinGrundgerüsts auf die Adhäsion von MV3 Melanomzellen unter Flussbedingungen. Mit steigender Desulfatierung in Position 6 nahm die inhibitorische Kapazität ab. Eingesetzt wurden jeweils 500 µg des entsprechenden Heparins.

Hingegen nahm mit steigendem Grad der Desulfatierung die Inhibitionsfähigkeit ab. Moleküle, die zu 56 % desulfatiert waren, reduzierten die Adhäsion auf das Niveau unstimulierter Zellen, wohingegen 85 % desulfatiertes Heparin keinen inhibitorischen Effekt mehr ausübte. Somit ist ein bestimmter Grad an Desulfatierung in Position 6 also tolerabel,

was mit der Inhibition von P-Selektin kongruent ist. Eine Desulfatierung auf 42 % in Position 6 verbessert die P-Selektin Inhibitionsfähigkeit sogar geringfügig, wohingegen die L-Selektin Inhibition verringert ist. Komplett desulfatiertes Heparin vermag weder P- noch L-Selektin zu inhibieren^{161,169,168}.

Heparinderivate, die in Position 2 zu verschiedenen Ausmaßen desulfatiert waren, konnten die VLA-4/VCAM-1-Wechselwirkung kaum inhibieren (s. Abbildung 4.11). Hier hatte der Grad der Desulfatierung keinen oder nur einen äußerst geringen Einfluss auf das Inhibitionspotential. Auch sind diese Derivate nicht in der Lage, eine P- und L-Selektin Inhibition zu vermitteln¹⁶¹.

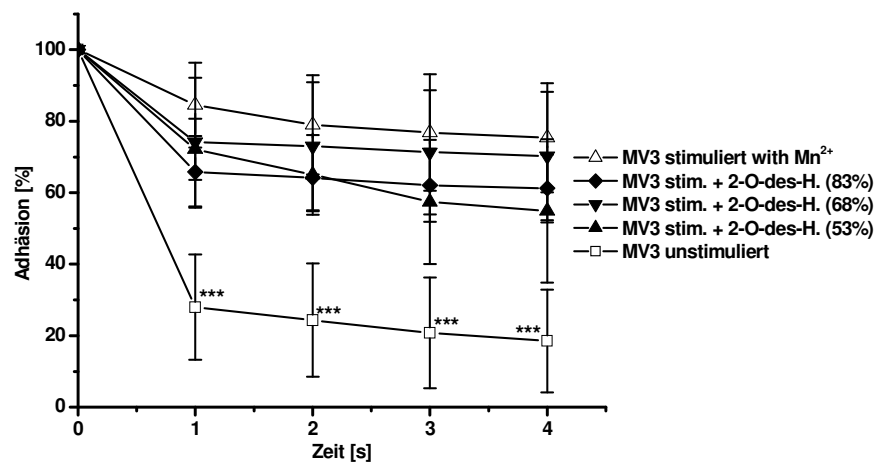


Abbildung 4.11: Einfluss der Desulfatierung in Position 2 des HeparinGrundgerüsts auf die Adhäsion von MV3 Melanomzellen. Schon ein zu 50 % desulfatiertes Derivat vermag die VLA-4/VCAM-1-Wechselwirkung nur noch bedingt zu inhibieren.

4.1.2.5 Charakterisierung der Heparin Bindungsstelle am VLA-4

Die Bindung von Heparin an murines VLA-4 und wie hier bestätigt auch humanes VLA-4 wurde erstmals von unserer Arbeitsgruppe beschrieben, weitergehende Informationen über die Bindungsstelle des Heparins am Integrin sind deswegen nicht vorhanden. Da Heparinbindungen an anderen Integrinen nur vereinzelt in der Literatur berichtet wurden, lassen sich daraus keine verallgemeinernden Schlussfolgerungen ziehen. Daher sollte die Heparin Bindungsstelle in ersten Versuchen grob charakterisiert werden. Dazu wurden Antikörper gegen die α -Untereinheit (Natalizumab) und gegen die β -Untereinheit (anti-CD29) auf Glasplättchen immobilisiert, die dann zu Zelladhäsionsversuchen herangezogen wurden. Bei den Versuchen wurden jeweils 500 μ g unfraktioniertes Heparin zugegeben. Liegt die

Heparinbindungsstelle auf der α - bzw. der β -Untereinheit des Integrins, so sollte das gebundene Heparin die Bindung der Zelle an den α - bzw. den β -Antikörper inhibieren.

Wie in Abbildung 4.12 ersichtlich, bindet Heparin vornehmlich an die α -Untereinheit, da die Adhäsion eine Sekunde nach Starten des Flusses um 80 % reduziert ist im Vergleich zu Versuchsansätzen, bei denen kein Heparin verwendet wurde. Bei Versuchen mit Antikörpern gegen die β -Untereinheit wurde die Adhäsion im gleichen Zeitraum nur um 25 % reduziert. Dies sind erste Anhaltspunkte, die für eine dominante Bindung des Heparins an die α -Untereinheit sprechen. Allerdings sind die genauen Bindungsstellen der Antikörper nicht bekannt. So ist beispielsweise denkbar, dass der Antikörper gegen die β -Untereinheit und Heparin an räumlich verschiedenen Stellen der β -Untereinheit binden und nicht um eine Bindungsstelle konkurrieren. Hier bedarf es weiterführender Untersuchungen, die aber durch das Fehlen von Röntgenstrukturanalysen oder der Nichtzugänglichkeit des VLA-4 für strukturaufklärende NMR-Untersuchungen schwierig erscheinen.

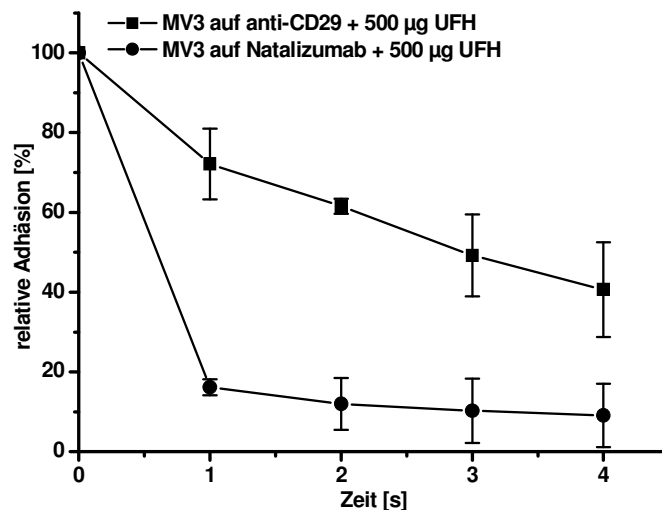


Abbildung 4.12: Adhäsionsuntersuchungen von MV3 Melanomzellen an Antikörpern gegen die α - und β -Untereinheit (anti-CD29 und Natalizumab) unter physiologischen Flussbedingungen zur näheren Charakterisierung der Heparinbindungsstelle. Heparin bindet anscheinend eher an die α -Untereinheit, da die Adhäsion stärker reduziert war als bei Versuchen mit Antikörpern gegen die β -Untereinheit.

4.1.3 Untersuchung der Relevanz der VLA-4/VCAM-1-Interaktion in einem Mausmodell mit modifizierten Heparinderivaten

Die Rolle von Adhäsionsrezeptoren im metastatischen Geschehen gilt als gesichert und konnte für die Klasse der Selektine in vielen in vivo Modellen nachgewiesen werden. Das Integrin VLA-4 hingegen wurde bisher nur unzureichend unter diesem Aspekt untersucht. Daher wurde in einem ersten Mausversuch die Rolle des VLA-4 auf MV3 Melanomzellen im Prozess der hämatogenen Metastasierung evaluiert. Diese Experimente führte Dr. Zeisig am Institut für „Experimentelle Pharmakologie und Onkologie“ in Berlin durch. Nacktmäusen wurden 1×10^6 MV3 Melanomzellen in 0,4 mL PBS Puffer in die Schwanzvene injiziert. Neben der Kontrollgruppe wurde einer Mausgruppe 30 min vor Tumorzellapplikation (10 mg/kg Körpergewicht) Natalizumab injiziert. Die dritte Gruppe erhielt mit 5 μ g Natalizumab präinkubierte MV3 Zellen. Nach 31 Tagen wurden die Mäuse getötet, und die Zahl und Größe der Lungenmetastasen wurde ausgewertet. Dabei konnte für beide Verumgruppen eine signifikante Reduktion der Metastasierung im Vergleich zur Kontrollgruppe verzeichnet werden, wobei die Mäuse, die mit Natalizumab präinkubierte MV3 Zellen injiziert wurden, die geringste Zahl an pulmonalen Metastasen aufwiesen. Dargestellt in Abbildung 4.13 ist der Median der Score Werte der einzelnen Gruppen, berechnet aus Größe und Anzahl der pulmonalen Metastasen.

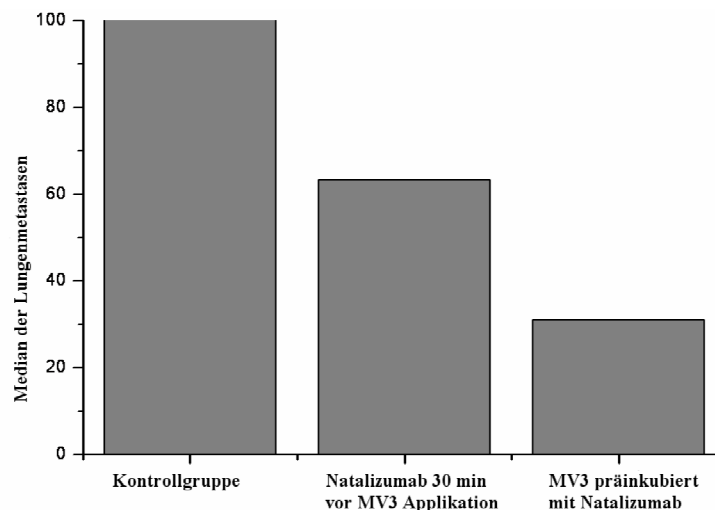


Abbildung 4.13: Median der Score Werte der Lungenmetastasen. MV3 Zellen, die mit Natalizumab präinkubiert wurden, wiesen die geringste Zahl an Metastasen in der Lunge auf.

Dieser Versuch zeigte deutlich die Involvierung des VLA-4 im Prozess der hämatogenen Metastasierung der MV3 Melanomzellen und rechtfertigte die weiteren in vivo

Untersuchungen zur Evaluierung der inhibitorischen Wirkung von Heparin. Da das fraktionierte Heparin Enoxaparin einen starken inhibitorischen Einfluss auf die VLA-4/VCAM-1-Interaktion in den in vitro Versuchen ausübte, wurde es einer Mausgruppe 30 min vor Tumorzellinokulation (100 IU) i. v. verabreicht. Wie Läubli et al. zeigen konnte, entfaltet Heparin in der Anfangsphase der Tumorzell dissemination seine antimetastatischen Fähigkeiten vornehmlich über die Inhibition der Tumorzell-Thrombozyten-Assoziation. Erst nach einer Zeit von ca. 12 Std. ist die antimetastatische Wirkung des Heparins auf eine Inhibition von L-Selektin zurückzuführen¹⁶⁷. Die Beteiligung des VLA-4 am metastatischen Geschehen wird wahrscheinlich zu einem ähnlich späten Zeitpunkt wie beim L-Selektin stattfinden, da VLA-4 vornehmlich eine feste Bindung der Tumorzelle bzw. der Mikroembolie an das Gefäßendothel vermitteln wird.

Aus diesem Grund wurde einer Mausgruppe u. a. Enoxaparin (100 IU) erst 14 Std. nach Tumorzellinokulation injiziert. Zur Bestätigung der späten VLA-4-vermittelten Heparinwirkung wurde auch einer weiteren Gruppe Natalizumab (10mg/kg Körpergewicht) 14 Std. nach Tumorzellinokulation appliziert. Um den Selektin-vermittelten antimetastatischen Effekt von dem VLA-4-vermittelten zu trennen, wurde einer weiteren Mausgruppe ein Heparinderivat (150 µg) mit einer definierten Kettenlänge, bestehend aus 12 Monosaccharideinheiten, 30 min vor Tumorzellinokulation appliziert. Dieses Derivat inhibiert nur Selektine in ihrer Funktion und nicht das VLA-4.

Nach Applikation der Zellen starben nur in der Kontrollgruppe innerhalb von 24 Std. zahlreiche Tiere. Auch bei Wiederholung des Versuches tauchte dieses Phänomen auf. Durch mikroskopische Beobachtungen konnte in vitro festgestellt werden, dass die MV3 Zellen stark zur Aggregation neigen, was wahrscheinlich ursächlich für die starke Erhöhung der Mortalität ist. Auf Grund des hohen Verlustes an Mäusen konnte die Kontrollgruppe statistisch nicht in die Auswertung des Versuches mit einbezogen werden. Auch ist ein Vergleich mit der Kontrollgruppe des ersten Experiments aus statistischen Gründen nicht zulässig. Daher musste die Auswertung durch Vergleich der einzelnen Gruppen untereinander erfolgen.

Die Applikation von Enoxaparin 30 min vor Tumorzellgabe zeigte eine Reduktion der Metastasierung im Vergleich zur Applikation 14 Std. nach Tumorzellinokulation um ca. 50 % (s. Abbildung 4.14). Allerdings waren in der Gruppe der späten Heparininjektion nur vier Tiere auswertbar und die Zahl der pulmonalen Metastasen schwankte von 4 bis 21. Die Reduktion der Metastasierung scheint vornehmlich durch die Inhibition von thrombozytärem P-Selektin in der frühen Phase der Tumorzell dissemination bedingt zu sein. Die späte Heparininjektion (14 Std. nach Tumorzellapplikation) hat hierauf keinen Einfluss.

Die Injektion von Natalizumab 14 Std. nach Tumorzellgabe reduzierte die Zahl der Metastasen auf das Maß der frühen Enoxaparininjektion bzw. sogar darunter, schließt man die Maus mit 27 pulmonalen Metastasen aus der Betrachtung aus. Natalizumab scheint effektiv die VLA-4-vermittelte Anhaftung der MV3 Zellen, respektive der Mikrothromben am Gefäßendothel zu unterbinden. Der Unterschied in der Zahl der Metastasen im Vergleich der späten Enoxaparin- und Natalizumabinjektion liegt wahrscheinlich in der höheren Affinität des Natalizumabs zu VLA-4 begründet.

Das kurzkettige Heparin vermittelte eine sehr heterogene Verteilung der Anzahl der Metastasen, denn vier Tiere zeigten nur eine oder gar keine Metastasen, wohingegen zwei Tiere über 20 Metastasen aufwiesen. Der Mittelwert lag bei 7,8 Metastasen pro Tier und damit knapp über dem Niveau der frühen Enoxaparin Injektion. Dieses Derivat wirkte ausschließlich über die Blockade von thrombozytärem P-Selektin.

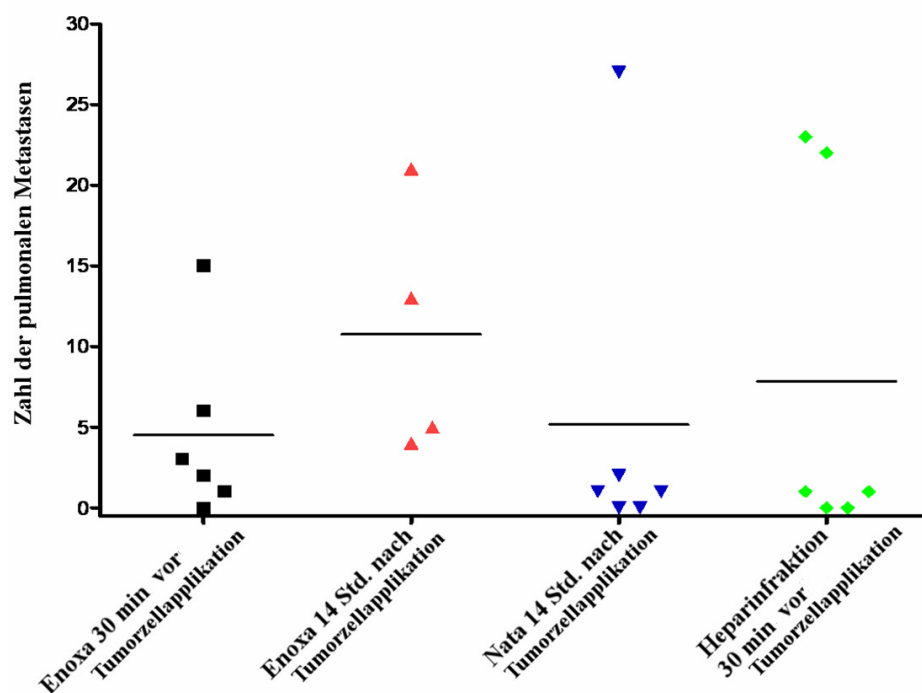


Abbildung 4.14: Anzahl der pulmonalen Metastasen nach Applikation von Enoxaparin (Enoxa), Natalizumab (Nata) und Heparinderivaten bestehend aus 12 Saccharideinheiten. Eine Reduktion der Zahl der Metastasen ist durch frühe Heparinapplikation oder durch späte Natalizumab Injektion zu erreichen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das Integrin VLA-4 einen entscheidenden Adhäsionsrezeptor für die hämatogene Metastasierung der humanen Melanomzelllinie MV3 darstellt. Für die Inhibition durch Heparin konnten in vitro eindeutige Struktur-Wirkungs-Beziehungen ermittelt werden. Dabei unterscheiden sich die strukturellen Voraussetzungen

der Heparinmoleküle für eine VLA-4 Inhibition teilweise deutlich von den Bedingungen für eine Hemmung der Selektine. Weitere in vivo Untersuchungen müssten durchgeführt werden, um die VLA-4 Inhibition durch Heparin in ihrer physiologischen Relevanz beim Prozess der hämatogenen Metastasierung zu untermauern.

Auch ist zukünftig bei Kenntnis der molekularen Adhäsionsfunktionen verschiedener Tumorentitäten ein gezielter antimetastatischer Einsatz von definierten, möglichst nicht antikoagulativ wirksamen Heparinderivaten denkbar.

4.2 Untersuchung des Einflusses von Lysophosphatidylcholin auf das Metastasierungsverhalten verschiedene Krebszelllinien

4.2.1 LPC Metabolismus von B16F10 Melanomzellen

4.2.1.1 Aufnahme von LPC durch B16F10 Melanomzellen

Wie in Kap. 2.4.4 dargelegt, konnten Massing und Mitarbeiter eine antimetastatische Wirkung von leeren Liposomen in einem Pankreastumormodell zeigen. Als molekulare Hypothese wird eine Anreicherung der Liposomen im Tumor durch den EPR-Effekt und eine anschließende Spaltung der liposomalen Phospholipide zu LPC angenommen, das dann in lokal hohen Konzentrationen die Tumorzellen beeinflusst.

In dieser Arbeit sollten Beiträge für die Erklärung der molekularen Mechanismen des LPC in seiner antimetastatischen Wirkung erbracht werden. Durch die bekannte Schlüsselrolle der zellulären Adhäsionsrezeptoren lag hierauf das besondere Augenmerk. Die murine Melanomzelllinie B16F10 fand für diese Untersuchungen Verwendung, da sie ein hohes metastatisches Potential aufweist.

Zunächst wurden die Zellen in Kulturflaschen mit 450 μM LPC versetzt. Dies entspricht einer leicht erhöhten physiologischen Konzentration. Um LPC-vermittelte, zytotoxische Effekte zu vermeiden, wurden 20 mg/mL Bovines Serum Albumin zugesetzt, dies bindet freies LPC reversibel. Neben den B16F10 Zellen wurden auch Luciferase transfizierte B16F10 Zellen in die Untersuchungen eingeschlossen, um zu überprüfen, ob durch die Transfektion ein verändertes Verhalten der Zellen zu beobachten ist. Jeweils nach 24 Std. wurde die LPC Konzentration im Medium enzymatisch bestimmt, dabei ließ die Entstehung eines roten Farbstoffs Rückschlüsse auf die LPC Konzentration zu. Diese Untersuchungen wurden von Dr. Jantschke im Institut für Tumorbologie in Freiburg durchgeführt. Wie in Abbildung 4.15 ersichtlich, nahm die LPC Konzentration in den Kulturflaschen mit B16F10 Zellen innerhalb

von 24 Std. auf die Hälfte der Ausgangskonzentration ab und nach 48 Std. war das LPC quantitativ verbraucht. Die Konzentration im zellfreien Medium blieb hingegen konstant.

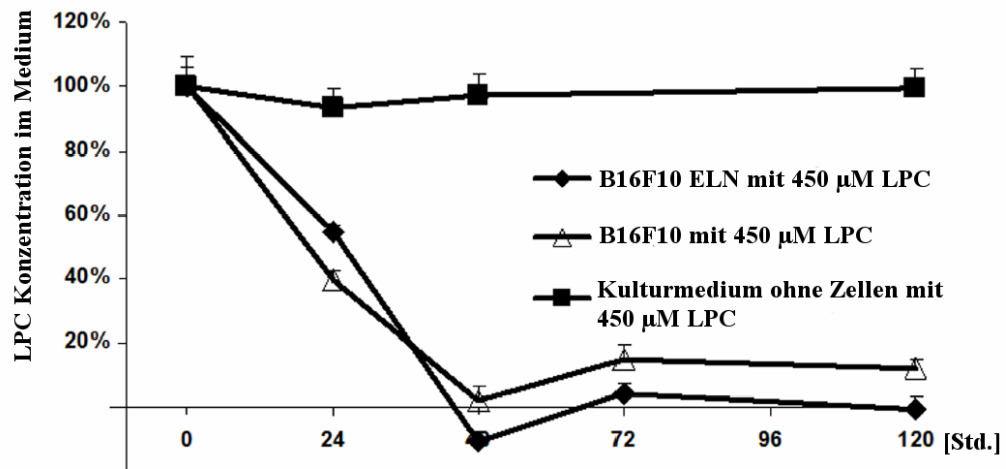


Abbildung 4.15: LPC Konsumierung von B16F10 Melanomzellen. Nach 48 Std. war das LPC quantitativ metabolisiert und aus dem Kulturmedium entfernt.

Auch zeigte sich der Effekt der kompletten Metabolisierung des LPC nach wiederholter LPC Gabe erneut (s. Abbildung 4.16). Innerhalb von 48 Std. wurde das LPC quantitativ aus dem Zellkulturmedium verstoffwechselt.

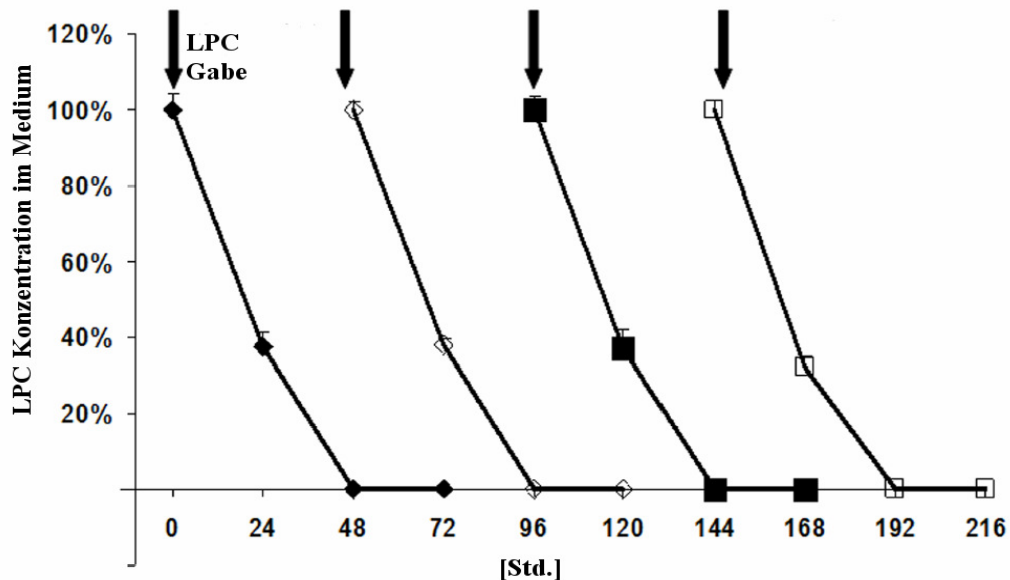


Abbildung 4.16: LPC Metabolismus aus dem Kulturmedium. Auch nach wiederholter LPC Gabe konnte eine komplette Metabolisierung des LPC beobachtet werden.

4.2.1.2 Veränderung der Fettsäurekomposition von B16F10 Melanomzellen

Um zu überprüfen, ob die massive zelluläre Aufnahme von LPC zu einer Veränderung der Zellmembranzusammensetzung führt, wurden gaschromatographische Analysen der Zellmembranen von B16F10 Melanomzellen nach LPC Inkubation durchgeführt. Diese zeigten eine rapide Veränderung der Zusammensetzung der Membranlipide. Dabei wurde eine deutliche Anreicherung der Fettsäureart beobachtet, die an das Glycerocholingrundgerüst des LPC gebunden war. Wie in Abbildung 4.17 dargestellt, war eine Zunahme von Margarinsäure von ca. 5 % zum Zeitpunkt der LPC Zugabe auf ca. 45 % innerhalb von 24 Std. zu beobachten.

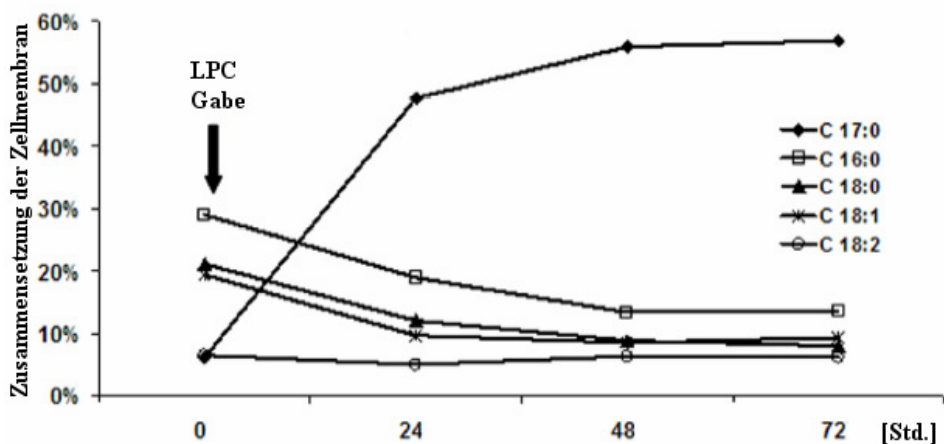


Abbildung 4.17: Veränderung der Membranzusammensetzung von B16F10 Melanomzellen. Nach LPC Inkubation ließ sich ein steigender Anteil an Margarinsäure in der Zellmembran detektieren. Die Menge anderer Fettsäuren ging sukzessive zurück.

Gleichzeitig kam es zur Reduktion der Anteile anderer Fettsäuren in der Zellmembran. So sank die Konzentration an Palmitinsäure von 30 % innerhalb von 48 Std. auf 15 % ab. Auch verringerte sich die Konzentration anderer ungesättigter Fettsäuren wie z. B. der Ölsäure. Nach 48 Std. LPC Inkubation war eine Absättigung der Zellmembran mit ca. 55 % Margarinsäure zu detektieren.

4.2.2 Untersuchung von apoptoserelevanten Proteinen nach LPC Inkubation

Trotz dieser dramatischen Änderung der Zellmembranzusammensetzung konnten keine Einflüsse auf die Viabilität der B16F10 festgestellt werden. Dies wurde durch mehrere Methoden bewiesen. Dr. Jantscheff konnte den Einbau von Bromdesoxyuridin (BrdU) in die DNA der B16F10 Zellen verdeutlichen, was ein Kennzeichen proliferierender Zellen darstellt.

Parallel dazu wurde das Proteom von MV3 Melanomzellen nach apoptoserelevanten Proteinen oder deren Spaltprodukte nach achttägiger LPC Behandlung untersucht. MV3, als Melanomzellen humanen Ursprungs, zeigten ein ähnliches Bild in der Aufnahme von LPC wie die murinen B16F10 Melanomzellen. Daher sind auch die LPC-vermittelten Auswirkungen auf potentiell apoptotisches Verhalten als ähnlich zu erachten. Durchgeführt wurden die Untersuchungen mit einem Apoptose Array mittels einer antikörperbeschichteten Membran, die hochaffin und quantitativ apoptoserelevante Proteine im Zelllysate bindet und immobilisiert (s. Kap. 3.11.2). Durch Biotin gelabelte, sekundäre Antikörper und Streptavidin gebundene Meerrettichperoxidase war schließlich eine Quantifizierung der gebundenen Proteine sowohl für LPC behandelte als auch für LPC unbehandelte Zellen möglich. Nach Auswertung war kein signifikanter Unterschied in der Menge apoptoserelevanter Proteine oder deren Spaltprodukte detektierbar. Tendenziell lässt sich eine leicht erhöhte Proteinmenge bei LPC behandelten Zellen nachweisen, was jedoch nicht auf alle Proteine zutrifft. An drei Beispielen soll dies exemplarisch gezeigt werden (s. Abbildung 4.18).

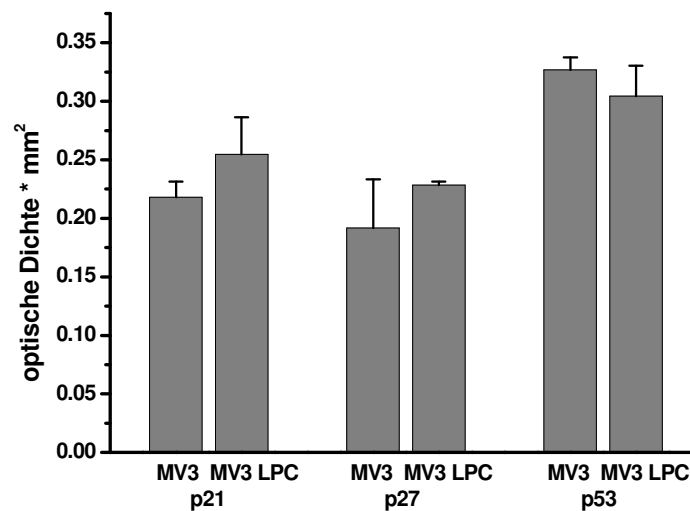


Abbildung 4.18: Vergleich der Expression von apoptoserelevanten Proteinen in LPC behandelten und unbehandelten MV3 Melanomzellen. Es waren keine signifikanten Unterschiede detektierbar.

Das Protein p53 wird konstitutiv von Zellen exprimiert aber auch permanent ubiquitinyliert und durch Proteasomen degradiert, wodurch seine Funktion als Transkriptionsfaktor für zellzyklusinhibierende Proteine letztlich gehemmt wird. Ist die Zelle allerdings oxidativem Stress ausgesetzt oder erfährt eine Schädigung der DNA, kommt es zur Akkumulation und Konformationsveränderungen von p53 in der Zelle. Infolgedessen kann p53 in den Zellkern translozieren und dort die Translation proapoptotischer und zellzyklusinhibierender Proteine

fördern. Beispielsweise werden die Proteine p21 und p27 vermehrt translatiert. Diese binden und inhibieren u. a. Proteine, die den Zellzyklus vorantreiben wie die Cyclin-abhängigen Kinasen 2 und 4. Diese vermitteln den Arrest in der G₁-Phase des Zellzyklusses und einen Proliferationsstopp^{288,289}. Sollten die MV3 Zellen eine Schädigung durch die LPC Inkubation erfahren haben, so wäre eine deutlich erhöhte Menge der oben untersuchten Proteine im Zelllysate im Vergleich zu unbehandelten MV3 Zellen zu detektieren gewesen. Die in Tabelle 4.1 aufgeführten Proteine wurden ebenfalls quantifiziert, zeigten jedoch keine signifikant verschiedenen Expressionslevel.

Tabelle 4.1: Untersuchte, potentiell apoptoserelevante Proteine

Bad	HSP60	HSP70	Bcl-2	HTRA2/Omi
Bax	Bcl-x	Livin	Pro-Caspase-3	PON2
Cleaved Caspase-3	p21/CIP1/CDNK1A	Catalase	p27/Kip1	cIAP-1
Phospho-p53 (S15)	cIAP-2	Phospho-p53 (S46)	Claspin	Phospho-p53 (S392)
Clusterin	Phospho-Rad17 (S635)	Cytochrome c	SMAC/Diablo	TRAIL R1/DR4
Survivin	TRAIL R2/DR5	TNF RI/TNFRSF1A	FADD	XIAP
Fas/TNFRSF6	HIF-1	HO-1/HMOX1/HSP32	HO-2/HMOX2	HSP27

4.2.3 Einfluss des LPC auf die Adhäsions- und Migrationseigenschaften der B16F10 Melanomzellen

4.2.3.1 Bestimmung der Expression von Adhäsionsrezeptoren nach Inkubation mit verschiedenen LPC Konzentrationen

Um zu überprüfen, ob die LPC Behandlung der B16F10 Melanomzellen einen Einfluss auf die Genexpression von Adhäsionsrezeptoren oder deren Liganden ausübt, wurde die Expression des Integrins VLA-4 und die von P-Selektin-Liganden nach Inkubation der B16F10 Zellen mit 300 µM bzw. 450 µM LPC für 13 Tage bestimmt. Durch den Einsatz eines primären Antikörpers gegen VLA-4 und eines sekundären, FITC-gelabelten Antikörpers gegen den Fc-Teil des primären Antikörpers wurde die Integrin-Expression ermittelt. Im Anschluss an diese Markierung wurde die Expression durchflusszytometrisch bestimmt. Auch die Funktionalität des VLA-4 wurde durch die Verwendung von löslichen VCAM-1-Fc-Chimeren überprüft, die ebenfalls an VLA-4 binden. Mit löslichen P-Selektin-Fc-Chimeren

wurde die P-Selektin-Ligand-Expression bestimmt. Sowohl VCAM-1 als auch P-Selektin wurden mit FITC-gelabelten, sekundären Antikörpern markiert. Wie in Abbildung 4.19 zu erkennen, übten sowohl die Inkubation mit 300 μM LPC als auch die Inkubation mit 450 μM keinen Einfluss auf die Expression des Integrins VLA-4 aus (s. Teilabbildungen A und D).

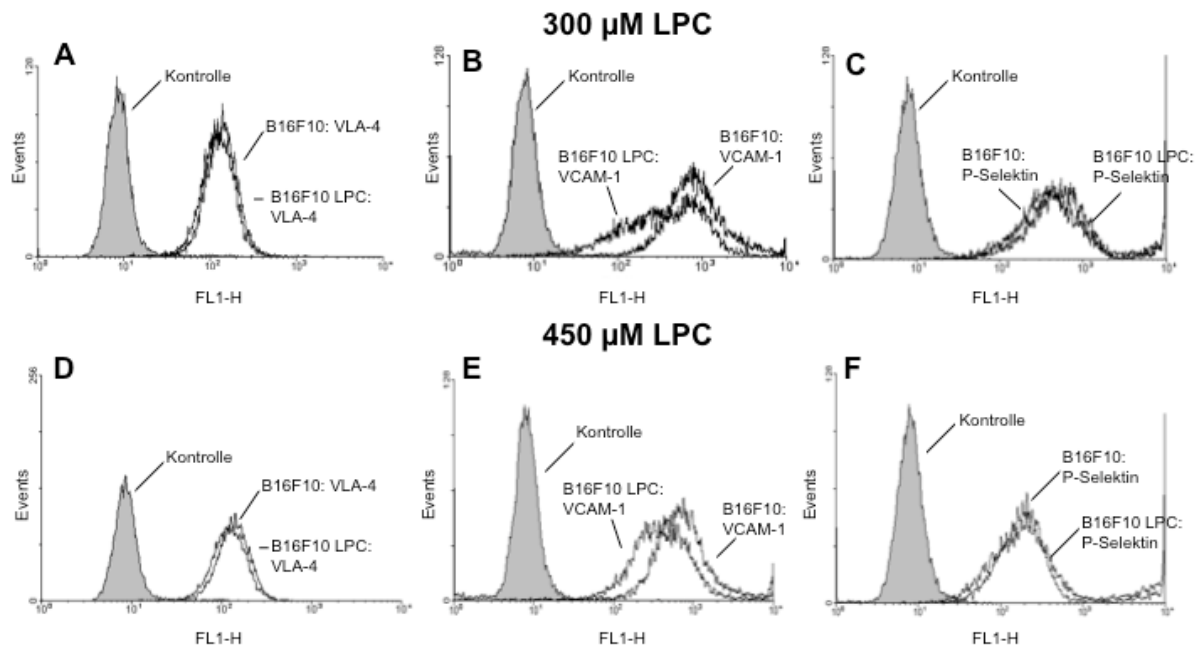


Abbildung 4.19: Expression von Adhäsionsrezeptoren nach LPC Inkubation für 13 Tage mit 300 μM (A-C) und 450 μM LPC (D-F). Die Expression von VLA-4 war nicht beeinflusst durch Inkubation mit 300 μM (A) und 450 μM (D) LPC. Die Bindung von VCAM-1 an VLA-4 zeigte sich durch die LPC Inkubation leicht eingeschränkt (B und D). Die Bindung von rekombinantem, löslichem P-Selektin war durch die LPC Behandlung nicht betroffen (C und F).

Es waren keine Verschiebungen der Histogrammkurven im Vergleich zu unbehandelten B16F10 Zellen zu erkennen. Bei Verwendung des natürlichen Liganden VCAM-1 war eine geringe Linksverschiebung der LPC behandelten B16F10 Zellen zu verzeichnen, sowohl bei einer 300 μM als auch einer 450 μM Konzentration (s. Teilabbildungen B und E). Diese nicht signifikanten Unterschiede lassen sich wahrscheinlich durch eine verminderte Zugänglichkeit des VLA-4 auf der Oberfläche der B16F10 Melanomzellen erklären. Die P-Selektin-Ligand-Expression schien bei beiden Konzentrationen unbeeinflusst zu sein, die durchflusszytometrisch erhaltenen Histogrammkurven sind für behandelte und unbehandelte Zellen nahezu identisch (s. Teilabbildungen C und F).

4.2.3.2 Beeinflussung des VLA-4/VCAM-1-Bindungsweges durch verschiedene LPC Konzentrationen

Nach Feststellung der Adhäsionsrezeptor-Expression wurde der Einfluss der LPC Inkubation auf den VLA-4/VCAM-1-Bindungsweg unter physiologischen Flussbedingungen untersucht. Dafür wurden die B16F10 Zellen für 13 Tage mit verschiedenen LPC Konzentrationen versetzt, beginnend mit 300 μM , was einer physiologischen Konzentration entspricht. Zur besseren Veranschaulichung ist in Abbildung 4.20 nur die Adhäsion der Zellen vier Sekunden nach Starten des Flusses aufgetragen. Hier wird deutlich, dass LPC Konzentrationen von 300 μM bis 375 μM nicht zu einer Abnahme der Adhäsion im Vergleich zu unbehandelten Zellen führten, sondern sogar geringfügige Anstiege der Adhäsion vermittelten. Bei Erreichen einer Konzentration von 400 μM LPC war ein Abfall der Adhäsion zu detektieren, der sich in signifikanten Unterschieden bei LPC Konzentrationen von 425 μM und 450 μM manifestierte.

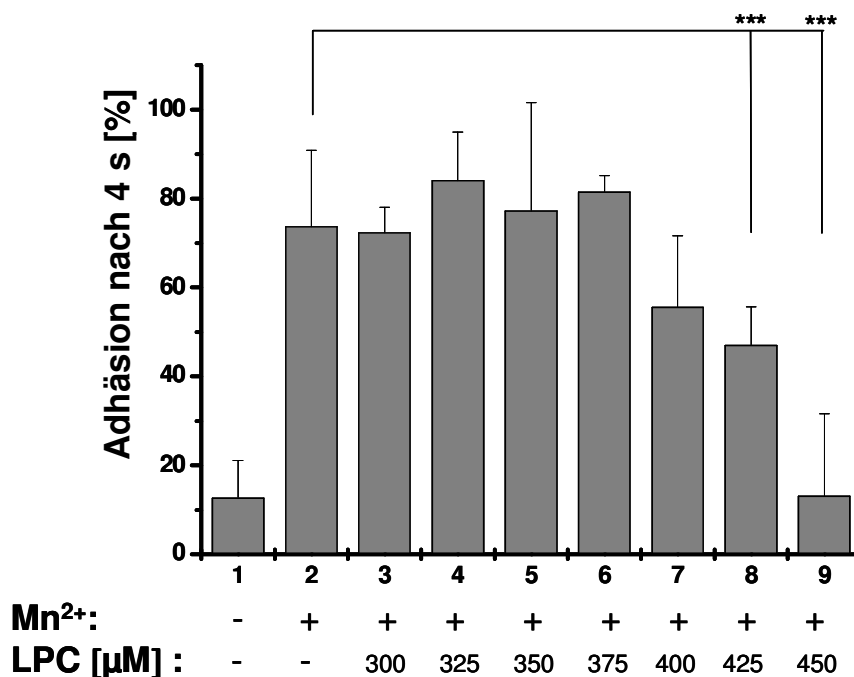


Abbildung 4.20: VLA-4-vermitteltes Adhäsionsverhalten von B16F10 Zellen inkubiert mit verschiedenen LPC Konzentrationen für 13 Tage. Zellen, inkubiert mit 300 μM bis 375 μM LPC und stimuliert mit Mn^{2+} , zeigten ein Adhäsionsverhalten wie unbehandelte, stimulierte Zellen. Teilweise war sogar eine leichte Steigerung der Adhäsion zu erkennen. Erst Konzentrationen von 425 μM LPC konnten die Adhäsion der B16F10 Zellen vermindern.

Bei einer LPC Konzentration von 450 μM war die Adhäsion auf das Maß unstimulierter Zellen reduziert. Eine leichte Erhöhung des LPC Spiegels über die physiologische Konzentration hinaus übt also bereits einen starken Effekt auf die Funktionalität des Integrins

VLA-4 aus, dies ist insbesondere hinsichtlich der unveränderten Expressionslevel bemerkenswert. Eine LPC Konzentration von 425 μM scheint einen Schwellenwert für diese weiter zu klärenden Effekte darzustellen.

4.2.3.3 Beeinflussung des VLA-4/VCAM-1-Bindungsweges durch verschiedene LPC Inkubationszeiträume

Nach der Bestimmung der Konzentrationsabhängigkeit der Inhibition des VLA-4 wurde der Einfluss der Inkubationszeit auf die VLA-4-vermittelte Adhäsion untersucht. B16F10 Melanomzellen, die mit einer Konzentration von 450 μM für verschiedene Inkubationszeiträume versetzt wurden, zeigten eine zunehmende Abnahme der Adhäsionsfähigkeit mit längerer Inkubationsdauer (s. Abbildung 4.21).

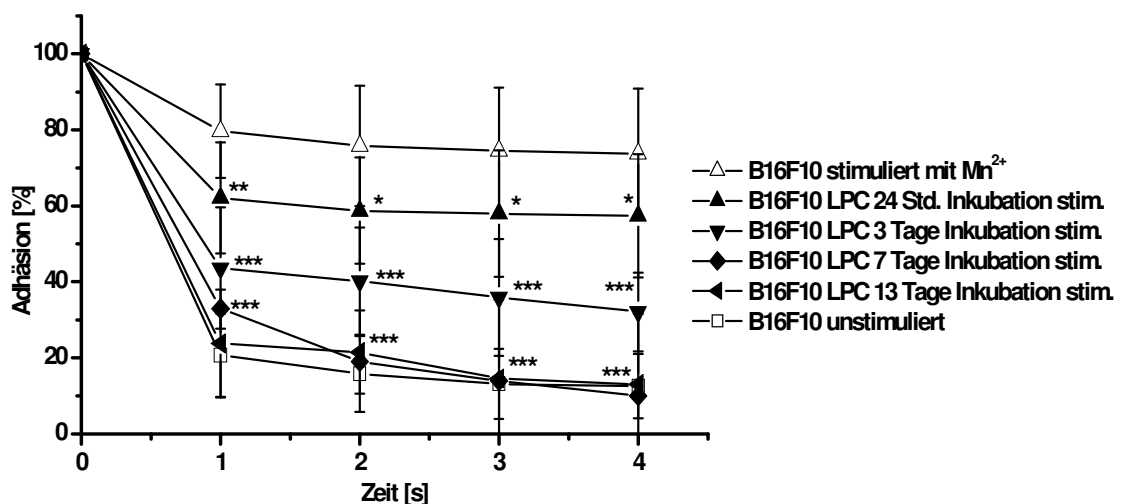


Abbildung 4.21: Einfluss der Inkubationszeit auf das Adhäsionsverhalten der B16F10 Zellen. Nach 7 Tagen Inkubation mit 450 μM LPC wurde ein Maximum der Adhäsionsinhibition erreicht. Durch fortdauernde Inkubation wurde die Adhäsion nicht weiter minimiert.

Schon nach 24stündiger Inkubation war ein Abnahme der Adhäsion zu verzeichnen, die nach sieben Tagen ihr Maximum erreichte und sich auch durch Verlängern des Inkubationszeitraumes auf 13 Tage nur geringfügig steigern ließ. Bei diesen Untersuchungen wurde das Kulturmedium alle 48 Std. inklusive des LPC gewechselt. Parallel durchgeführte Untersuchungen mit LPC Konzentrationen von 300 μM für verschiedene Inkubationszeiträume zeigten keinen Einfluss auf die Adhäsion der MV3 Zellen.

Um zu überprüfen, ob es sich bei den beobachteten Effekten um reversible oder irreversible Prozesse handelt, wurde den LPC inkubierten Zellen das Medium entzogen und durch LPC

freies Medium ausgetauscht. Im Anschluss wurden nach verschiedenen Zeiträumen des LPC Entzuges erneut Adhäsionsuntersuchungen durchgeführt (s. Abbildung 4.22). Vier Std. nach Entzug zeigte sich ein Anstieg der Adhäsion, der mit der Dauer des Entzuges korrelierte. Nach 18stündigem Entzug waren keine Unterschiede mehr zwischen unbehandelten und vormals LPC behandelten Zellen zu erkennen.

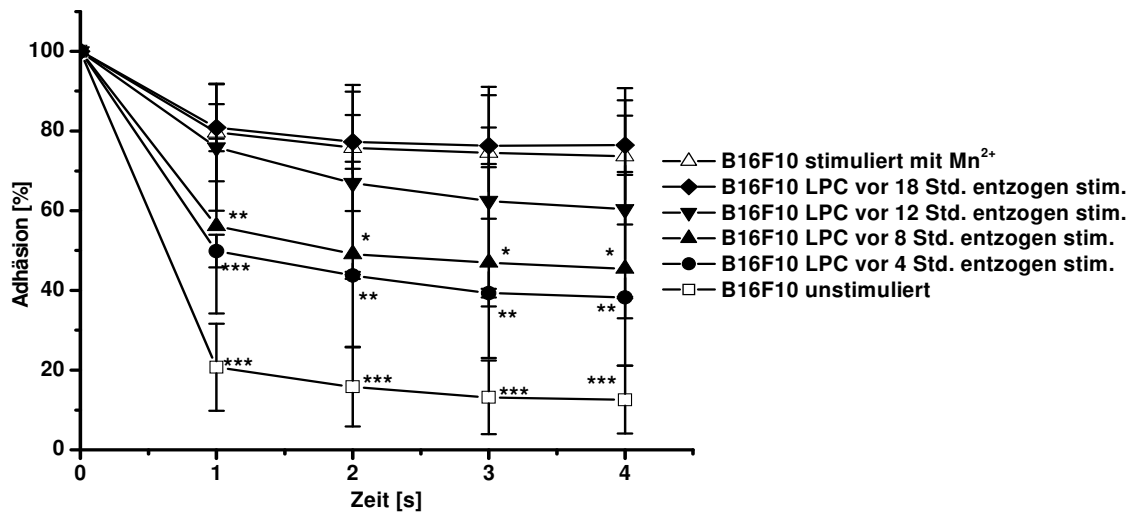


Abbildung 4.22: Einfluss des LPC Entzuges auf die Adhäsion von B16F10 Zellen. Nach 4 Std. der LPC Entziehung war ein Ansteigen der Adhäsion zu verzeichnen. Nach 18 Std. war die Adhäsionsfähigkeit vollständig wiederhergestellt.

Die beobachteten Effekte scheinen somit reversibler Natur zu sein. Ob sich eine Verminderung der Adhäsion durch erneute LPC Inkubation der B16F10 Zellen erreichen lässt, wurde durch erneute 24stündige LPC Inkubation untersucht. Es zeigte sich eine Verminderung der Adhäsion bei 24stündiger LPC Inkubation. Diese war stärker ausgeprägt als bei erstmaliger Inkubation über den gleichen Zeitraum (s. Abbildung 4.23). Die Reduktion der Adhäsion von B16F10 Melanomzellen durch LPC Inkubation stellt somit einen reversiblen Effekt dar, der sich, je nach LPC Konzentration und Inkubationszeit, verändert. Die molekularen Ursachen bleiben an dieser Stelle noch ungeklärt.

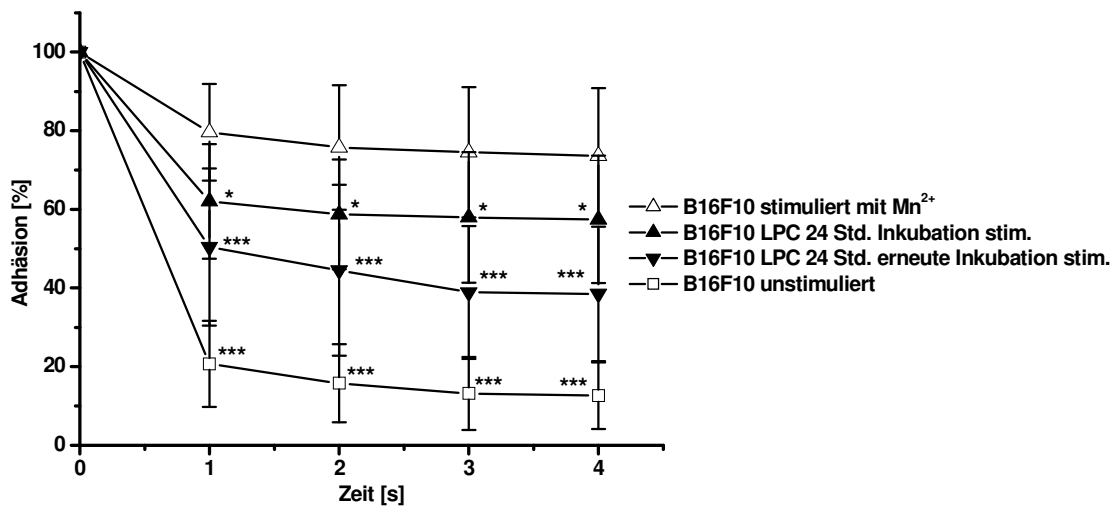


Abbildung 4.23: Einfluss der erneuten LPC Zugabe auf das Adhäsionsverhalten der B16F10 Zellen. Eine abermalige LPC Gabe verminderte die Adhäsion unter das Level der erstmaligen.

4.2.3.4 LPC-vermittelte Beeinflussung der Interaktion von Thrombozyten mit B16F10 Melanomzellen

Wie in Kapitel 2.2.6 beschrieben, spielt die Ummantelung der Tumorzellen mit Thrombozyten in der Blutbahn eine essentielle Rolle im Prozess der hämatogenen Metastasierung. Daher wurde der Einfluss der LPC Inkubation auf die Thrombozyten Adhäsion an B16F10 Zellen quantifiziert. Die B16F10 Zellen wurden im Vorfeld der Untersuchungen für drei Tage mit 450 μ M LPC inkubiert. Die genaue Versuchsdurchführung und das Verfahren der Thrombozytenisolierung sind in Kapitel 3.12 und 3.4 beschrieben. Wie in Abbildung 4.24 ersichtlich, ist die Anzahl der unstimulierten Thrombozyten, die an LPC behandelte und unbehandelte B16F10 binden, nahezu identisch. Durch Aktivierung der Thrombozyten mittels TRAP-14, einem Peptidagonisten an PAR-Rezeptoren, kommt es zu einer verstärkten Interaktion zwischen Thrombozyten und B16F10 Melanomzellen. Dabei ist die Interaktion mit LPC inkubierten B16F10 Zellen signifikant vermindert und auf dem Niveau unstimulierter Thrombozyten. Die Interaktion zwischen Thrombozyten und B16F10 Melanomzellen ist P-Selektin-vermittelt, dies konnte durch den Einsatz von Antikörpern, die gegen P-Selektin gerichtet sind, gezeigt werden. Hiervon wurde auch die Interaktion zwischen LPC behandelten und unbehandelten B16F10 beeinflusst.

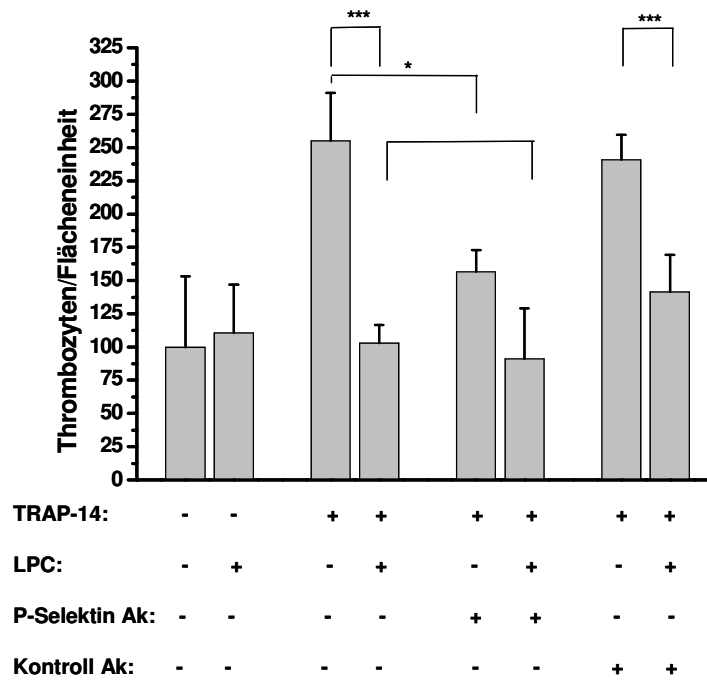


Abbildung 4.24: Bestimmung der Interaktion zwischen B16F10 Melanomzellen und Thrombozyten. Durch LPC Inkubation war die Wechselwirkung zwischen aktivierten Thrombozyten und B16F10 Melanomzellen signifikant vermindert. P-Selektin scheint hauptverantwortlich für die Interaktion zu sein.

Durch den Einsatz eines Antikörpers, der kein Epitop auf B16F10 Zellen oder Thrombozyten erkennt, war die Bindung zwischen B16F10 Zellen und Thrombozyten nicht eingeschränkt. Es lässt sich damit schlussfolgern, dass die LPC Behandlung der Melanomzellen signifikant die P-Selektin-vermittelte Wechselwirkung mit aktivierten Thrombozyten reduziert, und hieraus eine Erklärung der antimetastatischen Wirkung resultieren kann.

4.2.3.5 Einfluss des LPC auf die Zellgröße und den Zelldurchmesser

VLA-4 hat nicht nur eine Funktion zur Vermittlung der Zell-Zell-Wechselwirkung über VCAM-1, sondern ebenfalls eine Beteiligung an der Migrationsbewegung der Zellen, beispielsweise an Fibronectin-Substraten. Daher stellte sich die Frage, inwieweit die eingeschränkte Adhäsionswirkung auch in einer verminderten Matrixbindung und -migration der LPC behandelten Melanomzellen manifestiert war.

Dafür wurde die Integrin-vermittelte Adhäsion an Fibronectin untersucht, indem der Durchmesser der B16F10 Zellen mit der Flächenausdehnung der B16F10 Zellen in Aufsicht korreliert wurde. Bei intakter Integrinfunktion ist den Zellen eine Adhäsion mit daraus resultierendem Spreiten auf der Fibronectinschicht möglich. Ist die Integrinfunktion inhibiert

oder negativ beeinflusst, so kommt es zu einer verminderten Adhäsion und einer abgerundeten Zelle, die in der Aufsicht eine verringerte Fläche einnimmt. Dazu wurden der Durchmesser und die Flächenausdehnung in Aufsicht von LPC behandelten und LPC unbehandelten B16F10 Zellen bestimmt. Die LPC behandelten Zellen wurden für drei Tage mit 450 μM LPC versetzt. Der Durchmesser der Zellen wurde mit einem CASY[®] 1 Modell TT nach dem Coulter Counter Prinzip bestimmt (s. Kapitel 3.2.3), und die Flächenausdehnung auf Fibronektin wurde mit dem Programm „NIS Elements AR 2.30“ erfasst.

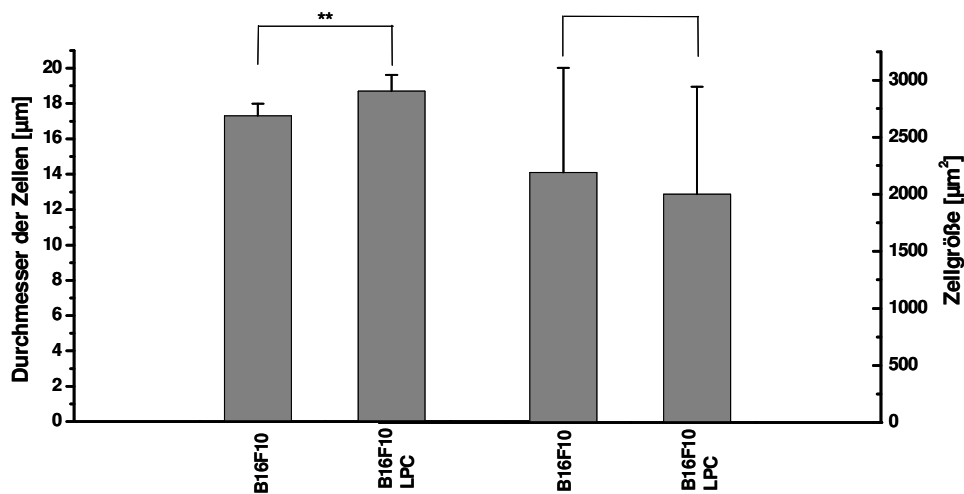


Abbildung 4.25: Bestimmung des Zelldurchmessers und der Oberflächenausdehnung von LPC behandelten und unbehandelten B16F10 Melanomzellen. LPC-vermittelt zeigte sich eine geringere Oberflächenausdehnung bei größerem Durchmesser.

Wie in Abbildung 4.25 zu erkennen, waren die LPC inkubierten B16F10 Zellen durchschnittlich ca. 2 μm größer als unbehandelte Zellen. Bei Betrachtung der Flächenausdehnung stellte sich ein konträres Bild dar. Die unbehandelten Zellen waren geringfügig größer als LPC inkubierte Zellen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Adhäsion an Fibronektin durch die LPC Inkubation vermindert war. Dies spricht für ein Abkugeln der Zellen und schließlich für eine gestörte VLA-4 Rezeptorfunktion.

4.2.3.6 Einfluss des LPC auf die Migrationseigenschaften von B16F10 Melanomzellen

Mithilfe des SACED Assays wurde ebenfalls der LPC-vermittelte Einfluss auf die Migration von B16F10 Melanomzellen untersucht. Zu diesem Zweck wurden B16F10 Melanomzellen für drei Tage mit 450 μM LPC inkubiert und auf eine Fibronektin Matrix überführt, auf der anschließend die migrationsbeschreibenden Parameter ermittelt wurden. Einerseits wurde die

Dynamik der Zelllamelle hinsichtlich ihrer Protrusions- und Retraktionsbewegung untersucht und quantifiziert, andererseits wurde die Ruffledynamik betrachtet. Ruffles sind lamellenartige Zellausstülpungen, die sich vertikal und nicht horizontal erstrecken.

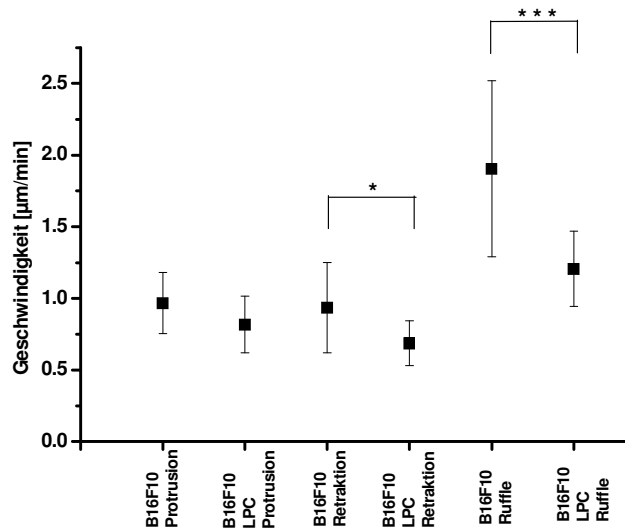


Abbildung 4.26: Einfluss der LPC Inkubation auf die Lamellen und Ruffle Dynamik. Durch LPC Inkubation war eine signifikant verminderte Ruffle Geschwindigkeit zu detektieren.

Durch die LPC Inkubation kam es zu einer Verlangsamung der Lamellenprotrusion und Retraktion sowie zu einer signifikant verminderten Ruffle Geschwindigkeit (s. Abbildung 4.26). Bei Betrachtung der Bewegungsfrequenz von LPC behandelten und unbehandelten Zellen zeigte sich eine signifikant verminderte Lamellenprotrusion und Retraktion, wobei die Ruffle Dynamik unbeeinflusst blieb (s. Abbildung 4.27).

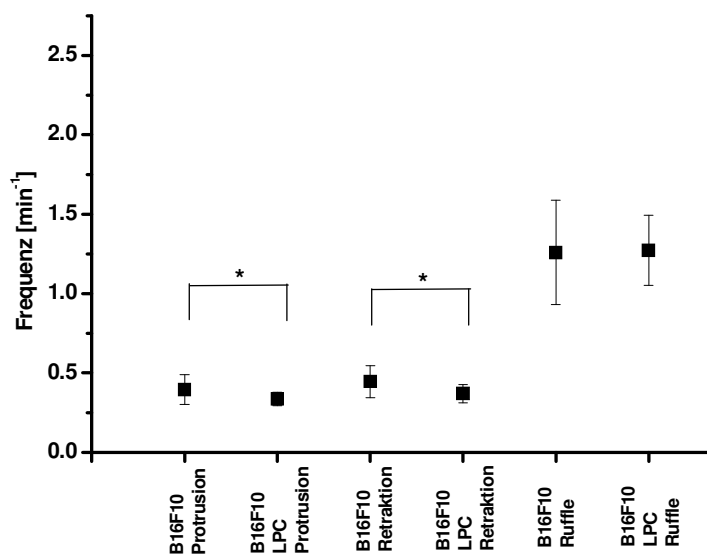


Abbildung 4.27: Einfluss der LPC Inkubation auf die Lamellen und Ruffle Frequenz. LPC vermittelt kam es zu einer Abnahme der Lamellenfrequenz.

Eine Erklärung für die beobachteten Effekte der verminderten Bewegungsfrequenz als auch der verringerten Bewegungsgeschwindigkeit könnte in der Anreicherung von gesättigten Phospholipiden in den Zellmembranen der LPC behandelten Zellen begründet liegen. Durch den starken Einbau der an das LPC gebundenen Fettsäure kommt es zu einer Steigerung der Rigidität der Zellmembran, dies äußert sich in einer verminderten Beweglichkeit der Zelle.

4.2.4 Mikroskopische Untersuchungen verschiedener Membraneigenschaften nach LPC Inkubation

4.2.4.1 Bestimmung der Integrinverteilung auf B16F10 Melanomzellen nach LPC

Inkubation

Mit der Annahme, dass es durch den vermehrten LPC-vermittelten Einbau von gesättigten Phospholipiden zu einer Rigiditätsveränderung der Zellmembran kommt, könnten auch die Befunde der verminderten Adhäsionsfähigkeit von LPC inkubierten B16F10 Melanomzellen erklärt werden (s. Kapitel 4.2.3). So kann beispielsweise die freie Beweglichkeit von VLA-4-Molekülen in der Zellmembran gestört sein, was sich in einer verringerten Funktionalität äußert. Eine vermehrte oder abgeschwächte VLA-4-Clusterbildung durch die veränderte Membranzusammensetzung ist ebenfalls denkbar. Dies wurde nach Markierung der membranständigen VLA-4-Moleküle mittels FITC-gelabelter Antikörper und anschließender fluoreszenzmikroskopischer Betrachtung untersucht. LPC behandelte und unbehandelte B16F10 Zellen (450 μ M für fünf Tage) wurden mit einem primären Antikörper gegen VLA-4 und einem sekundären Antikörper gegen den Fc-Teil des primären gelabelt und anschließend durch ein Konfokales-Laserscanning-Mikroskop betrachtet (s. Abbildung 4.28). Es konnten allerdings keine Unterschiede in der Verteilung des VLA-4 gefunden werden.

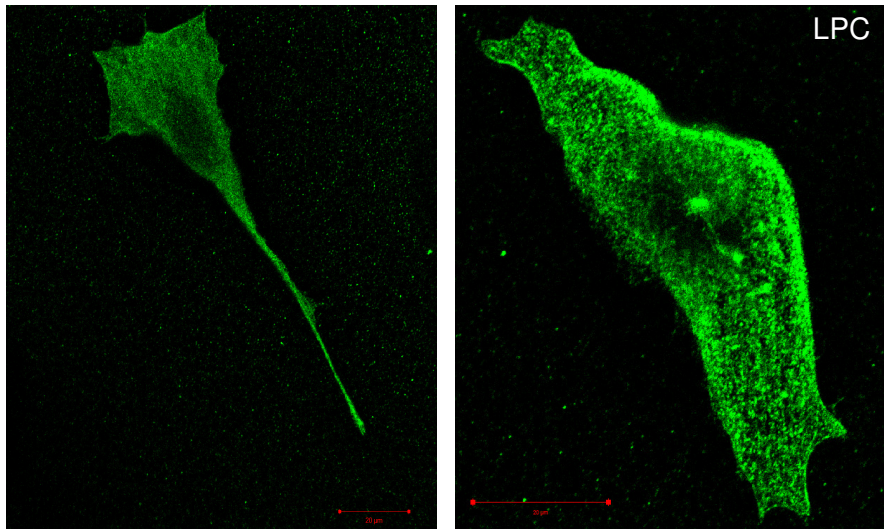


Abbildung 4.28: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme mittels Laserscanning-Mikroskop von B16F10 Melanomzellen, auf deren Oberfläche das Integrin VLA-4 markiert war. Es waren keine Unterschiede der Integrin Verteilung bei den unbehandelten Zellen (links) und den LPC behandelten Zellen (rechts) zu detektieren. Die Maßstabsbalken symbolisieren jeweils eine Länge von 20 μm .

4.2.4.2 Rasterelektronenmikroskopische Betrachtung der Zellmorphologie nach LPC Inkubation

Nachdem keine Unterschiede der Integrinverteilung nach LPC Inkubation in der Zelloberfläche der B16F10 Zellen mittels LSM detektiert werden konnten, wurden die Zellen elektronenmikroskopisch betrachtet, um eventuell vorhandene LPC-vermittelte morphologische Unterschiede zu erfassen. Nach der anfänglich detektierten Zunahme von Filopodien auf der Zelloberfläche von B16F10 Zellen, wurden verschiedene LPC Konzentrationen und Inkubationszeiträume in die Untersuchungen mit einbezogen (s. Abbildung 4.29).

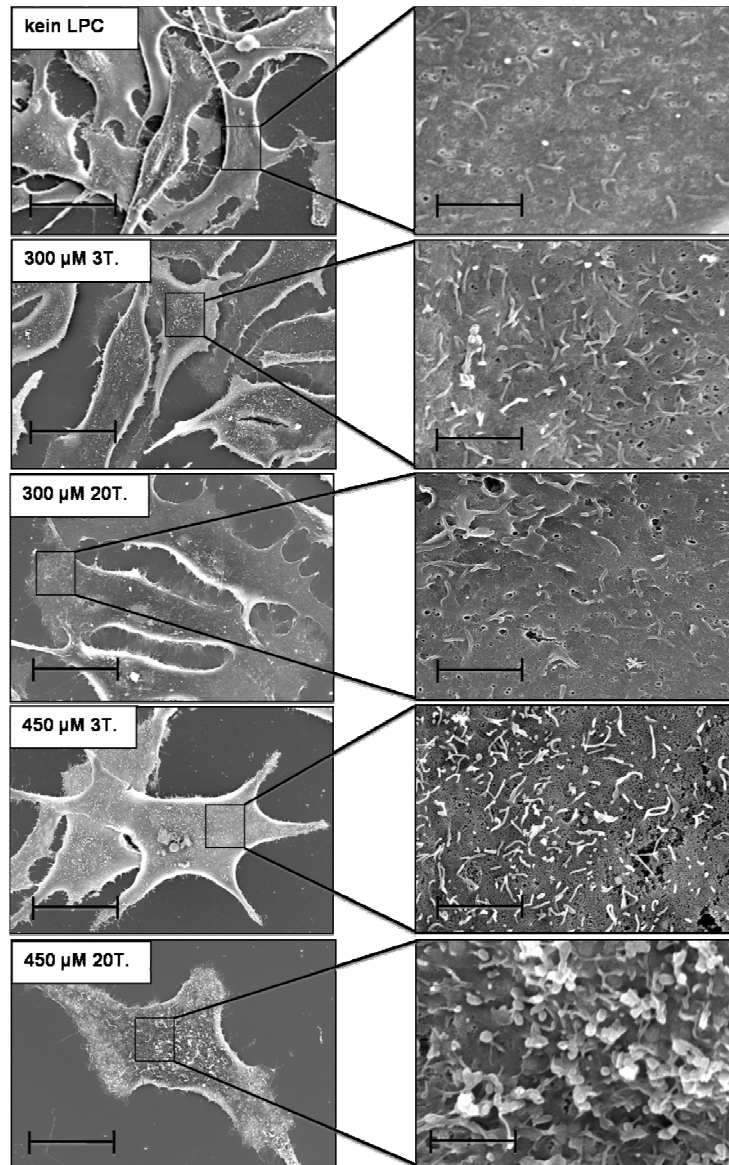


Abbildung 4.29: Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung von B16F10 Melanomzellen. Mit zunehmender LPC Inkubationsdauer und LPC Konzentrationen von 450 μM war eine starke Zunahme an Filopodien zu verzeichnen. LPC Konzentrationen von 300 μM zeigten nur eine geringe Steigerung der Filopodienbildung. Die Maßstabsbalken in der linken Spalte repräsentieren eine Länge von 20 μm und in der rechten von 2 μm .

Wie in Abbildung 4.29 zu erkennen ist, kam es durch eine Inkubation mit 450 μM LPC für drei Tage zu einer starken Zunahme der Anzahl an Filopodien auf der Zelloberfläche. Nach 20tägiger Inkubation mit der gleichen Konzentration hatte sich diese noch weiter erhöht und die ursprüngliche Zelloberfläche war kaum noch zu erkennen. Eine Inkubation mit 300 μM LPC sowohl für drei als auch für 20 Tage führte hingegen nur zu einer geringen Zunahme der Anzahl an Filopodien. Diese Resultate korrelieren mit den Befunden zur Adhäsion und Migration der B16F10 Zellen unter LPC Einfluss. So konnten bei LPC Konzentrationen von 300 μM keine Einflüsse auf die Adhäsion festgestellt werden. Hingegen bei Konzentrationen

von 450 μM konnten mit zunehmender Inkubationszeit Abnahmen der Adhäsion beobachtet werden. Die verstärkte Bildung von Filopodien ist möglicherweise ursächlich für die Abnahme der Adhäsion. Entgegen der vorherrschenden Lehrmeinung, nach der mit einer verstärkten Filopodienbildung auch eine verstärkte Adhäsion und Migration einhergehen, könnte eine unphysiologisch hohe Zahl an Filopodien die Adhäsion sterisch behindern und sogar inhibieren. Diese Theorie wird auch durch rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen von B16F10 Zellen, denen das LPC-haltige Medium entzogen wurde, untermauert. So nahm die Zahl der Filopodien mit fortdauernder Zeit des LPC Entzuges ab und die Adhäsion der B16F10 Melanomzellen an VCAM-1 wieder zu (s. Kapitel 4.2.3.3). In Abbildung 4.30 ist dies für Entzugszeiträume von 2, 4, 8, 24 und 96 Std. gezeigt. Es wurde eine Rückbildung der Filopodien einhergehend mit einer Glättung der Zellmembran mit zunehmender LPC Entzugszeit detektiert.

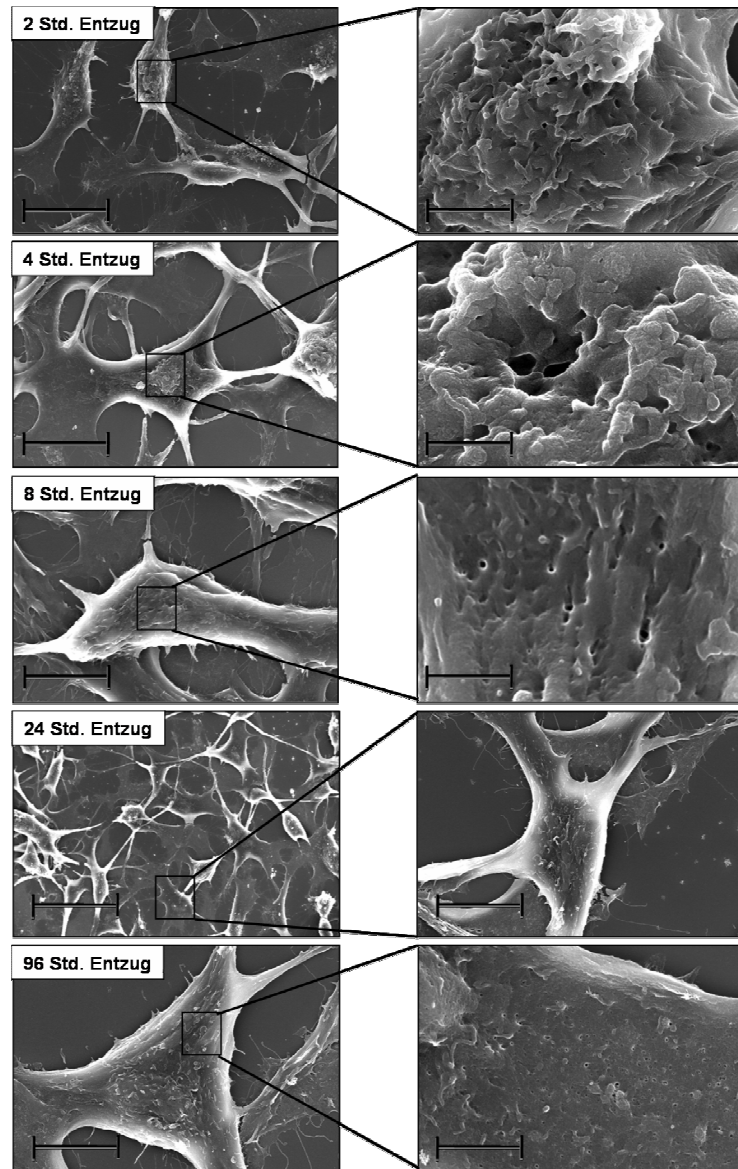


Abbildung 4.30: Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung von B16F10 Melanomzellen. Mit zunehmender Dauer des LPC Entzuges war eine Rückbildung der Filopodien zu verzeichnen. Die Maßstabsbalken in der linken Spalte repräsentieren eine Länge von 20 µm und in der rechten von 2 µm.

Neben den oben beschriebenen Untersuchungen an murinen B16F10 Melanomzellen wurden auch humane MV3 Melanomzellen mit LPC versetzt und rasterelektronenmikroskopischen Betrachtungen unterzogen. Wie in Abbildung 4.31 zu erkennen ist, hat eine Inkubation mit 450 µM LPC für sieben Tage auch bei den MV3 Melanomzellen eine verstärkte Bildung von Filopodien zur Folge. Weiterhin präsentieren unbehandelte MV3 Zellen im Vergleich zu B16F10 Melanomzellen vermehrt Filopodien auf ihrer Zellmembran.

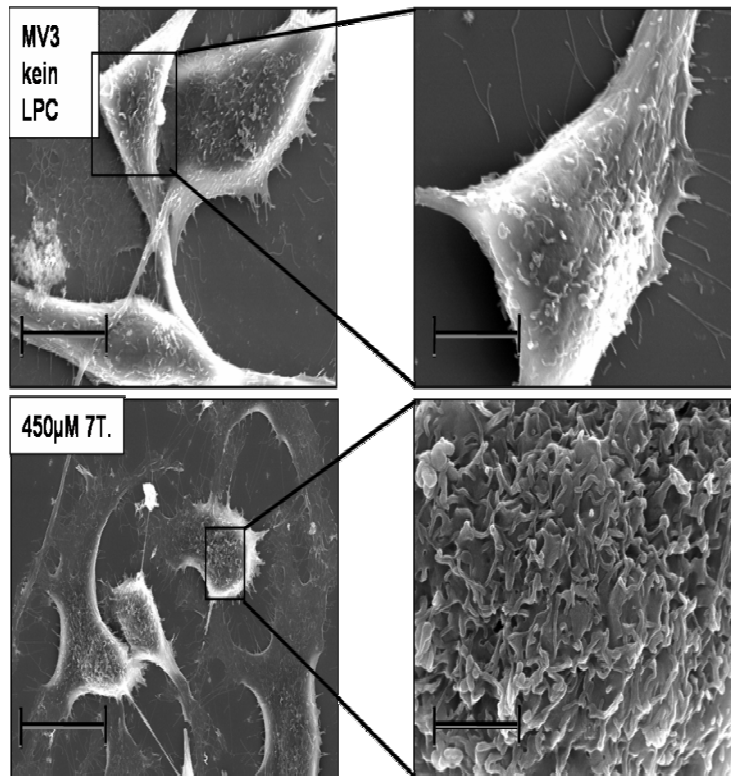


Abbildung 4.31: Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung von MV3 Melanomzellen. Durch eine Inkubation von sieben Tagen mit $450\ \mu\text{M}$ LPC war eine starke Zunahme an Filopodien auf der Zellmembran zu verzeichnen. Die Maßstabsbalken in der linken Spalte repräsentieren eine Länge von $20\ \mu\text{m}$ und in der rechten von $2\ \mu\text{m}$.

Das Phänomen der vermehrten Bildung von Filopodien nach LPC Inkubation scheint also nicht zelllinienspezifisch, sondern zumindest auch auf andere Melanomzelllinien unterschiedlicher Spezies übertragbar zu sein. Die funktionelle Charakterisierung von Pankreastumorzellen nach LPC Exposition ist in Kapitel 4.2.11 näher beschrieben.

4.2.4.3 Quantifizierung der Filopodien auf B16F10 Melanomzellen

Nach Generierung der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen von B16F10 Melanomzellen, inkubiert mit LPC in verschiedenen Konzentrationen für verschiedene Zeiträume, wurde eine Quantifizierung der Filopodien vorgenommen (s. Abbildung 4.32). Die bereits in Kapitel 4.2.4.2 dargestellten optischen Eindrücke bestätigen sich nun auch statistisch.

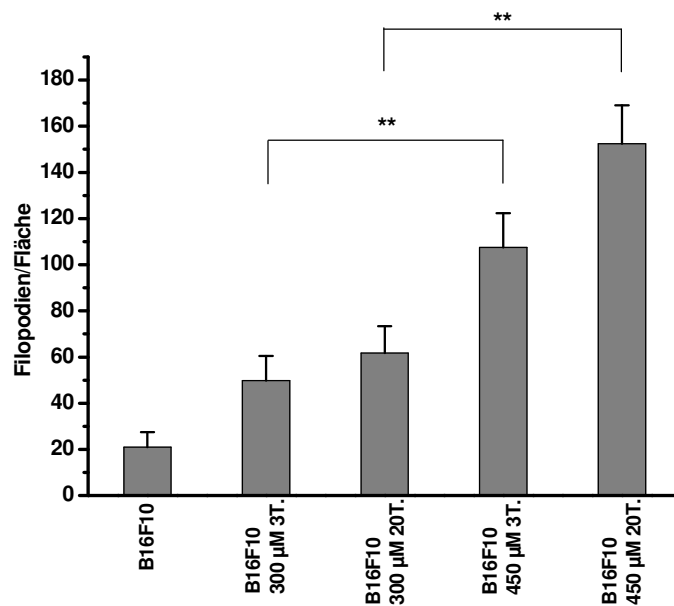


Abbildung 4.32: Quantifizierung von Filopodien auf LPC behandelten und unbehandelten Zellmembranen. Es konnten statistisch signifikante Unterschiede zwischen 300 µM LPC und 450 µM LPC behandelten B16F10 Zellen ermittelt werden.

Durch Inkubation der Zellen mit 300 µM LPC kam es in etwa zu einer Verdopplung der Zahl der Filopodien auf der Zellmembran im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Die Inkubationsdauer hatte hier keinen oder nur einen sehr geringen Einfluss auf die Mengen an Filopodien. Eine Inkubation mit 450 µM LPC für drei Tage führte zu einer fünffachen Expression von Filopodien auf der Zellmembran, die nach 20 Tagen auf das Siebenfache anstieg.

4.2.4.4 Betrachtung des Aktinzytoskeletts nach LPC Inkubation

Die vermehrte Bildung von Filopodien auf der Zellmembran infolge einer LPC Inkubation erweist sich zwar als ein hochinteressantes, morphologisches Phänomen, welches auch für eine reduzierte Zelladhäsion partiell verantwortlich sein könnte, jedoch ergeben die elektronenmikroskopischen Untersuchungen keinerlei Hinweise für deren Ursachen. Es ist davon auszugehen, dass die Filopodien durch das Vorantreiben zytoskelettaler Bestandteile in die Zellmembran gebildet wurden. Um dies zu beweisen wurde das Aktinzytoskelett mit Phalloidin-FITC markiert und die Zellproben mit einem Laserscanning-Mikroskop untersucht.

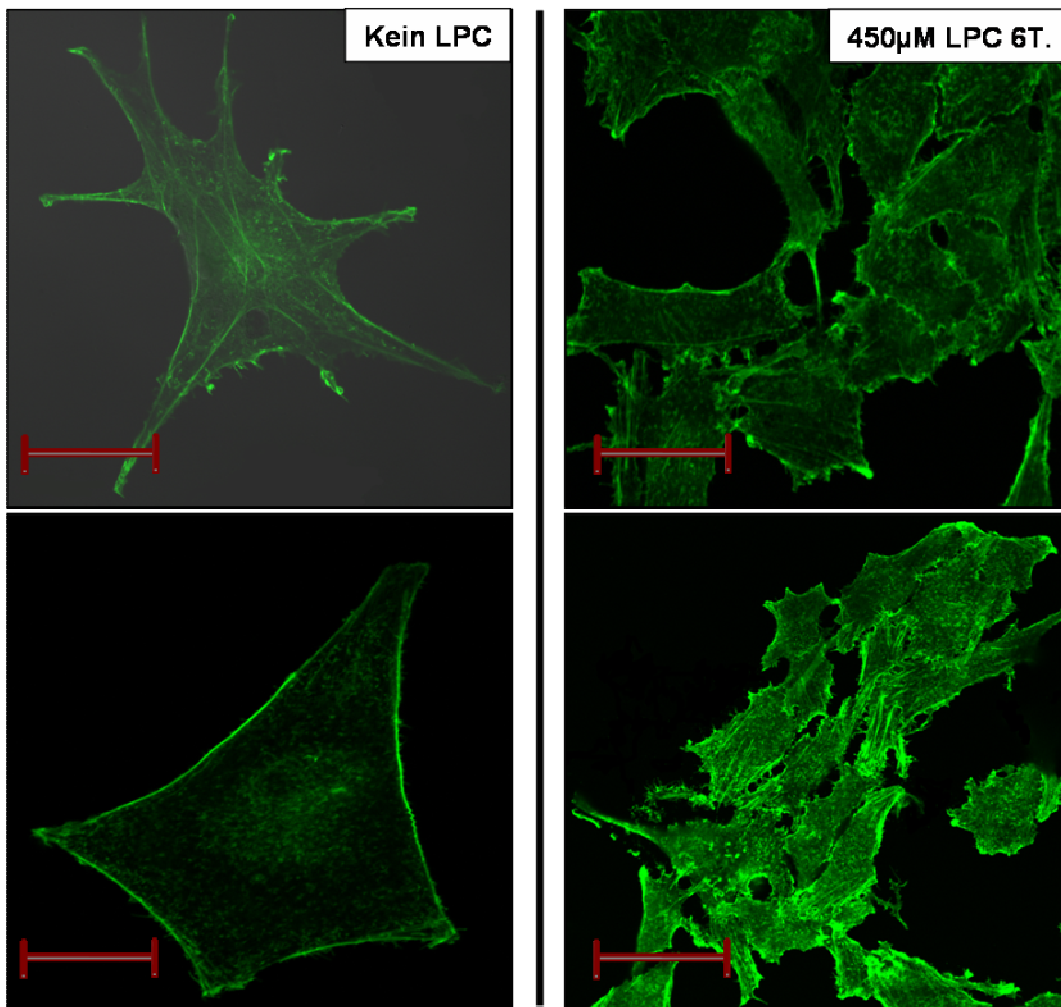


Abbildung 4.33: Laserscanningmikroskopische Untersuchung von B16F10 Melanomzellen. Durch eine LPC Inkubation von sechs Tagen kam es zur vermehrten Bildung von Aktinfilamenten an der Zellmembran (rechte Bildhälfte).

Die erhaltenen Aufnahmen sind in Abbildung 4.33 dargestellt, wobei links die unbehandelten und rechts die LPC inkubierten B16F10 Zellen abgebildet sind. Eine vermehrte Lokalisation von Aktinfilamenten an der Zellmembran nach sechstägiger Inkubation mit 450 μ M LPC

konnte sehr deutlich anhand einer verstärkten Fluoreszenz an der Zelloberfläche gezeigt werden. LPC scheint also eine Aktin Nucleation an der Zellmembran durch einen bislang unbekanntem Mechanismus zu vermitteln und damit eine vermehrte Bildung von Filopodien zu forcieren. Dabei scheint der Schwellenwert, ab dem eine Filopodienbildung detektierbar ist, knapp über der physiologischen Konzentration zu liegen.

Die Anreicherung von gesättigten Fettsäuren in der Zellmembran kann somit nicht für die Bildung von Filopodien verantwortlich sein, denn auch B16F10 Zellen, die mit 300 μ M LPC inkubiert wurden, zeigten eine Anreicherung von gesättigten Fettsäuren in der Zellmembran, jedoch keine vermehrte Formation von Filopodien. Vorstellbar ist auch, dass die Tumorzellen das LPC enzymatisch recyceln - beispielsweise durch die „lysophosphatidylcholine acyltransferase“ - und in die Membran einbauen, was zu einer Rigiditätssteigerung führt. Ab einer bestimmten Konzentration gelingt es der Zelle allerdings nicht mehr, das vorhandene LPC quantitativ zu metabolisieren, wodurch es sich in den Zellmembranen anreichert. Dies könnte eine starke Veränderung von sogenannten Lipid Rafts, lateral separierten Membranbereichen mit hoher Rigidität, in der Zellmembran mit darin lokalisierten Proteinen nach sich ziehen. So kann die laterale Bewegung oder der Verbleib von membranständigen Proteinen in Lipid Rafts verändert sein. Durch Gabe des Alkylphosphocholins Edelfosin, das LPC strukturell ähnelt, konnte eine solche Änderung der biophysikalischen Eigenschaften von Lipid Rafts in Myelomzellen beobachtet werden. Edelfosin reichert sich in Lipid Rafts an, was zu einer Redistribution von Cholesterol in der Zellmembran führt²⁹⁰⁻²⁹³.

So könnte es durch LPC Administration zu einer Rigiditätssteigerung der Zellmembran und damit einhergehend zu einer verlängerten Membranständigkeit von Rho-GTPasen kommen, was eine Aktin Nucleation und Filopodienbildung nach sich ziehen würde. Neben Proteinen, die an der Organisation des Zytoskeletts beteiligt sind, könnte eine Veränderung der Lipid Rafts auch einen Einfluss auf Proteine wie Integrine und Proteine, die an der Integrin Aktivierung beteiligt sind, nach sich ziehen. Mehrere Gruppen haben die Lokalisation des Integrins VLA-4 in der Zellmembran untersucht. Einige Studien konnten eindeutig die laterale Bewegung von VLA-4 in Lipid Rafts nach Aktivierung von T-Lymphozyten zeigen. Eine Zerstörung der Raft Strukturen hatte eine Abnahme der Integrin-vermittelten Adhäsion von T-Lymphozyten zur Folge. Eine Clusterung von Lipid Rafts mit darin enthaltenen VLA-4-Molekülen führte wiederum zu einer verstärkten Adhäsion.

Andere Gruppen hingegen konnten die Lokalisation von VLA-4 in Lipid Rafts in Lymphozyten im peripheren Blut nicht bestätigen, wohl aber die Notwendigkeit des Vorhandenseins von Rafts für die VLA-4 Aktivierung²⁹⁴⁻²⁹⁷. So scheint der LPC-vermittelte

Einfluss auf die „Lipid Rafts“ ursächlich für die Bildung von Filopodien als auch für die gestörte Integrin-Funktion zu sein. Der LPC Effekt auf die Adhäsion könnte allerdings auch durch eine Kombination beider Mechanismen verursacht werden.

4.2.5 Einfluss verschiedener Lipidderivate bzw. Lipidmetabolite auf die Zelladhäsion von B16F10 Melanomzellen

4.2.5.1 Beeinflussung des VLA-4/VCAM-1-Bindungsweges durch Hexadecylphosphocholin unter physiologischen Flussbedingungen

Bei Betrachtung der Struktur von LPC fällt die Ähnlichkeit zu Hexadecylphosphocholin (HePC) auf, einem Arzneistoff aus der Klasse der Alkylphosphocholine, der zur Therapie der Leishmaniose und zur Behandlung von bösartigen Hautveränderungen bei Brustkrebs dermal eingesetzt wird (s. Abbildung 4.34).

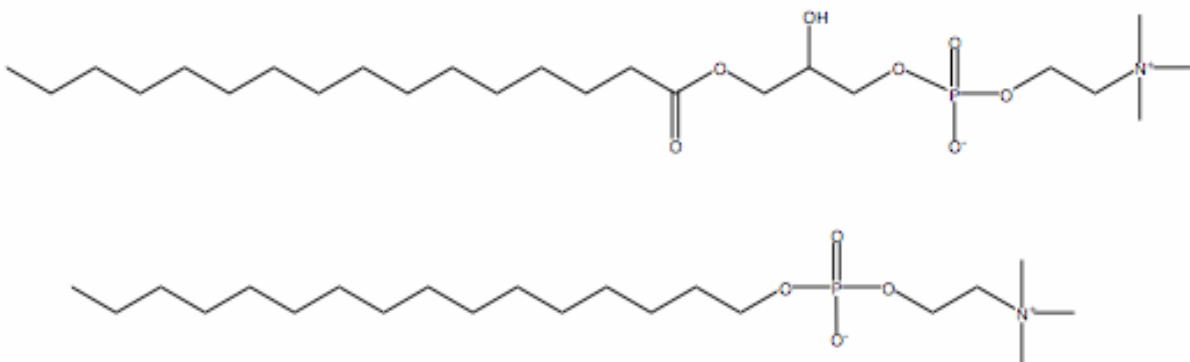


Abbildung 4.34: Strukturen von LPC (oben) und Hexadecylphosphocholin im Vergleich

Für HePC ist ein rapider Uptake aus dem Kulturmedium mit anschließender Inkorporation in die Zellmembran von Tumorzellen beschrieben²⁹⁸⁻³⁰⁰. Neben der Vermittlung der Apoptose durch zahlreiche Mechanismen, beispielsweise der Aktivierung von Caspasen konnte eine Clusterung und Aktivierung von Todesrezeptoren gezeigt werden³⁰¹. HePC scheint also einen Einfluss auf Membraneigenschaften auszuüben. Um indirekt weitere Erkenntnisse über die Effekte des LPC zu gewinnen, wurde auch der Einfluss des HePC auf die Funktionalität des Integrins VLA-4 unter Flussbedingungen untersucht. Zunächst wurde die Toxizität mittels MTT Assay bestimmt und ein IC₅₀-Wert von 100 µM ermittelt. Für die anschließend durchgeführten Adhäsionsuntersuchungen wurden Konzentrationen von 10 µM, 20 µM und 75 µM gewählt. Um eine vollständige Aufnahme des HePC zu gewährleisten, wurden die

B16F10 Zellen 24 Std. vor Versuchsbeginn mit entsprechenden Substanzmengen versetzt. Wie in Abbildung 4.35 zu erkennen ist, reduzierten Konzentrationen von 10 μM und 20 μM HePC die Adhäsion an VCAM-1 um ca. 20 % unter Flussbedingungen, wohingegen 75 μM HePC die Adhäsion auf ca. 30 % reduzierte.

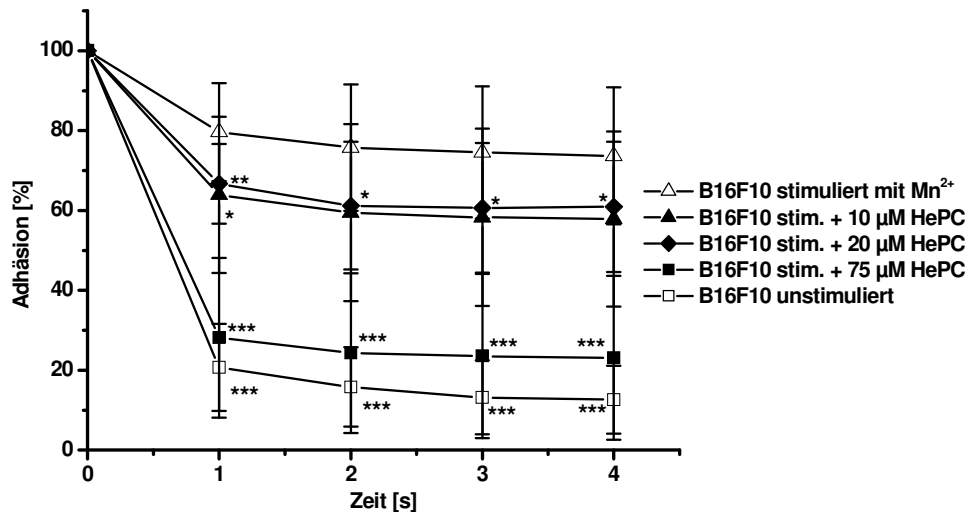


Abbildung 4.35: Einfluss von Hexadecylphosphocholin (HePC) auf die Zelladhäsion von B16F10 Melanomzellen an VCAM-1 unter Flussbedingungen. Konzentrationen von 10 μM und 20 μM HePC reduzierten die Adhäsion um ca. 20 %.

HePC scheint also durch seine gesättigte Struktur einen Einfluss auf die Membranfunktion auszuüben und die Adhäsionsrezeptorfunktion zu inhibieren. Auch ist eine Beeinflussung intrazellulärer Signalwege denkbar, die sich in einer eingeschränkten Rezeptorfunktion niederschlägt. Auf Grund der oben dargelegten Befunde ist eine Differenzierung zwischen den beiden Mechanismen nicht möglich, sie liefern nur weitere Indizien, die die LPC-vermittelten Effekte durch Membranzustandänderungen erklärbar machen.

4.2.5.2 Beeinflussung des VLA-4/VCAM-1-Bindungsweges durch Glycerophosphocholin unter physiologischen Flussbedingungen

Durch den rapiden Abbau von LPC und die Inkorporation der Fettsäuren in die Zellmembran ist die Möglichkeit einer extrazellulären Anreicherung von Metaboliten wie beispielsweise Glycerophosphocholin im Kulturmedium gegeben. Dieses könnte zweiwertige Kationen wie Mn^{2+} chelatieren. Chelatiertes Mn^{2+} ist dann nicht mehr in der Lage, Integrine zu aktivieren. Dies könnte eine verminderte Adhäsion von B16F10 Zellen in in vitro Untersuchungen

erklären. Daher wurden B16F10 Zellen vor Mn^{2+} Stimulation mit Konzentrationen von 450 μM und 900 μM Glycerophosphocholin versetzt.

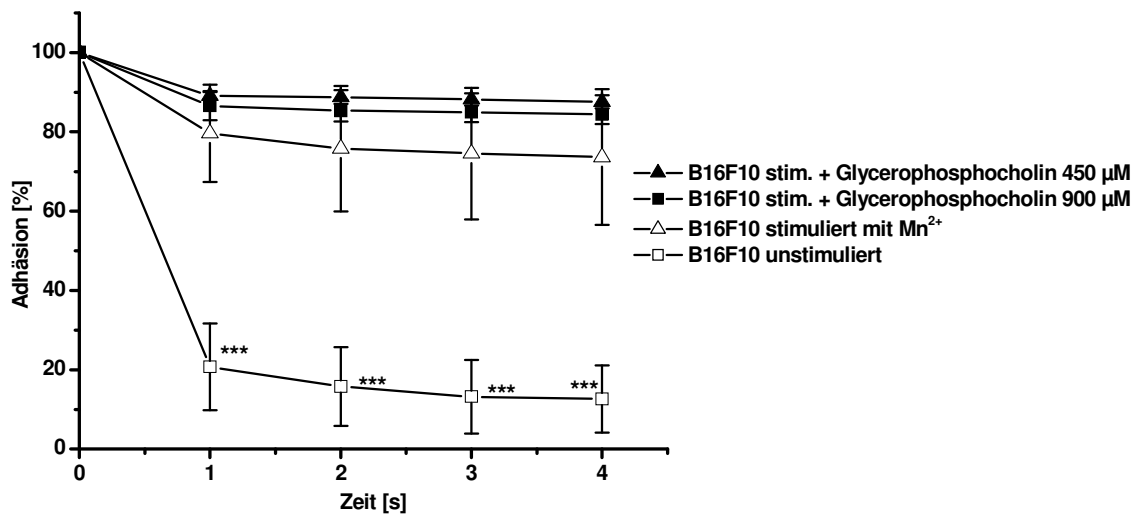


Abbildung 4.36: Einfluss von Glycerophosphocholin auf die Zelladhäsion von B16F10 Melanomzellen an VCAM-1 unter Flussbedingungen. Konzentrationen von 450 μM und 900 μM hatten keinen Einfluss auf die Adhäsion.

Wie in Abbildung 4.36 zu erkennen ist, hatte Glycerophosphocholin keinen Einfluss auf die Adhäsion der B16F10 Melanomzellen an VCAM-1 unter Flussbedingungen. Die Adhäsion war sogar geringfügig stärker als von B16F10 Zellen ohne Glycerophosphocholin. Eine Beeinflussung der Aktivierung der B16F10 Zellen und damit des Adhäsionsverhaltens durch Lipidmetabolite scheint somit nicht ursächlich für die beobachteten Effekte.

4.2.6 Beeinflussung des VLA-4/VCAM-1-Bindungsweges von B16F10 Melanomzellen durch Kombinationen aus LPC und Heparin

Wie bereits in Kapitel 4.1.2 dargestellt, konnte Heparin die Interaktion zwischen VLA-4 und VCAM-1 in in vitro Untersuchungen unter Flussbedingungen effektiv hemmen. Dabei interagiert Heparin mit dem extrazellulären Teil des VLA-4. Auch LPC vermag, wie in Kapitel 4.2.3 beschrieben, die VLA-4/VCAM-1-Bindung zu inhibieren. Die zugrundeliegenden Effekte scheinen, wie in Kapitel 4.2.4.4 beschrieben, auf einer Beeinflussung von Lipid Rafts und der Ausbildung von Filopodien zu beruhen. Daher stellte sich die Frage, ob durch den Einsatz einer Kombination beider Agenzien eine verstärkte Inhibition des VLA-4/VCAM-1-Bindungsweges zu erzielen ist. Infolgedessen wurden verschiedene Untersuchungen durchgeführt, um synergistische Effekte zu detektieren bzw. zu

quantifizieren. Zunächst wurden dazu B16F10 Melanomzellen für 13 Tage mit LPC in einer Konzentration von 450 μM inkubiert und Adhäsionsuntersuchungen unter physiologischen Flussbedingungen unterzogen, wobei gleichzeitig 500 μg unfraktioniertes Heparin zugegeben wurde. Wie in Abbildung 4.37 zu erkennen, konnte die Kombination aus LPC Inkubation und 500 μg unfraktioniertem Heparin die Adhäsion sogar unter das Niveau unstimulierter Zellen absenken. Damit ist die kombinierte inhibitorische Wirkung von LPC Inkubation und Heparin auch stärker als die Aktivität der beiden einzelnen Agenzien, die somit offensichtlich synergistisch auf die VLA-4/VCAM-1-Interaktion einwirken.

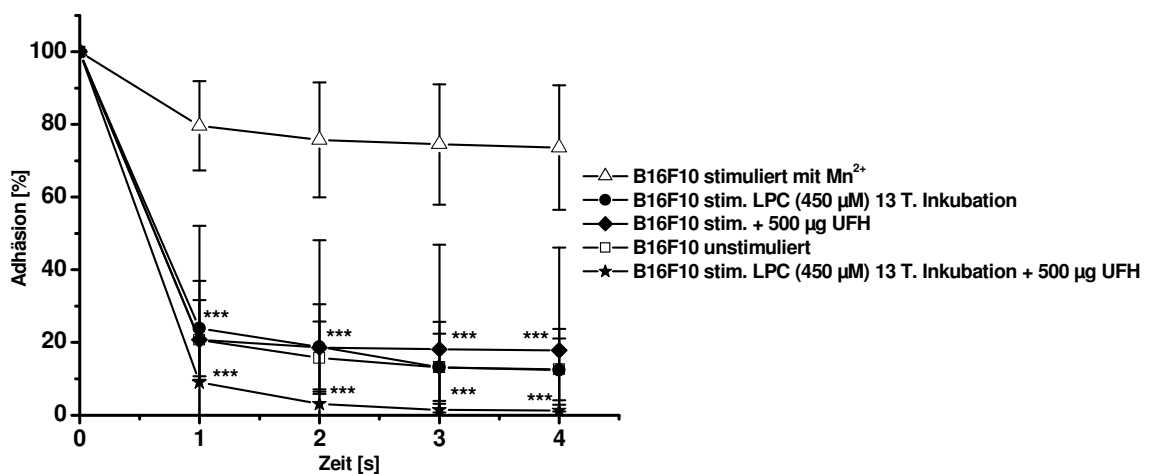


Abbildung 4.37: Untersuchung der Wirkung von LPC Inkubation und unfraktioniertem Heparin auf die VLA-4/VCAM-1-Interaktion. Die Kombination aus Heparin (500 μg) und LPC (450 μM für 13 Tage) übertraf die inhibitorische Wirkung der einzelnen Komponenten. Auch die Adhäsion unstimulierter B16F10 Melanomzellen wurde durch die Kombination noch unterboten.

Um die Art der aufgetretenen synergistischen Wirkung weiter zu determinieren, wurde eine LPC Konzentration zur Kombination mit Heparin gewählt, die keine bzw. nur eine geringe inhibitorische Wirkung ausübt. B16F10 Zellen, die sechs Tage mit 300 μM LPC inkubiert wurden, fanden hier Verwendung. Auch B16F10 Zellen, die 50 μg unfraktioniertes Heparin und die Kombination aus LPC Behandlung und Heparin erhalten hatten, wurden Adhäsionsuntersuchungen unterzogen. Dabei zeigten die LPC inkubierten B16F10 Zellen nur eine geringe inhibitorische Wirkung, die nicht signifikant verschieden von unbehandelten, stimulierten Zellen war. Ein ähnliches Bild ergab sich für B16F10 Zellen, die vor den Adhäsionsuntersuchungen mit 50 μg unfraktioniertem Heparin behandelt wurden. Allerdings konnte eine geringfügig stärkere Inhibition beobachtet werden als bei den LPC inkubierten B16F10 Zellen.

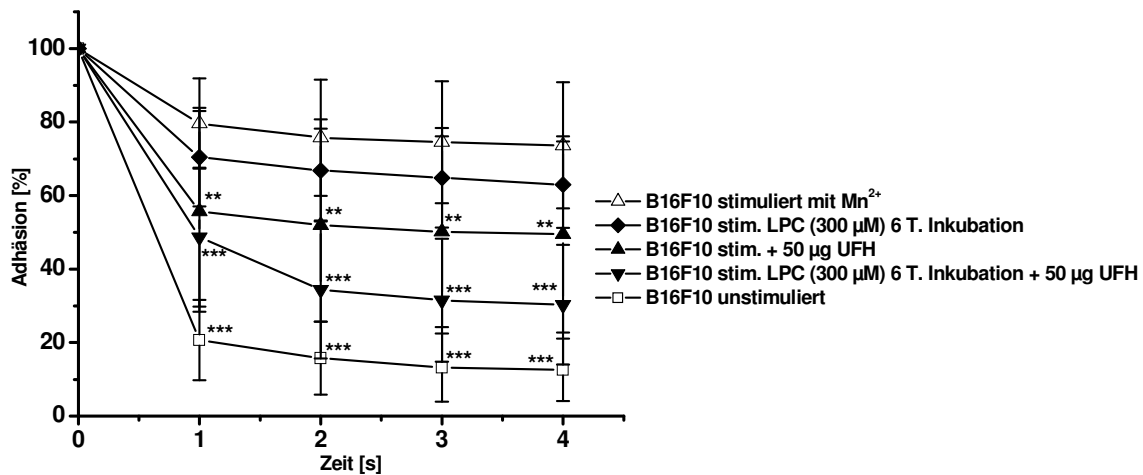


Abbildung 4.38: Untersuchung der Wirkung von LPC Inkubation und unfraktioniertem Heparin auf die VLA-4/VCAM-1-Interaktion. Durch den Einsatz nicht inhibitorisch wirkender Konzentrationen von Heparin (50 µg) und LPC (450 µM für sechs Tage) konnte eine additive Wirkung von LPC und Heparin detektiert werden.

Eine Kombination aus LPC Inkubation und Heparin Behandlung in den bereits genannten Konzentrationen und Zeiträumen zeigte hingegen eine Summierung der beiden Einzeleffekte (s. Abbildung 4.38). Vier Sekunden nach Starten des Durchflusses war die Adhäsion durch Kombination der beiden Agenzien um 50 % reduziert, verglichen mit den unbehandelten, stimulierten Zellen. Verglichen mit den Effekten der Einzelkomponenten (Heparin Reduktion um ca. 30 %, LPC Inkubation um ca. 10 %) deuten die hier beobachteten Effekte nicht nur auf eine einfache Synergie, sondern sogar auf additiv-synergistische Effekte hin.

4.2.7 Beeinflussung des VLA-4/VCAM-1-Bindungsweges von MV3 Melanomzellen durch LPC unter physiologischen Flussbedingungen

Wie bereits dargelegt, hat eine LPC Inkubation von 450 µM einen starken Einfluss auf die Adhäsion der murinen Melanomzelllinie B16F10. Um zu bestimmen, ob die detektierten Effekte nur zelllinienspezifischer Natur waren oder sich darüber hinaus auch auf Melanomzellen unterschiedlicher Spezies übertragen lassen, wurden in einem nächsten Schritt VLA-4 positive MV3 Melanomzellen humanen Ursprungs untersucht. Bei rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte, wie schon in Kapitel 4.2.4.2 dargestellt, auch bei diesen Zellen nach LPC Inkubation mit 450 µM eine verstärkte Filopodien Bildung beobachtet werden. Infolgedessen wurden MV3 Zellen mit 450 µM LPC für verschiedene Zeiträume inkubiert und anschließend Adhäsionsuntersuchungen unter physiologischen Flussbedingungen unterzogen. Wie in Abbildung 4.39 ersichtlich ist, hatte

eine LPC Inkubation von 24 Std. eine Reduktion der Adhäsion an VCAM-1 zur Folge. Mit fortdauernder Inkubationszeit konnte dieser Effekt noch auf das Niveau unstimulierter MV3 Zellen gesteigert werden.

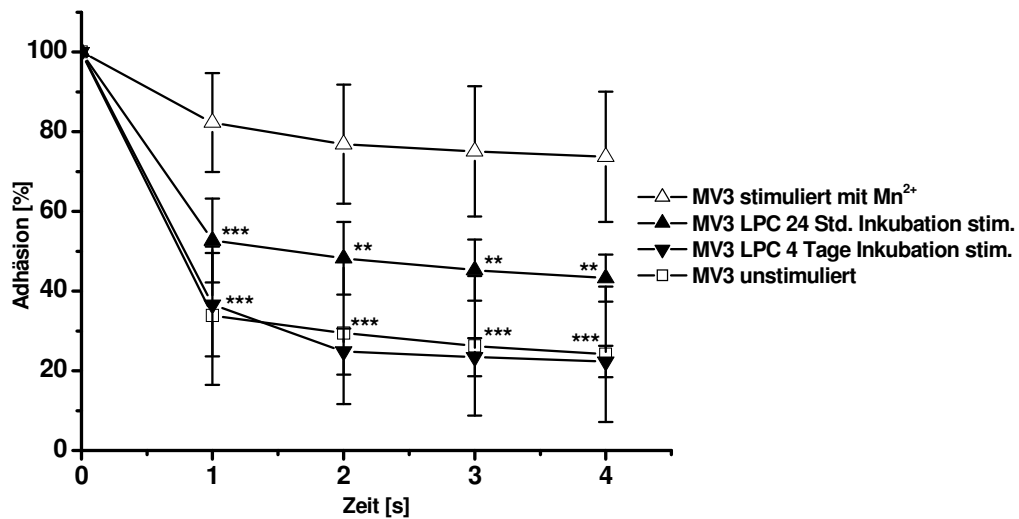


Abbildung 4.39: Einfluss der Inkubationszeit auf das Adhäsionsverhalten der MV3 Zellen. Nach 24 Std. Inkubation mit 450 μ M LPC wurde eine Reduktion der Adhäsion ersichtlich. Durch fortdauernde Inkubation wurde die Adhäsion weiter minimiert.

Ob diese Effekte wie bei den B16F10 Zellen reversibler Natur sind, wurde durch den Entzug des LPC haltigen Mediums und anschließend durchgeführte Adhäsionsuntersuchungen getestet. Auch wurde ebenfalls der Einfluss von Hexadecylphosphocholin (HePC) auf die VLA-4-vermittelte Adhäsion untersucht. Wie in Abbildung 4.40 dargestellt, kam es durch eine LPC Inkubation von vier Tagen und einen sich daran anschließenden LPC Entzug von 24 Std. zu einer Zunahme der Adhäsion bis nahezu auf das Niveau der unbehandelten, stimulierten MV3 Zellen.

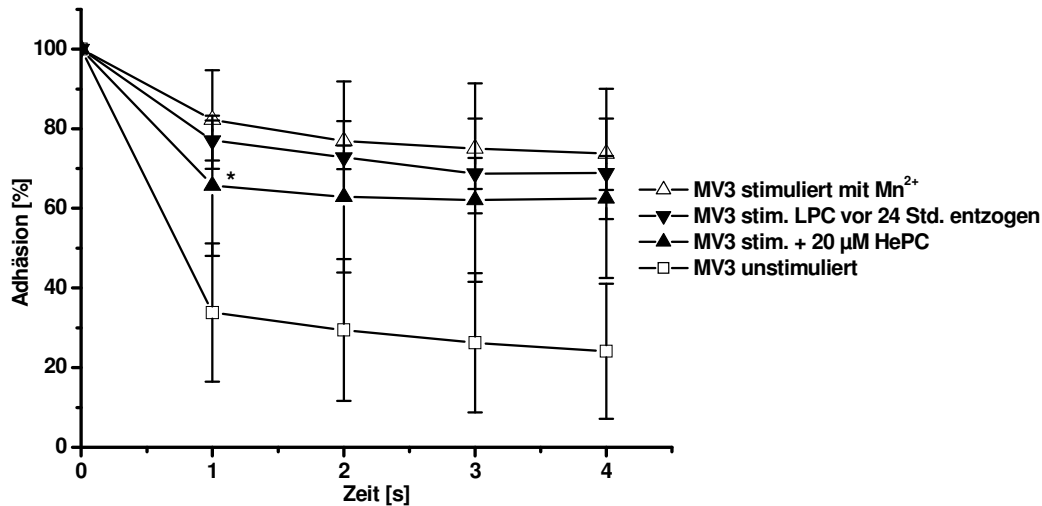


Abbildung 4.40: Einfluss des LPC Entzuges auf die Adhäsion von MV3 Zellen. Nach 24 Std. der LPC Entziehung war ein Ansteigen der Adhäsion auf das Level unbehandelter Zellen zu verzeichnen. Eine Behandlung der Zellen mit 20 µM HePC führte zu einer Reduzierung der Adhäsion.

Die Behandlung der MV3 Melanomzellen mit HePC in einer Konzentration von 20 µM zeigte eine Abnahme der VLA-4-vermittelten Adhäsion, allerdings war der Unterschied nur nach einer Sekunde nach Starten des Durchflusses signifikant verschieden von unbehandelten, stimulierten Zellen. LPC und HePC scheinen also auch bei dieser Zelllinie Adhäsionsrezeptoren in ihrer Funktion zu inhibieren. Die bei den murinen B16F10 Melanomzellen beobachteten Effekte lassen sich somit auch auf andere Zelllinien übertragen.

4.2.8 Untersuchung des Transkriptom von MV3 Melanomzellen nach LPC Inkubation mittels Genexpressionsanalyse

Die beschriebenen Aktivitäten des LPC auf die Integrinfunktion offensichtlich durch membranäre Effekte deuten auf eine komplexe Beeinflussung vielfältiger Signalwege der Zellen hin. Eine orientierende Information über beeinflusste pathways sollte eine Untersuchung der Genexpression von Melanomzellen nach LPC Behandlung liefern. Dafür wurde die Mikrochip Technologie der Firma Illumina verwendet. So war eine umfassende Analyse des gesamten Transkriptom von LPC behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen möglich. Eine punktuelle Betrachtung einzelner Gene mittels quantitativer Echtzeit-PCR konnte so vermieden werden.

Da nur humane Mikrochips zur Verfügung standen, wurde statt der murinen Zelllinie B16F10 auf die humane Melanomzelllinie MV3 zurückgegriffen. MV3 Zellen zeigen eine ähnliche Reaktion auf LPC Behandlung wie B16F10 Zellen, weshalb dies zulässig war. Durch die

Analysen sollten einerseits die Auswirkungen verschiedener LPC Konzentrationen auf die Genexpression analysiert werden, andererseits sollten auch verschiedene Inkubationszeiträume untersucht werden. Daher wurden MV3 Zellen für drei bzw. sieben Tage mit jeweils 300 μM bzw. 450 μM LPC inkubiert. Da sich auch während des normalen Zellwachstums eine Veränderung der Genexpression ergeben kann, z. B. bei zunehmender Konfluenz durch vermehrte Bildung von Zell-Zell-Kontakten, wurden für die genannten Zeiträume zusätzlich unbehandelte MV3 Zellen analysiert. Zur besseren Übersicht sind die Versuchsansätze in Kapitel 3.14 tabellarisch dargestellt.

Analysiert wurden jeweils Triplikate der einzelnen Ansätze, wobei jeweils behandelte und unbehandelte Zellen miteinander verglichen wurden, so dass insgesamt vier Vergleiche resultierten. Durch die Software detektiert wurden jeweils die Gene, die um den Faktor 1,5 im Vergleich zu den unbehandelten Zellen dereguliert waren. Im Ergebnis ergaben sich 32 Gene, die jeweils in allen vier Vergleichen dereguliert waren. Dabei konnte für 18 Gene eine verstärkte Expression und für 14 Gene eine verminderte Expression ermittelt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit soll nur auf die Gene eingegangen werden, die in unmittelbarem Zusammenhang mit Integrinen stehen oder solche, die einen Einfluss auf die Formation des Zytoskeletts vermitteln.

In Abbildung 4.41 exemplarisch dargestellt ist die Expression der Proteine Rho A und B als Vertreter der kleinen GTPasen. Die Proteine der Rho Familie sind maßgeblich an der Organisation und Formation des Aktinzytoskeletts beteiligt²⁵⁶. So konnte sowohl für Rho A, als auch für Rho B nach beiden LPC Inkubationszeiträumen eine verminderte Expression detektiert werden. Bei genauerer Betrachtung der in Abbildung 4.41 dargestellten Heatmaps fällt auch eine Konzentrationsabhängigkeit der Expression auf. So waren die Effekte für MV3 Zellen, die mit 450 μM LPC inkubiert wurden, stärker ausgeprägt als für Zellen, die eine physiologische LPC Konzentration von 300 μM erhielten.

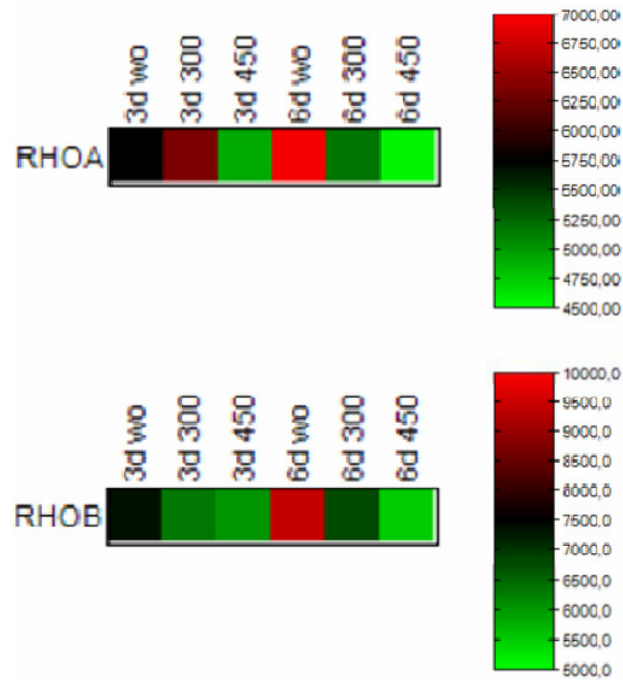


Abbildung 4.41: Heatmap Analyse der Genexpression von Rho A und B nach Inkubation der MV3 Melanomzellen mit LPC. Die Untersuchungen wurden an MV3 Zellen durchgeführt, die drei (3d) bzw. sechs (6d) Tage mit 300 μ M (300) bzw. 450 μ M (450) LPC inkubiert wurden. Durch Vergleich mit unbehandelten Zellen (wo = without) kann auf die Expression geschlossen werden. In rot dargestellte Felder zeigen allgemein eine verstärkte Transkription des entsprechenden Gens an, während grüne Felder eher für eine verringerte Transkription sprechen. Durch Vergleich der Farbe des jeweiligen Feldes mit den im rechten Bildteil dargestellten Farbskalen kann auf die Transkriptionsintensität des jeweiligen Gens geschlossen werden. Durch anschließenden Abgleich von LPC behandelten mit unbehandelten Ansätzen kann eine Deregulierung quantifiziert werden. Eine verminderte Expression sowohl von Rho A und B konnte für beide Inkubationszeiträume und Konzentrationen detektiert werden.

Im Kontext einer verstärkten Aktin Nucleation und der damit einhergehenden vermehrten Bildung von Filopodien scheinen diese Resultate eher widersprüchlich. So wäre eine verstärkte Expression von Rho A bzw. B zu erwarten gewesen. Allerdings kann mit der hier beschriebenen Methode der Genexpressionsanalyse nicht auf die Aktivitäten der untersuchten Proteine geschlossen werden. So kann eine verminderte Expression durch eine erhöhte Aktivität kompensiert werden. Auch könnte die verringerte Expression von Rho A und B im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus verstanden werden, in dem die überhöhte Aktivität durch die verminderte Expression eben dieser Proteine nivelliert wird.

Allerdings könnte eine Reduktion von Rho A und B auch ursächlich für die verringerte Adhäsionsfähigkeit LPC behandelter Zellen sein, denn auch Proteine der Rho Familie sind maßgeblich an der Affinitäts- und Aviditätsregulation von Integrinen beteiligt³⁰²⁻³⁰⁵. So scheinen die Rho Proteine ein funktionelles Begegnungselement darzustellen, denn sowohl die Aktin Organisation als auch die Integrin Funktionalität werden über sie reguliert. Eine

GTPase Aktivitätsmessung LPC behandelter Zellen könnte teilweise Aufschluss über die hier postulierten Mechanismen bringen. Neben der Bestimmung der Rho Expressionslevel wurde auch die Expression der LPC Rezeptoren G2A und GPR4 determiniert. Es zeigte sich, dass beide Rezeptoren nur marginal exprimiert werden und daher als Targets respektive Ursache der hier beschriebenen Effekte ausscheiden. Routinemäßig fand auch eine Analyse der erhobenen Daten zur Expression des VLA-4 statt. Eine Bestimmung auf Proteinebene mittels Durchflusszytometrie zeigte keine oder nur sehr geringe Unterschiede in der Expression LPC behandelter bzw. unbehandelter B16F10 Zellen (s. Kapitel 4.2.3.1).

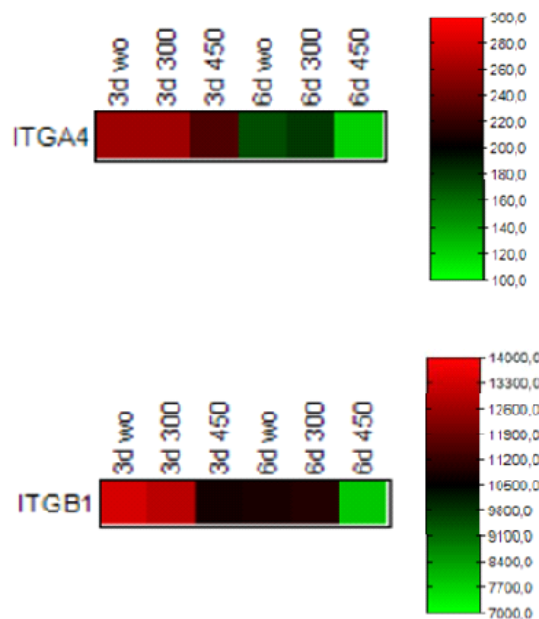


Abbildung 4.42: Heatmap Analyse der Genexpression der α_4 - (ITGA4) und β_1 -Untereinheiten (ITGB1) des Integrins VLA-4. Die Untersuchungen wurden an MV3 Zellen durchgeführt, die drei (3d) bzw. sechs (6d) Tage mit 300 μ M (300) bzw. 450 μ M (450) LPC inkubiert wurden. Durch Vergleich mit unbehandelten Zellen (wo = without) kann auf die Expression geschlossen werden. In rot dargestellte Felder zeigen allgemein eine verstärkte Transkription des entsprechenden Gens an, während grüne Felder für eine verringerte Transkription sprechen. Durch Vergleich der Farbe des jeweiligen Feldes mit den im rechten Bildteil dargestellten Farbskalen kann auf die Transkriptionsintensität des jeweiligen Gens geschlossen werden. Durch anschließenden Abgleich von LPC behandelten mit unbehandelten Ansätzen kann eine Deregulierung quantifiziert werden. Nur eine LPC Inkubation mit 450 μ M LPC für sechs Tage zeigte eine verminderte mRNA Menge sowohl für die α_4 - als auch für die β_1 -Untereinheiten.

Auf mRNA Ebene zeigten sich auch nur geringe Unterschiede in der Transkriptmenge von α_4 - (ITGA4) und β_1 -Untereinheiten (ITGB1) (s. Abbildung 4.42). Bei LPC Inkubationszeiten von drei Tagen waren so gut wie keine Unterschiede detektierbar. Bei Inkubationszeiträumen von sechs Tagen indes waren Unterschiede nur für LPC Konzentrationen von 450 μ M

konstatierbar. Hier kam es zu einer Herabregulation der Expression um maximal 20-30 %, sowohl für die α_4 - als auch für die β_1 -Untereinheiten.

Da auf Proteinebene auch nur äußerst geringe Unterschiede in der VLA-4-Expression festgestellt werden konnten und eine Bindung des löslichen, physiologischen Liganden VCAM-1 auch kaum eingeschränkt war, können die stark ausgeprägten Einflüsse der LPC Inkubation auf die Adhäsion der MV3 Zellen an VCAM-1 unter Flussbedingungen nicht mit einer verminderten Expression der VLA-4 Untereinheiten erklärt werden. Möglicherweise trägt die leichte Reduktion der Expression marginal zu den beobachteten Effekten bei. Die Hauptursache der verminderten Adhäsion dürfte in anderen Mechanismen begründet liegen.

4.2.9 In vivo Untersuchung des LPC Effektes auf B16F10 Melanomzellen in einem Mausmodell

Um die in vitro beobachteten LPC-vermittelten Effekte auf ihre physiologische Relevanz in vivo zu überprüfen, wurde ein Mausmodell zur Simulation der hämatogenen Metastasierung etabliert. Die Details der Versuchsdurchführung werden in Kapitel 3.15 beschrieben. Neben einer Kontrollgruppe, der unbehandelte B16F10 Melanomzellen administriert wurden, wurden einer Verumgruppe B16F10 Zellen injiziert, die zuvor für zehn Tage mit 450 μM LPC inkubiert worden waren. Einer weiteren Mausgruppe wurden B16F10 Zellen gespritzt, die vorher zwei Tage einer Konzentration von 300 μM LPC ausgesetzt waren. Neben der LPC Wirkung wurde in einem weiteren Versuchsteil zusätzlich die Kombination mit unfraktioniertem Heparin (50 IU) untersucht, welches den Versuchstieren 30 min vor Tumorzellapplikation i. v. injiziert wurde. Die verwendeten B16F10 Zellen hatten zuvor eine Inkubation mit 450 μM LPC für zehn Tage erhalten. Hierbei sollten synergistische Effekte zwischen LPC und Heparin in vivo untersucht werden. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden einer weiteren Mauskohorte unbehandelte B16F10 Zellen injiziert, 30 min nach Heparininjektion. Nach Beendigung des Versuchs und Analyse der Lungen hinsichtlich pulmonaler Metastasen mithilfe eines Luciferase Assays ergab sich das in Abbildung 4.43 illustrierte Resultat.

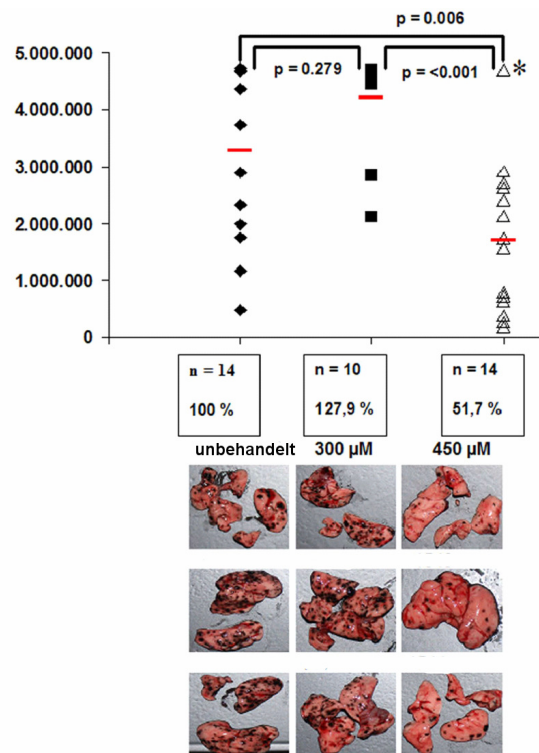


Abbildung 4.43: Quantifizierung der pulmonalen Metastasen der Versuchstiere. Im oberen Teil ist die Luciferase Aktivität der Lungen Homogenate der Versuchstiere zu erkennen, dargestellt als Dotplot. Eine stark verminderte Luciferase Aktivität war für die Gruppe zu erkennen, der 450 µM LPC behandelte Zellen injiziert worden waren. Diese Ergebnisse wurden optisch anhand der präparierten Lungen bestätigt (unterer Teil der Abbildung). n = Zahl der Tiere pro Gruppe.

Durch die Behandlung der B16F10 Zellen mit 300 µM LPC für zwei Tage kam es nicht zu einer Verringerung der Zahl pulmonaler Metastasen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte sogar eine Zunahme der Luciferase Aktivität um 28 % detektiert werden. Diese Unterschiede waren allerdings nicht signifikant. Durch die Langzeitbehandlung der B16F10 Zellen mit 450 µM LPC für zehn Tage war hingegen eine Abnahme um 50 % der Zahl der Metastasen im Vergleich zur Kontrollgruppe zu verzeichnen. Eindrucksvoll ist dieses Resultat in Abbildung 4.43 anhand der drei exemplarisch aufgeführten Lungensektionen zu erkennen. Eine stark verminderte Zahl an Metastasen weisen die Lungen der Tiere auf, die mit 450 µM LPC inkubierte Zellen erhalten hatten. Diesen visuellen Eindruck belegt der im oberen Teil der Abbildung aufgeführte Dotplot.

Der Synergismus zwischen Heparin und LPC wurde in einem zweiten Versuchsteil analysiert. In Abbildung 4.44 als Balkendiagramm dargestellt, kam es durch Administration von 50 IU unfraktioniertem Heparin vor Tumorzellinokulation zu einer Abnahme der Luciferase Aktivität von 56 % im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Kombination aus LPC Inkubation (450 µM LPC für 10 Tage) der B16F10 Zellen und einer Heparin Injektion 30 min vor

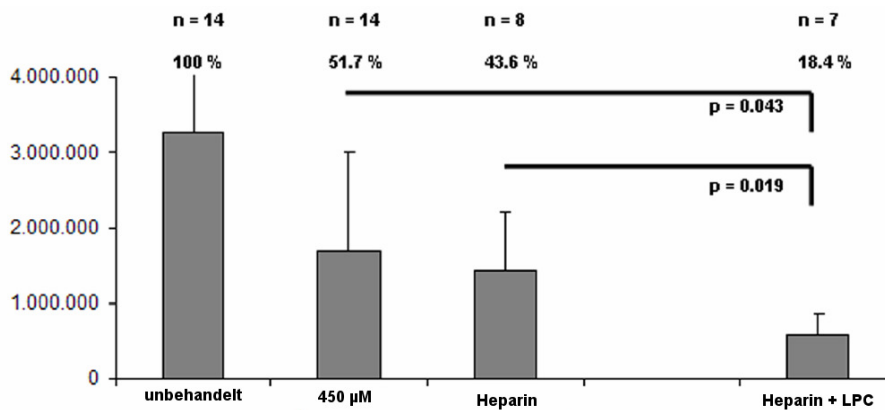


Abbildung 4.44: Quantifizierung der pulmonalen Metastasen der Versuchstiere. Durch eine Kombination aus LPC Inkubation (450 µM für 10 Tage) und einer Heparin Applikation 30 min vor Tumorzellinokulation konnte eine Reduktion der Metastasen um 80 % erreicht werden. Beide Substanzen wirken synergistisch.

Tumorzellinokulation hatte eine weitere deutliche Reduktion der Bildung von Metastasen um 80 % zur Folge. Die erhaltenen Werte unterschieden sich signifikant von denen, die bei den Untersuchungen der Einzelkomponenten erzielt wurden. Neben dem eindrucksvollen Beweis der antimetastatischen LPC Wirkung in vivo reflektiert sich auch der in vitro nachgewiesene Synergismus zwischen beiden Agenzien. Für den Beweis eines additiven Synergismus müssten jedoch weitere Experimente erfolgen.

4.2.10 Verallgemeinerung des LPC Effektes auf verschiedene Tumorentitäten

Nachdem auch in einem in vivo Modell bestätigt werden konnte, dass der LPC-vermittelte Einfluss auf die Funktionalität von Adhäsionsrezeptoren und die Morphologie von Melanomzellen zu einer Reduktion der Metastasierung führt, sollten die beobachteten Effekte nun auch auf andere Tumorentitäten übertragen werden. Folglich wurden zwei Pankreastumorzelllinien (AsPC-1 und MIA PaCa-2) und eine Lymphomzelllinie (U937) in die Untersuchungen einbezogen.

Mithilfe der Durchflusszytometrie konnte gezeigt werden, dass sowohl AsPC-1 als auch MIA PaCa-2 Zellen kein VLA-4 exprimieren. Jedoch konnte eine Expression von P- und L-Selektin-Liganden konstatiert werden. Damit sind diese Zelllinien im initialen Schritt der hämatogenen Metastasierung befähigt, eine Interaktion mit Thrombozyten einzugehen (s. Kapitel 2.2.6). Daher wurde der Einfluss der LPC Inkubation auf die Thrombozyten-Interaktion durchflusszytometrisch untersucht.

Zuvor wurden die MIA PaCa Tumorzellen für drei Tage mit 450 µM LPC behandelt. In Abbildung 4.45 sind die für MIA PaCa-2 erhaltenen Daten graphisch dargestellt. Ruhende

Thrombozyten zeigten eine fast identische Bindung an LPC behandelte und unbehandelte MIA PaCa-2 Zellen. Durch eine Stimulation der Thrombozyten mit TRAP-14 und einer damit verbundenen Präsentation von P-Selektin und Aktivierung weiterer Adhäsionsrezeptoren auf der Zelloberfläche der Thrombozyten kam es zu einer verstärkten Bindung an die Tumorzellen. Hier war die Bindung an LPC behandelte MIA PaCa-2 Zellen signifikant verringert. Durch den Einsatz eines Antikörpers gegen P-Selektin konnte die Bindung der unbehandelten MIA PaCa-2 Zellen ebenfalls vermindert werden, die der LPC inkubierten Zellen allerdings nicht. Somit kann angenommen werden, dass die Interaktion zwischen Tumorzellen und Thrombozyten zu einem gewissen Teil P-Selektin-vermittelt ist. Der Einsatz eines Kontroll-Antikörpers, der kein Epitop auf Tumorzellen oder Thrombozyten erkennt, hatte keinen Einfluss auf die Interaktion. Der Einsatz von 100 µg unfraktioniertem Heparin indes konnte die Interaktion von Thrombozyten sowohl mit LPC behandelten als auch unbehandelten Zellen deutlich reduzieren. Auch bei den hier untersuchten Effekten scheinen LPC und Heparin synergistisch zu wirken. Heparin entfaltet einen Teil seiner Wirkung über eine Blockade von P-Selektin.

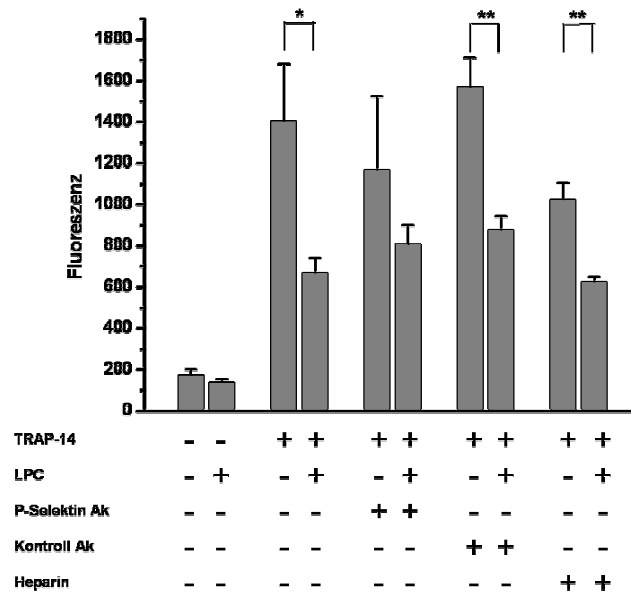


Abbildung 4.45: Interaktion von LPC behandelten und unbehandelten MIA PaCa-2 Pankreastumorzellen mit Thrombozyten. Eine LPC Inkubation vermochte die Bindung zwischen Thrombozyten und Tumorzellen signifikant zu verringern, dies geschah teilweise durch eine Inhibition des thrombozytären P-Selektin. Auch 100 µg unfraktioniertes Heparin konnte die Thrombozyt-Tumorzell-Interaktion vermindern. Die bei den jeweiligen Teilversuchen eingesetzten Reagenzien sind unter den Balken durch „+“ gekennzeichnet.

In weiteren Analysen wurde der LPC Einfluss auf die Wechselwirkung von Thrombozyten mit AsPC-1 Zellen analysiert. Die AsPC-1 Pankreastumorzellen hatten zuvor eine zweitägige

LPC (450 μ M) Inkubation erfahren. Wie in Abbildung 4.46 ersichtlich ist, konnte eine LPC Inkubation die Interaktion mit aktivierten Thrombozyten minimieren, allerdings waren die detektierten Unterschiede nicht signifikant. Durch den Einsatz eines Antikörpers gegen P-Selektin wurde die Interaktion der LPC behandelten als auch der unbehandelten Zellen mit Thrombozyten reduziert. Gleichwohl führte auch der Einsatz eines Kontroll-Antikörpers zu ähnlichen Reduzierungen der Bindung. Der Einsatz von 100 μ g unfraktioniertem Heparin zur Überprüfung, ob ein synergistischer Effekt zwischen LPC Inkubation und Heparin besteht, zeigte keine Wirkung. Für eine umfassende Untersuchung potentieller Synergismen zwischen LPC Behandlung und Heparin bei dieser Tumorzelllinie müssen noch weitergehende Experimente durchgeführt werden, die in diesem Rahmen der Arbeit nicht berücksichtigt wurden.

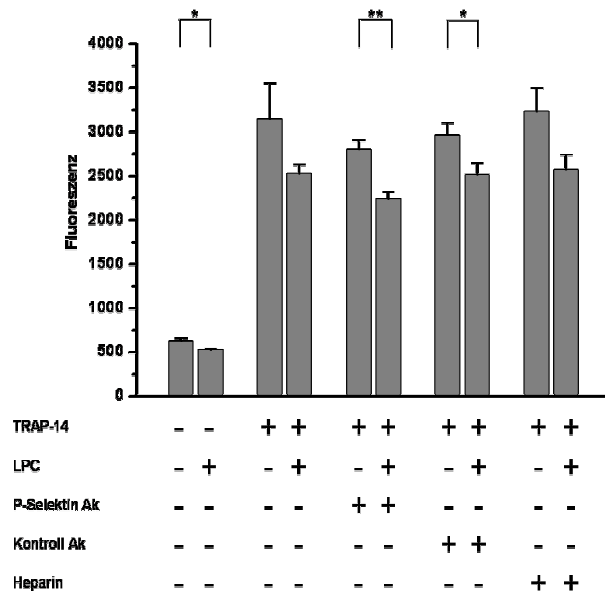


Abbildung 4.46: Interaktion von LPC behandelten und unbehandelten AsPC-1 Pankreastumorzellen mit Thrombozyten. Eine LPC Inkubation vermochte die Bindung zwischen Thrombozyten und Tumorzellen zu mindern, was teilweise durch eine Inhibition des thrombozytären P-Selektin geschah. Ein potentiell vorhandener Synergismus zwischen Heparin und LPC Behandlung konnte hier nicht nachgewiesen werden. Die bei den jeweiligen Teilversuchen eingesetzten Reagenzien sind unter den Balken durch „+“ gekennzeichnet.

Neben der Untersuchung der LPC-vermittelten Wirkung auf Zellen solider Tumore sollte auch die Wirkung auf Tumore lymphozytären Ursprungs untersucht werden. Dazu wurde die aus einem Non-Hodgkin-Lymphom abgeleitete Suspensionszelllinie U937 verwandt.

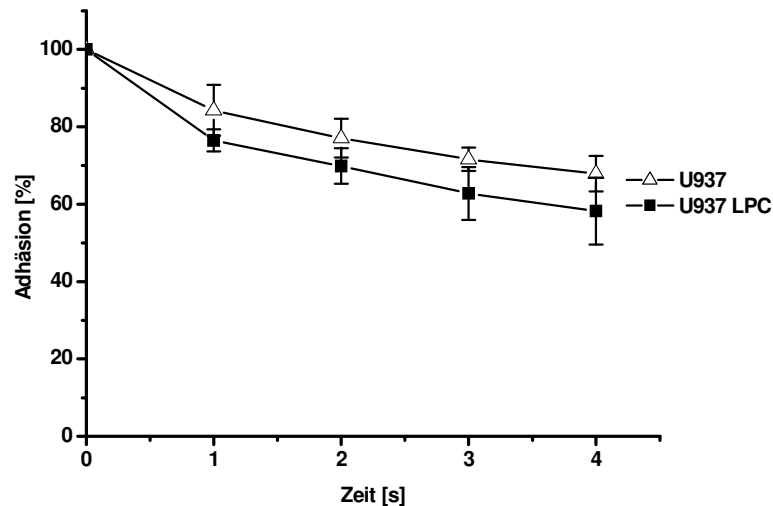


Abbildung 4.47: Einfluss der LPC Inkubation (450 μ M für 24 Std.) auf die Wechselwirkung von U937 Zellen mit rekombinantem P-Selektin. Durch die Inkubation kam es zu einer geringen Abnahme der Adhäsion der U937 Zellen an P-Selektin.

Da U937 Zellen bekanntermaßen PSGL-1 auf ihrer Membran exprimieren, wurde die Interaktion dieser Zellen mit immobilisiertem P-Selektin unter physiologischen Flussbedingungen untersucht³⁰⁶. Durch Inkubation der Zellen für 24 Std. mit 450 μ M LPC konnte eine geringe Reduktion der Adhäsion detektiert werden (s. Abbildung 4.47). Die Rollgeschwindigkeiten der behandelten und unbehandelten Zellen auf P-Selektin waren durch die LPC Inkubation nicht beeinflusst. Diese nur schwach ausgeprägten Effekte deuten darauf hin, dass entweder das räumlich ausgedehnte PSGL-1 durch zu erwartende LPC Membraneffekte (Filopodien) wenig beeinflusst wird, weiterhin sind Selektin-Ligand-Bindungen nicht von komplexen Signalwegen wie im Falle der Integrine gesteuert.

Es lässt sich verallgemeinern, dass die an Melanomzellen erhobenen Effekte des LPC offensichtlich auch bei Zellen anderer Tumorentitäten zum Tragen kommen. Eine genaue Analyse bedarf der Kenntnisse der vorherrschenden Adhäsionsmaschinerie der Zellen. Weitere Untersuchungen hinsichtlich verschiedener LPC Konzentrationen und Inkubationszeiten, sowie morphologische Untersuchungen sollten folgen. Ebenso sollte die Relevanz der LPC Wirkung in in vivo Metastasierungsmodellen kritisch überprüft werden.

4.3 Untersuchung des Einflusses von Histon-Deacetylase-Inhibitoren auf die Adhäsionswirkung verschiedener Krebszelllinien als potentiell antimetastatischer Therapieansatz

4.3.1 Beeinflussung des VLA-4/VCAM-1-Bindungsweges von MV3 Zellen durch verschiedene Inkubationszeiten und verschiedene Konzentrationen an TSA/ST71 und HDACi x

Das Integrin VLA-4 spielt, wie in vorangegangenen Kapiteln umfassend erläutert, eine Schlüsselrolle bei der Metastasierung der Melanomzelllinien MV3 und B16F10. Eine Inhibition der extrazellulären Domäne des VLA-4 durch verschiedene Heparin Derivate sowie auf membranärer Ebene durch LPC konnte in den vorherigen Kapiteln dargelegt werden.

Eine weitere Möglichkeit zur Inhibition der Integrinwirkung könnte auf intrazellulärer Ebene erfolgen. Dabei sollen verschiedene Schlüsselenzyme, die in Zusammenhang mit einer Integrinaktivierung beschrieben sind, im Mittelpunkt stehen. Dadurch können einerseits weitere therapeutische Ansätze gefunden werden, andererseits soll eine Charakterisierung der MV3 Melanomzelllinie hinsichtlich intrazellulärer Signalkaskaden und deren Inhibition erfolgen.

Histon-Deacetylase-Inhibitoren (HDACi) werden seit einigen Jahren intensiv als potentielle Wirkstoffe in der Tumorthherapie untersucht. Da das Gebiet der HDACs und deren antimetastatisches Potential auf Adhäsionsrezeptorebene bisher kaum erforscht ist, wurde zunächst der Pan-HDACi Trichostatin A (TSA) auf seine Wirkung zur Hemmung der VLA-4-vermittelten Zelladhäsion untersucht. In Voruntersuchungen wurde mittels MTT Assay die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) des TSA auf die MV3 Zellen bestimmt, wobei ein $\log(IC_{50})$ -Wert von -6,5 ermittelt wurde. Die Zellen wurden infolgedessen mit einer subtoxischen Konzentration von $10^{-7.5}$ M TSA versetzt und Adhäsionsuntersuchungen unter physiologischen Flussbedingungen unterzogen. Dabei wurde der TSA-vermittelte Einfluss auf den VLA-4/VCAM-1-Bindungsweg analysiert.

Vor Versuchsbeginn wurden die Zellen 72 bzw. 96 Std. mit TSA inkubiert. Da evtl. ein supprimierender Einfluss auf die Expression der Adhäsionsrezeptoren resultierte, wurden diese Inkubationszeiten gewählt, um den Abbau funktionsfähiger Moleküle und deren verminderte Nachbildung zu gewährleisten und den resultierenden Effekt zu quantifizieren.

Es zeigte sich eine Inhibition der Bindung der MV3 Zellen an immobilisiertes VCAM-1. Dieser Effekt war für eine 72stündige Inkubationsdauer stärker ausgeprägt als für eine 96stündige (s. Abbildung 4.48).

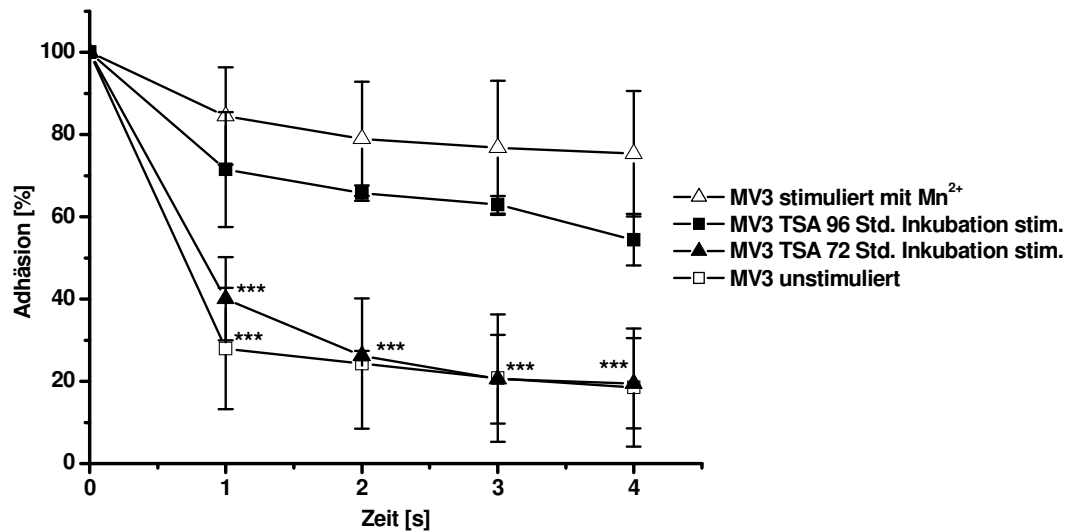


Abbildung 4.48: Einfluss der Inkubationszeit auf das Adhäsionsverhalten der MV3 Zellen unter TSA Inkubation an VCAM-1. Nach 72 Std. Inkubation war eine Reduktion der Adhäsion auf das Niveau unstimulierter MV3 Zellen ersichtlic. Durch fortdauernde Inkubation (96 Std.) fand eine Wiederherstellung der Adhäsion statt.

Über die Ursachen des Wiederanstiegs der Adhäsionsfähigkeit der MV3 Zellen kann nur spekuliert werden. Sollte die Expression intrazellulärer VLA-4-aktivierender Signalproteine durch TSA inhibiert worden sein, so könnte es durch verstärkte Expression anderer Moleküle zu einer VLA-4 Aktivierung kommen.

Um einen ersten Anhaltspunkt für die zugrundeliegenden Mechanismen zu bekommen, wurde ein selektiver HDAC 6 Inhibitor, synthetisiert im Arbeitskreis von Prof. Jung aus Freiburg, untersucht. HDAC 6 findet sich ausschließlich im Zytosol und ist an der Deacetylierung des Chaperon Proteins HSP90 beteiligt^{267,307}. HSP90 wiederum ist u. a. an der Formgebung der Proteinkinase B beteiligt, einem Enzym, das die Aktivierung von Integrinen vermitteln kann. So könnten genomische von zytosolischen HDAC-vermittelten Wirkungen getrennt betrachtet werden. Eine Inkubation der MV3 Zellen nach durchgeführtem Zytotoxizitätstest mit $10^{-5,5}$ M ST71 für 72 Std. und anschließenden Adhäsionsuntersuchungen zeigten allerdings keinen signifikant hemmenden Effekt (s. Abbildung 4.49). Somit scheint eine TSA-vermittelte HDAC 6 Inhibition als mögliche Ursache für die beobachtete Reduktion der Adhäsion auszuschließen.

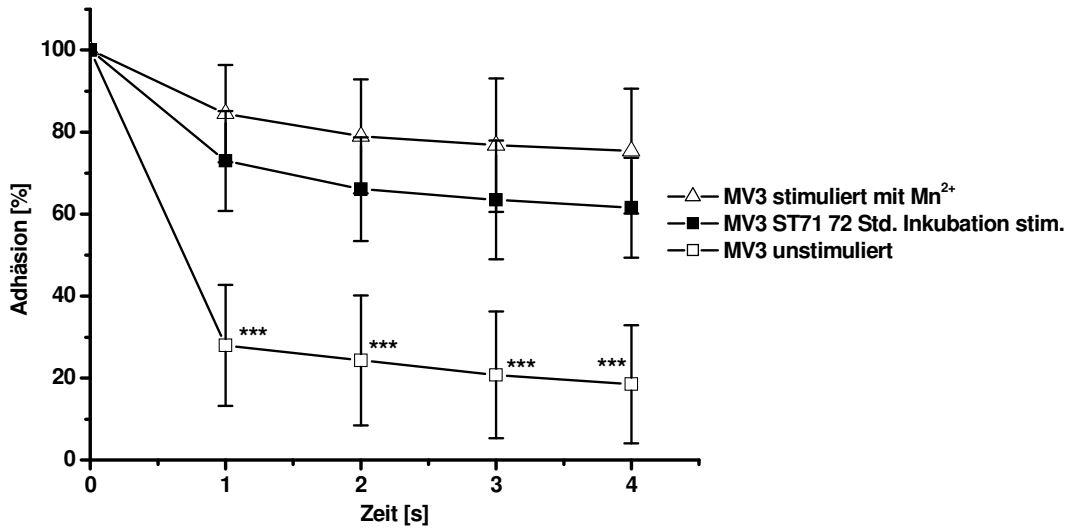


Abbildung 4.49: Einfluss des HDAC 6 selektiven Inhibitors ST71 auf das Adhäsionsverhalten der MV3 Zellen an VCAM-1. Eine geringe, nicht signifikante Reduktion der Adhäsion war erkennbar.

Zur Verifizierung der mit TSA beobachteten Effekte wurde ein sich in der klinischen Erprobung befindlicher Pan-HDACi, im Folgenden als HDACi x bezeichnet, in die Untersuchungen mit einbezogen. Nach durchgeführten MTT Assays wurde eine subtoxische Konzentration von 10 nM eingesetzt und es wurden Inkubationszeiten von 72 bzw. 96 Std. gewählt. Auch wurde zur Testung der Konzentrationsabhängigkeit eine Konzentration von 1 nM verwendet.

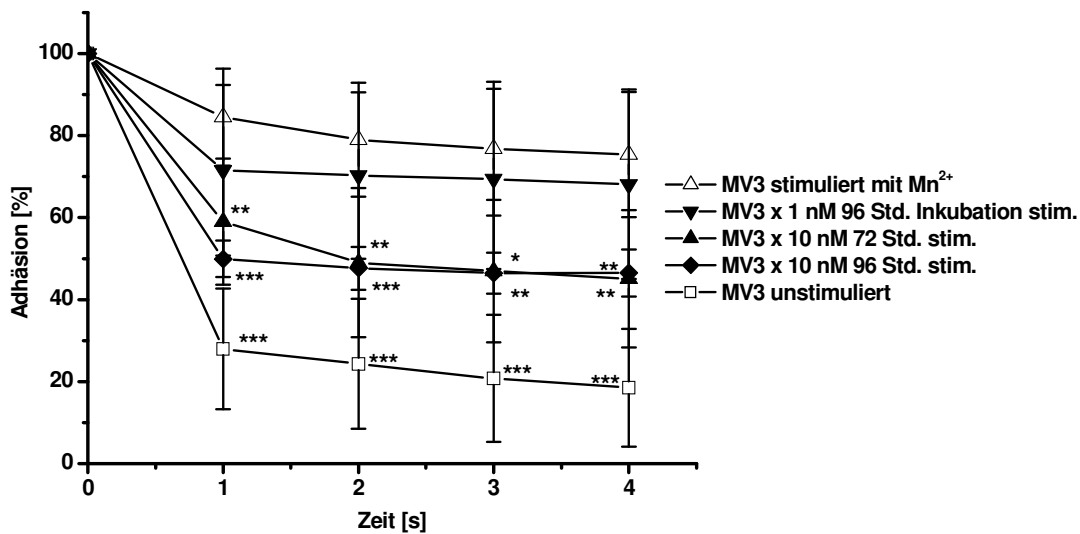


Abbildung 4.50: Einfluss des HDACi x (x) auf das Adhäsionsverhalten der MV3 Zellen an VCAM-1. Unterschiedlich lange Inkubationszeiträume zeigten keine Unterschiede in der vermittelten Inhibition. Konzentrationen von 1 nM wiesen keinen inhibitorischen Effekt mehr auf.

Wie in Abbildung 4.50 ersichtlich, kam es durch den Einsatz der 10 nM Konzentration sowohl nach 72 als auch nach 96 Std. zu einer signifikanten Verminderung der Adhäsion der MV3 Zellen an immobilisiertem VCAM-1. Die Inkubationsdauer vermittelte hier keine Unterschiede. Eine Inkubation mit einer Konzentration von 1 nM hingegen hatte keinen Einfluss auf die Bindung der MV3 Zellen. Der Schwellenwert für eine effektive Inhibition scheint also im niedrigen nanomolaren Bereich zwischen Konzentrationen von 1 und 10 nM zu liegen. Der für TSA konstatierte Effekt auf die Adhäsion lässt sich somit auch mit anderen Pan-HDACi herbeiführen. Eine selektive Inhibition von HDAC 6 hingegen hat keinen Einfluss auf die Adhäsion.

4.3.2 Einfluss von TSA/ST71 und HDACi x auf die Expression des Integrins VLA-4

Um zu überprüfen, ob die verminderte Adhäsion durch die beiden Pan-HDACi, TSA und HDACi x, auf einer erniedrigten Expression des VLA-4 der MV3 Zellen beruht, wurde eine durchflusszytometrische Quantifizierung durchgeführt. Dazu wurden MV3 Zellen mit oben genannten Konzentrationen der jeweiligen HDACi versetzt und für 72 Std. inkubiert. Da die Testung des HDACi x zu einem späteren Zeitpunkt mit einer neuen Charge fluoreszenzmarkiertem Antikörper durchgeführt wurde, war ein direkter Vergleich mit der Untersuchung der Expression des VLA-4 unter TSA und ST71 Einfluss nicht zulässig. Daher sind in Abbildung 4.51 zwei Balkendiagramme aufgeführt. Wie erwartet hatte ST71 keinen Einfluss auf die Expression, da es seine Wirkung vornehmlich im Zytosol ausüben sollte. Eine TSA Inkubation hingegen verursachte eine signifikant verstärkte Expression von VLA-4. Dieses Resultat lässt sich mit einer TSA-vermittelten, vermehrten Acetylierung der Histone erklären. Die Packungsdichte des Chromatin ist durch einen erhöhten Acetylierungsgrad erniedrigt, wodurch Polymerasen leichter binden und die Translation forcieren können. Allerdings sollte eine vermehrte VLA-4-Expression auch mit einer verstärkten Adhäsion an VCAM-1 korrelieren. Da dies nicht der Fall war, müssen den beobachteten Effekten andere, bislang unbekannte Mechanismen zu Grunde liegen. Diese könnten sich auf Expressionsebene aber auch posttranslational im Zytosol abspielen. Beispielsweise könnte die Funktion von Signalmolekülen durch ein verändertes Acetylierungsmuster eingeschränkt sein, wodurch nur noch eine verminderte VLA-4 Aktivierung möglich ist.

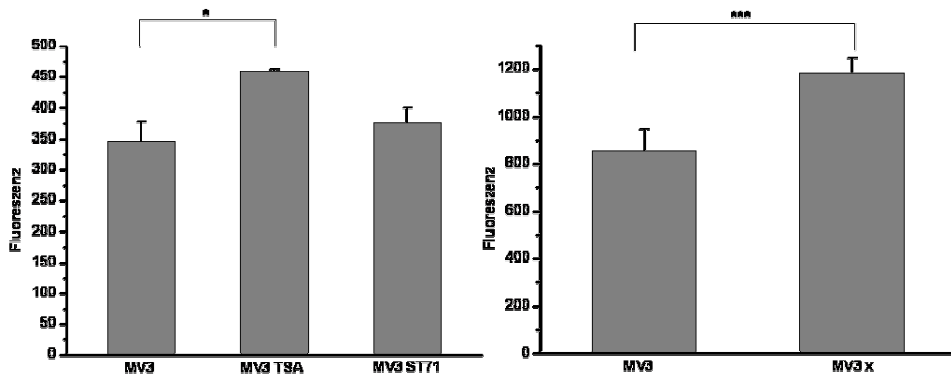


Abbildung 4.51: Durchflusszytometrische Bestimmung des Einflusses von TSA, ST71 und HDACi x auf die Expression von VLA-4. Durch TSA und HDACi x Inkubation war eine verstärkte VLA-4-Expression zu detektieren. ST71 hingegen hatte keinen Auswirkungen auf die Expression.

Auch für die Inkubation mit HDACi x war eine signifikant verstärkte VLA-4 -Expression zu detektieren. Es kommen wahrscheinlich auch hier die oben beschriebenen gleichen Mechanismen zum Tragen.

Die erwähnten Erklärungsansätze bedürfen weiterer Untersuchungen wie z. B. Genexpressionsanalysen, um den HDACi-vermittelten Einfluss auf die Translation zu spezifizieren. Auch sind Analysen einzelner, ausgesuchter Signalmoleküle auf acetylierungsbedingte Veränderungen der Proteinstruktur mittels SDS-Page denkbar.

4.3.3 Beeinflussung des VLA-4/VCAM-1-Bindungsweges von G361 Melanomzellen durch TSA und HDACi x

Zur Überprüfung der Übertragbarkeit der in Kapitel 4.3.1 beschriebenen HDACi-vermittelten Effekte auf die VLA-4 abhängige Adhäsion der MV3 Melanomzellen an VCAM-1 wurde eine weitere humane Melanomzelllinie verwandt. Wie in durchflusszytometrischen Analysen bestätigt werden konnte, exprimieren auch Melanomzellen der Linie G361 VLA-4. Daher wurden die Zellen nach Zytotoxizitätsbestimmungen sowohl mit TSA als auch mit HDACi x für 72 Std. mit Konzentrationen von 10^{-8} M inkubiert.

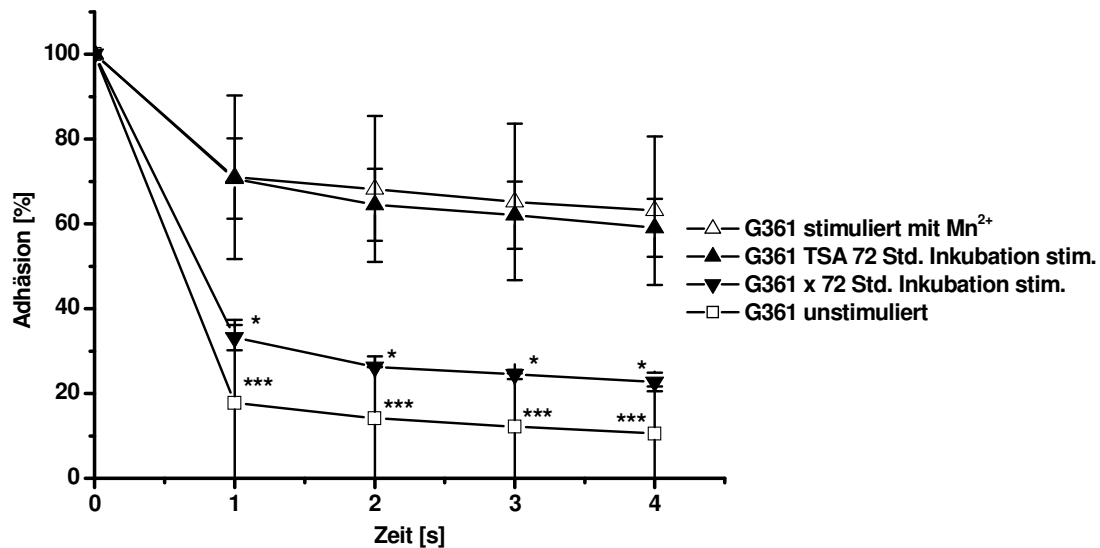


Abbildung 4.52: Einfluss der TSA und HDACi x (x) Inkubation auf die Adhäsion der humanen G361 Zellen an VCAM-1 unter physiologischen Flussbedingungen. HDACi x war in der Lage, die Adhäsion zu vermindern, wohingegen TSA keinen Einfluss ausübte.

Bei den anschließend durchgeführten Adhäsionsuntersuchungen unter Flussbedingungen zeigte sich eine signifikante Reduktion der Adhäsion nur für die HDACi x inkubierten Zellen (s. Abbildung 4.52). Die TSA Behandlung hat hingegen keinen Einfluss auf die VLA-4-vermittelte Adhäsion. Die Ursache könnte durch eine zu niedrig gewählte TSA Konzentration bedingt sein, wobei durch den Einsatz höherer Konzentrationen die Gefahr besteht, in einen für die Zellen toxischen Bereich zu gelangen. Auch ist denkbar, dass in den G361 Zellen andere intrazelluläre Signaltransduktionswege als in MV3 Zellen zur Aktivierung des VLA-4 vorhanden sind und diese nicht durch das TSA, wohl aber durch HDACi x inhibiert werden. Vergleichende Genexpressionsanalysen zwischen MV3 und G361 Zellen könnten hier Aufschluss bringen.

4.3.4 Inhibition von krebserrelevanten Schlüsselenzymen zur Beeinflussung des VLA-4/VCAM-1-Bindungsweges

Neben der Untersuchung des Einflusses von HDACi auf den VLA-4/VCAM-1-Bindungswege wurden weitere potentielle Schlüsselmoleküle im Kontext der VLA-4 Aktivierung analysiert. Dazu wurden niedermolekulare, sich in der klinischen Erprobung befindliche Inhibitoren eingesetzt. Auch hier können aus rechtlichen Gründe Namen und Strukturen nicht aufgezeigt werden. Daraus sollte einerseits eine Identifizierung weiterer Targets erfolgen, mit deren gezielter Beeinflussung eine Herabregulation der VLA-4 Integrinfunktion erreicht werden kann. Andererseits sollte eine weitere Charakterisierung der MV3 Melanomzelllinie auf

funktioneller Ebene erfolgen. Eine Analyse des gesamten Transkriptom der Zelllinie, wie in Kapitel 4.2.8 dargestellt, gibt zwar einen Aufschluss über den Expressionsstatus der Zellen, ermöglicht jedoch keine Aussagen über genutzte Signaltransduktionswege. Gerade vor dem Hintergrund der geringen Differenzierung von entarteten Zellen sind diese Informationen interessant.

Folgende Substanzen gegen folgende Targets wurden eingesetzt:

- Ein Inhibitor, der sowohl die Klasse der Phosphoinositol 3-Kinasen (PI3K) als auch mTOR (mammalian Target of Rapamycin) bindet und inhibiert. Für beide Enzyme konnte eine Beteiligung beim malignen Geschehen einer Krebserkrankung in zahlreichen Studien nachgewiesen werden^{308,309}.
- Ein Inhibitor, der nur mTOR inhibiert.
- Ein Inhibitor, der das Chaperon Molekül HSP90 inhibiert. HSP90 ist ubiquitär in Zellen vorhanden und u. a. an der Ausformung von Steroidrezeptoren und Transkriptionsfaktoren beteiligt. In vielen Krebszellen konnte eine Überexpression von HSP90 detektiert werden. Eine Inhibition führt zur Akkumulation falsch gefalteter, funktionsloser Proteine, die eine Apoptose der Zellen nach sich ziehen können³¹⁰.

Nach erfolgten Zytotoxizitätsbestimmungen der Substanzen wurden die Zellen für 72 Std. mit den jeweiligen Inhibitoren inkubiert. Wie in Abbildung 4.53 ersichtlich hatte keiner der Inhibitoren einen Einfluss auf die VLA-4-vermittelte Adhäsion.

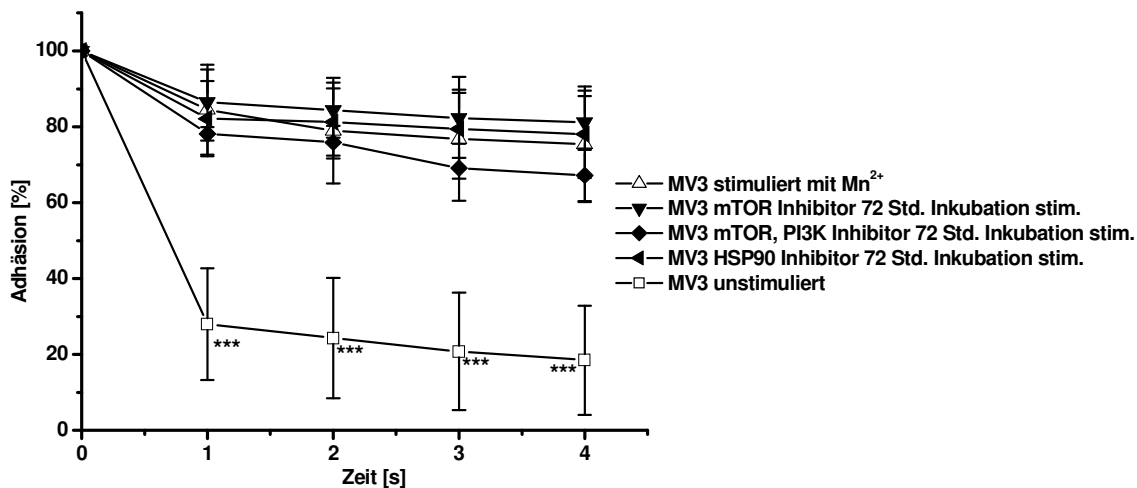


Abbildung 4.53: Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die Adhäsion der MV3 Melanomzellen an VCAM-1 unter physiologischen Flussbedingungen nach einer Inkubationszeit von 72 Std. Weder eine Blockade von mTor und PI3K noch von HSP90 hatte einen inhibierenden Einfluss auf die VLA-4-vermittelte Interaktion.

Die inhibierten Enzyme scheinen keine Auswirkungen auf die VLA-4-vermittelte Adhäsion von MV3 Melanomzellen an VCAM-1 zu haben. Für das Ausbleiben der Inhibition könnten natürlich eine falsch gewählte Inkubationszeit oder eine zu niedrige Konzentration der Inhibitoren ursächlich sein, die in dieser Arbeit nicht allumfassend geklärt werden konnten. Das Ausbleiben der Effekte könnte aber auch durch eine dynamische Anpassung der MV3 Zellen hinsichtlich ihrer „signal pathways“ verursacht sein. So könnten die MV3 Zellen auf eine Inhibition der PI3K für 72 Std. mit einer Kompensation der verlorenen Enzymaktivität reagieren. Eine Umgehung des PI3K Signalweges über andere, nicht inhibierte Kaskaden könnte eine Aktivierung des VLA-4 trotz PI3K Inhibition ermöglichen. Es wurden MV3 Zellen für kürzere Zeiträume mit dem PI3K Inhibitor versetzt, um Kompensationseffekten der Zellen vorzubeugen. Eine evtl. vorhandene inhibitorische Auswirkung auf die Zelladhäsion sollte so detektierbar sein. Inkubationszeiträume von 2 und 16 Std. zeigten allerdings auch keine Effekte auf die Adhäsion (s. Abbildung 4.54). Nach diesen preliminären Versuchen kann der PI3K Signalweg als mögliches Target zur Inhibition der VLA-4-vermittelten Adhäsion vorerst ausgeschlossen werden.

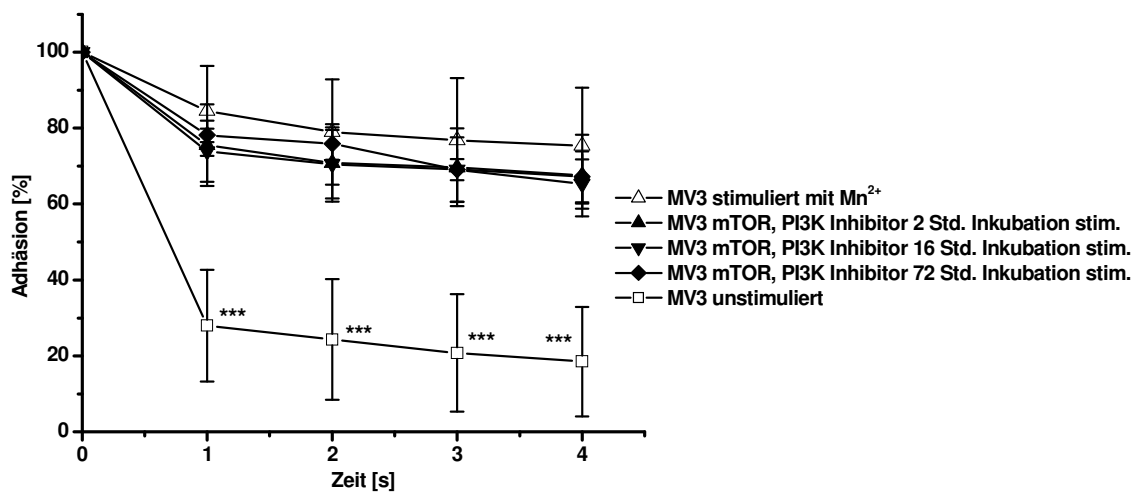


Abbildung 4.54: Einfluss der Inkubationszeit des kombinierten PI3K/mTOR Inhibitors auf die Adhäsion der MV3 Melanomzellen an VCAM-1 unter physiologischen Flussbedingungen. Nach keiner der angegebenen Inkubationszeiten war eine Reduktion der Adhäsion detektierbar.

Dies kann ebenfalls sowohl für den mTOR als auch für den HSP90 Inhibitor angenommen werden. So hatten nur Pan-HDACi einen Einfluss auf den VLA-4/VCAM-1-Bindungsweg. Erste orientierende Untersuchungen zur Beeinflussung der VLA-4 Aktivität auf intrazellulärer Signalebene mit HDACi ergaben somit erfolgversprechende Ansätze, die auch auf eine alternative Melanomzelllinie übertragen werden konnten. Zur Aufklärung der in MV3 Melanomzellen aktivierten Signalwege könnten in zukünftigen Untersuchungen weitere

niedermolekulare, selektive Inhibitoren zum Einsatz kommen. Bestätigungen hierfür sowie als alternativer Ansatz kann in der siRNA Technologie, mit der bestimmte Enzyme transient herabreguliert werden können, gefunden werden.

5 Zusammenfassung

Zellulären Adhäsionsrezeptoren wird im Prozess der hämatogenen Metastasierung eine entscheidende Rolle zuteil. So besteht, vermittelt durch P-Selektin, die Möglichkeit einer Ummantelung der Tumorzellen mit Thrombozyten, die neben einem Schutz vor Zellen des Immunsystems eine Voraussetzung für eine größenabhängige Restriktion der entstandenen Mikrothromben in den Kapillaren des Blutgefäßsystems darstellt. Auch bietet die Interaktion des Integrins VLA-4 auf Tumorzellen mit endotheliale VCAM-1 eine Möglichkeit zur Adhäsion von Tumorzellen an das Gefäßendothel mit anschließender Extravasation. Adhäsionsrezeptoren erweisen sich somit als aussichtsreiche Targets für eine therapeutische Intervention des Metastasierungsprozesses. Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der VLA-4/VCAM-1-Wechselwirkung, die exemplarisch an verschiedenen Melanomzellen untersucht wurde und den Möglichkeiten zu deren Inhibition. Durch Tierexperimente zur experimentellen Metastasierung konnte die pathophysiologisch bedeutende Rolle dieser Interaktion für den Metastasierungsprozess von Melanomzellen verdeutlicht werden. In dieser Arbeit wurden verschiedene Ansätze zur Inhibition verfolgt.

So wurde zunächst eine Blockade mit strukturell modifizierten, nicht antikoagulativ wirkenden Heparinderivaten untersucht. Dabei konnten klare Struktur-Wirkungs-Beziehungen ermittelt werden. Neben der Molekülgröße spielt auch der Sulfatierungsgrad eine entscheidende Rolle zur optimalen Inhibition. Damit sind nicht nur völlig neuartige Erkenntnisse zur Heparinwirkung entstanden, sondern zukünftig ist bei Kenntnis der Adhäsionsrezeptorausstattung der Tumorzellen eine längerfristige Applikation mit einem selektiv Adhäsionsrezeptor-blockierenden, nicht antikoagulativ wirkendem Heparin als therapeutische Option besser kalkulierbar.

Aufbauend auf ersten Erkenntnissen von antimetastatischen Wirkungen gesättigter Phospholipide wurde eine Inhibition des VLA-4/VCAM-1-Bindungsweges auf membranärer Ebene durch Applikation von Lysophosphatidylcholin erreicht. Dabei kamen sowohl der LPC Inkubationsdauer als auch der Konzentration eine entscheidende Bedeutung zu. Einhergehend mit Veränderungen der Membranzusammensetzung kam es zu einer starken morphologischen Verwandlung der Zellen mit Formation zahlreicher Filopodien, bedingt durch Reorganisationen des Zytoskeletts. Die festgestellte, deutliche Reduktion der Zelladhäsion über VLA-4 konnte durch in vivo Versuche mit Nachweis einer signifikanten Abnahme der Metastasierungsfähigkeit der verwendeten Melanomzellen nach LPC Behandlung eindrucksvoll bestätigt werden. Erste Einblicke in die molekularen Mechanismen durch „Gene Array“ Analysen ergaben Hinweise auf die Involvierung von GTPasen, die sowohl für

die Veränderung der Integrinfunktionalität als auch für die beobachteten Membraneffekte verantwortlich gemacht werden könnten. Damit wird erstmalig ein Erklärungsansatz geliefert, der noch weitreichende Möglichkeiten für eine pharmakologische Intervention liefert. Auch mithilfe weiterer, molekularbiologischer Techniken soll das therapeutische Potential des LPC Einsatzes weiter beleuchtet werden.

Auf intrazellulärer Ebene konnte der VLA-4/VCAM-1-Bindungsweg durch die Anwendung von Inhibitoren der Histon-Deacetylase effektiv gehemmt werden. Diese neue Wirkstoffklasse scheint nicht nur einen zytostatischen Effekt auf Tumore auszuüben, sondern auch den Prozess der Metastasierung zu beeinflussen.

So wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene neuartige Ansatzpunkte zur Prävention einer Adhäsionsrezeptor-vermittelten Metastasierung aufgezeigt, in ihren Mechanismen verfolgt und somit für potentielle therapeutische Ansatzpunkte offengelegt.

6 Literaturverzeichnis

1. Liotta, L.A., Kleinerman, J. & Saidel, G.M. Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation. *Cancer Res* **34**, 997-1004 (1974).
2. Mareel, M., Berx, G., Van Roy, F. & Bracke, M. Cadherin/catenin complex: a target for antiinvasive therapy? *J. Cell. Biochem* **61**, 524-530 (1996).
3. Swisshelm, K., Macek, R. & Kubbies, M. Role of claudins in tumorigenesis. *Adv. Drug Deliv. Rev* **57**, 919-928 (2005).
4. Duffy, M.J., Maguire, T.M., McDermott, E.W. & O'Higgins, N. Urokinase plasminogen activator: a prognostic marker in multiple types of cancer. *J Surg Oncol* **71**, 130-135 (1999).
5. Maguire, T.M. et al. High levels of cathepsin B predict poor outcome in patients with breast cancer. *Int. J. Biol. Markers* **13**, 139-144 (1998).
6. Niedgerthmann, M. et al. Prognostic impact of cysteine proteases cathepsin B and cathepsin L in pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas* **29**, 204-211 (2004).
7. Duffy, M.J. Proteases as prognostic markers in cancer. *Clin. Cancer Res* **2**, 613-618 (1996).
8. Lauffenburger, D.A. & Horwitz, A.F. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* **84**, 359-369 (1996).
9. Jay, P.Y., Pham, P.A., Wong, S.A. & Elson, E.L. A mechanical function of myosin II in cell motility. *J. Cell. Sci* **108** (Pt 1), 387-393 (1995).
10. Palecek, S.P., Huttenlocher, A., Horwitz, A.F. & Lauffenburger, D.A. Physical and biochemical regulation of integrin release during rear detachment of migrating cells. *J. Cell. Sci* **111** (Pt 7), 929-940 (1998).
11. Gallatin, W.M., Weissman, I.L. & Butcher, E.C. A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. 1983. *J. Immunol* **177**, 5-9 (2006).
12. Johnston, G.I., Cook, R.G. & McEver, R.P. Cloning of GMP-140, a granule membrane protein of platelets and endothelium: sequence similarity to proteins involved in cell adhesion and inflammation. *Cell* **56**, 1033-1044 (1989).
13. Crockett-Torabi, E. Selectins and mechanisms of signal transduction. *J. Leukoc. Biol* **63**, 1-14 (1998).
14. Kansas, G.S. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* **88**, 3259-3287 (1996).

15. Springer, T.A. Structural basis for selectin mechanochemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **106**, 91-96 (2009).
16. Bevilacqua, M.P. & Nelson, R.M. Selectins. *J. Clin. Invest* **91**, 379-387 (1993).
17. Watson, S.R. et al. The complement binding-like domains of the murine homing receptor facilitate lectin activity. *J. Cell Biol* **115**, 235-243 (1991).
18. Bargatze, R.F. et al. In vivo and in vitro functional examination of a conserved epitope of L- and E-selectin crucial for leukocyte-endothelial cell interactions. *J. Immunol* **152**, 5814-5825 (1994).
19. Ivetic, A. & Ridley, A.J. The telling tail of L-selectin. *Biochem. Soc. Trans* **32**, 1118-1121 (2004).
20. Evangelista, V. et al. Src family kinases mediate neutrophil adhesion to adherent platelets. *Blood* **109**, 2461-2469 (2007).
21. Simon, S.I., Hu, Y., Vestweber, D. & Smith, C.W. Neutrophil tethering on E-selectin activates beta 2 integrin binding to ICAM-1 through a mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J. Immunol* **164**, 4348-4358 (2000).
22. Geng, J.G. et al. Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature* **343**, 757-760 (1990).
23. McEver, R.P. Selectin-carbohydrate interactions during inflammation and metastasis. *Glycoconj. J* **14**, 585-591 (1997).
24. Green, S.A., Setiadi, H., McEver, R.P. & Kelly, R.B. The cytoplasmic domain of P-selectin contains a sorting determinant that mediates rapid degradation in lysosomes. *J. Cell Biol* **124**, 435-448 (1994).
25. Setiadi, H., Disdier, M., Green, S.A., Canfield, W.M. & McEver, R.P. Residues throughout the cytoplasmic domain affect the internalization efficiency of P-selectin. *J. Biol. Chem* **270**, 26818-26826 (1995).
26. Gotsch, U., Jäger, U., Dominis, M. & Vestweber, D. Expression of P-selectin on endothelial cells is upregulated by LPS and TNF-alpha in vivo. *Cell Adhes. Commun* **2**, 7-14 (1994).
27. Bischoff, J. & Brasel, C. Regulation of P-selectin by tumor necrosis factor-alpha. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **210**, 174-180 (1995).
28. Sanders, W.E., Wilson, R.W., Ballantyne, C.M. & Beaudet, A.L. Molecular cloning and analysis of in vivo expression of murine P-selectin. *Blood* **80**, 795-800 (1992).
29. Varki, A. Selectin ligands: will the real ones please stand up? *J. Clin. Invest* **99**, 158-162 (1997).

30. Moore, K.L. Structure and function of P-selectin glycoprotein ligand-1. *Leuk. Lymphoma* **29**, 1-15 (1998).
31. Moore, K.L. et al. Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells. *J. Cell Biol* **118**, 445-456 (1992).
32. Sako, D. et al. A sulfated peptide segment at the amino terminus of PSGL-1 is critical for P-selectin binding. *Cell* **83**, 323-331 (1995).
33. Zarbock, A. et al. PSGL-1 engagement by E-selectin signals through Src kinase Fgr and ITAM adapters DAP12 and FcR gamma to induce slow leukocyte rolling. *J. Exp. Med* **205**, 2339-2347 (2008).
34. Aigner, S. et al. CD24, a mucin-type glycoprotein, is a ligand for P-selectin on human tumor cells. *Blood* **89**, 3385-3395 (1997).
35. Aruffo, A., Kolanus, W., Walz, G., Fredman, P. & Seed, B. CD62/P-selectin recognition of myeloid and tumor cell sulfatides. *Cell* **67**, 35-44 (1991).
36. Romo, G.M. et al. The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin. *J. Exp. Med* **190**, 803-814 (1999).
37. Goetz, D.J. et al. A human colon carcinoma cell line exhibits adhesive interactions with P-selectin under fluid flow via a PSGL-1-independent mechanism. *Am. J. Pathol* **149**, 1661-1673 (1996).
38. Ma, Y.Q. & Geng, J.G. Heparan sulfate-like proteoglycans mediate adhesion of human malignant melanoma A375 cells to P-selectin under flow. *J. Immunol* **165**, 558-565 (2000).
39. Hanley, W. et al. Single molecule characterization of P-selectin/ligand binding. *J. Biol. Chem* **278**, 10556-10561 (2003).
40. Garcia, J., Callewaert, N. & Borsig, L. P-selectin mediates metastatic progression through binding to sulfatides on tumor cells. *Glycobiology* **17**, 185-196 (2007).
41. Lee, H.J. et al. CD24, a novel cancer biomarker, predicting disease-free survival of non-small cell lung carcinomas: a retrospective study of prognostic factor analysis from the viewpoint of forthcoming (seventh) new TNM classification. *J Thorac Oncol* **5**, 649-657 (2010).
42. Kim, Y.J., Borsig, L., Varki, N.M. & Varki, A. P-selectin deficiency attenuates tumor growth and metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **95**, 9325-9330 (1998).
43. Ludwig, R.J. et al. Endothelial P-selectin as a target of heparin action in experimental melanoma lung metastasis. *Cancer Res* **64**, 2743-2750 (2004).

44. Bruehl, R.E., Springer, T.A. & Bainton, D.F. Quantitation of L-selectin distribution on human leukocyte microvilli by immunogold labeling and electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem* **44**, 835-844 (1996).
45. Hafezi-Moghadam, A., Thomas, K.L., Prorock, A.J., Huo, Y. & Ley, K. L-selectin shedding regulates leukocyte recruitment. *J. Exp. Med* **193**, 863-872 (2001).
46. Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I. & Nourshargh, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol* **7**, 678-689 (2007).
47. Brustein, M., Kraal, G., Mebius, R.E. & Watson, S.R. Identification of a soluble form of a ligand for the lymphocyte homing receptor. *J. Exp. Med* **176**, 1415-1419 (1992).
48. Mebius, R.E. et al. Expression of GlyCAM-1, an endothelial ligand for L-selectin, is affected by afferent lymphatic flow. *J. Immunol* **151**, 6769-6776 (1993).
49. Berg, E.L., MULLowney, A.T., Andrew, D.P., Goldberg, J.E. & Butcher, E.C. Complexity and differential expression of carbohydrate epitopes associated with L-selectin recognition of high endothelial venules. *Am J Pathol* **152**, 469-477 (1998).
50. Suzawa, K. et al. Preferential Induction of Peripheral Lymph Node Addressin on High Endothelial Venule-Like Vessels in the Active Phase of Ulcerative Colitis. *Am J Gastroenterol* **102**, 1499-1509 (2007).
51. Taura, D. et al. Induction and isolation of vascular cells from human induced pluripotent stem cells--brief report. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* **29**, 1100-1103 (2009).
52. Rosen, S.D. Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond. *Annu. Rev. Immunol* **22**, 129-156 (2004).
53. Berlin, C. et al. alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. *Cell* **80**, 413-422 (1995).
54. Qian, F., Hanahan, D. & Weissman, I.L. L-selectin can facilitate metastasis to lymph nodes in a transgenic mouse model of carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **98**, 3976-3981 (2001).
55. Mannori, G. et al. Differential colon cancer cell adhesion to E-, P-, and L-selectin: role of mucin-type glycoproteins. *Cancer Res* **55**, 4425-4431 (1995).
56. Talmadge, J.E., Donkor, M. & Scholar, E. Inflammatory cell infiltration of tumors: Jekyll or Hyde. *Cancer Metastasis Rev* **26**, 373-400 (2007).
57. Läubli, H., Spanaus, K. & Borsig, L. Selectin-mediated activation of endothelial cells induces expression of CCL5 and promotes metastasis through recruitment of monocytes. *Blood* **114**, 4583-4591 (2009).

58. Läubli, H. & Borsig, L. Selectins promote tumor metastasis. *Semin Cancer Biol* (2010).doi:10.1016/j.semcancer.2010.04.005
59. Schindler, U. & Baichwal, V.R. Three NF-kappa B binding sites in the human E-selectin gene required for maximal tumor necrosis factor alpha-induced expression. *Mol. Cell. Biol* **14**, 5820-5831 (1994).
60. Morigi, M. et al. Fluid shear stress modulates surface expression of adhesion molecules by endothelial cells. *Blood* **85**, 1696-1703 (1995).
61. Sipkins, D.A. et al. In vivo imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumour engraftment. *Nature* **435**, 969-973 (2005).
62. Antoine, M., Tag, C.G., Gressner, A.M., Hellerbrand, C. & Kiefer, P. Expression of E-selectin ligand-1 (CFR/ESL-1) on hepatic stellate cells: implications for leukocyte extravasation and liver metastasis. *Oncol. Rep* **21**, 357-362 (2009).
63. Antoine, M. et al. Secreted cysteine-rich FGF receptor derives from posttranslational processing by furin-like prohormone convertases. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **382**, 359-364 (2009).
64. Lenter, M., Levinovitz, A., Isenmann, S. & Vestweber, D. Monospecific and common glycoprotein ligands for E- and P-selectin on myeloid cells. *J. Cell Biol* **125**, 471-481 (1994).
65. Levinovitz, A., Mühlhoff, J., Isenmann, S. & Vestweber, D. Identification of a glycoprotein ligand for E-selectin on mouse myeloid cells. *J. Cell Biol* **121**, 449-459 (1993).
66. Steegmaier, M., Borges, E., Berger, J., Schwarz, H. & Vestweber, D. The E-selectin-ligand ESL-1 is located in the Golgi as well as on microvilli on the cell surface. *J. Cell. Sci* **110 (Pt 6)**, 687-694 (1997).
67. Fuhlbrigge, R.C., King, S.L., Sackstein, R. & Kupper, T.S. CD43 is a ligand for E-selectin on CLA+ human T cells. *Blood* **107**, 1421-1426 (2006).
68. Kotovuori, P. et al. The vascular E-selectin binds to the leukocyte integrins CD11/CD18. *Glycobiology* **3**, 131-136 (1993).
69. Dimitroff, C.J., Lee, J.Y., Rafii, S., Fuhlbrigge, R.C. & Sackstein, R. CD44 is a major E-selectin ligand on human hematopoietic progenitor cells. *J. Cell Biol* **153**, 1277-1286 (2001).
70. Brodt, P. et al. Liver endothelial E-selectin mediates carcinoma cell adhesion and promotes liver metastasis. *Int. J. Cancer* **71**, 612-619 (1997).

71. Khatib, A.M. et al. Rapid induction of cytokine and E-selectin expression in the liver in response to metastatic tumor cells. *Cancer Res* **59**, 1356-1361 (1999).
72. Laferriere, J., Houle, F. & Huot, J. Regulation of the metastatic process by E-selectin and stress-activated protein kinase-2/p38. *Ann. N. Y. Acad. Sci* **973**, 562-572 (2002).
73. Laferrière, J., Houle, F. & Huot, J. Adhesion of HT-29 colon carcinoma cells to endothelial cells requires sequential events involving E-selectin and integrin beta4. *Clin. Exp. Metastasis* **21**, 257-264 (2004).
74. Witz, I.P. The involvement of selectins and their ligands in tumor-progression. *Immunol. Lett* **104**, 89-93 (2006).
75. Gout, S., Tremblay, P. & Huot, J. Selectins and selectin ligands in extravasation of cancer cells and organ selectivity of metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* **25**, 335-344 (2008).
76. Burdick, M.M., McCaffery, J.M., Kim, Y.S., Bochner, B.S. & Konstantopoulos, K. Colon carcinoma cell glycolipids, integrins, and other glycoproteins mediate adhesion to HUVECs under flow. *Am. J. Physiol., Cell Physiol* **284**, C977-987 (2003).
77. Fukuda, M.N. et al. A peptide mimic of E-selectin ligand inhibits sialyl Lewis X-dependent lung colonization of tumor cells. *Cancer Res* **60**, 450-456 (2000).
78. Mannori, G. et al. Inhibition of colon carcinoma cell lung colony formation by a soluble form of E-selectin. *Am. J. Pathol* **151**, 233-243 (1997).
79. Lauri, D., Needham, L., Martin-Padura, I. & Dejana, E. Tumor cell adhesion to endothelial cells: endothelial leukocyte adhesion molecule-1 as an inducible adhesive receptor specific for colon carcinoma cells. *J. Natl. Cancer Inst* **83**, 1321-1324 (1991).
80. Dimitroff, C.J., Lechpammer, M., Long-Woodward, D. & Kutok, J.L. Rolling of human bone-metastatic prostate tumor cells on human bone marrow endothelium under shear flow is mediated by E-selectin. *Cancer Res* **64**, 5261-5269 (2004).
81. Gout, S., Morin, C., Houle, F. & Huot, J. Death receptor-3, a new E-Selectin counter-receptor that confers migration and survival advantages to colon carcinoma cells by triggering p38 and ERK MAPK activation. *Cancer Res* **66**, 9117-9124 (2006).
82. Aychek, T. et al. E-selectin regulates gene expression in metastatic colorectal carcinoma cells and enhances HMGB1 release. *Int. J. Cancer* **123**, 1741-1750 (2008).
83. Laferriere, J., Houle, F., Taher, M.M., Valerie, K. & Huot, J. Transendothelial migration of colon carcinoma cells requires expression of E-selectin by endothelial cells and activation of stress-activated protein kinase-2 (SAPK2/p38) in the tumor cells. *J. Biol. Chem* **276**, 33762-33772 (2001).

-
84. Läubli, H. & Borsig, L. Selectins as Mediators of Lung Metastasis. *Cancer Microenvironment* (2010).doi:10.1007/s12307-010-0043-6
 85. Hemler, M.E. VLA proteins in the integrin family: structures, functions, and their role on leukocytes. *Annu. Rev. Immunol* **8**, 365-400 (1990).
 86. Kinashi, T. Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nat. Rev. Immunol* **5**, 546-559 (2005).
 87. Hynes, R.O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**, 11-25 (1992).
 88. Springer, T.A. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu. Rev. Physiol* **57**, 827-872 (1995).
 89. Bridges, L.C., Sheppard, D. & Bowditch, R.D. ADAM disintegrin-like domain recognition by the lymphocyte integrins alpha4beta1 and alpha4beta7. *Biochem. J* **387**, 101-108 (2005).
 90. Dustin, M.L. & Springer, T.A. T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature* **341**, 619-624 (1989).
 91. Carman, C.V. & Springer, T.A. Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized? *Curr. Opin. Cell Biol* **15**, 547-556 (2003).
 92. Bilsland, C.A., Diamond, M.S. & Springer, T.A. The leukocyte integrin p150,95 (CD11c/CD18) as a receptor for iC3b. Activation by a heterologous beta subunit and localization of a ligand recognition site to the I domain. *J. Immunol* **152**, 4582-4589 (1994).
 93. Shimaoka, M., Takagi, J. & Springer, T.A. Conformational regulation of integrin structure and function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **31**, 485-516 (2002).
 94. Luo, B., Carman, C.V. & Springer, T.A. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu. Rev. Immunol* **25**, 619-647 (2007).
 95. Moser, M., Legate, K.R., Zent, R. & Fässler, R. The tail of integrins, talin, and kindlins. *Science* **324**, 895-899 (2009).
 96. Hauck, C.R., Hsia, D.A., Ilic, D. & Schlaepfer, D.D. v-Src SH3-enhanced interaction with focal adhesion kinase at beta 1 integrin-containing invadopodia promotes cell invasion. *J. Biol. Chem* **277**, 12487-12490 (2002).
 97. Guo, W. & Giancotti, F.G. Integrin signalling during tumour progression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* **5**, 816-826 (2004).
 98. Mitra, S.K. & Schlaepfer, D.D. Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr. Opin. Cell Biol* **18**, 516-523 (2006).

99. Desgrosellier, J.S. & Cheresh, D.A. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 9-22 (2010).
100. Hieken, T.J., Ronan, S.G., Farolan, M., Shilkaitis, A.L. & Das Gupta, T.K. Molecular prognostic markers in intermediate-thickness cutaneous malignant melanoma. *Cancer* **85**, 375-382 (1999).
101. Nip, J., Shibata, H., Loskutoff, D.J., Cheresh, D.A. & Brodt, P. Human melanoma cells derived from lymphatic metastases use integrin alpha v beta 3 to adhere to lymph node vitronectin. *J. Clin. Invest* **90**, 1406-1413 (1992).
102. Gutheil, J.C. et al. Targeted antiangiogenic therapy for cancer using Vitaxin: a humanized monoclonal antibody to the integrin alphavbeta3. *Clin. Cancer Res* **6**, 3056-3061 (2000).
103. McNeel, D.G. et al. Phase I trial of a monoclonal antibody specific for alphavbeta3 integrin (MEDI-522) in patients with advanced malignancies, including an assessment of effect on tumor perfusion. *Clin. Cancer Res* **11**, 7851-7860 (2005).
104. Tamaskar, I. et al. Antitumor effects of sunitinib or sorafenib in patients with metastatic renal cell carcinoma who received prior antiangiogenic therapy. *J. Urol* **179**, 81-86; discussion 86 (2008).
105. Kuwada, S.K. Drug evaluation: Volociximab, an angiogenesis-inhibiting chimeric monoclonal antibody. *Curr. Opin. Mol. Ther* **9**, 92-98 (2007).
106. Taichman, D.B. et al. Tumor cell surface alpha 4 beta 1 integrin mediates adhesion to vascular endothelium: demonstration of an interaction with the N-terminal domains of INCAM-110/VCAM-1. *Cell Regul* **2**, 347-355 (1991).
107. Martín-Padura, I. et al. Heterogeneity in human melanoma cell adhesion to cytokine activated endothelial cells correlates with VLA-4 expression. *Cancer Res* **51**, 2239-2241 (1991).
108. Mattila, P., Majuri, M.L. & Renkonen, R. VLA-4 integrin on sarcoma cell lines recognizes endothelial VCAM-1. Differential regulation of the VLA-4 avidity on various sarcoma cell lines. *Int. J. Cancer* **52**, 918-923 (1992).
109. Klemke, M., Weschenfelder, T., Konstandin, M.H. & Samstag, Y. High affinity interaction of integrin alpha4beta1 (VLA-4) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) enhances migration of human melanoma cells across activated endothelial cell layers. *J. Cell. Physiol* **212**, 368-374 (2007).
110. Garofalo, A. et al. Involvement of the very late antigen 4 integrin on melanoma in interleukin 1-augmented experimental metastases. *Cancer Res* **55**, 414-419 (1995).

111. Higashiyama, A., Watanabe, H., Okumura, K. & Yagita, H. Involvement of tumor necrosis factor alpha and very late activation antigen 4/vascular cell adhesion molecule 1 interaction in surgical-stress-enhanced experimental metastasis. *Cancer Immunol. Immunother* **42**, 231-236 (1996).
112. Okahara, H., Yagita, H., Miyake, K. & Okumura, K. Involvement of very late activation antigen 4 (VLA-4) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) in tumor necrosis factor alpha enhancement of experimental metastasis. *Cancer Res* **54**, 3233-3236 (1994).
113. Schadendorf, D., Heidel, J., Gawlik, C., Suter, L. & Czarnetzki, B.M. Association with clinical outcome of expression of VLA-4 in primary cutaneous malignant melanoma as well as P-selectin and E-selectin on intratumoral vessels. *J. Natl. Cancer Inst* **87**, 366-371 (1995).
114. Hieken, T.J. et al. Beta 1 integrin expression in malignant melanoma predicts occult lymph node metastases. *Surgery* **118**, 669-673; discussion 673-675 (1995).
115. Hieken, T.J., Ronan, S.G., Farolan, M., Shilkaitis, A.L. & Das Gupta, T.K. Beta 1 integrin expression: a marker of lymphatic metastases in cutaneous malignant melanoma. *Anticancer Res* **16**, 2321-2324 (1996).
116. Qian, F., Vaux, D.L. & Weissman, I.L. Expression of the integrin alpha 4 beta 1 on melanoma cells can inhibit the invasive stage of metastasis formation. *Cell* **77**, 335-347 (1994).
117. Mullen, J.T., Vartanian, T.K. & Atkins, M.B. Melanoma complicating treatment with natalizumab for multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med* **358**, 647-648 (2008).
118. Panzara, M.A., Bozic, C. & Sandrock, A.W. More on melanoma with transdifferentiation. *N. Engl. J. Med* **359**, 99; author reply 99-100 (2008).
119. Kopp, H., Placke, T. & Salih, H.R. Platelet-derived transforming growth factor-beta down-regulates NKG2D thereby inhibiting natural killer cell antitumor reactivity. *Cancer Res* **69**, 7775-7783 (2009).
120. Rickles, F.R. & Falanga, A. Molecular basis for the relationship between thrombosis and cancer. *Thromb. Res* **102**, V215-224 (2001).
121. Estrov, Z. et al. Elevated plasma thrombopoietic activity in patients with metastatic cancer-related thrombocytosis. *Am. J. Med* **98**, 551-558 (1995).
122. Trousseau Phlegmasia alba dolens. *Clinique Medicale de l'Hotel-Dieu de Paris 2nd ed. 2nd Edition ed.*, 654-712 (1865).
123. Trantum, B.L. & Haut, A. Thrombocytosis: platelet kinetics in neoplasia. *J. Lab. Clin. Med* **84**, 615-619 (1974).

124. Baron, J.A., Gridley, G., Weiderpass, E., Nyrén, O. & Linet, M. Venous thromboembolism and cancer. *Lancet* **351**, 1077-1080 (1998).
125. Sørensen, H.T., Mellekjaer, L., Steffensen, F.H., Olsen, J.H. & Nielsen, G.L. The risk of a diagnosis of cancer after primary deep venous thrombosis or pulmonary embolism. *N. Engl. J. Med* **338**, 1169-1173 (1998).
126. Erpenbeck, L. & Schön, M.P. Deadly allies: the fatal interplay between platelets and metastasizing cancer cells. *Blood* **115**, 3427-3436 (2010).
127. Gately, S. The contributions of cyclooxygenase-2 to tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* **19**, 19-27 (2000).
128. Melnikova, V.O., Villares, G.J. & Bar-Eli, M. Emerging roles of PAR-1 and PAFR in melanoma metastasis. *Cancer Microenviron* **1**, 103-111 (2008).
129. Kahn, M.L., Nakanishi-Matsui, M., Shapiro, M.J., Ishihara, H. & Coughlin, S.R. Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. *J. Clin. Invest* **103**, 879-887 (1999).
130. Dennis, J.W. & Laferte, S. Tumor cell surface carbohydrate and the metastatic phenotype. *Cancer Metastasis Rev* **5**, 185-204 (1987).
131. Stone, J.P. & Wagner, D.D. P-selectin mediates adhesion of platelets to neuroblastoma and small cell lung cancer. *J. Clin. Invest* **92**, 804-813 (1993).
132. Borsig, L. et al. Heparin and cancer revisited: mechanistic connections involving platelets, P-selectin, carcinoma mucins, and tumor metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **98**, 3352-3357 (2001).
133. Dardik, R., Savion, N., Kaufmann, Y. & Varon, D. Thrombin promotes platelet-mediated melanoma cell adhesion to endothelial cells under flow conditions: role of platelet glycoproteins P-selectin and GPIIb-IIIa. *Br. J. Cancer* **77**, 2069-2075 (1998).
134. Yu, Y. et al. Platelets promote the adhesion of human hepatoma cells with a highly metastatic potential to extracellular matrix protein: involvement of platelet P-selectin and GP IIb-IIIa. *J. Cancer Res. Clin. Oncol* **128**, 283-287 (2002).
135. Karpatkin, S., Pearlstein, E., Ambrogio, C. & Collier, B.S. Role of adhesive proteins in platelet tumor interaction in vitro and metastasis formation in vivo. *J. Clin. Invest* **81**, 1012-1019 (1988).
136. Boukerche, H. et al. Platelet-melanoma cell interaction is mediated by the glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood* **74**, 658-663 (1989).

137. Nierodzik, M.L., Klepfish, A. & Karpatkin, S. Role of platelets, thrombin, integrin IIb-IIIa, fibronectin and von Willebrand factor on tumor adhesion in vitro and metastasis in vivo. *Thromb. Haemost* **74**, 282-290 (1995).
138. Rimpler, Horst *Biogene Arzneistoffe*. (Deutscher Apotheker Verlag: Stuttgart, 1999).
139. Akl, E.A. et al. Anticoagulation for the initial treatment of venous thromboembolism in patients with cancer: a systematic review. *Cancer* **113**, 1685-1694 (2008).
140. Büller, H.R. et al. Fondaparinux or enoxaparin for the initial treatment of symptomatic deep venous thrombosis: a randomized trial. *Ann. Intern. Med* **140**, 867-873 (2004).
141. van Dongen, C.J.J., van den Belt, A.G.M., Prins, M.H. & Lensing, A.W.A. Fixed dose subcutaneous low molecular weight heparins versus adjusted dose unfractionated heparin for venous thromboembolism. *Cochrane Database Syst Rev* CD001100 (2004).doi:10.1002/14651858.CD001100.pub2
142. van Doormaal, F.F. et al. Treatment of venous thromboembolism in patients with cancer: subgroup analysis of the Matisse clinical trials. *Thromb. Haemost* **101**, 762-769 (2009).
143. Riess, H. et al. Fixed-dose, body weight-independent subcutaneous low molecular weight heparin Certoparin compared with adjusted-dose intravenous unfractionated heparin in patients with proximal deep venous thrombosis. *Thromb. Haemost* **90**, 252-259 (2003).
144. Akl, E.A. et al. Extended perioperative thromboprophylaxis in patients with cancer. A systematic review. *Thromb. Haemost* **100**, 1176-1180 (2008).
145. Akl, E.A. et al. Low-molecular-weight heparins are superior to vitamin K antagonists for the long term treatment of venous thromboembolism in patients with cancer: a cochrane systematic review. *J. Exp. Clin. Cancer Res* **27**, 21 (2008).
146. AGOSTINO, D. & CLIFFTON, E.E. Decrease in pulmonary metastases: potentiation of nitrogen mustard effect by heparin and fibrinolysin. *Ann. Surg* **157**, 400-408 (1963).
147. Halkin, H., Goldberg, J., Modan, M. & Modan, B. Reduction of mortality in general medical in-patients by low-dose heparin prophylaxis. *Ann. Intern. Med* **96**, 561-565 (1982).
148. Kingston, R.D., Fielding, J.W. & Palmer, M.K. Peri-operative heparin: a possible adjuvant to surgery in colo-rectal cancer? *Int J Colorectal Dis* **8**, 111-115 (1993).
149. Törngren, S. & Rieger, A. The influence of heparin and curable resection on the survival of colorectal cancer. *Acta Chir Scand* **149**, 427-429 (1983).

150. Siragusa, S., Cosmi, B., Piovella, F., Hirsh, J. & Ginsberg, J.S. Low-molecular-weight heparins and unfractionated heparin in the treatment of patients with acute venous thromboembolism: results of a meta-analysis. *Am. J. Med* **100**, 269-277 (1996).
151. Hettiarachchi, R.J. et al. Do heparins do more than just treat thrombosis? The influence of heparins on cancer spread. *Thromb. Haemost* **82**, 947-952 (1999).
152. Agnelli, G. et al. Nadroparin for the prevention of thromboembolic events in ambulatory patients with metastatic or locally advanced solid cancer receiving chemotherapy: a randomised, placebo-controlled, double-blind study. *Lancet Oncol* **10**, 943-949 (2009).
153. Altinbas, M. et al. A randomized clinical trial of combination chemotherapy with and without low-molecular-weight heparin in small cell lung cancer. *J. Thromb. Haemost* **2**, 1266-1271 (2004).
154. Kakkar, A.K. et al. Low molecular weight heparin, therapy with dalteparin, and survival in advanced cancer: the fragmin advanced malignancy outcome study (FAMOUS). *J. Clin. Oncol* **22**, 1944-1948 (2004).
155. Klerk, C.P.W. et al. The effect of low molecular weight heparin on survival in patients with advanced malignancy. *J. Clin. Oncol* **23**, 2130-2135 (2005).
156. Lee, A.Y.Y. et al. Randomized comparison of low molecular weight heparin and coumarin derivatives on the survival of patients with cancer and venous thromboembolism. *J. Clin. Oncol* **23**, 2123-2129 (2005).
157. Borsig, L. Antimetastatic activities of heparins and modified heparins. Experimental evidence. *Thromb. Res* **125 Suppl 2**, S66-71 (2010).
158. Bereczky, B. et al. Selective antimetastatic effect of heparins in preclinical human melanoma models is based on inhibition of migration and microvascular arrest. *Clin. Exp. Metastasis* **22**, 69-76 (2005).
159. Stevenson, J.L., Choi, S.H. & Varki, A. Differential metastasis inhibition by clinically relevant levels of heparins--correlation with selectin inhibition, not antithrombotic activity. *Clin. Cancer Res* **11**, 7003-7011 (2005).
160. Miao, H.Q. et al. Inhibition of heparanase activity and tumor metastasis by laminarin sulfate and synthetic phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Int. J. Cancer* **83**, 424-431 (1999).
161. Hostettler, N. et al. P-selectin- and heparanase-dependent antimetastatic activity of non-anticoagulant heparins. *FASEB J* **21**, 3562-3572 (2007).

162. Lee, A.E., Rogers, L.A., Longcroft, J.M. & Jeffery, R.E. Reduction of metastasis in a murine mammary tumour model by heparin and polyinosinic-polycytidylic acid. *Clin. Exp. Metastasis* **8**, 165-171 (1990).
163. Amirkhosravi, A., Mousa, S.A., Amaya, M. & Francis, J.L. Antimetastatic effect of tinzaparin, a low-molecular-weight heparin. *J. Thromb. Haemost* **1**, 1972-1976 (2003).
164. Ludwig, R.J. et al. The ability of different forms of heparins to suppress P-selectin function in vitro correlates to their inhibitory capacity on bloodborne metastasis in vivo. *Thromb. Haemost* **95**, 535-540 (2006).
165. Nelson, R.M. et al. Heparin oligosaccharides bind L- and P-selectin and inhibit acute inflammation. *Blood* **82**, 3253-3258 (1993).
166. Borsig, L., Wong, R., Hynes, R.O., Varki, N.M. & Varki, A. Synergistic effects of L- and P-selectin in facilitating tumor metastasis can involve non-mucin ligands and implicate leukocytes as enhancers of metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **99**, 2193-2198 (2002).
167. Läubli, H., Stevenson, J.L., Varki, A., Varki, N.M. & Borsig, L. L-selectin facilitation of metastasis involves temporal induction of Fut7-dependent ligands at sites of tumor cell arrest. *Cancer Res* **66**, 1536-1542 (2006).
168. Wang, L., Brown, J.R., Varki, A. & Esko, J.D. Heparin's anti-inflammatory effects require glucosamine 6-O-sulfation and are mediated by blockade of L- and P-selectins. *J. Clin. Invest* **110**, 127-136 (2002).
169. Wei, M. et al. Modified heparin inhibits P-selectin-mediated cell adhesion of human colon carcinoma cells to immobilized platelets under dynamic flow conditions. *J. Biol. Chem* **279**, 29202-29210 (2004).
170. Vlodavsky, I. et al. Mammalian heparanase: Gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis. *Nat Med* **5**, 793-802 (1999).
171. Mousa, S.A. & Mohamed, S. Inhibition of endothelial cell tube formation by the low molecular weight heparin, tinzaparin, is mediated by tissue factor pathway inhibitor. *Thromb. Haemost* **92**, 627-633 (2004).
172. Aviezer, D. et al. Differential structural requirements of heparin and heparan sulfate proteoglycans that promote binding of basic fibroblast growth factor to its receptor. *J. Biol. Chem* **269**, 114-121 (1994).
173. Castelli, R., Porro, F. & Tarsia, P. The heparins and cancer: review of clinical trials and biological properties. *Vasc Med* **9**, 205-213 (2004).

174. Jayson, G.C. & Gallagher, J.T. Heparin oligosaccharides: inhibitors of the biological activity of bFGF on Caco-2 cells. *Br. J. Cancer* **75**, 9-16 (1997).
175. Ishihara, M. et al. Heparin-carrying polystyrene to mediate cellular attachment and growth via interaction with growth factors. *J. Biomed. Mater. Res* **50**, 144-152 (2000).
176. Angelini, A. et al. Inhibition of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by unfractionated heparin: a new potential chemosensitizer for cancer therapy. *Cancer Biol. Ther* **4**, 313-317 (2005).
177. Napirei, M., Ludwig, S., Mezrhah, J., Klöckl, T. & Mannherz, H.G. Murine serum nucleases--contrasting effects of plasmin and heparin on the activities of DNase1 and DNase1-like 3 (DNase113). *FEBS J* **276**, 1059-1073 (2009).
178. Widlak, P. & Garrard, W.T. The apoptotic endonuclease DFF40/CAD is inhibited by RNA, heparin and other polyanions. *Apoptosis* **11**, 1331-1337 (2006).
179. Fritzsche, J., Simonis, D. & Bendas, G. Melanoma cell adhesion can be blocked by heparin in vitro: suggestion of VLA-4 as a novel target for antimetastatic approaches. *Thromb. Haemost* **100**, 1166-1175 (2008).
180. Zhang, C. et al. Modified heparins inhibit integrin alpha(IIb)beta(3) mediated adhesion of melanoma cells to platelets in vitro and in vivo. *Int. J. Cancer* **125**, 2058-2065 (2009).
181. Bitar, K.N. & Yamada, H. Modulation of smooth muscle contraction by sphingosylphosphorylcholine. *Am. J. Physiol* **269**, G370-377 (1995).
182. Xu, Y., Fang, X.J., Casey, G. & Mills, G.B. Lysophospholipids activate ovarian and breast cancer cells. *Biochem. J* **309** (Pt 3), 933-940 (1995).
183. Gauster, M. et al. Endothelial lipase releases saturated and unsaturated fatty acids of high density lipoprotein phosphatidylcholine. *J. Lipid Res* **46**, 1517-1525 (2005).
184. Cathcart, M.K., McNally, A.K. & Chisolm, G.M. Lipoxygenase-mediated transformation of human low density lipoprotein to an oxidized and cytotoxic complex. *J. Lipid Res* **32**, 63-70 (1991).
185. Hessler, J.R., Morel, D.W., Lewis, L.J. & Chisolm, G.M. Lipoprotein oxidation and lipoprotein-induced cytotoxicity. *Arteriosclerosis* **3**, 215-222 (1983).
186. Kuliszkiwicz-Janus, M., Janus, W. & Baczyński, S. Application of ³¹P NMR spectroscopy in clinical analysis of changes of serum phospholipids in leukemia, lymphoma and some other non-haematological cancers. *Anticancer Res* **16**, 1587-1594 (1996).

187. Kuliszkiwicz-Janus, M., Tuz, M.A. & Baczyński, S. Application of ³¹P MRS to the analysis of phospholipid changes in plasma of patients with acute leukemia. *Biochim. Biophys. Acta* **1737**, 11-15 (2005).
188. Raffelt, K. et al. Systemic alterations in phospholipid concentrations of blood plasma in patients with thyroid carcinoma: an in-vitro (³¹P) high-resolution NMR study. *NMR Biomed* **13**, 8-13 (2000).
189. Takatera, A. et al. Quantification of lysophosphatidylcholines and phosphatidylcholines using liquid chromatography-tandem mass spectrometry in neonatal serum. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci* **838**, 31-36 (2006).
190. Takatera, A. et al. Blood lysophosphatidylcholine (LPC) levels and characteristic molecular species in neonates: prolonged low blood LPC levels in very low birth weight infants. *Pediatr. Res* **62**, 477-482 (2007).
191. Cunningham, T.J., Yao, L. & Lucena, A. Product inhibition of secreted phospholipase A2 may explain lysophosphatidylcholines' unexpected therapeutic properties. *J Inflamm (Lond)* **5**, 17 (2008).
192. Thiés, F., Delachambre, M.C., Bentejac, M., Lagarde, M. & Lecerf, J. Unsaturated fatty acids esterified in 2-acyl-l-lysophosphatidylcholine bound to albumin are more efficiently taken up by the young rat brain than the unesterified form. *J. Neurochem* **59**, 1110-1116 (1992).
193. Scott, G.A., Arioka, M. & Jacobs, S.E. Lysophosphatidylcholine mediates melanocyte dendricity through PKCzeta activation. *J. Invest. Dermatol* **127**, 668-675 (2007).
194. Scott, G.A., Jacobs, S.E. & Pentland, A.P. sPLA2-X stimulates cutaneous melanocyte dendricity and pigmentation through a lysophosphatidylcholine-dependent mechanism. *J. Invest. Dermatol* **126**, 855-861 (2006).
195. Sakai, M. et al. Lysophosphatidylcholine plays an essential role in the mitogenic effect of oxidized low density lipoprotein on murine macrophages. *J. Biol. Chem* **269**, 31430-31435 (1994).
196. Sakai, M. et al. Lysophosphatidylcholine potentiates the mitogenic activity of modified LDL for human monocyte-derived macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* **16**, 600-605 (1996).
197. Ngwenya, B.Z. & Yamamoto, N. Effects of inflammation products on immune systems. Lysophosphatidylcholine stimulates macrophages. *Cancer Immunol. Immunother* **21**, 174-182 (1986).

198. Quinn, M.T., Parthasarathy, S. & Steinberg, D. Lysophosphatidylcholine: a chemotactic factor for human monocytes and its potential role in atherogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **85**, 2805-2809 (1988).
199. McMurray, H.F., Parthasarathy, S. & Steinberg, D. Oxidatively modified low density lipoprotein is a chemoattractant for human T lymphocytes. *J. Clin. Invest* **92**, 1004-1008 (1993).
200. Ohara, Y., Peterson, T.E., Zheng, B., Kuo, J.F. & Harrison, D.G. Lysophosphatidylcholine increases vascular superoxide anion production via protein kinase C activation. *Arterioscler. Thromb* **14**, 1007-1013 (1994).
201. Rong, J.X., Berman, J.W., Taubman, M.B. & Fisher, E.A. Lysophosphatidylcholine stimulates monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in rat aortic smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* **22**, 1617-1623 (2002).
202. Engelmann, B. et al. Tissue factor expression of human monocytes is suppressed by lysophosphatidylcholine. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* **19**, 47-53 (1999).
203. Dichtl, W. et al. Oxidized LDL and lysophosphatidylcholine stimulate plasminogen activator inhibitor-1 expression in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* **19**, 3025-3032 (1999).
204. Oka, H. et al. Lysophosphatidylcholine induces urokinase-type plasminogen activator and its receptor in human macrophages partly through redox-sensitive pathway. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* **20**, 244-250 (2000).
205. Lundbaek, J.A. & Andersen, O.S. Lysophospholipids modulate channel function by altering the mechanical properties of lipid bilayers. *J. Gen. Physiol* **104**, 645-673 (1994).
206. Kume, N., Cybulsky, M.I. & Gimbrone, M.A. Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells. *J. Clin. Invest* **90**, 1138-1144 (1992).
207. Sugiyama, S., Kugiyama, K., Ohgushi, M., Fujimoto, K. & Yasue, H. Lysophosphatidylcholine in oxidized low-density lipoprotein increases endothelial susceptibility to polymorphonuclear leukocyte-induced endothelial dysfunction in porcine coronary arteries. Role of protein kinase C. *Circ. Res* **74**, 565-575 (1994).
208. Murohara, T., Scalia, R. & Lefer, A.M. Lysophosphatidylcholine promotes P-selectin expression in platelets and endothelial cells. Possible involvement of protein kinase C activation and its inhibition by nitric oxide donors. *Circ. Res* **78**, 780-789 (1996).

-
209. Huang, Y.H., Schäfer-Elinder, L., Wu, R., Claesson, H.E. & Frostegård, J. Lysophosphatidylcholine (LPC) induces proinflammatory cytokines by a platelet-activating factor (PAF) receptor-dependent mechanism. *Clin. Exp. Immunol* **116**, 326-331 (1999).
210. Kabarowski, J.H., Zhu, K., Le, L.Q., Witte, O.N. & Xu, Y. Lysophosphatidylcholine as a ligand for the immunoregulatory receptor G2A. *Science* **293**, 702-705 (2001).
211. Zhu, K. et al. Sphingosylphosphorylcholine and lysophosphatidylcholine are ligands for the G protein-coupled receptor GPR4. *J. Biol. Chem* **276**, 41325-41335 (2001).
212. Xu, Y. Sphingosylphosphorylcholine and lysophosphatidylcholine: G protein-coupled receptors and receptor-mediated signal transduction. *Biochim. Biophys. Acta* **1582**, 81-88 (2002).
213. Zohn, I.E. et al. G2A is an oncogenic G protein-coupled receptor. *Oncogene* **19**, 3866-3877 (2000).
214. Weng, Z. et al. A DNA damage and stress inducible G protein-coupled receptor blocks cells in G2/M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **95**, 12334-12339 (1998).
215. Lin, P. & Ye, R.D. The Lysophospholipid Receptor G2A Activates a Specific Combination of G Proteins and Promotes Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 14379 -14386 (2003).
216. Kabarowski, J.H. et al. Direct genetic demonstration of G alpha 13 coupling to the orphan G protein-coupled receptor G2A leading to RhoA-dependent actin rearrangement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **97**, 12109-12114 (2000).
217. Radu, C.G., Yang, L.V., Riedinger, M., Au, M. & Witte, O.N. T cell chemotaxis to lysophosphatidylcholine through the G2A receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **101**, 245-250 (2004).
218. Tomura, H., Mogi, C., Sato, K. & Okajima, F. Proton-sensing and lysolipid-sensitive G-protein-coupled receptors: a novel type of multi-functional receptors. *Cell. Signal* **17**, 1466-1476 (2005).
219. Bektas, M. et al. The G protein-coupled receptor GPR4 suppresses ERK activation in a ligand-independent manner. *Biochemistry* **42**, 12181-12191 (2003).
220. Wang, L. et al. Lysophosphatidylcholine-induced surface redistribution regulates signaling of the murine G protein-coupled receptor G2A. *Mol. Biol. Cell* **16**, 2234-2247 (2005).

221. Liu, J. et al. Each one of certain histidine residues in G-protein-coupled receptor GPR4 is critical for extracellular proton-induced stimulation of multiple G-protein-signaling pathways. *Pharmacol. Res* **61**, 499-505 (2010).
222. Murakami, N., Yokomizo, T., Okuno, T. & Shimizu, T. G2A is a proton-sensing G-protein-coupled receptor antagonized by lysophosphatidylcholine. *J. Biol. Chem* **279**, 42484-42491 (2004).
223. Seuwen, K., Ludwig, M. & Wolf, R.M. Receptors for protons or lipid messengers or both? *J. Recept. Signal Transduct. Res* **26**, 599-610 (2006).
224. Tokumura, A. et al. Identification of human plasma lysophospholipase D, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, as autotaxin, a multifunctional phosphodiesterase. *J. Biol. Chem* **277**, 39436-39442 (2002).
225. Umezū-Goto, M. et al. Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production. *J. Cell Biol* **158**, 227-233 (2002).
226. Tanaka, M. et al. Autotaxin stabilizes blood vessels and is required for embryonic vasculature by producing lysophosphatidic acid. *J. Biol. Chem* **281**, 25822-25830 (2006).
227. van Meeteren, L.A. et al. Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, is essential for blood vessel formation during development. *Mol. Cell. Biol* **26**, 5015-5022 (2006).
228. van Leeuwen, F.N., Giepmans, B.N.G., van Meeteren, L.A. & Moolenaar, W.H. Lysophosphatidic acid: mitogen and motility factor. *Biochem. Soc. Trans* **31**, 1209-1212 (2003).
229. Mills, G.B. & Moolenaar, W.H. The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 582-591 (2003).
230. Ren, J. et al. Lysophosphatidic acid is constitutively produced by human peritoneal mesothelial cells and enhances adhesion, migration, and invasion of ovarian cancer cells. *Cancer Res* **66**, 3006-3014 (2006).
231. Baker, D.L. et al. Plasma lysophosphatidic acid concentration and ovarian cancer. *JAMA* **287**, 3081-3082 (2002).
232. Sengupta, S., Wang, Z., Tipps, R. & Xu, Y. Biology of LPA in health and disease. *Semin. Cell Dev. Biol* **15**, 503-512 (2004).
233. Xu, Y. et al. Lysophosphatidic acid as a potential biomarker for ovarian and other gynecologic cancers. *JAMA* **280**, 719-723 (1998).

-
234. Sedláková, I., Vávrová, J., Tosner, J. & Hanousek, L. [Lysophosphatidic acid in ovarian cancer patients]. *Ceska Gynekol* **71**, 312-317 (2006).
235. Taylor, L.A., Arends, J., Hodina, A.K., Unger, C. & Massing, U. Plasma lysophosphatidylcholine concentration is decreased in cancer patients with weight loss and activated inflammatory status. *Lipids Health Dis* **6**, 17 (2007).
236. Zhao, Z. et al. Plasma lysophosphatidylcholine levels: potential biomarkers for colorectal cancer. *J. Clin. Oncol* **25**, 2696-2701 (2007).
237. Süllentrop, F. et al. ³¹P NMR spectroscopy of blood plasma: determination and quantification of phospholipid classes in patients with renal cell carcinoma. *NMR Biomed* **15**, 60-68 (2002).
238. Sasagawa, T., Okita, M., Murakami, J., Kato, T. & Watanabe, A. Abnormal serum lysophospholipids in multiple myeloma patients. *Lipids* **34**, 17-21 (1999).
239. Okita, M., Gaudette, D.C., Mills, G.B. & Holub, B.J. Elevated levels and altered fatty acid composition of plasma lysophosphatidylcholine(lysoPC) in ovarian cancer patients. *Int. J. Cancer* **71**, 31-34 (1997).
240. Geilen, C.C., Wieder, T., Boremski, S., Wieprecht, M. & Orfanos, C.E. c-Ha-ras oncogene expression increases choline uptake, CTP: phosphocholine cytidyltransferase activity and phosphatidylcholine biosynthesis in the immortalized human keratinocyte cell line HaCaT. *Biochim. Biophys. Acta* **1299**, 299-305 (1996).
241. Teegarden, D., Taparowsky, E.J. & Kent, C. Altered phosphatidylcholine metabolism in C3H10T1/2 cells transfected with the Harvey-ras oncogene. *J. Biol. Chem* **265**, 6042-6047 (1990).
242. Mansilla, F. et al. Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 (LPCAT1) overexpression in human colorectal cancer. *J. Mol. Med* **87**, 85-97 (2009).
243. Kishi, Y. et al. Autotaxin is overexpressed in glioblastoma multiforme and contributes to cell motility of glioblastoma by converting lysophosphatidylcholine to lysophosphatidic acid. *J. Biol. Chem* **281**, 17492-17500 (2006).
244. Yang, Y., Mou, L., Liu, N. & Tsao, M.S. Autotaxin expression in non-small-cell lung cancer. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol* **21**, 216-222 (1999).
245. Quiñones, L.G. & Garcia-Castro, I. Characterization of human melanoma cell lines according to their migratory properties in vitro. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim* **40**, 35-42 (2004).

246. Bartolomé, R.A., Wright, N., Molina-Ortiz, I., Sánchez-Luque, F.J. & Teixidó, J. Activated G(alpha)13 impairs cell invasiveness through p190RhoGAP-mediated inhibition of RhoA activity. *Cancer Res* **68**, 8221-8230 (2008).
247. Gaetano, C.G. et al. Inhibition of autotaxin production or activity blocks lysophosphatidylcholine-induced migration of human breast cancer and melanoma cells. *Mol. Carcinog* **48**, 801-809 (2009).
248. Graeser, R. et al. Antimetastatic effects of liposomal gemcitabine and empty liposomes in an orthotopic mouse model of pancreatic cancer. *Pancreas* **38**, 330-337 (2009).
249. Millard, T.H., Sharp, S.J. & Machesky, L.M. Signalling to actin assembly via the WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein)-family proteins and the Arp2/3 complex. *Biochem. J* **380**, 1-17 (2004).
250. Mullins, R.D., Heuser, J.A. & Pollard, T.D. The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **95**, 6181-6186 (1998).
251. Svitkina, T.M. & Borisy, G.G. Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J. Cell Biol* **145**, 1009-1026 (1999).
252. Pollard, T.D. & Borisy, G.G. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* **112**, 453-465 (2003).
253. Maciver, S.K. & Hussey, P.J. The ADF/cofilin family: actin-remodeling proteins. *Genome Biol* **3**, reviews3007 (2002).
254. Svitkina, T.M. et al. Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *J. Cell Biol* **160**, 409-421 (2003).
255. Krugmann, S. et al. Cdc42 induces filopodia by promoting the formation of an IRSp53:Mena complex. *Curr. Biol* **11**, 1645-1655 (2001).
256. Jaffe, A.B. & Hall, A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* **21**, 247-269 (2005).
257. Olofsson, B. Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cell. Signal* **11**, 545-554 (1999).
258. Ridley, A.J. Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends Cell Biol* **11**, 471-477 (2001).
259. Wennerberg, K. & Der, C.J. Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J. Cell. Sci* **117**, 1301-1312 (2004).

-
260. Roberts, P.J. et al. Rho Family GTPase modification and dependence on CAAX motif-signaled posttranslational modification. *J. Biol. Chem* **283**, 25150-25163 (2008).
261. Marks, P.A. & Dokmanovic, M. Histone deacetylase inhibitors: discovery and development as anticancer agents. *Expert Opin Investig Drugs* **14**, 1497-1511 (2005).
262. Xu, W.S., Parmigiani, R.B. & Marks, P.A. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene* **26**, 5541-5552 (2007).
263. Chen, B. & Cepko, C.L. HDAC4 regulates neuronal survival in normal and diseased retinas. *Science* **323**, 256-259 (2009).
264. Li, B. et al. FOXP3 interactions with histone acetyltransferase and class II histone deacetylases are required for repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **104**, 4571-4576 (2007).
265. Chang, S. et al. Histone deacetylases 5 and 9 govern responsiveness of the heart to a subset of stress signals and play redundant roles in heart development. *Mol. Cell. Biol* **24**, 8467-8476 (2004).
266. Ha, C.H. et al. PKA phosphorylates histone deacetylase 5 and prevents its nuclear export, leading to the inhibition of gene transcription and cardiomyocyte hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **107**, 15467-15472 (2010).
267. Marks, P.A. & Xu, W. Histone deacetylase inhibitors: Potential in cancer therapy. *J. Cell. Biochem* **107**, 600-608 (2009).
268. Rivera-Del Valle, N. et al. PCI-24781, a Novel Hydroxamic Acid HDAC Inhibitor, Exerts Cytotoxicity and Histone Alterations via Caspase-8 and FADD in Leukemia Cells. *Int J Cell Biol* **2010**, 207420 (2010).
269. Gui, C., Ngo, L., Xu, W.S., Richon, V.M. & Marks, P.A. Histone deacetylase (HDAC) inhibitor activation of p21WAF1 involves changes in promoter-associated proteins, including HDAC1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **101**, 1241-1246 (2004).
270. Qian, D.Z. et al. Class II histone deacetylases are associated with VHL-independent regulation of hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Cancer Res* **66**, 8814-8821 (2006).
271. Kim, S.O. et al. Anti-invasive activity of histone deacetylase inhibitors via the induction of Egr-1 and the modulation of tight junction-related proteins in human hepatocarcinoma cells. *BMB Rep* **42**, 655-660 (2009).
272. Zhang, X. et al. HDAC6 modulates cell motility by altering the acetylation level of cortactin. *Mol. Cell* **27**, 197-213 (2007).

273. Inoue, K. et al. Histone deacetylase inhibitor reduces monocyte adhesion to endothelium through the suppression of vascular cell adhesion molecule-1 expression. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* **26**, 2652-2659 (2006).
274. Hellebrekers, D.M.E.I. et al. Epigenetic regulation of tumor endothelial cell anergy: silencing of intercellular adhesion molecule-1 by histone modifications. *Cancer Res* **66**, 10770-10777 (2006).
275. Kuzelová, K. et al. Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) at subtoxic concentrations increases the adhesivity of human leukemic cells to fibronectin. *J. Cell. Biochem* **109**, 184-195 (2010).
276. Mahlknecht, U. & Schönbein, C. Histone deacetylase inhibitor treatment downregulates VLA-4 adhesion in hematopoietic stem cells and acute myeloid leukemia blast cells. *Haematologica* **93**, 443-446 (2008).
277. Juengel, E. et al. Effects of combined valproic acid and the epidermal growth factor/vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor AEE788 on renal cell carcinoma cell lines in vitro. *BJU Int* **105**, 549-557 (2010).
278. Juengel, E. et al. Alterations of the gene expression profile in renal cell carcinoma after treatment with the histone deacetylase-inhibitor valproic acid and interferon-alpha. *World J Urol* (2010).doi:10.1007/s00345-010-0582-y
279. Oertl, A. et al. Altered expression of beta1 integrins in renal carcinoma cell lines exposed to the differentiation inducer valproic acid. *Int. J. Mol. Med* **18**, 347-354 (2006).
280. van Muijen, G.N. et al. Establishment and characterization of a human melanoma cell line (MV3) which is highly metastatic in nude mice. *Int. J. Cancer* **48**, 85-91 (1991).
281. Poste, G., Doll, J., Hart, I.R. & Fidler, I.J. In vitro selection of murine B16 melanoma variants with enhanced tissue-invasive properties. *Cancer Res* **40**, 1636-1644 (1980).
282. Montesano, R. et al. Increased proteolytic activity is responsible for the aberrant morphogenetic behavior of endothelial cells expressing the middle T oncogene. *Cell* **62**, 435-445 (1990).
283. Jäger, E. et al. Identification of a naturally processed NY-ESO-1 peptide recognized by CD8+ T cells in the context of HLA-B51. *Cancer Immun* **2**, 12 (2002).
284. Lydolph, M.C. et al. Alpha9beta1 integrin in melanoma cells can signal different adhesion states for migration and anchorage. *Exp. Cell Res* **315**, 3312-3324 (2009).
285. Chen, W.H. et al. Human pancreatic adenocarcinoma: in vitro and in vivo morphology of a new tumor line established from ascites. *In Vitro* **18**, 24-34 (1982).

-
286. Yunis, A.A., Arimura, G.K. & Russin, D.J. Human pancreatic carcinoma (MIA PaCa-2) in continuous culture: sensitivity to asparaginase. *Int. J. Cancer* **19**, 128-135 (1977).
287. Barthel, S.R., Johansson, M.W., Annis, D.S. & Mosher, D.F. Cleavage of human 7-domain VCAM-1 (CD106) by thrombin. *Thromb. Haemost* **95**, 873-880 (2006).
288. Garner, E. & Raj, K. Protective mechanisms of p53-p21-pRb proteins against DNA damage-induced cell death. *Cell Cycle* **7**, 277-282 (2008).
289. Toyoshima, H. & Hunter, T. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* **78**, 67-74 (1994).
290. Mollinedo, F. et al. In vitro and In vivo selective antitumor activity of Edelfosine against mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia involving lipid rafts. *Clin. Cancer Res* **16**, 2046-2054 (2010).
291. Mollinedo, F. et al. Lipid raft-targeted therapy in multiple myeloma. *Oncogene* **29**, 3748-3757 (2010).
292. Zarembeg, V., Gajate, C., Cacharro, L.M., Mollinedo, F. & McMaster, C.R. Cytotoxicity of an anti-cancer lysophospholipid through selective modification of lipid raft composition. *J. Biol. Chem* **280**, 38047-38058 (2005).
293. Jiménez-López, J.M., Ríos-Marco, P., Marco, C., Segovia, J.L. & Carrasco, M.P. Alterations in the homeostasis of phospholipids and cholesterol by antitumor alkylphospholipids. *Lipids Health Dis* **9**, 33 (2010).
294. Holleran, B.J., Barbar, E., Payet, M.D. & Dupuis, G. Differential recruitment of alpha2beta1 and alpha4beta1 integrins to lipid rafts in Jurkat T lymphocytes exposed to collagen type IV and fibronectin. *J. Leukoc. Biol* **73**, 243-252 (2003).
295. Mitchell, J.S., Brown, W.S., Woodside, D.G., Vanderslice, P. & McIntyre, B.W. Clustering T-cell GM1 lipid rafts increases cellular resistance to shear on fibronectin through changes in integrin affinity and cytoskeletal dynamics. *Immunol. Cell Biol* **87**, 324-336 (2009).
296. Leitinger, B. & Hogg, N. The involvement of lipid rafts in the regulation of integrin function. *J. Cell. Sci* **115**, 963-972 (2002).
297. Shamri, R. et al. Chemokine stimulation of lymphocyte alpha 4 integrin avidity but not of leukocyte function-associated antigen-1 avidity to endothelial ligands under shear flow requires cholesterol membrane rafts. *J. Biol. Chem* **277**, 40027-40035 (2002).
298. Gajate, C. & Mollinedo, F. The antitumor ether lipid ET-18-OCH(3) induces apoptosis through translocation and capping of Fas/CD95 into membrane rafts in human leukemic cells. *Blood* **98**, 3860-3863 (2001).

299. Gajate, C. et al. Intracellular triggering of Fas, independently of FasL, as a new mechanism of antitumor ether lipid-induced apoptosis. *Int. J. Cancer* **85**, 674-682 (2000).
300. Vink, S.R., van Blitterswijk, W.J., Schellens, J.H.M. & Verheij, M. Rationale and clinical application of alkylphospholipid analogues in combination with radiotherapy. *Cancer Treat. Rev* **33**, 191-202 (2007).
301. Oberle, C., Massing, U. & Krug, H.F. On the mechanism of alkylphosphocholine (APC)-induced apoptosis in tumour cells. *Biol. Chem* **386**, 237-245 (2005).
302. Aepfelbacher, M. ADP-ribosylation of Rho enhances adhesion of U937 cells to fibronectin via the alpha 5 beta 1 integrin receptor. *FEBS Lett* **363**, 78-80 (1995).
303. Hotchin, N.A. & Hall, A. Regulation of the actin cytoskeleton, integrins and cell growth by the Rho family of small GTPases. *Cancer Surv* **27**, 311-322 (1996).
304. Hotchin, N.A. & Hall, A. The assembly of integrin adhesion complexes requires both extracellular matrix and intracellular rho/rac GTPases. *J. Cell Biol* **131**, 1857-1865 (1995).
305. Laudanna, C., Campbell, J.J. & Butcher, E.C. Role of Rho in chemoattractant-activated leukocyte adhesion through integrins. *Science* **271**, 981-983 (1996).
306. Ramos, C.L. et al. Functional characterization of L-selectin ligands on human neutrophils and leukemia cell lines: evidence for mucinlike ligand activity distinct from P-selectin glycoprotein ligand-1. *Blood* **91**, 1067-1075 (1998).
307. Chen, L. et al. Chemical ablation of androgen receptor in prostate cancer cells by the histone deacetylase inhibitor LAQ824. *Mol. Cancer Ther* **4**, 1311-1319 (2005).
308. Beckwith, M., Fenton, R.G., Katona, I.M. & Longo, D.L. Phosphatidylinositol-3-kinase activity is required for the anti-ig-mediated growth inhibition of a human B-lymphoma cell line. *Blood* **87**, 202-210 (1996).
309. Hosoi, H. et al. Studies on the mechanism of resistance to rapamycin in human cancer cells. *Mol. Pharmacol* **54**, 815-824 (1998).
310. Jego, G., Hazoumé, A., Seigneuric, R. & Garrido, C. Targeting heat shock proteins in cancer. *Cancer Lett* (2010).doi:10.1016/j.canlet.2010.10.014

7 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildung 2.1:	Überblick über Assoziationsmöglichkeiten von Integrinuntereinheiten.....	9
Abbildung 2.2:	Affinitäts- und Aviditätserhöhung von Integrinen.....	11
Abbildung 2.3:	Thrombozyt-Tumorzell-Interaktion.....	15
Abbildung 2.4:	Schematische Darstellung der LPC-vermittelten Migration von Glioblastomzellen in die Blutbahn.....	24
Abbildung 3.1:	Kovalente Fixierung von Proteinen an Glasoberflächen.....	53
Abbildung 3.2:	Aufbau der Durchflussapparatur.....	54
Abbildung 3.3:	Auswertung mittels Imagoquant MultiTrack-AVI-2.....	56
Abbildung 3.4:	Schematischer Aufbau eines Rasterelektronenmikroskops.....	58
Abbildung 3.5:	„time-space-plot“ des SACED Assays.....	60
Abbildung 3.6:	Röntgenfilm von zwei ausgewerteten Membranen.....	67
Abbildung 4.1:	Durchflusszytometrischer Nachweis der VLA-4, P- und L-Selektin- Ligand Expression auf MV3 Melanomzellen.....	70
Abbildung 4.2:	Interaktion von MV3 Melanomzellen mit Thrombozyten.....	71
Abbildung 4.3:	Interaktion von MV3 Melanomzellen mit P-Selektin.....	71
Abbildung 4.4:	Durchflusszytometrische Bestimmung der VLA-4-Expression 72 Std. nach siRNA Zugabe.....	73
Abbildung 4.5:	Einfluss von Mn ²⁺ Stimulation und siRNA Behandlung auf die Zelladhäsion an VCAM-1.....	73
Abbildung 4.6:	Interaktion zwischen MV3 Melanomzellen und HUVEC Endothelzellen unter physiologischen Flussbedingungen.....	74
Abbildung 4.7:	Inhibition der VLA-4/VCAM-1-Wechselwirkung durch fraktionierte und unfraktionierte Heparine und den Antikörper Natalizumab.....	76
Abbildung 4.8:	Einfluss der Kettenlänge auf die VLA-4/VCAM-1-Wechselwirkung.....	77
Abbildung 4.9:	Einfluss von N-aceyliertem und RO-Heparin auf die Adhäsion von MV3 Melanomzellen.....	78
Abbildung 4.10:	Einfluss der Desulfatierung in Position 6 des HeparinGrundgerüsts auf die Adhäsion von MV3 Melanomzellen unter Flussbedingungen.....	78
Abbildung 4.11:	Einfluss der Desulfatierung in Position 2 des HeparinGrundgerüsts auf die Adhäsion von MV3 Melanomzellen.....	79
Abbildung 4.12:	Adhäsionsuntersuchungen von MV3 Melanomzellen an Antikörpern gegen die α- und β-Untereinheit (anti-CD29 und Natalizumab) unter physiologischen Flussbedingungen zur näheren Charakterisierung der Heparinbindungsstelle.....	80
Abbildung 4.13:	Median der Score Werte der Lungenmetastasen.....	81
Abbildung 4.14:	Anzahl der pulmonalen Metastasen nach Applikation von Enoxaparin (Enoxa), Natalizumab (Nata) und Heparinderivaten bestehend aus 12 Saccharideinheiten.....	83
Abbildung 4.15:	LPC Konsumierung von B16F10 Melanomzellen.....	85
Abbildung 4.16:	LPC Metabolismus aus dem Kulturmedium.....	85
Abbildung 4.17:	Veränderung der Membranzusammensetzung von B16F10 Melanomzellen.....	86
Abbildung 4.18:	Vergleich der Expression von apoptoserelevanten Proteinen in LPC behandelten und unbehandelten MV3 Melanomzellen.....	87
Abbildung 4.19:	Expression von Adhäsionsrezeptoren nach LPC Inkubation für 13 Tage mit 300 µM (A-C) und 450 µM LPC (D-F).....	89

Abbildung 4.20: VLA-4-vermitteltes Adhäsionsverhalten von B16F10 Zellen inkubiert mit verschiedenen LPC Konzentrationen für 13 Tage	90
Abbildung 4.21: Einfluss der Inkubationszeit auf das Adhäsionsverhalten der B16F10 Zellen	91
Abbildung 4.22: Einfluss des LPC Entzuges auf die Adhäsion von B16F10 Zellen	92
Abbildung 4.23: Einfluss der erneuten LPC Zugabe auf das Adhäsionsverhalten der B16F10 Zellen.	93
Abbildung 4.24: Bestimmung der Interaktion zwischen B16F10 Melanomzellen und Thrombozyten.....	94
Abbildung 4.25: Bestimmung des Zelldurchmessers und der Oberflächenausdehnung von LPC behandelten und unbehandelten B16F10 Melanomzellen.....	95
Abbildung 4.26: Einfluss der LPC Inkubation auf die Lamellen und Ruffle Dynamik	96
Abbildung 4.27: Einfluss der LPC Inkubation auf die Lamellen und Ruffle Frequenz	96
Abbildung 4.28: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme mittels Laserscanning-Mikroskop von B16F10 Melanomzellen, auf deren Oberfläche das Integrin VLA-4 markiert war	98
Abbildung 4.29: Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung von B16F10 Melanomzellen.....	99
Abbildung 4.30: Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung von B16F10 Melanomzellen.....	101
Abbildung 4.31: Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung von MV3 Melanomzellen	102
Abbildung 4.32: Quantifizierung von Filopodien auf LPC behandelten und unbehandelten Zellmembranen.....	103
Abbildung 4.33: Laserscanningmikroskopische Untersuchung von B16F10 Melanomzellen.....	104
Abbildung 4.34: Strukturen von LPC (oben) und Hexadecylphosphocholin im Vergleich.....	106
Abbildung 4.35: Einfluss von Hexadecylphosphocholin (HePC) auf die Zelladhäsion von B16F10 Melanomzellen an VCAM-1 unter Flussbedingungen	107
Abbildung 4.36: Einfluss von Glycerophosphocholin auf die Zelladhäsion von B16F10 Melanomzellen an VCAM-1 unter Flussbedingungen	108
Abbildung 4.37: Untersuchung der Wirkung von LPC Inkubation und unfraktioniertem Heparin auf die VLA-4/VCAM-1-Interaktion.....	109
Abbildung 4.38: Untersuchung der Wirkung von LPC Inkubation und unfraktioniertem Heparin auf die VLA-4/VCAM-1-Interaktion.....	110
Abbildung 4.39: Einfluss der Inkubationszeit auf das Adhäsionsverhalten der MV3 Zellen.....	111
Abbildung 4.40: Einfluss des LPC Entzuges auf die Adhäsion von MV3 Zellen.....	112
Abbildung 4.41: Heatmap Analyse der Genexpression von Rho A und B nach Inkubation der MV3 Melanomzellen mit LPC	114
Abbildung 4.42: Heatmap Analyse der Genexpression der α_4 - (ITGA4) und β_1 - Untereinheiten (ITGB1) des Integrins VLA-4	115
Abbildung 4.43: Quantifizierung der pulmonalen Metastasen der Versuchstiere	117
Abbildung 4.44: Quantifizierung der pulmonalen Metastasen der Versuchstiere	118
Abbildung 4.45: Interaktion von LPC behandelten und unbehandelten MIA PaCa-2 Pankreastumorzellen mit Thrombozyten	119
Abbildung 4.46: Interaktion von LPC behandelten und unbehandelten AsPC-1 Pankreastumorzellen mit Thrombozyten	120
Abbildung 4.47: Einfluss der LPC Inkubation (450 μ M für 24 Std.) auf die Wechselwirkung von U937 Zellen mit rekombinantem P-Selektin	121

Abbildung 4.48: Einfluss der Inkubationszeit auf das Adhäsionsverhalten der MV3 Zellen unter TSA Inkubation an VCAM-1.....	123
Abbildung 4.49: Einfluss des HDAC 6 selektiven Inhibitors ST71 auf das Adhäsionsverhalten der MV3 Zellen an VCAM-1	124
Abbildung 4.50: Einfluss des HDACi x (x) auf das Adhäsionsverhalten der MV3 Zellen an VCAM-1	124
Abbildung 4.51: Durchflusszytometrische Bestimmung des Einflusses von TSA, ST71 und HDACi x auf die Expression von VLA-4.....	126
Abbildung 4.52: Einfluss der TSA und HDACi x (x) Inkubation auf die Adhäsion der humanen G361 Zellen an VCAM-1 unter physiologischen Flussbedingungen	127
Abbildung 4.53: Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die Adhäsion der MV3 Melanomzellen an VCAM-1 unter physiologischen Flussbedingungen nach einer Inkubationszeit von 72 Std	128
Abbildung 4.54: Einfluss der Inkubationszeit des kombinierten PI3K/mTOR Inhibitors auf die Adhäsion der MV3 Melanomzellen an VCAM-1 unter physiologischen Flussbedingungen.....	129
Tabelle 3.1: Geräte	31
Tabelle 3.2: Verwendete Chemikalien	34
Tabelle 3.3: Antikörper.....	38
Tabelle 3.4: Verwendete Testsubstanzen	38
Tabelle 3.5: Sonstige verwendete Artikel.....	39
Tabelle 3.6: Ansätze die mittles Genexpressionsanalyse untersucht wurden	65
Tabelle 4.1: Untersuchte, potentiell apoptoserelevante Proteine	88

8 Publikationsliste

Wissenschaftliche Originalarbeiten:

Schlesinger M, Simonis D, Schmitz P, Fritzsche J, Bendas G.
Binding between heparin and the integrin VLA-4.
Thromb Haemost. 2009 Nov;102(5):816-22

Simonis D, Schlesinger M, Seelandt C, Borsig L, Bendas G.
Analysis of SM4 sulfatide as a P-selectin ligand using model membranes.
Biophys Chem. 2010 Aug;150(1-3):98-104

Jantscheff P, Schlesinger M, Fritzsche J, Taylor L, Graeser R, Kirfel G, Fürst D, Massing U, Bendas G.
Lysophosphatidylcholine pretreatment reduces VLA-4 and P-selectin mediated B16.F10 melanoma cell adhesion in vitro and inhibits metastasis-like lung-invasion in vivo.
Mol Cancer Ther. 2010, im Druck

Schlesinger M, Schmitz P, Zeisig R, Naggi A, Torri G, Casu B, Bendas G.
Impact of the integrin VLA-4 in MV3 melanoma metastasis and its inhibition by different heparin derivatives. Thromb Haemost. 2011, eingereicht

Abstracta/Kongressbeiträge

Schlesinger M, Naggi A, Torri G, Zeisig R, Alexander M, Schmitz P, Casu B, Bendas G.
Blocking of integrin-mediated human MV3 melanoma cell binding by commercial and modified heparins.
Int J Clin Pharmacol Ther. 2010 Jul;48(7):448-50

Alexander M, Schlesinger M, Jantscheff P, Massing U, Bendas G.
Reduction in human melanoma cell adhesion receptor activity by lysophosphatidylcholine (LPC) treatment - functional characterization and signal pathway analyses.
Int J Clin Pharmacol Ther. 2010 Jul;48(7):478-80

Alexander M, Schlesinger M, Jantscheff P, Massing U, Bendas G.
Lysophosphatidylcholine (LPC) as a pharmacological molecule for the reduction of tumor cell adhesion and metastasis.
Pharmacol Ther. 2010, im Druck

Patente

Europäisches Patent mit der Nummer: 10156776.6 und dem Titel: „Combined use of phospholipids and sulfate groups-carrying polysaccharides for inhibiting metastatic spread”

Preise

Best Abstract Preis für junge Wissenschaftler anlässlich der CESAR Jahrestagung: „Neue therapeutische Konzepte für onkologische und hämatologische Patienten“, 01.-03. Juli 2010, St. Gallen, Schweiz

Poster

Simonis D, Schlesinger M, Alban S, Rothe U, Bendas G.
The detection of kinetic binding constants confirms the potency of heparin as selectin inhibitor
DPhG-Jahrestagung in Erlangen, 2007 (Poster)

Schlesinger M, Fritzsche J, Jantscheff P, Massing U, Bendas G.
Lysophosphatidylcholine inhibits VLA-4 mediated melanoma cell adhesion in the course of metastasis
Minisymposium des GRK 677 in Bonn, 2009 (Poster)

Schlesinger M, Fritzsche J, Jantscheff P, Kirfel G, Fürst D, Massing U, Bendas G.
Lysophosphatidylcholine inhibits VLA-4 mediated melanoma cell adhesion in the course of metastasis
Symposium on Phospholipids in Pharmaceutical Research, Heidelberg, 2009 (Poster)

Schlesinger M, Naggi A, Torri G, Fritzsche J, Simonis D, Schmitz P, Casu B, Bendas G.
Heparin inhibits the VLA-4 mediated melanoma cell binding – Evaluation of structural requirements
6th International Conference on Proteoglycan“, Aix-les-Bains Frankreich, 2009 (Poster)

Schlesinger M, Naggi A, Torri G, Fritzsche J, Simonis D, Schmitz P, Casu B, Bendas G.
Heparin inhibits the VLA-4 mediated melanoma cell binding – Evaluation of structural requirements
Internationales Symposium des GRK 677 in Bonn, 2009 (Poster)

Schlesinger M, Naggi A, Torri G, Zeisig R, Fritzsche J, Simonis D, Alexander M, Schmitz P, Casu B, Bendas G.
Heparin inhibits VLA-4 mediated melanoma cell binding – Evaluation of structural requirements
CESAR-Jahrestagung Heidelberg, 2009 (Poster)

Schlesinger M, Naggi A, Torri G, Zeisig R, Fitchner I, Fritzsche J, Simonis D, Schmitz P, Casu B, Bendas G.
VLA-4 as a target for heparin in inhibiting melanoma cell metastasis – Evaluation of structural requirements of heparin
4th Mildred Scheel Cancer Conference in Bonn, 2010 (Poster)

Schlesinger M, Jantscheff P, Kirfel G, Massing U, Bendas G.
Lysophosphatidylcholine pretreatment reduces VLA-4 and P-selectin mediated B16.F10 melanoma cell adhesion in vitro and inhibits metastasis-like lung-invasion in vivo
CESAR-Jahrestagung St. Gallen, Schweiz, 2010 (Poster)

9 Verfassererklärung

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

Bonn,

Martin Schlesinger

