

II. Medizinische Klinik und Poliklinik
der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ. Prof. Dr. R. Schmid)

**Einfluss von Heparinen auf die Tumorzelladhäsion an
Endothelzellen in-vitro am Beispiel des Pankreaskarzinoms**

Oliver Weigert

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Chr. Lersch
2. Univ.- Prof. Dr. F. Fend

Die Dissertation wurde am 15.06.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 22.07.2004 angenommen.

1	Inhaltsverzeichnis.....	2
2	Abkürzungsverzeichnis	6
3	Einleitung	9
3.1	Malignität und Thrombophilie	9
3.2	Malignität und Antikoagulation	9
3.3	Spezifische Wirkung von Heparinen auf maligne Prozesse.....	9
3.3.1	Potentielle Zielstrukturen für Heparine bezüglich maligner Prozesse	10
3.3.2	Klinische Studien zur Heparinwirkung auf maligne Prozesse	11
3.3.2.1	Klinische Studien zur Wirkung von UFH auf maligne Prozesse.....	11
3.3.2.2	Klinische Studien zur Wirkung von LMWH auf maligne Prozesse	11
3.4	Schlussfolgerungen.....	12
4	Problemstellung	13
5	Material und Methodik.....	14
5.1	Heparine.....	14
5.1.1	Unfraktioniertes Heparin	14
5.1.2	Fraktioniertes Heparin	14
5.1.2.1	Biochemie des Certoparin.....	14
5.1.2.2	Pharmakodynamik des Certoparin.....	15
5.1.2.3	Pharmakokinetik des Certoparin.....	15
5.2	Zellkultur.....	16
5.2.1	Kulturbedingungen.....	16
5.2.2	Zellkulturmedien.....	16
5.2.3	Subkultivierung	17
5.2.4	Kryokonservierung.....	17
5.2.5	Verwendete Zellen.....	18
5.2.5.1	Pa-Tu-8902.....	18
5.2.5.2	Pa-Tu-8988T.....	18
5.2.5.3	Primärzelllinie EPAM-98	19
5.2.5.4	Endothelzellen	19
5.3	In-vitro Adhäsionsversuch.....	20
5.3.1	Prinzip des in-vitro Adhäsionsversuchs.....	20
5.3.2	Verwendete Substanzen.....	20
5.3.3	Vorbereitung der Tumorzellen	21
5.3.4	Vorbereitung des Endothelzelllayers	21
5.3.5	Adhäsionsversuch	22
5.3.6	Übersicht der in-vitro Adhäsionsversuche in Abhängigkeit von der Fragestellung	23
5.3.7	Beta Counter.....	24
5.3.8	Statistik	24
5.3.9	Signifikanztestung.....	24
5.3.9.1	Der t-Test.....	25
5.3.9.2	Der Mann-Whitney Rank Sum Test	25

5.4	Durchflusszytometrie	26
5.4.1	Prinzip der Durchflusszytometrie	26
5.4.2	Verwendete Substanzen	26
5.4.3	Immunologische Färbung	27
5.4.4	Auswertung durchflusszytometrischer Ergebnisse	27
5.4.4.1	Einleitung zur Interpretation durchflusszytometrischer Daten	27
5.4.4.2	Darstellung einer gesamten Fluoreszenzintensität	28
5.4.4.3	Kolmogorov- Smirnov Test	29
5.5	Präparation und Analyse von Ribonukleinsäure	31
5.5.1	Die Präparation zytoplasmatischer RNS aus Gewebekulturzellen	31
5.5.1.1	Allgemeines Prinzip	31
5.5.1.2	Verwendete Substanzen	31
5.5.1.3	Praktisches Vorgehen	31
5.5.2	Gelelektrophorese von RNS	32
5.5.2.1	Allgemeines Prinzip	32
5.5.2.2	Verwendete Substanzen und Vorgehen	33
5.5.3	Northern-Blot Analyse	33
5.5.3.1	Der Transfer der RNS aus dem Gel auf eine Membran	33
5.5.3.1.1	Verwendete Substanzen und Vorgehen	34
5.5.3.2	Hybridisierungsanalyse	34
5.5.3.2.1	Verwendete Substanzen und Vorgehen zur Herstellung 32P-markierter Sonden	34
5.5.3.2.2	Verwendete Substanzen und Vorgehen zur Hybridisierung	35
6	Ergebnisse	37
6.1	In-vitro Tumorzell-Adhäsionsanalyse	37
6.1.1	Modulation der endothelialen Tumorzelladhäsion durch Zytokinstimulation	37
6.1.1.1	Zytokinspezifische Stimulation der endothelialen Tumorzelladhäsion	37
6.1.1.2	Zeit- und Dosis-Wirkungsbeziehung der zytokininduzierten Stimulation der endothelialen Tumorzelladhäsion	38
6.1.2	Inhibition der endothelialen Tumorzelladhäsion durch monoklonale Antikörper gegen Adhäsionsmoleküle	39
6.1.3	Einfluss von Heparinen auf die endotheliale Tumorzelladhäsion in-vitro	40
6.1.3.1	Können unfraktionierte und fraktionierte Heparine die Adhäsion von Pankreasadenokarzinomzellen an Endothel kompetitiv hemmen?	40
6.1.3.2	Können unfraktionierte und fraktionierte Heparine durch Hemmung von Zytokin- Wirkung die Aktivierung von Endothelzellen vermindern und die Tumorzelladhäsion reduzieren?	43
6.1.3.3	Können fraktionierte Heparine intrazelluläre Signalkaskaden stören und somit die Zytokin-induzierte Stimulation des Endothels hemmen?	44
6.1.4	Auflichtmikroskopische Photographien des in-vitro Adhäsionsversuchs	47
6.2	Durchflusszytometrische Analysen	51
6.2.1	Durchflusszytometrische Analyse des Oberflächenexpressionsmusters der verwendeten Tumorzelllinien	51
6.2.2	Durchflusszytometrische Analyse der Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen	52
6.2.2.1	Die endotheliale Expression von E-Selektin in Abhängigkeit vom proinflammatorischen Zytokin	52
6.2.2.2	Die endotheliale Expression von E-Selektin in Abhängigkeit von der Zytokin- Dosierung	54
6.2.2.3	Die endotheliale Expression von E-Selektin in Abhängigkeit von der Dauer der Zytokinstimulation	55
6.2.3	Beeinflussbarkeit der endothelialen Expression von E-Selektin durch Heparine	56
6.2.3.1	Substanz- Wirkungsbeziehung	56
6.2.3.2	Zeit- Wirkungsbeziehung	57
6.2.3.3	Dosis-Wirkungsbeziehung	58

6.3	Northern Blot Analyse	61
7	Diskussion	63
7.1	Diskussion der Grundlagen	63
7.1.1	Heparine	63
7.1.1.1	Unfraktioniertes Heparin	63
7.1.1.1.1	Historie des unfraktionierten Heparins	63
7.1.1.1.2	Biochemie des unfraktionierten Heparins	63
7.1.1.1.3	Wirkung des unfraktionierten Heparins als Antikoagulans	64
7.1.1.1.4	Pharmakokinetik des unfraktionierten Heparins	65
7.1.1.1.5	Dosierung, Konzentration und Monitoring des unfraktionierten Heparins	66
7.1.1.2	Fraktioniertes oder niedermolekulares Heparin	67
7.1.1.2.1	Allgemeines zu niedermolekularen Heparinen	67
7.1.1.2.2	Biochemie der niedermolekularen Heparine	67
7.1.1.2.3	Wirkung des niedermolekularen Heparins als Antikoagulans	68
7.1.1.2.4	Pharmakokinetik, Monitoring und Dosierung des niedermolekularen Heparins	68
7.1.1.3	Spezifische Beeinflussung der Tumorbiologie durch Heparine	69
7.1.1.4	Potentielle Wirkungsmechanismen von Heparin und seinen Derivaten auf maligne Prozesse	70
7.1.2	Metastasierung	74
7.1.2.1	Klinische Bedeutung der Metastasierung	74
7.1.2.2	Metastasierung als phasenhafte Kaskade komplexer Abläufe	74
7.1.2.3	Tumorzelladhäsion im malignen Prozess	76
7.1.2.4	Bedeutung Adhäsionsmoleküle im Rahmen der Metastasierung	76
7.1.2.4.1	Die Selektine	77
7.1.2.4.2	CD44 (Hermes Antigen, H-CAM, pgp-1 Antigen, ECM III)	77
7.1.2.4.3	Andere Zelladhäsionsmoleküle	78
7.1.3	Zytokine im malignen Prozess	78
7.1.3.1	Übersicht der Zytokine	78
7.1.3.2	Wichtige proinflammatorische Zytokine	79
7.1.3.2.1	Interleukin-1 (IL-1)	79
7.1.3.2.2	Tumor Nekrose Faktor α (TNF α)	80
7.1.4	Rationale: Fokussierung auf die endotheliale Tumorzelladhäsion	81
7.2	Diskussion der experimentellen Ergebnisse	82
7.2.1	Wirkung von Zytokinen auf die Interaktion zwischen Endothel und Tumorzelle	82
7.2.1.1	Proinflammatorische Zytokine IL-1 β und TNF α stimulieren die endotheliale Tumorzelladhäsion	82
7.2.1.2	Stimulation mit IL-8 steigert nicht die endotheliale Tumorzelladhäsion	82
7.2.1.3	E-Selektin vermittelt maßgeblich die zytokininduzierte Tumorzelladhäsion	83
7.2.1.4	Charakterisierung der zytokininduzierten Expression von E-Selektin	85
7.2.1.4.1	Methodik der E-Selektin Bestimmung in der Durchflusszytometrie	85
7.2.1.4.2	Ruhende Endothelzellen exprimieren kein E-Selektin	85
7.2.1.4.3	IL-1 β ist TNF α bezüglich der Stimulation von Tumorzelladhäsion und E-Selektin Expression überlegen	85
7.2.1.4.4	Kinetik der E-Selektin Expression auf IL-1 β stimulierten HUVEC	86
7.2.1.4.5	E-Selektin Expression korreliert mit der Zytokin- Dosierung	87
7.2.1.4.6	Biologisch wirksame Zytokinkonzentrationen in-vivo	87
7.2.1.4.7	Einfluss der malignen Grunderkrankung auf das Zytokinprofil in-vivo	88
7.2.1.4.8	Adhäsionsmolekülexpression auf malignomassoziierten Endothelzellen	88

7.2.2	Wirkung von Heparinen auf die zytokinstimulierte Interaktion zwischen Endothel und Tumorzelle	90
7.2.2.1	Unfraktionierte und fraktionierte Heparine können nicht die spezifische Bindung von endothelialen Adhäsionsmolekülen und Tumorantigenen kompetitiv hemmen.....	91
7.2.2.2	Unfraktionierte und fraktionierte Heparine können nicht durch biologische Inaktivierung der Zytokinwirkung die Aktivierung von Endothelzellen vermindern und die Tumorzelladhäsion reduzieren	92
7.2.2.3	Präinkubation mit fraktioniertem Heparin kann im Gegensatz zu unfraktioniertem Heparin die zytokininduzierte Aktivierung von Endothelzellen vermindern und die Tumorzelladhäsion reduzieren	93
7.2.2.4	Fraktioniertes Heparin kann internalisiert werden	94
7.2.2.5	Heparine können mit intrazellulären Molekülen interagieren.....	95
7.2.2.6	Mögliche Interaktionsstelle ist die gemeinsame Endstrecke der Signaltransduktion von IL-1 β und TNF α	95
7.2.2.7	NF- κ B Signalkaskade	96
7.2.2.7.1	Bedeutung des Transkriptionsfaktors NF- κ B	96
7.2.2.7.2	Aktivierung der NF- κ B Signalkaskade	96
7.2.2.7.3	Die NF- κ B Protein-Familie	96
7.2.2.7.4	Übersicht der Signalkaskade von NF κ B	97
7.2.2.7.5	NF- κ B NLS als mögliche Zielstruktur für die durch LMWH inhibierte Zytokinaktivität	97
7.2.2.7.6	IKK als mögliche Zielmoleküle für die durch LMWH inhibierte Zytokinaktivität	98
7.2.3	Mögliche klinische Bedeutung einer begleitenden Heparintherapie bei onkologischen Patienten und Ausblick	99
8	Zusammenfassung.....	100
8.1	Hintergrund	100
8.2	Fragestellungen	100
8.3	Methoden	100
8.3.1	In-vitro Adhäsionsversuch	100
8.3.2	Durchflusszytometrie	101
8.3.3	Northern Blot Analyse.....	101
8.4	Ergebnisse	101
8.5	Diskussion	102
9	Literaturverzeichnis	104
10	Abbildungsverzeichnis.....	121
11	Danksagung	124
12	Curriculum vitae.....	125

2 Abkürzungsverzeichnis

α - ³² P-dATP	α - ³² Phosphat-Desoxy-Adenosintriophosphat
(d)ATP	(Desoxy-) Adenosin Triphosphat
³ H	Tritium
BFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
CEA	Carcinoembryonales Antigen
cpm	Counts per minute
D	Dalton
DEPC-H ₂ O	Diethylpyrocarbonat-Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulphoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ds	Doppelsträngig (double stranded)
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
ECGS/H	Endothelial Cell Growth Supplement for HUVEC
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epithelial Growth Factor
ELAM-1	Endothelial leukocyte adhesion molecule-1
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
F _c	Kristallisierbares Antikörperfragment
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FL	Fluoreszenz
FSC	Forward scatter
g	Erdbeschleunigung
GeoMean	Geometrischer Mittelwert einer Fluoreszenzintensität
GM-CSF	Granulozyten Makrophagen Colony Stimulating Factor
H ₂ O	Wasser

HBSS	<i>Hank's Balanced Salts Solution</i>
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule-1</i>
ICE	<i>Interleukin 1 Converting Enzyme</i>
Ig	<i>Immunglobulin</i>
IL	<i>Interleukin</i>
IL-1 β	<i>Interleukin-1beta</i>
IL-8	<i>Interleukin-8</i>
INF γ	<i>Interferon gamma</i>
kD	<i>Kilo-Dalton</i>
LMWH	<i>Low molecular weight heparin</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharid</i>
MCP	<i>Macrophage Chemotactic Protein</i>
MDR	<i>Multi Drug Resistance</i>
MIP	<i>Macrophage Inflammatory Protein</i>
MOPS	<i>3-(N-Morpholino-)-Propansulfonsäure</i>
NF- κ B	<i>Nukleärer Faktor kappa B</i>
NF- κ B NLS	<i>NF-κB nukleäre Lokalisationssequenz</i>
NMH	<i>Niedermolekulares Heparin</i>
NO	<i>Stickoxyd</i>
PAF	<i>Platelet Activating Factor</i>
Pa-Tu	<i>Pankreas-Tumor</i>
PBS	<i>Phosphat gepufferte Kochsalzlösung</i>
PECAM-1	<i>Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1</i>
PF-4	<i>Platelet Factor 4</i>
PGE	<i>Prostaglandin E</i>
RANTES	<i>Regulation-upon activation, normal T expressed and excreted</i>
RNS	<i>Ribonukleinsäure</i>
rpm	<i>Rotationen pro Minute</i>

SDS	<i>Natrium- Dodecylsulfat</i>
ss	<i>Einzelsträngig (single stranded)</i>
SSC	<i>Side scatter</i>
Succ100-LMW-H	<i>Low molecular weight heparin mit 100% Succinylierung</i>
TFPI	<i>Tissue factor pathway inhibitor</i>
TGF β	<i>Transforming Growth Factor</i>
TNF α	<i>Tumor Nekrose Faktor alfa</i>
UFH	<i>Unfraktioniertes Heparin</i>
VCAM	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i>
VLMW-H	<i>Very low molecular weight heparin</i>

3 Einleitung

3.1 Malignität und Thrombophilie

Thromboembolische Erkrankungen betreffen etwa 15% aller Patienten mit malignen Grundleiden [52] und stellen in dieser Population die zweithäufigste Todesursache dar [32]. Die Assoziation von malignem Tumorleiden und Hyperkoagulabilität wurde schon im 19. Jahrhundert von Trousseau beschrieben [66] und wiederholt in Studien belegt [13;126]. Die Krebserkrankung und deren Therapie können alle drei Säulen der klassischen Triade Virchows zur Pathogenese thromboembolischer Ereignisse beeinflussen: Störung des Blutflusses, Schädigung des Endothelzellverbandes und Verstärkung prokoagulativer Faktoren [87]. Konsequenterweise ergibt sich für viele Patienten eine Indikation zur prophylaktischen oder therapeutischen Antikoagulation.

3.2 Malignität und Antikoagulation

Anfängliche Bedenken wegen einer möglicherweise überproportional erhöhten Blutungsgefahr, speziell bei Patienten mit malignen Grundleiden während oder nach einer antikoagulativen Behandlung [47;82;83] haben sich in nachfolgenden prospektiven Studien nicht bestätigt [18-20]. Neben der oralen Antikoagulation war unfraktioniertes Heparin (UFH) für viele Jahre die initiale Standardtherapie [124], doch niedermolekulare Heparine (LMWH) haben sich in Studien als mindestens ebenso sicher und wirksam herausgestellt [16].

3.3 Spezifische Wirkung von Heparinen auf maligne Prozesse

Neben der einfachen Assoziation von Malignomen und Thrombophilie, finden sich zahlreiche Hinweise auf eine Beteiligung von Koagulationsmechanismen an der Pathogenese maligner Vorgänge [78]. Zusätzlich zu ihrer antikoagulativen Wirkung weisen Heparin und seine Derivate Eigenschaften auf, die wenig oder nichts mit einer Beeinflussung der Hämostase tun zu haben scheinen.

Eine der ersten diesbezüglichen Publikationen geht auf Goerner et al. im Jahr 1930 zurück: Durch Inkubation von Karzinomfragmenten mit Heparin vor Implantation konnte im Tiermodell das Tumorwachstum gehemmt und die Überlebenszeit der Tiere verlängert werden.

Bis zum heutigen Zeitpunkt sind die spezifischen Wirkungen von Heparin und seiner Derivate auf maligne Prozesse in-vitro, im Tierversuch und in klinischen Studien intensiv beforschte Themengebiete (vgl. 7.1.1.3).

3.3.1 Potentielle Zielstrukturen für Heparine bezüglich maligner Prozesse

Unfraktionierte und, in einem geringeren Ausmaß, fraktionierte Heparine binden durch elektrostatische Interaktion ihrer polyanionischen Gruppen der Glykosaminoglykan-Ketten an eine Vielzahl von Proteinen und anderen Molekülen [124]. Diese Interaktionen werden durch physikochemische Eigenschaften (vgl. 7.1.1.1.2 und 7.1.1.2.2) der Heparinpolymere bestimmt, wie der Primärsequenz, dem Sulfatierungsmuster, der Verteilung der elektrischen Ladung, der generellen Ladungsdichte und dem Molekulargewicht.

Potentiell können unfraktioniertes Heparin und seine Derivate mit einer Vielzahl von Zielmolekülen interagieren, die an malignen Prozessen wie der Karzinogenese, dem Tumorwachstum, der Angiogenese, der Tumorzelladhäsion und -invasion sowie der Metastasierung beteiligt sind [107] (vgl. Tabelle 7-1).

Eine Übersichtsarbeit zu allen verfügbaren Tierstudien zwischen 1960 und 1999 unterstreicht die Vielschichtigkeit und Komplexität der Heparinwirkung auf Tumorprogression und Metastasierung sowie der damit verbundenen Interpretationsschwierigkeiten der Ergebnisse [124].

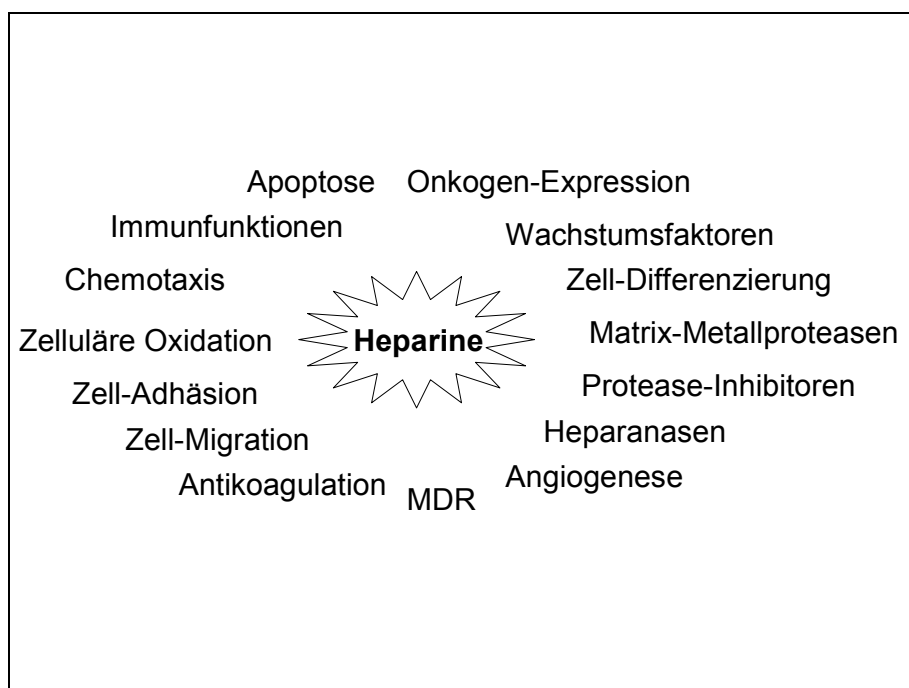


Abbildung 3-1 Auswahl potentieller Zielstrukturen für Heparine bezüglich maligner Prozesse
Modifiziert nach [122]

3.3.2 Klinische Studien zur Heparinwirkung auf maligne Prozesse

Vor dem Hintergrund der paraneoplastischen Thrombophilie, wurde eine Vielzahl von Tumorpatienten im Rahmen klinischer Studien mit unfraktionierten und fraktionierten Heparinen therapiert [86;122;123].

3.3.2.1 Klinische Studien zur Wirkung von UFH auf maligne Prozesse

Seit der Publikation mehrerer Metaanalysen klinischer Studien zur Prophylaxe venöser Thromboembolien durch unfraktionierte Heparine (UFH), hat sich wegen der gezeigten reduzierten Mortalität und des verlängerten Überlebens von Patienten mit malignen Grundleiden das Interesse am Einfluss dieser Substanzen auf die Tumorbiologie verstärkt.

Studie	Intervention/Indikation	Studientyp	Ergebnisse	Statistische Signifikanz
Halkin et al. [54]	Prophylaxe einer Phlebothrombose (UFH vs. keine Therapie)	Retrospektiv mit Subgruppen-Analyse	Reduzierte Mortalität bei UFH therapierten Patienten mit malignem Grundleiden	p<0,05
Kingston et al. [71]	Perioperative Prophylaxe einer Phlebothrombose bei Patienten mit Kolon-Karzinomen (UFH vs. keine Therapie)	Retrospektiv	Reduzierte Mortalität in UFH therapiertes Gruppe	p=0,041
Kohanna et al. [74]	Perioperative Prophylaxe einer Phlebothrombose bei Patienten mit Kolon-Karzinomen (UFH vs. keine Therapie)	Retrospektiv	Reduzierte Mortalität in UFH therapiertes Gruppe	p<0,05
Kakkar et al. [66]	Perioperative Prophylaxe einer Phlebothrombose bei Patienten mit verschiedenen Tumoren (UFH vs. keine Therapie)	Retrospektiv	Reduzierte Mortalität in UFH therapiertes Gruppe	p=0,0005
Lebeau et al. [85]	Polychemotherapie beim kleinzelligen Bronchialkarzinom mit oder ohne UFH	Prospektive, randomisierte Multicenter-Studie	Verlängertes mittleres Überleben der mit UFH therapierten Gruppe	p=0,01

Tabelle 3-1 Ausgewählte Studien zur Wirkung von unfraktioniertem Heparin (UFH) bei Patienten mit malignen Tumorleiden

3.3.2.2 Klinische Studien zur Wirkung von LMWH auf maligne Prozesse

Unerwartet ließ sich in weiteren Metaanalysen bei Tumorpatienten, deren Thrombose mit niedermolekularen Heparinen therapiert wurde, ein signifikanter Überlebensvorteil nachweisen, im Vergleich zur Kontrollgruppe, deren Thrombose mit unfraktioniertem

Heparin behandelt wurde [58;86;123]. Unter anderem konnte eine 65%ige Reduktion der Mortalität bei Patienten mit einer malignen Grunderkrankung gezeigt werden [51;67], wohingegen sich die Mortalität bei Patienten ohne maligne Grunderkrankung in beiden Gruppen nicht signifikant unterschied [122]. Diese Resultate können die reduzierte Mortalität folglich nicht durch die Prävention und Therapie thromboembolischer Ereignisse erklären, sondern repräsentieren eine zusätzliche, spezifische Wirkung niedermolekularer Heparine auf die Tumorbilogie, die bis heute nicht evidenzbasiert verstanden wird. Die signifikante Überlegenheit fraktionierter gegenüber unfraktionierten Heparinen bei vergleichbarer antikoagulativer Wirkung ist derzeit schwer zu erklären [122].

3.4 Schlussfolgerungen

- (1) Thromboembolische Ereignisse sind eine Hauptursache der Morbidität und Mortalität in der Onkologie.
- (2) Sowohl unfraktionierte als auch fraktionierte Heparine können die Überlebensprognose von Tumorpatienten verbessern.
- (3) Die verbesserte Überlebensprognose kann nicht allein durch die Verhinderung thromboembolischer Ereignisse erklärt werden, sondern scheint einen zusätzlichen Effekt der Heparine auf die Tumorbilogie zu repräsentieren.
- (4) Niedermolekulare Heparine scheinen diesbezüglich bei onkologischen Patienten dem unfraktionierten Heparin überlegen zu sein.
- (5) Die möglichen Interaktionen von Heparinen und seinen Derivaten mit malignen Prozessen sind vielfältig. Es herrscht Unklarheit über die Signifikanz dieser Interaktionen.

4 Problemstellung

Das Pankreaskarzinom gilt als klassisches Beispiel für assoziierte paraneoplastische Thrombophilie [13]. Häufig ergibt sich eine prophylaktische oder therapeutische Indikation zur Antikoagulation [87]. In Studien zeigte sich unter begleitender Heparinmedikation eine verbesserte Überlebensprognose. Dieser Effekt scheint unabhängig von der antikoagulativen Wirkung, eine zusätzliche, eigenständige Auswirkung auf die Tumorbiologie zu repräsentieren [122].

Die Prognose einer malignen Grunderkrankung hängt unter anderem maßgeblich vom Vorliegen und Ausmaß der metastatischen Dissemination ab [40]. Eine essentielle Phase der sequentiellen Abläufe der Fernmetastasierung stellt die Adhäsion von zirkulierenden Tumorzellen im entfernten Kapillarbett dar [104] (vgl. 7.1.1.3). Dieser Prozess wurde vor dem Hintergrund der möglichen Interaktion von Heparin und dessen fraktionierten Derivaten im Rahmen dieser Arbeit in-vitro untersucht, um folgende Fragen zu beantworten:

- (1) Können wichtige Determinanten der Tumorzelladhäsion an Endothelzellen in-vitro identifiziert werden?
- (2) Beeinflussen Heparine die endotheliale Tumorzelladhäsion in-vitro?
- (3) Es ist unklar, warum niedermolekulare Heparine bei gleichem antikoagulativen Effekt effektiver die Prognose von Tumorpatienten verbessern als unfraktionierte Heparine. Können funktionelle Unterschiede bezüglich der endothelialen Tumorzelladhäsion in Abhängigkeit vom Molekulargewicht der Heparine in-vitro identifiziert werden?
- (4) Welche Mechanismen können dafür verantwortlich sein?

5 Material und Methodik

5.1 Heparine

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich kommerziell erhältliche Präparate verwendet, die für den medizinischen Einsatz am Menschen geeignet und in Deutschland zugelassen sind.

5.1.1 Unfraktioniertes Heparin

Als typischer Vertreter der unfraktionierten Heparine wurde Heparin-Natrium aus der Mukosa von Schweinen (Liquemin N25.000®, Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) verwendet (vgl. 7.1.1.1).

5.1.2 Fraktioniertes Heparin

Als typischer Vertreter der niedermolekularen Heparine wurde Certoparin (Monoemborex®, Sandoz/Novartis, Nürnberg, Deutschland) verwendet (vgl. 7.1.1.2). Aufgrund der interindividuellen Unterschiede der fraktionierten Heparine, sollen wichtige und herausragende Eigenschaften des verwendeten Certoparins dargestellt werden.

5.1.2.1 Biochemie des Certoparin

Certoparin repräsentiert einen typischen Vertreter aus der Gruppe der niedermolekularen Heparine [37]. Unfraktioniertes Heparin aus der Mukosa von Schweinen wird mittels chemischer Depolymerisation durch Isoamylnitrit zu einem Molekulargewicht von 3.000 bis 10.000 Dalton gespalten. Certoparin hat ein verhältnismäßig konstantes Molekulargewichtprofil: 85 % aller Heparinketten des Certoparin besitzen ein Molekulargewicht von weniger als 8.000 Dalton, nur 13 % weniger als 2.500 Dalton [4]. Die Spaltung durch Isoamylnitrit bedingt eine Desamination der Glucosamine unter Bildung von 2,5-Anhydro-D-Mannose [5]. Mehr als 60 % der anionischen Gruppen bestehen aus dem Disaccharid 2-O-SO₃-Uronsäure-6-O-SO₃-Glucosamin-N-SO₄, die beobachtete Sulfat/Carboxyl-Ratio ist mit 2,5 der des unfraktionierten Heparin ähnlich [36].

5.1.2.2 Pharmakodynamik des Certoparin

Bezüglich der Pharmakodynamik befindet sich Certoparin mit einer antikoagulativen Aktivität von 41– 46 USP U/mg in der typischen Größenordnung der niedermolekularen Heparine. Die anti-Xa: aPTT Ratio beträgt 2:1, die anti-Xa: anti-IIa Ratio 2,0- 2,2:1. Auch bezüglich anderer pharmakodynamischer Aspekte, wie der antithrombotischen und thrombolytischen Aktivität, der Beeinflussung der Thrombozytenfunktion und der beobachteten Stimulation von endothelialer Tissue factor pathway inhibitor (TFPI) Sekretion, unterscheidet sich Certoparin nicht wesentlich von anderen Vertretern der fraktionierten Heparine [36].

5.1.2.3 Pharmakokinetik des Certoparin

Die pharmakokinetischen Eigenschaften von Certoparin wurden sowohl im Tiermodell als auch am Menschen untersucht. Tabelle 5-1 fasst die relevanten Daten zusammen.

	Intravenös		Subkutan	
	3000 IU	5000 IU	3000 IU	5000 IU
c_{max} (IU/ml)	0,72	1,14	0,232	0,361
t_{max} (min)	5	5	240	240
t_{1/2} (min)	222	240	276	282
AUC (U*h/ml)	2,22	3,59	1,96	3,35
Cl_t (l/h)	1,4	1,4	1,5	1,5
Bioverfügbarkeit (%)	-	-	89	94

Tabelle 5-1 Pharmakokinetik nach intravenöser bzw. subkutaner Einzelgabe von Certoparin

Modifiziert nach Grobecker H, Study Report 1994

c_{max} Maximalkonzentration im Serum nach Applikation, **t_{max}** Zeit bis zum Erreichen der Maximalkonzentration, **t_{1/2}** Eliminationshalbwertszeit, **AUC** Area under the curve, **Cl_t** Gesamtclearance

Certoparin wird unabhängig von der Applikationsart nach einer Kinetik erster Ordnung eliminiert. Nach intravenöser Gabe ist die anti-Xa Aktivität unmittelbar im Serum nachweisbar. Eine Steigerung der Dosierung von 3.000 IU auf 5.000 IU verlängert die Eliminationshalbwertszeit um den Faktor 1,1, allerdings ist die Gesamtclearance dosisunabhängig. Nach subkutaner Applikation verlängert sich die Eliminationshalbwertszeit geringfügig. Die Zeit bis zum Erreichen der

Maximalkonzentration und die Gesamtclearance scheinen dosisunabhängig zu sein. Die Bioverfügbarkeit von Certoparin beträgt etwa 90 %, verglichen mit 15– 20 % bei unfraktioniertem Heparin.

5.2 Zellkultur

5.2.1 Kulturbedingungen

Nicht anderweitig aufgeführtes Material und Vorgehen entsprach den üblichen Empfehlungen und Normen für steriles Arbeiten mit Zellkulturen. Alle Zellen wurden in einem Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Es wurden 25 cm² bzw. 75 cm² Kulturflaschen (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) verwendet.

5.2.2 Zellkulturmedien

Die etablierten Pankreaskarzinomzelllinien Pa-Tu-8902 und Pa-Tu-8988T (vgl. 5.2.5.1 und 5.2.5.2) wurden in 89 % Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM mit 4,5 g/l Glukose, GibcoBRL, Gaithersburg, USA) mit 10 % FCS (Sigma, Rödermark, Deutschland) und 1 % Penicillin/Streptomycin (GibcoBRL, Gaithersburg, USA) kultiviert. Als Zellkulturmedium für die Primärzellkultur EPAM-98 (vgl. 5.2.5.3) wurde in unserem Labor ein Medium etabliert, das auf DMEM mit 4,5 g/l Glukose (GibcoBRL, Gaithersburg, USA) basiert. Weitere Zusätze sind 10 % FCS (Sigma, Rödermark, Deutschland), 1 % Penicillin/Streptomycin (GibcoBRL, Gaithersburg, USA), 5 ng/ml Epithelial Growth Factor (EGF, Sigma, Rödermark, Deutschland), 13,5 U/ml unfraktioniertes Heparin (Liquemin N25000, Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland), 0,2 U/ml Insulin (Insulin Actrapid HM, NovoNordisk, Bagsværd, Dänemark) und 1 µg/ml Hydrocortison (Hydrocortison 100, Pharmacia&Upjohn GmbH, Peapack, USA).

Für die Kultur der Endothelzellen wurde ein ready-to-use Endothelial Cell Growth Medium (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Es enthält auf der Basis eines firmenintern definierten Basalmediums insbesondere 10ml FCS (2 %, low serum), 2 ml ECGS/H, 0,1 ng/ml EGF, 1,0 ng/ml bFGF, 1,0 µg/ml Hydrocortison und Gentamycin/ Amphotericin B.

Für alle Zellen galt als Richtvolumen 200 µl Medium pro cm² Kulturflasche.

5.2.3 Subkultivierung

Als besonders schonend bezüglich der in der Trypanblau-Färbung (Sigma, Rödermark, Deutschland) beobachteten Vitalität und der adhäsiven Eigenschaften, zeigte sich folgendes Vorgehen für die Subkultivierung (Splitting) aller Zellen, insbesondere der Endothelzellen:

Waschen mit 37°C warmer Hank's Balanced Salts Solution (HBSS, GibcoBRL, Gaithersburg, USA), Zugabe von Trypsin/EDTA (GibcoBRL, Gaithersburg, USA) bis der Zell-Monolayer gerade bedeckt war und Inkubation bei 37°C. Im Mikroskop war nach einer Zelllinien-spezifischen Zeit (HUVEC ½- ¾ Minuten, Pa-Tu-8902 2- 3 Minuten, Pa-Tu-8988T 1- 2 Minuten und EPAM-98 5 Minuten) die Zell-Separation erkennbar. Nach dieser verhältnismäßig kurzen Inkubation waren die Zellen in der Regel noch am Flaschenboden adhärent. Trypsin/EDTA konnte abgesaugt werden und wenig 1mM EDTA (Sigma, Rödermark, Deutschland) in HBSS (GibcoBRL, Gaithersburg, USA) zugegeben werden, so dass die Zellen gerade noch durch Schwenken umspült werden konnten. Nach wenigen Minuten konnte mikroskopisch das Ablösen der Zellen vom Kulturflaschenboden kontrolliert werden, und mit calciumhaltigem Medium (divalenten Kationen zur Sättigung von EDTA) konnten die Zellen abgespült werden. In reichlich Medium konnten die Zellen neu angesetzt werden. Nach einigen Stunden waren die Zellen in der Regel in der neuen Kulturflasche adhärent und das Medium wurde gewechselt, um Reste von Trypsin und EDTA zu entfernen.

5.2.4 Kryokonservierung

Es wurden 2,0 ml Kryokonservierungsröhrchen (Nalgene, Neerijse, Belgien) verwendet. Alle Zellen wurden nach folgendem Vorgehen kryokonserviert: Die Zellen wurden wie unter 5.2.3 beschrieben abgelöst, in 50 ml Falcon Röhrchen (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) 10 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert und das Pellet in 4°C kalter Kryokonservierungslösung mit einer Konzentration von 2- 4x 10⁶ Zellen/ml resuspendiert. Bestandteile der Kryokonservierungslösung waren 70 % DMEM (GibcoBRL, Gaithersburg, USA) mit 20 % FCS (Sigma, Rödermark, Deutschland) und 10 % DMSO (Dimethyl Sulphoxide, Sigma, Rödermark, Deutschland). Um die Zellen annähernd kontinuierlich, über die empfohlene Rate von 1°C/Minuten einzufrieren, wurden die Zellen in Styropor gepackt, auf Eis

transportiert, 24 Stunden bei - 80°C gelagert und anschließend in flüssigen Stickstoff (- 196°C) überführt.

Um die Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden sie im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in angewärmtem Zellkulturmedium in einer Konzentration von etwa 80.000 Zellen/cm² in Kulturflaschen angesetzt. Um die Kryokonservierungslösung zu entfernen erfolgte nach wenigen Stunden ein Mediumwechsel, nachdem ein Großteil der Zellen adhärent war.

5.2.5 Verwendete Zellen

im Rahmen dieser Arbeit wurden als Tumorzellen ausschließlich Zellen maligner Neoplasien des Pankreas verwendet.

5.2.5.1 Pa-Tu-8902

Diese Zelllinie aus der deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) wurde 1985 von Elsässer et al. an der Universität Marburg aus einem primären, duktalem Pankreas-Adeno-Karzinom (Grad 2) einer 44-jährigen Frau etabliert. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass diese Zellen Metastasen in Nacktmäusen bilden können.

Die homogenen, mittelgroßen Zellen mit polychromatischen Kernen und hellem Zytoplasma wachsen adhärent als Monolayer mit einer Verdoppelungszeit von 25-40 Stunden. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2 bis 3 Tage. Nach 4 bis 6 Tagen wurden die konfluenten Zellen 1:4 bis 1:10 subkultiviert.

Für Adhäsionsversuche und Durchflusszytometrie wurden Zellen der mindestens 3. Passage nach Kryokonservierung verwendet.

5.2.5.2 Pa-Tu-8988T

Diese Zelllinie aus der deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) wurde 1985 von Elsässer et al. an der Universität Marburg aus einer Lebermetastase eines primären, duktalem Pankreas-Adeno-Karzinoms einer 64-jährigen Frau etabliert. Die Verdoppelungszeit beträgt 22 Stunden, ein Mediumwechsel war alle 2 bis 3 Tage erforderlich. Die konfluenten Zellen wurden alle 3-5 Tage in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:5 subkultiviert.

Für Adhäsionsversuche und Durchflusszytometrie wurden Zellen der mindestens 3. Passage nach Kryokonservierung verwendet.

5.2.5.3 Primärzelllinie EPAM-98

Diese Zelllinie wurde 1998 in unserem Labor aus dem malignen Aszites eines 66-jährigen, männlichen Patienten isoliert (noch nicht publizierte Daten). Der Patient hatte einen 4 x 6 cm großen Tumor im Bereich des Pankreaskopfes. Es zeigte sich eine diffuse hepatische Metastasierung, eine 5 cm große pulmonale Raumforderung und eine hiläre Lymphadenopathie. Histologisch zeigte sich ein undifferenziertes Adenokarzinom, der klinische Verlauf war mit dem eines pankreatischen Primärtumors vereinbar.

Die mittelgroßen, homogenen Zellen mit hellem Zytoplasma und großen Kernen wachsen zytoadhärent in Nestern oder trabekulären Monolayern. Die Generationszeit beträgt 40 bis 60 Stunden. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2 bis 3 Tage und Subkultivieren war alle 4 bis 7 Tage in einem Verhältnis von 1:2 oder 1:3 nötig.

Für die Adhäsionsversuche und Durchflusszytometrie wurden Zellen der mindestens 3. Generation nach Kryokonservierung verwendet.

5.2.5.4 Endothelzellen

Es wurden menschliche Endothelzellen aus der Nabelvene verwendet (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC, PromoCell, Heidelberg, Deutschland). Die Zellen wachsen spindelig mit ausgeprägter Kontaktinhibition. Ein Mediumwechsel war alle 2 Tage nötig. In subkonfluentem Zustand wurden die Zellen 1:2, maximal 1:3 alle 4 bis 7 Tage subkultiviert. Vor allem während der ersten Passagen nach Kryokonservierung war es unter Umständen notwendig, auf der Basis lichtmikroskopischer Beurteilung (vermehrt Vakuolen im Zytoplasma, extrem spindelige Zellmorphologie, zunehmend ausgedünnte Zellausläufer, langsames Wachstum), die Zellen zusätzlich mit DMEM mit 10 % FCS 1:5 zu kultivieren. Nach einer entsprechenden Behandlung wurden die Zellen für mindestens 2 Passagen nicht für Versuche verwendet. Die relevanten und dargestellten Versuche wurden ausschließlich mit Zellen einer Charge, also eines Spenders durchgeführt. Außerdem wurde darauf geachtet, Zellen zwischen der 3. und 10. Passage zu verwenden.

5.3 In-vitro Adhäsionsversuch

5.3.1 Prinzip des in-vitro Adhäsionsversuchs

Nach aktuellem Erkenntnisstand können Tumorzellen mit schwachen radioaktiven Nukliden, die kovalent an DNA Basen konjugiert sind, markiert und detektiert werden, ohne dass sich Zelleigenschaften maßgeblich zu ändern scheinen. Verwendet wurde der Betastrahler [³H] Methyl-Thymidin (ICN Pharma, Frankfurt/Main, Deutschland). Nach entsprechender Adhäsion der so markierten Tumorzellen an einen Endothel-Zell-Monolayer, Entfernen der nicht-adhärenenten Zellen und Lyse aller verbliebenen Zellen konnte mittels Liquidszintigraphie ein Strahlungswert, counts per minute (cpm), ermittelt werden, der direkt proportional der Zelladhäsion war.

5.3.2 Verwendete Substanzen

Zytokine	Interleukin 1 β , rekombinant, human; IL-1 β (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland)
	Interleukin 8, rekombinant human; IL-8 (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland)
	Tumor-Nekrose-Faktor α , rekombinant human, TNF α (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland)
Heparine	Unfraktioniertes Heparin (Liquemin N25.000®, Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland)
	Fraktioniertes, niedermolekulares Heparin; Certoparin (Monoemborex®, Sandoz/Novartis, Nürnberg, Deutschland)
Antikörper	Anti CA19-9, Maus-anti-human IgM (BMA, Augst, Schweiz)
	Anti CA 19-9, Maus-anti-human IgG (Dako, Hamburg, Germany)
	Anti E-Selektin, Maus-anti-human IgG (Dako, Hamburg, Germany)

5.3.3 Vorbereitung der Tumorzellen

1 bis 2×10^6 Tumorzellen wurden in 75 cm² Kulturflecken angesetzt (ca. 15.000 Zellen/cm²) und in Gegenwart von 2-5µl/ml (20- 50 µCi/10ml= 740- 1850 kBq/10ml) [³H]-Methyl-Thymidin (ICN Pharma, Frankfurt/Main, Deutschland) entsprechend ihrer individuellen Generationszeit entweder 24 Stunden (Pa-Tu-8902 und Pa-Tu-8988T) oder 48 Stunden (EPAM-98) kultiviert.

Vor dem Adhäsionsversuch konnten die Zellen mit monoklonalen Antikörpern (anti Sialyl Lewis_a (CA19-9) IgG und IgM; 30 µg/ml/30 Minuten) inkubiert werden.

Um eine mögliche kompetitive Inhibition der endothelialen Tumorzelladhäsion durch Heparine zu untersuchen, wurden UFH und LMWH (0,01– 1000 U/ml) synchron mit der Tumorzellsuspension zugegeben (vgl. Abbildung 5-1; Pfeil 1).

5.3.4 Vorbereitung des Endothelzelllayers

Es wurden 48 Well Multiwellplatten (Falcon, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) verwendet. HUVEC wurden mit einer verhältnismäßig hohen Konzentration von 60.000– 80.000 Zellen/Well (80.000- 100.000 Zellen/cm²) angesetzt. Es wurde wegen des Heparinanteils des SupplementMix nur das Basalmedium des Endothelial Cell Growth Mediums (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Nach etwa 24 Stunden bildete sich ein konfluenten Endothelzell-Monolayer aus.

Vor dem Adhäsionsversuch konnten HUVEC zu unterschiedlichen Zeiten mit verschiedenen Konzentrationen von Zytokinen (IL-1β, TNFα, IL-8; jeweils 0,5– 1,0 ng/ml/2- 4 Stunden in frischem Basalmedium) stimuliert und mit monoklonalen Antikörpern (Anti E-Selektin; 1:100/30 Minuten) inkubiert werden.

Um eine mögliche biologische Inaktivierung der Zytokinwirkung durch Heparine zu untersuchen, wurden HUVEC in Anwesenheit von UFH oder LMWH (0,01- 1000 U/ml) proinflammatorisch stimuliert (vgl. Abbildung 5-1; Pfeil 2).

Um eine denkbare endotheliale Internalisierung von Heparinen zu ermöglichen und eine heparinvermittelte Inhibition der zytokininduzierten Endothelzellstimulation durch Interferenz mit intrazellulären Molekülen zu untersuchen, wurden HUVEC vor Zytokinstimulation mit UFH und LMWH (100-1000 U/ml/) präinkubiert (vgl. Abbildung 5-1; Pfeil 3).

5.3.5 Adhäsionsversuch

Die radioaktiv markierten Tumorzellen wurden wie unter 5.2.3 beschrieben abgelöst und in Basalmedium des Endothelial Cell Growth Mediums (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) auf eine Konzentration von etwa 250.000 Zellen/ml resuspendiert. Das Medium auf den HUVEC wurde abgesaugt und 200 µl Tumorzellsuspension pro Well zugegeben (etwa 50.000 Zellen pro Well). Nach 30 Minuten Adhäsionszeit im Inkubator bei 37°C wurden die adhären von den nicht-adhären, sedimentierten Tumorzellen standardisiert getrennt (30 Sekunden, Stufe 6 der Schüttelplatte Titertek®, Flow Laboratories, Irvine, Schottland) und die nicht adhären Zellen abgesaugt. Durch Zugabe von TritonX-100 (Sigma, Rödermark, Deutschland) 1:100 in Aqua 400 µl/Well wurden die verbliebenen Zellen lysiert und die Platte abermals standardisiert wie beschrieben geschüttelt.

Um ein Maß für die insgesamt zugegebene Zellzahl zu erhalten, wurden je 200 µl Tumorzellsuspension in 4 Eppendorf- Reaktionsgefäße pipettiert, 10 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert und das Pellet in gleicher Weise mit 400 µl TritonX-100 (Sigma, Rödermark, Deutschland) 1:100 in Aqua lysiert. Durch vorherige Zellzählung in einer Neubauer Kammer konnten cpm- Wert und Zellzahl zueinander ins Verhältnis gesetzt werden.

5.3.6 Übersicht der in-vitro Adhäsionsversuche in Abhängigkeit von der Fragestellung

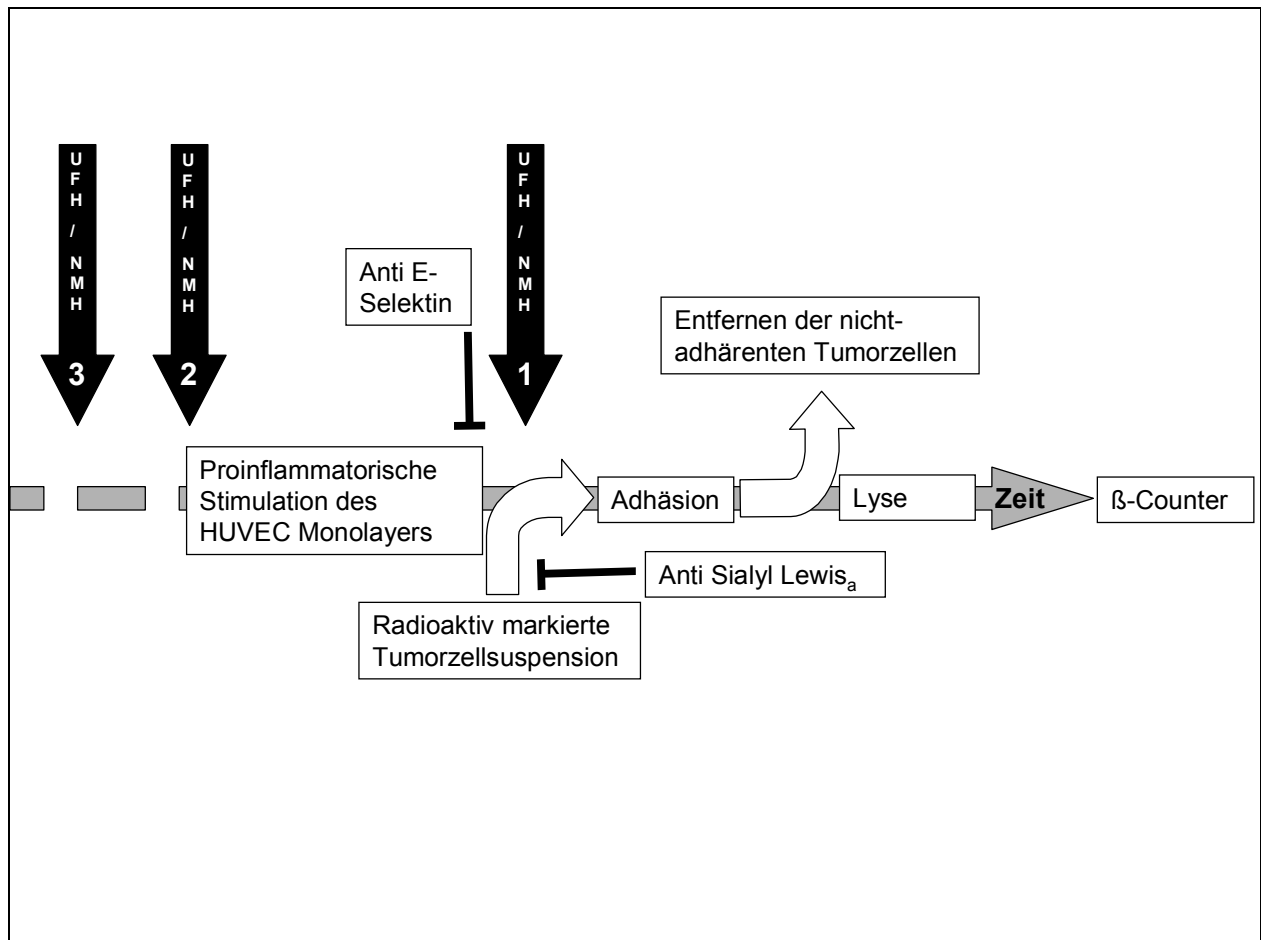


Abbildung 5-1 Schematische Übersichtsdarstellung der in-vitro Adhäsionsversuche

- (1) Testung der kompetitiven Inhibition der Adhäsion von Tumorzellen an proinflammatorisch stimulierte Endothelzellen durch Heparine: UFH oder LMWH wurden synchron mit der Tumorzellsuspension zugegeben.
- (2) Testung der Inhibition der proinflammatorischen Endothelzellstimulation durch biologische Inaktivierung der Zytokinaktivität: UFH und LMWH wurden synchron zur proinflammatorischen Zytokininkubation der HUVEC zugegeben.
- (3) Testung der Inhibition der proinflammatorischen Endothelzellstimulation durch Interferenz von Heparinen mit intrazellulären Molekülen nach möglicher endothelialer Internalisierung: UFH und LMWH wurden vor der proinflammatorischen Zytokininkubation zu HUVEC gegeben.

5.3.7 Beta Counter

Es wurde mit dem Gerät 1450 Microbeta Trilux (Wallac, Freiburg, Deutschland) gearbeitet.

24 Well Sample Plates (1ml, flat bottom wells, PET-A, Wallac, Freiburg, Deutschland) wurden durch Zugabe von 300 µl Flüssigkeits-Szintillations-Cocktail OptiPhase ‚Supermix‘ (Wallac, Freiburg, Deutschland) pro Well vorbereitet. Die 400 µl Zellysat/Well der Versuchsplatte wurden geerntet und zum Flüssigkeits-Szintillations-Cocktail gegeben.

Die radioaktive Betastrahlung von ^3H wurde 1 Minute ohne Normalisation und Hintergrundkorrektion gemessen (1 repeat, 1 cycle).

5.3.8 Statistik

Da der cpm- Wert direkt proportional der Anzahl der adhärenen Zellen ist, berechnet sich die relative Adhäsion wie folgt:

$$\frac{cpm(well)}{cpm(Eppendorf - Cup)} \times 100\%,$$

dabei sei $cpm(well)$ der cpm- Wert für ein individuelles Well entsprechend der adhärenen Zellmenge, und $\overline{cpm(Eppendorf - Cup)}$ der Mittelwert der cpm- Werte der Eppendorf- Reaktionsgefäße entsprechend der mittleren eingesetzten Zellmenge.

5.3.9 Signifikanztestung

Die Signifikanztestung erfolgte mit Hilfe der Software SigmaStat for Windows Version 1.0. Basierend auf der Verteilung der Rohdaten wurden der t-Test für unabhängige Stichproben oder der Mann-Whitney Rangsummen Test durchgeführt.

Der t-Test weist eine größere statistische Power auf; mit dem Mann-Whitney Rangsummentest muss man nicht von einer eventuell unzutreffenden Normalverteilung mit gleichen Varianzen ausgehen.

SigmaStat testete sowohl die Normalverteilung als auch die Varianz der Gruppen, und schlug bei Nichterfüllen der Testkriterien für den t-Test den Mann-Whitney Rank Sum Test vor. Im Sinne der Übersichtlichkeit wurden in Abbildungen

Signifikanzunterschiede zum Teil graphisch durch ein * gekennzeichnet.

5.3.9.1 Der t-Test

Der t-Test für unabhängige Stichproben prüft, ob sich die Mittelwerte zweier verschiedener Gruppen signifikant unterscheiden. Als parametrischer Test sind dabei Stichproben aus normal verteilten Populationen mit gleichen Varianzen Testvoraussetzung. Geprüft wird, ob ein Unterschied zwischen zwei Gruppen existiert, der größer ist, als einer zufälligen Stichprobenwahl zugeschrieben werden kann. Die Nullhypothese des t-Tests für unabhängige Stichproben besagt, dass die Mittelwerte der Populationen, aus denen die Stichproben stammen, übereinstimmen. Kann diese Hypothese begründet verworfen werden, folgt daraus, dass sich die Mittelwerte und somit die Gruppen signifikant unterscheiden.

5.3.9.2 Der Mann-Whitney Rank Sum Test

Der Mann-Whitney Rank Sum (Rangsummen) Test ist ein nicht-parametrischer Test, der Signifikanztestung auch für zwei Gruppen zulässt, die nicht mit gleicher Varianz normal verteilt sind, oder bei denen eine solche Vermutung nicht zugrunde gelegt werden soll. Er prüft, ob sich die Mediane zweier verschiedener Gruppen signifikant unterscheiden. Der Rangsummentest ordnet alle Stichprobenbeobachtungen der Reihenfolge nach, ohne Rücksicht darauf, aus welcher Gruppe sie stammen. Die Ränge jeder Gruppe werden summiert und verglichen. Falls sich die Gruppen nicht unterscheiden, sollten die mittleren Ränge ähnlich sein. Unterscheiden sie sich in größerem Umfang, wird angenommen, dass die Stichproben aus unterschiedlichen Populationen stammen, sich also signifikant unterscheiden.

5.4 Durchflusszytometrie

Es wurde mit dem BD FACS Calibur™ Durchflusszytometer (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) gearbeitet.

5.4.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Ein Durchflusszytometer misst und zählt physikalische und biochemische Eigenschaften biologischer Partikel, im vorliegenden Fall die Expression von Oberflächenstrukturen auf Zellen. Dieses Instrument besteht aus vier grundsätzlichen Systemen: Ein (1) Flüssigkeitssystem transportiert Einzel-Zell-Suspensionen mittels eines hydrodynamischen Fokus in ein (2) illuminierendes System, bestehend aus einem Argon-Laser mit $\lambda=488\text{nm}$. Die resultierende Lichtbrechung und Fluoreszenz wird gesammelt, gefiltert und durch (3) optische und elektronische Systeme in elektrische Signale umgewandelt. Ein (4) Daten-Speicherungs- und Computer-Kontroll- System speichert die aufgezeichneten Daten.

Da im hydrodynamischen Fokus jeweils nur eine Zelle repräsentiert wird, können individuellen Zellen mehrere Eigenschaften zugeordnet werden: die Größe, die mit dem Wert FSC (forward scatter) korreliert, binnenstrukturelle Eigenschaften, die maßgeblich den Wert SSC (side scatter) bestimmen und vorhandene spezielle Eigenschaften der Zelle. Somit kann beispielsweise mittels eines monoklonalen Antikörpers ein Epitop gezielt markiert und erfasst werden; entweder direkt, indem der Antikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert ist (z.B. FITC, grün), oder indirekt, wenn man einen zweiten Farbstoff-konjugierten Antikörper gegen den speziesspezifischen F_c - Teil zugibt.

5.4.2 Verwendete Substanzen

Grundsätzlich wurden die gleichen Reagenzien wie unter 5.3.2 aufgeführt benutzt. Darüber hinaus wurden monoklonale Maus-anti-human Antikörper gegen epitheliales Antigen (FITC konjugiert) und carcinoembryonales Antigen, CEA (beide Dako, Hamburg, Germany) verwendet. Als Zweitantikörper fungierte Fluoreszein (FITC)-konjugierter Ziege-anti-Maus IgG+ IgM (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Baltimore, USA).

Außerdem wurde standardisierte Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (PBS, 500ml sterile Lösung enthalten 4,00g Natriumchlorid, 0,10g Kaliumchlorid, 0,72g di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat, 0,10g Kaliumdihydrogenphosphat, Herstellung Apotheke des Klinikums München Rechts der Isar) verwendet.

5.4.3 Immunologische Färbung

Die Zellen wurden wie unter 5.2.3 beschrieben abgelöst, wobei auf kurze Trypsinierungszeit geachtet wurde (für HUVEC 20- 30 Sekunden, für Tumorzellen nicht länger als 1 Minuten). Nach 10 Minuten Zentrifugation bei 1000 rpm wurde das Zellpellet gewaschen und anschließend in einer Konzentration von nicht weniger als $1- 2 \times 10^6/\text{ml}$ in PBS resuspendiert. Je 100 μl wurden in 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäße (Safe-Lock 2,0 ml, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland) pipettiert. Der Erstantikörper wurde in einer Konzentration von 1:20 bis 1:50 zugegeben und 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde mit PBS gewaschen, und das Pellet abermals in 100 μl PBS aufgenommen. Der Zweitantikörper wurde in einer höheren Verdünnung von 1:50 bzw. 1:100 zugegeben und 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach abermaligem Waschen mit PBS wurde das Pellet in 500 μl PBS aufgenommen. Bei anschließenden Kontrollen im Mikroskop waren in der Neubauerkammer in der Regel zwischen 100.000 und 200.000 Zellen/500 μl zu zählen und in der Trypanblaufärbung keine oder wenig avitale Zellen zu erkennen.

5.4.4 Auswertung durchflusszytometrischer Ergebnisse

5.4.4.1 Einleitung zur Interpretation durchflusszytometrischer Daten

Einer der großen Vorteile der Durchflusszytometrie ist die Möglichkeit, eine große Zahl von Daten erheben zu können. So können aus einer Population innerhalb kurzer Zeit die Eigenschaften von 10.000 Zellen und mehr erfasst werden. Vorzugsweise werden die Daten qualitativ ausgewertet.

Im vorliegenden Fall waren aber quantitative Aussagen wünschenswert. Das gewählte Vorgehen, um aussagekräftige und reproduzierbare Werte zu erhalten, ist im Folgenden beschrieben [139] und soll am Beispiel von HUVEC, die durch IL-1 β Stimulation eine Expression von E-Selektin zeigen, verdeutlicht werden.

5.4.4.2 Darstellung einer gesamten Fluoreszenzintensität

Es ist notwendig, eine große Menge an Immunfluoreszenz-Daten adäquat mittels eines „durchschnittlichen“ Wertes für ein ganzes Histogramm darzustellen. Um mit einem Mittelwert (oder einem Median) sinnvolle Aussagen treffen zu können, ist es nötig, die gesamte, zu erfassende Population abzubilden, so dass keine Werte „off-scale“ dargestellt werden.

Dazu wurde in der FSC- SSC Darstellung ein morphologischer Bereich (eine „region“) gewählt, der nur vitale Einzelzellen repräsentiert und andere Bereiche ignoriert, die beispielsweise Zellfragmente, Detritus oder Zellcluster darstellen.

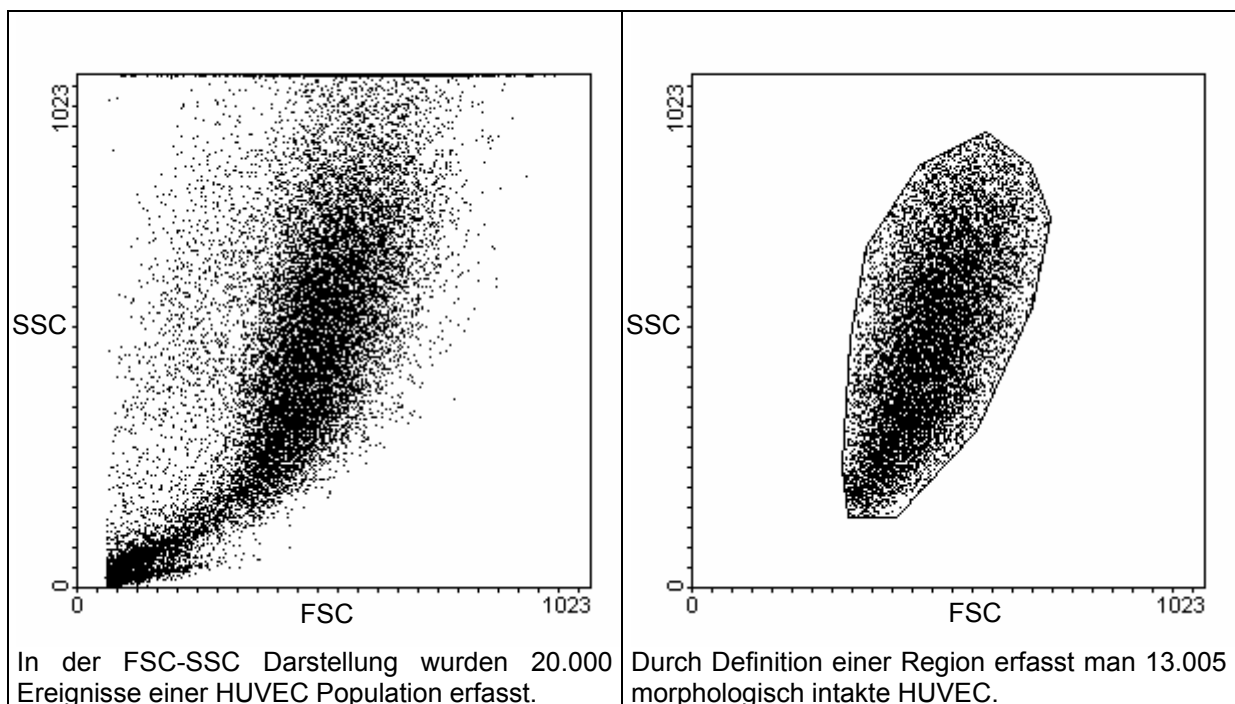


Abbildung 5-2 Definition einer Region am Beispiel einer HUVEC Population

Durch Beschränkung auf diesen Bereich (das „gate“) bei der Darstellung der Fluoreszenz-Farbstoff-Intensität in einem Histogramm, war es möglich, alle Extreme auf einer Histogramm Darstellung zu erfassen.

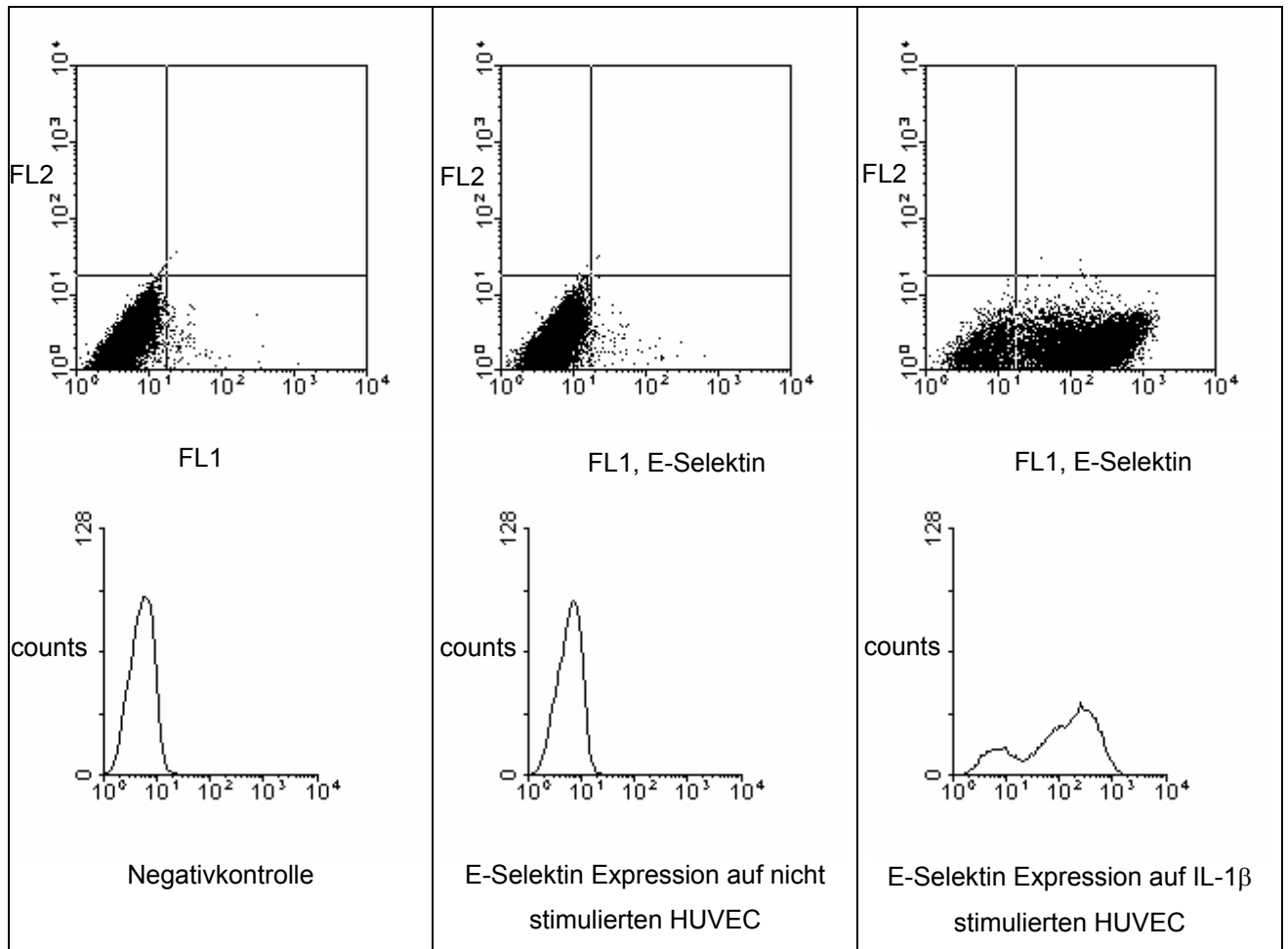


Abbildung 5-3 Beispiel von HUVEC Populationen

Oben Dotplot (FL1 vs. FL2) und unten Histogramm (FL1 vs. counts)

Da es sich in der Regel um relativ verzerrte Kurven handelt, wird empfohlen, den geometrischen Mittelwert (GeoMean) als quantitativen Wert zu wählen [139, S. 101 f.].

5.4.4.3 Kolmogorov- Smirnov Test

Um zu prüfen, ob sich zwei Proben signifikant unterscheiden, wurde der Kolmogorov-Smirnov Test (K- S Test) angewandt.

Der K- S Wert D repräsentiert ein Maß der Signifikanz für die maximale vertikale Verschiebung zwischen zwei kumulativen Frequenz- Verteilungen. Da in der Durchflusszytometrie grundsätzlich mit Kontroll- und Testpopulationen gearbeitet werden sollte, beschränkt man sich auf die zweiseitige Variante des Tests.

Die kumulativen Frequenzdistributen der Kontrolle, bestehend aus n_1 Zellen, und der Probe, bestehend aus n_2 Zellen, berechnen sich wie folgt: für $1 \leq i \leq 256$,

$$F_{n_1}(i) = \sum_{j=1}^{j=i} f_{n_1}(j) \quad \text{und} \quad F_{n_2}(i) = \sum_{j=2}^{j=i} f_{n_2}(j),$$

mit 256 Kanälen i , und somit jeder Kanal $f_n(i)$ mit $i=1$ bis 256.

Um die kumulativen Frequenzdistributen zu normalisieren, so dass $F_n(\text{max}) = 1$, wobei „max“ in der Durchflusszytometrie 256 ist (Anzahl der Kanäle auf der logarithmischen Abszisse), werden alle F_n durch 256 geteilt.

Bei der K-S Statistik wird in der Nullhypothese angenommen, dass die Wahrscheinlichkeitsfunktionen $P_1(j)$ und $P_2(j)$, die den Histogrammen $f_{n_1}(j)$ und $f_{n_2}(j)$ unterliegen, Proben der gleichen Population sind, also:

$$P_1(j) = P_2(j), \text{ mit } -\infty \leq j \leq +\infty.$$

Die D -Statistik ist der Wert für die maximale absolute Differenz zwischen den zwei normalisierten kumulativen Frequenzverteilungen über das Ganze der zwei Verteilungen, wobei:

$$D = \max_j |F_{n_1}(j) - F_{n_2}(j)|.$$

Die Varianz ist

$$Var = \frac{(n_1 - n_2)}{n_1 \times n_2},$$

mit der Standardabweichung $s = \sqrt{Var}$.

$$\text{Damit erhält man den Wert } D_{crit} = \frac{\max |F_{n_1} - F_{n_2}|}{\sqrt{(n_1 + n_2) / n_1 \times n_2}}.$$

Schließlich kann man mit zu D_{crit} aus Tabellen einen Wert p erhalten, der die Wahrscheinlichkeit angibt, mit der ein solches D erreicht werden kann, falls die Proben aus der gleichen Population stammen [139, S. 103 f.].

5.5 Präparation und Analyse von Ribonukleinsäure

Durch die Isolation reiner und intakter Ribonukleinsäure (RNS) aus Gewebekulturzellen, kann man mittels einer Northern-Blot Analyse einen qualitativen und semiquantitativen Aufschluss über die Genexpression erhalten.

5.5.1 Die Präparation zytoplasmatischer RNS aus Gewebekulturzellen

5.5.1.1 Allgemeines Prinzip

Die Schwierigkeit der RNS Isolation besteht darin, dass die meisten Ribonukleasen sehr stabile und aktive Enzyme sind, die keine Cofaktoren benötigen. Aus diesem Grund lysiert man die Zellen in einem chemischen Umfeld, das die Ribonukleasen denaturiert. Dann wird die RNS von anderen zellulären Makromolekülen getrennt.

Im Folgenden wird auf die verwandte Einzelschritt- RNS- Isolation mit TRIzol® (LifeTechnologies, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) eingegangen, einer monophasischen Phenol- und Guanidin- Isothiocyanat Lösung, einer Weiterentwicklung der klassischen Methode nach Chomczynski und Sacchi [25]

5.5.1.2 Verwendete Substanzen

TRIzol® (LifeTechnologies, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland)

Chloroform (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Isopropanol (Merck, Darmstadt, Deutschland)

RNAse freies Wasser (Sigma, Rödermark, Deutschland)

Propylen Röhrchen (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland)

5.5.1.3 Praktisches Vorgehen

Es wurde nach den Instruktionen des Herstellers gearbeitet (TRIzol®, LifeTechnologies, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland).

Drei Endothelzellpopulationen wurden untersucht: (1) HUVEC, die weder proinflammatorisch stimuliert noch inhibiert wurden. (2) HUVEC, die proinflammatorisch stimuliert wurden. Zur proinflammatorischen Stimulation wurde IL-1 β in einer Konzentration von 1 ng/ml verwendet, allerdings betrug die Inkubationszeit wegen des beabsichtigten Nachweises von transkribierter Ribonukleinsäure (messenger RNS oder mRNS) im Gegensatz zum Nachweis von Oberflächenmolekülen lediglich zwei statt vier Stunden. Und (3) HUVEC, die nach

einer zweistündigen Vorinkubation mit niedermolekularem Heparin in einer Konzentration von 500 U/ml in gleicher Weise stimuliert wurden. Aus Gründen der internen Kontrolle und um die Genexpression von E-Selektin semiquantitativ beurteilen zu können, verwendeten wir neben einer radioaktiv markierten Oligonukleotid Probe für E-Selektin auch noch eine Probe gegen ein ubiquitär exprimiertes Gen, ein sogenanntes „House-keeping-Gen“. Ein klassisches Gen hierfür ist ein Enzym der Glykolyse, die Glycerin-Aldehydphosphat-Dehydrogenase (GAPDH).

Der Inhalt der Zellkulturflaschen wurde mit 7,5ml TRIzol® Reagenz mehrfach durch eine Pipette gespült. Dadurch bleibt zum einen die Integrität der RNS gewahrt, zum anderen werden aber die Zellen und Zellbestandteile lysiert. Nach 5 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur, wurde durch Zugabe von 1,5 ml Chloroform und anschließende Zentrifugation (10.000 g/15 Minuten bei 2- 8°C) die Lösung in eine wässrige und eine organische Phase getrennt. Die organische Phase enthält Proteine und DNS, während die RNS in der wässrigen Phase verbleibt. Nach Überführung in ein frisches Polypropylen- Röhrchen, wurde durch Zugabe von 3,75 ml Isopropanol die RNS präzipitiert (Inkubation 10 Minuten bei Raumtemperatur). Nach abermaliger Zentrifugation (10.000 g/15 Minuten bei 2- 8°C), konnte das RNS Pellet mit 70 % Alkohol (Roth, Karlsruhe, Deutschland) gewaschen und aufbewahrt werden.

5.5.2 Gelelektrophorese von RNS

5.5.2.1 Allgemeines Prinzip

Durch die negativen Ladungen des Phosphatrückgrats der RNS ist es möglich, diese im elektrischen Feld aufzutrennen. Dabei verhält sich die Wanderungsgeschwindigkeit der RNS Moleküle im Gel umgekehrt proportional zu ihrer Größe. Um die Ausbildung von Sekundärstrukturen der RNS zu verhindern, die das Wanderungsverhalten beeinflussen würden, wird die Elektrophorese in Gegenwart von Formaldehyd (Roth, Karlsruhe, Deutschland) durchgeführt.

5.5.2.2 Verwendete Substanzen und Vorgehen

10 fach Laufpuffer, pH 7,0:

- MOPS (Sigma, Rödermark, Deutschland)	41,9g
- NatriumAcetat (Merck, Darmstadt, Deutschland)	4,1g
- EDTA (Sigma, Rödermark, Deutschland)	3,7g
- DEPC-H ₂ O (Sigma, Rödermark, Deutschland)	ad 1000ml

Gellösung:

- Agarose 1,0% (Biozym, Wien, Österreich)	0,8g
- DEPC-H ₂ O (Sigma, Rödermark, Deutschland)	57,6ml

Auflösen und auf 60°C abkühlen lassen, dann

- 10 fach Laufpuffer	8ml
- Formaldehyd 35% (Roth, Karlsruhe, Deutschland)	14,4ml

Probenpuffer:

- Formamid (Sigma, Rödermark, Deutschland)	504 µl
- 10x MOPS (Sigma, Rödermark, Deutschland)	105 µl
- Formaldehyd 37% (Merck, Darmstadt, Deutschland)	182 µl
- DEPC-H ₂ O (Sigma, Rödermark, Deutschland)	147µl
- Glycerol steril (Sigma, Rödermark, Deutschland)	56µl
- Bromphenol H ₂ O-gesättigt (Merck, Darmstadt, Deutschland)	56µl

Nach Gießen und Abkühlung des Gels, wurde es in einer Laufkammer mit genügend Laufpuffer bis zu einer Tiefe von mindestens 1 mm bedeckt. Die in Wasser aufgenommene RNS wurde im Verhältnis 1:1 mit dem Probenpuffer versetzt. Pro Probe wurden etwa 10 bis 20 µg RNS eingesetzt. Das Gel lief über etwa 3 Stunden bei 5 V/cm.

5.5.3 Northern-Blot Analyse

5.5.3.1 Der Transfer der RNS aus dem Gel auf eine Membran

Die Northern-Blot Analyse ist ein Verfahren zum Nachweis von RNS Transkripten. Dazu muss die elektrophoretisch aufgetrennte RNS, im vorliegenden Fall die Gesamt-RNS einer Endothelpopulation, zunächst aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran (GeneScreen™ Plus Membran, NEN Research Products, Boston, USA) übertragen werden.

5.5.3.1.1 Verwendete Substanzen und Vorgehen

Dazu wurde das Gel zunächst mit destilliertem Wasser gewaschen. Das Gel wurde mit den Taschen nach unten auf eine mit Whatman-Paper bedeckte, erhabene Glasplatte gelegt, die sich in einer Wanne mit ca. 600ml SSC Puffer befand. Die Enden des Filterpapiers reichten bis in das Becken, und wurden von SSC Puffer umspült. Dann wurde die zurechtgeschnittene und mit SSC angefeuchtete Nylonmembran auf das Gel gelegt und anschließend von drei Schichten Filterpapier (Whatman-Paper) bedeckt. Um entsprechende Kapillarkräfte aufzubauen, die den SSC Puffer durch das Gel und die Membran saugen, wurde abschließend ein 7 cm Papierstapel aufgelegt, der zusätzlich mit einer Glasplatte beschwert wurde. Es sollte darauf geachtet werden, dass sich weder Luft noch Bläschen innerhalb dieses Kapillarsystems befinden. Während der 16 bis 18 Stunden dauernden Blotzeit, wandern die Nukleinsäuremoleküle mit dem Puffer aus dem Gel, um in der Filtermembran hängen zu bleiben. In einem UV Transilluminator mit $\lambda=254\text{nm}$ wurde die RNS anschließend kovalent an die Aminogruppen der Nylonmembran fixiert (UV cross-linking).

5.5.3.2 Hybridisierungsanalyse

5.5.3.2.1 Verwendete Substanzen und Vorgehen zur Herstellung ^{32}P -markierter Sonden

TE Puffer:

- 1M Tris pH 8,0 (Merck, Darmstadt, Deutschland)	10ml
- 0,5M EDTA pH 8,0 (Sigma, Rödermark, Deutschland)	2ml
- H_2O	ad 1000ml

Labeling-Zusatz:

- RNA denaturiert (Sigma, Rödermark, Deutschland)	8 μl
- dXTP(G,A,T) (Amersham, Braunschweig, Deutschland)	3 μl
- $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ -dATP 10mC/ml (Amersham, Braunschweig, Deutschland)	6 μl

Da wir uns für die Expression von Adhäsionsmolekülen in Zellkulturen von menschlichen Nabelvenen-Endothelien interessierten, in Abhängigkeit von Zytokinstimulation bzw. in Anwesenheit von potentiellen Inhibitoren, wie zum Beispiel niedermolekularem Heparin, verwandten wir einen kommerziell erhältlichen Probencocktail bestehend aus sechs individuellen, einzelsträngigen DNS Antisense-

Oligonukleotiden, speziell für die Detektion von humanem E-Selektin/ELAM, als Surrogatmarker für Adhäsionsmoleküle (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland).

Diese nicht markierten Oligonukleotide müssen zuvor entweder an dem freien 3' oder 5' Hydroxylende radioaktiv markiert werden. Dies geschieht durch ein Enzym, die terminale Transferase (Amersham, Braunschweig, Deutschland), die α -³²P-dATP terminal ansynthetisiert, und somit nachweisbar macht.

5.5.3.2.2 Verwendete Substanzen und Vorgehen zur Hybridisierung

Prähybridisierungslösung:

- 5 fach PE (ICN Pharma, Frankfurt/Main, Deutschland)	2,0ml
- 20 fach SSC (Sigma, Rödermark, Deutschland)	2,5ml
- 100 % Formamid, deionisiert (Roth, Karlsruhe, Deutschland)	5,0ml
- ssDNS (10mg/ml, GibcoBRL, Gaithersburg, USA)	150µl
- H ₂ O	ad 10ml

5 fach PE-Lösung:

- Natriumpyrophosphat (Sigma, Rödermark, Deutschland)	1g
- SDS (Sigma, Rödermark, Deutschland)	10g
- Polyvinylpyrrolidon (40.000)	2g
- Ficoll (400.000, Pharmacia/Pfizer, Karlsruhe, Deutschland)	2g
- 1M Tris pH 7,5 (Sigma, Rödermark, Deutschland)	50ml
- 0,5M EDTA (Sigma, Rödermark, Deutschland)	10 ml
- H ₂ O	ad 150ml, bei 65°C 30 Minuten lösen

20 fach SDS:

- NaCl (Sigma, Rödermark, Deutschland)	175,3g
- Na ₃ Citrat (Sigma, Rödermark, Deutschland)	88,2g
- H ₂ O	ad 1000ml

10%SDS:

- Natriumduodecylsulfat (Sigma, Rödermark, Deutschland)	50g
- H ₂ O	ad 500ml

Die Membran mit der immobilisierten RNS wurde mit Prähybridisierungspuffer in einen Hybridisierungsbeutel (Gibco-BRL, Gaithersburg, USA) eingeschweißt und im Wasserbad für eine Stunde bei 65°C und eine weitere Stunde bei 42°C inkubiert. Die eigentliche Hybridisierung erfolgte mit der Hybridisierungslösung ExpressHyb™ Hybridization Solution (Clontech, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland), welche

die entsprechende ^{32}P -markierte Oligonukleotid-Sonde enthielt (5×10^6 cpm/ml). Bei diesem Verfahren genügt eine Hybridisierungszeit von etwa einer Stunde. Anschließend wurde durch folgende Waschschriffe die unspezifisch gebundene Sonde wieder von der Membran entfernt:

2x 5 Minuten in 2x SSC, 0,1 % SDS-Lösung bei Raumtemperatur

2x 10 Minuten in 1x SSC, 0,1 % SDS-Lösung bei Raumtemperatur

2x 15 Minuten in 0,1x SSC, 0,1 % SDS-Lösung bei 42°C

Durch Auflegen der Nylonmembran auf eine Phosphoimage-Platte konnte die Hybridisierung der radioaktiven Sonde mit der komplementären RNS mit Hilfe eines Image-Analyzers (BAS-1500, Fuji) nachgewiesen werden.

6 Ergebnisse

Die Adhäsion von Tumorzellen an Endothelzellen in-vitro am Beispiel des Pankreaskarzinoms, deren Determinanten sowie deren Modulation durch Heparine unterschiedlicher Molekulargewichte, wurden auf mehreren funktionellen Ebenen untersucht: auf Ebene der Endothel- Tumorzell- Interaktion (siehe 6.1), auf Ebene der Expression zellulärer Oberflächenmoleküle (siehe 6.2) und auf Ebene der Genexpression entsprechender Oberflächenmoleküle (siehe 6.3).

6.1 In-vitro Tumorzell-Adhäsionsanalyse

6.1.1 Modulation der endothelialen Tumorzelladhäsion durch Zytokinstimulation

6.1.1.1 Zytokinspezifische Stimulation der endothelialen Tumorzelladhäsion

Zunächst wurde der Einfluss von endothelialer Zytokinstimulation auf die in-vitro Tumorzelladhäsion an HUVEC untersucht.

Durch Inkubation mit den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 β und TNF α (1 ng/ml/4 h) konnte eine signifikante Steigerung der endothelialen Adhäsion von Pa-Tu-8902 (p jeweils <0,01 im Vergleich zu keiner Stimulation; t-Test) induziert werden, nicht jedoch durch Interleukin 8 (Abbildung 6-1). Es zeigte sich, dass IL-1 β ein potenteres Stimulans in Bezug auf Tumorzelladhäsion zu sein scheint als TNF α . Durch Koinkubation der proinflammatorischen Zytokine wurden darüber hinaus keine additiven oder überadditiven Stimulationseffekte beobachtet.

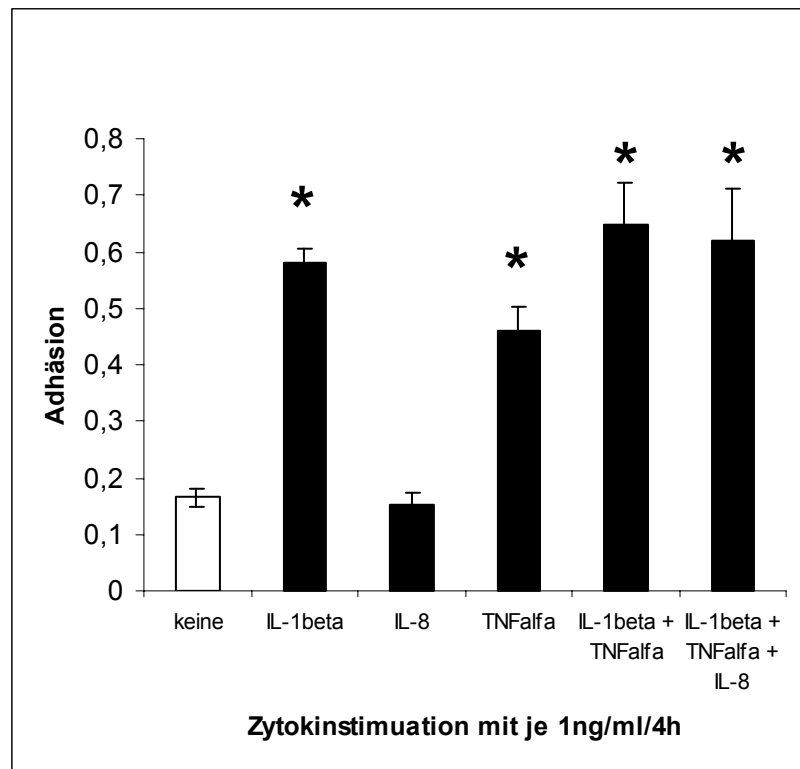


Abbildung 6-1 Zytokinspezifische Stimulation der Adhäsion von Pa-Tu-8902 an HUVEC

Mittelwert der Adhäsion und zugehörige Standardabweichung in Prozent der eingesetzten Zellmenge/Well, Quadrupelansätze

Der dargestellte Versuch ist repräsentativ für drei gleichartige Experimente. Die Verwendung der Zelllinien Pa-Tu-8988T und EPAM-98 lieferten vergleichbare Ergebnisse.

6.1.1.2 Zeit- und Dosis-Wirkungsbeziehung der zytokininduzierten Stimulation der endothelialen Tumorzelladhäsion

In den folgenden Versuchen wurde der Einfluss der Dauer und der Konzentration der proinflammatorischen Zytokininkubation (IL-1 β und TNF α) von HUVEC auf die endotheliale Tumorzelladhäsion in-vitro untersucht.

Abbildung 6-2 verdeutlicht repräsentativ, dass diese Stimulation sowohl mit der Zeit (2- 4 h) als auch mit der Dosierung (0,5- 1 ng/ml) positiv korrelierte. Die bereits beobachtete unterschiedliche Potenz der zwei Zytokine bezüglich Stimulation der endothelialen Tumorzelladhäsion schien bei längerer Inkubationszeit ausgeprägter zu sein.

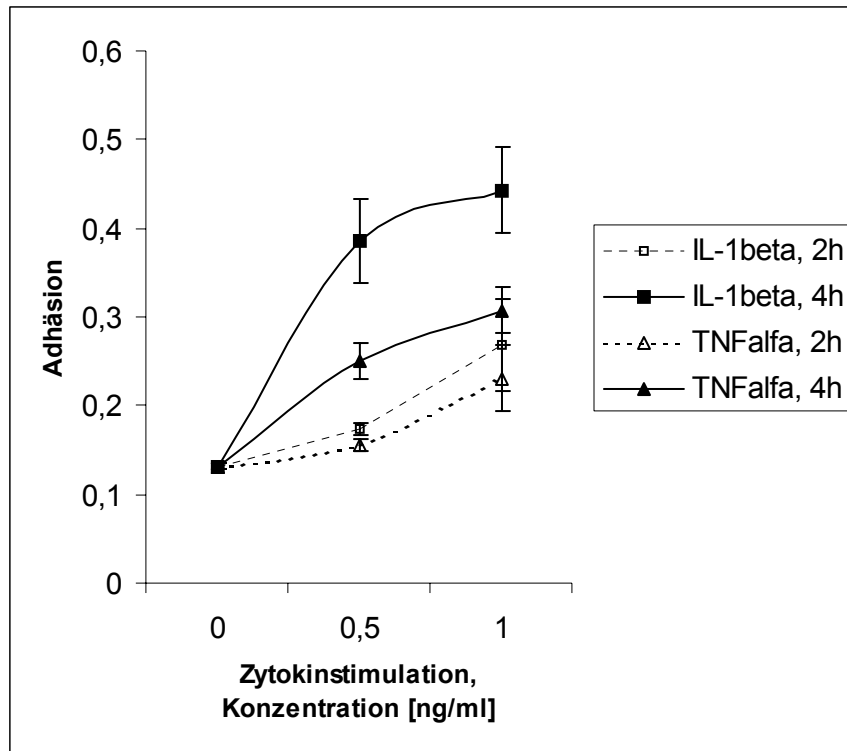


Abbildung 6-2 Stimulation der Adhäsion von Pa-Tu-8902 an HUVEC durch IL-1 β und TNF α in Abhängigkeit von Inkubationszeit und Konzentration

Mittelwert der Adhäsion und zugehörige Standardabweichung in Prozent der eingesetzten Zellmenge/Well, Quadrupelansätze

Der dargestellte Versuch ist repräsentativ für zwei gleichartige Experimente. Die Verwendung der Zelllinie Pa-Tu-8988T lieferte vergleichbare Ergebnisse.

6.1.2 Inhibition der endothelialen Tumorzelladhäsion durch monoklonale Antikörper gegen Adhäsionsmoleküle

In den folgenden Versuchen wurde der Einfluss von monoklonalen Antikörpern gegen die Liganden endotheliales E-Selektin und tumorzellassoziiertes Sialyl Lewis_a (CA 19-9) auf die in-vitro Adhäsion von Pankreaskarzinomzellen an HUVEC überprüft.

Durch Inkubation der Tumorzellen mit Anti-CA 19-9 (30 μ g/ml/0,5 h) konnte eine signifikante Reduktion der Adhäsion von Pa-Tu-8906 an proinflammatorisch stimulierte HUVEC ($p < 0,005$ im Vergleich zu gleichermaßen zytokinstimulierten HUVEC ohne Antikörperinkubation; t-Test) beobachtet werden (Abbildung 6-3). Ein vergleichbarer Effekt konnte durch Inkubation von HUVEC mit Anti-E-Selektin (1:100/30 Minuten) beobachtet werden ($p < 0,005$ im Vergleich zu gleichermaßen zytokinstimulierten HUVEC ohne Antikörperinkubation, t-Test).

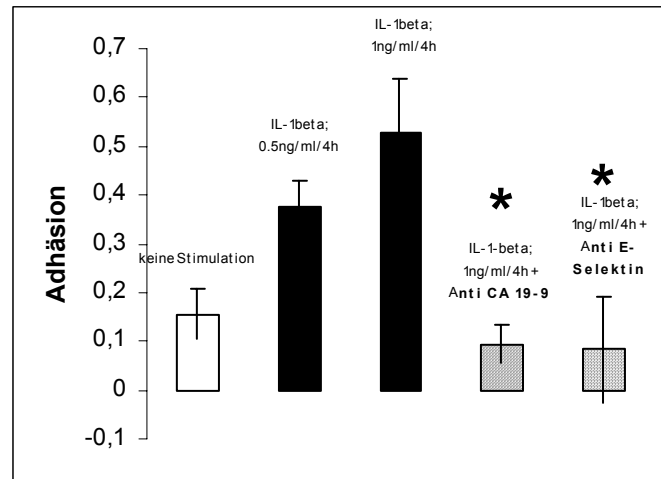


Abbildung 6-3 Hemmung der Adhäsion von Pa-Tu-8902 an proinflammatorisch stimulierte HUVEC durch monoklonale Antikörper gegen tumorzellassoziiertes Sialyl Lewis_a (CA 19-9) und gegen endotheliales E-Selektin

Mittelwert der Adhäsion und zugehörige Standardabweichung in Prozent der eingesetzten Zellmenge/Well, Quadrupelansätze

Der dargestellte Versuch ist repräsentativ für mehr als drei gleichartige Experimente. Die Verwendung der Zelllinien Pa-Tu-8988T und EPAM-98 lieferte vergleichbare Ergebnisse.

6.1.3 Einfluss von Heparinen auf die endotheliale Tumorzelladhäsion in-vitro

6.1.3.1 Können unfraktionierte und fraktionierte Heparine die Adhäsion von Pankreasadenokarzinomzellen an Endothel kompetitiv hemmen?

Im Folgenden sollte die These geprüft werden, ob unfraktionierte und fraktionierte Heparine, entsprechend ihrer physikochemischen Eigenschaften, etwa durch Bildung eines Lektin-bindenden Glykokonjugats, kompetitiv die Adhäsion von Pankreaskarzinomzellen an stimuliertes Endothel hemmen können.

Dazu wurde der Endothelzell-Monolayer zunächst proinflammatorisch stimuliert (IL-1 β 1 ng/ml/4 h) und anschließend verschiedene Dosierungen von unfraktioniertem und fraktioniertem Heparin synchron mit der Tumorzellsuspension zugegeben.

Abbildung 6-4 zeigt, dass sich zwar die Tumorzellen als interne Kontrolle signifikant in ihrer Adhäsion durch IL-1 β stimulieren und durch anti-CA19-9 inhibieren ließen, jedoch die Zugabe von unfraktioniertem oder fraktioniertem Heparin in in-vivo realisierbaren Konzentrationen (folgend als „physiologische Dosierung“ bezeichnet), weder bei nicht-stimulierten, noch bei stimulierten Endothelzellen zu einer signifikant verminderten Adhäsion von Tumorzellen führte.

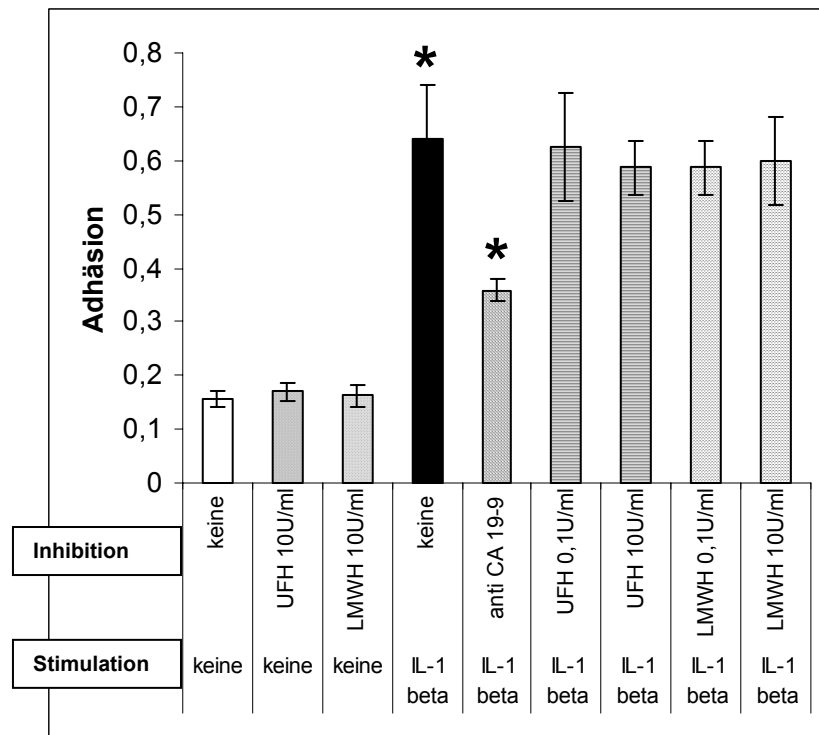


Abbildung 6-4 Einfluss von UFH und LMWH in physiologischer Dosierung auf die Adhäsion von Pa-Tu-8902 auf unstimulierte und proinflammatorisch stimulierte HUVEC

Mittelwert der Adhäsion und zugehörige Standardabweichung in Prozent der eingesetzten Zellmenge/Well, Quadrapelansätze

Der dargestellte Versuch ist repräsentativ für drei gleichartige Experimente.

Eine weitere Steigerung der Heparin- Konzentrationen (folgend als „supraphysiologische Dosierung“ bezeichnet) konnte ebenfalls, wie repräsentativ in Abbildung 6-5 und Abbildung 6-6 dargestellt, keinen Hinweis auf eine signifikante Modulation der endothelialen Tumorzelladhäsion zeigen.

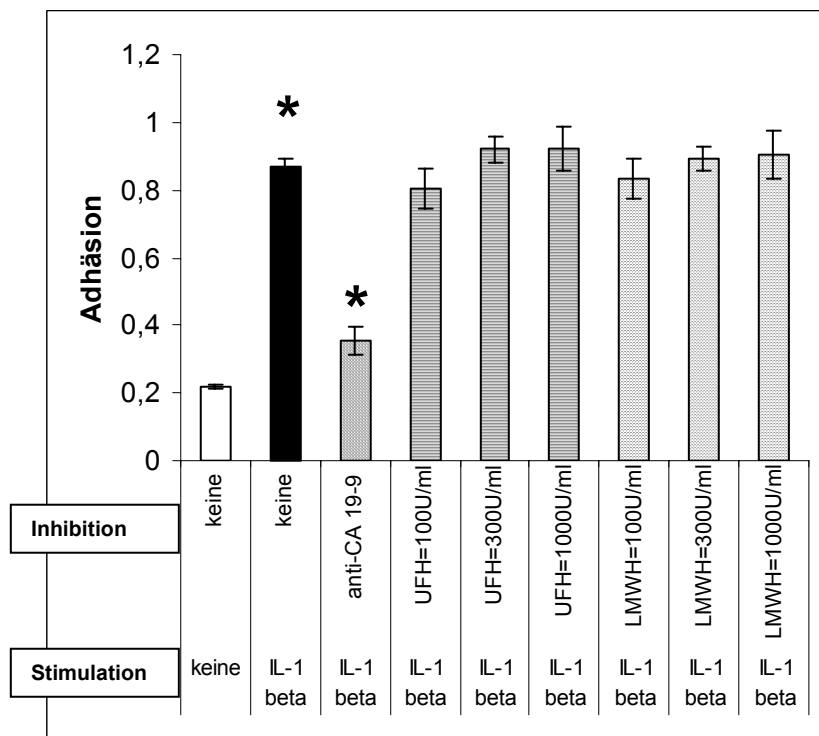
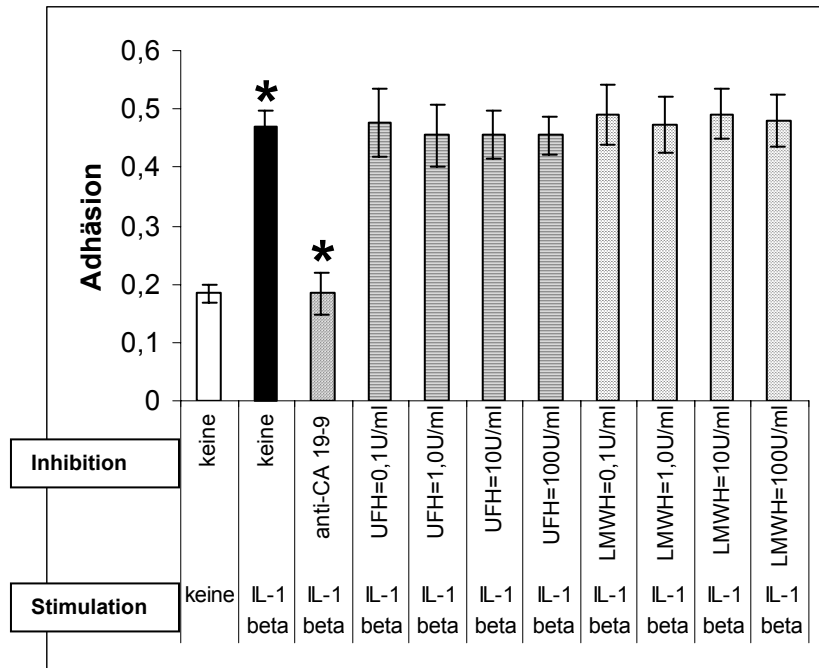


Abbildung 6-5 und Abbildung 6-6 Einfluss von UFH und LMWH in physiologischer Dosierung auf die Adhäsion von Pa-Tu-8902 auf proinflammatorisch stimulierte HUVEC

Mittelwert der Adhäsion und zugehörige Standardabweichung in Prozent der eingesetzten Zellmenge/Well, Quadrupelansätze.

Die dargestellten Versuche sind repräsentativ für jeweils drei gleichartige Experimente.

6.1.3.2 Können unfraktionierte und fraktionierte Heparine durch Hemmung von Zytokin- Wirkung die Aktivierung von Endothelzellen vermindern und die Tumorzelladhäsion reduzieren?

Im Folgenden sollte die Hypothese geprüft werden, ob unfraktionierte und fraktionierte Heparine entsprechend ihrer physikochemischen Eigenschaften durch biologische Inaktivierung der Zytokinaktivität, etwa durch Komplexbildung, die proinflammatorische Stimulation von Endothelzellen vermindern und die in-vitro Adhäsion von Tumorzellen an HUVEC reduzieren können.

Dazu wurde der Endothelzell-Monolayer in Anwesenheit verschiedener Dosierungen von unfraktioniertem und fraktioniertem Heparin proinflammatorisch stimuliert (TNF α , IL-1 β , 1 ng/ml/4 h).

Den folgenden Darstellungen ist zu entnehmen, dass weder physiologische noch supraphysiologische Dosierungen von unfraktioniertem oder fraktioniertem Heparin die Stimulation der Endothelzellen durch sowohl IL-1 β (Abbildung 6-7), als auch durch TNF α (Abbildung 6-8) in dem Ausmaß vermindern konnten, dass eine signifikant reduzierte endotheliale Adhäsion von Pa-Tu-8902 Zellen beobachtet werden konnte.

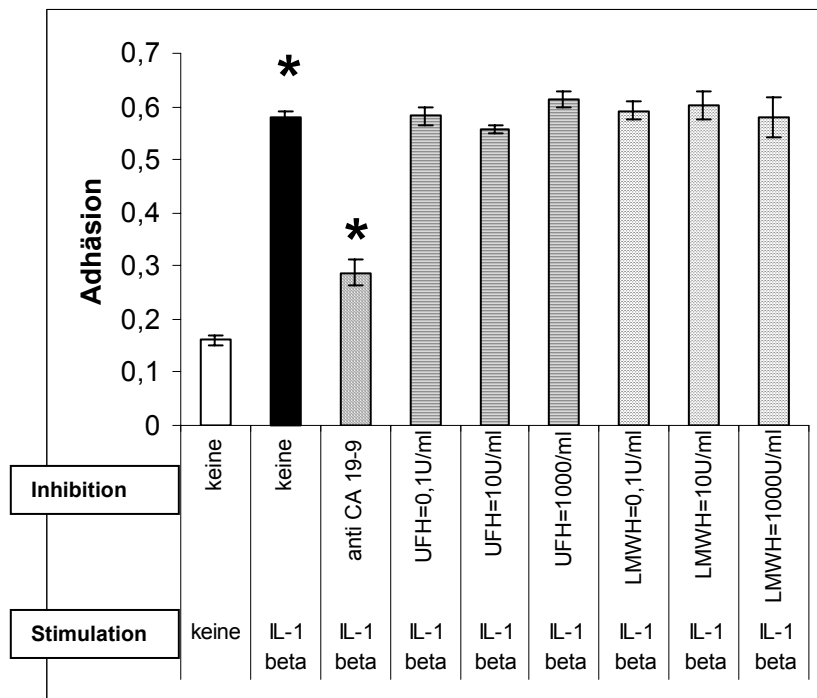


Abbildung 6-7 Einfluss der stimulationssynchronen Gabe von UFH und LMWH auf die Tumorzelladhäsion an IL-1 β stimulierte HUVEC

Mittelwert der Adhäsion und zugehörige Standardabweichung in Prozent der eingesetzten Zellmenge/Well, Quadrupelansätze

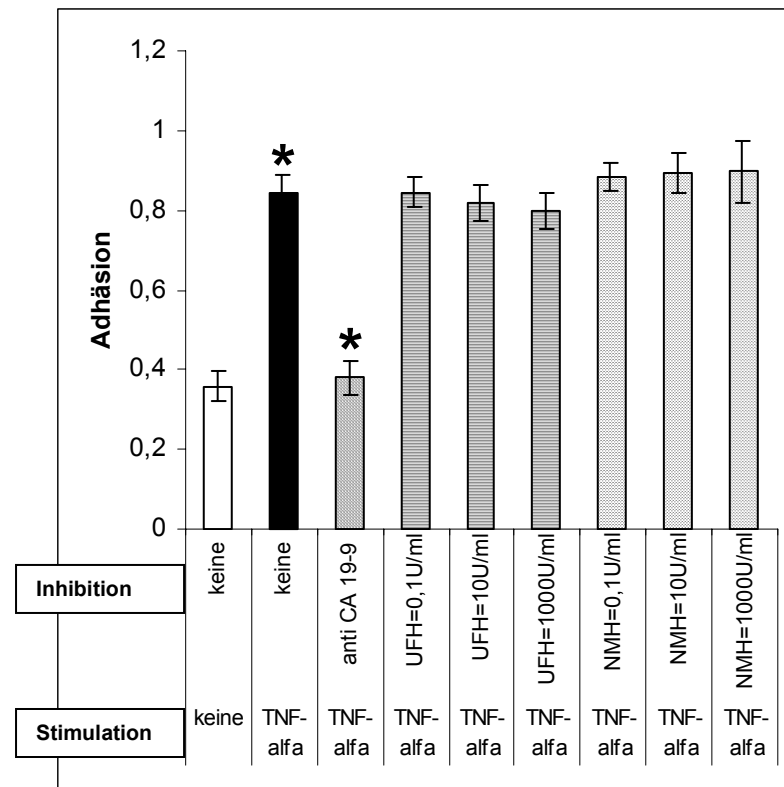


Abbildung 6-8 Einfluss der stimulationssynchronen Gabe von UFH und LMWH auf die Tumorzelladhäsion an TNF α stimulierte HUVEC

Mittelwert der Adhäsion und zugehörige Standardabweichung in Prozent der eingesetzten Zellmenge/Well, Quadrupelansätze

Die dargestellten Versuche sind repräsentativ für jeweils drei gleichartige Experimente.

Vergleichbare Resultate wurden mit der Pankreasadenokarzinomlinie Pa-Tu-8988T beobachtet.

6.1.3.3 Können fraktionierte Heparine intrazelluläre Signalkaskaden stören und somit die Zytokin-induzierte Stimulation des Endothels hemmen?

Im Folgenden sollte die These geprüft werden, ob Heparine nach möglicher endothelialer Internalisierung mit intrazellulären Prozessen interferieren können, wie etwa mit der proinflammatorisch stimulierten Signaltransduktion. Als Folge der verminderten zytokininduzierten Endothelzellstimulation und dementsprechend verminderter Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle könnte eine reduzierte in-vitro Adhäsion von Tumorzellen an HUVEC beobachtet werden.

Dazu wurden die Endothelzellen zwei Stunden mit steigenden Konzentrationen von unfraktionierten und fraktionierten Heparinen „präinkubiert“, dann proinflammatorisch stimuliert und anschließend die endotheliale Adhäsion der Tumorzellen bestimmt.

Wie Abbildung 6-9 zu entnehmen ist, ließ sich durch die Präinkubation mit niedermolekularem Heparin die Adhäsion von Pa-Tu-8902 an IL-1 β stimuliertes Endothel signifikant und dosisabhängig hemmen ($p < 0,05$ im Vergleich zur jeweils vorhergehenden Dosierung bei LMWH; Mann-Whitney Rank Sum Test). Die relativ ausgeprägteste und signifikanteste Inhibition der zytokininduzierten endothelialen Tumorzelladhäsion zeigte sich bereits bei der Dosierung von 10 U/l LMWH ($p < 0,01$ im Vergleich zu ohne LMWH; Mann-Whitney Rank Sum Test).

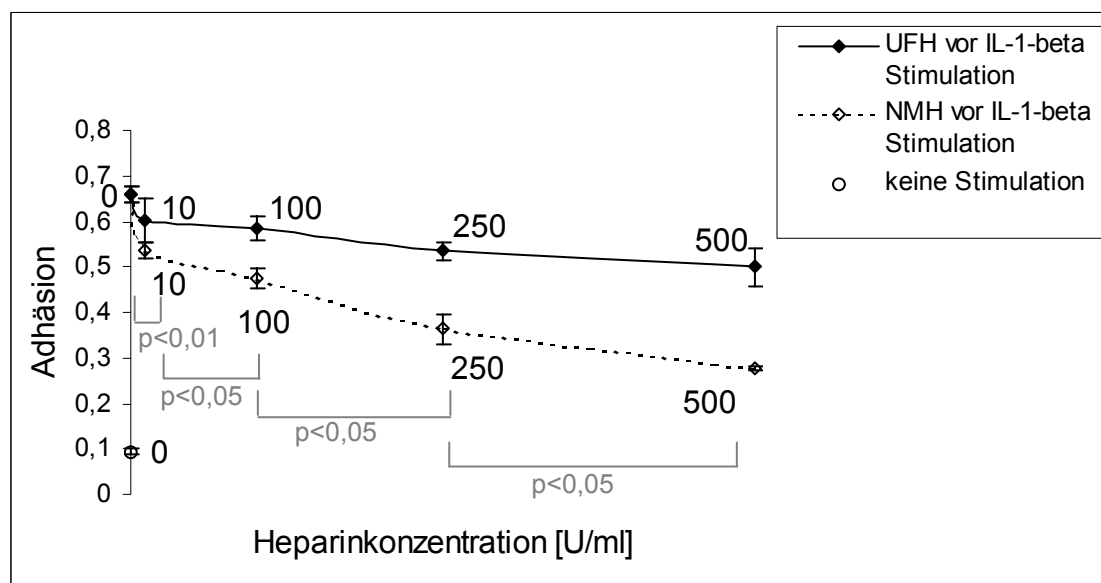


Abbildung 6-9 Einfluss der Präinkubation (2 h) von HUVEC mit UFH und LMWH vor IL-1 β Stimulation auf die endotheliale Adhäsion von Pa-Tu-8902

Mittelwert der Adhäsion und zugehörige Standardabweichung in Prozent der eingesetzten Zellmenge/Well, Quadrupelansätze.

Der dargestellte Versuch ist repräsentativ für drei gleichartige Experimente.

Diese Ergebnisse konnten ebenso mit der primären Pankreasadenokarzinomzelllinie, EPAM-98, reproduziert werden, wie in Abbildung 6-10 gezeigt.

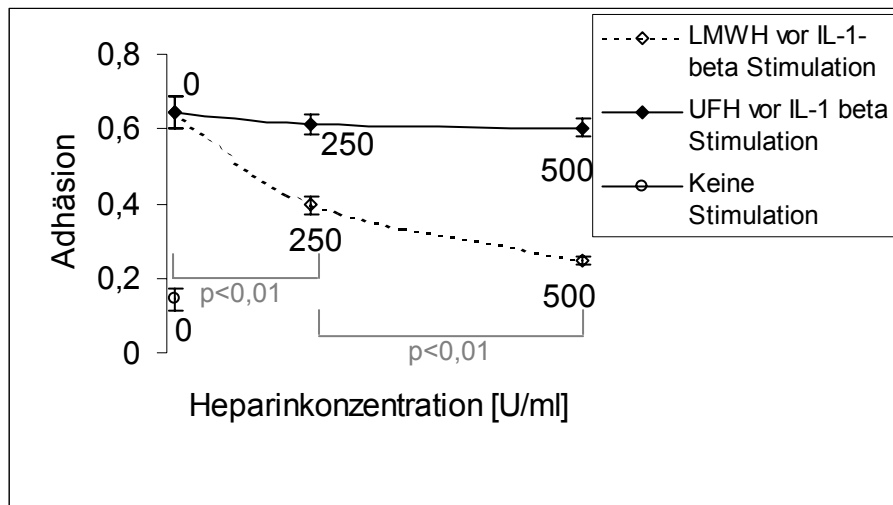


Abbildung 6-10 Einfluss der Präinkubation (2 h) von HUVEC mit LMWH vor IL-1 β Stimulation auf die Adhäsion von EPAM-98.

Mittelwert der Adhäsion und zugehörige Standardabweichung in Prozent der eingesetzten Zellmenge/Well, Quadrupelansätze.

Der dargestellte Versuch ist repräsentativ für zwei gleichartige Experimente.

6.1.4 Auflichtmikroskopische Photographien des in-vitro Adhäsionsversuchs

Die endotheliale Adhäsion wurde mittels radioaktiver Markierung der Tumorzellen und Beta-Counter objektiv ermittelt (vgl. 5.3). Zusätzlich erfolgte stets eine mikroskopische Kontrolle. Im Folgenden sollen auflichtmikroskopische Photographien die Ergebnisse des in-vitro Adhäsionsversuchs veranschaulichen.

Die Tumorzellen lagern sich den spindelig angeordneten, nicht- stimulierten Endothelzellen in geringer Dichte an:

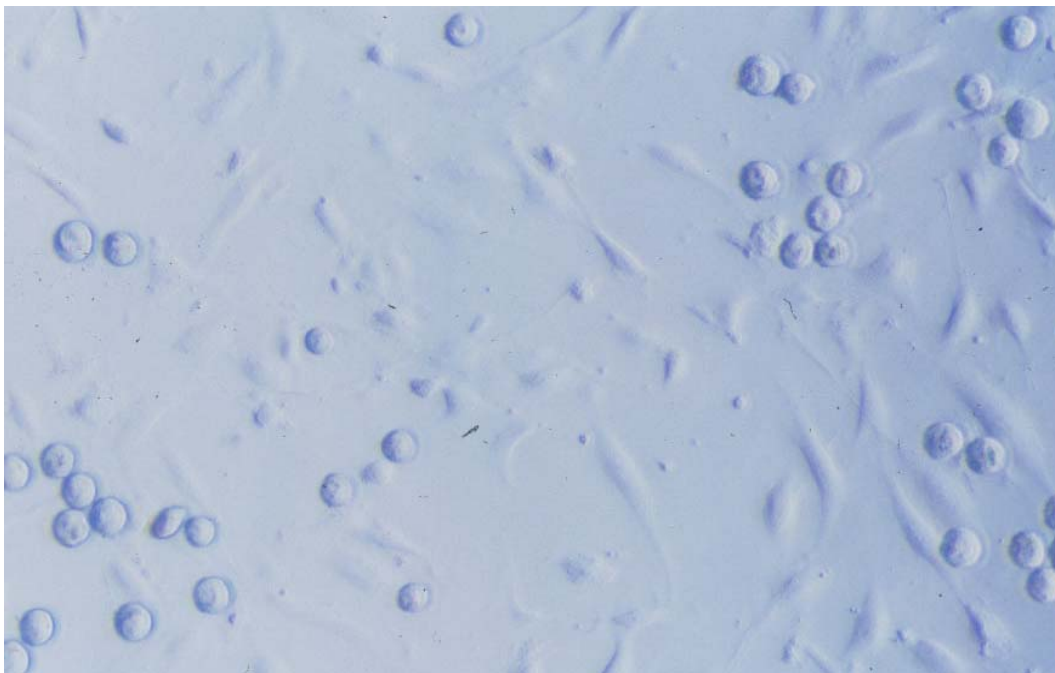


Abbildung 6-11 Adhäsion von Pa-Tu-8902 an nicht stimulierte HUVEC

Man erkennt die charakteristische Anheftung der Tumorzellen an Endothelzellen. An Stellen, an denen der Endothelzellverband nicht konfluent ist, verbleiben nach den standardisierten Waschvorgängen kaum Tumorzellen unspezifisch adhären:

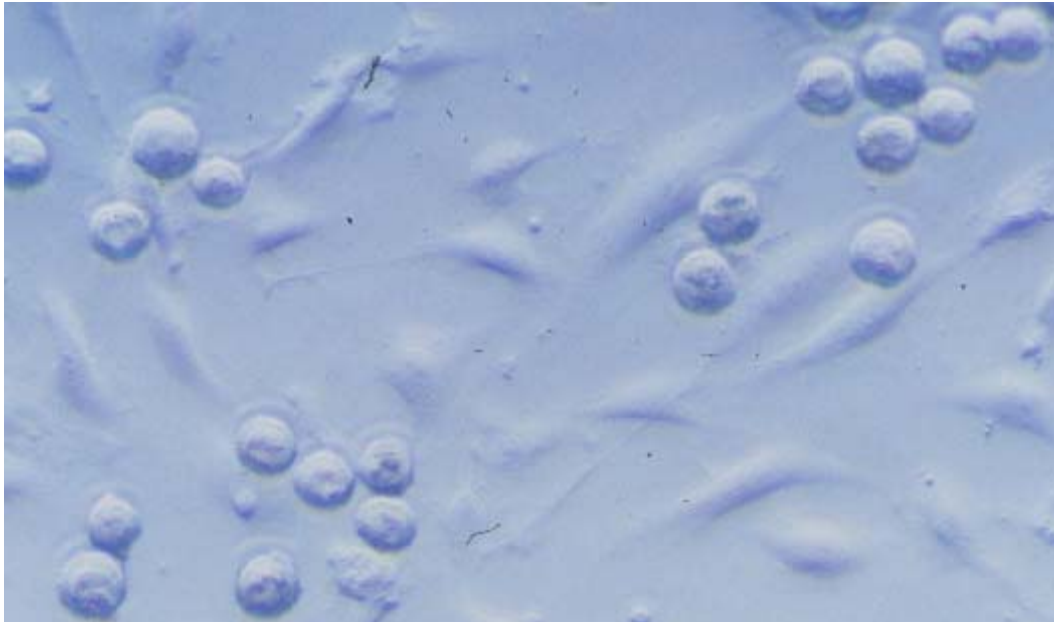


Abbildung 6-12 Adhäsion von Pa-Tu-8902 an nicht stimulierte HUVEC (vgl. Abbildung 6-11, stärkere Vergrößerung)

Nach Inkubation mit IL-1 β (1 ng/ml/4 h) verändern sich die Endothelzellen lichtmikroskopisch erkennbar morphologisch; sie erscheinen abgerundeter und voluminöser:

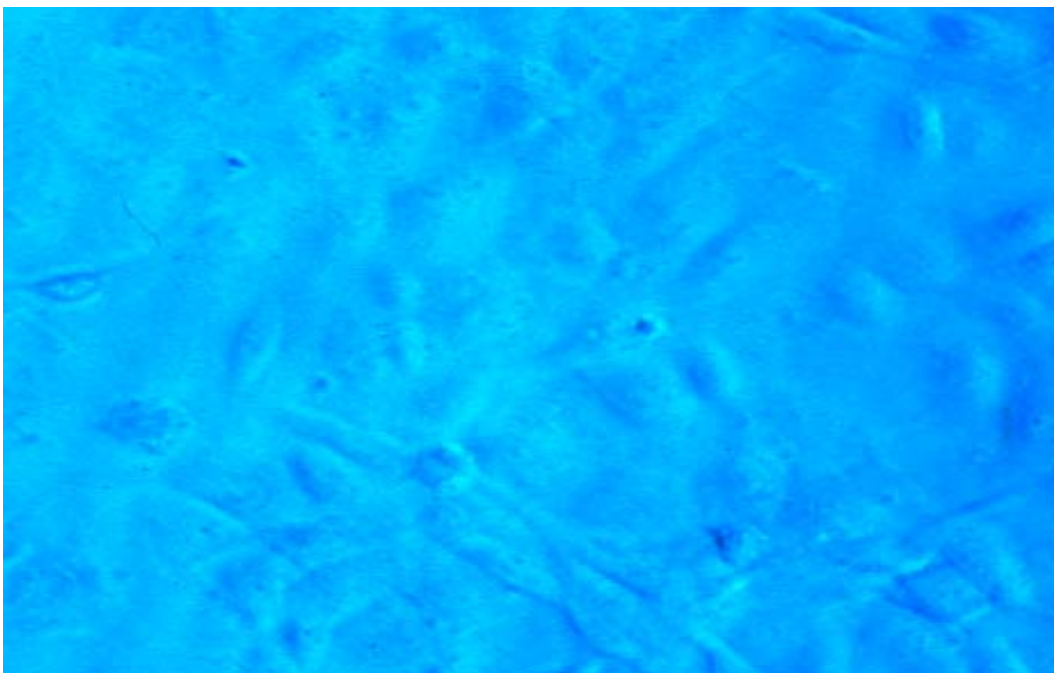


Abbildung 6-13 Proinflammatorisch stimulierte HUVEC

Die Tumorzellen lagern sich in größerer Dichte (vgl. Abbildung 6-11) den zuvor mit IL-1 β stimulierten Endothelzellen (1 ng/ml/4 h) an:



Abbildung 6-14 Adhäsion von Pa-Tu-8902 an proinflammatorisch stimulierte HUVEC

Durch Inhibition der Interaktion des tumorassoziierten Liganden Sialyl Lewis_a (Ca19-9) und seinem endothelialen Liganden E-Selektin lagern sich die Tumorzellen in deutlich geringerer Dichte den proinflammatorisch stimulierten Endothelzellen (IL-1 β , 1ng/ml/4 h) an:

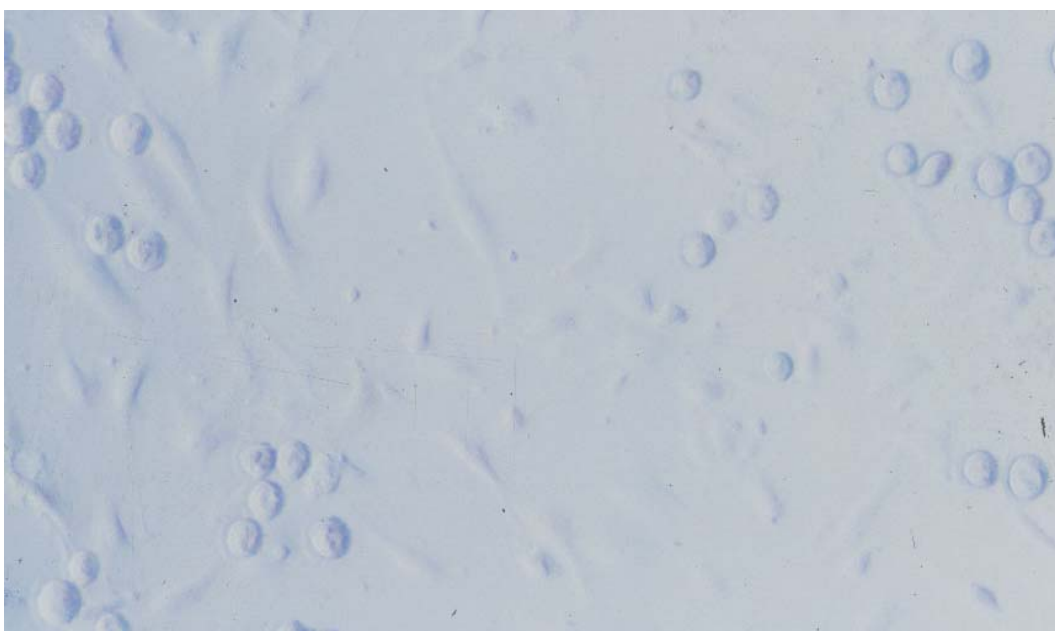


Abbildung 6-15 Durch Anti-Sialyl Lewis_a inhibierte Adhäsion von Pa-Tu-8902 an proinflammatorisch stimulierte HUVEC

Durch Inkubation der Endothelzellen mit LMWH vor der proinflammatorischen Zytokinaktivierung können auch lichtmikroskopisch erkennbar die Zeichen der Endothelzellaktivierung, wie das Anschwellen verringert werden. Entsprechend ist die Dichte der Tumorzelladhäsion an die spindelig aussehenden Endothelzellen vermindert:

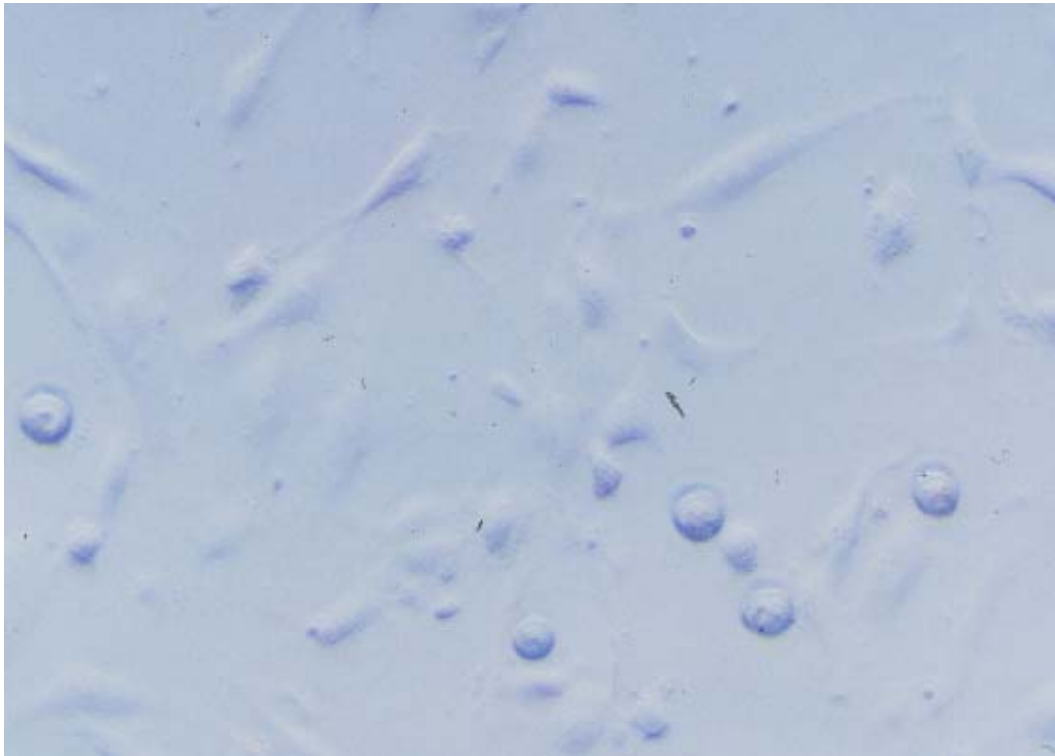


Abbildung 6-16 Durch Präinkubation mit NMH (500U/ml/2 h) verminderte zytokininduzierte Stimulation (IL-1 β , 1ng/ml/4 h) von HUVEC und assoziierte geringere Dichte der endothelialen Adhäsion von Pa-Tu-8902

6.2 Durchflusszytometrische Analysen

6.2.1 Durchflusszytometrische Analyse des Oberflächenexpressionsmusters der verwendeten Tumorzelllinien

Um endotheliale Adhäsionsmechanismen untersuchen zu können, sollten die verwendeten Tumorzellen bezüglich der Expression von Oberflächenmolekülen, denen unter anderem Bedeutung für Adhäsionsprozesse zugeschrieben werden, gut charakterisiert sein (Abbildung 6-17 und Tabelle 6-1).

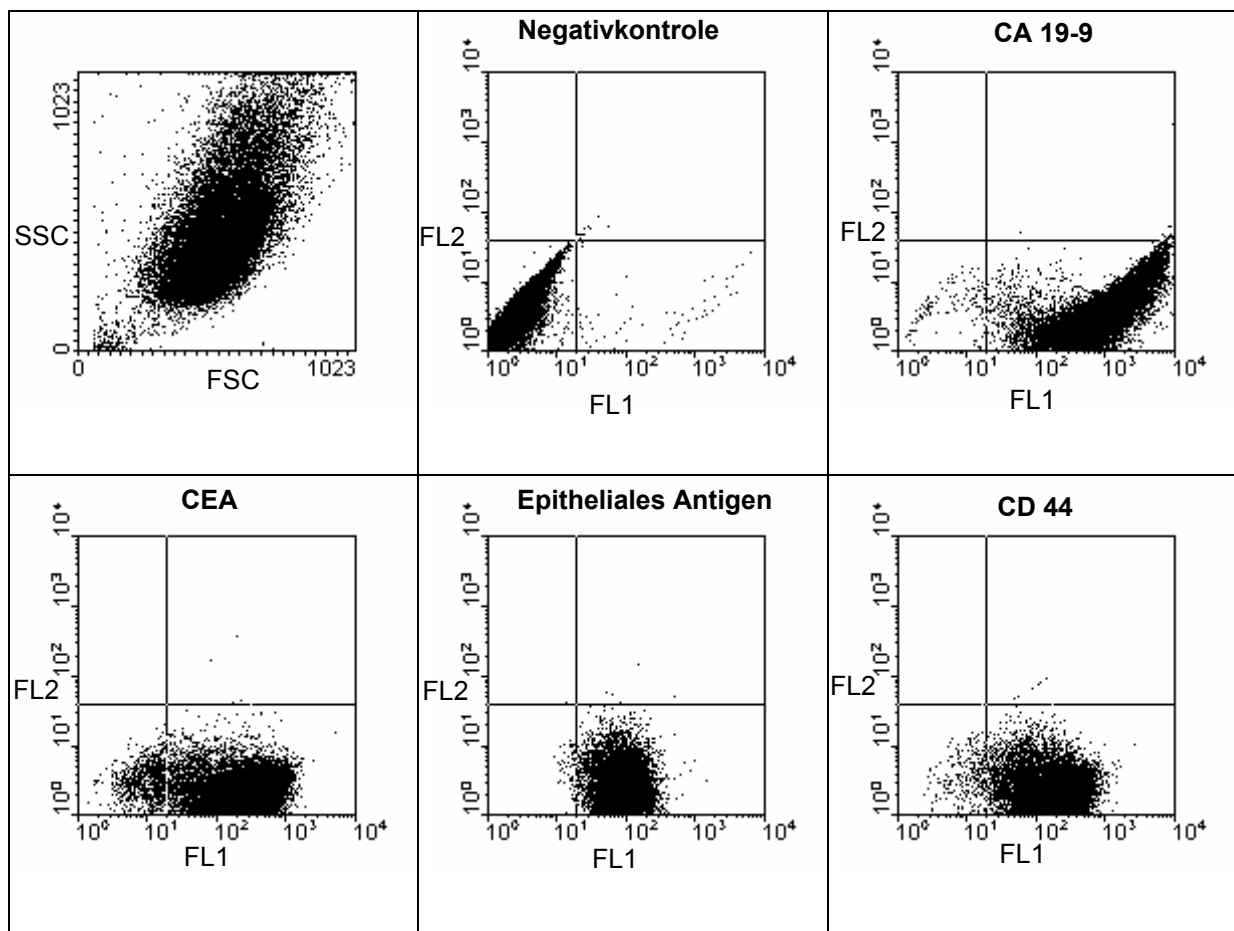


Abbildung 6-17 Durchflusszytometrische Analyse von ausgewählten Epitopen am Beispiel EPAM-98
FSC, Forward Scatter, *SSC* Side Scatter, *FL1*, Fluoreszenz 1, FITC; *FL2*, Fluoreszenz 2, PE

<u>Zelllinie</u>	<u>Anteil der Merkmalsträger an der Gesamtpopulation</u>					
	<i>Negativ-Kontrolle</i>	<i>epitheliales Antigen</i>	<i>CA 19-9 IgG</i>	<i>CA 19-9 IgM</i>	<i>CD 44</i>	<i>CEA</i>
Pa-Tu-8902	0%	99,13%	14,2%	3,4%	100%	72,13%
Pa-Tu-8988T	0%	49,29%	11,4%	2,5%	100%	
EPAM-98	1,22%	99,60%	95,09%	61,43%	98,36%	95,78%

Tabelle 6-1 Durchflusszytometrischer Nachweis von Epitopen auf den verwendeten Tumorzelllinien.

6.2.2 Durchflusszytometrische Analyse der Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen

Anschließend sollte die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen untersucht werden. Als Surrogatmarker verwendeten wir die Expression des Adhäsionsmoleküls E-Selektin (CD 62E). Die Expression von endothelialen Oberflächenmolekülen, die am Zelladhäsionsprozess beteiligt sind, muss nach aktuellem Kenntnisstand als aktiver Prozess angesehen werden. Entsprechend sollte die Adhäsionsmolekül-Expression nicht nur qualitativ, sondern auch in ihrer Dynamik bezüglich der Zytokinstimulation beschrieben werden.

6.2.2.1 Die endotheliale Expression von E-Selektin in Abhängigkeit vom proinflammatorischen Zytokin

Abbildung 6-18 und Abbildung 6-19 zeigen repräsentativ die Induktion der endothelialen Expression von E-Selektin in Abhängigkeit von den verwendeten proinflammatorischen Zytokinen.

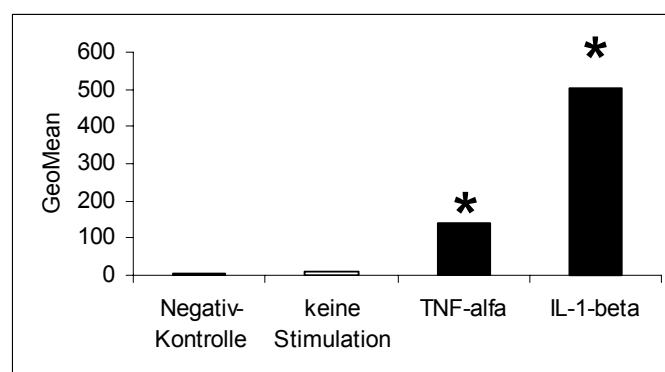


Abbildung 6-18 Durchflusszytometrisch bestimmte Expression von E-Selektin auf HUVEC in Abhängigkeit der Zytokin- Stimulation (1ng/ml/4 h)

GeoMean, geometrischer Mittelwert der Fluoreszenz 1, E-Selektin, n= 10 000, * p < 0,001

Der dargestellte Versuch ist repräsentativ für mehr als drei gleichartige Experimente.

Die Beobachtung, dass sich die geometrischen Mittelwerte der Fluoreszenz der Negativ-Kontrolle und der nicht-stimulierten Endothelzellen nicht signifikant unterscheiden (Kolmogorov- Smirnov Test, vgl. 5.4.4), ist ein Hinweis darauf, dass auf nicht-stimulierten Endothelzellen kein E-Selektin exprimiert wurde. Die Expression von E-Selektin konnte aber durch die Zytokine IL-1 β und TNF α signifikant induziert werden (p jeweils $< 0,001$ im Vergleich zu keiner Stimulation; Kolmogorov-Smirnov Test). In Bezug auf die Induktion der Expression von E-Selektin stellte sich IL-1 β potenter als TNF α heraus ($p < 0,001$ im Vergleich zueinander; Kolmogorov-Smirnov Test).

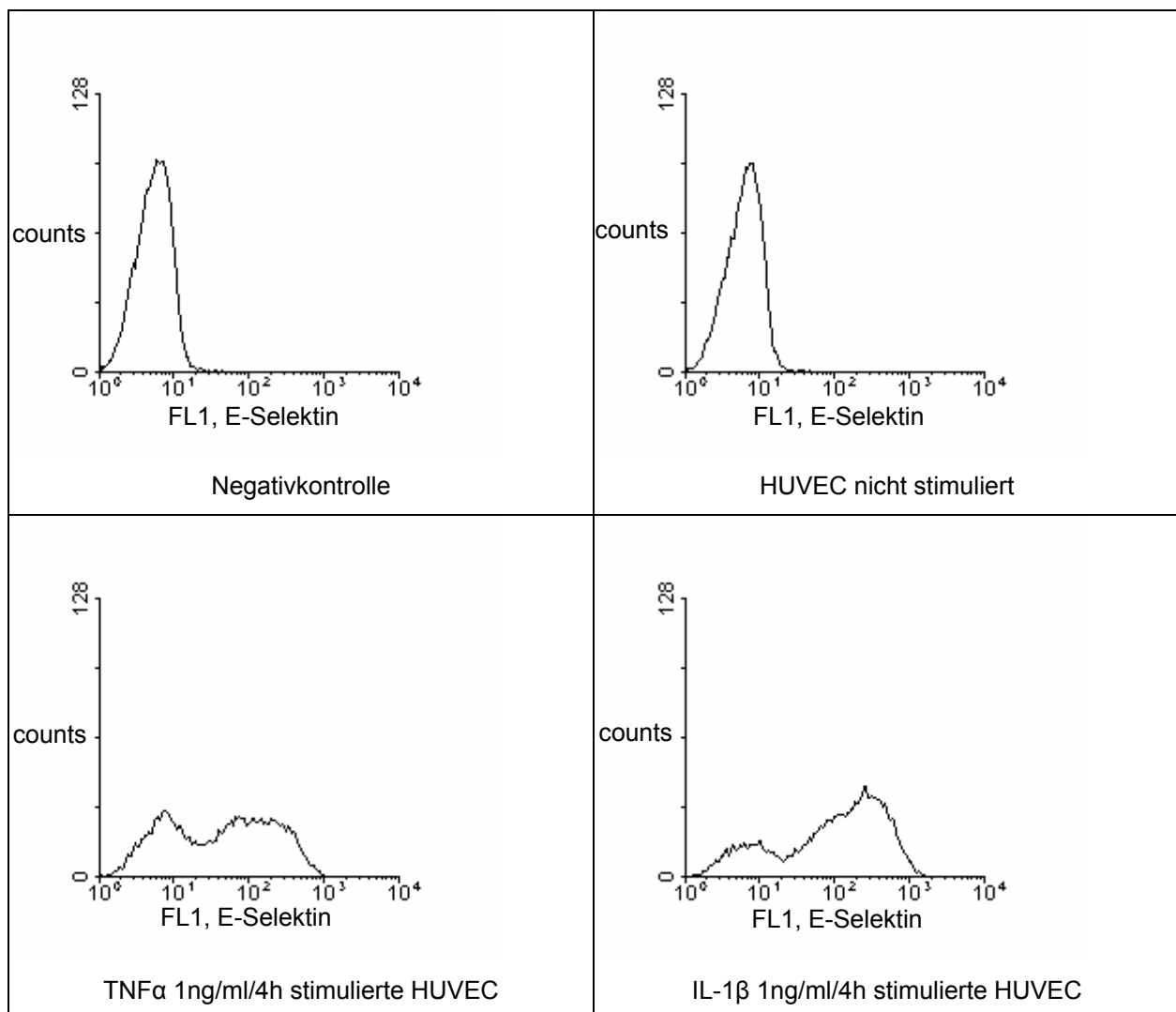


Abbildung 6-19 Histogramme der durchflusszytometrischen Analysen der E-Selektin Expression (Abszisse, FITC markiert) auf HUVEC in Abhängigkeit von der Zytokinstimulation

FL1, Fluoreszenz 1, FITC markiert Anti-E-Selektin

Zur besseren Vergleichbarkeit wurde der Maßstab der Ordinate von 128 counts beibehalten.

6.2.2.2 Die endotheliale Expression von E-Selektin in Abhängigkeit von der Zytokin-Dosierung

Abbildung 6-20 repräsentiert stellvertretend die Ergebnisse der Untersuchung zur Induktion der Expression von E-Selektin durch verschiedene Konzentrationen von IL-1 β .

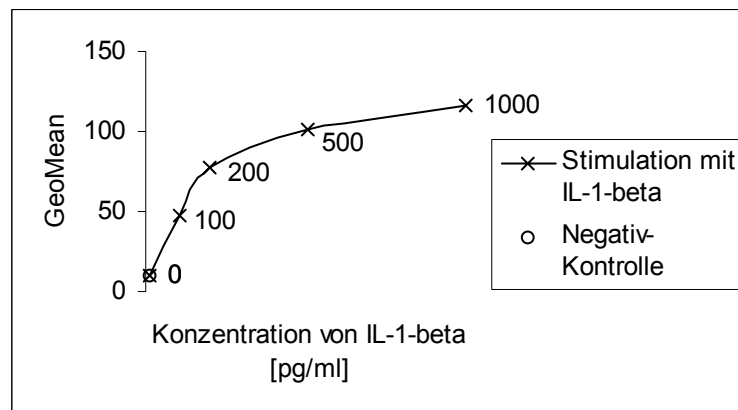


Abbildung 6-20 Durchflusszytometrisch bestimmte Expression von E-Selektin auf HUVEC in Abhängigkeit von der Konzentration der IL-1 β Stimulation (4 h)

GeoMean, geometrischer Mittelwert der Fluoreszenz 1, E-Selektin, n= 10 000

Der dargestellte Versuch ist repräsentativ für drei gleichartige Experimente.

Steigende Konzentrationen von IL-1 β führten zu einer dosisabhängigen Induktion der endothelialen Expression von E-Selektin. Bei einer Konzentration von 1 ng/ml schien näherungsweise ein Wirkungs- Plateau erreicht.

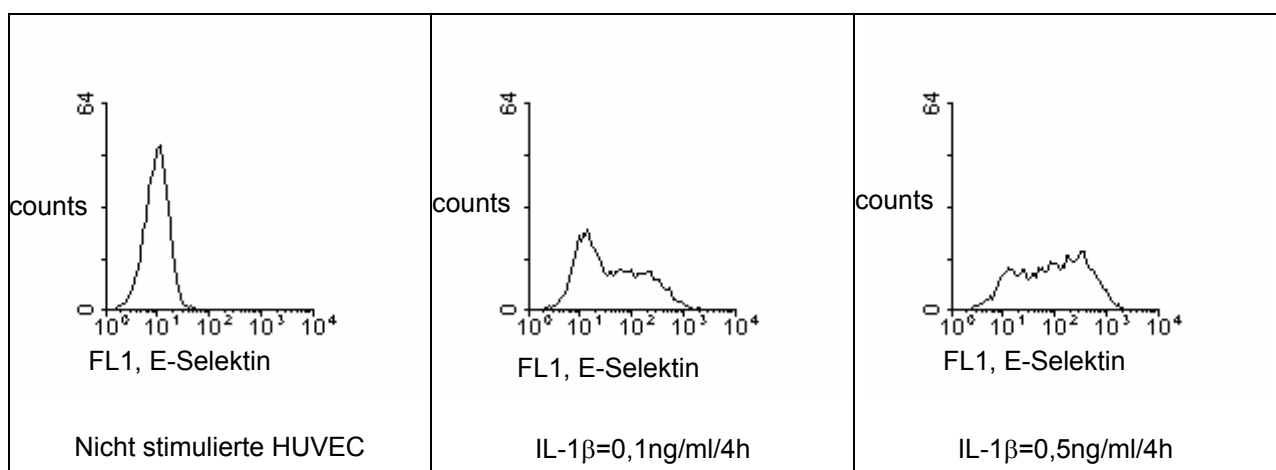


Abbildung 6-21 Beispiele aus der durchflußzytometrischen Bestimmung der Expression von E-Selektin auf HUVEC in Abhängigkeit von der Konzentration der IL-1 β Stimulation

FL1, Fluoreszenz 1, FITC markiert Anti-E-Selektin

Zur besseren Vergleichbarkeit wurde der Maßstab der Ordinate von 64 counts beibehalten. Vergleichbare Ergebnisse wurden bei der Verwendung von TNF α beobachtet.

6.2.2.3 Die endotheliale Expression von E-Selektin in Abhängigkeit von der Dauer der Zytokinstimulation

Repräsentative Darstellungen zur Induktion der endothelialen Expression von E-Selektin in Abhängigkeit von verschiedenen Inkubationszeiten mit IL-1 β sind Abbildung 6-22 und Abbildung 6-23 zu entnehmen.

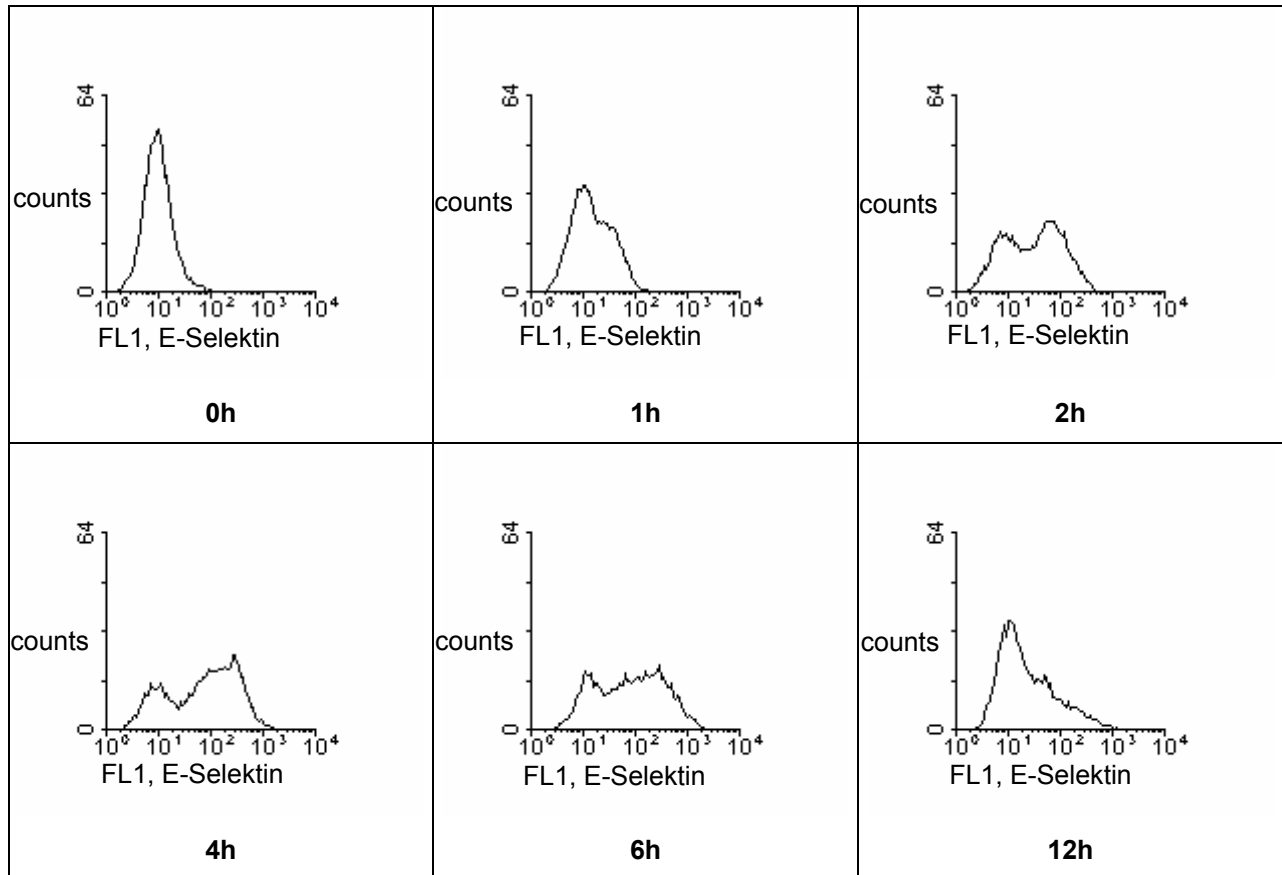


Abbildung 6-22 Histogramme der durchflusszytometrischen Bestimmung der Expression von E-Selektin auf HUVEC in Abhängigkeit von der Dauer der IL-1 β Stimulation (1ng/ml)

FL1, Fluoreszenz 1, FITC markiert Anti-E-Selektin

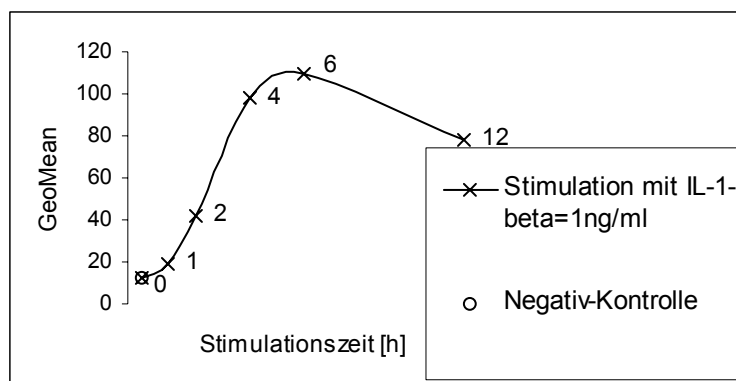


Abbildung 6-23 Expression von E-Selektin auf HUVEC in Abhängigkeit von der Dauer der IL-1 β Stimulation (1ng/ml)

GeoMean, geometrischer Mittelwert der Fluoreszenz 1, E-Selektin, n= 10 000

Der dargestellte Versuch ist repräsentativ für zwei gleichartige Experimente.

Es bestätigte sich die Zeitabhängigkeit der Induktion der Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen, wie sie bereits bei den in-vitro Adhäsionsversuchen beobachtet werden konnte. Bis zu einem Maximum nach 4 bis 6 Stunden resultierte eine Verlängerung der Inkubationszeit von HUVEC mit IL-1 β in einer vermehrten endothelialen Expression von E-Selektin, um danach wieder abzufallen.

6.2.3 Beeinflussbarkeit der endothelialen Expression von E-Selektin durch Heparine

Um die Ergebnisse der in-vitro Adhäsionsversuche auf Ebene der Proteinexpression erklären zu können, wurde die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen in Abhängigkeit von der Inkubation mit Heparinen unterschiedlicher Molekulargewichte in der Durchflusszytometrie untersucht.

6.2.3.1 Substanz- Wirkungsbeziehung

In einer ersten Versuchsreihe wurden HUVEC während, bzw. zwei Stunden vor und zwei Stunden nach proinflammatorischen Stimulation mit unfraktionierten und fraktionierten Heparinen inkubiert. Vor dem Hintergrund des „proof of principle“ wurde eine verhältnismäßig hohe Heparindosierung gewählt. Die repräsentative Darstellung Abbildung 6-24 verdeutlicht, dass nur die Vorinkubation mit niedermolekularem Heparin zu einer signifikanten Verminderung der endothelialen Expression von E-Selektin führt ($p < 0,001$ verglichen mit HUVEC ohne Heparininkubation; Kolmogorov-Smirnov Test, vgl. 5.4.4).

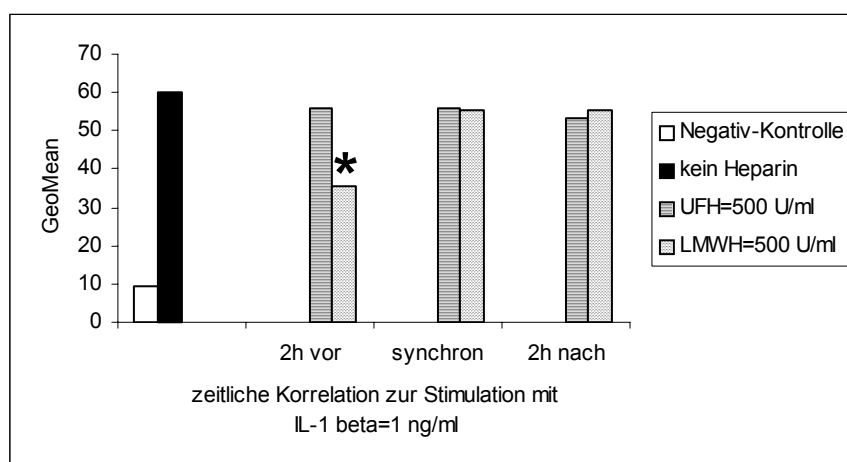


Abbildung 6-24 Einfluss der Inkubation von HUVEC mit UFH und LMWH vor, während und nach proinflammatorischer IL-1 β Stimulation auf die Expression von E-Selektin.

GeoMean, geometrischer Mittelwert der Fluoreszenz 1, E-Selektin, n= 10 000

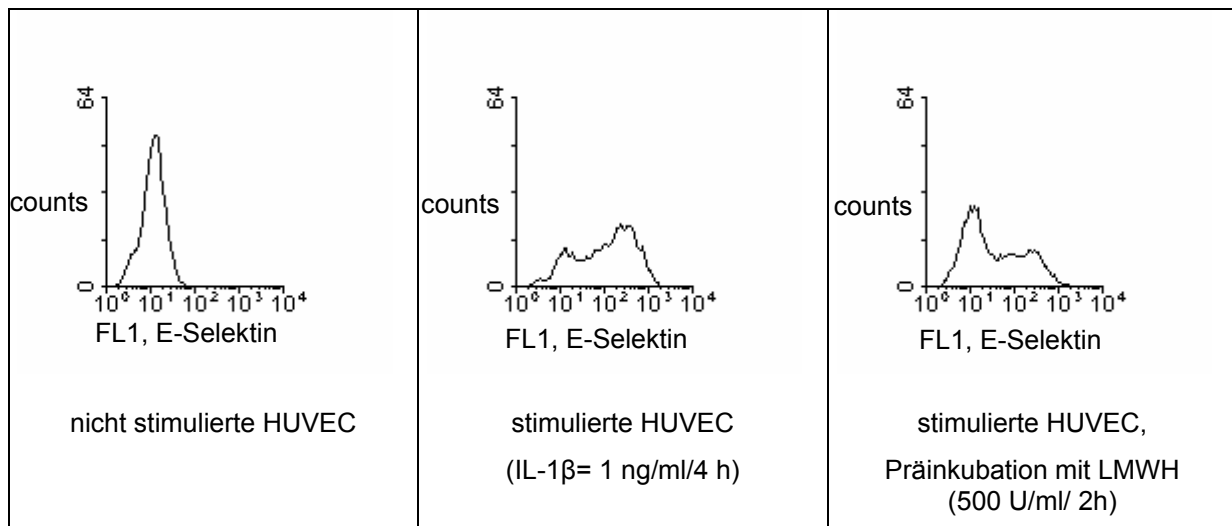


Abbildung 6-25 Beispiel- Histogramme der durchflusszytometrisch bestimmten Expression von E-Selektin auf HUVEC

FL1, Fluoreszenz 1, FITC markiert Anti-E-Selektin

Der dargestellte Versuch ist repräsentativ für zwei gleichartige Experimente.

6.2.3.2 Zeit- Wirkungsbeziehung

In der Abbildung 6-26 wird der Einfluss der Dauer der Präinkubation von Endothelzellen mit niedermolekularem Heparin vor proinflammatorischer Stimulation (IL-1 β 1 ng/ml/4 h) auf die endotheliale Expression von E-Selektin dargestellt.

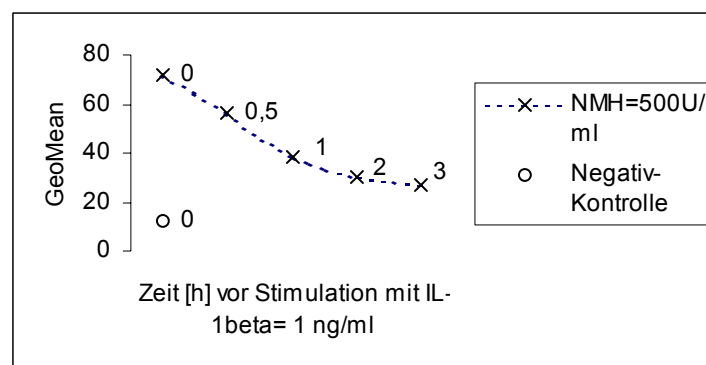


Abbildung 6-26 Einfluss der Dauer der Präinkubation von HUVEC mit LMWH (500 U/ml) bezüglich der IL-1 β induzierten endothelialen E-Selektin Expression

GeoMean, geometrischer Mittelwert der Fluoreszenz 1, E-Selektin, n= 10 000

Der dargestellte Versuch ist repräsentativ für zwei gleichartige Experimente.

Man erkennt, dass ab einer Vorinkubationszeit von zwei bis drei Stunden eine maximale Inhibition der IL-1 β Wirkung bezüglich der induzierten Expression von E-Selektin erreicht war.

6.2.3.3 Dosis-Wirkungsbeziehung

In weiteren Versuchen wurde untersucht, inwiefern die inhibitorische Wirkung des niedermolekularen Heparins bei einer Präinkubationszeit von zwei Stunden und anschließender proinflammatorischen Stimulation der Endothelzellen von der verwendeten Konzentration abhängig ist.

Der repräsentativen Abbildung 6-27 ist zu entnehmen, dass zwar mit zunehmender, und somit supraphysiologischer Konzentration von niedermolekularem Heparin, eine verstärkte Inhibition der IL-1 β induzierten Expression von E-Selektin zu beobachten war, jedoch die deutlichste relative Abnahme der E-Selektin Expression in einen Konzentrationsbereich fällt, der in-vivo durchaus realisierbar erscheint.

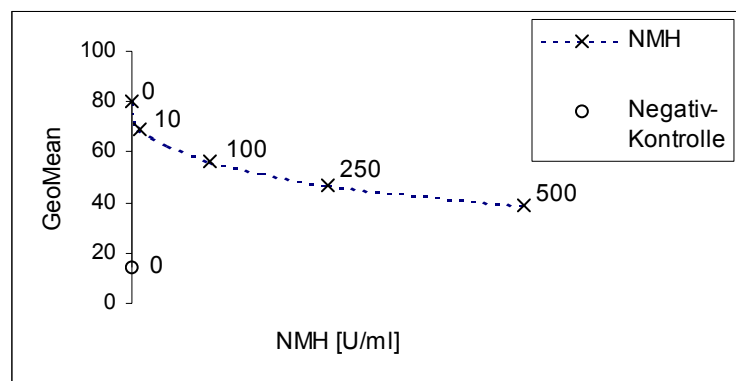


Abbildung 6-27 Einfluss der Dosierung der Präinkubation mit LMWH bezüglich der maximalen IL-1 β Stimulation (1ng/ml/4 h) von HUVEC auf die Expression von E-Selektin

GeoMean, geometrischer Mittelwert der Fluoreszenz 1, E-Selektin, n= 10 000

Der dargestellte Versuch ist repräsentativ für drei gleichartige Experimente.

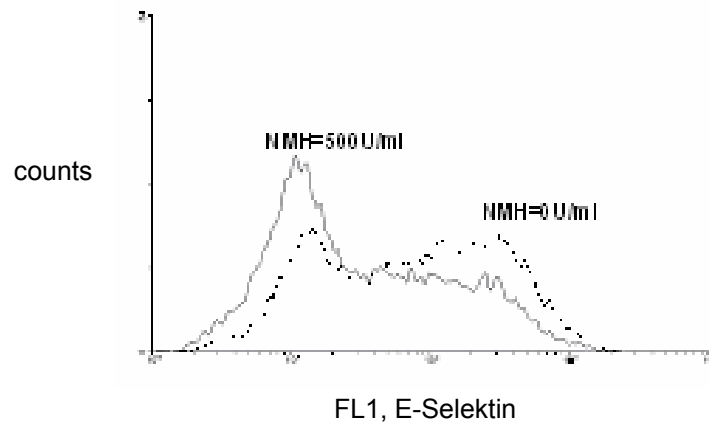
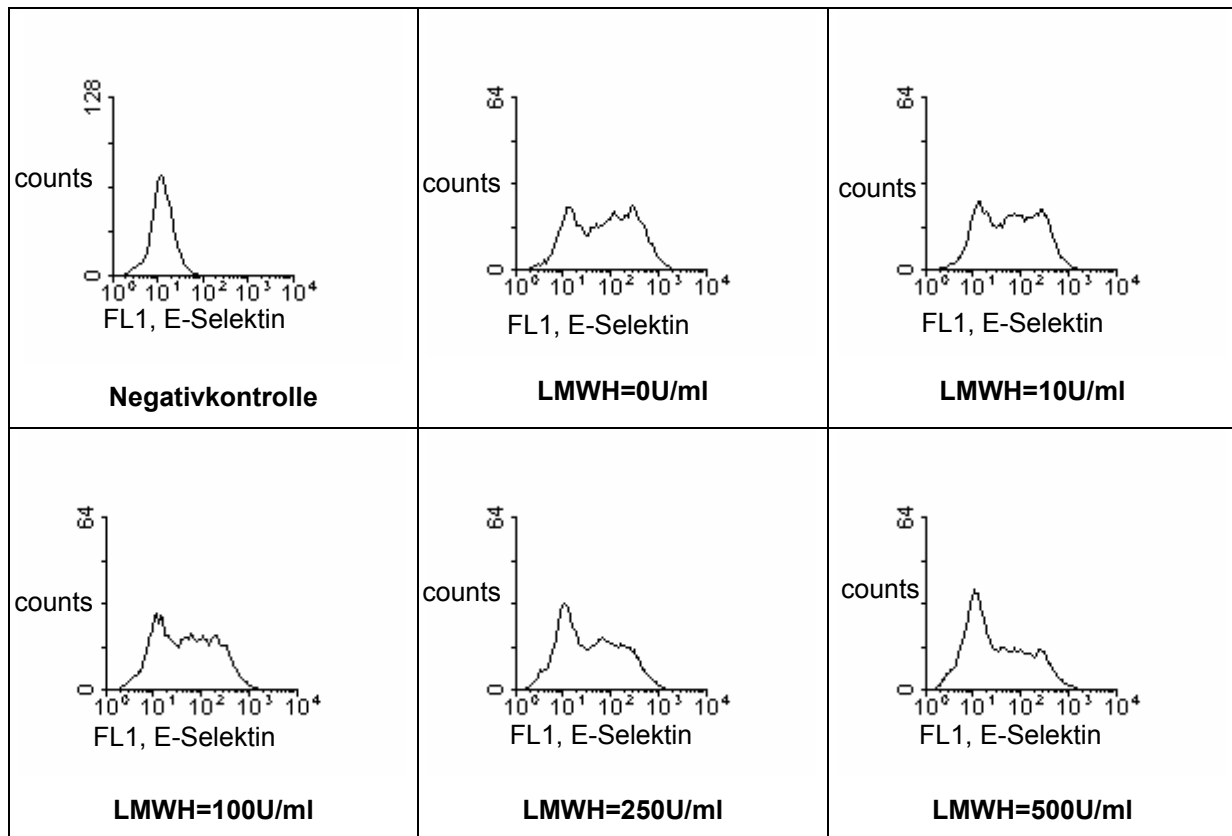


Abbildung 6-28 und Abbildung 6-29 Histogramme der durchflusszytometrisch bestimmten Auswirkung einer zweistündigen Präinkubation mit LMWH auf die Expression von E-Selektin auf IL-1 β stimulierte HUVEC (1ng/ml/4 h)

FL1, Fluoreszenz 1, FITC markiert Anti-E-Selektin

Vergleichbare Ergebnisse ließen sich auch bei der Verwendung von $\text{TNF}\alpha$ als stimulierendes Zytokin beobachten, wie exemplarisch in Abbildung 6-30 dargestellt. Man beachte abermals die geringere stimulatorische Potenz des $\text{TNF}\alpha$ im Vergleich zu $\text{IL-1}\beta$.

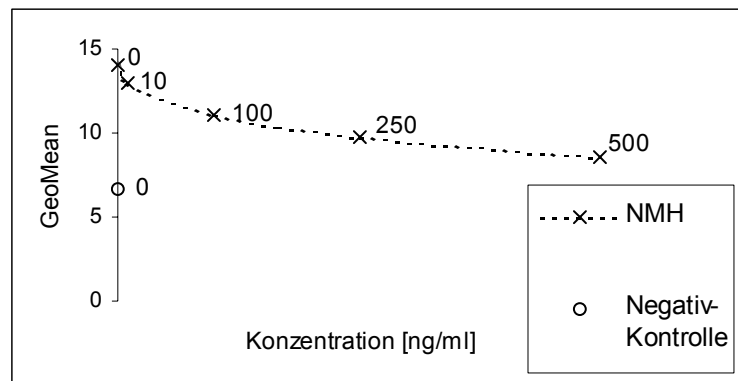


Abbildung 6-30 Einfluss der Dosierung der Präinkubation mit fraktioniertem Heparin bezüglich der $\text{TNF}\alpha$ Stimulation (1ng/ml/4 h) von HUVEC auf die endotheliale Expression von E-Selektin

GeoMean, geometrischer Mittelwert der Fluoreszenz 1, E-Selektin, n= 10 000

Der dargestellte Versuch ist repräsentativ für zwei gleichartige Experimente.

6.3 Northern Blot Analyse

Die Regulation bzw. Stimulation der Tumorzelladhäsion an Endothelzellen sowie deren Beeinflussbarkeit durch niedermolekulare Heparine sollte auf Ebene der endothelialen Genexpression von Adhäsionsmolekülen untersucht werden. Die Northern Blot Analyse stellt ein etabliertes Verfahren zum qualitativen sowie zum semiquantitativen Nachweis von Ribonukleinsäuren und somit der Gentranskription dar. Wir konzentrierten uns auf den Nachweis von E-Selektin als Surrogatmarker für endotheliale Adhäsionsmoleküle.

Es wurden drei Endothelzellpopulationen untersucht: (1) HUVEC, die weder proinflammatorisch stimuliert noch inhibiert wurden. (2) HUVEC, die proinflammatorisch mit IL-1 β stimuliert wurden. Und (3) HUVEC, die nach einer Vorinkubation mit niedermolekularem Heparin in gleicher Weise stimuliert wurden. Neben einer radioaktiv markierten Oligonukleotid Probe für E-Selektin wurde die Glycerin-Aldehydphosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als sogenanntes „House-keeping-Gen“ verwendet (vgl. 5.5.1.3).

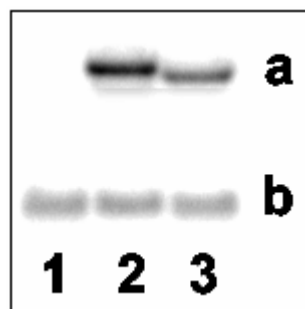


Abbildung 6-31 mRNA Expression von E-Selektin (a) und GAPDH (b) in den HUVEC Populationen (1) „keine Stimulation, keine Inhibition“, (2) „IL-1 β Stimulation, keine Inhibition“, und (3) „IL-1 β Stimulation nach Präinkubation mit LMWH“

In Abbildung 6-31 erkennt man drei Proben (1– 3) entsprechend der extrahierten GesamtRNS der drei Endothelzellpopulationen. In allen drei Proben ist die untere Bande (b) in gleicher Weise zu erkennen, die dem Nachweis des House-keeping-Gens GAPDH entspricht; ein Hinweis darauf, dass pro Probe die gleiche Menge RNS zugegeben wurde, da die Expression der GAPDH von der verwendeten Stimulation und Inhibition unabhängig sein sollte. In Probe (2) erkennt man eine zweite kräftige Bande (a), die dem Nachweis der mRNA für E-Selektin entspricht; ein Hinweis darauf, dass durch die Stimulation mit IL-1 β die Gentranskription von E-Selektin induziert wurde, denn der unstimulierten Probe (1) fehlt diese Bande. In der mit niedermolekularem Heparin präinkubierten Probe (3) ist diese Bande (a) deutlich

schwächer ausgeprägt; ein Hinweis darauf, dass es durch die zweistündige Präinkubation mit LMWH zu einer verminderten Synthese von E-Selektin- mRNA gekommen war, im Vergleich zur nicht mit LMWH vorbehandelten aber in gleicher Weise mit IL-1 β stimulierten Probe (2).

7 Diskussion

7.1 Diskussion der Grundlagen

7.1.1 Heparine

Unfraktioniertes Heparin (UFH) und seine Derivate, die fraktionierten oder niedermolekularen Heparine (LMWH) sind Medikamente der Wahl, wenn ein rascher antikoagulativer Effekt erwünscht ist [60]. Nach derzeitigen Empfehlungen sind sie indiziert und wirksam zur Prävention der tiefen Beinvenenthrombose, zur Therapie der tiefen Beinvenenthrombose und der Pulmonalembolie, zur frühen Intervention bei Patienten mit instabiler Angina pectoris und akutem Myokardinfarkt, zur Behandlung von Patienten mit kardialen oder gefäßchirurgischen Eingriffen, nach Koronar-Angioplastie, zur Prophylaxe thromboembolischer Komplikationen bei der Verwendung extrakorporaler Verfahren wie der Herz-Lungen-Maschine oder der Hämodialyse, bei Patienten mit koronaren Stents, bei strenger Indikation zur Therapie einer fetalen Wachstumsretardierung, und bei einer ausgewählten Patientenpopulation mit disseminierter intravasaler Koagulation [59, S. 1566].

7.1.1.1 Unfraktioniertes Heparin

7.1.1.1.1 Historie des unfraktionierten Heparins

Heparin wurde 1916 von dem damaligen Medizinstudenten McLean in Lebergewebe entdeckt. 1939 konnten Brinkhous et al zeigen, dass die antikoagulative Wirkung des Heparins von einem Plasmafaktor abhängig ist, der 1968 von Abildgaard als Antithrombin III bezeichnet wurde [1;2]. Ende der 70'er Jahre konnte dann schließlich die Korrelation zwischen Struktur und Form des Heparins und die Interaktion mit Antithrombin III geklärt werden [117].

7.1.1.1.2 Biochemie des unfraktionierten Heparins

Die Biosynthese des Heparins im Organismus ist komplex, umfasst mindestens fünf enzymatische Schritte und ist in verschiedenen Zellen nicht identisch [120]. Sie findet vornehmlich in Mastzellen, möglicherweise auch in Endothelzellen statt [34, S. 257].

Heparine gehören zu einer Familie der Polysaccharide, den Glykosaminoglykanen. Glykosaminoglykane sind lineare Kohlenhydrat-Polymere aus sich wiederholenden Disacchariden, bestehend aus einem Hexosamin und einem stickstofffreien

Monosaccharid [124]. Heparine bestehen aus Ketten von alternierenden Aminozuckern, entweder D-Glucosamin oder D-Galaktosamin und Uronsäuren, entweder Glucuronsäure oder Iduronsäure, die im Gegensatz zu anderen Glykosaminoglykanen auch über α -glykosidische Bindungen verknüpft sind [120]. Unfraktioniertes Heparin ist ein heterogenes Gemisch von Glykosaminoglykan-Ketten, die jeweils 200 bis 300 Saccharideinheiten umfassen. Das Molekulargewicht schwankt zwischen 5.000 und 30.000 und beträgt im Mittel 15.000 [60]. Durch die vielen anionischen Gruppen der polysulfatierten Glykosaminoglykan-Ketten ist Heparin stark negativ geladen [34, S. 257].

7.1.1.1.3 Wirkung des unfraktionierten Heparins als Antikoagulans

Der antikoagulative Effekt des Heparins beruht vor allem auf dessen Interaktion mit Antithrombin III (ATIII). Dadurch kommt es zu einer Konformationsänderung und zu einer etwa 1000-fach beschleunigten Wirkung der physiologischen Inhibition der Gerinnung [60]. Die Bindung von Heparin an ATIII geschieht über eine spezifische und hochaffine Pentasaccharid-Sequenz [24]. ATIII neutralisiert über ein Arginin im aktiven Zentrum lösliche Serinproteasen, die an der Gerinnungskaskade beteiligt sind, vornehmlich Thrombin (Faktor IIa), Faktor IXa und Faktor Xa. Heparin katalysiert die Inaktivierung von Thrombin, indem es vorübergehend sowohl die Protease, als auch den Inhibitor als Tertiärkomplex an sich bindet. Nach Dissoziation vom Komplex steht Heparin wiederum katalytisch zur Verfügung [59, S. 1565]. Im Gegensatz dazu ist die Ausbildung dieses Komplexes bei der Inaktivierung des Faktors X nicht nötig. Heparinmoleküle, die über weniger als 18 Saccharideinheiten verfügen, verlieren zwar die Fähigkeit, ATIII und Thrombin simultan an sich zu binden, aber ihnen bleibt die Fähigkeit zur Inaktivierung des Faktors X erhalten.

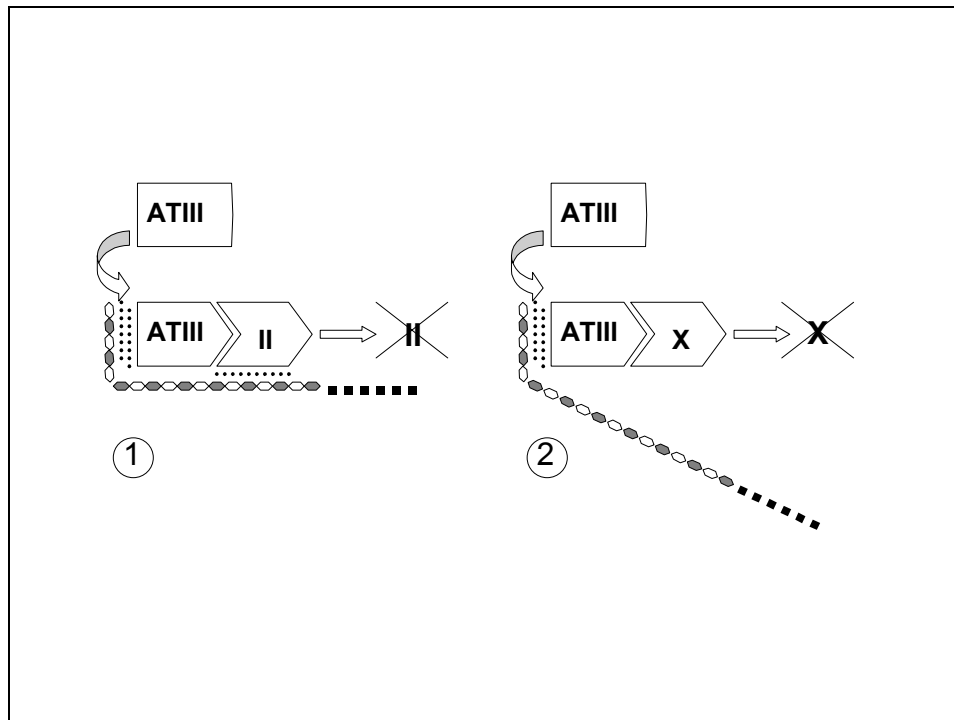


Abbildung 7-1 Schema zur antikoagulativen Heparinwirkung

(1) Die Inaktivierung von Thrombin (II) geschieht über Ausbildung eines katalytischen Tertiärkomplexes mit Heparin und Antithrombin III (ATIII). (2) Im Gegensatz dazu muss Faktor X bei seiner Inaktivierung durch ATIII nicht an Heparin gebunden werden.

Ein weiterer Plasmfaktor, Heparin Cofaktor II, inaktiviert spezifisch und ausschließlich Thrombin und wirkt unabhängig von der ATIII-bindenden Pentasaccharid-Sequenz, bedarf jedoch höherer Heparinkonzentrationen als jene, die zur Katalyse der ATIII-Wirkung nötig sind.

Die zu beobachtende Heterogenität der antikoagulativen Wirkung unfraktionierter Heparine hat mindestens drei Ursachen:

- (1) Nur ein Drittel der Heparinmoleküle trägt die angesprochene Pentasaccharid-Sequenz.
- (2) Das antikoagulative Profil wird maßgeblich von der Kettenlänge beeinflusst.
- (3) Die Heparin-Clearance wird vom Molekulargewicht insofern beeinflusst, als dass hochmolekulare Moleküle eine kürzere Eliminationszeit besitzen, als niedermolekulare.

7.1.1.1.4 Pharmakokinetik des unfraktionierten Heparins

Da Heparin nach oraler Gabe nicht ausreichend resorbiert wird, muss es parenteral appliziert werden, bevorzugt subkutan und intravenös [60]. Die Bioverfügbarkeit ist wegen des hohen Proteinbindungsvermögens gering. Aufgrund der hohen negativen Ladung bindet UFH Pentasaccharid-unabhängig an Plasmaproteine, wie

beispielsweise Fibrinogen oder Fibronectin, an Proteine, die von Thrombozyten sezerniert werden, wie zum Beispiel Plättchen-Faktor 4, und an von Endothelzellen sezernierte Proteine, wie den hochmolekularen Von-Willebrand-Faktor [59, S. 1566]. Die Bioverfügbarkeit verschlechtert sich aus noch unbekanntem Gründen abermals, wenn Heparin subkutan in Dosen von weniger als 35.000 U pro Tag verabreicht wird [61].

Heparin wird durch einen schnellen Mechanismus nullter Ordnung metabolisiert, gefolgt von einer langsameren, renalen Elimination erster Ordnung. Man geht davon aus, dass Heparin während der Metabolisierung nullter Ordnung an Oberflächenrezeptoren auf Endothelzellen und Makrophagen bindet, internalisiert und zu niedermolekularen Molekülen depolymerisiert wird. Da dieser Prozess sättigbar ist, hat Heparin eine dosisabhängige Halbwertszeit, die sich von 30 Minuten auf 150 Minuten steigern lässt, wenn man die verabreichte Dosis von 25 U/kg auf 400 U/kg Körpergewicht erhöht [60].

7.1.1.1.5 Dosierung, Konzentration und Monitoring des unfraktionierten Heparins

Auf diesen umfangreichen und im Wandel befindlichen Themenkomplex kann in diesem Zusammenhang nur cursorisch eingegangen werden. Die Dosierungsempfehlungen variieren unter anderem mit der Art der Applikation [60], und die Schemata hängen von der entsprechenden Indikation und Situation ab [59]. Trotz der nur mäßigen Korrelation wird der Heparineffekt in der Regel durch Testung der aPTT überwacht. Unter Berücksichtigung der entsprechenden Indikation und Situation weiß man heute, dass der therapeutische Zielwert der aPTT Ratio höher ist, als zunächst angenommen [23] und mindestens 1,8 bis 2,6, in ausgewählten Fällen sogar 4,2 betragen sollte. Die Testung der aPTT ist über einen Konzentrationsbereich des Heparins im Serum von 0,1 bis 1,0 U/ml sensitiv. Zur Therapieüberwachung von Patienten, die höhere Heparinkonzentrationen benötigen, wird in der Regel die aktivierte Gerinnungszeit bestimmt, die bis zu einem Konzentrationsbereich von 5 U/ml verlässlich misst.

7.1.1.2 Fraktioniertes oder niedermolekulares Heparin

7.1.1.2.1 Allgemeines zu niedermolekularen Heparinen

Nach mehr als zwei Jahrzehnten intensiver Forschung und Studien haben sich die niedermolekularen Heparine als sichere und effektive Alternative zu den unfraktionierten Heparinen als Antikoagulantien herausgestellt, und diese bei einer Vielzahl von Indikationen sowohl in Europa, als auch zunehmend in Nordamerika abgelöst [142, S. 688]. Als Gründe hierfür sind im Folgenden die wichtigsten Eigenschaften und grundlegenden Unterschiede der niedermolekularen Heparine im Vergleich zu den unfraktionierten Heparinen in Stichworten angeführt.

- (1) LMWH haben wegen der kleineren Fragmentlängen eine geringere Wirksamkeit bezüglich der Katalyse der Inaktivierung von Thrombin, aber die Fähigkeit zur Inaktivierung von Faktor X bleibt ihnen erhalten.
- (2) LMWH binden in geringerem Umfang unspezifisch an Proteine, was zu einer besseren Vorhersagbarkeit ihrer Wirkung führt und ein spezifisches Monitoring weitgehend unnötig macht. In mehreren Studien haben sich fraktionierte Heparine als sicher in ihrer ambulanten Anwendung herausgestellt [75;89].
- (3) LMWH binden in geringerem Umfang an Makrophagen und Endothelzellen, wodurch sich ihre Halbwertszeit verdoppelt bis vervierfacht.
- (4) LMWH binden in geringerem Umfang an Thrombozyten und Plättchenfaktor 4, was unter Umständen die verminderte Inzidenz Heparin abhängiger Antikörper und Heparin-induzierter-Thrombozytopenie erklären kann.
- (5) LMWH binden in geringerem Umfang an Osteoklasten, was unter Umständen die geringere Inzidenz der Osteopenie erklären kann.

7.1.1.2.2 Biochemie der niedermolekularen Heparine

Durch kontrollierte enzymatische (z.B. Heparinasen), chemische (z.B. Peroxidasespaltung), oder physikalische (z.B. Gammabestrahlung) Depolimerisation von unfraktioniertem Heparin erhält man Fragmente von etwa einem Drittel der Ausgangsgröße. Bei ansonsten identischer chemischer Zusammensetzung der Glykosaminoglykan-Ketten variiert das Molekulargewicht nun zwischen 1000 und 10.000, und beträgt im Mittel 4.000 bis 5.000 [60]. Wie das unfraktionierte Ausgangssubstrat, sind auch die niedermolekularen Heparine nicht nur in Hinsicht auf Molekulargewicht, sondern auch bezüglich ihrer antikoagulativen Wirkung als

heterogen zu beurteilen. Nur etwa 15 bis 25% der Ketten des niedermolekularen Heparins tragen die angesprochene Pentasaccharid-Sequenz [142, S. 688].

7.1.1.2.3 Wirkung des niedermolekularen Heparins als Antikoagulans

Prinzipiell unterscheidet sich die Pharmakodynamik der niedermolekularen Heparine kaum von der ihrer unfraktionierten Ausgangssubstanz. Durch Bindung der Pentasaccharid-Sequenz an ATIII wird, durch dessen Konformationsänderung, seine Interaktion mit Thrombin und Faktor X etwa um den Faktor 1000 beschleunigt. Der Hauptunterschied der antikoagulativen Wirkung zwischen unfraktioniertem und niedermolekularem Heparin besteht in ihrer relativen Aktivität, Thrombin beziehungsweise Faktor X zu inhibieren [142, S. 688]. Da fast alle Glykosaminoglykan-Ketten des unfraktionierten Heparins mehr als 18 Saccharideinheiten lang sind, hingegen weniger als die Hälfte aller Ketten des niedermolekularen Heparins diese Minimallänge für die Ausbildung des Tertiärkomplexes zwischen Heparinmolekül, ATIII und Thrombin aufweisen, wirkt fraktioniertes Heparin relativ stärker gegen Faktor X (vgl. Abbildung 7-1).

Unklarheit besteht noch über die funktionelle Relevanz der sowohl durch unfraktioniertes als auch durch fraktioniertes Heparin induzierten endothelialen Sezernierung von „Tissue Factor“, dessen Fähigkeit zur Komplexbildung und Inaktivierung von Faktor X, und der damit verbundenen sukzessiven Hemmung von Faktor VII durch den gebildeten Komplex [3;119].

7.1.1.2.4 Pharmakokinetik, Monitoring und Dosierung des niedermolekularen Heparins

Die Unterschiede der Pharmakokinetik im Vergleich zu den unfraktionierten Heparinen beruhen größtenteils auf den verminderten Bindungseigenschaften des niedermolekularen Heparins bezüglich Proteinen und Zellen. Die meisten Proteine, die unfraktioniertes Heparin binden und biologisch neutralisieren, haben geringe oder keine Affinität zu fraktionierten Heparinen [60;148;149]. Dies trägt maßgeblich zu der guten Vorhersagbarkeit des antikoagulativen Effekts bei gleicher Dosierung [55] und der exzellenten Bioverfügbarkeit bei verhältnismäßig niedriger Dosierung bei [10]. Das verminderte Blutungsrisiko, verglichen mit einer Therapie mit unfraktioniertem Heparin, kann bei gleichem antikoagulativen Effekt mit der geringeren Bindung an Von-Willebrand-Faktor erklärt werden [125]. Neben der besseren Bioverfügbarkeit kann das geringere Bindungsvermögen an Endothelzellen [14] auch die längere

Plasmahalbwertszeit erklären, die sich etwa um den Faktor 2 bis 4 verlängert. Sie beträgt somit 2 bis 4 Stunden nach intravenöser und 3 bis 6 Stunden nach subkutaner Applikation [11;56;96]. Schließlich führt die verminderte Bindung an Makrophagen zu der dosisunabhängigen Clearance des niedermolekularen Heparins über die Niere.

Konsequenterweise ist bei Patienten mit ausreichender Nierenfunktion und einem Körpergewicht von nicht weniger als 50 kg und nicht mehr als 80 kg, keine laborchemische Überwachung der Therapie mit niedermolekularem Heparin erforderlich [142, S. 690].

Wie auch beim unfraktionierten Heparin variieren die Dosierungsempfehlungen und Schemata mit der entsprechenden klinischen Indikation und Situation. Zusätzlich ist das verabreichte Präparat zu berücksichtigen. Die verabreichten Dosen sind in der Regel niedriger als die der unfraktionierten Heparine [59;60].

7.1.1.3 Spezifische Beeinflussung der Tumorbilogie durch Heparine

Schon seit 1930 mit Goerner et al. wird die Wirkung von Antikoagulantien auf maligne Prozesse untersucht, doch aktuelle Studien haben das Interesse an der pharmakologischen Substanzklasse der Heparine und ihrer Derivate im Zusammenhang mit malignen Tumoren neu geweckt. Vor dem Hintergrund der paraneoplastischen Thrombophilie wurde eine Vielzahl von Tumorpatienten im Rahmen klinischer Studien mit unfraktionierten und fraktionierten Heparinen therapiert [51;58;86;122;123]. Zusammenfassend ergaben sich bei Patienten mit malignen Grundliden Hinweise auf eine Verbesserung der Überlebensprognose durch den Einsatz von unfraktionierten und fraktionierten Heparinen (vgl. 3.3.2 und Tabelle 3-1). Interessanterweise zeigte sich unter der Therapie mit niedermolekularen Heparinen eine signifikant reduzierte Mortalität (bis zu 40% während eines follow-up Zeitraums von 3 bis 6 Monaten), verglichen mit Patienten, deren thromboembolisches Ereignis mit unfraktionierten Heparinen therapiert wurde. Diese Unterschiede bezüglich des Überlebens konnten nicht auf letale thromboembolische Ereignisse oder Blutungen zurückgeführt werden und wurden nicht bei Patienten ohne maligne Grundliden beobachtet. Somit ist von einer spezifischen Beeinflussung der Tumorbilogie auszugehen (vgl. 3.3).

7.1.1.4 Potentielle Wirkungsmechanismen von Heparin und seinen Derivaten auf maligne Prozesse

Durch elektrostatische Interaktion ihrer polyanionischen Gruppen der Glykosaminoglykan-Ketten, können Heparine an eine Vielzahl von anderen Proteinen und Molekülen binden [124]. Diese Interaktionen werden maßgeblich durch physikochemische Eigenschaften der Heparinpolymere bestimmt, wie der Primärsequenz, dem Sulfatierungsmuster, der Verteilung der elektrischen Ladung, der generellen Ladungsdichte und dem Molekulargewicht. Tabelle 7-1 soll einen Überblick über die vielen verschiedenen potentiellen Wirkmechanismen geben, die dem Heparin und seinen Derivaten in Bezug auf Tumorprogression und Metastasierung in der Literatur zugeschrieben werden, wobei über deren Signifikanz in-vivo Unklarheit herrscht (nach [107]).

Mechanismen maligner Prozesse	Mögliche Interaktion durch Heparin
1. Karzinogenese und Tumorwachstum	
Thrombin ist ein Mitogen für Tumorzellen, induziert die Freisetzung von VEGF aus Endothelzellen und Thrombozyten und verstärkt die Tumorzell- Adhäsion	Heparin ist ein Antithrombin
Histamin ist ein Promotor für Tumor- Wachstum in experimentellen Modellen	Heparin bindet und inaktiviert Histamin
Chemokine (z.B. IL-8, Melanozyten Wachstumsfaktor) stimulieren Wachstum und Metastasierung	Heparin hemmt die Chemokin- Aktivität
Viren (z.B. EBV, HIV, CMV) sind mit der Pathogenese einiger menschlicher Tumoren assoziiert	Heparin hat antivirale Aktivität
Sauerstoffradikale initiieren die Karzinogenese und verstärken die Metastasierung	Heparin hemmt die Produktion von Sauerstoffradikalen und schützt Zellen vor Schäden durch O ₂ Radikale
Onkogene und Transkriptionsfaktoren vermitteln Tumorwachstum und –entwicklung	Heparin hemmt die Expression bestimmter Onkogene
Die Aktivität der Kaseinkinase II ist in Tumorzelllinien und in einigen humanen Tumoren erhöht. Sie hemmt eventuell die Aktivität des Tumorsuppressorgens p53 und/oder ist ein Onkogen	Heparin ist ein potenter Inhibitor der Kaseinkinase II
Telomerasen und Topoisomerasen werden für Zellwachstum und Replikation benötigt	Heparin hemmt eventuell diese Enzyme durch Bindung an positiv geladene Aminosäuren in ihren aktiven Domänen
Glukosaminoglykane der extrazellulären Matrix bilden ein Speicherdepot für Faktoren, die das Zellwachstum fördern und hemmen können, und bestimmen ihre Beziehung zu Zelloberflächenrezeptoren	Heparin verändert eventuell dieses Depot durch Bindung an die Glukosaminoglykane der extrazellulären Matrix
Der sog. Scatter Factor ist ein Mitogen	Heparin bindet an die kationischen Ansammlungen des Scatter Factor und hemmt seine Aktivierung
Tumorzell-assoziierte Proteoglykane binden an Wachstumsfaktoren	Lösliches Heparin interferiert eventuell kompetitiv mit diesen Proteoglykanen um das Binden von Wachstumsfaktoren
Transkriptionsfaktoren der AP-1 Familie sind an der malignen Transformation beteiligt	Heparin hemmt die AP-1 Bindung an die DNA
Fibrin bildet ein Gerüst für das Tumorzellwachstum, schützt Tumorzellen vor NK-Zellen und ist Teil der malignen Neoangiogenese	Heparin hemmt die Fibrin-Formation

Mechanismen maligner Prozesse	Mögliche Interaktion durch Heparin
-------------------------------	------------------------------------

2. Angiogenese

Angiogenese unterstützt das Tumorzell-Wachstum	Heparin hemmt die Angiogenese
Der sog. Tissue Factor stimuliert die Angiogenese	Heparin hemmt die Tissue Factor Expression und verstärkt den sog. Tissue Factor Pathway Inhibitor
VEGF, IL-8 und der Hepatozyten Wachstumsfaktor/ Scatter Factor stimulieren die Angiogenese	Heparin ist anionisch und bindet eventuell an die Anhäufungen von basischen Aminosäuren in diesen Proteinen und hemmt möglicherweise ihre Aktivität
Die VEGF Bindung an den KDR/flk-1 Rezeptor Komplex benötigt eine positiv geladene Aminosäure-Oberfläche	Heparin ist stark negativ geladen und interferiert möglicherweise mit dieser Bindung, und somit der Angiogenese

3. Tumor- Adhäsion, -Invasion und –Metastasierung

Die Tumorzelladhäsion an vaskuläre Endothelzell-Oberflächen ist ein kritischer Schritt in der Metastasierung	Heparin bindet an und hemmt eventuell Moleküle, die an der Adhäsion beteiligt sind (z.B. Selektine, Heparansulfat- Proteoglykane) und verändert die adhäsiven Eigenschaften der Tumor- und Endothelzellen
Komplement führt in experimentellen Modellen zu einer verstärkten Metastasierung	Heparin hemmt den klassischen und alternativen Weg der Komplementaktivierung
Matrix-Metalloproteasen erleichtern die Metastasierung	Heparin hemmt die Thrombin- und Plasminogen-Aktivierung und könnte somit indirekt die Aktivität der Matrix-Metalloproteasen hemmen
Thrombospondin erleichtert die Migration, das Anheften und das Streuen von Tumorzellen	Heparin hemmt die Bindung von Thrombospondin an den Rezeptor
Serin-Proteasen (z.B. Thrombin, Urokinase, Plasmin, Cathepsin G) stimulieren das Metastasenwachstum	Heparin hemmt die Aktivität dieser Enzyme, wahrscheinlich durch Bindung an die positiv geladenen aktiven Zentren
Protease Nexin ist ein Serin-Protease-Inhibitor (Serpine), der die Tumorzellinvasion blockt	Heparin bindet an Serin Protease Inhibitor und verstärkt ihre Bindung an ihre Substrate, außerdem aktiviert es andere Serpine
Heparanase degradiert Basalmembranen, und ihre Expression korreliert mit dem metastatischen Potential einiger Tumore	Heparin hemmt Tumorzell- Heparanase und vermindert Tumormetastasen in experimentellen Modellen
Ornithin-Decarboxylase ist ein kationisches Enzym, das die Polyamin Biosynthese katalysiert. Überexpression geht mit einer verstärkten Invasivität von epithelialen Zellen einher	Heparin ist anionisch und hemmt möglicherweise die Aktivität der Ornithin- Decarboxylase

Mechanismen maligner Prozesse	Mögliche Interaktion durch Heparin
-------------------------------	------------------------------------

4. Antineoplastische Faktoren

TGF β hat eventuell antineoplastische Eigenschaften	Heparin potenziert die TGF β Aktivität in einigen experimentellen Systemen
Maligne Zellen haben ihre Fähigkeit zur Apoptose verloren	Heparin induziert Apoptose in einigen experimentellen Tumoren
Maligne Zellen haben ihre Fähigkeit zur Differenzierung verloren	Heparin induziert die Differenzierung in einigen experimentellen Tumoren
Immunsuppression verstärkt das Tumorzellwachstum einiger humaner Tumoren	Heparin stimuliert die Lymphozytenaktivierung und die zytotoxische Antitumor- Antwort in einigen experimentellen Modellen
Expression von MDR (multi drug resistance) Proteinen von Leukämiezellen macht diese resistent gegenüber Chemotherapeutika	Heparin ändert den MDR Phenotyp in verschiedenen Leukämie Zelllinien

Tabelle 7-1 Mögliche Mechanismen der Wirkung von Heparin auf maligne Prozesse

7.1.2 Metastasierung

7.1.2.1 Klinische Bedeutung der Metastasierung

Das Vorliegen einer Metastasierung gilt neben der Fähigkeit zur Invasion als definierende Eigenschaft maligner Neoplasien [38]. Das Bestehen und die Ausprägung der metastatischen Dissemination bestimmt maßgeblich Therapie und Prognose. Trotz der Fortschritte und der Verbesserungen der Frühdiagnostik, der chirurgischen Möglichkeiten, der lokalen und systemischen Therapien, und der supportiven Patientenversorgung, sind die meisten Behandlungsversagen und Todesfälle in Rahmen einer Krebserkrankung auf Metastasen zurückzuführen [40]. Somit stellen Malignome aktuell die zweithäufigste Todesursache der industrialisierten Welt dar [94]. Eine Verminderung oder Verhinderung der Metastasierung ist daher erstrebenswert. Vor dem Hintergrund einer potentiellen therapeutischen Intervention ist ein grundlegendes Verständnis der zellulären und molekularen Vorgänge der Metastasierung notwendig.

7.1.2.2 Metastasierung als phasenhafte Kaskade komplexer Abläufe

Metastasierung ist kein statisches Ereignis, sondern muss vielmehr als phasenhafte Kaskade multipler und komplexer Abläufe angesehen werden [6;140]. In diesem sequentiellen Zusammenwirken kann das Misslingen einer Phase zum Fehlschlagen des Metastasierungsprozesses führen. Um Ausgangspunkt einer Metastase sein zu können, muss eine Tumorzelle einer Vielzahl von potentiell lytischen Wirtsreaktionen entgehen. Experimentelle Studien haben gezeigt, dass nur etwa 0,05% der zirkulierenden Tumorzellen in der Lage sind, sich zu metastatischen Herden zu entwickeln [140].

Trotz interindividueller Unterschiede und der Heterogenität verschiedener Tumorentitäten [41] sind nachfolgend essentielle und relativ uniforme Phasen der Entstehung von Metastasen solider Malignome aufgeführt (vgl. Abbildung 7-2) [9;113].

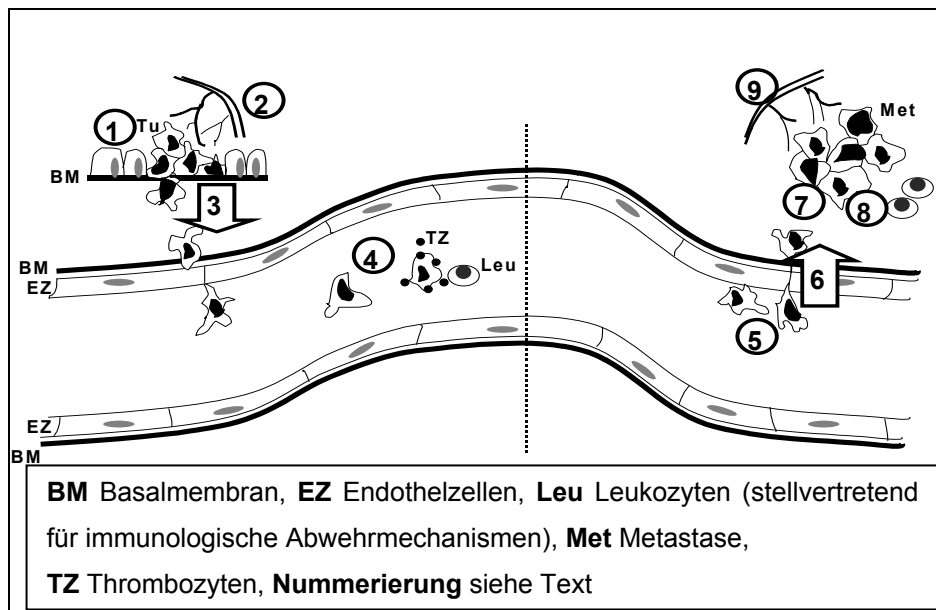


Abbildung 7-2 Allgemeines Schema der metastatischen Kaskade (nach [6, S. 5])

- (1) Nach der neoplastischen Transformation wird die Versorgung mit Bedarfsstoffen zur autonomen Proliferation zunächst durch Diffusion aus der Mikro-Umgebung des Organs gewährleistet.
- (2) und (9) Neovaskularisation und Angiogenese sind nötig, damit der Tumor eine Größe von 1 bis 2 mm Durchmesser überschreiten kann. Synthese und Sekretion verschiedener angiogenetischer Moleküle und die Suppression inhibitorischer Moleküle sind für die Ausbildung eines Kapillarnetzwerks in der Tumorumgebung verantwortlich.
- (3) Einige Tumorzellen können sich durch verminderte Expression von Kohäsionsmolekülen, verminderte homotype Zelladhäsion und verstärkte Motilität vom Primärtumor lösen. Die Invasion in das Stroma beruht auf mehreren parallelen Mechanismen. Kapillaren und dünnwandige Gefäße bieten der Penetration den geringsten Widerstand und stellen somit die häufigsten Eintrittsporten in die systemische Zirkulation dar.
- (4) Einzelne Tumorzellen oder Tumorzellaggregate lösen sich ab oder embolisieren, wobei die Mehrzahl der zirkulierenden Tumorzellen schnell durch spezifische und unspezifische, zelluläre und humorale Immunreaktionen zerstört wird.
- (5) Ein wesentlicher Schritt der Fernmetastasierung ist die Adhäsion von Tumorzellen an Endothelzellen in entfernten Organen oder Organabschnitten. Dabei handelt es sich um eine komplexe und spezifische Interaktion von Endothel- und Tumorzelle.
- (6) Einige Tumorzellen, vor allem Tumorzellaggregate, können im Lumen von Blutgefäßen proliferieren. Die überwiegende Mehrzahl vitaler Tumorzellen muss jedoch die Zirkulation durch ähnliche Mechanismen wie während der Invasion verlassen, um weiter überleben zu können.
- (7) Tumorzellen mit entsprechenden Oberflächenrezeptoren können auf parakrine Wachstumsfaktoren reagieren und im Organparenchym wachsen.
- (8) Die metastatischen Zellen müssen den spezifischen und unspezifischen Immunmechanismen der Wirtsabwehr entgehen.

7.1.2.3 Tumorzelladhäsion im malignen Prozess

Die Anzahl der zirkulierenden Tumorzellen und Tumoremboli korreliert mit der Größe der Tumormasse, deren Alter und den nekrotischen Arealen im Tumor, die zu Hämorrhagien prädisponieren und somit Eintrittspforten zur systemischen Zirkulation für Tumorzellen darstellen [140]. Jedoch korreliert die Zahl der zirkulierenden Tumorzellen keineswegs mit dem Risiko einer Metastasierung und hat kaum prädiktiven Wert in Bezug auf den klinischen Verlauf einer metastasierenden Erkrankung [39]. Daran, und an der Tatsache, dass die überwiegende Mehrzahl der zirkulierenden Tumorzellen zerstört wird, erkennt man, dass dem Organismus bis zu dieser Phase der Metastasierungskaskade (in Abbildung 7-2 links der gestrichelten Linie) durchaus effiziente Abwehrmechanismen zur Verminderung und Verhinderung einer Metastasierung zur Verfügung stehen.

Eine entscheidende Phase der Metastasierungskaskade ist die erfolgreiche Adhäsion der Tumorzelle im entfernten Kapillarbett, die nach heutigem Verständnis weniger als mechanisches Verfangen in kleinsten Gefäßen, als vielmehr spezifische Interaktion von Tumor- und Endothelzelle angesehen wird [104].

Während vieler Phasen der Metastasierungskaskade spielt entweder eine verstärkte oder eine verminderte Fähigkeit der Tumorzellen zur Adhäsion eine Rolle [6, S. 5]. Die Parallelen zum Migrationsverhalten von Leukozyten während Entzündungsreaktionen haben dazu beigetragen, viele der Prozesse und der Schlüssel-moleküle, die an der Tumordissemination beteiligt sind, zu identifizieren und charakterisieren [22;98;141].

7.1.2.4 Bedeutsame Adhäsionsmoleküle im Rahmen der Metastasierung

Um sich zunächst vom Primärtumor zu separieren, müssen Tumorzellen ihren homotypen Zell-Zell-Verband lösen, der bei epithelialen Tumoren vor allem über Vertreter der Cadherine vermittelt wird, insbesondere der E-Cadherine [98, S. 214 f.]. Migration wird unter anderem durch Interaktion der mobilen Tumorzelle mit Substraten der extrazellulären Matrix ermöglicht. Integrine sind die wichtigsten Vertreter von Adhäsionsmolekülen, die an dieser Zell-Substrat-Interaktion beteiligt sind [116;118]. Von besonderem Interesse sind heterophile Zell-Zell-Wechselwirkungen, wozu auch die Adhäsion von Tumorzellen an Endothelzellen zählt. Die in diesem Zusammenhang bedeutsame Familie der Selektine und das Antigen CD44 sollen im Folgenden vorgestellt werden.

7.1.2.4.1 Die Selektine

Im Gegensatz zu den meisten anderen Adhäsionsmolekülen, die andere Proteine binden, sind die Liganden der Selektine Kohlenhydrate [44;45;98]. Sie wurden initial auf der Oberfläche von Thrombozyten, Leukozyten und Endothelzellen identifiziert und demnach als P-, L- bzw. E-Selektin bezeichnet. Die Lektin-Domäne befindet sich am distalen Ende des extrazellulären Anteils des Moleküls und bindet calciumabhängig Sialyl Lewis_x, welches auf Neutrophilen und Monozyten exprimiert wird. Während einer Entzündungsreaktion wird die E-Selektin Expression induziert und ist für die frühe, initiale Kontaktaufnahme von Leukozyten und Endothelzellen verantwortlich [124]. Die niedrigaffine Bindung initiiert das sogenannte „rolling“, welches dann von Adhäsion und Extravasation gefolgt wird.

Die Parallelen der Leukozytenrekrutierung und der Metastasierungskaskade sind offensichtlich. Sialyl Lewis_x und dessen Isoform Sialyl Lewis_a können auf vielen Tumorzellen nachgewiesen werden [46] und binden nachweislich über diesen Mechanismus an Endothelzellen [137]. Darüber hinaus zeigt sich, dass die Expression von Sialyl Lewis_x mit dem klinischen Verlauf und dem metastatischen Potential bestimmter Tumore korreliert [79].

7.1.2.4.2 CD44 (Hermes Antigen, H-CAM, pgp-1 Antigen, ECM III)

Dieses Antigen ist ein weit verbreitetes, stark glykosyliertes, integrales Membranprotein, das in einer Vielzahl von Isoformen mit unterschiedlichen Molekulargewichten existiert. Das 90 kD Protein befindet sich vor allem auf Leukozyten und ist am Prozess des sogenannten „leukocyte homings“ beteiligt. Die größere Isoform von ca. 160 kD ist vor allem auf endothelialen und mesenchymalen Zellen zu finden und fungiert als Rezeptor für Hyaluronsäure. Obwohl die physiologische Rolle dieser Adhäsionsmoleküle als auch die Bedeutung des CD44 am malignen Prozess noch unvollständig verstanden sind, existieren vielfache Hinweise auf eine Beteiligung dieser Adhäsionsmoleküle an der Tumorprogression und Metastasierung. So exprimieren metastasierende Zellen CD44 in signifikant höherem Maße als nicht-disseminierende Tumorzellen und Normalgewebe, und die verschiedenen Molekulargewichte der Isoformen haben Einfluss auf das Metastasierungsverhalten [6, S. 12].

7.1.2.4.3 Andere Zelladhäsionsmoleküle

Neben den angesprochenen Adhäsionsmolekülen existieren selbstverständlich weitere Moleküle, denen potentiell bedeutsame Funktionen im Rahmen der Tumordissemination zugeschrieben werden. Beispielhaft können an dieser Stelle die Immunglobulin-Superfamilie oder das 67-69 kD Laminin-Elastin bindende Protein genannt werden. Auf eine ausführliche Darstellung muss in diesem Zusammenhang verzichtet werden.

7.1.3 Zytokine im malignen Prozess

Die Mikroumgebung epithelialer Tumoren ist ein komplexes Organisationsgefüge, das unter anderem aus neoplastischen Zellen, Endothelzellen und infiltrierenden Leukozyten besteht. Dabei wird die Kommunikation zwischen diesen individuellen Zelltypen maßgeblich über Zytokine vermittelt [92;144] und somit auch die Regulation der spezifischen endothelialen Tumorzelladhäsion entscheidend beeinflusst.

7.1.3.1 Übersicht der Zytokine

Zytokine werden sowohl von hämatogenen als auch von nicht-hämatogenen Zellen synthetisiert, exprimiert und sezerniert und sind zentrale, hormonähnliche [42] Regulatoren immunologischer, entzündlicher und infektiöser Prozesse [57]. Sie können autokrin, parakrin und endokrin wirken, und zeichnen sich durch einen beachtlichen Pleiotropismus bezüglich ihrer Zielzellen und eine ausgesprochene Redundanz bezüglich ihrer individuellen Wirkung aus. Im Allgemeinen sind Zytokine lösliche Proteine oder Glykoproteine mit Molekulargewichten in der Größenordnung von 15.000 bis 40.000 D. Sie sind häufig glykosyliert, obwohl diese Glykosylierung scheinbar keinen wesentlichen Einfluss auf deren Funktion zu haben scheint. Im Gegensatz zu klassischen Hormonen werden Zytokine nicht präformiert in Vesikeln gespeichert. Stattdessen induzieren entsprechende Signale aktive Gen-Transkription und Translation [92].

Aufgrund der forschungsgeschichtlich bedingten Komplexität der Nomenklatur unterscheidet eine empirische Klassifikation pragmatisch drei wesentliche Gruppen:

- (1) Immunmodulatorische Zytokine, die Aktivierung, Wachstum und Differenzierung von Lymphozyten und Monozyten regulieren (z.B. IL-2, IL-4, IL-10, $\text{INF}\gamma$, $\text{TGF}\beta$)
- (2) Zytokine, die das Wachstum und die Reifung unreifer Leukozyten regulieren (z.B. IL-3, IL-7, GM-CSF)
- (3) Proinflammatorische Zytokine werden vornehmlich von mononukleären Zellen produziert und können weiter unterteilt werden in Lymphokine (z.B. IL-1 β , $\text{TNF}\alpha$, IL-6), Chemokine (z.B. IL-8, MCP 1-3, MIP-1 α/β , RANTES) etc.. Diese Gruppe spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation der endothelialen Tumorzelladhäsion.

7.1.3.2 Wichtige proinflammatorische Zytokine

7.1.3.2.1 Interleukin-1 (IL-1)

Die zwei Formen IL-1 α und IL-1 β sind Produkte unterschiedlicher Gene [31]. Trotz der unterschiedlichen Aminosäuresequenz mit etwa 25% Homologität, sind sie dreidimensional strukturell verwandt, wirken über die gleichen Oberflächenrezeptoren und haben somit Gemeinsamkeiten bezüglich der biologischen Wirkung. IL-1 wird rasch in Antwort auf mikrobielle Produkte oder Entzündung von mononukleären Zellen synthetisiert, insbesondere von monozytären Phagozyten und Endothelzellen, aber auch von vielen anderen Zelltypen [92, S. 119]. Das große Vorläufermolekül von 31.000 D wird entweder durch eine spezifische intrazelluläre Cysteinprotease (Interleukin-1 concerting enzyme- ICE) oder durch extrazelluläre Proteasen zur reifen Form von 17.500 D gespalten. Der Teil des IL-1 verbleibt in seiner Vorläuferform im Zytosol und fungiert als autokrines Hormon. IL-1 α wird vornehmlich auf der Zelloberfläche membrangebunden exprimiert und wirkt als parakriner Botenstoff auf benachbarte Zellen [92], wohingegen ein beachtlicher Teil des IL-1 β durch Exozytose aus Vesikeln, aktiven Transport über MDR- Proteine oder Zelltod in den Extrazellularraum und die Zirkulation abgegeben wird. Die Halbwertszeit beträgt nur 6 Minuten [31]. IL-1 aktiviert seinen Rezeptor auf vielfältigen Zellen, u.a. Lymphozyten, Makrophagen, Endothelzellen, glatte Gefäßmuskelzellen, Fibroblasten und Chondrozyten [30]. Zwei distinkte Rezeptortypen für IL-1 wurden identifiziert und

kloniert. Die Signaltransduktion erfolgt über den IL-1 Rezeptortyp I, einem 80 kD Transmembran-Protein. Der IL-1 Rezeptortyp II besitzt nur eine relativ kurze zytoplasmatische Domäne ohne Signalfunktion und existiert auch als lösliche Form. Die biologische Wirkung des IL-1 ist der des $\text{TNF}\alpha$ (vgl. 7.1.3.2.2) ähnlich [114]. An Endothelzellen induziert IL-1 neben der Synthese von beispielsweise NO, PAF und Prostaglandin E insbesondere die Expression von spezifischen Adhäsionsmolekülen [26;92].

7.1.3.2.2 Tumor Nekrose Faktor α ($\text{TNF}\alpha$)

$\text{TNF}\alpha$ ist ein früher Mediator der Immunantwort und wird bereits durch Mechanismen der nicht antigenspezifischen Immunantwort aktiviert. Innerhalb einer Stunde nach entsprechendem Reiz, wie etwa Endotoxin, können Blutkonzentrationen von über 1000 pg/ml beim Menschen beobachtet werden [92, S. 118]. Die Halbwertszeit beträgt weniger als 20 Minuten. Die $\text{TNF}\alpha$ Synthese findet vorwiegend in Monozyten/Makrophagen, T-Lymphozyten und Endothelzellen statt, jedoch sind ähnlich wie beim IL-1 β eine Vielzahl anderer Zelltypen dazu in der Lage. $\text{TNF}\alpha$ und das verwandte Lymphotoxin- α [112], welches ausschließlich von Lymphozyten und NK-Zellen synthetisiert wird, zählen zur TNF-Liganden Familie, die mindestens 10 bekannte Mitglieder umfasst. Alle Mitglieder der TNF-Liganden Familie bestehen aus drei Polypeptidketten, die mit Ausnahme des Lymphotoxin- β aus drei identischen Untereinheiten bestehen. Im Gegensatz zu den anderen TNF-Liganden, die als Transmembran-Proteine vor allem über Zell-Zell-Kontakt wirken, wird Lymphotoxin- α vollständig und $\text{TNF}\alpha$ größtenteils sezerniert [15]. Während die anderen Mitglieder der TNF-Liganden Familie jeweils an ihren spezifischen Rezeptor binden, besitzen $\text{TNF}\alpha$ und Lymphotoxin- α gleiche Affinität zu zwei Rezeptoren mit 55 kD und 75 kD, die praktisch auf allen Zellen nachweisbar sind. Die Beeinflussung der Tumorzelladhäsion über Regulation des Expressionsmusters von endothelialen Adhäsionsmolekülen ist der Wirkung des IL-1 ähnlich [114].

7.1.4 Rationale: Fokussierung auf die endotheliale Tumorzelladhäsion

- (1) Das Vorliegen und das Ausmaß einer Metastasierung bestimmt maßgeblich die Prognose von Patienten mit malignen Grunderkrankungen.
- (2) Das Misslingen einer Phase der Metastasierungskaskade kann zum Scheitern der Metastasierung führen.
- (3) Bis zur Adhäsion von Zellen solider, maligner Neoplasien im entfernten Kapillarbett, stehen dem Organismus durchaus effiziente Abwehrmechanismen zur Verfügung.
- (4) Die spezifische Wechselwirkung von Tumorzelle und endothelialen Adhäsionsmolekülen ist entscheidend für die Metastasierung.
- (5) Eine frühe Kontaktaufnahme der Tumorzelle im entfernten Kapillarbett wird über die Familie der Selektine vermittelt.
- (6) Proinflammatorische Zytokine beeinflussen maßgeblich die Interaktion von Endothel- und Tumorzelle.

7.2 Diskussion der experimentellen Ergebnisse

7.2.1 Wirkung von Zytokinen auf die Interaktion zwischen Endothel und Tumorzelle

Metastasierung ist ein hochorganisierter und organspezifischer Prozess multipler, sequentieller Abläufe [110]. Während der hämatogenen Phase der Tumorzell dissemination wird die erforderliche Tumorzelladhäsion an vaskuläres Endothel durch ähnliche Mechanismen reguliert, wie während der Rekrutierung von Leukozyten. Die initialen Interaktionen umfassen den mechanischen Kontakt und die temporäre Anheftung der Tumorzellen [39;108]. Die Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle wird maßgeblich durch proinflammatorische Zytokine moduliert [92;26].

7.2.1.1 Proinflammatorische Zytokine IL-1 β und TNF α stimulieren die endotheliale Tumorzelladhäsion

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass proinflammatorische Zytokine die Adhäsion von Tumorzellen an Endothel stimulieren. Im in-vitro Adhäsionsversuch konnten durch IL-1 β und TNF α die adhäsiven Eigenschaften von humanen Endothelzellen gesteigert werden und eine verstärkte Anheftung von Pankreasadeno-Karzinomzellen beobachtet werden (siehe Abbildung 6-1).

Gesteigerte Adhäsion von nicht-hämatologischen und hämatologischen Tumorzellen an proinflammatorisch stimuliertes Endothel kann sowohl in-vitro als auch in-vivo demonstriert werden. So binden Colon-Karzinomzellen Colo 201 und humane Leukämiezellen HL60 verstärkt an IL-1 β und TNF α stimuliertes Endothel [131]. IL-1 β steigert die Adhäsionskräfte zwischen Endothelzellen und humanen Leukämiezellen HL60 in-vitro [130]. In-vivo wird häufig Tumorzellwachstum in entzündlich verändertem Gewebe beobachtet. Im Tierversuch verstärkt die systemische Gabe sowohl von IL-1 β , als auch LPS die Adhäsion von intrasplenal applizierten B16 Melanomzellen an hepatisches Sinusoidalepithel [136].

7.2.1.2 Stimulation mit IL-8 steigert nicht die endotheliale Tumorzelladhäsion

Im Gegensatz zu den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 β und TNF α konnte durch endotheliale Stimulation mit IL-8 im in-vitro Adhäsionsversuch keine Steigerung der Tumorzelladhäsion beobachtet werden (siehe Abbildung 6-1).

Zwar zählt auch IL-8 zu den proinflammatorischen Zytokinen, doch hat es eine andere pathophysiologische Funktion. Es wirkt als Chemokin auf neutrophile Granulozyten und wird von Endothelzellen produziert. Induktionssignale sind unter anderem der membrane attack complex des Complement Systems [70] oder mikrobielle Reize wie *Borrelia burgdorferi* [21]. Einige Tumorzelllinien sind zur IL-8 Synthese in der Lage [34, S. 260]. Für Pankreastumoren konnte gezeigt werden, dass IL-8 als autokriner Wachstumsfaktor fungiert und über eine verstärkte Expression von tumorassoziierten Oberflächenantigenen wie Sialyl Lewis_a die Adhäsion an stimuliertes Endothel verstärkt [102]. Eine direkte Wirkung von IL-8 auf Endothelzellen, die mit einer gesteigerten Tumorzelladhäsion einhergeht, ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit in der Literatur nicht beschrieben.

7.2.1.3 E-Selektin vermittelt maßgeblich die zytokinstimulierte Tumorzelladhäsion

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass die gesteigerte Tumorzelladhäsion an zytokinstimuliertes Endothel inhibiert werden kann. Monoklonale Antikörper sowohl gegen das endotheliale Adhäsionsmolekül E-Selektin als auch gegen dessen tumorassoziierten Liganden Sialyl Lewis_a (CA 19-9) verminderten im in-vitro Adhäsionsversuch die adhäsionsstimulierende Wirkung von IL-1 β und TNF α (Abbildung 6-3). Die beteiligten Oberflächenmoleküle waren durchflusszytometrisch auf den entsprechenden Zellen nachweisbar (Abbildung 6-17 und Tabelle 6-1).

Analog zur inflammatorischen Rekrutierung von Leukozyten [109;128] kann die Bedeutung endothelialer Adhäsionsmoleküle für die spezifische Anheftung von Tumorzellen an Endothel im Rahmen der hämatogenen Metastasierung in-vitro und in-vivo gezeigt werden. Stimulation von kultivierten Endothelzellen sowohl durch proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β und TNF α , als auch LPS steigern die Expression nahezu aller Adhäsionsmoleküle [72]. Während der initialen Adhäsion spielt die Familie der Selektine eine herausragende Rolle [132]. So konnte durch Verwendung eines Mikropipetten Einzelzell-Manipulationssystems gezeigt werden, dass die Zunahme der Adhäsionskräfte zwischen HL-60 Zellen und IL-1 β stimuliertem Endothel auf verstärkte E-Selektin Expression zurückgeführt werden kann, in Abgrenzung gegenüber den ebenfalls verstärkt exprimierten Adhäsionsmolekülen ICAM-1 und VCAM-1 [130]. In Übereinstimmung mit den Daten dieser Arbeit kann die endotheliale Adhäsion von sowohl hämatogenen als auch

nicht-hämatogenen Tumorzelllinien durch monoklonale Antikörper gegen E-Selektin und seine Liganden inhibiert werden [131, S. 715].

Die Liganden des E-Selektins (ELAM-1) sind fukosylierte Kohlenhydrate und finden sich als Sialyl Lewis_x und dessen Isoform Sialyl Lewis_a auf vielen Tumorzellen [46]. Erhöhte Serumwerte der löslichen Form des Sialyl Lewis_a können in der klinischen Routine unter der Bezeichnung CA 19-9 bei malignen und nicht-malignen Prozessen verschiedener Organe, unter anderem des Pankreas und des Colons beobachtet werden und sind als Tumormarker von Bedeutung [94].

Tatsächlich scheinen E-Selektin und seine Liganden bei der Pathogenese des metastasierenden Pankreaskarzinoms eine herausragende Rolle zu spielen. Analog den Ergebnissen dieser Arbeit kann ex-vivo eine IL-1 β und TNF α stimulierte Adhäsion nur für Pankreas-Adenokarzinomzellen gezeigt werden, die Sialyl Lewis Antigene exprimieren. Monoklonale Antikörper gegen E-Selektin und Sialyl Lewis_a, nicht jedoch gegen Sialyl Lewis_x, blockieren die stimulierte Adhäsion in-vitro [62].

Im Tiermodell kann durch LPS Applikation induzierte hohe TNF α Plasmaspiegel eine verstärkte Adhäsion von intrasplenal injizierten Pankreaskarzinomzellen an hepatisches Sinusoidalendothel beobachtet werden, welches vermehrt E-Selektin exprimiert. Dabei korreliert das Ausmaß der stimulierten Tumorzelladhäsion mit der Dichte der Expression von Sialyl Lewis_x [106].

In SCID Mäusen kann durch die Gabe monoklonaler Antikörper gegen Sialyl Lewis_a und Sialyl Lewis_x eine verminderte Bildung und ein langsames Wachstum von Lebermetastasen beobachtet werden. Die Diskrepanz bezüglich der Wirkung des monoklonalen Antikörpers gegen Sialyl Lewis_x in-vitro und in-vivo, als auch dessen Wirksamkeit bei Verwendung der Pankreaskarzinom-Zelllinie PCI-6, die keines der Sialyl Lewis Antigene exprimiert, lässt in-vivo Funktionen dieser tumorassoziierten Antigene vermuten, die über ausschließliche Tumorzelladhäsion an Endothel hinauszugehen scheinen [68].

Aufgrund seiner herausragenden Bedeutung für die Tumorzelladhäsion generell und im Besonderen für das Pankreaskarzinom rückte E-Selektin in den Fokus dieser Arbeit und wurde als Surrogatmarker für endotheliale Adhäsionsmolekülexpression verwendet.

7.2.1.4 Charakterisierung der zytokininduzierten Expression von E-Selektin

7.2.1.4.1 Methodik der E-Selektin Bestimmung in der Durchflusszytometrie

Erkenntnisse dieser Arbeit beruhen unter anderem auf dem durchflusszytometrisch bestimmten Nachweis von E-Selektin auf Endothelzellen. Um aussagekräftige Messungen zu gewährleisten, orientierte sich die Methodik an Erfahrungen und Empfehlungen aus der wissenschaftlichen Literatur:

- (1) Aufgrund der Beobachtung, dass das Ausmaß der Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen mit steigender Anzahl der Passagen signifikant abnimmt [72], beruhen die Daten dieser Arbeit ausschließlich auf HUVEC Populationen zwischen der dritten und zehnten Passage.
- (2) Es wurden ausschließlich Zellen einer Charge verwendet.
- (3) Um die enzymatische Destruktion von Oberflächenmolekülen auf ein Minimum zu beschränken und die Zellintegrität bestmöglich zu erhalten, wurden die für diese Zwecke empfohlenen Trypsinierungszeiten [50] deutlich unterschritten.

7.2.1.4.2 Ruhende Endothelzellen exprimieren kein E-Selektin

Durchflusszytometrisch konnte auf nicht-stimulierten Endothelzellen keine E-Selektin Expression nachgewiesen werden (Abbildung 6-18 und Abbildung 6-19). Dies korrelierte mit dem fehlenden Nachweis von mRNA für E-Selektin in der Northern Blot Analyse nativer HUVEC (Abbildung 6-31).

Es bestätigt sich, dass E-Selektin auf ruhenden Endothelzellen nicht konstitutiv exprimiert wird [17]. Dem widerspricht nicht die Beobachtung, dass subkonfluent wachsende Endothelzellkulturen ebenso wie proliferierende Endothelzellen in-vivo verstärkt E-Selektin exprimieren können [77].

7.2.1.4.3 IL-1 β ist TNF α bezüglich der Stimulation von Tumorzelladhäsion und E-Selektin Expression überlegen

Die Daten dieser Arbeit zeigten, dass die proinflammatorischen Zytokine TNF α und IL-1 β sowohl die Tumorzelladhäsion, als auch die Expression von E-Selektin auf Endothelzellen induzieren. Diesbezüglich scheint die Wirkung des IL-1 β bei gleicher Dosierung ausgeprägter zu sein, als die des TNF α (Abbildung 6-1, Abbildung 6-2 und Abbildung 6-18).

Ray et al bestätigen diese Beobachtung mit einer eleganten Versuchsanordnung [115]: Durch stabile Transfektion eines Reporter-Gens, bestehend aus der zytokinresponsiven Region des E-Selektin Gens und dem der alkalischen Phosphatase in A549 Zellen, konnten ED 50 Werte für IL-1 β und TNF α von 3 pM beziehungsweise 1000 pM bestimmt werden.

Die funktionelle Relevanz der ungleichen Potenz dieser Zytokine bezüglich der Induktion der E-Selektin Expression kam in dieser Arbeit in der unterschiedlichen Auswirkung der Stimulation der Tumorzelladhäsion im in-vitro Adhäsionsversuch zum Ausdruck.

In der Northern Blot Analyse IL-1 β stimulierter HUVEC gelang der Nachweis von E-Selektin mRNA (Abbildung 6-31). Vor dem Hintergrund der Zytokinwirkung über aktivierte Gentranskription wird die nötige Inkubationszeit verständlich.

7.2.1.4.4 Kinetik der E-Selektin Expression auf IL-1 β stimulierten HUVEC

Es konnte demonstriert werden, dass durch Verlängerung der IL-1 β und TNF α Inkubationszeiten die endotheliale Tumorzelladhäsion bis zu einem Plateau bei vier Stunden zunimmt (Abbildung 6-2). Dies korrelierte mit der gezeigten Kinetik der E-Selektin Expression auf IL-1 β stimulierten HUVEC (Abbildung 6-22 und Abbildung 6-23). Durch semiquantitative Bestimmung der Expressionsstärke von E-Selektin auf HUVEC in Abhängigkeit von der Dauer der IL-1 β Stimulation konnte bei fehlender Basalexpression bereits nach einer Stunde ein Anstieg beobachtet werden. Einer Maximalexpression nach vier bis sechs Stunden folgte eine kontinuierliche Abnahme der Expression von E-Selektin ohne allerdings den Ausgangswert zu erreichen.

Einer Zelle stehen zwei grundsätzliche Mechanismen zur Verfügung, die Dichte regulatorischer Proteine, wie Rezeptoren oder Adhäsionsmoleküle, auf ihrer Oberfläche zu reduzieren: „down-regulation“ und „down-modulation“ [29]. Erstere ist durch ligandenabhängige Endozytose und lysosomalen Abbau gekennzeichnet, wohingegen bei Letzterer Zielmoleküle durch spezifische Endoproteasen direkt auf der Zelloberfläche degradiert werden. Makromolekulare Portionen der Substratproteine werden als biologisch aktive Ektodomänen von der Zelloberfläche abgestoßen, ein Prozess der als „shedding“ bezeichnet wird. Untersuchungen an Primärzellkulturen boviner Aortenendothelzellen zeigen nahezu eine identische Kinetik der E-Selektin Expression nach TNF α Stimulation, sowohl in der Durchflusszytometrie, als auch in der reversen Transkription Polymerasen-

Kettenreaktion [134]. Durch den Nachweis von E-Selektin in den Kulturüberständen kann die abnehmende Adhäsionsmolekül-Expression durch den Vorgang des „Sheddings“ erklärt werden.

7.2.1.4.5 E-Selektin Expression korreliert mit der Zytokin- Dosierung

Die Daten dieser Arbeit zeigten, dass mit steigender Dosierung des Zytokins die Expression von E-Selektin auf Endothelzellen zunahm (Abbildung 6-19 und Abbildung 6-20). Dabei war die Zunahme der Expression bei IL-1 β Konzentrationen bis 200 pg/ml am ausgeprägtesten und verlief anschließend in einer flacheren Kurve bis 1000 pg/ml. Die funktionelle Relevanz der Expressionsdichte des E-Selektin wurde in der zunehmenden Tumorzelladhäsion mit steigenden Stimulationskonzentrationen von IL-1 β und TNF α deutlich. Analog der durchflusszytometrischen Resultate konnten Dosierungen über 1000 pg/ml (Abbildung 6-2) und Costimulation der Zytokine die Tumorzelladhäsion nicht weiter signifikant steigern (Abbildung 6-1).

7.2.1.4.6 Biologisch wirksame Zytokinkonzentrationen in-vivo

Die Interpretation biologisch wirksamer Zytokin-Konzentrationen in-vivo ist komplex. Methodisch einfache Messungen der zirkulierenden Zytokin-Konzentrationen unterliegen vielfältigen Einflussfaktoren, und die Angaben in der wissenschaftlichen Literatur divergieren auffallend. So werden in einer Studie bei gesunden Probanden Plasmakonzentrationen für IL-1 β und TNF α von nur 0,04 pg/ml und 1,0 pg/ml angegeben, die sich durch körperliche Anstrengung auf maximal 0,59 pg/ml und 1,9 pg/ml steigern lassen [103, S 1501 f.]. Hingegen werden in einer anderen Studie IL-1 β und TNF α Plasmakonzentrationen einer gesunden, älteren Kontrollgruppe von $183,4 \pm 24,4$ pg/ml und $9,47 \pm 2,64$ pg/ml beobachtet [7]. Durch einen intravenösen Bolus von 2 ng/kg Endotoxin können bei gesunden männlichen Probanden sogar zirkulierende TNF α Konzentrationen von über 1000 pg/ml gemessen werden [92, S. 118].

7.2.1.4.7 Einfluss der malignen Grunderkrankung auf das Zytokinprofil in-vivo

Der Einfluss maligner Erkrankungen auf das Zytokinprofil ist vielschichtig und die wissenschaftliche Literatur diesbezüglich dementsprechend unübersichtlich. So werden in einer Studie zum Magenkarzinom für IL-1 β und IL-6 sechsfach erhöhte, für TNF α jedoch auf ein Drittel erniedrigte Serumwerte angegeben, verglichen mit einer altersentsprechenden Kontrollgruppe [65]. In einer Studie zum Mammakarzinom ist jedoch der Serumwert für TNF α im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht [121]. Eine unzureichende Repräsentation der vorwiegend lokalen Zytokinwirkung durch die Plasmakonzentration könnte in Anbetracht der kurzen Halbwertszeiten von 6 und 20 Minuten für IL-1 β und TNF α eine Erklärung dieser divergierenden Beobachtungen sein. Etablierte Erkenntnisse gehen von einer verstärkten Zytokinaktivität im malignen Prozess aus. Die Wirkung der Zytokine IL-1 β , TNF α und IL-6 sind ausschlaggebend an der Pathogenese malignomassoziierter Symptome wie der Tumorkachexie beteiligt [69]. Obwohl im Serum kachektischer Patienten mit nicht-resezierbarem Pankreaskarzinom keine erhöhten TNF α Werte zu messen sind, produzieren deren mononukleäre Blutzellen verstärkt TNF α und IL-6 verglichen mit einer altersentsprechenden Kontrollgruppe [35]. Eine Studie des British Journal of Cancer belegt eindrucksvoll den Einfluss von IL-1 β auf das Überleben von Malignompatienten. Patienten mit Pankreaskarzinom, die einen spezifischen Polymorphismus für das IL-1 β Gen tragen (homozygot für Allel 2), der mit gesteigerter IL-1 β Produktion einhergeht, haben ein signifikant verkürztes Überleben [12].

7.2.1.4.8 Adhäsionsmolekülexpression auf malignomassozierten Endothelzellen

Die Datenlage zur Adhäsionsmolekülexpression auf malignomassozierten Endothelzellen als möglicher biologischer Effekt lokaler Zytokinwirkung ist komplex. Unter der Vorstellung der erleichterten Tumorzeldissemination erwartet man in den Kapillaren des Primärtumors ein reduziertes Adhäsionspotential, was sich auch in Studien mittels Immunhistochemie [81] und Durchflusszytometrie [53] bestätigt hat [145]. Andere Studien dokumentieren aber mittels Immunhistochemie eine verstärkte Adhäsionsmolekülexpression vom entzündlichen Typ auf Kapillarendothel des Bronchialkarzinoms [127], des Mammakarzinoms [43] und des kolorektalen Karzinoms [147]. Interpretationsschwierigkeiten ergeben sich zusätzlich aus oben

angesprochener (vgl. 7.2.1.4.1 und 7.2.1.4.2) Abhängigkeit der Adhäsionsmolekülexpression vom Zellzyklus der Endothelzelle [77] und von der Angiogenese [53;97]. Eine differenzierte Quantifizierung endothelialer Adhäsionsmoleküle gelingt durch Verwendung dual-radiomarkierter, monoklonaler Antikörper. Im Mausmodell ist die konstitutionelle E-Selektin Expression auf Endothelzellen innerhalb des experimentellen Tumors (RM-1, myc-transformiertes murines Prostatakarzinom) höher als in den peripheren Gefäßarealen. Dagegen entspricht die Expression von ICAM-1, VCAM-1 und P-Selektin am Tumorendothel derjenigen in der Peripherie, kann jedoch durch $\text{TNF}\alpha$ verstärkt induziert werden. Durch $\text{TNF}\alpha$ Gabe kommt es am Endothel innerhalb des Tumors zu einer dramatisch reduzierten Expression von PECAM-1 und ICAM-2. Die bereits konstitutionell gesteigerte Expression von E-Selektin am Tumorendothel wird durch die $\text{TNF}\alpha$ Gabe nicht beeinflusst [84, S. H 1164].

Diese Beobachtungen am Endothel eines Primärtumors können nicht zwingend auf das Endothel einer sich bildenden Metastase übertragen werden und die effektive Zytokinaktivität am Ort der metastatischen Tumorzelladhäsion ist nicht bekannt. Um jedoch die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zytokinkonzentrationen in Relation zu potentiellen in-vivo Bedingungen setzen zu können, kann man analog zu gemessenen Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine am Ort des Geschehens, beispielsweise in arthritischen Gelenkspunktaten, von erheblich höheren lokalen Zytokinaktivitäten ausgehen, als die systemische Bestimmung vermuten lässt. Somit sind selbst zunächst hoch erscheinende $\text{IL-1}\beta$ Konzentrationen bis zu 1000 pg/ml zur maximalen Endothelzell-Stimulation durchaus denkbar.

7.2.2 Wirkung von Heparinen auf die zytokinstimulierte Interaktion zwischen Endothel und Tumorzelle

Um die in Studien gezeigte spezifische Prognoseverbesserung bei Malignompatienten unter Heparintherapie erklären zu können, werden eine Vielzahl von Hypothesen diskutiert, die mögliche Interferenzen mit malignen Prozessen zugrundelegen, wie der Karzinogenese, dem Tumorwachstum, der Angiogenese, der Tumorzelladhäsion, der Invasion, der Metastasierung und antineoplastischen Faktoren, deren Relevanz aber unklar sind (vgl. Tabelle 7-1). Die signifikante Überlegenheit fraktionierter gegenüber unfraktionierten Heparinen bei vergleichbarer antikoagulativer Wirkung ist derzeit schwer zu erklären [122].

Möglicherweise vorteilhafte Eigenschaften niedermolekularer Heparine vor dem Hintergrund einer malignen Grunderkrankung sind in Tabelle 7-2 (nach [107]) zusammengestellt:

Verglichen mit UFH, zeigt LMWH ...	Mögliche Vorteile einer LMWH Therapie bei Malignompatienten gegenüber UFH
...eine stärker ausgeprägte inhibitorische Wirkung auf bFGF-induzierte Proliferation von Kolonkarzinomzellen	Potentere Antitumor-Wirkung
...weniger ausgeprägte Thrombozyten-aktivierende Eigenschaften	Geringere Synthese von Thrombin und anderen Wachstumsfaktoren
...eine geringer ausgeprägte Erhöhung der vaskulären Permeabilität	Geringere Tumorzell- Extravasation
...geringere Wechselwirkungen mit Plasmaproteinen	Gut vorhersagbare Pharmakokinetik
...eine geringere Affinität zu Von-Willebrand Faktor	Geringere Blutungskomplikationen
...eine geringere Interferenz mit PF-4	Geringere Inzidenz von Heparin-induzierter Thrombozytopenie und Thrombose
...geringere Osteoklasten-aktivierende Eigenschaften	Potentiell weniger Osteopenie/-porose bei Langzeitanwendung
...eine ausgeprägte Stimulation der Megakaryopoese	Potentiell gemilderte Chemotherapie-induzierte Thrombozytopenie

Tabelle 7-2 Möglicherweise vorteilhafte Eigenschaften von fraktionierten Heparinen bei malignen Grunderkrankungen

Die möglichen Wirkmechanismen von unfraktionierten und fraktionierten Heparinen, die endotheliale Tumorzelladhäsion und deren Stimulation durch proinflammatorische Zytokine zu inhibieren, wurden in dieser Arbeit untersucht.

7.2.2.1 Unfraktionierte und fraktionierte Heparine können nicht die spezifische Bindung von endothelialen Adhäsionsmolekülen und Tumorantigenen kompetitiv hemmen

Es ist vorstellbar, dass Heparine aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften Affinität zu kohlenhydratbindenden Adhäsionsmolekülen besitzen und, durch Konkurrenz mit Tumorantigenen um Bindung an die Familie der Selektine, die Tumorzelladhäsion kompetitiv hemmen.

Die Daten dieser Arbeit zeigten, dass weder unfraktionierte noch fraktionierte Heparine, selbst in hoher Konzentration, im in-vitro Adhäsionsversuch die Adhäsion von verschiedenen Pankreaskarzinom-Zelllinien an unstimuliertes oder stimuliertes Endothel signifikant vermindern können (siehe Abbildung 6-4, Abbildung 6-5, Abbildung 6-5 und Abbildung 6-6).

Das grundsätzliche Wirkprinzip hingegen belegen Studien zur Leukozyten- und Tumorzelladhäsion. Eine etablierte Vorstellung geht davon aus, dass eine intakte Benetzung der luminalen Gefäßwand durch das Glykosaminoglykan Heparansulfat, ein endogenes Heparinanalogen, eine physiologische Limitierung der endothelialen Leukozytenadhäsion darstellt [48]. Sowohl unfraktioniertes als auch fraktioniertes Heparin und ein O-desulfatiertes Derivat ohne antikoagulative Eigenschaften vermindern in-vitro die Adhäsion von unstimulierten polymorphonukleären Leukozyten an IL-1 β , TNF α und LPS stimulierte HUVEC [88]. Ebenso binden Heparin und seine Oligosaccharid- Spaltprodukte, inklusive eines nicht-antikoagulativen Tetrasaccharids, in einem Kompetitions- ELISA an P- und L-Selektin, hemmen die Leukozytenadhäsion an P-Selektin-exprimierende COS Zellen und vermindern die Adhäsion von Kolonkarzinomzellen an P- und L-Selektin. Außerdem kann bei Thioglykolat-behandelten Mäusen, als Tiermodell einer akuten Entzündung, die Leukozytenemigration in die Peritonealhöhle durch intravenöse Gabe von Heparin-Tetrasacchariden vermindert werden. Zwar zeigt keines der verwendeten Glykosaminoglykane Affinität zu E-Selektin [73;105], doch kann P-Selektin in Weibel-Palade-Körper der Endothelzellen [27] und nach Stimulation auf deren Zelloberfläche nachgewiesen werden [84]. Die Affinität für P- und L-Selektin korreliert mit der Kettenlänge der verwendeten Oligosaccharide [105, S. 3256] und könnte in diesem Zusammenhang die Überlegenheit des fraktionierten gegenüber dem unfraktionierten Heparin bei der begleitenden Therapie maligner Erkrankungen nicht erklären. Die Berücksichtigung der unterschiedlichen Bioverfügbarkeiten

wiederum offenbart beispielhaft die Komplexität der Interpretation von in-vitro Daten für in-vivo Bedingungen.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit kann die endotheliale Adhäsion von Melanomzellen B16-BL6 durch Verwendung zweier chemisch modifizierter Heparine mit geringfügigen antikoagulativen Eigenschaften (VLMW-H und Succ100-LMW-H) weder in-vitro noch in-vivo signifikant reduziert werden [120]. Vor dem Hintergrund der dominierenden Bedeutung von E-Selektin für die Adhäsion von Tumorzellen in unserem in-vitro System und in-vivo, und der geringen Affinität des Heparins und seiner Derivate für E-Selektin, machen die Resultate dieser Arbeit eine kompetitive Inhibition der Bindung von tumorassoziierten Kohlehydratantigenen an endotheliale Adhäsionsmoleküle und eine signifikante Reduktion der Tumorzelladhäsion äußerst unwahrscheinlich.

7.2.2.2 Unfraktionierte und fraktionierte Heparine können nicht durch biologische Inaktivierung der Zytokinwirkung die Aktivierung von Endothelzellen vermindern und die Tumorzelladhäsion reduzieren

Interaktionen zwischen Glykosaminoglykanen auf Zelloberflächen und Chemokinen modulieren deren spezifische Bindung an ihren Rezeptor [80]. Es ist vorstellbar, dass exogene Glykosaminoglykane wie Heparin und seine Derivate durch Intervention der Zytokin-vermittelten Entzündungsreaktion des Endothels die Tumorzelladhäsion vermindern können.

Unter der Vorstellung, die Assoziation der Heparine an IL-1 β oder TNF α , beziehungsweise an deren Rezeptoren zu ermöglichen, wurden die Endothelzellen in Anwesenheit der zu testenden Heparine proinflammatorisch stimuliert. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass weder unfraktionierte noch fraktionierte Heparine, selbst in hoher Konzentration, die IL-1 β und TNF α vermittelte Stimulation des Endothels im Sinne einer verringerten Adhäsion der verwendeten Tumorzellen vermindern können (siehe Abbildung 6-7, Abbildung 6-8). Ebenso wenig hatte die stimulationssynchrone Inkubation mit unfraktioniertem oder fraktioniertem Heparin Auswirkung auf die IL-1 β induzierte E-Selektin Expression auf HUVEC (siehe Abbildung 6-24).

Heparansulfat ist als Heparansulfat-Proteoglykan mit heparinähnlichen Eigenschaften in menschlichen Geweben weitverbreitet und auf Endothelzell-Oberflächen nachweisbar [34, S. 257]. Für die lokale Zytokinwirkung ist die Affinität

der Chemokine für diese Glykosaminoglykane von Bedeutung, in absteigender Reihenfolge RANTES, MCP-1, IL-8, MIP-1 α . Wiederum korreliert die selektive Bindungsaffinität der Chemokine mit der Kettenlänge der entsprechenden Glykosaminoglykane [80]. Ebenso kann gezeigt werden, dass Zelloberflächen-Heparansulfat essentiell für die optimale Bindung von INF- γ und somit für die Endothelzell-Stimulation ist, und dass freies Heparin diesen Prozess inhibieren kann [33]. Exogenes Heparin kann zwar Heparansulfat von Zelloberflächen lösen [76], allerdings werden die im Rahmen dieser Arbeit verwandten proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF α in der Literatur nicht in diesem Kontext erwähnt.

Endothelzellen exprimieren auch in Kultur eine Endoglykosidase, die neben endogenem Heparansulfat auch exogenes Heparin zum Substrat hat. Die physiologische Funktion dieser Heparanase ist vermutlich die Degradation extrazellulärer Matrix im Rahmen von Prozessen wie Wundheilung und Neovaskularisation. Dementsprechend gering ist die gemessene Enzymaktivität auf vitalen, unversehrten HUVEC -selbst nach Exposition diverser Stimuli inklusive IL-1 β und TNF α [49]- und von einer signifikanten Verfälschung unserer Ergebnisse ist in Anbetracht der hohen verwandten Heparinkonzentrationen nicht auszugehen.

Aufgrund der Beobachtung, dass Zellkulturmedien, die sauren Fibroblasten Wachstumsfaktor (aFGF) zusammen mit Heparin enthalten, der HUVEC Stimulation mit IL-1 β entgegenwirken [101] wurde in unserem Endothelzellkulturmedium der basische Fibroblasten Wachstumsfaktor (bFGF) verwendet und auf Heparin gänzlich verzichtet.

Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass die synchrone Inkubation mit unfraktionierten und fraktionierten Heparinen weder die zytokinstimulierte Endothelzellaktivierung noch Tumorzelladhäsion vermindert.

7.2.2.3 Präinkubation mit fraktioniertem Heparin kann im Gegensatz zu unfraktioniertem Heparin die zytokininduzierte Aktivierung von Endothelzellen vermindern und die Tumorzelladhäsion reduzieren

Aufgrund der beschriebenen Affinität von Heparinen für intrazelluläre Moleküle (siehe Tabelle 1-1 Grundlagen) ist nach endothelialer Internalisierung eine Interferenz mit Prozessen wie Signaltransduktion oder Proteinbiosynthese vorstellbar.

Unter der Vorstellung, die Penetration in die Endothelzelle zu ermöglichen, wurden im in-vitro Adhäsionsversuch HUVEC vor der Zytokinstimulation mit den zu testenden

Heparinen präinkubiert. Im Gegensatz zu unfraktioniertem Heparin reduzierte die Präinkubation mit steigenden Konzentrationen fraktionierten Heparins zunehmend signifikant die Adhäsion von zwei Pankreaskarzinom-Zelllinien (siehe Abbildung 6-9 und Abbildung 6-10). Eine reduzierte Expression von E-Selektin auf HUVEC war durchflusszytometrisch ausschließlich nach Vorinkubation mit fraktioniertem Heparin zu beobachten (siehe Abbildung 6-24) und korrelierte sowohl mit der Konzentration (siehe Abbildung 6-27, Abbildung 6-28, Abbildung 6-29 und Abbildung 6-30), als auch mit der Dauer der Vorinkubation (siehe Abbildung 6-26). Die Northern Blot Analyse zeigte, dass die verminderte E-Selektin Expression mit verringerter Genexpression einherging (siehe Abbildung 6-31).

7.2.2.4 Fraktioniertes Heparin kann internalisiert werden

Es existieren vielfach Hinweise auf mögliche transmembranöse Penetration und Internalisierung von exogenen Heparinen.

Intraneuronal injiziertes konventionelles Heparin verhindert die Glutamat vermittelte Kalzium-Freisetzung durch seine hemmende Wirkung auf Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃). Fraktioniertes Heparin besitzt einen vergleichbaren Effekt, unterscheidet sich jedoch vom unfraktionierten Heparin darin, dass es seine neuroprotektive Wirkung auch bei externer Applikation beibehält. Die Autoren postulieren, dass das kleinere LMWH Molekül in der Lage sein soll, die Zellmembran zu passieren und sehen darin die Erklärung für die beobachtete Prognoseverbesserung für Schlaganfall-Patienten, die mit fraktionierten statt mit unfraktionierten Heparinen therapiert werden [64].

Eine Übertragung dieser Beobachtung auf Endothelzellen scheint möglich. Untersuchungen bezüglich der Bindungseigenschaften von Glykosaminoglykanen an Endothelzellen belegen, dass nur hochsulfatierte Glykosaminoglykane wie Heparin und seine Derivate langsam, sättigbar und spezifisch an HUVEC binden und anschließend teilweise internalisiert werden [14]. Durch Gelfiltration kann gezeigt werden, dass nach Inkubation von Endothelzellen mit ³H-markiertem Heparin, dieses selektiv gebunden, internalisiert und degradiert wird [135].

Nach Präinkubation im Bereich von Stunden könnte jedoch die intrazelluläre Konzentration von unfraktioniertem Heparin zu gering sein, um signifikant mit intrazellulären Molekülen zu interagieren. Werden allerdings HUVEC dauerhaft in Anwesenheit von konventionellem Heparin kultiviert, ist nach partieller Internalisierung eine verminderte Zytokinwirkung nicht auszuschließen. So

exprimieren HUVEC und aortale Endothelzellen unter heparinhaltigen Kulturbedingungen signifikant weniger ICAM-1 mRNA und Adhäsionsmolekül und lassen sich geringer durch $\text{INF-}\gamma$ stimulieren, verglichen mit heparindefizienten Kulturbedingungen [100].

Fraktioniertes Heparin hingegen könnte in der Lage sein, bereits nach Präinkubationszeiten im Bereich von Stunden intrazellulär zu akkumulieren, umso ausgeprägter, je länger die Dauer und je höher die extrazelluläre Konzentration.

7.2.2.5 Heparine können mit intrazellulären Molekülen interagieren

Durch Assoziation mit intrazellulären Molekülen (vgl. Tabelle 7-1) der Signaltransduktion, der Genexpression oder der Proteinbiosynthese, kann die abgeschwächte Zytokinstimulation des Endothels mit verringerter Adhäsionsmolekülexpression und verminderter Tumorzelladhäsion erklärt werden. Da die reduzierte Expression von E-Selektin mit einer verminderten Genexpression von E-Selektin in der Northern Blot Analyse einherging (siehe Abbildung 6-31), ist die Intervention des Heparins prätranskriptional in der Signalkaskade zu vermuten.

7.2.2.6 Mögliche Interaktionsstelle ist die gemeinsame Endstrecke der Signaltransduktion von $\text{IL-1}\beta$ und $\text{TNF}\alpha$

Die Beobachtung, dass sowohl die proinflammatorische Wirkung von $\text{IL-1}\beta$, als auch von $\text{TNF}\alpha$ abgeschwächt wird, fokussiert die Suche auf Zielmoleküle, die an einer Art gemeinsamer Endstrecke der Signalkaskade beteiligt sind.

Viele Transkriptionsfaktoren haben Heparin-bindende basische Aminosäure-Sequenzen [143]. In diesen Heparin-bindenden Regionen bilden charakteristische Anhäufungen von Arginin und Lysin Zentren hoher positiver Ladungsdichte, die elektrostatisch mit den sauren Gruppen von Mukopolysacchariden wie den Heparinen interagieren können [63].

Um mögliche Zielmoleküle zu eruieren, ist die Kenntnis über die Signaltransduktion der proinflammatorischen Zytokine notwendig. Diese komplexen und teilweise noch unbekanntem Zusammenhänge sind Gegenstand intensiver aktueller Forschung, so dass in diesem Rahmen auf eine detaillierte Darstellung verzichtet wird. An dieser Stelle sei auf die regelmäßig aktualisierte Internetseite <http://stke.sciencemag.org> der Zeitschrift Science verwiesen, mit detaillierten Erklärungen und Illustrationen zum

aktuellen Stand der internationalen Wissenschaft zum Thema Signaltransduktion (STKE, Signal Transduction Knowledge Environment).

7.2.2.7 NF- κ B Signalkaskade

7.2.2.7.1 Bedeutung des Transkriptionsfaktors NF- κ B

Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B ist ein regulatorischer Schlüsselprozess für die Expression einer Vielzahl von Genen, welche die Immunantwort koordinieren [90]. Außerdem existieren Hinweise darauf, dass NF- κ B an der Onkogenese beteiligt ist [91]. Somit ist diese Signalkaskade bei einer Fülle von Erkrankungen bezüglich Pathogenese und potentieller therapeutischer Zielmoleküle von entscheidender Bedeutung, von entzündlichen Prozessen bis zu malignen Tumoren.

7.2.2.7.2 Aktivierung der NF- κ B Signalkaskade

Die rasche Aktivierung von NF- κ B erfolgt über eine Vielzahl von Stimuli.

Pathogene, wie LPS, unmethylierte bakterielle DNS und doppelsträngige RNS, Peptidoglykane oder Lipoproteine werden über spezifische pattern-recognition-Rezeptoren (PRR) erkannt. Ein gut untersuchtes Beispiel für PRR stellt die Familie der Toll like receptors (TLR) dar, auf die in diesem Zusammenhang nicht näher eingegangen werden soll.

Wichtige Induktoren der NF- κ B Aktivierung sind Stress-Signale und proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β und TNF α [90]. IL-1 aktiviert wegen der Homologien der zytoplasmatischen Signaldomänen des IL-1 Rezeptors (IL-1R) und TLR NF- κ B in ähnlicher Weise wie LPS. TNF Rezeptoren werden auf einer Vielzahl von Zellen exprimiert (vgl. 7.1.3.2.2).

7.2.2.7.3 Die NF- κ B Protein-Familie

NF- κ B gehört zur Rel Familie. Wie die meisten Transkriptionsfaktor-Familien umfasst sie mehrere Proteine: die wichtigsten fünf umfassen RelA (p65), c-Rel, RelB, NF- κ B1 (p50/p105), und NF- κ B2 (p52/p100) [91]. Diese Proteine haben strukturell konservierte, aminoternale 300-Aminosäureregionen, welche die Dimerisations-, die DNA-bindende und die nukleäre Lokalisationssequenz beinhalten [90]. Während RelA, c-Rel und RelB als reife Proteine synthetisiert werden, werden p50 und p52 aus den großen Vorläuferproteinen p105 und p100 von Proteasomen prozessiert.

7.2.2.7.4 Übersicht der Signalkaskade von NF κ B

Die Aktivität von NF- κ B wird durch die Verteilung von zytosolischem und nukleärem Anteil bestimmt. Die Assoziation mit inhibitorischen Proteinen, den Inhibitoren des NF- κ B (I κ B), bedingt ein zytosolisches Vorliegen. Nach Aktivierung durch eine Vielzahl von Stimuli, werden die I κ B Proteine durch aktivierte I κ B Kinasen (IKK) phosphoryliert, anschließend ubiquitinyliert und durch ein Proteasom degradiert. Die Degradation von I κ B erlaubt die Translokation von NF- κ B in den Nukleus, wo die Assoziation an die entsprechende DNS bindende Domäne die Transkription einer Vielzahl von Genen reguliert, unter anderem für Zytokine, Chemokine, Stress-Proteine, antiapoptotische und antimikrobielle Proteine und auch Adhäsionsmoleküle [129;146].

7.2.2.7.5 NF- κ B NLS als mögliche Zielstruktur für die durch LMWH inhibierte Zytokinaktivität

Die vorherrschende Meinung geht von der Vorstellung aus, dass durch I- κ B die nukleäre Lokalisations- Sequenz (NLS) der NF- κ B Untereinheiten maskiert wird [90]. Durch das Ablösen von I- κ B wird die NF- κ B NLS exponiert, eine hochkationische Domäne bestehend aus acht Aminosäuren (VQRDRQKLM) [95]. Synthetische, zellpermeable Peptide, die diese NF- κ B NLS enthalten, können die nukleäre Translokation von NF- κ B kompetitiv inhibieren [93].

Es ist denkbar, dass die polyanionischen Heparinderivate nach Internalisierung elektrostatisch an die positiv geladenen Aminosäuren der NF- κ B NLS binden und somit die Assoziation mit der nukleären Pore für NF- κ B verhindern [133]. Nachdem gezeigt werden kann, dass Dermatansulfat NF- κ B aktivieren und die Expression von ICAM-1 auf Endothelzellen verstärken kann [111], scheint die Inhibition der NF- κ B Aktivierung heparinspezifisch zu sein.

7.2.2.7.6 IKK als mögliche Zielmoleküle für die durch LMWH inhibierte Zytokinaktivität

Andere Wirkprinzipien der durch LMWH inhibierten Zytokinaktivierung sind denkbar. Die I κ B Kinasen umfassen IKK α (oder IKK1), IKK β (oder IKK2) und die essentielle regulatorische Untereinheit IKK γ (oder NEMO) [91].

Da Heparin die Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase (MAPK) hemmen kann [28], ist nicht auszuschließen, dass der hemmende Effekt des LMWH über die I- κ B Kinase vermittelte Phosphorylierung erfolgt [133]. Dabei würde durch ausbleibende Phosphorylierung des I- κ B dessen Dissoziation und Degradation unterbleiben und somit die Aktivierung von NF- κ B verhindert.

In jedem Fall verringert sich der stimulierende Effekt proinflammatorischer Zytokine auf Gen- und Adhäsionsmolekül-Expression und somit die beobachtete Tumorzelladhäsion.

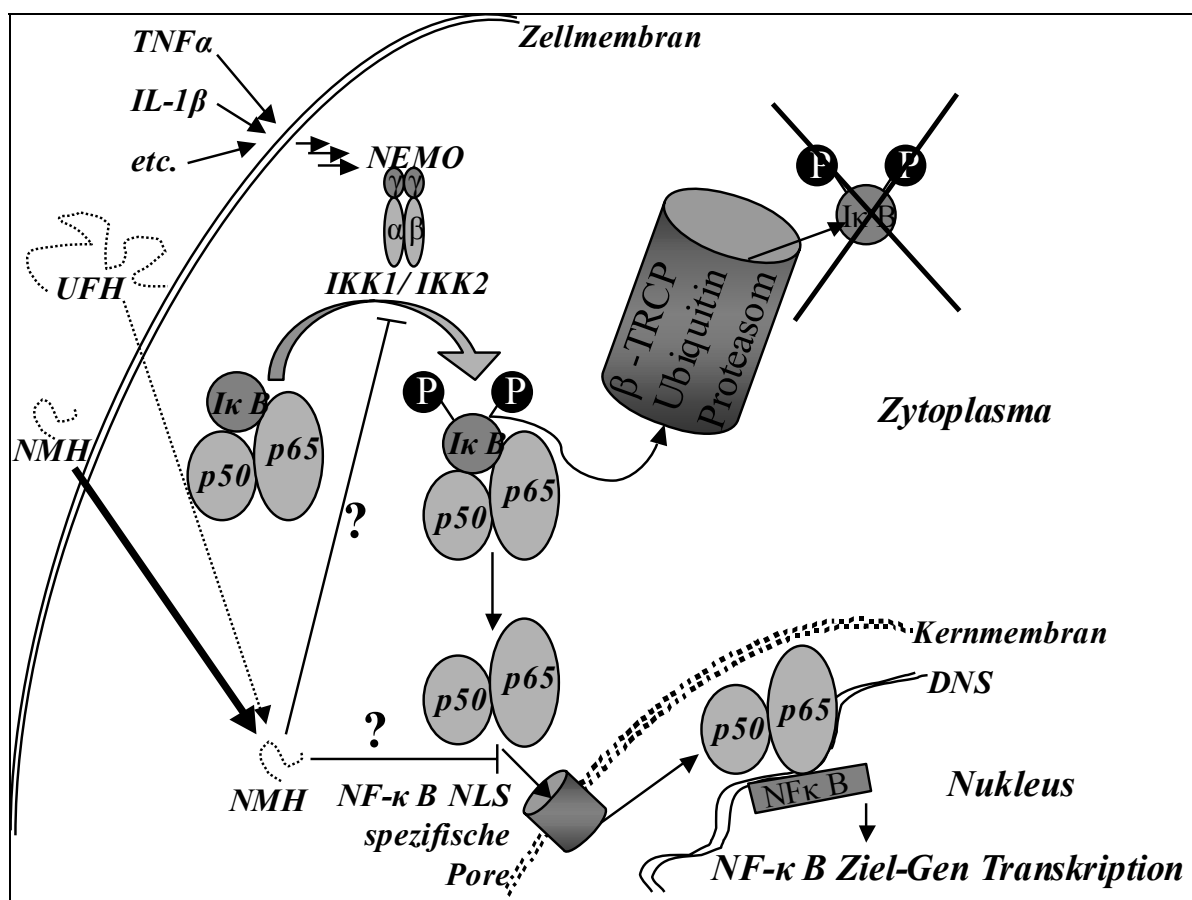


Abbildung 7-3 Vereinfachte Darstellung der NF- κ B Signalkaskade im Ausschnitt und mögliche Angriffspunkte von Heparinen

7.2.3 Mögliche klinische Bedeutung einer begleitenden Heparintherapie bei onkologischen Patienten und Ausblick

Neben klinisch-epidemiologischen Daten zur antimetastatischen Wirkung von Heparinen und der Überlegenheit von fraktionierten Heparinen existieren diesbezüglich vielfach experimentelle Hinweise.

So kann im Mausmodell zur Lungenmetastasierung durch injizierte B16 Melanomzellen durch vorhergehende subkutane Applikation des niedermolekularen Heparins Tinzaparin (10 mg/kg Körpergewicht; 4 Stunden vorher, bzw. 14 Tage vorher, einmal täglich) die pulmonale Tumorformation um 89% bzw. 96% reduziert werden, ohne signifikante Steigerung der Blutungsereignisse [8]. Neben der von den Autoren vorgeschlagenen kausalen Assoziation mit Tissue Factor Pathway Inhibitor, könnte auch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit beschriebene, durch LMWH inhibierte Endothelzellaktivierung von entscheidender Bedeutung sein.

Aufgrund ihrer vorteilhaften pharmakokinetischen Eigenschaften und ihres günstigen Nebenwirkungsprofils bieten sich niedermolekulare Heparine speziell zum Einsatz bei onkologischen Patienten an (vgl. auch 7.1.1.2). Über die Tatsache hinaus, dass die Daten dieser Arbeit einen neuen und plausiblen Erklärungsansatz zur antimetastatischen Wirkung von Heparinen anbieten, der die unterschiedliche klinische Effektivität in Abhängigkeit vom Molekulargewicht berücksichtigt, können diese Erkenntnisse ein weiterer Anstoß für die Planung prospektiver, randomisierter und kontrollierter klinischer Studien sein, um das Metastasierungsverhalten und die Prognose von onkologischen Patienten unter einer begleitenden Therapie mit niedermolekularen Heparinen zu evaluieren.

Die Bedeutung der vielfältigen weiteren Modifikationsmöglichkeiten der biochemischen Eigenschaften von Heparinen, wie der isolierten Pentasaccharidsequenz, der sehr niedermolekularen Heparinen oder der nicht-antikoagulativen Heparinen, wie beispielsweise durch N-Desulfatierung [138] bleibt abzuwarten.

8 Zusammenfassung

8.1 Hintergrund

Die in Studien gezeigte signifikante Prognoseverbesserung von onkologischen Patienten unter begleitender Heparintherapie, hat das Interesse am Einfluss dieser Pharmaka auf den malignen Prozess gesteigert. Dieser Überlebensvorteil kann nicht ausschließlich auf Prävention und Therapie thromboembolischer Komplikationen zurückgeführt werden, sondern repräsentiert einen zusätzlichen, spezifischen Effekt bei Patienten mit malignen Grundleiden. Bislang ist ungeklärt, warum niedermolekulare Heparine (LMWH) diesbezüglich den unfraktionierten Heparinen (UFH) überlegen sind.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wirkung von UFH und LMWH auf die Interaktion von Endothel- und Tumorzelle in-vitro untersucht.

8.2 Fragestellungen

- (1) Können wichtige Determinanten der Tumorzelladhäsion an Endothelzellen in-vitro identifiziert werden?
- (2) Beeinflussen Heparine die endotheliale Tumorzelladhäsion in-vitro?
- (3) Können funktionelle Unterschiede bezüglich der endothelialen Tumorzelladhäsion in Abhängigkeit vom Molekulargewicht der Heparine in-vitro identifiziert werden?
- (4) Welche Mechanismen können dafür verantwortlich sein?

8.3 Methoden

8.3.1 In-vitro Adhäsionsversuch

Bestimmung der Adhäsion von [³H]-Methylthymidin radioaktiv markierten Pankreasadenokarzinomzellen (Pa-Tu-8902, Pa-Tu-8988T und EPAM-98) an konfluente Monolayer von humanen Nabelvenen-Endothelzellen (HUVEC). HUVEC wurden mit Zytokinen stimuliert (IL-1 β , TNF α , IL-8; 0,5- 1,0 ng/ml/2- 4 h) und mit anti-E-Selektin (anti-ELAM-1) Antikörper inkubiert (1:100/0,5 h). Karzinomzellen wurden mit anti-Sialyl Lewis_a (anti-CA 19-9) Antikörper inkubiert (30 μ g/ml/0,5 h). UFH oder LMWH wurden (1) synchron mit der Tumorzellsuspension zugegeben (0,1- 1000 U/ml), um eine mögliche kompetitive Inhibition der endothelialen Tumorzelladhäsion zu prüfen, (2) synchron zur proinflammatorischen Zytokininkubation der HUVEC

zugegeben (0,1- 1000 U/ml), um eine mögliche Inhibition der Endothelstimulation durch biologische Inaktivierung der Zytokinaktivität zu prüfen, und (3) vor der proinflammatorischen Zytokininkubation zu HUVEC zugegeben (10- 500 U/ml/2 h), um nach potentieller endothelialer Internalisierung eine mögliche intrazelluläre Interferenz und Inhibition der zytokininduzierten proinflammatorischen Endothelstimulation zu prüfen.

8.3.2 Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von E-Selektin (ELAM-1, CD62E) auf nichtstimulierten und proinflammatorisch stimulierten (IL-1 β , TNF- α ; 0,1- 1 ng/ml/1- 12 h) HUVEC. HUVEC wurden 2 Stunden nach, synchron mit, oder vor (0,5- 3 h) Zytokinstimulation (IL-1 β , TNF- α ; 1 ng/ml/4 h) mit UFH oder LMWH (10- 500 U/ml) inkubiert.

8.3.3 Northern Blot Analyse

Quantifizierung der Expression von E-Selektin mRNS in (1) nichtstimulierten HUVEC, (2) stimulierten HUVEC (IL-1 β ; 1 ng/ml/2 h) und (3) in stimulierten HUVEC nach zusätzlicher Präinkubation mit LMWH (500 U/ml/2 h).

8.4 Ergebnisse

Proinflammatorische Zytokine IL-1 β und TNF- α steigerten substanzspezifisch, zeit- und dosisabhängig sowohl die Adhäsion von Pankreasadenokarzinomzellen an HUVEC, als auch die endotheliale Expression von E-Selektin. Diesbezüglich war die Wirkung des IL-1 β der des TNF- α überlegen. IL-8 besaß bezüglich der Tumorzelladhäsion keine signifikanten endothelstimulierenden Eigenschaften.

Auf allen verwendeten Pankreasadenokarzinomzellen konnte das tumorassoziierte Kohlenhydratantigen Sialyl Lewis _a nachgewiesen werden. Monoklonale Antikörper gegen dieses Antigen, als auch gegen dessen endothelialen Rezeptor E-Selektin inhibierten signifikant die zytokinstimulierte Tumorzelladhäsion.

UFH und LMWH konnten weder die endotheliale Tumorzelladhäsion kompetitiv hemmen, noch die endothelstimulierende Zytokinwirkung biologisch inaktivieren.

Durch Präinkubation mit LMWH vor Zytokinstimulation konnte im Gegensatz zu UFH sowohl die endotheliale Tumorzelladhäsion, als auch die Expression von E-Selektin auf HUVEC signifikant reduziert werden.

Während in nichtstimulierten HUVEC keine E-Selektin mRNA nachweisbar war, ging die IL-1 β induzierte Endothelaktivierung mit einer gesteigerten Genexpression dieses Adhäsionsmoleküls einher. Präinkubation mit LMWH vor Zytokinstimulation reduzierte die nachweisbare E-Selektin mRNA in IL-1 β stimulierten HUVEC.

8.5 Diskussion

Proinflammatorische Zytokine IL-1 β und TNF- α verstärkten die Adhäsion von Pankreasadenokarzinomzellen an HUVEC in-vitro. Das endotheliale Adhäsionsmolekül E-Selektin und sein tumorassoziierter Ligand Sialyl Lewis_a waren für den Adhäsionsprozess von entscheidender Bedeutung. Die verstärkte Tumorzelladhäsion korrelierte mit vermehrter Expression von E-Selektin. Inkubation von HUVEC mit LMWH vor proinflammatorischer Stimulation verringerte die E-Selektin-Expression und entsprechend die Tumorzelladhäsion. Diese verminderte zytokinstimulierte E-Selektin-Expression war mit reduzierter E-Selektin-Genexpression assoziiert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit machen eine Inhibition der NF- κ B Signalkaskade durch internalisierte Heparinderivate denkbar, wobei LMWH aufgrund seines geringeren Molekulargewichts effektiver die Endothelzellmembran penetrieren kann als UFH. Durch Stören der gemeinsamen Endstrecke proinflammatorischer Signaltransduktion kann sowohl die reduzierte Gentranskription, als auch Adhäsionsmolekül-Expression auf IL-1 β und TNF- α stimulierten Endothelzellen erklärt werden und somit die verringerte endotheliale Tumorzelladhäsion. Mögliche Zielmoleküle sind die nukleäre Lokalisations-Sequenz von NF- κ B (NLS), oder die I κ B Kinasen (IKK).

Die initiale Adhäsion von Tumorzellen an vaskuläres Endothel im Rahmen der hämatogenen Dissemination maligner Neoplasien kann eine Achillesferse der Metastasierungskaskade sein. Es existieren indirekte und direkte Hinweise, dass die in-vitro gezeigte proinflammatorische Zytokinwirkung auf die Interaktion zwischen Endothel und Tumorzelle, und die herausragende Bedeutung des E-Selektins für den Adhäsionsprozess, auch in-vivo Relevanz besitzen.

Wir postulieren, dass der beschriebene Mechanismus mitverantwortlich sein kann für die in retrospektiven Studien beobachtete, signifikant reduzierte Mortalität von Patienten mit malignen Grundliden unter begleitender Therapie mit niedermolekularen Heparinen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit können ein weiterer Anstoß zur Planung prospektiver, randomisierter und kontrollierter klinischer Studien sein, um die Auswirkungen einer begleitenden Medikation mit fraktionierten Heparinen auf das Metastasierungsverhalten und die Prognose von onkologischen Patienten zu evaluieren.

Die Bedeutung der vielfältigen weiteren Modifikationsmöglichkeiten der biochemischen Eigenschaften von Heparinen bezüglich ihrer antimetastatischen Wirkung bleibt abzuwarten.

9 Literaturverzeichnis

1. Abildgaard U.
Highly purified antithrombin 3 with heparin cofactor activity prepared by disc electrophoresis.
Scand. J. Clin. Lab Invest 21 (1968) 89-91
2. Abildgaard U.
Binding of thrombin to antithrombin III.
Scand. J. Clin. Lab Invest 24 (1969) 23-27
3. Abildgaard U., Lindahl A.K. und Sandset P.M.
Heparin requires both antithrombin and extrinsic pathway inhibitor for its anticoagulant effect in human blood.
Haemostasis 21 (1991) 254-257
4. Ahsan A., Jeske W., Hoppensteadt D., Lormeau J.C., Wolf H. und Fareed J.
Molecular profiling and weight determination of heparins and depolymerized heparins.
J. Pharm. Sci. 84 (1995) 724-727
5. Ahsan A., Jeske W., Wolf H. und Fareed J.
Isoamyl nitrite depolymerized heparin as a universal calibrator for heparins and low molecular weight heparins.
Clin. Appl. Thromb. Hemost. 6 (2000) 169-174
6. Albelda S.M.
Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis.
Lab Invest 68 (1993) 4-17
7. Alvarez X.A., Franco A., Fernandez-Novoa L. und Cacabelos R.
Blood levels of histamine, IL-1 beta, and TNF-alpha in patients with mild to moderate Alzheimer disease.
Mol. Chem. Neuropathol. 29 (1996) 237-252
8. Amirkhosravi A., Mousa S.A., Amaya M. und Francis J.L.
Antimetastatic effect of tinzaparin, a low-molecular-weight heparin.
J. Thromb. Haemost. 1 (2003) 1972-1976
9. Aznavoorian S., Murphy A.N., Stetler-Stevenson W.G. und Liotta L.A.
Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis.
Cancer 71 (1993) 1368-1383

10. Bara L., Billaud E., Gramond G., Kher A. und Samama M.
Comparative pharmacokinetics of a low molecular weight heparin (PK 10 169) and unfractionated heparin after intravenous and subcutaneous administration.
Thromb. Res. 39 (1985) 631-636

11. Bara L. und Samama M.
Pharmacokinetics of low molecular weight heparins.
Acta Chir Scand. Suppl 543 (1988) 65-72

12. Barber M.D., Powell J.J., Lynch S.F., Fearon K.C. und Ross J.A.
A polymorphism of the interleukin-1 beta gene influences survival in pancreatic cancer.
Br. J. Cancer 83 (2000) 1443-1447

13. Baron J.A., Gridley G., Weiderpass E., Nyren O. und Linet M.
Venous thromboembolism and cancer.
Lancet 351 (1998) 1077-1080

14. Barzu T., Molho P., Tobelem G., Petitou M. und Caen J.
Binding and endocytosis of heparin by human endothelial cells in culture.
Biochim. Biophys. Acta 845 (1985) 196-203

15. Bazzoni F. und Beutler B.
The tumor necrosis factor ligand and receptor families.
N. Engl. J. Med. 334 (1996) 1717-1725

16. Bijsterveld N.R., Hettiarachchi R., Peters R., Prins M.H., Levi M. und Buller H.R.
Low-molecular weight heparins in venous and arterial thrombotic disease.
Thromb. Haemost. 82 Suppl 1 (1999) 139-147

17. Bischoff J., Brasel C., Kraling B. und Vranovska K.
E-selectin is upregulated in proliferating endothelial cells in vitro.
Microcirculation. 4 (1997) 279-287

18. Bona R.D., Hickey A.D. und Wallace D.M.
Efficacy and safety of oral anticoagulation in patients with cancer.
Thromb. Haemost. 78 (1997) 137-140

19. Bona R.D., Hickey A.D. und Wallace D.M.
Warfarin is safe as secondary prophylaxis in patients with cancer and a previous episode of venous thrombosis.
Am. J. Clin. Oncol. 23 (2000) 71-73

20. Bona R.D., Sivjee K.Y., Hickey A.D., Wallace D.M. und Wajcs S.B.
The efficacy and safety of oral anticoagulation in patients with cancer.
Thromb. Haemost. 74 (1995) 1055-1058
21. Burns M.J., Sellati T.J., Teng E.I. und Furie M.B.
Production of interleukin-8 (IL-8) by cultured endothelial cells in response to *Borrelia burgdorferi* occurs independently of secreted [corrected] IL-1 and tumor necrosis factor alpha and is required for subsequent transendothelial migration of neutrophils.
Infect. Immun. 65 (1997) 1217-1222
22. Carlos T.M. und Harlan J.M.
Leukocyte-endothelial adhesion molecules.
Blood 84 (1994) 2068-2101
23. Chiu H.M., Hirsh J., Yung W.L., Regoeczi E. und Gent M.
Relationship between the anticoagulant and antithrombotic effects of heparin in experimental venous thrombosis.
Blood 49 (1977) 171-184
24. Choay J., Petitou M., Lormeau J.C., Sinay P., Casu B. und Gatti G.
Structure-activity relationship in heparin: a synthetic pentasaccharide with high affinity for antithrombin III and eliciting high anti-factor Xa activity.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 116 (1983) 492-499
25. Chomczynski P. und Sacchi N.
Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.
Anal. Biochem. 162 (1987) 156-159
26. Cohen M.C., Bereta M. und Bereta J.
Effect of cytokines on tumour cell-endothelial interactions.
Indian J. Biochem. Biophys. 34 (1997) 199-204
27. Cronstein, B.N.
Leukocyte-endothelial adhesion in the pathogenesis of inflammation.
UpToDate Online Version 10.2 (2003)
28. Daum G., Hedin U., Wang Y., Wang T. und Clowes A.W.
Diverse effects of heparin on mitogen-activated protein kinase-dependent signal transduction in vascular smooth muscle cells.
Circ. Res. 81 (1997) 17-23

29. Dello S.P. und Rovida E.
Transmodulation of cell surface regulatory molecules via ectodomain shedding.
Biol. Chem. 383 (2002) 69-83
30. Dinarello C.A.
The role of the interleukin-1-receptor antagonist in blocking inflammation mediated by interleukin-1.
N. Engl. J. Med. 343 (2000) 732-734
31. Dinarello C.A. und Wolff S.M.
The role of interleukin-1 in disease.
N. Engl. J. Med. 328 (1993) 106-113
32. Donati M.B.
Cancer and thrombosis.
Haemostasis 24 (1994) 128-131
33. Douglas M.S., Ali S., Rix D.A., Zhang J.G. und Kirby J.A.
Endothelial production of MCP-1: modulation by heparin and consequences for mononuclear cell activation.
Immunology 92 (1997) 512-518
34. Engelberg H.
Actions of heparin that may affect the malignant process.
Cancer 85 (1999) 257-272
35. Falconer J.S., Fearon K.C., Plester C.E., Ross J.A. und Carter D.C.
Cytokines, the acute-phase response, and resting energy expenditure in cachectic patients with pancreatic cancer.
Ann. Surg. 219 (1994) 325-331
36. Fareed J. und Hoppensteadt D.A.
Pharmacology of the low-molecular-weight heparins.
Semin. Thromb. Hemost. 22 Suppl 2 (1996) 13-18
37. Fareed J., Hoppensteadt D.A. und Bick R.L.
An update on heparins at the beginning of the new millennium.
Semin. Thromb. Hemost. 26 Suppl 1 (2000) 5-21
38. Fenton R.G., Longo Dan L.
Cell Biology of Cancer.
In: "Harrison's Practice and Principles of Internal Medicine, 15th edition", Braunwald et al (Hrsg.), Mc Graw Hill (2001) 509.

39. Fidler I.J.
Molecular Biology of Cancer: Invasion and Metastasis.
In: "Cancer, Principles and Practice of Oncology",
DeVita V.T.Jr.e.al. (Hrsg.), Lippincott-Raven, Philadelphia, New York (1997)
140.
40. Fidler I.J.
Critical determinants of cancer metastasis: rationale for therapy.
Cancer Chemother. Pharmacol. 43 Suppl (1999) S3-10
41. Fidler I.J. und Hart I.R.
Biological diversity in metastatic neoplasms: origins and implications.
Science 217 (1982) 998-1003
42. Firestein, G.S.
Role of cytokines in the immune system.
UpToDate Online Version 10.2 (2003)
43. Fox S.B., Turner G.D., Gatter K.C. und Harris A.L.
The increased expression of adhesion molecules ICAM-3, E- and P-selectins
on breast cancer endothelium.
J. Pathol. 177 (1995) 369-376
44. Frenette P.S. und Wagner D.D.
Adhesion molecules--Part 1.
N. Engl. J. Med. 334 (1996) 1526-1529
45. Frenette P.S. und Wagner D.D.
Adhesion molecules--Part II: Blood vessels and blood cells.
N. Engl. J. Med. 335 (1996) 43-45
46. Fukushima K., Hirota M., Terasaki P.I., Wakisaka A., Togashi H., Chia D.,
Suyama N., Fukushi Y., Nudelman E. und Hakomori S.
Characterization of sialosylated Lewis x as a new tumor-associated antigen.
Cancer Res. 44 (1984) 5279-5285
47. Gitter M.J., Jaeger T.M., Petterson T.M., Gersh B.J. und Silverstein M.D.
Bleeding and thromboembolism during anticoagulant therapy: a population-
based study in Rochester, Minnesota.
Mayo Clin. Proc. 70 (1995) 725-733
48. Giuffre L., Cordey A.S., Monai N., Tardy Y., Schapira M. und Spertini O.
Monocyte adhesion to activated aortic endothelium: role of L-selectin and
heparan sulfate proteoglycans.
J. Cell Biol. 136 (1997) 945-956

49. Godder K., Vlodaysky I., Eldor A., Weksler B.B., Haimovitz-Freidman A. und Fuks Z.
Heparanase activity in cultured endothelial cells.
J. Cell Physiol 148 (1991) 274-280

50. Grabner R., Till U. und Heller R.
Flow cytometric determination of E-selectin, vascular cell adhesion molecule-1, and intercellular cell adhesion molecule-1 in formaldehyde-fixed endothelial cell monolayers.
Cytometry 40 (2000) 238-244

51. Green D., Hull R.D., Brant R. und Pineo G.F.
Lower mortality in cancer patients treated with low-molecular-weight versus standard heparin.
Lancet 339 (1992) 1476

52. Green K.B. und Silverstein R.L.
Hypercoagulability in cancer.
Hematol. Oncol. Clin. North Am. 10 (1996) 499-530

53. Griffioen A.W., Damen C.A., Martinotti S., Blijham G.H. und Groenewegen G.
Endothelial intercellular adhesion molecule-1 expression is suppressed in human malignancies: the role of angiogenic factors.
Cancer Res. 56 (1996) 1111-1117

54. Halkin H., Goldberg J., Modan M. und Modan B.
Reduction of mortality in general medical in-patients by low-dose heparin prophylaxis.
Ann. Intern. Med. 96 (1982) 561-565

55. Handeland G.F., Abildgaard U., Holm H.A. und Arnesen K.E.
Dose adjusted heparin treatment of deep venous thrombosis: a comparison of unfractionated and low molecular weight heparin.
Eur. J. Clin. Pharmacol. 39 (1990) 107-112

56. Harenberg J.
Pharmacology of low molecular weight heparins.
Semin. Thromb. Hemost. 16 Suppl (1990) 12-18

57. Haynes Barton F., Fauci Anthony S.
Introduction to the Immune System.
In: "Harrison's Principles and Practice of Internal Medicine", Braunwald et al (Hrsg.), Mc Graw Hill (2001) 1805.

58. Hettiarachchi R.J., Smorenburg S.M., Ginsberg J., Levine M., Prins M.H. und Buller H.R.
Do heparins do more than just treat thrombosis? The influence of heparins on cancer spread.
Thromb. Haemost. 82 (1999) 947-952
59. Hirsh J.
Heparin.
N. Engl. J. Med. 324 (1991) 1565-1574
60. Hirsh J., Warkentin T.E., Raschke R., Granger C., Ohman E.M. und Dalen J.E.
Heparin and low-molecular-weight heparin: mechanisms of action, pharmacokinetics, dosing considerations, monitoring, efficacy, and safety.
Chest 114 (1998) 489S-510S
61. Hull R.D., Raskob G.E., Hirsh J., Jay R.M., Leclerc J.R., Geerts W.H., Rosenbloom D., Sackett D.L., Anderson C., Harrison L. und .
Continuous intravenous heparin compared with intermittent subcutaneous heparin in the initial treatment of proximal-vein thrombosis.
N. Engl. J. Med. 315 (1986) 1109-1114
62. Iwai K., Ishikura H., Kaji M., Sugiura H., Ishizu A., Takahashi C., Kato H., Tanabe T. und Yoshiki T.
Importance of E-selectin (ELAM-1) and sialyl Lewis(a) in the adhesion of pancreatic carcinoma cells to activated endothelium.
Int. J. Cancer 54 (1993) 972-977
63. Jackson R.L., Busch S.J. und Cardin A.D.
Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes.
Physiol Rev. 71 (1991) 481-539
64. Jonas S., Sugimori M. und Llinas R.
Is low molecular weight heparin a neuroprotectant?
Ann. N. Y. Acad. Sci. 825 (1997) 389-393
65. Kabir S. und Daar G.A.
Serum levels of interleukin-1, interleukin-6 and tumour necrosis factor-alpha in patients with gastric carcinoma.
Cancer Lett. 95 (1995) 207-212
66. Kakkar A.K. und Williamson R.C.
Thromboprophylaxis in the cancer patient.
Haemostasis 28 Suppl 3 (1998) 61-65

67. Kakkar A.K. und Williamson R.C.
Antithrombotic therapy in cancer.
BMJ 318 (1999) 1571-1572
68. Kawarada Y., Ishikura H., Kishimoto T., Kato H., Yano T., Kato H. und Yoshiki T.
The role of sialylated Lewis antigens on hematogenous metastases of human pancreas carcinoma cell lines in vivo.
Pathol. Res. Pract. 196 (2000) 259-263
69. Keller U.
Pathophysiology of cancer cachexia.
Support. Care Cancer 1 (1993) 290-294
70. Kilgore K.S., Flory C.M., Miller B.F., Evans V.M. und Warren J.S.
The membrane attack complex of complement induces interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 secretion from human umbilical vein endothelial cells.
Am. J. Pathol. 149 (1996) 953-961
71. Kingston R.D., Fielding J.W. und Palmer M.K.
Peri-operative heparin: a possible adjuvant to surgery in colo-rectal cancer?
Int. J. Colorectal Dis. 8 (1993) 111-115
72. Klein C.L., Bittinger F., Kohler H., Wagner M., Otto M., Hermanns I. und Kirkpatrick C.J.
Comparative studies on vascular endothelium in vitro. 3. Effects of cytokines on the expression of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 by cultured human endothelial cells obtained from different passages.
Pathobiology 63 (1995) 83-92
73. Koenig A., Norgard-Sumnicht K., Linhardt R. und Varki A.
Differential interactions of heparin and heparan sulfate glycosaminoglycans with the selectins. Implications for the use of unfractionated and low molecular weight heparins as therapeutic agents.
J. Clin. Invest 101 (1998) 877-889
74. Kohanna F.H., Sweeney J., Hussey S., Zacharski L.R. und Salzman E.W.
Effect of perioperative low-dose heparin administration on the course of colon cancer.
Surgery 93 (1983) 433-438

75. Koopman M.M., Prandoni P., Piovella F., Ockelford P.A., Brandjes D.P., van der M.J., Gallus A.S., Simonneau G., Chesterman C.H. und Prins M.H.
Treatment of venous thrombosis with intravenous unfractionated heparin administered in the hospital as compared with subcutaneous low-molecular-weight heparin administered at home. The Tasman Study Group.
N. Engl. J. Med. 334 (1996) 682-687
76. Kraemer P.M.
Heparin releases heparan sulfate from the cell surface.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 78 (1977) 1334-1340
77. Kraling B.M., Razon M.J., Boon L.M., Zurakowski D., Seachord C., Darveau R.P., Mulliken J.B., Corless C.L. und Bischoff J.
E-selectin is present in proliferating endothelial cells in human hemangiomas.
Am. J. Pathol. 148 (1996) 1181-1191
78. Kudrijashov B.A., Kalishevskaya T.M. und Kolomina S.M.
Blood anticoagulating system and malignant tumours.
Nature 222 (1969) 548-550
79. Kurahara S., Shinohara M., Ikebe T., Nakamura S., Hiraki A., Sasaki M., Beppu M. und Shirasuna K.
Immunohistochemical study of sialyl Le(a) and sialyl Le(x) antigen in oral squamous cell carcinoma: the association of sialyl Le(a) expression with the metastatic potential.
Head Neck 21 (1999) 330-337
80. Kuschert G.S., Coulin F., Power C.A., Proudfoot A.E., Hubbard R.E., Hoogewerf A.J. und Wells T.N.
Glycosaminoglycans interact selectively with chemokines and modulate receptor binding and cellular responses.
Biochemistry 38 (1999) 12959-12968
81. Kuzu I., Bicknell R., Fletcher C.D. und Gatter K.C.
Expression of adhesion molecules on the endothelium of normal tissue vessels and vascular tumors.
Lab Invest 69 (1993) 322-328
82. Landefeld C.S., Cook E.F., Flatley M., Weisberg M. und Goldman L.
Identification and preliminary validation of predictors of major bleeding in hospitalized patients starting anticoagulant therapy.
Am. J. Med. 82 (1987) 703-713

83. Landefeld C.S., Rosenblatt M.W. und Goldman L.
Bleeding in outpatients treated with warfarin: relation to the prothrombin time and important remediable lesions.
Am. J. Med. 87 (1989) 153-159
84. Langley R.R., Russell J., Eppihimer M.J., Alexander S.J., Gerritsen M., Specian R.D. und Granger D.N.
Quantification of murine endothelial cell adhesion molecules in solid tumors.
Am. J. Physiol 277 (1999) H1156-H1166
85. Lebeau B., Chastang C., Brechot J.M., Capron F., Dautzenberg B., Delaisements C., Mornet M., Brun J., Hurdebourcq J.P. und Lemarie E.
Subcutaneous heparin treatment increases survival in small cell lung cancer. "Petites Cellules" Group.
Cancer 74 (1994) 38-45
86. Lensing A.W., Prins M.H., Davidson B.L. und Hirsh J.
Treatment of deep venous thrombosis with low-molecular-weight heparins. A meta-analysis.
Arch. Intern. Med. 155 (1995) 601-607
87. Letai A. und Kuter D.J.
Cancer, coagulation, and anticoagulation.
Oncologist. 4 (1999) 443-449
88. Lever R., Hoult J.R. und Page C.P.
The effects of heparin and related molecules upon the adhesion of human polymorphonuclear leucocytes to vascular endothelium in vitro.
Br. J. Pharmacol. 129 (2000) 533-540
89. Levine M., Gent M., Hirsh J., Leclerc J., Anderson D., Weitz J., Ginsberg J., Turpie A.G., Demers C. und Kovacs M.
A comparison of low-molecular-weight heparin administered primarily at home with unfractionated heparin administered in the hospital for proximal deep-vein thrombosis.
N. Engl. J. Med. 334 (1996) 677-681
90. Li Q. und Verma I.M.
NF-kappaB regulation in the immune system.
Nat. Rev. Immunol. 2 (2002) 725-734
91. Lin A. und Karin M.
NF-kappaB in cancer: a marked target.
Semin. Cancer Biol. 13 (2003) 107-114

92. Lin E., Calvano S.E. und Lowry S.F.
Inflammatory cytokines and cell response in surgery.
Surgery 127 (2000) 117-126

93. Lin Y.Z., Yao S.Y., Veach R.A., Torgerson T.R. und Hawiger J.
Inhibition of nuclear translocation of transcription factor NF-kappa B by a synthetic peptide containing a cell membrane-permeable motif and nuclear localization sequence.
J. Biol. Chem. 270 (1995) 14255-14258

94. Longo D.L.
Approach to the Patient with Cancer.
In: "Harrison's Principles and Practice of Internal Medicine",
Braunwald et al (Hrsg.), McGraw-Hill, New York (2001) 491-497.

95. Malek S., Huxford T. und Ghosh G.
Ikappa Balpha functions through direct contacts with the nuclear localization signals and the DNA binding sequences of NF-kappaB.
J. Biol. Chem. 273 (1998) 25427-25435

96. Matzsch T., Bergqvist D., Hedner U. und Ostergaard P.
Effects of an enzymatically depolymerized heparin as compared with conventional heparin in healthy volunteers.
Thromb. Haemost. 57 (1987) 97-101

97. Melder R.J., Koenig G.C., Witwer B.P., Safabakhsh N., Munn L.L. und Jain R.K.
During angiogenesis, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor regulate natural killer cell adhesion to tumor endothelium.
Nat. Med. 2 (1996) 992-997

98. Meyer T. und Hart I.R.
Mechanisms of tumour metastasis.
Eur. J. Cancer 34 (1998) 214-221

99. Miller M.D. und Krangel M.S.
Biology and biochemistry of the chemokines: a family of chemotactic and inflammatory cytokines.
Crit. Rev. Immunol. 12 (1992) 17-46

100. Miller S.J., Hoggat A.M. und Faulk W.P.
Heparin regulates ICAM-1 expression in human endothelial cells: an example of non-cytokine-mediated endothelial activation.
Thromb. Haemost. 80 (1998) 481-487

101. Minter A.J., Keoshkerian E., Chesterman C.N. und Dawes J.
Fibroblast growth factor and heparin protect endothelial cells from the effects of interleukin 1.
J. Cell Physiol 167 (1996) 229-237

102. Miyamoto M., Shimizu Y., Okada K., Kashii Y., Higuchi K. und Watanabe A.
Effect of interleukin-8 on production of tumor-associated substances and autocrine growth of human liver and pancreatic cancer cells.
Cancer Immunol. Immunother. 47 (1998) 47-57

103. Moldoveanu A.I., Shephard R.J. und Shek P.N.
Exercise elevates plasma levels but not gene expression of IL-1beta, IL-6, and TNF-alpha in blood mononuclear cells.
J. Appl. Physiol 89 (2000) 1499-1504

104. Morris V.L., Schmidt E.E., MacDonald I.C., Groom A.C. und Chambers A.F.
Sequential steps in hematogenous metastasis of cancer cells studied by in vivo videomicroscopy.
Invasion Metastasis 17 (1997) 281-296

105. Nelson R.M., Cecconi O., Roberts W.G., Aruffo A., Linhardt R.J. und Bevilacqua M.P.
Heparin oligosaccharides bind L- and P-selectin and inhibit acute inflammation.
Blood 82 (1993) 3253-3258

106. Nozawa F., Hirota M., Okabe A., Shibata M., Iwamura T., Haga Y. und Ogawa M.
Tumor necrosis factor alpha acts on cultured human vascular endothelial cells to increase the adhesion of pancreatic cancer cells.
Pancreas 21 (2000) 392-398

107. Ornstein D.L. und Zacharski L.R.
The use of heparin for treating human malignancies.
Haemostasis 29 Suppl S1 (1999) 48-60

108. Orr F.W., Wang H.H., Lafrenie R.M., Scherbarth S. und Nance D.M.
Interactions between cancer cells and the endothelium in metastasis.
J. Pathol. 190 (2000) 310-329

109. Osborn L.
Leukocyte adhesion to endothelium in inflammation.
Cell 62 (1990) 3-6

-
110. Pass H.I.
Biology of metastatic disease.
Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg. 14 (2002) 10-17
111. Penc S.F., Pomahac B., Eriksson E., Detmar M. und Gallo R.L.
Dermatan sulfate activates nuclear factor-kappaB and induces endothelial and circulating intercellular adhesion molecule-1.
J. Clin. Invest 103 (1999) 1329-1335
112. Pennica D., Nedwin G.E., Hayflick J.S., Seeburg P.H., Derynck R., Palladino M.A., Kohr W.J., Aggarwal B.B. und Goeddel D.V.
Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin.
Nature 312 (1984) 724-729
113. Poste G. und Fidler I.J.
The pathogenesis of cancer metastasis.
Nature 283 (1980) 139-146
114. Poutsika D.D., Clark B.D., Vannier E. und Dinarello C.A.
Production of interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 beta by peripheral blood mononuclear cells is differentially regulated.
Blood 78 (1991) 1275-1281
115. Ray K.P., Farrow S., Daly M., Talabot F. und Searle N.
Induction of the E-selectin promoter by interleukin 1 and tumour necrosis factor alpha, and inhibition by glucocorticoids.
Biochem. J. 328 (Pt 2) (1997) 707-715
116. Reeves M.E.
A metastatic tumor cell line has greatly reduced levels of a specific homotypic cell adhesion molecule activity.
Cancer Res. 52 (1992) 1546-1552
117. Rosenberg R.D. und Lam L.
Correlation between structure and function of heparin.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 76 (1979) 1218-1222
118. Ruoslahti E. und Pierschbacher M.D.
New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins.
Science 238 (1987) 491-497
119. Sandset P.M., Abildgaard U. und Larsen M.L.
Heparin induces release of extrinsic coagulation pathway inhibitor (EPI).
Thromb. Res. 50 (1988) 803-813

-
120. Sciumbata T., Caretto P., Pirovano P., Pozzi P., Cremonesi P., Galimberti G., Leoni F. und Marcucci F.
Treatment with modified heparins inhibits experimental metastasis formation and leads, in some animals, to long-term survival.
Invasion Metastasis 16 (1996) 132-143
121. Sheen-Chen S.M., Chen W.J., Eng H.L. und Chou F.F.
Serum concentration of tumor necrosis factor in patients with breast cancer.
Breast Cancer Res. Treat. 43 (1997) 211-215
122. Siragusa S.
Low molecular weight heparins could be important in cancer [letter; comment].
BMJ 319 (1999) 851
123. Siragusa S., Cosmi B., Piovella F., Hirsh J. und 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 (1996) 269-277
124. Smorenburg S.M. und Van Noorden C.J.
The complex effects of heparins on cancer progression and metastasis in experimental studies.
Pharmacol. Rev. 53 (2001) 93-105
125. Sobel M., McNeill P.M., Carlson P.L., Kermode J.C., Adelman B., Conroy R. und Marques D.
Heparin inhibition of von Willebrand factor-dependent platelet function in vitro and in vivo.
J. Clin. Invest 87 (1991) 1787-1793
126. Sorensen H.T., Mellekjaer L., Steffensen F.H., Olsen J.H. und Nielsen G.L.
The risk of a diagnosis of cancer after primary deep venous thrombosis or pulmonary embolism.
N. Engl. J. Med. 338 (1998) 1169-1173
127. Staal-van den Brekel AJ, Thunnissen F.B., Buurman W.A. und Wouters E.F.
Expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 and vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 in non-small-cell lung carcinoma.
Virchows Arch. 428 (1996) 21-27
128. Stoolman L.M.
Adhesion molecules controlling lymphocyte migration.
Cell 56 (1989) 907-910

-
129. Stratowa C. und Audette M.
Transcriptional regulation of the human intercellular adhesion molecule-1 gene: a short overview.
Immunobiology 193 (1995) 293-304
130. Sung K.L., Saldivar E. und Phillips L.
Interleukin-1 beta induces differential adhesiveness on human endothelial cell surfaces.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 202 (1994) 866-872
131. Takada A., Ohmori K., Takahashi N., Tsuyuoka K., Yago A., Zenita K., Hasegawa A. und Kannagi R.
Adhesion of human cancer cells to vascular endothelium mediated by a carbohydrate antigen, sialyl Lewis A.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 179 (1991) 713-719
132. Tedder T.F., Steeber D.A., Chen A. und Engel P.
The selectins: vascular adhesion molecules.
FASEB J. 9 (1995) 866-873
133. Thourani V.H., Brar S.S., Kennedy T.P., Thornton L.R., Watts J.A., Ronson R.S., Zhao Z.Q., Sturrock A.L., Hoidal J.R. und Vinten-Johansen J.
Nonanticoagulant heparin inhibits NF-kappaB activation and attenuates myocardial reperfusion injury.
Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol 278 (2000) H2084-H2093
134. Van Kampen C. und Mallard B.A.
Regulation of bovine E-selectin expression by recombinant tumor necrosis factor alpha and lipopolysaccharide.
Vet. Immunol. Immunopathol. 79 (2001) 151-165
135. Vannucchi S., Pasquali F., Porciatti F., Chiarugi V., Magnelli L. und Bianchini P.
Binding, internalization and degradation of heparin and heparin fragments by cultured endothelial cells.
Thromb. Res. 49 (1988) 373-383
136. Vidal-Vanaclocha F., Alvarez A., Asumendi A., Urcelay B., Tonino P. und Dinarello C.A.
Interleukin 1 (IL-1)-dependent melanoma hepatic metastasis in vivo; increased endothelial adherence by IL-1-induced mannose receptors and growth factor production in vitro.
J. Natl. Cancer Inst. 88 (1996) 198-205

137. Walz G., Aruffo A., Kolanus W., Bevilacqua M. und Seed B.
Recognition by ELAM-1 of the sialyl-Lex determinant on myeloid and tumor cells.
Science 250 (1990) 1132-1135
138. Wan J.G., Mu J.S., Zhu H.S., und Geng J.G.
N-desulfated non-anticoagulant heparin inhibits leukocyte adhesion and transmigration in vitro and attenuates acute peritonitis and ischemia and reperfusion injury in vivo
Inflamm. Res. 51 (2002) 435-443
139. Watson J.V.
Immunofluorescence Data.
In: "Flow Cytometry Data Analysis: Basic Concepts and Statistics", Cambridge University Press, New York (1992) 101-125.
140. Weiss L.
Metastasis.
Cell Biophys. 23 (1993) 1-2
141. Weiss L.
Cell adhesion molecules: a critical examination of their role in metastasis.
Invasion Metastasis 14 (1994) 192-197
142. Weitz J.I.
Low-molecular-weight heparins.
N. Engl. J. Med. 337 (1997) 688-698
143. Wight T.N., Kinsella M.G. und Qwarnstrom E.E.
The role of proteoglycans in cell adhesion, migration and proliferation.
Curr. Opin. Cell Biol. 4 (1992) 793-801
144. Wilson J. und Balkwill F.
The role of cytokines in the epithelial cancer microenvironment.
Semin. Cancer Biol. 12 (2002) 113-120
145. Wu N.Z., Klitzman B., Dodge R. und Dewhirst M.W.
Diminished leukocyte-endothelium interaction in tumor microvessels.
Cancer Res. 52 (1992) 4265-4268
146. Wulczyn F.G., Krappmann D. und Scheidereit C.
The NF-kappa B/Rel and I kappa B gene families: mediators of immune response and inflammation.
J. Mol. Med. 74 (1996) 749-769

147. Ye C., Kiriyaama K., Mistuoka C., Kannagi R., Ito K., Watanabe T., Kondo K., Akiyama S. und Takagi H.
Expression of E-selectin on endothelial cells of small veins in human colorectal cancer.
Int. J. Cancer 61 (1995) 455-460
148. Young E., Cosmi B., Weitz J. und Hirsh J.
Comparison of the non-specific binding of unfractionated heparin and low molecular weight heparin (Enoxaparin) to plasma proteins.
Thromb. Haemost. 70 (1993) 625-630
149. Young E., Wells P., Holloway S., Weitz J. und Hirsh J.
Ex-vivo and in-vitro evidence that low molecular weight heparins exhibit less binding to plasma proteins than unfractionated heparin.
Thromb. Haemost. 71 (1994) 300-304
150. Zacharski L.R. und Ornstein D.L.
Heparin and cancer.
Thromb. Haemost. 80 (1998) 10-23

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3-1 Auswahl potentieller Zielstrukturen für Heparine bezüglich maligner Prozesse	10
Abbildung 5-1 Schematische Übersichtsdarstellung der in-vitro Adhäsionsversuche	23
Abbildung 5-2 Definition einer Region am Beispiel einer HUVEC Population	28
Abbildung 5-3 Beispiel von HUVEC Populationen	29
Abbildung 6-1 Zytokinspezifische Stimulation der Adhäsion von Pa-Tu-8902 an HUVEC	38
Abbildung 6-2 Stimulation der Adhäsion von Pa-Tu-8902 an HUVEC durch IL-1 β und TNF α in Abhängigkeit von Inkubationszeit und Konzentration	39
Abbildung 6-3 Hemmung der Adhäsion von Pa-Tu-8902 an proinflammatorisch stimulierte HUVEC durch monoklonale Antikörper gegen tumorzellassoziertes Sialyl Lewis _a (CA 19-9) und gegen endotheliales E-Selektin	40
Abbildung 6-4 Einfluss von UFH und LMWH in physiologischer Dosierung auf die Adhäsion von Pa-Tu-8902 auf unstimulierte und proinflammatorisch stimulierte HUVEC	41
Abbildung 6-5 und Abbildung 6-6 Einfluss von UFH und LMWH in physiologischer Dosierung auf die Adhäsion von Pa-Tu-8902 auf proinflammatorisch stimulierte HUVEC	42
Abbildung 6-7 Einfluss der stimulationssynchronen Gabe von UFH und LMWH auf die Tumorzelladhäsion an IL-1 β stimulierte HUVEC	43
Abbildung 6-8 Einfluss der stimulationssynchronen Gabe von UFH und LMWH auf die Tumorzelladhäsion an TNF α stimulierte HUVEC	44
Abbildung 6-9 Einfluss der Präinkubation (2 h) von HUVEC mit UFH und LMWH vor IL-1 β Stimulation auf die endotheliale Adhäsion von Pa-Tu-8902	45
Abbildung 6-10 Einfluss der Präinkubation (2 h) von HUVEC mit LMWH vor IL-1 β Stimulation auf die Adhäsion von EPAM-98	46
Abbildung 6-11 Adhäsion von Pa-Tu-8902 an nicht stimulierte HUVEC	47
Abbildung 6-12 Adhäsion von Pa-Tu-8902 an HUVEC	48
Abbildung 6-13 Proinflammatorisch stimulierte HUVEC	48

Abbildung 6-14 Adhäsion von Pa-Tu-8902 an proinflammatorisch stimulierte HUVEC	49
Abbildung 6-15 Durch Anti-Sialyl Lewis _a inhibierte Adhäsion von Pa-Tu-8902 an proinflammatorisch stimulierte HUVEC	49
Abbildung 6-16 Durch Präinkubation mit LMWH (500U/ml/2h) verminderte zytokininduzierte Stimulation (IL-1 β , 1ng/ml/4h) von HUVEC und assoziierte geringere Dichte der endothelialen Adhäsion von Pa-Tu-8902	50
Abbildung 6-17 Durchflusszytometrische Analyse von ausgewählten Epitopen am Beispiel EPAM-98.....	51
Abbildung 6-18 Durchflusszytometrisch bestimmte Expression von E-Selektin auf HUVEC in Abhängigkeit der Zytokin- Stimulation (1ng/ml/4 h).....	52
Abbildung 6-19 Histogramme der durchflusszytometrischen Analysen der E-Selektin Expression auf HUVEC in Abhängigkeit von der Zytokinstimulation .	53
Abbildung 6-20 Durchflusszytometrisch bestimmte Expression von E-Selektin auf HUVEC in Abhängigkeit von der Konzentration der IL-1 β Stimulation	54
Abbildung 6-21 Beispiele aus der durchflußzytometrischen Bestimmung der Expression von E-Selektin auf HUVEC in Abhängigkeit von der Konzentration der IL-1 β Stimulation	54
Abbildung 6-22 Histogramme der durchflusszytometrischen Bestimmung der Expression von E-Selektin auf HUVEC in Abhängigkeit von der Dauer der IL-1 β Stimulation (1ng/ml).....	55
Abbildung 6-23 Expression von E-Selektin auf HUVEC in Abhängigkeit von der Dauer der IL-1 β Stimulation (1ng/ml).....	55
Abbildung 6-24 Einfluss der Inkubation von HUVEC mit UFH und LMWH vor, während und nach proinflammatorischer IL-1 β Stimulation auf die Expression von E-Selektin.	56
Abbildung 6-25 Beispiel- Histogramme der durchflusszytometrisch bestimmten Expression von E-Selektin auf HUVEC	57
Abbildung 6-26 Einfluss der Dauer der Präinkubation von HUVEC mit LMWH bezüglich der IL-1 β induzierten endothelialen E-Selektin Expression	57
Abbildung 6-27 Einfluss der Dosierung der Präinkubation mit LMWH bezüglich der maximalen IL-1 β Stimulation (1ng/ml/4 h) von HUVEC auf die Expression von E-Selektin	58

Abbildung 6-28 und Abbildung 6-29 Histogramme der durchflusszytometrisch bestimmten Auswirkung einer zweistündigen Präinkubation mit LMWH auf die Expression von E-Selektin auf IL-1 β stimulierte HUVEC (1ng/ml/4 h)	59
Abbildung 6-30 Einfluss der Dosierung der Präinkubation mit LMWH bezüglich der TNF α Stimulation (1ng/ml/4 h) von HUVEC auf die endotheliale Expression von E-Selektin	60
Abbildung 6-31 mRNA Expression von E-Selektin (a) und GAPDH (b) in den HUVEC Populationen (1) „keine Stimulation, keine Inhibition“, (2) „IL-1 β Stimulation, keine Inhibition“, und (3) „IL-1 β Stimulation nach Präinkubation mit LMWH“	61
Abbildung 7-1 Schema zur antikoagulativen Heparinwirkung.....	65
Abbildung 7-2 Allgemeines Schema der metastatischen Kaskade	75
Abbildung 7-3 Vereinfachte Darstellung der NF- κ B Signalkaskade im Ausschnitt und mögliche Angriffspunkte von Heparinen	98

11 Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei allen, die diese Doktorarbeit ermöglicht und zu ihrem Gelingen beigetragen haben.

An erster Stelle gilt der Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Christian Lersch für die Vergabe des Themas. Er ermöglichte mir die Durchführung der Arbeit in der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik und gewährte mir dabei Unterstützung in jeglicher Hinsicht.

Herrn Dr. med. Wolfgang Reindl möchte ich für die stets verfügbare, kompetente und geduldige Beratung und Betreuung sowie zahlreichen Anregungen während der gesamten Arbeit danken.

Frau Dr. med. Nicole Endres half mir, die ersten Schwierigkeiten zu Beginn der Arbeit zu überwinden.

Hilfsbereite Ansprechpartner bei der Durchführung der Experimente fand ich bei vielen Mitarbeitern des Labors und der Klinik. Die freundliche Aufnahme und stets kollegiale Arbeitsatmosphäre haben entscheidend zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Ulrike Semmelmayr danke ich dafür, dass sie immer für mich da ist.

Meiner Familie, besonders meinen Eltern möchte ich für ihre Unterstützung danken.

12 Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name Oliver Weigert
Geburtsdatum 03. Februar 1975
Geburtsort Regensburg

Schulausbildung

1981 – 1985 Grundschule am Sallerner Berg, Regensburg
1985 – 1994 Werner von Siemens Gymnasium, Regensburg
1994 Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

1994 – 1995 Krankenpflegetätigkeit, Caritas Krankenhaus St. Josef, Regensburg

Studium

1995 – 1997 Medizinstudium, vorklinischer Abschnitt, Universität Regensburg
1997 Ärztliche Vorprüfung
1997 – 2002 Medizinstudium, klinischer Abschnitt, Technische Universität München
1998 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
1998 United States Medical Licensing Examination, Step 1
2001 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2001 – 2002 Praktisches Jahr:
Memorial Sloan Kettering Cancer Center- New York (Innere Medizin)
Hôpital Cochin Port Royal- Paris, Klinikum Rechts der Isar- München (Anästhesie)
Klinikum der Universität München- Passau (Chirurgie)
2002 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2002 United States Medical Licensing Examination Step 2

Beruf

2002 – 2003 Arzt im Praktikum, Klinikum der Ludwig Maximilians Universität München,
Klinikum Großhadern, Medizinische Klinik und Poliklinik III
2003 Approbation
Seit 2003 Assistenzarzt, Klinikum der Ludwig Maximilians Universität München,
Klinikum Großhadern, Medizinische Klinik und Poliklinik III

Wissenschaftliche Tätigkeit

Forschungstätigkeit im Rahmen der klinischen Kooperationsgruppe (KKG) Lymphome und Leukämien
Klinische Studien zur wirkungsverstärkten Antikörpertherapie und Molekulartherapie bei Non-Hodgkin-
Lymphomen