

Wirkmechanistische Untersuchungen antiangiogener Galactansulfate



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Naturwissenschaftlichen Fakultät IV
- Chemie und Pharmazie -
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Jutta Bürgermeister
aus Plattling

2002

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Januar 1999 bis Dezember 2001 am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Universität Regensburg.

Die Arbeit wurde angeleitet von:

PD Dr. D. H. Paper

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:

08.05.2002

Tag der mündlichen Prüfung:

03.06.2002

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. G. Franz (Vorsitzender)

PD Dr. D. H. Paper (Erstgutachter)

Prof. Dr. A. Göpferich (Zweitgutachter)

Prof. Dr. A. Buschauer

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Insbesondere gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Gerhard Franz für die vertrauensvolle Überlassung des Themas, das beständige Interesse am Fortgang der Arbeit und die vielfältige Unterstützung.

Besonders danken möchte ich Herrn PD Dr. Dietrich H. Paper für die ausdauernde Betreuung und gute Zusammenarbeit, für kritische fachliche Diskussionen und mühsames Korrekturlesen. Danke aber auch für motivierende Gespräche zur rechten Zeit, spannende Kongressbesuche und viel Spaß im Praktikum PB III.

Ich danke

- Herrn Prof. Dr. Armin Buschauer für die Überlassung des Fluoreszenzspektrometers und Densitometers,
- Herrn PD Dr. Günther Bernhardt für geduldiges Experimentieren und gute Ratschläge,
- Frau Susanne Bollwein für die Kultivierung der Gliomazellen und die Unterstützung bei der Durchführung der Zellkulturversuche,
- Herrn Prof. Dr. Achim Göpferich und Herrn Dr. Werner Vogelhuber für die interessante Kooperation im dreidimensionalen Tumormodell-Projekt.

Weiterhin ein großes Dankeschön an alle (ehemaligen) Mitglieder des Lehrstuhls für das angenehme Arbeitsklima und das kollegiale Miteinander, insbesondere an

- die Ehemaligen vom PB III Team: Meinen Laborkollegen Herrn Dr. Marco Marchesan für stets gute Laune und Einweihung in das Geheimnis der Agarosering-Herstellung und Herrn Dr. Christian Käsbauer für wertvolle praktische Labortipps und stapelweise Literatur,
- Herrn Dr. Harald Schuhbaum für die musikalische Horizontweiterung und angenehme Atmosphäre während der wöchentlichen Eierschlachten,
- Herrn Dietmar Heigl, der die personalgeschwächte PB III Truppe verstärkte, für so manche hitzige Diskussion im Praktikum und gemeinsame sportliche Höchstleistungen,
- Frau Antonella Azzolina für die tatkräftige Unterstützung beim CAM-Assay, ihre unkomplizierte Art und die gesangliche Aufhellung des Laboralltags,
- Frau Dr. Claudia Sturm für die Einweisung in die Lehrstuhlsitten und ihre Hilfsbereitschaft bei verschiedensten Laborproblemen,

- Herrn Musuyu Muganza, der zeitweise das Labor mit allerlei seltsamen afrikanischen Drogen beschlagnahmte und für eine gewisse Auffrischung meiner Französischkenntnisse sorgte, für seine unübertroffene Sangeskunst,
- alle, die sich je dem freitäglichen Eierkampf gestellt haben, insbesondere Frau Hana Schmid, die Generationen von Auszubildenden sowie Herrn Bernhard Meilhammer,
- Frau Anne Grashuber für die exzellente Vorbereitung und Unterstützung während der Praktika,
- das PB II Team um Frau PD Dr. Susanne Alban, Frau Dr. Michaela Braun, Frau Maria Lafffranchini, Herrn Markus Becker und Herrn Dr. Helmut Stibich für die gute Zusammenarbeit.

Meiner Familie für die Unterstützung und die unendliche Geduld während der letzten Jahre:

Danke

1	EINLEITUNG	1
1.1	Angiogenese	1
1.1.1	Kapillarbildung	3
1.1.2	Regulatoren der Angiogenese	4
1.2	Arten der Angiogenese	8
1.3	Antiangiogene Therapie	10
1.4	Angiogeneseinhibitoren	13
1.4.1	Endogene Angiogeneseinhibitoren	13
1.4.2	Angiostatische Steroide	15
1.4.3	Naturstoffe und ihre Derivate	16
1.4.3.1	Combretastatin A-4	16
1.4.3.2	Fumagillin und partialsynthetische Derivate	17
1.4.4	Synthetische Angiogeneseinhibitoren	18
1.4.4.1	Phosphomannopentaosesulfat	18
1.4.4.2	Matrixmetalloproteinase-Inhibitoren	18
1.4.4.3	Verbindungen, die mit VEGF interagieren	19
1.4.4.4	Integrin-Antagonisten	20
1.4.4.5	Suramin	20
1.4.4.6	Thalidomid	21
1.4.5	Neuartige Angriffspunkte	22
1.4.6	Antiangiogene Gentherapie	23
1.5	Angiogenese und sulfatierte Kohlenhydrate	23
2	PROBLEMSTELLUNG.....	27
3	TESTSUBSTANZEN.....	29
3.1	Polysaccharide.....	29
3.1.1	Galactane	29
3.1.1.1	lineare α -1,3/ β -1,4-D-Galactane (Carrageenane)	29
3.1.1.2	lineare β -1,4-D-Galactane	30
3.1.1.3	lineare α -1,4-D-Galactane	31
3.1.1.4	β -1,3-D-Galactane	31
3.1.2	Glucane	32
3.1.3	Sonstige Kohlenhydrate	32
3.2	Oligosaccharide	33
4	IN VIVO TESTUNG	34
4.1	<i>In vivo</i> Angiogenese-Testmodelle.....	34

4.2	CAM-Assay.....	37
4.2.1	Durchführung des CAM-Assays.....	38
4.2.2	Ergebnisse der Testung im CAM-Assay.....	41
4.2.2.1	Dosis-Wirkungsbeziehung.....	42
4.2.2.2	Standardsubstanzen und Glucosaminoglykane.....	43
4.2.2.3	Bedeutung des Kohlenhydratgrundgerüsts des sulfatierten Polymers.....	45
4.2.2.4	Bedeutung des Molekulargewichts.....	46
4.2.2.5	Diskussion der pharmakologischen und strukturellen Parameter.....	48
4.3	HET-CAM-Assay	49
4.3.1	Entzündung	49
4.3.2	HET-CAM-Assay als alternatives Entzündungsmodell	51
4.3.2.1	Durchführung des modifizierten HET-CAM-Assays	52
4.3.3	Ergebnisse der Testung im HET-CAM-Assay	56
4.3.3.1	Dosis-Wirkungsbeziehung	56
4.3.3.2	unsubstituierte Galactane	57
4.3.3.3	Bedeutung des Sulfatierungsgrads	58
4.3.3.4	Bedeutung des Kohlenhydratgrundgerüsts	60
4.3.3.5	Bedeutung der Position der Sulfatgruppen	64
4.3.3.6	Bedeutung des Molekulargewichts	69
4.3.3.7	Bedeutung der Lipophilie	71
4.3.3.8	Art der Substituenten	72
4.3.3.9	Diskussion der pharmakologischen und strukturellen Parameter	73
4.4	TUM-CAM-Assay	75
4.4.1	Tumorangiogenese	75
4.4.2	Primäre Tumoren des zentralen Nervensystems	76
4.4.2.1	Glioblastom - Inzidenz und Morphologie	76
4.4.2.2	Glioblastom - Regulation der Angiogenese	77
4.4.2.3	Glioblastom - neue Therapieansätze	78
4.4.2.4	Charakterisierung der Zelllinie U-87 MG	79
4.4.3	TUM-CAM-Assay als Modell der tumorzellinduzierten Angiogenese	79
4.4.3.1	Durchführung des TUM-CAM-Assays	81
4.4.4	Ergebnisse der Testung im TUM-CAM-Assay	85
4.4.4.1	Dosis-Wirkungsbeziehung	86
4.4.4.2	Standardsubstanzen, Heparin und Saccharoseoctasulfat	87
4.4.4.3	Bedeutung des Sulfatierungsgrads	88
4.4.4.4	Bedeutung des Kohlenhydratgrundgerüsts	90
4.4.4.5	Bedeutung der Position der Sulfatgruppen	93
4.4.4.6	Bedeutung des Molekulargewichts und der Lipophilie	97
4.4.4.7	Art der Substituenten	98
4.4.4.8	Diskussion der pharmakologischen und strukturellen Parameter	100
4.4.5	FGF-2-CAM-Assay als Modell der FGF-2 induzierten Angiogenese	101
4.5	Vergleich der <i>in vivo</i> Assays.....	102
4.5.1	Screening.....	102
4.5.2	Struktur-Wirkungsbeziehungen	106

5	<i>IN VITRO TESTUNG</i>.....	109
5.1	<i>In vitro Angiogenese-Testmodelle.....</i>	109
5.2	Interaktion mit Wachstumsfaktoren (FGF-2, VEGF) und IL-2	110
5.2.1	Interaktion mit FGF-2	112
5.2.1.1	Gelpermeationschromatographie	112
5.2.1.2	Fluoreszenzuntersuchungen.....	115
5.2.1.2.1	Durchführung der Fluoreszenzuntersuchungen	116
5.2.1.2.2	Ergebnisse der Fluoreszenzuntersuchungen	120
5.2.1.2.3	Zusammenfassung.....	122
5.2.1.3	Trypsin-Verdau-Assay (FGF-2).....	123
5.2.1.3.1	Durchführung des Trypsin-Verdau-Assays	123
5.2.1.3.2	Ergebnisse des Trypsin-Verdau-Assays	125
5.2.1.3.2.1	Dosis-Wirkungsbeziehung	125
5.2.1.3.2.2	Unsubstituierte Polysaccharide und Oligosaccharidsulfate.....	126
5.2.1.3.2.3	lineare α -1,3/ β -1,4-D-Galactane (Carrageenane).....	127
5.2.1.3.2.4	lineare β -1,4-D-Galactane (LuPS-sulfate)	128
5.2.1.3.2.5	α -1,4- und β -1,3-D-Galactane	129
5.2.1.3.2.6	Glucane	130
5.2.1.3.2.7	Sonstige Kohlenhydrate	131
5.2.1.3.2.8	Zeitabhängigkeit des protektiven Effekts	132
5.2.1.3.2.9	Substanzkombinationen	133
5.2.1.3.3	Zusammenfassung.....	135
5.2.2	Interaktion mit IL-2 (Trypsin-Verdau-Assay)	137
5.2.2.1	Durchführung des Trypsin-Verdau-Assays (IL-2).....	139
5.2.2.2	Ergebnisse des Trypsin-Verdau-Assays (IL-2).....	140
5.2.2.2.1	Dosis-Wirkungsbeziehung	140
5.2.2.2.2	Heparine, unsubstituierte Polysaccharide und Oligosaccharidsulfate	142
5.2.2.2.3	lineare α -1,3/ β -1,4-D-Galactane (Carrageenane).....	143
5.2.2.2.4	lineare β -1,4-D-Galactane (LuPS-sulfate)	144
5.2.2.2.5	α -1,4- und β -1,3-D-Galactane	145
5.2.2.2.6	Glucane	146
5.2.2.2.7	Sonstige Kohlenhydrate	147
5.2.2.3	Zusammenfassung.....	148
5.2.3	Interaktion mit VEGF	150
5.2.3.1	Durchführung des Zellkultur-Assays.....	151
5.2.3.2	Ergebnisse des Zellkultur-Assays	153
5.2.3.3	Zusammenfassung.....	156
5.3	Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse der <i>in vitro</i> Assays.....	157
5.3.1	Vergleich U-87 MG Zellkultur-Assay mit Trypsin-Verdau-Assay (FGF-2).....	157
5.3.2	Vergleich Fluoreszenzuntersuchungen mit <i>in vivo</i> Assays.....	158
5.3.2.1	Gesamtbeurteilung	160
5.3.3	Vergleich Trypsin-Verdau-Assays (FGF-2, IL-2) mit <i>in vivo</i> Assays	160
5.3.3.1	Gesamtbeurteilung	163

6	ZUSAMMENFASSUNG	164
6.1	<i>In vivo</i> Testung	164
6.1.1	CAM-Assay	164
6.1.2	HET-CAM-Assay	164
6.1.3	TUM-CAM-Assay	165
6.2	<i>In vitro</i> Testung	165
6.2.1	Interaktion mit FGF-2	165
6.2.2	Interaktion mit IL-2	166
6.2.3	Interaktion mit VEGF	166
6.3	Screening.....	167
6.4	Therapeutische Relevanz.....	168
7	MATERIAL UND METHODEN	169
7.1	Standardsubstanzen.....	169
7.2	Nicht synthetisierte Testsubstanzen, Chemikalien und Lösungsmittel	169
7.3	Testsubstanzen	170
7.3.1	Polysaccharide	170
7.3.1.1	Galactane.....	170
7.3.1.1.1	lineare α -1,3/ β -1,4-D-Galactane (Carrageenane).....	170
7.3.1.1.2	lineare β -1,4-D-Galactane.....	171
7.3.1.1.3	lineare α -1,4-D-Galactane	172
7.3.1.1.4	β -1,3-D-Galactane	172
7.3.1.2	Glucane	173
7.3.1.3	Sonstige Kohlenhydrate	174
7.3.2	Oligosaccharide.....	175
7.4	<i>In vivo</i> Testung	175
7.4.1	CAM-Assay	176
7.4.2	HET-CAM-Assay	177
7.4.3	TUM-CAM-Assay	177
7.5	<i>In vitro</i> Testung	179
7.5.1	Interaktion mit FGF-2	179
7.5.1.1	Gelpermeationschromatographie	179
7.5.1.2	Fluoreszenzuntersuchungen	180
7.5.1.3	Trypsin-Verdau-Assay (FGF-2).....	181
7.5.2	Interaktion mit IL-2 (Trypsin-Verdau-Assay)	183
7.5.3	Interaktion mit VEGF (Zellkultur-Assay)	184
7.6	Statistische Auswertung	188

8	ANHANG.....	189
8.1	Tabellarische Darstellung der Ergebnisse	189
8.1.1	Einzelergebnisse	189
8.1.2	Gesamtdarstellung der Ergebnisse	195
8.2	Vereinfachtes Modell der Angiogenese.....	197
9	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	198
10	LITERATURVERZEICHNIS.....	202

1 Einleitung

1.1 Angiogenese

Angiogenese leitet sich vom griechischen Wort für Gefäß ab und bezeichnet die Bildung neuer Kapillaren aus bestehenden Blutgefäßen. Die Endothelzellen (EC) der Gefäßwand spielen dabei eine führende Rolle. Im gesunden adulten Organismus beträgt deren Proliferationsrate Monate bis mehrere Jahre, während der Angiogenese dagegen nur wenige Tage [1,2]. Nur bei der Wundheilung, Embryonalentwicklung und Ovulation findet eine zeitlich begrenzte Kapillarneubildung statt (physiologische Angiogenese). Angiogenese ist ein in vielen Schritten ablaufender Prozess mit ineinander greifenden Wirkmechanismen. Störungen des Gleichgewichtes können aufgrund gesteigertem oder ungenügendem Kapillarwachstum (pathologische Angiogenese) zu einer Vielzahl von Erkrankungen führen (s. Abbildung 1).

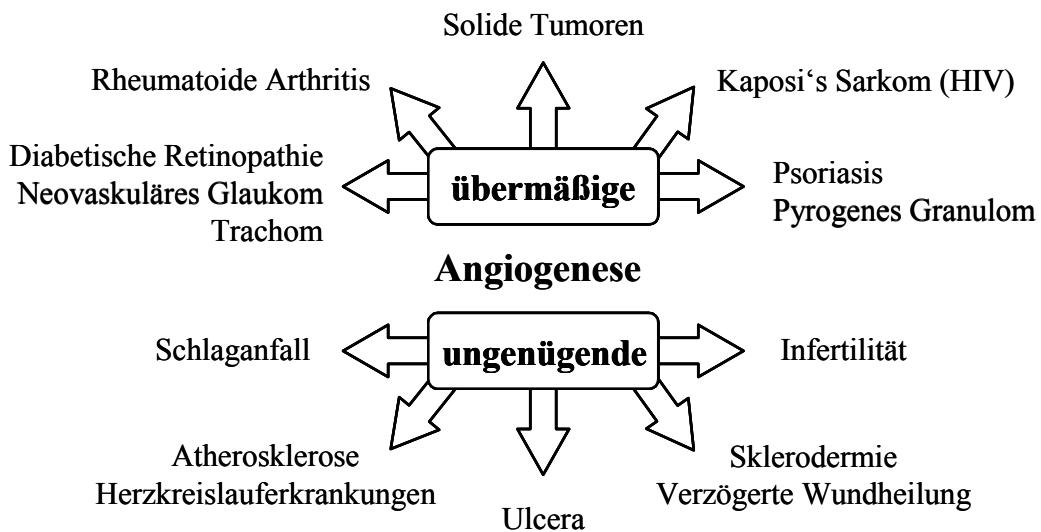


Abbildung 1: angiogeneseabhängige Erkrankungen (modifiziert nach [3])

Die exzessive Neubildung von Kapillaren kann u.a. verschiedene Augenerkrankungen verursachen, die bis zur Erblindung führen können [4]. Auch juvenile Hämangiome [5], rheumatoide Arthritis [6] und Tumorerkrankungen [7] sind angiogeneseabhängig. Periphere arterielle Verschlusskrankheit und koronare Herzkrankheit sind durch ungenügende Angiogenese gekennzeichnet [8]. Ebenso zählen Infertilität [9], Ulcus [10] und verzögerte Wundheilung zu den angiogenen Erkrankungen. Die pathologische Angiogenese kann

entweder Ursache der Erkrankung sein (z.B. diabetische Retinopathie) oder diese aufrechterhalten und deren Progression fördern (z.B. Wachstum solider Tumoren).

Krebserkrankungen sind die zweithäufigste Todesursache in Deutschland nach Herz-Kreislauferkrankungen [11]. Viele endogene (z.B. erbliche Disposition, gestörte Immunfunktion, Hormone) und exogene Faktoren (z.B. ionisierende Strahlen, UV-Licht, chemische Karzinogene, Asbeststaub, onkogene Viren) [12] können zur Entartung einer gesunden Körperzelle führen, wobei heute 95% der Krebserkrankungen exogenen Einflüssen (z.B. falsche Ernährung, Tabakkonsum) zugeschrieben werden. Nur 5% der Erkrankungen sind genetisch bedingt, 2% die Folge von Umwelteinflüssen [13]. Während des Tumorwachstums und der Metastasierung spielt die Angiogenese eine entscheidende Rolle. Diesen Zusammenhang stellte J. Folkman schon vor 30 Jahren fest. Ohne Anschluss an ein neues Blutgefäßsystem kann ein Tumorzellhaufen nur bis zu einer Größe von $1-3 \text{ mm}^3$ wachsen, da die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff sowie der Abtransport von Stoffwechselprodukten allein durch Diffusion nicht ausreichend ist [14].

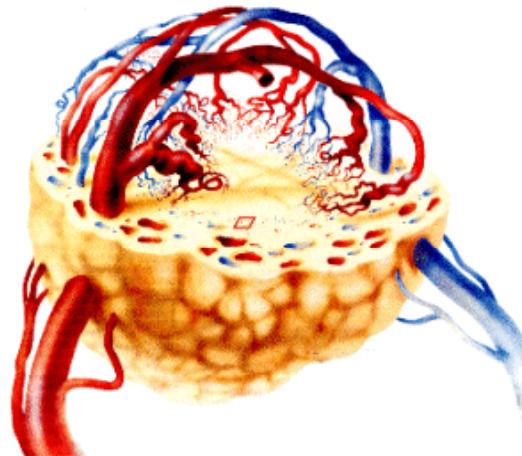


Abbildung 2: Vaskularisation eines Tumors [3]

Neue Kapillaren sollten auch antineoplastischen Wirkstoffen den Zutritt zu den proliferierenden Tumorzellen ermöglichen. Jedoch verursachen undichte Kapillaren einen Anstieg des interstitiellen Drucks, welcher die Diffusion des Wirkstoffs innerhalb des Tumors limitiert und die Verbreitung der Tumorzellen in den Blutstrom begünstigt. Möglicherweise erklärt dies die Tumorausbreitung und Entstehung von Metastasen [15]. Andererseits verstärken Angiogeneseinhibitoren die Wirkung der traditionellen Chemo- und Radiotherapie [16,17]. Die Angiosuppression führt nicht, wie erwartet, zu einem verminderten Blutfluss in den Tumor und somit zu einer reduzierten Arzneistoffpenetration, sondern bewirkt eine vorübergehende Normalisierung der abnormalen Struktur der Tumorgefäße. Daraus resultierend kann der Blutfluss kurzzeitig ansteigen und für einen verbesserten

Wirkstofftransport in das Tumorinnere sorgen [18]. Eine alternative Erklärung geht von einer direkten Wirkung des Zytostatikums auf die EC neuer Tumorgefäße aus, welche durch den Angiogeneseinhibitor z.B. durch Niederregulierung antiapoptotischer Proteine verstärkt wird [19].

1.1.1 Kapillarbildung

Ist aus einer endothelialen Vorläuferzelle (Angioblast) durch Vaskulogenese ein einfacher kapillarer Plexus entstanden, wird das gebildete Netzwerk durch Angiogenese (Intussuszeption, Interkalation, Sprossung oder „Bridging“) erweitert.

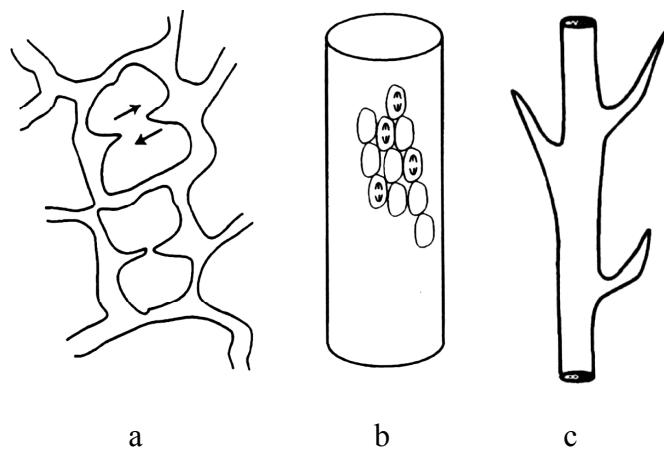


Abbildung 3: Verschiedene Mechanismen der Kapillarbildung (nach [20])
a: Intussuszeption, b: Interkalation, c: Sprossung

Bei der Intussuszeption (s. Abbildung 3a) teilt sich eine bestehende Kapillare in zwei Tochterkapillaren durch Bildung transkapillarer Säulen und Umhüllung durch Pericyten (PC) und extrazelluläre Matrix (ECM). Dieser Prozess scheint von besonderer Bedeutung in der Lunge zu sein, es ist aber auch der vorherrschende Mechanismus des VEGF-induzierten Gefäßwachstums in der Chorioallantoismembran (CAM) [20]. Das interkaläre Wachstum von Blutgefäßen (s. Abbildung 3b), auch als nicht-sprossende Angiogenese bezeichnet, findet bei der endothelialen Wundheilung und beim Gefäßwachstum im Herzen statt. Dabei verschmelzen bestehende Kapillaren, oder es fusionieren zusätzlich EC mit bestehenden Gefäßen, um Durchmesser und Länge zu erhöhen [20]. Die Sprossung neuer Kapillaren, ausgehend von bereits existierenden Blutgefäßen, wird u.a. im Gehirn und in der Niere beobachtet (s. Abbildung 3c) [20]. Das „Bridging“ beruht auf der Bildung transendothelialer Zellbrücken und anschließenden Teilung in einzelne Kapillaren [21].

Angiogenese ist ein mehrstufiger Prozess, bei dem es zunächst zu einer Aktivierung von EC durch einen angiogenen Stimulus kommt. In der Folge ändern die EC ihre ursprüngliche Form. Durch den Einfluss von VE-Cadherin auf die Tight Junctions können sich die EC aus dem Zellverband lösen, und bedingt durch VEGF-A wird die perizelluläre Permeabilität erhöht. Die EC steigern nun die Produktion an Proteasen (z.B. PA, MMP), die zur Auflösung der Basalmembran und zum Umbau der ECM führen. Dies ermöglicht den EC die Migration in Richtung des angiogenen Stimulus. Es kommt zur Ausbildung eines Kapillarsprosses, der durch proliferierende EC vergrößert wird, bis er schließlich ein Lumen bildet. Benachbarte Kapillarsprosse fusionieren zu einer Kapillarschleife. Die Reifung und Stabilisierung des neuen Blutgefäßes wird durch Ausbildung einer neuen Basalmembran und Anlagerung von Perizyten und glatten Muskelzellen abgeschlossen [22]. In Tabelle 1 sind die für die einzelnen Phasen verantwortlichen Faktoren angegeben.

Tabelle 1: molekularer Mechanismus der angiogenen Sprossung (nach [20])

Initiation	Progression	Reifung-Termination
<u>EC Formänderung</u>	<u>EC Proliferation</u>	<u>EC Überleben</u>
Integrin $\alpha_v\beta_3$	VEGF-A	VEGF-A, Integrin $\alpha_v\beta_3$
<u>EC Junctions</u>	<u>EC Migration</u>	<u>PC Differenzierung</u>
VE-Cadherin	VEGF-A	TGF- β_1 , Ang-1
<u>EC Permeabilität</u>	<u>EC Lumenbildung</u>	<u>ECM Bildung</u>
VEGF-A	VEGF-A	TGF- β_1
<u>ECM Abbau</u>	<u>PC Rekrutierung</u>	<u>EC Fusion</u>
Proteasen	PDGF-B, Tie2, Ang-1	Integrin α_4 , VCAM-1, VE-Cadherin
<u>PC Ablösung</u>		
Ang-2		

1.1.2 Regulatoren der Angiogenese

Unter normalen physiologischen Bedingungen wird die Angiogenese von einer Vielzahl von Faktoren reguliert, die in einem ausgewogenen Verhältnis stehen (s. Tabelle 2).

Verschiebt sich das Gleichgewicht, entweder durch eine erhöhte Produktion an positiven Regulatoren oder eine verminderte Bildung an negativen Regulatoren, unterliegen die EC einer „shift“ hin zum angiogenen Phänotyp. Das angiogene Signal kann dabei nicht nur von Tumorzellen, sondern auch von Fibroblasten, EC, Epithelzellen oder aktivierten Makrophagen stammen. Durch Degranulation von Thrombozyten oder proteolytischen Abbau der ECM nach einer Gewebeverletzung können angiogene Faktoren freigesetzt werden [22].

Tabelle 2: Angiogene und angiostatische Faktoren (nach [23,24,25])

angiogene Faktoren		angiostatische Faktoren	
<u>Wachstumsfaktoren (GF)</u>		<u>Wachstumsfaktoren (GF)</u>	
FGF-1, -2	PIGF	TGF- β (hohe Dosis)	
EGF	PDGF	TNF- α (hohe Dosis)	
G-CSF	TGF- α		
GM-CSF	TGF- β (geringe Dosis)		
IGF-1	TNF- α (geringe Dosis)		
HGF/SF	VEGF		
Pleiotrophin	HIV-tat		
<u>Zytokine</u>		<u>Zytokine</u>	
IL-1	IL-6	Interferon- α	Platelet factor (PF)-4
IL-3	IL-8	IL-12	inducible protein 10
<u>Matrixmetalloproteininasen (MMPs)</u>		<u>Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs)</u>	
Elastase	Collagenase		
Gelatinase	Stromelysin		
<u>Serinproteasen</u>		<u>Serinproteasen</u>	
Plasmin	t-PA	Plasminogenaktivatorinhibitor (PAI)	
Urokinase	u-PA		
SPARC und bioaktive SPARC Peptide		SPARC Peptide 2.1 und 4.2	
<u>Prostaglandine</u>		Angiostatin (Spaltprodukt von Plasminogen)	
PGE ₁	PGE ₂	Endostatin (Spaltprodukt von Collagen XVIII)	
<u>Integrine</u>		Angiopoietin-2 (Ang-2)	
Integrin $\alpha_v\beta_3$	Integrin $\alpha_v\beta_5$	16 kD Prolactinfragment	
Angiopoietin-1 (Ang-1)		placental proliferin related protein	
14 kD Plasmaprotein mit angiogener und ribonukleolytischer Aktivität		Vasostatin (Calreticulinfragment)	
Angiogenin		NO	
Platelet activating factor (PAF)		Thrombospondin-1	
		Antithrombin III Fragment	

Angiogenese wird u.a. durch verschiedene Proteine kontrolliert, die die Aktivität von Rezeptortyrosinkinasen (RTK) modulieren [26]. RTKs, die vorrangig auf EC exprimiert werden, bestehen aus einer extrazellulären ligandbindenden Domäne, einer transmembranären Domäne und einer Domäne mit Tyrosinkinaseaktivität. Nach Bindung des Liganden, z.B. VEGF oder FGF-2, findet die Dimerisierung der Rezeptoren, die Aktivierung der Tyrosinkinase und Autophosphorylierung des Rezeptors statt [27].

VEGF und FGF-2 gehören zur Gruppe der heparinbindenden peptidischen Wachstumsfaktoren, die sowohl Proliferation als auch Migration und Differenzierung von EC *in vitro* beeinflussen [28].

Zur VEGF-Familie zählt man 5 Proteine, die innerhalb einer zentralen Region hohe Sequenzhomologie zeigen: VEGF (= VEGF-A) und seine Isoformen (VEGF-A_{121,145,165,189,206}), PlGF (placental growth factor), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D und virale Homologe von VEGF (VEGF-E) [29,30].

Sie können mit drei RTKs (VEGFR1 (= Flt-1), VEGFR2 (= KDR/Flk-1), VEGFR3 (= Flt-4, beschränkt auf lymphatisches Endothel)), die weitgehend nur auf EC exprimiert werden, mit unterschiedlicher Bindungsaffinität interagieren [29,31]. Die Vermittlung der VEGF-induzierten Effekte auf EC erfolgt hauptsächlich durch VEGFR2 [29,30]. Fehlt auch nur ein einziges VEGF Allel, führt dies zum Tod des Embryos [32]. Dies verdeutlicht die wichtige Rolle von VEGF während der Entwicklung des vaskulären Systems. Darüber hinaus kann VEGF durch die Stimulation der Gefäßneubildung im Herzmuskelgewebe möglicherweise die Prognose von Patienten mit schwerer Angina pectoris verbessern (therapeutische Angiogenese). Eine Erhöhung des Krebsrisikos wurde nicht beobachtet [33].

Kürzlich wurde Neuropilin-1, ein Glykoprotein der Zelloberfläche, das in EC exprimiert wird und Proteine der Familie der Collapsine/Semaphorine bindet (Mediatoren der neuronalen Übertragung) als Rezeptor von VEGF-A₁₆₅ identifiziert. Neuropilin-1 erhöht die Bindung von VEGF-A₁₆₅ an VEGFR2 und dessen Bioaktivität [29].

Tie1 und Tie2 sind zwei weitere EC-spezifische Rezeptoren, die im embryonalen Gefäßendothel häufig vorkommen, jedoch im adulten Organismus verstärkt während aktiver Angiogenese auftreten. Die Liganden der Tie Rezeptoren gehören zur Familie der Angiopoietine (Ang-1, -2, -3, -4), deren Bedeutung z.T. noch ungeklärt ist [34]. Ang-1 und Ang-2, beides Proteine mit einem Molekulargewicht von ~ 75 kDa, binden an Tie2 mit ähnlicher Affinität. Keines der Angiopoietine interagiert mit Tie1 [26]. Im Gegensatz zu Ang-1, das sowohl im Embryo als auch im adulten Organismus weit verbreitet exprimiert wird, ist Ang-2 beim Erwachsenen vorrangig in Plazenta, Ovar und Uterus zu finden [26,35].

Das Zusammenspiel von VEGF und Angiopoietinen bei der Gefäßentwicklung und der Angiogenese kann nach folgendem Schema ablaufen:

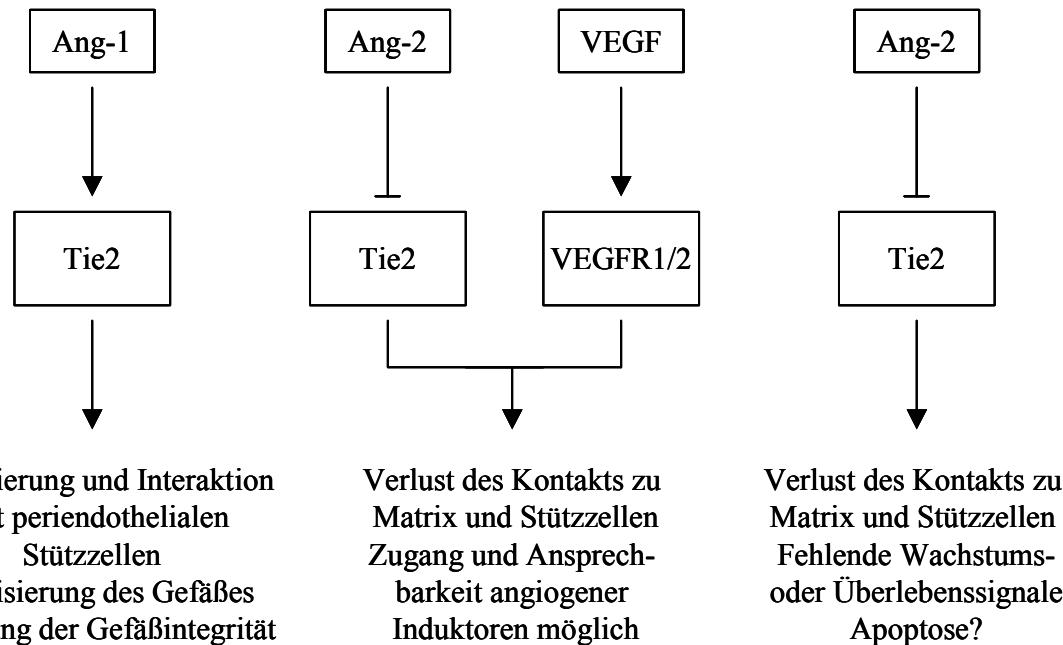


Abbildung 4: Modell der Regulierung des Gefäßendothels durch VEGF und Ang-1/2 (modifiziert nach [26])

Die Interaktion von Ang-1 mit Tie2 führt zur Rekrutierung von Stützzellen (Perizyten, glatte Muskelzellen, Myokardiozyten), die das neu gebildete Blutgefäß, aber auch adulte Gefäße stabilisieren. Ang-2 als ein natürlich vorkommender Ang-1-Antagonist [35] inhibiert den Effekt von Ang-1 durch den Tie2 Rezeptor. Dies führt zur Destabilisierung des Blutgefäßes und Zelltod. In Gegenwart von VEGF wird Angiogenese gefördert, da die EC aufgrund des Tie2-Signals den Kontakt mit Perizyten und der ECM verlieren und sich nun teilen und neue Blutgefäße bilden können [26].

FGF-2 war einer der ersten angiogenen Wachstumsfaktoren, der charakterisiert wurde [36]. Bis heute sind mindestens 19 zur FGF-Familie gehörende Proteine bekannt, die Liganden für vier Rezeptortyrosinkinasen (FGFR1-4) sind [37]. FGF-2 wird in nahezu allen Organen und Geweben gebildet, insbesondere im Gehirn und in der Hypophyse. FGF-2 zeigt angiogene Aktivität *in vivo* [38] und induziert Proliferation, Migration und Proteasebildung in Endothelzellkulturen [39].

Essentiell für die physiologische Aktivität des Wachstumsfaktors ist die Interaktion mit der als high-affinity-Rezeptor bezeichneten membranständigen Rezeptortyrosinkinase. Voraussetzung dafür ist die Bindung von FGF-2 an Heparin oder Heparansulfatproteoglykane (HSPG) der Zelloberfläche (low-affinity-Rezeptor). Wachstumsfaktor, HSPG und RTK bilden einen ternären Komplex, der zur Dimerisierung des Rezeptors führt. Nachfolgend kommt es zur Aktivierung der zytoplasmatischen Tyrosinkinase, Autophosphorylierung des Rezeptors und Phosphorylierung von Substratproteinen. Durch verschiedene Serin- und Threonin-

Proteinkinasen, die in ihrer Gesamtheit als MAP (mitogen-activated protein)-Kinasen bezeichnet werden, wird das Signal auf nukleäre oder zytoplasmatische Effektoren übertragen, die u.a. die für die Zellproliferation erforderliche Genexpression beeinflussen [40].

1.2 Arten der Angiogenese

Angiogenese ist ein physiologischer Prozess, der außer Kontrolle geraten und so zu manifesten Erkrankungen wie chronischer Entzündung oder Tumorerkrankungen führen kann (s. Kapitel 1.1). Physiologische und pathologische Angiogenese unterscheiden sich hinsichtlich der beteiligten Triggermechanismen [21]. Auch die Regulation der Angiogenese in Tumoren ist nicht einheitlich, da das Gefäßsystem in Tumoren nicht nur von jenem in normalem Gewebe abweicht, sondern sowohl in Abhängigkeit von Art, Wachstumsrate und Lokalisierung des Tumors variieren kann [4,15]. Ein stark vereinfachtes Modell der Angiogenese zeigt Abbildung 89/Anhang. Noch immer ist der Übergang von ruhender zu aktiver Vaskularisierung nicht vollständig erklärbar. Ein möglicher Auslöser ist Sauerstoffmangel um einen Tumor herum, der zur Expression von u.a. VEGF und PlGF führt [41,42], die spezifisch das Wachstum von EC stimulieren. Andererseits sezernieren Tumorzellen wie auch EC proteolytische Enzyme (z.B. MMPs, Serinproteasen), die zum Abbau der ECM führen. Die dabei gebildeten Spaltprodukte können sowohl angiogene als auch antiangiogene Eigenschaften besitzen. So sind die beim Abbau der Hyaluronsäure, einem Glykosaminoglykan der ECM, entstehenden niedermolekularen Fragmente angiogen [43]. Im Gegensatz dazu wirkt das Collagen XVIII-Spaltprodukt Endostatin als endogener negativer Regulator [44]. Tumorzellen aktivieren und rekrutieren Zellen des Immunsystems (Mastzellen, Makrophagen), die wiederum das Gefäßwachstum stimulieren können. Oftmals übersteigt die Zellzahl nicht neoplastischer Zellen (Fibroblasten, EC, inflammatorische Zellen) die Tumorzellzahl, wobei Makrophagen in einigen Mammakarzinomen mehr als 50% der Zellmasse bilden [45]. Ursprünglich wurde die Auffassung vertreten, dass diese Makrophagen Teil der Immunabwehr des Wirtes gegen neoplastische Zellen sind. Diese Meinung ist heute nur mehr bedingt richtig und einer komplexen Beteiligung von Makrophagen bei der Tumorentstehung gewichen.

Makrophagen sind die differenziertesten Zellen des mononukleären Phagozytosesystems und nehmen innerhalb des Immunsystems eine zentrale Rolle ein. Sie können sowohl eine unspezifische (Phagozytose) als auch eine spezifische Immunantwort (Antigenpräsentation) auslösen [46]. Makrophagen zeigen Chemotaxis entlang eines Gradienten von Zytokinen, Zelloberflächenmarkern und Sauerstoff. Eine Vielzahl biologisch aktiver Substanzen wird von

Makrophagen sezernieren u.a. Enzyme, Enzyminhibitoren, Komponenten des Komplementsystems, reaktive Sauerstoffspezies, Arachidonsäureintermediate, Blutgerinnungsfaktoren und Zytokine [47]. Doch erst durch Hypoxie- oder Zytokinaktivierung können sie diese multiplen Funktionen ausüben [47,48]. Von besonderem Interesse sind die von sog. **tumorassoziierten Makrophagen** (TAMs) sezernierten angiogenen Modulatoren [47]. Eine Auswahl zeigt Tabelle 3.

Tabelle 3: Angiogene Modulatoren von tumorassoziierten Makrophagen (TAMs) [nach 47]

Angiogenesestimulation	Angiogeneinhibition
<u>Proteasen</u>	<u>Inhibitoren von</u>
Metalloproteasen z.B. Collagenase	Metalloproteasen z.B. TIMP
Serinproteasen z.B. Elastase, PAs	Serinproteasen z.B. PAI-1
<u>Zytokine</u>	<u>Zytokine</u>
z.B. IL-1, IL-6, IL-8	z.B. IFN- α , IFN- γ
<u>Wachstumsfaktoren</u>	Thrombospondin-1
z.B. PDGF, FGF-2, VEGF	
Angiotropin	Angiostatinfreisetzung

Die unterschiedliche sekretorische/angiogene Aktivität könnte auf verschiedenen Entwicklungs- oder Funktionsstadien der Makrophagen beruhen [48]. Makrophagen zeigen nicht nur anti-Tumor-Effekte hervorgerufen durch direkte zytotoxische Aktivität oder die Sekretion wachstumshemmender Zytokine, sondern können auch das Tumorwachstum stimulieren. Diese Stimulation beruht auf der Beeinflussung der Tumorangiogenese über angiogene Zytokine oder indirekte Effekte auf die ECM (z.B. proteolytische Freisetzung von in der ECM gebundener angiogener Wachstumsfaktoren, Abbau von ECM-Komponenten zu angiogenen Fragmenten) [47,48].

Die Invasion von Makrophagen ist auch Teil der Entzündungsreaktion [49]. Bei einer chronischen Entzündung z.B. der rheumatoïden Arthritis ist das proliferierende Gewebe mit zahlreichen Entzündungszellen infiltriert und von neugebildeten Kapillaren durchzogen. Die reichlich vorhandenen Entzündungsmediatoren können auch die Angiogenese fördern, da viele der regulatorischen Wachstumsfaktoren und Zytokine sowohl bei der chronischen Entzündung als auch bei der Gefäßneubildung eine Rolle spielen. In zunehmendem Maße wird deutlich, dass Angiogenese und chronische Entzündung ineinandergrifende Prozesse sind [50].

1.3 Antiangiogene Therapie

Die Behandlung der Tumorerkrankung beruht u.a. auf Chemotherapie, Bestrahlung und chirurgischen Methoden. Seit mehreren Jahren werden unterschiedlichste antiangiogene Verbindungen in klinischen Studien nicht nur zur Behandlung von Tumoren, sondern auch weiterer angiogeneseabhängiger Erkrankungen (vgl. Abbildung 1) getestet. Vorrangiges Ziel der antiangiogenen Therapie in der Onkologie ist nicht die Heilung, sondern vielmehr die Hemmung des Tumorwachstums und damit die Verringerung der Tumorbelastung des Körpers [23].

Bedingt durch den vielstufigen Ablauf der Angiogenese, der die Freisetzung angiogener Stimulatoren und deren Interaktion mit RTKs, den Abbau der Basalmembran und der ECM, die Proliferation und Migration von EC sowie die Lumenbildung und die Bildung einer neuen Basalmembran umfasst, sind verschiedenste Strategien zur Hemmung der Angiogenese denkbar.

Tabelle 4 führt verschiedene Angiogeneseinhibitoren und ihren Wirkmechanismus an. Die Klasse der Angiogeneseinhibitoren ist sehr heterogen; sie umfasst z.B. Antibiotika (Fumagillin-Analoga, Minocyclin), Polypeptide (PF-4, IFN- γ , Angiostatin), Polykationen und -anionen (Protamin, Suramin), Steroide und Antagonisten von VEGF und Integrinen.

Wie schon die tabellarische Übersicht deutlich macht ist eine selektive antiangiogene Wirkung der Inhibitoren selten, ihre Mechanismen sind in der Realität oftmals überlappend. Die Ursache dafür liegt in der Redundanz des angiogenen Prozesses. Beispielsweise wurden für Suramin Interaktionen mit einer Vielzahl von Wachstumsfaktoren beschrieben [51]. Viele gebräuchliche Zytostatika haben neben ihrer antiproliferativen Wirkung einen modulatorischen Effekt auf die Angiogenese. So wurden für Paclitaxel, einem Tubulininhibitor, der bei verschiedensten Tumorarten therapeutisch eingesetzt wird, von der antiproliferativen Aktivität unabhängige antiangiogene Eigenschaften in *in vivo* Modellen beschrieben [52]. Es erscheint also sinnvoll, verschiedene Angiogeneseinhibitoren mit unterschiedlichen Angriffspunkten therapeutisch einzusetzen.

Bislang konnten die angiogenen Hemmstoffe die in sie gesetzten übersteigerten Hoffnungen nicht erfüllen. Trotz intensivster Forschung und Entwicklung - mehr als 200 Biotechnologieunternehmen und zahlreiche Pharmafirmen arbeiten auf dem Gebiet der Angiogenese - hat bis jetzt außer IFN- α (Indikation: Behandlung kindlicher Hämangiome [53]) noch kein Angiogeneseinhibitor Eingang in die Therapie gefunden.

Tabelle 4: Antiangiogene Therapie: Verbindungen und ihr Wirkmechanismus [28]

Wirkmechanismus	Verbindungen
<u>Inhibitoren des ECM Remodeling</u>	
MMP-Inhibitoren	Batimastat, Marimastat, AG3340, Neovastat, PEX, TIMP-1,-2,-3,-4
u-PA-Inhibitoren	PAI-1, -2, uPA AK, uPAR AK, Amilorid
Collagenase-Inhibitoren	Minocyclin, Tetracycline, TIMP (Knorpel)
<u>Inhibitoren von Adhäsionsmolekülen</u>	
Integrin $\alpha_v\beta_3$	Integrin $\alpha_v\beta_3$ AK (LM609, Vitaxin), RGD-Peptide, Benzodiazepinderivate
Integrin $\alpha_v\beta_5$	Integrin $\alpha_v\beta_5$ AK
<u>Inhibitoren aktiverter EC</u>	
Hemmung der EC Proliferation, Apoptose-induktion	endogene Inhibitoren (Endostatin, Angiostatin, aaAT)
Hemmung der Migration und Proliferation von EC	IFN- α , IFN- γ , IL-12, NO-Synthaseinhibitoren, TSP-1
Hemmung der EC Proliferation	TNP-470, Combretastatin A-4
Angiogeneseinhibition <i>in vivo</i>	Thalidomid
Hemmung der EC Migration	Linomid
<u>Inhibitoren angiogener Mediatoren oder Rezeptoren</u>	
FGF-2-Inhibitoren, Hemmung der FGF-2-induzierten EC Proliferation	IFN- α , PF-4, Prolaktinfragment
Interaktion mit verschiedenen GF (u.a. FGF-2, VEGF, PDGF), Hemmung der Migration und Proliferation von EC	Suramin und Analoga
Inhibitoren der FGF-2-Aktivität	PPS, Distamycin A Analoga, FGF-2 AK, antisense-FGF-2
Inhibitoren der VEGF-Aktivität	SU5416, löslicher Flt-1, dominant-negativer Flk-1, VEGF Rezeptor Ribozyme, VEGF AK
COX-2-Inhibitoren	Aspirin, NS-398
TP-Antagonisten	6AT, 6A5BU, 7-DX
<u>Inhibitoren intrazellulärer Signalübertragung</u>	
Tyrosinkinaseinhibitor	Genistein
selektiver Proteintyrosinkinaseinhibitor	Lavendustin A
Tie2-Inhibitor	Ang-2

Nur wenige Patienten konnten in klinischen Studien von einer solchen Therapie profitieren; häufig waren nur geringe oder keine Effekte nachweisbar, in seltenen Fällen trat sogar eine Verschlechterung ein [54]. Verantwortlich dafür sind die genomische Instabilität und Heterogenität von Tumorzellen sowie ein uneinheitliches Blutgefäßsystem in Tumoren. Dies führt zu unterschiedlichen Therapieerfolgen von Patienten mit Tumoren im gleichen pathologischen oder klinischen Stadium [28].

Hieraus wird die Bedeutung der Etablierung eines angiogenen Profils von Patienten mit Tumoren oder anderen chronischen angiogeneseabhängigen Erkrankungen deutlich, um die von einer antiangiogenen Therapie am meisten profitierenden Patienten herauszufiltern. Als Parameter mit zuverlässigem prognostischem Wert sollten die intratumorale Blutgefäßdichte (IVD), der Blutfluß *in vivo* mittels Farbdoppler- oder Nuklearmagnetresonanz und angiogene Faktoren in Serum, Urin oder Gewebeprobe bestimmt werden. Auch die Quantifizierung endogener Inhibitoren sollte in Betracht gezogen werden, da deren Fehlen ein Umschalten zum angiogenen Phänotyp und folglich ein Fortschreiten der Erkrankung induzieren kann [18,28]. Trotzdem scheint die antiangiogene Therapie eine Zukunft zu haben, insbesondere in Kombination mit einer Standardchemotherapie, die an anderen zellulären Targets angreift. Charakteristisch für die Behandlung mit Standardchemotherapeutika ist das Auftreten toxischer Nebenwirkungen (gastrointestinale Symptome, Knochenmarkssuppression), da sie nicht nur Tumorzellen, sondern alle sich teilenden Zellen beeinflusst. Die Toxizität der an sich teilenden EC angreifenden Angiogeneseinhibitoren wird dagegen als gering eingestuft [55]. Allerdings können Angiogeneseinhibitoren, die gegen unspezifische Targets gerichtet sind, auch zu schweren Nebenwirkungen führen wie bei den MMP-Inhibitoren (MMPI) beobachtet. Während der Behandlung mit Marimastat treten bei ca. 30% der Patienten Gelenk- und Muskelschmerzen auf. Die Symptome scheinen dosisabhängig zu sein und sind nach Absetzen der Medikation reversibel [56]. In jüngster Zeit wird auch ein mögliches kanzerogenes Potential der MMPI diskutiert, die häufig das Enzym Caspase-3 hemmen, dem eine wichtige Rolle während der Apoptose zugeschrieben wird [57].

Durch die bei den meisten Tumorzellen vorhandene genetische Instabilität und Anfälligkeit für Mutationen können Resistzenzen gegen das Behandlungsregime auftreten. Für unwahrscheinlich wird eine Resistenzentwicklung durch Angiogeneseinhibitoren beurteilt, da sie gegen normale EC gerichtet sind, die eine höhere genetische Stabilität besitzen. Da Angiogenese im adulten Organismus nur während zeitlich limitierter Prozesse (Wundheilung, Ovulation) stattfindet, verspricht die antiangiogene Therapie mit geeigneten selektiven Inhibitoren einen gewissen Grad an Spezifität, der eine relativ untoxische Langzeitbehandlung von Tumorerkrankungen ermöglichen sollte [55].

Die überwiegend zytostatisch wirkenden Angiogeneseinhibitoren unterscheiden sich auch hinsichtlich der Endpunkte in frühen klinischen Studien von den zytotoxischen Standardchemotherapeutika mit eindeutigen Endpunkten (z.B. rasche Tumorregression, Lebensverlängerung). Zur Evaluierung einer antiangiogenen Therapie sollten deshalb eine verbesserte Lebensqualität oder ein Hinauszögern der Erkrankung als geeignete Endpunkte herangezogen werden. Zusätzlich sollten auch Patienten mit permanenter physiologischer Angiogenese (Kinder, Frauen im gebärfähigem Alter) berücksichtigt werden [55].

1.4 Angiogeneseinhibitoren

Zur Zeit wird der Einsatz endogener Hemmstoffe der Angiogenese sowie von Angiogeneseinhibitoren unterschiedlichen Ursprungs erprobt. Außerdem werden verschiedene Studien zur antiangiogenen Gentherapie in Tiermodellen durchgeführt. Die folgende Tabelle zeigt eine Auswahl von mehr als 20 Angiogeneseinhibitoren, die gegenwärtig in klinischen Studien getestet werden.

Tabelle 5: Angiogeneseinhibitoren in klinischen Prüfungen (nach [55,58])

Mechanismus	klinische Prüfung (Phase)	Mechanismus	klinische Prüfung (Phase)
<u>VEGF-Antagonisten</u>		<u>Integrin-Antagonisten</u>	
Anti-VEGF Antikörper	I, II, II/III, III	EMD121974	I, I/II
PTK787/ZK22584	I/II	Vitaxin	II
SU5416	I, I/II, II, III		
SU6668	I		
<u>MMP-Inhibitoren</u>		<u>EC-Inhibitoren</u>	
Marimastat	III	TNP-470	I, II
BAY 12-9566	III	Endostatin	I
AG3340	III	Squalamin	I, II
Neovastat	III	Thalidomid	I, I/II, II, III
Col-3	I/II	Angiostatin	I
MMI270	I		
BMS-275291	II/III		
<u>Zytokine</u>		<u>anderer Mechanismus</u>	
Interferon- α	II/III	CAI	I, II
IL-12	I/II	IM862	II

1.4.1 Endogene Angiogeneseinhibitoren

Fast 30 endogene Angiogeneseinhibitoren sind bis heute bekannt [58]. Einige davon sind derzeit in verschiedenen Phasen der klinischen Prüfung.

Endostatin, das 20kDa C-terminale Fragment von Collagen XVIII, wird in Phase I Studien bei Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumoren eingesetzt. Es hemmt spezifisch die EC Proliferation *in vitro* und erhöht die Apoptoserate von EC durch Reduktion antiapoptotischer Proteine [59]. *In vivo* Studien in Mäusen mit EOMA-, Lewis-Lungenkarzinom-, T241 Fibrosarkom- und B16F10 Melanoma-Zelllinien konnten den Rückgang dieser Tumoren ohne Resistenzentwicklung zeigen [60].

Aus Serum und Urin von Mäusen mit Lewis-Lungenkarzinom wurde ein weiterer endogener Inhibitor, der wie Endostatin durch Proteolyse einer inaktiven Vorstufe gebildet wird, erstmals isoliert: Angiostatin. Es besteht aus den ersten vier Disulfid-verknüpften Kringledomänen von Plasminogen [61] und wird durch die proteolytische Aktivität einer von Makrophagen exprimierten Metalloelastase gebildet [62]. Angiostatin hemmt *in vitro* die Proliferation von EC [61] und unterdrückt das Wachstum zahlreicher menschlicher Tumoren und deren Metastasen in Mäusen durch eine gesteigerte Apoptoserate [63,64].

IL-12 wird derzeit in einer Phase I/II Studie bei AIDS-assoziiertem Kaposi's Sarkom eingesetzt. IL-12 ist ein multifunktionales Zytokin mit Effekten auf T-Zellen und natürliche Killerzellen. Die Hemmung der Angiogenese erfolgt durch Stimulation von IFN- γ und IP 10, zwei weiteren endogenen Angiogeneseinhibitoren [65]. Aber noch weitere Immunzytokine spielen als endogene antiangiogene Mediatoren eine Rolle (z.B. PF-4, IL-18) [58]. Dies deutet auf ein enges Zusammenspiel von Immunsystem und vaskulärem System hin.

Bereits in zahlreichen Phase II-III Studien befindet sich IFN- α in Kombination mit Chemotherapie oder u.a. Retinsäure, Bacillus Calmette-Guérin (BCG) und IL-2 zur Behandlung verschiedenster solider Tumoren (z.B. Niere, Magen, Blase, Pankreas), Leukämien und Melanome [55]. IFN- α wird erfolgreich bei der Behandlung kindlicher Hämangiome angewendet [53]. Allerdings sollte der Einsatz nur nach Versagen der Standardtherapie (Cortison) erfolgen, da z.T. irreversible neurotoxische Schädigungen (spastische Lähmungen) auftreten können [5]. Als Wirkmechanismen werden eine verminderte mRNA-Expression und Proteinsynthese des angiogenen FGF-2 [66] und Apoptoseinduktion in EC [67] diskutiert.

Dem Einsatz endogener Angiogeneseinhibitoren in klinischen Prüfungen stehen verschiedene ungelöste Probleme gegenüber. Zum einen wird die Proteintherapie lebenslang durchgeführt werden müssen. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit müssen fast alle endogenen Angiogeneseinhibitoren ein- bis mehrmals täglich appliziert werden. Abgeleitet von tierexperimentellen Untersuchungen wird die täglich zu verabreichende Menge an Inhibitor bei einigen Gramm liegen. Dies kann zu nicht kalkulierbaren Toxizitätsrisiken der rekombinant hergestellten endogenen Angiogeneseinhibitoren durch Verunreinigungen während ihrer Produktion in Mikroorganismen führen. Nicht zuletzt sind aufgrund der langen Hochdosistherapie enorme Kosten sowohl für den pharmazeutischen Hersteller als auch für den Patienten zu erwarten [58].

1.4.2 Angiostatische Steroide

Um die durch Heparin verstärkte Tumorangiogenese im CAM-Assay zu verdeutlichen, setzten Folkman et al. zur Unterbindung begleitender Entzündungsreaktionen durch Eischalenstaub Cortison zu. Erstaunlicherweise konnte die Kombination aus Cortison und Heparin oder einem hexameren Heparinfragment das Gefäßwachstum und das Tumorwachstum in verschiedenen Tiermodellen hemmen [68].

Weitergehende Untersuchungen führten zu den erstmals von Crum et al. beschriebenen angiostatischen Steroiden, die in Kombination mit Heparin oder einem Heparinfragment unabhängig von gluco- oder mineralcorticoiden Eigenschaften antiangiogene Aktivität zeigen [69]. Potenter als der natürliche Glucocorticoidmetabolit Tetrahydrocortisol (5 β -Pregnan-3 α ,11 β ,17 α ,21-tetrol-20-on) [70] ist Tetrahydro S (5 β -Pregnan-3 α ,17 α ,21-triol-20-on, Tetrahydrocortexolon) [69] mit bislang unbekannter biologischer Aktivität. Deutlich höhere Aktivität in Tiermodellen zeigen synthetische Steroide wie U-42129 (6 α -Fluor-16 β -methyl-4,9(11)-pregnadien-17 α ,21-diol-3,20-dion) oder AL-3789 (4,9(11)-Pregnadien-17 α ,21-diol-3,20-dion-21-acetat) und AL-4940 (4,9(11)-Pregnadien-17 α ,21-diol-3,20-dion), die sowohl im CAM-Assay als auch im Hornhautmodell des Kaninchens antiangiogen sind [71].

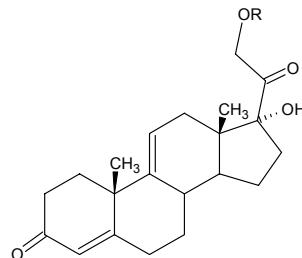


Abbildung 5: Struktur der angiostatischen Steroide AL-4940 (R = H) und AL-3789 (R = COCH₃)

Der Wirkmechanismus der angiostatischen Steroide ist noch immer unklar: Neben einer Auflösung der kapillaren Basalmembran, Hemmung der PA- und/oder Stimulation der PAI-Aktivität oder -Expression wird auch die Hemmung von u-PA und MMP-3 diskutiert [71]. Die angiostatische Aktivität der Steroide ist nicht an Heparin gebunden, sondern bleibt auch in Gegenwart von Heparinfragmenten [72], polyanionischen Verbindungen wie Suramin [73], sulfatiertem β -Cyclodextrin [74] und einem synthetischen Arylsulfataseinhibitor [75] erhalten. Der endogene Estrogenmetabolit 2-Methoxyestradiol (2-ME) inhibiert, im Gegensatz zu den angiostatischen Steroiden unabhängig von Heparin oder sulfatierten Cyclodextrinen, *in vitro* die Proliferation und Migration von EC und die Angiogenese in dreidimensionalen Collagengelen. Bei *p.o.* Applikation in Mäusen mit subkutanem Meth-A-Sarkom oder B16-

Melanom hemmt 2-ME deutlich die Neovaskularisation und das Wachstum der Tumoren [76]. Möglicherweise beruht die antiangiogene Aktivität auf einer gesteigerten Apoptoserate der Endothelzellen [77].

1.4.3 Naturstoffe und ihre Derivate

1.4.3.1 Combretastatin A-4

Tubulin-bindende Substanzen werden z.T. klinisch als Zytostatika (z.B. Vincristin, Vinblastin) oder zur Therapie des Gichtanfalls (Colchicin) eingesetzt. Da bei Colchicin erstmals antivaskuläre Effekte beobachtet wurden, jedoch aufgrund der Toxizität eine weitere klinische Entwicklung unmöglich war, suchte man nach geeigneteren Verbindungen. Aus dem südafrikanischen Baum *Combretum caffrum* (Eckl. & Zeyh.) Kuntze, Combretaceae, wurden die als Combretastatine bezeichneten Verbindungen isoliert. Insbesondere das auch als besser lösliches Phosphat vorliegende Combretastatin A-4 besitzt hohe Affinität zum Tubulin in der Nähe der Colchicin Bindungsstelle [78].

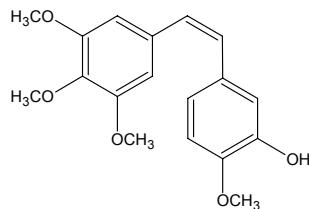


Abbildung 6: Struktur von Combretastatin A-4

In vitro hemmt es die Proliferation endothelialer Zellen durch Induktion des programmierten Zelltodes [79], *in vivo* reduziert es selbst in Konzentrationen von 10% der maximal tolerierten Dosis deutlich den Blutfluss durch ausgedehnte Nekrose im Tumorgewebe [78]. Derzeit findet die Phase I Prüfung von Combretastatin A-4 bei soliden Tumoren statt [55].

1.4.3.2 Fumagillin und partialsynthetische Derivate

Durch die Kontaminierung einer EC Kulturflasche wurde Fumagillin (s. Abbildung 7), ein Antibiotikum aus *Aspergillus fumigatus* Fresenius, Aspergillaceae, als Angiogeneseinhibitor entdeckt [80]. Jedoch verhinderten schwere toxische Effekte die weitere vorklinische Entwicklung. Ein Derivat mit besserem Nebenwirkungsprofil bei höherer antiangiogener Aktivität ist TNP-470 (frühere Bezeichnung: AGM-1470, s. Abbildung 7), das nicht nur *in vitro* die Proliferation und Migration von EC inhibiert, sondern auch in unterschiedlichen Tiermodellen Wachstum und Metastasierung von Tumoren hemmt.

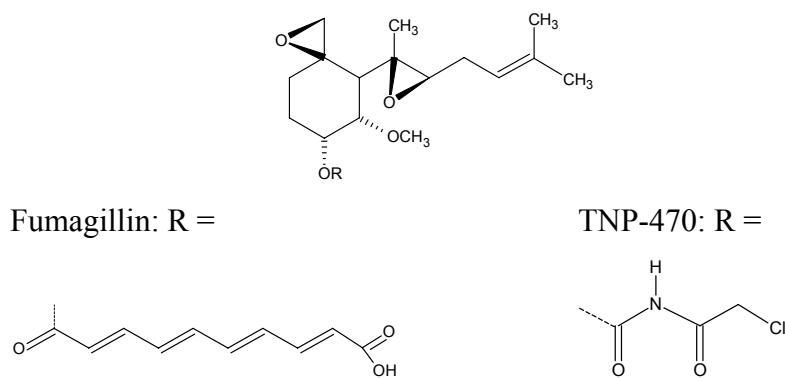


Abbildung 7: Struktur von Fumagillin und seinem Derivat TNP-470

Derzeit wird der Einsatz von TNP-470 zur Behandlung solider Tumoren bei Erwachsenen (Phase II) und bei Patienten mit Lymphomen und akuter Leukämie (Phase I) geprüft [55]. Als möglicher Wirkmechanismus von Fumagillin und TNP-470 wurde die Bindung und nachfolgende Hemmung der Typ 2 Methioninaminopeptidase (MetAP-2) beschrieben [81], eines der Enzyme, die in Eukaryonten für die posttranskriptionale Abspaltung des initialen Methioninrestes am aminoterminalen Ende verantwortlich sind. Unterbleibt die Entfernung von Methionin könnte dies zur Inaktivierung bislang noch unbekannter Proteine mit Bedeutung für das Endothelzellwachstum führen. Eine andere Arbeitsgruppe berichtet, dass Fumagillin die Expression des Transkriptionsfaktors Ets-1 inhibiert [82]. Ets-1 bindet an regulatorische Regionen von Genen, die für verschiedene angiogeneseregulierende Proteininasen codieren. Ob die angiotatische Wirkung von Fumagillin dieser Interaktion zugeschrieben werden kann, ist nicht gesichert. Denkbar wäre, neben einer Fumagillin-vermittelten Inhibition der Biosynthese oder Stimulierung des Abbaus von Ets-1, eine Beteiligung der MetAP-2 an der Regulation der Aktivität des Transkriptionsfaktors Ets-1. Dieser weist einen N-terminalen Methioninrest auf und stellt somit möglicherweise ein Substrat der Methioninaminopeptidase-2 dar [82].

1.4.4 Synthetische Angiogeneseinhibitoren

1.4.4.1 Phosphomannopentaosesulfat

Die Endoglycosidase Heparanase nimmt u.a. während Tumorzellinvasion und Metastasierung, Angiogenese und chronischer Entzündung eine Schlüsselfunktion ein [83]. Sie ist neben Proteasen (MMPs, Serin-, Cystein- und Aspartatproteasen) am Abbau der ECM durch Tumorzellen und Leukozyten beteiligt. Doch auch EC sezernieren *in vitro* u.a. Heparanase, die zur Auflösung der ECM führt [84] und so möglicherweise zur EC Migration während der Angiogenese beiträgt [83]. Die Heparanase kann durch Spaltung von HS-Ketten auch in der ECM gespeicherte Wachstumsfaktoren freisetzen bzw. durch Abbau zellulärer HSs, deren Interaktion mit dem GF essentiell für die nachfolgende Rezeptorinteraktion ist, die Aktivität der GFs regulieren [83]. Verschiedene polyanionische Verbindungen wie z.B. selektiv sulfatiertes Chitin, Laminarin sulfat oder Suramin sind Heparanase-Inhibitoren, die jedoch u.a. aufgrund eines zu hohen Molekulargewichts, einer heterogenen Struktur, toxischer Eigenschaften und unspezifischer biologischer Effekte keine geeigneten Kandidaten für die klinische Untersuchung sind. Die Suche nach einem definierten und selektiveren Heparanaseinhibitor führte zu dem synthetischen sulfatierten Oligosaccharid PI-88 (Phosphomannopentaosesulfat), das neben der antiangiogenen Aktivität auch antimetastatische Eigenschaften zeigt (s. Abbildung 8) [85]. Nach erfolgreicher Präklinik und Phase I Prüfung wird derzeit der Einsatz von PI-88 bei Tumorpatienten untersucht [83].

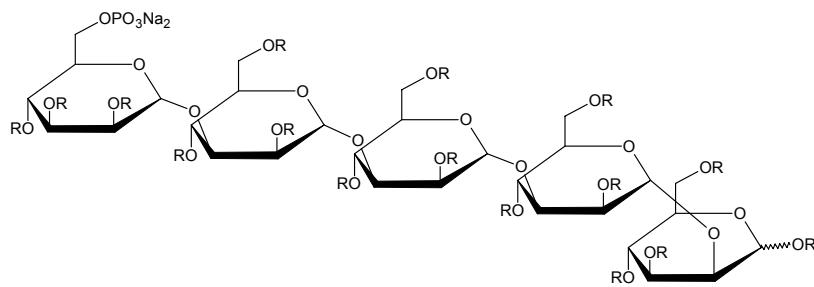


Abbildung 8: Struktur von Phosphomannopentaosesulfat (PI-88). R = SO₃Na oder H

1.4.4.2 Matrixmetalloproteinase-Inhibitoren

MMPs führen im Zusammenspiel mit dem PA-System zum Abbau der Basalmembran und der ECM, einer für die Angiogenese notwendigen Voraussetzung für die Invasion und

Proliferation von Endothelzellen. Mindestens 16 dieser Zinkatom-abhängigen Endopeptidasen, die als inaktive Zymogene exprimiert werden und erst durch proteolytische Spaltung u.a. von Plasmin aktiviert werden, sind bis heute bekannt. PAs und MMPs werden mit ihren Inhibitoren sezerniert, um den proteolytischen Prozess kontrollieren zu können. Jedoch deuten zahlreiche Untersuchungen der häufigsten Tumorarten auf eine gestörte Regulation während Tumorwachstum und Metastasierung hin [86].

Auch wenn inzwischen endogene MMPI bekannt sind (PEX: ein nicht-katalytisches Fragment von MMP-2; TIMP-1, -2, -3, -4) konzentriert sich die Forschung hauptsächlich auf synthetische oral verfügbare Inhibitoren. Bereits sieben befinden sich derzeit in klinischen Prüfungen (s. Tabelle 5), darunter das nichtpeptidische Hydroxamat AG3340, der aus Knorpel isolierte endogene Inhibitor Neovastat und Marimastat. Marimastat besitzt im Gegensatz zu strukturverwandten pseudopeptidischen Hydroxamsäure Batimastat eine höhere Bioverfügbarkeit bei vergleichbarem Wirkprofil [28].

1.4.4.3 Verbindungen, die mit VEGF interagieren

Die Strategie, durch Hemmung von VEGF als einem der wichtigsten Mediatoren der Tumorangiogenese oder durch Interaktion mit seinem Rezeptor Tumorwachstum und Metastasierung beeinflussen zu können, hat bereits zu klinischen Prüfungen eines humanisierten monoklonalen anti-VEGF Antikörpers (Phase II u.a. bei metastasierendem Nierenzellkarzinom, fortgeschrittenem Prostatakarzinom und anderen soliden Tumoren [55]) und mehrerer synthetischer niedermolekularer RTK-Inhibitoren geführt. Diese können selektiv mit dem VEGF-Rezeptor (SU5416, s. Abbildung 9) bzw. zusätzlich mit der FGF-2- und PDGF-RTK (SU6668) wechselwirken. Die Beeinflussung der Rezeptoren verschiedener, von Tumorzellen produzierter Zytokine soll das Tumorwachstum effizienter hemmen [28].

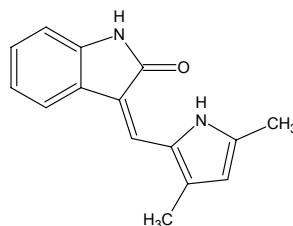


Abbildung 9: Struktur von SU5416

1.4.4.4 Integrin-Antagonisten

Das Integrin $\alpha_v\beta_3$ wird ausschließlich auf der Oberfläche aktiverter Endothelzellen exprimiert und fungiert dort als Adhäsionsrezeptor für Proteine der ECM (u.a. Vitronectin, Fibronectin, Fibrinogen, Laminin, Collagen). Es erkennt eine charakteristische Sequenz aus den Aminosäuren Arginin, Glycin und Asparaginsäure (RGD), die sich in verschiedenen zyklischen Peptidantagonisten (z.B. EMD121974) wiederfindet. Diese induzieren wie der monoklonale anti-Integrin $\alpha_v\beta_3$ Antikörper LM609 bzw. dessen humanisierte Form Vitaxin Apoptose in den stimulierten EC und beeinflussen durch Hemmung der Röhrenbildung der proliferierenden EC einen entscheidenden Schritt in der angiogenen Kaskade. Sowohl während der Embryonalentwicklung als auch bei Arthrose [87] und in wachsenden Tumoren wird die Angiogenese gehemmt [28]. Die Phase I der klinischen Prüfung bei fortgeschrittenen soliden Tumoren hat Vitaxin erfolgreich beendet; momentan untersucht man in einer Pilot-Phase II Studie den Einsatz bei Patienten mit Leiomyosarkom. Der Peptidantagonist EMD121974 wird derzeit in Phase I und II Studien bei Kaposi's Sarkom, Hirntumoren und soliden Tumoren getestet [55].

1.4.4.5 Suramin

Suramin ist ein polysulfonierter Naphthylharnstoff, der *in vitro* die Bindung verschiedener Wachstumsfaktoren (FGF-2, PDGF, EGF, TGF- β , IGF-1, VEGF) an der Zelloberfläche und damit die Zellproliferation hemmt [51].

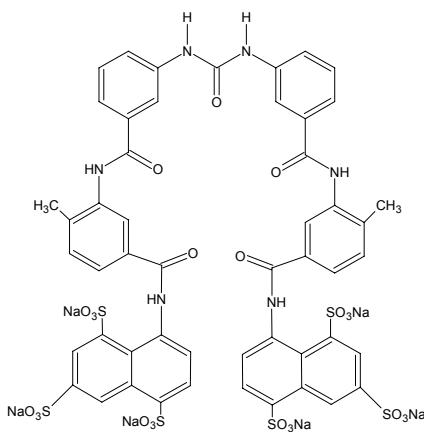


Abbildung 10: Suramin

Im CAM-Assay bleibt die Aktivität angiostatischer Steroide beim Ersatz von Heparin durch Suramin erhalten [73]. Suramin selbst zeigt ebenfalls einen antiangiogenen Effekt an der Chorioallantoismembran [88]. Darüber hinaus interagiert Suramin mit verschiedenen Enzymen der intrazellulären Signaltransduktion [51]. Klinische Studien an Patienten mit diversen Tumoren zeigten, dass hohe Dosen erforderlich sind um nachweisbare Effekte zu erzielen, dabei aber Nebenwirkungen im Gerinnungssystem auftraten [28]. Durch strukturelle Modifikationen im Molekül konnten weniger toxische, aber ebenso aktive Derivate gefunden werden [51].

1.4.4.6 Thalidomid

Das vor ca. 50 Jahren als Hypnotikum entwickelte und nach Routinetierversuchen als absolut untoxisch geltende Thalidomid (s. Abbildung 11) hatte aufgrund seiner teratogenen Nebenwirkungen zu einer wahren Katastrophe geführt.

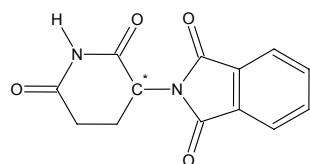


Abbildung 11: (±)-Thalidomid

Mehr als 10000 Menschen mit schwerwiegenden Organdeformationen wurden in den späten 50er und 60er Jahren weltweit geboren. Erst später entdeckte man die speziesabhängige Teratogenität des Thalidomids, die nicht bei Ratten- und Mäuseembryonen, sondern erst an Kaninchen und bestimmten Kleinaffen auftritt. Keine der bis heute postulierten Theorien zum teratogenen Mechanismus ist endgültig gesichert (u.a. Prostaglandinsynthese-katalysierte teratogene Metaboliten, Initiator DNA schädigender Sauerstoffradikale, Integrin-Hemmung) [89].

Seit 1998 ist Thalidomid unter strengen Auflagen wieder als Arzneimittel zugelassen (zur Lepra-Behandlung). Mittlerweile hat man die immunmodulatorische Wirkung insbesondere durch „Down“-Regulierung verschiedener Zytokine (u.a. TNF- α) erkannt, wodurch sich verschiedenste Anwendungsgebiete (Kachexie v.a. im Endstadium von Krebs und AIDS, neoplastisches Fieber, Tuberkulose, Mundaphthen bei AIDS, Pyoderma gangraenosum, fortgeschrittene solide Tumor- und Blutkrebsarten, rheumatischer Formenkreis, Abstoßungsreaktionen bei Transplantationen) ergeben [89]. Im Hornhautmodell des

Kaninchens wurde gezeigt, dass Thalidomid nach *p.o.* Applikation die FGF-2 induzierte Angiogenese hemmt [90]. Erst nach Abbau in der Leber entsteht speziesabhängig ein aktiver Metabolit [91]; dies erklärt auch den fehlenden Effekt im CAM-Assay. Nach einer ersten Studie mit 84 Patienten mit multiplen Myelom hofft man auf Behandlungserfolge bei bisher nicht therapierbaren Tumorerkrankungen (u.a. Phase I Malignes Gliom) [55].

1.4.5 Neuartige Angriffspunkte

Als mögliche Targets der antiangiogenen Therapie gelten auch die Enzyme PD-ECGF/TP (platelet-derived endothelial cell growth factor/Thymidinphosphorylase) und COX (Cyclooxygenase) [28].

TP wird von verschiedenen Tumoren (u.a. der Mamma, des Ovar und des Pankreas) und während der Menstruation überexprimiert. Der angiogene Effekt des PD-ECGF, der *in vitro* die Migration von EC und *in vivo* die Angiogenese stimuliert, beruht auf der Freisetzung von 2-Desoxy-D-ribose als Folge der TP-katalysierten Spaltung von Pyrimidin(desoxy)nucleosiden in 2-Desoxyribose-1-phosphat und die entsprechende Base und anschließenden Dephosphorylierung. Bislang sind nur wenige TP-Inhibitoren bekannt (6-Aminothymin (6AT), 6-Amino-5-bromuracil (6A5BU), 7-Deazaxanthin (7-DX)) [28].

Jüngsten Untersuchungen nach ist die induzierbare Form der Cyclooxygenase COX-2 an der Kontrolle der Tumorangiogenese beteiligt. COX-2 reguliert verschiedene zelluläre Prozesse u.a. während der Entwicklung des Colonkarzinoms. In einer Cocultur endothelialer Zellen und Kolonkarzinomzellen konnte gezeigt werden, dass COX-2 die Freisetzung angiogener Prostaglandine aus Tumorzellen induziert. Durch unselektive (NSAID, z.B. Aspirin) und selektive COX-Inhibitoren (NS-398) kann der Effekt der COX auf die EC unterbunden werden, auch wenn die Zufuhr exogener Prostaglandine nur zur teilweisen Aufhebung der NSAID-Wirkung führt [92]. Dies spricht für weitere Prostaglandin-unabhängige Effekte der induzierbaren Cyclooxygenase auf die Angiogenese (Erhöhung der VEGF-Expression, Hemmung der Apoptose von EC) [93].

1.4.6 Antiangiogene Gentherapie

Die Gentherapie, also das Einbringen von Genen in Zellen, greift gewöhnlich die Tumorzelle an und zielt darauf ab

- die Zellzyklen von Tumorzellen anzuhalten
- Tumorzellen zu Apoptose oder Suizid zu zwingen
- zytostatische Moleküle zu exprimieren
- genetische Mutationen zu korrigieren
- die Immunantwort des Wirtes gegen Tumorzellen zu verbessern und
- die Sensitivität der Tumorzellen gegen Wirkstoffe zu erhöhen.

Als problematisch erweisen sich dabei jedoch die Heterogenität der Tumorzellpopulation, die mögliche Entwicklung resistenter Tumorzellen und letztlich auch die limitierte Diffusion der Genvektoren.

Im Gegensatz dazu sind das Ziel der antiangiogenen Gentherapie die genetisch stabilen EC. Mehr als 10 endogene Angiogeneseinhibitoren (Angiostatin, Endostatin, IL-4, IL-12, PF-4, mutierter VEGFR2, löslicher VEGFR1, löslicher Tie2-Rezeptor, TIMP-1, VEGF antisense, TSP-1) wurden hinsichtlich einer möglichen Gentherapie in der Behandlung von Tumoren in Tieren getestet. Alle eingesetzten Inhibitoren führten zu den erwarteten anti-Tumoreffekten. Im Gegensatz zur Therapie mit endogenen Proteinen sind nur geringe Mengen an DNA-Molekülen erforderlich (kostengünstigere Behandlungsmethode), auch ist die Expression des eingebauten Gens im Organismus für Monate oder sogar Jahre durch verbesserte DNA-Vektoren gewährleistet [58].

Alle bis heute durchgeführten Untersuchungen stellen jedoch nur erste Schritte in Richtung einer antiangiogenen Gentherapie am Menschen dar; die Handhabung und Übertragung in die Praxis sind noch immer problematisch.

1.5 Angiogenese und sulfatierte Kohlenhydrate

Die ECM ist ein komplexes Gefüge aus verschiedenen Makromolekülen, hauptsächlich Collagen, Proteoglykanen, Strukturglykoproteinen und Elastin, dessen struktureller Aufbau und funktionelle Zusammensetzung für die Aufrechterhaltung der normalen Gewebearchitektur und für gewebespezifische Funktionen essentiell sind [94]. Die ECM speichert nicht nur eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren und Zytokinen durch die Bindung an

Komponenten der ECM (Proteoglykane, PGs), sondern kann auch die Expression von GF-Rezeptoren modulieren [95].

Die Proteoglykane der ECM und der Zelloberflächen bestehen aus einem zentralen Protein und einer bis mehrerer kovalent gebundener Glykosaminoglykan (GAG)-Seitenketten; häufig finden sich weitere N- und O-glykosidische Oligosaccharide im Proteinteil. Von Bedeutung für die Angiogenese sind insbesondere die GAGs, die außer in PGs auch in löslicher Form vorliegen können. GAGs sind negativ geladene Polysaccharide, die zum überwiegenden Teil aus sich wiederholenden Disaccharideinheiten (Aminozucker + Hexuronsäure (Ausnahme: Galactose bei Keratansulfat)) bestehen. Die Sulfatgruppen können ester- oder aminoverknüpft sein. Die Zahl der Disaccharideinheiten/Kette variiert zwischen 15 (KS), 50-200 (HS, CS) und mehr als 4000 (Hyaluronsäure) [96]. Tabelle 6 zeigt die hauptsächlich enthaltenen Disaccharidkomponenten der drei Typen sulfatierter GAGs (Chondroitin-/Dermatansulfat, Heparin und Heparansulfat, Keratansulfat), wobei Hyaluronsäure nicht als Teil der Proteoglykanstruktur betrachtet wird, da es ein unsulfatiertes, nicht kovalent gebundenes Glykan darstellt.

Tabelle 6: vereinfachte Kohlenhydratzusammensetzung von GAGs (nach [96])

Abkürzungen: GalNAc, N-Acetylgalactosamin; GlcA, Glucuronsäure; IdoA, Iduronsäure; GlcNAc, N-Acetylglucosamin; GlcNSO₃, N-Glucosaminsulfat; Gal, Galactose

Glykosaminoglykan	Disaccharide (Hauptkomponenten)	Position der Sulfatgruppen	Bindungs- typ
<u>Galactosaminoglykane</u>			
Chondroitinsulfat (CS)	GalNAc GlcA	4, 6 bzw. 4 und 6 -	β-1,4
Dermatansulfat (DS)	GalNAc IdoA	4 oder 6 2 oder unsulfatiert	β-1,4
<u>Glucosaminoglykane</u>			
Heparansulfat (HS)	GlcNAc oder GlcNSO ₃ GlcA oder IdoA	6 oder unsulfatiert 2 oder unsulfatiert (IdoA)	α-1,4
Heparin	GlcNSO ₃ IdoA	3 oder 6 2	α-1,4
Keratansulfat (KS)	GlcNAc Gal	6 6 oder unsulfatiert	β-1,3
Hyaluronsäure (HA)	GlcNAc GlcA	- -	β-1,4

HSPGs können verschiedene Moleküle binden (u.a. ECM-Proteine, Enzyme und Proteaseinhibitoren), insbesondere auch verschiedene Wachstumsfaktoren, Zytokine und Chemokine, die bei der Angiogenese eine Rolle spielen (s. Tabelle 7), und so deren biologische Aktivität beeinflussen. Die Interaktion eines GF mit HSPGs stabilisiert ihn, schützt

vor dem proteolytischen Abbau und ist Voraussetzung für die Wechselwirkung mit Rezeptortyrosinkinasen.

Tabelle 7: Angiogenese beeinflussende Wachstumsfaktoren, Zytokine und Chemokine, die mit HSPGs interagieren (modifiziert nach [3])

Fibroblast growth factors (FGFs)	Interleukin-8 (IL-8)
Vascular endothelial growth factor (VEGF)	Interferon- γ (IFN- γ)
Platelet-derived growth factor (PDGF)	Interferon- γ inducible protein 10 (IP 10)
Placental growth factor (PIGF)	Macrophage inflammatory protein-1 (MIP-1)
Hepatocyte growth factor (HGF)	Platelet factor-4 (PF-4)
Heparin-binding EGF-like growth factor	Pleiotrophin
Transforming growth factor-beta (TGF- β)	HIV-tat

Die Interaktion von FGF-2 mit HSPGs führt zu einer Änderung der Tertiärstruktur und Oligomerisierung des Wachstumsfaktors. So wird die Bindung von FGF-2 und des Heparansulfats an den high-affinity-Rezeptor möglich. Es folgt die für die Aktivierung des high-affinity-Rezeptors notwendige Dimerisierung, die zur intrazellulären Autophosphorylierung der Tyrosinkinasen führt und die Signaltransduktionskaskade auslöst. Ein Modell der Wechselwirkung zwischen FGF-2, HSPG und dem FGFR1 zeigt Abbildung 12.

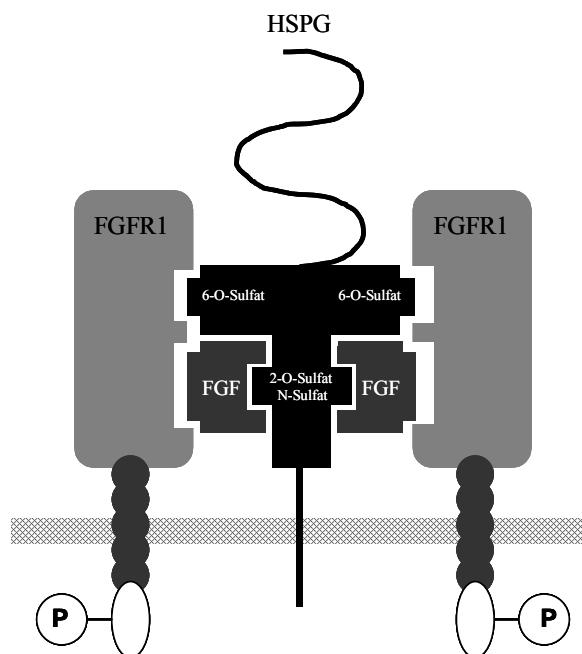


Abbildung 12: Modell des ternären Komplexes aus RTK, FGF-2 und HSPG (modifiziert nach [3])

Verhindert man die Bildung des ternären Komplexes aus RTK, GF und HSPG durch die externe Zugabe von Oligosacchariden zu einer EC-Kultur bleibt das Wachstum von EC aus [97].

Eine Beeinflussung der Angiogenese durch die externe Zufuhr von Heparin und anderen sulfatierten Kohlenhydraten beruht auf modulatorischen Effekten auf Proteine der ECM, Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, Enzyme und proinflammatorische Mediatoren [23]. Heparin verstört, unabhig von gerinnungshemmenden Eigenschaften, die durch einen Extrakt humaner Hepatomzellen vermittelte Angiogenese im CAM-Assay, ohne sie selbst zu induzieren [98]. Überraschenderweise frt Heparin in Kombination mit angiotastischen Steroiden zur Angiosuppression [69]. Auch ein Heparin-Steroid-Konjugat aus Heparinadipinhydrazid und Cortisol zeigt sowohl *in vitro* als auch *in vivo* antiangiogene Aktivität und eine Hemmung des Tumorwachstums in Mäusen [99]. Andere Arbeitsgruppen konnten belegen, dass Heparin auch bei alleiniger Applikation das Gefswachstums in der Chorioallantoismembran hemmt [100]. Unfraktioniertes Heparin kann sowohl angiogenesestimulierende als auch -inhibierende Fraktionen enthalten [101]. Diese widersprüchlichen Beobachtungen beruhen auf strukturellen Unterschieden und Inhomogenitäten der untersuchten Heparine.

Verschiedene sulfatierte Polysaccharide wie z.B. Pentosanpolysulfat [102,103,104], LAM S5 [105] und Chitinderivate (SCM-chitin III) [106] sind als Angiogeneseinhibitoren bekannt. Auch λ -, ι - und κ -Carrageenan, die selektive Antagonisten u.a. von FGF-2 sind [107], zeigen *in vivo* Angiosuppression [108].

In der Folge konzentrierte man sich auf niedermolekulare, gut charakterisierte sulfatierte Kohlenhydrate. Verschiedene semisynthetische Heparin- und Heparansulfat-ähnliche Oligosaccharide (u.a. Oligosaccharide des *Escherichia coli* K5 Kapselpolysaccharids) wurden auf FGF-2 bindende Eigenschaften oder ihre antiangiogene Aktivität getestet [109,110]. Das Heparansulfat Suleparoid, ein semisynthetisches N-desulfatiertes, N-acetyliertes Heparinderivat (MW = 9 kDa) zeigt *in vivo* im CAM-Assay und im Hornhautmodell der Ratte Angiogenesehemmung [111].

Das Carrageenangrundgert diente als Ausgangspunkt für die Partialsynthese niedermolekularer definierter Galactane, die *in vivo* antiangiogene Aktivität zeigen [112,113], deren möglicher Wirkmechanismus jedoch noch unklar ist.

2 Problemstellung

Basierend auf der in einem *in vivo* Test belegten antiangiogenen Aktivität verschiedener hoch- und niedermolekularer Galactansulfate sollte in weiteren *in vivo* Testungen am bebrüteten Hühnerei ein möglicher Einfluss sulfatierter Kohlenhydrate nicht nur auf die embryonale Angiogenese, sondern insbesondere auf die bei chronischer Entzündung ablaufende und die durch Tumorzellen induzierte Angiogenese untersucht werden. Dies sollte Hinweise auf mögliche Wirkmechanismen geben.

Bei den Testsubstanzen handelte es sich überwiegend um Galactansulfate, die im Rahmen einer vorangegangenen Dissertation partialsynthetisch hergestellt wurden [112]. Darüber hinaus wurden kommerziell erhältliche Carrageenane sowie weitere Poly- und Oligosaccharide in die Testung einbezogen (s. Kapitel 3, Testsubstanzen).

In vivo Testung

- Bestimmung der antiangiogenen Aktivität noch nicht getesteter Verbindungen im CAM-Assay [112]
- Überprüfung der antiinflammatorischen Aktivität im HET-CAM-Assay [114]
- Etablierung eines modifizierten CAM-Assays zur Überprüfung des inhibitorischen Effekts auf die durch U-87 MG Zellen induzierte Angiogenese (TUM-CAM-Assay)

Des Weiteren sollten gezielt einige wichtige angiogene Wirkmechanismen *in vitro* überprüft werden. Die möglichen Interaktionen sulfatierter Kohlenhydrate mit Proteinen (FGF-2, IL-2, VEGF) sollten mit unterschiedlichen Versuchsmethoden analysiert werden.

In vitro Testung

- Gelpermeationschromatographie mit FGF-2
- Fluoreszenzuntersuchungen an FGF-2
- Trypsin-Verdau-Assay mit FGF-2 und IL-2
- U-87 MG Zellkultur-Assay (Einfluss der Testsubstanzen auf die VEGF-Produktion)

Die Testung sollte einerseits mögliche Wirkmechanismen der sulfatierten Kohlenhydrate aufdecken. Andererseits sollten die Ergebnisse zur Aufklärung möglicher Zusammenhänge zwischen einer Aktivität *in vivo* und/oder *in vitro* und verschiedenen strukturellen Parametern z.B.

- Sulfatierungsgrad
- Kohlenhydratgrundgerüst
- Position der Sulfatgruppen
- Molekulargewicht
- Lipophilie
- Art der Substituenten

dienen.

Die Eignung der verwendeten *in vitro* Tests als Screening-Methoden zur rascheren Auffindung *in vivo* aktiver antiangiogener Verbindungen sollte abschließend beurteilt werden.

3 Testsubstanzen

Die strukturelle Zuordnung, das entsprechende Molekulargewicht und der Substitutionsgrad sowie die verwendeten Abkürzungen der Testsubstanzen sind in Kapitel 7.3 angegeben.

3.1 Polysaccharide

3.1.1 Galactane

Ziel der Derivatisierung natürlicher Carrageenane sowie der Isolierung und Modifikation genuiner Galactane unterschiedlichster Herkunft war es, Carrageenanderivate mit höherer antiangiogener Aktivität und optimierten Eigenschaften (fehlende Allergenität, niedrige Viskosität, keine Gelbildung in wässriger Lösung, einheitliche Struktur, verbesserte Bioverfügbarkeit) zu erhalten [112].

3.1.1.1 lineare α -1,3/ β -1,4-D-Galactane (Carrageenane)

In die Untersuchungen wurden verschiedene genuine Carrageenane und einige Derivate einbezogen.

Carrageenane sind lineare α -1,3/ β -1,4-D-Galactane, die sich hauptsächlich im α -3,6-D-Anhydrogalactosegehalt sowie im Sulfatierungsgrad und in der Sulfatgruppenverteilung unterscheiden. Als Strukturpolysaccharide vieler Rotalgen sind sie in den Zellwänden und der interzellulären Matrix der Algenthalli lokalisiert.

Die bedeutendsten Vertreter sind κ -, ι - und λ -Carrageenan. θ -Carrageenan entsteht beim Erhitzen von λ -Carrageenan in stark alkalischer Lösung unter Bildung von α -3,6-D-Anhydrogalactose.

Da eine Veretherung freier OH-Gruppen möglicherweise zu einer Änderung der Proteinbindungseigenschaften führt, wurde das durch Methylierung von ι -Carrageenan gewonnene Derivat mit erhöhter Lipophilie und weniger freien OH-Gruppen ebenfalls getestet (Methyl- ι -Carrageenan) [112].

Ein wesentlicher Nachteil der im Handel erhältlichen hochmolekularen Carrageenane ist ihre Inhomogenität, da sich die während des dreigliedrigen Generationswechsels auftretenden

unterschiedlichen Hybridformen der Algen in ihrem Carrageenanmuster unterscheiden bzw. Carrageenane unterschiedlicher Grundstruktur synthetisieren.

Mit ι -Carrageenan pH 3,2 und dessen Fraktionen D3, D4, D5, D6 und D7 standen Derivate von ι -Carrageenan mit einheitlicherer Struktur und definierterem Molekulargewicht (MW) für die Testung zur Verfügung. Die mit ι -Carrageenan pH 3,2 bezeichneten Fragmente (700 Da < MW < 79 kDa, mittleres MW: 20 kDa) wurden aus ι -Carrageenan durch Dialyse und Lyophilisation (Autohydrolyse) gewonnen und mittels Ionenaustauschchromatographie fraktioniert (D3, D4, D5, D6 und D7) [115].

3.1.1.2 lineare β -1,4-D-Galactane

Vogl hatte einfache, homogen strukturierte Galactane unterschiedlicher Verknüpfungsart partialsynthetisch hergestellt [112]. Wie die Ergebnisse mehrerer Arbeiten vermuten lassen, ist die Art der glykosidischen Bindung von größerer Bedeutung als Zahl und Verteilung der Sulfatgruppen [72,116].

Ausgehend von Samen von *Lupinus polyphyllus* Lindl., Fabaceae wurde ein lineares β -1,4-D-Galactan mit einem Molekulargewicht von ca. 8,5 kDa (LuPS) gewonnen [112], das durch unselektive Sulfatierung zu einer Reihe von β -1,4-D-Galactanen mit unterschiedlichem MW und Substitutionsgrad modifiziert wurde (LuPS-sulfate: LuPS S3, LuPS S5, LuPS S7, LuPS S8, LuPS S9).

Die Methylierungsanalytik der sulfatierten Polysaccharide hatte erwartungsgemäß eine ungleichmäßige Substitution gezeigt. So konnten neben hochsulfatierten Zuckern auch unsulfatierte Zucker nachgewiesen werden. Jedoch wurden bestimmte Positionen (Pos.) bevorzugt sulfatiert [112]:

Pos. 6 > Pos. 3 > Pos. 2 > Pos. 4

Um den Einfluss der Position der Sulfatgruppen auf die *in vivo* bzw. *in vitro* Aktivität zu untersuchen, wurde das durch spezifische 6-Desulfatierung von LuPS S5 gewonnene LuPS S5 6DS, das hauptsächlich in Position 3, zusätzlich in geringerem Maße in Position 2 sulfatiert ist, eingesetzt [112]. Statt reiner Galactansulfate wurden auch die Phosphatester LuPS P1 und LuPS P2 (Phosphatgruppen gleichmäßig verteilt, Position 6 geringfügig bevorzugt) sowie das zusätzlich am C-6 fluorierte LuPS F S1 untersucht [112].

Da das unsulfatierte Ausgangsprodukt LuPS nicht mehr zur Verfügung stand, wurde stattdessen das bei der Fluorierung eines α -1,4-D-Galactans durch vollständige Anomerieinversion entstandene β -1,4-D-Galactan β -Galactan mit einem MW von etwa 4 kDa getestet [112].

3.1.1.3 lineare α -1,4-D-Galactane

Die α -1,4-verknüpften Galactane leiten sich von Polygalacturonsäure (PGA) ab. Diese wurde nach Carbodiimid-Aktivierung mit Natriumborhydrid reduziert. Dabei wurde eine lösliche (α -Galactan ls) und eine unlösliche (α -Galactan ul) Fraktion erhalten. Die unterschiedliche Löslichkeit der beiden linearen α -1,4-verknüpften Komponenten beruht vermutlich auf der Ausbildung übergeordneter Strukturen von α -Galactan ul aufgrund eines sehr einheitlichen Aufbaus aus mehr als 90% Galactose und nur wenig Galacturonsäure. Die anschließende Sulfatierung mit SO_3 -Pyridin/DMF führte zu den hoch sulfatierten Produkten α -Galactan ls S1 (α -Gal ls S1) und α -Galactan ul S1 (α -Gal ul S1) [112].

3.1.1.4 β -1,3-D-Galactane

Die untersuchten β -1,3-D-Galactansulfate AsaPS S1 sowie AG S1, LäPS v S1 und LäPS S1 wurden aus unterschiedlichem Ausgangsmaterial gewonnen [112].

AsaPS S1 wurde durch Sulfatierung des Arabinogalactans (AsaPS) aus dem Gummiharz *Asa foetida*, dem eingetrockneten Milchsaft verschiedener Ferulaarten, insbesondere von *Ferula assa foetida* L., Apiaceae, partialsynthetisch hergestellt. Die Methylierungsanalyse von AsaPS zeigte, dass etwa jedes 5. Galactosemolekül in Position 6 verzweigt ist [112].

Um ein lineares β -1,3-D-Galactan zu gewinnen, wurde das Arabinogalactan (AG) von *Larix decidua* Miller, Pinaceae, verwendet. Durch saure Partialhydrolyse und Dialyse konnte ein stark verzweigtes Galactan gewonnen werden (LäPS v), wobei etwa jedes 2. Galactosemolekül in Position 6 eine Seitenkette trägt (Galactose oder 6-O-Galactopyranosyl-galactose). Durch Smith-Abbau von LäPS v entstand das niedermolekulare lineare β -1,3-D-Galactan LäPS. Die so gewonnenen Galactane sowie das unmodifizierte Lärchenarabinogalactan AG wurden durch nichtselektive Sulfatierung derivatisiert (LäPS v S1, LäPS S1, AG S1) [112].

3.1.2 Glucane

Neben den Galactansulfaten fanden auch verschiedene Glucane, die D-Glucose als Monosaccharidbaustein enthalten, Eingang in die Testung.

Am weitesten verbreitet ist das Strukturpolysaccharid Cellulose, das in den Zellwänden der meisten Pflanzen enthalten ist. Es setzt sich aus β -1,4-verknüpften D-Glucoseresten zusammen. Von einer Arbeitsgruppe in Teltow-Sechof wurden drei selektiv sulfatierte Cellulosederivate zur Verfügung gestellt. Dabei handelt es sich um in Position 2 (Cellulose O-2) oder 3 (Cellulose O-3) bzw. in beiden Positionen sulfatierte Glucane (Cellulose 2-3).

Aus der Braunalge *Laminaria digitata* (Huds.) Lamour., Laminariaceae, kann ein β -1,3-D-Glucan isoliert werden: Laminarin. Durch Sulfatierung erhält man LAM S5, das *in vitro* die Lumenbildung von EC in Matrikel und *in vivo* das Gefäßwachstum in der Chorioallantoismembran hemmt (CAM-Assay). Neben der antiangiogenen Aktivität zeigt LAM S5 antitumorale Aktivität gegen RIF-1 Tumoren in C3H/Km Mäusen [105].

LiPS IX ist ein Sulfatierungsprodukt des linearen β -1,3/ β -1,4-D-Glucans Lichenan, das eine gewisse Struktur analogie zum λ -Carrageenan besitzt. Lichenan ist das Hauptpolysaccharid der Flechten *Cetraria islandica* L. und *Cetraria tenuifolia* (Retz.), Parmeliaceae. Es setzt sich aus 60-200 β -1,4 (70%)- und β -1,3 (30%)-verknüpften Glucoseeinheiten zusammen, wobei Cellobiose- und Cellotrioseeinheiten durch Laminaribiose getrennt sind [117].

3.1.3 Sonstige Kohlenhydrate

In die Untersuchungen wurden ferner die folgenden Kohlenhydrate einbezogen:

Fucoidan, ein aus überwiegend α -1,2-gebundenem L-Fucose-4-sulfat (in Position 3 entweder verzweigt oder eine zweite Sulfatgruppe) bestehendes Polysaccharid kommt u.a. in der Braunalge *Fucus vesiculosus* L., Phaeophyceae, vor [117]. Es beeinflusst sowohl die Blutgerinnungskaskade [118] als auch die Fibrinolyse [119]. Darüberhinaus zeigt es Aktivität gegen verschiedene Viren (z.B. HIV, Herpes Simplex- und Cytomegalie-Virus) [120,121]. Fucoidane unterschiedlichster Herkunft können Wachstum (z.B. Ehrlich-Karzinom, nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom) und Metastasierung (Lewis-Lungenkarzinom) verschiedener Tumoren im Tiermodell hemmen [122,123,124]. In einem *in vitro* Modell inhibierte übersulfatiertes Fucoidan die Lumenbildung menschlicher Gefäßendothelzellen [125].

Die erste antiangiogene Verbindung in der klinischen Prüfung war Pentosanpolysulfat (PPS), ein partialsynthetisches Xylanpolysulfat aus Birkenholz. Es fand zunächst als Antikoagulans und zur Behandlung der interstitiellen Cystitis und strahleninduzierter Proktitis

(Mastdarmentzündung) Eingang in die Therapie [126]. *In vitro* hemmt PPS die FGF-2-induzierte Migration und Proliferation von EC und bindet verschiedene, von unterschiedlichen Tumorzellen sezernierte heparinbindende Wachstumsfaktoren [103]. Erste klinische Prüfungen offenbarten schwere toxische Nebenwirkungen (Blutungen, Thrombozytopenie, erhöhte Transaminasespiegel) ohne deutliche klinische Aktivität [104].

Als Hauptkomponente des Agars, der als Bestandteil der Mittellamellen und Primärzellwände aus den Thalli verschiedener Rotalgen, v.a. von *Gelidium*arten, *Rhodophyceae*, durch Heißextraktion mit Wasser gewonnen wird, ist die Agarose für die Gelbildungsfähigkeit des Agars verantwortlich. Sie besteht aus β -1,3-D-Galactose- und α -1,4-(3,6)-Anhydro-L-Galactose-Bausteinen. Durch Sulfatierung mit SO_3 -Pyridin/DMF wurde das hochmolekulare Agarosederivat Agarose S3 erhalten [112].

Alginsäure ist neben Pektinen, neutralen Glykanen und Fucoidan ein weiterer charakteristischer Zellwandbestandteil von Braunalgen. Sie wird u.a. aus *Macrocystis pyrifera* L., *Phaeophyceae*, gewonnen und stellt ein Gemisch linearer Polyuronide aus β -1,4-D-Mannuronsäure und α -1,4-L-Guluronsäure dar. Die beiden Hexuronsäuren liegen in der Alginsäure als Blockpolymere (MM- oder GG-Block) oder auch als alternierende Sequenzpolymere (MG-Block) vor [117].

3.2 Oligosaccharide

Um eine gezielte antiangiogene Wirkung zu erreichen und Effekte auf das Gerinnungssystem oder die Komplementkaskade weitgehend ausschalten zu können, sollten sulfatierte Oligosaccharide mit exakt charakterisierter Struktur eingesetzt werden. Die Arbeiten von Käsbauer zur Synthese sulfatierter Oligosaccharide und ihrer Testung auf antiangiogene Wirkung hatten bereits eine mit sulfatierten Polysacchariden vergleichbare Angiogeneseinhibition bestimmter Oligosaccharidsulfate gezeigt [127,128]. Deshalb wurden auch einige definierte Oligosaccharide getestet:

Das hochsulfatierte Disaccharid Saccharoseoctasulfat interagiert u.a. mit dem Wachstumsfaktor FGF-1. Es hemmt die FGF-1-induzierte Zellproliferation von Endothelzellen, indem es die Oligomerisierung des Wachstumsfaktors verhindert und damit die Dimerisierung und Aktivierung der Rezeptortyrosinkinase unterbindet [97].

Durch enzymatische Spaltung von κ -Carrageenan können die Oligosaccharide Neocarratetraose-4(1),4(3)-disulfat und Neocarrahexasose-4(1),4(3),4(5)-trisulfat gewonnen werden.

4 In vivo Testung

4.1 In vivo Angiogenese-Testmodelle

Die Erforschung der Bedeutung sowohl der Angiogenese in neoplastischen und anderen angiogenen Erkrankungen als auch der therapeutischen Angiogenese erforderte die Entwicklung verschiedener Assays zur Quantifizierung der Angiogenese. Grundsätzlich stehen für molekularbiologische und wirkmechanistische Untersuchungen und zur Auffindung potentieller Angiogeneseinhibitoren/-stimulatoren *in vivo* und *in vitro* Assays zur Verfügung. Keiner der bis heute verwendeten Tests erfüllt alle an einen idealen quantitativen Angiogenese-Assay zu stellenden Anforderungen [129]:

- bekannte Freisetzungsraten und räumliche/zeitliche Konzentrationsverteilung angiogener Faktoren/Inhibitoren zur Erstellung von Dosis-Wirkungskurven
- möglicherweise als Quelle angiogener Faktoren verwendete neoplastische Zellen müssen genetisch gut definiert sein
- quantitative Messung der neugebildeten Gefäßstrukturen
- quantitative Messung der charakteristischen Funktionen des neuen Gefäßsystems (u.a. Migrations- und Proliferationsrate der EC)
- klare Unterscheidung zwischen neugebildeten und existierenden Gefäßen
- Vermeidung von Gewebeverletzungen, da sie Gefäßneubildung induzieren können
- Langzeit- und falls möglich nicht-invasive Beobachtung
- kosteneffektiv, schnell, routinemäßig zu handhaben, reproduzierbar, zuverlässig

Um den komplexen Prozess der Angiogenese in Modellen zu imitieren, sind verschiedene Zelltypen (Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Perizyten, Entzündungszellen), eine geeignete extrazelluläre Matrix und ein ausgewogenes Gleichgewicht an angiogenen Faktoren erforderlich [130].

In vitro können nur bestimmte Aspekte der Angiogenese wie z.B. die Proliferation, Migration und Lumenbildung von Endothelzellen oder die Bildung proangiogener Wachstumsfaktoren in zellulären Systemen untersucht werden. Letztlich muss jeder *in vitro* Effekt in einem *in vivo* Assay bestätigt werden, weil nicht zwangsläufig *in vitro* Beobachtungen auf die *in vivo* Situation übertragen werden können. Ergebnisse aus *in vitro* Assays, die in der Regel einen spezifischen Wirkmechanismus untersuchen, stehen häufig im Widerspruch zur Aktivität *in*

vivo, da sich hier verschiedenste, möglicherweise auch bisher nicht bekannte Mechanismen wechselseitig beeinflussen können (Redundanz der Angiogenese) [129].

Zur *in vivo* Quantifizierung der Angiogenese werden drei unterschiedliche Versuchsansätze verwendet (s. Tabelle 8).

Tabelle 8: *in vivo* Assays zur Quantifizierung der Neovaskularisation [129]

Untersuchung der Mikrozirkulation	Vaskularisierung in Matriximplantate
<u>chronische transparente Kammern</u>	<ul style="list-style-type: none"> • s.c. implantierte Polymergele mit angiogenen Faktoren • Collagengele mit/ohne angiogene(n) Faktoren, implantiert in „dorsal skin chambers“ (Mäuse) oder „cranial windows“ • auf der CAM implantierte Polymergele
<u>externe Gewebepräparationen</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Hamster cheek pouch (ohne Fenster) • Dorsal skin and subcutaneous air sac (Ratte) • Subcutane Assays • Intradermale Assays • CAM-Assay • Rat cremaster muscle • Mesenteriale Präparationen
<u>In situ Präparationen</u>	<p>Gewebeschnitte</p> <ul style="list-style-type: none"> • verschiedene Tumorgewebe • Gewebe von CAM-Assays • Gewebe von „corneal micropocket assays“ • mit Polymer durchdrungenes Tumorgewebe
<ul style="list-style-type: none"> • Anterior chamber/Iris assays • Corneal micropocket assays 	

In sog. mikrozirkulatorischen Präparaten kann das Wachstum neuer Kapillaren lichtmikroskopisch untersucht werden. Eines der ersten Testsysteme zur Angiogenese waren die transparenten Kammern, die aus zwei, eine runde Kammer bildenden Metallplatten bestehen und zunächst im Kaninchenohr [131], später auch in der Backentasche des Hamsters [132] implantiert wurden.

Die weitere Entwicklung führte über das „Rat dorsal air sac“-Modell, bei dem Ratten in eine Luftpammer am Rücken eine Milliporekammer mit Testsubstanz implantiert wird [133], über das „Corneal micropocket“-Modell (Implantation eines testsubstanz- oder tumorhaltigen Polymerpellets in der Hornhaut von Kaninchen, Ratten oder Mäusen) [134] hin zur Verwendung von gel- oder schwammartigen Polymermatrices auf der Chorioallantoismembran (CAM) und im „dorsal skin“- oder „cranial window“-Modell. Histologische Untersuchungen von verschiedenen Geweben sind neben der Bestimmung angiogener Faktoren in Plasma und Urin auch in der Klinik gebräuchliche Methoden.

Die meisten *in vivo* Assays sind zeit- und kostenintensiv. Problematisch ist neben der schwierigen Quantifizierbarkeit auch die hohe Schwankungsbreite der Resultate, die Mehrfachbestimmungen erforderlich macht. Da aus ethischen Gründen die Zahl der Versuchstiere gering zu halten ist, können Testsubstanzen nicht in unbegrenzter Zahl und Konzentration getestet werden.

Eine Alternative stellt die Prüfung am bebrüteten Hühnerei dar (HET, Hühner-Ei-Test), die vergleichsweise kostengünstig und einfach durchzuführen ist. Der HET eignet sich zur Voruntersuchung der akuten und chronischen Toxizität sowie der Entwicklungstoxikologie, wodurch die Zahl der eingesetzten Säugetiere erheblich reduziert werden kann [135].

Bei der Prüfung der Schleimhautverträglichkeit chemischer Stoffe und extern anzuwendender Arzneistoffe gilt der HET-CAM-Assay auf der Chorioallantoismembran (CAM) des bebrüteten Hühnereies als anerkannte Ersatzmethode [135].

Seit 1992 werden in Deutschland HET-CAM-Daten zur Klassifizierung schwer augenreizender Chemikalien (Gefahrenhinweis R41) bei der Anzeige neuer Industriechemikalien akzeptiert. Eine Studie mit 136 Industriechemikalien hatte gezeigt, dass durch eine kombinierte Testung im HET-CAM-Test und im 3T3 (Mäusefibroblasten) NRU-Test Chemikalien mit ausreichender Zuverlässigkeit der Kategorie R41 zugeordnet werden können. Außerdem ergaben beide Tests eine ähnliche Einteilung nach dem Schweregrad der Reizung wie der *in vivo* Test am offenen Kaninchenauge (Draize eye test) [136].

Die Chorioallantoismembran eignet sich auch zur pharmakologischen Prüfung der Vasoaktivität sowie thrombogener und thrombolytischer Wirkungen (HET-VASA, HET-THRO). Außerdem sind Untersuchungen zur Metabolisierung von Prüfsubstanzen möglich (HET-META). Als Alternative zum klassischen Rattenpfotenödemtest zur Bestimmung der antiphlogistischen Aktivität steht der modifizierte HET-CAM-Test zur Verfügung [135,137].

Wegen des möglichen hohen Probendurchsatzes ist der HET insbesondere für Screeningzwecke geeignet. Vorteilhaft ist darüber hinaus der geringe Substanzbedarf, der ihn zu einem attraktiven Testmodell für Naturstoffe macht. Außerdem kann die Beurteilung möglicher Nebenwirkungen im gleichen System erfolgen (Embryotoxizität, Membranirritation, Blutung). Durch Modifikation des Testsystems kann nicht nur der Einfluss auf die embryonale Angiogenese (CAM-Assay), sondern auch auf die chronische Entzündung (modifizierter HET-CAM-Assay nach Marchesan und Paper) bzw. die durch Tumorzellen induzierte Angiogenese untersucht werden [108,112,113,114,138].

4.2 CAM-Assay

Neben dem Hornhautmodell an Kaninchen oder Ratte, das teuer und äußerst zeitaufwendig ist, ist die Chorioallantoismembran (CAM) des bebrüteten Hühnereies das wohl gebräuchlichste *in vivo* Testsystem für Angiogenese.

Die CAM ist eine extraembryonale Membran, die nach 3-4 Tagen durch Verschmelzen von Allantois (Ansammlung harnpflichtiger Substanzen) und Chorioneipithel entsteht. Die zunächst primitiven Gefäße proliferieren und differenzieren zu einem arteriovenösen System (bis Tag 8), das als Ernährungs- und Atmungsorgan den kleiner werdenden Dottersack ersetzt. Bis Tag 11 hält das schnelle Kapillarwachstum an, danach sinkt die Proliferationsrate rasch, und das vaskuläre System nimmt bis zum 18. Tag seine endgültige Form an [139].

Seit der Verwendung des CAM-Assays zur Bestimmung tumorinduzierter Angiogenese durch Folkman [140] wurden verschiedene Parameter wie z.B. Bebrütungsdauer, *in* oder *ex ovo* Verwendung, Art der Substanzapplikation, Dauer der Substanzapplikation oder der Auswertemodus variiert. Verwendet werden 6-10 Tage alte Embryonen, die entweder ohne Eischale in eine Petrischale überführt oder im geöffneten Ei belassen werden. Letztere Methode erhöht die Überlebensfähigkeit der Embryonen deutlich. Die Applikation der Testsubstanzen kann u.a. als getrocknetes Polymerplättchen (z.B. Methylcellulose (0,45%), synthetische Polymere (z.B. Ethylenvinylacetatcopolymer), Gelatine), befeuchtetes Filterpapier oder getränkter Gelatineschwamm erfolgen; der resultierende Effekt ist lokal begrenzt. Alternativ kann die Testsubstanz auch mittels einer feinen Nadel subkutan in ein Gefäß der Allantois appliziert werden, wodurch die Gesamtheit der CAM-Gefäße beeinflusst wird [141].

Die Auswertung erfolgt üblicherweise nach 1-3 Tagen. Bei der semiquantitativen Beurteilung wird u.a. Verteilung, Dichte oder Länge der Gefäße subjektiv bestimmt und mittels willkürlicher Score-Werte und Indices (z.B. Gefäßindex, Indexdichte) angegeben [139].

Ein automatisches Bildverarbeitungssystem bestehend aus Foto- oder Videokamera sowie entsprechender Software soll eine objektivere Auswertung ermöglichen [142], auch wenn durch mangelhaften Kontrast (feine Kapillaren können nicht mehr erfasst werden) die Anwendung im Wesentlichen auf eine Bestimmung der kapillarfreien Fläche um die antiangiogene Testsubstanz beschränkt ist und für weiterführende Auswertungen manuelle, d.h. subjektive Eingaben (z.B. Auswahl der zu erfassenden Kapillaren) erforderlich sind.

Nguyen et al. entwickelten einen leicht quantifizierbaren CAM-Assay, bei dem die Testsubstanz (FGF-2 ± Inhibitor, Tumorzellen) „sandwichartig“ in ein Collagengel zwischen zwei Kunststoffnetzen eingebettet ist. Die neugebildeten Kapillaren werden so zu vertikalem

Wachstum gezwungen. Die Stimulation der Angiogenese wird als Prozentsatz der Quadrate im oberen Netz angegeben, die Kapillaren enthalten [138].

Zur quantitativen Bewertung kann auch die histologische Untersuchung fixierter CAM-Proben (morpho- und planimetrische Methoden) herangezogen werden. Auch hier kann eine gewisse Subjektivität der Auswertung nicht ausgeschlossen werden. Mit Hilfe von ^3H -Thymidin kann die DNA-Syntheserate der EC in der CAM bestimmt werden [139].

4.2.1 Durchführung des CAM-Assays

Der CAM-Assay wurde nach der von Vogl entwickelten Methode [112,113] durchgeführt.

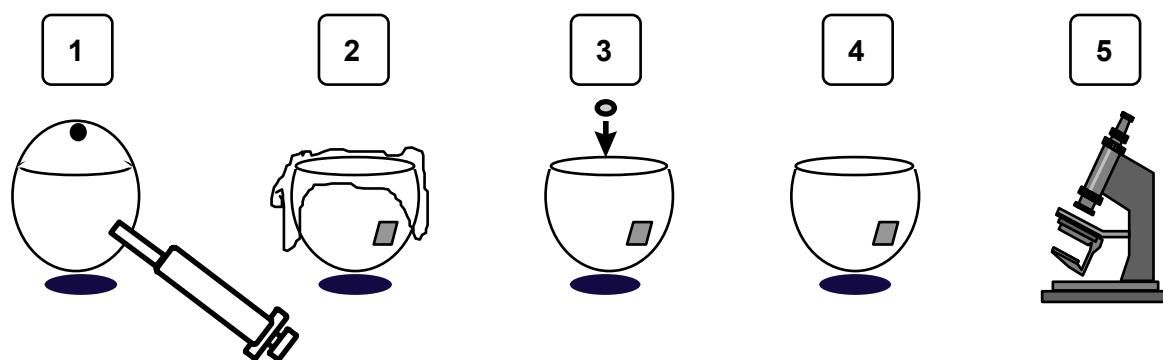


Abbildung 13: Durchführung des CAM-Assays

- 1 72 h Inkubation (37°C, 80% rel. Luftfeuchtigkeit)
Absaugen von 8-10 ml Eiweiß
Verschließen der Absaugöffnung
- 2 Entfernen von Eischale und Luftsackmembran
Bedecken des Eies mit Folie
72 h Inkubation (37°C, 80% rel. Luftfeuchtigkeit)
- 3 Aufgabe des Agarose-Pellets
- 4 weitere 24 h Inkubation (37°C, 80% rel. Luftfeuchtigkeit)
- 5 Auswertung unter der Stereolupe

Im Gegensatz zur Methode nach Folkman [140] wurden die Eier nach einer Bebrütungsdauer von 3 Tagen nicht in Petrischalen aufgeschlagen, sondern lediglich die Eischale an der stumpfen Seite geöffnet und die CAM freigelegt. Dadurch lag die Überlebensrate der Embryonen bis zum 6. Tag bei mehr als 85%. Um die bei *in vivo* Assays naturgemäß hohe Schwankungsbreite zu berücksichtigen, wurde eine relativ hohe Anzahl an Eiern (12) je Testsubstanz und Kontrollen verwendet und jeder Versuch mindestens einmal wiederholt. Andere Arbeitsgruppen beschränkten sich hingegen z.T. auf nur 4-6 Eier [143].

Die Testsubstanzen wurden in gelöster oder suspendierter Form als Agarosepellets auf der CAM appliziert. Die während der Pelletherstellung auftretende Temperaturbelastung ist sehr kurz, sodass keine Artefaktbildung zu erwarten ist. Gleichwohl ist diese Methode für thermolabile Substanzen (z.B. peptidische Wachstumsfaktoren) ungeeignet. Aus Kapazitätsgründen wurden die Testsubstanzen zur Eingangstestung stets in einer Konzentration von 50 µg/Pellet eingesetzt.

Im Allgemeinen erfolgt die Aufgabe der Testsubstanzen auf der CAM am Tag 10 oder später [144,145]. Davon abweichend wurden jedoch hier die Testsubstanzen bereits nach 6tägiger Inkubation im Stadium mit hoher EC Proliferation (bis Tag 11) appliziert [146]. Deshalb wurde im Unterschied zu anderen Studien der antiangiogene Effekt nach 24 h beurteilt, da bereits zu diesem Zeitpunkt eindeutig das Wachstum neuer Kapillaren beobachtet werden konnte und eine Vasodilatation als Ursache des beobachteten Effekts ausgeschlossen werden konnte [139].

Wegen dem zu diesem Zeitpunkt noch nicht voll ausgereiften Immunsystem des Embryos sind weniger unspezifische Entzündungsreaktionen durch das Trägermaterial (hier: Agarose) oder durch beim Öffnen des Eies entstehende Partikel der Eischale zu erwarten [147,148]. Während der gesamten Testung wurde nie eine derartige Membranreizung beobachtet.

Durchschnittlich lag die Überlebensrate der getesteten Eier bei 88-100%. Zur Erhöhung des Kontrastes und besseren Unterscheidbarkeit der neugebildeten von tieferliegenden Gefäßen wurde die CAM in Analogie zur Verwendung einer 10%igen Fettémulsion bei Einsatz eines automatischen Bildverarbeitungssystems [142] mit haltbarer Schlagsahne unterspritzt.

Die Auswertung erfolgte nach einem validierten Scoresystem [112,113], das nicht nur eine Positiv- bzw. Negativbeurteilung ermöglicht, sondern Aussagen über die Wirkstärke der antiangiogenen Testsubstanzen erlaubt (s. Tabelle 9).

Tabelle 9: Scorewerte zur Evaluierung des antiangiogenen Effekts [112,113]

Scorewert	Beurteilung	beobachteter Effekt
0	kein Effekt	-
0,5	sehr schwacher Effekt	kein kapillarfreier Bereich Fläche mit reduzierter Kapillardichte um das Pellet nicht größer als die Fläche des Pellets
1	schwacher-mittlerer Effekt	kleine kapillarfreie Fläche oder Fläche mit signifikant reduzierter Kapillardichte Effekte nicht größer als die doppelte Pelletgröße
2	starker Effekt	kapillarfreie Fläche um das Pellet mindestens doppelt so groß wie das Pellet

Abbildung 14 zeigt die CAM nach 24stündiger Inkubation mit Agarose. Das Adernetz um das Pellet zeigt keinerlei Veränderungen verglichen mit anderen Bereichen der CAM entsprechend dem Score 0. In Abbildung 15 ist der typische Effekt einer stark antiangiogenen Substanz zu erkennen (Score 2). Ein Areal, das mehr als der doppelten Pelletfläche entspricht, ist völlig frei von Kapillaren.

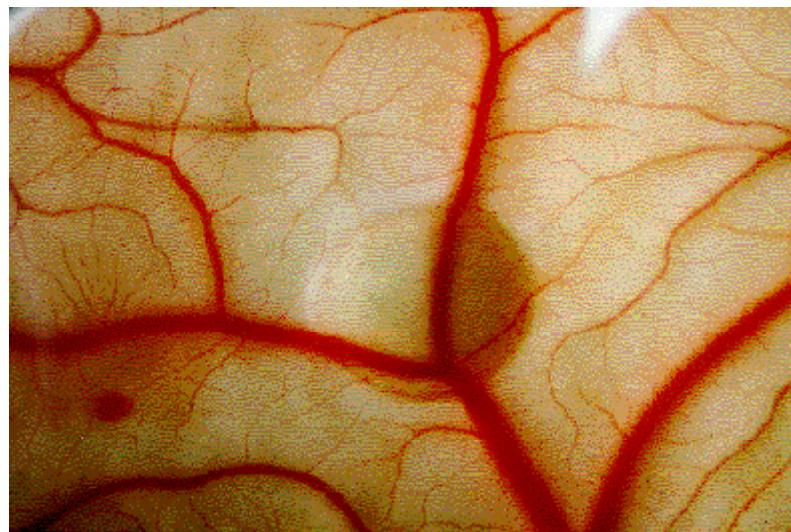


Abbildung 14: Kein Einfluss auf das Kapillarwachstum in der CAM durch ein testsubstanzfreies Agarosepellet. Beispiel für Scorewert 0 (s. Tabelle 9)

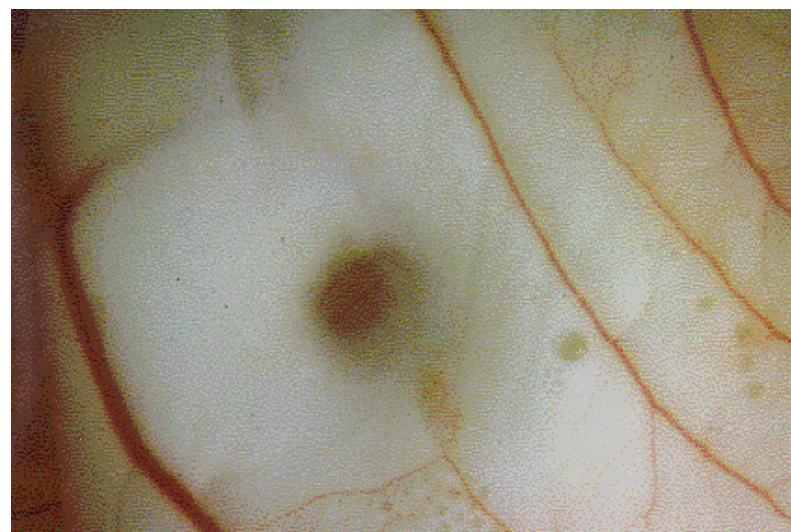


Abbildung 15: Hemmung des Kapillarwachstums in der CAM durch ein testsubstanzhaltiges Agarosepellet. Beispiel für Scorewert 2 (s. Tabelle 9)

Der Scorewert einer Testsubstanz wird als arithmetisches Mittel der Scorewerte der einzelnen getesteten Eier nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Scorewert} = \frac{\text{Zahl (Eier Score 0/0,5)} \times 0 + \text{Zahl (Eier Score 1)} \times 1 + \text{Zahl (Eier Score 2)} \times 2}{\text{Gesamtzahl lebender Eier}}$$

Dabei wird der Scorewert 0,5 zum Scorewert 0 gerechnet. Da es sich bei den Scorewerten um ordinalskalierte Werte handelt, ist lediglich eine Angabe der Rangfolge der Wirkstärke möglich. Jedoch besteht kein linearer Zusammenhang: Eine Substanz mit dem gemittelten Scorewert 2 ist nicht doppelt so wirksam wie eine Substanz mit dem gemittelten Scorewert 1.

Statt der Standardabweichung wurde hier wegen der fehlenden Linearität die Schwankungsbreite der Einzelwerte um den Mittelwert angegeben.

Tabelle 10: Zusammenhang zwischen gemitteltem Scorewert und Wirkstärke

Scorewert	Wirkstärke
< 0,5	kein antiangiogener Effekt
0,5-1	schwacher-mittlerer Effekt
> 1	mittlerer-starker Effekt

4.2.2 Ergebnisse der Testung im CAM-Assay

Folgende Parameter wurden an einigen in Kapitel 3 beschriebenen Testsubstanzen bearbeitet:

Pharmakologische Parameter

1 Dosis-Wirkungsbeziehung

Strukturelle Parameter

2 Glucosaminoglykane

3 Kohlenhydratgrundgerüst

4 Molekulargewicht

4.2.2.1 Dosis-Wirkungsbeziehung

Für einen möglichen therapeutischen Einsatz ist die Vorhersagbarkeit der Wirkung bei steigender Dosis eine zwingende Voraussetzung. Am Beispiel der verzweigten β -1,3-D-Galactane LäPS v S1 und AG S1 wurde dieser Zusammenhang untersucht.

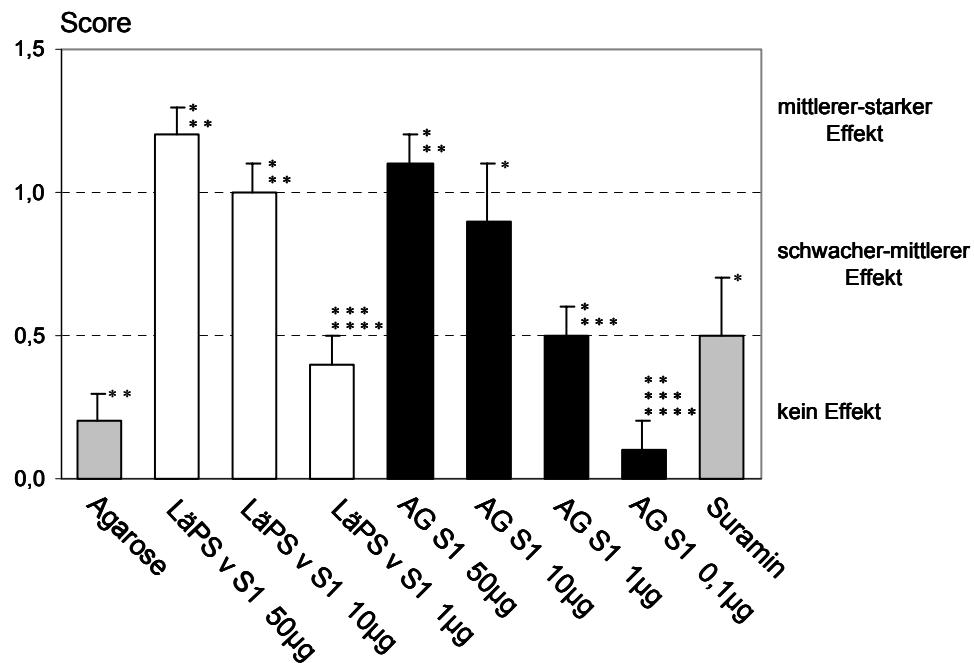


Abbildung 16: Zusammenhang zwischen Dosis und Wirkung: Scorewerte der β -1,3-D-Galactane LäPS v S1 (weiß) und AG S1 (schwarz).

(* = $p < 0,05$ vs Agarose; ** = $p < 0,05$ vs Suramin; *** = $p < 0,05$ vs LäPS v S1/AG S1 50µg; **** = $p < 0,05$ vs LäPS v S1/AG S1 10µg)

Testkonzentration: 50 µg/Pellet

Suramin: Positivkontrolle

Die als Kontrolle verwendete Agarose hatte keinen Einfluss auf die Angiogenese (Score 0,2).

Die Standardsubstanz Suramin hatte nur einen schwachen, aber verglichen mit Agarose signifikanten Effekt (vgl. Kapitel 4.2.2.2).

Die beiden β -1,3-D-Galactane waren in der höchsten getesteten Konzentration gute Angiogeneseinhibitoren. LäPS v S1 zeigte im Konzentrationsbereich von 50-1 µg/Pellet eine abnehmende Wirkung. Der Effekt von AG S1 nahm im Bereich von 50-0,1 µg/Pellet konzentrationsabhängig ab (s. Abbildung 16).

Der CAM-Assay ermöglicht also nicht nur eine Unterscheidung zwischen unterschiedlich aktiven Substanzen, sondern auch eine Beurteilung der Wirkstärke einer antiangiogenen Substanz in Abhängigkeit von der Dosis.

4.2.2.2 Standardsubstanzen und Glucosaminoglykane

Als Standardsubstanzen wurden die Angiogeneseinhibitoren Thalidomid und Suramin getestet. Außerdem wurde die Aktivität verschiedener Heparine untersucht (s. Abbildung 17).

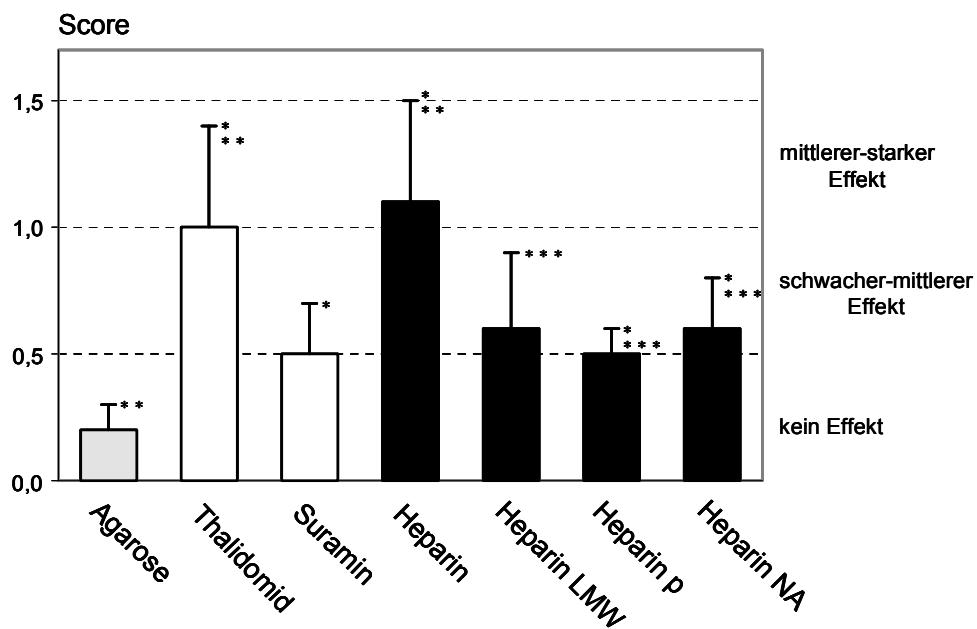


Abbildung 17: Scorewerte der Standardsubstanzen Thalidomid und Suramin sowie der getesteten Heparine.

Heparin unfraktioniert, bovine Darmmukosa

Heparin LMW niedermolekular, bovine Darmmukosa

Heparin p unfraktioniert, Schweinedarmmukosa

Heparin NA unfraktioniert, Schweinedarmmukosa

(* = $p < 0,05$ vs Agarose; ** = $p < 0,05$ vs Suramin ; *** = $p < 0,05$ vs Heparin)

Testkonzentration: 50 µg/Pellet

Suramin: Positivkontrolle

Thalidomid zeigte eine mittlere antiangiogene Wirkung und war der Standardsubstanz Suramin signifikant überlegen. Dies steht im Widerspruch zu Ergebnissen mehrerer Arbeitsgruppen, die zeigen konnten, dass Thalidomid selbst keine antiangiogene Aktivität an der Chorioallantoismembran des Hühnerembryos besitzt [90,149]. Erst die durch speziesabhängige metabolische Aktivierung gebildeten Derivate in Mensch und Kaninchen, nicht aber in Nagern führten zur Angiosuppression (erste Ergebnisse deuten auf ein Epoxid-Intermediat hin) [91]. Möglicherweise findet jedoch nach Diffusion der Testsubstanz aus dem Pellet in die CAM in gewissem Umfang eine Metabolisierung statt. Wie Lüpke am Beispiel verschiedener Prodrugs der Salicylsäure zeigen konnte, stellt das bebrütete Hühnerei ein metabolisierendes System dar,

das Dehydrogenasen, Oxidasen, Esterasen, Hydrolasen, Glucosidasen und eine induzierbare P-450 Fraktion enthält [137]. Nicht auszuschließen ist auch eine Derivatisierung durch die kurzzeitige thermische Belastung während der Herstellung der Agarosepellets, da Thalidomid als eine aus zwei Imiden bestehende Verbindung rasch hydrolysiert wird. Allerdings war keines der Hydrolyseprodukte ohne vorherige Metabolisierung durch Mikrosomen aktiv [91]. Andererseits liegt die Vermutung nahe, dass die Unterschiede in der biologischen Aktivität hauptsächlich auf der geringen Löslichkeit von Thalidomid beruhen. Bei der Probenvorbereitung ist unbedingt auf die Homogenität der Suspension zu achten.

Die Standardsubstanz Suramin konnte die Angiogenese im CAM-Assay nur schwach hemmen. Dieser Effekt korrelierte mit den Untersuchungen von Gagliardi et al., die einen dosisabhängigen antiangiogenen Effekt im Bereich von 25-200 µg Suramin/Ei mit einer Inhibition von 46% bei 50 µg/Ei beobachteten. Erst bei einer Konzentration von 200 µg/Ei zeigte Suramin eine deutliche Angiogenesehemmung (79% Inhibition) [88]. Danesi et al. hatten gezeigt, dass Suramin (50 µg) der Kombination Heparin (60 µg)/Hydrocortison (50 µg) im CAM-Assay überlegen war [150]. In mehreren *in vivo* Studien hatten auch verschiedene Suramin-Analoga antiangiogene Effekte gezeigt [51,151,152].

Die in eigenen Untersuchungen getesteten Heparine unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Herkunft und ihres Molekulargewichtes. Heparin (unfraktioniert) und Heparin LMW (niedermolekular) stammen beide von boviner Darmmukosa. Dagegen wurden Heparin p (unfraktioniert) und Heparin NA (unfraktioniert) aus Schweinedarmmukosa isoliert.

Lediglich das unfraktionierte bovine Heparin zeigte einen mittleren bis starken antiangiogenen Effekt. Das niedermolekulare bovine Heparin und die beiden porcinen unfraktionierten Heparine dagegen hatten nur eine schwache bis mittlere Aktivität im CAM-Assay.

Ausgehend von Untersuchungen angiotaktischer Steroide, die in Gegenwart von Heparin oder Heparinfragmenten die Angiogenese inhibieren [69], konnte auch bei alleiniger Applikation von Heparin und Heparansulfat, nicht aber von Keratan-, Dermatan- und Chondroitinsulfat eine Hemmung der Angiogenese gezeigt werden [100]. Wie schon von Folkman et al. festgestellt wurde, kann die antiangiogene Aktivität des Heparins aufgrund seiner Polydispersität und Heterogenität je nach Bezugsquelle stark variieren [68]. *In vitro* Untersuchungen von Heparinen unterschiedlicher Organe (Lunge, Darm) und Spezies (Rind, Schwein) zeigten uneinheitliche Effekte auf spezifische biologische Eigenschaften von FGF-2 (Interaktion mit HSPGs oder FGFR) [153].

4.2.2.3 Bedeutung des Kohlenhydratgrundgerüsts des sulfatierten Polymers

Im Folgenden ist die Testung von Polysacchariden unterschiedlichster Struktur zusammengefasst:

Verschiedene Fucoidane, die aus unterschiedlichen Spezies (*Fucus vesiculosus* L. (Fucoidan (ves.)), *Laminaria saccharina* (L.) Lam. (Fucoidan (lam.)) [154], *Fucus evanescens* C.Ag. (Fucoidan (ev.)) [155]) isoliert wurden, hatten unterschiedliche antiangiogene Aktivität. Während Fucoidan (ves.) und Fucoidan (lam.) effektiv das Kapillarwachstum in der CAM inhibierten, war Fucoidan (ev.) inaktiv. Diese Diskrepanz ist angesichts der strukturellen Vielfalt und Heterogenität der Fucoidane nicht erstaunlich. Selbst für das am besten charakterisierte Fucoidan aus *Fucus vesiculosus* L. werden widersprüchliche Strukturdaten postuliert (α -1,2- oder α -1,3-Verknüpfung) [155]. Fucoidan (lam.) besteht u.a. aus einem α -1,3-L-Fucose-Gerüst mit Sulfatgruppen in Position 4 [154], Fucoidan (ev.) aus α -1,3/ α -1,4-L-Fucose-2-sulfat mit zusätzlichen Sulfatgruppen in Position 4 und Acetylgruppen [155].

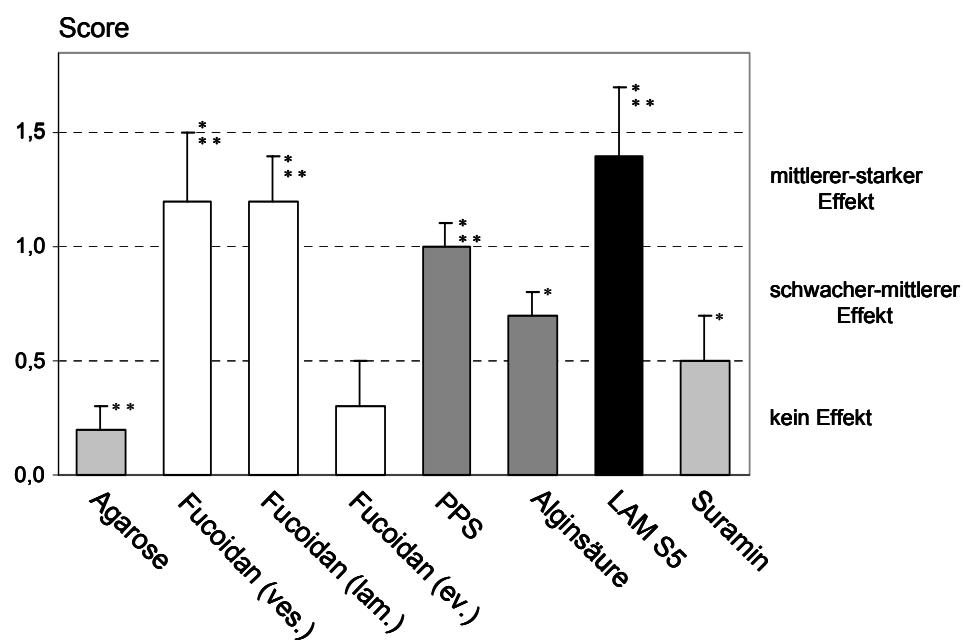


Abbildung 18: Scorewerte verschiedener Polysaccharide ohne Galactangrundgerüst.

Fucoidan (ves.): *Fucus vesiculosus* L.; Fucoidan (lam.): *Laminaria saccharina* (L.) Lam.; Fucoidan (ev.): *Fucus evanescens* C.Ag.; PPS: Xylanpolysulfat; Alginsäure: β -1,4-D-Mannuronsäure/ α -1,4-L-Guluronsäure; LAM S5: β -1,3-D-Glucan

(* = $p < 0,05$ vs Agarose; ** = $p < 0,05$ vs Suramin)

Testkonzentration: 50 μ g/Pellet

Suramin: Positivkontrolle

Das sulfatierte Xylosederivat PPS erreichte annähernd den gleichen Scorewert wie das aktivste Heparin (vgl. Kapitel 4.2.2.2). Die uronsäurehaltige Alginsäure, die keine Sulfatgruppen enthält, war dagegen weniger effektiv. Die bereits beschriebene deutliche antiangiogene Aktivität von LAM S5 [105] bestätigte sich auch nach Auswertung mit dem unter Kapitel 4.2.1 angegebenen Scoresystem.

4.2.2.4 Bedeutung des Molekulargewichts

In den Arbeiten von Vogl wurden verschiedene natürlich vorkommende Carrageenane im CAM-Assay überprüft. Dabei nahm die antiangiogene Aktivität in der Reihenfolge von λ -Carrageenan (schwacher-mittlerer Effekt) über ι - und θ -Carrageenane zum κ -Carrageenan (kein Effekt) ab [108,112].

Am Beispiel von ι -Carrageenan (s. Abbildung 19) und κ -Carrageenan (s. Abbildung 20) wurde der Einfluss des Molekulargewichts auf die antiangiogene Wirkung untersucht.

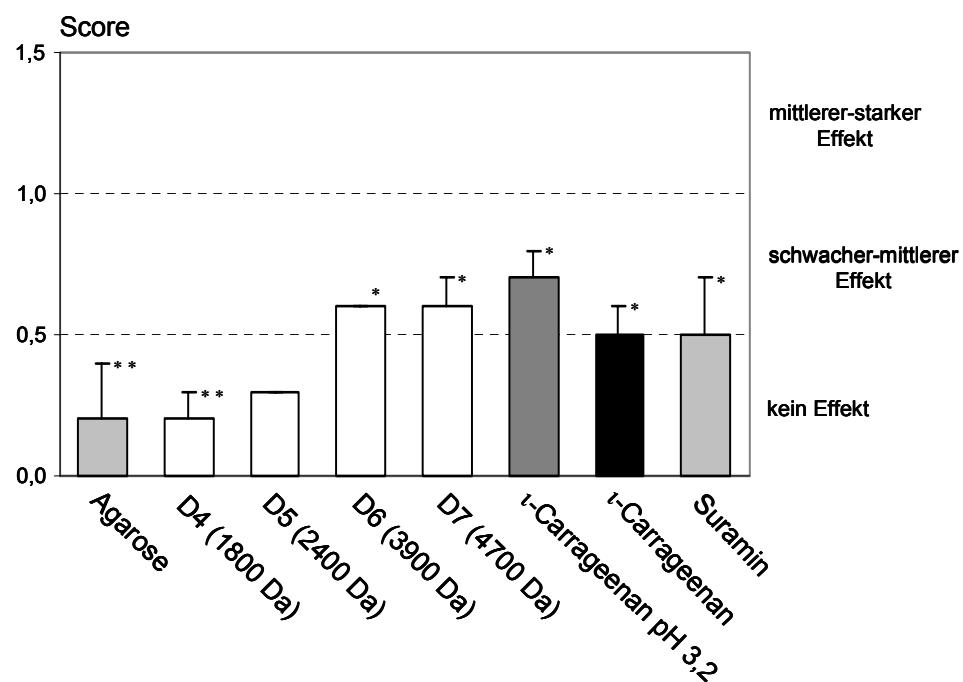


Abbildung 19: Scorewerte des hydrolysierten ι -Carrageenans (ι -Carrageenan pH 3,2) und seiner niedermolekularen Fraktionen (D4, D5, D6, D7). Das Molekulargewicht steigt von links nach rechts.

(* = $p < 0,05$ vs Agarose; ** = $p < 0,05$ vs Suramin)

Testkonzentration: 50 μ g/Pellet

Suramin: Positivkontrolle

Das durch Dialyse und nachfolgende Lyophilisation aus ι -Carrageenan gewonnene ι -Carrageenan pH 3,2 mit deutlich geringerem Molekulargewicht als die Ausgangsverbindung war stärker antiangiogen als ι -Carrageenan.

Die einzelnen, nach steigendem Molekulargewicht bezeichneten niedermolekularen Fraktionen des Lyophilisats (D4, D5, D6, D7) mit Molekulargewichten zwischen 1800 und 4700 Da zeigten bis zu einem Molekulargewicht ≤ 2400 Da keinen antiangiogenen Effekt. Erst die beiden höermolekularen Fraktionen D6 und D7 mit einem MW ≥ 3900 Da bewirkten eine schwache bis mittlere Angiogenesehemmung.

Die α -1,3/ β -1,4-D-Galactane Neocarratetraose-disulfat und Neocarrahexasose-trisulfat, die sich bei gleichem DS nur in der Monomerenzahl unterscheiden, hatten eine schwache-mittlere antiangiogene Aktivität (Score 0,6) und waren damit κ -Carrageenan (Score 0,3), bei dessen enzymatischem Abbau sie entstehen, überlegen (s. Abbildung 20). Ein *in vivo* Effekt scheint demnach nicht an ein hohes MW gebunden zu sein.

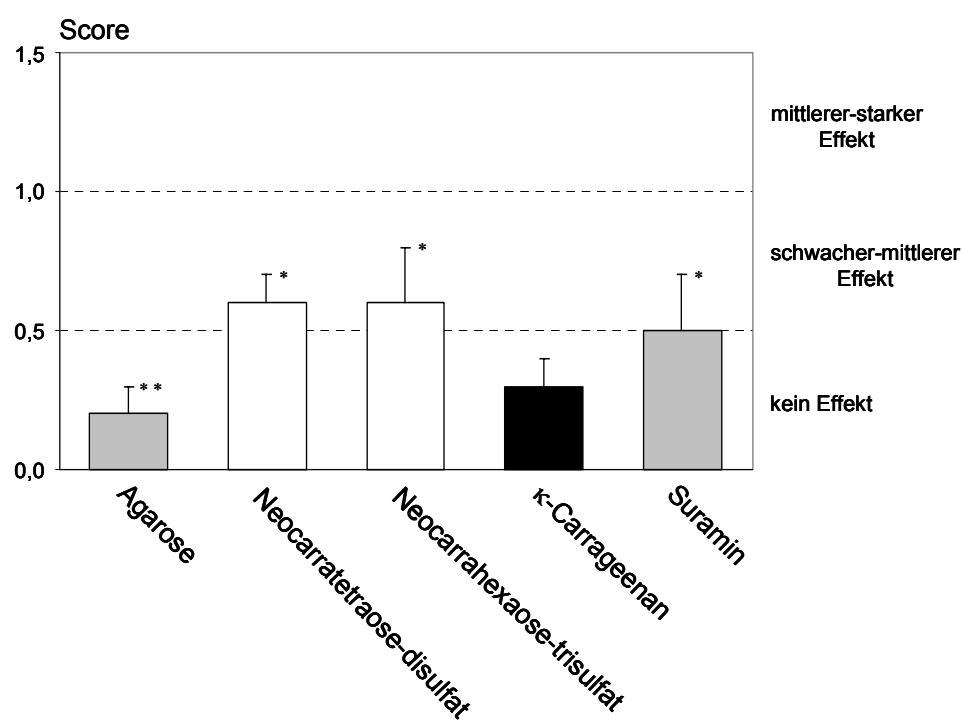


Abbildung 20: Scorewerte von Neocarratetraose-disulfat und Neocarrahexasose-trisulfat im Vergleich zur Ausgangsverbindung κ -Carrageenan. Das Molekulargewicht steigt von links nach rechts.

(* = $p < 0,05$ vs Agarose; ** = $p < 0,05$ vs Suramin)

Testkonzentration: 50 μ g/Pellet

Suramin: Positivkontrolle

Im Einzelfall kann demnach eine Verringerung des MW mit einer Aktivitätszunahme einhergehen. Dies steht in Einklang mit Untersuchungen zur Bestimmung der antiangiogenen Aktivität sulfatierter Oligosaccharide, die ab einem Polymerisationsgrad von 4, moduliert durch das Kohlenhydratgrundgerüst, den Sulfatierungsgrad und die Position der Sulfatgruppen, eine antiangiogene Wirkung gezeigt hatten [127].

Von Vogl war bei der Untersuchung von Galactansulfaten im CAM-Assay eine im Bereich von 20-1000 Monomeren von der Kettenlänge unabhängige antiangiogene Wirkung festgestellt worden [112]. Untersuchungen zur Angiogenesehemmung von Heparinderivaten in Gegenwart von Cortison ergaben für ein Hexasaccharid die höchste Aktivität [68]. Svahn et al. gelang es, Heparin ohne offensichtlichen Wirkverlust bis zu Fragmenten von 3800-5100 Da abzubauen [72]. Bei einer anderen Arbeitsgruppe war für einen eindeutigen biologischen Effekt ein Hexa-Octasaccharid nötig [110].

4.2.2.5 Diskussion der pharmakologischen und strukturellen Parameter

Die Untersuchung der Abhängigkeit der Wirkung von der eingesetzten Dosis Galactansulfat lieferte einen linearen Zusammenhang im Sinne eines stetigen Anstiegs der Wirkung bei steigender Dosis. Das verwendete Scoresystem ist demnach zur Beurteilung unterschiedlicher Dosierungen einer Substanz und gleicher Dosierungen verschiedener Substanzen geeignet.

Das in der Literatur z.T. kontrovers diskutierte Heparin, das als sulfatiertes uronsäurehaltiges inhomogenes Polymer vorliegt, zeigte in Abhängigkeit von Spezies und MW antiangiogene Eigenschaften.

Nicht nur Carrageenane, Galactane und β -1,4-D-Glucane hatten antiangiogene Aktivität, die u.a. durch Sulfatierungsgrad, Position der Sulfatgruppen, Kohlenhydratgrundgerüst und Art der Substituenten beeinflusst wird [112], auch L-fucose (Fucoidane)-, D-xylose (PPS)-, uronsäure (Alginsäure)- und β -1,3-verknüpfte D-glucosehaltige (LAM S5) Polymere waren inhibitorisch im CAM-Assay, wobei die Wirkung in der Reihenfolge

Glucose > Fucose > Xylose = Heparin > unsulfatierte Uronsäure

abnahm.

In der Gruppe der getesteten Fucoidane war die antiangiogene Aktivität entsprechend der unterschiedlichen Herkunft und damit auch der unterschiedlichen Struktur in hohem Maße variabel.

In den Untersuchungen von Vogl zur antiangiogenen Aktivität von Carrageenanen und Galactanen war ein Einfluss des Molekulargewichts im Bereich von 20-1000 Monomeren nicht nachweisbar [112]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen jedoch, dass niedermolekulare Derivate von ι (ι -Carrageenan pH 3,2, D6, D7)- und κ -Carrageenan (Neocarratetraose-disulfat, Neocarrahexaose-trisulfat) stärkere angiogenesehemmende Eigenschaften als die Ausgangsverbindungen haben können. Eine lineare Abhängigkeit der antiangiogenen Wirkung von der Monomerenzahl unabhängig vom zugrundeliegenden Kohlenhydratgerüst konnte nicht belegt werden.

4.3 HET-CAM-Assay

4.3.1 Entzündung

Auf eine durch endogene oder exogene Noxen verursachte Gewebeschädigung reagiert der Organismus mit einer Entzündung, die vorwiegend durch körpereigene Mediatoren (Histamin, Serotonin, Komplementfaktoren C3a und C5a, Bradykinin, Prostaglandine E₂ und F_{2 α} , Leukotriene, Plättchen-aktivierender Faktor, NO, ROS) ausgelöst und gesteuert wird. Dabei treten v.a. während der akuten Phase Rötung, Schwellung, Überwärmung, Schmerz und eine gestörte Funktion als lokale Symptome auf [156]. Die Entzündungsreaktion verläuft in drei, von unterschiedlichen Mechanismen gesteuerten Phasen [157]:

akute Phase:	lokale Vasodilatation, erhöhte Kapillarpermeabilität
subakute Phase:	Einwanderung von Leukozyten und phagozytierenden Zellen
chronisch-proliferative Phase:	Gewebeabbau und Fibrosis

Durch chemotaktische Faktoren (Komplementfaktoren, Zytokine, Wachstumsfaktoren) in das Entzündungsgebiet gelockte Granulozyten und Makrophagen bauen Bakterien, Zelltrümmer oder Fremdpartikel enzymatisch ab. Teilweise wird durch Freisetzung proteolytischer Enzyme aus den Lysosomen der Phagozyten aber auch umliegendes Gewebe geschädigt oder zerstört. Die Einwanderung von Leukozyten aus dem Blutkreislauf in das entzündete Gewebe wird über die als Selektine (L-, E- und P-Selektin) bezeichneten Adhäsionsmoleküle eingeleitet. Nach einer initialen Adhäsion erfahren die Leukozyten eine „rollende Verlangsamung“ entlang der Gefäßwand. Die anschließende feste Adhäsion sowie die Migration der Leukozyten durch Lücken zwischen den EC wird durch Integrine und PECAM vermittelt [158].

Die Selektine wurden zu Beginn der neunziger Jahre als kohlenhydratbindende Adhäsionsmoleküle entdeckt und in ihrer Struktur aufgeklärt. Ihre Bedeutung geht aber über die physiologische Funktion innerhalb der Immunabwehr (Erhöhung der Adhäsion von Leukozyten am Gefäßendothel von entzündetem Gewebe) hinaus. Man beobachtete auch eine Dysregulation der Selektinexpression bei pathologischen Entzündungsformen (rheumatoide Arthritis, Asthma, Diabetes mellitus, Ischämie/Reperfusion) und eine Beteiligung an der Gewebeinvasion metastasierender Krebszellen [159].

Als Leitsubstanz für die Suche nach Selektininhibitoren diente dabei das Tetrasaccharid Sialyl Lewis^X (NeuNAc α -(2→3)-Gal β -(1→4)-[Fuc α -(1→3)]-GlcNAc), das ein sialyliertes, fucosyierte Oligosaccharid auf N-Acetyllactosamin-Basis darstellt und an alle drei Selektine bindet. Als für die Bindung der Lektindomäne essentielle Strukturelemente konnten mittlerweile die negative Ladung der Sialinsäure, die 2-, 3-, und 4-ständige Hydroxygruppe der Fucose und die 6-ständige Hydroxygruppe der Galactose identifiziert werden [159]. Durch strukturelle Abwandlungen und Reduktion auf die wesentlichen Strukturmerkmale versuchte man zu Selektininhibitoren mit höherer Bindungsaffinität zu gelangen [160].

Wird körpereigenes Gewebe als fremd angesehen oder der Entzündungsprozess verlängert, kommt es zu überschießenden Entzündungsreaktionen, die u.a. zu Diabetes, Krebs und rheumatischen Erkrankungen führen können. Rheumatoide Arthritis ist eine chronische systemische Autoimmunerkrankung, die zur fortschreitenden Zerstörung von Knorpel- und angrenzendem Knochengewebe in entzündeten Gelenken durch von Makrophagen sezernierte Enzyme und wucherndes vaskularisiertes Synovialgewebe (Pannus) führt. Letztgenanntes kann auch als tumorähnliche Masse angesehen werden, die spezialisierte Zellen (Synoviozyten) mit charakteristischen Eigenschaften von Tumorzellen enthält [161].

Angiogenese und Entzündung sind sich beeinflussende und voneinander abhängige Prozesse [50,130]. Durch Angiogenese gebildete Blutgefäße transportieren sowohl Nährstoffe und Sauerstoff als auch Entzündungsmediatoren in das proliferierende Gewebe. Meist findet an Orten der Gefäßneubildung auch Entzündung statt. Die von Entzündungszellen gebildeten proinflammatorischen Mediatoren können die Angiogenese steuern. Daher ist die Hemmung der Angiogenese möglicherweise Erfolg versprechend in der Therapie chronisch proliferativer Erkrankungen.

Heute stehen zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis neben antineoplastischen Substanzen (Methotrexat) und Immunsuppressiva (Cyclosporin A) insbesondere antiinflammatorische Basistherapeutika zur Verfügung. Diese wirken z.T. über eine Hemmung der Selektine: Verschiedene Goldverbindungen hemmen die synoviale Expression von E-Selektin [162]. Arzneistoffe wie z.B. Glucocorticoide und Acetylsalicylsäure hemmen die Aktivierung des

Transkriptionsfaktors NFκB, der die Exprimierung der vaskulären E- und P-Selektine im Entzündungsprozess vermittelt [159].

Daneben rücken Angiogeneseinhibitoren als neue Basistherapeutika in den Mittelpunkt des Interesses. In verschiedenen Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass antiangiogene Verbindungen (TNP-470, Taxol, Integrin $\alpha_v\beta_3$ -Inhibitor) die arthritische Entzündungsreaktion verringern konnten [161].

Zur Therapie der rheumatoiden Arthritis stehen bereits zwei gegen den angiogenen TNF- α gerichtete Verbindungen zur Verfügung: Der chimäre TNF- α -Antikörper Infliximab (für diese Indikation nur in den USA zugelassen) und das IgG-Fusionsprotein Etanercept. Unklar ist, ob die Wirksamkeit auf einer direkten Wirkung gegen TNF- α oder auf sekundären Effekten (Beeinflussung angiogener Wachstumsfaktoren, verstärkte Bildung proinflammatorischer Zytokine, gesteigerte Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle, Freisetzung von MMPs) beruht [163].

4.3.2 HET-CAM-Assay als alternatives Entzündungsmodell

Um Substanzen auf mögliche antiinflammatorische Eigenschaften zu testen, stehen neben diversen *in vitro* Tests auf spezifische Entzündungsmechanismen mit begrenzter Aussagekraft (Hemmung von Enzymen u.a. Cyclooxygenase, Einfluss auf Leukozytenmigration, Interaktion mit Entzündungsmediatoren) verschiedene Tiermodelle zur akuten (z.B. Carrageenan-induziertes Rattenpfotenödem), subakuten („Granuloma pouch“-Test, Rattenpfotenödem mit unterschiedlichen Agenzien) und chronischen Entzündung (Methoden zur Testung der Granulombildung u.a. mit Baumwollpellets) zur Verfügung [157].

Im Jahre 1967 beschrieben erstmals D'Arcy und Howard eine Methode zur Bestimmung der Entzündungshemmung auf der Chorioallantoismembran bebrüteter Hühnereier. Dazu verwendeten sie Filterpapierscheiben (\varnothing 13 mm), die während einer 4tägigen Inkubationszeit auf der 8 Tage alten CAM eine chronische Entzündungsreaktion mit Granulombildung auslösten. Filterpapier und darunter gebildetes Granulomgewebe wurden aus der CAM geschnitten und nach Trocknung gewogen. Wurde das Filterpapier vorher mit steroidalen und nichtsteroidalen Antiphlogistika (Betamethason, Hydrocortison, Phenylbutazon, Chloroquin, Indomethacin, Natriumsalicylat) imprägniert, war eine dosisabhängige Gewichtsreduktion des Granulomgewebes nachweisbar. Die Wirksamkeit der Testsubstanzen war mit klinischen Daten vergleichbar [164].

Die akute Entzündung lässt sich dagegen im modifizierten HET-CAM-Assay von Lüpke untersuchen. Abweichend vom HET-CAM-Assay nach D'Arcy und Howard werden die

Prüfsubstanzen i.a. 2 h vor Prüfung der Membranirritation durch 0,3 ml einer 0,5%igen Natriumlaurylsulfat (LS)-Lösung systemisch oder lokal auf die innere Eihaut appliziert. Für verschiedene H₂-Antihistaminika, COX-Inhibitoren und Anilinderivate konnte eine gute Korrelation mit *in vivo* Daten gezeigt werden [137,165]. Dannhardt et al. beschrieben den modifizierten HET-CAM-Assay als eine selektive Methode zur Bestimmung und Quantifizierung der Aktivität nichtsteroidaler Antiphlogistika. Die Testung des Steroids Hydrocortison hatte keinen Einfluss auf die Irritationsphänomene in der CAM (Hyperämie, Hämorragie, Lyse) [166].

Für die vorliegende Arbeit wurde der von Marchesan und Paper entwickelte modifizierte HET-CAM-Assay verwendet [114], der aufgrund des geringen Substanzbedarfs besonders für Untersuchungen zum Einfluss von Naturstoffen und Extrakten auf die chronische Entzündung geeignet ist [167,168].

4.3.2.1 Durchführung des modifizierten HET-CAM-Assays

Die Präparation der bebrüteten Hühnereier erfolgte in Analogie zum CAM-Assay (s. Kapitel 4.2.1). Um der natürlichen Schwankungsbreite des biologischen Systems gerecht zu werden, wurde erneut eine hohe Anzahl an Eiern (14) je Testsubstanz und Kontrollen eingesetzt und jeder Versuch mindestens einmal wiederholt. Häufig werden nur ca. 6 Eier verwendet [137]. Im Gegensatz zum HET-CAM-Assay nach D'Arcy und Howard, bei dem ein mit Testsubstanz imprägniertes Filterpapier als entzündliches Agens verwendet wird [164], diente Natriumlaurylsulfat zur unspezifischen Membranirritation (Granulombildung, Veränderungen des Blutgefäßsystems). Anders als beim HET-CAM-Assay nach Lüpke [137] wurden die Testsubstanzen zeitgleich mit LS (50 µg/Pellet) in Form eines Agarosepellets auf die CAM aufgebracht. Aus Kapazitätsgründen wurden die Testsubstanzen zur Eingangstestung stets in einer Konzentration von 50 µg/Pellet eingesetzt.

Die Testung wurde auf der CAM 6 Tage alter Embryonen durchgeführt. Typisch für eine CAM in diesem Stadium ist eine hohe Proliferationsrate, wodurch die Inkubationszeit von 4 Tagen bei den üblicherweise verwendeten 8-10 Tage alten Embryonen [164] auf 24 h reduziert werden konnte. Außerdem ist das Immunsystem des Embryos nach 6 Tagen noch nicht völlig ausgereift, wodurch keine unspezifischen Membranreizungen, beispielsweise durch Partikel der Eischale, auftreten [147,148].

Die Auswertung erfolgte nach einem von Marchesan und Paper entwickeltem Scoresystem [114], bei dem in einem randomisierten Verfahren aufgrund spezifischer Charakteristika der CAM die Zuordnung zu einer von 4 Kategorien erfolgt (s. Tabelle 11).

Im Folgenden ist die antiinflammatorische Aktivität stets mit der angiostatischen Aktivität im chronischen Entzündungsprozess gleichzusetzen.

Tabelle 11: Scorewerte zur Evaluierung des antiinflammatorischen Effekts [114]

Kategorie	Beurteilung	beobachteter Effekt
1	gereizt	stark vaskularisiertes Granulom sternförmiges Adernetz um das Granulom „Spannung“ der CAM mit einer Reichweite bis zu 8 mm um das Granulom
2	schwach gereizt	schwach vaskularisiertes Granulom dünnstes sternförmiges Adernetz um das Granulom leichte „Spannung“ der CAM mit einer Reichweite bis zu 4 mm um das Granulom
3	schwach normalisiert	nur leicht vaskularisiertes Granulom, kleiner als bei Scorewert 1 und 2 sternförmiges Adernetz kaum erkennbar keine „Spannung“ der CAM
4	normalisiert	kein Granulom oder nicht vaskularisierte, aus dem Granulom entstehende „Narbe“ normales Adernetz wie bei Kontrolle keine „Spannung“ der CAM

Abbildung 21 zeigt die charakteristischen Merkmale der durch Natriumlaurylsulfat (50 µg/Pellet) induzierten Entzündung auf der CAM. In unmittelbarer Nähe zum Pellet entsteht innerhalb von 24 h ein stark vaskularisiertes Granulom, das von sternförmig zulaufenden Kapillaren umgeben ist. Ein geübtes Auge kann auch die durch die Granulombildung verursachte „Spannung“ der CAM bis zu einem Radius von 8 mm um die Entzündungsstelle erkennen.

Wird dem Pellet z.B. Hydrocortison (50 µg/Pellet) zugesetzt, wird das für eine Entzündung typische sternförmige Adernetz nicht ausgebildet. Ein Granulom ist nicht erkennbar, oder es bleibt stattdessen eine vernarbte, nicht vaskularisierte Stelle auf der nicht „gespannten“ CAM zurück. In Abbildung 22 ist dieser der Kategorie 4 entsprechende Effekt gezeigt.

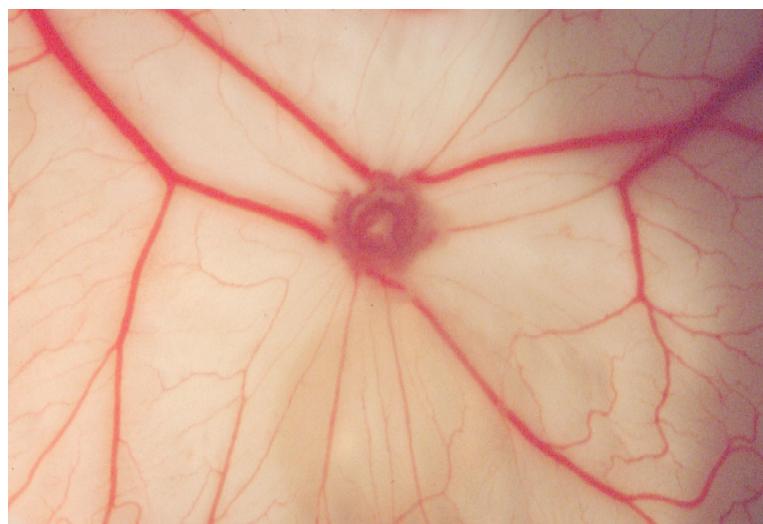


Abbildung 21: Durch Natriumlaurylsulfat (50 µg/Pellet) induzierte Entzündung auf der CAM. Beispiel für Kategorie 1 (s. Tabelle 11)

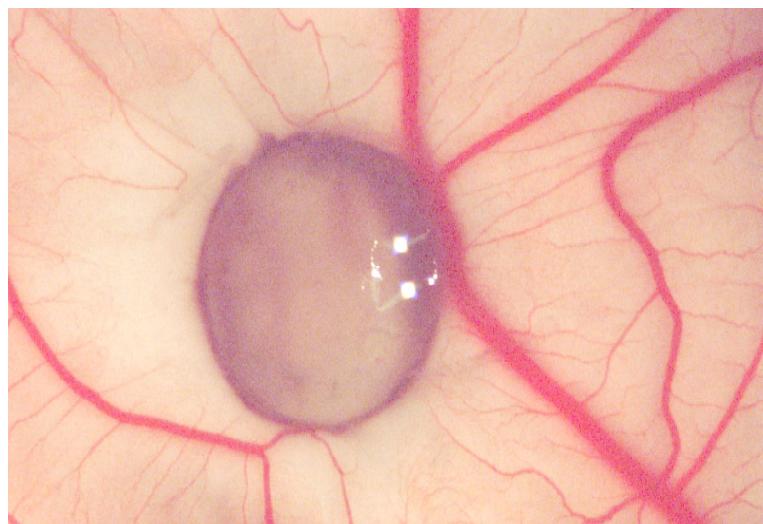


Abbildung 22: Hemmung der Natriumlaurylsulfat (50 µg/Pellet) induzierten Entzündung auf der CAM durch Hydrocortison (50 µg/Pellet). Beispiel für Kategorie 4 (s. Tabelle 11)

Nach Zuordnung der ausgewerteten Eier zu einer der 4 Kategorien kann die Entzündungshemmung [%] nach folgender Formel berechnet werden [114]:

$$1 \text{ Inhibition [%]} = \frac{\text{Zahl (Eier Kategorie 3)} + \text{Zahl (Eier Kategorie 4)}}{\text{Gesamtzahl lebender Eier}} \times 100\%$$

Bei dieser Methode erhalten Eier der Kategorie 3 und 4 die gleiche Gewichtung. Allerdings geht die für den Beobachter oft schwierige Differenzierung zwischen Kategorie 2 und 3 maßgeblich in die Berechnung mit ein. Eine Alternative bietet der sog. Scoreindex, der die Unterscheidung der beiden Kategorien nicht erfordert.

$$2 \text{ Scoreindex} = \text{Eier Kategorie 1 [%]} \times 2 + \text{Eier Kategorie 2 [%]} + \text{Eier Kategorie 3 [%]}$$

Die berechneten Scoreindices können im Intervall von 0 (vollständige Entzündungshemmung: alle Eier wurden der Kategorie 4 zugeordnet) bis 200 (fehlende Entzündungshemmung: alle Eier wurden der Kategorie 1 zugeordnet) liegen.

Zahlreiche Reinsubstanzen und Extrakte unterschiedlicher Herkunft wurden mit diesem Testmodell untersucht und der entzündungshemmende Effekt nach beiden Formeln berechnet [114].

Der Vergleich der Ergebnisse der beiden Rechenmethoden zeigte eine gute Korrelation. Daraus wurde Gleichung 3 abgeleitet, nach der die ermittelten Scoreindices in die Inhibition [%] umgerechnet werden können.

$$3 \text{ Inhibition [%]} = 99,87 - 0,53 \times \text{Scoreindex} [169]$$

Die prozentuale Inhibition der Entzündung kann folgenden Effekten zugeordnet werden:

Tabelle 12: Zusammenhang zwischen prozentualer Inhibition und antiinflammatorischem Effekt [114]

Inhibition	antiinflammatorischer Effekt
86%-100%	stark
71%-85%	gut
56%-70%	schwach
41%-55%	unsicher
$\leq 40\%$	kein

4.3.3 Ergebnisse der Testung im HET-CAM-Assay

An den in Kapitel 3 beschriebenen Testsubstanzen wurde untersucht, an welche strukturellen Eigenschaften die antiinflammatorische Aktivität sulfatierter Kohlenhydrate gebunden ist. Folgende Parameter wurden bearbeitet:

Pharmakologische Parameter

1 Dosis-Wirkungsbeziehung

Strukturelle Parameter

2 unsubstituierte Galactane

3 Sulfatierungsgrad

4 Kohlenhydratgrundgerüst

glykosidische Verknüpfung

Verzweigungsgrad

Monomerbausteine

5 Position der Sulfatgruppen

6 Molekulargewicht

7 Lipophilie

8 Art der Substituenten

4.3.3.1 Dosis-Wirkungsbeziehung

Das als inflammatorisches Agens eingesetzte Natriumlaurylsulfat (50 µg/Pellet), das zur Kontrolle mitgetestet wurde, zeigte während der Gesamtdauer der Testung stets eine starke Entzündungsreaktion und war ohne inhibitorischen Effekt. Als Positivkontrolle wurde Hydrocortison (50 µg/Pellet) verwendet, das zu einer annähernd 85%igen Entzündungshemmung führte. Hydrocortison kann also die chronische Entzündungsreaktion deutlich reduzieren, auch wenn das Steroid im akuten Entzündungsprozess wirkungslos ist [166].

Am Beispiel des β -1,3-D-Galactans LäPS v S1 wurde die Konzentrationsabhängigkeit des *in vivo* Effekts überprüft. Die antiinflammatorische Aktivität nahm im Bereich von 50-10 µg/Pellet konzentrationsabhängig ab. In der niedrigsten getesteten Konzentration war LäPS v S1 ohne Effekt. In der maximal eingesetzten Dosis dagegen hatte LäPS v S1 gute antiinflammatorische Aktivität und war damit dem unfraktionierten bovinen Heparin (schwacher Effekt) überlegen.

Für Heparin werden vielfältige entzündungshemmende Eigenschaften, beispielsweise bei der Therapie von Asthma, beschrieben, die u.a. auf der Modulation von Selektin-Ligand Interaktionen und verschiedenen Effekten auf Leukozyten, die bei der Entzündung eine zentrale Rolle spielen, beruhen könnten [170].

Der HET-CAM-Assay lässt also die Differenzierung der antiinflammatorischen Aktivität einer Verbindung abhängig von der eingesetzten Dosis zu.

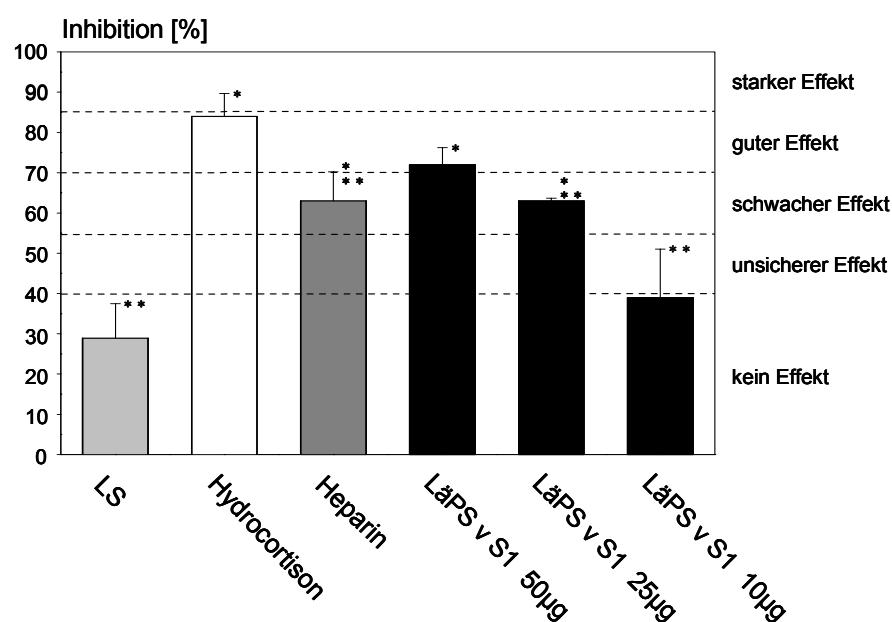


Abbildung 23: Zusammenhang zwischen Dosis und Wirkung: Antiinflammatorischer Effekt von LäPS v S1 (schwarz). Zum Vergleich ist die prozentuale Inhibition von Hydrocortison (Standardsubstanz) und dem Glucosaminoglykan Heparin (unfraktioniert, bovine Darmmukosa) angegeben.
 (* = $p < 0,05$ vs LS; ** = $p < 0,05$ vs Hydrocortison)
 Testkonzentration: 50 µg/Pellet

4.3.3.2 unsubstituierte Galactane

Wie schon im CAM-Assay [112] wurden zunächst die unsubstituierten Galactane, soweit sie zur Verfügung standen, und weitere, in dieser Arbeit verwendete unsulfatierte Polysaccharide auf ihr antiinflammatorisches Potential getestet.

Das β -1,4-verknüpfte β -Galactan sowie Arabinogalactan (AG), Laminarin und Alginsäure zeigten einen unsicheren Effekt. Lediglich Polygalacturonsäure (PGA) hatte einen schwachen

Effekt. Der Unterschied zur ebenfalls uronsäurehaltigen Alginsäure war statistisch jedoch nicht signifikant. Entscheidend für die antiinflammatorische Aktivität eines Polysaccharids ist demnach nicht nur eine negative Ladung z.B. durch Carboxylgruppen, sondern insbesondere das Kohlenhydratgrundgerüst. Es deutet sich ein nur geringer Vorteil der α -1,4-Verknüpfung (PGA) gegenüber der β -1,3 (AG, Laminarin)- oder β -1,4 (β -Galactan)-Verknüpfung an.

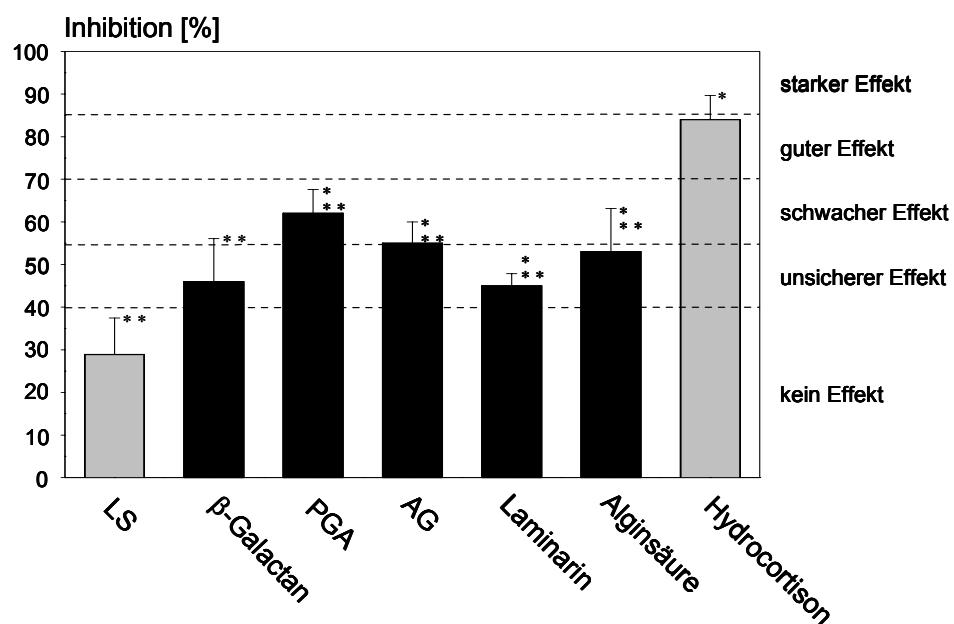


Abbildung 24: Antiinflammatorische Effekte genuiner Galactane und weiterer in dieser Arbeit verwendeter unsulfatierter Polysaccharide.

β -Galactan: β -1,4-D-Galactan; PGA: α -1,4-D-Galacturonsäure; AG: Arabino-galactan; Laminarin: β -1,3-D-Glucan; Alginsäure: β -1,4-D-Mannuronsäure/ α -1,4-L-Guluronsäure

(* = $p < 0,05$ vs LS; ** = $p < 0,05$ vs Hydrocortison)

Testkonzentration: 50 μ g/Pellet

Hydrocortison: Positivkontrolle

4.3.3.3 Bedeutung des Sulfatierungsgrads

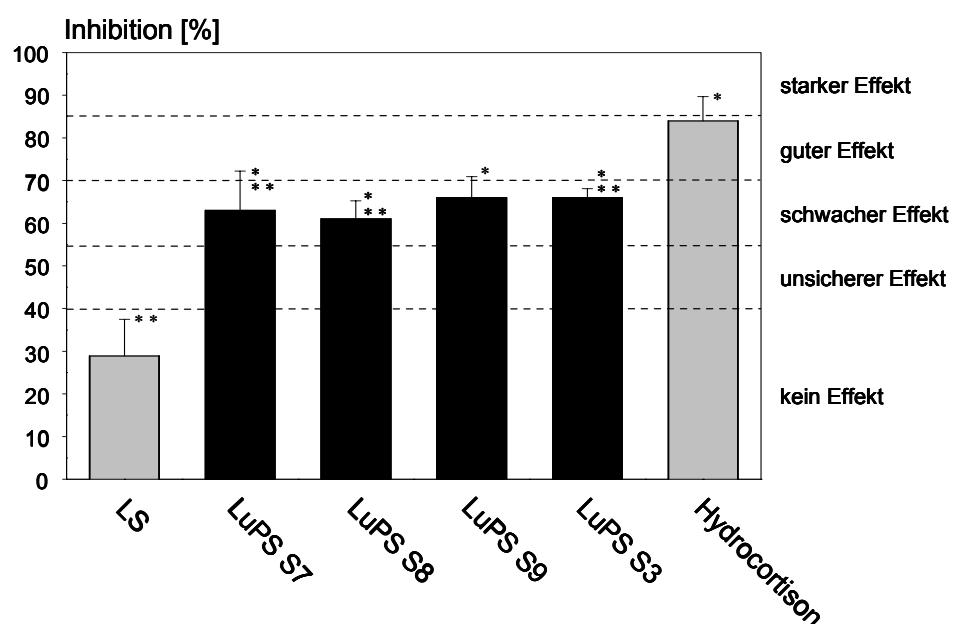
An vier verschiedenen LuPS-sulfaten wurde der Einfluss des Sulfatierungsgrads auf die Entzündungshemmung untersucht. Mit Ausnahme von LuPS S3 mit deutlich geringerem Polymerisationsgrad haben alle Galactane annähernd die gleiche Kettenlänge. Die Zunahme des MW beruht auf der steigenden Zahl von Sulfatgruppen (s. Tabelle 13).

Tabelle 13: MW und DS getesteter LuPS-sulfate (geordnet nach steigendem DS) [112]

Galactansulfate	LuPS S7	LuPS S8	LuPS S9	LuPS S3
DS	0,27	0,53	0,72	1,65
MW [kDa]	12	19	20	10

Unabhängig vom Sulfatierungsgrad war bei den LuPS-sulfaten ein schwacher Effekt auf die chronische Entzündung zu beobachten (s. Abbildung 25). Verglichen mit der unsulfatierten Grundstruktur β -Galactan (s. Abbildung 24) zeigte sich jedoch eine Wirkungsverstärkung.

Die Einführung negativ geladener Sulfatgruppen führte zu aktiven β -1,4-D-Galactanen, deren entzündungshemmende Effekte mit PGA vergleichbar waren (s. Abbildung 24).

**Abbildung 25:** Antiinflammatorische Effekte von β -1,4-D-Galactanen (LuPS-sulfate) mit unterschiedlichem Sulfatierungsgrad (von links nach rechts mit steigendem DS, s. Tabelle 13).

(* = $p < 0,05$ vs LS; ** = $p < 0,05$ vs Hydrocortison)

Testkonzentration: 50 μ g/Pellet

Hydrocortison: Positivkontrolle

Die Untersuchung von Galactanen mit abweichendem Verknüpfungstyp (α -1,4-, β -1,3-Verknüpfung) lieferte ein uneinheitliches Bild (s. Abbildung 26).

Während α -Galactan ul S1 (α -Gal ul S1) einen mit den LuPS-sulfaten vergleichbaren Effekt hatte, zeigte α -Galactan ls S1 (α -Gal ls S1) trotz eines geringeren Sulfatierungsgrads eine überraschend deutliche entzündungshemmende Aktivität (Inhibition 83%).

Die Testung des β -1,3-verknüpften LäPS v S1 mit einem DS ≈ 2 ergab wie bei dem aktivsten α -1,4-D-Galactan α -Galactan ls S1 einen guten Effekt.

Dies deutet darauf hin, dass die antiinflammatorischen Eigenschaften der Galactane außer vom Sulfatierungsgrad vermutlich noch von weiteren Parametern wie z.B. der glykosidischen Bindungsart abhängen.

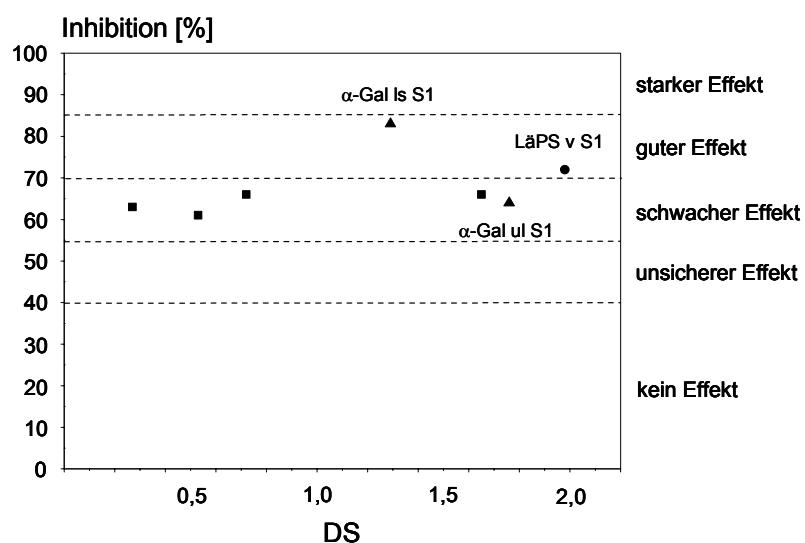


Abbildung 26: Antiinflammatorische Effekte von α -1,4 (▲)- und β -1,3 (●)-D-Galactanen im Vergleich zu den β -1,4-D-Galactanen (■) mit unterschiedlichem Sulfatierungsgrad (von links nach rechts mit steigendem DS).
Testkonzentration: 50 μ g/Pellet

4.3.3.4 Bedeutung des Kohlenhydratgrundgerüsts

Bedeutung der glykosidischen Verknüpfung

Wie bereits im vorigen Kapitel angedeutet wird die antiinflammatorische Aktivität der Galactane nicht nur vom Sulfatierungsgrad bestimmt.

Die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der Struktur des Kohlenhydratgrundgerüsts und der Hemmung der chronischen Entzündung erforderte die Berücksichtigung des unterschiedlichen Sulfatierungsgrads der Polysaccharidderivate. Die getesteten Derivate wurden mit den LuPS-sulfaten verglichen (s. Abbildung 27).

Die α -1,4-D-Galactansulfate erwiesen sich gegenüber den LuPS-sulfaten als mindestens gleichwertige Entzündungsinhibitoren. Auffallend war die Überlegenheit von α -Galactan ls S1 (α -Gal ls S1) gegenüber α -Galactan ul S1 (α -Gal ul S1). Vermutlich ist der DS nur von

untergeordneter Bedeutung; vielmehr scheint der im Vergleich zu α -Galactan ul erhöhte Galacturonsäuregehalt (α -Galactan ls: 7,9%; α -Galactan ul: 4,7%) und der Anteil von ca. 7% Rhamnose in α -Galactan ls [112] wesentlich zur Wirkung beizutragen. Unter der Annahme, dass bei den β -1,4-D-Galactanen (LuPS-sulfate) auch bei einer Steigerung des DS über 1,65 keine wesentliche Änderung des antiinflammatorischen Potentials auftritt, zeigte sich bei einem der getesteten β -1,3-D-Galactane (LäPS v S1) eine Wirkungssteigerung. Trotz praktisch identischem DS (LäPS v S1: DS = 1,98; AG S1: DS = 2,0) erzielte dagegen das sulfatierte Lärchenarabinogalactan AG S1 lediglich eine mit den LuPS-sulfaten vergleichbare Aktivität.

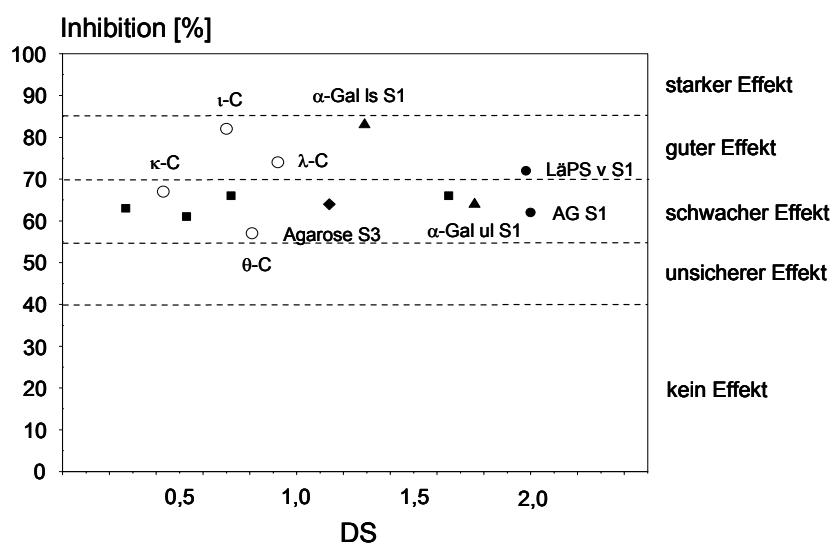


Abbildung 27: Antiinflammatorische Effekte von α -1,4 (▲)- und β -1,3 (●)-D-Galactanen mit unterschiedlichem Sulfatierungsgrad, genuinen Carrageenane (○) und sulfatisierter Agarose (◆) (von links nach rechts mit steigendem DS). Die zum Vergleich angegebenen Werte der β -1,4-D-Galactane (■) sind ohne Beschriftung.

Testkonzentration: 50 μ g/Pellet

Die alternierend aus α -1,3- und β -1,4-verknüpfter D-Galactose aufgebauten genuinen Carrageenane konnten die Entzündungsreaktion teilweise effektiver hemmen als die LuPS-sulfate. Es wird deutlich, dass wiederum der Sulfatierungsgrad, ebenso aber der unterschiedliche α -3,6-D-Anhydrogalactosegehalt (κ -, ι -, θ -Carrageenan: anhydrogalactose-haltig; λ -Carrageenan: keine Anhydrogalactose) nur geringen Einfluss haben, vielmehr wird die biologische Aktivität durch die Position der Sulfatgruppen moduliert (vgl. Kapitel 4.3.3.5).

Das sulfatierte Agarosederivat Agarose S3 war in seinen entzündungshemmenden Eigenschaften mit den LuPS-sulfaten vergleichbar. Somit stellt die Mischstruktur der Agarose aus β -1,3-D-Galactose- und α -1,4-(3,6)-Anhydro-L-Galactose-Bausteinen keinen Nachteil gegenüber den einheitlichen β -1,4-D-Galactanen dar.

Bedeutung des Verzweigungsgrads

Ob möglicherweise ein verzweigtes Kohlenhydratgrundgerüst einen Einfluss auf die Wirkung hat, wurde am Beispiel unterschiedlich stark verzweigter Arabinogalactane untersucht. LäPS v S1 (DS = 1,98) und das sulfatierte Lärchenarabinogalactan AG S1 (DS = 2,0) wurden mit einem annähernd so hoch sulfatierten β -1,4-D-Galactan, LuPS S3 (DS = 1,65) verglichen.

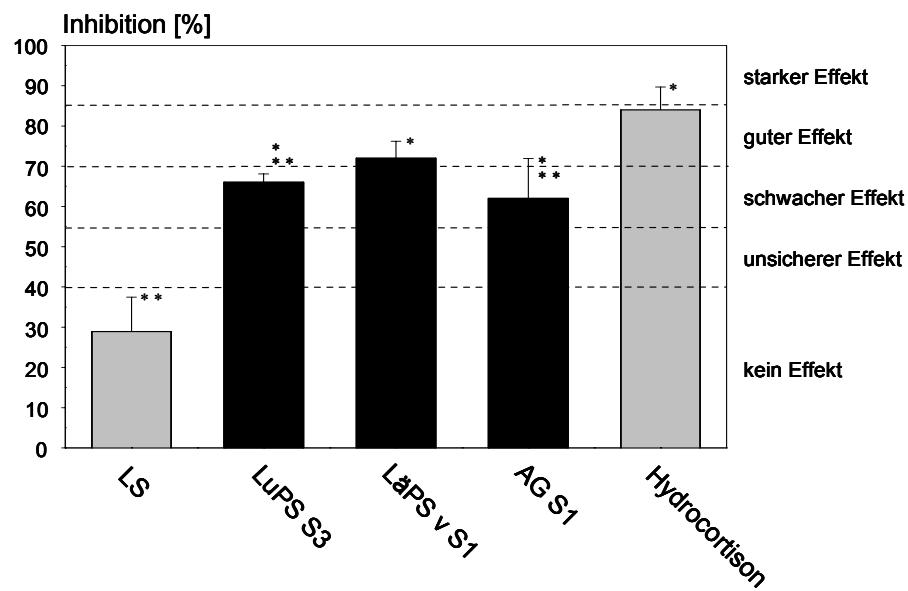


Abbildung 28: Antiinflammatorische Effekte der verzweigten β -1,3-D-Galactane LäPS v S1 und AG S1 im Vergleich zum β -1,4-D-Galactan LuPS S3.

(* = $p < 0,05$ vs LS; ** = $p < 0,05$ vs Hydrocortison)

Testkonzentration: 50 μ g/Pellet

Hydrocortison: Positivkontrolle

LäPS v S1, das an jedem 2. Galactosemolekül der Grundkette an Position 6 eine aus 1-2 Galactosemolekülen bestehende Seitenkette trägt, erzielte einen annähernd so guten antiinflammatorischen Effekt im HET-CAM-Assay wie Hydrocortison und war damit LuPS S3 überlegen. Obwohl der Sulfatierungsgrad von AG S1 nahezu mit dem von LäPS v S1 übereinstimmt, war es in seiner Aktivität lediglich mit LuPS S3 vergleichbar. Neben einem höheren Arabinosegehalt (AG: 12,2%; LäPS v: 2,7%) [112] scheint unter anderem auch der höhere Verzweigungsgrad für die Wirkungsabnahme von AG S1 verantwortlich zu sein.

Bedeutung der Monomerbausteine des sulfatierten Polymers

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob sulfatierte Polysaccharide mit von Galactanen abweichenden Monomerbausteinen ebenfalls antiinflammatorisches Potential besitzen. Neben Fucoidanen unterschiedlicher Herkunft wurden PPS und Derivate verschiedener Glucane (Laminarin, Lichenan) getestet.

Die Fucoidane ließen sich abhängig von der isolierten Spezies in eine Gruppe mit guter antiinflammatorischer Aktivität (*Fucus vesiculosus* L. (Fucoidan (ves.)), *Laminaria saccharina* (L.) Lam. (Fucoidan (lam.)) [154]) und eine Gruppe mit lediglich unsicherer Wirkung (*Fucus evanescens* C.Ag. (Fucoidan (ev.)) [155]) einteilen. Möglicherweise trägt die Variabilität der Fucoidane, die meist heterogene, verzweigte Polysaccharide unterschiedlichen Verknüpfungstyps mit zusätzlichen Monosaccharidkomponenten und Acetylgruppen sowie uneinheitlichem Sulfatierungsmuster darstellen [155], zu den unterschiedlichen *in vivo* Effekten bei.

Die antiinflammatorische Aktivität von Fucoidan beruht vermutlich auf einer Interaktion mit Selektinen (P- und L-Selektin). In einem Rattenmodell wurde der Effekt von Fucoidan auf die Einwanderung von Leukozyten ins Bauchfell nach Peptoninjektion untersucht. Dabei konnte eine dosisabhängige Hemmung der Leukozytenmigration beobachtet werden. *In vitro* Experimente zeigten eine hohe Affinität von Fucoidan sowohl zu isoliertem als auch in der Plasmamembran aktiverter Plättchen gebundenem P-Selektin [171]. In Untersuchungen einer japanischen Arbeitsgruppe zeigte Fucoidan, das an L-Selektin bindet und dessen Funktionen inhibiert (u.a. Adhäsion und „Rollen“ der Leukozyten), eine signifikante Inhibition der verzögerten Hautreaktion mit Trinitrochlorbenzen (TNBC) sensibilisierter Balb/c Mäuse [172]. Bereits 1983 stellten Stoolman und Rosen eine signifikante Inhibition der Adhäsion von Lymphozyten an der Oberfläche von PNHEV (postcapillary high endothelial venules within peripheral lymph nodes) in Gegenwart von Fucoidan, nicht jedoch von Heparin, Dextransulfat und Chondroitinsulfat fest [173].

PPS mit Xylose als Monomerbaustein zeigte ebenso wie die Glucanderivate LAM S5 und LiPS IX einen guten entzündungshemmenden Effekt. Dabei scheint die alternierende β -1,3/ β -1,4-Verknüpfung des höhermolekularen Lichenanabkömmlings LiPS IX gegenüber der β -1,3-glykosidischen Bindung von LAM S5 bei vergleichbar hohem DS (DS > 2,1) geringfügig bevorzugt zu sein. Mit Ausnahme von Fucoidan (ev.) aus *Fucus evanescens* C.Ag. waren alle untersuchten Verbindungen den β -1,4-D-Galactanen überlegen und in ihrer Aktivität mit den potentesten Galactanderivaten (α -1,4-, β -1,3-D-Galactane, α -1,3/ β -1,4-D-Galactane (Carrageenane)) vergleichbar (s. Abbildung 27). Somit ist Galactose als Monomerbaustein für ein mögliches entzündungshemmendes Potential nicht zwingend erforderlich, sondern kann

durch andere Monomere (z.B. L-Fucose, D-Xylose, D-Glucose) mit entsprechendem Sulfatierungsgrad ersetzt werden.

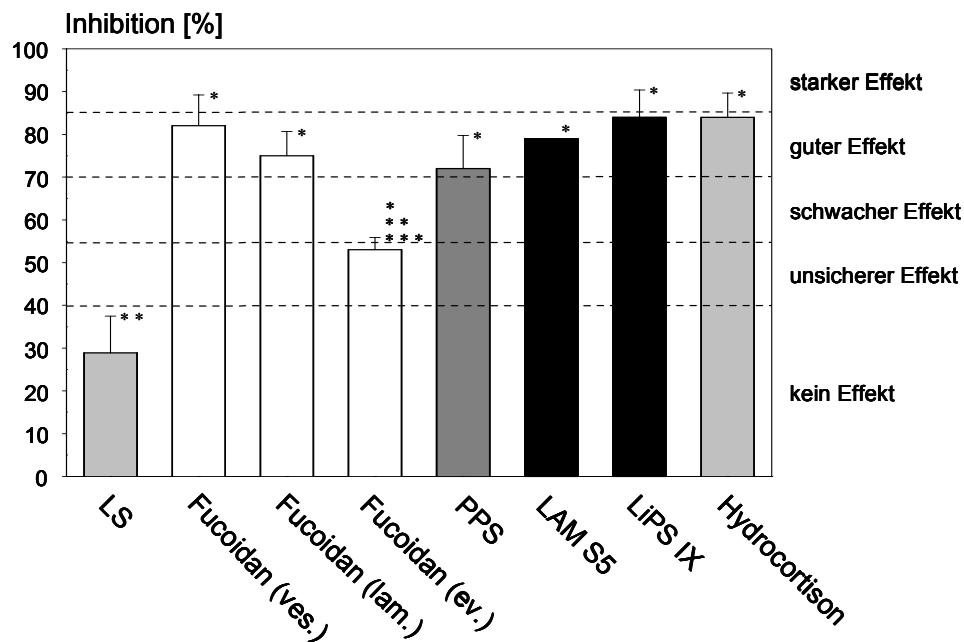


Abbildung 29: Antiinflammatorische Effekte verschiedener Polysaccharide ohne Galactangrundgerüst.

Fucoidan (ves.): *Fucus vesiculosus* L.; Fucoidan (lam.): *Laminaria saccharina* (L.) Lam.; Fucoidan (ev.): *Fucus evanescens* C.Ag.; PPS: Xylanpolysulfat; LAM S5: β -1,3-D-Glucan; LiPS IX: β -1,3/ β -1,4-D-Glucan

(* = $p < 0,05$ vs LS; ** = $p < 0,05$ vs Hydrocortison; *** = $p < 0,05$ vs Fucoidan (ves.))

Testkonzentration: 50 μ g/Pellet

Hydrocortison: Positivkontrolle

4.3.3.5 Bedeutung der Position der Sulfatgruppen

Im Folgenden wurde der Frage nachgegangen, ob Sulfatgruppen in bestimmten Positionen essentiell für eine antiinflammatorische Wirkung sind bzw. keinen Einfluss auf die biologische Aktivität haben. Zunächst wurden die genuinen Carrageenane, die charakteristischerweise selektiv sulfatiert sind, getestet (s. Abbildung 30). Tabelle 14 enthält einige wichtige Strukturparameter der getesteten Polymere.

Tabelle 14: Carrageenane: Sulfatierungsgrad (DS) und Position der Sulfatgruppe(n) [112]

Carrageenan	DS	Position der Sulfatgruppe(n)	
κ -	0,43	β -1,3-Galactose (4)	α -1,4-Anhydrogalactose (-)
ι -	0,70	β -1,3-Galactose (4)	α -1,4-Anhydrogalactose (2)
θ -	0,81	β -1,3-Galactose (2)	α -1,4-Anhydrogalactose (2)
λ -	0,92	β -1,3-Galactose (2)	α -1,4-Galactose (2,6)

κ -Carrageenan mit Sulfatgruppen lediglich in Position 4 der β -1,3-Galactose hatte, trotz des niedrigsten DS innerhalb der untersuchten Carrageenane, einen deutlichen Effekt. Das zusätzlich in Position 2 der α -1,4-Anhydrogalactose sulfatierte ι -Carrageenan mit einem mittleren DS zeigte die höchste antiinflammatorische Aktivität. θ -Carrageenan war trotz eines höheren Sulfatierungsgrad das Derivat mit der schwächsten Wirkung (s. Abbildung 30). Der wesentliche Unterschied zu κ - und ι -Carrageenan besteht in der abweichenden Position der Sulfatgruppe im β -1,3-Galactoseanteil (Position 2 statt Position 4).

Entscheidend für einen starken entzündungshemmenden Effekt der Carrageenane ist demnach eine in Position 4 sulfatierte β -1,3-Galactose. Eine zusätzliche Sulfatgruppe in Position 2 der α -1,4-Anhydrogalactose bewirkt eine klare Wirkungssteigerung. Dieser Gesamteffekt konnte auch nicht durch das in der Zuckerzusammensetzung modifizierte (keine Anhydrogalactose) höher sulfatierte λ -Carrageenan mit Sulfatgruppen in Position 2 der β -1,3-Galactose bzw. 2 und 6 der α -1,4-Galactose erreicht werden (s. Abbildung 30).

Grundsätzlich sind bei den Carrageenane jedoch Sulfatgruppen in allen Positionen geeignet, um eine antiinflammatorische Wirkung zu erzielen.

Die entzündungshemmenden Eigenschaften der Carrageenane im HET-CAM-Assay scheinen im Widerspruch zu ihrer Verwendung als 1%ige Lösung zur Provokation einer Entzündung in der Rattenpfote, einem klassischen Entzündungsmodell (Rattenpfotenödem), zu stehen [117,157]. Diese Diskrepanz ist allerdings auf die verschiedenen Stadien der Entzündung, die den einzelnen Tests zugrunde liegen (HET-CAM-Assay: chronische Entzündung – Rattenpfotenödem: akute Entzündung), und die unterschiedliche Applikationsart (HET-CAM-Assay: Membran – Rattenpfotenödem: subkutane Injektion) zurückzuführen.

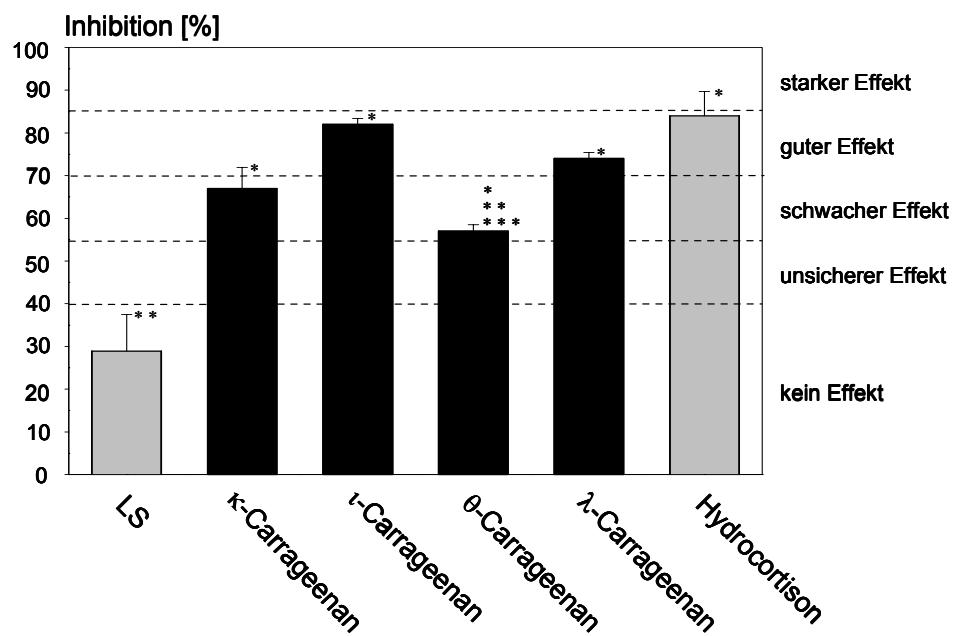


Abbildung 30: Antiinflammatorische Effekte genuiner Carrageenane (von links nach rechts mit steigendem DS, s. Tabelle 14).

(* = $p < 0,05$ vs LS; ** = $p < 0,05$ vs Hydrocortison; *** = $p < 0,05$ vs ι -Carrageenan)

Testkonzentration: 50 μ g/Pellet

Hydrocortison: Positivkontrolle

Um den Einfluss des Sulfatgehalts zu berücksichtigen, wurde der inhibitorische Effekt gegen den DS aufgetragen (s. Abbildung 31).

Dabei zeigte das unselektiv sulfatierte Agarosederivat (Agarose S3) einen vergleichbaren Effekt wie die ebenfalls unselektiv sulfatierten β -1,4-D-Galactane (LuPS-sulfate), die DS-unabhängig schwache entzündungshemmende Eigenschaften haben. Die genuin selektiv sulfatierten Carrageenane, bei denen die Position der Sulfatgruppe(n) die Wirkung entscheidend beeinflusst (s. Abbildung 30), wichen davon ebenso wie das selektiv in Position 6 desulfatierte LuPS S5 6DS ab.

Unter der Annahme, dass für LuPS S5, das nicht mehr in ausreichender Menge zur Testung zur Verfügung stand, ein analoger Zusammenhang zwischen DS und antiinflammatorischer Aktivität wie für die übrigen getesteten LuPS-sulfate besteht, führte die selektive Desulfatierung dieses Derivats zu dem wirkungslosen LuPS S5 6DS.

Daraus kann gefolgt werden, dass zumindest bei den LuPS-sulfaten eine Sulfatgruppe in Position 6 wesentlich zur Entzündungshemmung beiträgt. Um dieses Resultat verallgemeinern zu können, müssten noch weitere Derivate überprüft werden.

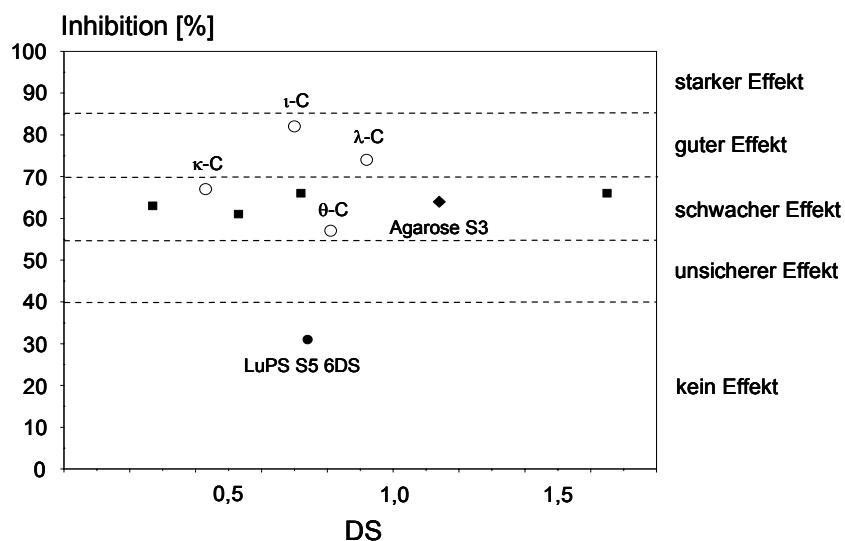


Abbildung 31: Abhängigkeit des entzündungshemmenden Effekts vom DS.

Selektiv sulfatierte Galactane: genuine Carrageenane (κ -, ι -, θ -, λ -Carrageenan): (O); LuPS S5 6DS (in Position 6 selektiv desulfatiertes β -1,4-D-Galactan): (●).

Unselektiv sulfatierte Verbindungen: LuPS-sulfate: (■) (unbeschriftete Symbole); sulfatierte Agarose (Agarose S3): (◆).

Testkonzentration: 50 μ g/Pellet

In einem weiteren HET-CAM-Assay wurden drei selektiv sulfatierte Cellulosederivate getestet. Die mit Cellulose O-2 (DS = 0,56; Position 2 sulfatiert), Cellulose O-3 (DS = 0,98; Position 3 sulfatiert) und Cellulose 2-3 (DS = 1,33; Position 2 und 3 sulfatiert) bezeichneten Verbindungen variierten außer im Molekulargewicht insbesondere in Sulfatierungsgrad und Position der Sulfatgruppen.

Wie aus Abbildung 32 zu erkennen ist, korrelierte ein hoher DS nicht zwingend mit einem guten *in vivo* Effekt, da Cellulose O-3 trotz eines annähernd doppelt so hohen DS wie Cellulose O-2 wirkungslos war. Somit scheint eine Monosulfatierung nur in Position 2, nicht jedoch in Position 3 der β -1,4-D-Glucane zu antiinflammatorischen Verbindungen zu führen.

Nicht völlig ausgeschlossen werden kann jedoch ein Einfluss des Molekulargewichts, das bei Cellulose O-3 mit 60 kDa doppelt so hoch ist wie bei Cellulose O-2.

Die in Position 2 und 3 selektiv sulfatierte Verbindung mit hohem DS (Cellulose 2-3) zeigte den stärksten *in vivo* Effekt. Demnach führt die Einführung einer zusätzlichen Sulfatgruppe in Position 3 der Glucankette zu einer deutlichen Aktivitätssteigerung im Vergleich zur monosubstituierten 2-OH-Gruppe.

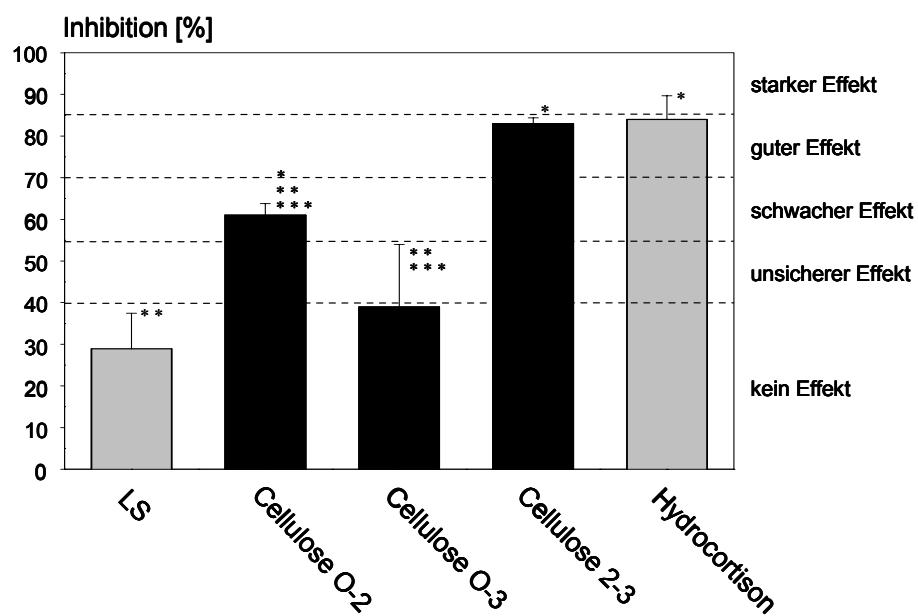


Abbildung 32: Testung selektiv sulfatierter Cellulosederivate (Cellulose O-2, Cellulose O-3, Cellulose 2-3). Der DS steigt von links nach rechts.

(* = $p < 0,05$ vs LS; ** = $p < 0,05$ vs Hydrocortison; *** = $p < 0,05$ vs Cellulose 2-3)

Testkonzentration: 50 $\mu\text{g}/\text{Pellet}$

Hydrocortison: Positivkontrolle

Die Untersuchungen zum möglichen Einfluss der Position der Sulfatgruppe(n) lassen die folgenden Schlüsse zu:

- 1 Sulfatgruppen in Position 4 der β -1,3-Galactose der Carrageenane führen zur Entzündungshemmung. Zusätzliche Sulfatgruppen in Position 2 der α -1,4-Anhydrogalactose verstärken den Effekt.
- 2 Sulfatgruppen in Position 6 sind für die Wirkung der β -1,4-D-Galactane (LuPS-sulfate) zwingend erforderlich.
- 3 Sulfatgruppen in Position 2 der Cellulosulfate führen zur Entzündungshemmung. Zusätzliche Sulfatgruppen in Position 3 steigern die Wirkung deutlich.

4.3.3.6 Bedeutung des Molekulargewichts

Die Untersuchung des Einflusses des Molekulargewichts auf die antiinflammatorische Wirkung erfordert Derivate, die sich ausschließlich im Molekulargewicht unterscheiden. Voraussetzung ist zudem eine möglichst homogene Verteilung der Sulfatgruppen. Die durch Sulfatierung von Polysacchariden gewonnenen Galactane enthalten jedoch neben mehrfach substituierten auch unsubstituierte Zuckerbausteine.

Deshalb wurde als Beispielderivat ι -Carrageenan verwendet, das zwar naturgemäß eine gewisse Inhomogenität aufweist, bei dessen Abbau durch Dialyse und anschließender Lyophilisation (ι -Carrageenan pH 3,2) sowie nachfolgender GPC-Fraktionierung (D3, D4, D5, D6, D7) jedoch Derivate gewonnen werden, die strukturell sehr ähnlich sind und sich hauptsächlich im Molekulargewicht unterscheiden.

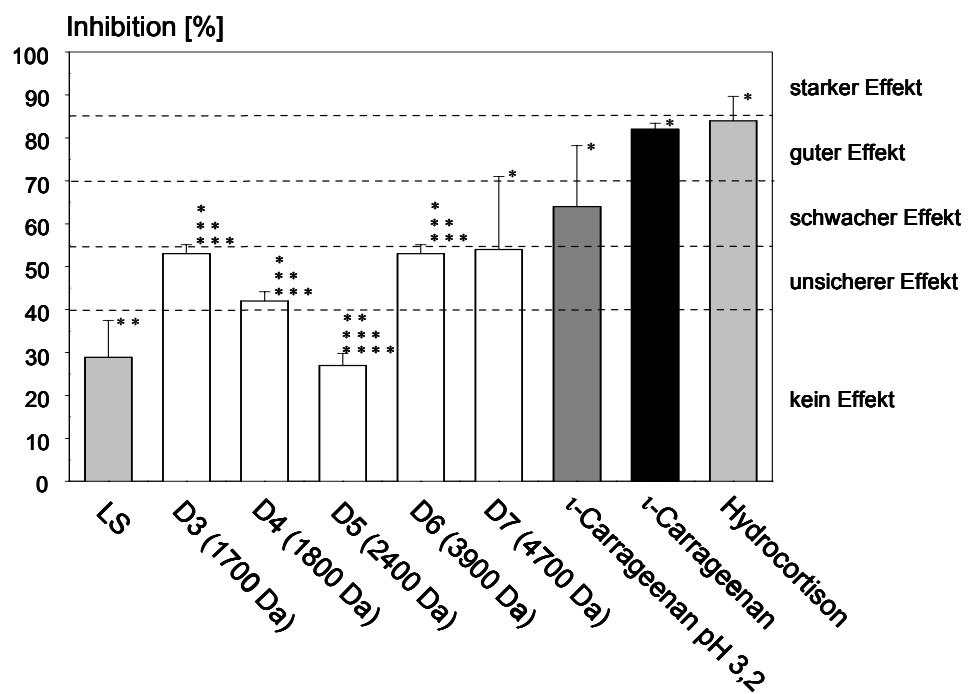


Abbildung 33: Antiinflammatorische Effekte des hydrolysierten ι -Carrageenan (ι -Carrageenan pH 3,2) und seiner niedermolekularen Fraktionen (D3, D4, D5, D6, D7). Das Molekulargewicht steigt von links nach rechts.

(* = $p < 0,05$ vs LS; ** = $p < 0,05$ vs Hydrocortison; *** = $p < 0,05$ vs ι -Carrageenan; **** = $p < 0,05$ vs ι -Carrageenan pH 3,2)

Testkonzentration: 50 μ g/Pellet

Hydrocortison: Positivkontrolle

In Abbildung 33 sind die inhibitorischen Effekte von ι -Carrageenan und seinen Derivaten von links nach rechts mit steigendem Molekulargewicht angegeben. Keine der niedermolekularen Verbindungen erreichte die gute Aktivität der Ausgangssubstanz ι -Carrageenan. Zeigte bereits

ι -Carrageenan pH 3,2 einen deutlichen, wenn auch statistisch nicht signifikanten Wirkungsverlust, so hatten dessen Fraktionen (D3, D4, D6, D7) nur unsichere Effekte. Bei D5 mit einem MW von 2400 Da trat die geringste Entzündungshemmung auf (kein Effekt).

Im Falle von ι -Carrageenan nimmt also die antiinflammatorische Aktivität bei Reduzierung des Molekulargewichts eindeutig ab.

Zusätzlich wurde der Einfluss einiger Oligosaccharide auf die chronisch-entzündliche Angiogenese untersucht.

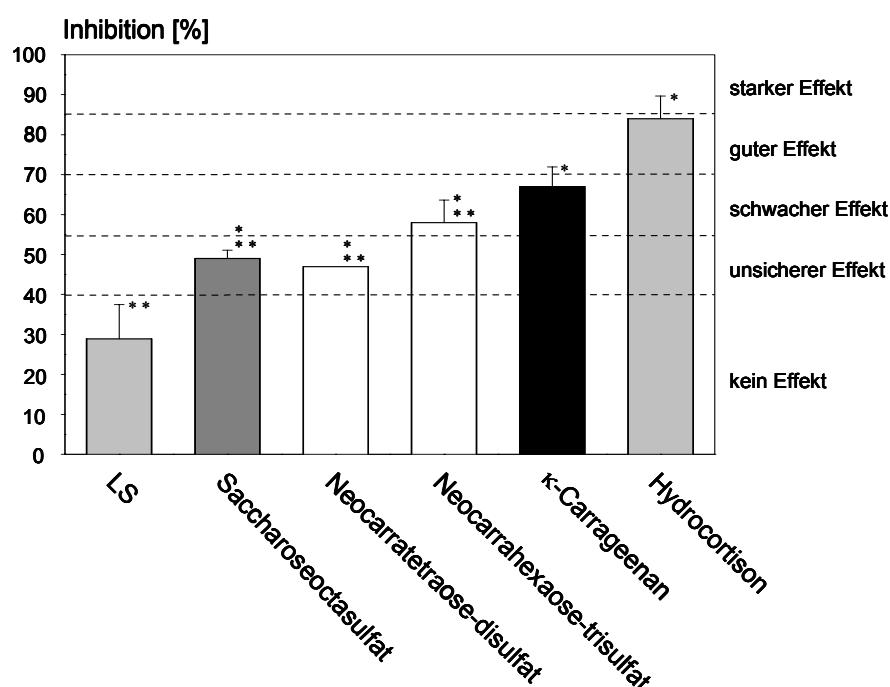


Abbildung 34: Testung verschiedener sulfatierter Oligosaccharide unterschiedlicher Monomerenzahl im HET-CAM-Assay.

(* = p < 0,05 vs LS; ** = p < 0,05 vs Hydrocortison)

Testkonzentration: 50 μ g/Pellet

Hydrocortison: Positivkontrolle

Saccharoseoctasulfat ist ein hochsulfatiertes Disaccharid, bei dem im HET-CAM-Assay, wie auch bei dem kurzkettigen κ -Carrageenan-Abkömmling Neocarratetraose-disulfat, nur ein unsicherer Effekt festgestellt wurde. Das um 2 Monomereinheiten längere Neocarrahexasulfat hingegen war wie die Ausgangsverbindung κ -Carrageenan schwach aktiv. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den bei der Untersuchung von niedermolekularen ι -Carrageenan-Derivaten beobachteten Effekten: Auch hier waren die Derivate mit geringer Kettenlänge inaktiv (s. Abbildung 33).

Ob dieses Ergebnis auch auf andere Polysaccharide, insbesondere auf einheitlich verknüpfte Galactansulfate, übertragen werden kann, ist unklar und muss sicherlich in jedem Einzelfall gesondert untersucht werden.

4.3.3.7 Bedeutung der Lipophilie

Am Beispiel von Methyl- ι -Carrageenan, dem Methylether von ι -Carrageenan, wurde untersucht, ob eine Erhöhung der Lipophilie Auswirkungen auf die Entzündungshemmung hat.

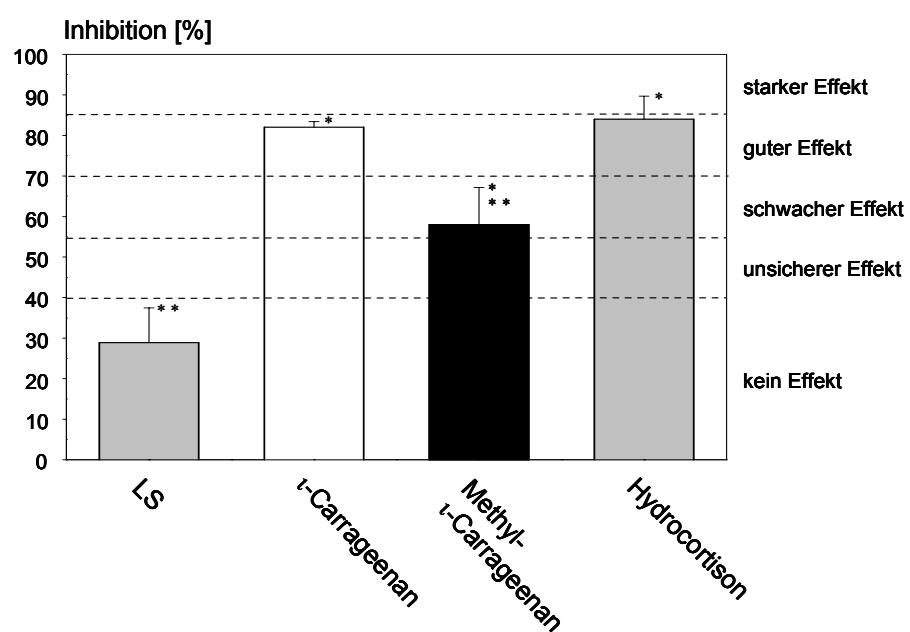


Abbildung 35: Vergleich der antiinflammatorischen Wirkung von ι -Carrageenan und seinem Methylether (Methyl- ι -Carrageenan).

(* = $p < 0,05$ vs LS; ** = $p < 0,05$ vs Hydrocortison)

Testkonzentration: 50 $\mu\text{g}/\text{Pellet}$

Hydrocortison: Positivkontrolle

In früheren Arbeiten zur antiangiogenen Aktivität im CAM-Assay zeigte das methylierte Derivat im Vergleich zu ι -Carrageenan eine Wirkungsverstärkung bei gleichzeitigem Verlust der FGF-2 antagonistischen Eigenschaften auf Endothelzellen (FBHE-Zellen) in einem *in vitro* Assay [112]. In Analogie dazu stehen Ergebnisse aus Struktur-Wirkungsuntersuchungen von an freien OH-Gruppen alkylierten Heparinoiden, die zu einer Steigerung der Anti-Faktor Xa Aktivität führten. Die optimale Wirkung wurde durch ein Derivat mit Butylresten erreicht, eine weitere Verlängerung der Alkylkette führte zur Wirkungsabnahme bzw. zum völligen Wirkungsverlust bei Veretherung mit einem Tetradecylrest [174].

Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen ging im HET-CAM-Assay durch die Derivatisierung von ι -Carrageenan und dem damit verbundenen Lipophilieanstieg ein Großteil der Wirkung verloren.

4.3.3.8 Art der Substituenten

Im menschlichen Organismus liegen neben Schwefelsäureestern auch Phosphorsäureester von Kohlenhydraten vor. Deshalb wurden auch Galactanphosphate auf ihr antiinflammatorisches Potential hin getestet.

Bei den beiden eingesetzten Verbindungen handelte es sich um lineare β -1,4-D-Galactane (LuPS-Derivate), die in unterschiedlichem Ausmaß mit Phosphorsäure verestert waren (LuPS P1: DS(PO₄) = 0,81; LuPS P2: DS(PO₄) = 0,40).

Eine weitere Modifikation bestand in der Einführung eines Fluoratoms in das β -1,4-D-Grundgerüst mit anschließender Sulfatierung, sodass das gewonnene Derivat einen gemischten Ester darstellte (LuPS F S1: DS(SO₄) = 1,75; DS(F) = 0,63). Im Vergleich zu reinen Galactansulfaten führte die ladungsneutrale Fluorierung zu einer gewissen Lipophilieerhöhung.

Der Ersatz von Sulfatgruppen in β -1,4-D-Galactanen durch geladene oder neutrale Substituenten (Phosphatgruppen, Fluoratome) bewirkte keine wesentliche Änderung der entzündungshemmenden Eigenschaften, wie aus dem Vergleich mit dem β -1,4-D-Galactan LuPS S3 deutlich wird. LuPS F S1, das einen geringfügig höheren DS als LuPS S3 hat, entsprach in seiner Wirkung dem Galactansulfat. Die zusätzliche Fluorierung hatte demnach keinen erkennbaren Einfluss auf das Entzündungsgeschehen. Zumindest hatte die durch das Fluoratom verursachte erhöhte Lipophilie keine negativen Auswirkungen hinsichtlich der Verträglichkeit, die bei LuPS F S1 und LuPS S3 übereinstimmend gut war. Dies ist insbesondere im Hinblick auf eine mögliche therapeutische Anwendung von Interesse, da bei lipophileren Verbindungen im Vergleich zu den hydrophilen Galactansulfaten eine verbesserte Resorption zu erwarten sein dürfte.

Bei den phosphatierten Galactanen deutete sich eine Abhängigkeit des *in vivo* Effekts vom Substitutionsgrad an. Das Derivat mit dem höchsten DS(PO₄) (LuPS P1) war am aktivsten. Dieser Trend konnte bei den Galactansulfaten, die über einen weiten DS-Bereich nahezu identische Wirkung haben, nicht beobachtet werden (vgl. Kapitel 4.3.3.3).

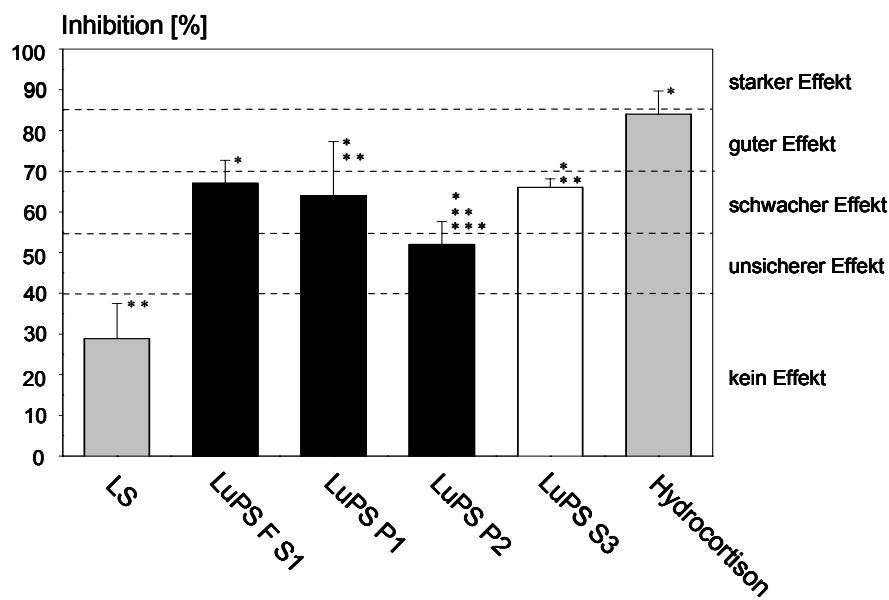


Abbildung 36: Effekte der Galactanester verschiedener anorganischer Säuren.

LuPS F S1 fluoriertes β -1,4-D-Galactansulfat
 LuPS P1 phosphatiertes β -1,4-D-Galactan, DS(PO₄) = 0,81
 LuPS P2 phosphatiertes β -1,4-D-Galactan, DS(PO₄) = 0,40
 LuPS S3 β -1,4-D-Galactansulfat, DS(SO₄) = 1,65
 (* = p < 0,05 vs LS; ** = p < 0,05 vs Hydrocortison; *** = p < 0,05 vs LuPS S3)
 Testkonzentration: 50 μ g/Pellet
 Hydrocortison: Positivkontrolle

4.3.3.9 Diskussion der pharmakologischen und strukturellen Parameter

Die Untersuchung des pharmakologischen Aspekts lieferte einen linearen Zusammenhang zwischen eingesetzter Dosis an Galactansulfat und erzielter Wirkung. Linear ist hier im Sinne eines stetigen Anstiegs der Wirkung bei steigender Dosis zu verstehen. Dies bestätigte die Eignung des verwendeten Scoresystems zum Wirkvergleich zwischen unterschiedlichen Dosierungen einer Substanz und gleichen Dosierungen verschiedener Substanzen.

Bei der Bearbeitung der strukturellen Voraussetzungen für eine antiinflammatorische Wirkung der Galactansulfate deutete sich nur ein untergeordneter Einfluss des Sulfatierungsgrads an. Bei den β -1,4-D-Galactanen blieb im erfassten DS-Bereich (0,27-1,65) die Wirkung nahezu unverändert. Jedoch führte erst die Sulfatierung des unsubstituierten Grundgerüsts zu

wirksamen Verbindungen. Auch bei Galactanen mit α -1,4- und β -1,3-glykosidischer Bindung konnte kein eindeutiger Einfluss des DS festgestellt werden.

Vielmehr zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit von der Verknüpfungsart der Kohlenhydratkette. Eine der aktivsten Verbindungen war ein α -1,4-D-Galactan mit hohem Galacturonsäuregehalt und einem ca. 7%igem Rhamnoseanteil (α -Galactan ls S1). Bereits eine unsulfatierte α -1,4-verknüpfte Galactankette wies einen geringen Vorteil gegenüber einem β -1,3- oder β -1,4-verknüpften Grundgerüst auf. β -1,4-D-Galactansulfate hatten DS-unabhängig einen schwachen Effekt. Ebenso erwies sich eine alternierende Verknüpfung wie bei dem Agarosesulfat (β -1,3-D-Galactose und α -1,4-(3,6)-Anhydro-L-Galactose) als vergleichbar aktiv. Demgegenüber hatten Galactane mit β -1,3- oder alternierend α -1,3/ β -1,4-glykosidischer Bindung z.T. stärkere Effekte, wobei jedoch der Einfluss weiterer Strukturparameter (Verzweigungsgrad, Position der Sulfatgruppen) nicht unberücksichtigt bleiben darf.

Auch die Struktur des Kohlenhydratgrundgerüsts hatte einen Einfluss auf die Aktivität der Galactansulfate. Bei den β -1,3-D-Galactanen führte eine zunehmende Verzweigung in Position 6 zur Wirkungsabschwächung. Ob dieser Zusammenhang allgemeingültig ist, müssen weitere Untersuchungen, z.B. mit verzweigten β -1,4-D-Galactanen, zeigen.

Die antiinflammatorische Aktivität ist nicht an eine Galactangrundstruktur gebunden, wie die Testung von Fucoidanen, PPS und sulfatierten Glucanen (Abkömmlinge von Laminarin, Lichenan, Cellulose), die den β -1,4-D-Galactanen eindeutig überlegen waren, offenbarte. Jedoch ist bei diesen Verbindungen mit einem höheren Nebenwirkungspotential zu rechnen. Fucoidan und Glucansulfate haben einen starken Einfluss auf die Blutgerinnung, und zumindest das sulfatierte β -1,3-D-Glucan LAM S5 erwies sich als embryotoxisch (CAM-Assay) [105].

Im Einzelfall kann die Stellung der Sulfatgruppen entscheidenden Einfluss auf die antiinflammatorische Wirkung haben. In der Gruppe der Carrageenane waren v.a. Derivate mit Sulfatgruppen in Position 4 der β -1,3-Galactose aktiv. Zusätzliche Sulfatgruppen in Position 2 der α -1,4-Anhydrogalactose resultierten in einer deutlichen Wirkungssteigerung. Bei den LuPS-sulfaten führte die Desulfatierung in Position 6 der Galactose zu einem inaktiven Derivat. Die Testung selektiv sulfatierter β -1,4-Glucane zeigte, dass nur in Position 2, nicht jedoch in Position 3 monosulfatierte Derivate aktiv sind. Die zusätzliche Sulfatierung in Position 3 resultierte in einer Verstärkung der Entzündungshemmung.

Ein Einfluss des Molekulargewichts konnte nur für ι - und κ -Carrageenan und deren Derivate gezeigt werden. So hatten die niedermolekularen Verbindungen stets geringere Aktivität als

die jeweilige Ausgangsverbindung bzw. waren ohne Effekt. Ob diese Beobachtung auch auf andere Polysaccharide übertragen werden kann, müsste in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Eine geringfügige Erhöhung der Lipophilie kann im Einzelfall zu Wirkabschwächung führen (methyliertes τ -Carrageenan). Bei einem fluorierten Galactansulfat war hingegen kein Unterschied im Vergleich zu reinen Galactansulfaten zu beobachten.

Im Allgemeinen ist eine gute antiinflammatorische Aktivität an negative Ladungen gebunden. Jedoch müssen nicht zwingend Sulfatgruppen vorliegen; stattdessen können ohne Wirkverlust auch Phosphatgruppen in die Zuckermoleküle eingeführt werden.

4.4 TUM-CAM-Assay

4.4.1 Tumorangiogenese

Physiologische und pathologische Angiogenese (z.B. Tumorangiogenese) werden zwar im Wesentlichen von den gleichen Stimulatoren und Inhibitoren beeinflusst, jedoch unterscheiden sie sich grundlegend in ihrer Regulation [175]. Während unter physiologischen Bedingungen die Gefäßneubildung streng kontrolliert und zeitlich stark begrenzt ist, findet während Tumorwachstum und Metastasierung eine unkontrollierte Zellproliferation statt. Krebszellen beginnen zunächst sich rasch zu teilen. Es entsteht ein mikroskopisch kleiner, avaskulärer Tumor (in situ Karzinom), der jahrelang latent und unentdeckt bleiben kann. Nach Monaten oder Jahren kann ein in situ Tumor durch ein Ungleichgewicht zwischen positiven und negativen Regulatoren in den angiogenen Phänotyp übergehen („angiogenic switch“) und die Bildung neuer Blutgefäße und Metastasen induzieren [28]. Sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen ist Hypoxie der Hauptinitiator des angiogenen Prozesses. Durch stark proliferierende Krebszellen entstehen im Innern der Tumormasse hypoxische Bereiche, die in den betroffenen Zellen die Expression von VEGF induzieren [176]. Mit HIF-1 α konnte der dafür verantwortliche Transkriptionsfaktor identifiziert werden [177]. Durch den Sauerstoffmangel können auch Makrophagen zur Sekretion peptidischer endothelialer Wachstumsfaktoren (z.B. PDGF, FGFs) angeregt werden [178]. Neben VEGF sind aber auch andere Wachstumsfaktoren wie z.B. FGF-1 und FGF-2 sowie Oncogene (v-ras, K-ras, v-raf, src, fos, v-yes) direkt an der Tumorangiogenese beteiligt [28,179].

Eine Sonderstellung in der Klasse der soliden Tumoren nimmt das Glioblastom (s. Kapitel 4.4.2) ein, dessen angiogene Aktivität, im Gegensatz zu anderen Tumoren (z.B. primäres Mammakarzinom), hauptsächlich auf VEGF als einzigem angiogenem Faktor beruht [180].

4.4.2 Primäre Tumoren des zentralen Nervensystems

Hirntumoren sind bei an Krebs erkrankten Männern bis 40 Jahre die dritthäufigste, bei Frauen bis zum gleichen Alter die vierthäufigste Todesursache, obwohl sie nur für 5% aller Krebserkrankungen verantwortlich sind [181]. Die meisten Primärtumoren des ZNS gehen von glialen Zellen aus und werden unter der Sammelbezeichnung Gliome nach ihrer mutmaßlichen Ursprungszelle u.a. differenziert in Astrozytome, Oligodendroglome und Ependymome. Neben Größe und Lokalisation der Gliome sind die Tumorklassifikation und insbesondere die Zuordnung zu einem bestimmten Gliomgrad für das weitere therapeutische Vorgehen und die prognostische Beurteilung von Bedeutung. Problematisch dabei ist v.a. die Verwendung verschiedener (z.B. drei- oder vierstufiger), mehr oder weniger gut evaluierter Gradierungssysteme [182]. Für Astrozytome beispielsweise scheint neben der aktuellen WHO-Klassifikation, die zwischen pilozytischem Astrozytom (WHO Grad I), diffusem Astrozytom (WHO Grad II), anaplastischem Astrozytom (WHO Grad III) und Glioblastoma multiforme (WHO Grad IV) unterscheidet, auch ein binärer Gradingansatz mit Differenzierung von low-grade (Astrozytom WHO Grad II und III) und high-grade (Glioblastom WHO Grad IV) Tumoren reproduzierbar und prognostisch relevant zu sein [182].

4.4.2.1 Glioblastom - Inzidenz und Morphologie

Das Glioblastom (Glioblastoma multiforme) ist die häufigste und aggressivste Form des Hirntumors. Jährlich erkranken daran in Deutschland zwischen 3000 und 4000 Menschen. Bis heute ist die Prognose trotz laufender Verbesserungen der Operations- und v.a. der Bestrahlungstechniken äußerst ungünstig. Die durchschnittliche Überlebenszeit beträgt weniger als ein Jahr, die 5-Jahresüberlebensrate liegt nach wie vor bei 0%.

Das Glioblastom ist ein sich rasch teilender und hochgradig invasiver Tumor. Histologisch ist dieser charakterisiert durch hohe Zelldichte, zelluläre Polymorphismen, hohe Mitoserate, nekrotische Bereiche mit Palisadenzellen und stark vaskularisierte Bezirke mit proliferierenden Endothelzellen [183].

Häufig entsteht das Glioblastom nicht *de novo*, sondern aus Astrozytomen niedrigeren Malignitätsgangs. Während der Tumorprogression finden Änderungen im Genom und in der spezifischen Genexpression statt. Ein wesentlicher Faktor in der Entstehung von Astrozytomen WHO Grad I und II sind Mutationen des p53 Tumorsuppressorgens, die es zu einem potenzen Oncogen werden lassen. Zusätzlich kommt es zu einem Verlust von Chromosom 22q und einer Überexpression von PDGFR α . Während der Entwicklung zum Glioblastoma multiforme über

das anaplastische Astrozytom finden weitere Mutationen, Chromosomenverluste und insbesondere eine Überexprimierung und Neuanordnung des Gens von EGFR statt [184]. Zudem wird die Angiogenese stimuliert. Das Gefäßsystem von low-grade Gliomen ähnelt dem des normalen Gehirns, das spezialisierte Endothelzellen (Blut-Hirn-Schranke) enthält. Mit zunehmender Malignität finden vaskuläre Veränderungen wie z.B. EC Proliferation, Verlust von Tight Junctions sowie spezifischen Transportern der Blut-Hirn-Schranke und Enzymen statt [185]. Mikrovaskuläre Proliferation von SMC/Perizyten und EC sowie hoch vaskularisierte und nekrotische Bereiche sind charakteristisch für high-grade Gliome [186].

4.4.2.2 Glioblastom - Regulation der Angiogenese

Die Regulation der Glioma-Angiogenese beruht auf der Interaktion verschiedener Zellen (Glioma- und Endothelzellen), Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, Proteasen, Proteaseinhibitoren und der umgebenden ECM. Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen stützen die heutige Auffassung, dass VEGF eine Schlüsselrolle bei der Angiogenese von Gliomen einnimmt [187]. In Glioblastomen ist v.a. in Tumorzellen um nekrotische Bereiche (sog. Palisadenzellen) eine erhöhte Expression der VEGF mRNA zu beobachten [188]. Als Hauptauslöser der VEGF-Expression *in vitro* gilt eine unzureichende Sauerstoffkonzentration, aber auch Glucosemangel kann diese verursachen [189]. Abhängig vom Tumorstadium findet eine verstärkte Bildung von VEGFR1 und VEGFR2 statt [187,188]. Durch *in vitro* und *in vivo* Experimente mit einer inaktiven dominant-negativen Mutante von VEGFR2 konnte dessen zentrale Bedeutung für die Angiogenese in Gliomen gezeigt werden [190].

Neben der Angiogenesestimulation verursacht VEGF, auch als vascular permeability factor (VPF) bezeichnet, eine erhöhte Permeabilität der Tumorgefäße und Extravasation von Proteinen und induziert damit die Bildung von Ödemen, die sich erschwerend auf das Krankheitsbild und die Mortalität der Patienten auswirken [185].

Nicht nur VEGF, auch andere GF wie FGF, PDGF, EGF, TGF- α und - β und ihre Rezeptoren scheinen regulierend in den angiogenen Prozess einzugreifen [191]. Ihre Wirkung kann dabei direkt oder indirekt (durch Erhöhung der Expression von VEGF oder anderer GF) auf EC gerichtet sein oder auf einer gesteigerten Aktivierung matrixabbauender proteolytischer Enzyme beruhen.

4.4.2.3 Glioblastom - neue Therapieansätze

Trotz der Standardtherapie maligner Gliome, die die operative Entfernung des Tumors mit nachfolgender postoperativer Bestrahlung und gelegentlich zusätzlicher Chemotherapie umfasst, treten in über 90% der Fälle in unmittelbarer Nähe des Primärtumors Rezidive auf. Verantwortlich dafür sind vermutlich nicht entfernte Tumorzellen oder Änderungen in der ECM nach Narbenbildung im Operationsgebiet [192]. Für das Versagen vieler Chemotherapien ist v.a. die Blut-Hirn-Schranke verantwortlich, die eine Anreicherung vieler Zytostatika in ausreichender Konzentration im Hirnparenchym verhindert.

Neue Ansätze in der Therapie maligner Gliome beruhen deshalb auf der lokalen Kontrolle des Tumors. Die Behandlungsstrategien umfassen Chemotherapie (supraselektive intraarterielle Applikation, Implantation bioabbaubarer Polymere, konvektionsverstärkte Infusion), Immun-, Gen- und Radiotherapie [192]. Besonders aussichtsreich erscheint das Einbringen zytostatika-haltiger Polymerimplantate nach erfolgter Tumorresektion, wodurch ein kontinuierlicher hoher lokaler Wirkstoffspiegel bei reduzierten systemischen Nebenwirkungen erzielt wird (z.B. Gliadel®). Die lokale Therapie mit vektorproduzierenden murinen Fibroblasten (Freisetzung suizidigen-tragender Retroviren) erwies sich in zwei klinische Phase III Prüfungen als sichere Behandlungsmethode. Deutliche therapeutische Effekte konnten jedoch nicht erzielt werden [192].

Die meisten lokalen Therapieansätze wirken jedoch nicht in einem ausreichend großen Hirnareal, um auch einzelne invasive Gliomazellen, die im Umkreis von mehreren Zentimetern um den Primärtumor auftreten können [193], zu erreichen.

Nachdem die Bedeutung der Angiogenese beim Wachstum von Tumoren, insbesondere des ZNS, erkannt war, begann die Suche nach antiangiogenen Verbindungen für eine mögliche Therapie maligner Gliome. Derzeit befinden sich Angiogeneiseinhibitoren mit unterschiedlichem Wirkmechanismus in klinischen Prüfungen: Thalidomid (oral, Phase I), der MMP-Inhibitor Col-3 (oral, Phase I/II) [194,195] sowie der EC-Inhibitor TNP-470 (Phase II bei wiederauftretenden malignen Gliomen) [196].

Ein vielversprechendes Target der antiangiogenen Therapie maligner Gliome sind VEGF und seine Rezeptoren. *In vivo* Untersuchungen mit Antisense-VEGF Konstrukten zeigten eine Hemmung des Tumorwachstums bei Verwendung maligner Gliomazellen [197] und C6 Rattengliomazellen [198]. Millauer et al. verwendeten in einem Mausmodell einen Retrovirus, der für eine dominant-negative Mutante von flk-1 in EC subkutan implantierter Gliome codierte, und konnten eine Hemmung des Tumorwachstums, verminderte Vaskularisation und verlängerte Überlebenszeit bei den behandelten Tieren beobachten [190]. Im et al. verwendeten einen rekombinanten Adenovirus, um antisense VEGF₁₆₅cDNA in U-87 MG Zellen zu transferieren. Dies führte zu einer Reduktion der mRNA und des Proteinspiegels von

VEGF *in vitro* und zu einer Hemmung des Tumorwachstums in Nacktmäusen *in vivo*. Jedoch wird mit dieser Technik noch keine ausreichende Infektion der überwiegenden Zahl der Tumorzellen erzielt und bedarf noch weiterer Verbesserungen [199].

Verschiedene Inhibitoren des VEGF-Rezeptor-Signals sind in Phase I der klinischen Prüfung (SU101, SU5416) [196].

Möglicherweise müssen auch diese Verbindungen unter Umgehung der Blut-Hirn-Schranke lokal als bioabbaubare implantierbare Polymere appliziert werden, um eine ausreichend hohe Wirkstoffkonzentration zu erreichen.

4.4.2.4 Charakterisierung der Zelllinie U-87 MG

Die Zelllinie U-87 MG (American Type Culture Collection HTB-14), die 1966 von J. Ponten etabliert wurde, stammt aus dem Glioblastom (Grad III) einer 44-jährigen weißen Frau, das durch große Tumorzellen und Nekrosen gekennzeichnet war. In der Zellkultur wächst U-87 MG als Monolayer und weist epitheliale Strukturen auf [200].

Die Zellen wurden in EMEM/10% FCS kultiviert.

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurde diese Zelllinie deshalb ausgewählt, weil sie hohe Spiegel an VEGF mRNA exprimiert, das VEGF Protein sezerniert und 3 VEGF-Isoformen (VEGF_{121,165,189}) exprimiert [197].

4.4.3 TUM-CAM-Assay als Modell der tumorzellinduzierten Angiogenese

Nachdem die Testsubstanzen bereits auf ihr antiangiogenes und antiinflammatorisches Potential untersucht wurden (s. Kapitel 4.2 und 4.3), sollte der Einfluss auf die durch U-87 MG Zellen induzierte Angiogenese bestimmt werden.

Als geeignetes Testsystem erschien zunächst der von Nguyen et al. entwickelte Bioassay zur Quantifizierung der Angiogenese [138]. Dabei wird das Untersuchungsmaterial (FGF-2 ± Inhibitor (β -Cyclodextrin tetradecasulfat + Hydrocortison, U24067, AGM-1470 (= TNP-470) und Protamin), FGF-2 freisetzende Tumorzellen) in ein Collagengel (Vitrogen) zwischen zwei übereinandergelegten Kunststoffnetzen eingebettet und das dreidimensionale Konstrukt auf die CAM 8 Tage alter Hühnerembryonen gelegt. Ein im Collagengel enthaltener Angiogenesestimulator zwingt die während der mehrtägigen Inkubation neugebildeten Kapillaren zum vertikalen Wachstum. Die Auswertung erfolgt durch Bestimmung der

kapillarhaltigen Quadrate im oberen Netz. FGF-2 führte, eingesetzt in einer Konzentration von 30 bzw. 300 ng, nach einem Zeitraum von mindestens 5 Tagen zu einer signifikanten Steigerung der Kapillarbildung [138].

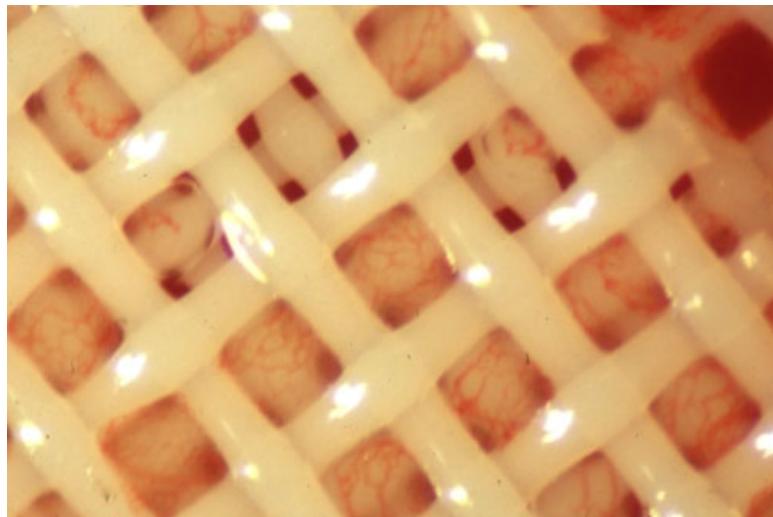


Abbildung 37: Durch FGF-2 (33 ng in PBS) induziertes Kapillarwachstum im modifizierten CAM-Assay (Sandwich-Technik).

Eigene Untersuchungen mit FGF-2 (33 ng in PBS) führten zu ähnlichen Ergebnissen (s. Abbildung 37), auch wenn in diesem Fall die Applikation bereits an Tag 6 erfolgte und die Inkubationszeit lediglich 72 h betrug.

Allerdings erwies sich diese Methode als äußerst zeitaufwendig und erforderte insbesondere bei der Applikation der Kunststoffnetze auf die CAM ein hohes Maß an Geschicklichkeit. Versuche mit Zusatz von λ -Carrageenan als potentiellem Inhibitor der FGF-2 induzierten Angiogenese zeigten keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen eingesetzter Dosis und Wirkung.

Andere Arbeitsgruppen verwenden mit GF imprägnierte Scheiben aus Filterpapier oder einem ähnlich geeignetem Material [144,145]. Die Applikation von Zellen auf der CAM (z.B. C6 Gliomazellen der Ratte, murine Aortaendothelzellen) kann beispielsweise als über die gesamte Membran verteilte Suspension [201] oder als mit Zellen beladener Gelatineschwamm [202] erfolgen.

Durch Modifikation des von Marchesan entwickelten Ring-HET-CAM-Tests [114] stand eine praktikablere und relativ schnelle Methode zur Testung der gliomazellinduzierten Angiogenese zur Verfügung. Diese Technik ermöglicht neben einer Applikation von Zellen (TUM-CAM-Assay) auch die Untersuchung wässriger Lösungen thermolabiler Agenzien (FGF-2-CAM-Assay), die in Form der üblicherweise verwendeten Agarosepellets aufgrund der kurzfristigen thermischen Belastung während deren Herstellung nicht untersucht werden können.

4.4.3.1 Durchführung des TUM-CAM-Assays

Der TUM-CAM-Assay wurde wie in Abbildung 38 dargestellt durchgeführt.

Die Präparation der bebrüteten Hühnereier erfolgte in Analogie zum CAM-Assay (s. Kapitel 4.2.1). Es wurden 12-14 Eier je Testsubstanz und Kontrollen verwendet und jeder Versuch mindestens einmal wiederholt. Nach dem Öffnen wurden die Eier im Unterschied zu CAM- und HET-CAM-Assay jedoch 4 Tage im Brutschrank inkubiert. Untersuchungen im CAM-Assay hatten keine Unterschiede bei Applikation der Testsubstanzen an unterschiedlichen Tagen während der Phase mit höchster Proliferation (Tag 6-8) gezeigt.

Wurde im HET-CAM-Assay Natriumlaurylsulfat als unspezifisches entzündliches Agens eingesetzt, das aufgrund seiner amphiphilen Eigenschaften Membranproteine zu solubilisieren vermag und dadurch Zellschäden verursacht, diente im TUM-CAM-Assay eine Suspension von $2 \cdot 10^5$ U-87 MG Zellen in Medium als selektiverer angiogener Stimulator. Durch die frühe Applikation der Zellen an Tag 7 (häufig erfolgt die Applikation zwischen Tag 8-10 [138,201,202]) und dem zu diesem Zeitpunkt noch unreifen Immunsystem des Embryos wurden keine Reizerscheinungen auf der Membran beobachtet.

In der Literatur schwanken die eingesetzten Zellzahlen zwischen 10^4 - 10^6 Zellen je nach eingesetzter Zelllinie und Applikationsart [138,201,202]. Die gewählte Zahl von $2 \cdot 10^5$ U-87 MG Zellen zeigte bereits nach einer Inkubationszeit von 3 Tagen einen eindeutigen *in vivo* Effekt (s. Abbildung 39).

Im Unterschied zu Methoden nach Nguyen [138] und Ribatti [202], bei denen der angiogene Stimulus das dreidimensionale Kapillarwachstum in ein Collagengel oder einen Gelatineschwamm induzierte, war der Effekt auf die durch den Agarosering begrenzte Fläche der CAM reduziert. Bei alleiniger Aufgabe der Zellsuspension konnte in der CAM das Wachstum kleinstter Kapillaren zu einem regelrechten Netzwerk beobachtet werden, das sich stark vom verästelten Kapillarwachstum in mit Medium behandelten Membranen unterschied. Substanzen mit inhibitorischer Aktivität gegenüber der durch die Gliomazellen induzierten Angiogenese können diesen Effekt reduzieren bzw. aufheben.

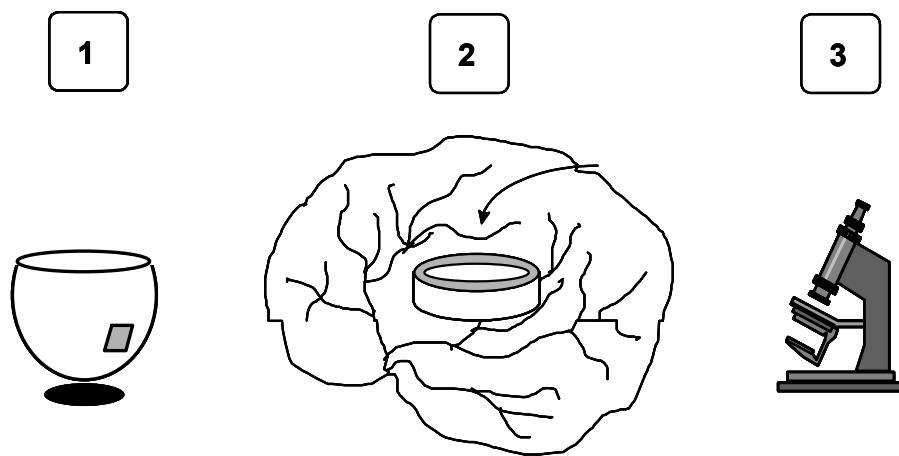


Abbildung 38: Durchführung des TUM-CAM-Assays

- 1 72 h Inkubation (37°C, 80% rel. Luftfeuchtigkeit)
Präparation des Eies (vgl. CAM-Assay)
96 h Inkubation (37°C, 80% rel. Luftfeuchtigkeit)
- 2 Aufgabe des Agaroserings mit U-87 MG Zellen ± Testsubstanz
weitere 72 h Inkubation (37°C, 80% rel. Luftfeuchtigkeit)
- 3 Auswertung unter der Stereolupe

Die Auswertung erfolgte in einem randomisierten Verfahren, bei dem aufgrund spezifischer Charakteristika der CAM die Einteilung in drei Kategorien erfolgt (s. Tabelle 15).

Tabelle 15: Scorewerte zur Evaluierung der gliomazellinduzierten Angiogenese

Kategorie	Beurteilung	beobachteter Effekt im Agarosering
0	Normalisierung	normale Vaskularisierung oder kapillarfri
1	schwache Angiogenesestimulation bzw. schwache Normalisierung	schwach ausgeprägtes kapilläres Netzwerk, zusätzliche Bereiche mit normaler Vaskularisierung oder kleine kapillarfri Bereiche
2	starke Angiogenesestimulation	stark ausgeprägtes kapilläres Netzwerk

In Abbildung 39 sieht man die Chorioallantoismembran im Agarosering nach 72stündiger Inkubation mit U-87 MG Zellen. Deutlich sind eine Vielzahl von Kapillaren zu erkennen, die einem Netzwerk gleich die Membran überziehen.

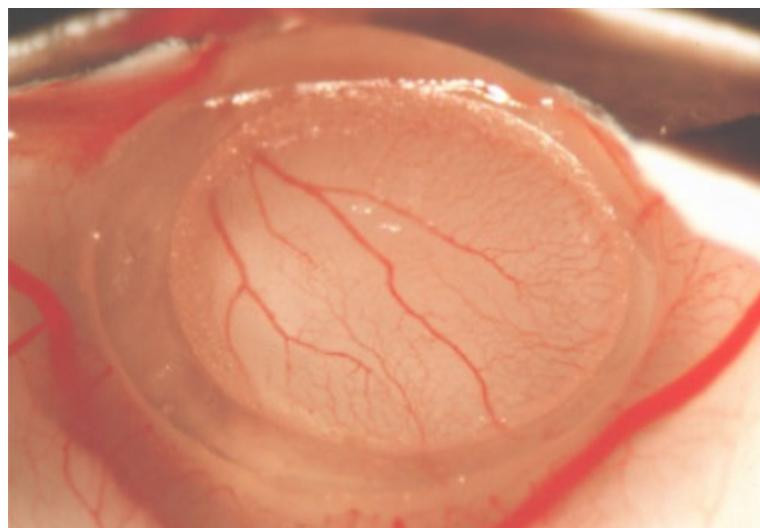


Abbildung 39: Durch U-87 MG Zellen ($2 \cdot 10^5$ Zellen/Agarosering) induziertes Kapillarwachstum in der CAM. Beispiel für Kategorie 2 (s. Tabelle 15)

Wird nur Medium im ringbegrenzten Membranbereich appliziert entstehen die charakteristisch verästelten Kapillaren wie in der übrigen CAM. Dieser der Kategorie 0 entsprechende Effekt ist in Abbildung 40 zu sehen. Substanzen, die die U-87 MG stimulierte Kapillarbildung hemmen, zeigen entweder einen mit Medium vergleichbaren Effekt oder eine Angiogeneseinhibition mit praktisch kapillarfreier Fläche innerhalb des Agarosering.

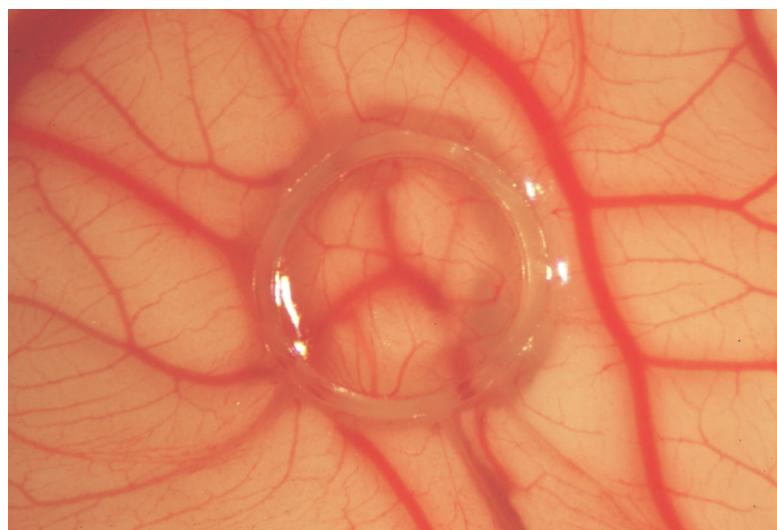


Abbildung 40: Normales Kapillarwachstum in der CAM bei Zusatz von Medium. Beispiel für Kategorie 0 (s. Tabelle 15)

Abbildung 41 zeigt einen Effekt der Kategorie 1. Innerhalb des Agarosering ist nur noch geringes Kapillarwachstum zu erkennen. Ein Bereich rechts vom Begrenzungsring ist nahezu

kapillarfärbung frei. Vermutlich konnte ein gewisser Substanzanteil aus dem Agarosering diffundieren und so auch die physiologische Angiogenese hemmen. Da der Einfluss aller Testsubstanzen auf das normale Gefäßwachstum bereits im CAM-Assay untersucht wurde, erfolgte im TUM-CAM-Assay keine Unterscheidung zwischen einer reinen Hemmung der tumorzellinduzierten Angiogenese und einer zusätzlichen physiologischen Angiogenesehemmung.

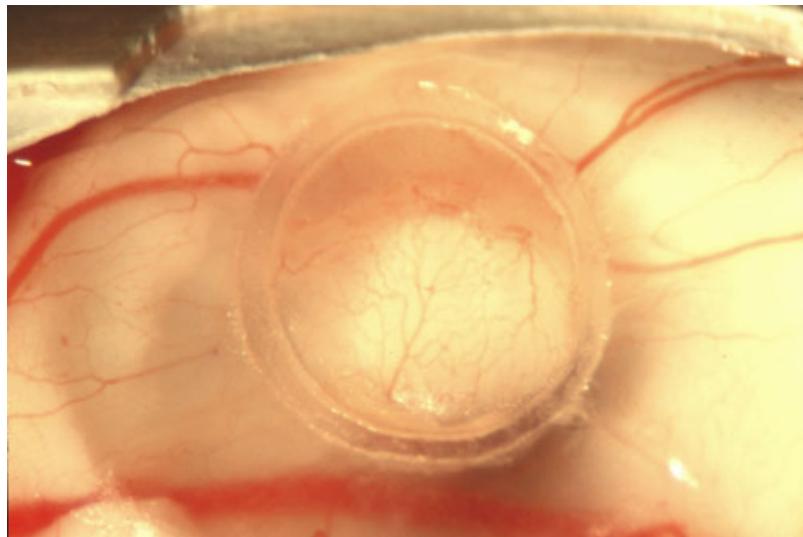


Abbildung 41: Schwaches kapilläres Netzwerk im Agarosering mit kapillarfärbung freiem Bereich: Rechts davon teilweise Inhibition der U-87 MG induzierten sowie der physiologischen Angiogenese durch 50 µg einer Testsubstanz (LuPS P1). Beispiel für Kategorie 1 (s. Tabelle 15)

Nach Zuordnung der ausgewerteten Eier zu einer der drei Kategorien kann die Inhibition der gliomzellinduzierten Angiogenese [%] nach folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Inhibition [%]} = \frac{\text{Zahl (Eier Kategorie 0)} + 0,5 \times \text{Zahl (Eier Kategorie 1)}}{\text{Gesamtzahl lebender Eier}} \times 100\%$$

Um den Einfluss der Kategorie 1, dessen Zuordnung sich für den Betrachter oftmals schwierig gestaltet, zu reduzieren, geht dieser nur zu 50% in die Berechnung ein. Damit wird auch möglichen Falschzuordnungen Rechnung getragen.

Im Folgenden ist unter der tumorantiangiogenen bzw. tumorangiostatischen Aktivität stets die inhibitorische Aktivität auf die durch U-87 Gliomazellen induzierte Angiogenese zu verstehen.

Die prozentuale Inhibition der U-87 MG induzierten Angiogenese kann folgenden Effekten zugeordnet werden:

Tabelle 16: Zusammenhang zwischen prozentualer Inhibition und tumorantiangiogenem Effekt

Inhibition	tumorantiangiogener Effekt
86%-100%	stark
71%-85%	gut
56%-70%	schwach
41%-55%	unsicher
$\leq 40\%$	kein

4.4.4 Ergebnisse der Testung im TUM-CAM-Assay

An in Kapitel 3 beschriebenen Testsubstanzen wurde untersucht, an welche strukturellen Eigenschaften die tumorantiangiogene Aktivität von sulfatierten Kohlenhydraten gebunden ist. Folgende Parameter wurden bearbeitet:

Pharmakologische Parameter

1 Dosis-Wirkungsbeziehung

Strukturelle Parameter

2 Standardsubstanzen, Heparin und Saccharoseoctasulfat

3 Sulfatierungsgrad

4 Kohlenhydratgrundgerüst

glykosidische Verknüpfung

Verzweigungsgrad

Monomerbausteine

5 Position der Sulfatgruppen

6 Molekulargewicht und Lipophilie

7 Art der Substituenten

4.4.4.1 Dosis-Wirkungsbeziehung

Am Beispiel des λ -Carrageenan wurde der Zusammenhang zwischen Dosis und Wirkung untersucht.

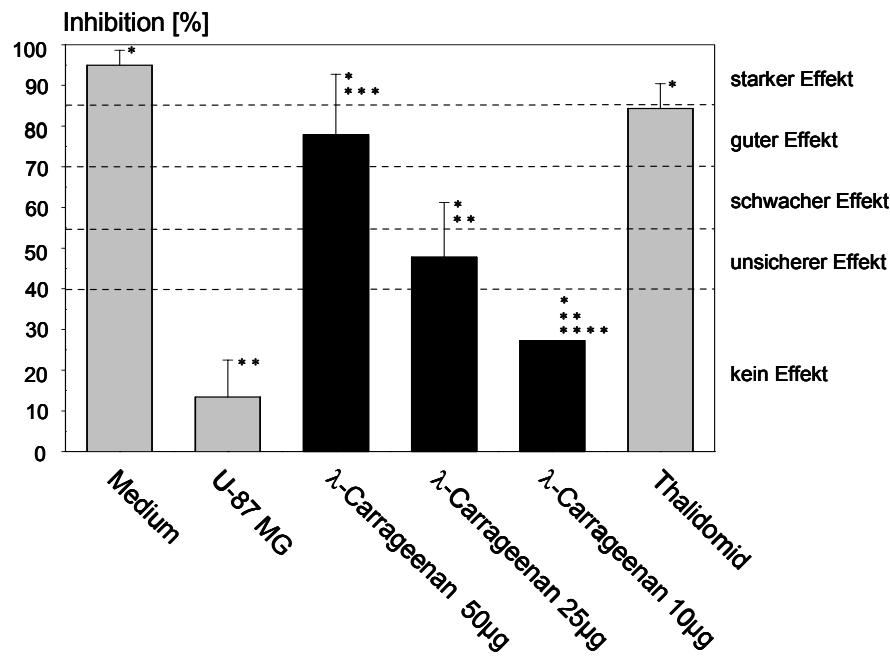


Abbildung 42: Zusammenhang zwischen Dosis und Wirkung: Prozentuale Inhibition von λ -Carrageenan (schwarz). Zum Vergleich sind Medium (Blindwert), U-87 MG Zellen (Negativkontrolle) und Thalidomid (Positivkontrolle) angegeben. (* = $p < 0,05$ vs U-87 MG; ** = $p < 0,05$ vs Thalidomid; *** = $p < 0,05$ vs λ -Carrageenan 10 μ g/Ring; **** = $p < 0,05$ vs λ -Carrageenan 50 μ g/Ring)
 Testkonzentration: 50 μ g/Ring
 Thalidomid: Positivkontrolle

Die U-87 MG Zellsuspension ($2 \cdot 10^5$ Zellen) ohne Testsubstanz wurde stets zur Kontrolle mitgetestet und zeigte während der gesamten Testung kontinuierlich eine starke Stimulation des netzartigen Kapillarwachstums in der CAM (13,4% Inhibition). Medium hingegen hatte keinen Einfluss auf das Gefäßsystem (95% Inhibition). Als Positivkontrolle wurde Thalidomid (50 μ g/Ring) verwendet, das zu einer annähernd 85%igen Hemmung der gliomazellinduzierten Angiogenese führte (s. Kapitel 4.4.4.2).

Der inhibitorische Effekt von λ -Carrageenan nahm im Intervall von 50-10 μ g/Ring konzentrationsabhängig ab, auch wenn lediglich zwischen der höchsten und der niedrigsten Dosierung ein signifikanter Unterschied besteht. In allen drei Konzentrationen war der Unterschied zur U-87 MG Zellsuspension statistisch signifikant. Die tumorantiangiogene

Wirkung von λ -Carrageenan in der höchsten getesteten Konzentration war mit der von Thalidomid vergleichbar.

Der TUM-CAM-Assay ist also zur Differenzierung der tumorantiangiogenen Aktivität verschiedener Verbindungen sowie unterschiedlicher Dosierungen einer Substanz geeignet.

4.4.4.2 Standardsubstanzen, Heparin und Saccharoseoctasulfat

Als Standardsubstanzen wurden die Angiogeneseinhibitoren Thalidomid und Suramin verwendet, deren Einsatz zur Behandlung von Gliomen bereits klinisch geprüft wird [203].

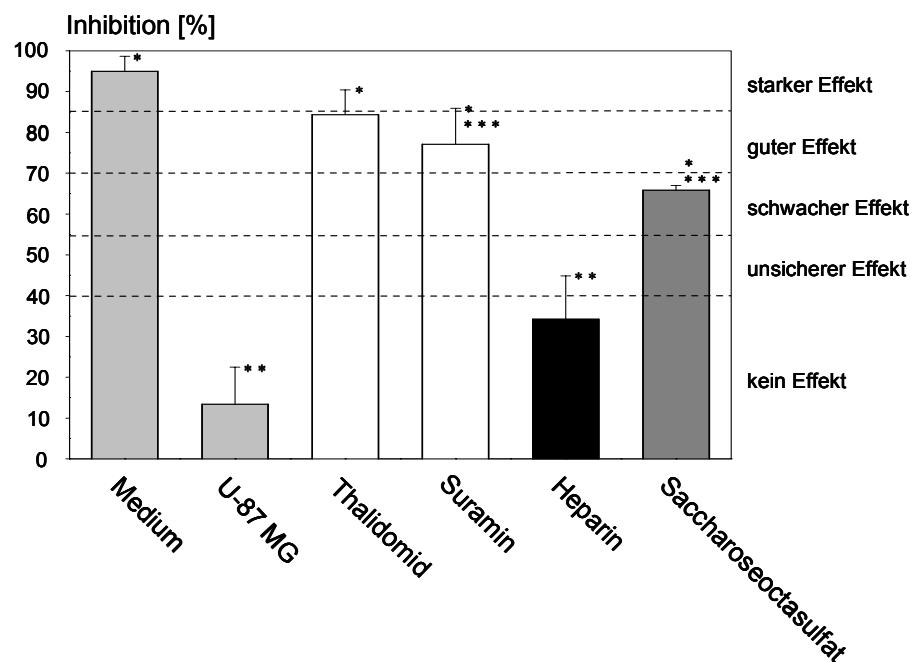


Abbildung 43: Tumorangiostatische Aktivität von Standardsubstanzen (Thalidomid und Suramin), Heparin (unfraktioniert, bovine Darmmukosa) und Saccharoseoctasulfat. Zum Vergleich sind Medium (Blindwert) und U-87 MG Zellen (Negativkontrolle) angegeben.

(* = $p < 0,05$ vs U-87 MG; ** = $p < 0,05$ vs Thalidomid; *** = $p < 0,05$ vs Heparin)

Testkonzentration: 50 μ g/Ring

Thalidomid: Positivkontrolle

Beide zeigten einen guten tumorantiangiogenen Effekt. Die Diskrepanz zwischen der in Literaturdaten beschriebenen und der in eigenen Untersuchungen beobachteten Aktivität von Thalidomid wurde bereits in Kapitel 4.2.2.2 ausführlich diskutiert. Möglicherweise ist dafür die schlechte Löslichkeit des Thalidomids und die damit verbundenen Probleme bei der

Herstellung einer homogenen Suspension verantwortlich. Die hohe Aktivität von Suramin könnte auf einer Interaktion mit verschiedenen heparinbindenden Wachstumsfaktoren u.a. VEGF [51,88] beruhen, wodurch deren angiogene Eigenschaften moduliert werden könnten. Im Gegensatz dazu resultierte der Zusatz von unfractioniertem Heparin (bovine Darmmukosa) zu U-87 MG Zellen in keiner signifikanten Abweichung verglichen mit unbehandelten Gliomazellen. Das hochsulfatierte Saccharoseoctasulfat, für das FGF-1 bindende Eigenschaften beschrieben wurden [97], zeigte einen deutlich stärkeren Effekt als Heparin.

4.4.4.3 Bedeutung des Sulfatierungsgrads

In Analogie zum HET-CAM-Assay (s. Kapitel 4.3.3.3) wurde auch im TUM-CAM-Assay an verschiedenen LuPS-sulfaten (LuPS S7: DS = 0,27; LuPS S8: DS = 0,53; LuPS S9: DS = 0,72; LuPS S3: DS = 1,65) der Einfluss des Sulfatierungsgrads auf die Hemmung der Tumorangiogenese untersucht (s. auch Tabelle 13).

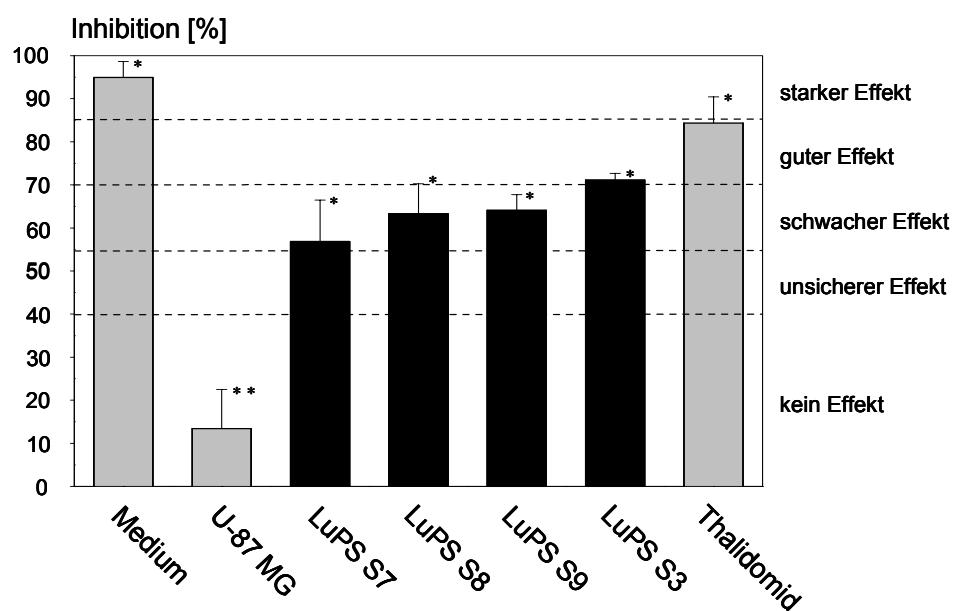


Abbildung 44: Tumorangiostatische Effekte von β -1,4-D-Galactanen (LuPS-sulfate) mit unterschiedlichem Sulfatierungsgrad (von links nach rechts mit steigendem DS, s. Tabelle 13). Zum Vergleich sind Medium (Blindwert) und U-87 MG Zellen (Negativkontrolle) angegeben.

(* = $p < 0,05$ vs U-87 MG; ** = $p < 0,05$ vs Thalidomid)

Testkonzentration: 50 μ g/Ring

Thalidomid: Positivkontrolle

Die LuPS-sulfate hatten bis zu einem DS $\leq 0,72$ (LuPS S9) bei vergleichbarem Polymerisationsgrad einen schwachen Effekt. Allerdings nahm die Aktivität der β -1,4-D-Galactane mit steigendem DS geringfügig zu und resultierte in einem guten Effekt bei dem höchstsulfatierten kürzerkettigen Derivat LuPS S3. Diese Unterschiede waren statistisch jedoch nicht signifikant. Im Vergleich zu dem Glucosaminoglykan Heparin (unfraktioniert, bovine Darmmukosa, s. Abbildung 43) zeigten die LuPS-sulfate eine deutlich stärkere Wirkung. Demnach ist, zumindest bei den β -1,4-D-Galactanen, der Sulfatierungsgrad nur von untergeordneter Bedeutung. Für eine *in vivo* Aktivität scheint hier das zu Grunde liegende Kohlenhydratgerüst entscheidend zu sein.

Der Einfluss des DS wurde auch bei Galactanen mit abweichendem Verknüpfungstyp (α -1,4-, β -1,3-Verknüpfung) untersucht (s. Abbildung 45).

Bei den α -1,4-D-Galactanen zeigte das Derivat mit dem geringeren DS (α -Galactan ls S1) keinen eindeutigen Effekt, während das hochsulfatierte α -Galactan ul S1 eine mit dem aktivsten β -1,4-D-Galactan LuPS S3 vergleichbare gute tumorantiangiogene Aktivität besaß. Die Testung des β -1,3-verknüpften LäPS v S1 mit einem DS ≈ 2 ergab wie bei den niedrig sulfatierten β -1,4-D-Galactanen einen schwachen Effekt.

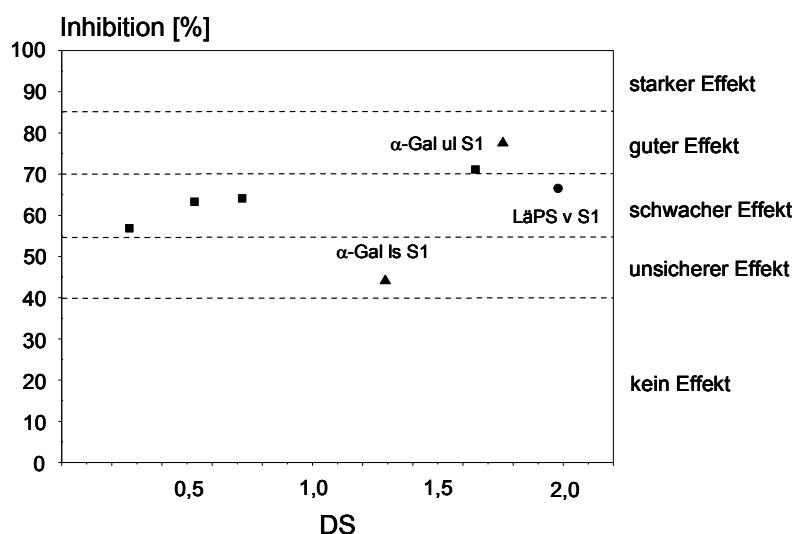


Abbildung 45: Tumorangiostatische Effekte von α -1,4 (▲)- und β -1,3 (●)-D-Galactanen im Vergleich zu den β -1,4-D-Galactanen (■) mit unterschiedlichem Sulfatierungsgrad (von links nach rechts mit steigendem DS).
Testkonzentration: 50 μ g/Ring

Die Ergebnisse legen nahe, dass die inhibitorischen Eigenschaften der Galactane auf die Tumorangiogenese außer vom Sulfatierungsgrad noch von weiteren Parametern wie z.B. der glykosidischen Bindungsart abhängen.

4.4.4.4 Bedeutung des Kohlenhydratgrundgerüsts

Bedeutung der glykosidischen Verknüpfung

Unter Berücksichtigung des unterschiedlichen Substitutionsgrads der Polysaccharidderivate wurde der Zusammenhang zwischen der Struktur des Kohlenhydratgrundgerüsts und der Hemmung der tumorzellinduzierten Angiogenese untersucht. Die getesteten Derivate wurden mit den LuPS-sulfaten verglichen (s. Abbildung 46).

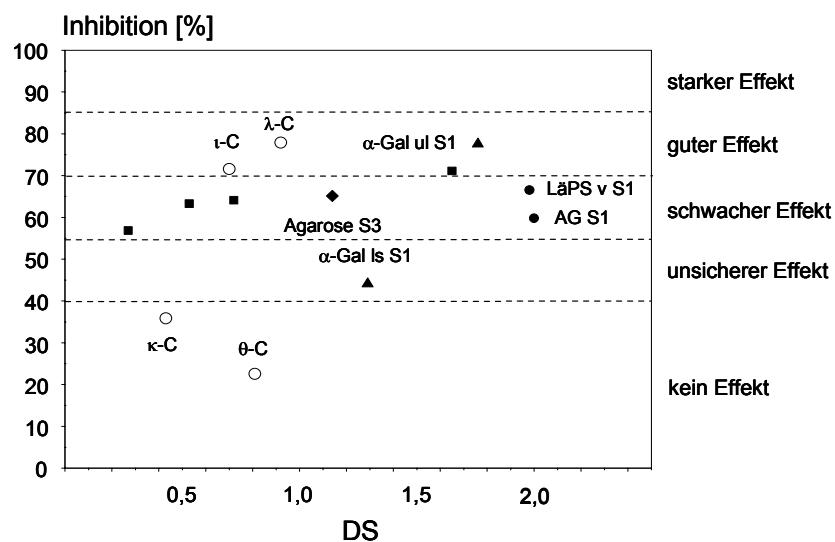


Abbildung 46: Tumorangiostatische Effekte von α -1,4 (▲)- und β -1,3 (●)-D-Galactanen mit unterschiedlichem Sulfatierungsgrad, genuinen Carrageenamen (○) und sulfatierter Agarose (◆) (von links nach rechts mit steigendem DS). Die zum Vergleich angegebenen Werte der β -1,4-D-Galactane (■) sind ohne Beschriftung.

Testkonzentration: 50 μ g/Ring

In der Gruppe der α -1,4-D-Galactane war besonders das nahezu inaktive α -Galactan ls S1 auffallend, das einen deutlich geringeren Effekt hatte als die LuPS-sulfate. α -Galactan ul S1 mit einem höheren Sulfatierungsgrad hingegen war in seiner Aktivität mit einem ähnlich hoch sulfatierten β -1,4-D-Galactan (LuPS S3: DS = 1,65) vergleichbar. Möglicherweise trägt auch

der variierende Galacturonsäure- und Rhamnosegehalt der beiden α -1,4-D-Galactane zur unterschiedlichen *in vivo* Aktivität bei. Ab einem gewissen DS kann auch bei den α -1,4-D-Galactanen eine den LuPS-sulfaten entsprechende tumorantiangiogene Aktivität erzielt werden.

Die getesteten β -1,3-D-Galactane mit nahezu identischem DS (LäPS v S1: DS = 1,98; Arabinogalactansulfat AG S1: DS = 2,0) waren schwach aktiv und in ihrer Wirkung mit den niedriger sulfatierten β -1,4-D-Galactanen vergleichbar. Unter der Voraussetzung, dass sich die bei den LuPS-sulfaten beobachtete Aktivitätssteigerung auch bei einem DS > 1,65 fortsetzt, ist ein β -1,4-verknüpftes einem β -1,3-verknüpften Galactangrundgerüst überlegen.

Die genuinen Carrageenane zeigten ein uneinheitliches Bild. ι - und λ -Carrageenan konnten die Tumorangiogenese effektiver hemmen als die LuPS-sulfate, κ - und θ -Carrageenan hingegen waren inaktiv. Die glykosidische Verknüpfungsart scheint demnach bei den alternierend aus β -1,3- und α -1,4-D-Galactose aufgebauten Carrageenanan nur von untergeordneter Bedeutung zu sein; vielmehr deutet sich eine Abhängigkeit der biologischen Aktivität vom DS und insbesondere von der Position der Sulfatgruppen ab (s. Kapitel 4.4.4.5).

Wie auch schon im HET-CAM-Assay zeigte das unregelmäßig aus β -1,3-D-Galactose- und α -1,4-(3,6)-Anhydro-L-Galactose-Bausteinen aufgebaute sulfatierte Agarosederivat Agarose S3 auch im TUM-CAM-Assay eine mit den LuPS-sulfaten vergleichbare Aktivität. Eine Grundstruktur aus β -1,4-D-Galactose kann also ohne Wirkverlust durch Agarose ersetzt werden.

Bedeutung des Verzweigungsgrads

Der Einfluss des Verzweigungsgrads des Kohlenhydratgrundgerüstes wurde an den in Position 6 unterschiedlich stark verzweigten β -1,3-D-Galactanen LäPS v S1 (DS = 1,98) und AG S1 (Arabinogalactansulfat, DS = 2,0) mit nahezu identischem DS untersucht. Die tumorantiangiogene Wirkung wurde mit der eines annähernd so hoch sulfatierten β -1,4-D-Galactans, LuPS S3 (DS = 1,65) verglichen.

AG S1 als das am stärksten verzweigte β -1,3-verknüppte Galactansulfat zeigte ebenso wie LäPS v S1 mit einem geringeren Anteil an Seitenketten lediglich einen schwachen Effekt. Die *in vivo* Aktivität der β -1,3-D-Galactane wird also durch einen erhöhten Anteil an Galactoseseitenketten nicht wesentlich beeinflusst, sondern beruht v.a. auf dem Anteil negativ geladener Sulfatgruppen und der glykosidischen Bindungsart. Die Überlegenheit des unverzweigten β -1,4-D-Galactans LuPS S3 war nicht signifikant.

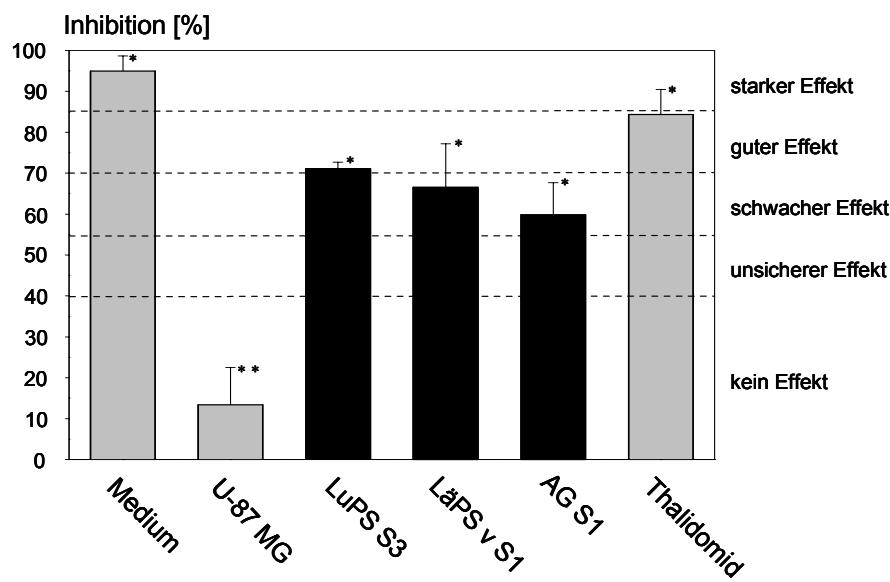


Abbildung 47: Tumorangiostatische Effekte der verzweigten β -1,3-D-Galactane LäPS v S1 und AG S1 im Vergleich zum β -1,4-D-Galactan LuPS S3. Medium (Blindwert) und U-87 MG Zellen (Negativkontrolle) sind als Kontrollen angegeben.

(* = $p < 0,05$ vs U-87 MG; ** = $p < 0,05$ vs Thalidomid)

Testkonzentration: 50 μ g/Ring

Thalidomid: Positivkontrolle

Bedeutung der Monomerbausteine des sulfatierten Polymers

In einem weiteren TUM-CAM-Assay wurde die potentielle Inhibition der U-87 MG induzierten Angiogenese durch nicht auf einem Galactangrundgerüst basierende sulfatierte Polysaccharide untersucht. Als Testsubstanzen fanden Fucoidan, das Polyxytan PPS und das Glucan LAM S5 Verwendung.

Das Fucoidan von *Fucus vesiculosus* L., Phaeophyceae (Fucoidan (ves.)) hatte einen schwachen Effekt im TUM-CAM-Assay. Das aus α -1,2-L-Fucose bestehende Grundgerüst mit hohem Sulfatierungsgrad erzielte eine mit den niedrig sulfatierten β -1,4-D-Galactanen vergleichbare Wirkung (s. Abbildung 44).

Wird Galactose als Monomerbaustein wie beim PPS durch Xylose ersetzt, geht die tumorangiostatische Aktivität verloren. Hingegen erzielte das β -1,3-D-Glucan LAM S5 (DS = 2,3) wie das potenteste β -1,4-D-Galactan LuPS S3 einen guten Effekt. Ein Galactangrundgerüst ist also keine zwingende Bedingung für eine *in vivo* Aktivität. Vielmehr

können auch hochsulfatierte Polysaccharide aus L-Fucose- oder D-Glucose-, nicht jedoch D-Xylosemonomeren eine vergleichbare Wirkung haben.

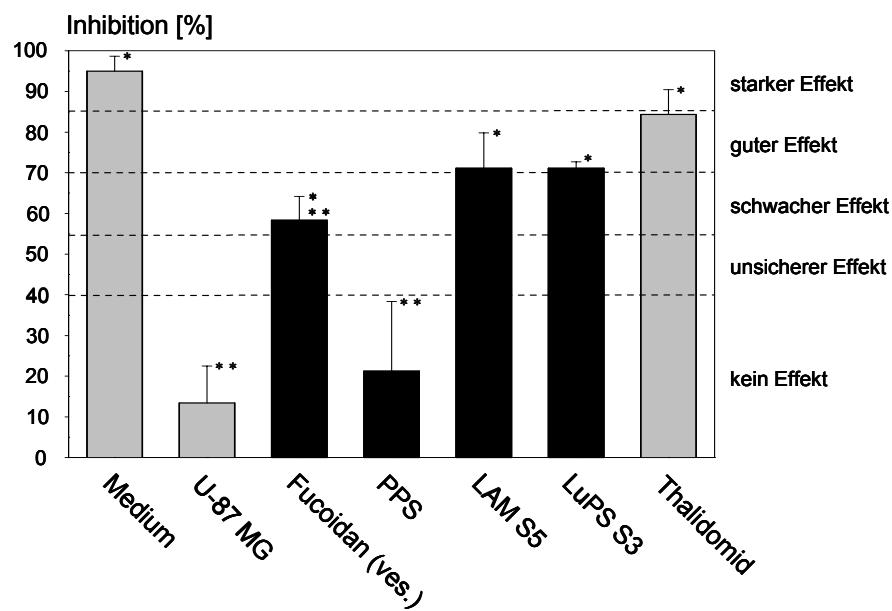


Abbildung 48: Tumorangiostatische Effekte verschiedener Polysaccharide ohne Galactangrundgerüst im Unterschied zum β -1,4-D-Galactan LuPS S3. Zum Vergleich sind Medium (Blindwert) und U-87 MG Zellen (Negativkontrolle) angegeben.

(* = $p < 0,05$ vs U-87 MG; ** = $p < 0,05$ vs Thalidomid)

Testkonzentration: 50 μ g/Ring

Thalidomid: Positivkontrolle

4.4.4.5 Bedeutung der Position der Sulfatgruppen

Ob die Position der Sulfatgruppe(n) entscheidend zur tumorantiangiogenen Wirkung beiträgt, wurde zunächst an den genuinen Carrageenane untersucht. Diese sind selektiv sulfatiert, unterscheiden sich jedoch in Anhydrogalactosegehalt, DS und Verteilung der Sulfatgruppen (s. Tabelle 14). In Abbildung 49 sind die Effekte der Carrageenane mit von links nach rechts steigendem DS dargestellt.

Das nur in Position 4 der β -1,3-Galactose sulfatierte κ -Carrageenan (enthält Anhydrogalactose, DS = 0,43) war inaktiv. Hingegen zeigte das zusätzlich in Position 2 der α -1,4-Anhydrogalactose sulfatierte ι -Carrageenan mit einem mittleren Sulfatierungsgrad (DS = 0,70) einen guten Effekt. θ -Carrageenan, das sich von ι -Carrageenan durch eine veränderte Position

der Sulfatgruppe im β -1,3-Galactoseanteil (Position 2 statt Position 4) unterscheidet, war trotz eines hohen DS (DS = 0,81) wirkungslos.

Als ebenfalls besonders potenter Inhibitor der gliomazellinduzierten Angiogenese erwies sich λ -Carrageenan (DS = 0,92), das, verglichen mit den anderen Carrageenanen, einige strukturelle Besonderheiten aufweist. Wie auch im θ -Carrageenan ist die β -1,3-Galactose in Position 2 sulfatiert. Statt einer Anhydrogalactose enthält λ -Carrageenan jedoch in Position 2 und 6 disulfatierte 1,4-verknüpfte Galactose.

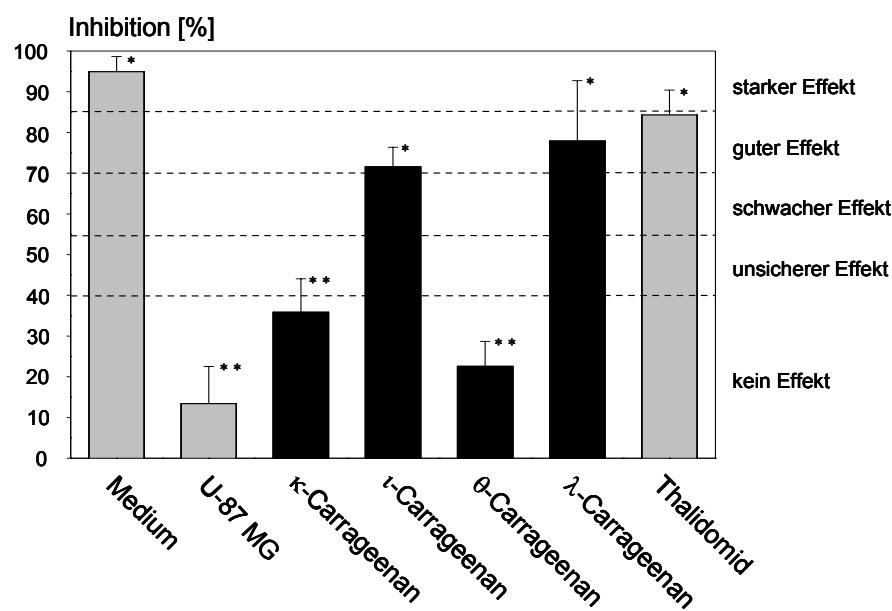


Abbildung 49: Tumorangiostatische Effekte genuiner Carrageenane (von links nach rechts mit steigendem DS). Zum Vergleich sind Medium (Blindwert) und U-87 MG Zellen (Negativkontrolle) angegeben.

(* = $p < 0,05$ vs U-87 MG; ** = $p < 0,05$ vs Thalidomid)

Testkonzentration: 50 μ g/Ring

Thalidomid: Positivkontrolle

Entscheidend für eine Aktivität der Carrageenane im TUM-CAM-Assay ist also neben einem hohen DS insbesondere die Position der Sulfatgruppen. Bei den anhydrogalactosehaltigen Carrageenanen (κ -, τ - und θ -Carrageenan) ist eine Sulfatgruppe in Position 4 der β -1,3-Galactose neben einer zusätzlichen Sulfatgruppe in Position 2 des Anhydrogalactoseteils Voraussetzung für eine *in vivo* Aktivität. Das anhydrogalactosefreie λ -Carrageenan kann den negativen Einfluss der in Position 2 sulfatierten β -1,3-Galactose (vgl. θ -Carrageenan) durch α -1,4-Galactose-(2,6)-disulfat kompensieren.

Um den Einfluss des Sulfatgehalts zu berücksichtigen, wurde der inhibitorische Effekt verschiedener selektiv und unselektiv sulfatierter Polysaccharide gegen den DS aufgetragen (s. Abbildung 50).

Dabei ließ sich das unselektiv sulfatierte Agarosederivat (Agarose S3) in die Reihe der ebenfalls unselektiv sulfatierten β -1,4-D-Galactane (LuPS-sulfate) einordnen, die mit zunehmendem Sulfatierungsgrad eine geringe Aktivitätssteigerung zeigen. Wie schon im HET-CAM-Assay war auch im TUM-CAM-Assay eine Abweichung der genuin selektiv sulfatierten Carrageenane, bei denen die Position der Sulfatgruppe(n) die Wirkung entscheidend beeinflusst (s. Abbildung 49), und des selektiv in Position 6 desulfatierten β -1,4-D-Galactans LuPS S5 6DS von den LuPS-sulfaten zu beobachten. Nimmt man für das entsprechende in Position 6 sulfatierte LuPS S5, das nicht mehr zur Testung zur Verfügung stand, einen analogen Zusammenhang zwischen DS und Wirkung an wie bei den anderen LuPS-sulfaten, resultierte die selektive Desulfatierung in einer Wirkungsabschwächung.

Daraus kann gefolgt werden, dass zumindest bei den LuPS-sulfaten eine Sulfatgruppe in Position 6 für einen eindeutigen *in vivo* Effekt wesentlich ist. Um dieses Resultat verallgemeinern zu können, müssten noch weitere Derivate überprüft werden.

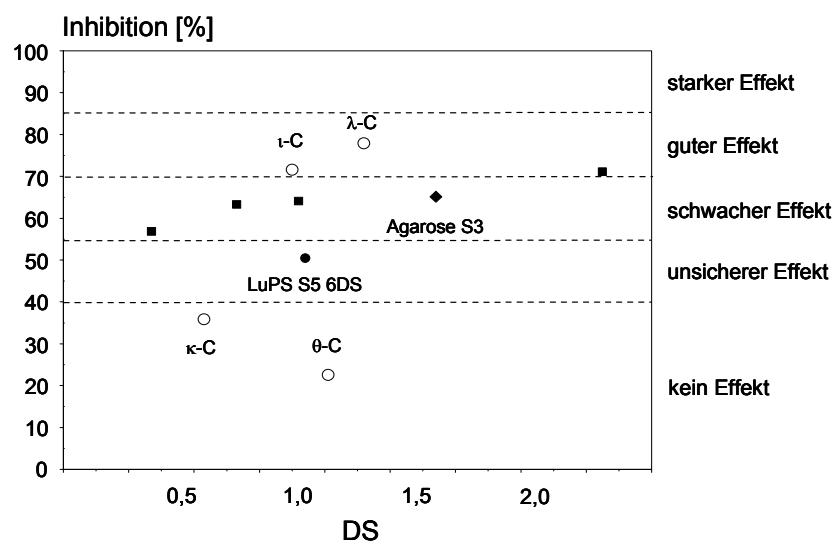


Abbildung 50: Abhängigkeit des tumorangistatischen Effekts vom DS.

Selektiv sulfatierte Galactane: genuine Carrageenane (κ -, ι -, θ -, λ -Carrageenan): (○); LuPS S5 6DS (in Position 6 selektiv desulfatiertes β -1,4-D-Galactan): (●).

Unselektiv sulfatierte Verbindungen: LuPS-sulfate: (■) (unbeschriftete Symbole); sulfatierte Agarose (Agarose S3): (◆).

Testkonzentration: 50 μ g/Ring

Als weitere selektiv sulfatierte Polysaccharide standen verschiedene Cellulosederivate zur Verfügung, die sich sowohl im Molekulargewicht und Sulfatierungsgrad als auch insbesondere in der Position der Sulfatgruppe(n) unterscheiden (s. Tabelle 17).

Tabelle 17: Cellulosederivate: Molekulargewicht (MW), Sulfatierungsgrad (DS) und Position der Sulfatgruppe(n)

Cellulosederivat	MW [kDa]	DS	Position der Sulfatgruppe(n)
Cellulose O-2	30	0,56	2
Cellulose O-3	60	0,98	3
Cellulose 2-3	40	1,33	2

Die folgende Abbildung fasst die Testung der Cellulosederivate im TUM-CAM-Assay zusammen.

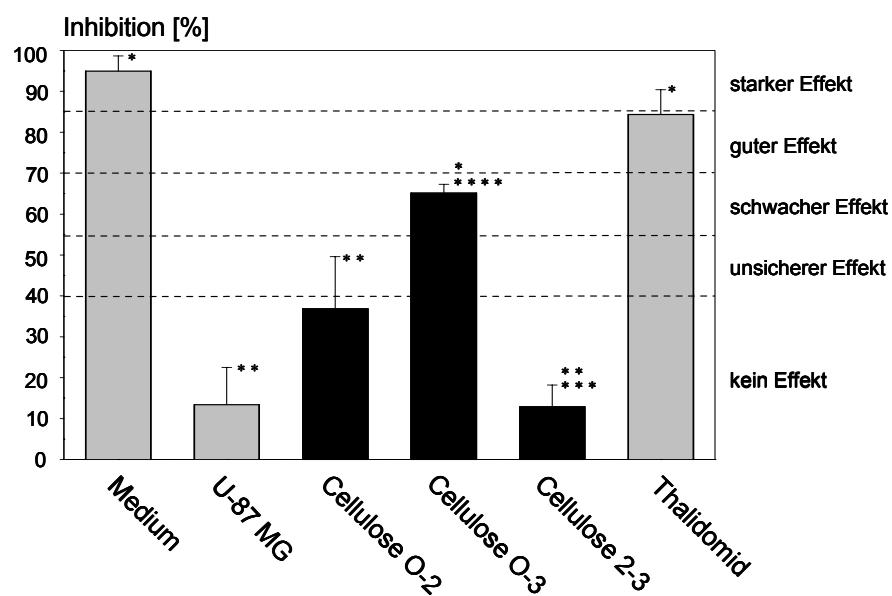


Abbildung 51: Testung selektiv sulfatierter Cellulosederivate im TUM-CAM-Assay (von links nach rechts mit steigendem DS). Zum Vergleich sind Medium (Blindwert) und U-87 MG Zellen (Negativkontrolle) angegeben.

(* = $p < 0,05$ vs U-87 MG; ** = $p < 0,05$ vs Thalidomid; *** = $p < 0,05$ vs Cellulose O-3; **** = $p < 0,05$ vs Cellulose 2-3)

Testkonzentration: 50 µg/Ring

Thalidomid: Positivkontrolle

Cellulose O-2 als das Cellulosederivat mit dem geringsten DS und Sulfatgruppen ausschließlich in 2-Stellung war ohne Effekt. Hingegen führte die Verschiebung der Sulfatgruppe in Position 3 der Glucosekette zu dem aktiven Cellulose O-3. Inwieweit dieser

Aktivitätsanstieg auch auf der Erhöhung des Sulfatierungsgrads beruht, ist unklar. Jedoch resultierte eine weitere Steigerung des DS in dem wirkungslosen Derivat Cellulose 2-3, das sowohl in Position 3 als auch in Position 2 sulfatiert ist. Demnach führt eine Sulfatierung in 2-Stellung des Glucosemoleküls unabhängig vom Sulfatierungsgrad zu einem Wirkungsverlust.

Aus den Untersuchungen zum möglichen Einfluss der Position der Sulfatgruppe(n) kann folgendes Fazit gezogen werden:

- 1 Bei anhydrogalactosehaltigen Carrageenanen führen Sulfatgruppen in Position 4 der β -1,3-Galactose neben einer zusätzlichen Sulfatgruppe in Position 2 der α -1,4-Anhydrogalactose zur Angiogenesehemmung. Beim anhydrogalactosefreien λ -Carrageenan können zusätzliche Sulfatgruppen in Position 2 und 6 der α -1,4-Galactose den negativen Einfluss der in Position 2 sulfatierten β -1,3-Galactose aufheben
- 2 Sulfatgruppen in Position 6 sind für die Wirkung der β -1,4-D-Galactane (LuPS-sulfate) zwingend erforderlich.
- 3 Bei Cellulosederivaten führen Sulfatgruppen in Position 2 zu einem Wirkungsverlust. Lediglich eine Monosulfatierung in Position 3 resultiert in der Hemmung der tumorzellinduzierten Angiogenese.

4.4.4.6 Bedeutung des Molekulargewichts und der Lipophilie

Die Untersuchung des Einflusses von Molekulargewicht und Lipophilie wurde wie im HET-CAM-Assay am Beispiel des ι -Carrageenans durchgeführt.

Der Zusammenhang zwischen Wirkung und MW konnte nur an dem beim Abbau von ι -Carrageenan entstehenden ι -Carrageenan pH 3,2 überprüft werden, da die durch nachfolgende GPC-Fraktionierung gewonnenen Derivate (D3, D4, D5, D6, D7) nicht mehr in ausreichender Menge für eine biologische Testung zur Verfügung standen. Die Auswirkungen einer Lipophilieerhöhung wurden am Methylether von ι -Carrageenan, Methyl- ι -Carrageenan, untersucht.

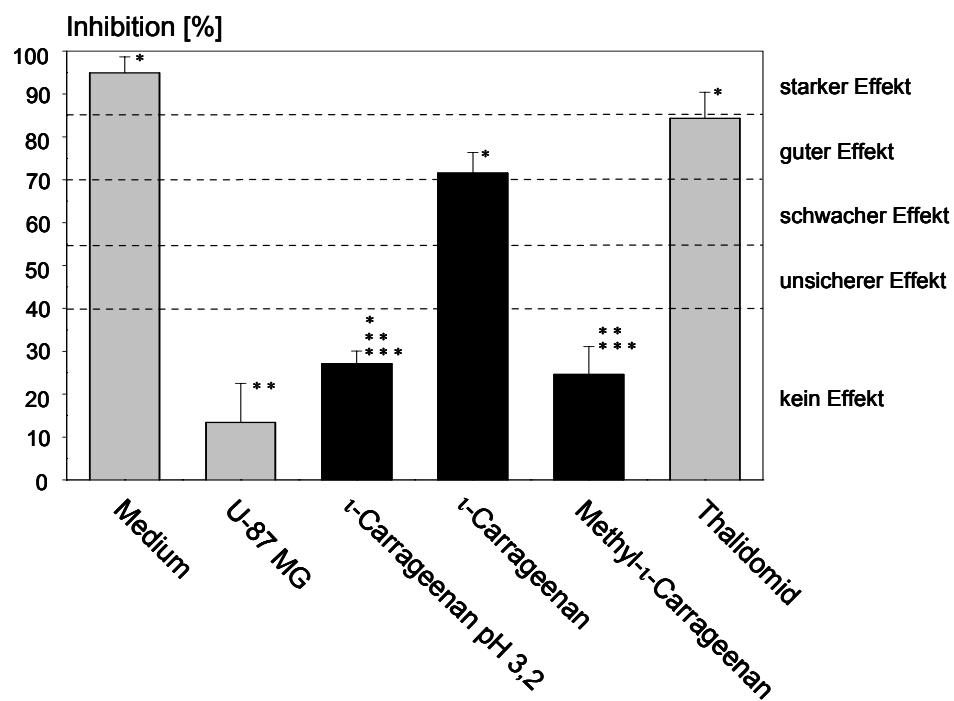


Abbildung 52: Untersuchung des Einflusses von Molekulargewicht und Lipophilie am Beispiel von ι -Carrageenan: Testung des hydrolysierten ι -Carrageenans (ι -Carrageenan pH 3,2) und des Methylethers (Methyl- ι -Carrageenan). Zum Vergleich sind Medium (Blindwert) und U-87 MG Zellen (Negativkontrolle) angegeben.

(* = $p < 0,05$ vs U-87 MG; ** = $p < 0,05$ vs Thalidomid; *** = $p < 0,05$ vs ι -Carrageenan)

Testkonzentration: 50 $\mu\text{g}/\text{Ring}$

Thalidomid: Positivkontrolle

Das im Vergleich zur Ausgangsverbindung niedermolekulare ι -Carrageenan pH 3,2 hatte keinen *in vivo* Effekt mehr. Ebenso resultierte die Einführung von Methoxygruppen in das Galactangrundgerüst in einem völligen Wirkungsverlust (Methyl- ι -Carrageenan). Ob dieser Zusammenhang auch auf andere Polysaccharide übertragen werden kann, müssten weitergehende Untersuchungen zeigen.

4.4.4.7 Art der Substituenten

In Analogie zum HET-CAM-Assay wurden auch im TUM-CAM-Assay Galactanester der neben Schwefelsäure ebenfalls im menschlichen Organismus vorliegenden Phosphorsäure auf ihre potentielle tumorantiangiogene Wirkung untersucht (LuPS P1: DS(PO₄) = 0,81; LuPS P2:

DS(PO_4) = 0,40). Außerdem wurde das fluorierte β -1,4-D-Galactansulfat LuPS F S1 (DS(SO_4) = 1,75; DS(F) = 0,63) mit im Vergleich zu LuPS-sulfaten lipophileren Eigenschaften getestet (s. Abbildung 53).

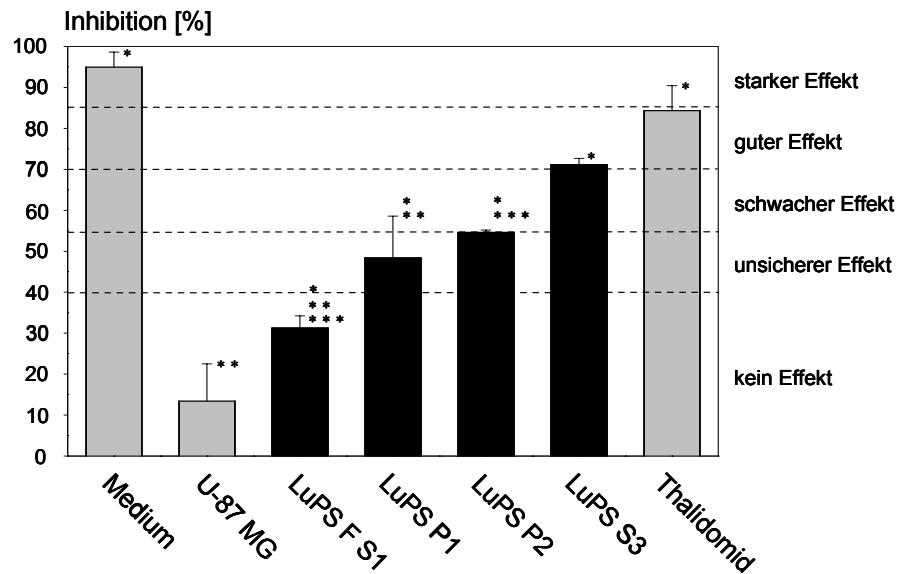


Abbildung 53: Effekte der Galactanester verschiedener anorganischer Säuren im TUM-CAM-Assay. Zum Vergleich sind Medium (Blindwert) und U-87 MG Zellen (Negativkontrolle) angegeben.

LuPS F S1	fluoriertes β -1,4-D-Galactansulfat,
LuPS P1	phosphatiertes β -1,4-D-Galactan, DS(PO_4) = 0,81
LuPS P2	phosphatiertes β -1,4-D-Galactan, DS(PO_4) = 0,40
LuPS S3	β -1,4-D-Galactansulfat, DS(SO_4) = 1,65
(* = $p < 0,05$ vs U-87 MG; ** = $p < 0,05$ vs Thalidomid; *** = $p < 0,05$ vs LuPS S3)	
Testkonzentration: 50 $\mu\text{g}/\text{Ring}$	
Thalidomid: Positivkontrolle	

Das fluorierte β -1,4-D-Galactansulfat LuPS F S1 mit etwas höherem DS als LuPS S3 zeigte keine Aktivität mehr. Die zusätzliche Fluorierung führt demnach zum Verlust der antiangiogenen Eigenschaften.

Der Austausch der Sulfat- durch Phosphatgruppen wirkte sich bei den β -1,4-D-Galactanen nachteilig auf deren Aktivität aus. Zwar hatte das niedrig phosphatierte Derivat LuPS P2 ein geringfügig höheres inhibitorisches Potential als LuPS P1 mit einem annähernd doppelt so hohen DS(PO_4), trotzdem war der Effekt der beiden phosphatierten LuPS-derivate schwächer als der vergleichbarer LuPS-sulfate (vgl. auch Abbildung 44). Ein Ersatz von Sulfat- durch Phosphatgruppen in β -1,4-D-Galactanen geht also mit einer Aktivitätsminderung einher.

4.4.4.8 Diskussion der pharmakologischen und strukturellen Parameter

Mit dem TUM-CAM-Assay wurde ein modifizierter CAM-Assay zur Beurteilung der Inhibition der gliomzellinduzierten Angiogenese durch verschiedene Standard- und Testsubstanzen etabliert. Da allerdings je nach Tumor- bzw. Tumorzellart Unterschiede in den angiogenen Triggermechanismen vorhanden sind, erlauben diese Ergebnisse keine allgemein gültigen Aussagen zum tumorantiangiogenen Potential der Testsubstanzen.

Die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Dosis und Wirkung zeigte eine Korrelation zwischen eingesetzter Wirkstoffkonzentration und erzieltem Effekt. Das verwendete Auswerteverfahren ermöglicht also den Wirkvergleich zwischen unterschiedlichen Dosierungen einer Substanz und gleichen Dosierungen verschiedener Substanzen.

Im Rahmen der Bearbeitung diverser struktureller Parameter waren auch verschiedene Verbindungen (Suramin, Heparin, Saccharoseoctasulfat) getestet worden, für die Interaktionen mit GF (u.a. FGF, VEGF) beschrieben wurden. Mit Ausnahme des Glucosaminoglykans Heparin (unfraktioniert, bovine Darmmukosa) konnte eine *in vivo* Aktivität gezeigt werden.

Die getesteten Galactansulfate waren überwiegend potenter als Heparin. Das Ausmaß der Inhibition der gliomzellinduzierten Angiogenese wird bei den Galactansulfaten u.a. durch den Sulfatierungsgrad moduliert. Bei β -1,4 (LuPS-sulfate)- und β -1,3-D-Galactanen konnte kein eindeutiger Einfluss des DS festgestellt werden, auch wenn in der Reihe der LuPS-sulfate die antiangiogene Aktivität mit steigendem DS geringfügig zunahm. Bei den α -1,4-D-Galactanen war jedoch für eine eindeutige Aktivität ein hoher Sulfatgehalt erforderlich (α -Galactan ul S1).

Die tumorantiangiogene Wirkung scheint demnach an das zugrundeliegende Kohlenhydratgerüst gebunden zu sein. Eine besonders hohe Aktivität, die jedoch in hohem Maße von der Position der Sulfatgruppen beeinflusst wird, zeigten die α -1,3/ β -1,4-verknüpften Carrageenane. β -1,4- und β -1,3-D-Galactane waren in ihrer Wirkung vergleichbar, auch wenn sich bei einem hohen DS eine gewisse Überlegenheit der β -1,4-Verknüpfung andeutete. Die alternierende Verknüpfung aus β -1,3-D-Galactose und α -1,4-(3,6)-Anhydro-L-Galactose des Agarosesulfats Agarose S3 stellte im Vergleich zu den LuPS-sulfaten keinen Nachteil dar.

Die Einführung von Seitenketten in das lineare Kohlenhydratgrundgerüst hat keinen Einfluss auf die tumorantiangiogenen Eigenschaften. Ebenso ist die *in vivo* Aktivität nicht an Galactose als Monomerbaustein gebunden, sondern bleibt auch in fucose- und glucosehaltigen (Fucoidan, LAM S5), nicht aber in xylosehaltigen Polysacchariden (PPS) erhalten.

Von entscheidender Bedeutung für das antiangiogene Potential kann im Einzelfall die Stellung der Sulfatgruppe(n) sein. Bei den genuinen Carrageenanen war eine klare Trennung zwischen anhydrogalactosehaltigen Verbindungen (κ -, ι - und θ -Carrageenan), bei denen nur Sulfatgruppen in Position 4 der β -1,3-Galactose neben einer zusätzlichen Sulfatgruppe in Position 2 der α -1,4-Anhydrogalactose antiangiogen wirkten, und dem anhydrogalactosefreien λ -Carrageenan, dessen zusätzliche Sulfatgruppen in Position 2 und 6 der α -1,4-Galactose den negativen Einfluss der in Position 2 sulfatierten β -1,3-Galactose aufheben konnten, möglich. Bei den LuPS-sulfaten ist eine Sulfatierung in Position 6 unerlässlich für die Wirkung. Die Aktivität verschiedener Cellulosederivate ist an die Monosulfatierung in Position 3 gebunden. Die alleinige oder zusätzliche Derivatisierung in Position 2 der Glucose führt zum Wirkverlust.

Der Einfluss von Molekulargewicht und Lipophilie konnte nur an wenigen Beispielen untersucht werden. Sowohl die Reduzierung des MW (ι -Carrageenan pH 3,2) als auch die Erhöhung der Lipophilie (Methyl- ι -Carrageenan) führten bei ι -Carrageenan zu inaktiven Derivaten. Das durch Fluorierung gewonnene lipophile β -1,4-D-Galactan (LuPS F S1) zeigte ebenfalls keinen Effekt mehr. Im Einzelfall kann also eine Verringerung des MW oder eine Erhöhung des lipophilen Charakters zum Wirkverlust führen. Ob diese Ergebnisse allgemein gültig sind, müssten weitere Untersuchungen zeigen.

Die tumorantiangiogenen Eigenschaften sind an Sulfatgruppen als negative Ladungsträger gebunden – ein Ersatz durch Phosphatgruppen geht mit einer Aktivitätsminderung einher.

4.4.5 FGF-2-CAM-Assay als Modell der FGF-2 induzierten Angiogenese

Der entwickelte TUM-CAM-Assay ist in geringfügig modifizierter Form auch zur Testung der FGF-2 induzierten Angiogenese verwendbar. Damit kann z.B. der in einer *in vitro* Testung festgestellte Wirkmechanismus auf seine *in vivo* Relevanz überprüft werden.

Statt der U-87 MG Zellsuspension wurde FGF-2 (50 ng in PBS) als angiogener Stimulus eingesetzt (s. Abbildung 54). Nach 72 h Inkubation konnte innerhalb des Agaroseringe eine erhöhte Dichte netzartig ausgebildeter Kapillaren beobachtet werden (64% Stimulation). Die Behandlung mit PBS hingegen verursachte keine Veränderungen in Struktur und Dichte der Kapillaren. Im Gegensatz dazu resultierte der Zusatz von LäPS v S1 (50 μ g) zu FGF-2 in ausgedehnten kapillarfreien Bereichen innerhalb des Rings. LäPS v S1 inhibierte deutlich die durch FGF-2 getriggerte Angiogenese (50% Inhibition).

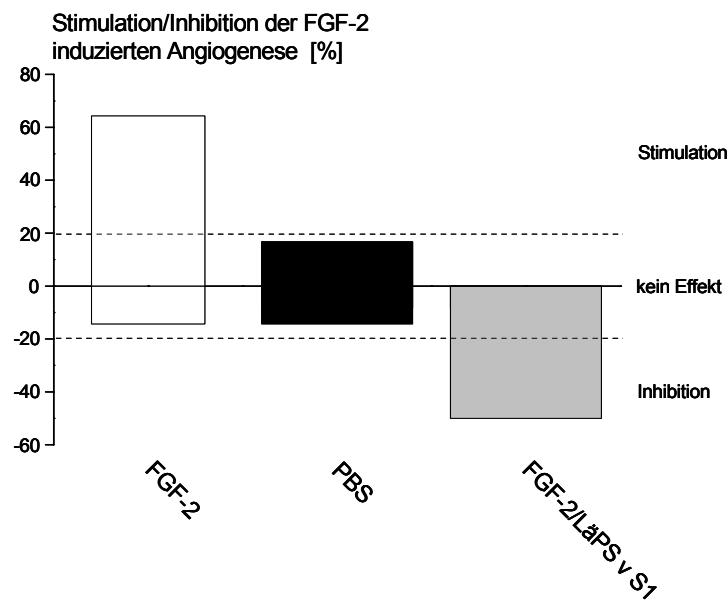


Abbildung 54: FGF-2 induzierte Angiogenese im modifizierten Ring-CAM-Assay. FGF-2 (50 ng in PBS) induzierte das Kapillarwachstums in der CAM (64% Stimulation). PBS war ohne Effekt. Das β -1,3-D-Galactan LäPS v S1 führte zu einer deutlichen Hemmung der FGF-2 getriggerten Angiogenese. (Positive/negative Effekte bis zu 20% wurden als natürliche Schwankungsbreite beurteilt)

4.5 Vergleich der *in vivo* Assays

4.5.1 Screening

Um die Resultate der *in vivo* Assays vergleichen zu können, wurden die Testsubstanzen verschiedenen Aktivitätskategorien zugeordnet. Die Einteilung erfolgte nach den in Tabelle 18 angegebenen Kriterien:

Tabelle 18: Aktivitätskriterien der *in vivo* Assays

<i>In vivo</i> Assay	- (keine Aktivität)	\pm (mittlere Aktivität)	+(gute Aktivität)
CAM	Score 0–0,4	Score 0,5–0,8	Score $\geq 0,9$
HET-CAM	Inhibition [%] 0–40	Inhibition [%] 41–70	Inhibition [%] 71–100
TUM-CAM	Inhibition [%] 0–40	Inhibition [%] 41–70	Inhibition [%] 71–100

In Tabelle 20 sind alle getesteten Substanzen entsprechend ihrer Aktivität in den *in vivo* Assays angeführt. Angegeben ist der prozentuale Anteil der Testsubstanzen (TS) mit *in vivo* Effekt zur Gesamtzahl der Testsubstanzen (1. bzw. einzige Prozentangabe) bzw. zur Zahl der Testsubstanzen mit bestimmter Aktivität im CAM- bzw. CAM- und HET-CAM-Assay (2. Prozentangabe). Nicht in allen drei *in vivo* Assays getestete Substanzen werden bei dem(n) durchgeführten Assay(s) aufgeführt (z.B. LäPS S1: nur im CAM-Assay getestet).

Die folgende vereinfachte Darstellung (Tabelle 19) zeigt, dass die überwiegende Zahl der Testsubstanzen in allen drei Assays mittlere Aktivität besaß (Spalte 3). Der Anteil an Substanzen mit guter Aktivität nahm vom CAM- über den HET-CAM- zum TUM-CAM-Assay hin ab (Spalte 4).

Tabelle 19: Anteil der Testsubstanzen [%] mit fehlender (-), mittlerer (±) oder guter (+) Aktivität in den *in vivo* Assays

<i>In vivo</i> Assay	-	±	+
CAM	25,6%	41,9%	32,6%
HET-CAM	10,0%	67,5%	22,5%
TUM-CAM	33,3%	48,2%	18,5%

Wie Tabelle 20 verdeutlicht, zeigen Substanzen ohne Aktivität im CAM-Assay überwiegend eine mittlere Aktivität im HET-CAM-Assay (81,8% der im CAM-Assay inaktiven TS). Keine der im CAM-Assay inaktiven TS hat gute Aktivität im HET-CAM-Assay. Testsubstanzen mit mittlerer bzw. guter antiangiogener Wirkung haben mittlere (76,5% der TS mit mittlerer Aktivität im CAM-Assay bzw. 41,7% der TS mit guter Aktivität im CAM-Assay) bis gute entzündungshemmende Eigenschaften (17,6% der TS mit mittlerer Aktivität im CAM-Assay bzw. 50,0% der TS mit guter Aktivität im CAM-Assay). Substanzen mit gutem antiinflammatorischem Potential im HET-CAM-Assay besitzen mindestens eine mittlere antiangiogene Wirkung. Dieses Phänomen beruht auf der unspezifischen Angiogenesestimulation im HET-CAM-Assay durch das eingesetzte Natriumlaurylsulfat.

Dagegen wird die Angiogenese im TUM-CAM-Assay durch einen selektiveren Mechanismus ausgelöst (VEGF sezernierende U-87 MG Zellen). Dies zeigt sich im höheren Anteil an inaktiven Substanzen im TUM-CAM-Assay. Eine mittlere oder gute Aktivität im CAM-Assay korreliert nur bedingt mit der Aktivität im TUM-CAM-Assay. Nur wenige Testsubstanzen besitzen eine gute Wirkung im TUM-CAM-Assay (7,4% (mittlere Aktivität im CAM-Assay) bzw. 11,1% (gute Aktivität im CAM-Assay) aller TS). Selbst im CAM-Assay inaktive Verbindungen besitzen mittlere Aktivität. Allerdings zeigt keine dieser TS einen guten Effekt.

Tabelle 20: Einteilung der Testsubstanzen nach ihrer Aktivität in CAM-[112], HET-CAM- und TUM-CAM-Assay. ((%): Erläuterungen siehe Text)

CAM - (25,6%)									
HET-CAM - (5,0%/18,2%)			HET-CAM ± (22,5%/81,8%)			HET-CAM +			
D5 Agarose		D4 β-Galactan PGA		AG Laminarin					
TUM -	TUM ±	TUM +	TUM - κ-C	TUM ± LuPS S7 LuPS P1 SOS	TUM +	TUM -	TUM ±	TUM +	
				(3,7%/ 25%)	(11,1%/ 75%)				
CAM ± (41,9%)									
HET-CAM - (2,5%/5,9%)			HET-CAM ± (32,5%/76,5%)			HET-CAM + (7,5%/17,6%)			
D6 D7 Alginsäure		NCT-disulfat NCH-trisulfat							
TUM -	TUM ± Cell O-3	TUM +	TUM - θ-C Methyl- ι-C ι-C pH 3,2 Cell O-2	TUM ± LuPS S8 LuPS S9 LuPS P2 Agarose S3	TUM +	TUM - Cell 2-3	TUM ±	TUM + λ-C ι-C	
				(14,8%/ 50%)	(14,8%/ 50%)			(3,7%/ 33,3%)	(7,4%/ 66,7%)
CAM + (32,6%)									
HET-CAM - (2,5%/8,3%)			HET-CAM ± (12,5%/41,7%)			HET-CAM + (15,0%/50,0%)			
LuPS S5 AsaPS S1				LiPS IX					
TUM -	TUM ± LuPS S5 6DS	TUM +	TUM - Heparin LuPS F S1	TUM ± AG S1	TUM + LuPS S3 α-Gal ul S1	TUM - PPS	TUM ± α-Gal ls S1 LäPS v S1 Fucoidan (ves.)	TUM + LAM S5	
				(3,7%/ 40%)	(3,7%/ 20%)	(7,4%/ 40%)	(3,7%/ 20%)	(11,1%/ 60%)	(3,7%/ 20%)

Der Vergleich der Ergebnisse von HET-CAM- und TUM-CAM-Assay zeigt, dass Substanzen ohne antiinflammatorische Aktivität im TUM-CAM-Assay mittlere Effekte haben. Die im HET-CAM-Assay mittelaktiven Verbindungen haben überwiegend keine bis mittlere Aktivität im TUM-CAM-Assay. Stark antiinflammatorische Substanzen besitzen meist mittlere bis gute Aktivität im TUM-CAM-Assay. Substanzen mit guter Hemmwirkung auf die tumorzellinduzierte Angiogenese haben zusätzliche antiinflammatorische Effekte.

Das ***in vivo* Screening** potentieller Angiogeneseinhibitoren sollte also nach folgendem Schema durchgeführt werden:

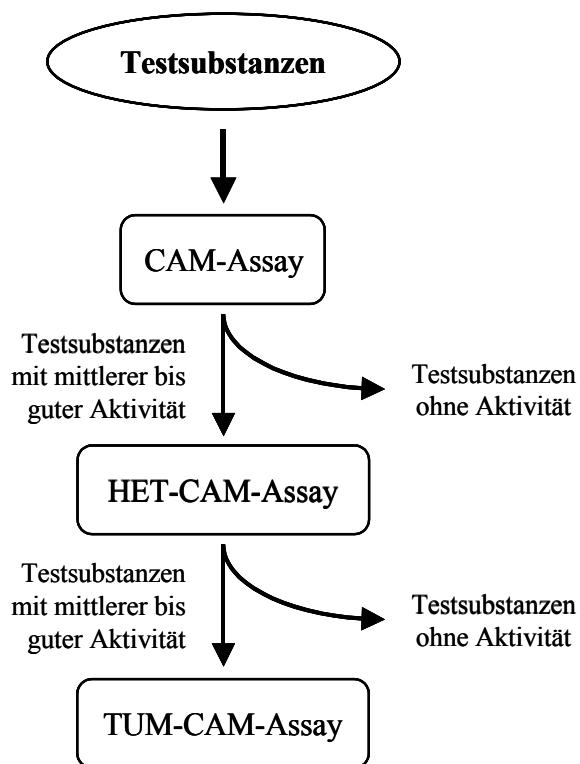


Abbildung 55: Screeningschema für potentielle Angiogeneseinhibitoren

Erfolgt die Testung potentieller Angiogeneseinhibitoren nach dem angegebenen Screeningschema, werden in dem mit geringem Zeitaufwand verbundenen CAM-Assay bereits TS ohne Effekt auf die unspezifische Angiogenese eliminiert (25,6% aller TS). Wie Tabelle 20 zeigt, werden dabei jedoch keine TS mit guter Aktivität im HET-CAM- oder TUM-CAM-Assay von der weiteren Untersuchung ausgeschlossen. Der sich anschließende HET-CAM-Assay in der Modifikation nach Marchesan und Paper ermöglicht die vergleichsweise rasche Beurteilung der antiinflammatorischen Aktivität der TS. Bei inaktiven Substanzen kann von einer nachfolgenden Testung im TUM-CAM-Assay abgesehen werden, da diese nur einen schwachen Effekt auf die tumorzellinduzierte Angiogenese haben (s. Tabelle 20). Die

verbleibende Gruppe der TS mit mittlerer bis guter antiinflammatorischer Aktivität schließt alle Verbindungen mit guter tumorantiangiogener Wirkung ein.

4.5.2 Struktur-Wirkungsbeziehungen

Die Aktivität der Testsubstanzen in den verschiedenen *in vivo* Assays ist an unterschiedliche strukturelle Voraussetzungen gebunden:

Die Untersuchungen von Galactansulfaten im **CAM-Assay** [112] hatten bereits gezeigt, dass die *in vivo* Aktivität mit dem Sulfatierungsgrad korreliert (LuPS-sulfate, Carrageenane). Eine bevorzugte Position der Sulfatgruppen ist nicht ableitbar. Jedoch ist die Verteilung der Sulfatgruppen im Polysaccharid entscheidend für die Wirkstärke (z.B. Position 2 der Cellulosederivate). Das lediglich in Position 4 der β -1,3-Galactose sulfatierte κ -Carrageenan ist inaktiv. Die antiangiogene Aktivität bleibt auch bei Ersatz von Sulfatgruppen durch Phosphat- und Nitratgruppen bestehen, nimmt aber bei Einführung von Fluoratomen deutlich ab. Bezogen auf das Kohlenhydratgrundgerüst sind insbesondere Verzweigungen und eine alternierende α -1,3/ β -1,4-Verknüpfung negative Einflussfaktoren. Mit lipophileren Derivaten ist im Einzelfall eine Wirkungsverbesserung zu erzielen [112].

Neben Galactanen und Cellulosederivaten sind auch Polymere aus anderen Monomerbausteinen (β -1,3-D-Glucose, L-Fucose, D-Xylose) sowie Heparin in Abhängigkeit von MW und Herkunft und unsulfatierte Uronsäure antiangiogen. Im Einzelfall können auch niedermolekulare Kohlenhydrate (Derivate von κ - und ι -Carrageenans) antiangiogene Aktivität besitzen.

Im Unterschied zum CAM-Assay ist im **HET-CAM-Assay** der Sulfatierungsgrad von untergeordneter Bedeutung. Vielmehr ist im Einzelfall die Stellung der Sulfatgruppen entscheidend. Desulfatierung in Position 6 eines β -1,4-D-Galactans führt zum Wirkverlust. Sulfatgruppen in Position 2 von Cellulose-Derivaten bzw. Position 4 der β -1,3-Galactose anhydrogalactosehaltiger Carrageenane sind mit einem ausgeprägten antiinflammatorischen Effekt verbunden.

In Abhängigkeit von der glykosidischen Verknüpfungsart zeigen α -1,4-, β -1,3- und α -1,3/ β -1,4-D-Galactane im Vergleich zu den LuPS-sulfaten zum Teil überlegene Aktivität. Eine Erhöhung des Verzweigungsgrads bzw. der Lipophile sowie die Reduzierung des MW führen im Falle einzelner Galactane zur Wirkungsabschwächung. Ohne Wirkverlust können dagegen Sulfat- durch Phosphatgruppen oder Fluoratome ersetzt werden. Die antiinflammatorische

Aktivität ist wie die antiangiogene Aktivität nicht an das Galactangrundgerüst gebunden (D-Glucose, L-Fucose und D-Xylose als Monomere möglich).

Die Aktivität im **TUM-CAM-Assay** ist z.T. vom Sulfatierungsgrad und von der Art der glykosidischen Bindung abhängig (α -1,4-, β -1,4- und α -1,3/ β -1,4-D-Galactane). Von entscheidender Bedeutung für die *in vivo* Aktivität kann im Einzelfall die Stellung der Sulfatgruppen sein. Wie schon die antiinflammatorische Aktivität ist auch die tumorantiangiogene Aktivität anhydrogalactosesulfathaltiger Carrageenane an Sulfatgruppen in Position 4 der β -1,3-Galactose gebunden. Für die LuPS-sulfate ist die Sulfatierung in Position 6, für Cellulosederivate die Monosulfatierung in Position 3 für eine *in vivo* Wirkung zwingend. Die Erhöhung des Seitenkettenanteils hat keinen Einfluss auf die tumorantiangiogene Aktivität. Dagegen ist ein Anstieg der Lipophilie bzw. eine Abnahme des MW im Einzelfall mit einem völligen Wirkverlust verbunden. Im Unterschied zum HET-CAM-Assay geht im TUM-CAM-Assay die Einführung von Fluoratomen oder Phosphatgruppen als Ersatz von Sulfatgruppen mit einem Wirkverlust bzw. einer Wirkminderung einher. Nicht nur Galactane, auch Polymere mit L-Fucose- und D-Glucose-, nicht aber D-Xylose-Monomeren zeigen *in vivo* einen Effekt.

In Tabelle 21 sind die im jeweiligen *in vivo* Assay aktivsten Verbindungen angegeben.

Tabelle 21: Testsubstanzen mit höchster Aktivität in den *in vivo* Assays

CAM-Assay Score $\geq 0,9$	HET-CAM-Assay Inhibition 71%–100%	TUM-CAM-Assay Inhibition 71%–100%
- Heparin	- Carrageenane (λ -, ι -Carrageenan)	- Carrageenane (λ -, ι -Carrageenan)
- β -1,4-D-Galactane (LuPS S3, LuPS S5, LuPS S5 6DS, LuPS F S1)		- β -1,4-D-Galactane (LuPS S3)
- α -1,4-D-Galactane (α -Galactan ls S1/ul S1)	- α -1,4-D-Galactane (α -Galactan ls S1)	- α -1,4-D-Galactane (α -Galactan ul S1)
- β -1,3-D-Galactane (AsaPS S1, AG S1, LäPS v S1)	- β -1,3-D-Galactane (LäPS v S1)	
- Glucane (LAM S5, LiPS IX)	- Glucane (Cell 2-3, LAM S5, LiPS IX)	- Glucane (LAM S5)
- Fucoidan	- Fucoidan	
- PPS	- PPS	

Die Ergebnisse der verschiedenen *in vivo* Assays zeigen, dass die Angiogenese unter physiologischen Bedingungen anderen Wirkmechanismen unterworfen ist als die pathologische Angiogenese in chronischer Entzündung und Tumorwachstum.

Da meist nur innerhalb einer streng definierten Klasse der sulfatierten Kohlenhydrate ein Zusammenhang zwischen antiangiogener Wirkung und strukturellen Parametern besteht, sollte die Aktivität jedes potentiellen Angiogeneseinhibitors in den diversen *in vivo* Assays nach dem angegebenen Screeningschema bestimmt werden.

5 In vitro Testung

5.1 In vitro Angiogenese-Testmodelle

Zur Suche nach spezifischen Wirkmechanismen von Angiogeneseinhibitoren (z.B. EC-Mitogen, Inhibition der Zytokinsekretion, Reduktion der Zellmotilität) werden diese in verschiedenen *in vitro* Testsystemen untersucht [129,204,205]. Deren Aussagekraft ist jedoch häufig limitiert, da sie niemals die Gesamtheit der komplexen redundanten Prozesse während der Neovaskularisation wiederspiegeln können. Oftmals werden endotheliale Zellkultursysteme eingesetzt. Damit können verschiedene spezifische Schritte der angiogenen Kaskade simuliert werden (s. Tabelle 22). Am weitesten verbreitet sind Tests zur Bestimmung der Migration (Boydenkammer oder Variationen) und Proliferation von EC (Zellzahlbestimmung, Thymidineinbau, Bestimmung der Zellproliferation mit PCNA (proliferating cell nuclear antigen)-Antikörpern) [129]. Als problematisch anzusehen sind die Herkunft der EC und die Anzahl der Zellpassagen, da die Reaktion von EC unterschiedlichen Ursprungs auf GF und Inhibitoren variiert und während langer Zellkulturzeiten zahlreiche Veränderungen z.B. in der Aktivität, der Expression von Zelloberflächenantigenen und im Wachstum der EC eintreten können. Zudem sind geringfügige pH- oder Osmolaritätsänderungen durch Testsubstanzen bereits zytotoxisch für die EC. Diese Effekte werden für die falsch positiven antiangiogenen Eigenschaften von untersuchten Verbindungen verantwortlich gemacht. Darüberhinaus sind viele zytotoxische Substanzen und GF nicht spezifisch für EC und haben vermutlich keine selektiven *in vivo* Effekte [204].

Eine Verbesserung in der Annäherung der Endothelzellkultur an die realen Bedingungen stellt die Verwendung sog. Cokulturen aus EC und SMC dar [206].

Auch die verschiedenen Organkulturen, in denen in ein Fibrillengel eingebettete Segmente adulter (Rattenaorta-Ringassay [91,207], humane Plazentablutgefäß [85,208]) oder embryonaler Blutgefäß (Aortenbogenassay des Huhns [209]) als dreidimensionale *in vitro* Systeme verwendet werden, spiegeln den Phänotyp der in den angiogenen Prozess verwickelten EC deutlicher wieder. Die Verwendung explantierter Embryonen von Affen oder Säugetieren ist prinzipiell möglich. Allerdings ist deren Einsatz zur Beurteilung der Angiogenese durch die geringe Überlebensdauer der Embryonen stark limitiert. Im allgemeinen werden sie deshalb zur Untersuchung kurzzeitiger Effekte durch Substanzen oder transgene Expression insbesondere auf die Vaskulogenese und Organbildung eingesetzt [204,210]. Gebräuchlicher ist dagegen die Untersuchung angiogener Effekte in der CAM explantierter Hühnerembryonen [205].

Tabelle 22: *in vitro* Assays zur Quantifizierung der Angiogenese [204]**Endothelzellkultur**Assay

- Metalloproteinaseassay
- Zellproliferationsassay
- Phagokinetik, *In vitro* Wundheilungsassay
- transmembranärer Assay
- Lumenbildungsassay (Collagen, Matrigel) [212]

Mechanismus

- Auflösung der ECM [211]
- Proliferation der EC
- Motilität der EC
- Chemotaxis, Migration
- Differenzierung von Gefäßen

Organkultur

- Aorta-Ringassay [85,91,207,208]
- Aortenbogen-Assay (Huhn) [209]

EmbryokulturEingesetzte Spezies

- Embryonen von Affen und Säugetieren [204,210]
- Hühnerembryonen [205]

Untersuchungsparameter

- Vaskulogenese, Organbildung
- Effekte in der CAM

5.2 Interaktion mit Wachstumsfaktoren (FGF-2, VEGF) und IL-2

Neben den bisher angeführten *in vitro* Assays kann sowohl in zellulären [213,214] als auch in zellfreien Systemen die spezifische Bindung zwischen Wachstumsfaktoren und Zytokinen mit Glykosaminoglykanen untersucht werden. Die Wechselwirkung des Proteins mit löslichen, in der ECM oder an der Zelloberfläche gebundenen HSPGs kann unterschiedliche biologische Konsequenzen haben [3,153]:

- Regulation der Bioverfügbarkeit
- Stabilisierung und Schutz vor proteolytischem Abbau
- Modulation der Interaktion mit spezifischen Signalrezeptoren
- Kontrolle der intrazellulären Wirkung
- möglicherweise direkte Interaktion mit Wachstumsfaktorrezeptoren

Durch Zusatz exogener GAG Analoga als FGF-2-Agonisten und/oder -Antagonisten, welche die physiologische Interaktion zwischen Wachstumsfaktor und Heparin oder Heparansulfaten beeinflussen können, findet möglicherweise eine Modulation der Angiogenese statt.

Zur Untersuchung nichtkovalerter Komplexe von Makromolekülen können zahlreiche biophysikalische Techniken eingesetzt werden [215]. Spektroskopische Methoden

(Fluoreszenz, Lichtstreuung, Zirkulardichroismus [216], UV, IR) zeigen Änderungen in der dreidimensionalen Struktur an. NMR (nuclear magnetic resonance spectroscopy) und Röntgenkristallstrukturanalyse liefern die atomaren Strukturen von Biomolekülen und Komplexen in flüssiger bzw. fester Phase. Beide Methoden erfordern hohe Substanzmengen (im Milligrammbereich) und sind zeitaufwendig.

Mit ESI-MS (electrospray ionization mass spectrometry) steht eine sensitive und schnelle Analysenmethode, die nur geringe Probenmengen erfordert, auch zur Untersuchung von Komplexen polysulfatierter Kohlenhydrate (u.a. Saccharoseoctasulfat, sulfatierte Cyclodextrine) mit basischen Proteinen zur Verfügung [217].

Neben ITC (isothermal titration calorimetry), DSC (differential scanning calorimetry) und moderner analytischer Ultrazentrifugation können verschiedene chromatographische (GPC, Gelpermeationschromatographie) und elektrophoretische Verfahren (Trypsin-Verdau-Assay [218] und Affinitätscoelektrophorese [219]) eingesetzt werden [215]. Auch mittels ELISA-Technik kann die Interaktion zwischen Zytokinen und Glykosaminoglykanen untersucht werden. Dazu wird die Proteinlösung einer mit Kohlenhydrat beschichteten Mikrotiterplatte zugesetzt und die Menge an gebundenem Protein nach Zusatz geeigneter Antikörper enzymatisch bestimmt [220].

Durch Filtration über eine positiv geladene Membran kann die Bindung eines GF an ein negativ geladenes Proteoglykan analysiert werden (CAFAS, cationic filtration assay). Nur der an das Proteoglykan gebundene GF wird auf der Filtermembran zurückgehalten [221].

Eine relativ neue und kostenintensive Methode zur Bestimmung von Bindungskonstanten beruht auf einem quantenmechanischen Phänomen, der SPR (surface plasmon resonance). Die Interaktion von Makromolekülen mit dem an eine Dextranschicht auf einem Gold-Sensor-Chip gebundenen Liganden wird durch eine Änderung des Brechungsindex detektiert [222].

Zur Untersuchung von Interaktionen zwischen Biomolekülen kann auch die Schwingquarzmikrowaage eingesetzt werden, die, ähnlich wie die SPR, die Analyse der Anlagerung eines Analyten an einen immobilisierten Liganden und die Berechnung von Assoziations- und Dissoziationskonstanten ermöglicht. Im Unterschied zur SPR wird die auftretende Massenänderung, die auf der Bindung des Reaktionspartners an den auf den Goldelektroden des Schwingquarz-Sensors immobilisierten Liganden beruht, als Änderung der Resonanzfrequenz gemessen [223]. Bei beiden Methoden kann durch die Immobilisierung jedoch eine sterische Hinderung oder eine Modifizierung des gebundenen Moleküls eintreten.

5.2.1 Interaktion mit FGF-2

Die Interaktionen von Glykosaminoglykanen mit FGF-2 waren Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Voraussetzung für die Bindung des GF an Heparin und Heparansulfate ist eine optimale dreidimensionale Struktur des FGF-2 Moleküls. Mittels Röntgenkristallstrukturanalyse konnte eine Gruppe positiv geladener Aminosäuren, die in der 3D-Struktur eine basische Tasche bilden, als mögliche Heparinbindungsstelle identifiziert werden (Lys35, Arg53, Lys128, Arg129, Lys134, Lys138, Lys144, bezogen auf FGF-2 mit 155 Aminosäuren) [224,225]. Neben ionischen Interaktionen spielen auch Wechselwirkungen mit ungeladenen Aminosäuren (Wasserstoffbrücken, van der Waals Kräfte) eine Rolle [226,227]. Die Interaktion zwischen FGF-2 und HSPGs der Zelloberfläche kann durch von Heparin abgeleitete Penta- oder Hexa- bis Octasaccharide inhibiert werden [228,229]. Dagegen ist für eine Erhöhung der Affinität von FGF-2 an seinen Rezeptor mindestens ein Deca- bzw. Dodecasaccharid erforderlich [229,230]. Von Bedeutung für die Wechselwirkung von Heparin oder Heparansulfaten mit FGF-2 sind insbesondere 2-O- und N-Sulfatgruppen, die Interaktion mit dem FGFR erfordert zusätzliche 6-O-Sulfatgruppen [153,231]. Auch negativ geladene Carboxylgruppen von Iduronsäureresten, die durch andere funktionelle Gruppen mit negativer Ladung (z.B. Amidomethylsulfonatreste) ersetzt werden können, tragen zur Interaktion mit FGF-2 bei [232]. Für FGF-2 wird, wie schon für FGF-1 gezeigt [97], eine heparinabhängige Oligomerisierung und nachfolgende Rezeptordimerisierung und -aktivierung diskutiert (s. Abbildung 12).

5.2.1.1 Gelpermeationschromatographie

Mittels Gelpermeationschromatographie (= Größenausschlusschromatographie) kann die Interaktion von Proteinen mit Kohlenhydraten untersucht werden. Die nach Inkubation von Protein und Kohlenhydrat gebildeten stabilen Komplexe können aufgrund ihres erhöhten Molekulargewichts vom freien Protein getrennt werden.

In eigenen Arbeiten wurde die Interaktion von FGF-2 mit Heparinen unterschiedlichen Molekulargewichts und Saccharoseoctasulfat untersucht. Abbildung 56 zeigt die Chromatogramme von FGF-2 bzw. der Mischungen aus FGF-2 mit steigenden Mengen (A-E) an Heparin (unfraktioniert, bovine Darmmukosa). Die reine Proteinlösung wurde nach ca. 28 min als einzelner Peak eluiert (FGF-2). Der Zusatz von Heparin führte zunächst zu einer Reduzierung des Peaks von freiem FGF-2 (FGF-2/A, FGF-2/B). Bei weiterer Erhöhung der Heparinkonzentration trat nach ca. 20–22 min der zusätzliche Peak des gebildeten FGF-2-

Heparin-Komplexes auf (FGF-2/C), der bei den Mischungen FGF-2/A und FGF-2/B noch unterhalb der Nachweigrenze lag. Ab einer gewissen Heparinmenge war nur noch der einem höheren Molekulargewicht entsprechende Peak (FGF-2/D, FGF-2/E) detektierbar. Heparin allein zeigte bei der verwendeten Wellenlänge keine Absorption.

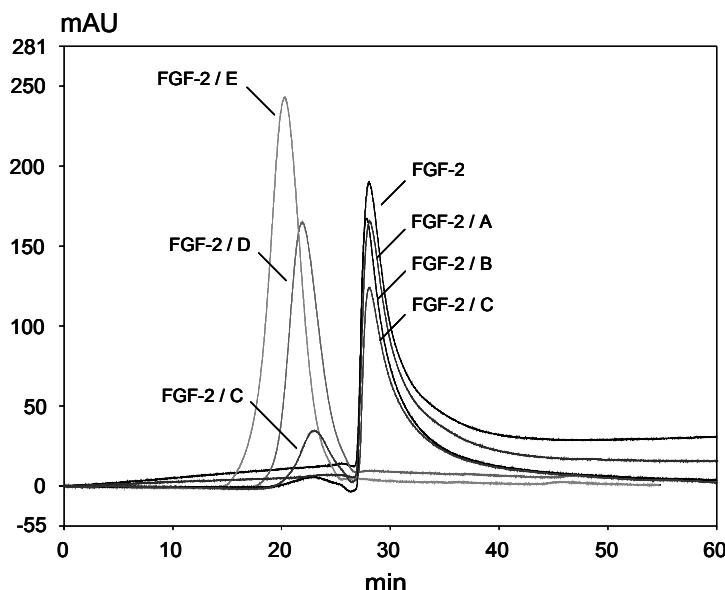


Abbildung 56: GPC-Chromatogramme von Mischungen aus FGF-2 und Heparin (unfraktioniert, bovine Darmmukosa). Alle Proben enthalten 2,04 nmol FGF-2 mit variablen Heparinmengen. Das Verhältnis FGF-2:Heparin [mol/mol] ist 64,8:1 (A), 32,4:1 (B), 13,0:1 (C), 3,2:1 (D) und 1,6:1 (E).

Stationäre Phase: Ultro Pac TSK-G4000 SW, Fa. LKB, Schweden

Fließmittel: Phosphatpuffer pH 7,5

Detektion: UV-Absorption bei 206 nm

Untersuchungen von Arakawa et al. zur Stöchiometrie der Bindung von Heparin an FGF-2 mittels Größenausschlusschromatographie und direkter Detektion durch Lichtbrechung, Absorption und Brechungsindex hatten gezeigt, dass durchschnittlich 6,3 FGF-2 Moleküle pro Molekül hochmolekularem Heparin (MW = 15 kDa) gebunden sind. In entsprechend durchgeföhrten Untersuchungen mit niedermolekularem Heparin (MW \approx 5 kDa) lagen im Komplex etwa 2,5 Moleküle FGF-2 je Molekül Heparin vor. Bei einem Proteinüberschuss bildeten sich Komplexe unterschiedlicher Stöchiometrie aus [233].

Die folgenden Abbildungen zeigen das chromatographische Profil der Komplexe aus FGF-2 und niedermolekularem Heparin (Heparin LMW, bovine Darmmukosa) bzw. Saccharoseoctasulfat im Vergleich zu ungebundenem FGF-2.

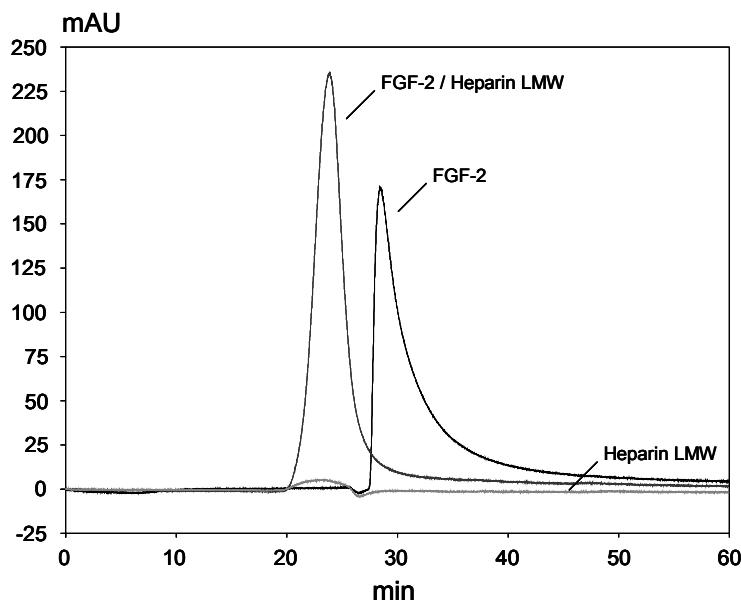


Abbildung 57: GPC-Chromatogramm einer Mischung aus FGF-2 (2,04 nmol) und Heparin LMW (22,7 µg). Zum Vergleich sind die Chromatogramme von FGF-2 und Heparin LMW angegeben.

Stationäre Phase: Ultro Pac TSK-G4000 SW, Fa. LKB, Schweden

Fließmittel: Phosphatpuffer pH 7,5

Detektion: UV-Absorption bei 206 nm

Wie schon bei der Interaktion von Heparin mit FGF-2 trat bei Zusatz des sulfatierten Polymers (s. Abbildung 57) bzw. des Disaccharids (s. Abbildung 58) eine Verschiebung des Peaks zu einem höheren Molekulargewicht auf. Der FGF-2-Heparin LMW-Komplex wurde nach ca. 24 min, der FGF-2-Saccharoseoctasulfat-Komplex nach ca. 26 min eluiert. Die Kohlenhydrate selbst zeigten keine Absorption.

Diese Methode ist nur einsetzbar bei großen Molekulargewichtsunterschieden zwischen dem Protein in freier und gebundener Form und einer geringen Dissoziationskonstanten des Komplexes. Darüber hinaus ist eine relativ hohe Proteinmenge (µg-Bereich) erforderlich, auch wenn durch die Detektion bei der spezifischeren Wellenlänge von 206 nm statt bei 280 nm die eingesetzte Proteinkonzentration reduziert werden konnte. Eine weitere Limitation besteht in einer möglicherweise auftretenden Trübung der Analysenlösung durch schwerlösliche Protein-Kohlenhydrat-Komplexe.

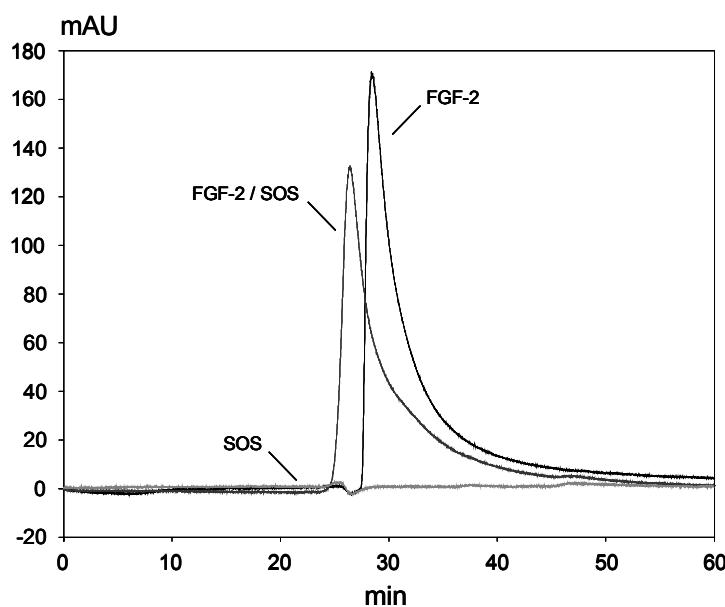


Abbildung 58: GPC-Chromatogramm einer Mischung aus FGF-2 (2,04 nmol) und Saccharoseoctasulfat (SOS, 22,7 µg). Zum Vergleich sind die Chromatogramme von FGF-2 und Saccharoseoctasulfat angegeben.

Stationäre Phase: Ultro Pac TSK-G4000 SW, Fa. LKB, Schweden

Fließmittel: Phosphatpuffer pH 7,5

Detektion: UV-Absorption bei 206 nm

5.2.1.2 Fluoreszenzuntersuchungen

Um Interaktionen zwischen Kohlenhydratliganden und bindenden Proteinen zu untersuchen, steht mit der Fluoreszenzspektroskopie eine aussagekräftige Methode zur Verfügung. Sie ermöglicht die Bestimmung von Bindungskonstanten, ohne das Gleichgewicht durch die häufig erforderliche physikalische Abtrennung eines der Bindungspartner zu stören. Die Proteinfluoreszenz wird durch die aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan verursacht. Da diese sich aber in ihren Absorptionsspektren unterscheiden, kann durch geeignete Wahl der Anregungswellenlänge ($\lambda_{\text{Exc}}(\text{Tyrosin}) = 280 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{Exc}}(\text{Tryptophan}) = 290 \text{ nm}$) selektiv die Tryptophanfluoreszenz bestimmt werden. Nahezu alle kohlenhydratbindenden Proteine enthalten Tryptophanreste, deren Fluoreszenz jedoch in Abhängigkeit von Position und Mikroumgebung, die durch spezielle physiko-chemische Bedingungen (Polarisierbarkeit, Mikroviskosität, Vorhandensein geladener Gruppen, mögliche spezifische Interaktionen) charakterisiert ist, variiert. Die Proteinfluoreszenz ist demnach die Summe der Fluoreszenzbeiträge einzelner Tryptophanreste [234].

FGF-2 enthält lediglich einen Tryptophanrest, der nach Röntgenkristallstrukturanalyse nahe einer Gruppe basischer Aminosäurereste liegt, die an der Interaktion mit Heparin und Rezeptor beteiligt sind [224]. Eine Änderung der Mikroumgebung des Tryptophanrestes, z.B. durch Bindung eines Liganden in der basischen Region, kann dessen Fluoreszenzeigenschaften beeinflussen (z.B. Änderung der Fluoreszenzintensität, des Spektrums oder der Wellenlänge im Intensitätsmaximum (λ_{\max})) [235]. Wie für FGF-1 konnte auch für FGF-2 eine Minderung der Fluoreszenzemission nach Heparinzusatz gezeigt werden [236,237].

5.2.1.2.1 Durchführung der Fluoreszenzuntersuchungen

In Analogie zu Fluoreszenztitrationsmessungen von Li und Seddon [237] wurden einer FGF-2-Lösung in Tris-HCl-Puffer verschiedene sulfatierte bzw. unsulfatierte Polysaccharide und Oligosaccharidsulfate in steigender Konzentration zugesetzt und nach Anregung bei 290 nm die Fluoreszenzemission des Proteins bei 340 nm ermittelt.

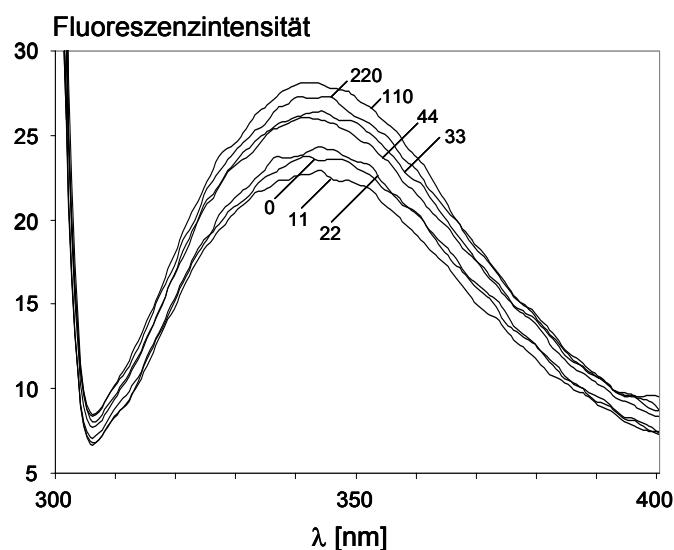


Abbildung 59: Fluoreszenzspektren von FGF-2 (450 nM) nach Zusatz von Heparin. Die Anregungswellenlänge war 290 nm, bei 340 nm trat eine maximale Fluoreszenzintensität auf. Die Konzentration von Heparin [nM] ist nahe dem jeweiligen Spektrum angegeben.

Abbildung 59 zeigt eine Reihe von Fluoreszenzspektren von FGF-2 nach Heparinzusatz (0–220 nM). Nach der ersten Substanzzugabe nahm die Tryptophanfluoreszenzintensität vorübergehend ab, um bis zu einer maximalen Fluoreszenzintensität bei einer Heparinkonzentration von 110 nM anzusteigen. Die initiale Fluoreszenzintensität nahm um ca.

17% zu. Li und Seddon hingegen beobachteten eine Abnahme der Fluoreszenzintensität bei steigender Heparinkonzentration [237]. Worauf die unterschiedlichen Effekte zurückzuführen sind, ist unklar. Möglicherweise lagen die verwendeten Proteine in verschiedenen Ausgangskonformationen vor oder aber die verwendeten Heparine unterschiedlicher Herkunft (bovine Darmmukosa bzw. Schweinedarmmukosa [237]) führten zu einer positiven bzw. negativen Änderung der Mikroumgebung des Tryptophanrestes. Es wurde jedoch eindeutig eine Änderung der Tryptophanfluoreszenz durch das zugesetzte Glucosaminoglykan festgestellt (s. Abbildung 59).

Analog wurden Titrationsmessungen mit dem oligomeren Saccharoseoctasulfat durchgeführt. Im Konzentrationsbereich von 410–8200 nM Disaccharid nahm die Fluoreszenzintensität von FGF-2 stetig zu (s. Abbildung 60). Die terminale Fluoreszenzintensität lag etwa 22% über der anfänglichen Fluoreszenzintensität.

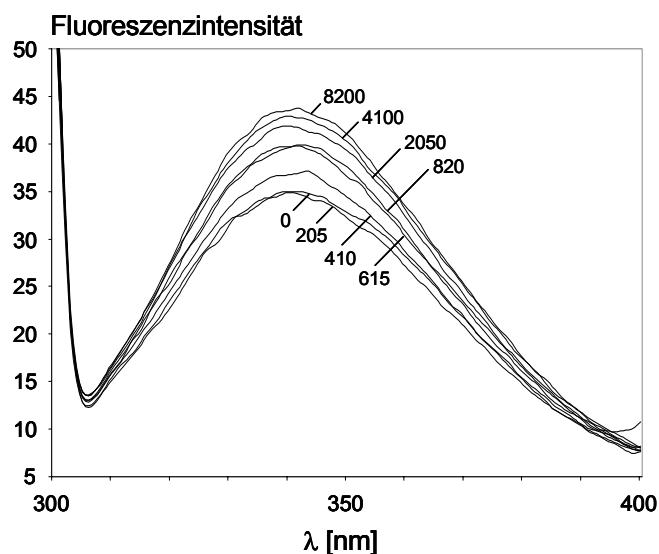


Abbildung 60: Fluoreszenzspektren von FGF-2 (450 nM) nach Zusatz von Saccharoseoctasulfat. Die Anregungswellenlänge war 290 nm, bei 340 nm trat eine maximale Fluoreszenzintensität auf. Die Konzentration von Saccharoseoctasulfat [nM] ist nahe dem jeweiligen Spektrum angegeben.

In Untersuchungen mit dem α -1,3/ β -1,4-D-Galactansulfat λ -Carrageenan wurde eine Fluoreszenzminderung (ca. 12% der initialen Fluoreszenzintensität) in Abhängigkeit von der Konzentration des Polysaccharids (0,57–11,4 nM) festgestellt (s. Abbildung 61).

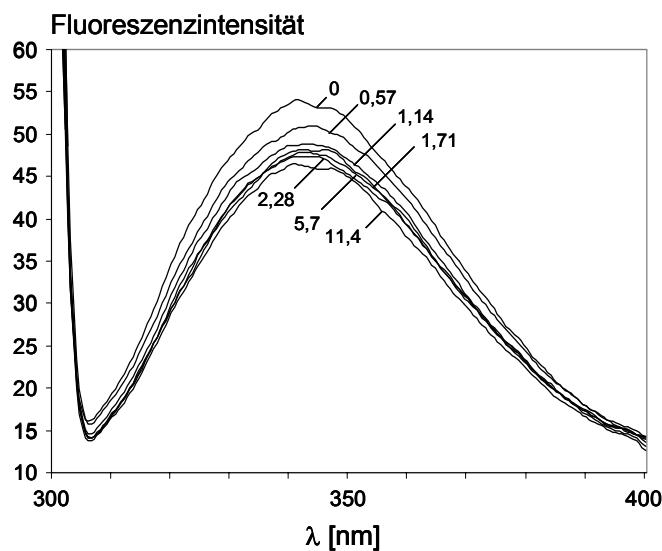


Abbildung 61: Fluoreszenzspektren von FGF-2 (450 nM) nach Zusatz von λ -Carrageenan. Die Anregungswellenlänge war 290 nm, bei 340 nm trat eine maximale Fluoreszenzintensität auf. Die Konzentration von λ -Carrageenan [nM] ist nahe dem jeweiligen Spektrum angegeben.

In Abbildung 62 ist die Abnahme der Fluoreszenzintensität von FGF-2 bei 340 nm nach Anregung bei 290 nm gegen die Konzentration von λ -Carrageenan [nM] aufgetragen. Unter der Voraussetzung, dass ein Molekül λ -Carrageenan ein Molekül FGF-2 bindet, kann die Änderung der Fluoreszenzemission nach folgender Gleichung beschrieben werden [238]:

$$1 \quad F_O = F_I + \frac{\Delta F((P)_t + K_D + [L]_t) - (([P]_t + K_D + [L]_t)^2 - 4[P]_t[L]_t)^{0,5}}{2[P]_t}$$

F_O , beobachtete Fluoreszenzintensität; F_I , initiale Fluoreszenzintensität; ΔF , Differenz zwischen initialer und terminaler Fluoreszenzintensität; K_D , Gleichgewichtsdissoziationskonstante; $[P]_t$, totale Konzentration des Proteins (FGF-2); $[L]_t$, totale Konzentration des Liganden (Kohlenhydrat)

Ist die totale Proteinkonzentration $[P]_t$ im Vergleich zur Dissoziationskonstanten K_D viel größer, kann Gleichung 1 zu Gleichung 2 vereinfacht werden [237]:

$$2 \quad F_O = F_I + \frac{\Delta F[L]_t}{[P]_t}$$

Bei niedrigen Ligandkonzentrationen besteht ein linearer Zusammenhang zwischen beobachteter Fluoreszenzintensität und Ligandkonzentration. Nähert sich die Fluoreszenzintensität dem Sättigungsgrenzwert an ($\Delta F = F_0 - F_I = \text{konstant}$), so entspricht die totale Ligandkonzentration $[L]_t$ der totalen Proteinkonzentration $[P]_t$.

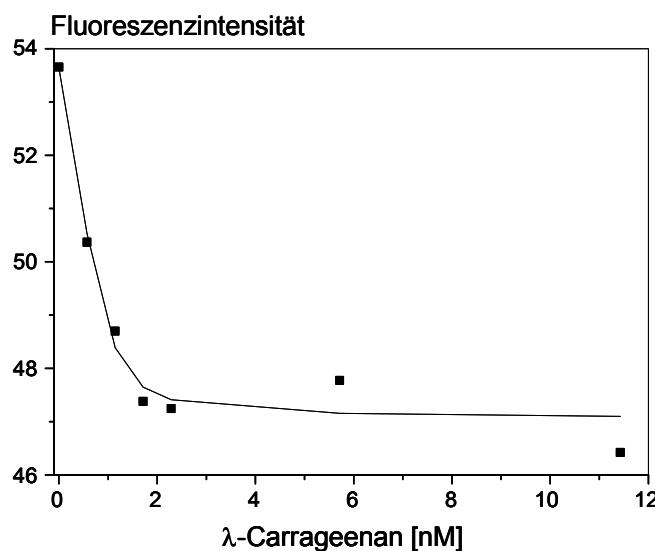


Abbildung 62: Fluoreszenztitration von FGF-2 (450 nM) mit λ -Carrageenan.

Anregungswellenlänge: 290 nm

Emissionswellenlänge: 340 nm

Die totale Proteinkonzentration $[P]_t$ entspricht mit $\approx 5 \text{ nM}$ (s. Abbildung 62) nur etwa 1,1% der gesamten Proteinmenge (450 nM). Dies bedeutet, dass die zur Sättigung von FGF-2 erforderliche Ligandkonzentration ca. 1,1% der Proteinkonzentration beträgt. Daraus kann der Schluss gezogen werden, dass ca. 90 (n) FGF-2 Moleküle an ein Molekül λ -Carrageenan binden können. Die Gültigkeit von Gleichung 1 bleibt bestehen, wenn der Faktor n berücksichtigt wird ($n[L]_t, nK_D$) [237]. Jedoch darf bei der Beurteilung der Stöchiometrie des FGF-2-Kohlenhydrat-Komplexes nicht außer Acht gelassen werden, dass λ -Carrageenan eine heterogene Struktur aufweist, im FGF-2 Molekül sowohl hoch- als auch niedrigaffine Bindungsstellen vorliegen und möglicherweise durch die Bindung an das Polysaccharid Proteinaggregate gebildet werden [237]. Im Folgenden wurde der Faktor n vernachlässigt und vereinfachend eine 1:1-Stöchiometrie zwischen FGF-2 und Kohlenhydrat angenommen.

Um die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D zu bestimmen, wurden die Titrationskurven einer nichtlinearen Regression nach Gleichung 1 unterworfen. Die getesteten Substanzen wurden, den ermittelten K_D -Werten entsprechend, in drei Kategorien (Fluoreszenz -: keine Affinität zu FGF-2; Fluoreszenz \pm : mittlere Affinität zu FGF-2 ($K_D > 1 \text{ nM}$); Fluoreszenz +: hohe Affinität zu FGF-2 ($K_D < 1 \text{ nM}$)) eingeteilt (s. Kapitel 5.2.1.2.2).

5.2.1.2.2 Ergebnisse der Fluoreszenzuntersuchungen

Die für Heparin (unfraktioniert, bovine Darmmukosa) ermittelte Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D lag unter 1 nM und steht damit für eine starke Bindung des Glucosaminoglykans an FGF-2. Dies stimmt mit Fluoreszenzuntersuchungen von Li und Seddon überein. Sie bestimmten einen K_D -Wert von $\approx 1\text{nM}$ für die Interaktion von Heparin aus Schweinedarmmukosa mit FGF-2, wobei kein Unterschied zwischen in *E. coli* exprimiertem und kommerziell erhältlichem rekombinantem humanem FGF-2 auftrat [237]. Auch die Untersuchungen von Heparinen unterschiedlichen Molekulargewichts mit FGF-2 mittels Affinitätscoelektrophorese lieferten ähnliche K_D -Werte [219]. In Bindungsstudien mit ^{125}I -FGF-2 und BHK (baby hamster kidney)-Zellen konnte gezeigt werden, dass sowohl zelluläre Bindungsstellen mit hoher ($K_D = 20\text{ pM}$) als auch mit niedriger Affinität ($K_D = 2\text{ nM}$) existieren, wobei letztere vermutlich für die Bindung des Wachstumsfaktors an zellgebundenes Heparin oder verwandte Strukturen stehen [239]. Übereinstimmende Resultate ergab auch die Analyse der Bindung von FGF-2 an zelluläre oder isolierte Rezeptoren und Heparansulfatproteoglykane muriner Balb/c3T3 Zellen [240].

Auch die K_D -Werte der anderen getesteten Substanzen lagen im nanomolaren Bereich (s. Tabelle 23). Lediglich ca. 21% der Testsubstanzen zeigten keine Interaktion mit FGF-2 (d.h. Fluoreszenz –).

Für die Affinität zu FGF-2 war das zugrundeliegende Kohlenhydratgerüst nicht entscheidend. Neben Heparin waren sowohl α -1,3/ β -1,4-D-Galactansulfate (Carrageenane) als auch vergleichsweise niedermolekulare sulfatierte Galactane (β -1,4-, α -1,4- und β -1,3-D-Galactane) aktiv. Jedoch konnte das Galactangrundgerüst ohne Affinitätsverlust durch u.a. glucose- oder fucosehaltige Polymere ersetzt werden (Cellulose 2-3, Laminarin, LiPS IX, Fucoidan (ves.), Agarose, Agarose S3, Alginsäure).

Ebensowenig konnte ein allgemeiner Zusammenhang zwischen Sulfatierungsgrad und Bindungsstärke festgestellt werden. Es lagen sowohl unsulfatierte Verbindungen (β -Galactan, PGA, AG, Laminarin, Agarose, Alginsäure) mit Affinität zu FGF-2 vor als auch verschiedene hochsulfatierte Polysaccharide, wie z.B. das Glucan LAM S5 und das Polyxytan PPS, die keine Interaktion mit dem Wachstumsfaktor zeigten. Sowohl für PPS [102] als auch für LAM S5 [241] wurden jedoch FGF-2 antagonistische Eigenschaften beschrieben. Möglicherweise kann diese Diskrepanz durch die Bindung der Polymere an FGF-2 außerhalb der sog. Heparinbindungsstelle erklärt werden. Die Wechselwirkung unsulfatierter Polymere mit FGF-2 kann wie bei neutralen heparin- und heparansulfatähnlichen Oligosacchariden [109,226] bzw. Carboxymethylextranbenzylamid [216] auf dem Kohlenhydratgrundgerüst durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken und Van der Waals Kräften beruhen. Nichtionische Interaktionen tragen entscheidend zur Bindungsreaktion bei [227]. Da hochsulfatierte

Kohlenhydratsequenzen in Heparansulfaten seltener als in Heparin vorkommen [228], sind neutrale Oligosaccharidsequenzen möglicherweise ebenfalls an der Bindung mit FGF-2 beteiligt [109].

Die hochmolekularen Carrageenane zeigten unabhängig von Zahl und Position der Sulfatgruppen vergleichbare Bindungsaffinitäten (hohe Affinität). Bereits in Zellkulturversuchen inhibierten ι -, κ - und λ -Carrageenan selektiv die Bindung radioaktiv markierter Wachstumsfaktoren (u.a. FGF-2, PDGF, TGF- β 1) [107]. Eine Erhöhung der Lipophile hatte keinen Effekt (Methyl- ι -Carrageenan).

Jedoch zeichnete sich ein deutlicher Einfluss des Molekulargewichts ab: Niedermolekulare Derivate von ι -Carrageenan waren nur schwach oder nicht bindend. Die getesteten sulfatierten Oligosaccharide (≥ 2 Monomere) zeigten nur schwache Affinität zu FGF-2. Für Saccharoseoctasulfat war, wie auch schon in Untersuchungen mittels Gelpermeationschromatographie (s. Abbildung 58) und Gleichgewichtsdialyse/Densitometrie [242], eine Bindung an FGF-2 nachweisbar.

Bei den α -1,4-verknüpften Galactanen scheint der Einfluss des Sulfatierungsgrads eher gering zu sein. Die unsulfatierte Ausgangsverbindung PGA hatte eine den sulfatierten Derivaten α -Galactan ls S1 und α -Galactan ul S1 entsprechende hohe Affinität. Demnach sind neben Sulfat- auch Carboxylgruppen als negative Ladungsträger möglich.

Anders bei den β -1,4-D-Galactanen (LuPS-sulfate) und den β -1,4-D-Glucanen (Cellulosederivate). Hier trat eine messbare Fluoreszenzänderung erst ab einem gewissen Sulfatierungsgrad auf (LuPS-sulfate: DS $\geq 0,53$; Cellulosederivate: DS > 1). Bei den β -1,4-D-Galactanen blieb die Aktivität auch bei Desulfatierung in Position 6 erhalten (LuPS S5 6DS).

Der Ersatz von Sulfatgruppen durch Phosphatgruppen war bis zu einem bestimmten Substitutionsgrad möglich (LuPS P2). Eine zusätzliche Fluorierung veränderte die Bindungseigenschaften des β -1,4-verknüpften Galactans (LuPS F S1) nicht.

Innerhalb der β -1,3-D-Galactane stellte ein zunehmender Verzweigungsgrad (AsaPS S1 < LäPS v S1 < AG S1) keinen Nachteil für die Bindung dar.

Tabelle 23: Ergebnisse der Fluoreszenzuntersuchungen an FGF-2
(-: keine Affinität; \pm : mittlere Affinität; +: hohe Affinität)

Substanz	Fluoreszenz – (20,9%)	Fluoreszenz \pm $K_D > 1 \text{ nM}$ (25,6%)	Fluoreszenz + $K_D < 1 \text{ nM}$ (53,5%)
lineare α -1,3/ β -1,4-D-Galactane	D5	ι -Carrageenan pH 3,2	λ -Carrageenan
	D6	D3	θ -Carrageenan
	D7	D4	κ -Carrageenan ι -Carrageenan Methyl- ι -C
lineare β -1,4-D-Galactane	LuPS S7	β -Galactan	LuPS S5
	LuPS P1	LuPS S9	LuPS S8
			LuPS S5 6DS
			LuPS P2
			LuPS F S1
lineare α -1,4-D-Galactane			PGA
			α -Galactan ls S1 α -Galactan ul S1
β -1,3-D-Galactane		AsaPS S1	AG S1
		AG	LäPS v S1
		LäPS S1	
Glucane	Cellulose O-2		Cellulose 2-3
	Cellulose O-3		Laminarin
	LAM S5		LiPS IX
Sonstige Kohlenhydrate	PPS		Heparin
			Fucoidan (ves.)
			Agarose
			Agarose S3
			Alginsäure
Oligosaccharide		Saccharoseoctasulfat	
		Neocarratetraose-disulfat	
		Neocarrahexasulfat	

5.2.1.2.3 Zusammenfassung

Die Fluoreszenzspektroskopie stellt eine äußerst empfindliche Methode zur Bestimmung der Affinität von Kohlenhydratliganden zu FGF-2 dar. Jedoch werden lediglich solche Liganden als proteinbindend erkannt, die in der Nähe des Tryptophanrestes binden und so zu einer Änderung der Fluoreszenzemission führen. Deshalb ist die Bindungsfähigkeit eines Liganden aufgrund seiner strukturellen Eigenschaften nicht eindeutig festzulegen.

5.2.1.3 Trypsin-Verdau-Assay (FGF-2)

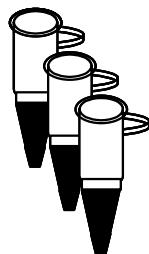
Der Trypsin-Verdau-Assay stellt eine relativ einfach durchzuführende Methode dar, um die Interaktion von humanem FGF-2 mit ungebundenen GAGs in Lösung zu untersuchen. In Abhängigkeit von der Struktur der GAGs binden diese *in vitro* an den Wachstumsfaktor und schützen ihn vor dem proteolytischen Abbau durch Trypsin. Für FGF-2 sind mehr als 20 theoretische Spaltstellen denkbar, da die Protease spezifisch nach Arginin- bzw. Lysinresten angreift. Coltrini et al. vermuten jedoch eine bevorzugte Trypsin-Spaltstelle im FGF-2 Molekül, die wahrscheinlich der durch Röntgenkristallstrukturanalyse identifizierten, konformationsabhängigen, sulfation-bindenden Gruppe basischer Aminosäuren entspricht [218,224]. Sterische Hinderung durch den Kohlenhydratliganden bzw. ionische Wechselwirkungen zwischen FGF-2 und Ligand verhindern den Angriff der Protease in diesem Proteinbereich und so den Abbau des GF. Sowohl Heparin als auch endothelzellgebundene und sezernierte Heparansulfate schützen FGF-2 vor enzymatischer Inaktivierung [243,244].

5.2.1.3.1 Durchführung des Trypsin-Verdau-Assays

Die Testung wurde nach der von Käsbauer entwickelten Methode [127,128] durchgeführt (s. Abbildung 63). Im Vergleich zu früher beschriebenen Versuchsdurchführungen [218,243] konnte der Bedarf an FGF-2 durch Zusatz des Tensids Tween 20 (Polyoxyethylen(20)-sorbitanlaurat) und Verwendung eines dreifach konzentrierten Probenpuffers deutlich reduziert werden. Die Proteinbanden wurden statt durch Coomassie- mit der zeitaufwendigen Silberfärbung sichtbar gemacht, die jedoch selbst den Nachweis geringer Mengen FGF-2 sicher ermöglichte. Die Auswertung der Gele erfolgte stets mit einem Durchlichtscanner und entsprechender Software. Die Integrationswerte der Banden der TS (optische Dichte \times Bandenbreite) wurden als prozentualer Anteil des Integrationswertes des Vergleichs (FGF-2 ohne Testsubstanz und Trypsin) angegeben (unverdauter FGF-2 [%]).

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass der Schutz des Wachstumsfaktors vor dem proteolytischen Abbau auf der Hemmung der Protease durch die Testsubstanzen beruht, wurde als Kontrolle stets ein durch Hitzebehandlung (65°C, 5 min) inaktivierter FGF-2 mitgetestet. Durch die thermische Belastung tritt eine Änderung der nativen Konformation von FGF-2 und infolgedessen ein Verlust der Bindungsaffinität zu Heparin oder GAGs ein. Wird der denaturierte, nicht aber der native FGF-2 in Gegenwart einer Testsubstanz durch Trypsin abgebaut, so beruht die protektive Wirkung der Testsubstanz nicht auf einer Enzyminhibition,

sondern auf der Bindung an arginin- und lysinreiche Bereiche in der Tertiärstruktur des Wachstumsfaktors.



- 1 FGF-2 (EK = 12,5 µg/ml), Testsubstanz (EK = 0-0,75 µg/ml) und Trypsin (EK = 0,25 µg/ml) in Reaktionsgefäßchen mischen
- 2 7, 20 oder 40 h Inkubation bei 37°C
- 3 Zugabe von dreifach konzentriertem Probenpuffer
- 4 SDS/PAGE auf 16%igen Gelen in einem Tris-Glycin-Puffer
- 5 Silberfärbung, Auswertung mit dem Densitometer

Abbildung 63: Durchführung des Trypsin-Verdau-Assays (FGF-2)

Um inaktive Substanzen ausschließen zu können, wurden in einem ersten Screening die Testsubstanzen zunächst in zwei Konzentrationen (0,25 µg/ml; 0,5 µg/ml) auf ihre FGF-2 bindenden Eigenschaften untersucht. Die aktiven Substanzen und verschiedene Verdünnungen davon wurden dann zur Ermittlung der IC₅₀-Werte und der Beurteilung der Wirkdauer erneut getestet.

Als Standardsubstanz wurde Heparin (unfraktioniert, bovine Darmmukosa) gewählt. Auch die anderen getesteten Heparine (Heparin LMW, Heparin p, Heparin NA) zeigten vergleichbare Aktivität.

In Abbildung 64 ist der konzentrationsabhängige Effekt des verzweigten β-1,3-D-Galactans LäPS v S1 nach 7stündiger Inkubation gezeigt.

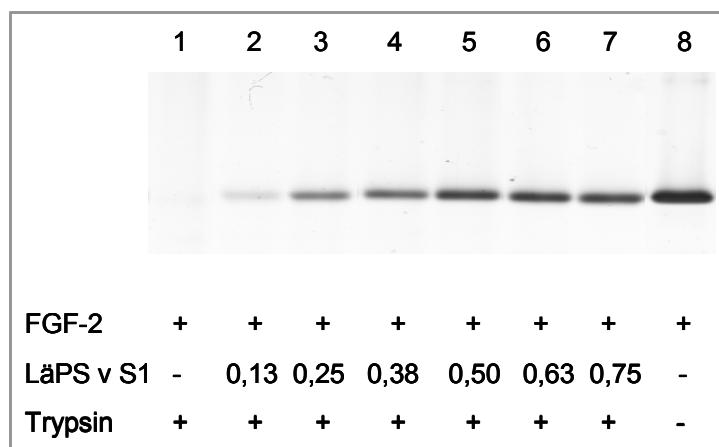


Abbildung 64: SDS/PAGE von FGF-2 und LäPS v S1. Dosisabhängiger Effekt von LäPS v S1 (EK = 0,13-0,75 µg/ml) nach 7stündiger Inkubation.

Ohne Zusatz des sulfatierten Galactans wurde FGF-2 durch Trypsin vollständig abgebaut (Bande 1). Mit steigender Konzentration an LäPS v S1 nahm die Bandenintensität und damit die Menge an unverdautem FGF-2 zu (Bande 2-7). Unter den gleichen Bedingungen wurde FGF-2 ohne Trypsin- und LäPS v S1-Zusatz inkubiert (Bande 8).

5.2.1.3.2 Ergebnisse des Trypsin-Verdau-Assays

5.2.1.3.2.1 Dosis-Wirkungsbeziehung

Am Beispiel von Heparin (unfraktioniert, bovine Darmmukosa), Saccharoseoctasulfat und ι -Carrageenan ist in der folgenden Abbildung die Dosisabhängigkeit der FGF-2-Protektion vor dem proteolytischen Abbau dargestellt. In Analogie zum in Abbildung 64 gezeigten Effekt von LäPS v S1 nahm mit steigender Konzentration der sulfatierten Kohlenhydrate der prozentuale Anteil an unverdautem FGF-2 bis zu einem Sättigungswert zu. Die getesteten Substanzen unterschieden sich sowohl in der inhibitorischen Konzentration des halbmaximalen Effekts (IC_{50} (Heparin) = 0,14 μ g/ml; IC_{50} (Saccharoseoctasulfat) = 0,24 μ g/ml; IC_{50} (ι -Carrageenan) = 0,27 μ g/ml) als auch im erreichbaren Maximaleffekt (E_m (Heparin) = 56,6%; E_m (Saccharoseoctasulfat) = 73,1%; E_m (ι -Carrageenan) = 51,8%).

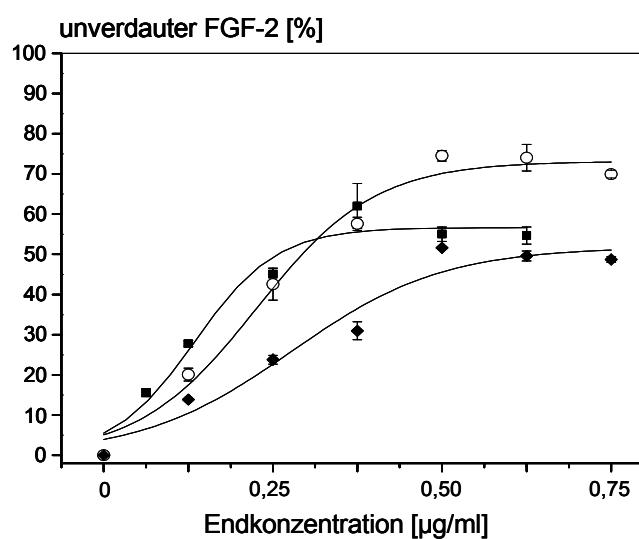


Abbildung 65: Konzentrationsabhängigkeit des protektiven Effekts von Heparin (unfraktioniert, bovine Darmmukosa, ■), Saccharoseoctasulfat (○) und ι -Carrageenan (◆) im Trypsin-Verdau-Assay mit FGF-2 nach 7 h Inkubation. Die Dosis-Wirkungskurven wurden einem sigmoidalen Kurvenlauf angenähert.

Unter Vernachlässigung des Molekulargewichts war Heparin demnach die Substanz mit der höchsten Affinität zu FGF-2, die jedoch den Wachstumsfaktor ebenso wie ι -Carrageenan nur teilweise vor dem proteolytischen Abbau schützen konnte ($E_m \leq 56,6\%$). Saccharoseoctasulfat, das mit vergleichbarer Affinität wie ι -Carrageenan an den Wachstumsfaktor bindet, konnte den proteolytischen Abbau effektiver hemmen. Das Ausmaß der Hemmwirkung auf den FGF-2 Abbau (E_m) ist von der Dissoziationsgeschwindigkeit des Kohlenhydrat-FGF-2-Komplexes abhängig.

Bei Angabe der IC_{50} -Werte in nM ergibt sich für Heparin eine 10fach, für Saccharoseoctasulfat eine mehr als 300fach geringere Affinität zu FGF-2 als für ι -Carrageenan (IC_{50} (Heparin) = 7,8 nM; IC_{50} (Saccharoseoctasulfat) = 246,4 nM; IC_{50} (ι -Carrageenan) = 0,8 nM). Dies deutet auf zusätzliche Kontaktpunkte für FGF-2 in der Molekülstruktur von ι -Carrageenan hin.

Der Trypsin-Verdau-Assay ermöglicht also zum einen die Bestimmung des maximalen Effekts (E_m (unverdauter FGF-2 [%])), der Hinweise auf die Dissoziationsgeschwindigkeit des Kohlenhydrat-FGF-2-Komplexes liefert (Komplexstabilität, Aktivität), zum anderen die Bestimmung der Konzentration des Kohlenhydratliganden, die zu einer 50%igen Hemmung des enzymatischen FGF-2-Abbaus führt (IC_{50} [μ g/ml]). Diese ist gleichbedeutend mit der Affinität des Liganden bzw. deutet bei gleichem Maximaleffekt auf die Anzahl möglicher Proteinbindungsstellen im Kohlenhydratliganden hin.

Bei der Bestimmung der IC_{50} -Werte wurde wegen der großen Molekulargewichtsunterschiede der einzelnen Testsubstanzen auf die Angabe der Molarität verzichtet, da für eine mögliche therapeutische Anwendung die absolut einzusetzenden Substanzmengen von Bedeutung sind.

5.2.1.3.2.2 Unsubstituierte Polysaccharide und Oligosaccharidsulfate

Im Trypsin-Verdau-Assay zeigten unsulfatierte Polysaccharide unabhängig vom zugrunde liegenden Kohlenhydratgerüst (β -Galactan, PGA, AG, Laminarin, Agarose) keinen Effekt. Eine Ausnahme stellte die uronsäurehaltige Alginsäure dar (s. Kapitel 5.2.1.3.2.7). In der Gruppe der Oligosaccharide waren die niedrig sulfatierten Kohlenhydrate (Neocarratetraose-disulfat, Neocarrahexasulfat-trisulfat) inaktiv. Lediglich bei dem hochsulfatierten Saccharoseoctasulfat war ein guter biologischer Effekt zu beobachten (siehe Abbildung 65).

5.2.1.3.2.3 lineare α -1,3/ β -1,4-D-Galactane (Carrageenane)

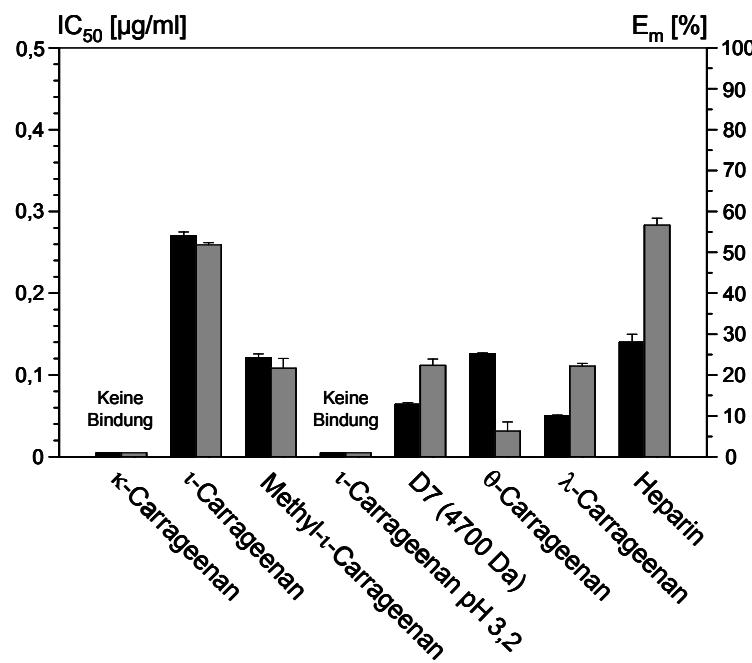


Abbildung 66: Effekte der genuinen Carrageenane (κ -, ι -, θ - und λ -Carrageenane, von links nach rechts mit steigendem DS) sowie der durch Methylierung (Methyl- ι -Carrageenan) und Hydrolyse (ι -Carrageenan pH 3,2; D7) modifizierten Derivate von ι -Carrageenan.

IC₅₀ [μg/ml]: schwarze Säulen

E_m (unverdauter FGF-2 [%]): graue Säulen

Heparin: Standardsubstanz

In der Gruppe der selektiv sulfatierten genuinen Carrageenane zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit der Affinität zu FGF-2 vom Sulfatierungsgrad. Während das nur schwach sulfatierte κ -Carrageenan inaktiv war, nahmen die IC₅₀-Werte von ι -, θ - und λ -Carrageenan mit steigendem DS ab und folglich die proteinbindenden Eigenschaften zu. Möglicherweise spielt auch die Verteilung der Sulfatgruppen eine Rolle, da das wie κ -Carrageenan in Position 4 der β -1,3-Galactose sulfatierte ι -Carrageenan im Vergleich zu den in Position 2 der β -1,3-Galactose sulfatierten θ - und λ -Carrageenan geringere Affinität besaß. Betrachtet man lediglich die E_m-Werte, überrascht ι -Carrageenan jedoch mit einem deutlich höheren Maximaleffekt als θ - und λ -Carrageenan, der auf der geringeren Dissoziationsgeschwindigkeit des ι -Carrageenan-FGF-2-Komplexes beruht, und ist damit Heparin (IC₅₀ (Heparin) = 0,14 μg/ml; E_m (Heparin) = 56,6%) äquivalent.

Die Untersuchung von Methyl- ι -Carrageenan (Methylether von ι -Carrageenan) machte deutlich, dass sich eine Lipophilieerhöhung im Einzelfall positiv auf die Affinität auswirken kann (IC₅₀ ↓), auch wenn diese mit einer Verringerung der Aktivität (E_m ↓) einhergeht. Der

hydrolytische Abbau von ι -Carrageenan mit anschließender Fraktionierung führte zu Derivaten (ι -Carrageenan pH 3,2 und seine Fraktionen D3, D4, D5, D6, D7), die nicht mehr mit FGF-2 interagieren. Lediglich D7, die Fraktion mit dem höchsten Molekulargewicht und Sulfatgehalt, hatte FGF-2 bindende Eigenschaften. Möglicherweise liegt hier eine optimale Anordnung der negativ geladenen Sulfatgruppen im Kohlenhydratgrundgerüst vor.

5.2.1.3.2.4 lineare β -1,4-D-Galactane (LuPS-sulfate)

Wie bei den Carrageenanen trat auch bei den LuPS-sulfaten erst ab einem gewissen Sulfatierungsgrad eine Proteinbindung auf. Das unsulfatierte Grundgerüst wie auch die sulfatierten Derivate bis zu einem DS $\leq 0,72$ (LuPS S7, LuPS S8, LuPS S9) waren inaktiv. Hingegen konnte LuPS S5 bei niedrigerem IC₅₀-Wert den Wachstumsfaktor annähernd so effektiv vor dem Trypsinabbau schützen wie Heparin.

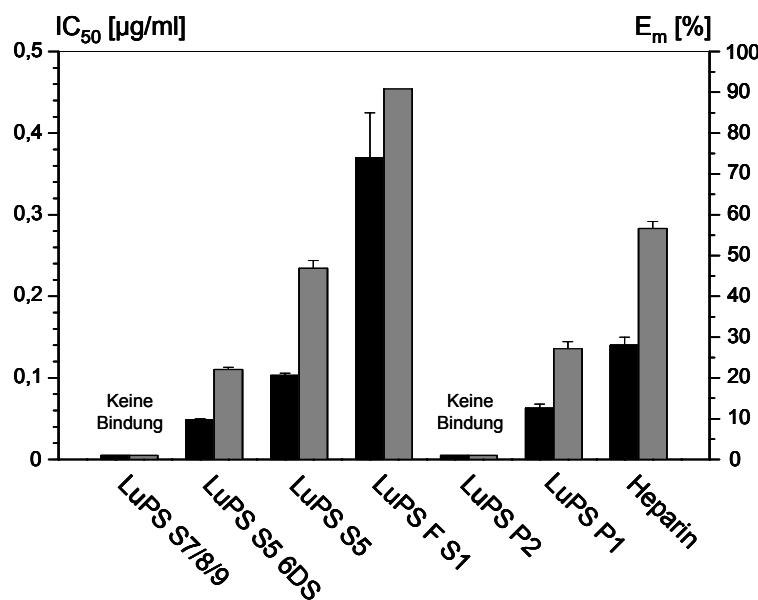


Abbildung 67: Effekte der LuPS-sulfate (von links nach rechts mit steigendem DS).
 LuPS S5 6DS: selektiv in Position 6 desulfatiertes β -1,4-D-Galactansulfat;
 LuPS FS1: fluoriertes β -1,4-D-Galactansulfat; LuPS P2/1: phosphatiertes β -1,4-D-Galactan
 IC₅₀ [µg/ml]: schwarze Säulen
 E_m (unverdauter FGF-2 [%]): graue Säulen
 Heparin: Standardsubstanz

Die selektive Desulfatierung in Position 6 von LuPS S5 führte zu dem noch aktiven Derivat LuPS S5 6DS, das jedoch eine deutlich höhere Affinität zu FGF-2 besaß. Die Einführung

ungeladener Fluoratome in Position 6 des Galactansulfats äußerte sich in einer nahezu vollständigen Inhibition des proteolytischen Abbaus von FGF-2. Allerdings ging diese Aktivitätssteigerung mit einer deutlichen Verminderung der Affinität einher (LuPS F S1). β -1,4-D-Galactane, in denen die Sulfatgruppen durch Phosphatreste ersetzt wurden, können ab einem gewissen DS mit LuPS-sulfaten vergleichbare Effekte erzielen. LuPS P2 (DS(PO_4) = 0,40) zeigte keine Interaktion mit FGF-2, das höher phosphatierte LuPS P1 (DS(PO_4) = 0,81) hingegen war ebenso aktiv wie LuPS S5 6DS, ein Galactansulfat mit vergleichbarem DS (DS(SO_4) = 0,74).

5.2.1.3.2.5 α -1,4- und β -1,3-D-Galactane

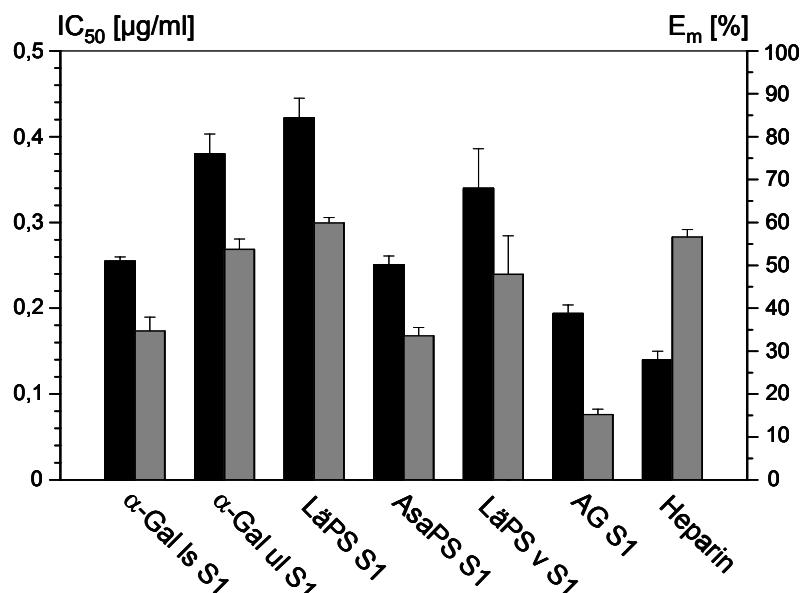


Abbildung 68: Effekte von α -1,4- und β -1,3-D-Galactanen im Trypsin-Verdau-Assay.
 α -Gal ls S1, α -Gal ul S1: α -1,4-D-Galactansulfate (von links nach rechts mit steigendem DS)
LäPS S1: lineares β -1,3-D-Galactansulfat
AsaPS S1, LäPS v S1, AG S1: β -1,3-D-Galactansulfate (von links nach rechts mit steigendem Verzweigungsgrad)
IC₅₀ [µg/ml]: schwarze Säulen
E_m (unverdauter FGF-2 [%]): graue Säulen
Heparin: Standardsubstanz

Die Untersuchung der α -1,4-D-Galactansulfate zeigte einen Anstieg der protektiven Wirkung in Abhängigkeit von DS und Molekulargewicht. α -Galactan ls S1 mit einem niedrigeren MW

und Sulfatierungsgrad als α -Galactan ul S1 wies sowohl eine schwächere Affinität als auch eine schwächere Aktivität als Heparin auf. Die Erhöhung von MW und DS führte zu einem Galactansulfat (α -Gal ul S1) mit ähnlich guter FGF-2 protektiver Wirkung wie Heparin. α -Gal ul S1 musste jedoch in deutlich höherer Dosierung eingesetzt werden.

Das lineare β -1,3-D-Galactansulfat LäPS S1 hatte, ebenso wie das verzweigte LäPS v S1, eine mit Heparin vergleichbare inhibitorische Aktivität (E_m (LäPS S1) = 59,9%; E_m (LäPS v S1) = 47,9%) bei allerdings 2,4-3fach erhöhten IC_{50} -Werten. AsaPS S1 und AG S1 aus der Reihe der seitenkettenhaltigen β -1,3-D-Galactansulfate, deren Verzweigungsgrad in der Reihe AsaPS S1 < LäPS v S1 < AG S1 ansteigt, waren hingegen weniger aktiv als Heparin.

5.2.1.3.2.6 Glucane

Eine Wechselwirkung mit FGF-2 ist nicht an ein Galactangrundgerüst des Liganden gebunden (s. Abbildung 69).

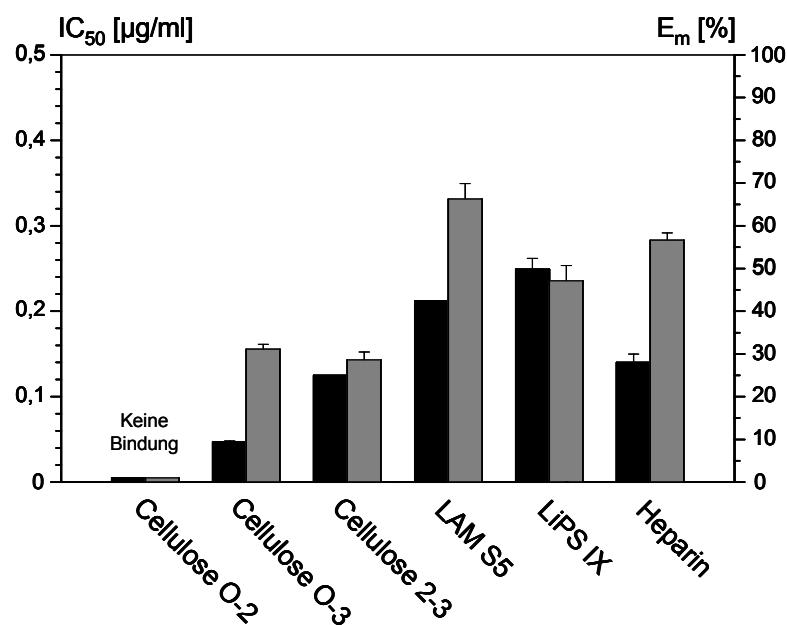


Abbildung 69: Effekte verschiedener Glucane im Trypsin-Verdau-Assay (FGF-2).

Cellulose O-2, Cellulose O-3, Cellulose 2-3: β -1,4-D-Glucansulfate (von links nach rechts mit steigendem DS)

LAM S5: β -1,3-D-Glucansulfat

LiPS IX: β -1,3/ β -1,4-D-Glucansulfat

IC_{50} [$\mu\text{g}/\text{ml}$]: schwarze Säulen

E_m (unverdauter FGF-2 [%]): graue Säulen

Heparin: Standardsubstanz

Auch Polysaccharide mit Glucose als Monomerbaustein, z.B. Cellulosederivate, waren in der Lage, das Protein vor dem enzymatischen Abbau zu schützen. Hier ist wiederum die Abhängigkeit der Aktivität vom DS auffallend. Erst ab einem Sulfatierungsgrad von ≈ 1 (z.B. Cellulose O-3) war ein Effekt nachweisbar. Zwar lag der IC_{50} -Wert von Cellulose O-3 deutlich unter dem von Heparin, der maximal erzielbare Effekt entsprach jedoch nur etwa 50% der Wirkung durch Heparin. Die Steigerung des DS (Cellulose 2-3) führte zu keiner weiteren Verbesserung der *in vitro* Aktivität. Als mögliche Ursache ist ein negativer Einfluss der Sulfatgruppen in Position 2 der Glucoseketten denkbar, da das in Position 2 monosulfatierte Derivat Cellulose O-2 wirkungslos war. Die hochsulfatierten Glucane LAM S5 und LiPS IX zeigten mit Heparin vergleichbare Effekte bei leicht erhöhten IC_{50} -Werten.

5.2.1.3.2.7 Sonstige Kohlenhydrate

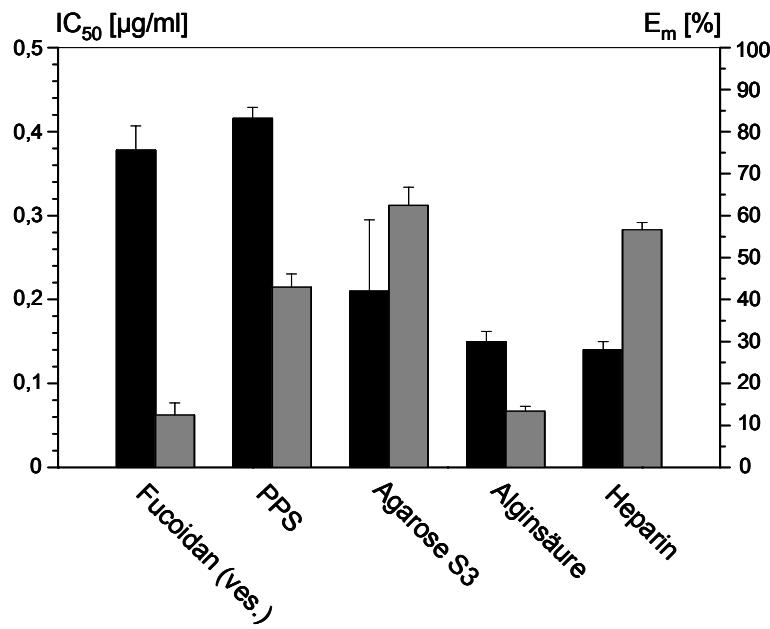


Abbildung 70: Effekte verschiedener Polysaccharide ohne Galactangrundgerüst.

Fucoidan (ves.): *Fucus vesiculosus* L.; PPS: Xylanpolysulfat; Agarose S3: unselektiv sulfatiertes Agarosederivat

IC_{50} [$\mu\text{g}/\text{ml}$]: schwarze Säulen

E_m (unverdauter FGF-2 [%]): graue Säulen

Heparin: Standardsubstanz

Wie in Abbildung 70 dargestellt, zeigen z.T. auch Polysaccharide ohne Galactan- oder Glucangrundstruktur eine Wechselwirkung mit FGF-2. Alginsäure und das in allen drei *in vivo*

Assays aktive Fucoidan (ves.) sind der Standardsubstanz Heparin unterlegen, während PPS und Agarose S3 den Proteinabbau ähnlich effektiv wie diese unterbinden können. Allerdings ist die dafür erforderliche Hemmkonzentration zumindest für PPS um das Dreifache erhöht. Die Aktivität der Alginsäure beruht nicht nur auf den negativ geladenen Substituenten in Form von Carboxylgruppen, sondern insbesondere auf dem Kohlenhydratgrundgerüst, da die entsprechende α -1,4-D-Galacturonsäure PGA ohne Effekt war.

5.2.1.3.2.8 Zeitabhängigkeit des protektiven Effekts

An einigen ausgewählten Verbindungen wurde die Dauer des protektiven Effekts untersucht.

Neben dem als Standardsubstanz verwendeten Heparin wurden das α -1,3/ β -1,4-D-Galactan ι -Carrageenan, das β -1,4-D-Galactan LuPS F S1, das β -1,3-D-Galactan LäPS v S1, das hochmolekulare Agarose S3 und das oligomere Saccharoseoctasulfat über einen Zeitraum von 7 h, 20 h und 40 h in der Mischung mit FGF-2 und Trypsin inkubiert und der Maximaleffekt bestimmt.

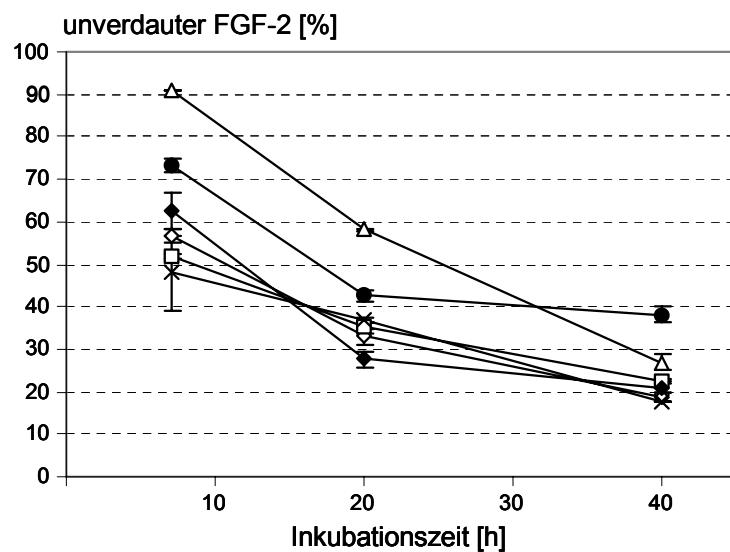


Abbildung 71: Zeitabhängigkeit des maximalen protektiven Effekts von Heparin (\diamond , (0,50 µg/ml)), ι -Carrageenan (\square , (0,75 µg/ml)), LuPS F S1 (Δ , (0,75 µg/ml)), LäPS v S1 (\times , (0,75 µg/ml)), Agarose S3 (\blacklozenge , (0,75 µg/ml)) und Saccharose-octasulfat (\bullet , (0,63 µg/ml)) im Trypsin-Verdau-Assay mit FGF-2.

Der prozentuale Anteil an unverdautem FGF-2 wurde jeweils nach 7 h, 20 h und 40 h mittels SDS/PAGE und anschließender Silberfärbung densitometrisch bestimmt.

ι -Carrageenan, LäPS v S1 und Agarose S3 erzielten nach den jeweiligen Inkubationszeiten mit Heparin vergleichbare Effekte und zeigten auch einen ähnlichen Zeitverlauf ihrer FGF-2-protektiven Wirkung. Im Intervall von 7-20 h trat ein stärkerer Aktivitätsverlust als im Intervall von 20-40 h auf, erkennbar an der deutlich steiler abfallenden Gerade im ersten Zeitabschnitt (Ausnahme: LäPS v S1). Zwei der getesteten Substanzen (LuPS F S1, Saccharoseoctasulfat) wichen davon jedoch deutlich ab. Bei Koinkubation mit dem fluorierten LuPS-sulfat waren nach 7stündiger Inkubation lediglich ca. 10% der ursprünglichen Menge an FGF-2 durch Trypsin abgebaut. Im weiteren Verlauf war eine annähernd lineare Abnahme der protektiven Wirkung bis zum Niveau des Heparins zu beobachten. Saccharoseoctasulfat war zwar zunächst weniger aktiv als LuPS F S1, aber Heparin eindeutig überlegen. Im letzten Inkubationszeitraum war nahezu keine Veränderung mehr zu beobachten, sodass nach einem Zeitraum von 40 h letztlich das Disaccharid die Verbindung mit der höchsten FGF-2-protektiven Wirkung war.

In Gegenwart sämtlicher getesteter sulfatiertes Kohlenhydrate hatte FGF-2 eine Mindesthalbwertszeit von 7 Stunden, die im Einzelfall auf bis zu 17 h (Saccharoseoctasulfat) bzw. 25 h (LuPS F S1) anstieg. Dies ist insbesondere hinsichtlich eines möglichen therapeutischen Einsatzes von Bedeutung, da diese Testsubstanzen bei ein- bis dreimal täglicher Applikation einen ausreichenden Effekt erzielen würden. Unklar ist allerdings, ob Substanzen mit kurzzeitigen Effekten solchen mit Langzeiteffekten vorzuziehen sind, da, bedingt durch die Redundanz der angiogenen Mechanismen, die Folgen einer vorübergehenden Bindung von FGF-2 an exogene heparinähnliche Strukturen nicht vorhersehbar sind. Denkbar sind sowohl eine erhöhte (Stabilisierung, Schutz vor Proteaseverdau, Interaktion mit RTK) als auch eine verminderte Bioverfügbarkeit des Wachstumsfaktors (stabiler Komplex zwischen GF und sulfatiertem Kohlenhydrat). Möglicherweise könnte in letzterem Fall durch physiologische Gegenregulation eine Erhöhung der endogenen Synthese von FGF-2 oder eines anderen angiogenen Stimulators ausgelöst werden.

5.2.1.3.2.9 Substanzkombinationen

Der Zweck folgender Untersuchung war, mögliche additive oder sogar synergistische Effekte von Substanzkombinationen aufzudecken. Diese können auftreten, wenn durch die gleichzeitige Interaktion von FGF-2 mit beiden Bindungspartnern der Angriff des proteolytischen Enzyms effektiver unterbunden werden kann. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass durch den zweiten Liganden die Ausbildung der Schutzhülle durch den

ersten Liganden gestört wird und das Protein dem enzymatischen Angriff ungeschützt gegenübersteht.

Es wurden Substanzen mit geringer struktureller Übereinstimmung gewählt, da diese mit höherer Wahrscheinlichkeit unterschiedliche Bindungsstellen am Protein aufweisen. Neben Kombinationen von Heparin mit α -Gal ul S1, LuPS S5 6DS und ι -Carrageenan wurde noch α -Gal ul S1/LuPS S5 6DS untersucht. Die sulfatierten Kohlenhydrate wurden in Konzentrationen eingesetzt, die im Sättigungsbereich der Dosis-Wirkungskurve lagen. Dadurch wurde gewährleistet, dass mögliche Bindungsstellen vollständig abgesättigt sind und bei Konkurrenz beider Substanzen um die gleiche Bindungsstelle jene mit der höheren Bindungsaffinität die weniger affine verdrängt.

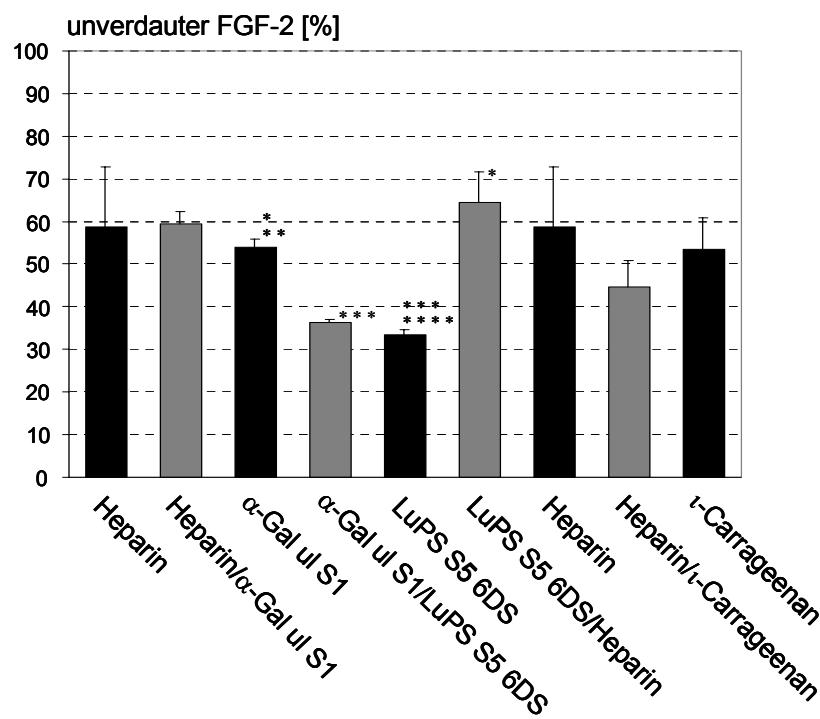


Abbildung 72: Testung von Substanzkombinationen im Trypsin-Verdau-Assay (FGF-2).
 $(* = p < 0,05 \text{ vs LuPS S5 6DS}; ** = p < 0,05 \text{ vs } \alpha\text{-Gal ul S1/LuPS S5 6DS};$
 $*** = p < 0,05 \text{ vs } \alpha\text{-Gal ul S1}; **** = p < 0,05 \text{ vs LuPS S5 6DS/Heparin})$

Die Mischung aus Heparin und α -Gal ul S1 war den beiden Einzelsubstanzen gleichwertig. Dies lässt den Schluss zu, dass Heparin und α -Gal ul S1 identische Bindungsstellen haben und entweder mit der gleichen Affinität an FGF-2 binden, sodass eine schützende Kohlenhydrathülle aus beiden Liganden gebildet wird, oder aber eines der Polymere bevorzugt wird.

Die Kombination aus α -Gal u1 S1 und LuPS S5 6DS zeigte lediglich den schwachen Effekt des LuPS-sulfats. Vermutlich interagiert nur das höheraffine LuPS S5 6DS mit der gemeinsamen Bindungsstelle des Wachstumsfaktors. Der Effekt von LuPS S5 6DS/Heparin war im Vergleich zu LuPS S5 6DS signifikant erhöht, entsprach aber der bei Heparin beobachteten Wirkung. Die Aktivität der Substanzkombination beruht folglich vermutlich auf der höheren Affinität von Heparin zu FGF-2. Ebenso lassen sich für Heparin und ι -Carrageenan erneut identische Bindungsstellen postulieren, die in einem ausgewogenen Verhältnis oder durch die höheraffine Substanz besetzt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass strukturell unterschiedliche Substanzen an identischen Bereichen im FGF-2 Molekül binden. Unterschiede in der protektiven Wirkung der Kombination zweier Testsubstanzen verglichen mit den Einzelsubstanzen sind nur bei unterschiedlicher Affinität der Kohlenhydratliganden zum basischen Protein zu erwarten.

5.2.1.3.3 Zusammenfassung

Der Trypsin-Verdau-Assay stellt eine relativ einfache Methode zur Untersuchung der Interaktion von Kohlenhydraten mit FGF-2 dar. Neben der Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung eines Liganden kann auch die Dauer des protektiven Effekts bestimmt werden. Substanzkombinationen zeigen keinen Vorteil gegenüber den Einzelsubstanzen, da die Liganden an identischen Bereichen im Protein gebunden werden.

Zudem ermöglicht der Test differenzierte Aussagen bezüglich der FGF-2 bindenden Eigenschaften von Kohlenhydraten. Neben der Affinität (IC_{50}) eines Kohlenhydratliganden kann auch dessen Maximaleffekt (E_m , Komplexstabilität, Aktivität) bestimmt werden. Meist besteht jedoch keine direkte Korrelation zwischen beiden Parametern.

Unsulfatierte Polysaccharide sowie Oligosaccharidsulfate zeigen keine Wechselwirkung mit FGF-2 (Ausnahme: Alginsäure, Saccharoseoctasulfat). Auch niedermolekulare Derivate von ι -Carrageenan waren inaktiv (Ausnahme: D7).

Die Aktivität der Kohlenhydratliganden (E_m) ist insbesondere bei den β -1,4- und α -1,4-D-Galactanen vom Sulfatierungsgrad abhängig. Eine Erhöhung des DS ging mit einem Wirkanstieg einher.

Hingegen deutete sich bei den Carrageenanan ein zusätzlicher Einfluss der Stellung der Sulfatgruppen an. Eine in Position 4 substituierte β -1,3-Galactose neben einer weiteren sulfatierten Monomereinheit (ι -Carrageenan) war der in 2-Stellung sulfatierten β -1,3-Galactose

(θ -, λ -Carrageenan) überlegen. In der Gruppe der LuPS-sulfate führte die selektive Desulfatierung in Position 6 zu einer Wirkungsabschwächung (LuPS S5 6DS).

Neben D-Galactanen unterschiedlicher glykosidischer Verknüpfungsart (α -1,3/ β -1,4 (ι -Carrageenan)-, β -1,4 (LuPS S5, LuPS F S1)-, α -1,4 (α -Gal ul S1)-, β -1,3 (LäPS S1, LäPS v S1)-Verknüpfung) zeigen auch Kohlenhydrate mit anderen Monomerbausteinen (Glucane, PPS, Agarose S3) einen mit Heparin vergleichbaren Effekt. Fucoidan und die uronsäurehaltige Alginsäure waren dagegen weniger aktiv. In der Gruppe der Cellulosederivate war die Wirkung an die 3-Sulfatgruppe gebunden; eine Monosubstitution in Position 2 war wirkungslos.

Wie am Beispiel unterschiedlich stark verzweigter β -1,3-D-Galactane gezeigt, ist der Verzweigungsgrad für die Aktivität nicht entscheidend. Vielmehr nimmt die Wirkung ab einem gewissen Molekulargewicht deutlich ab (AG S1). Meist ist jedoch ein guter Effekt an ein hohes MW gebunden (α -1,4-D-Galactane, ι -Carrageenan).

Die Untersuchung von Methyl- ι -Carrageenan zeigte, dass eine Lipophilieerhöhung im Einzelfall zu einer Aktivitätsminderung führen kann. Anstelle von Sulfatgruppen sind auch andere funktionelle Gruppen als negative Ladungsträger möglich: LuPS-phosphate hatten wie die entsprechenden sulfatierten β -1,4-D-Galactane erst ab einem bestimmten DS einen biologischen Effekt. Zu einem Galactan mit überraschend hoher Aktivität führte die zusätzliche Fluorierung eines LuPS-sulfats (LuPS F S1). Möglicherweise bildet das stark elektronegative Fluoratom zusätzliche Bindungen zu FGF-2 aus.

Betrachtet man die IC_{50} -Werte und damit die Affinität der Kohlenhydrate zu FGF-2, so ergeben sich teilweise andere Zusammenhänge zwischen Struktur und Wirkung.

Die Affinität sowohl der β -1,4- als auch der α -1,4-D-Galactane nahm mit steigendem DS ab. Dagegen resultierte bei den Carrageenanen eine Erhöhung des Sulfatierunggrads in einer Affinitätssteigerung, die zusätzlich durch die Position der Sulfatgruppen moduliert wird (Position 2 der β -1,3-Galactose bevorzugt). Das in Position 6 selektiv desulfatierte β -1,4-D-Galactan LuPS S5 6DS wies eine höhere Bindungstendenz zu FGF-2 auf als die Ausgangsverbindung LuPS S5.

Von Nachteil für die Bindung an FGF-2 sind ein α -1,4- und ein β -1,3-D-Galactangrundgerüst. Jedoch kann durch Galactane anderer Verknüpfungsart (α -1,3/ β -1,4 (θ -, λ -Carrageenan)-, β -1,4 (LuPS S5, LuPS S5 6DS)-Verknüpfung) und durch Polymere unterschiedlicher Struktur (Cellulosederivate, Agarose S3, Alginsäure) eine mindestens gleichwertige Affinität zu FGF-2 wie durch Heparin erzielt werden. Bei den selektiv sulfatierten Cellulosederivaten wird wiederum der Einfluss der Sulfatierungsposition deutlich. Während das in Position 2 substituierte Glucan inaktiv war, zeigte Cellulose O-3 deutlich höhere Affinität zu dem

Wachstumsfaktor als Heparin. Die zusätzliche Sulfatierung in Position 2 beeinflusste die Affinität negativ.

In der Gruppe der β -1,3-D-Galactane ist der Verzweigungsgrad ohne Bedeutung für die Affinität. Sowohl das lineare LäPS S1 als auch die unterschiedlich stark verzweigten Derivate (AsaPS S1 < LäPS v S1 < AG S1) waren schwächer proteinbindend als Heparin.

Durch die Derivatisierung zum Methylether konnte die Affinität von ι -Carrageenan deutlich gesteigert werden. Der Ersatz von Sulfatgruppen durch Phosphatgruppen in β -1,4-D-Galactanen ist bei vergleichbarem DS ohne Änderung der Bindungseigenschaften möglich. Hingegen nahm die Affinität des fluorierten LuPS-sulfates stark ab.

5.2.2 Interaktion mit IL-2 (Trypsin-Verdau-Assay)

Interleukine (IL) gehören neben Interferonen (IFN), Tumornekrosefaktoren (TNF) und koloniestimulierenden Faktoren (CSF) zu den als Zytokinen bezeichneten körpereigenen Immunmodulatoren, die die Aktivität des Immunsystems beeinflussen können. Interleukin 2 (IL-2) ist eines von mehr als 15 bis heute bekannten Interleukinen, deren Wirkung über membranständige Rezeptoren vermittelt wird [245]. Das von antigen- oder mitogenaktivierten T-Zellen sezernierte IL-2 [246] fördert die Proliferation IL-2 abhängiger T-Zellen und hat immunmodulatorische Effekte auf zytotoxische T-Zellen, natürliche Killerzellen, aktivierte B-Zellen und Lymphokin-aktivierte Zellen [247], die Tumorzellen, nicht aber Zellen gesunder Gewebe angreifen. In nichtglykosylierter rekombinanter Form ist humanes IL-2 (rhIL-2, Proleukin[®]) bei der Therapie des metastasierenden Nierenkarzinoms indiziert [245]. Angiogeneseinhibitoren wie z.B. das Fumagillinderivat TNP-470 können neben ihren Effekten auf das Gefäßwachstum möglicherweise durch die erhöhte Sekretion von IL-2 und IL-4 die Aktivierung von T-Zellen verstärken [248].

IL-2 ist ein aus 133 Aminosäureresten aufgebautes Glykoprotein (MW 15,5 kDa), das aus vier α -Helices und einem kurzen Bereich mit β -Faltblattstruktur besteht. Wie FGF-2 [228] gehört es zur Klasse der Heparin/Heparansulfat bindenden Proteine, die häufig Bindungsstellen aus basischen Aminosäureresten enthalten [249]. Die Untersuchungen von Najjam et al. lassen auf zwei mögliche lysin- und argininreiche Heparinbindungsstellen in humanem IL-2 schließen, die jedoch von der Rezeptorbindungsstelle vollständig getrennt sind, da die biologische Aktivität von IL-2 durch die Interaktion mit Heparin nicht beeinflusst wird. Die Bindung an Glykosaminoglykane könnte das Zytokin in aktiver Form nahe der Sekretionsstelle halten und so für eine parakrine Rolle von IL-2 sprechen [250]. Kuschert et al. konnten zeigen, dass die Interaktion von Chemokinen (u.a. IL-8) sowohl mit löslichen als auch an der Zelloberfläche

gebundenen GAGs unterschiedliche biologische Effekte hat. Lösliche GAGs konkurrieren mit zellgebundenen GAGs um die Bindung des Chemokins an seinen Rezeptor und inhibieren so die zelluläre Reaktion [251].

Als calcium-unabhängiges Lektin bindet IL-2 spezifisch an N-Glykane mit 5 oder 6 Mannoseresten [252]. Die bifunktionelle Interaktion von IL-2 mit $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ und einer spezifischen Peptidsequenz in der α -Untereinheit des IL-2 Rezeptors (IL-2R) führt zur Bildung des hochaffinen Komplexes aus IL-2 und IL-2R α , - β oder - γ mit nachfolgender Phosphorylierung verschiedener Tyrosinkinasen der β - und γ -Untereinheit (Lck, Jak1, Jak3, Lyn), die das zelluläre Signal induzieren [253]. Ein mögliches Rezeptormodell ist in Abbildung 73 dargestellt. An der Bindung von IL-2 an IL-2R α sind die Aminosäurereste Lys35, Arg38, Phe42 und Lys43 beteiligt. Asn26 in IL-2 ist für die Interaktion mit dem mannosereichen Kohlenhydrat von Bedeutung. Da biologisch aktives IL-2 in der dimeren Form vorliegt, wird das Hetero-Octamer (IL-2·IL-2R α , - β , - γ)₂ postuliert [254].

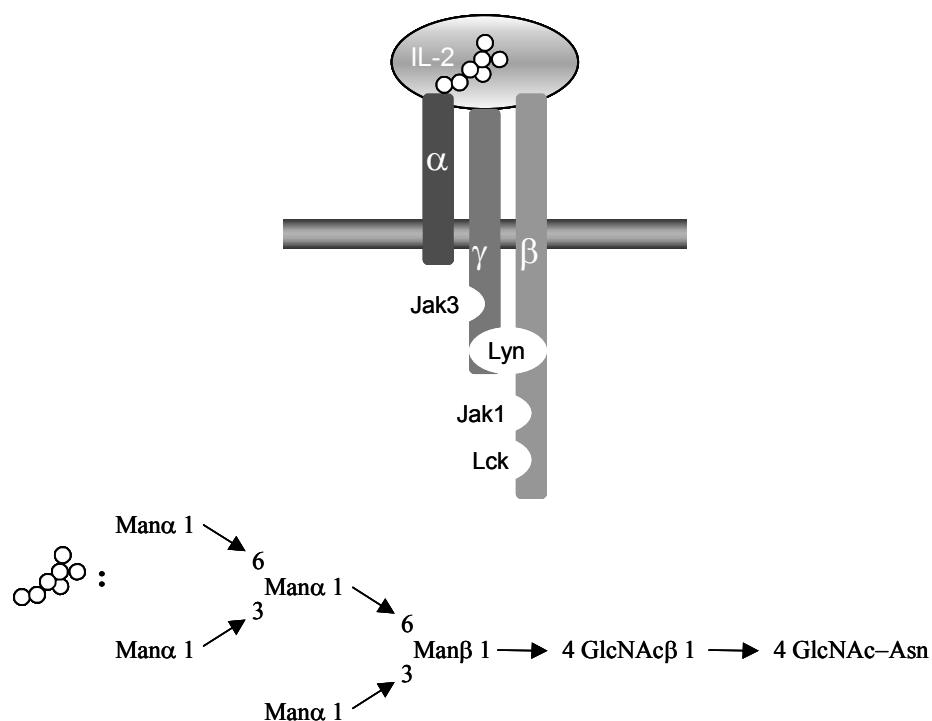
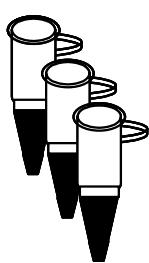


Abbildung 73: Mögliches Modell des Komplexes aus IL-2 und IL-2R α , - β oder - γ . Die Komplexbildung wird durch die Erkennung des $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ -Restes der α -Untereinheit des IL-2 Rezeptors ausgelöst [253].

5.2.2.1 Durchführung des Trypsin-Verdau-Assays (IL-2)

In einem modifizierten Trypsin-Verdau-Assay wurde das Potential verschiedener Kohlenhydrate, IL-2 vor dem proteolytischen Abbau zu schützen, untersucht. Dadurch sind Aussagen zu einer möglichen Bindung der Kohlenhydrate an das Zytokin möglich. Najjam et al. konnten in einem ELISA eine dosisabhängige Bindung von IL-2 an immobilisiertes Heparin zeigen, die durch lösliches Heparin, Fucoidan oder ein hochsulfatiertes Heparansulfat, nicht aber durch Chondroitin- und Dermatansulfat gehemmt werden kann [220]. Die IL-2 bindenden Eigenschaften von Heparin sind vom Molekulargewicht abhängig und bleiben bis zu einer Kettenlänge von ca. 15 Hexosen erhalten [250].

Das Versuchsschema des Trypsin-Verdau-Assays wurde weitgehend beibehalten (s. Abbildung 74), auch wenn einige Änderungen notwendig waren. Zunächst wurde das zur Stabilisierung zugesetzte bovine Serumalbumin (BSA) durch Ultrafiltration ohne Nachteil für IL-2 entfernt, wodurch die Zahl der auftretenden Proteinbanden deutlich reduziert werden konnte und somit eine eindeutige Auswertung möglich war. Da im Gegensatz zum Test mit FGF-2 Gele mit geringerer Porengröße verwendet wurden (20%ige Polyacrylamidgele), konnte die Menge an Zytokin um 80% reduziert werden. Die Testsubstanzen mussten in bis zu 100fach höherer Konzentration als im Trypsin-Verdau-Assay mit FGF-2 eingesetzt werden, um eindeutige Effekte beobachten zu können. Entsprechend war auch eine Reduktion der Inkubationszeit von 7 h auf 100 min notwendig. Der Zeitbedarf für die Elektrophorese konnte verringert werden, ohne die Trennqualität zu beeinflussen. Sowohl die Silberfärbung als auch die densitometrische Auswertung wurde unverändert beibehalten. Die IL-2 Bindungsfähigkeit wurde als Prozentsatz an unverdautem IL-2 angegeben.



- 1 IL-2 (EK = 2,5 µg/ml) und Testsubstanz (EK = 0-75 µg/ml) in Reaktionsgefäß mischen, 5 min Vorinkubation bei 37°C
- 2 Zusatz von Trypsin (EK = 0,2 µg/ml), 100 min Inkubation bei 37°C
- 3 Zugabe von dreifach konzentriertem Probenpuffer
- 4 SDS/PAGE auf 20%igen Gelen in einem Tris-Glycin-Puffer
- 5 Silberfärbung, Auswertung mit dem Densitometer

Abbildung 74: Durchführung des Trypsin-Verdau-Assays (IL-2)

Um auszuschließen, dass der protektive Effekt einer Testsubstanz auf der Inhibition der Protease beruhen könnte, wurden die Testsubstanzen in der höchsten getesteten Konzentration in Gegenwart von Trypsin mit hitzedenaturiertem Protein inkubiert. Da durch thermische Behandlung (65°C, 5 min) keine vollständige Inaktivierung von IL-2 erreicht werden konnte,

wurde stattdessen hitzedenaturierter FGF-2 verwendet. Trypsin wurde durch keine der getesteten Substanzen inhibiert.

In einem Eingangsscreening wurden die Testsubstanzen zunächst in zwei Konzentrationen (12,5 µg/ml; 37,5 µg/ml) auf eine mögliche Bindung an IL-2 untersucht. Von einer Auswahl aktiver Substanzen wurde dann die Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung bestimmt (IC₅₀-Werte).

Als Standardsubstanz wurde erneut Heparin (unfraktioniert, bovine Darmmukosa) gewählt. Auch die anderen getesteten Heparine (Heparin LMW, Heparin p, Heparin NA) zeigten vergleichbare Aktivität.

Abbildung 75 zeigt den konzentrationsabhängigen Effekt von Heparin nach der Inkubation mit IL-2 in Gegenwart von Trypsin. Ohne Zusatz des Glucosaminoglykans wurde IL-2 durch Trypsin vollständig abgebaut (Bande 1). Mit steigender Konzentration an Heparin nahm die Bandenintensität und damit die Menge an unverdaulchem IL-2 (Bande 2-7) zu. Unter den gleichen Bedingungen wurde IL-2 ohne Trypsin- und Heparin-Zusatz inkubiert (Bande 8).

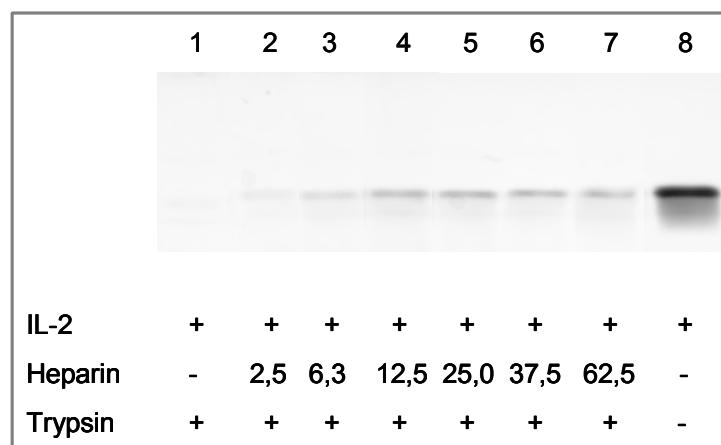


Abbildung 75: SDS/PAGE von IL-2 und Heparin. Dosisabhängiger Effekt von Heparin (unfraktioniert, bovine Darmmukosa, EK = 2,5-62,5 µg/ml) nach 100 min Inkubation.

5.2.2.2 Ergebnisse des Trypsin-Verdau-Assays (IL-2)

5.2.2.2.1 Dosis-Wirkungsbeziehung

Bei einigen Testsubstanzen wurde die Abhängigkeit der IL-2 Affinität von der eingesetzten Konzentration untersucht (s. Abbildung 76).

Erwartungsgemäß zeigte Heparin wie schon im Trypsin-Verdau-Assay mit FGF-2 eine dosisabhängige Bindung an IL-2 ($IC_{50} = 5,77 \mu\text{g/ml}$; $E_m = 18,7\%$). Einen vergleichbaren Effekt erzielte das α -1,4-verknüpfte α -Gal ls S1, während das verzweigte β -1,3-D-Galactan LäPS v S1 den IL-2 Abbau deutlich weniger effektiv zu inhibieren vermochte ($IC_{50} = 9,44 \mu\text{g/ml}$; $E_m = 6,7\%$).

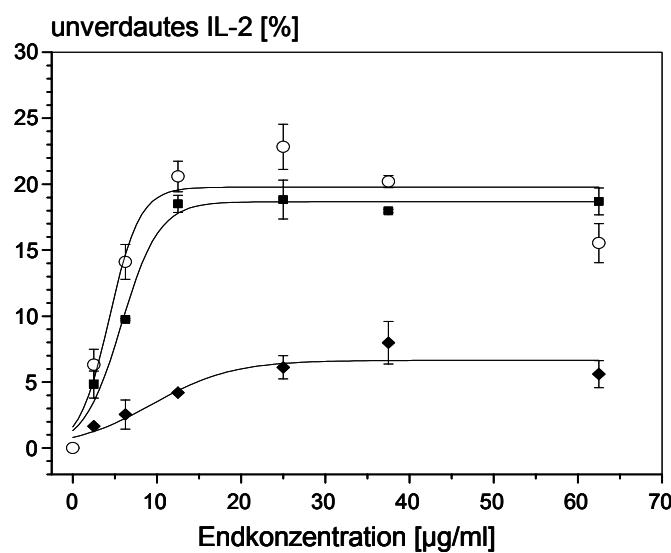


Abbildung 76: Konzentrationsabhängigkeit des protektiven Effekts von Heparin (unfraktioniert, bovine Darmmukosa, ■), α -Gal ls S1 (○) und LäPS v S1 (◆) im Trypsin-Verdau-Assay mit IL-2 nach 100 min Inkubation. Die Dosis-Wirkungskurven wurden einem sigmoidalen Kurvenlauf angenähert.

Die folgende Tabelle gibt sowohl die IC_{50} -Werte als auch die maximale Aktivität E_m einzelner sulfatierter Kohlenhydrate im Trypsin-Verdau-Assay mit FGF-2 und IL-2 an.

Tabelle 24: Vergleich der Bindungseigenschaften sulfatierter Polysaccharide im Trypsin-Verdau-Assay mit FGF-2 und IL-2

Substanz	FGF-2		IL-2	
	IC_{50} [$\mu\text{g/ml}$]	E_m unverdauter FGF-2 [%]	IC_{50} [$\mu\text{g/ml}$]	E_m unverdautes IL-2 [%]
Heparin	0,14	56,6	5,77	18,7
LuPS F S1	0,37	90,9	2,25	10,0
α-Gal ls S1	0,26	34,7	4,35	19,8
LäPS v S1	0,34	47,9	9,44	6,7
LiPS IX	0,25	47,1	2,25	19,1
PPS	0,42	42,9	2,93	28,2

Die IC_{50} -Werte der aufgeführten Polysaccharide lagen bei der Testung mit IL-2 um das 6-40fache höher als mit FGF-2. Demnach besitzen die getesteten Kohlenhydrate gegenüber IL-2 im Vergleich zu FGF-2 eine deutlich geringere Affinität. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit ELISA-Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Najjam, in denen Heparin eine 50%ige Inhibition der FGF-2-Bindung bei 0,15 µg/ml erreichte, wohingegen die für eine entsprechende Hemmung der IL-2-Bindung erforderliche Heparinkonzentration mit 5 µg/ml eindeutig höher lag [220]. Zudem waren die sulfatierten Polysaccharide in deutlich geringerem Maße in der Lage, IL-2 vor dem Proteaseangriff zu schützen als FGF-2 (E_m). Vermutlich findet die Bindung der sulfatierten Kohlenhydrate überwiegend in solchen Bereichen des IL-2 Moleküls statt, die keinen Einfluss auf die möglichen Trypsinspaltstellen haben.

5.2.2.2 Heparine, unsubstituierte Polysaccharide und Oligosaccharidsulfate

Neben dem als Standard verwendeten unfractionierten bovinen Heparin wurden weitere Heparine mit geringerem Molekulargewicht (Heparin LMW) bzw. abweichender Herkunft (Heparin p und Heparin NA, unfractioniert, Schweinedarmmukosa) untersucht. Die Glucosaminoglykane zeigten übereinstimmend eine Wechselwirkung mit IL-2. Mit Ausnahme von Heparin NA erzielten die anderen Heparine im untersuchten Konzentrationsbereich eine mit dem Standardheparin vergleichbare Aktivität. Loganathan et al. hatten Variationen der AT III-Bindungsstelle bei Heparinen unterschiedlicher Spezies und unterschiedlicher Gewebe einer Spezies festgestellt [255]. Möglicherweise sind auch die z.T. unterschiedlichen Effekte der Heparine im Trypsin-Verdau-Assay durch strukturelle Variationen der Proteinbindungsstelle erklärbar, die in Abweichungen in der IL-2 Affinität und/oder des Bindungsorts resultieren können.

In Analogie zum Trypsin-Verdau-Assay mit FGF-2 zeigten unsulfatierte Polysaccharide unabhängig vom zugrundeliegenden Kohlenhydratgerüst (β -Galactan, PGA, AG, Laminarin, Agarose) keine Affinität zu IL-2. Eine Sonderstellung nahm erneut Alginsäure ein (s. Abbildung 82).

Saccharoseoctasulfat zeigte als einziges Oligosaccharid Affinität zu IL-2 und war in seiner Wirkung mit Heparin NA vergleichbar (s. Abbildung 77). Die niedrig sulfatierten oligomeren κ -Carrageenanderivate (Neocarratetraose-disulfat, Neocarrahexasose-trisulfat) waren inaktiv. Die IL-2 Affinität der Oligosaccharide ist demnach an einen hohen Sulfatierungsgrad gebunden.

Gelegentlich war der Anteil an unverdautem IL-2 bei der Kohlenhydratkonzentration von 37,5 µg/ml geringer als bei 12,5 µg/ml. Möglicherweise konkurrieren die

Kohlenhydratliganden in entsprechend hoher Konzentration um die Bindungsstellen in den basischen Bereichen des Interleukins und führen so zu einer ungenügenden Abdeckung möglicher Trypsinspaltstellen.

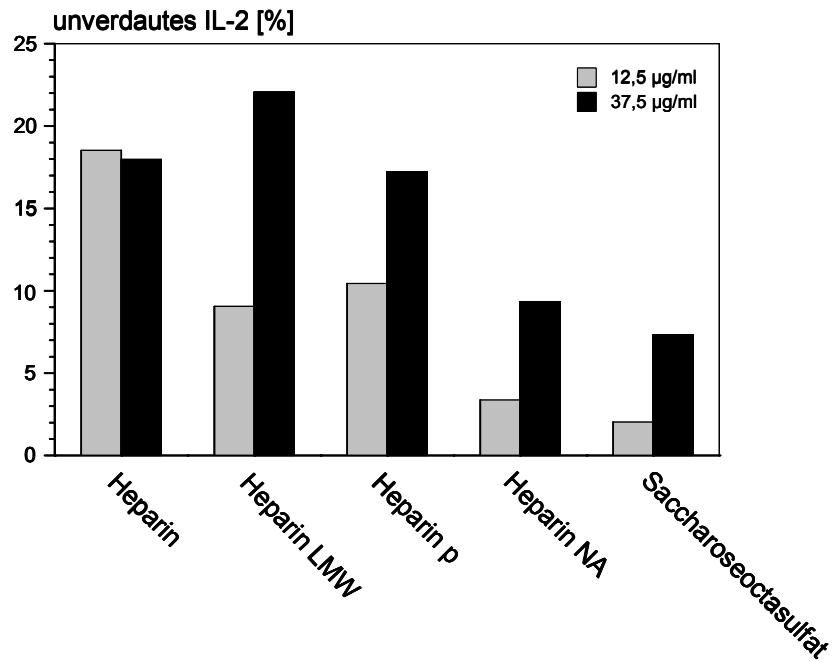


Abbildung 77: Protektiver Effekt unterschiedlicher Heparine und Saccharoseoctasulfat im Trypsin-Verdau-Assay (IL-2).

Heparin	unfraktioniert, bovine Darmmukosa
Heparin LMW	niedermolekular, bovine Darmmukosa
Heparin p	unfraktioniert, Schweinedarmmukosa
Heparin NA	unfraktioniert, Schweinedarmmukosa

5.2.2.2.3 lineare α -1,3/ β -1,4-D-Galactane (Carrageenane)

In einem weiteren Trypsin-Verdau-Assay wurden die genuinen Carrageenane sowie Derivate von ι -Carrageenan mit lipophilerem Charakter bzw. geringerem Molekulargewicht untersucht. War das mit einem DS = 0,43 nur schwach sulfatierte κ -Carrageenan wie seine niedermolekularen Derivate (NCT-disulfat, NCH-trisulfat, s. Kapitel 5.2.2.2) noch inaktiv, zeigten die anderen Carrageenane eine mit dem Sulfatierungsgrad korrelierende Aktivitätszunahme. Ebenso deutete sich ein gewisser Vorteil der 2-O-Sulfatierung (θ - und λ -Carrageenan) gegenüber der 4-O-Sulfatierung des β -1,3-Galactosebausteins (ι -Carrageenan) an. Anders als im Trypsin-Verdau-Assay mit FGF-2 zeigte nicht ι -Carrageenan, sondern λ -Carrageenan einen ebenso guten hemmenden Effekt wie Heparin.

Die im Vergleich zu ι -Carrageenan erhöhte Lipophilie des Methylethers führte zu einer geringfügigen Aktivitätsminderung. Dagegen waren das niedermolekulare ι -Carrageenan pH 3,2 sowie dessen Fraktionen (D3, D4, D5, D6, D7) inaktiv.

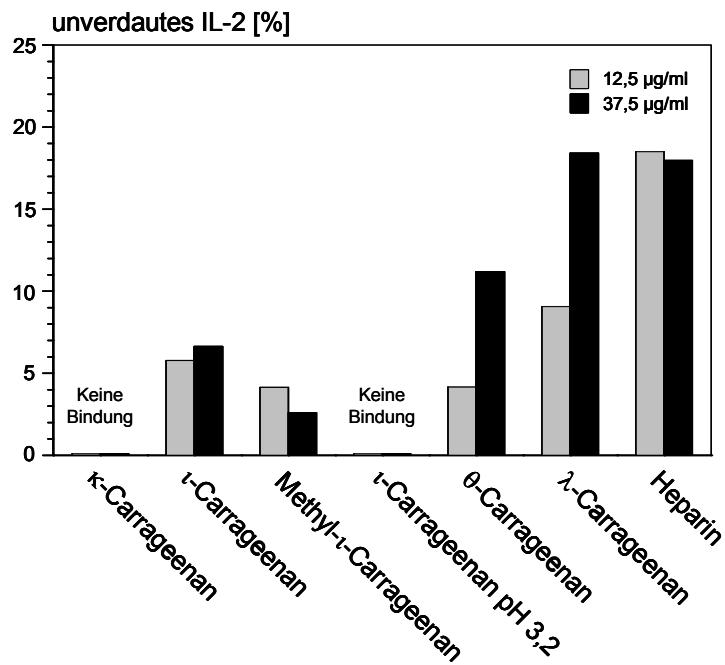


Abbildung 78: Effekte der genuinen Carrageenane (κ -, ι -, θ - und λ -Carrageenane, von links nach rechts mit steigendem DS) sowie der durch Methylierung (Methyl- ι -Carrageenan) und Hydrolyse (ι -Carrageenan pH 3,2) modifizierten Derivate von ι -Carrageenan.
Heparin: Standardsubstanz

5.2.2.2.4 lineare β -1,4-D-Galactane (LuPS-sulfate)

Die LuPS-sulfate zeigten gegenüber IL-2 ähnliche Bindungseigenschaften wie gegenüber FGF-2. Wiederum konnten erst β -1,4-D-Galactane mit einem DS > 0,72 (LuPS S5) den Abbau von IL-2 hemmen. Zusätzliche Sulfatgruppen führten zu keiner weiteren Aktivitätssteigerung (LuPS S3).

Die selektive 6-O-Desulfatierung (LuPS S5 6DS) ging mit einem völligen Verlust der IL-2 bindenden Eigenschaften einher. Vermutlich trägt aber ebenso die Reduzierung des Gesamtsulfatgehalts zum Wirkungsverlust bei. Durch die Fluorierung eines LuPS-sulfates (LuPS F S1), die mit einer gewissen Lipophilieerhöhung verbunden ist, trat trotz des im Vergleich zu LuPS S5 nochmals erhöhten DS keine wesentliche Änderung der Aktivität auf. Im Gegensatz zur Interaktion mit FGF-2 waren β -1,4-D-Galactane mit Phosphat- statt

Sulfatgruppen nicht in der Lage, IL-2 vor dem proteolytischen Abbau zu schützen. Keines der LuPS-sulfate war in der Lage, den IL-2 Abbau so effektiv wie Heparin zu inhibieren.

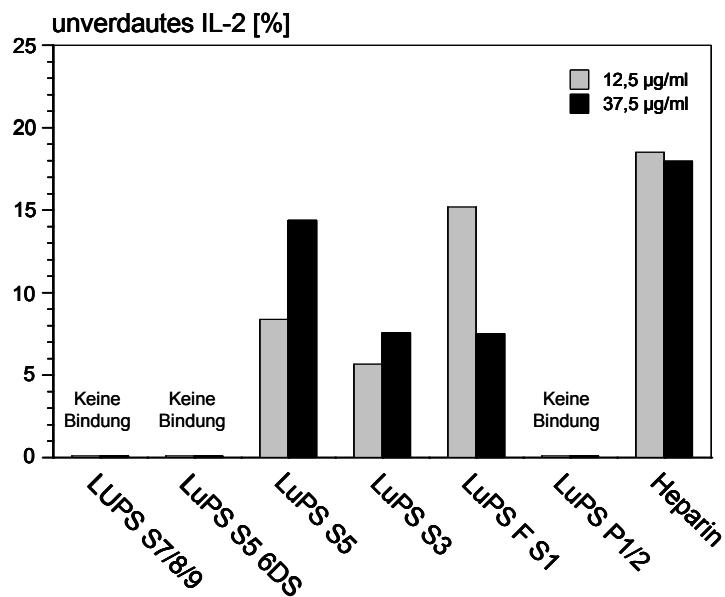


Abbildung 79: Effekte der LuPS-sulfate (von links nach rechts mit steigendem DS).

LuPS S5 6DS: selektiv in Position 6 desulfatiertes β -1,4-D-Galactansulfat; LuPS F S1: fluoriertes β -1,4-D-Galactansulfat; LuPS P1/2: phosphatiertes β -1,4-D-Galactan

Heparin: Standardsubstanz

5.2.2.2.5 α -1,4- und β -1,3-D-Galactane

α -Gal I_s S1 und α -Gal uI S1 konnten den Proteinabbau in vergleichbarem Maße hemmen und waren dem aus modifizierten Glucosemonomeren bestehendem Heparin gleichwertig bzw. sogar überlegen. Demnach waren weniger Molekulargewicht und Sulfatierungsgrad, sondern vielmehr die α -1,4-D-Galactangrundstruktur entscheidend für die ausgeprägte IL-2 Bindung. Demgegenüber zeigten die β -1,3-D-Galactane eine deutlich geringere Hemmung des Zytokinabbaus. Das lineare L_aPS S1 hatte die geringste Aktivität, die jedoch mit steigendem Molekulargewicht und Verzweigungsgrad zunahm.

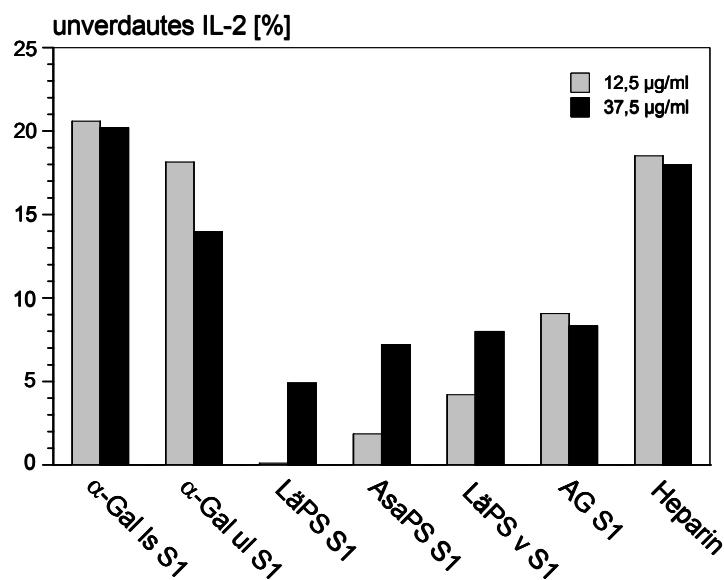


Abbildung 80: Effekte von α -1,4- und β -1,3-D-Galactanen im Trypsin-Verdau-Assay (IL-2).

α -Gal ls S₁, α -Gal ul S₁: α -1,4-D-Galactansulfate (von links nach rechts mit steigendem DS)

LäPS S₁: lineares β -1,3-D-Galactansulfat

AsaPS S₁, LäPS v S₁, AG S₁: β -1,3-D-Galactansulfate (von links nach rechts mit steigendem DS, MW und Verzweigungsgrad)

Heparin: Standardsubstanz

5.2.2.2.6 Glucane

Die Testung verschiedener Glucane zeigte, dass auch β -1,4 (Cellulose 2-3)- und β -1,3- bzw. β -1,3/ β -1,4-gebundene Glucosemonomere (LAM S5, LiPS IX) als Grundgerüst für IL-2 bindende Kohlenhydratsulfate geeignet sind.

Bei den Cellulosederivaten hatte lediglich das disulfatierte Polymer mit dem höchsten DS IL-2 protektive Eigenschaften. Die monosubstituierten Derivate (Cellulose O-2, Cellulose O-3) mit geringerem DS waren ohne Effekt.

Wie schon in den elektrophoretischen Untersuchungen mit FGF-2 waren erneut das β -1,3-D-Glucan LAM S5 und das β -1,3/ β -1,4-D-Glucan LiPS IX besonders aktiv und erzielten eine mit Heparin vergleichbare Wirkung.

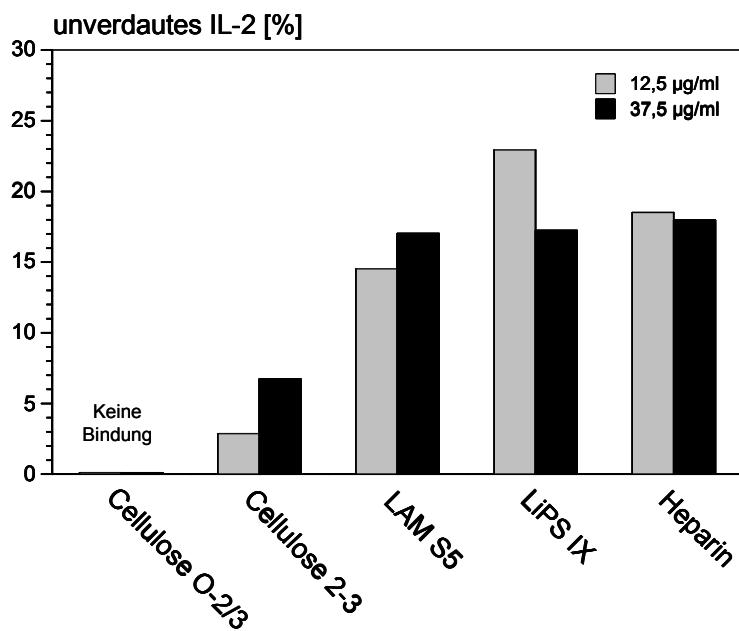


Abbildung 81: Effekte verschiedener Glucane im Trypsin-Verdau-Assay (IL-2).

Cellulose O-2, Cellulose O-3, Cellulose 2-3: β -1,4-D-Glucansulfate (von links nach rechts mit steigendem DS); LAM S5: β -1,3-D-Glucansulfat; LiPS IX: β -1,3/ β -1,4-D-Glucansulfat (Lichenanderivat)
Heparin: Standardsubstanz

5.2.2.2.7 Sonstige Kohlenhydrate

Die Untersuchungen von Najjam et al. hatten gezeigt, dass Fucoidan die Bindung von IL-2 an einen Heparin-BSA-Komplex stärker inhibiert als Heparin [220]. Im Widerspruch dazu stehen allerdings die Ergebnisse des Trypsin-Verdau-Assays, die für Fucoidan im Vergleich zu Heparin eine schwächere Hemmung ergaben. Diese Diskrepanz kann sowohl durch grundsätzliche Unterschiede in den Versuchsbedingungen (Reaktionspartner in Lösung \leftrightarrow immobilisiertes IL-2 (ELISA)) als auch im verwendeten Heparin (bovin \leftrightarrow porcin) und Fucoidan erklärt werden.

Pentosanpolysulfat (PPS) war von allen untersuchten Kohlenhydraten die Verbindung mit der ausgeprägtesten IL-2 protektiven Wirkung. Ein sulfatiertes Xylangrundgerüst ist damit effektiver als Heparin. Einen vergleichsweise guten Effekt zeigte auch Agarose S3, während Alginäure, die zwar unsulfatiert ist, jedoch negative Ladungsträger in Form von Carboxylgruppen enthält, nur noch schwach aktiv war. Wie schon die Testung der (inaktiven) LuPS-phosphate gezeigt hatte, können Sulfatgruppen nicht beliebig durch andere anionische Substituenten ersetzt werden.

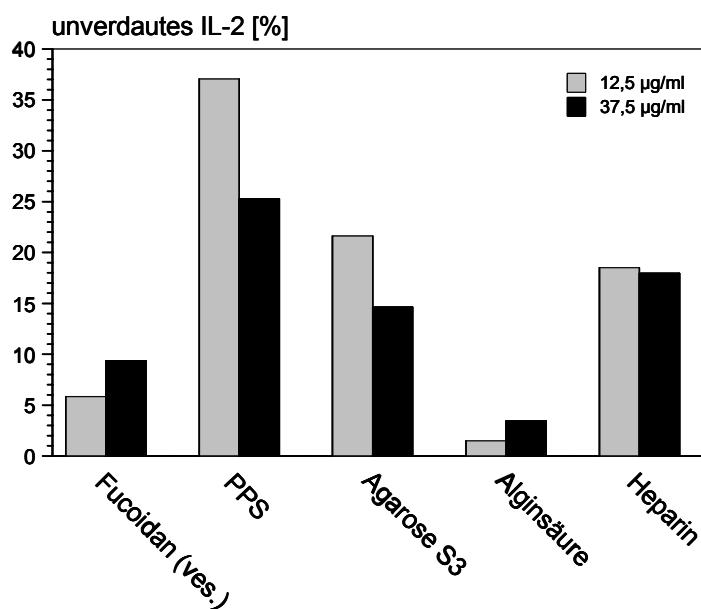


Abbildung 82: Effekte verschiedener Polysaccharide ohne Galactangrundgerüst.

Fucoidan (ves.): *Fucus vesiculosus* L.; PPS: Xylanpolysulfat; Agarose S3:

unselektiv sulfatiertes Agarosederivat

Heparin: Standardsubstanz

5.2.2.3 Zusammenfassung

Die Modifizierung des Trypsin-Verdau-Assays (FGF-2) ermöglicht Aussagen zur Bindungsfähigkeit von Kohlenhydratliganden an IL-2 als einem weiteren heparinbindenden Protein. Die Hemmung des IL-2 Abbaus durch Trypsin war bei den untersuchten Polysacchariden konzentrationsabhängig. Im Vergleich zur Testung mit FGF-2 weisen sowohl die ermittelten IC_{50} -Werte als auch die maximal möglichen Hemmeffekte (E_m) zusammen mit einer deutlich reduzierten Wirkdauer auf eine verringerte Affinität der Kohlenhydrate zu IL-2 im Vergleich zu FGF-2 hin.

Die Daten des Trypsin-Verdau-Assays mit IL-2 haben aufgrund der schwächer ausgeprägten Effekte der Testsubstanzen geringere Aussagekraft für eine mögliche *in vivo* Korrelation als die Ergebnisse des Trypsin-Verdau-Assays mit FGF-2.

In beiden Tests ergaben sich z.T. übereinstimmende Struktur-Wirkungsbeziehungen. Insbesondere zeigen unsulfatierte Polysaccharide keine Affinität zu IL-2 und FGF-2 (Ausnahme: Alginsäure).

Wie schon im Trypsin-Verdau-Assay (FGF-2) ist die Bindung an IL-2 meist vom Sulfatierungsgrad abhängig (α -1,3/ β -1,4-D-Galactane, LuPS-sulfate). Niedrig sulfatierte

Verbindungen (z.B. κ -Carrageenan und die davon abgeleiteten Oligosaccharide) sind inaktiv. Bei den Carrageenamen zeigten Polysaccharide mit einer 2-O-Sulfatierung der β -1,3-Galactose eine bevorzugte Bindung an IL-2. Die selektive Desulfatierung in Position 6 eines LuPS-sulfates führte, vermutlich gleichzeitig mit der Abnahme des Sulfatgehalts, zum Affinitätsverlust. Eine zusätzliche Fluorierung resultierte in keiner wesentlichen Änderung der inhibitorischen Aktivität (LuPS F S1). Wie auch die Testung phosphatisierter β -1,4-D-Galactane sowie der carboxylgruppen-haltigen Alginsäure zeigte, sind Sulfatgruppen nicht beliebig durch andere negative Ladungsträger zu ersetzen. Im Einzelfall kann eine Lipophilieerhöhung zu einer Wirkungsminderung führen (Methyl- ι -Carrageenan).

In der Gruppe der Galactane ist eine mit Heparin vergleichbare Wirkung insbesondere auch an die glykosidische Verknüpfungsart der Monomere gebunden. Besonders deutliche Effekte zeigten Polysaccharide mit α -1,3/ β -1,4 (λ -Carrageenan)- und α -1,4-Bindung (α -Gal ls S1, α -Gal ul S1). Hingegen ist ein β -1,3-D-Galactangrundgerüst der Heparinstruktur unterlegen, auch wenn eine Erhöhung von MW und Verzweigungsgrad mit einer Aktivitätssteigerung korreliert. Im Allgemeinen führt die Verminderung des Molekulargewichts zu inaktiven Verbindungen (niedermolekulare Derivate von ι -Carrageenan). Eine Ausnahme bildet das hochsulfatierte Saccharoseoctasulfat, das als einziges Oligosaccharid eine Affinität zu IL-2 besitzt.

Neben D-Galactansulfaten können auch Polysaccharide aus anderen Monomerbausteinen den Abbau von IL-2 mindestens in gleichem Maße wie Heparin hemmen. Die modifizierte Galactanstruktur des Agarosesulfats stellt keinen Nachteil für die Bindung an IL-2 dar. Eine deutlich höhere Aktivität als β -1,4-D-Glucane, deren protektive Eigenschaften DS-abhängig sind (Cellulose 2-3), zeigen sulfatierte β -1,3- und β -1,3/ β -1,4-D-Glucane (LAM S5, LiPS IX). Als besonders potenter Inhibitor des proteolytischen IL-2 Verdaus erwies sich allerdings die Xylansulfatstruktur von Pentosanpolysulfat (PPS).

5.2.3 Interaktion mit VEGF

Wie schon in Kapitel 4.4 dargelegt, nimmt VEGF in der Gefäßneubildung von Tumoren, insbesondere von Gliomen, eine Schlüsselrolle ein [256]. Lange wurde die Auffassung vertreten, dass VEGF seine physiologische Aktivität durch Interaktion mit nahezu ausschließlich auf EC exprimierten Rezeptoren ausübt. In jüngsten Untersuchungen konnte dagegen eine Coexpression von VEGF und VEGFR1/2 sowohl in nativem Tumorgewebe als auch in Tumorzellkulturen nachgewiesen werden. Darüberhinaus wurde eine VEGF-vermittelte Hemmung der Proliferation und Migration verschiedener humaner Tumorzellkulturen beobachtet. Dieser Mechanismus könnte eine „Schutzreaktion“ der Tumorzellen gegen Sauerstoff- und Nährstoffmangel in einem wachsenden Tumor sein [257]. Mit Ausnahme von VEGF₁₂₁ binden alle VEGF-Isoformen an Heparin oder Heparansulfate. Die Interaktion von VEGF₁₆₅ und Heparin ist für die Bindung an den Rezeptor erforderlich [258]. Im Gegensatz zur Interaktion mit FGF-2 und HGF ist für die Bindung an VEGF₁₆₅ kein hoher Gehalt an 2-O-Sulfatgruppen im GAG-Molekül erforderlich. Allerdings geht durch die Desulfatierung in Position 2 die mitogene Aktivität des Wachstumsfaktors gegenüber mit Chlorat behandelten HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) verloren [259].

Die Angiogenese in Gliomen ist darüber hinaus von weiteren Wachstumsfaktoren (z.B. FGF-2) abhängig, die die Aktivität von EC modulieren bzw. die VEGF Expression in Tumorzellen regulieren können [191]. Immunhistochemische Analysen zeigten erhöhte FGF-2-Spiegel in high-grade Gliomen verglichen mit low-grade Gliomen [260] sowie eine Korrelation zwischen FGF-2 Expression und Vaskularisierung [261]. Andere Arbeitsgruppen konnten dagegen, vermutlich aufgrund der unterschiedlichen Analysenmethoden, keinen Zusammenhang zwischen FGF-2-Konzentration und Malignitäts- bzw. Vaskularitätsgrad beobachten. Allerdings führte *in vitro* insbesondere der Zusatz FGF-2 neutralisierender Antikörper zu Gliomextrakten zur Inhibition der Lumenbildung von EC [262]. Substanzen, die an von Tumorzellen sezernierten FGF-2 binden, könnten so auch die durch den Wachstumsfaktor induzierte VEGF-Synthese der Tumorzellen inhibieren.

Nachdem in einem modifizierten CAM-Assay (TUM-CAM-Assay, s. Kapitel 4.4) bereits die Inhibition der U-87 MG zellinduzierten Angiogenese durch Heparin und strukturverwandte sulfatierte Kohlenhydrate untersucht, sowie deren FGF-2-Affinität bestimmt wurde (s. Kapitel 5.2.1), sollte *in vitro* deren Einfluss auf die VEGF₁₆₅-Bildung in U-87 MG Zellen untersucht werden.

5.2.3.1 Durchführung des Zellkultur-Assays

Um ausschließen zu können, dass eine mögliche Inhibition der VEGF-Synthese auf zytotoxischen Effekten der Testsubstanzen beruht, wurde zunächst der Einfluss der sulfatierten Kohlenhydrate bzw. Standardsubstanzen auf die Proliferationsrate der U-87 MG Zellen untersucht. Dazu wurden die U-87 MG Zellen in Mikrotiterplatten ausgesät und 48 h adhärieren lassen. Das verbrauchte Medium wurde durch neues Medium mit (EK = 50 µg/ml) oder ohne Testsubstanz (Kontrolle) ersetzt und die Zellmassen zur Bestimmung der Proliferationskinetik sofort bzw. nach 48, 72, 96, 120 und 144 h nach Kristallvioletfärbung photometrisch bestimmt.

Da die Testung unterschiedlicher Konzentrationen zu aufwendig war, wurde bewusst eine Testkonzentration = 50 µg/ml gewählt, die erfahrungsgemäß einem akzeptablen IC₅₀-Wert entspricht. In Abbildung 83 sind beispielhaft die Wachstumskinetiken behandelter und unbehandelter U-87 MG Zellen dargestellt. In Analogie zu Heparin, Thalidomid und LuPS S7 zeigte keine der getesteten Substanzen einen Einfluss auf die Proliferationsrate der Gliomazellen. Somit konnten zytotoxische Eigenschaften als Ursache einer möglichen Beeinflussung der VEGF-Synthese ausgeschlossen werden.

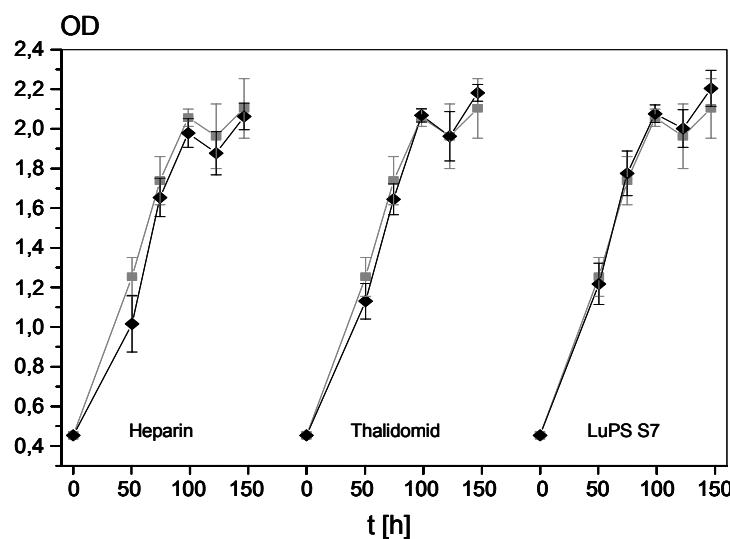


Abbildung 83: Wachstumskinetik von unbehandelten (■) und mit Heparin, Thalidomid oder dem β-1,4-D-Galactan LuPS S7 behandelten (◆) U-87 MG Zellen (EK = 50 µg/ml). Die optische Dichte bei 578 nm ist direkt proportional zur Zellmasse bzw. Zellzahl.

Nach 72, 120 und 144 h wurden aus mindestens 6 Kavitäten/Testsubstanz bzw. Kontrolle 150 µl Zellüberstand entnommen und der Gehalt an sezerniertem VEGF mittels ELISA bestimmt (s. Abbildung 84).

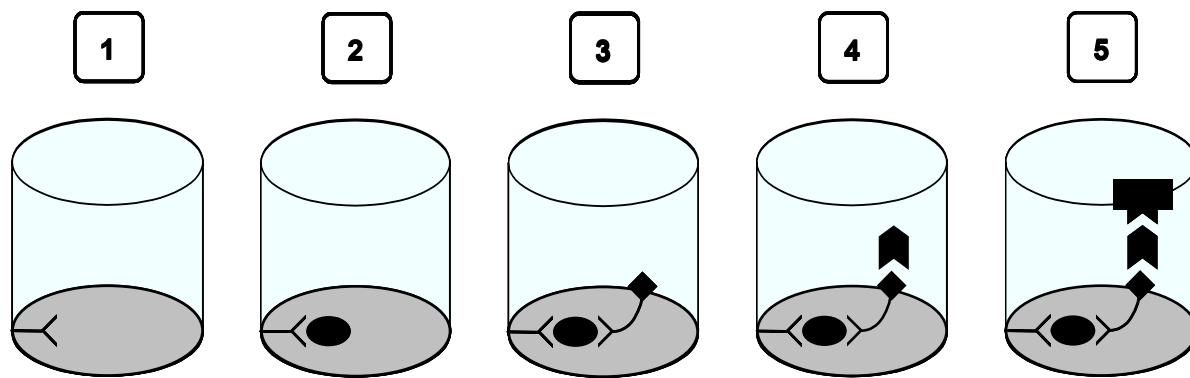


Abbildung 84: Durchführung des VEGF-ELISAs

- 1 Beschichten der Mikrotiterplatte mit 100 µl Anti-human VEGF AK
- 2 Zugabe von 100 µl Probe bzw. rhVEG₁₆₅, 2 h Inkubation
- 3 Zugabe von 100 µl biotinyliertem Anti-human VEGF AK, 2 h Inkubation
- 4 Zugabe von 100 µl Avidin-Peroxidase, 30 min Inkubation
- 5 Zugabe von 100 µl ABTS/H₂O₂, Messung der OD bei 405 nm nach 80 min

Dazu wurden die Zellkulturüberstände bzw. rhVEG₁₆₅ zu einer mit einem VEGF-spezifischen Antikörper (AK) beschichteten Mikrotiterplatte (MTP) zupipettiert. Um eine unspezifische Bindung des Wachstumsfaktors zu verhindern, wurden vorher freie Bindungsstellen mit Serumproteinen blockiert. Danach wurde ein biotinylierter VEGF₁₆₅ AK zugegeben, an den der Avidinrest der nachfolgend zugesetzten Peroxidase bindet. Nach Zusatz der Substratlösung (ABTS/H₂O₂) und 80minütiger Reaktion wurde die Absorption bei 405 nm im Mikrotiterplattenphotometer bestimmt.

Bei der enzymkatalysierten Redoxreaktion zwischen zwei Molekülen 2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS) und einem Molekül H₂O₂ entstehen zwei Moleküle eines Radikalkations (s. Abbildung 85), das selektiv Licht der Wellenlänge von 405 nm absorbiert (gelbgrüne Farbe).

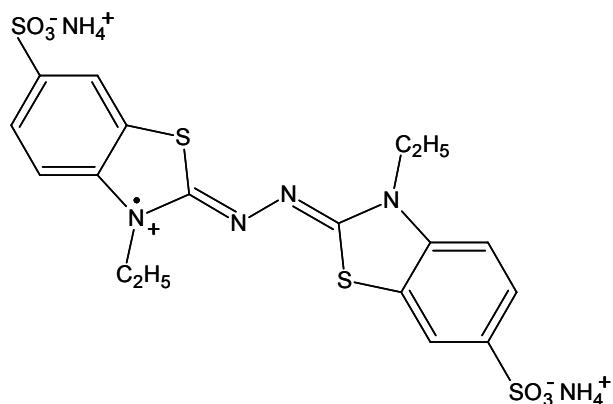


Abbildung 85: Struktur des bei der Oxidation von ABTS entstehenden Radikalkations [263]

Der VEGF-Gehalt der Proben [ng/ml] wurde aus der durch logarithmische Auftragung erhaltenen Kalibriergeraden des rhVEGF₁₆₅-Standards und seiner Verdünnungen bestimmt (s. Abbildung 88, Material und Methoden) und auf die Zellmasse (OD bei 578 nm) bezogen [ng/ml/OD]. Der Einfluss der Testsubstanzen auf die VEGF₁₆₅-Bildung der U-87 MG Zellen wurde als Stimulationsindex (SI) nach folgender Formel berechnet:

$$SI = \frac{\text{VEGF}_{165} \text{ (Testsubstanz) [ng/ml/OD]}}{\text{VEGF}_{165} \text{ (Kontrolle) [ng/ml/OD]}}$$

Ein SI > 1 gibt eine Steigerung, ein SI < 1 eine Reduktion der VEGF₁₆₅-Konzentration im Vergleich zu unbehandelten U-87 MG Zellen (Kontrolle) an.

5.2.3.2 Ergebnisse des Zellkultur-Assays

In der folgenden Abbildung ist der Einfluss von Heparin, Suramin und Thalidomid, die als Standardsubstanzen verwendet wurden, sowie einer Auswahl an Testsubstanzen auf die VEGF₁₆₅-Produktion von U-87 MG Zellen während einer 6tägigen Inkubationszeit dargestellt. Eine im Vergleich zur VEGF-Konzentration un behandelter Zellen (Kontrolle, Medium) auftretende Abweichung ist als Stimulationsindex (SI) angegeben.

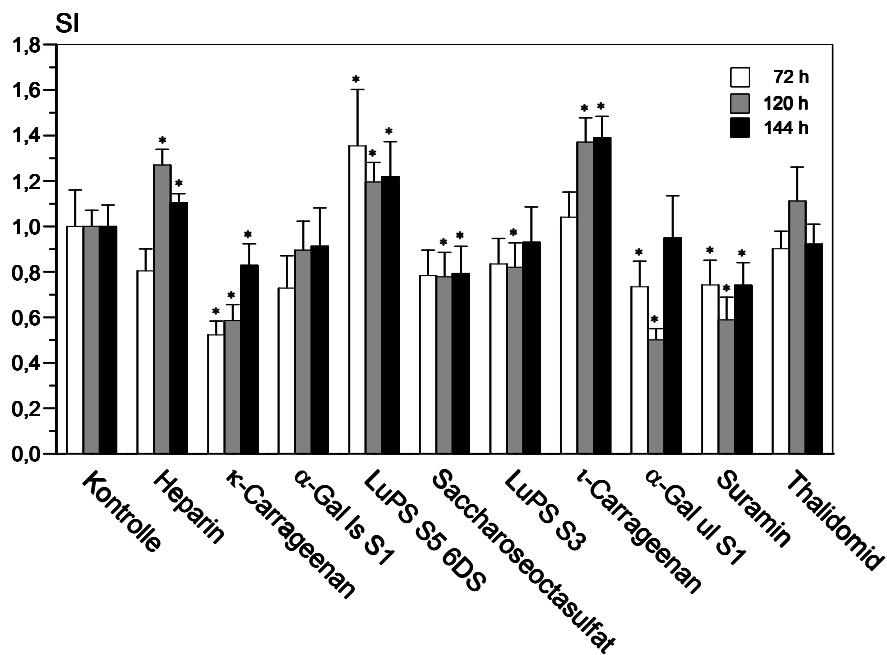


Abbildung 86: Effekte von Standardsubstanzen (Heparin, Suramin, Thalidomid) und einer Auswahl an Testsubstanzen im Zellkultur-Assay (von links nach rechts mit steigender *in vivo* Aktivität im TUM-CAM-Assay). Der Einfluss der getesteten Substanzen auf die VEGF-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle (mit Medium behandelte Zellen) ist als Stimulationsindex (SI) angegeben.

α-Gal ls S1, α-Gal ul S1: α-1,4-D-Galactansulfate
 LuPS S5 6DS, LuPS S3: β-1,4-D-Galactansulfate
 (* = p < 0,05 vs Kontrolle)

Obwohl κ-Carrageenan und Heparin keinen Effekt auf die gliomzellinduzierte Angiogenese *in vivo* haben, war für κ-Carrageenan *in vitro* eine deutliche VEGF-Abnahme zu beobachten, während Heparin eine Erhöhung der VEGF-Konzentration zeigte.

LuPS S5 6DS und Saccharoseoctasulfat in der Gruppe der *in vivo* nur mäßig aktiven Verbindungen zeigten widersprüchliche Effekte. Die Behandlung mit α-Gal ls S1 beeinflusste die VEGF-Synthese der Gliomzellen nicht.

Die *in vivo* aktiven Verbindungen LuPS S3 und Thalidomid waren *in vitro* ohne Effekt, während Suramin und α-Gal ul S1 eine zumindest bis zum 5. Behandlungstag (α-Gal ul S1) andauernde VEGF-Abnahme induzierten. Das im TUM-CAM-Assay hochaktive ι-Carrageenan führte zu einer Steigerung der VEGF-Konzentration im Zellkulturüberstand.

Tabelle 25 fasst die Ergebnisse des Zellkultur-Assays aller getesteter Substanzen im Vergleich zur *in vivo* Untersuchung im TUM-CAM-Assay zusammen. Dabei wurden Testsubstanzen im

Vergleich zur Kontrolle nur dann als verschieden angesehen, wenn sich die Stimulationsindices mindestens zweier Messzeitpunkte signifikant unterschieden.

Tabelle 25: Vergleich der Ergebnisse im Zellkultur-Assay und im TUM-CAM-Assay.

Zellkultur-Assay: -: [VEGF] ↑; 0: [VEGF] konstant; +: [VEGF] ↓

TUM-CAM -: keine Aktivität; TUM-CAM ±: mittlere Aktivität; TUM-CAM +: gute Aktivität (vgl. Tabelle 18)

(%): prozentualer Anteil der TS mit bestimmtem *in vitro* oder *in vivo* Effekt

Zellkultur	TUM-CAM – (31,0%)	TUM-CAM ± (44,8%)	TUM-CAM + (24,1%)
- (17,2%)	Heparin θ-Carrageenan Methyl-ι-Carrageenan ι-Carrageenan pH 3,2 LuPS F S1 Cellulose O-2 Cellulose 2-3 PPS	LuPS S5 6DS AG S1 LäPS v S1 LuPS S7 LuPS S8 LuPS S9 LuPS P1 LuPS P2 α-Gal ls S1 Cellulose O-3 Fucoïdan Agarose S3	ι-Carrageenan λ-Carrageenan LuPS S3 LAM S5 Thalidomid
0 (69,0%)			
+(13,8%)	κ-Carrageenan	Saccharoseoctasulfat	α-Gal ul S1 Suramin

Die Mehrzahl der getesteten Substanzen (69%) hatte keinen Einfluss auf die VEGF₁₆₅-Bildung der U-87 MG Zellen. Nur 50% der *in vitro* aktiven Substanzen (α-Gal ul S1, Suramin) zeigten auch *in vivo* hohe Aktivität. Allerdings ist das Wachstum der Tumorzellen in der Zellkultur im Gegensatz zur *in vivo* Situation nicht angiogeneseabhängig.

Der *in vivo* Effekt korreliert also nicht zwangsläufig mit einer VEGF-Reduktion *in vitro*. Folglich müssen bei der gliomzellinduzierten Angiogenese außer einer Beteiligung von VEGF noch weitere Wirkmechanismen zum Tragen kommen.

Ein nicht zu vernachlässigendes Problem stellt die Inhomogenität der Testsubstanzen dar, die Mischungen strukturell nicht exakt definierter Polysaccharide sind (Ausnahmen: Suramin, Thalidomid und Saccharoseoctasulfat). Es wird also stets die Summe der Effekte der einzelnen Komponenten beobachtet, die möglicherweise an unterschiedlichen Targets angreifen.

Unklar bleibt weiterhin, ob die Beeinflussung der VEGF-Produktion der Gliomazellen durch sulfatierte Kohlenhydrate z.B. auf der Komplexbildung mit VEGF bzw. FGF-2 (Hemmung der FGF-2 induzierten VEGF-Synthese), der Interaktion mit der VEGF-VEGFR-Bindung oder der Beeinflussung der Expression des Wachstumsfaktors nach intrazellulärer Aufnahme beruht. Dies müsste das Ziel weitergehender Untersuchungen sein.

Würde man den Zellkultur-Assay als *in vitro* Screeningmethode für potentielle Tumorangiogeneseinhibitoren einsetzen, werden 71,4% der *in vivo* hochaktiven Substanzen (λ -Carrageenan, ι -Carrageenan, LuPS S3, LAM S5, Thalidomid) bzw. nahezu alle Testsubstanzen mit mittlerer Aktivität ausgeschlossen. 11,1% der *in vivo* inaktiven Substanzen (κ -Carrageenan) werden fälschlicherweise erfasst.

5.2.3.3 Zusammenfassung

Der Zellkultur-Assay ist kein Ersatz für die Bestimmung der antiangiogenen Aktivität einer Verbindung im TUM-CAM-Assay und liefert nur begrenzte Hinweise auf mögliche VEGF-antagonistische Eigenschaften.

Die Verwendung komplexerer Zellkulturmodelle z.B. 3-dimensionaler Tumormodelle sollte aussagekräftigere Ergebnisse liefern. Diese verhalten sich in höherem Maße als herkömmliche 2-dimensionale Tumorzellkulturen wie *in vivo* Tumoren, da sie Zellen mit unterschiedlichem metabolischem und genetischem Heterogenitätsgrad enthalten.

5.3 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse der *in vitro* Assays

5.3.1 Vergleich U-87 MG Zellkultur-Assay mit Trypsin-Verdau-Assay (FGF-2)

Durch die Interaktion eines Kohlenhydratliganden mit FGF-2 kann möglicherweise die FGF-2 induzierte VEGF-Synthese moduliert werden. Deshalb wurden die Ergebnisse des Zellkultur-Assays mit den Resultaten des Trypsin-Verdau-Assays (FGF-2) verglichen, um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Bindung von Kohlenhydratliganden an FGF-2 und der VEGF-Produktion festzustellen (s. Tabelle 26).

Tabelle 26: Vergleich der Ergebnisse Zellkultur-Assay - Trypsin-Verdau-Assay (FGF-2).

Zellkultur-Assay: -: [VEGF] ↑; 0: [VEGF] konstant; +: [VEGF] ↓

Trypsin-Verdau-Assay (FGF-2): -: kein Schutz; ±: $IC_{50} \geq 0,15 \mu\text{g/ml}$, mittlere Affinität; +: $IC_{50} < 0,15 \mu\text{g/ml}$, hohe Affinität

(%): prozentualer Anteil der TS mit bestimmtem *in vitro* Effekt

Zellkultur	FGF-2 – (26,9%)	FGF-2 ± (42,3%)	FGF-2 + (30,8%)
- (19,2%)		ι-Carrageenan AG S1 LäPS v S1	Heparin LuPS S5 6DS
0 (69,2%)	ι-Carrageenan pH 3,2 LuPS S7 LuPS S8 LuPS S9 LuPS P2 Cellulose O-2	LuPS F S1 α-Gal ls S1 LAM S5 Fucoidan PPS Agarose S3	λ-Carrageenan θ-Carrageenan Methyl-ι-Carrageenan LuPS P1 Cellulose O-3 Cellulose 2-3
+	κ-Carrageenan (11,5%)	α-Gal ul S1 Saccharoseoctasulfat	

Der überwiegende Anteil der Testsubstanzen beeinflusste die VEGF-Produktion der U-87 MG Zellen nicht (69,2%) und zeigte gegenüber FGF-2 ein uneinheitliches Verhalten (keine Bindung - starke Bindung). Im Zellkultur-Assay aktive Substanzen (11,5%) hatten keine (33,3%) bzw. lediglich mittlere Affinität (66,7%) zu FGF-2. Testsubstanzen, die zu einer Erhöhung der VEGF-Synthese führten (19,2%) stellten im Trypsin-Verdau-Assay mäßige bis starke Bindungspartner für FGF-2 dar. Aus diesen Ergebnissen kann kein allgemein gültiger Zusammenhang zwischen einer möglichen Stabilisierung von FGF-2 durch Komplexbildung mit einem sulfatierten Kohlenhydrat und einer dadurch verstärkten oder verminderten VEGF-Synthese abgeleitet werden. In Analogie dazu besteht auch zwischen den Ergebnissen der Fluoreszenzuntersuchungen mit FGF-2 und dem Zellkultur-Assay kein kausaler Zusammenhang.

5.3.2 Vergleich Fluoreszenzuntersuchungen mit *in vivo* Assays

Die Ergebnisse der Fluoreszenzuntersuchungen mit FGF-2 wurden mit den Daten der *in vivo* Assays verglichen, um auf einen möglichen Wirkmechanismus der Testsubstanzen (Interaktion mit FGF-2) bzw. auf die Eignung des *in vitro* Tests als Screeningmethode schließen zu können.

Nur 26,2% der getesteten Substanzen waren im CAM-Assay ohne Effekt. Unabhängig von ihrer *in vivo* Aktivität zeigte die überwiegende Zahl der Testsubstanzen eine Interaktion mit FGF-2. Die im CAM-Assay aktivsten Verbindungen zeigten am häufigsten eine Bindung an den Wachstumsfaktor (s. Tabelle 27).

Tabelle 27: Vergleich der Ergebnisse im CAM-Assay und der Fluoreszenzuntersuchungen (Einzelheiten s. Tabelle 35/Anhang).

(%): prozentualer Anteil der TS mit bestimmtem *in vivo* bzw. *in vivo* und *in vitro* Effekt

		Fluoreszenz –	Fluoreszenz ±	Fluoreszenz +
26,2%	CAM -	27,3%	36,4%	36,4%
42,9%	CAM ±	22,2%	27,8%	50,0%
31,0%	CAM +	15,4%	7,7%	76,9%

Im HET-CAM-Assay zeigten zwar 90% der Testsubstanzen antiinflammatorische Aktivität, allerdings war kein eindeutiger Einfluss der Wechselwirkung mit FGF-2 auf den *in vivo* Effekt erkennbar. Der Anteil FGF-2 bindender Substanzen nahm mit steigender *in vivo* Aktivität zu (s. Tabelle 28).

Tabelle 28: Vergleich der Ergebnisse im HET-CAM-Assay und der Fluoreszenzuntersuchungen (Einzelheiten s. Tabelle 36/Anhang).

(%): prozentualer Anteil der TS mit bestimmtem *in vivo* bzw. *in vivo* und *in vitro* Effekt

		Fluoreszenz –	Fluoreszenz ±	Fluoreszenz +
10,0%	HET-CAM -	50,0%		50,0%
67,5%	HET-CAM ±	18,5%	33,3%	48,2%
22,5%	HET-CAM +	22,2%		77,8%

Wie schon im CAM- und HET-CAM-Assay war auch im TUM-CAM-Assay kein Zusammenhang zwischen *in vivo* Effekt und FGF-2 Interaktion festzustellen. In der Gruppe der

in vivo aktivsten Testsubstanzen war lediglich der Anteil hochaffiner Verbindungen am höchsten (s. Tabelle 29).

Tabelle 29: Vergleich der Ergebnisse im TUM-CAM-Assay und der Fluoreszenzuntersuchungen (Einzelheiten s. Tabelle 37/Anhang).

(%): prozentualer Anteil der TS mit bestimmtem *in vivo* bzw. *in vivo* und *in vitro* Effekt

		Fluoreszenz –	Fluoreszenz ±	Fluoreszenz +
34,6%	TUM-CAM -	22,2%	11,1%	66,7%
50,0%	TUM-CAM ±	23,1%	15,4%	61,5%
15,4%	TUM-CAM +	25,0%		75,0%

Die Fluoreszenzuntersuchungen gaben damit keine eindeutigen Hinweise auf einen möglichen Wirkmechanismus im CAM-, HET-CAM- und TUM-CAM-Assay.

Wie die Ergebnisse von HET-CAM-Assay und Fluoreszenzuntersuchungen beispielhaft zeigen sollen (s. Tabelle 30), ist diese *in vitro* Testung auch als Screeningmethode auf *in vivo* aktive Verbindungen wenig geeignet.

Tabelle 30: Relevanz der Ergebnisse der Fluoreszenzuntersuchungen für die Aktivität im HET-CAM-Assay.

(%): prozentualer Anteil der TS mit bestimmtem *in vitro* bzw. *in vitro* und *in vivo* Effekt

		HET-CAM -	HET-CAM ±	HET-CAM +
22,5%	Fluoreszenz –	22,2%	55,6%	22,2%
22,5%	Fluoreszenz ±		100%	
55,0%	Fluoreszenz +	9,1%	59,1%	31,8%

55,0% der Testsubstanzen hatten gute FGF-2 bindende Eigenschaften. Allerdings war dies nur ein bedingter Hinweis auf eine gute *in vivo* Aktivität, da die Testsubstanzen unabhängig von ihrer Affinität zu FGF-2 überwiegend mittlere entzündungshemmende Wirkung zeigten.

Zwar sind nur 9,1% der *in vitro* aktiven Substanzen *in vivo* inaktiv (entsprechend 50,0% aller *in vivo* inaktiven Substanzen), allerdings zeigen nur 31,8% der *in vitro* aktiven TS auch *in vivo* gute Aktivität (entsprechend 77,8% der *in vivo* aktiven Testsubstanzen). Diese

Screeningmethode erfasst also ca. 20% der *in vivo* aktiven TS nicht, jedoch 50% der TS ohne biologische Aktivität (s. Tabelle 28).

Im CAM- und TUM-CAM-Assay war in Analogie zum HET-CAM-Assay ebenfalls kein Rückschluss von der *in vitro* auf die *in vivo* Aktivität möglich.

5.3.2.1 Gesamtbeurteilung

Die Untersuchung einer möglichen Bindung von Kohlenhydraten an FGF-2 mittels Fluoreszenzspektroskopie lässt keine eindeutige Schlussfolgerung auf deren Wirkmechanismus zu. Die meisten Testsubstanzen zeigen eine Interaktion mit FGF-2 (Fluoreszenz -: 20,9%; Fluoreszenz \pm : 25,6%; Fluoreszenz +: 53,5%, s. Tabelle 23). Jedoch kann daraus nicht auf die Aktivität *in vivo* geschlossen werden. Zwar zeigen die *in vivo* (CAM-, HET-CAM-, TUM-CAM-Assay) aktivsten Substanzen am häufigsten eine Wechselwirkung mit FGF-2, dennoch stellt die Änderung der Fluoreszenzeigenschaften des Tryptophanrestes im FGF-2 Molekül nach Bindung eines Liganden an basische Aminosäurereste einen relativ unspezifischen prognostischen Faktor für die *in vivo* Aktivität dar. Als Screeningmethode ist die Fluoreszenzuntersuchung wenig geeignet, da maximal 78% der *in vivo* aktiven Substanzen entdeckt werden, dagegen aber bis zu 67% der *in vivo* inaktiven Verbindungen nicht ausgeschlossen werden.

5.3.3 Vergleich Trypsin-Verdau-Assays (FGF-2, IL-2) mit *in vivo* Assays

Die Gegenüberstellung der Ergebnisse der Trypsin-Verdau-Assays und der Daten der *in vivo* Assays sollte einen möglichen Zusammenhang zwischen der *in vivo* Aktivität einer Substanz und ihrer Wechselwirkung mit FGF-2 und IL-2 verdeutlichen.

Im Unterschied zu den Fluoreszenzuntersuchungen, die für viele Testsubstanzen eine Bindung an FGF-2 bestätigten, wurde im Trypsin-Verdau-Assay ein Effekt mit physiologischer Bedeutung untersucht (Schutz von FGF-2 bzw. IL-2 vor dem proteolytischen Abbau). Damit sollten die Ergebnisse der Trypsin-Verdau-Assays höhere Aussagekraft für einen möglichen Wirkmechanismus der Testsubstanzen und für die Vorhersagbarkeit der *in vivo* Wirkung haben.

Hinsichtlich ihrer *in vitro* Aktivität wurden die Testsubstanzen nur noch in aktive (+: Affinität zu FGF-2 bzw. IL-2) und inaktive Verbindungen (-: keine Affinität zu FGF-2 bzw. IL-2) eingeteilt.

Die im CAM-Assay hoch aktiven Verbindungen zeigten sowohl eine Interaktion mit FGF-2 als auch mit IL-2 (92,9%). Die meisten *in vivo* inaktiven Verbindungen waren dagegen auch *in vitro* ohne Effekt. In der Gruppe mit mittlerer antiangiogener Wirkung war eine Bindung an FGF-2 und IL-2 nicht zwingend (s. Tabelle 31).

Tabelle 31: Vergleich der Ergebnisse im CAM-Assay und der Trypsin-Verdau-Assays (Einzelheiten s. Tabelle 38/Anhang).

(%): prozentualer Anteil der TS mit bestimmtem *in vivo* bzw. *in vivo* und *in vitro* Effekt

	FGF-2 - IL-2 -	FGF-2 - IL-2 +	FGF-2 + IL-2 -	FGF-2 + IL-2 +
25,6% CAM -	81,8%		9,1%	9,1%
41,9% CAM ±	44,4%		11,1%	44,4%
32,6% CAM +			7,1%	92,9%

Die Korrelation zwischen *in vivo* und *in vitro* Aktivität war im HET-CAM-Assay noch deutlicher. Alle Testsubstanzen mit guter antiinflammatorischer Wirkung inhibierten sowohl den Abbau von FGF-2 als auch von IL-2 durch Trypsin. Inaktive bzw. mäßig aktive Verbindungen verhielten sich dagegen *in vitro* uneinheitlich (s. Tabelle 32).

Tabelle 32: Vergleich der Ergebnisse im HET-CAM-Assay und der Trypsin-Verdau-Assays (Einzelheiten s. Tabelle 39/Anhang).

(%): prozentualer Anteil der TS mit bestimmtem *in vivo* bzw. *in vivo* und *in vitro* Effekt

	FGF-2 - IL-2 -	FGF-2 - IL-2 +	FGF-2 + IL-2 -	FGF-2 + IL-2 +
10,0% HET-CAM -	50,0%		50,0%	
67,5% HET-CAM ±	55,6%		7,4%	37,0%
22,5% HET-CAM +				100%

Für einen Effekt im TUM-CAM-Assay war die Interaktion mit FGF-2 und IL-2 nur von untergeordneter Bedeutung. Zwar waren *in vivo* hoch aktive Substanzen stets protektiv gegenüber FGF-2 und IL-2, jedoch war in der Gruppe der mäßig aktiven bis inaktiven

Verbindungen ein ähnlicher Trend zu beobachten (s. Tabelle 33). Möglicherweise sind *in vivo* noch andere Wirkmechanismen involviert.

Tabelle 33: Vergleich der Ergebnisse im TUM-CAM-Assay und der Trypsin-Verdau-Assays (Einzelheiten s. Tabelle 40/Anhang).

(%): prozentualer Anteil der TS mit bestimmtem *in vivo* bzw. *in vivo* und *in vitro* Effekt

	FGF-2 - IL-2 -	FGF-2 - IL-2 +	FGF-2 + IL-2 -	FGF-2 + IL-2 +
33,3% TUM-CAM -	33,3%			66,7%
48,2% TUM-CAM ±		30,8%	23,1%	46,2%
18,5% TUM-CAM +				100%

Wie schon bei den Fluoreszenzuntersuchungen mit FGF-2 zeigen erneut die *in vivo* (CAM-, HET-CAM-, TUM-CAM-Assay) aktivsten Substanzen am häufigsten eine Wechselwirkung sowohl mit FGF-2 als auch mit IL-2, die jedoch im TUM-CAM-Assay weniger relevant ist.

Im Folgenden wurde der Frage nachgegangen, ob der Trypsin-Verdau-Assay mit FGF-2 und IL-2 eine geeignete Screeningmethode für potentielle Angiogeneseinhibitoren im CAM-, HET-CAM- und TUM-CAM-Assay darstellt. Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse von *in vitro* und *in vivo* Assays am Beispiel des HET-CAM-Assays.

Tabelle 34: Relevanz der Ergebnisse der Trypsin-Verdau-Assays für die Aktivität im HET-CAM-Assay.

(%): prozentualer Anteil der TS mit bestimmtem *in vitro* bzw. *in vitro* und *in vivo* Effekt

	HET-CAM -	HET-CAM ±	HET-CAM +
42,5% FGF -	11,8%		88,2%
IL-2 -			
FGF -			
IL-2 +			
10,0% FGF +	50,0%		50,0%
IL-2 -			
47,5% FGF +		52,6%	47,4%
IL-2 +			

Nur die Interaktion sowohl mit FGF-2 als auch mit IL-2 führte zu Verbindungen mit guter *in vivo* Wirkung. Findet nur eine Interaktion mit FGF-2 bzw. keine Interaktion mit beiden

Proteinen statt, sind die Substanzen *in vivo* mäßig aktiv bis inaktiv. Bei einem *in vitro* Screening (FGF-2 +, IL-2 +) werden demnach 100% der Verbindungen mit guter bzw. 37,0% der Testsubstanzen mit mittlerer *in vivo* Aktivität erfasst. Substanzen ohne antiinflammatorisches Potential werden vollständig ausgeschlossen (s. Tabelle 32).

Ähnlich gut ist die Vorhersagbarkeit für die Aktivität der Substanzen im CAM-Assay. 92,9% der hoch aktiven und 44,4% der mäßig aktiven Angiogeneseinhibitoren werden mit diesem *in vitro* Screening aufgefunden. Inaktive Verbindungen werden nur in geringem Umfang (9,1%) fälschlicherweise nicht ausgeschlossen (s. Tabelle 31).

Als Screeningmethode für Inhibitoren der tumorzellinduzierten Angiogenese ist die Kombination der beiden Trypsin-Verdau-Assays wenig geeignet, da damit zwar alle *in vivo* aktiven Substanzen bzw. 46,2% der Verbindungen mit mittlerer Aktivität, gleichzeitig aber auch 66,7% der *in vivo* inaktiven Testsubstanzen erfasst werden (s. Tabelle 33).

5.3.3.1 Gesamtbeurteilung

Eine Interaktion sowohl mit FGF-2 als auch mit IL-2 scheint nach den vorliegenden Ergebnissen ein möglicher Wirkmechanismus von Substanzen mit hoher *in vivo* Aktivität im CAM- und im HET-CAM-Assay zu sein. Im TUM-CAM-Assay sind vermutlich noch weitere Mechanismen von Bedeutung. Die Kombination der beiden Trypsin-Verdau-Assays ist insbesondere als Screeningmethode vor einer aufwendigen *in vivo* Testung im HET-CAM-Assay und auch im CAM-Assay geeignet.

Mit dem Trypsin-Verdau-Assay (FGF-2, IL-2) steht somit eine kostengünstige und mit relativ geringem Aufwand verbundene *in vitro* Methode für Screeningzwecke potentieller Inhibitoren von Angiogenese und chronischer Entzündung zur Verfügung, die wertvolle Hinweise auf mögliche Wirkmechanismen liefern kann. Im Unterschied zum Zellkultur-Assay für VEGF wird die Aussagekraft der elektrophoretischen Tests durch die Inhomogenität der Testsubstanzen nicht vermindert.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Poly- und Oligosaccharide, die sich überwiegend von Galactansulfaten ableiten, auf ihre antiangiogene Aktivität *in vivo* (CAM-Assay und Modifikationen) und spezielle Wirkmechanismen *in vitro* (Interaktion mit FGF-2, IL-2 und VEGF) untersucht. Die Gesamtergebnisse stellten die Grundlage zur Entwicklung eines Screeningschemas potentieller Angiogeneseinhibitoren dar.

6.1 *In vivo* Testung

6.1.1 CAM-Assay

Da die antiangiogene Aktivität einiger Testsubstanzen noch unbekannt war, wurde diese im CAM-Assay nach Vogl bestimmt [112]. Die Untersuchungen zeigten, dass nicht nur polymere Galactansulfate [112], sondern auch hochmolekulare Glucane, Fucane, Xylane sowie Heparin, Alginsäure und niedermolekulare Galactansulfate in einer Konzentration von 50 µg/Pellet die Angiogenese inhibieren können. Die beobachteten Effekte sind dosisabhängig. Die strukturelle Variabilität der getesteten Heparine und Fucoidane spiegelt sich in der unterschiedlichen antiangiogenen Aktivität wieder.

6.1.2 HET-CAM-Assay

Zur Beurteilung der Inhibition der chronisch entzündlichen Angiogenese wurde der HET-CAM-Assay nach Marchesan und Paper herangezogen [114]. Die Testsubstanzen zeigten in Abhängigkeit von Dosis und strukturellen Parametern Entzündungshemmung. Die Aktivität der Galactansulfate wird in erster Linie nicht durch den Sulfatierungsgrad, sondern vielmehr durch die Position der Sulfatgruppe(n) und das Kohlenhydratgrundgerüst bestimmt. Der biologische Effekt ist nicht an Sulfatgruppen als negative Ladungsträger gebunden. Ebenso kann das Galactangrundgerüst durch Polyglucane, -fucane und -xylane ersetzt werden.

6.1.3 TUM-CAM-Assay

Mit der Etablierung und Validierung des TUM-CAM-Assays konnte der Einfluss der Testsubstanzen auf die gliomazellinduzierte Angiogenese untersucht werden. Die Wirkung der Testsubstanzen ist sowohl konzentrations- als auch strukturabhängig. Insbesondere ist die Position der Sulfatgruppen, die nicht beliebig durch andere negativ geladene Gruppen ersetzt werden können, und das Kohlenhydratgrundgerüst aus Galactose-, Fucose- oder Glucosemonomeren für die *in vivo* Aktivität ausschlaggebend. Der TUM-CAM-Assay stellt darüber hinaus einen universell einsetzbaren modifizierten CAM-Assay insbesondere für die Testung unterschiedlichster Tumorzellen oder thermolabiler Agenzien (z.B. peptidischer Wachstumsfaktoren) dar. Durch die Überprüfung spezifischer Mediatoren kann die Relevanz von *in vitro* Wirkmechanismen beurteilt werden (vgl. FGF-2-CAM-Assay).

6.2 *In vitro* Testung

6.2.1 Interaktion mit FGF-2

Die Bindung der Testsubstanzen an FGF-2 wurde mit unterschiedlichen Analysenmethoden untersucht.

Die **Gelpermeationschromatographie** ist zum Nachweis des Protein-Kohlenhydrat-Komplexes geeignet, auch wenn deren Anwendbarkeit insbesondere durch den hohen Proteinbedarf limitiert ist.

Die **Fluoreszenzuntersuchungen** stellen eine äußerst sensitive Nachweismethode der Bindung von Kohlenhydraten an bestimmte Proteinbereiche dar und ermöglichen die Bestimmung der Bindungsstärke (Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D). Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl ionische (negative Ladungsträger z.B. Sulfatgruppen) als auch hydrophobe Wechselwirkungen (Kohlenhydratgrundgerüst) zur Bindung an FGF-2 beitragen. Allerdings besteht kein Zusammenhang zwischen den *in vitro* und den *in vivo* Ergebnissen.

Der **Trypsin-Verdau-Assay** ermöglicht die Beurteilung der Affinität (IC_{50}) der Testsubstanzen zu FGF-2 sowie der Stabilität (E_m) des gebildeten Komplexes. Zudem kann die Dauer der protektiven Wirkung bestimmt werden. Durch Substanzkombinationen wird kein additiver Effekt erzielt, da die Kohlenhydratliganden mit identischen Proteinbindungsstellen interagieren. Die Aktivität der Testsubstanzen ist z.T. abhängig vom Substitutionsgrad (β -1,4-, α -1,4-D-Galactane). Insbesondere sind fehlende Sulfatgruppen oder ein zu geringes Molekulargewicht für die Wirkungslosigkeit der Testsubstanzen verantwortlich. *In vitro*

Effekte sind nicht ausschließlich an ein Galactangrundgerüst (auch Polyfucane, -xylane, -glucane möglich), oftmals aber an bestimmte Positionen der Sulfatgruppen (Carrageenane, β -1,4-D-Galactane) gebunden.

6.2.2 Interaktion mit IL-2

Durch die Entwicklung eines modifizierten Trypsin-Verdau-Assays (IL-2) konnten die Bindungseigenschaften der Testsubstanzen gegenüber IL-2 als weiterem heparinbindendem Protein untersucht werden. Die Affinität der Testsubstanzen zu IL-2 im Vergleich zu FGF-2 ist trotz ähnlicher Struktur-Wirkungsbeziehungen deutlich geringer. Insbesondere zeigen erneut unsulfatierte Polysaccharide und niedermolekulare Carrageenanderivate keinen Effekt. Für die Bindung eines Kohlenhydratliganden ist demnach nicht nur die Interaktion mit basischen Aminosäuren der Heparinbindungsstelle im Protein, sondern vielmehr auch die optimale räumliche Anordnung entscheidend.

Die Kombination aus Trypsin-Verdau-Assay (FGF-2) [127,128] und dem neu entwickelten Trypsin-Verdau-Assay (IL-2) erwies sich als geeignete *in vitro* Screeningmethode für potentiell aktive Kohlenhydrate im CAM- und insbesondere im HET-CAM-Assay. Die *in vivo* Aktivität ist demnach u.a. auf die Interaktion mit FGF-2 und IL-2 zurückzuführen.

6.2.3 Interaktion mit VEGF

Im Zellkultur-Assay wurde der Einfluss der Testsubstanzen auf die VEGF-Bildung von U-87 MG Zellen untersucht. Die Testsubstanzen sind nicht zytotoxisch, zeigen jedoch überwiegend auch keinen Einfluss auf die VEGF-Synthese der Gliomazellen. Eine Übereinstimmung der *in vitro* mit den *in vivo* Ergebnissen im TUM-CAM-Assay bzw. der FGF-2 Affinität war nicht festzustellen.

6.3 Screening

Unter Berücksichtigung aller *in vivo* und *in vitro* Assays sollte bei der Testung potentieller Angiogeneseinhibitoren nach folgendem Screeningschema vorgegangen werden.

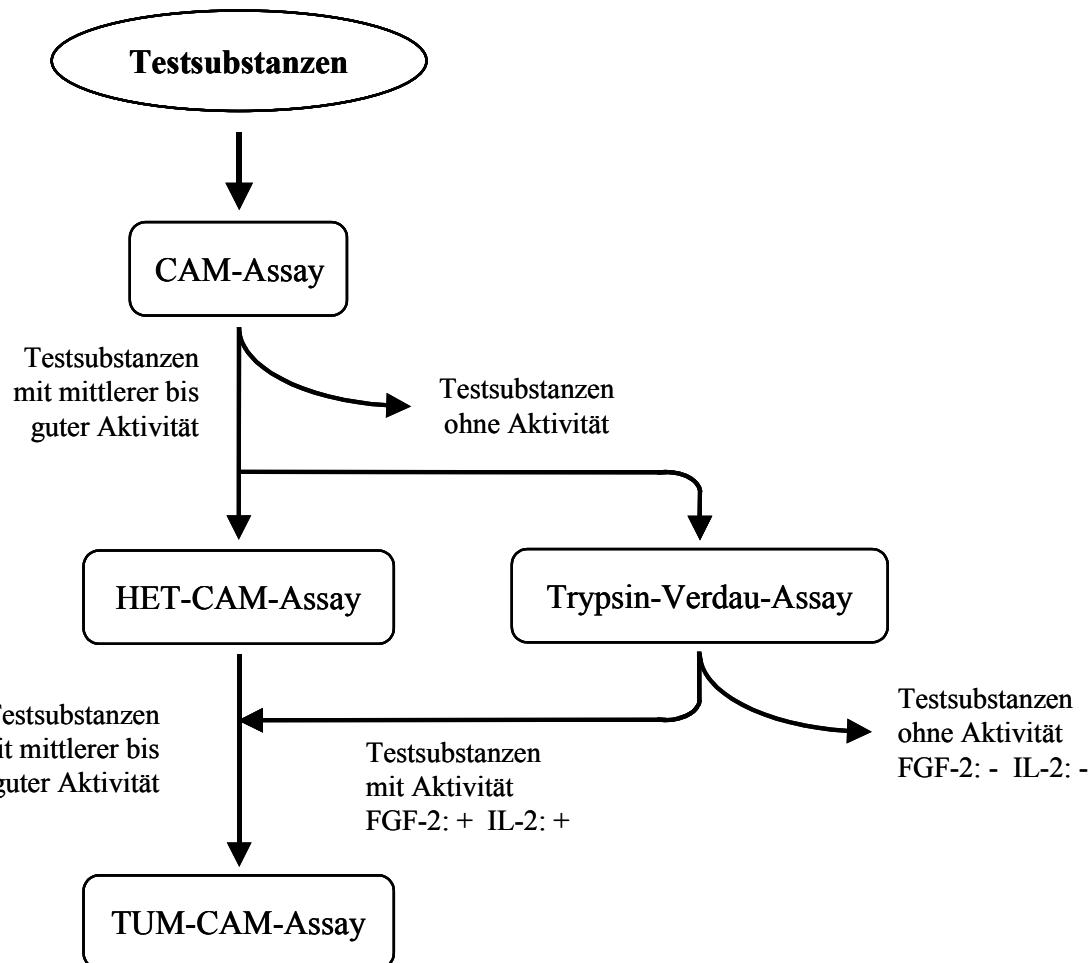


Abbildung 87: modifiziertes Screeningschema potentieller Angiogeneseinhibitoren
 FGF-2: -/+ keine Aktivität/Aktivität im Trypsin-Verdau-Assay (FGF-2)
 IL-2: -/+ keine Aktivität/Aktivität im Trypsin-Verdau-Assay (IL-2)

Nach der Eingangstestung im CAM-Assay, die zusätzliche Hinweise auf mögliche Nebeneffekte liefert, werden die aktiven Testsubstanzen im HET-CAM-Assay und/oder im Trypsin-Verdau-Assay (FGF-2, IL-2) auf ihr antiinflammatorisches Potential bzw. auf mögliche Wirkmechanismen untersucht, bevor die tumorantiangiogenen Eigenschaften der verbleibenden aktiven Verbindungen bestimmt werden.

Die Testung in den unterschiedlichen Modifikationen des CAM-Assays erwies sich als relativ schnelle Screeningmethode für potentielle Inhibitoren der pathologischen Angiogenese (s. Tabelle 21).

Ob das Screeningschema außer für die getesteten sulfatierten Kohlenhydrate, denen überwiegend ein Galactangrundgerüst zugrunde liegt, auch für andere Substanzklassen z.B. Extrakte gültig ist, müssten weitere Untersuchungen zeigen.

6.4 Therapeutische Relevanz

Auch wenn im Rahmen dieser Arbeit lediglich die antiangiogene Aktivität der Testsubstanzen *in vivo* gezeigt wurde, die möglicherweise nicht mit der Aktivität im Tiermodell oder im menschlichen Organismus korreliert, stellt sich die Frage, welche Relevanz die gewonnenen Ergebnisse für eine mögliche therapeutische Anwendung besitzen.

Da aufgrund der zahlreichen negativ geladenen funktionellen Gruppen eine Resorption nach der zu bevorzugenden oralen Applikation nicht in ausreichendem Maße zu erwarten ist und eine systemische Verabreichung aufgrund möglicher Blutgerinnungsstörungen äußerst fraglich ist, sollten die sulfatierten Polysaccharide lokal appliziert werden. Denkbar wäre der topische Einsatz bei entzündlichen Erkrankungen der Haut (Psoriasis) oder zur Rezidivbehandlung maligner Melanome. Auch der prophylaktische bzw. therapeutische Einsatz bei entzündlichen Darmerkrankungen oder malignen Tumoren des Gastrointestinaltrakts bzw. die lokale Therapie nach operativer Entfernung eines Hirntumors ist vorstellbar.

7 Material und Methoden

7.1 Standardsubstanzen

Mit Ausnahme des Heparins NA (Heparin NA, porcine intestinal mucosa #73508019, Novartis, Nürnberg) wurden alle verwendeten Heparine von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen bezogen:

Heparin	Heparin H-5767, Na-Salz (bovine intestinal mucosa)
Heparin p	Heparin H-7005 GradeII/Na-Salz (porcine intestinal mucosa)
Heparin LMW	LMW-Heparin H-5271, Na-Salz (bovine intestinal mucosa)
Suramin	Na-Salz, Calbiochem-Novabiochem GmbH, Schwalbach
(±)-Thalidomid	Calbiochem-Novabiochem GmbH, Schwalbach
Hydrocortison	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

7.2 Nicht synthetisierte Testsubstanzen, Chemikalien und Lösungsmittel

Alle nicht synthetisierten Verbindungen, mit Ausnahme von Agarose (Fa. Merck, Darmstadt), wurden bei der Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen bezogen.

Fucoidan (lam.) von *Laminaria saccharina* (L.) Lam. und Fucoidan (ev.) von *Fucus evanescens* C.Ag. stammten von Dr. N. E. Nifantiev (N.D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moskau, Russia).

Der Wachstumsfaktor FGF-2 wurde von Prof. Dr. R. J. Linhardt (Department of Chemical and Biochemical Engineering, University of Iowa, Iowa City, USA) zur Verfügung gestellt.

FGF-2 und IL-2 für den Trypsin-Verdau-Assay wurden von Strathmann Biotech GmbH, Hannover bezogen.

Falls nichts anderes angegeben ist, wurden Chemikalien und Lösungsmittel der Fa. Merck, Darmstadt in p.A. Qualität verwendet.

Es wurde grundsätzlich mit dem Gerät Milli-Q UF Plus (Fa. Millipore) aufbereitetes Wasser mit einer Leitfähigkeit von 18,2 MΩcm verwendet.

7.3 Testsubstanzen

7.3.1 Polysaccharide

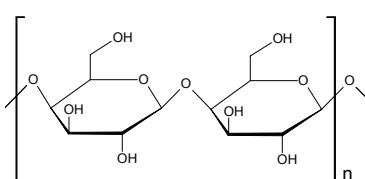
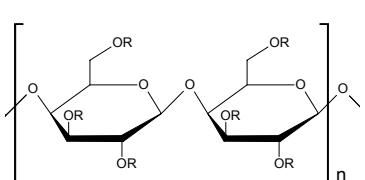
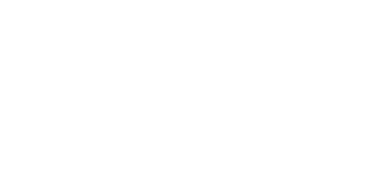
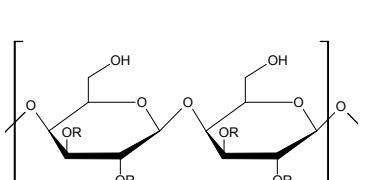
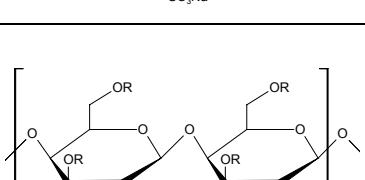
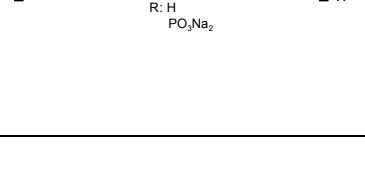
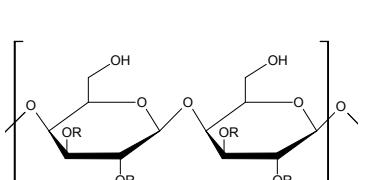
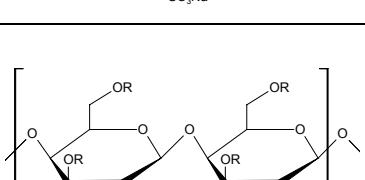
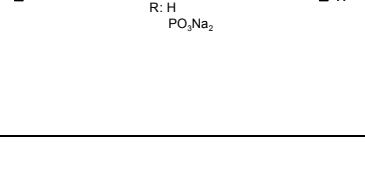
7.3.1.1 Galactane

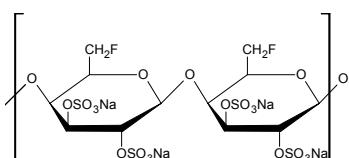
7.3.1.1.1 lineare α -1,3/ β -1,4-D-Galactane (Carrageenane)

Name	Struktur	MW [kDa]	DS
λ -Carrageenan-Na (λ -C)		≈ 350	0,92
$n \approx 1000$			
θ -Carrageenan-Na (θ -C)		≈ 350	0,81
$n \approx 1000$			
κ -Carrageenan-Na (κ -C)		≈ 350	0,43
$n \approx 1000$			
ι -Carrageenan-Na (ι -C)		≈ 350	0,70
$n \approx 1000$			
Methyl- ι -Carrageenan-Na (Methyl- ι -C)		>100	0,70
$n > 200$			
ι -Carrageenan pH 3,2 (ι -C pH 3,2)		20	n.b.

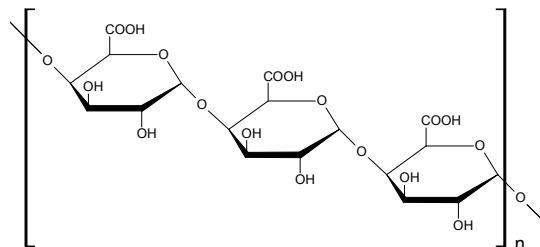
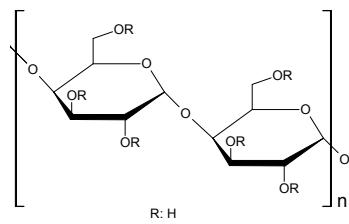
Name	MW [kDa]	Sulfatgehalt
ι -Carrageenan, fraktioniert		
D3	1,7	27,1 %
D4	1,8	30,5 %
D5	2,4	33,5 %
D6	3,9	31,9 %
D7	4,7	34,1 %

7.3.1.1.2 lineare β -1,4-D-Galactane

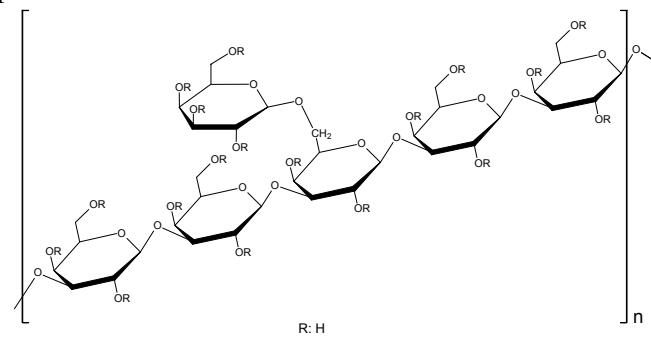
Name	Struktur	MW [kDa]	DS
β -Galactan	 $n \approx 11$	ca. 4	-
LuPS S3	 $n \approx 18$	10	1,65
LuPS S5	 $n \approx 45$	25	1,48
LuPS S7	 $n \approx 40$	12	0,27
LuPS S8	 $n \approx 40$	19	0,53
LuPS S9	 $n \approx 40$	20	0,72
LuPS S5 6DS	 $n \approx 45$	20	0,74
LuPS P1	 $n \approx 40$	23	0,81
LuPS P2	 $n \approx 36$	15	0,40

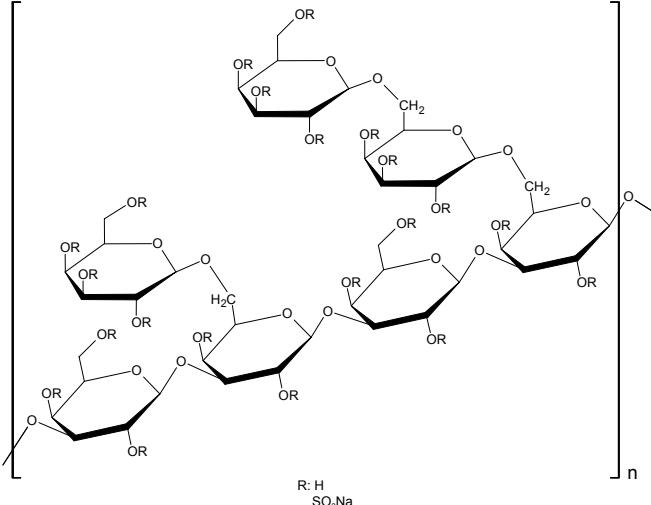
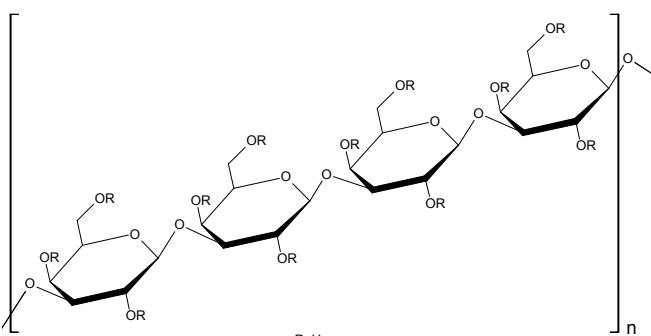
Name	Struktur	MW [kDa]	DS
LuPS F S1	 $n \approx 45$	30	1,75 (Sulfat) 0,63 (Fluorid)

7.3.1.1.3 lineare α -1,4-D-Galactane

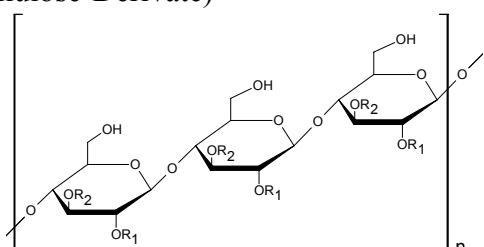
Polygalacturonsäure (PGA)	 $n \approx 67$	100	-
α -Galactan ls S1 (α -Gal ls S1)	 R: H SO_3Na	n ≈ 24	13,5
α -Galactan ul S1 (α -Gal ul S1)		n ≈ 36	23,5
			1,29
			1,76

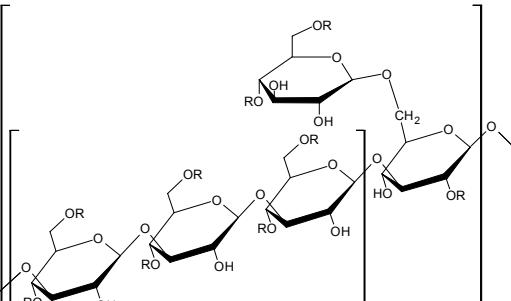
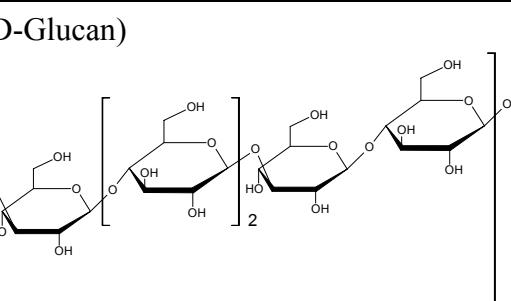
7.3.1.1.4 β -1,3-D-Galactane

AsaPS S1	 R: H SO_3Na	8	1,70
		$n \approx 5$	

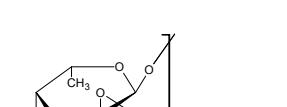
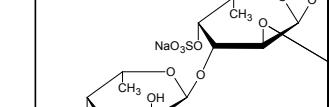
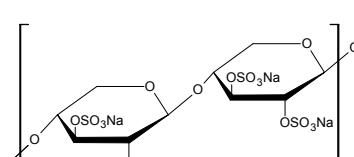
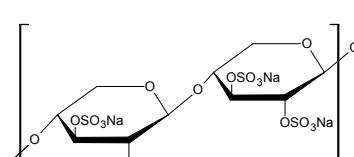
Name	Struktur	MW [kDa]	DS
AG		12	
AG S1		20	2,00
LäPS v S1	 <p>R: H SO₃Na</p>	10	1,98
	$n \approx 7$		
LäPS S1	 <p>R: H SO₃Na</p>	5,4	1,88
	$n \approx 3$		

7.3.1.2 Glucane

β -1,4-D-Glucane (Cellulose-Derivate)					
					
Cellulose O-2	R ₁ : SO ₃ Na	R ₂ : H	n ≈ 45	30	0,56
Cellulose O-3	R ₁ : H	R ₂ : SO ₃ Na	n ≈ 77	60	0,98
Cellulose 2-3	R ₁ : SO ₃ Na	R ₂ : SO ₃ Na	n ≈ 47	40	1,33

Name	Struktur	MW [kDa]	DS
β -1,3-D-Glucane			
Laminarin	R: H n \approx 2 - 3	5	-
LAM S5	R: SO ₃ Na n \approx 3	12,5	2,30
LiPS IX (β -1,3/ β -1,4-D-Glucan)	 n \approx 7,5 - 25	26	2,15

7.3.1.3 Sonstige Kohlenhydrate

Fucoidan (charakteristische Formelausschnitte)			100	n.b.
Pentosanpolysulfat (PPS)			18	n.b.
$n \approx 26$				
Agarose	R: H	$n \approx 700$	250	-
Agarose S3	R: SO_3Na	$n \approx 700$	380	1,14

Name	Struktur	MW [kDa]	DS
Alginsäure n ≈ 2000		850	-
MM-Block	R ₁ : H R ₂ : COOH	R ₃ : H R ₄ : COOH	
GG-Block	R ₁ : COOH R ₂ : H	R ₃ : COOH R ₄ : H	
MG-Block	R ₁ : H R ₂ : COOH	R ₃ : COOH R ₄ : H	

7.3.2 Oligosaccharide

Name	Struktur	MW [Da]	DS
Saccharoseoctasulfat (SOS)		974	4,00
α -1,3/ β -1,4-D-Galactane			
Neocarratetraose-4(1),4(3)-disulfat (NCT-disulfat)		n = 1	835
Neocarrahexasose-4(1),4(3),4(5)-trisulfat (NCH-trisulfat)		n = 2	1243

7.4 In vivo Testung

Geräte und Materialien

Brutschrank	Reach-in Incubator, Modell 3956, Fa. Forma Scientific, Ohio, USA
Stereolupe	SZ6045TR, Fa. Olympus, Hamburg
Kaltlichtleuchte	GKL 315, Fa. Gossen, St. Georgen
Kontrastmittel	Schlagsahne „Milfina“, Aldi-Süd, Regenstauf

7.4.1 CAM-Assay

Durchführung (nach [112,113])

Nach Reinigung der Schale mit EtOH 70% wurden die befruchteten Hühnereier in horizontaler Lage und unter mehrmaligem Drehen 72 h bei 37°C und 80% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Vor dem Öffnen wurden die Eier in die vertikale Position gebracht (stumpfe Seite nach oben). Mit einer Pinzette wurden 2 Öffnungen in die Schale gebohrt, eine auf der stumpfen Seite, eine im unteren Drittel des Eies. Je nach Größe des Eies wurden mit einer Spritze mit feiner Kanüle (Ø 1,5 mm) aus der unteren Öffnung 8-10 ml Eiweiß abgesaugt. Die durchbohrte Eischale wurde mit einem Textilklebeband dicht verschlossen. Mittels einer Pinzette wurde nun an der stumpfen Seite des Eies die Schale entfernt, bis eine im Durchmesser etwa 3 cm große Öffnung entstand. Wahlweise wurde auch ein im Handel erhältlicher Eieröffner verwendet. Nach Entfernen der Luftsackmembran wurde das geöffnete Ei mit Frischhaltefolie bedeckt und weitere 72 h bei 37°C und 80% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Am 6. Tag der Inkubation wurden die testsubstanz-haltigen Pellets mit der flachen Seite nach unten auf die nun ca. 2 cm große CAM gelegt. Die Pellets wurden stets in einem Bereich der CAM platziert, der mindestens 0,5 cm vom Rand der CAM entfernt lag. Pro Testsubstanz bzw. Kontrolle wurden 12 Eier verwendet, jeder Versuch wurde mindestens einmal wiederholt. Zur Kontrolle wurden stets die 2,5%ige Agaroselösung (Blindwert) und Suramin (50 µg/Pellet, Positivkontrolle) getestet. Die mit gekennzeichneter Frischhaltefolie bedeckten Eier wurden weitere 24 h bei 37°C und 80% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Vor der Auswertung am 7. Tag wurden tote Eier aussortiert und notiert. Zur Erhöhung des Kontrastes wurden mittels einer Spritze mit feiner Kanüle 0,5-1,5 ml haltbare Schlagsahne unter die CAM gespritzt. Die randomisierte Auswertung erfolgte unmittelbar danach mit einer Stereolupe mit 10facher Vergrößerung bei Beleuchtung durch eine Kaltlichtlampe.

Herstellung der Pellets

Unter Erwärmen auf ca. 80°C im Wasserbad wurde eine 2,5%ige Agaroselösung hergestellt. Unterschiedliche Mengen Testsubstanz wurden in dieser heißen Lösung gelöst (i.a. EK = 50 µg/Pellet). 10 µl der erhaltenen noch flüssigen Lösung wurden mit einer Direktausschubpipette (Gilson) auf Teflonstäbe mit einem Durchmesser von 3 mm pipettiert. Die nach kurzem Abkühlen erstarrten Pellets wurden auf die CAM gelegt.

Auswertung

Die Auswertung erfolgte nach dem von Vogl entwickeltem Scoresystem [112,113].

7.4.2 HET-CAM-Assay

Durchführung

Die Präparation der befruchteten Hühnereier erfolgte wie in Kapitel 7.4.1 (CAM-Assay) beschrieben. Am 6. Tag der Inkubation wurden die testsubstanz-haltigen Pellets mit der flachen Seite nach unten auf die nun ca. 2 cm große CAM gelegt. Die Pellets wurden stets in einem Bereich der CAM platziert, der mindestens 0,5 cm vom Rand der CAM entfernt lag. Pro Testsubstanz bzw. Kontrolle wurden 14 Eier verwendet, jeder Versuch wurde mindestens einmal wiederholt. Zur Kontrolle wurden stets die 2,5%ige Agaroselösung mit 0,5% Natriumlaurylsulfat (Negativkontrolle) und Hydrocortison (50 µg/Pellet, Positivkontrolle) getestet. Die mit gekennzeichneter Frischhaltefolie bedeckten Eier wurden weitere 24 h bei 37°C und 80% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Vor der Auswertung am 7. Tag wurden tote Eier aussortiert und notiert. Zur Erhöhung des Kontrastes wurden mittels einer Spritze mit feiner Kanüle 0,5-1,5 ml haltbare Schlagsahne unter die CAM gespritzt. Die randomisierte Auswertung erfolgte unmittelbar danach mit einer Stereolupe mit 10facher Vergrößerung bei Beleuchtung durch eine Kaltlichtlampe.

Herstellung der Pellets

Die Herstellung der Pellets erfolgte wie im Kapitel 7.4.1 beschrieben, jedoch wurde der 2,5%igen Agaroselösung das Tensid Natriumlaurylsulfat (LS) in einer Konzentration von 0,5% zugesetzt.

Auswertung

Die Auswertung erfolgte nach dem von Marchesan entwickeltem Scoresystem [114].

7.4.3 TUM-CAM-Assay

Geräte und Materialien

Zentrifuge	Minifuge RF, Heraeus, Sepatech, Hanau
Neubauer improved Zählkammer	Laborcenter, Nürnberg
Mikroskop	Ortholux II, Leitz, Wetzlar
PP-Röhrchen steril	Greiner, Frickenhausen

Gewinnung der Zellsuspension

Alle Arbeiten wurden weitgehend unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Die U-87 MG Zellen wurden wie im Kapitel 7.5.3 beschrieben kultiviert. Nach 6tägiger Inkubation bei 37°C/5% CO₂ wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und die adhären wachsenden Zellen durch etwa 1,5minütiges Einwirken von ca. 2,5 ml Trypsin-Lösung von der Kulturflasche abgelöst. Nach Absaugen der Trypsin-Lösung wurden die Zellen in ca. 5 ml EMEM/10% FCS aufgenommen. Die Zellen wurden abzentrifugiert (1000 U/min, 7 min), das Zellpellet in ca. 5 ml EMEM/10% FCS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Zellpellet (ca. 100 µl) wurde in 300 µl EMEM/10% FCS aufgenommen. Zur Bestimmung der Menge vitaler Zellen wurde eine 1:10 verdünnte Zellsuspension mit der gleichen Menge an Trypanblau-Lösung (0,1% Trypanblau in isotonischer Kochsalzlösung) gemischt und in der Neubauer Zählkammer gezählt. Die Zellsuspension wurde durch Zusatz des erforderlichen Volumens an EMEM/10% FCS auf eine Zellzahl von ca. 4·10⁶ Zellen/100 µl eingestellt. Dann wurden 1:1-Mischungen der Zellsuspension mit den Stammlösungen der Testsubstanzen (1 mg/100 µl EMEM/10% FCS) hergestellt, sodass 10 µl der resultierenden Suspension ca. 2·10⁵ Zellen und 50 µg der jeweiligen Testsubstanz enthielten.

Herstellung der Agaroseringe (nach [114])

Unter Erwärmen auf ca. 85-90°C im Wasserbad wurde eine 5%ige Agaroselösung hergestellt. 1 ml dieser heißen Lösung wurde mit einer vorgewärmten Pasteurpipette in ein erwärmtes, fettfreies, schräg gehaltenes Glasrohr mit verschlossenem Hahn (Ø 5 mm, Länge ca. 10 cm) pipettiert. Unmittelbar darauf wurde ein Glasstab (Ø 4 mm) langsam in das senkrecht gehaltene Glasrohr eingeführt. Nach dem Abkühlen wurde der Hahn geöffnet und der Glasstab, unterstützt durch Luftdruck von der anderen Seite des Glasrohres, vorsichtig herausgezogen. Die gebildeten Agaroseröhren ließen sich leicht vom Glasstab abschieben. Mit Hilfe eines Skalpells wurden Ringe von ca. 2 mm Breite abgeschnitten. So konnten gleich große Agaroseringe mit einem inneren Durchmesser von 4 mm und einer Wanddicke von 0,5 mm hergestellt werden. Die Agaroseringe konnten in einer EtOH 70% enthaltenden Petrischale im Kühlschrank 3-4 Wochen gelagert werden. Vor der Applikation auf die CAM mussten die Agaroseringe kurz mit einem Phosphatpuffer pH 7,4 (vgl. Kapitel 7.5.3) gewaschen werden, um unspezifische Membranreizungen durch EtOH 70% zu verhindern.

Durchführung

Die Präparation der befruchteten Hühnereier erfolgte wie in Kapitel 7.4.1 (CAM-Assay) beschrieben. Am 7. Tag der Inkubation wurde ein Agarosering/Ei auf der CAM (Ø ca. 3 cm) in einem Abstand von ca. 0,5 cm vom Rand der CAM platziert. Unmittelbar darauf wurden 10 µl

der testsubstanz-haltigen Zellsuspension mit einer Direktausschubpipette (Gilson) in die Agaroseringe pipettiert. Bei jedem Versuch wurden Medium (Blindwert), Zellsuspension ohne Testsubstanz (Negativkontrolle) und Zellsuspension mit 50 µg Thalidomid (Positivkontrolle) getestet. Nach Abdecken der geöffneten Eier mit beschrifteter Frischhaltefolie folgten weitere 72 h Inkubation bei 37°C und 80% relativer Luftfeuchtigkeit. Pro Testsubstanz bzw. Blindwert und Kontrollen wurden 12-14 Eier verwendet. Jeder Versuch wurde mindestens einmal wiederholt. Vor der Auswertung am 10. Tag wurden tote Eier aussortiert und notiert. Zur Erhöhung des Kontrastes wurden mittels einer Spritze mit feiner Kanüle 0,5-1,5 ml haltbare Schlagsahne unter die CAM gespritzt. Die randomisierte Auswertung erfolgte unmittelbar danach mit einer Stereolupe mit 10facher Vergrößerung bei Beleuchtung durch eine Kaltlichtlampe.

Auswertung

Die Auswertung erfolgte wie im Kapitel 4.4.3.1 beschrieben.

7.5 *In vitro* Testung

7.5.1 Interaktion mit FGF-2

7.5.1.1 Gelpermeationschromatographie

HPLC-Anlage

Pumpe	Waters 510, Fa. Millipore/Waters, Eschborn		
Autosampler	Waters 717 plus Autosampler, Fa. Millipore/Waters, Eschborn		
Detektor	Dioden-Array-Detektor UVD 320S, Fa. Gynkotec, Germerring		
Integration	Software Gynkosoft DA 320A, Fa. Gynkotec, Germerring		
Säule	Ultro Pac TSK-G4000 SW, 7,5 x 600 mm, Fa. LKB, Schweden		
Vorsäule	Ultro Pac TSK-GSWP, 7,5 x 75 mm, Fa. LKB, Schweden		
Flußrate	1 ml/min		
Fließmittel	Phosphatpuffer pH 7,5	4,873 g/l	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
		1,741 g/l	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O
		11,688 g/l	NaCl, auffüllen mit Wasser
Injektionsvolumen	55 µl		
Lauf	isokratisch, 60 min, 206 nm		

Durchführung

33 µl FGF-2-Lösung (1,33 mg/ml) wurden mit oder ohne 33 µl der wässrigen Lösung der Testsubstanz (823,3 µg/ml = E bzw. entsprechende Verdünnungen D-A) 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 55 µl der Probenlösung (entsprechend 36,7 µg (= 2,04 nmol) FGF-2 bzw. 22,7 µg Testsubstanz = E) injiziert und die Absorption bei 206 nm aufgezeichnet.

7.5.1.2 Fluoreszenzuntersuchungen

Geräte

Perkin Elmer LS 50 B Luminescence Spektrometer

Reagenzien

Tris-HCl Puffer pH 7,5	1,211 g/l	Tris (10mM)
	0,309 g/l	1,4-Dithiothreitol (2mM)
mit HCl einstellen auf pH 7,5, auffüllen mit Wasser		

Durchführung

Die Messung der Fluoreszenz erfolgte bei 25°C nach Anregung bei 290 nm. Zu 2 ml einer 450 nM Lösung von FGF-2 in einem Tris-HCl Puffer pH 7,5 wurden kleine Anteile (1-40 µl) einer Lösung der Testsubstanzen in Tris-HCl Puffer pH 7,5 (0,4 mg/ml) zugefügt und die Fluoreszenzintensität bei 340 nm nach Mixen und 2minütiger Inkubation gemessen. Um die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D zu bestimmen, wurde die Titrationskurve einer nichtlinearen Regression unterworfen. Dabei wurde die Software Microcal™ Origin™ Version 4.1, Fa. Microcal Software, Inc., Northampton verwendet.

7.5.1.3 Trypsin-Verdau-Assay (FGF-2)

Geräte und Materialien

Elektrophoreseapparatur	Xcell II™ Mini Cell, Invitrogen, Groningen, NL
Spannungsquelle	Power Ease™ 500, Invitrogen, Groningen, NL
Einmalkassetten	Gel cassettes, 1,0 mm, 10x10 cm, Invitrogen, Groningen, NL
Durchlichtscanner GS710	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Software Quantity One	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Reagenzien

Färbereagenzien	SilverXpress™ Staining Kit, Invitrogen, Groningen, NL
Acrylamid, BIS, TEMED, APS	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Durchführung des Trypsin-Verdau-Assays (FGF-2) (nach [127,128])

Je 4,5 µl der Lösungen von FGF-2 (50 µg/ml PBS pH 7,4/0,5% (V/V) Tween 20), Testsubstanz (0-3 µg/ml) und Trypsin (1 µg/ml 25 mM Tris-HCl pH 7,5) wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßern gemischt. Den Kontrollen wurden statt der Testlösung (Blindwert) bzw. zusätzlich statt der Trypsinlösung (Vergleich) Wasser zugesetzt. Um eine Inhibition des Trypsins durch die Testsubstanz als mögliche Ursache des FGF-2 protektiven Effekts auszuschließen, wurde denaturierter FGF-2 (65°C, 5 min) mit Testsubstanz in Gegenwart von Trypsin getestet. Nach Verschließen der Gefäße erfolgte eine 7-, 20- oder 40stündige Inkubation bei 37°C. Danach wurden je Ansatz 4,5 µl des Probenpuffers zugesetzt und gemischt. Die Proben wurden bei Bedarf bzw. zur Entfernung von Luftblasen tiefgefroren (-20°C) und der Proteingehalt nach dem Auftauen elektrophoretisch bestimmt.

Durchführung der Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Herstellung der Polyacrylamidgele (16% Acrylamid/BIS): Ansatz für 4 Gele

Trenngel	8,00 ml	Acrylamid/BIS 50%
		(48,3 g Acrylamid, 1,7 g BIS, auffüllen mit Wasser ad 100,0 ml)
	9,40 ml	1 M Tris-HCl pH 8,8
	0,25 ml	SDS 10%
	4,00 ml	Saccharose 50%
	2,70 ml	Wasser
	6,25 µl	TEMED
	625 µl	APS (50 mg/ml, frisch hergestellt)

Die Lösungen wurden gut gemischt und nach Zugabe des Radikalstarters APS mit einer Spritze mit 1,0 mm Kanüle luftblasenfrei bis zu einer Füllhöhe von ca. 80% in die Gelkassetten gefüllt. Anschließend wurde vorsichtig mit Wasser überschichtet. Nach Auspolymerisieren des Trenngels (mind. 1 h) und Abgießen des Wassers wurde die Lösung des Sammelgels sofort nach Zugabe von APS eingefüllt.

Sammelgel	1,00 ml	Acrylamid/BIS 50%
	4,20 ml	0,375 M Tris-HCl pH 6,8
	0,125 ml	SDS 10%
	6,30 ml	Wasser
	5,00 µl	TEMED
	1,00 ml	APS (50 mg/ml, frisch hergestellt)

Unmittelbar darauf wurden Kämme (15 Vertiefungen) luftblasenfrei in die Kassetten gesteckt. Nach mindestens einer weiteren Stunde Auspolymerisieren waren die Gele gebrauchsfertig bzw. konnten gekühlt mehrere Tage gelagert werden.

Die Elektrophorese wurde in einem Tris-Glycin-Puffer unter reduzierenden Bedingungen (SDS) durchgeführt.

Elektrophoresepuffer	3,03 g/l	Tris
	14,40 g/l	Glycin
	1,00 g/l	SDS, auffüllen mit Wasser

Probenpuffer (3fach)	2,50 ml	1,5 M Tris-HCl pH 6,8
	6,00 ml	Glycerin
	1,20 g	SDS
	0,50 ml	Bromphenolblau 0,3%
auffüllen mit Wasser ad 10,00 ml (löslich bei 40°C)		

Elektrophoresebedingungen 125 V const. 1 h 40 min
170 V const. 20 min

Nach Silberfärbung mit SilverXpress™ Staining Kit und Konservierung der Gele in wässrigem Glycerin 10% erfolgte die densitometrische Auswertung.

7.5.2 Interaktion mit IL-2 (Trypsin-Verdau-Assay)

Durchführung des Trypsin-Verdau-Assays (IL-2)

Die IL-2-Lösung wurde zunächst zur Entfernung des zur Stabilisierung zugesetzten bovinen Serumalbumins ultrafiltriert (13000 g/15 min, Nanosep 30K, Pall Gelman Laboratory, Roßdorf). Je 4,5 µl der Lösungen von IL-2 (10 µg/ml PBS pH 7,4/0,5% (V/V) Tween 20) und Testsubstanz (0-300 µg/ml) wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßchen gemischt und 5 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden jedem Ansatz 4,5 µl einer Trypsinlösung (0,8 µg/ml 25 mM Tris-HCl pH 7,5) zugesetzt. Die Kontrollen enthielten statt der Testlösung (Blindwert) bzw. zusätzlich statt der Trypsinlösung (Vergleich) Wasser. Eine Inhibition des Trypsins durch die Testsubstanz als mögliche Ursache des IL-2 protektiven Effekts wurde durch die Testung von denaturiertem FGF-2 (65°C, 5 min) nach Zusatz der Testsubstanz in der höchsten untersuchten Konzentration in Gegenwart von Trypsin ausgeschlossen. Die Reaktionsgefäßchen wurden 100 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden je Ansatz 4,5 µl des Probenpuffers zugesetzt und gemischt. Die Proben wurden bei Bedarf bzw. zur Entfernung von Luftblasen eingefroren (-20°C) und der Proteingehalt nach dem Auftauen elektrophoretisch bestimmt.

Durchführung der Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Abweichend vom Trypsin-Verdau-Assay (FGF-2) wurden 20%ige Polyacrylamidgele (20% Acrylamid/BIS) verwendet. Lediglich die Zusammensetzung des Trengels wurde wie folgt abgeändert (für 4 Gele):

Trenngel:	10,00 ml	Acrylamid/BIS 50%
	9,40 ml	1 M Tris-HCl pH 8,8
	0,25 ml	SDS 10%
	4,00 ml	Saccharose 50%
	750 µl	Wasser
	6,25 µl	TEMED
	625 µl	APS (50 mg/ml, frisch hergestellt)

Die Gele wurden 1 Tag nach ihrer Herstellung verwendet, da zu diesem Zeitpunkt die optimale Porengröße erreicht war. Eine längere Lagerung führte zu einer Überladung der Gele mit Probenlösung.

Elektrophoresebedingungen 125 V const. 30 min

170 V const. 1 h

Die Gele wurden nach Silberfärbung mit SilverXpress™ Staining Kit und Konservierung in wässrigem Glycerin 10% densitometrisch ausgewertet.

7.5.3 Interaktion mit VEGF (Zellkultur-Assay)

Geräte und Materialien

Inkubator	Forma Scientific Inc., Marietta, Ohio, USA
Mikrotiterplattenphotometer	Microplate EL 309 Autoreader, BIO-TEK Instruments, Inc., Vermont, USA
Kulturflaschen	Nalge Nunc International, Rochester, USA
Mikrotiterplatten	Cellstar®, Greiner, Frickenhausen
Sterilfilter	Minisart 0,2 µm, Sartorius AG, Göttingen

Reagenzien

Pulvermedium EMEM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Fetal Calf Serum (FCS)	Life Technologies Gibco BRL, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Gentamycin	Sebio GmbH, Mitterskirchen
Mykoplasmatest	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
Trypsin/EDTA-Lösung	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
Glutardialdehyd 25%	Fa. Merck, Darmstadt
Kristallviolett	Serva Feinbiochemica GmbH & Co.KG, Heidelberg

PBS (Phosphate buffered saline):	8,0 g/l	NaCl
	1,0 g/l	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
	0,2 g/l	KCl
	0,2 g/l	KH ₂ PO ₄
	0,15 g/l	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O, auffüllen mit Wasser

Kultivierung der Zellen

U-87 MG

American Type Culture Collection, Rockville, USA

Die Zelllinie wurde als „Multilayer“ kultiviert. Die Inkubation der Kultur erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Das Kulturmedium wurde durch Auflösen des Pulvermediums und der entsprechenden Zusätze in Millipore-Wasser und anschließender Sterilfiltration hergestellt. Vor dem Gebrauch wurde dem Kulturmedium FCS in einer EK von 10% steril zugesetzt.

EMEM

MEM Eagle Pulvermedium mit Earle's Salzen, L-Glutamin und nichtessentiellen Aminosäuren

2,2 g/l NaHCO₃

110 mg/l Natriumpyruvat

Das Passagieren der Zellkultur erfolgte einmal wöchentlich. Dabei wurden die Zellen bis zu einer leichten Trübung des Zellrasens mit Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert (ca. 1-2 min). Nach Absaugen der Trypsin/EDTA-Lösung und Ablösen der Zellen mit frischem Medium wurde ein aliquoter Teil dieser Zellsuspension in eine neue Kulturflasche überführt. Die Zellkultur wurde in regelmäßigen Abständen unter Verwendung eines Mykoplasmentests auf Kontamination mit Mykoplasmen untersucht.

Untersuchung der Beeinflussung der Zellzahl bzw. der VEGF-Produktion

Die Zellen wurden in einer Dichte von 10-15 Zellen pro Gesichtsfeld (Umkehrmikroskop, 320x) ausgesät. Nach 48 h wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und durch 200 µl neues Medium mit (EK 50 µg/ml) oder ohne Testsubstanz (Kontrolle) ersetzt. Unmittelbar danach (t₀) sowie zum Zeitpunkt t₁ (48 h), t₂ (72 h), t₃ (96 h), t₄ (120 h) und t₅ (144 h) wurde die Reaktion durch Zusatz von Glutardialdehyd 4% in PBS abgestoppt. Anschließend erfolgte die Färbung der Zellen mit 0,02%iger Kristallviolettlösung. Die Zellmassen konnten nun photometrisch bei 578 nm bestimmt werden. Zu den Zeitpunkten t₂, t₄ und t₅ wurden 150 µl Zellüberstand von mind. 6 Kavitäten in sterile 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und bis zur weiteren Untersuchung bei -20°C aufbewahrt.

Die Bestimmung des VEGF-Gehaltes/Kavität erfolgte mittels ELISA nach Modifizierung des Herstellerprotokolls.

Geräte und Materialien

Mikrotiterplattenphotometer	Titertek Twinreader, Flow, Meckenheim
Mikrotiterplattenwischer	MRW, Dynatech, Denkendorf
Mikrotiterplatten	Immilon® 1B, Dynex, Denkendorf

Reagenzien

Recombinant human VEGF, Anti-human VEGF Antibody und biotinylated Anti-human VEGF Antibody wurden über R&D Systems GmbH, Wiesbaden bezogen.

BSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen	
FCS (nicht hitzeinaktiviert)	Biochrom, Berlin	
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen	
Phosphatpuffer pH 7,4	0,144 g/l	KH ₂ PO ₄
	9,000 g/l	NaCl
	0,528 g/l	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O, auffüllen mit Wasser
TBS pH 7,3 (Tris buffered saline)	2,423 g/l	Tris (20 mM)
	8,766 g/l	NaCl (150 mM), auffüllen mit Wasser
Diluent	0,1%	BSA
	0,05%	Tween 20 in TBS pH 7,3

ABTS-Lösung 30 mg ABTS (2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen wurden in 500 ml 0,1 M Zitronensäurelösung gelöst und mit NaOH-Plätzchen auf pH 4,35 eingestellt. Die Lösung wurde portioniert eingefroren, unmittelbar vor Gebrauch aufgetaut und mit 0,1% H₂O₂ versetzt.

Durchführung

- Der Anti-human VEGF Antibody (capture antibody) wurde mit PBS pH 7,4 zu einer Konzentration von 0,4 µg/ml verdünnt. Pro Kavität einer 96-F-well-Immilon® 1B Platte wurden 100 µl pipettiert und nach Verschließen der Mikrotiterplatte (MTP) mit Parafilm über Nacht bei RT inkubiert.
- Die Platte wurde dreimal mit PBS pH 7,4/0,05% (V/V) Tween 20 (400 µl/Kavität) im MTP-wischer gewaschen. Nach dem letzten Waschschritt wurden letzte Flüssigkeitsrückstände durch vorsichtiges Klopfen der MTP gegen Papiertücher entfernt.
- Die Kavitäten wurden dann mit 300 µl PBS pH 7,4/1% BSA/5% Saccharose/0,5% NaN₃ gefüllt und mindestens eine Stunde bei RT inkubiert.

- Die MTP wurde erneut in Analogie zum ersten Waschschritt gewaschen. Die Platten waren dann fertig zur Probenzugabe. Alternativ konnten sie jedoch mit Parafilm verschlossen bei 4-8°C unter Vakuum mindestens 2 Monate gelagert werden.
- 100 µl der entsprechenden Verdünnungen von Probe und Standard mit Diluent (in Polypropylenbehältnissen) wurden in die Kavitäten pipettiert. Nach leichtem einminütigem Schütteln der MTP und Verschließen mit Parafilm wurde 2 Stunden bei RT inkubiert.
- Nach Wiederholung des Waschschrittes wurden 100 µl biotinylated Anti-human VEGF Antibody (detection antibody) (100 ng/ml in TBS pH 7,3/0,1% BSA) pro Kavität pipettiert und 2 Stunden bei RT inkubiert.
- Danach wurde die MTP erneut gewaschen und nach Zugabe von 100 µl/Kavität einer Lösung von Avidin-Peroxidase (1 µg/ml, 1:400) in PBS pH 7,4/10% FCS 30 min bei RT stehengelassen.
- Nach zehnmaligem Waschen (500 µl/Kavität PBS pH 7,4/0,05% (V/V) Tween 20, ohne Pause) wurden sofort 100 µl einer frisch aufgetauten ABTS-Lösung mit 0,1% H₂O₂ zupipettiert und die Extinktion nach 80minütiger Entwicklung der Reaktion im ELISA-Reader bei 405 nm gemessen.

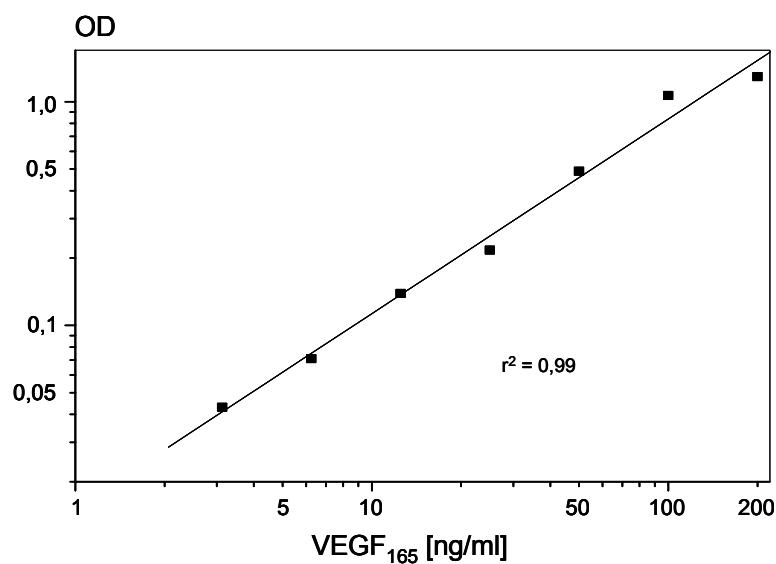


Abbildung 88: Kalibriergerade von rhVEGF₁₆₅ in doppelt logarithmischer Auftragung. r^2 ist das Bestimmtheitsmaß.

7.6 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde stets ein zweiseitiger Student'scher t-Test herangezogen. Es wurde ein Signifikanzniveau von 5% gewählt.

Lediglich die Ergebnisse des CAM-Assays wurden in einem zweiseitigen Mann-Whitney-Wilcoxon-Test (nichtparametrischer Zweistichprobentest) beurteilt.

8 Anhang

8.1 Tabellarische Darstellung der Ergebnisse

8.1.1 Einzelergebnisse

Tabelle 35: Vergleich der Ergebnisse im CAM-Assay und der Fluoreszenzuntersuchungen.

CAM -: keine Aktivität; CAM \pm : mittlere Aktivität; CAM +: gute Aktivität

Fluoreszenz -: keine Affinität zu FGF-2; Fluoreszenz \pm : mittlere Affinität zu FGF-2; Fluoreszenz +: hohe Affinität zu FGF-2

(%): prozentualer Anteil der TS mit bestimmtem *in vivo* und/oder *in vitro* Effekt

CAM	Fluoreszenz - (21,4%)	Fluoreszenz \pm (23,8%)		Fluoreszenz + (54,8%)
		$K_D > 1 \text{ nM}$	$K_D < 1 \text{ nM}$	
- (26,2%)	D5 LuPS S7 LuPS P1	D4 β -Galactan AG Saccharoseoctasulfat	κ -Carrageenan PGA Laminarin Agarose	
	(27,3%)	(36,4%)	(36,4%)	
\pm (42,9%)	D6 D7 Cellulose O-2 Cellulose O-3	ι -Carrageenan pH 3,2 LuPS S9 LäPS S1 NCT-disulfat NCH-trisulfat	λ -Carrageenan θ -Carrageenan ι -Carrageenan Methyl- ι -Carrageenan LuPS S8 LuPS P2 Cellulose 2-3 Agarose S3 Alginsäure	
	(22,2%)	(27,8%)	(50,0%)	
+(31,0%)	LAM S5 PPS	AsaPS S1	Heparin LuPS S5 LuPS S5 6DS LuPS F S1 α -Gal ls S1 α -Gal ul S1 AG S1 LäPS v S1 LiPS IX Fucoidan	
	(15,4%)	(7,7%)	(76,9%)	

Tabelle 36: Vergleich der Ergebnisse im HET-CAM-Assay und der Fluoreszenzuntersuchungen.HET-CAM -: keine Aktivität; HET-CAM \pm : mittlere Aktivität; HET-CAM +: gute AktivitätFluoreszenz -: keine Affinität zu FGF-2; Fluoreszenz \pm : mittlere Affinität zu FGF-2; Fluoreszenz +: hohe Affinität zu FGF-2(%): prozentualer Anteil der TS mit bestimmtem *in vivo* und/oder *in vitro* Effekt

HET-CAM	Fluoreszenz – (22,5%)	Fluoreszenz \pm (22,5%)	Fluoreszenz + (55,0%)
	$K_D > 1 \text{ nM}$	$K_D < 1 \text{ nM}$	
- (10,0%)	D5 Cellulose O-3		LuPS S5 6DS Agarose
	(50,0%)		(50,0%)
\pm (67,5%)	D6 D7 LuPS S7 LuPS P1 Cellulose O-2	ι -Carrageenan pH 3,2 D3 D4 β -Galactan LuPS S9 AG NCT-disulfat NCH-trisulfat Saccharoseoctasulfat	Heparin θ -Carrageenan κ -Carrageenan Methyl- ι -Carrageenan LuPS S8 LuPS P2 LuPS F S1 PGA α -Gal ul S1 AG S1 Laminarin Agarose S3 Alginsäure
	(18,5%)	(33,3%)	(48,2%)
+(22,5%)	LAM S5 PPS		λ -Carrageenan ι -Carrageenan α -Gal ls S1 LäPS v S1 Cellulose 2-3 LiPS IX Fucoidan
	(22,2%)		(77,8%)

Tabelle 37: Vergleich der Ergebnisse im TUM-CAM-Assay und der Fluoreszenzuntersuchungen.TUM-CAM -: keine Aktivität; TUM-CAM \pm : mittlere Aktivität; TUM-CAM +: gute AktivitätFluoreszenz -: keine Affinität zu FGF-2; Fluoreszenz \pm : mittlere Affinität zu FGF-2; Fluoreszenz +: hohe Affinität zu FGF-2(%): prozentualer Anteil der TS mit bestimmtem *in vivo* und/oder *in vitro* Effekt

TUM-CAM		Fluoreszenz - (23,1%)	Fluoreszenz \pm (11,5%) $K_D > 1 \text{ nM}$	Fluoreszenz + (65,4%) $K_D < 1 \text{ nM}$
- (34,6%)	Cellulose O-2 PPS		ι -Carrageenan pH 3,2	Heparin θ -Carrageenan κ -Carrageenan Methyl- ι -Carrageenan LuPS F S1 Cellulose 2-3
		(22,2%)	(11,1%)	(66,7%)
\pm (50,0%)	LuPS S7 LuPS P1 Cellulose O-3		LuPS S9 Saccharoseoctasulfat	LuPS S8 LuPS S5 6DS LuPS P2 α -Gal I S1 AG S1 LäPS v S1 Fucoidan Agarose S3
		(23,1%)	(15,4%)	(61,5%)
+(15,4%)	LAM S5			λ -Carrageenan ι -Carrageenan α -Gal ul S1
		(25,0%)		(75,0%)

Tabelle 38: Vergleich der Ergebnisse im CAM-Assay und der Trypsin-Verdau-Assays.CAM -: keine Aktivität; CAM \pm : mittlere Aktivität; CAM +: gute Aktivität

FGF-2 bzw. IL-2 -: keine Affinität zu FGF-2 bzw. IL-2; FGF-2 bzw. IL-2 +: Affinität zu FGF-2 bzw. IL-2

(%): prozentualer Anteil der TS mit bestimmtem *in vivo* und/oder *in vitro* Effekt

CAM	FGF – IL-2 – (39,5%)	FGF – IL-2 +	FGF + IL-2 – (9,3%)	FGF + IL-2 + (51,2%)
- (25,6%)	κ -Carrageenan D4 D5 β -Galactan LuPS S7 PGA AG Laminarin Agarose		LuPS P1	Saccharoseoctasulfat
	(81,8%)		(9,1%)	(9,1%)
\pm (41,9%)	ι -Carrageenan pH 3,2 D6 LuPS S8 LuPS S9 LuPS P2 Cellulose O-2 NCT-disulfat NCH-trisulfat		D7 Cellulose O-3	λ -Carrageenan θ -Carrageenan ι -Carrageenan Methyl- ι -Carrageenan LäPS S1 Cellulose 2-3 Agarose S3 Alginsäure
	(44,4%)		(11,1%)	(44,4%)
+		LuPS S5 6DS		Heparin LuPS S3 LuPS S5 LuPS F S1 α -Gal ls S1 α -Gal ul S1 AsaPS S1 AG S1 LäPS v S1 LAM S5 LiPS IX Fucoidan PPS
			(7,1%)	(92,9%)

Tabelle 39: Vergleich der Ergebnisse im HET-CAM-Assay und der Trypsin-Verdau-Assays.

HET-CAM -: keine Aktivität; HET-CAM ±: mittlere Aktivität; HET-CAM +: gute Aktivität

FGF-2 bzw. IL-2 -: keine Affinität zu FGF-2 bzw. IL-2; FGF-2 bzw. IL-2 +: Affinität zu FGF-2 bzw. IL-2

(%): prozentualer Anteil der TS mit bestimmtem *in vivo* und/oder *in vitro* Effekt

HET-CAM	FGF – IL-2 – (42,5%)	FGF – IL-2 +	FGF + IL-2 – (10,0%)	FGF + IL-2 + (47,5%)
-	D5 (10,0%)		LuPS S5 6DS Cellulose O-3	
		(50,0%)	(50,0%)	
±	κ-Carrageenan ι-Carrageenan pH 3,2 D4 D6 β-Galactan LuPS S7 LuPS S8 LuPS S9 LuPS P2 PGA AG Cellulose O-2 Laminarin NCT-disulfat NCH-trisulfat		D7 LuPS P1	Heparin θ-Carrageenan Methyl-ι-Carrageenan LuPS S3 LuPS F S1 α-Gal ul S1 AG S1 Agarose S3 Alginsäure Saccharoseoctasulfat
	(55,6%)		(7,4%)	(37,0%)
+	(22,5%)			λ-Carrageenan ι-Carrageenan α-Gal ls S1 LäPS v S1 Cellulose 2-3 LAM S5 LiPS IX Fucoidan PPS
				(100%)

Tabelle 40: Vergleich der Ergebnisse im TUM-CAM-Assay und der Trypsin-Verdau-Assays.

TUM-CAM -: keine Aktivität; TUM-CAM \pm : mittlere Aktivität; TUM-CAM +: gute Aktivität

FGF-2 bzw. IL-2 -: keine Affinität zu FGF-2 bzw. IL-2; FGF-2 bzw. IL-2 +: Affinität zu FGF-2 bzw. IL-2

(%): prozentualer Anteil der TS mit bestimmtem *in vivo* und/oder *in vitro* Effekt

TUM-CAM	FGF – IL-2 – (25,9%)	FGF – IL-2 +	FGF + IL-2 – (11,1%)	FGF + IL-2 + (63,0%)
- (33,3%)	κ -Carrageenan ι -Carrageenan pH 3,2 Cellulose O-2			Heparin θ -Carrageenan Methyl- ι -Carrageenan LuPS F S1 Cellulose 2-3 PPS
\pm (48,2%)	LuPS S7 LuPS S8 LuPS S9 LuPS P2		LuPS S5 6DS LuPS P1 Cellulose O-3	α -Gal ls S1 AG S1 LäPS v S1 Fucoidan Agarose S3 Saccharoseoctasulfat
+			(23,1%)	(46,2%)
(18,5%)				λ -Carrageenan ι -Carrageenan LuPS S3 α -Gal ul S1 LAM S5
				(100,0%)

8.1.2 Gesamtdarstellung der Ergebnisse

Substanz	CAM	HET-CAM	TUM-CAM	K _D	FGF-2		IL-2		VEGF
					IC ₅₀ [μ g/ml]	E _{max} [%]	IC ₅₀ [μ g/ml]	E _{max} [%]	
Heparin	+	\pm	-	+	0,14	56,6	5,77	18,7	-
Heparin LMW	\pm	n.b.	n.b.	n.b.	aktiv		aktiv		n.b.
Heparin p	\pm	n.b.	n.b.	n.b.	aktiv		8,30	15,6	n.b.
Heparin NA	\pm	n.b.	n.b.	n.b.	aktiv		aktiv		n.b.
lineare α -1,3/ β -1,4-D-Galactane									
λ -Carrageenan-Na	\pm	+	+	+	0,05	22,1	aktiv		0
θ -Carrageenan-Na	\pm	\pm	-	+	0,13	6,3	aktiv		0
κ -Carrageenan-Na	-	\pm	-	+	inaktiv		inaktiv		+
ι -Carrageenan-Na	\pm	+	+	+	0,27	51,8	aktiv		-
Methyl- ι -Carrageenan-Na	\pm	\pm	-	+	0,12	21,6	aktiv		0
ι -Carrageenan pH 3,2	\pm	\pm	-	\pm	inaktiv		inaktiv		0
D3	n.b.	\pm	n.b.	\pm	inaktiv		inaktiv		n.b.
D4	-	\pm	n.b.	\pm	inaktiv		inaktiv		n.b.
D5	-	-	n.b.	-	inaktiv		inaktiv		n.b.
D6	\pm	\pm	n.b.	-	inaktiv		inaktiv		n.b.
D7	\pm	\pm	n.b.	-	0,06	22,4	inaktiv		n.b.
lineare β -1,4-D-Galactane									
β -Galactan	-	\pm	n.b.	\pm	inaktiv		inaktiv		n.b.
LuPS S3	+	\pm	+	n.b.	aktiv		aktiv		0
LuPS S5	+	n.b.	n.b.	+	0,10	46,9	aktiv		n.b.
LuPS S7	-	\pm	\pm	-	inaktiv		inaktiv		0
LuPS S8	\pm	\pm	\pm	+	inaktiv		inaktiv		0
LuPS S9	\pm	\pm	\pm	\pm	inaktiv		inaktiv		0
LuPS S5 6DS	+	-	\pm	+	0,05	22,1	inaktiv		-
LuPS P1	-	\pm	\pm	-	0,06	27,1	inaktiv		0
LuPS P2	\pm	\pm	\pm	+	inaktiv		inaktiv		0
LuPS F S1	+	\pm	-	+	0,37	90,9	2,25	10,0	0
lineare α -1,4-D-Galactane									
Polygalacturonsäure	-	\pm	n.b.	+	inaktiv		inaktiv		n.b.
α -Galactan ls S1	+	+	\pm	+	0,26	34,7	4,35	19,8	0
α -Galactan ul S1	+	\pm	+	+	0,38	53,7	aktiv		+

Substanz	CAM	HET-CAM	TUM-CAM	K _D	FGF-2	IL-2	VEGF	
					IC ₅₀ [µg/ml]	E _{max} [%]	IC ₅₀ [µg/ml]	E _{max} [%]
β-1,3-D-Galactane								
AsaPS S1	+	n.b.	n.b.	±	0,25	33,6	aktiv	n.b.
AG	-	±	n.b.	±	inaktiv		inaktiv	n.b.
AG S1	+	±	±	+	0,19	15,2	aktiv	-
LäPS v S1	+	+	±	+	0,34	47,9	9,44	6,7
LäPS S1	±	n.b.	n.b.	±	0,42	59,9	aktiv	n.b.
Glucane								
Cellulose O-2	±	±	-	-	inaktiv		inaktiv	0
Cellulose O-3	±	-	±	-	0,05	31,1	inaktiv	0
Cellulose 2-3	±	+	-	+	0,13	28,6	aktiv	0
Laminarin	-	±	n.b.	+	inaktiv		inaktiv	n.b.
LAM S5	+	+	+	-	0,21	66,2	aktiv	0
LiPS IX	+	+	n.b.	+	0,25	47,1	2,25	19,1
Sonstige Kohlenhydrate								
Fucoidan (ves.)	+	+	±	+	0,38	12,5	aktiv	0
Fucoidan (lam.)	+	+	n.b.	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.
Fucoidan (ev.)	-	±	n.b.	n.b.	n.b.		n.b.	n.b.
Pentosanpolysulfat	+	+	-	-	0,42	42,9	2,93	28,2
Agarose	-	-	n.b.	+	inaktiv		inaktiv	n.b.
Agarose S3	±	±	±	+	0,21	62,4	aktiv	0
Alginsäure	±	±	n.b.	+	0,15	13,4	aktiv	n.b.
Oligosaccharide								
Saccharoseoctasulfat	-	±	±	±	0,24	73,1	aktiv	+
NCT-disulfat	±	±	n.b.	±	inaktiv		inaktiv	n.b.
NCH-trisulfat	±	±	n.b.	±	inaktiv		inaktiv	n.b.

Bewertung der Resultate

CAM-, HET-CAM-, TUM-CAM-Assay: - keine Aktivität
 ± mittlere Aktivität
 + gute Aktivität

K_D (Fluoreszenzuntersuchungen):	-	keine Affinität zu FGF-2
	\pm	mittlere Affinität zu FGF-2
	+	hohe Affinität zu FGF-2

VEGF (Zellkultur-Assay):	-	[VEGF] ↑
	0	kein Effekt
	+	[VEGF] ↓

8.2 Vereinfachtes Modell der Angiogenese

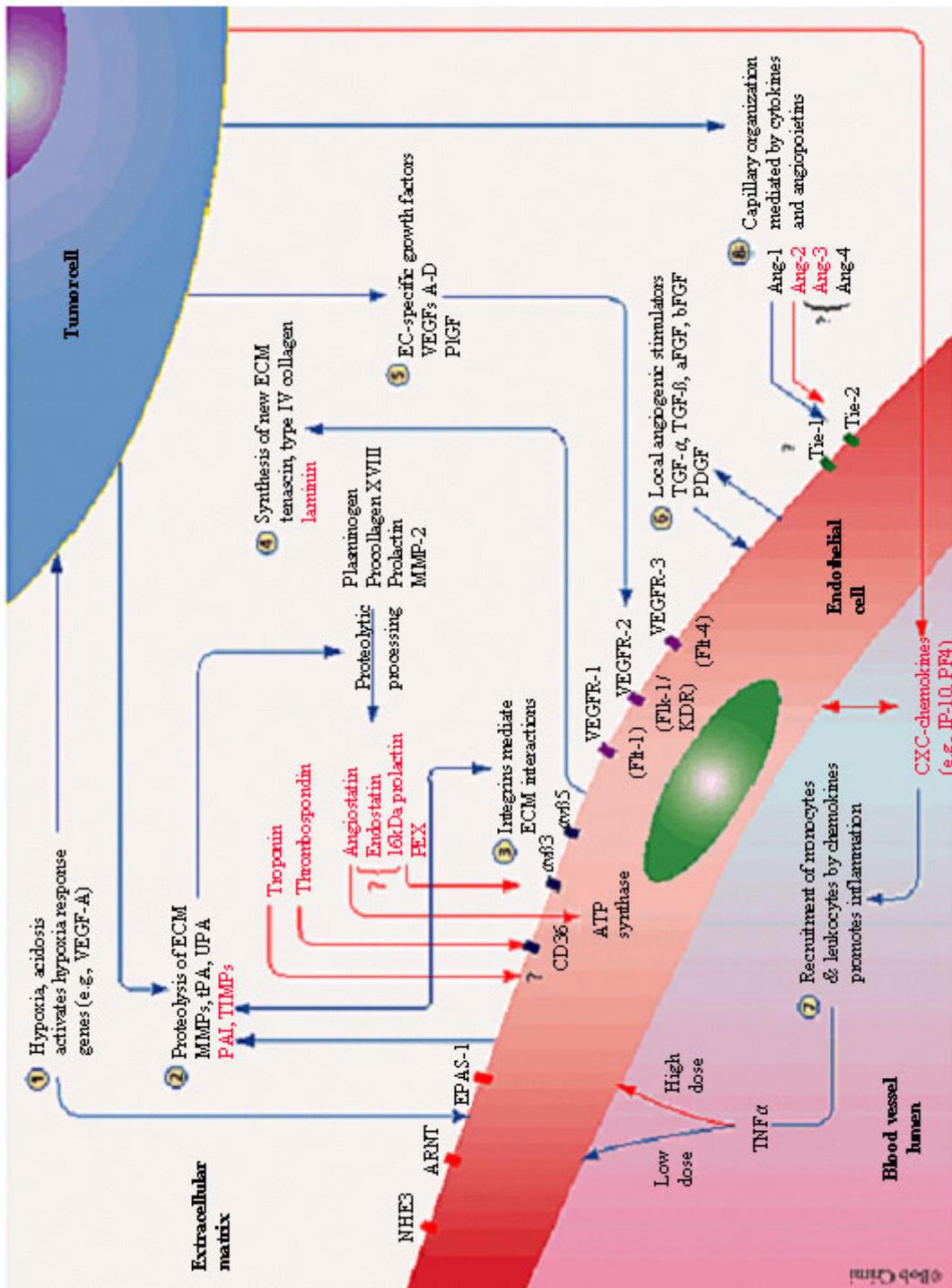


Abbildung 89: Vereinfachtes Modell der Angiogenese [264]
(Inhibitorische Moleküle sind rot gekennzeichnet.)

9 Abkürzungsverzeichnis

aaAT	Antithrombin III Fragment
ABTS	2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
AG	Lärchenarabinogalactan
AK	Antikörper
Ang-1/2	Angiopoietin-1/2
APS	Ammoniumpersulfat
AsaPS	Asa foetida-Polysaccharid
BIS	Bisacrylamid
BSA	bovines Serumalbumin
CAM	Chorioallantoismembran
COX	Cyclooxygenase
Da	Dalton
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DS	Substitutionsgrad
EC	Endothelzellen
ECM	Extrazelluläre Matrix
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
EK	Endkonzentration
ELISA	enzyme linked immuno sorbent assay
E_m	Maximaleffekt
EMEM	Eagle's minimum essential medium
Ets-1	Transkriptionsfaktor
FCS	fetales Kälberserum
FGF-1/2	fibroblast growth factor-1/2
FGFR	fibroblast growth factor receptor
Flk-1	VEGFR2 (murines Homolog), fetal liver kinase receptor 1
Flt-1	VEGFR1, fms-like tyrosine kinase
Flt-4	VEGFR3
GAG	Glykosaminoglykan
G-CSF	granulocyte colony-stimulating factor
GF	growth factor (Wachstumsfaktor)

GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GPC	Gelpermeationschromatographie
HET	Hühner-Ei-Test
HET-VAS	Hühner-Ei-Test zur Vasoaktivität
HET-THRO	Hühner-Ei-Test zur thrombolytischen Wirkung
HET-META	Hühner-Ei-Test für Metabolismusuntersuchungen
HGF/SF	hepatocyte growth factor/scatter factor
HIF-1 α	Hypoxia-inducible factor-1 α
HIV-tat	HIV-transactivating protein
HS	Heparansulfat
HSPG	Heparansulfatproteoglykan
IC ₅₀	Konzentration, die zur 50%igen Inhibition führt
IFN- α/γ	Interferon- α/γ
IGF-1	insulin-like growth factor 1
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IL-2R	Interleukin-2 Rezeptor
IP 10	interferon- γ inducible protein 10
KDR	VEGFR2, kinase insert domain containing receptor
LäPS	Lärchen-Polysaccharid
LiPS	Lichen-Polysaccharid
LS	Natriumlaurylsulfat, SDS
LuPS	Lupinen-Polysaccharid
MAP	mitogen-activated protein
mAU	milli absorption unit
2-ME	2-Methoxyestradiol
MetAP-2	Methioninaminopeptidase-2
MMP	Matrixmetalloproteinase
MMPI	Matrixmetalloproteinase-Inhibitor
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MTP	Mikrotiterplatte
MW	Molekulargewicht
n.b.	nicht bestimmt
NF κ B	Transkriptionsfaktor
NO	Stickstoffmonoxid
NSAID	nonsteroidal antiinflammatory drug

OD	optische Dichte
p.A.	pro analysi
PA	Plasminogenaktivator
PAF	platelet activating factor
PAGE	Polyacrylamidgelektrophorese
PAI	Plasminogenaktivatorinhibitor
PBS	phosphate buffered saline
PC	Perizyten
PD-ECGF	platelet-derived endothelial cell growth factor
PDGF	platelet-derived growth factor
PDGFR α	platelet-derived growth factor receptor α
PECAM	platelet endothelial cell adhesion molecule
PEX	C-terminale Hemopexin-ähnliche Domäne von MMP-2
PF-4	platelet factor-4
PGA	Polygalacturonsäure
PG	Proteoglykan
PGE	Prostaglandin E
PIGF	placental growth factor
p.o.	peroral
PPS	Pentosanpolysulfat
R41	Gefahrenhinweis R41 (Gefahr ernster Augenschäden)
rel.	relativ
RGD	Peptidsequenz aus Arginin (R), Glycin (G) und Asparaginsäure (D)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RTK	Rezeptortyrosinkinase
s.c.	subkutan
SDS	Natriumlaurylsulfat, LS
SI	Stimulationsindex
SMC	smooth muscle cell (glatte Muskelzelle)
SOS	Saccharoseoctasulfat
sog.	sogenannt
SPARC	secreted protein, acidic and rich in cysteine
SPR	surface plasmon resonance
TAM	tumorassoziierte Makrophage
TBS	Tris buffered saline
TEMED	Tetramethylendiamin

TGF- α/β	transforming growth factor- α/β
Tie1/2	tyrosine kinase with immunoglobulin- and EGF-like domains
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinases
TNF- α	tumor necrosis factor- α
TP	Thymidinphosphorylase
t-PA	tissue plasminogen activator
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TS	Testsubstanz
TSP-1	Thrombospondin-1
U	Umdrehung
u-PA	urokinase type plasminogen activator
u-PAR	urokinase type plasminogen activator receptor
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VE-Cadherin	vascular endothelial cadherin
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor
VPF	vascular permeability factor = VEGF
vs	versus
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentralnervensystem
\emptyset	Durchmesser

10 Literaturverzeichnis

- 1 Hobson B, Denekamp J (1984) Endothelial proliferation in tumours and normal tissues: Continuous labeling studies, *Br. J. Cancer* 49: 405-413
- 2 Folkman J (1995) Clinical applications of research on angiogenesis, *N. Engl. J. Med.* 333: 1757-1763
- 3 <http://www.med.unibs.it/~airc>
- 4 Folkman J, Brem H (1992) Angiogenesis and inflammation in: Inflammation: Basic principles and clinical correlates (Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R, Hrsg.), Raven Press, Ltd., New York: 821-839
- 5 Powell J (1999) Update on hemangiomas and vascular malformations, *Curr. Opin. Pediatr.* 11: 457-463
- 6 Szekanecz Z, Koch AE (2000) Angiogenesis in rheumatoid arthritis in: Angiogenesis in health and disease: Basic mechanisms and clinical applications (Rubanyi GM, Hrsg.), Marcel Dekker, Inc., New York, Basel: 429-450
- 7 Pluda JM (1997) Tumor-associated angiogenesis: Mechanisms, clinical implications, and therapeutic strategies, *Semin. Oncol.* 24: 203-218
- 8 Helisch A, Schaper W (2000) Angiogenesis and arteriogenesis - not yet for prescription, *Z. Kardiol.* 89: 239-244
- 9 Geva E, Jaffe RB (2000) Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology and pathology, *Fertil. Steril.* 74: 429-438
- 10 Takahashi M, Kawabe T, Ogura K, Maeda S, Mikami Y, Kaneko N, Terano A, Omata M (1997) Expression of vascular endothelial growth factor at the human gastric ulcer margin and in cultured gastric fibroblasts: A new angiogenic factor for gastric ulcer healing, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234: 493-498
- 11 Statistisches Bundesamt, Statistik der Todesursachen 2000
- 12 Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M (2001) Chemotherapie maligner Tumoren in: Mutschler Arzneimittelwirkungen (8. Auflage), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart: 873-907
- 13 Brunner U, Gensthaler BM, Mevissen G, Morck H (2000) *Pharm. Ztg.* 23: 1878-1879
- 14 Folkman J (1971) Tumor angiogenesis: Therapeutic implications, *N. Engl. J. Med.* 285: 1182-1186
- 15 Jain RK (1989) Delivery of novel therapeutic agents in tumors: Physiological barriers and strategies, *J. Natl. Cancer Inst.* 81: 570-576
- 16 Teicher BA (1999) Potentiation of cytotoxic cancer therapies by antiangiogenic agents in: Antiangiogenic agents in cancer therapy (Teicher BA, Hrsg.), Humana Press Inc., Totowa, NJ: 277-316

- 17 Mauceri HJ, Hanna NN, Beckett MA, Gorski DH, Staba M-J, Stellato KA, Bigelow K, Heimann R, Gately S, Dhanabal M, Soff GA, Sukhatme VP, Kufe DW, Weichselbaum RR (1998) Combined effects of angiostatin and ionizing radiation in antitumour therapy, *Nature* 394: 287-291
- 18 Kerbel RS (2000) Tumor angiogenesis: Past, present and the near future, *Carcinogenesis* 21: 505-515
- 19 Klement G, Baruchel S, Rak J, Man S, Clark K, Hicklin DJ, Bohlen P, Kerbel RS (2000) Continuous low-dose therapy with vinblastine and VEGF receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity, *J. Clin. Invest.* 105: R15-R24
- 20 Carmeliet P, Collen D (1999) Role of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptors in vascular development in: *Vascular growth factors and angiogenesis* (Claesson-Welsh L, Hrsg.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: 133-158
- 21 Carmeliet P (2000) Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis, *Nat. Med.* 6: 389-395
- 22 Arenberg DA, Strieter RM (1999) Angiogenesis in: *Molecular and cellular basis of inflammation* (Serhan CN, Ward PA, Hrsg.), Humana Press Inc., Totowa, NJ: 29-49
- 23 Paper DH (1998) Natural products as angiogenesis inhibitors, *Planta Med.* 64: 686-695
- 24 Pike SE, Yao L, Jones KD, Cherney B, Appella E, Sakaguchi K, Nakhasi H, Teruya-Feldstein J, Wirth P, Gupta G, Tosato G (1998) Vasostatin, a calreticulin fragment, inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth, *J. Exp. Med.* 188: 2349-2356
- 25 Bussolino F, Albini A, Camussi G, Presta M, Viglietto G, Ziche M, Persico G (1996) Role of soluble mediators in angiogenesis, *Eur. J. Cancer* 32A: 2401-2412
- 26 Hanahan D (1997) Signaling vascular morphogenesis and maintenance, *Science* 277: 48-50
- 27 Shawver LK, Lipson KE, Fong TAT, McMahon G, Plowman GD, Strawn LM (1997) Receptor tyrosine kinases as targets for inhibition of angiogenesis, *Drug Discovery Today* 2: 50-63
- 28 Liekens S, De Clercq E, Neyts J (2001) Angiogenesis: Regulators and clinical applications, *Biochem. Pharmacol.* 61: 253-270
- 29 Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M (1998) Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor, *Cell* 92: 735-745
- 30 Petrova TV, Makinen T, Alitalo K (1999) Signaling via vascular endothelial growth factor receptors, *Exp. Cell Res.* 253: 117-130
- 31 Nash A, Kurek J, Hilton D (1999) Cytokines: From the laboratory to the clinic, *Drug Dev. Res.* 46: 197-205
- 32 Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW (1996) Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene, *Nature* 380: 439-442

- 33 Henry TD, McKendall GR, Azrin MA, Lopez JJ, Benza R, Willerson JT, Giacomini J, Olson R, Bart BA, Roel JP, Annex BH (2000) VIVA trial: One year follow up, *Circulation* (Suppl. II) 102: II-309
- 34 Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J (2000) Vascular-specific growth factors and blood vessel formation, *Nature* 407: 242-248
- 35 Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD (1997) Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis, *Science* 277: 55-60
- 36 Gospodarowicz D, Bialecki H, Greenburg G (1978) Purification of the fibroblast growth factor activity from bovine brain, *J. Biol. Chem.* 253: 3736-3743
- 37 Xie M-H, Holcomb I, Deuel B, Dowd P, Huang A, Vagts A, Foster J, Liang J, Brush J, Gu Q, Hillan K, Goddard A, Gurney AL (1999) FGF-19, a novel fibroblast growth factor with unique specificity for FGFR4, *Cytokine* 11: 729-735
- 38 Folkman J, Klagsbrun M (1987) Angiogenic factors, *Science* 235: 442-447
- 39 Moscatelli D, Presta M, Rifkin DB (1986) Purification of a factor from human placenta that stimulates capillary endothelial cell protease production, DNA synthesis, and migration, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 2091-2095
- 40 Cybulsky AV, McTavish AJ, Papillon J, Takano T (1999) Role of extracellular matrix and Ras in regulation of glomerular epithelial cell proliferation, *Am. J. Pathol.* 154: 899-908
- 41 Ferrara N (1999) Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis, *Kidney Int.* 56: 794-814
- 42 Green CJ, Lichtlen P, Huynh NT, Yanovsky M, Laderoute KR, Schaffner W, Murphy BJ (2001) Placenta growth factor gene expression is induced by hypoxia in fibroblasts: A central role for metal transcription factor-1, *Cancer Res.* 61: 2696-2703
- 43 West DC, Hampson IN, Arnold F, Kumar S (1985) Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid, *Science* 228: 1324-1326
- 44 O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J (1997) Endostatin: An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth, *Cell* 88: 277-285
- 45 Kelly PMA, Davison RS, Bliss E, McGee JO'D (1988) Macrophages in human breast disease: A quantitative immunohistochemical study, *Br. J. Cancer* 57: 174-177
- 46 Gordon S (1998) The Role of the macrophage in immune regulation, *Res. Immunol.* 149: 685-688
- 47 Leek RD, Lewis CE, Harris AL (1997) The role of macrophages in tumour angiogenesis in: Tumour angiogenesis (Bicknell R, Lewis CE, Ferrara N, Hrsg.), Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo: 81-99
- 48 Sunderkötter C, Steinbrink K, Goebeler M, Bhardwaj R, Sorg C (1994) Macrophages and angiogenesis, *J. Leukoc. Biol.* 55: 410-422
- 49 Polverini PJ (1997) Role of the macrophage in angiogenesis-dependent diseases in: Regulation of angiogenesis (Goldberg ID, Rosen EM, Hrsg.), Birkhäuser Verlag, Basel: 11-28

- 50 Jackson JR, Seed MP, Kircher CH, Willoughby DA, Winkler JD (1997) The codependence of angiogenesis and chronic inflammation, *FASEB J.* 11: 457-465
- 51 Firsching A, Nickel P, Mora P, Allolio B (1995) Antiproliferative and angiostatic activity of suramin analogues, *Cancer Res.* 55: 4957-4961
- 52 Belotti D, Vergani V, Drudis T, Borsotti P, Pitelli MR, Viale G, Giavazzi R, Taraboletti G (1996) The microtubule-affecting drug paclitaxel has antiangiogenic activity, *Clin. Cancer Res.* 2: 1843-1849
- 53 Ezekowitz RAB, Mulliken JB, Folkman J (1992) Interferon alfa-2a therapy for life-threatening hemangiomas of infancy, *N. Engl. J. Med.* 326: 1456-1463
- 54 Junker A (2001) *Dtsch. Apoth. Ztg.* 28: 3332-3339
- 55 Rosen L (2000) Antiangiogenic strategies and agents in clinical trials, *Oncologist* 5 (Suppl. 1): 20-27
- 56 Denis LJ, Verweij J (1997) Matrix metalloproteinase inhibitors: Present achievements and future prospects, *Invest. New Drugs* 15: 175-185
- 57 Laufer S (2001) *Pharm. Ztg.* 26: 2216
- 58 Cao Y (2001) Endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic implications, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33: 357-369
- 59 Dhanabal M, Ramchandran R, Waterman MJF, Lu H, Knebelmann B, Segal M, Sukhatme VP (1999) Endostatin induces endothelial cell apoptosis, *J. Biol. Chem.* 274: 11721-11726
- 60 Boehm T, Folkman J, Browder T, O'Reilly MS (1997) Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance, *Nature* 390: 404-407
- 61 O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J (1994) Angiostatin: A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma, *Cell* 79: 315-328
- 62 Dong Z, Kumar R, Yang X, Fidler IJ (1997) Macrophage-derived metalloelastase is responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma, *Cell* 88: 801-810
- 63 Cao Y (1999) Therapeutic potentials of angiostatin in the treatment of cancer, *Haematologica* 84: 643-650
- 64 Claesson-Welsh L, Welsh M, Nobuyuki I, Anand-Apte B, Soker S, Zetter B, O'Reilly M, Folkman J (1998) Angiostatin induces endothelial cell apoptosis and activation of focal adhesion kinase independently of the integrin-binding motif RGD, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 5579-5583
- 65 Yao L, Pike SE, Setsuda J, Parekh J, Gupta G, Raffeld M, Jaffe ES, Tosato G (2000) Effective targeting of tumor vasculature by the angiogenesis inhibitors vasostatin and interleukin-12, *Blood* 96: 1900-1905
- 66 Singh RK, Gutman M, Bucana CD, Sanchez R, Llansa N, Fidler IJ (1995) Interferons α and β down-regulate the expression of basic fibroblast growth factor in human carcinomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4562-4566
- 67 Sgonc R, Fuerhapter C, Boeck G, Swerlick RA, Fritsch P, Sepp N (1998) Induction of apoptosis in human dermal microvascular endothelial cells and infantile hemangiomas by interferon- α , *Int. Arch. Allergy Immunol.* 117: 209-214

- 68 Folkman J, Langer R, Linhardt RJ, Haudenschild C, Taylor S (1983) Angiogenesis inhibition and tumor regression caused by heparin or a heparin fragment in the presence of cortisone, *Science* 221: 719-725
- 69 Crum R, Szabo S, Folkman J (1985) A new class of steroids inhibits angiogenesis in the presence of heparin or a heparin fragment, *Science* 230: 1375-1378
- 70 Folkman J, Ingber DE (1987) Angiostatic steroids, *Ann. Surg.* 206: 374-383
- 71 McNatt LG, Weimer L, Yanni J, Clark AF (1999) Angiostatic activity of steroids in the chick embryo CAM and rabbit cornea models of neovascularization, *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 15: 413-423
- 72 Svahn CM, Weber M, Mattsson C, Neiger K, Palm M (1992) Inhibition of angiogenesis by heparin fragments in the presence of hydrocortisone, *Carbohydr. Polym.* 18: 9-16
- 73 Wilks JW, Scott PS, Vrba LK, Cocuzza JM (1991) Inhibition of angiogenesis with combination treatments of angiostatic steroids and suramin, *Int. J. Radiat. Biol.* 60: 73-77
- 74 Folkman J, Weisz PB, Joullié MM, Li WW, Ewing WR (1989) Control of angiogenesis with synthetic heparin substitutes, *Science* 243: 1490-1493
- 75 Chen NT, Corey EJ, Folkman J (1988) Potentiation of angiostatic steroids by a synthetic inhibitor of arylsulfatase, *Lab. Invest.* 59: 453-459
- 76 Fotsis T, Zhang Y, Pepper MS, Adlercreutz H, Montesano R, Nawroth PP, Schweigerer L (1994) The endogenous oestrogen metabolite 2-methoxyestradiol inhibits angiogenesis and suppresses tumour growth, *Nature* 368: 237-239
- 77 Yue T-L, Wang X, Louden CS, Gupta S, Pillarisetti K, Gu J-L, Hart TK, Lysko PG, Feuerstein GZ (1997) 2-Methoxyestradiol, an endogenous estrogen metabolite, induces apoptosis in endothelial cells and inhibits angiogenesis: Possible role for stress-activated protein kinase signaling pathway and Fas expression, *Mol. Pharmacol.* 51: 951-962
- 78 Tozer GM, Prise VE, Wilson J, Locke RJ, Vojnovic B, Stratford MRL, Dennis MF, Chaplin DJ (1999) Combretastatin A-4 phosphate as a tumor vascular-targeting agent: Early effects in tumors and normal tissues, *Cancer Res.* 59: 1626-1634
- 79 Iyer S, Chaplin DJ, Rosenthal DS, Boulares AH, Li L-Y, Smulson ME (1998) Induction of apoptosis in proliferating human endothelial cells by the tumor-specific antiangiogenesis agent combretastatin A-4, *Cancer Res.* 58: 4510-4514
- 80 Ingber D, Fujita T, Kishimoto S, Sudo K, Kanamaru T, Brem H, Folkman J (1990) Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth, *Nature* 348: 555-557
- 81 Turk BE, Griffith EC, Wolf S, Biemann K, Chang Y-H, Liu JO (1999) Selective inhibition of amino-terminal methionine processing by TNP-470 and ovalicin in endothelial cells, *Chem. Biol.* 6: 823-833
- 82 Wernert N, Stanjek A, Kiriakidis S, Hügel A, Jha HC, Mazitschek R, Giannis A (1999) Inhibierung der Angiogenese *in vivo* durch ets-1-Antisense-Oligonucleotide - Hemmung der Expression des Ets-1-Transkriptionsfaktors durch das Antibiotikum Fumagillin, *Angew. Chem.* 111: 3432-3435

- 83 Parish CR, Freeman C, Hulett MD (2001) Heparanase: A key enzyme involved in cell invasion, *Biochim. Biophys. Acta* 1471: M99-M108
- 84 Bartlett MR, Underwood PA, Parish CR (1995) Comparative analysis of the ability of leucocytes, endothelial cells and platelets to degrade the subendothelial basement membrane: Evidence for cytokine dependence and detection of a novel sulfatase, *Immunol. Cell Biol.* 73: 113-124
- 85 Parish CR, Freeman C, Brown KJ, Francis DJ, Cowden WB (1999) Identification of sulfated oligosaccharide-based inhibitors of tumor growth and metastasis using novel in vitro assays for angiogenesis and heparanase activity, *Cancer Res.* 59: 3433-3441
- 86 Curran S, Murray GI (1999) Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis, *J. Pathol.* 189: 300-308
- 87 Storgard CM, Stupack DG, Jonczyk A, Goodman SL, Fox RI, Cheresh DA (1999) Decreased angiogenesis and arthritic disease in rabbits treated with an $\alpha_v\beta_3$ antagonist, *J. Clin. Invest.* 103: 47-54
- 88 Gagliardi A, Hadd H, Collins DC (1992) Inhibition of angiogenesis by suramin, *Cancer Res.* 52: 5073-5075
- 89 Seitz R (2001) *Dtsch. Apoth. Ztg.* 30: 3550-3551
- 90 D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J (1994) Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 4082-4085
- 91 Bauer KS, Dixon SC, Figg WD (1998) Inhibition of angiogenesis by thalidomide requires metabolic activation, which is species-dependent, *Biochem. Pharmacol.* 55: 1827-1834
- 92 Jones MK, Wang H, Peskar BM, Levin E, Itani RM, Sarfeh IJ, Tarnawski AS (1999) Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: Insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing, *Nat. Med.* 5: 1418-1423
- 93 Gately S (2000) The contributions of cyclooxygenase-2 to tumor angiogenesis, *Cancer Metastasis Rev.* 19: 19-27
- 94 Haralson MA, Hassell JR (1995) The extracellular matrix - an overview in: *Extracellular Matrix, a practical approach* (Haralson MA, Hassell RJ, Hrsg.), Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo: 1-30
- 95 Zvibel I, Halpern Z, Papa M (1998) Extracellular matrix modulates expression of growth factors and growth-factor receptors in liver-colonizing colon-cancer cell lines, *Int. J. Cancer* 77: 295-301
- 96 Turnbull JE, Lyon M, Gallagher JT (1995) Structural analysis of glycosaminoglycans in: *Extracellular Matrix, a practical approach* (Haralson MA, Hassell RJ, Hrsg.), Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo: 199-219
- 97 Spivak-Kroizman T, Lemmon MA, Dikic I, Ladbury JE, Pinchasi D, Huang J, Jaye M, Crumley G, Schlessinger J, Lax I (1994) Heparin-induced oligomerization of FGF molecules is responsible for FGF receptor dimerization, activation, and cell proliferation, *Cell* 79: 1015-1024
- 98 Taylor S, Folkman J (1982) Protamine is an inhibitor of angiogenesis, *Nature* 297: 307-312

- 99 Thorpe PE, Derbyshire EJ, Andrade SP, Press N, Knowles PP, King S, Watson GJ, Yang Y-C, Rao-Betté M (1993) Heparin-steroid conjugates: New angiogenesis inhibitors with antitumor activity in mice, *Cancer Res.* 53: 3000-3007
- 100 Jakobson AM, Hahnenberger R (1991) Antiangiogenic effect of heparin and other sulphated glycosaminoglycans in the chick embryo chorioallantoic membrane, *Pharmacol. Toxicol.* 69: 122-126
- 101 Norrby K (1993) Heparin and angiogenesis: A low-molecular-weight fraction inhibits and a high-molecular-weight fraction stimulates angiogenesis systemically, *Haemostasis* 23 (Suppl. I): 141-149
- 102 Nguyen NM, Lehr JE, Pienta KJ (1993) Pentosan inhibits angiogenesis *in vitro* and suppresses prostate tumor growth *in vivo*, *Anticancer Res.* 13: 2143-2148
- 103 Zugmaier G, Lippman ME, Wellstein A (1992) Inhibition by pentosan polysulfate (PPS) of heparin-binding growth factors released from tumor cells and blockage by PPS of tumor growth in animals, *J. Natl. Cancer Inst.* 84: 1716-1724
- 104 Pluda JM, Shay LE, Foli A, Tannenbaum S, Cohen PJ, Goldspiel BR, Adamo D, Cooper MR, Broder S, Yarchoan R (1993) Administration of pentosan polysulfate to patients with human immunodeficiency virus-associated Kaposi's sarcoma, *J. Natl. Cancer Inst.* 85: 1585-1592
- 105 Hoffman R, Paper DH, Donaldson J, Vogl H (1996) Inhibition of angiogenesis and murine tumour growth by laminarin sulphate, *Br. J. Cancer* 73: 1183-1186
- 106 Murata J, Saiki I, Makabe T, Tsuta Y, Tokura S, Azuma I (1991) Inhibition of tumor-induced angiogenesis by sulfated chitin derivatives, *Cancer Res.* 51: 22-26
- 107 Hoffman R (1993) Carrageenans inhibit growth-factor binding, *Biochem. J.* 289: 331-334
- 108 Paper DH, Vogl H, Franz G, Hoffman R (1995) Defined carrageenan derivatives as angiogenesis inhibitors, *Macromol. Symp.* 99: 219-225
- 109 Westman J, Nilsson M, Ornitz DM, Svahn C-M (1995) Synthesis and fibroblast growth factor binding of oligosaccharides related to heparin and heparan sulphate, *J. Carbohydr. Chem.* 14: 95-113
- 110 Hahnenberger R, Jakobson AM, Ansari A, Wehler T, Svahn CM, Lindahl U (1993) Low-sulphated oligosaccharides derived from heparan sulphate inhibit normal angiogenesis, *Glycobiology* 3: 567-573
- 111 Benelli U, Bocci G, Danesi R, Lepri A, Bernardini N, Bianchi F, Lupetti M, Dolfi A, Campagni A, Agen C, Nardi M, del Tacca M (1998) The heparan sulfate Suleparoide inhibits rat corneal angiogenesis and *in vitro* neovascularization, *Exp. Eye Res.* 67: 133-142
- 112 Vogl H (1996) Galactansulfate als potentielle Angiogeneseinhibitoren, Dissertation Universität Regensburg
- 113 Paper DH, Vogl H, Franz G (1999) Low-molecular-weight galactan sulfates as angiogenesis inhibitors in: Relevance of tumor models for anticancer drug development. *Contrib. Oncol.* (Fiebig HH, Burger AM, Hrsg.), Karger, Basel 54: 191-199

- 114 Marchesan M (1999) Phytochemische Charakterisierung von Spitzwegerichfluid-extrakten und pharmakologische Untersuchungen *in vitro* und *in vivo*, Dissertation Universität Regensburg
- 115 Paper DH, Marchesan M, Franz G (1994) Hydrolysis of κ - and ι -Carrageenan by lyophilisation, *Eur. J. Pharm. Sci.* 2: 114
- 116 Inoue K, Korenaga H, Tanaka NG, Sakamoto N, Kadoya S (1988) The sulphated polysaccharide-peptidoglycan complex potently inhibits embryonic angiogenesis and tumor growth in the presence of cortisone acetate, *Carbohydr. Res.* 181: 135-142
- 117 Franz G, Alban S (1999) Kohlenhydrate in: Pharmakognosie-Phytopharmazie (Hänsel R, Sticher O, Steinbäcker E, Hrsg.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: 301-427
- 118 Dürig J, Bruhn T, Zurborn K-H, Guttensohn K, Bruhn HD, Béress L (1997) Anticoagulant fucoidan fractions from *Fucus vesiculosus* induce platelet activation *in vitro*, *Thromb. Res.* 85: 479-491
- 119 Shanmugam M, Mody KH (2000) Heparinoid-active sulphated polysaccharides from marine algae as potential blood anticoagulant agents, *Curr. Sci.* 79: 1672-1683
- 120 Baba M, Snoeck R, Pauwels R, De Clercq E (1988) Sulfated polysaccharides are potent and selective inhibitors of various enveloped viruses, including herpes simplex virus, cytomegalovirus, vesicular stomatitis virus, and human immunodeficiency virus, *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 1742-1745
- 121 Schaeffer DJ, Krylov VS (2000) Anti-HIV activity of extracts and compounds from algae and cyanobacteria, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 45: 208-227
- 122 Hiroko I, Hiroyuki N, Hideomi A, Cun Z, Takashi M, Hitoshi I (1993) Antitumor activity and immunological properties of marine algal polysaccharides, especially fucoidan, prepared from *Sargassum thunbergii* of Phaeophyceae, *Anticancer Res.* 13 (6A): 2045-2052
- 123 Riou D, Collic-Jouault S, Du Sel DP, Bosch S, Siavoshian S, Le Bert V, Tomasoni C, Sinquin C, Durand P, Roussakis C (1996) Antitumor and antiproliferative effects of a fucan extracted from *ascophyllum nodosum* against a non-small-cell bronchopulmonary carcinoma line, *Anticancer Res.* 16 (3A): 1213-1218
- 124 Hiroki I, Hiroyuki N, Hideomi A, Hitoshi I (1995) Immunological analysis of inhibition of lung metastasis by fucoidan (GIV-A) prepared from brown seaweed *Sargassum thunbergii*, *Anticancer Res.* 15: 1937-1947
- 125 Soeda S, Shibata Y, Shimeno H (1997) Inhibitory effect of oversulfated fucoidan on tube formation by human vascular endothelial cells, *Biol. Pharm. Bull.* 20: 1131-1135
- 126 Marshall JL, Hawkins MJ (1995) The clinical experience with antiangiogenic agents, *Breast Cancer Res. Treat.* 36: 253-261
- 127 Käsbauer C (1999) Synthese von sulfatierten Oligosacchariden und Glycosiden und ihre Testung auf antiangiogene Wirkung, Dissertation Universität Regensburg
- 128 Käsbauer CW, Paper DH, Franz G (2001) Sulfated β -(1 \rightarrow 4)-galacto-oligosaccharides and their effect on angiogenesis, *Carbohydr. Res.* 330: 427-430
- 129 Jain RK, Schlenger K, Höckel M, Yuan F (1997) Quantitative angiogenesis assays: Progress and problems, *Nat. Med.* 3: 1203-1208

- 130 Winkler JD, Jackson JR, Fan T-P, Seed MP (1999) Angiogenesis in: *In vivo* models of inflammation (Morgan DW, Marshall LA, Hrsg.), Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin: 93-109
- 131 Sandison JC (1924) A new method for the microscopic study of living growing tissues by the introduction of a transparent chamber in the rabbit's ear, *Anat. Rec.* 28: 281-287
- 132 Warren BA, Shubik P (1966) The growth of the blood supply to melanoma transplants in the hamster cheek pouch, *Lab. Invest.* 15: 464-478
- 133 Selye H (1953) On the mechanism through which hydrocortisone affects the resistance of tissues to injury. An experimental study with the granuloma pouch technique, *J. A. Med. Assoc.* 152: 1207-1213
- 134 Gimbrone MA Jr., Cotran RS, Leapman SB, Folkman J (1974) Tumor growth and neovascularization: An experimental model using the rabbit cornea, *J. Natl. Cancer Inst.* 52: 413-427
- 135 Lüpke N-P (1992) Tierversuche - Ergänzungs- und Ersatzmethoden, *Pharm. Ztg. Wiss.* 6: 221-233
- 136 Spielmann H, Kalweit S, Liebsch M, Wirnsberger T, Gerner I, Bertram-Neis E, Krauser K, Kreiling R, Miltenburger G, Pape W, Steiling W (1993) Validation study of alternatives to the Draize eye irritation test in Germany: Cytotoxicity testing and HET-CAM test with 136 industrial chemicals, *Toxicol. In Vitro* 7: 505-510
- 137 Lüpke N-P (1992) Toxikologisch-pharmakologische Prüfmöglichkeiten am bebrüteten Hühnerei in: Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen (Schöffl H, Schulte-Hermann R, Tritthart HA, Hrsg.), Springer-Verlag, Wien: 37-49
- 138 Nguyen M, Shing Y, Folkman J (1994) Quantitation of angiogenesis and antiangiogenesis in the chick embryo chorioallantoic membrane, *Microvasc. Res.* 47: 31-40
- 139 Ribatti D, Vacca A, Roncali L, Dammacco F (1996) The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for *in vivo* research on angiogenesis, *Int. J. Dev. Biol.* 40: 1189-1197
- 140 Auerbach R, Kubai L, Knighton D, Folkman J (1974) A simple procedure for the long-term cultivation of chicken embryos, *Dev. Biol.* 41: 391-394
- 141 Ribatti D, Roncali L, Nico B, Bertossi M (1987) Effects of exogenous heparin on the vasculogenesis of the chorioallantoic membrane, *Acta Anat.* 130: 257-263
- 142 Tanaka NG, Sakamoto N, Tohgo A, Nishiyama Y, Ogawa H (1986) Inhibitory effects of anti-angiogenic agents on neovascularization and growth of the chorioallantoic membrane (CAM). - The possibility of a new CAM assay for angiogenesis inhibition, *Exp. Pathol.* 30: 143-150
- 143 Cao Y, Cao R (1999) Angiogenesis inhibited by drinking tea, *Nature* 398: 381
- 144 Masood R, McGarvey ME, Zheng T, Cai J, Arora N, Lynne Smith D, Sloane N, Gill PS (1999) Antineoplastic urinary protein inhibits Kaposi's sarcoma and angiogenesis *in vitro* and *in vivo*, *Blood* 93: 1038-1044
- 145 Wilting J, Christ B, Bokeloh M, Weich HA (1993) *In vivo* effects of vascular endothelial growth factor on the chicken chorioallantoic membrane, *Cell Tissue Res.* 274: 163-172

- 146 Ausprunk DH, Knighton DR, Folkman J (1974) Differentiation of vascular endothelium in the chick chorioallantois: A structural and autoradiographic study, *Dev. Biol.* 38: 237-248
- 147 Jakob W, Jentzsch KD, Mauersberger B, Heder G (1978) The chick chorioallantoic membrane as a bioassay for angiogenesis factors: Reactions induced by carrier materials, *Exp. Pathol.* 15: 241-249
- 148 Leene W, Duyzings MJM, van Steeg C (1973) Lymphoid stem cell identification in the developing thymus and bursa of fabricius of the chick, *Z. Zellforsch.* 136: 521-533
- 149 Veselá D, Veselý D, Jelinek R (1994) Embryotoxicity in chick embryo of thalidomide hydrolysis products following metabolic activation by rat liver homogenate, *Funct. Dev. Morphol.* 4: 313-316
- 150 Danesi R, Del Bianchi S, Soldani P, Campagni A, La Rocca RV, Myers CE, Paparelli A, Del Tacca M (1993) Suramin inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane, *Br. J. Cancer* 68: 932-938
- 151 Braddock PS, Hu D-E, Fan T-PD, Stratford IJ, Harris AL, Bicknell R (1994) A structure-activity analysis of antagonism of the growth factor and angiogenic activity of basic fibroblast growth factor by suramin and related polyanions, *Br. J. Cancer* 69: 890-898
- 152 Gagliardi AR, Kassack M, Kreimeyer A, Muller G, Nickel P, Collins DC (1998) Antiangiogenic and antiproliferative activity of suramin analogues, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 41: 117-124
- 153 Rusnati M, Coltrini D, Oreste P, Zoppetti G, Presta M (1996) The interaction of basic fibroblast growth factor (bFGF) with heparan sulfate proteoglycans in: Nonanticoagulant actions of glycosaminoglycans (Harenberg J, Casu B, Hrsg.), Plenum Press, New York: 171-187
- 154 Usov AI, Smirnova GP, Bilan MI, Shashkov AS (1998) Polysaccharides of algae. 53. Brown alga *Laminaria saccharina* (L.) Lam. as a source of fucoidan, *Bioorgan. Khim.* 24: 437-445
- 155 Bilan MI, Grachev AA, Ustuzhanina NE, Shashkov AS, Nifantiev NE, Usov AI (2002) Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus evanescens* C.Ag., *Carbohydr. Res.* 337: 719-730
- 156 Thews G, Mutschler E, Vaupel P (1999) Entzündung in: Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen (5. Auflage), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart: 59-60
- 157 Vogel HG, Vogel WH (1997) Anti-inflammatory activity in: Drug Discovery and Evaluation (Vogel HG, Vogel WH, Hrsg.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: 390-418
- 158 Robinson LA, Steeber DA, Tedder TF (1999) The selectins in inflammation in: Inflammation: Basic principles and clinical correlates (Gallin JI, Snyderman R, Hrsg.), 3. Auflage, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia: 571-583
- 159 Bendas G (1999) *Pharm. Ztg.* 46: 3754-3760
- 160 Simanek EE, McGarvey GJ, Jablonowski JA, Wong C-H (1998) Selectin-carbohydrate interactions: From natural ligands to designed mimics, *Chem. Rev.* 98: 833-862

- 161 Firestein GS (1999) Starving the synovium: Angiogenesis and inflammation in rheumatoid arthritis, *J. Clin. Invest.* 103: 3-4
- 162 Corkill MM, Kirkham BW, Haskard DO, Barbatis C, Gibson T, Panayi GS (1991) Gold treatment of rheumatoid arthritis decreases synovial expression of the endothelial leukocyte adhesion receptor ELAM-1, *J. Rheumatol.* 18: 1453-1460
- 163 Brunner U, Gensthaler BM, Mevissen G, Morck H (2000) *Pharm. Ztg.* 24: 1978-1979
- 164 D'Arcy PF, Howard EM (1967) A new anti-inflammatory test, utilizing the chorio-allantoic membrane of the chick embryo, *Br. J. Pharmac. Chemother.* 29: 378-387
- 165 Lüpke N-P, Theisen NL, Baron G (1990) *Arch. Pharm.* (Weinheim, Ger.) 323: 798
- 166 Dannhardt G, Kreher M, Nowe U, Pies A (1996) Method for testing non-steroidal anti-inflammatories: The modified hen's egg chorioallantoic membrane test (HET-CAM Test) compared to other procedures, *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* 329: 301-310
- 167 Marchesan M, Paper DH, Hose S, Franz G (1998) Investigation of the antiinflammatory activity of liquid extracts of *Plantago lanceolata* L., *Phytother. Res.* 12: S33-S34
- 168 Schuhbaum H, Bürgermeister J, Paper DH, Franz G (2000) Anti-inflammatory activity of *Zingiber officinale* extracts, *Pharm. Pharmacol. Lett.* 2: 82-85
- 169 Persönliche Mitteilung von PD Dr. Paper DH
- 170 Tyrrell DJ, Horne AP, Holme KR, Preuss JMH, Page CP (1999) Heparin in inflammation: Potential therapeutic applications beyond anticoagulation in: *Advances in pharmacology* (August JT, Anders MW, Murad F, Coyle JT, Hrsg.), Academic Press, San Diego, Californien: 151-208
- 171 Preobrazhenskaya ME, Berman AE, Mikhailov VI, Ushakova NA, Mazurov AV, Semenov AV, Usov AI, Nifant'ev NE, Bovin NV (1997) Fucoidan inhibits leukocyte recruitment in a model peritoneal inflammation in rat and blocks interaction of P-selectin with its carbohydrate ligand, *Biochem. Mol. Biol. Int.* 43: 443-451
- 172 Nasu T, Fukuda Y, Nagahira K, Kawashima H, Noguchi C, Nakanishi T (1997) Fucoidin, a potent inhibitor of L-selectin function, reduces contact hypersensitivity reaction in mice, *Immunol. Lett.* 59: 47-51
- 173 Stoolman LM, Rosen SD (1983) Possible role for cell-surface carbohydrate-binding molecules in lymphocyte recirculation, *J. Cell Biol.* 96: 722-729
- 174 van Boeckel CAA, Petitou M (1993) The unique antithrombin III binding domain of heparin: A lead to new synthetic antithrombotics, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 32: 1671-1690
- 175 Folkman J (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease, *Nat. Med.* 1: 27-31
- 176 Plate KH, Breier G, Millauer B, Ullrich A, Risau W (1993) Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its cognate receptors in a rat glioma model of tumor angiogenesis, *Cancer Res.* 53: 5822-5827
- 177 Carmeliet P, Dor Y, Herbert J-M, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, Neeman M, Bono F, Abramovitch R, Maxwell P, Koch CJ, Ratcliffe P, Moons L, Jain RK, Collen D, Keshet E (1998) Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis, *Nature* 394: 485-490

- 178 Kuwabara K, Ogawa S, Matsumoto M, Koga S, Clauss M, Pinsky DJ, Lyn P, Leavy J, Witte L, Joseph-Silverstein J, Furie MB, Torcia G, Cozzolino F, Kamada T, Stern DM (1995) Hypoxia-mediated induction of acidic/basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor in mononuclear phagocytes stimulates growth of hypoxic endothelial cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4606-4610
- 179 Cavallaro U, Christofori G (2000) Molecular mechanisms of tumor angiogenesis and tumor progression, *J. Neuro-Oncol.* 50: 63-70
- 180 Bicknell R (1997) Mechanistic insights into tumour angiogenesis in: Tumour angiogenesis (Bicknell R, Lewis CE, Ferrara N, Hrsg.), Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo: 19-28
- 181 Wagner U (2001) *Pharm. Ztg.* 40: 3532-3533
- 182 Kolles H, Niedermayer I, Feiden W (1998) Grading von Astrozytomen und Oligodendroglomen, *Pathologe* 19: 259-268
- 183 Plate KH, Breier G, Risau W (1994) Molecular mechanisms of developmental and tumor angiogenesis, *Brain Pathol.* 4: 207-218
- 184 Sehgal A (1998) Molecular changes during the genesis of human gliomas, *Semin. Surg. Oncol.* 14: 3-12
- 185 Guerin C, Laterra J (1997) Regulation of angiogenesis in malignant gliomas in: Regulation of angiogenesis (Goldberg ID, Rosen EM, Hrsg.), Birkhäuser Verlag, Basel: 47-64
- 186 Plate KH, Risau W (1995) Angiogenesis in malignant gliomas, *Glia* 15: 339-347
- 187 Plate KH, Breier G, Weich HA, Mennel HD, Risau W (1994) Vascular endothelial growth factor and glioma angiogenesis: Coordinate induction of VEGF receptors, distribution of VEGF protein and possible *in vivo* regulatory mechanisms, *Int. J. Cancer* 59: 520-529
- 188 Plate KH, Breier G, Weich HA, Risau W (1992) Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas *in vivo*, *Nature* 359: 845-848
- 189 Plate KH, Warnke PC (1997) Vascular endothelial growth factor, *J. Neuro-Oncol.* 35: 365-372
- 190 Millauer B, Shawver LK, Plate KH, Risau W, Ullrich A (1994) Glioblastoma growth inhibited *in vivo* by a dominant-negative Flk-1 mutant, *Nature* 367: 576-579
- 191 Dunn IF, Heese O, McL. Black P (2001) Growth factors in glioma angiogenesis: FGFs, PDGF, EGF, and TGFs, *J. Neuro-Oncol.* 50: 121-137
- 192 Giese A, Westphal M (2001) Treatment of malignant glioma: A problem beyond the margins of resection, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 127: 217-225
- 193 Silbergeld DL, Chicoine MR (1997) Isolation and characterization of human malignant glioma cells from histologically normal brain, *J. Neurosurg.* 86: 525-531
- 194 Sipos EP, Brem H (2000) Local anti-angiogenic brain tumor therapies, *J. Neuro-Oncol.* 50: 181-188
- 195 Grossman S, Fisher J, Piantadosi S, Brem H (1998) The new approaches to brain tumor therapy (NABTT) CNS consortium: Organization, objectives, and activities, *Cancer Control* 5: 107-114

- 196 Puduvalli VK, Sawaya R (2000) Antiangiogenesis – therapeutic strategies and clinical implications for brain tumors, *J. Neuro-Oncol.* 50: 189-200
- 197 Cheng S-Y, Su Huang H-J, Nagane M, Ji X-D, Wang D, Shih CC-Y, Arap W, Huang C-M, Cavenee WK (1996) Suppression of glioblastoma angiogenicity and tumorigenicity by inhibition of endogenous expression of vascular endothelial growth factor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8502-8507
- 198 Saleh M, Stacker SA, Wilks AF (1996) Inhibition of growth of C6 glioma cells *in vivo* by expression of antisense vascular endothelial growth factor sequence, *Cancer Res.* 56: 393-401
- 199 Im S-A, Gomez-Manzano C, Fueyo J, Liu T-J, Ke LD, Kim J-S, Lee H-Y, Steck PA, Kyritsis AP, Yung WKA (1999) Antiangiogenesis treatment for gliomas: Transfer of antisense-vascular endothelial growth factor inhibits tumor growth *in vivo*, *Cancer Res.* 59: 895-900
- 200 ATCC Catalogue of Cell Lines and Hybridomas (1992) ATCC Rockville, Maryland, USA
- 201 Papoutsi M, Kurz H, Schächtele C, Marmé D, Christ B, Pröls F, Wilting J (2000) Induction of the blood-brain barrier marker neurothelin/HT7 in endothelial cells by a variety of tumors in chick embryos, *Histochem. Cell Biol.* 113: 105-113
- 202 Ribatti D, Gualandris A, Belleri M, Massardi L, Nico B, Rusnati M, Dell'era P, Vacca A, Roncali L, Presta M (1999) Alterations of blood vessel development by endothelial cells overexpressing fibroblast growth factor-2, *J. Pathol.* 189: 590-599
- 203 <http://cancertrials.nci.nih.gov>
- 204 Auerbach R, Akhtar N, Lewis RL, Shinners BL (2000) Angiogenesis assays: Problems and pitfalls, *Cancer Metastasis Rev.* 19: 167-172
- 205 Auerbach R, Auerbach W, Polakowski I (1991) Assays for angiogenesis: A review, *Pharmac. Ther.* 51: 1-11
- 206 Korff T, Kimmina S, Martiny-Baron G, Augustin HG (2001) Blood vessel maturation in a 3-dimensional spheroidal coculture model: Direct contact with smooth muscle cells regulates endothelial cell quiescence and abrogates VEGF responsiveness, *FASEB J.* 15: 447-457
- 207 Nicosia RF, Ottinetti A (1990) Growth of microvessels in serum-free matrix culture of rat aorta. A quantitative assay of angiogenesis *in vitro*, *Lab. Invest.* 63: 115-122
- 208 Brown KJ, Maynes SF, Bezios A, Maguire DJ, Ford MD, Parish CR (1996) A novel *in vitro* assay for human angiogenesis, *Lab. Invest.* 75: 539-555
- 209 Muthukkaruppan V, Shinners BL, Lewis RL, Park S-Y, Baechler BJ, Auerbach R (2000) The chick embryo aortic arch assay: A new, rapid, quantifiable *in vitro* method for testing the efficacy of angiogenic and anti-angiogenic factors in a three-dimensional, serum-free organ culture system, *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 41: 65
- 210 Feucht M, Christ B, Wilting J (1997) VEGF induces cardiovascular malformation and embryonic lethality, *Am. J. Pathol.* 151: 1407-1416
- 211 Montesano R, Orci L (1985) Tumor-promoting phorbol esters induce angiogenesis *in vitro*, *Cell* 42: 469-477

- 212 Grant DS, Tashiro K-I, Segui-Real B, Yamada Y, Martin GR, Kleinman HK (1989) Two different laminin domains mediate the differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures *in vitro*, *Cell* 58: 933-943
- 213 Ishihara M, Tyrrell DJ, Kiefer MC, Barr PJ, Swiedler SJ (1992) A cell-based assay for evaluating the interaction of heparin-like molecules and basic fibroblast growth factor, *Anal. Biochem.* 202: 310-315
- 214 Fannon M, Forsten KE, Nugent MA (2000) Potentiation and inhibition of bFGF binding by heparin: A model for regulation of cellular response, *Biochemistry* 39: 1434-1445
- 215 Loo JA (1997) Studying noncovalent protein complexes by electrospray ionization mass spectrometry, *Mass Spectrom. Rev.* 16: 1-23
- 216 Bittoun P, Bagheri-Yarmand R, Chaubet F, Crépin M, Jozefonvicz J, Fermandjian S (1999) Effects of the binding of a dextran derivative on fibroblast growth factor 2: Secondary structure and receptor-binding studies, *Biochem. Pharmacol.* 57: 1399-1406
- 217 Siegel MM, Tabei K, Kagan MZ, Vlahov IR, Hileman RE, Linhardt RJ (1997) Polysulfated carbohydrates analyzed as ion-paired complexes with basic peptides and proteins using electrospray negative ionization mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 32: 760-772
- 218 Coltrini D, Rusnati M, Zoppetti G, Oreste P, Isacchi A, Caccia P, Bergonzoni L, Presta M (1993) Biochemical basis of the interaction of human basic fibroblast growth factor with glycosaminoglycans, *Eur. J. Biochem.* 214: 51-58
- 219 Lee MK, Lander AD (1991) Analysis of affinity and structural selectivity in the binding of proteins to glycosaminoglycans: Development of a sensitive electrophoretic approach, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 2768-2772
- 220 Najjam S, Gibbs RV, Gordon MY, Rider CC (1997) Characterization of human recombinant interleukin 2 binding to heparin and heparan sulfate using an ELISA approach, *Cytokine* 9: 1013-1022
- 221 Forsten KE, Wang N, Robinson RM, Nugent MA (2000) A simple assay for evaluating inhibitors of proteoglycan-ligand binding, *Ann. Biomed. Eng.* 28: 119-127
- 222 Szabo A, Stolz L, Granzow R (1995) Surface plasmon resonance and its use in biomolecular interaction analysis (BIA), *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5: 699-705
- 223 Steinem C, Janshoff A, Wegener J, Ulrich W-P, Willenbrink W, Sieber M, Galla H-J (1997) Impedance and shear wave resonance analysis of ligand-receptor interactions at functionalized surfaces and of cell monolayers, *Biosens. Bioelectron.* 12: 787-808
- 224 Eriksson AE, Cousens LS, Weaver LH, Matthews BW (1991) Three-dimensional structure of human basic fibroblast growth factor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 3441-3445
- 225 Faham S, Hileman RE, Fromm JR, Linhardt RJ, Rees DC (1996) Heparin structure and interactions with basic fibroblast growth factor, *Science* 271: 1116-1120
- 226 Ornitz DM, Herr AB, Nilsson M, Westman J, Svahn C-M, Waksman G (1995) FGF binding and FGF receptor activation by synthetic heparan-derived di- and trisaccharides, *Science* 268: 432-436

- 227 Thompson LD, Pantoliano MW, Springer BA (1994) Energetic characterization of the basic fibroblast growth factor-heparin interaction: Identification of the heparin binding domain, *Biochemistry* 33: 3831-3840
- 228 Maccarana M, Casu B, Lindahl U (1993) Minimal sequence in heparin/heparan sulfate required for binding of basic fibroblast growth factor, *J. Biol. Chem.* 268: 23898-23905
- 229 Ishihara M, Tyrrell DJ, Stauber GB, Brown S, Cousens LS, Stack RJ (1993) Preparation of affinity-fractionated, heparin-derived oligosaccharides and their effects on selected biological activities mediated by basic fibroblast growth factor, *J. Biol. Chem.* 268: 4675-4683
- 230 Guimond S, Maccarana M, Olwin BB, Lindahl U, Rapraeger AC (1993) Activating and inhibitory heparin sequences for FGF-2 (basic FGF), *J. Biol. Chem.* 268: 23906-23914
- 231 Rusnati M, Coltrini D, Caccia P, Dell'Era P, Zoppetti G, Oreste P, Valsasina B, Presta M (1994) Distinct role of 2-O-, N-, and 6-O-sulfate groups of heparin in the formation of the ternary complex with basic fibroblast growth factor and soluble FGF receptor-1, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203: 450-458
- 232 Ishihara M, Shaklee PN, Yang Z, Liang W, Wei Z, Stack RJ, Holme K (1994) Structural features in heparin which modulate specific biological activities mediated by basic fibroblast growth factor, *Glycobiology* 4: 451-458
- 233 Arakawa T, Wen J, Philo JS (1994) Stoichiometry of heparin binding to basic fibroblast growth factor, *Arch. Biochem. Biophys.* 308: 267-273
- 234 Burstein EA, Vedenkina NS, Ivkova MN (1973) Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules, *Photochem. Photobiol.* 18: 263-279
- 235 Lee YC (1997) Fluorescence spectrometry in studies of carbohydrate-protein interactions, *J. Biochem.* 121: 818-825
- 236 Jaye M, Burgess WH, Shaw AB, Drohan WN (1987) Biological equivalence of natural bovine and recombinant human α -endothelial cell growth factors, *J. Biol. Chem.* 262: 16612-16617
- 237 Li L-Y, Seddon AP (1994) Fluorospectrometric analysis of heparin interaction with fibroblast growth factors, *Growth Factors* 11: 1-7
- 238 Taira K, Benkovic SJ (1988) Evaluation of the importance of hydrophobic interactions in drug binding to dihydrofolate reductase, *J. Med. Chem.* 31: 129-137
- 239 Moscatelli D (1987) High and low affinity binding sites for basic fibroblast growth factor on cultured cells: Absence of a role for low affinity binding in the stimulation of plasminogen activator production by bovine capillary endothelial cells, *J. Cell. Physiol.* 131: 123-130
- 240 Nugent MA, Edelman ER (1992) Kinetics of basic fibroblast growth factor binding to its receptor and heparan sulfate proteoglycan: A mechanism for cooperativity, *Biochemistry* 31: 8876-8883
- 241 Hoffman R, Paper DH, Donaldson J, Alban S, Franz G (1995) Characterisation of a laminarin sulphate which inhibits basic fibroblast growth factor binding and endothelial cell proliferation, *J. Cell Sci.* 108: 3591-3598

- 242 Arakawa T, Wen J, Philo JS (1993) Densimetric determination of equilibrium binding of sucrose octasulfate with basic fibroblast growth factor, *J. Protein Chem.* 12: 689-693
- 243 Sommer A, Rifkin DB (1989) Interaction of heparin with human basic fibroblast growth factor: Protection of the angiogenic protein from proteolytic degradation by a glycosaminoglycan, *J. Cell. Physiol.* 138: 215-220
- 244 Saksela O, Moscatelli D, Sommer A, Rifkin DB (1988) Endothelial cell-derived heparan sulfate binds basic fibroblast growth factor and protects it from proteolytic degradation, *J. Cell Biol.* 107: 743-751
- 245 Mutschler E (1996) Immunsystem und immunologisch wirksame Stoffe in: Arzneimittelwirkungen (7. Auflage), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart: 763-782
- 246 Gillis S, Ferm MM, Ou W, Smith KA (1978) T cell growth factor: Parameters of production and a quantitative microassay for activity, *J. Immunol.* 120: 2027-2032
- 247 Taniguchi T, Matsui H, Fujita T, Hatakeyama M, Kashima N, Fuse A, Hamuro J, Nishi-Takaoka C, Yamada G (1986) Molecular analysis of the interleukin-2 system, *Immunol. Rev.* 92: 121-133
- 248 Locigno R, Antoine N, Bours V, Daukandt M, Heinen E, Castronovo V (2000) TNP-470, a potent angiogenesis inhibitor, amplifies human T lymphocyte activation through an induction of nuclear factor- κ B, nuclear factor-AT, and activation protein-1 transcription factors, *Lab. Invest.* 80: 13-21
- 249 Spillmann D, Lindahl U (1994) Glycosaminoglycan-protein interactions: A question of specificity, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 4: 677-682
- 250 Najjam S, Mulloy B, Theze J, Gordon M, Gibbs R, Rider CC (1998) Further characterization of the binding of human recombinant interleukin 2 to heparin and identification of putative binding sites, *Glycobiology* 8: 509-516
- 251 Kuschert GSV, Coulin F, Power CA, Proudfoot AEI, Hubbard RE, Hoogewerf AJ, Wells TNC (1999) Glycosaminoglycans interact selectively with chemokines and modulate receptor binding and cellular responses, *Biochemistry* 38: 12959-12968
- 252 Zanetta J-P, Alonso C, Michalski J-C (1996) Interleukin 2 is a lectin that associates its receptor with the T-cell receptor complex, *Biochem. J.* 318: 49-53
- 253 Fukushima K, Yamashita K (2001) Interleukin-2 carbohydrate recognition modulates CTLL-2 cell proliferation, *J. Biol. Chem.* 276: 7351-7356
- 254 Fukushima K, Hara-Kuge S, Ideo H, Yamashita K (2001) Carbohydrate recognition site of interleukin-2 in relation to cell proliferation, *J. Biol. Chem.* 276: 31202-31208
- 255 Loganathan D, Wang HM, Mallis LM, Linhardt RJ (1990) Structural variation in the antithrombin III binding site region and its occurrence in heparin from different sources, *Biochemistry* 29: 4362-4368
- 256 Siemeister G, Martiny-Baron G, Marmé D (1998) The pivotal role of VEGF in tumor angiogenesis: Molecular facts and therapeutic opportunities, *Cancer Metastasis Rev.* 17: 241-248

- 257 Herold-Mende C, Steiner H-H, Andl T, Riede D, Buttler A, Reisser C, Fusenig NE, Mueller MM (1999) Expression and functional significance of vascular endothelial growth factor receptors in human tumor cells, *Lab. Invest.* 79: 1573-1582
- 258 Tessler S, Rockwell P, Hicklin D, Cohen T, Levi B-Z, Witte L, Lemischka IR, Neufeld G (1994) Heparin modulates the interaction of VEGF₁₆₅ with soluble and cell associated flk-1 receptors, *J. Biol. Chem.* 269: 12456-12461
- 259 Ono K, Hattori H, Takeshita S, Kurita A, Ishihara M (1999) Structural features in heparin that interact with VEGF₁₆₅ and modulate its biological activity, *Glycobiology* 9: 705-711
- 260 Zagzag D, Miller DC, Sato Y, Rifkin DB, Burstein DE (1990) Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in astrocytomas, *Cancer Res.* 50: 7393-7398
- 261 Takahashi JA, Fukumoto M, Igarashi K, Oda Y, Kikuchi H, Hatanaka M (1992) Correlation of basic fibroblast growth factor expression levels with the degree of malignancy and vascularity in human gliomas, *J. Neurosurg.* 76: 792-798
- 262 Schmidt NO, Westphal M, Hagel C, Ergün S, Stavrou D, Rosen EM, Lamszus K (1999) Levels of vascular endothelial growth factor, hepatocyte growth factor/scatter factor and basic fibroblast growth factor in human gliomas and their relation to angiogenesis, *Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)* 84: 10-18
- 263 Childs RE, Bardsley WG (1975) The steady-state kinetics of peroxidase with 2,2'-Azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen, *Biochem. J.* 145: 93-103
- 264 Brower V (1999) Tumor angiogenesis – new drugs on the block, *Nat. Biotechnol.* 17: 963-968