

Sandra Sauer

Dr. med.

**Der Einfluss des Zelloberflächen-ständigen Oligosaccharids Lewis Y (CD174) sowie synthetisch hergestellter Glykanmimetika auf das Adhäsions- und Migrationsverhalten humaner Knochenmarksendothelien**

Fach/ Einrichtung: Innere Medizin

Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. Thomas Möhler

Das Ziel dieser Arbeit war die Bedeutung des Oligosaccharids Lewis Y (CD174) bei der Tumorangiogenese und Metastasierung zu untersuchen.

Bereits 1971 postulierte Folkman, dass das Wachstum solider Tumore und die Metastasierung angiogenese-abhängige Prozesse sind und daher eine Hemmung der Angiogenese eine vielversprechende Therapiestrategie darstellt, um das Tumorstadium zu unterbinden und eine Metastasierung zu verhindern. Die Bedeutung der Glykosylierung der Endothelzell-Oberfläche im Rahmen der Angiogenese bzw. Tumorangiogenese ist noch weitgehend unbekannt. Proinflammatorische und proangiogene Zytokine bewirken bei Endothelzellen eine Veränderung der Glykanexpression sowie eine Veränderung wichtiger Schlüsselenzyme der Glykanbiosynthese.

In Vorversuchen konnte die Hochregulation von CD174 auf aktivierten Endothelzellen insbesondere auf der Knochenmarksendothelzelllinie (HBMEC) nachgewiesen werden. Um den funktionellen Einfluss von Lewis Y (CD174) zu untersuchen, wurden zunächst die Expression des Kohlenhydratantigens auf HBMEC sowie des Schlüsselenzyms  $\alpha$ 1-2-Fucosyltransferase 1 (FUT1) analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl Lewis Y (CD174) als auch FUT1 durch Stimulation mit TNF- $\alpha$  in ihrer Expression gesteigert werden, durch VEGF oder bFGF-Stimulation konnte hingegen keine Veränderung festgestellt werden. In der immunzytologischen Analyse bestätigte sich dies: nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  zeigte sich eine deutliche CD174-Überexpression auf Zellfortsätzen der HBMEC, die eine essentielle Rolle bei der Endothelzellmigration spielen.

Daher wurden die funktionellen Konsequenzen der Lewis Y Expression für das Adhäsions- und Migrationsverhalten der HBMEC, beides Grundvoraussetzung für die Angiogenese,

untersucht. Durch Transfektion der HBMEC mit FUT1 und FX -spezifischer inhibierender siRNA konnte bei den so hergestellten FUT1 und FX-Transfektanten die Lewis Y Expression herunterreguliert werden. Bei den transfizierten FUT1 und FX-Zellen konnte im Vergleich zu unbehandelten HBMEC eine signifikante Reduktion sowohl bei der Adhäsion als auch bei der Migration beobachtet werden. Diese Untersuchungen führten uns zur Testung in *in vitro* Angiogenese-Assays. Sowohl im Matrigel-Angiogenese-Assay als auch im drei-dimensionalen Spheroid-Assay wurde bei FUT1 und FX im Vergleich zu HBMEC eine signifikante Hemmung der Aussprossung und Netzwerkbildung der Endothelzellen festgestellt. Eine Hemmung von Migration und Adhäsion durch Herunterregulation von FUT1/FUT3 konnte von Zhang et al. bereits an Karzinomzellen gezeigt werden (Zhang et al., 2007).

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde der Einfluss von CD174 und Lewis Y-Analoga (Saccharidmimetika) auf die Endothelzell-vermittelte Angiogenese untersucht. Es konnte zunächst eine Inhibition des Adhäsions- und Migrationsverhalten durch das Lewis Y Analogon BGF gezeigt werden. Die inhibitorische Wirkung von BGF konnte auch in *in vitro* Angiogenese-Assays (Matrigel-, Tubing Assay) nachgewiesen werden. Die Endothel- und Angiogenese-inhibitorische Wirkung von BGF wurde mit GSF verglichen, einem Oligosaccharid-Mimetikum welches die RGD-Bindungsstelle des Integrin- $\alpha\beta 3$  blockiert und somit ein etabliertes antiangiogenes Wirkprinzip darstellt. Der Vergleich zeigte, dass BGF im Vergleich zu GSF in Bezug auf die molare Konzentration eine ca. 20-fach schwächere Wirkung im Hinblick auf die Endothelzell-inhibitorische und anti-angiogene Wirkung hat. Bei entsprechend höherer Konzentration (bis zu 10 mM) konnte die schwächere Wirkung von BGF im Vergleich zu GSF partiell aber nicht vollständig kompensiert werden.

Unsere Ergebnisse zeigen eine Bedeutung der Lewis Y Expression und FUT1-Transkription für die Adhäsion und Zellmigration im Rahmen der frühen Tumorangiogenese sowie der Endothelzellaktivierung bei inflammatorischen Prozessen. Wir konnten darstellen, dass Lewis Y und FUT1 insbesondere durch TNF- $\alpha$  hochreguliert werden und eine funktionelle Bedeutung vor allem im Kontext der TNF- $\alpha$  -induzierten Endothelzellaktivierung haben.

Lewis Y spezifische Saccharidmimetika konnten als neue Klasse anti-angiogener Saccharid-Mimetika eingeführt werden. Die Hemmung von Lewis Y durch Saccharid-Mimetika ist ein vielversprechender Ansatz für weitere Forschung und für eine mögliche zukünftige klinische Anwendung u.a. in der Onkologie und Rheumatologie.