

Thomas Groth¹, Dieter Peschel¹, Kai Zhang²,
Alexander Köwitsch¹, Steffen Fischer²

Cellulosesulfate als bioaktive Glykane für biomedizinische Anwendungen

1. Einleitung

Glykane besitzen vielfältige Funktionen im Organismus, die nicht nur für die Aufrechterhaltung der normalen Funktion von Zellen und Geweben sondern auch bei Wundheilungsvorgängen oder pathologischen Prozessen, wie bakteriellen oder viralen Infektionen und dem Wachstum und der Metastasierung von Tumoren eine große Rolle spielen¹. Eine wichtige Gruppe von Glykanen sind Glykosaminoglykane (GAG), die als Glykopolymere aus spezifischen dimeren Wiederholungseinheiten aufgebaut sind, welche in der Regel eine Uronsäure mit einem N-Acetyl-Glukosamin oder N-Acetyl-Galaktosamin verbinden. Wichtige Vertreter der Glykosaminoglykane sind Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat, Heparansulfat und Heparin, wobei der Sulfatierungsgrad bei Heparin am höchsten ist, während die Hyaluronsäure keine Sulfatgruppen besitzt^{1,2}. Heparansulfat und Heparin sind sich dabei strukturell sehr ähnlich und unterscheiden sich vor allem im Sulfatierungsgrad, dem Molekulargewicht und ihrem Vorkommen im Organismus³. Heparin ist aufgrund seiner großen Anzahl an Sulfat- und Carboxylgruppen das Glykosaminoglykan mit der höchsten negativen Ladungsdichte (Abbildung 1).

Es besteht aus Disaccharid-Untereinheiten, bei denen entweder D-Glukuronsäure (zu 10%) β -(1→4)-glykosidisch, oder L-Iduronsäure (zu 90%) α -(1→4)-glykosidisch mit einem N-Acetyl-D-Glukosamin verknüpft ist. Die typische Grundstruktur ist dabei das trisulfatierte Disaccharid. Dabei können die Sulfatgruppen an der 2-*O*-Position der Iduron- bzw. Glukuronsäure, sowie an 3-*O*- und 6-*O*-Position des Glu-

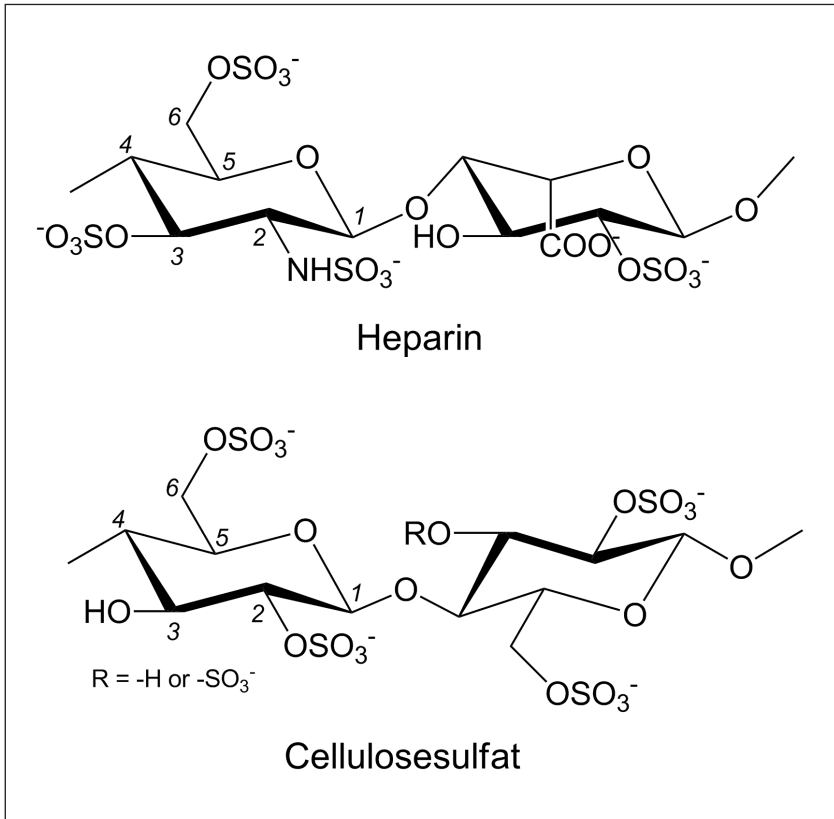


Abb. 1: Grundstruktur von Cellulosesulfat.

kosamins positioniert sein. Die Aminogruppe des Glukosaminrestes kann dagegen durch eine Acetyl- oder Sulfatgruppe substituiert oder frei sein. Die durchschnittliche Molmasse eines Heparin-Moleküls beträgt ca. 15 kDa⁴. Im Gegensatz dazu hat Heparansulfat eine durchschnittlich größere Molmasse (ca. 30 kDa) und trägt darüber hinaus weniger Sulfatgruppen. Heparansulfat-Ketten enthalten dabei häufig Domänen mit ausgedehnten Sequenzen entweder niedriger oder aber hoher Sulfatierung. Dabei ist in weiten Bereichen nur eine Sulfatgruppe pro Disaccharid zu finden. Aber auch Heparin weist Inhomogenitäten

im Sulfatierungsgrad auf, welche aber wesentlich geringer als bei Heparansulfat sind⁵.

Die Synthese von Heparin findet hauptsächlich in Mastzellen und basophilen Granulozyten statt. Heparin übernimmt eine Vielzahl von Funktionen, wie beispielsweise die Bindung von Histamin in den sekretorischen Vesikeln der Zelle und die Kontrolle der Aktivität von Proteasen⁶. Exozytierte Heparin-Proteoglykane inhibieren auch die Wechselwirkung von Thrombozyten mit Kollagen und die Bindung des Von-Willebrand-Faktors an Thrombozyten⁷. Des Weiteren können Heparine auch „low density lipoprotein“ (LDL) binden. Zusammen mit diesen werden die Heparine anschließend in Makrophagen aufgenommen und dort abgebaut⁸. Die wohl bekannteste Eigenschaft von Heparin ist allerdings die Bindung an Anti-Thrombin III (AT III) und die Verstärkung von dessen Affinität zu Thrombin und anderen Faktoren der Gerinnungskaskade, weshalb es zur Hemmung der Blutgerinnung genutzt wird⁶. Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) sind dagegen auf der Oberfläche vieler Zellen und in der extrazellulären Matrix lokalisiert. Die bekanntesten Vertreter Zellmembran-lokalisierter HSPG sind Syndecan, Glypican und weitere Vertreter wie CD44³. So tragen Syndecan-1 und -3 Chondroitinsulfate proximal zur Membran, aber auch Heparansulfat am distalen Teil. Syndecan-2 und -4 dagegen tragen ausschließlich Heparansulfate. Aufgrund der cytoplasmatischen Domäne können Syndecane Signale von der extrazellulären Umgebung in das Innere der Zelle übertragen. So führt die Bindung eines Liganden an die HS-Ketten zur Oligomerisierung der Syndecane, welche die Aktivierung von Faktoren wie z.B. Kinasen im Cytoplasma bedingen¹. Vielfältige Funktionen der HSPG sind auch mit der Regulierung der Aktivität von Chemokinen und Wachstumsfaktoren verbunden. Als Co-Rezeptoren für Wachstumsfaktoren präsentieren sie diese den Rezeptor-Tyrosin-Kinasen auf der gleichen oder einer benachbarten Zelle, und können auch zur Zell-Zell-Adhäsion beitragen⁹. Dabei können die HS-Ketten direkt in die Formierung des Rezeptor-Ligand-Komplexes eingebunden sein, wie für den Fibroblasten-Wachstumsfaktor FGF-2 beschrieben und damit die mitogene Wirkung von Cytokinen beeinflussen¹⁰. HSPG können Wachstumsfaktoren darüber hinaus außerhalb der Zelle speichern und als „Reservoir“ dienen. Die Freisetzung der gebundenen Wachstumsfaktoren erfolgt dann entweder durch eine Ver-

änderung des Sulfatierungsgrades durch lokal exprimierte Sulfatasen¹¹, durch Proteolyse des Proteins-Rückgrats oder durch Heparanase-Spaltung der HS-Ketten. Die Bindung von Heparin oder Heparan-Sulfat an regulatorische Proteine erfolgt durch Heparin-Bindungsstellen, welche im Allgemeinen an der Außenseite der Proteine liegen. Dies sind meist spaltartige Domänen mit einem hohen Anteil positiv geladener Aminosäuren wie Lysin oder Arginin⁴.

Die Hemmung der Blutgerinnung durch Heparin wird schon lange für den Einsatz in der Klinik ausgenutzt⁴. Zudem wird Heparin auch verwendet, um die Oberflächen von Biomaterialien wie Katheter, Schlauchsysteme und Dialysatoren blutverträglicher zu machen¹², was den systemischen Einsatz von Heparin im Blut verringert kann, da dieser auch Nebenwirkungen wie z.B. die Aggregation von Thrombozyten oder die Blutungsneigung fördert und andererseits zu verzögerter Knochenheilung und einem gesteigertem Risiko von Osteoporose führt^{13, 14}. Neben diesen aus der Klinik bekannten Risiken der Anwendung bestehen weitere Nachteile der Nutzung natürlicher GAGs, wie Heparin in deren aufwendigen Extraktion aus tierischen Organen mit einem gewissen Risiko von Infektionen und immunologischen Reaktionen bei der Anwendung. Zudem ist die Bioaktivität von Heparin auch stark abhängig von seiner biologischen Herkunft (Spezies, Organ), wodurch es unterschiedliche Sulfatierungsgrade und Substitutionsmuster aufweisen kann⁴. Schließlich bietet die Nutzung von natürlichen GAGs für den klinischen Einsatz auch die Möglichkeit in krimineller Weise verschiedene GAGs wie z.B. übersulfatierte Chondroitinsulfate mit Heparin zu mischen, um dieses als Heparin zu vermarkten, was für einige Patienten in den USA tödliche Folgen hatte¹⁵.

Deshalb wird seit langem nach Möglichkeiten gesucht, biokompatible Polymere zu synthetisieren, die Heparin ersetzen können und dabei weniger variabel in der biologischen Wirkung sind. Beispielsweise gehört Cellulose zu den am häufigsten in der Natur vorkommenden Polysacchariden. Als Hauptbestandteil der Zellwand von Pflanzen besitzt sie ein sehr hohes Molekulargewicht, ist unlöslich in Wasser und den meisten organischen Lösungsmitteln. Sie zeichnet sich zudem gegenüber anderen natürlichen Polysacchariden wie z.B. Hemicellulose und Pektin darin aus, dass sie nicht verzweigt ist¹⁶. Cellulose ist aus β -(1 \rightarrow 4) glykosidisch verbundenen D-Glukose-Einheiten aufgebaut, wobei die Hydroxylgrup-

pen der Cellulose an C2, C3 und C6 der Anhydroglukoseeinheit (AGU) chemisch umgesetzt werden können, wodurch weitverbreitete Polymere wie z.B. Carboxymethylcellulosen für die Papierindustrie, Lebensmitteltechnologie und zum Teil für medizinischen Anwendungen entstehen können¹⁷. Die Sulfatierung von Cellulosen besitzt ebenfalls eine lange Tradition und führt zu wasserlöslichen Produkten mit vielfältigen industriellen Anwendungsmöglichkeiten¹⁸. Die Grundstruktur von Cellulosesulfat ist ebenfalls in Abbildung 1 dargestellt. Allerdings werden die Möglichkeiten medizinischer Anwendungen von Cellulosesulfaten erst seit einiger Zeit erforscht. Der hier vorliegende Artikel zeigt an zwei Beispielen, wie eine regioselektive Sulfatierung von Cellulose zu Polymeren mit Heparin-analoger Wirkung führt, was sich in Gerinnungsuntersuchungen mit humanem Blut bzw. Blutplasma und Arbeiten zum Einfluss auf die mitogene Aktivität des Fibroblasten-Wachstumsfaktors-2 (FGF-2) mit Fibroblasten nachweisen lässt.

2. Die Hemmung der Blutgerinnung durch C2/C3-sulfatierte Cellulosen

Die Sulfatierung verschiedener partiell substituierter Celluloseacetate wurde bereits im Detail beschrieben¹⁹ und soll an dieser Stelle nur kurz erläutert werden. Die Sulfatierung der Celluloseacetate wurde in Dimethylformamid durch Amidosulfonsäure vorgenommen. Die dadurch entstandenen gemischten Celluloseester, die sowohl Acetat- als Sulfat-Gruppen enthielten, wurden nachfolgend in einer konzentrierten Lösung von Natriumacetat in Ethanol präzipitiert und anschließend in 90% Ethanol mit 4 Gew.% NaOH deacetyliert. Der Gesamtgehalt an Schwefel wurde mit Elementaranalyse bestimmt, während die Verteilung der Substituenten quantitativ mit ¹³C-NMR-Spektroskopie ermittelt wurde. Dabei wurden folgende Derivate synthetisiert, die in Tabelle 1 hinsichtlich des gesamten Sulfatierungs- oder Substitutionsgrad (DS, degree of substitution) und der Verteilung der Substituenten charakterisiert wurden. Abbildung 1 B zeigt hier die typische Grundstruktur sulfatierter Cellulosen.

Die Untersuchung des Effektes der Cellulosesulfate auf die Blutgerinnung wurde mit Citratplasma untersucht, das von 10 verschiedenen Spendern gesammelt und gemischt wurde. Die Hemmung der Blut-

Tab. 1: Gesamt-Sulfatierungsgrad (DS) und Verteilung der Sulfatgruppen von Cellulosesulfaten in Untersuchungen zur Gerinnungshemmung.

Cellulosesulfat (CS)	DS _{Gesamt} Ele- mentaranalyse	DS _{Gesamt} ¹³ C-NMR	Substitutionsmuster der Sulfate ^a		
			C2	C3	C6
CS 0.26	0.35	0.25	0.17	0.08	0
CS 0.95	0.80	0.95	0.55	0.20	0.20
CS 1.14	1.10	1.14	0.74	0.09	0.31
CS 1.33	1.40	1.33	0.76	0.10	0.47
CS 1.35	1.07	1.35	0.67	0.33	0.35

^a DS-Werte der Sulfat Gruppen an C2-, C3-, und C6-Position wurden aus ¹³C-NMR Spektren berechnet.

gerinnung nach Zugabe von Cellulosesulfaten wurde mit kommerziellen Testkits für die Thrombinzeit (TT) und für die partielle-Thromboplastinzeit (PTT) bestimmt. Dabei wurde Cellulosesulfate in 50 µl TRIS-Puffer bei pH 7.4 gelöst und 100 µl Plasma zugesetzt, bevor die Gerinnungsmessung mit einem Koagulometer durchgeführt und die Gerinnungszeiten im Vergleich zu unbehandeltem Citraplasma als Kontrolle verglichen wurden. Die Thrombinzeit wurde durch Zugabe von 100 µl Thrombinlösung (0.3 IE/mL), die partielle Thromboplastinzeit wurde nach Zugabe von 100 µl Kaolin-Kephalin-Lösung und Zugabe von 100 µl 25 mM CaCl₂-Lösung bestimmt. Nach Zugabe der Gerinnungsaktivatoren wurden die Gerinnungszeiten mit dem Koagulometer gemessen. Proben die nicht innerhalb von 10 min geronnen, wurden als nicht gerinnbar eingestuft und die Messung deshalb gestoppt. Alle Gerinnungszeiten, die gleich 10 min sind, bedeuten deshalb, dass diese Cellulosesulfate die Gerinnung von Plasma komplett inhibierten.

Abbildung 2A und B zeigen die Ergebnisse der Messungen der TT und PTT Gerinnungszeiten. Insgesamt wurde aus diesen Untersuchungen ersichtlich, dass eine Zunahme des Sulfatgehaltes insgesamt zu einer Verlängerung der Gerinnungszeiten führte. Außerdem weisen die Ergebnisse darauf hin, dass die mit der Zunahme des DS verbundene Gerinnungshemmung sowohl von TT als auch von PTT, bei einer stärkeren Derivatisierung der C2-Position der AGU nachweisbar war,

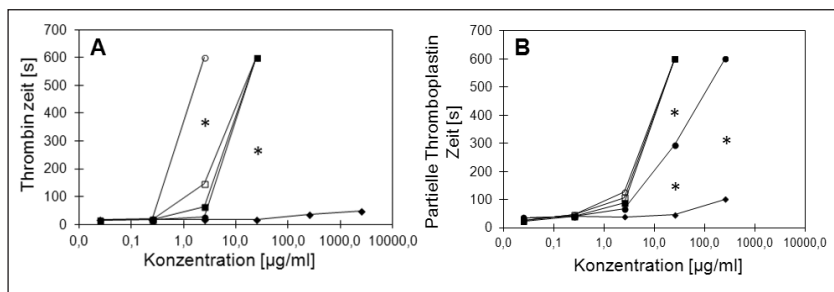


Abb. 2: Thrombinzeit (A), und partielle Thromboplastin-Zeit (B) von Citratplasma in Anwesenheit von Cellulosesulfaten (Konzentrationsbereich von 0.025 µg/ml bis 2.5 mg/ml). (t) – CS 0.26; (l) – CS 0.95; (o) – CS 1.14; (m) – CS 1.33; (n) – CS 1.35. Sterne in den Abbildungen zeigen signifikante Unterschiede ($p < 0.05$).

wie der Vergleich von CS 1.33 und CS 1.35 klar zeigt (siehe auch Tabelle 1). Das war insbesondere bei der Bestimmung der Thrombinzeit auffällig, da eine Zunahme des DS auf C6-Position und Abnahme auf C2-Position mit einer kürzeren Gerinnungszeit bei vergleichbarem Gesamtsulfatgehalt verbunden war. Bei einer Konzentration der Cellulosesulfate von 25 µg/ml Cellulosesulfate mit einem $DS \geq 0.95$ wurde die Blutgerinnung während der TT-Messungen und bei einem $DS \geq 1.15$ während der PTT-Messungen komplett inhibiert.

Während bei der Inaktivierung von Faktor Xa kürzere Heparinsequenzen mit bestimmten Sulfatierungsmustern von Bedeutung sind und sich ein binärer Komplex zwischen AT III- und Heparin ausbildet, der Faktor Xa inhibiert, bilden längere Heparinmoleküle bei der Inhibierung von Faktor II a. d. h. von Thrombin einen ternären Komplex bei dem Heparin quasi eine katalytische Oberfläche für die Interaktion von AT III und F IIa bildet^{3,4}. Um abzuklären, in welcher Weise die regioselective Derivatisierung der Cellulosesulfate die Blutgerinnung hemmt, ergaben sich bereits erste Hinweise, dass eine stärkere Inhibierung von Thrombin im TT-Test nachweisbar war, im Vergleich zu PTT Gerinnungsmessungen. Aus diesem Grunde wurden Tests mit Faktor IIa und Faktor Xa in Anwesenheit von AT III und ausgewählten Cellulosesulfaten mit hohem und niedrigem DS durchgeführt.

Dazu wurden Einzelfaktortest mit chromogen Substraten für die spezifischen Serinproteasen F IIa (Thrombin) und F Xa entwickelt¹⁹.

Die Cellulosederivate wurden wie zuvor in TRIS-Puffer gelöst und mit 50 μl AT III (Aktivität 0.265 pkat/ml) und 200 μl Thrombin (Aktivität 0.53 nkat/ml) gemischt. Nach 5 min Inkubation bei 37 $^\circ\text{C}$ wurden 200 μl des chromogenen Substrates S-2238 (0.22 mM) für 2 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zusatz von Essigsäure gestoppt und die Extinktion gemessen. Der Faktor Xa Assay wurde analog mit 200 μl Faktor Xa Lösung (Aktivität 1.06 nkat/ml), 50 μl AT III Lösung (Aktivität 0.265 pkat/ml), 50 μl Lösung Cellulosesulfate and 200 μl des chromogenen Substrates S- 2222 (0.22 mM) durchgeführt.

Abbildung 3A zeigt, dass Cellulosesulfate mit einem DS 0.26 keine hemmende Wirkung gegen Thrombin besitzen, da die Restaktivität von Thrombin auch bei 2.5 mg der Substanz noch ca. 100% beträgt. Auf der anderen Seite zeigt die vorrangig in C2- und C3-sulfatierte Cellulose mit einem DS = 1.33 ca. 40% Inhibierung der Thrombinaktivit at bereits bei einer Konzentration von nur 2.5 $\mu\text{g/mL}$. Im Vergleich dazu verursacht das Cellulosederivat mit einem DS=1.35 in diesem Konzentrationsbereich nur eine sehr geringe Hemmung von ca. 10%. Dieses überraschende Ergebnis lässt sich zum Teil aus Unterschieden im Substitutionsmuster erklären. Wie aus **Tabelle 1** ersichtlich ist, besitzt das Derivat DS1.35 eine etwas höhere Substitution auf C3-Position, was zu einer Verringerung der Sulfatierung auf C2- und C6-Positi-onf uhrt. Obwohl gerade bei Heparin eine C3-Sulfatierung als kritisch

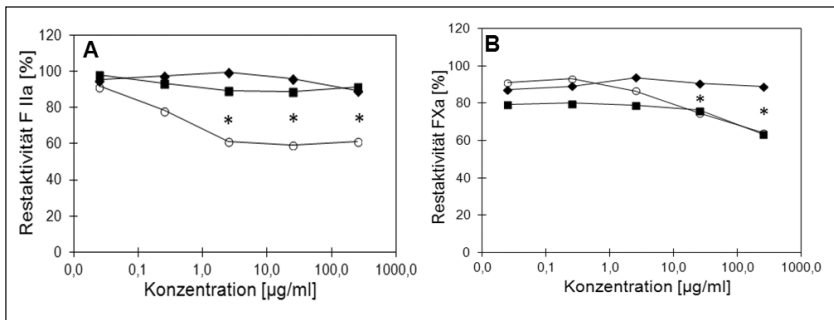


Abb. 3 A und B: Restaktivität von Thrombin (F IIa, A) und Faktor Xa (F Xa, B) nach Zugabe von ausgewählten Cellulosesulfaten mit unterschiedlichem Derivatisierungsgrad. (t) – CS 0.26; (m) – CS 1.33; (n) – CS 1.35. Die Sterne in der Grafik zeigen signifikante Unterschiede ($p < 0.05$).

für eine anti-thrombogene Wirkung angesehen wird^{20, 21}, scheint bei Cellulosesulfaten aufgrund der unterschiedlichen Struktur und vorliegenden β -(1 \rightarrow 4)-glykosidischen Bindung eine stärkere Sulfatierung auf C2- und C6-Position hinsichtlich einer Inhibierung von Thrombin nützlich zu sein. Allerdings ist das Vorhandensein von Sulfatgruppen auf der C2-Position der Iduronsäure des Heparins wichtig für die Konformation der Kette und resultiert in einer hohen Affinität für Anti-Thrombin III^{20, 21}, was sich möglicherweise auch fördernd auf die gerinnungshemmende Aktivität der Cellulose-2-6-sulfate hinsichtlich Thrombin auswirkt. Die Ergebnisse des Faktor Xa-Assays sehen dabei aber anders aus (siehe Abbildung 3 B). Hier zeigen beide Derivate mit hohem Sulfatgehalt eine signifikante Hemmung des Faktors Xa in höheren Konzentrationsbereichen ab 50 $\mu\text{g/ml}$ im Vergleich zum gering sulfatierten DS = 0.26. Insgesamt zeigen diese Untersuchungen jedoch, dass Cellulosesulfate mit hohem Sulfatierungsgrad auf C2- und C6-Position eine Heparin-analoge Wirksamkeit hinsichtlich der Hemmung der Blutgerinnung besitzen, was sich insbesondere auf die Inhibierung von Thrombin bezieht.

3. Einfluss des Derivatisierungsgrades und der Regioselektivität von Cellulosesulfaten auf die Bindung und Aktivität des Fibroblasten-Wachstumsfaktors FGF-2

Cellulosesulfate wurden durch Acetosulfatierung oder direkter Sulfatierung hergestellt, wodurch ein weiter Bereich von Derivatisierungsgraden erreicht wurde. Tabelle 2 gibt eine Übersicht zu den synthetisierten Cellulosesulfaten. Die Besonderheit des Sulfatierungsverfahrens in diesen Untersuchungen bestand darin, dass keine nennenswerte Derivatisierung in C3-Position der AGU stattfand. Details zur Durchführung der Sulfatierung finden sich bei Peschel et al.²².

3.1 Bindung des Fibroblasten-Wachstumsfaktors FGF-2 an Cellulosesulfate

Wachstumsfaktoren wie FGF-2 werden von Proteoglykanen wie Syndecan, das Heparansulfat-Seitenketten besitzt, den Rezeptoren auf der Zelloberfläche präsentiert, was zur Aktivierung zellulärer Kinasen führt, die beispielsweise die Zellteilung induzieren^{4, 5, 9}. Deshalb wur-

Tab. 2: Gesamt-Sulfatierungsgrad (DS) und Verteilung der Sulfatgruppen von Cellulosesulfaten in Untersuchungen zur Aktivität des Wachstumsfaktor FGF-2.

Cellulosesulfat (CS)	DS _S (¹³ C-NMR) ^a			
	C6	C2	C3	DS _{Gesamt}
CS 0.39	0.36	0.03	0	0.39
CS 0.58	0.52	0.06	0	0.58
CS 0.66	0.60	0.06	0	0.66
CS 0.92	0.77	0.15	0	0.92
CS 1.57	1.0	0.57	0	1.57
CS 1.69	1.0	0.69	0	1.69
CS 1.80	1.0	0.80	n.d.	1.80
CS 1.94	1.0	0.94	n.d.	1.94

^a DS-Werte der Sulfat Gruppen an C2-, C3-, und C6-Position wurden aus ¹³C-NMR Spektren berechnet. n.d. – nicht bestimmt.

de zunächst die Bindungsaffinität von FGF-2 zu Cellulosesulfaten in einem kompetitiven Versuchsansatz ermittelt. Dazu wurden 25 ng des Wachstumsfaktors FGF-2 mit 50 µl Heparin-Agarose-Mikropartikeln inkubiert, um eine Bindung von FGF-2 an die Partikeloberfläche zu ermöglichen. Nach Abtrennen des Überstandes und Waschen mit Salzlösung wurden diese Partikel entweder mit Heparin als Kontrolle oder 10 mg/ml Cellulosesulfaten inkubiert, um eine Ablösung von FGF-2 von der Oberflächen der Heparin-Agarosepartikel durch kompetitive Mechanismen zu ermöglichen. Die Überstände wurden dann mit Immunoblotting analysiert und densitometrisch ausgewertet.

Abbildung 4 zeigt den Sufatierungsgrad der Derivate, wobei die hellgrauen und dunkelgrauen Balken die Derivatisierung in C2- und C6-Position illustrieren und die beobachtete prozentuale Bindung von FGF-2 im Vergleich zu Heparin als Kontrolle (100%). Die Abbildung zeigt dabei, dass im Vergleich zu Heparin die Cellulosesulfate mit einem $DS \leq 0,92$ keine signifikante Bindung von FGF-2 erlauben. Erst

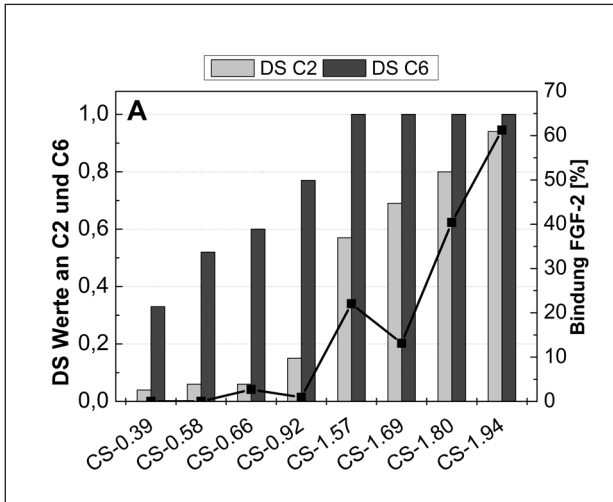


Abb. 4: Bindung von FGF-2 an sulfatierten Cellulosen in Abhängigkeit vom Sulfatierungsgrad in C2-Position (hellgraue Säulen) und C6-Position (dunkelgraue Säulen) im Vergleich zur Bindung an Heparin (100%). Die Bindung von FGF-2 wurde als Messkurve gegen den Sulfatierungsgrad aufgetragen. Die Werte repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n = 4$).

für Cellulosesulfate mit einem $DS \geq 1,57$ konnte eine mit dem Derivatisierungsgrad ansteigende Bindung von FGF-2 bis zu 60% verglichen mit Heparin nachgewiesen werden. So wurde im Vergleich von CS 1.94 gegenüber CS 1.57 ein signifikanter Anstieg der Bindungsaffinität von ca. 40 % ($p < 0.05$) beobachtet.

Die Bindungsaffinität ist ein wichtiger Indikator für die biologische Wirksamkeit der Cellulosesulfate, da die Bindung von Wachstumsfaktoren durch Glykosaminoglykane häufig mit der in vitro gemessenen biologischen Aktivität korreliert²³. Hier konnte eine signifikante Bindung der Cellulosesulfate an den Wachstumsfaktor FGF-2 erst ab einem $DS = 1.00$ in C6-Position der AGU nachgewiesen werden, die offensichtlich mit dem ansteigenden Sulfatierungsgrad in 2-O-Position korreliert. Untersuchungen anderer Autoren zeigten auch, dass bei der Bindung von Heparin an FGF-2 keine der Wasserstoffbrückenbindungen über 6-O-Sulfatgruppen realisiert werden, während eine Sulfatierung

zung der 2-*O*- bzw. 2-*N*-Position für die Bindung von Bedeutung ist²⁴, was bei Cellulosesulfaten bei einem Sulfatierungsgrad $DS > 1.5$ der Fall war.

3.2 Bestimmung des Effekts von Cellulosesulfaten auf die FGF-2-induzierte Proliferation von Maus-Fibroblasten

Zur Untersuchung der Beeinflussung einer FGF-2-induzierten Proliferation durch die synthetisierten Cellulosesulfate, wurde analog zu Arbeiten anderer Autoren eine Zellkultur aus embryonalen Mausfibroblasten (Zelllinie 3T3-L1) genutzt²⁵. Dazu wurden die Fibroblasten im Kulturmedium ohne Serum mit Zugabe von 10 ng/ml FGF-2 und den Cellulosederivaten oder Heparin als Kontrolle für 48 h inkubiert und das Wachstum mit einem DNA-Quantifizierungs-Assay bestimmt.

3.2.1 Mitogene Aktivität der Cellulosesulfate bei einer Konzentration von 1 mg/ml

Die Ergebnisse in Abbildung 5 zeigen, dass alle niedrig sulfatierten Cellulosen mit einem $DS \leq 0.58$ die Proliferation der Zellen inhibierten. Ab einem $DS \geq 0.66$ war eine Stimulierung der FGF-2-induzierten Proliferation zu verzeichnen. Mit steigendem Gesamt-Sulfatierungsgrad erhöhte sich demnach auch die mitogene Wirkung der Cellulosesulfate. Für das am höchsten sulfatierte Derivat CS 1.94 wurde eine Proliferation von 160%, verglichen mit 10 ng/ml FGF-2 als Kontrolle, gemessen.

Bei den Cellulosesulfaten korrelierte die Proliferation prinzipiell mit der Bindungsaffinität des Wachstumsfaktors, das heißt eine ansteigende Sulfatierung resultierte auch in stärkerer FGF-2-induzierter mitogener Aktivität. Hier führten auch Derivate mit einem $DS \leq 1.57$, die keine Bindung von FGF-2 zeigten, zu einer Erhöhung der Proliferation. Die Ursache hierfür könnte in der hohen Affinität von FGF-2 für Heparin liegen, so dass diese Derivate im kompetitiven Bindungsassay (siehe Abbildung 5) keinen Wachstumsfaktor binden konnten, im zellulären Assay in Abwesenheit von Heparin aber eine Bindung zu FGF-2 möglich ist, was sich in der Erhöhung der Aktivität von FGF-2 zeigte. Ähnlich zu diesen Ergebnissen konnte auch Kunou et al. eine Steigerung der FGF-1 induzierten Proliferation durch ein Dextransulfat mit einem gesamten DS von ca. 1.0 nachweisen²⁶.

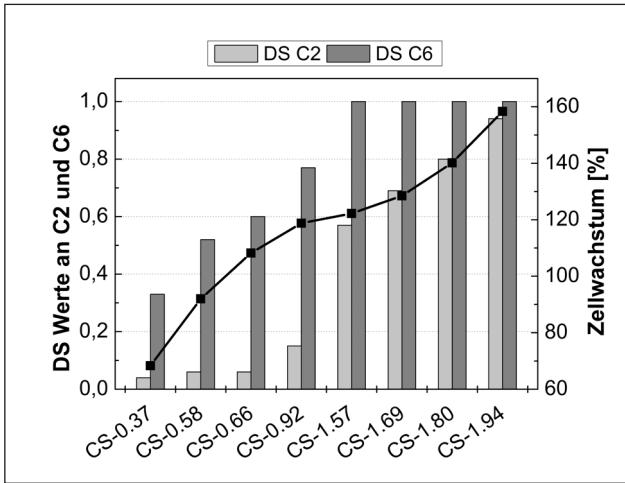


Abb. 5: Vergleich des Wachstums von Fibroblasten bei Zugabe von FGF-2 (10 ng/ml) und 1 mg/ml unterschiedlicher Cellulosesulfate (CS) in Abhängigkeit von deren Sulfatierungsgrad (CS 0.37 bis CS 1.94). Die Proliferation wurde anhand des DNA-Gehaltes bestimmt (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 5$).

3.2.2. Konzentrationsabhängigkeit der mitogenen Aktivität von Cellulosesulfaten im Vergleich zu Heparin

Nicht nur Sulfatierungsgrad und Position der Sulfatgruppen an der AGU, sondern auch die Konzentration Heparin-analoger Makromoleküle beeinflusst die Aktivität von Wachstumsfaktoren, wobei schon Konzentrationen von weniger als 1 $\mu\text{g/ml}$ Heparin-analoger Substanzen in Studien anderer Autoren die Aktivität von FGF-2 steigerten. Deshalb wurden hier Untersuchungen zur mitogenen Aktivität von Cellulosesulfaten in einem Konzentrationsbereich von 1 $\mu\text{g/ml}$ bis 1 mg/ml durchgeführt, wobei die mitogene Aktivität auf das Wachstum der Fibroblasten in Anwesenheit von 10 ng/ml FGF-2 als Kontrolle (100%) bezogen wurde. In diesen Experimenten wurden Cellulosesulfate mit einem $\text{DS} \geq 0.92$ und Heparin eingesetzt. In Abbildung 6 A und B ist eine starke Abhängigkeit der Proliferation der Fibroblasten von der Konzentration der untersuchten Cellulosesulfate und Heparin zu erkennen. Bei einer Konzentration von 1 mg/ml zeigten bis auf CS-0.92 alle

Cellulosesulfate eine mit Heparin vergleichbare Proliferation der Zellen. Im Konzentrationsbereich von 1 – 500 $\mu\text{g/ml}$ war eine stufenweise konzentrationsabhängige Steigerung der Proliferation von niedrig zu höher sulfatierten Derivaten zu beobachten.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass mit steigendem Sulfatierungsgrad immer geringere Mengen der Cellulosesulfate zur Verstärkung des FGF-2-induzierten Zellwachstums ausreichen. Bemerkenswerterweise bewirkten dabei die hoch-sulfatierten Cellulosen in wesentlich geringeren Konzentrationen als Heparin eine Steigerung der Proliferation. Da diese eine zunehmende Sulfatierung der C2-Position aufweisen, korreliert dies auch mit der beobachteten verstärkten Affinität von FGF-2 zu diesen Cellulosesulfaten. Heparin-bindende Wachstumsfaktoren wie FGF-2 verfügen dabei über spezielle, häufig spaltartige Domänen, die vor allem reich an basischen und aber auch zum Teil hydrophoben Aminosäuren sind, in die sich die geladenen Ketten von helikal geordnetem Heparin als gestreckte Kette anlagern²⁷. So könnte als eine Ursache für eine vergleichbare oder höhere Aktivität der Cellulosesulfate im Vergleich zu Heparin deren hoher Sulfatierungsgrad gesehen werden. Das hier verwendete Heparin hatte einen DS = 1.3, der unter dem der Cellulosesulfate liegt²². Gleichwohl spielt für

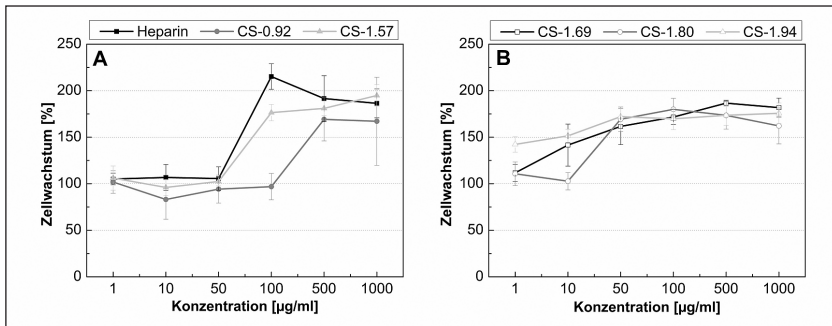


Abb. 6: Vergleich der Proliferation in Abhängigkeit von der Konzentration und dem Sulfatierungsgrad von Cellulosesulfaten (CS) und Heparin. 3T3-L1 Fibroblasten wurden für 48h mit 1 $\mu\text{g/ml}$ bis 1 mg/ml der Derivate und jeweils 10 ng/ml FGF-2 inkubiert. Die Proliferation wurde anhand des DNS-Gehaltes mit Pico Green bestimmt. (A) Heparin und mittel-sulfatierte CS, (B) hoch-sulfatierte CS. (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 5$).

die Wechselwirkung von Heparin mit FGF-2 und der Wechselwirkung mit dem FGF-2-Rezeptor der Zelle, die Karboxylgruppe an C6-Position der Iduronsäure eine wichtige Rolle²⁰. Allerdings sollte die β -(1 \rightarrow 4)-glykosidische Bindung der AGU in Cellulose bei relativ hoher Sulfatierung in C2- und C6-Position der AGU zu einer relativen homogenen Ladungsdichte auf beiden Seiten der Kette führen, was die Bindung von FGF-2 an Cellulosesulfate über Coulomb-Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen erleichtern könnte. Die Erhöhung der mitogenen Aktivität von FGF-2 in Kombination mit Cellulosesulfaten kann dabei auf zwei Ursachen zurückzuführen sein. Wachstumsfaktoren wie FGF-2 haben auch *in vitro* eine relativ kurze Halbwertszeit, die durch die rasche proteolytische Spaltung des Proteins bedingt ist. Hier zeigen *in vitro* Untersuchungen, dass die Stabilität des Wachstumsfaktors FGF-2 in Gegenwart von Heparin oder hoch-sulfatierten Cellulosen gegen Proteasen erheblich verbessert wird, was durch die Interaktion von Polysaccharid und Wachstumsfaktor bedingt ist²⁸. Auf der anderen Seite könnte der hohe Sulfatierungsgrad der Cellulosesulfate auch analog zu Heparin auch zur Formierung eines FGF-2 – Polysaccharid – FGF-Rezeptor-Komplexes befähigen, der zu einer Aktivierung der Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (MAPK/ERK) führt. Untersuchungen anderer Autoren zeigen, dass dafür vor allem eine starke Sulfatierung des Heparins an C6-Position des Glukosamin-Monomers eine wichtige Rolle spielt²⁹. Auch in dieser Hinsicht könnte sich auf Grund der β -(1 \rightarrow 4)-glykosidische Bindung eine stärker Sulfatierung auf C6- und C2-Position der AGU der Cellulose als vorteilhaft erweisen, was schlussendlich auch zum verstärkten Wachstum der Zellen bei Anwesenheit von FGF-2 und höher-sulfatierten Cellulosen führen könnte.

Zusammenfassung

Cellulosesulfate zeigten in den hier beschriebenen Untersuchungen eine Bioaktivität, die der von Heparin gleicht oder diese sogar übertrifft. Dabei war offensichtlich eine vollständige Sulfatierung in C6-Position und eine möglichst hohe in C2-Position wichtig für die biologische Aktivität. Die Hemmung der Blutgerinnung war dabei insbesondere in Hinsicht auf die Inaktivierung von Thrombin nachweisbar, wobei diese durch eine spezifische Interaktion mit Anti-Thrombin III zustande

gekommen ist. Obwohl die Aktivität der höher sulfatierten Cellulosen eine medizinische Anwendung nahelegt, ist ein direkter systemischer Einsatz zur Hemmung der Blutgerinnung wie bei Heparin aus Gründen der Produktsicherheit nicht zu empfehlen. Andererseits könnte eine Kopplung von Cellulosesulfaten an die Oberflächen blutkontaktierender medizinischer Geräte und Vorrichtungen wie z.B. Katheter und Schlauchsysteme eine interessante Alternative als Ersatz von Heparin für die Verbesserung der Blutverträglichkeit von Biomaterialien darstellen³⁰.

Neben der hier beschriebenen Hemmung der Blutgerinnung besitzen Cellulosesulfate auch die Fähigkeit verschiedene Wachstumsfaktoren zu binden und deren Aktivität zu beeinflussen. Die hier vorgestellte fördernde Wirkung auf den Wachstumsfaktor FGF-2, der mitogene und angiogene Effekte auf Zellen und Gewebe besitzt, legt Anwendungen im Bereich der Beschichtung von Implantaten für den Ersatz von Binde- und Stützgewebe oder für Herstellung von Hydrogelen im Bereich des Tissue Engineering verschiedener Gewebetypen wie z.B. dem Knochen nahe. Tatsächlich besitzen Cellulosesulfate über die Wirkung auf FGF-2 hinaus einem modulierenden Effekte auf andere Wachstumsfaktoren wie z.B. dem bone morphogenic protein (BMP-2) und lassen sich zudem auf verschiedene Weise als bioaktive Beschichtungen auf Oberflächen einsetzen^{31, 32}.

Danksagung

Herrn Wolfgang Wagenknecht als ehemaligen Kollegen und Mitarbeiter des Fraunhofer-Instituts für Polymerforschung in Potsdam-Golm sei an dieser Stelle für die ausgezeichnete und angenehme Zusammenarbeit bei der regioselektiven Synthese von Cellulosederivaten und der Bestimmung der Blutverträglichkeit herzlich gedankt.

Literaturangaben

1. Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME: Essentials of Glycobiology. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 2009

2. Kresse H, Schönherr E. *J. Cell Phys.* 2001; 189: 266–274
3. Garg HG, Linhardt RG, Hales CA. *Chemistry and Biology of Heparin and Heparan Sulfate*. Elsevier: San Diego, 2005
4. Capila I, Linhardt R J. *Angewandte Chemie* 2002; 114: 426–450
5. Bishop JR, Schuksz M, Esko JD. *Nature* 2007; 446: 1030–1037
6. Zehnder JL, Galli SJ. *Nature* 1999; 400: 714–715
7. Lassila R, Lindstedt K, Kovanen P. *Thromb. Haemostasis* 1993; 69:707–707
8. Lindstedt KA, Kokkonen JO, Kovanen PT. *J. Lipid Res.* 1992;33(1):65–75
9. Sakaguchi K, Yanagishita M, Takeuchi Y, Aurbach GD. *J. Biol. Chem.* 1991; 266: 7270–7278
10. Schlessinger J, Plotnikov AN, Ibrahim OA, Eliseenkova AV, Yeh BK, Yasyon A, et al. *Molec.Cell* 2000; 6: 743–750
11. Xingbin A, Do AT, Lozynska O, Gullberg MK, Lindahl U, Emerson Jr CP. *J. Cell Biol.* 2003; 162: 341–351.
12. Huang XJ, Guduru D, Xu ZK, Vienken J, Groth T. *Macromol. Biosci.* 2011; 11: 131–140
13. Street JT, McGrath M, O’Regan K, Wakai A, McGuinness A, Redmond HP. *Clin. Orthop.Relat. Res.* 2000; 381: 278–89.
14. Nelson-Piercy C. *Scand. J.Rheumatol.Suppl.* 1998; 107: 68–71.
15. Guerrini M, Beccati D, Shriver Z et al. *Nature Biotechnology* 2008; 26: 669–675
16. Klemm D, Philipp B, Heinze T, Heinze U, Wagenknecht W. *Comprehensive cellulose chemistry*. 1st ed., Vol. 2. Weinheim: Wiley; 1998
17. Heinze T, Koschella A. *Macromol.Symp.* 2005; 223: 13–29.
18. Philipp B, Wagenknecht W. 1983; 17: 443–459
19. Groth B, Wagenknecht W. *Biomaterials* 2001; 22: 2719–2729
20. Casu B. *Carbohydrates in Europe* 1994; 11: 18–21
21. Razi N, Lindahl U. *J Biol.Chem.* 1995; 270: 11267–11275
22. Peschel D, Zhang K, Aggarwal N, Brendler E, Fischer S, Groth T. *Acta Biomaterialia* 2010; 6: 2116–2125
23. Leali D, Belleri M, Urbinati C, Coltrini D, Oreste P, Zopetti G, et al. *J.Biol. Chem.* 2001; 276: 37900–37908
24. Faham S, Hileman RE, Fromm JR, Linhardt RJ, Rees DC. *Science* 1996; 271: 1116–1120
25. Hatanaka K, Ohtsuki T, Kunou M. *Chem. Lett.* 1994; 1407–1410
26. Kunou M; Hatanaka K. *Carbohydr. Polym.* 1995; 28: 107–112

27. Nimni ME. *Biomaterials* 1997; 18: 1201–1225
27. Weltrowski A, da Silva Almeida ML, Peschel D, Zhang K, Fischer S, Groth T, *Macromol. Biosci.* 2012; 12: 740–750
28. Rusnati M, Coltrini D, Caccia P, Dellera P, Zoppetti G, Oreste P et al. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1994; 203: 450–458
29. Gericke M, Doliska A, Stana J, Liebert T, Heinze T, Stana-Kleinschek K. *Macromol. Biosci.* 2011; 11: 549–556
30. Peschel D, Zhang K, Fischer S, Groth T. *Acta Biomaterialia* 2012; 8: 183–193
31. Aggarwal N, Altgärde N, Svedhem S, Zhang K, Fischer S, Groth T. *Langmuir* 2013; 29

Thomas Groth¹, Dieter Peschel¹, Kai Zhang², Alexander Köwitsch¹, Steffen Fischer²

- ¹ AG Biomedizinische Materialien, Institut für Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Heinrich-Damerow-Strasse 4, 06120 Halle (Saale)
- ² Institut für Holz- und Pflanzenchemie, Technische Universität Dresden, Piener Strasse 19, 01737 Tharandt (Sachsen)