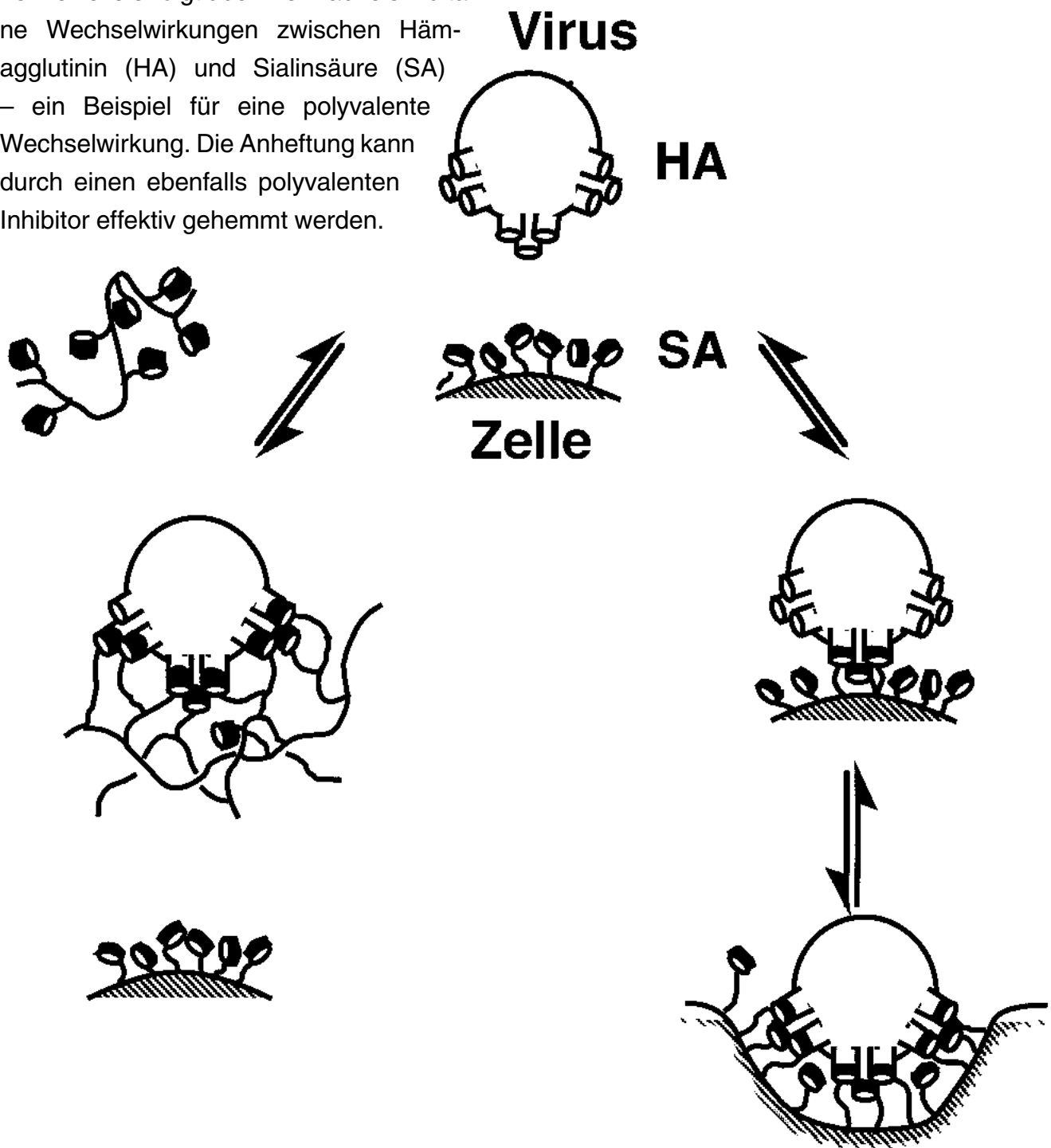


Die Anlagerung eines Influenzavirus an eine Zielzelle erfolgt über mehrfache simultane Wechselwirkungen zwischen Hämagglutinin (HA) und Sialinsäure (SA) – ein Beispiel für eine polyvalente Wechselwirkung. Die Anheftung kann durch einen ebenfalls polyvalenten Inhibitor effektiv gehemmt werden.



polyvalente Inhibierung \times **Infektion** \leftarrow **Anlagerung**

Polyvalente Wechselwirkungen in biologischen Systemen: Auswirkungen auf das Design und die Verwendung multivalenter Liganden und Inhibitoren**

Mathai Mammen, Seok-Ki Choi und George M. Whitesides*

Polyvalente Wechselwirkungen zeichnen sich durch die gleichzeitige Bindung mehrerer Liganden einer biologischen Einheit (eines Moleküls, einer Oberfläche) an mehrere Rezeptoren einer anderen biologischen Einheit aus. Derartige Wechselwirkungen kommen überall in der Biologie vor und haben eine Reihe von Charakteristika, die monovalenten Wechselwirkungen fehlen. Besonders im Verbund können polyvalente Wechselwirkungen viel stärker sein als entsprechende monovalente Wechselwirkungen, und sie können die Basis für das Verständnis fördernder und hemmender biologischer Wechselwirkungen liefern,

die sich grundsätzlich von denen in monovalenten Systemen unterscheiden. Zunächst wird der theoretische Hintergrund für das Verständnis der Polyvalenz umrissen, eine Nomenklatur für polyvalente Wechselwirkungen vorgestellt und die zentrale Rolle der Entropie für die Polyvalenz diskutiert. Die folgenden Abschnitte geben einen Überblick über eine Reihe biologischer Prozesse, bei denen polyvalente Wechselwirkungen eine Rolle spielen. Mit dieser systematischen Übersicht werden auf der Grundlage von Polyvalenz neue Ziele und neue Strategien für das Design von Pharmazeutika nahegelegt. Schließlich werden Prinzi-

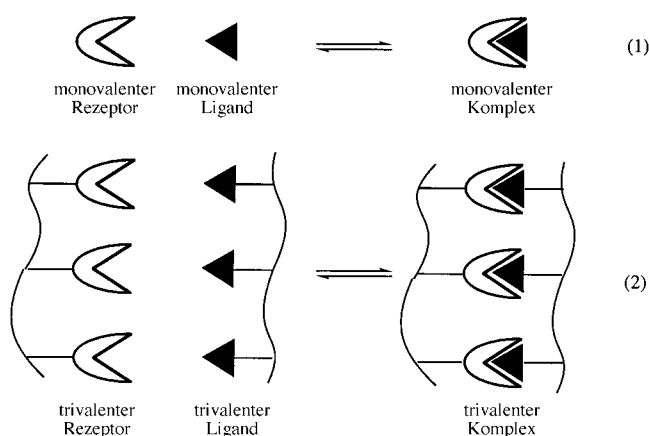
pien des Designs und der Synthese sowie die Untersuchung von synthetischen polyvalenten Liganden diskutiert, wobei die Anlagerung des Influenzavirus an Erythrocyten ausführlich geschildert wird. In diesem repräsentativen und gut untersuchten polyvalenten System gibt es es mehrere Arten der Wechselwirkung; die wichtigsten sind die entropisch verstärkte Bindung und die sterische Stabilisierung.

Stichwörter: Kooperative Effekte • Molekulare Erkennung • Nichtkovalente Wechselwirkungen • Polyvalenz • Rezeptoren

1. Polyvalente Wechselwirkungen kommen überall in der Biologie vor

Die Bindigkeit (Valenz) eines Teilchens ist durch die Zahl der gleichartigen Verknüpfungen gegeben, die es mit anderen Teilchen im Sinne der Liganden-Rezeptor-Wechselwirkung bilden kann [Gl. (1, 2)]. Unter Teilchen verstehen wir hier: kleine Moleküle, Oligosaccharide, Proteine, Nucleinsäuren, Lipide oder Aggregate dieser Moleküle; Membranen oder Organellen; Viren, Bakterien oder Zellen. In diesem Aufsatz werden Systeme behandelt, in denen zwei biologische Einheiten oligovalent oder polyvalent wechselwirken, d.h. die simultane und spezifische Assoziation von zwei oder mehreren Liganden und Rezeptoren.

Die Vorstellung, daß viele biologische Systeme über mehrere molekulare Kontaktstellen gleichzeitig wechselwir-



ken, ist bekannt. Gleichwohl ist sie in der molekularen Biochemie zu einem neuen Schwerpunkt der Forschung geworden, nachdem sich die Bedeutung von Wechselwirkungen abgezeichnet hat, bei denen mehrere Proteine und Liganden beteiligt sind. Die Möglichkeit, daß gleichzeitig auftretende Mehrfach-Wechselwirkungen (polyvalente Wechselwirkungen) einzigartige kollektive Eigenschaften

[*] Prof. G. M. Whitesides, Dr. M. Mammen, Dr. S.-K. Choi
Department of Chemistry and Chemical Biology
Harvard University
12 Oxford Street, Cambridge, MA 02138 (USA)
Fax: (+1) 617-495-9857
E-mail: gwhitesides@gmwhgroup.harvard.edu

[**] Häufiger verwendete Abkürzungen werden im Anhang erklärt.

haben, die sich von den Eigenschaften ihrer monovalent wechselwirkenden Komponenten qualitativ unterscheiden, legt neue Strategien für das Design von Arzneimitteln und Reagentien für die Forschung in der Biochemie und der Biologie nahe. Die Verstärkung oder Blockierung kollektiver oder polyvalenter Wechselwirkungen könnte von vollkommen anderen Strategien profitieren (oder diese erfordern), als man sie bei monovalenten molekularen Wechselwirkungen anwendet.

Wenige biologische Wechselwirkungen sind bisher als eindeutig polyvalent anerkannt. In diesem Aufsatz stellen wir die Hypothese auf, daß Wechselwirkungen zwischen biologischen Einheiten, die mehrere Liganden und Rezeptoren tragen, im allgemeinen polyvalenter Natur sind. Ziel des Aufsatzes ist die systematische Gliederung und Beschreibung experimenteller Ergebnisse, die die genannte Hypothese stützen oder für sie bedeutsam sind. Außerdem werden einige der thermodynamischen Prinzipien umrissen, die polyvalente Wechselwirkungen von monovalenten unterscheiden; ferner

schlagen wir Strategien vor, die darauf abzielen, polyvalente Wechselwirkungen zu stören oder zu fördern.

In Abschnitt 2 liefern wir fünf Beispiele für Klassen polyvalenter Wechselwirkungen, von denen wir glauben, daß sie in der Humanbiologie wichtig sind. Diese Beispiele schließen Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Klassen biologischer Einheiten ein: Zelle-Virus, Zelle-Bakterium, Zelle-Zelle, Zelle-Molekül und Molekül-Molekül. Diese Darstellungen sind nicht umfassend und beschreiben sicherlich nicht alle möglichen Arten der polyvalenten Wechselwirkungen; vielmehr sind es isolierte Beispiele, die dem Leser eine Orientierung zu den wichtigen qualitativen Vorstellungen dieses Fachgebiets geben sollen.

In Abschnitt 3 diskutieren wir die Thermodynamik von polyvalenten Wechselwirkungen sowie die Konzepte für die Kooperativität der Bindungen (ausgedrückt durch den Kooperativitätsparameter α) und die polyvalente Verstärkung bei Bindungen (ausgedrückt durch den neuen Parameter β , von dem wir glauben, daß er für die Bewertung von poly-

George M. Whitesides wurde 1939 in Louisville, Kentucky, geboren. 1960 erhielt er den AB-Abschluß an der Harvard University und promovierte 1964 bei J. D. Roberts am California Institute of Technology (Caltech). 1963 bis 1982 war er Fakultätsmitglied am Massachusetts Institute of Technology (MIT) und wechselte 1982 an das chemische Institut der Harvard University, dessen Leiter er 1986 bis 1989 war. Gegenwärtig ist Whitesides Mallinckrodt Professor of Chemistry an der Harvard University. Er hat in vielen Regierungs- und Industrieausschüssen und Beratungsgremien mitgewirkt, ist Mitherausgeber von 17 wissenschaftlichen Fachzeitschriften und Inhaber zahlreicher Auszeichnungen, darunter der Arthur C. Cope Award der American Chemical Society. Whitesides ist Autor von über 600 Veröffentlichungen; zu seinen gegenwärtigen Forschungsinteressen zählen Biochemie, Oberflächenchemie, Materialwissenschaften, molekulare Virologie, optische Materialien, Selbstorganisation, bioanalytische Chemie, mikroelektromechanische Systeme und mikrofluide Systeme.



G. M. Whitesides



M. Mammen



S.-K. Choi

Mathai Mammen wurde in Vellore, Indien, geboren und wuchs in Halifax, Neuschottland, auf. Er erwarb den Grad eines Bachelor of Science in Chemie an der Dalhousie University und seinen Dokortitel 1996 bei G. M. Whitesides an der Harvard University. In theoretischen und experimentellen Arbeiten untersuchte er Aspekte des Entropie- und Elektrostatikeinflusses auf die Wechselwirkungen von Molekülsystemen. Von der Harvard University erwarb er den Grad eines Doctor of Medicine, und er war ein Mitglied der Harvard Medical School – Massachusetts Institute of Technology Division of Health Sciences and Technology. Seine Forschungsinteressen umfassen die Anwendung der präparativen und biophysikalischen Chemie zur Lösung biologischer und medizinisch relevanter Probleme (neue Forschungs-, „Werkzeuge“, pharmazeutische Entwicklungen und medizinische Geräte). Seit Juli 1998 arbeitet er bei Advanced Medicine in South San Francisco, Kalifornien.

Seok-Ki Choi wurde in Puan, Südkorea, geboren. Er erwarb den Grad eines Bachelor of Science in Chemie 1986 an der Seoul National University, wo er 1988 auch den Masters of Science in organischer Chemie bei S.-H. Chang erhielt. Seinen Dokortitel erwarb er 1994 bei K. Nakanishi an der Columbia University, New York, wo er die molekularen Wirkungsmechanismen von Nervengiften der Wespe untersuchte. Nach einem Postdoktoranden-Aufenthalt bei G. M. Whitesides an der Harvard University arbeitet er seit April 1997 bei Advanced Medicine in South San Francisco, Kalifornien. Seine Forschungsgebiete sind die biologische und physikalisch-organische Chemie von Naturstoffen und biologisch relevanten Makromolekülen.

valenten Inhibitoren nützlicher ist als α). In den folgenden Abschnitten beschreiben wir Wechselwirkungen in der Biologie, die gut untersucht worden sind und gewiß oder sehr wahrscheinlich polyvalenter Natur sind. Diese Wechselwirkungen dienen zur Veranschaulichung einiger der verschiedenen und interessanten Eigenschaften von polyvalenten Systemen. Schließlich diskutieren wir die Prinzipien und die Ausführung des Designs von polyvalenten Liganden und beschreiben Methoden zur Überprüfung und Quantifizierung der Wirksamkeit dieser Liganden.

2. Beispiele für polyvalente Wechselwirkungen, die in der Humanbiologie von Bedeutung sind

Die folgenden Beispiele zur Mehrbindigkeit stammen von wichtigen Wechselwirkungen in der Humanbiologie. Die Reihenfolge der Beispiele spiegelt die momentane Tiefe des Verständnisses dieser Wechselwirkungstypen und die Intensität der darauf konzentrierten Forschungsaktivitäten wider.

2.1. Bindung eines Virus an die Oberfläche einer Zelle: Influenza und bronchiale Epithelzellen

Bei der Infektion lagert sich im ersten Schritt das Influenzavirus an die Oberfläche einer bronchialen Epithelzelle an (Abb. 1).^[1,2] Diese Anlagerung geschieht durch Wechselwirkung zwischen mehreren Trimeren des Hämagglutinins (HA,

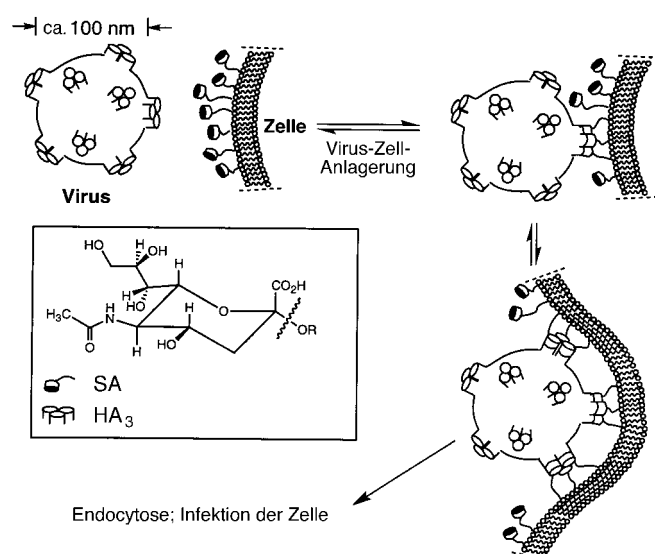


Abb. 1. Das Influenzavirus lagert sich durch Wechselwirkung des trimeren Hämagglutinins (HA₃, dargestellt durch herausstehende Zylinder auf dem Virus) mit Sialinsäure (SA, dargestellt durch Kappen auf der Zelle) an Zellen an. Nur wenige der Hämagglutinin-Trimere und der SA-Gruppen sind – nicht maßstabsgerecht – wiedergegeben.

ein Lectin, das dicht gepackt auf der Oberfläche des Virus enthalten ist, ca. 2–4 Kopien pro 100 nm² oder 600–1200 pro Virusteilchen) und mehreren Einheiten von *N*-Acetylneuraminsäure (= Sialinsäure, SA, der terminale Zucker vieler Glycoproteine, der auf der Oberfläche der Zielzelle

ebenfalls dicht angeordnet ist, ca. 50–200 Kopien pro 100 nm²). Tabelle 1 enthält weitere Beispiele für Zell-Virus-Wechselwirkungen. Bei einer zunehmenden Zahl von Viren wurde festgestellt, daß sie sich nicht nur eines Wechselwirkungstyps zur Anlagerung an Zielzellen bedienen.

2.2. Bindung eines Bakteriums an die Oberfläche einer Zelle: *E. coli* und Harnwegs-Endothelzellen

Uropathogene Stämme des Bakteriums *E. coli* lagern sich direkt und indirekt durch polyvalente Wechselwirkungen an die Oberfläche von Epithelzellen in den Harnwegen und der Blase an (Abb. 2). Dabei sind mehrere bakterielle Proteine identifiziert worden, die dieses Gewebe bevorzugen. Zwei

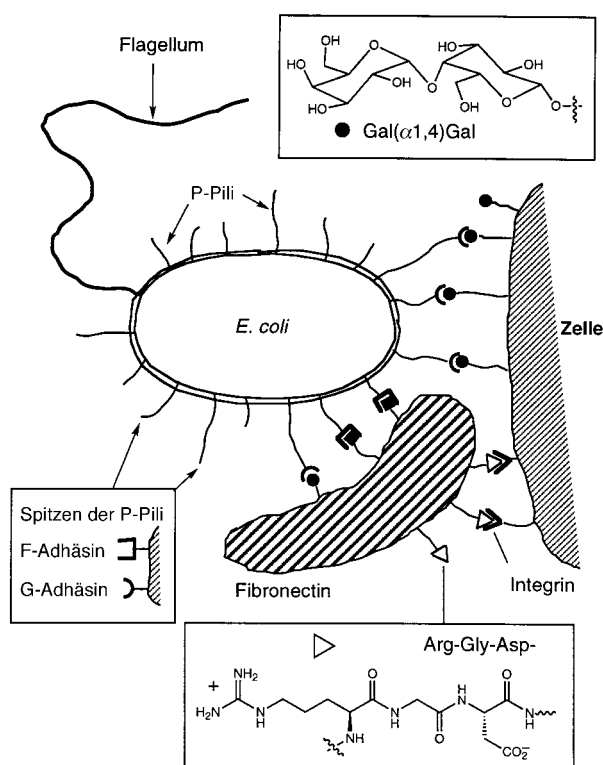


Abb. 2. Anlagerung von uropathogenen *E. coli*-Bakterien an Harnwegs-Endothelzellen. Diese Anlagerung wird entweder durch Typ-I-Fimbrien oder durch P-Fimbrien an der Oberfläche des Bakteriums vermittelt. In diesem Beispiel verwendet das Bakterium Lectin-ähnliches G-Adhäsine, lokalisiert an den Spitzen seiner Fimbrienfilamente (P-Fimbrien), um sich spezifisch an mehrere Kopien von Gal(α1,4)Gal (P_K-Antigen) anzuheften, die an der Oberfläche der Epithelzellen exprimiert werden. Außerdem lagern sich Mehrfachkopien von F-Adhäsine auf der Oberfläche von *E. coli* an Fibronectin an. Fibronectin trägt mehrere Kopien der Arg-Gly-Asp-Reste (RGD), die sich durch multivalente Wechselwirkungen mit Rezeptoren der Integrin-Klasse fest an Epithelzellen binden. Die Darstellung (besonders des G- und F-Adhäsins) ist nicht maßstabsgerecht.

Beispiele sind P-Fimbrien (sie enthalten G-Protein) und Typ-I-Fimbrien (sie enthalten FimH-Adhäsine), und beide sind an der Oberfläche von *E. coli* lokalisiert.^[94]

Wir erläutern die Mehrbindigkeit in diesem System am Beispiel der P-Fimbrien. Erstens können diese uropathogenen Bakterien das Lectin-ähnliche G-Protein verwenden, das

Tabelle 1. Beispiele für Liganden und Rezeptoren^[a] an der Oberfläche von Virus und Wirtszelle.^[3–5]

DNA-Viren	Erkrankung/Verwendung	Molekül am Virus	Molekül an der Wirtszelle
Papovaviridae <i>Polyomavirus</i> Polyomavirus	DNA-haltiges Tumor-Virus	VP1 ^[6]	Z: NeuAc(α 2,3)Gal(β 1,3)GalNAc ^[6, 7] Z: Sialyloligosaccharide
Adenovirus <i>Mastadenovirus</i> humanes Adenovirus	akute Atemwegserkrankungen, Pneumonie, Gastroenteritis (auch ein nützlicher Vektor zur Gentherapie)	P: Reste 1–141 des E3gp ^[8] P: RGD-Base des Pentonbasen-Proteins (unterscheidet sich vom Faserprotein)	P: Klasse-I-MHC ^[9] P: Pentonbase wechselwirkt mit β 2-Integrinen ^[10]
Herpesviridae-alpha <i>Herpes simplex</i> Herpes-Simplex-Virus Typ 1	Herpes Simplex	P: Glycoprotein E und D ^[11–20]	P: gD, gH (zweistufige Anlagerung vorgeschlagen)
Varicella-Zoster-Virus	Windpocken, Gürtelrose	P: Glycoprotein I (gE) ^[21, 22] (gE-Dimer ähnelt Fc-Rezeptor)	
Herpesviridae-beta <i>Cytomegalovirus</i> Cytomegalievirus	wichtige Ursache für Säuglingsblindheit und Entwicklungsverzögerung; Beteiligung bei AIDS und Kaposi-Sarkom vermutet	P: gC-11, gp-Reste 204–297 (86 kDa) des Gens der H301- α -Domäne, ähnlich Klasse-I-MHC- α 3 ^[23, 24]	Z: Heparinsulfat P: Klasse-I-HLA-MHC über β 2-Mikroglobulin ^[25]
<i>Lymphocryptovirus</i> Epstein-Barr-Virus	infektiöse Mononucleose (Pfeiffer-Drüsenfieber)	P: gp350 ^[26] P: gp3 ^[26]	P: C3d-Rezeptor CR2 (CD21) der B-Lymphocyten – ähnlich C3-Komplementsfragment C3d ^[27]
Poxviridae <i>Orthopoxvirus</i> Vaccina-Virus	verwendet zur Pockenimpfung; sehr ähnliches Antigenmuster wie Variola-Virus	P: Reste 71–80 des VGF-Proteins – ähnlich EGF α	P: EGF-Rezeptor ^[27] (es gibt auch Hinweise dagegen ^[28])
Parvoviridae <i>Parvovirus</i> Hunde-Parvovirus	dieses Virus ist ein Modell für den menschlichen Stamm, der Erythema infectiosum verursacht („Ringelröteln“); die menschliche Form kann Hydrops fetalis oder den Tod des Fetus verursachen, sofern während der Schwangerschaft erworben	P: GP1-verankertes Protein ^[29]	P: 3201 T-Zellen P: Oberfläche von Erythrocytenvorläufern im Knochenmark (Infektion kann Anämie verursachen)
Hepadnavirus <i>Hepatitis Typ B</i> humanes Hepatitis-B-Virus	Hepatitis B, eine chronische Infektion, die in 1–2 % der Fälle zu Lebersversagen und zum Tod führt	P: PräS-Anteil des Env-Proteins P: Reste 21–47 des PräS-Anteils des Env-Proteins P: PräS1-Sequenz des großen S-Proteins ^[30, 31]	P: IL-6-Rezeptor, Prä-S1-Bindungsprotein P: Rezeptor für polymerisiertes Serum-Albumin an Leberzellen P: Rezeptor für polymeres IgA an Leberzellen P: Sialoglycoprotein P: Ankopplung vermittelt durch lösliches IL6; so indirekter Zugang zu Nicht-Leberzellen Z: Asialoglycoprotein-Rezeptor ^[32]
Hepatitis-B-Virus der Vögel	Hepatitis B bei Vögeln		P: Glycoprotein 180 ^[33]
RNA-Viren	Erkrankung	Molekül am Virus	Molekül an der Wirtszelle
Picornaviridae Enterovirus Poliovirus	Polio	P: Reste 95–105 des VP1-Kapsid-Proteins ^[34]	P: gehört zur Immunglobulin-Oberfamilie ^[35] (nicht CD44, wie vorher beschrieben ^[36])
<i>Rhinovirus</i>	Erkältung	P: Reste des VP1- und VP3-Haupt-Kapsid-Proteins, die eine Furche auf der Virusoberfläche auskleiden ^[37–39]	P: ICAM-1 ^[40]
<i>Cardiovirus</i> Encephalomyocarditis-Virus	Mengo-Fieber, selten tödlich; pathogen für viele Tiere (hat z. B. eine tödliche Myocarditis bei Schweinen verursacht)	P: Reste des VP1- und VP3-Haupt-Kapsid-Proteins ^[41]	P: Sialoglycoprotein P: VCAM-1 ^[42]
<i>Aphthovirus</i> Maul- und Klauenseuche-Virus	hochinfektiöse Erkrankung bei Rindern, Schafen, Schweinen und Ziegen (Mortalität 10–70 %); für Menschen meist nicht tödlich, wird aber leicht von Tieren übertragen (verursacht hohes Fieber)	P: NS28-Glycoprotein P: Reste 145–147 (RGD) und 203–213 des VP1-Proteins P: Reste 133–158 und C-terminale Region des VP1-Proteins ^[37, 38, 43]	P: Integrine

Fortsetzung von Tabelle 1.

RNA-Viren	Erkrankung	Molekül am Virus	Molekül an der Wirtszelle
Reoviridae <i>Rotavirus</i> humanes Rotavirus	häufigster und wichtigster Erreger von Gastroenteritis bei Kindern weltweit: über 500 Millionen Fälle jährlich, davon 5 Millionen Todesfälle	P: C-terminaler Abschnitt des Häm-agglutinins ^[44–46]	1. P: K562-Erythroleukämiezellen? 2. P: β -adrenerger Rezeptor? 3. P: Sialoglycoproteine in den Mikrovilli der Saumzellen des Dünndarmepithels 4. Z: Sialinsäure ^[47, 48]
Togaviridae <i>Alphavirus</i> Semliki-Forest-Virus	Fieber, Enzephalitis	P: Nucleokapsid	P: Klasse-I-HLA- und H-2-MHC-Molekül ^[49–51]
Lactate-Dehydrogenase-Elevating-Virus	Fieber, Enzephalitis	P: Virushüllen-Glycoprotein (VP-3P) ^[52]	P: Klasse-II-1a-MHC-Molekül an Makrophagen ^[53]
Sindbis	verwandt mit Western-Equine-Enzephalitisvirus; ca. 5 % Mortalität	P: E1-E2 ^[54]	P: Lamininrezeptor mit hoher Affinität ^[55, 56]
<i>Rubivirus</i> Rubella	Röteln		Z: nicht identifiziertes Glycolipid ^[57, 58]
Orthomyxoviridae <i>Influenzavirus</i> Influenzavirus	Haupterreger verschiedener Erkrankungen der Atemwege beim Menschen, darunter Pneumonie	P: Hämagglutinin-Protein (HN- oder H-Protein) ^[59–61]	P: HN-Protein, Leberzellen Z: Sialyloligosaccharide Influenza A: ^[62] Z: NeuAc(α 2,6)-Gal(β 1,4)GlcNAc, Z: NeuAc(α 2,3)-Gal(β 1,3)GalNAc, Z: NeuAc(α 2,3)-Gal(β 1,4)GlcNAc Influenza C: ^[63] Z: 9- <i>O</i> -AcNeuAc
Paramyxoviridae <i>Paramyxovirus</i> Sendai-Virus	Die Bedeutung der Gattung Paramyxovirus als Erreger von Infektionen der unteren Atemwege bei kleinen Kindern liegt nur hinter der des Respiratory-Syncytial-Virus zurück	P: Hämagglutinin-Protein ^[64–66]	Z: Sialyloligosaccharide Z: NeuAc(α 2,3)Gal(β 1,3)GalNAc Z: NeuAc(α 2,8)NeuAc(α 2,3)-Gal(β 1,3)GalNAc Z: Gangliosid GD1a
Newcastle-Disease-Virus	Infektionen der unteren Atemwege	P: Hämagglutinin-Neuraminidase ^[67]	Z: Sialyloligosaccharide Z: NeuAc(α 2,3)Gal(β 1,3)GalNAc ^[68]
<i>Morbillivirus</i> Masern-Virus	Masern	P: Masern-Virus-Hämagglutinin ^[69]	P: CD46 ^[70]
<i>Pneumovirus</i> Respiratory-Syncytial-Virus	Haupterreger von Infektionen der unteren Atemwege (Bronchiolitis und Pneumonie), spielt möglicherweise eine Rolle beim plötzlichen Kindstod, wichtiger Erreger von Mittelohrinfektionen	P: ein Fusionsprotein (Nucleokapsid) ^[71]	
Coronavirus, OC43	Erkältung, Pharyngitis (Entzündung des Rachenschleimhauttrakts)		Z: Neu5,9Ac2 ^[72]
Rhabdoviridae <i>Vesiculovirus</i> Vesiculäres Stomatitis-Virus		P: Glycoprotein ^[73]	Z: Phosphatidylserin Z: Phosphatidylinositol Z: GM ₃ -Gangliosid ^[74]
<i>Lyssavirus</i> Tollwutvirus	Tollwut	P: Reste 151 – 238 des G-Proteins – ähnlich Curare-artigen Neurotoxinen ^[75, 76]	P: BHK-21-Zellen P: Acetylcholin-Rezeptor (Reste 173 – 204 der α -Einheit Z: sialylierte Ganglioside
Retroviridae ^[4, 77] <i>Oncovirus C – Human</i> humanes T-Zell-Leukämievirus (HTLV-1)	Krebs – Leukämie	P: Reste 246 – 253 des Virushüllen-Glycoproteins – ähnlich dem extrazellulären Teil von HLA-B-MHC IL2 ^[78]	P: Klasse-I-HLA-MHC-Molekül P: Interleukin-2-Rezeptor
Strahlungsleukämie-Virus	Krebs – Leukämie		P: T-Zell-Rezeptor: L3T4-Molekülkomplex ^[79]
amphotrophisches Retrovirus	Krebs – Leukämie		P: CD34 auf Knochenmarks-Stammzellen ^[80]
<i>Oncovirus C – Vögel</i> Vogel-Leukosevirus	Krebs		P: Low-density-Lipoprotein-Rezeptor ^[81, 82]
<i>Oncovirus C – Säugtiere</i> Leukämievirus bei Mäusen (Moloney)	Krebs – Leukämie	P: Virushüllen-p71 ^[83]	P: Lymphom-Zelloberflächen-IgM P: Hydrophobes Protein mit unbekannter Funktion aus 622 Aminosäuren

Fortsetzung von Tabelle 1.

RNA-Viren	Erkrankung	Molekül am Virus	Molekül an der Wirtszelle
Ökotropisches Mäuse-Retrovirus	Krebs	P : Virushüllen-Glycoprotein ^[84]	P : Transportprotein für Aminosäuren ^[85]
Nichtökotropisches Mäuse-Leuk-ämievirus	Leukämie	P : gp70 (Oberfläche) ^[86]	
HIV-1	AIDS	P : gp120-ähnlicher Bereich der schweren Kette (Ig) P : gp120-ähnliches Neuroleukin P : gp120-ähnliches Vasoactive Intestinal Peptide ^[87, 88]	P : CD4 der T-Zellen P : CD4-Molekül wechselwirkt mit Klasse-II-HLA-DR-MHC Z : Galactosylceramid (oder nahe verwandtes Molekül auf epithelialen HT29-Zellen im menschlichen Dickdarm) P : CR2, besonders in Zellen, die mit EBV infiziert sind P : Chemokin-Rezeptoren CXCR-4 (T-Zell-trophisch) und CCR-5 (Makrophagen-trophisch) – beide sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit sieben Transmembranhelices ^[89]
HIV-2	AIDS		P : CD4 ^[90]
Simian Immunodeficiency Virus (SIV)	Immunschwächesyndrom analog zu AIDS bei Affen	P : SIV mac239 ^[91]	P : CD4
Afrikanisches Schweinevirus		P : p12, p72 ^[92, 93]	

[a] **P** = Protein, **Z** = Zucker (Glycoprotein oder Glycolipid).

an den Spitzen ihrer P-Fimbrienfilamente lokalisiert ist, um sich fest und spezifisch an mehrere Kopien des Gal(α 1,4)Gal-Abschnitts^[95] (**P**_K-Antigen-Abschnitts) eines Glycolipids anzuheften. Diese kommen auf der Oberfläche von Epithelzellen im Harntrakt vor, besonders in den Nieren. Zweitens: Mehrere Kopien des F-Proteins auf der Oberfläche von *E. coli* lagern sich polyvalent an Fibronectin an, ein lösliches Glycoprotein. Das Fibronectin seinerseits bindet sich polyvalent an die Oberfläche der Epithelzelle. *E. coli* sammelt sich in diesen Geweben des Harntraktes, vermehrt sich dort und kann Krankheiten verursachen (besonders Pyelonephritis, die gleichzeitige Entzündung des Nierenbeckens und der Nieren). Im allgemeinen binden sich Bakterien entweder direkt an die Zelloberfläche oder an die Moleküle in der extrazellulären Matrix des bevorzugten Gewebes. Bakterien binden sich an Zucker und an Proteine; Beispiele dafür sind den Tabellen 2–4 zu entnehmen.

2.3. Bindung von Zellen an andere Zellen: neutrophile und arterielle Endothelzellen

Die Anlagerung eines ursprünglich in rasch fließendem Blut suspendierten Neutrophils an die Endothelzellen in der Nähe eines Entzündungsherds erfolgt durch polyvalente Wechselwirkungen.^[188–190] Durch eine Entzündung in der Nähe signalisiert, heftet sich dieses ursprünglich rasch transportierte Neutrophil an die Oberfläche der Endothelzellen an und bewegt sich dann langsam ($10\text{--}20\ \mu\text{m min}^{-1}$) weiter (Endothelzellen sind die Zellen, die das Innere der Blutgefäße auskleiden; Abb. 3). Dieses langsame „Rollen“ wird durch Wechselwirkungen zwischen zahlreichen E- und P-Selectinen an der Oberfläche von Endothelzellen und mehreren Glycoproteinen vermittelt, die an der Oberfläche des Neutrophils Sialyl-Lewis^x (sLe^x, ein Tetrasaccharid) aufwei-

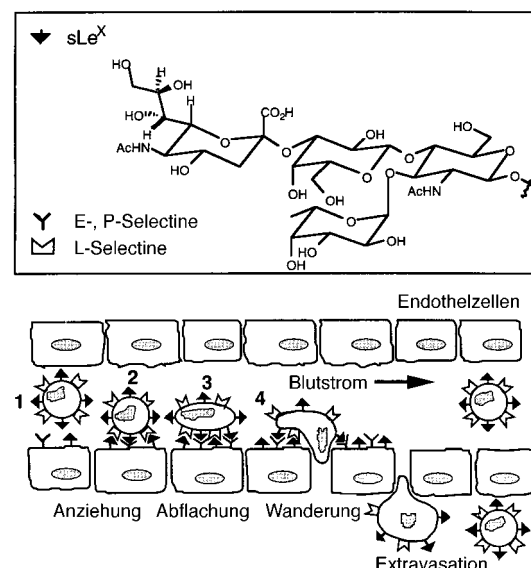


Abb. 3. Verletzungen führen zum Exprimieren und dem Auftreten von E- und P-Selectinen auf der Oberfläche naher Endothelzellen. Neutrophile (1) werden zu dieser Stelle (2) hingezogen. Die Neutrophile wechselwirken polyvalent (über sLe^x-Einheiten) mit E- und P-Selectinen. Außerdem wechselwirken an der Oberfläche des Neutrophils exprimierte L-Selectine mit endotheliale sLe^x. Neutrophile ändern nach der Anlagerung ihre Form (3). Weitere, durch Integrine vermittelte Anziehung, führt zur Extravasation (4), d.h. zum Austreten in das umgebende Gewebe.

sen (diese Selectine sind normalerweise an der Oberfläche der Endothelzellen nicht vorhanden; ihre Bildung wird während der Entzündung durch Cytokine induziert).^[190] Außerdem wechselwirkt L-Selectin, das an der Oberfläche des Neutrophils zugegen ist, mit endotheliale Sialyl-Lewis^x, das an der Endothelzelle vorhanden ist. Die Valenz dieser Reihe von Wechselwirkungen kann die Kinetik, Dynamik und Spezifität der Neutrophil-Aktivierung stark beeinflussen.^[191] Tabelle 5 enthält weitere Beispiele zur Zell-Zell-Wechselwirkung.

Tabelle 2. Beispiele für Bakterien, die Zucker (**Z**) und Proteine (**P**) an der Oberfläche von Wirtszellen binden.

Bakterium	Erkrankung	Molekül am Bakterium	Molekül an der Wirtszelle
<i>Actinomyces naeslundii</i> 12104 und <i>A. viscosus</i> LY7	chronische Mundschleimhautentzündung		Z: GalNAc β -enthaltende Glycosphingolipide (GSLs), z. B. GalNAc(β 1,3)Gal(α)-O-ethyl ^[96, 97]
<i>Candida albicans</i>	Bestandteil der normalen Fauna des Mundbereiches und des (weiblichen) Genitaltraktes, verursacht Sekundärkrankheiten bei Prädisposition (z. B. Diabetes Mellitus, Immunschwäche, Dauerkatheterisierung, Antibiotika, die die normale Bakterienfauna schädigen)	P: 37-kDa-Laminin-Rezeptor P: 58-kDa-Fibrinogen-bindendes Mannoprotein P: C3d-Rezeptor P: Ubiquitin ^[98]	Z: Fucose-enthaltende Glycoside ^[99] auf Epitheloberfläche
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Chronische Keratokonjunktivitis, die zu Vernarbungen und Blindheit führen kann (Geschlechtskrankheiten) Atemwegserkrankungen	Z: Polysaccharid mit 7–9 Mannose-Resten ^[100]	P: Mannose-bindende Proteine ^[100]
Enteroaggregative <i>E. coli</i> (EAggEC)	Lebensmittelvergiftung	P: Hämagglutinin ^[101]	Z: Sialinsäure
Uropathogene <i>E. coli</i>	Harnwegsinfektion	P: PapG-Adhäsine ^[102] P: FimH-Adhäsine ^[103]	Z: Gal(α 1,4)Gal auf Glycolipid P: Uroplakine Ia und Ib?
<i>E. coli</i> mit S-Fimbrien	cerebrovasculäre Komplikationen bei Meningitis		Z: NeuGc(α 2,3)Gal und NeuAc(α 2,8)-NeuAc ^[104] Z: NeuGc(α 2,3)Gal und NeuAc(α 2,8)-NeuAc ^[105] (gefunden auf Endothelzellen in kleinen Gefäßen des Hirns)
<i>Helicobacter pylori</i>	Magen- und Darmgeschwüre, Magenkrebs	P: Hämagglutinin P: Laminin-Bindungsprotein	Z: Lewis(b)-Blutgruppenantigen ^[106] Z: Neu5Ac(α 2,3)Gal (SA-abhängige Stämme) ^[107, 108]
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Pneumonie	P: 40- und 90-kDa-Protein auf den Spitzen der Pili ^[109]	Z: langkettige Sialyloligosaccharide ^[110, 111]
<i>Mycoplasma bovis</i>	Pneumonie, Infektionen des Genitaltraktes und der Harnwege	P: 26 kDa Protein ^[112]	Z: Sialinsäure-Reste und wahrscheinlich auch Sulfatidgruppen
<i>Neisseria meningitidis</i> Meningococcus	Meningitis, akute Nebenniereninsuffizienz	P: Pili (diese enthalten ungewöhnlicherweise Digalactosyl-2,4-diacetamido-2,4,6-tridesoxyhexose) ^[113]	P: CD66 auf Epithelzellen und Neutrophilen ^[114] P: Glycoprotein G auf RSV auf Oberfläche der Zielzelle (Coinfektion) ^[115]
<i>Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis</i>	Gingivitis		Z: D-GalNAc ^[116]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	befällt Bereiche ohne natürliche Abwehr (Katheter) und verursacht Erkrankung im immungeschwächten Wirt	P: Pilus-Adhäsine	Z: GalNAc(β 1,4) in Asialo-GM ₁ und Asialo-GM ₂ oder GM ₁ ^[117] Z: Mucin-Glycopeptide im Speichel (Sialinsäure) ^[118] Z: Lactose der Glycolipide ^[119]
<i>Rhizobium lupini</i>		P: L-Fucose-bindendes Protein	Z: L-Fucose ^[120]
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Harnwegsinfektionen	P: Oberflächenlectine	Z: Blutgruppe A (terminales GalNAc) ^[121]
<i>Streptococcus suis</i>	Meningitis		Z: Gal(α 1,4)Gal, vorhanden im P1- und Pk-Blutgruppen-Antigen ^[122] Z: N-Ac(α 2 \rightarrow 3)poly-NAc-lactosaminoglycane; NeuNAc(α 2,3)Gal(β 1,4)GlcNAc ^[123]
Streptokokken (M + Gruppe A)	Nasopharyngitis, Freisetzung von erythrogenen Toxinen kann Scharlach verursachen; auch als Sekundärinfektion neben Influenzaviren vorkommend, in diesen Fällen Erreger von tödlicher Pneumonie		P: C3, hauptsächlich C3b und iC3b auf PMN ^[124]
<i>Streptococcus sanguis</i> , <i>Streptococcus sobrinus</i> (Mundhöhle)	Bestandteil der normalen Flora in den oberen Atemwegen: Mangel kann Erkrankung verursachen		Z: Sialinsäure der Glycoproteine im Speichel ^[125]
<i>Yersinia enterocolitica</i>	schwere Bauchkrämpfe und Durchfälle; kann in manchen Fällen Sepsis verursachen		Z: Gal, GalNAc, Lac im intestinalen Mucin ^[126]

Tabelle 3. Beispiele für Bakterien, die an Derivate des Glycolipids Lactosylceramid binden.^[119, 122, 127–133]

Bakterium	Zielgewebe
<i>Bacteroides fragilis</i>	Dickdarm
<i>Bacteroides ovatus</i>	Dickdarm
<i>Bacteroides vulgatus</i>	Dickdarm
<i>Bacteroides distasonis</i>	Dickdarm
<i>Bacteroides thetaiotamicron</i>	Dickdarm
<i>Lactobacillus fermentum</i>	Dickdarm
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	verschiedene
<i>Fusobacterium necrioothorus</i>	Dickdarm
<i>Fusobacterium varium</i>	Dickdarm
<i>Clostridium difficile</i>	Dickdarm
<i>Clostridium botulinum</i>	Dickdarm
<i>Propionibacterium granulosum</i>	Haut, Dickdarm
<i>Propionibacterium acne</i>	Haut
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	Milchprodukte
<i>Actinomyces viscosus</i>	Mund
<i>Actinomyces naeslundii</i>	Mund
<i>Shigella dysenteriae</i>	Dickdarm
<i>Shigella flexnerii</i>	Dickdarm
<i>Shigella sonnei</i>	Dickdarm
<i>Salmonella typhimurium</i>	Dickdarm
<i>E. coli</i>	Darm
<i>Vibrio cholerae</i>	Dünndarm, Dickdarm
<i>Campylobacter jejunii</i>	Darm
<i>Hemophilus influenzae</i>	Atemwege
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	Darm
<i>Yersinia pestis</i>	Darm
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Harnwege
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Atemwege

Tabelle 4. Beispiele für Bakterien, die Zucker (Z) und Proteine (P) in der extrazellulären Matrix binden.

Bakterium	Erkrankung	Rezeptor (Ligand) am Bakterium	Ligand (Rezeptor) an der Wirtmatrix
<i>Aspergillus fumigatus conidia</i>	lokale Pilzinfektionen		P: D-Domäne des Fibrinogens ^[134]
<i>Borrelia burgdorferi</i>	Lyme-Borreliose (Zecken-Borreliose)		P: Integrin α IIb β 3 (GlycoProtein IIb-IIIa) (RGD) ^[135]
<i>Bordetella pertussis</i>	Keuchhusten (Pertussis)	P: Pertactin und filamentöses Hämagglutinin (FHA); Zell-Bindungssequenz (RGD) ^[136]	
<i>Candida albicans</i>	Bestandteil der normalen Fauna des Mundbereiches und des (weiblichen) Genitaltraktes, verursacht Sekundärkrankheiten bei Prädisposition (z. B. Diabetes Mellitus, Immunschwäche, Dauerkathetrisierung, Antibiotika, die die normale Bakterienfauna schädigen)	P: 37-kDa-Laminin-Rezeptor P: 58-kDa-Fibrinogen-bindendes Mannoprotein P: C3d-Rezeptor P: Ubiquitin ^[98]	Z: Zellwand-Polysaccharid von <i>Streptococcus gordonii</i> bei Coinfection ^[137] Z: Oligosaccharide, die sowohl β -1,2- als auch α -1,2-Bindungen enthalten ^[138–140]
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Chronische Keratokonjunktivitis, die zu Vernarbungen und Blindheit führen kann (Geschlechtskrankheiten) Atemwegserkrankungen	P: Heparin-bindendes Protein ^[141]	Z: Heparinsulfat-ähnliche GAG ^[141, 142] mit Decasacchariden mit minimaler Kettenlänge ^[143]
<i>Enterococcus faecalis</i>	Durchfall		Z: Galactose, Fucose und Mannosamin, aber nicht Mannose ^[144]
<i>E. coli</i> mit S-Fimbrien	Magen-Darm-Infektionen	P: S-Fimbrien-Protein SfaA	Z: inhibiert durch NeuAc(α 2,3)-lactose ^[145] Z: Glycolipide, die terminale Gal(3SO ₄)/ β -1-Reste enthalten ^[132]
<i>Haemophilus influenzae</i>	Infektionen der oberen Atemwege, häufig bei Sekundärinfektionen neben Influenzaviren	P: Hochmolekulare Proteine (HMW-1 und HMW-2) ^[146]	
<i>Leishmania donovani</i>	protozoischer Parasit, verursacht Kala-Azar	P: Heparin-Bindungs-Protein	Z: Heparin ^[147]
<i>Mycobacterium paratuberculosis</i>	kein bedeutender Krankheitserreger beim Menschen		P: Fibronectin ^[148, 149]

Fortsetzung von Tabelle 4.

Bakterium	Erkrankung	Rezeptor (Ligand) am Bakterium	Ligand (Rezeptor) an der Wirtmatrix
<i>Mycobacterium bovis</i>	chronische granulomatöse Infektionen, speziell der Lunge	P: Protein 85B und p55-Protein	P: Kollagenbindungsdomäne von Fibronectin, im Plasma vorhandenes Glycoprotein ^[150]
<i>Mycobacterium avium-intracellulare</i> (MAI)	häufiger Krankheitserreger bei AIDS-Patienten		P: Laminin, Kollagen I und Fibronectin ^[151]
<i>Prevotella intermedia</i>	Zahnwurzelentzündungen	P: Lactoferrin-Bindungs-Protein (Lactoferrin inhibiert die Bindung)	P: Fibronectin, Kollagen I und IV sowie Laminin ^[152]
<i>Salmonella enteritidis</i>	schwere Durchfälle (häufiger Erreger von Lebensmittelvergiftungen durch Hühnerfleisch oder -eier)	P: Fibronectin ^[153]	
<i>Staphylococcus aureus</i>	wichtiger Krankheitserreger beim Menschen, verursacht ein breites Spektrum an Infektionen; kann zu Meningitis, Endokarditis und Osteomyelitis führen	P: Drei Wiederholungseinheiten eines 38-Reste-D-Motivs P: Fibronectin-Bindungs-Proteine (gale A und ZZ-FnBP B) P: 60-kDa-Protein P: Kollagenbindungsdomäne (CBD) des Kollagenadhäsins P: Kollagen-Rezeptor, entweder zwei oder drei Kopien eines 187-Aminosäuren-Wiederholungsmotivs	P: N-terminales 29-kDa-Fragment des Fibronectins (Fn29 K) ^[154] P: Fibronectin ^[155] P: BSP (kleines (≈ 80 kDa) Integrin-bindendes, RGD-enhaltendes Knochenmatrix-Glycoprotein) ^[156, 157] P: Kollagen des Knorpels ^[158] P: Collagen ^[159, 160] P: N-terminale Region (Heparin-bindende Domäne) des Fibronectins ^[161]
<i>Staphylococcus aureus</i>	Osteomyelitis und infektiöse Arthritis	P: Kollagen-Adhäsion P: Fibrinogen-Rezeptor (Gerinnungsfaktor) Fibronectin-Bindungsprotein (FnBP) P: Unbekanntes Protein (60 kDa)	P: Kollagen (hoher Grad an Spezifität und Affinität) ^[162] P: Fibrinogen ^[163, 164] P: Laminin (aus Pepsin erhaltenes (P1)-Fragment) ^[165, 166] P: Vitronectin ^[167]
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Harnwegsinfektionen		Z: Anheftung wird teilweise durch Mannose inhibiert ^[168]
<i>Streptococcus</i>	weites Spektrum an Magen-Darm- und Atemwegsinfektionen		P: Kollagen I ^[160]
Streptokokken der Gruppe A	infektiöse Endokarditis, Glomerulonephritis und rheumatisches Fieber	P: Lipoteichonsäure (LTA) und M-Protein (Bindung wird inhibiert durch LTA) ^[169, 170] P: Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) ^[171, 172] P: F-Protein ^[173] P: PAM (verwandt mit den M-Proteinen) P: M3-Protein ^[174]	P: Fibronectin P: Humanplasminogen und -plasmin P: vielfache Bindungen an Plasma-Fibrinogen, -Albumin und -Fibronectin
Nephritis(+) und Nephritis(–)-Streptokokken der Gruppe A	Glomerulonephritis	P: Nephritis-Plasmin-Bindungsprotein (NPBP) ^[175]	P: Humanplasmin (Bindung wird durch ϵ -Aminocapronsäure blockiert)
<i>Streptococcus bovis</i>	Harnwegsinfektionen, Endokarditis	Z: Lipoteichonsäurederivat ^[176]	
<i>Streptococcus defectivus</i>	für Menschen nicht pathogen	P: Oberflächenprotein (ca. 200 kDa)	Z: Zell-sekretierte extrazelluläre Matrix (ECM) ^[177]
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	Sepsis und Meningitis bei Säuglingen	P: Fibronectin(Fn)-Rezeptoren FnBA und FnBB	P: Fibronectin ^[156, 157]
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Pneumonie		P: Laminin, Kollagen I, II und IV sowie Fibronectin und Vitronectin ^[178]
<i>Streptococcus pyogenes</i>	wichtiger Krankheitserreger, der ein weites Spektrum an systemischen und lokalen Infektionen verursacht, assoziiert mit immunologischen Erkrankungen nach Streptokokkeninfektionen	P: F-Protein (Struktur im Kristall bekannt) P: Streptococcal-Fibronectin-Bindungsprotein (Sfb-Protein, 37-Aminosäuren-Sequenz) ^[179, 180] P: 9-kDa-Glycosaminoglycan-Bindungsprotein (GAG-BP) ^[181] P: M-Protein ^[182, 183]	P: Fibronectin ^[148, 184] P: Basalmembran beim menschlichen Herzmuskel
<i>Veillonella atypica</i> PK1910 (orales Bakterium)	orale Infektionen		Z: Co-Aggregate mit manchen oralen Streptokokken (sowohl Lactose-inhibierbar als auch nicht-Lactose-inhibierbar) ^[185]
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Bauchkrämpfe und Durchfälle	P: Membranprotein YadA	P: aus Knorpel gewonnenes zelluläres Fibronectin und Humanplasma-Fibronectin ^[186]
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	Bauchkrämpfe und Durchfälle	P: Adhäsion YadA	P: β 1-Integrine ^[187]

Tabelle 5. Beispiele für polyvalente Zell-Zell-Wechselwirkungen.

Zelle 1	Molekül an Zelle 1	Zelle 2	Molekül an Zelle 2
Neutrophil	L-Selectin, P-Selectin ^[192–194]	Endothelzelle	sulfatiertes sLe ^X ^[193, 195]
Neutrophil	sulfatiertes sLe ^X ^[196]	Endothelzelle	E-Selectin ^[196]
Neuron	Neural Cell-Adhesion Molecule (NCAM) wie L1, NCAM-H, CD24 und α_6 -Integrin ^[192, 197]	Neuron	NCAM
Neutrophil	E-Selectin ^[193]		
Neutrophil	Cadherine ^[198]	sulfatiertes sLe ^X ^[193]	
T-Zelle	T-Zellen-Rezeptor ^[199]	Antigen-tragende Zellen	Haupt-Histokompatibilitätskomplex (MHC) ^[199]
T-Zelle	CD3 ^[200]	Antigen-tragende Zellen	MHC
T-Zelle	CD28 ^[201]	Antigen-tragende Zellen	MHC
Thrombocyt	Ia/IIa	Endothelzelle	Kollagen ^[202]
Thrombocyt	IIb/IIIa ^[203]	Thrombocyt	IIb/IIIa
Tumorzelle	GalTase ^[204]	Endothelzelle	GlcNAc
Spermium	GalTase ^[204]	Eizelle	GlcNAc
alternder Erythrocyt	desialylierte Glycoproteine ^[205, 206]	Leberzelle	Lectin vom C-Typ

2.4. Bindung von Zellen an polyvalente Moleküle: Bakterien, Antikörper und Makrophagen

Alle Klassen von Antikörpern – eine wichtige Gruppen von Proteinen, die Teil des Immunsystems sind – haben mehrere äquivalente Rezeptorstellen: zwei (IgD, IgE, IgG, IgA), vier (IgA), sechs (IgA) oder zehn (IgM). Ein allgegenwärtiges Charakteristikum der Immunerkennung scheinen polyvalente Bindungen an die Strukturen zu sein, die diese Antikörper erkennen – dies können Antigene sein oder andere Liganden, die auf der Oberfläche von Bakterien, Viren, Parasiten, Arzneimitteln, nicht körpereigenen Zellen oder anderen Strukturen vorhanden sind (einschließlich nichtkovalent gebundener Komplexe, die normalerweise im Blutkreislauf nicht vorliegen). Diese Wechselwirkungen können sowohl Prozesse inhibieren, die bei der Infektion wichtig sind (z. B. die Anlagerung eines fremden Organismus an die Zielzelle) als auch die Clearance unterstützen (Entfernung der fremden Partikel entweder durch Abbau durch Makrophagen oder andere Komponenten des Immunsystems, oder aber durch Filtration durch die Niere).^[207] Polyvalenz ermöglicht in diesen Fällen hochaffine Bindungen an Oberflächen mit sich wiederholenden Epitopen, was eine charakteristische Eigenschaft der Oberfläche von fast allen eindringenden Pathogenen ist (Epitop = Bereich eines Antigens, der mit einem spezifischen Bereich eines Antikörpers wechselwirkt).

Die am hinteren Teil (dem Fc-Abschnitt) des Antikörpers liegenden Mannose-Reste wechselwirken mit Mannose-Rezeptoren (dem Fc-Rezeptor) auf der Oberfläche eines Makrophagen. Die Wechselwirkung eines *einzelnen* Fc-Abschnitts mit seinem Rezeptor scheint zu schwach zu sein, um eine Aktion des Makrophagen zu induzieren, d. h., freie (unkomplexierte) Antikörper in Lösung aktivieren keine Makrophagen, und ein einzelner Antikörper bindet sich auch nicht an ein abgebautes Stück eines fremden Pathogens. *Mehrere* Antikörper hingegen, die an die Oberfläche eines infektiösen Partikels gebunden sind, gehen starke Wechselwirkungen mit *mehreren* Rezeptoren auf der Oberfläche des Makrophagen

ein und ergeben eine dreischichtige Struktur, die an beiden Nahtstellen durch polyvalente Wechselwirkungen stabilisiert ist (Abb. 4).^[208–210]

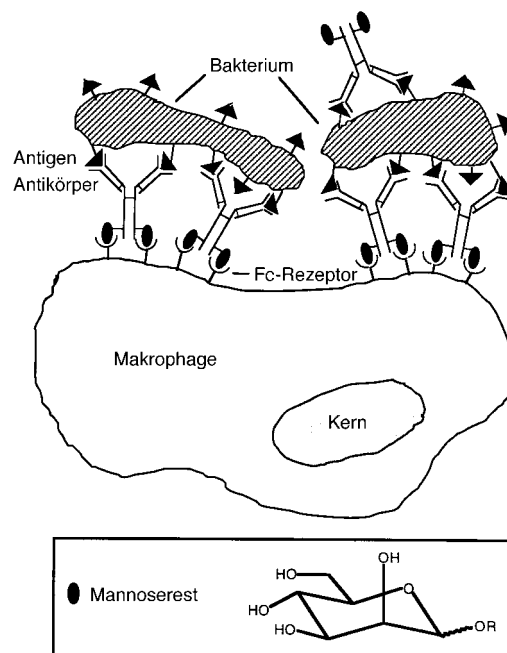


Abb. 4. Polyvalente Bindungen eines Makrophagen in mehreren Schichten an ein Bakterium über Antikörper. Der Antikörper erkennt einen Oberflächenliganden (in der Regel ein Protein) auf der Oberfläche eines Bakteriums und kann bivalent binden. Der Makrophage erkennt (mit Fc-Rezeptoren) die Mannose-Reste am „Schwanz“ der konstanten Domäne des Antikörpers und bindet ebenfalls multivalent an das Pathogen.

Darüber hinaus gestattet Polyvalenz in diesem System nicht nur Stabilität und Spezifität bei der Erkennung eines Bakteriums durch einen Makrophagen, sondern auch die nachfolgenden Wirkungen des Makrophagen hängen stark von polyvalenten Wechselwirkungen ab. Mehrere Wechselwirkungen zwischen dem Makrophagen und dem Antikörperbedeckten Bakterium führen auf dem Makrophagen zu einer Vernetzung der Oberflächenrezeptoren. Dadurch wird ein

internes Signal in dem Makrophagen zur Phagocytose auslöst, das zu seinem Abbau führt.^[211] In Abschnitt 4.4.1 diskutieren wir einen allgemeinen Mechanismus für diese Art der Signaltransduktion. Andere Beispiele, bei denen sich polyvalente Moleküle an die Oberfläche von Zellen anlagern, sind in den Tabellen 6 und 7 aufgeführt.

2.5. Bindung polyvalenter Moleküle an polyvalente Moleküle: Bindung von Transkriptionsfaktoren an mehrere Bindungsstellen der DNA

Ein Beispiel, bei dem Moleküle polyvalent wechselwirken, stammt aus der Biologie der Gen-Regulation durch oligomere Transkriptionsfaktoren (Abb. 5). Der retinoide X-Rezeptor (RXR) fungiert in Gegenwart seiner Liganden als Transkriptionsfaktor.^[258] Jeder RXR-Liganden-Komplex (RXR-L) bindet an einen DNA-Einzelstrang, genannt das „Cellular Retinol-binding Protein II Element“ (CRBP-II-Element). Die intrinsische Affinität einer RXR-L-Einheit zu einem CRBP-II-Element ist niedrig, die eines Dimers (RXR-L)₂ zu zwei angrenzenden Elementen (CRBP-II)₂ ist höher, aber immer noch niedrig. Die eines Tetramers (RXR-L)₄ zu vier benachbarten (CRBP-II)₄-Elementen ist mäßig, die eines Pentamers (RXR-L)₅ zu fünf angrenzenden (CRBP-II)₅-Elementen ist hoch und bedeutend höher als die eines Tetramers. In diesem Beispiel fungiert der Transkriptions-

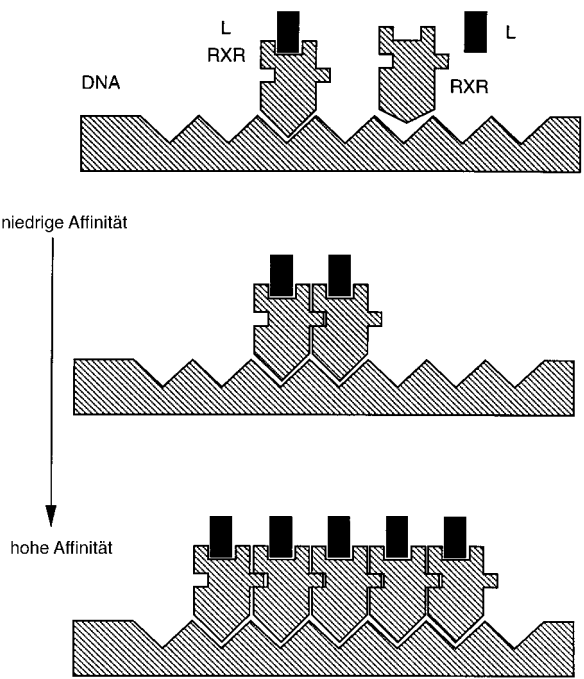


Abb. 5. Bindung von Transkriptionsfaktoren an mehrere Bindungsstellen der DNA. Oben: Der Komplex aus dem monomeren Retinoid-X-Rezeptor (RXR) und dem Liganden (L), RXR-L, bindet mit geringer Affinität an das CRBP-II-Element der DNA. Mitte: Der dimere Komplex (RXR-L)₂ hat eine höhere Affinität als der monomere Komplex. Unten: Der pentamere Komplex (RXR-L)₅ hat bereits eine sehr hohe Affinität zur DNA.

Tabelle 6. Rezeptoren für bakterielle Toxine.^[127, 129, 212, 213]

Bakterium	Toxin	Ligand
<i>Vibrio cholerae</i>	Choleratoxin ^[214]	Z: GM ₁ : Gal(β1,3)GalNAc(β1,4)(NeuAc(α2,3))Gal(β1,4)Glc(β)-ceramid ^[215, 216] Z: Isoliganden: ^[216] NeuAc(α2,3)Gal(β1,3)GalNAc(β)(NeuAc(α2,3)Gal(β1,4)Glc(β)-ceramid Gal(β)GalNAc(β1,4)(NeuAc(α2,8))NeuAc(α2,3)Gal(β1,4)Glc(β)-ceramid GalNAc(β1,4)Gal(β1,3)GalNAc(β1,4)((NeuAc(α2,3)Gal(β1,4)Glc(β)-ceramid Fuc(α1,2)Gal(β1,3)GalNAc(β1,4)((NeuAc(α2,3)Gal(β1,4)Glc(β)-ceramid Gal(β1,3)GalNAc(β1,4)(R-NeuAc(α2,3)Gal(β1,4)Glc(β)-ceramid (R = Lucifergelb CH, Rhodamin oder DNP)
<i>E. coli</i>	hitzelabiles Enterotoxin ^[217]	Z: GM ₁ ^[145]
<i>Clostridium tetani</i>	Tetanustoxin	Z: Gal(β1,3)GalNAc(β1,4)((NeuAc(α2,8))NeuAc(2,3)Gal(β1,4)Glc(β)-ceramid ^[218] Z: Isoliganden: NeuAc(α2,3)Gal(β1,3)GalNAc(β1,4)((NeuAc(α2,8))NeuAc(α2,3)Gal(β1,4)Glc(β)-ceramid NeuAc(α2,8)NeuAc(α2,3)Gal(β1,3)GalNAc(β1,4)(NeuAc(α2,8)NeuAc(α2,3)Gal(β1,4)Glc(β)-ceramid
<i>Clostridium botulinum</i>	Botulinustoxin A und E ^[219]	Z: NeuAc(α2,8)NeuAc(α2,3)Gal(β1,3)GalNAc(β1,4)(NeuAc(α2,8))NeuAc(α2,3)Gal(β1,4)Glc(β)-ceramid
<i>Clostridium botulinum</i>	Botulinustoxin B, C und F ^[219]	Z: NeuAc(α2,3)Gal(β1,3)GalNAc(β1,4)(NeuAc(α2,8))NeuAc(α2,3)Gal(β1,4)Glc(β)-ceramid
<i>Clostridium botulinum</i>	Botulinustoxin B ^[220]	Z: Gal(β)-ceramid
<i>Clostridium perfringens</i>	Deltatoxin ^[213]	Z: GalNAc(β1,4)(NeuAc(α2,3))Gal(β1,4)Glc(β)-ceramid
<i>Clostridium difficile</i>	Toxin A ^[221]	Z: Gal(α1,3)Gal(β1,4)GlcNAc(β1,3)Gal(β1,4)Glc(β)-ceramid
<i>Clostridium difficile</i>	Shiga-Toxin-ähnliche Toxine: (SLT)-I und SLT-II/IIc ^[222]	Z: Gal(α1,4)Gal(β)(P1-Disaccharid) Gal(α1,4)Gal(β1,4)GlcNAc(β)(P1-Trisaccharid) Gal(α1,4)Gal(β1,4)Glc(β)(Pk-Trisaccharid)
<i>Shigella dysenteriae</i> oder <i>E. coli</i>	Shiga-Toxin ^[213, 222]	Z: Gal(α1,4)Gal(β)-ceramid
<i>Shigella dysenteriae</i> oder <i>E. coli</i>	Vero-00 ^[223]	Z: Gal(α1,4)Gal(β1,4)Glc(β)-ceramid
<i>Bordella pertussis</i>	Pertussistoxin ^[224, 225]	Z: NeuAc(α2,6)Gal ^[224, 225]
<i>S. Dysenteriae I</i>	Dysenterietoxin ^[128]	Z: GlcNAc(β1)

Tabelle 7. Beispiele für die Quervernetzung von Oberflächenrezeptoren als Mechanismus der Signalübertragung.^[a]

Vorgang	Rezeptor – Ligand
Degranulation von Mastzellen (Allergie)	Allergene oligomerisieren IgE an der Oberfläche von Mastzellen (P, N:N) ^[226–230]
Zelluläre Differenzierung und Wachstum (Entwicklungsbiologie: Differenzierung, Migration, programmierter Zelltod)	Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF) dimerisiert FGF-Rezeptor. Heparin wird bei der Bildung von polyvalenten Templaten für FGF und anderen Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren eine zunehmende Bedeutung zugesprochen (P, N:N) ^[231–235] Epidermal Growth Factor (EGF) dimerisiert EGF-Rezeptor (NP) ^[236] Cytokin-Stammzell-Faktor (SCF) dimerisiert Kit-Rezeptor auf der Oberfläche der Stammzelle (P, 1:2) ^[237] Transforming Growth Factor (TGF) dimerisiert TGF-Rezeptor (NP) ^[238] Platelet-derived Growth Factor (PDGF) dimerisiert PDGF-Rezeptor (P, 1:2) ^[239] einzelnes humanes Wachstumshormon (hGH) dimerisiert hGH-Rezeptor (P, 1:2) ^[240–242] Hepatocyten-Wachstumsfaktor (HGF) dimerisiert c-Met-Rezeptor. Heparin (vergleiche FGF) könnte ein polyvalentes Templat für HGF sein (P, N:N) ^[243] EPO dimerisiert EPO-Rezeptor auf Erythrocyten-Vorläuferzellen (P, N:N) ^[244] Gefäßendothel-Wachstumsfaktor (VEGF) bindet an VEGF-Rezeptor Flt-1 (NP) ^[245] IL6 hexamerisiert IL6-Rezeptor (P) ^[246] IL4 dimerisiert seinen Rezeptor (P, 1:2) ^[247] humaner Makrophagenkolonie-stimulierender Faktor (M-CSF) dimerisiert M-CSF-Rezeptor (P, 1:2) ^[248] Prolactin kann Prolactin-Rezeptoren (PRLR) dimerisieren (P, 1:2) ^[249] zwei monovalente Granulocytenkolonie-stimulierende Faktoren (G-CSF) stimulieren die Dimerisierung von zwei G-CSF Rezeptoren. (NP) ^[250]
Gewebekondensation (Kompaktion) während früher Embryogenese	Rezeptor für X-Hapten und multivalentes X-Hapten (freie multivalente Formen des X-Haptens dekom-paktieren, monovalente X-Haptene haben keinen Effekt; P, N:N) ^[251]
parasympathische Antwort (autonomes Ner-vensystem)	Heterodimerisierung des Acetylcholin-Rezeptors nach unbekanntem Mechanismus (NP) ^[252]
akrosomale Reaktion bei der Wechselwir-kung des Spermiums mit der Eizelle (Fort-pflanzungsbiologie)	<i>GalTase</i> auf Spermium – GlcNAc an der Außenseite der Eizelle (P, N:N) ^[253]
Peptid-unabhängige klonale Selektion der B-Zellen (Immunologie)	Antikörper auf der Oberfläche einer B-Zelle – Polysaccharide auf der Oberfläche von Mikroorganismen (P, N:N) ^[254]
Interferon-Wirkungen	Interferon-alpha (IFN-alpha) dimerisiert seinen Rezeptor (P, N:N) ^[255]
klonale Selektion der T-Zellen	T-Lymphocyten-Rezeptor CD28 und CTLA-4 binden und werden durch costimulierende Moleküle CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) auf Antigen-tragenden Zellen oligomerisiert (P, N:N) ^[256]
bakterielle Chemotaxis	Aspartat dimerisiert den bakteriellen Rezeptor Tar (NP) ^[257]

[a] P, 1:2 = Heterobivalenter Ligand dimerisiert zwei Oberflächenrezeptoren. P, N:N = N-valenter Ligand oligomerisiert N Oberflächenrezeptoren. P = Wahrscheinlich polyvalent, aber mit unbekanntem Liganden-Rezeptor-Verhältnis. NP = Eventuell ein nichtpolyvalenter Mechanismus.

Tabelle 8. Beispiele für Transkriptionsfaktoren, die polyvalent an DNA binden.^[259–261]

Transkriptionsfaktor	Zahl der Stellen, die DNA erkennen
BZip-Transkriptionsfaktoren	2 (nichtkovalent, Homodimere) ^[262]
Lambda-Repressor	2 (nichtkovalent, Homodimere) ^[263]
p53	4 (nichtkovalent, Homotetramere) ^[264]
RXR zu CRBP-II	4–5 (nichtkovalent, Oligomere) ^[265]
Östrogen-Rezeptor	2 (nichtkovalent, Homodimere; das Dimer wird durch Östradiol induziert und bindet DNA 50mal schneller als das Monomer) ^[266]
Schilddrüsenhormonrezeptor	2 (nichtkovalent, Homodimere oder nichtkovalentes Heterodimer mit 9-cis-Retinsäurerezeptor; das Dimer wird durch die Bindung an das Schilddrüsenhormon induziert) ^[267]
Zn-Finger	1–3 (kovalent, Heterooligomere) ^[268, 269]

faktor als ein polyvalentes Aggregat von Liganden, und die DNA, die multiple Bindungsstellen aufweist, ist ein poly-valenter Rezeptor (Beispiele in Tabelle 8). Polyvalenz dieser Art ruft eine „transkriptive Antwort“ hervor, die hochempfindlich gegenüber der Konzentration des Transkriptionsfak-tors ist: Die Transkriptionsgeschwindigkeit ist proportional zu $\sum C_n [\text{CRBP-II}]^n$ mit C_n als Konstanten.

ⁿ Da die Transkriptionsgeschwindigkeit mit dem Pentamer wahrscheinlich am höchsten ist, ist sie annähernd proportio-nal zu $[\text{CRBP-II}]^5$; diese Konzentrationsabhängigkeit ist weitaus höher, als es bei monovalenten Wechselwirkungen möglich ist (dabei wäre die Transkriptionsgeschwindigkeit der

Konzentration des monovalenten Transkriptionsfaktors, $[\text{CRBP-II}]$, proportional).

3. Nomenklatur und Thermodynamik

3.1. Gibbs-Energie und Bindungskonstanten von polyvalenten Wechselwirkungen N-ter Ordnung

Beginnen wir mit der Nomenklatur. Spricht man in der Chemie über molekulare Erkennung, so bezieht man sich in der Regel auf zwei Komponenten: einen Protein-Rezeptor

und eine Spezies, die von dem Rezeptor erkannt wird (einen Liganden, einen Inhibitor, ein Substrat, ein Epitop oder ein anderes Molekül oder einen Teil eines Moleküls, je nach Zusammenhang). Hier werden wir das Wort *Ligand* für diese zweite Spezies verwenden. In der chemischen Nomenklatur ist der Rezeptor ein Protein, das eine Mulde oder Tasche auf seiner Oberfläche aufweist, der Ligand ist die molekulare Einheit, die in diese Tasche paßt [siehe Gl. (1)]. Der Rezeptor ist sozusagen das Schloß, der Ligand der Schlüssel. In der Literatur über die Biologie der Zelloberfläche wurden diese Begriffe nicht immer einheitlich verwendet, und der Rezeptor wie auch der Ligand sind als der Rezeptor bezeichnet worden, mit der Konvention, daß der Rezeptor die Spezies auf der Oberfläche der Zielzelle war. Wo immer möglich, werden wir die chemische Nomenklatur anwenden: In diesem Aufsatz ist der Rezeptor das Protein mit der Mulde an der Oberfläche, das an der spezifischen Erkennung beteiligt ist.

Für die Klasse der polyvalenten Wechselwirkungen gibt es keine anerkannte Nomenklatur. Da es mehrere Möglichkeiten gibt, wie N Rezeptorstellen mit N Liganden wechselwirken können, und weil die Gibbs-Bindungsenergie einer Wechselwirkung stark von den jeweiligen Begebenheiten abhängt, ist wahrscheinlich keine einfache allgemeine Nomenklatur möglich. Wir werden, so gut wir können, das am wenigsten komplexe Nomenklatorsystem verwenden. Wir wollen eine Wechselwirkung zwischen N Liganden und N Rezeptoren, verteilt auf zwei Einheiten, eine polyvalente Wechselwirkung N -ter Ordnung nennen mit der Gibbs-Bindungsenergie ΔG_N^{poly} . Gleichung (2) veranschaulicht z. B. eine polyvalente Wechselwirkung dritter Ordnung, mit der Gibbs-Bindungsenergie ΔG_3^{tri} (Seite 2909). Die vorgeschlagene Nomenklatur für polyvalente Wechselwirkungen ist in Abbildung 6 zusammengefaßt.

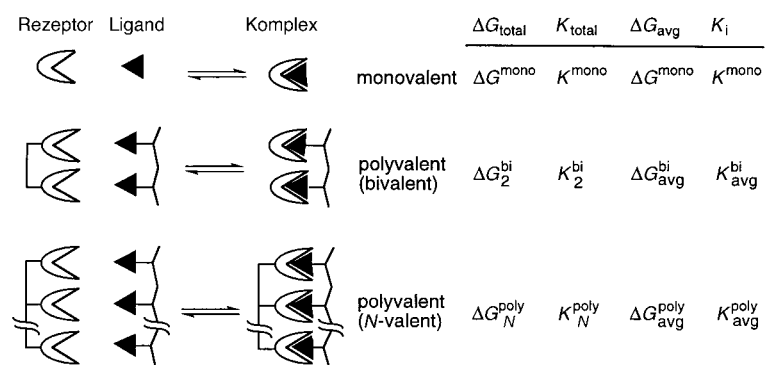


Abb. 6. Vorgeschlagene Nomenklatur für polyvalente Wechselwirkungen. Beziehungen zwischen der Gibbs-Bindungsenergie ΔG und der Inhibierungskonstante K_i für monovalente und polyvalente Systeme.

Die durchschnittliche Gibbs-Wechselwirkungsenergie, $\Delta G_{\text{avg}}^{\text{poly}}$, zwischen einer einzelnen Ligandeneinheit und einer einzelnen Rezeptoreinheit bei der in Abbildung 6 dargestellten polyvalenten Wechselwirkung ist gleich $\Delta G_N^{\text{poly}}/N$ [Gl. (3)].

$$\Delta G_{\text{avg}}^{\text{poly}} = \Delta G_N^{\text{poly}}/N \quad (3)$$

$$\Delta G = -RT \ln(K) \quad (4)$$

$$K_N^{\text{poly}} = (K_{\text{avg}}^{\text{poly}})^N \quad (5)$$

Eine monovalente Rezeptor-Liganden-Wechselwirkung erfolgt mit einer Änderung der Gibbs-Energie ΔG^{mono} , die Wechselwirkung von N monovalenten unabhängigen Rezeptoren mit N monovalenten unabhängigen Liganden mit einer Änderung der Gibbs-Energie $N\Delta G^{\text{mono}}$. Am sinnvollsten sind Vergleiche der Gibbs-Bindungsenergien, wenn dieselbe Zahl von Liganden und Rezeptoren gegeben ist. Ist dagegen die Zahl der Liganden und Rezeptoren unterschiedlich (und liegen Gleichgewichtskonstanten mit verschiedenen Einheiten vor), sollte man bei der Betrachtung vorsichtig sein. Die Gleichungen (3)–(5) liefern die Werte der zugehörigen Gleichgewichtskonstante K . Auch andere Ausdrücke wurden in der Literatur verwendet, um sich (oft ungenau und uneinheitlich) auf die Thermodynamik polyvalenter Wechselwirkungen zu beziehen. Es mag nützlich sein, diese Begriffe kurz zu rekapitulieren und sie in die Nomenklatur einzubeziehen, die wir in diesem Aufsatz einführen.

„Affinität“ ist ein qualitativer Begriff, und „Affinitätskonstante“ der entsprechende quantitative Begriff, der bei korrekter Verwendung die Bedeutung der Assoziationskonstante K hat. „Avidität“ ist ein Begriff, der sich auf die Assoziationskonstante einer polyvalenten Wechselwirkung bezieht. Wir definieren die Avidität hier als die Größe, die durch Gleichung (5) gegeben ist, K_N^{poly} . Beispielsweise bindet ein Fab-Fragment (der Abschnitt am Arm eines Antikörpers, der die Ligandenbindungsstelle enthält) einen Liganden mit einer bestimmten Affinität K . Der intakte Antikörper besteht aus mehreren kovalent verknüpften Fab-Fragmenten (IgG hat z. B. zwei Fab-Fragmente). Die Bindung von bivalentem IgG an eine Oberfläche mit hoher Ligandendichte kann man sich begrifflich als die Bindung einer monovalenten Einheit an diese Oberfläche mit hoher Ligandendichte vorstellen, die aber mit einer anderen Assoziationskonstante beschrieben

wird. Diese Bindungskonstante, in diesem Aufsatz K_2^{bi} , wird auch als die Avidität des bivalenten Antikörpers bezeichnet. In vielen Fällen wird eine höhere Avidität als die Affinität K der monovalent wechselwirkenden Komponenten (Fab-Fragmente) festgestellt. Um wieviel K_2^{bi} größer als K ist, hängt entscheidend von der Struktur und Geometrie des Antikörpers und der genauen Anordnung der Liganden auf der Oberfläche ab. Da Avidität traditionell nur auf polyvalente Wechselwirkungen mit Werten für $N \approx 2-10$ bezogen wurde, aber nicht für $N \approx 10^5$, werden wir diesen Begriff hier nicht verwenden, zumal wir eine ohnehin verwirrende Nomenklatur nicht noch komplizierter machen möchten. Wir werden die mit den Gleichungen (3)–(5) definierten Größen einheitlich anwenden.

Der Begriff „Chelateffekt“ stammt aus der Chemie und wird in der Metallorganik häufig verwendet, um qualitativ auf die Bindungsverstärkung zwischen Donorgruppen (wie einem Amin) und einem Metallion hinzuweisen, wenn die Donorgruppen durch einen Linker kovalent verbrückt sind. In diesem Aufsatz sprechen wir von einem Chelateffekt in solchen Fällen, bei denen K_N^{poly} größer ist als K irgendwelcher Wechselwirkungen der Komponenten in der entsprechenden vollständig monovalenten Bindungssituation. So würde sich K

auf die Bindungskonstante der Wechselwirkung zwischen Methylamin und Eisen beziehen, und K_2^{bi} wäre die Bindungskonstante für die Wechselwirkung zwischen Ethylendiamin und Eisen. Mit dem Chelateffekt ist dann also gemeint, daß K_2^{bi} häufig größer ist als K . Um wieviel K_2^{bi} größer als K ist, hängt sehr von der Struktur und der Geometrie der Linker ab.

3.2. Kooperativität: die Größenordnung von α

Die durchschnittliche Gibbs-Wechselwirkungsenergie zwischen einer Ligandeneinheit und einer Rezeptoreinheit bei einer polyvalenten Wechselwirkung ($\Delta G_{\text{avg}}^{\text{poly}}$) kann größer, gleich oder kleiner als die Gibbs-Energie bei der entsprechenden monovalenten Wechselwirkung (ΔG^{mono}) sein [Gl. (6)–(8)]. Der anerkannten Nomenklatur der Biochemie

$$\Delta G_{\text{avg}}^{\text{poly}} = \alpha \Delta G^{\text{mono}} \quad (6)$$

$$N \Delta G_{\text{avg}}^{\text{poly}} = \Delta G_N^{\text{poly}} = \alpha N \Delta G^{\text{mono}} \quad (7)$$

$$K_N^{\text{poly}} = (K_{\text{avg}}^{\text{poly}})^N = (K^{\text{mono}})^{\alpha N} \quad (8a)$$

$$\alpha = \frac{\lg(K_N^{\text{poly}})}{\lg(K^{\text{mono}})^N} \quad (8b)$$

folgend, nennen wir diese Arten polyvalenter Wechselwirkungen positiv kooperativ (synergistisch), nicht kooperativ (additiv) bzw. negativ kooperativ (interferierend). Wir folgen der Konvention, α als das Maß der Kooperativität zu definieren.^[270] Die Einheiten von α hängen von der Ordnung der polyvalenten Wechselwirkung ab. In der Biologie hat man Kooperativität streng definiert, und sie ist bereits in Übersichten umfassend dargestellt worden.^[271, 272] Das in der Biologie am besten untersuchte positiv kooperative System hat nichts mit Polyvalenz zu tun; so kommt die Bindung der vier O_2 -Moleküle an das tetramere Hämoglobin kooperativ zustande, d.h., die Gibbs-Bindungsenergie für die Bindung des zweiten O_2 -Moleküls an Hämoglobin ist negativer (d. h. günstiger) als die der ersten Bindung; somit gilt: $-\Delta G_{\text{avg}}^{\text{poly}} > -\Delta G_{(1)}^{\text{mono}}$. α ist in solchen nicht-polyvalenten Systemen > 1 und dimensionslos.

Zur Zeit gibt es in der Literatur keine überzeugend charakterisierten Beispiele für positive Kooperativität bei polyvalenten Systemen. Unseres Wissens sind polyvalente Wechselwirkungen nicht ausreichend häufig oder sorgfältig genug quantifiziert worden, um positive Kooperativität in nur einem einzigen System eindeutig schlußfolgern zu können.^[273]

Ein Beispiel für eine positiv kooperative polyvalente Wechselwirkung ($\alpha > 1$) könnte die Assoziation von pentamerem Cholera-Toxin mit GM_1 sein, einem Oligosaccharid-Abschnitt des GM_1 -Gangliosids (Abb. 7). Das Cholera-Toxin besteht aus fünf Einheiten (AB_5). Die Bindung des Toxins an monomeres GM_1 (GM_1 , das von Ceramidyl-Einheiten auf der Zelloberfläche gespalten worden ist) ist ein gut untersuchtes Beispiel für positive Kooperativität, die durch rein enthalpische Bindungsverstärkung zustandekommt. Wie wir gleich diskutieren werden, ist die Entropie des ersten Bindungsschritts eines monomeren GM_1 -Derivats an pentameres Cholera-Toxin gleich der Entropie eines jeden folgenden Bindungsschritts. (Die Entropie der ersten Bindung eines

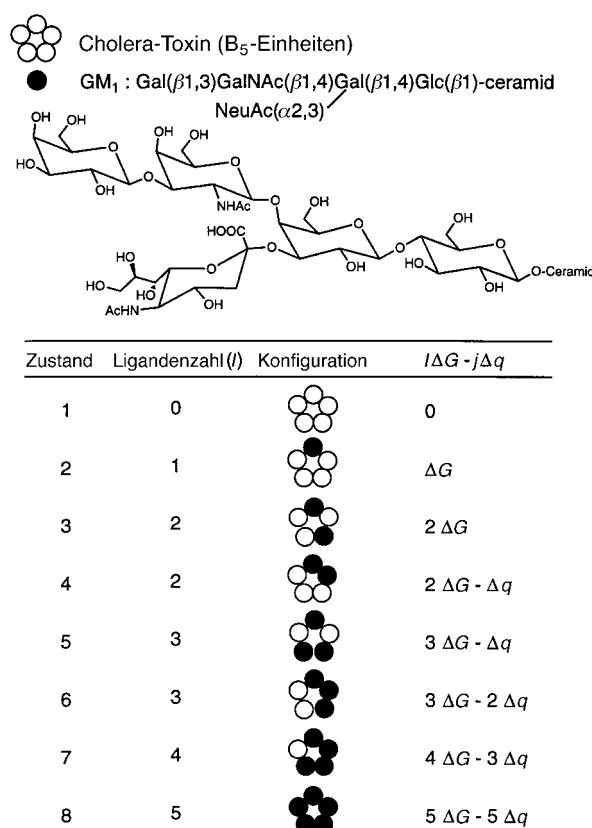


Abb. 7. Die Bindung von fünf GM_1 -Oligosaccharid-Molekülen an pentavalentes Cholera-Toxin erfolgt mit enthalpischer Bindungsverstärkung, d.h., die Bindung eines GM_1 -Oligosaccharids steigert die günstige Bindungsenergie für das nächste GM_1 -Oligosaccharid.^[268] Da die individuellen GM_1 -Oligosaccharid-Moleküle unabhängige Translations- und Rotationsbewegungen ausführen, sind die Bindungen in diesem System entropisch neutral. l = Ligandenzahl, j = Zahl der Kontaktstellen zwischen den GM_1 -Einheiten, q = Wechselwirkungsenergie (Enthalpie) von zwei in Kontakt stehenden GM_1 -Einheiten.

monomeren GM_1 -Derivats an pentameres Cholera-Toxin ist gleich der Entropie jeder folgenden Bindung.) Alle Unterschiede in der Gibbs-Energie (Abb. 7) der Bindung des monomeren GM_1 an das Toxin sind deshalb auf Unterschiede in der Enthalpie zurückzuführen. Schoen et al. führten kalorimetrische Studien zur Bindung von pentamerem B_5 an fünf unabhängige GM_1 -Oligosaccharid-Einheiten in Lösung durch.^[274] Sie stellten fest, daß die Bindungskonstante für den ersten Liganden um den Faktor 4 *kleiner* war als die für den zweiten. Auf statistischer Basis würde man erwarten, daß die erste Bindungskonstante im Vergleich zur zweiten um den Faktor 2.5 größer ist.^[275] Wir schließen daraus, daß die Bindung enthalpisch verstärkt war.

Schoen et al. berichten auch, daß die Assoziatbildung zwischen pentavalentem B_5 und der Oberfläche einer dicht mit GM_1 -Einheiten bedeckten Zelle im Grunde irreversibel und mit größerer Gibbs-Bindungsenergie ΔG verläuft, als es bei der Bindung von pentamerem Cholera-Toxin an fünf monomere GM_1 -Einheiten der Fall ist. Da die Enthalpie der Wechselwirkung für einzelne (monovalente) GM_1 -Einheiten und für GM_1 -Einheiten, die an einer Oberfläche immobilisiert wurden, ungefähr gleich ist, kann dieser Unterschied in der Gibbs-Bindungsenergie den Entropieunterschieden zwischen

diesen zwei Bindungstypen zugeschrieben werden: Die Affinität eines polyvalenten Rezeptors kann durch eine Anlagerung, die über mehrere Bindungsstellen vermittelt wird, erheblich verstärkt werden. Da die Affinität des Pentamers für die polyvalente Oberfläche nicht quantifiziert wurde, ist das Ausmaß der Kooperativität, sofern überhaupt vorhanden, unbekannt.

Im folgenden werden zwei Beispiele für Wechselwirkungen gegeben, die wahrscheinlich negativ kooperativ (interferierend, $\alpha < 1$) sind, d. h., im Unterschied zum Fall mit positiver Kooperativität (Hämoglobin und O_2) kommt die Bindung zwischen dem zweiten Liganden und dem zweiten Rezeptor mit einer weniger günstigen Gibbs-Energie zustande, als es bei der Bindung des ersten Liganden mit dem ersten Rezeptor der Fall ist. Das erste Beispiel ist die Bindung eines bivalenten Antikörpers an Liganden, die man dicht gepackt an einer Oberfläche oder immobilisiert in einer polymeren Matrix vorfindet (Abb. 8).^[276] Bei der Oberfläche kann es sich um die

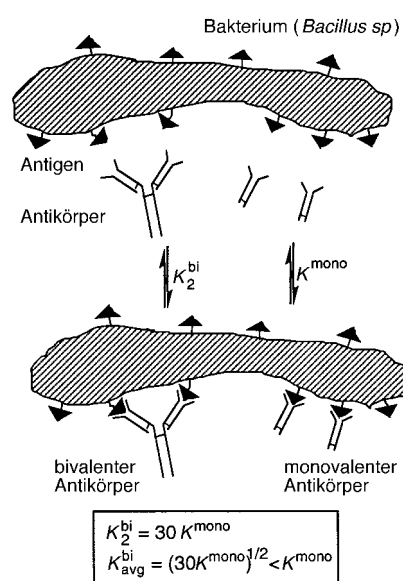


Abb. 8. Die Bindung eines bivalenten Antikörpers an Liganden, die auf der Oberfläche eines Bakteriums dicht beieinander liegen, ist negativ kooperativ.^[270]

einer Säugetierzelle oder eines Virus handeln, oder auch um einen Träger an fester Phase bei einem ELISA (enzyme-linked immunosorbant assay). Im allgemeinen variieren monovalente Bindungskonstanten von Antikörpern für kleine organische Moleküle erheblich, sie liegen aber im Bereich von $10^5 - 10^8 \text{ M}^{-1}$. Karush et al. fanden heraus, daß ein bivalenter Antikörper für ein Oberflächen-Antigen auf *Bacillus* sp. mit 30fach höherer Affinität band als der entsprechende monovalente Antikörper (ein monovalenter Antikörper ist ein Antikörper, dessen zwei oder mehrere Bindungsstellen, die in dem natürlichen Protein vorhanden sind, chemisch oder enzymatisch getrennt worden sind), d. h.: $K_2^{\text{bi}} = 30 K^{\text{mono}} < (K^{\text{mono}})^2 \text{ M}^{-1}$.^[277] Diese Bindung ist deshalb als negativ kooperativ einzustufen.

In einem zweiten Beispiel (Abb. 9) untersuchten Lee et al.^[206] die Bindung von bi- und trivalenten Galactosehaltigen Liganden, die Lectine vom C-Typ an der Oberfläche

Oligosaccharid	K für den Lectin/Gal-Oligosaccharid-Komplex (M^{-1})
Gal(β 1)OMe	$K^{\text{mono}} = 7 \times 10^4$
Gal(β 1,4)GlcNAc(β 1,2)Man Gal(β 1,4)GlcNAc(β 1,4)Man	$K_2^{\text{bi}} = 3 \times 10^7$
Gal(β 1,4)GlcNAc(β 1,2)Man(α 1,6)Man Gal(β 1,4)GlcNAc(β 1,2)Man(α 1,3)Man Gal(β 1,4)GlcNAc(β 1,4)Man	$K_3^{\text{tri}} = 2 \times 10^8$

Abb. 9. Bindungen von mono-, bi- und trivalenten, durch Gal-Gruppen terminierten Oligosacchariden an Mamma- und Leberzell-Lectine vom C-Typ.^[201]

von Leberzellen binden; die Dichte dieser Rezeptoren ist unbekannt. Dabei war $K^{\text{mono}} = 7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, $K_2^{\text{bi}} = 3 \times 10^7 \text{ M}^{-1} = 420 K^{\text{mono}}$ und $K_3^{\text{tri}} = 2 \times 10^8 = 2800 K^{\text{mono}}$. Da $K_2^{\text{bi}} < (K^{\text{mono}})^2$ und $K_3^{\text{tri}} < (K^{\text{mono}})^3$ gilt, binden diese bi- und trivalenten Liganden ebenfalls mit negativer Kooperativität.

Diese Beispiele verdeutlichen eine wichtige Eigenschaft polyvalenter Wechselwirkungen: Obwohl die bivalente Bindung in diesen Fällen negativ kooperativ ist ($\alpha < 1$), war die gemessene Affinität für bivalente Moleküle viel höher als für monovalente Moleküle. Eine feste Bindung erfordert also keine positive Kooperativität im traditionellen Wortsinn. In der klassischen Studie über Hämoglobin, das vier Moleküle O_2 bindet, korreliert beispielsweise die Gibbs-Energie für die Sauerstoffbindung mit der Zahl der gebundenen O_2 -Moleküle positiv (siehe oben in diesem Abschnitt). Bei polyvalenten Bindungen muß die Gibbs-Bindungsenergie eines jeden Liganden in einem polyvalenten Komplex nicht unbedingt mit der Zahl der Ligandenmoleküle positiv korrelieren.

Insofern ist Kooperativität, wie sie im traditionell biochemischen Sinne definiert ist, weder ein nützlicher noch überhaupt ein beschreibender Parameter für polyvalente oder monovalente Systeme. Deshalb führen wir hier eine neue empirische Größe ein, die die Bindungsverstärkung von polyvalenten Systemen beschreibt: Als Erweiterung des Kooperativitätsparameters α nennen wir diese neue Größe β . Obwohl polyvalente Wechselwirkungen qualitativ viel stärker sein können als irgendeine der monovalenten Wechselwirkungen, die zu ihr beitragen, könnten diese monovalenten Wechselwirkungen immer noch miteinander interferieren^[1] oder sich zueinander indifferent verhalten (das „Kleben“ von polyvalenten Liganden an Affinitätsgele bei der Affinitätschromatographie ist wahrscheinlich ein solcher Fall). Nur durch quantitativen Vergleich von polyvalenten und monovalenten Wechselwirkungen ist es möglich, die Art der Kooperativität zu ermitteln.

3.3. Erhöhte Affinität bei polyvalenten Wechselwirkungen: die Größenordnung von β

In vielen polyvalenten Systemen ist die Zahl N der Liganden-Rezeptor-Wechselwirkungen unbekannt. Beispielsweise synthetisierten wir polymere polyvalente Inhibitoren

für das Agglutinieren von roten Blutkörperchen (Erythrocyten) durch Influenzaviren.^[2] Diese Inhibitoren bestanden aus einem Polyacrylamid-Gerüst, wobei ein gewisser Anteil der Seitenketten durch Sialinsäure-Gruppen (SA-Gruppen) terminiert war. Die SA-Einheiten dieses Polymers wechselwirken in spezifischer Weise mit mehreren Hämagglutinin-Rezeptorstellen auf der Oberfläche des Influenzavirus (siehe Abschnitt 2.1) und verhindern folglich die Wechselwirkung von Influenza mit der Zielzelle. Durch Verwendung eines Polymers, dessen Seitenketten sowohl SA-Gruppen als auch eine geringe Zahl von Biotingruppen (als Liganden für die Anlagerung von Enzym-konjugiertem Streptavidin in einem der nachfolgenden Schritte der Untersuchung) tragen, untersuchten wir quantitativ die Bindung dieses polymeren polyvalenten Inhibitors an die Oberfläche des Virus, indem wir einen ELISA-artigen Test durchführten (Abb. 10).^[278]

Das Oberflächen-gebundene Virus wurde mit verschiedenen Konzentrationen des SA enthaltenden Polymers inkubiert und die Menge des gebundenen Polymers indirekt durch eine Enzym-gekoppelte Wechselwirkung zwischen Streptavidin und Biotin gemessen. Die meßbaren Größen zur Erstellung einer Bindungsisothermen waren die SA-Menge des Polymers, die an die Virusoberfläche gebunden war, die SA-Konzentration [SA] und die zugehörige Konzentration des Polymers [P]. Diese Konzentration wurde durch Division von [SA] durch die durchschnittliche Zahl Q der Sialinsäuregruppen pro Polymerkette erhalten, die bei unseren Experimenten eine bekannte Größe war und aus dem bekannten Polymerisationsgrad und dem experimentell festgelegten Molverhältnis der SA-enthaltenden Seitenketten berechnet wurde. Weder die an das Virus gebundene Zahl der Polymere noch die Zahl N der SA-Gruppen der Polymere, die an die Hämagglutinin(HA)-Rezeptorstellen gebunden waren, wurde gemessen. Wir analysierten die Wechselwirkung zwischen Polymer und Virus durch Bestimmung der gebundenen Polymermenge in Abhängigkeit von [SA]. Bei der halbmaximalen Bindung gilt $1/K^{\text{ELISA}} \equiv [SA] \equiv Q[P]$, wobei K^{ELISA} der Assoziationskonstante entspricht [Gl. (9), Abb. 10]. Da der Wert von N bei dieser polyvalenten Wechselwirkung unbekannt ist, ist auch keine Aussage zur Kooperativität möglich, d. h. zu α . Der Wert von K^{mono} ist in diesem Beispiel $5 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$; der K^{ELISA} -Wert unseres besten Inhibitors beträgt 10^8 M^{-1} bezogen auf SA-Einheiten; dies entspricht 10^{10} M^{-1} bezogen auf die Polymere.^[278] Monomere SA bindet also halbmaximal bei $[SA] = 2 \times 10^{-3} \text{ M}$, wohingegen das SA-tragende Polymer an die Oberfläche des Virus bei $[SA] = 10^{-8} \text{ M}$ halbmaximal bindet. Der polyvalente Inhibitor könnte deshalb nützlich sein, ungeachtet seines α -Wertes.

Wir schlagen einen Verstärkungsfaktor β vor, den wir als das Verhältnis der beiden Bindungskonstanten K^{ELISA} (bezogen auf das Polymer P und für das obige Beispiel gleich 10^{10}) und K^{mono} [Gl. (9)] definieren und den wir bei der Diskussion der Affinitätssteigerung durch polyvalente Sy-

$$K^{\text{ELISA}} = \beta K^{\text{mono}} \quad (9)$$

$$\Delta G_N^{\text{poly}} = \Delta G^{\text{mono}} - RT \ln(\beta) \quad (10)$$

$$\beta = K_N^{\text{poly}} / K^{\text{mono}} \quad (11)$$

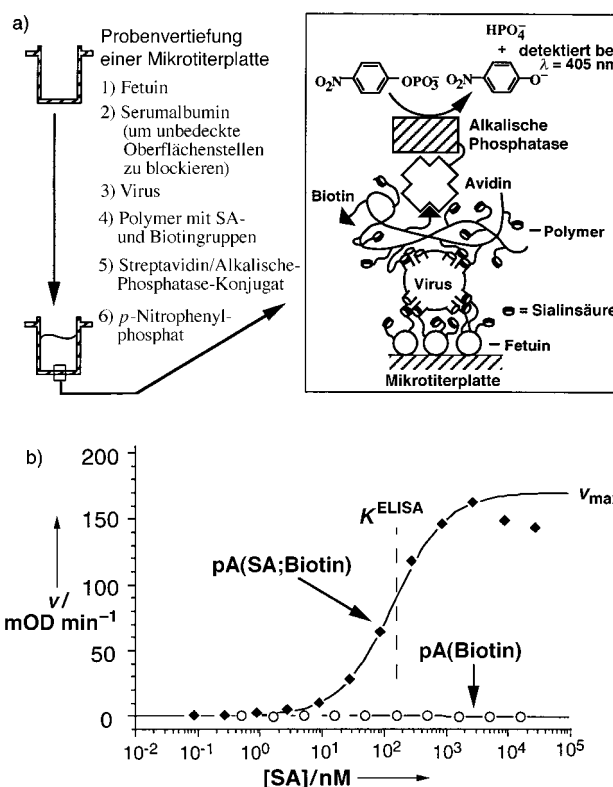


Abb. 10. ELISA-artiger Assay zur Messung der Bindung zwischen Biotin-markiertem, Sialinsäuregruppe-tragendem Polyacrylamid (pA(SA; Biotin)) und dem Influenzavirus. a) Schematische Darstellung, die die wichtigen Bindungsvorgänge im Verlauf des Assays zeigt. Das Influenzavirus wurde aus einer Suspension, die $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ des Virusproteins enthält, auf einer Fertilin-beschichteten Oberfläche immobilisiert. Das Polymer (pA(SA; Biotin)) wurde vom immobilisierten Virus über SA-HA-Wechselwirkungen adsorbiert. Das adsorbierte Polymer wurde durch Verwendung des Streptavidin/Alkalische-Phosphatase-Konjugats quantifiziert, das sich fest an die Biotin-Gruppen des Polymers bindet. Die Mengenbestimmung basierte auf der Messung der Geschwindigkeit der enzymatischen Hydrolyse von *p*-Nitrophenylphosphat (ermittelt über die Änderung der Absorbanz bei 405 nm). b) Auftragung, die die Bindung von pA(SA; Biotin) an das immobilisierte Influenzavirus zeigt. Die Geschwindigkeit der enzymatischen Hydrolyse wurde als eine Funktion der Konzentration der Polymer-gekoppelten Sialinsäure in Lösung gemessen. pA(SA; Biotin). pA(Biotin) bezeichnet ein Polyacrylamid, das mit Biotin-Seitenketten substituiert ist: Dieses Polymer wurde als Kontrollsubstanz getestet, um die Notwendigkeit von SA-Gruppen für die Bindung zu überprüfen. Die Kurve wurde durch nichtlineare Regression unter Annahme einer Langmuir-Isotherme ermittelt. Die Konstanten K^{ELISA} und v_{max} sind gezeigt; es gilt: $K^{\text{ELISA}} = [SA]$ bei $0.5 v_{\text{max}}$. Zwecks Übereinstimmung mit dem Text haben wir K^{ELISA} von [SA] in die äquivalente Konzentration des Polymers konvertiert, durch Division durch die mittlere Zahl der SA-Einheiten auf der Polymerkette (200). Damit ist das konvertierte K^{ELISA} gleich K_N^{poly} .

steme dem Faktor α vorziehen: Moleküle, die hohe β -Werte aufweisen, sind nützlich, ungeachtet dessen, ob die Wechselwirkungen, aus denen sie hervorgehen, kooperativ sind oder nicht. In jedem System, in dem N unbekannt, aber die Gesamtmenge an gebundenem polyvalenten Molekül bekannt ist, dürfte β ein nützlicher Parameter sein. Nur wenn der Wert für N bekannt ist, kann die bekannte Beziehung zwischen ΔG_N^{poly} , K_N^{poly} , α und β genau berechnet werden [Gl. (10), (11)]. Mit anderen Worten: β ist das Verhältnis von Avidität und Affinität der Komponente bei der entsprechenden monovalenten Wechselwirkung.

3.4. Enthalpie einer polyvalenten Wechselwirkung

ΔG_N^{poly} setzt sich aus enthalpischen (ΔH_N^{poly}) und entropischen Beiträgen (ΔS_N^{poly}) zusammen [Gl. (12)]. In erster Näherung entspricht der Wert von ΔH_N^{poly} der Summe der Enthalpien von N monovalenten Wechselwirkungen, $N\Delta H^{\text{mono}}$. Dieser Wert kann durch andere Wechselwirkungen im Bereich des aktiven Zentrums vergrößert oder verkleinert werden.

$$\Delta G_N^{\text{poly}} = \Delta H_N^{\text{poly}} - T\Delta S_N^{\text{poly}} \quad (12)$$

Enthalpische Bindungsverstärkung: Unter manchen Umständen kann die Bindung eines Liganden an einen Rezeptor mit einer bestimmten Enthalpie dazu führen, daß der nächste Ligand an seinen Rezeptor mit größerer Enthalpie bindet, d. h., der Wert von $\Delta H_{\text{avg}}^{\text{poly}}$ ist in diesem Fall negativer (günstiger) als der Wert von ΔH^{mono} . Solche Bindungen sind „enthalpisch verstärkt“. Ein gut untersuchtes Beispiel (wenngleich es sich nicht um ein polyvalentes System handelt) ist die Bindung von vier O_2 -Molekülen an Hämoglobin (siehe Abschnitt 3.2). Ein weniger gut untersuchtes Beispiel für enthalpische Bindungsverstärkung (bei einem polyvalenten System) ist die Bindung von pentamerem Cholera-Toxin an fünf GM_1 -Einheiten auf der Oberfläche einer Zelle (siehe Abschnitt 3.2).

Enthalpische Bindungsschwächung: Wenn die Bindung eines Liganden an seinen Rezeptor mit der nächsten Assoziatbildung interferiert, ist die Enthalpie der polyvalenten Wechselwirkung ungünstiger als die, die man für N äquivalente, monovalente Wechselwirkungen erwarten würde. Solche Bindungen sind „enthalpisch geschwächt“. Enthalpische Bindungsschwächung kann auftreten, wenn die Bildung der Liganden-Rezeptor-Wechselwirkung zwischen zwei polyvalenten Einheiten energetisch ungünstige Konformationen erfordert. Als Faustregel gilt: Je starrer die Konformation der polyvalenten Einheit ist, desto wahrscheinlicher ist es, daß auch geringe räumliche Abweichungen zwischen dem Liganden und seinem Rezeptor zu enthalpischer Bindungsschwächung führen (ausgenommen, der Ligand und der Rezeptor passen im Picometermaßstab geometrisch genau zusammen, was äußerst selten ist).

Die Bindungsenthalpie bei polyvalenten Wechselwirkungen ist qualitativ einfach zu beschreiben, aber quantitativ schwierig abzuschätzen, sowohl experimentell als auch theoretisch. Man stelle sich einen bivalenten Rezeptor vor (1; Abb. 11 a): Wenn die beiden Rezeptorstellen unabhängig voneinander sind und nicht interferieren, erfolgt die Assoziatbildung mit zwei monovalenten Liganden 2 mit der doppelten Bindungsenthalpie ($2\Delta H^{\text{mono}}$). Bei dimeren Liganden 3, deren zwei Liganden über eine starre Gruppe R miteinander verbrückt und mit genau derselben Geometrie wie 2 fixiert sind, entspricht die Bindungsenthalpie dem Doppelten des äquivalenten monovalenten Analogons: $\Delta H_2^{\text{bi}} = 2\Delta H^{\text{mono}}$. Wenn die Geometrie von 3 nicht zu der von 1 paßt, können die Liganden immer noch binden, aber das resultierende Aggregat wird dabei verzerrt – durch Verschiebung der Rezeptoren aus ihrer Gleichgewichtslage, um für die Geometrie L-R-L zu passen, oder durch Verzerrung von L-R-L aus seiner Gleichgewichtslage, um für die Rezeptoren zu passen, oder beides. Da der

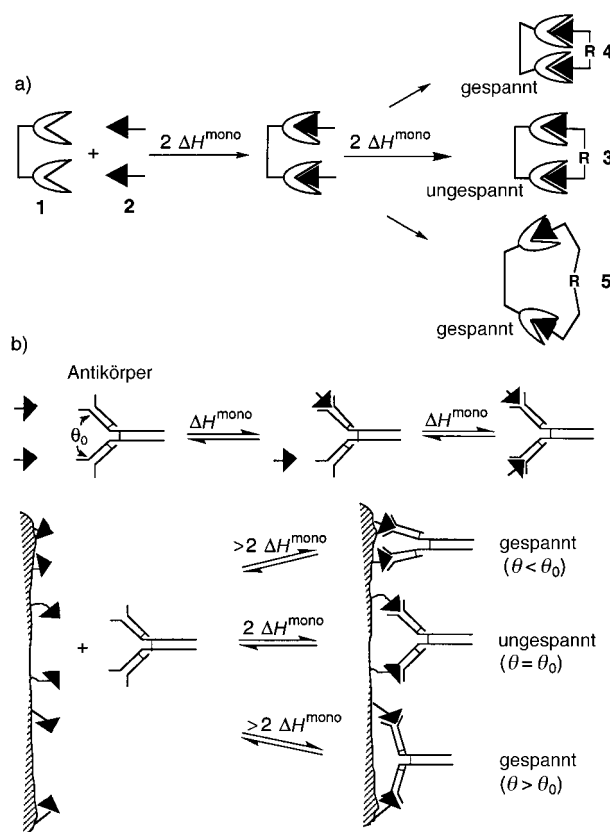


Abb. 11. Bindungsenthalpien für polyvalente Wechselwirkungen. a) Mögliche Arten der Bindung von monovalenten und bivalenten Liganden an einen bivalenten Rezeptor. b) Die Bindung eines bivalenten Antikörpers an einen mit unterschiedlicher Dichte auf einer Oberfläche vorliegenden Liganden kann durch Spannung enthalpisch geschwächt sein. Diese Spannung rührt von der Verzerrung des Antikörpers aus seiner stabilsten Konformation (θ_0) her.

durchschnittliche Abstand zwischen den Rezeptoren in Proteinen größer ist als die meisten organischen Moleküle (z. B. sind die beiden Bindungsstellen in einem Antikörper ungefähr 100 Å voneinander entfernt), ist die Gruppe R meistens wie bei 4 zu kurz, um ein gutes Zusammenspiel der beiden Liganden-Rezeptor-Paare zu ermöglichen. Durch Kraftfeldrechnungen könnte es möglich sein, die durch das Komprimieren einer zu langen Gruppe R (5) hervorgerufene enthalpische Spannung abzuschätzen. Allerdings bleibt es schwierig, die Enthalpie für die Verzerrung des Rezeptorproteins abzuschätzen, oder die von nichtkovalenten Wechselwirkungen zwischen der Gruppe R und dem Protein, oder die Enthalpie von Wechselwirkungen zwischen den Einheiten des Proteindimers. Abbildung 11 veranschaulicht diese Enthalpiebetrachtungen am Beispiel der Bindung bivalenter Antikörper an zufällig immobilisierten Liganden auf einer Oberfläche.

3.5. Wechselwirkungsentropie

Wir gehen davon aus, daß das Verständnis der Entropie von polyvalenten Wechselwirkungen unbedingt erforderlich ist, um die Beziehung zwischen monovalenten und polyvalenten Bindungen verstehen zu können. Ungenügendes Verständnis der Entropie hat beim Design von polyvalenten Inhibitoren

zu vielen synthetischen polyvalenten Molekülen geführt, die weniger wirksam oder nur geringfügig wirksamer als deren monovalente Gegenstücke sind. Die vielen bivalenten Systeme, die durch flexible Linker (z.B. Oligoethylenglykol- oder Polymethyleneinheiten) verbrückt sind, liefern Beispiele, die aus entropischen Gründen fast immer zum Scheitern verurteilt sind.^[279, 280]

Wir können die Gesamtentropie einer polyvalenten Wechselwirkung ΔS_N^{poly} in Beiträge zerlegen, die von Änderungen der Translations- ($\Delta S_{\text{trans},N}^{\text{poly}}$), Rotations- ($\Delta S_{\text{rot},N}^{\text{poly}}$) und Konformationsentropie ($\Delta S_{\text{konf},N}^{\text{poly}}$) der Rezeptoren und Liganden bei der Assoziation stammen, und einen Beitrag ($\Delta S_{\text{H}_2\text{O},N}^{\text{poly}}$), der die Entropieänderung des umgebenden Wassers berücksichtigt. Dieser ist häufig größtenteils auf die Entropie der hydrophoben Wechselwirkungen zurückzuführen [Gl. (13)].

$$\Delta S_N^{\text{poly}} = \Delta S_{\text{trans},N}^{\text{poly}} + \Delta S_{\text{rot},N}^{\text{poly}} + \Delta S_{\text{konf},N}^{\text{poly}} + \Delta S_{\text{H}_2\text{O},N}^{\text{poly}} \quad (13)$$

3.5.1. Translations- und Rotationsentropie

Die Translationsentropie von einem Molekül rührt von den unabhängigen Translationsfreiheitsgraden her; der Wert von ΔS_{trans} verhält sich proportional zum Logarithmus seiner Masse M ($\Delta S_{\text{trans}} \sim \ln(M)$) und umgekehrt proportional zum Logarithmus seiner Konzentration ($\Delta S_{\text{trans}} \sim \ln([L])^{-1}$). Die Rotationsentropie, ΔS_{rot} , rührt von der Freiheit des Moleküls her, um seine drei Hauptachsen zu rotieren, und verhält sich logarithmisch zum Produkt der drei Hauptträgheitsmomente I_x , I_y und I_z ($\Delta S_{\text{rot}} \sim \ln(I_x I_y I_z)$). Die Werte von ΔS_{trans} und ΔS_{rot} eines Teilchens hängen also nur schwach (eben logarithmisch) von seiner Masse und seinen Abmessungen ab. In erster Näherung sind die Translations- und Rotationsentropien *aller* Teilchen – Rezeptoren, Liganden, Rezeptor-Liganden-Aggregate – gleich. Wenn sich zwei Teilchen vereinigen, gehen insgesamt drei Freiheitsgrade der Translation und drei Freiheitsgrade der Rotation verloren. Wenn die Massenunterschiede der Teilchen ignoriert werden (oft sind die Massenverhältnisse $<10:1$ und fast immer $<100:1$), dann sind die Verluste von Translations- und Rotationsentropie bei der Verbindung zweier Teilchen ungefähr gleich groß, unabhängig davon, ob sie monovalent oder polyvalent wechselwirken – vorausgesetzt, sie liegen in ungefähr derselben Konzentration vor. In der Biologie können die Konzentrationen von Molekülen über mehr als zwölf Größenordnungen variieren (mm bis fm). Wenngleich die Translationsentropie nur logarithmisch von der Konzentration abhängt, macht dieser große Bereich die Kenntnis der Konzentration der wechselwirkenden Teilchen zur Abschätzung der Bedeutung der Translationsentropie unbedingt notwendig; dies gilt umso mehr, je niedriger die Konzentration ist.

3.5.2. Konformationsentropie

Fall I: $\Delta S_{\text{konf}} = 0$

Wir diskutieren die Rolle der Entropie bei polyvalenten Wechselwirkungen, indem wir eine einfache bivalente Wechselwirkung als Modell verwenden. Der gesamte Entropieaufwand bei der Assoziation zweier monovalenter Rezeptoren

mit zwei monovalenten Liganden ist $2 \Delta S_{\text{trans}} + 2 \Delta S_{\text{rot}}$ (Abb. 12a). Wenn die beiden Liganden und Rezeptoren durch einen starren Linker verbrückt sind (d.h. eine Brücke, bei der keine Torsion um Bindungen möglich ist), der genau

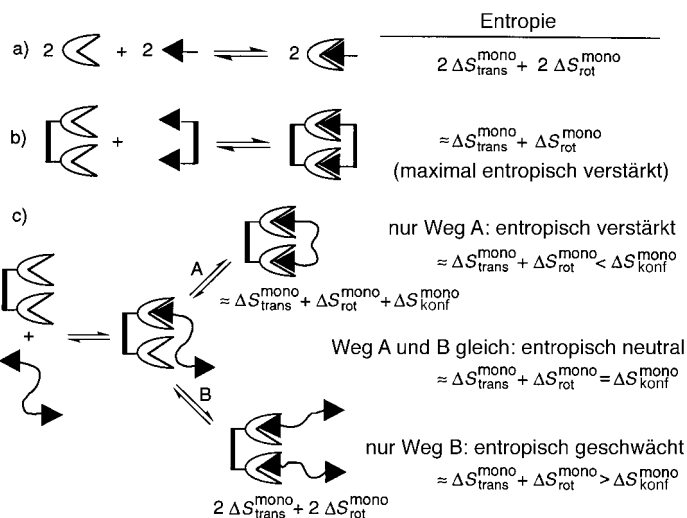


Abb. 12. Beziehungen zwischen Translations-, Rotations- und Konformationsentropie für ein bivalentes System mit starrem und flexiblem Linker.

den richtigen Abstand hat, damit die beiden Rezeptoren und Ligandenstellen gut zusammenpassen, dann ist der gesamte Entropieaufwand zum Zusammenfügen dieser beiden bivalenten Spezies ungefähr $\Delta S_{\text{trans}} + \Delta S_{\text{rot}}$ (das entspricht der Hälfte des Entropieaufwandes, der für die Assoziation von zwei unabhängigen Molekülpaares benötigt wird, oder genau dem Entropieaufwand für eine monovalente Wechselwirkung; Abb. 12b). Hat zwischen diesen beiden starren bivalenten Spezies einmal eine einzelne Liganden-Rezeptor-Wechselwirkung stattgefunden, so kann die nachfolgende (intramolekulare) Wechselwirkung zwischen der zweiten Ligandeneinheit der starren bivalenten Spezies und der zweiten Rezeptorstelle ohne weiteren Aufwand an Translations- und Rotationsentropie ablaufen, und auch ohne Aufwand an Konformationsentropie. Wenn es keine weiteren Enthalpieaufwände gibt, erfolgt die (intramolekulare) Bindung des zweiten Liganden an den zweiten Rezeptor mit einer größeren Veränderung der Gibbs-Energie als bei der ersten Bindung ($\Delta H \approx \Delta H^{\text{mono}}$, $\Delta S \approx 0 \Rightarrow \Delta G \approx \Delta H^{\text{mono}}$). Eine solche Bindung ist entropisch verstärkt.

Bisher haben wir die Hydratisierungsentropie ignoriert, aber wir werden sie noch in Abschnitt 3.5.3 diskutieren. Vorwegnehmend lässt sich sagen, daß die entropischen Veränderungen der Hydratisierung/Dehydratisierung, die die meisten biologischen Wechselwirkungen begleiten, den Gehalt der oben aufgeführten Argumente nicht ändern. Zu ihrer Berücksichtigung addiert man einfach eine Konstante zu jedem diskutierten Entropiewert.

Fall II: $\Delta S_{\text{konf}} \neq 0$

Im allgemeinen ist Fall I unrealistisch: Alle Linker sind etwas flexibel, und ΔS_{konf} ist bei der Komplexbildung fast immer kleiner als Null (also ungünstig), d.h., die Zahl der für

den bivalenten Liganden möglichen Konformationen ist vor der Komplexbildung größer als danach. Wenn dieser Aufwand an Konformationsentropie kleiner ist als die translatorischen und rotatorischen Entropieaufwände zusammen, dann ist der gesamte Entropieaufwand für die bivalente Assoziation immer noch geringer als der für den monovalenten Fall, und die Assoziation ist immer noch entropisch verstärkt (Abb. 12c, Weg A). Für den Fall, daß der Konformationsentropieaufwand die translatorischen und rotatorischen Entropieaufwände ausgleicht (Abb. 12c, Wege A und B), gilt, daß die Bindung entropisch neutral und der gesamte Energieaufwand zur Komplexbildung des zweiten Liganden derselbe wie der Entropieaufwand für die Komplexbildung einer zweiten dimeren Spezies ist. Grundsätzlich kann der Konformationsentropieaufwand für die Komplexbildung des zweiten Liganden den Aufwand der Translations- und Rotationsentropie übersteigen. In diesem Fall wird aber der zweite Ligand der dimeren Spezies niemals die konkurrierende Bindung einer zweiten dimeren Spezies an den noch freien Rezeptor übertreffen können (Abb. 12c, Weg B), und die Bindung ist entropisch geschwächt.

Interessanterweise können Entropie und Enthalpie teilweise auf die Affinität polyvalenter Wechselwirkungen kompensierend wirken: Wo konformative Flexibilität den Aufwand an Konformationsentropie für eine Assoziatbildung erhöht, steigert dieselbe Flexibilität die Wahrscheinlichkeit, daß alle Rezeptor-Liganden-Wechselwirkungen ohne Spannungsenergie zustandekommen. Dieser Verlust an Konformationsentropie bei der Assoziation eines polyvalenten Liganden mit einem polyvalenten Rezeptor ist leider immer schon schwierig zu quantifizieren gewesen. Die Entropieänderung beim Einfrieren der Rotation um eine einzige C-C-Bindung beträgt ungefähr $0.5 \text{ kcal mol}^{-1}$; die Werte für andere Einfachbindungen bewegen sich zwischen 0.1 und $1.0 \text{ kcal mol}^{-1}$.^[281, 282] Der maximale Verlust an Konformationsentropie würde eintreten, wenn alle Torsionsfreiheitsgrade bei der ursprünglich freien Rotation um alle Bindungen bei der Komplexbildung verloren gingen. Die genannte Schätzung für diesen Verlust an ΔS_{konf} beträgt dann ungefähr $0.5 N \text{ kcal mol}^{-1}$, wobei N die Zahl der Einfachbindungen in der Kette ist, die die beiden Liganden oder Rezeptoren verbindet. Bei einer langen, flexiblen Kette kann diese Zahl groß sein: Für einen Triethylenglykol-Spacer kann der Entropieverlust ungünstige Werte bis zu einer Größenordnung von 10 kcal mol^{-1} annehmen.^[281, 282]

3.5.3. Solvationsentropie

Bei Assoziatbildungen in wäßrigen Systemen ist die Entropieänderung der umgebenden Wassermoleküle, $\Delta S_{\text{H}_2\text{O}}$, ein letzter Beitrag zur Gesamtentropie. Den Hauptbeitrag zu den Wechselwirkungen in Wasser (hydrophobe Wechselwirkungen und solche, an denen polare Gruppen beteiligt sind) leistet die Aufhebung der Ordnung der Wassermoleküle, die um exponierte Flächen der biologischen Moleküle angeordnet sind, und somit der daraus resultierende Entropiegewinn. Über quantitative Messungen und Voraussagen zu hydrophoben Wechselwirkungen ist ausführlich berichtet worden.^[283] Diese Wechselwirkungen werden in monovalenten und poly-

valenten Systemen üblicherweise ähnliche Werte pro Ligand ausmachen; an den in den vorangegangenen Abschnitten getroffenen Aussagen ändert sich also nichts (ausgenommen, der Linker ändert seine Konformation oder assoziiert mit der Oberfläche des Rezeptors und ändert infolgedessen bei der Komplexbildung seine Assoziation mit dem Lösungsmittel). Im allgemeinen wird für jede Liganden-Rezeptor-Wechselwirkung ein negativer Wert von ΔS zur Gesamtentropieänderung ΔS addiert, unabhängig davon, ob in einem monovalenten oder polyvalenten System.

Polyvalente Wechselwirkungen lassen sich in eine ganze Reihe von Klassen aufteilen, deren entropische Eigenschaften deutlich voneinander abweichen. Wechselwirkungen sind möglich, wenn anfänglich beide Spezies in Lösung frei diffundieren (von den anfänglichen sechs Freiheitsgraden der Translation zweier solcher Partikel verbleiben nach der Komplexbildung drei), und wir klassifizieren diese Wechselwirkungen als dreidimensional (3D). Wenn eine oder beide Spezies auf die Diffusion in einer Ebene oder in nur einer Richtung beschränkt sind, klassifizieren wir diese Wechselwirkungen entsprechend als 2D bzw. 1D. Der Aufwand an Translations- und Rotationsentropie bei Assoziatbildung hängt von der Zahl der bei der Komplexbildung verlorengegangenen translatorischen und rotatorischen Freiheitsgrade ab. Dieser Aufwand (die kombinierten Werte von ΔS_{trans} und ΔS_{rot}) ist am größten für Partikel, die sich in drei Dimensionen bewegen können und am geringsten für solche, die sich nur in einer Dimension bewegen können. Der Entropieaufwand für die Wechselwirkung zwischen N Liganden, die im zweidimensionalen Raum frei diffundieren (etwa Liganden, die an die Oberfläche einer Zelle geheftet sind) und N Rezeptoren, die ebenfalls frei im zweidimensionalen Raum diffundieren (etwa Transmembranproteine auf der Oberfläche einer anderen Zelle), ist also geringer als für die unabhängige Wechselwirkung dieser Spezies im dreidimensionalen Raum. Wir werden diese Aspekte der Dimensionalität in Abschnitt 4.4 diskutieren, in dem die Signaltransduktion durch Vernetzung von Oberflächenrezeptoren beschrieben wird.

3.6. Kinetik und erhöhte Affinität

Kinetische Studien über sehr starke polyvalente Wechselwirkungen legen nahe, daß die Verstärkung meistens auf eine Abnahme der Dissoziationsgeschwindigkeit (k_{off}) der beiden polyvalenten Einheiten zurückzuführen ist, und nicht so sehr auf eine Zunahme der Assoziationsgeschwindigkeit (k_{on}). Bei der Bindung von *anti*-DNP-Antikörpern an DNP-lys und an die DNP-bedeckte Oberfläche von ΦX174 stellte sich heraus, daß sich die k_{on} -Werte für die Bindung nur um den Faktor 2 unterschieden ($k_{\text{on}}(\text{Oberfläche}) \approx 3.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{on}}(\text{DNP-lys}) \approx 8 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), während sich die Werte von k_{off} um den Faktor 10^4 unterschieden ($k_{\text{off}}(\text{Oberfläche}) \approx 3.3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{off}}(\text{DNP-lys}) \approx 1.0 \text{ s}^{-1}$).^[284] Da die Geschwindigkeit eines Prozesses qualitativ (und oft quantitativ) mit seiner Thermodynamik zusammenhängt,^[285] erscheinen diese Ergebnisse intuitiv im Einklang mit Polyvalenz: Der thermodynamische Aufwand der ersten Liganden-Rezeptor-Wechselwirkung zwischen zwei polyvalenten Einheiten ist ungefähr derselbe

wie der der analogen monovalenten Wechselwirkung. Insofern ist es plausibel, daß die Assoziationsgeschwindigkeit ähnlich sein könnte. Die Dissoziation von Teilchen, die polyvalent wechselwirken, erfordert das Aufbrechen von N Liganden-Rezeptor-Wechselwirkungen. Es ist deshalb einleuchtend, daß bei polyvalenten Wechselwirkungen die Dissoziation langsamer verläuft als bei den entsprechenden monovalenten Wechselwirkungen.

4. Polyvalente Wechselwirkungen in der Biologie

4.1. Funktionelle Vorteile polyvalenter Wechselwirkungen

Wegen funktioneller Vorteile scheinen biologische Systeme in vielen Fällen lieber polyvalente Wechselwirkungen einzugehen, als entweder eine äquivalente Zahl von monovalenten Bindungen zu bilden oder eine sehr starke monovalente Bindung. Im folgenden werden einige Beispiele für solche funktionellen Vorteile aufgeführt.

4.1.1. Sehr starke Bindungen mit Liganden mittlerer oder kleiner Oberfläche

Die gesamte Gibbs-Energie für polyvalente Wechselwirkungen, ΔG_N^{poly} , kann hier sehr groß sein, und die daraus resultierende Bindungsaffinität, K_N^{poly} , kann sehr günstig sein. Grundsätzlich kann die Stärke einer polyvalenten Wechselwirkung viel höher sein, als es bei einer einzelnen Wechselwirkung zwischen einem Liganden mit niedrigem Molekulargewicht und einem Protein erreicht werden kann, ungeachtet der Kooperativität. Die stärkste bekannte Bindung für eine einzelne Wechselwirkung zwischen einem Rezeptor und einem kleinen organischen Liganden ist die zwischen Biotin und Streptavidin ($K^{\text{mono}} \approx 10^{15} \text{ M}^{-1}$).^[286, 287] Die am stärksten bindenden, trivalenten, natürlich vorkommenden Oligosaccharide binden polyvalent mit ihren drei GalNAc-Gruppen an den C-Lectin-Asialoglycoprotein-Rezeptor auf der Oberfläche von Leberzellen mit $K_{\text{avg}}^{\text{poly}} = 10^8 \text{ M}^{-1}$, während für einfache Galactose $K_{\text{mono}} = 10^3 \text{ M}^{-1}$ beträgt.^[206] Es wurde auch behauptet, daß es Wechselwirkungen mit viel größerer Bindungskonstante ($> 10^{15} \text{ M}^{-1}$) gäbe.^[288] Die Genauigkeit der Bestimmung von Bindungskonstanten solcher Größenordnung ist aber ungewiß, da die Messung in der Praxis sehr schwierig ist.

4.1.2. Abgestufte biologische Antwort- und Signalprozesse

In polyvalenten Systemen kann die Signalstärke in Abhängigkeit von der Zahl der beteiligten Liganden-Rezeptor-Paare stark schwanken; in erster Näherung könnte die Signalstärke mit N korrelieren. Diese Fähigkeit zur Variation der Signalstärke über einen großen Bereich (weitaus größer als das binäre „an“ und „aus“ eines einzelnen Liganden, der einen einzelnen Rezeptor besetzt) könnte im Prinzip die Möglichkeit bieten, auf biologische Signale stufenweise zu antworten.

Ein Beispiel für diese Art der abgestuften Antwort könnte die Clearance von Pathogenen durch Antikörper-vermittelte Anlagerung an Makrophagen sein (Abb. 13). Während ein

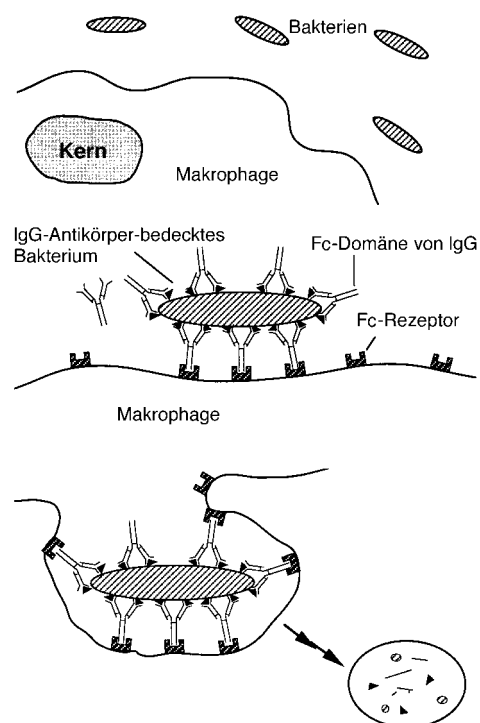


Abb. 13. Clearance von Pathogenen durch Antikörper-vermittelte Anlagerung an Makrophagen. Ein mit IgG-Antikörpern bedecktes Bakterium wird aus dem Blutkreislauf durch Phagocytose entfernt: Die Oberfläche des Makrophagen enthält Fc-Rezeptoren, die die Fc-Region des IgG-Moleküls erkennen. Die multivalente Bindung des Antikörper-überzogenen Bakteriums (oder Virus) an mehrere Fc-Rezeptoren des Makrophagen aktiviert den phagocytotischen Prozeß. Ungebundenes IgG verbindet sich nicht wirksam mit den Fc-Rezeptoren auf dem Makrophagen. (Die Darstellungen sind nicht maßstabsgerecht.)

einzelner Antikörper nicht in der Lage ist, einen Makrophagen zur Phagocytose eines Pathogens zu veranlassen, da Makrophagen nicht wirksam an einen einzelnen Antikörper binden, können zwei Antikörper dies sehr wohl bewirken. Mehrere Antikörper sollten das Ausmaß der Polyvalenz zwischen dem Pathogen und dem Makrophagen weiter verstärken und damit die Wahrscheinlichkeit erhöhen, daß das Pathogen erkannt und beseitigt wird. In diesem Fall bietet Polyvalenz einen Mechanismus für die molekulare Erkennung: Die meisten Pathogene haben Oberflächen, die mehrere Kopien eines Epitops aufweisen. Insofern würde die nichtspezifische Anheftung eines Antikörper-Rezeptors an ein nichtpolyvalentes Ziel auf einer natürlichen Oberfläche zu keiner festen polyvalenten Verknüpfung mit dieser Oberfläche führen. Außerdem können Makrophagen, die nur an einen einzelnen Antikörper binden, keine Teilstücke von Pathogenen erkennen. Wenn sie aber an mehrere Antikörper binden, erkennen sie das Pathogen als Ganzes.^[211]

Ein anderer Mechanismus, nach dem Antikörper zur Phagocytose eines Pathogens führen, ist die Auslösung der Komplementkaskade (dies wird in Abschnitt 4.1.7 genauer beschrieben, siehe Abb. 16). Die konstante Region am Ende

des Antikörpers, der Fc-Abschnitt, wechselwirkt mit einer der fünf Spalten des löslichen Proteins C1, einem pentavalenten Protein, das die Komplementkaskade bei Bindung initiiert.^[289, 290] C1 wird nicht durch Antikörper allein oder durch einen einzelnen Antikörper-Antigen-Komplex aktiviert. Je dichter sich die Antikörper auf einer Oberfläche drängen (z. B. auf einem Pathogen), desto wahrscheinlicher ist es, daß C1 bindet und aktiviert wird, und desto wahrscheinlicher ist es, daß das Pathogen zerstört wird.

4.1.3. Evolutionäre Effizienz: Vervielfältigung einer bestehenden Wechselwirkung – oder Bildung einer neuen

Die biologische Evolution von neuen wechselwirkenden Einheiten könnte Wechselwirkungen zwischen neuen Molekülen oder Gruppen von Molekülen erfordern. Man könnte annehmen, daß der Rückgriff auf einen bestehenden „Pool“ an Wechselwirkungen einen größeren evolutionären Vorteil bietet als das Schaffen neuer Wechselwirkungen. Umwelteinflüsse könnten einem Organismus zufällig einen Evolutionsvorteil verschaffen, der eine bestehende schwache Wechselwirkung durch eine viel stärkere ersetzt. Einfaches Erhöhen der Zahl der einzelnen schwachen Wechselwirkungen, um im Verbund eine stärkere zu ergeben, macht die Notwendigkeit hinfällig, ein neues Molekül für eine neue Wechselwirkung zu entwickeln.

4.1.4. Zunahme der Bindungsstärke und -spezifität durch heteromere Polyvalenz

Eine polyvalente Wechselwirkung kann eine Mischung von Liganden-Rezeptor-Paaren umfassen und zu größerer Bindungsstärke und -spezifität als bei äquivalenten monovalenten Wechselwirkungen führen, wenn bei dieser Mischung mehr als nur ein Ligandentyp mit mehr als nur einem Rezeptortyp wechselwirkt; wir nennen diese Art der Wechselwirkung „heteromere Polyvalenz“. Wenn durch Einbeziehung eines weiteren Ligandentyps die Gesamtzahl der Wechselwirkungen erhöht wird, dann kann die Gesamtstärke der Wechselwirkung ebenfalls zunehmen. Die Spezifität ($A_{N-1}B$ gegenüber A_N) kann durch differentielle Regulierung der Expression von A und B in oder auf einer Zelle erhöht werden; d. h., eine Zelle könnte an eine andere Zelle binden, die nur einen bestimmten Molekülbruch von A und B auf ihrer Oberfläche exprimiert. In Abschnitt 2 veranschaulichen zwei detaillierte Beispiele (Anheftung von *E. coli* und Neutrophilen) heteromere Polyvalenz.

4.1.5. Konformer Kontakt zwischen großen biologischen Oberflächen

Abbildung 14 zeigt ein Beispiel, bei dem viele schwache Wechselwirkungen (K_N^{poly}) gegenüber einer einzelnen Wechselwirkung von gleicher Stärke ($K^{\text{mono}} = K_N^{\text{poly}}$) biologisch im Vorteil sind: Man spricht von „konformem“ Kontakt. Solch enger Kontakt hat bei einem Zellpaar eine Reihe von Vorteilen: Beispielsweise könnte die Kommunikation zwischen zwei Zellen viel effizienter und schneller erfolgen als bei Zellen, die sich nur in einem kleinen Bereich berühren.

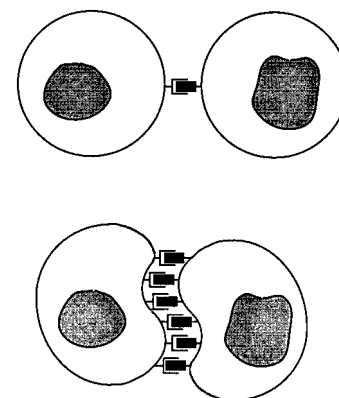


Abb. 14. Zur Erläuterung des „konformen“ Kontakts zwischen großen biologischen Oberflächen (Näheres siehe Text).

Eine einzelne starke Wechselwirkung würde engen konformen Kontakt zwischen zwei Oberflächen nicht fördern.

4.1.6. Induktion spezifischer geometrischer Formen und molekularer Verteilungen

Polyvalente Wechselwirkungen können zu makroskopischen Reorganisationen und Umverteilungen von Molekülen führen. Ein Beispiel für eine große Formveränderung ist die Umwandlung eines sphärisch geformten Neutrophils in ein abgeflachtes Neutrophil bei Anheftung an eine endotheliale Oberfläche. Dieser Formveränderung schließen sich spezifische Wechselwirkungen zwischen den Oberflächen der beiden Zellen an (Abb. 3). Ein Beispiel für die Veränderung der molekularen Verteilung ist die Ansammlung von Rezeptoren in einem Clathrin-überzogenen Grübchen (Abb. 15).

4.1.7. Signaltransduktion durch Induktion großer konformativer Veränderungen

Bei einigen polyvalenten Systemen ruft die Wechselwirkung eine große Konformationsänderung von einem oder beiden wechselwirkenden Partnern hervor. Beispielsweise liegt die DNA in einer spezifisch spiralisierten Konformation vor, die durch mehrfach wiederholte (polyvalente) Kontakte des polymeren Histons erreicht wird. Ein bemerkenswertes Beispiel ist die polyvalente Bindung von IgM an die polyvalente Oberfläche eines eingedrungenen Pathogens. Hierbei dient die Konformation des IgM, die durch die polyvalente Assoziation hervorgerufen wird, als ein Signal. IgM gehört zu einer Antikörper-Klasse mit fünf bivalenten Strukturen (d. h. zehn Bindungsstellen), die sich unregelmäßig um einen zentralen Ring anordnen. Nach decavalenter Bindung an die Bakterienoberfläche weisen alle fünf bivalenten Strukturen in eine gemeinsame Richtung, und Teile des zentralen Ringes sind dann exponierter und anders geordnet, als sie es vor der Bindung waren. Diese Ringabschnitte initiieren durch Wechselwirkung mit löslichem pentavalentem Protein C1 im Blut die Kettenreaktion, die die Komplementkaskade ausmacht (Abb. 16). Diese Kaskade endet mit dem Einbau der Proteine C5b–C9 in der Membran des Mikroorganismus. Dies ruft die Bildung weiter Kanäle (Löcher) in der Membran

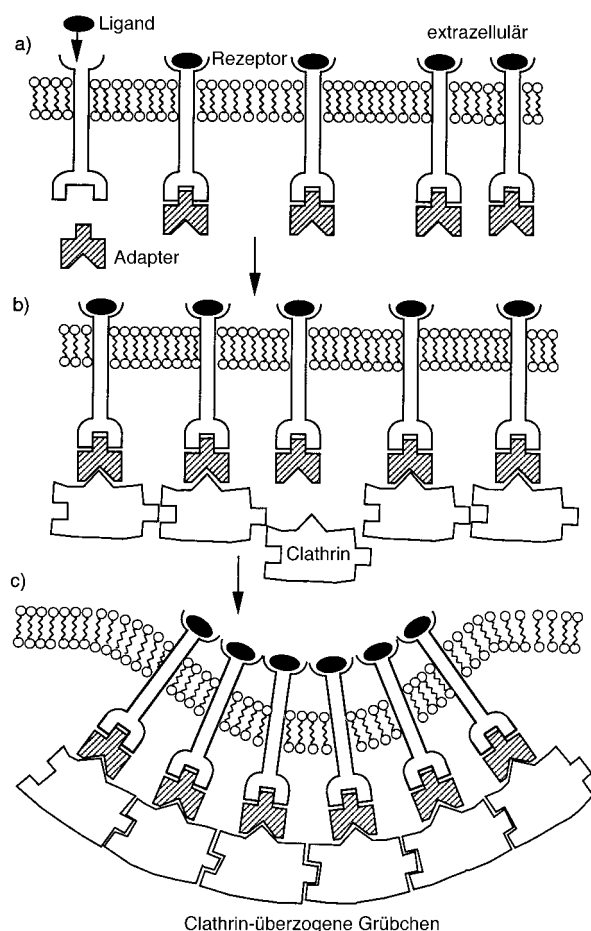


Abb. 15. Induktion spezifischer geometrischer Formen und Induktion molekularer Verteilung: Ansammlung von Rezeptoren in einem Clathrin-überzogenen Grübchen. Ein Beispiel stellt die Rezeptor-vermittelte Endocytose von Low-density-Lipoproteinen (LDL) dar. Der Ligand (LDL) bindet an LDL-Rezeptoren im Membranplasma der Zelle. Der aus dieser monovalenten Wechselwirkung hervorgegangene Komplex bindet an ein Adapter-Molekül im Cytoplasma, was die Bildung Clathrin-überzogener Grübchen durch multivalente Assoziation von Clathrin-molekülen und anderen Schicht-assoziierten Proteinen einleitet.

hervor, was zum Tod des Mikroorganismus führt. Die Bindung von IgM an monovalente Liganden im Blut führt zu keinen solchen konformativen Änderungen und löst die Komplementaskade nicht aus. In diesem Beispiel ist Polyvalenz nicht für enge Bindungen, aber für Signalisierung und Aktivierung durch Konformationsänderung unabdingbar.

4.1.8. Verhinderung unerwünschter Wechselwirkungen: natürliche polyvalente Inhibitoren

Wo Polyvalenz gewünschte Wechselwirkungen stark fördern kann, kann sie auch eine nützliche Strategie sein, um bestimmte ungewünschte biologische Wechselwirkungen zu verhindern, vor allem solche, die selbst polyvalent sind (hier wird also Polyvalenz gegen Polyvalenz eingesetzt). Der Flüssigkeitsfilm, der das Innere der Lunge der meisten Säugetiere benetzt, enthält z.B. einige Mucine (Proteine, die Sialinsäure-terminierte Oligosaccharide aufweisen). Diese Mucine, besonders α_2 -Makroglobulin, können an Influenza

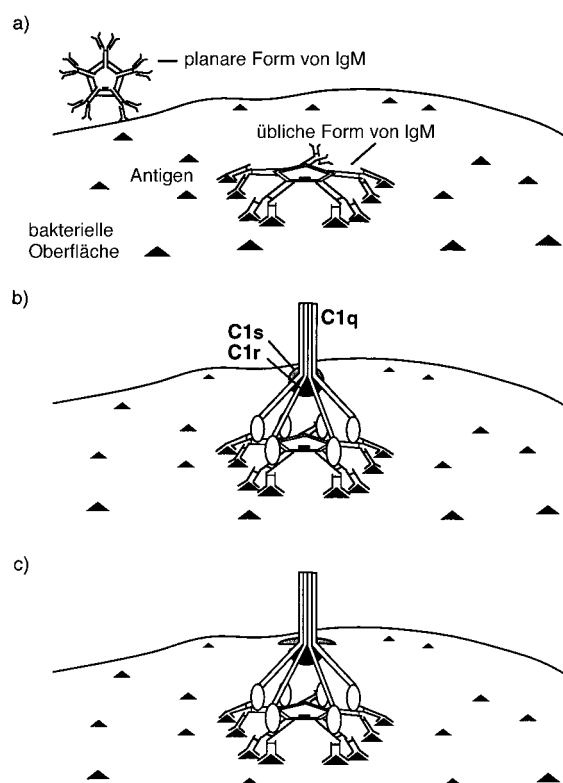


Abb. 16. Signaltransduktion durch Induktion großer Konformationsänderungen. Konformationsänderungen eines pentameren Immunglobulins (IgM) nach multivalenter Bindung an Antigene auf bakteriellen Oberflächen aktivieren die Komplementkaskade. a) Ein pentavalentes IgM-Molekül bindet an Antigene auf der Oberfläche eines Bakteriums und nimmt die „übliche“ Form an. b) C1q (drei Paare mit Y-Form) des C1-Komplexes (C1q, C1r, C1s) bindet direkt an ein konformativ verändertes IgM. c) Die Bindung von C1q an IgM führt zur Aktivierung des C1-Komplexes (die Aktivierung von C1r/C1s – dargestellt als Änderung der Orientierung): C1 ist nur dann aktiviert, wenn mindestens zwei C1q-Köpfe gleichzeitig an Antikörper binden. Solch eine Aktivierung des C1-IgM-Komplexes initiiert die Komplementkaskade, was schließlich zum Tod des Bakteriums führt.

und andere SA-bindende Viren binden und dabei deren Anlagerung an die Zielzelle verhindern (Abb. 17). Wie wir in Abschnitt 5.2 noch ausführlicher diskutieren werden, kann Polyvalenz für die feste Bindung an das Pathogen und auch für die sterische Stabilisierung der Pathogenoberfläche (eine besondere Eigenschaft dieser Art polyvalenter Wechselwirkung) genutzt werden.

Dank eines genauen Verständnisses der verschiedenen Systeme, in denen biologische Organismen polyvalente Wechselwirkungen auf der molekularen Ebene einsetzen, können wir allmählich neue Strategiekonzepte für die Pharmakologie entwickeln. In den folgenden Abschnitten diskutieren wir gut untersuchte Arten von Polyvalenz und versuchen, einige der ungewöhnlichen Eigenschaften polyvalenter Wechselwirken zu erläutern.

4.2. Anlagerung von Viren an Wirtszellen

Einige Beispiele für Liganden-Rezeptor-Wechselwirkungen, die bei der Anlagerung eines Virus an eine Wirtszelle

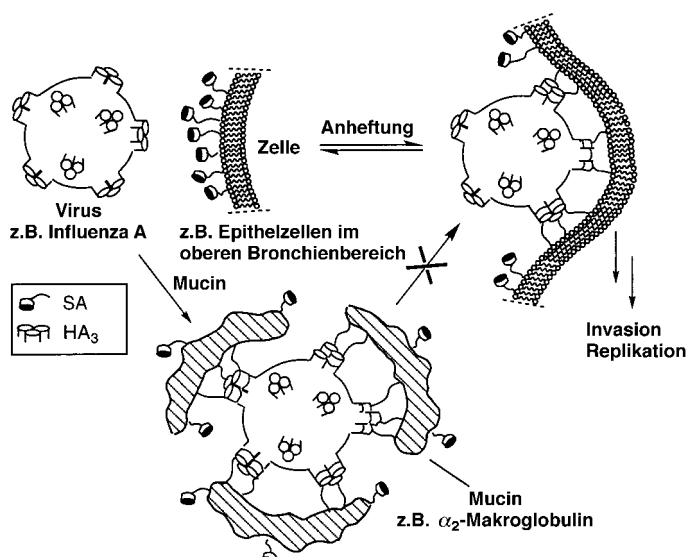


Abb. 17. Verhinderung der Anlagerung des Influenzavirus an die Zelloberfläche. Mucin ist ein natürliches Glycoprotein, das an seiner Oberfläche in hoher Dichte Sialinsäure-Gruppen trägt. Aufgrund der kompetitiven, multivalenten Verbindung dieser Sialinsäure-Gruppen mit den Hämagglutininen auf der Virusoberfläche ist es ein potenter Inhibitor der Virus-Anheftung.

wichtig sind, sind in Tabelle 1 aufgeführt.^[75] Der erste Schritt bei einer Virusinfektion ist die Anlagerung eines Virus an seinen Wirt, was die gleichzeitige Assoziation von mehreren Molekülen auf der Virusoberfläche mit mehreren Molekülen auf der Oberfläche seiner Wirtszelle erfordert (Abb. 18).^[291]

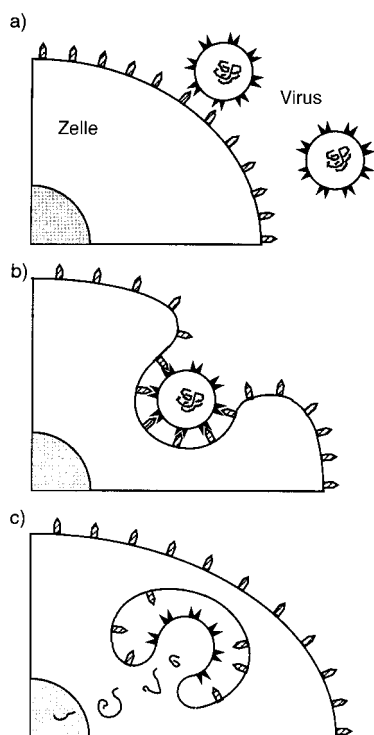


Abb. 18. Schematische Darstellung des Eindringens eines Virus in eine Wirtszelle. a) Ein Virus lagert sich durch polyvalente Wechselwirkungen zwischen viralen Rezeptoren und zellulären Liganden an die Zelloberfläche an. b) Die Zelle nimmt das Virus durch Endocytose auf. c) Azidifizierung der Virus-haltigen Vesikel nach Endocytose löst die Verschmelzung des Vesikels mit der Zelle aus; die virale DNA wird freigesetzt.

Über den Vorgang der molekularen Erkennung zwischen dem Virus und seiner Wirtszelle ist bereits berichtet worden.^[75]

Die bei der Vermittlung der Anlagerung beteiligten Moleküle auf den Virus- und Wirtszelloberflächen können am direktesten durch Hemmung dieser Verbindungen identifiziert werden, und zwar entweder durch eine hohe Konzentration der entsprechenden freien Monomere dieser Verbindungen oder durch monoklonale Antikörper gegen diese Moleküle. Solch eine Strategie wird oft angewendet, wenn der Ligand ein Zucker oder ein kleines Molekül ist. Eine weniger direkte Methode zur Charakterisierung der bei der Assoziationsbildung beteiligten Moleküle baut auf Korrelationen von Mutationen auf (entweder gezielt ausgelöst oder natürlichen), wobei die Mutanten nicht in der Lage sind, erfolgreich an die Zielzelle zu binden; d. h. wenn die Mutation eines bestimmten Proteins dem Virus die Fähigkeit zur Assoziationsbildung nimmt, ist es bei der Anlagerung entweder direkt oder indirekt beteiligt. Diese zweite Strategie wird oft für Rezeptoren und Liganden angewendet, die Proteine sind. Obwohl die Beteiligung etlicher Oberflächenmoleküle bei der Virus-Zell-Erkennung beschrieben ist, bestehen oft Zweideutigkeiten. Da sich Viren nichtspezifisch an viele Substanzen anheften, ist es oft schwierig, zwischen nichtbiospezifischer und biospezifischer Bindung zu unterscheiden. Einige Viren können durch einen nichtspezifischen Transportmechanismus in eine Wirtszelle eindringen (derselbe Mechanismus, den Zellen zur Aufnahme kleiner Moleküle nutzen). Einige auf der Virusoberfläche befindliche Proteine können mehr als nur einen Ligandentyp auf der zellulären Oberfläche erkennen. Schließlich können sich bestimmte Viren mit frei in Lösung diffundierenden Proteinen verbinden, die ihrerseits Moleküle auf der Zelloberfläche erkennen (vermittelte Anlagerung). Viren binden auf zellulären Oberflächen an fast alle Molekülklassen: Zucker^[292] (z. B. erkennen Polyoma^[7] und Orthomyxoviren^[293] Sialyloligosaccharide), Phosphatidylipide (z. B. erkennt das vesiculäre Stomatitis-Virus, VSV, Phosphatidylserin und Phosphatidylinositol^[58]) und Proteine (z. B. erkennt HIV CD4,^[294] und das humane Rhinovirus erkennt das interzelluläre Adhäsionsmolekül-1, ICAM-1^[295]).

Das im Zusammenhang mit Polyvalenz am meisten untersuchte System zur viralen Bindung und Hemmung ist ein künstlicher Influenza-Stamm, das Orthomyxovirus A(X-31), das an die Oberfläche von Erythrocyten bindet (Abb. 1).^[1, 2] Diese Bindung kommt durch mehrere gleichzeitige Wechselwirkungen zwischen viraler HA und zellulärer SA zustande. Genaue Affinitätsmessungen zwischen Influenzaviren und Erythrocyten sind bisher nicht durchgeführt worden, doch ist geschätzt worden, daß die Untergrenze für $K_N^{\text{poly}} = 10^{13} \text{ M}^{-1}$ beträgt. Da die Konstante für die Bindung zwischen einem einzelnen SA-Molekül und einem einzelnen HA-Rezeptor $K^{\text{mono}} \approx 10^3 \text{ M}^{-1}$ beträgt, ist die Wechselwirkung zwischen Zelle und Virus eindeutig polyvalent ($\beta \approx 10^8 > 1$). Da der Wert für N unbekannt ist, können wir keine Aussage zur Kooperativität α treffen.

Eine andere ausführlich untersuchte Virus-Zell-Wechselwirkung ist die zwischen dem Protein gp120 auf dem HI-Virus und dem 60K-Glycoprotein CD4 auf der Oberfläche der T-Zellen (Abb. 19). Hohe Konzentrationen an solubilisiertem CD4 (CD4, das chemisch von Zelloberflächen gespalten

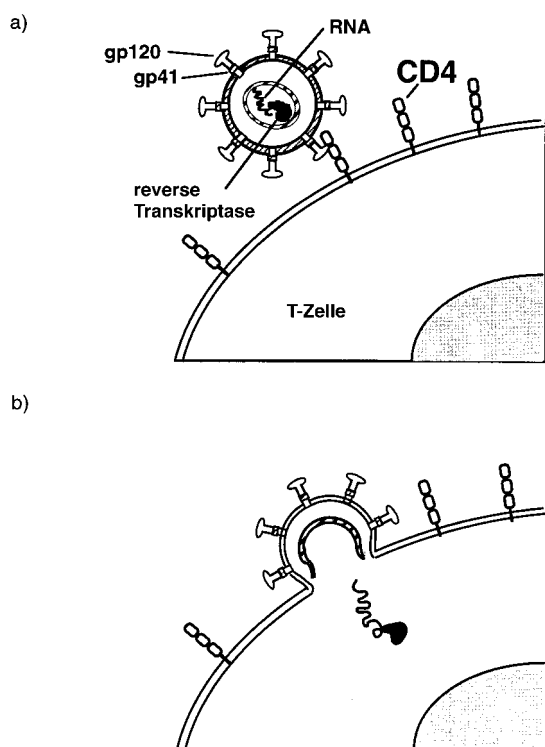


Abb. 19. Anheftung von HIV an eine T-Zelle. a) Bindung von gp120 der Virusoberfläche an CD4 der T-Zelloberfläche. b) Verschmelzung der Virushülle mit der Zellmembran und Eindringen der viralen RNA in die Zelle.

wurde) hemmen die Anlagerung. HIV ist ein Beispiel für ein Virus, das an alternierende Moleküle auf der Zelloberfläche binden kann: Es kann Gliom- und Rhabdosarkom-Zellen infizieren, denen CD4 fehlt. Solubilisiertes CD4 hemmt die Anlagerung und die nachfolgende Infektion dieser Zelltypen nicht.^[296]

Es gibt viele Beispiele für vermittelte Bindungen von Viren an Zellen. So bindet das Hepatitis-B-Virus in manchen Fällen an Serumalbumin-Aggregate. Diese Aggregate binden ihrerseits an Albumin-Rezeptoren auf der Oberfläche von Leberzellen.^[297] Bei einem anderen gut untersuchten Beispiel ist der Ausgangspunkt die bivalente Anlagerung von Anti-Virus-Antikörpern an die Oberfläche eines Virus (Beispiele sind Dengue-Virus, West-Nil-Fieber-Virus und HIV).^[298] Fc-Rezeptoren auf der Oberfläche der Zielzelle wechselwirken dann polyvalent mit mehreren Fc-Enden. Dieser Verbindungsmechanismus ist derselbe, der auch von Makrophagen bei der Erkennung von fremden Pathogenen genutzt wird, nur daß dieser interessanterweise zur Clearance und nicht zur Infektion führt.

4.3. Bindung von Bakterien an Wirtsgewebe: Gewebstropismus

Bakterielle Pathogene können in zwei Klassen aufgeteilt werden: intrazelluläre (die in eine Zelle eindringen und sich dort vervielfältigen) und extrazelluläre (die zwischen Zellen leben, aber nicht in sie eindringen). Der Mechanismus der bakteriellen Infektion ist für intrazelluläre Pathogene ähnlich

wie bei Viren: Die Infektion wird durch die Anlagerung des Pathogens an die Wirtszelle ausgelöst (Tabellen 2–4). Extrazelluläre Bakterien wandern oft in spezielle Gewebe und sammeln sich dort an. Dieser sogenannte Gewebstropismus kann entweder durch spezifische Wechselwirkungen zwischen Molekülen der Bakterienoberfläche und Molekülen auf der Oberfläche der Zellen des bevorzugten Gewebes zustande kommen, oder die Moleküle der Bakterienoberfläche wechselwirken mit Komponenten der extrazellulären Matrix, die für diese Gewebe charakteristisch sind. Viele spezifische Wechselwirkungen, entweder zwischen Bakterium und Wirtszelle oder Bakterium und extrazellulärer Matrix, sind bereits beschrieben worden.^[299, 300] Wie bei Viren wird die Spezifität der Wechselwirkung üblicherweise durch das Molekül bestimmt, das der beste Inhibitor bei einem Anheftungs- oder Agglutinationsassay ist. Diese Tests werden am häufigsten angewendet, wenn die Wechselwirkung zwischen einem Lectin auf der bakteriellen Oberfläche und einem Zucker stattfindet, der entweder auf der Wirtszelle oder der extrazellulären Matrix lokalisiert ist (Tabelle 2). Daß Ligand und Rezeptor Proteine sind, kommt wahrscheinlich bei bakteriellen Wechselwirkungen eher vor als bei viralen (Tabelle 3 und 4). Diese Protein-Protein-Wechselwirkungen sind schwieriger zu untersuchen, hauptsächlich weil das „Monomer“ entweder nicht bekannt oder für Studien nicht verfügbar ist, oder weil es seine „Form“ verliert, wenn es sich nicht mehr in der Membran befindet. Daher sind bis heute die meisten detaillierten Studien über bakterielle oder virale Wechselwirkungen keine über Protein-Protein-Wechselwirkungen, sondern über Lectin-Zucker-Wechselwirkungen.

Die Pionierarbeiten von Duguid et al., die als erste die Agglutinationseigenschaften von Darmbakterien systematisch untersucht haben,^[301] liefern viele Beispiele für bakterielle Wechselwirkungen mit Wirtszellen. In den meisten Fällen exprimiert das Darmbakterium Fimbrien vom Typ 1, die auf der Oberfläche von Epithelzellen im Darm an Mannose binden (z. B. *E. coli*, *Klebsiella pneumonia* und *Salmonella*). Diese Wechselwirkung kann durch Agglutination von Meerschweinchen-Erythrocyten getestet werden (deren Oberfläche ist dicht mit Mannose-Substituenten beschichtet). Ein bekanntes Beispiel sind uropathogene *E. coli*-Bakterien (siehe Abschnitt 1).

Bestimmte andere enterale *E. coli*-Bakterien haben fimbriale Hämagglutinine auf ihrer Oberfläche, die spezifisch an verschiedene Sialinsäure-haltige Glycoproteine auf der Oberfläche von Epithelzellen binden. Ein detailliert erforschtes Beispiel für Sialinsäure-Erkennung ist die Erkennung der spezifisch an NeuAc(α 2,3)Gal(β 1,4)Glc(β 1)-ceramid lokalisierten N-Glycolylneuraminsäure durch das Fimbrien-Lectin K99 aus *E. coli*.^[302] Stämme der Darmbakterien *Vibrio cholera* produzieren eine Vielfalt an Hämagglutininen.^[303] Das verbreitetste dieser Hämagglutinine bindet an Fucose-derivate der Epithelzellen.

Der Wirtorganismus baut häufig eine relativ unspezifische, aber polyvalente Abwehr gegen die polyvalenten Pathogene auf. Das Tamm-Horsfall-Glycoprotein etwa, das in menschlichem Urin am stärksten vertretene Glycoprotein, enthält eine veränderliche Zahl von N-gebundenen Oligomannose-Einheiten und bindet eine breite Palette von Bakterien.^[304]

4.4. Anlagerung polyvalenter Moleküle an Zellen

Polyvalente Moleküle können mit Zellen und Bakterien wechselwirken und Reaktionen auslösen, die von Wachstum und Differenzierung über Clearance bis hin zum Tod reichen. Einige dieser Reaktionen sind nur möglich, wenn das Molekül polyvalent ist. Wir geben im folgenden Beispiele für Antikörper-Zell-Wechselwirkungen, für die Anlagerung von Toxinen an deren Zielzellen und für die Signaltransduktion über die Assoziation polyvalenter Moleküle (Hormone, Wachstumsfaktoren).

Immunglobuline binden polyvalent an die Zelloberfläche. Wie schon beschrieben, ergaben die bahnbrechenden Arbeiten von Karush et al., daß die bivalente Form eines Antikörpers fester an biologische Oberflächen bindet als die entsprechende monovalente Form.^[305] Die Autoren studierten die Anheftung von IgG und IgM an eine DNP-derivatisierte Oberfläche des *E.-coli*-spezifischen Bakteriophagen Φ X174. Durch proteolytischen Abbau wandelten sie bivalentes IgG und decavalentes IgM in monovalente Formen um und verglichen deren Assoziationskonstanten mit denen der nicht modifizierten Antikörper. Sie ermittelten einen 10^3 - und 10^6 -fachen Unterschied für IgG bzw. IgM ($\beta = 5 \times 10^2$ bzw. 10^5). Ferner war die gemessene Assoziationskonstante für decavalentes IgM, K_{10}^{deca} , größer als 10^{11} M^{-1} .

Später, 1990, untersuchten Karush et al. die Anheftung einer polyklonalen Mischung von IgG. Diese war aus dem Serum einer Maus isoliert worden, die man mit dem Gram-positiven Bakterium *Bacillus sp.* geimpft hatte.^[277] Die Oberfläche (Zellwand) des *Bacillus sp.* besteht aus Peptidoglykan-Bausteinen, die das periodisch strukturierte Mureingerüst bilden.^[306] Die Bindungskonstante für das bivalente IgG war 30mal höher ($\beta = 30$) als für die monovalente Form, die durch Reduktion mit 2-Sulfanylethylamin erhalten wurde. Nach Untersuchung der Kinetik dieser Wechselwirkung kamen die Autoren auch zu dem Schluß, daß die Assoziationsgeschwindigkeiten für die bivalenten und monovalenten Formen fast dieselben waren, aber die Dissoziationsgeschwindigkeit für die bivalente Spezies 30mal niedriger war als die der monovalenten.

Ein bivalenter Antikörper hat gegenüber einem monovalenten zwei wesentliche Vorteile: 1. hohe Affinität ($\beta > 1$), 2. Erkennung. Zuzuschreiben ist die Erkennung der schwachen Affinität des bivalenten Antikörpers zu frei in Lösung umherschwebenden Bakterienfragmenten und nichtbakteriellen Oberflächen, die ähnliche Epitope wie bakterielle Oberflächen aufweisen könnten (es ist unwahrscheinlich, daß diese ähnlichen Epitope auf einer nichtbakteriellen Oberfläche in hoher Dichte vorkommen).

Als zweites Beispiel für Antikörper-Zell-Wechselwirkungen sei die Bindung zwischen humanem Wachstumshormon (hGH) und den Rezeptoren seiner Zielzellen angeführt (Abb. 20). Dieses Hormon besteht aus zwei unterschiedlichen Protein-Domänen, die durch eine starre Proteinbrücke auseinandergehalten werden. Obwohl diese Domänen unterschiedlich sind, erkennen doch beide denselben Rezeptor auf der Oberfläche, allerdings mit unterschiedlichen Affinitäten. Dieses Beispiel gehört auch zur oben definierten heteromeren Polyvalenz (Abschnitt 4.1.4).^[307]

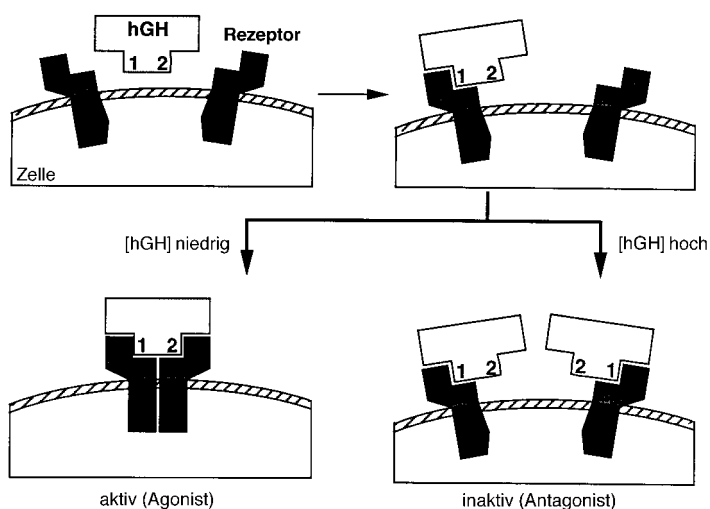


Abb. 20. Heteromere Polyvalenz: Modell der sequenziellen Dimerisierung bei der Aktivierung des hGH-Rezeptors.

4.4.1. Signaltransduktion durch Quervernetzung der Rezeptoren auf einer Zelloberfläche

Zellwachstum, Differenzierung, Migration und programmierter Zelltod werden zum Teil durch polypeptidische Wachstumsfaktoren oder Cytokine gesteuert.^[308, 309] Da diese Faktoren die hydrophobe Zellmembran nicht durchdringen können, stellt sich die grundsätzliche Frage, auf welchem Weg die Signaltransduktion in die Zelle erfolgt. Man hat eine Reihe von Liganden-Rezeptor-Wechselwirkungen ermittelt, die die Dimerisierung von Oberflächenrezeptoren zur Folge haben. Viele Wachstumsfaktoren und Cytokine sind polyvalent und entfalten ihre Wirkungen über Bindung und Dimerisierung (oder Oligomerisierung) zellulärer Oberflächenrezeptoren: Für solch einen Mechanismus wurden in den letzten Jahren deutliche Hinweise erhalten (Tabelle 7), und es ist auch schon eine Übersicht darüber erschienen.^[308] Die Bindung eines polyvalenten Liganden an mehrere, in einer Zellmembran bewegliche Rezeptoren spielt dabei oft eine Rolle. In einigen Fällen kann ein einzelnes signalgebendes Molekül aus zwei Teilen bestehen, von denen jeder für sich einen Oberflächenrezeptor bindet (wie beim humanen Wachstumsfaktor, der im vorangegangenen Abschnitt besprochen wurde). In diesem Fall ist der Ligand heterovalent/bivalent. Aber nicht in allen Fällen hat Polyvalenz (wie wir sie definiert haben) etwas mit dem Mechanismus der Rezeptordimerisierung zu tun. In einigen Fällen ist es sehr gut möglich, daß zwei Liganden-besetzte Rezeptoren mit einer günstigeren Dimerisierungsenergie wechselwirken als zwei unbesetzte Rezeptoren.^[257] Rezeptor-Dimerisierung wurde nach Bindung einer Reihe von Cytokinen und Wachstumsfaktoren festgestellt: Protein-Tyrosinkinase-Rezeptoren, Cytokin-Rezeptoren, Antigen-Rezeptoren, Rezeptoren für Tumornekrosefaktoren (TNF) und verwandte Faktoren sowie Serin-Threoninkinase-Rezeptoren.^[308]

Die Wechselwirkung zwischen einem Allergen und der Oberfläche einer Mastzelle verdeutlicht einige der ungewöhnlichen Eigenschaften von Systemen, die die Vernetzung von Rezeptoren nutzen. Die Mastzelle trägt mehrere Kopien des bivalenten Antikörpers IgE und kann auf eine große

Palette von Allergenen mit Degranulation reagieren (d.h. Freisetzung von Histamin, das eine lokale Entzündung fördert). Während monovalente Liganden für IgE keine Degranulation auslösen, sind polyvalente Liganden dazu in der Lage (Abb. 21). Die polyvalente Bindung an die Ober-

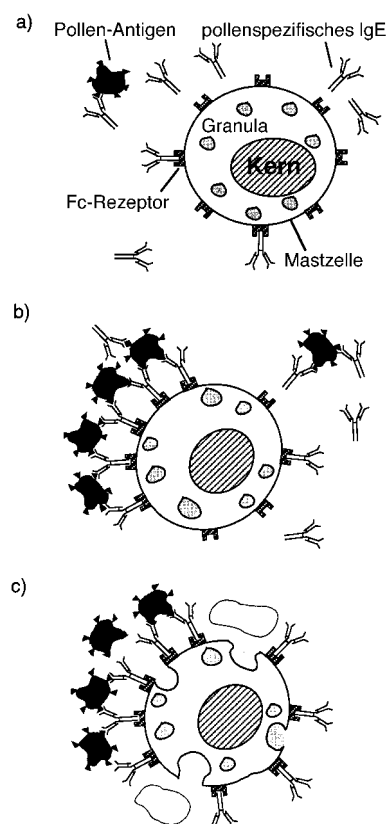


Abb. 21. Degranulation nach Bindung eines polyvalenten Allergens. a) Nach der Exposition gegenüber Pollen veranlaßt IL-4 B-Zellen, IgE als Antwort auf die Pollen-Antigene zu produzieren. b) Die zweite Exposition führt zur Mastzellenaktivierung durch multivalentes Binden und Vernetzen der IgE-Moleküle und Antigene. c) Die von der aktivierten Mastzelle durch Exocytose freigesetzten Granula enthalten Histamin und Heparin; die Folge ist „Heuschnupfen“.

fläche der Mastzelle kann zur Vernetzung von zwei IgE-Molekülen führen. Das vernetzte, oberflächengebundene IgE bindet (über einen Transmembranabschnitt) an ein unidentifiziertes intrazelluläres Protein, wobei diese Wechselwirkung ihrerseits eine Signalkette auslöst, die letztlich zur Degranulation führt. Das Minimum an vernetzten Einheiten, die zur Freisetzung von Histamin aus Mastzellen erforderlich sind, sind zwei vernetzte IgE-Moleküle.^[230, 310] Deshalb muß für das Antigen $N \geq 2$ gelten, damit Degranulation stattfindet.^[311] Wechselwirkungen von symmetrischen und unsymmetrischen bivalenten Liganden mit bivalenten Antikörpern auf der Oberfläche der Mastzelle sind mit der Histamin-Freisetzung in Beziehung gesetzt worden.^[312, 313]

Die Degranulation veranschaulicht eine wichtige Eigenschaft polyvalenter Wechselwirkungen in Membranen: Der Membran-Rezeptor verhält sich manchmal polyvalent (z.B. durch polyvalentes Binden an das polyvalente Allergen), manchmal aber auch nicht (der Rezeptor bindet ohne das

Allergen nichtpolyvalent an das/die intrazelluläre(n) Protein(e) in der Signaltransduktionskaskade). Ob Rezeptoren polyvalent an polyvalente Liganden binden oder nicht, hängt von der genauen Balance dreier thermodynamischer Parameter ab: 1. die Enthalpie der Komplexbildung, 2. der Verlust an Konformationsentropie des Liganden bei der Komplexbildung, 3. die Konzentration des Rezeptors in der Membran (die mit dem Verlust an Konformationsentropie bei der Komplexbildung zusammenhängt). Die ersten beiden Faktoren haben wir in den vorangegangenen Abschnitten schon diskutiert.

Die Konzentration des Rezeptors in der Membran bestimmt zum Teil die Wahrscheinlichkeit der Signaltransduktion. Die Mechanismen, nach denen ein vernetzter Zustand eines Rezeptors eine Antwort in einer Zelle induziert, lassen sich vereinfacht in zwei Klassen aufteilen:

1. Ein intrazelluläres Protein (oft eine Kinase, wenn die Signaltransduktion nach Erkennung eines polyvalenten Antigens durch T-Zellen-Rezeptoren erfolgt^[314]) kann fest an einen intrazellulären Abschnitt des Dimers binden, der sich in Teilen aus beiden Hälften des Dimers zusammensetzt. Dieses intrazelluläre Protein bindet aber nicht, nicht einmal schwach, an einzelne Rezeptoren.
2. Die beiden Rezeptoren, aus denen sich das Dimer zusammensetzt, können sich gegenseitig chemisch verändern. Ein Beispiel dafür ist die Autophosphorylierung,^[315] bei der jeder Rezeptor den anderen an spezifischen Positionen phosphoryliert. Die phosphorylierte Spezies wird dann von einem intrazellulären Protein erkannt, etwa einem, das eine SH2-Domäne enthält.^[315]

Bei beiden Mechanismen ist die Liganden-vermittelte Rezeptor-Dimerisierung der Schritt, der die Signaltransduktion limitiert. Dabei hängt die Geschwindigkeit dieses Schrittes umgekehrt proportional von der Rezeptor-Konzentration in der Membran ab. Die Translationsentropie eines Moleküls (Rezeptors) in einer Membran (zweidimensionaler Fall, 2D) ist geringer als die desselben Moleküls in Lösung (dreidimensionaler Fall, 3D). Daher kann die Bindung eines polyvalenten Moleküls an N Rezeptoren auf einer Zelloberfläche günstiger als die entsprechenden N monovalenten Wechselwirkungen in Lösung sein ($-\Delta G_N^{\text{poly}} > -N\Delta G^{\text{mono}}$). Ob in Lösung oder in einer Membran, die Translationsentropie eines Moleküls hängt umgekehrt proportional von seiner Konzentration ab: Je größer die Konzentration des Rezeptors in der Membran ist, desto geringer ist der Entropieverlust beim Komplexbilden eines polyvalenten Liganden. Die Empfindlichkeit der Vernetzungsreaktion gegenüber der Konzentration eines Liganden ist wichtig für die Art und die Empfindlichkeit der biologischen Antwort. Die Wahrscheinlichkeit einer biologischen Antwort kann durch Kontrolle der Rezeptor- oder Ligandenkonzentration in einer Membran reguliert werden und geht aus der Balance zweier Effekte hervor:

1. *Falsches Signalisieren*: Eine spontane (nicht signalisierte) Vernetzung entspricht falschem Signalisieren, d.h. Signalisieren in Abwesenheit eines bivalenten Liganden. Die Wahrscheinlichkeit einer spontanen Bildung eines vernetzten Dimers ist dem Quadrat der Rezeptorkonzentration in der Membran proportional. Deshalb muß die Rezeptorkonzen-

tration in der Membran hinreichend niedrig sein, um die Wahrscheinlichkeit einer spontanen Vernetzung auf einen annehmbaren Wert zu bringen.

2. Empfindlichkeit gegenüber richtigem Signalisieren: Der Verlust an Translationsentropie bei der Vernetzung nimmt logarithmisch mit der Rezeptorkonzentration in der Membran zu. Daher muß die Rezeptorkonzentration in der Membran hoch genug sein, damit das polyvalente Allergen die Rezeptoren vernetzen kann. Ein hervorragendes Beispiel, das die Empfindlichkeit der Signaltransduktionswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit von der Rezeptorkonzentration in der Membran verdeutlicht, stammt von Shur et al.:^[253] Spermazellen exprimieren auf ihrer Oberfläche Galactosyl-Transferase-Moleküle (GalTase) als Rezeptoren, die spezifisch mit *N*-Acetylglucosamin(GlcNAc)-Resten des Glycoproteins ZP3 auf der Oberfläche einer Eizelle in Wechselwirkung treten. Nach erfolgreicher Wechselwirkung zwischen Sperma- und Eizelle findet beim Spermium eine starke morphologische Veränderung statt, die akrosomale Reaktion genannt wird. Bei dieser Reaktion werden Enzyme freigesetzt, die bei der Penetration der Schutzhülle der Eizelle beteiligt sind. Erhöhte Genexpression von GalTase auf Spermaköpfen steigert die Empfindlichkeit der ZP3-induzierten akrosomalen Reaktion.^[253]

Wir stellen die Hypothese auf, daß die Konzentration von Rezeptoren, die bei der Signaltransduktion durch Vernetzung beteiligt sind, streng kontrolliert wird: Eine Konzentrationssteigerung würde die Empfindlichkeit der Zelle erhöhen, polyvalent zu signalisieren, würde aber ebenfalls die Wahrscheinlichkeit für spontane bzw. falsche Signaltransduktion erhöhen. Die Erniedrigung der Konzentration würde die Empfindlichkeit der Zelle vermindern und die Wahrscheinlichkeit erhöhen, ein Signal selbst in Gegenwart physiologisch wirksamer Konzentrationen eines polyvalenten Liganden nicht weiterzuleiten.

Das Dimer, das durch Wechselwirkungen mit einem gelösten polyvalenten Molekül gebildet wird, kann ein Homodimer oder ein Heterodimer sein. In beiden Fällen sind die oben genannten qualitativen Aussagen gültig. Ein Beispiel für Heterodimerisierung ist die Bindung des Platelet-derived-growth-factor (PDGF) an die Zelloberfläche. Die PDGF-A-Kette bindet nur an α -Rezeptoren, während die PDGF-B-Kette sowohl an α - wie auch an β -Rezeptoren bindet. PDGF ist ein Dimer, dessen Komponenten durch eine Disulfidbrücke kovalent verbunden sind. Das AA-Dimer induziert das $\alpha\alpha$ -Rezeptor-Homodimer, das AB-Dimer induziert das $\alpha\beta$ -Rezeptor-Heterodimer, und das BB-Dimer induziert alle drei Rezeptor-Dimer-Kombinationen.^[316]

In einigen Fällen bestimmt das Ausmaß der Polyvalenz des Liganden über die Frage, womit die Zelle wechselwirkt. Ein Beispiel ist die sogenannte „Positiv-gegen-Negativ-Selektion“ von T-Zellen im Thymus während des frühen Reifungsstadiums dieser Zellen.^[317] Direkte Vernetzung von TCR durch Antikörper, die gegen CD3 gerichtet sind, induziert selbst in Abwesenheit von MHC (Haupt-Histokompatibilitätskomplex) die Umwandlung von unreifen CD4⁺:CD8⁺-Zellen zu reifen CD4⁺-Zellen. Peptide, die eine hohe Affinität zu den MHC-Stellen auf den Endothelzellen haben, binden im Thymus in großer Zahl an MHC-Rezeptoren und

bilden zusammen mit dem MHC eine hochvalente Oberfläche, die mit unreifen CD4⁺:CD8⁺-T-Zellen wechselwirkt. Peptide hingegen, die eine niedrige Affinität zu dem MHC haben, weisen eine niedervalente Oberfläche gegenüber den passierenden T-Zellen auf. Niedervalente Aggregation scheint ein kritischer Faktor bei der positiven Selektion zu sein, die zu reifen T-Zellen führt. Hochvalente Aggregation scheint bei der negativen Selektion wichtig zu sein und führt wegen ausgedehnter Anlagerung der T-Zellen-Rezeptoren an der Schnittstelle zwischen T-Zelloberfläche und Thymus-Endothelzelle zum Tod der T-Zelle.

Viele Liganden-Wechselwirkungen sind nicht polyvalent und haben auch nichts mit Rezeptor-Dimerisierung zu tun: Adrenerge Rezeptoren und die Gruppe der Serpentin-Rezeptoren sind Beispiele dafür. Bei solchen Rezeptoren löst die Besetzung der Bindungstasche durch den Liganden eine spezifische Konformationsänderung aus, die ein Signal in das Zellinnere weiterleitet. Ein Beispiel, bei der die Gruppe der Integrin-Rezeptoren beteiligt ist, veranschaulicht die Effizienz und Flexibilität von biologischen Systemen: Sowohl Rezeptor-Besetzung als auch Rezeptor-Dimerisierung sind am selben Rezeptor wichtige Mechanismen.^[318] Integrin-Rezeptoren vermitteln die Zell-Anheftung, Signaltransduktion und die Organisation des Cytoskeletts. In einer Studie hatte die Besetzung von Rezeptoren mit monovalenten Liganden die Umverteilung der Rezeptoren, aber nur minimale Signalisierung durch Tyrosin-Phosphorylierung zur Folge. Die Aggregation von bivalenten, nichtinhibitorischen und auf der Oberfläche von Harzkügelchen immobilisierten Antikörpern (die die Bindungstasche des Integrin-Rezeptors, in die der Ligand paßt, nicht blockieren), löste die intrazelluläre Akkumulation von pp125^{FAK} und Tensin aus, aber nicht die Akkumulation von anderen Cytoskelett-Proteinen wie etwa Talin. Die Kombination der monovalenten Liganden mit diesen Antikörpern bewirkte die Akkumulation von sieben Cytoskelett-Proteinen, u.a. α -Actinin, Talin und F-Aktin, d.h., es wurden auf diese Weise multivalente Wechselwirkungen mit Fibronectin oder polyvalenten Peptiden (natürliche polyvalente Liganden für dieses Integrin) nachgeahmt. Insofern vermitteln Integrine ein komplexes Repertoire an Funktionen, als sie ausgeprägte Wirkungen auf die Rezeptorbesetzung, die Anlagerung an Rezeptoren oder beides haben.

4.5. Anlagerung polyvalenter Moleküle an andere polyvalente Moleküle: die Kontrolle der Transkription

Die Genexpression wird oft auf der Stufe der Transkription reguliert. Diese beginnt damit, daß sich die RNA-Polymerase an die Promotorregion der DNA anlagert, was sequenzspezifisch erfolgen muß. In den meisten Organismen wird die RNA-Polymerase durch ein Protein oder mehrere Proteine – Transkriptionsfaktor(en) – aktiviert, die an eine spezifische Stelle der DNA und der RNA-Polymerase binden. Sehr häufig findet man mehrere Kopien der DNA-Bindungsstelle vor (Paare bis Oktette), die den Transkriptionsfaktor erkennt. Ebenfalls sehr häufig kommt es vor, daß die Transkriptionsfaktoren selbst polyvalent sind. Bivalente Transkriptionsfaktoren (z. B. ein Leucin-Reißverschluß, Abb. 22) findet man

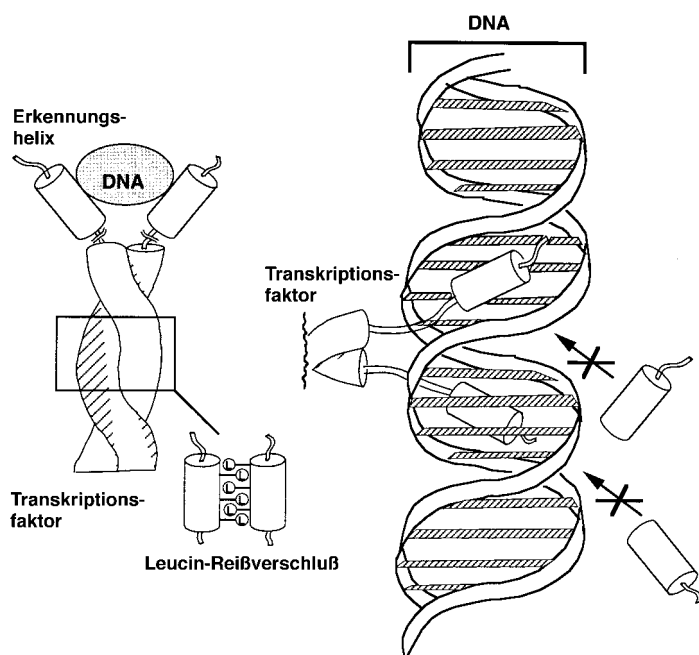


Abb. 22. Dimere Transkriptionsfaktoren. Zwei getrennte Polypeptideinheiten bilden eine Superspirale aus α -Helices, die durch einen Leucin-Reißverschluss stabilisiert wird und zwei Erkennungshelices in eine Position bringt, in der sie an Sequenzen der großen Furche der DNA binden.

in vielen Formen: Einige sind Homodimere und andere sind Heterodimere, einige sind kovalent verbrückt, andere nicht-kovalent. In fast allen Fällen binden die Transkriptionsfaktoren nicht als Monomere, sondern als Dimere oder Oligomere an die DNA: Die Polyvalenz wird bei der Transkription zur Bindungsverstärkung und Steigerung der Bindungsspezifität genutzt. In diesem Zusammenhang ist z. B. die Wechselwirkung der DNA mit dem RXR-Transkriptionsfaktor zu erwähnen (siehe Abschnitt 2). In diesem Beispiel führen kleine Änderungen der Konzentration des Transkriptionsfaktors, vermittelt durch einen polyvalenten Mechanismus, zu einer großen, nichtlinearen Steigerung der Transkriptionsgeschwindigkeit (die Transkriptionsgeschwindigkeit ist ungefähr proportional zu $[RXR]^5$). Die Gegenwart von mehr als zwei nichtdimerisierten „Hälften“ in einem Hormon-Antwort-Element ist nicht außergewöhnlich für RXR-Antwort-Elemente (Tabelle 7).^[319]

4.6. Anlagerung von Zellen an andere Zellen

Eine Reihe anderer Zell-Zell-Wechselwirkungen kann polyvalent sein (Tabelle 5). Beispiele hierfür sind die bereits in Abschnitt 2.3 beschriebene Anlagerung von Neutrophilen an Endothelzellen in der Nähe einer Gewebsverletzung und die Entfernung nicht sialylierter Zellen aus dem Blut durch die Leber (Abb. 23). Lee et al. haben umfassend die Rolle der Polyvalenz bei der Bindung von synthetischen bi- und trivalenten, Galactose-haltigen Liganden an Lectine des C-Typs auf der Oberfläche von Leberzellen untersucht.^[206] Ein Beispiel für Zellen, die im Verlauf ihres Alterungsprozesses zunehmend desialyliert werden, sind die Erythrocyten. Die Desialylierung ist eine Folge der Hydrolyseaktivität verschie-

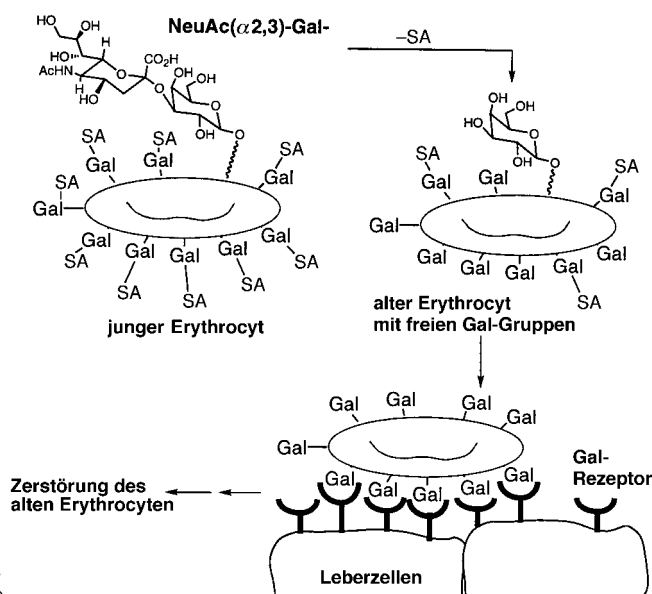


Abb. 23. Entfernung nicht sialylierter Erythrocyten aus dem Blut durch die Leber.

dener Neuraminidasen; dabei werden Galactosylgruppen freigelegt. Die Neuraminidasen können sowohl frei im Blut vorliegen wie auch an Endothelzellen gebunden sein, die das Innere der Blutgefäße auskleiden. Die Wahrscheinlichkeit der hepatischen Clearance kann mit der Wechselwirkungsenergie zwischen der Oberfläche der Leberzelle und dem Erythrocyten korreliert werden: Wenn die Dichte der Galactosyl-Liganden auf der Oberfläche des Erythrocyten steigt, vergrößert sich auch die Wechselwirkungsenergie. Sowie die Blutzelle altert, steigt auch die Dichte des „Clearance-Signals“ auf seiner Oberfläche, bis die Energie für die Wechselwirkung zwischen seiner Oberfläche und der Leberzelle ausreichend hoch ist, um die Verbindung und Beseitigung zu fördern. Die resultierende Lebenserwartung eines typischen roten Blutkörpers im menschlichen Blutkreislauf beträgt 120 Tage. Wir könnten uns vorstellen, daß Polyvalenz in diesem Beispiel als Teil eines Zeitgebers fungiert, der es dem Körper ermöglicht, das Alter von Erythrocyten zu beurteilen und die alten aus dem Blutkreislauf zu entfernen und zu zerstören.

Das dritte Beispiel für eine Zell-Zell-Wechselwirkung ist die Wechselwirkung zwischen einer Zelle, die Klasse-I-MHC (eine Klasse von Transmembranproteinen, siehe Abschnitt 4.4.1) sowie Antigene trägt, und einer CD8+-T-Zelle. Beide Zellen sind wesentliche Bestandteile des Immunsystems (Abb. 24). Die Antigen-tragende Zelle kann z. B. eine durch ein Virus infizierte Zelle sein: Ein kleiner Teil der von der Zelle produzierten proteinischen Virus-Komponenten wird intrazellulär zu Nonapeptiden abgebaut. Diese liegen auf der Oberfläche der infizierten Zelle als eine extrazelluläre Bindungstasche vor, und zwar für Klasse-I-MHC.^[320] Dieser Komplex wird durch einen komplementären T-Zellen-Rezeptor auf der Oberfläche einer CD8-tragenden (cytotoxischen) T-Zelle erkannt. Die Folgen eines einzelnen derartigen Erkennungsereignisses sind unbekannt, doch die Folge mehrerer solcher Ereignisse ist die Transduktion eines

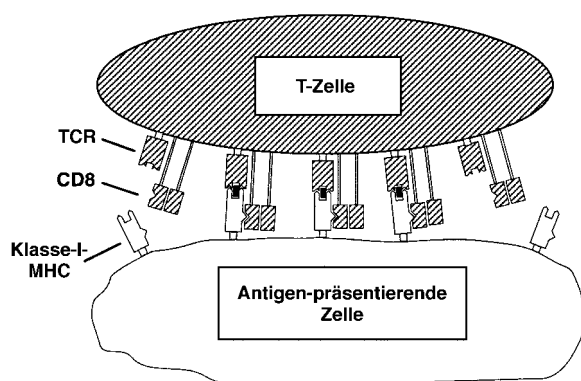


Abb. 24. Wechselwirkungen zwischen einer Antigen-präsentierenden Zelle, die Klasse-I-MHC trägt, und einer T-Zelle (die über T-Zellen-Rezeptoren (TCR) und CD8 verfügt). Klasse-I-MHC wechselwirkt mit CD8 und dem TCR.

Signals in das Innere der T-Zelle, das sie zum Töten der Zelle veranlaßt, die die Antigene trägt. Die Notwendigkeit zahlreicher diskreter Erkennungsereignisse verhindert die übermäßige Zerstörung von Zellen, die nicht infiziert sind, d.h., eine hohe Wechselwirkungsenergie, die auf mehrere Wechselwirkungen verteilt ist, geht mit einem hohen Grad an Sicherheit einher, daß die Zellen auch wirklich ein Virus in sich tragen.

Ein viertes Beispiel für Zell-Zell-Wechselwirkungen sei aus dem Bereich der Zellwanderung genannt. Eine gut untersuchte Wechselwirkung, die bei der Zellwanderung wichtig sein könnte, ist die zwischen dem Galactosyl-Transferase-(GalTase)-Protein auf einer Zelle und GlcNAc-terminierten Glycoproteinen und Glycolipiden auf einer anderen Zelle. Zellen exprimieren in unterschiedlicher Dichte GlcNAc und GalTase. Das Ausmaß der Genexpression kann mit der Zeit und der biologischen Umgebung variieren. Die Stärke der Bindung zwischen den Zellen hängt mit der Zahl der Kontaktstellen zwischen den beiden Oberflächen zusammen, und deshalb mit den Dichten von GlcNAc und GalTase. Schnaar et al. zeigten in einem klassischen Experiment, daß eine maligne Zelle, die auf ihrer Oberfläche GalTase exprimiert, entlang eines Konzentrationsgradienten von immobilisiertem GlcNAc wandert, während eine entsprechende Zelle, die nicht GalTase exprimiert, das nicht tut.^[341] Shur et al. haben gezeigt, daß Zellen, die GlcNAc exprimieren, entlang eines Konzentrationsgradienten von immobilisierter GalTase wandern.^[204] Diese Wechselwirkung zwischen GalTase und GlcNAc könnte bei einer Reihe von Zell-Zell-Wechselwirkungen wichtig sein, einschließlich solcher, die bei der Anlagerung oder Wanderung eines metastatischen Tumors an eine abgelegene Stelle (Abb. 25) oder der Befruchtung einer Eizelle durch ein Spermium von Bedeutung sind.^[318]

5. Bedeutung für die medizinische Chemie: polyvalente Arzneimittel

Polyvalenz ist in der Biologie allgegenwärtig. Ein Verständnis polyvalenter biologischer Systeme auf molekularer Ebene legt neue Strategien für den Entwurf von Arznei-

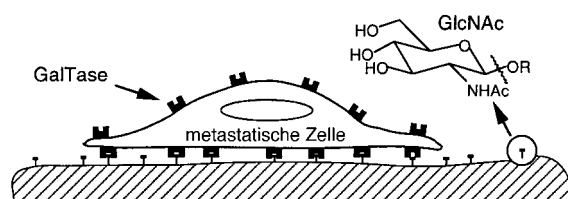


Abb. 25. Anheftung einer metastatischen Zelle an Laminin. GalTase wird am Rand wandernder Zellen exprimiert, wo es sich mit dem Cytoskelett verbindet und die Zellwanderung durch Bindung an Oligosaccharide vermittelt, die terminale N-Acetylglucosamin-Gruppen (GlcNAc) enthalten.

mitteln nahe. Grundsätzlich könnten polyvalente Moleküle agonistisch und antagonistisch wirken; bisherige Experimente zielten aber mehr auf die Hemmung unerwünschter biologischer Prozesse (\Rightarrow Antagonismus) als auf die Förderung gewünschter Prozesse (\Rightarrow Agonismus) ab.

5.1. Polyvalente Inhibierung

Ein polyvalenter Inhibitor hat zwei oder mehrere miteinander verbundene Liganden, die gleichzeitig an zwei oder mehreren miteinander verbundenen Rezeptoren wirken. Die Liganden können kovalent miteinander verbunden sein (durch einen Linker verknüpft,^[311, 313, 321–328] oder gebunden an ein Polymerrückgrat,^[2, 329, 330] an die Kopfgruppen eines Dendrimers^[331] oder an die Oberfläche eines kleinen Proteins) oder nichtkovalent verbrückt (gebunden an die Kopfgruppen eines Moleküls in Liposomen, Membranen oder auf Oberflächen^[194, 332, 333]). Beispiele für die verschiedenen Grundgerüste, die für den Bau polymerer Inhibitoren erfolgreich eingesetzt worden sind, sind in Tabelle 9 aufgeführt. Betrachtet man die Einfachheit der Synthese des Polymergrundgerüsts, die Flexibilität, mit der es synthetisch modifiziert werden kann, seine biologische Abbaubarkeit, seine Bioverfügbarkeit und seine Toxizität, so läßt jede Möglichkeit verschiedene Vor- und Nachteile erkennen. Ein Vorteil von Polyacrylamiden mit hohem Molekulargewicht ist z.B., daß sie effektivere Inhibitoren der durch das Influenzavirus ausgelösten Hämagglutination sind als Polyacrylamide mit niedrigem Molekulargewicht (Hämagglutination ist die Vernetzung von Erythrocyten, siehe Abschnitt 5.2). Nachteilig ist bei diesen Polyacrylamiden mit hohem Molekulargewicht dagegen, daß sie auch toxisch sind, weniger einfach durch die Niere ausgeschieden werden und schwieriger zu synthetisieren sind.

Ein Problem, das die Verwendung von bestimmten, extrem hochpolymeren Polymeren einschließlich Polyacrylamiden einschränken könnte, ist der Umstand, daß Moleküle, die die Größe eines Proteins von 60–70 kDa übersteigen, nicht mehr wirkungsvoll von der Niere filtriert werden können (hauptsächlich, weil solche Moleküle zu groß sind, um durch die Poren der Glomerulus-Kapillaren der Niere hindurchzutreten). Solche Moleküle müßten in der Leber enzymatisch abgebaut werden, was zu potentiell toxischen Metaboliten führen würde. Eine Strategie wäre die Verknüpfung von kleinen polyvalenten Inhibitoren über biologisch abbaubare

Tabelle 9. Beispiele für synthetisch hergestellte multivalente Liganden.

multivalenter Ligand	multivalenter Rezeptor	Assay	Bindungsverstärkung (β)
Polyacrylamid mit SA-haltigen Seitenketten, hergestellt durch Copolymerisation ^[334]	HA auf der Oberfläche des Influenzavirus X31	HAI ^[a]	$10^3 - 10^4$
Polyacrylamid mit SA-haltigen Seitenketten, hergestellt aus pNAS ^[2, 335]	HA auf der Oberfläche des Influenzavirus X31	HAI, OPTCOL	$10^5 - 10^8$
Polyacrylamid mit SA-haltigen Seitenketten, hergestellt aus pNAS ^[278]	HA auf der Oberfläche des Influenzavirus X31	ELISA-Bindungs-Assay	$10^4 - 10^5$
Poly(7-oxanorbornen) mit α -Mannose-haltigen Seitenketten, ^[336] hergestellt durch ROMP ^[d]	Concanavalin A	Concanavalin-A-vermittelter Zell-Agglutinations-Assay	5×10^4 bezogen auf α -Mannose
Poly(7-oxanorbornen) mit β -Glucose-haltigen Seitenketten, ^[330] hergestellt durch ROMP ^[d]	Concanavalin A	Concanavalin-A-vermittelter Zell-Agglutinations-Assay	2×10^3 bezogen auf β -Glucose
SA-haltige Dendrimere ^[331, 337]	HA auf der Oberfläche des Influenzavirus X31	Inhibierung von Meerrettich-Peroxidase	10^2
Dendrimer (Man- α) ₁₆ ^[337]	Concanavalin A	Inhibierung der Bindung von Concanavalin A an Hefe-Mannan	4
Dendrimer (NeuAc- α) ₁₅ ^[338]	Lectin (<i>L. flavus</i>)	Inhibierung der Bindung von Lectin an Orosomucoid	12
Dendrimer (<i>N</i> -Acetyllactosamin) ₂₋₈ ^[339]	<i>Erythrina-cristagalli</i> -Lectin	Inhibierung der Wechselwirkung von Lectin und Mucin aus Schweinemagen (IC 50)	1 – 10
Dendrimer (GlcNAc) ₂₋₈ ^[339]	Weizenkeim-Agglutinin	Inhibierung der Wechselwirkung von Lectin und Mucin aus Schweinemagen (IC 50)	1 – 10
SA-haltige Liposomen ^[332, 333]	HA auf der Oberfläche des Influenzavirus X31	HAI	$10^4 - 10^6$
Liposomen, die 332 Antikörper enthalten (664 Bindungsstellen) ^[340]	modifizierte Erythrocyten	Fluoreszenzlöschung	2 – 10
Liposomen, die sLe ^x -Mimetika enthalten ^[194]	P-Selectin-IgG-Konjugat	Inhibierung der Bindung von P-Selectin-IgG an HL-60-Zellen	2×10^6
GalNAc, gebunden an BSA ^[b] (BSA(GalNAc) ₃₀) ^[341]	Oberflächenlectin aus Amöben	Inhibierung der <i>E.-histolytica</i> -Lectin-vermittelten Bindung von humanen Erythrocyten	1.4×10^5
T-10 Fragmente (Glycopeptide) wurden polymerisiert	<i>M.-Prolifera</i> -Zellen	kompetitiver Test mit radioaktivem Monomer und unmarkiertem Polymer	1
α -Melanotropin (MSH), gebunden an TMV ^[c] ^[342]	Cloudman-S-91-Melanomzellen	agonistische Wirkung bei der Tyrosinase-Stimulation	6
dimeres α -MSH ^[343]	Melanocyten	funktionaler Melanocyten-Dispersions-Assay	7
Enkephalin-haltige Liposomen ^[344]	Rinderhirn-Homogenate	Verschiebung von radioaktivem (³ H-markiertem) Enkephalin	13
α_2 -Makroglobulin (4- <i>O</i> -Ac-Neu5Ac) ^[345, 346]	HA auf der Oberfläche des Influenzavirus X31	HAI	10^5
mono-, di-, tri- und tetraantennäre Galactosederivate ^[347]	Leberzellen aus Kaninchen ^[348]	Inhibierung von radioaktiven Glycopeptiden	10^5 (triantennär)
triantennäre Galactoside ^[349]	Leber-Asialoglycoprotein-Rezeptor	in vivo	2×10^3
bivalente SA ^[279, 280]	Influenzavirus (Hämagglutinin)	Bindungstest (¹ H-NMR)	10^2
bivalentes sLe ^x ^[196]	E-Selectin	Inhibierung der Anheftung von E-Selectin an HL-60-Zellen	5
bivalentes sLe ^x - <i>O</i> -Glycan ^[350]	Lymphocyten	Inhibierung der Anheftung von Lymphocyten an Endothelzellen	> 50
bivalentes Cyclosporin ^[351]	Cyclophilin (Cyp) A	Fluoreszenztitrations-Assay	ca. 1 für monomeres Cyp, > 1 für Membran-gebundenes Cyp

Fortsetzung von Tabelle 9.

multivalenter Ligand	multivalenter Rezeptor	Assay	Bindungsverstärkung (β)
bivalente Indole, die durch unterschiedlich lange Alkylketten verknüpft sind ^[352]	Serotoninrezeptoren: 5HT _{1A} , 5HT _{1D} , 5HT _{1E} und 5HT _{1F}	nicht spezifiziert	4(10) ²
bivalentes L-Lys-D-Ala-D-Ala, mit starrem Linker (10 Å) ^[353, 354]	synthetisches bivalentes Vancomycin, das durch einen Succinyl-Linker verknüpft ist	kompetitiver Test mit dem Monomer durch Kapillarelektrophorese, Fluoreszenz und Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR)-Assays	10 ³
bivalente Opioid ^[355]	Hirnmembranen aus Meerschweinchen	Inhibierung von radioaktivem Ethylketazin	20

[a] Hämagglutinations-Inhibierungs-Assay. [b] Rinder-Serumalbumin. [c] Tabakmosaikvirus. [d] Ringöffnungs-Metathese-Polymerisation.

Brücken. Die Geschwindigkeit der Hydrolyse dieser Brücken müßte größer sein als die Geschwindigkeit, mit der diese Polymere in der Leber aufgenommen werden. Andererseits ist anzunehmen, daß es bestimmte hochmolekulare Polymerstrukturen gibt, die sich in vivo gutartig verhalten.

Polyvalente Inhibitoren, die an das pathogene Teilchen binden, haben Vorteile gegenüber Inhibitoren, die an den Wirt (Rezeptor) binden. Im Prinzip ist es gleichgültig, welchen der beiden Partner eines Liganden-Rezeptor-Paares man als Basis für ein polyvalentes Arzneimittel verwendet, um ihre Wechselwirkung zu inhibieren. Zwar sollte eine Strategie, die auf dem Binden eines Pathogens beruht, allgemein mit geringeren Nebenwirkungen einhergehen als eine Strategie, die auf dem Binden der für den Rezeptor charakteristischen Moleküle beruht. Im Falle nichtinfektiöser Krankheiten ist die Wahl aber weniger eindeutig, da für den Patienten beide Partner des Liganden-Rezeptor-Paares natürlich erscheinen könnten.

5.2. Der Mechanismus der polyvalenten Inhibierung

5.2.1. Inhibierung der Anlagerung eines Virus an eine Wirtszelle

Wir^[1, 2] und andere (Matrosovich et al.,^[329, 356] Roy et al.,^[357, 358] Gamian et al.^[359] und Sabesan et al.^[360]) haben eine breite Palette an Polymeren entwickelt, die die Anlagerung des Influenzavirus an Erythrocyten hemmen, die ersatzweise als Zielzellen dienen. Von allen polyvalenten Wechselwirkungen ist diese gegenwärtig am umfassendsten untersucht und dient als prototypisches System, auf dem viele unserer Schlußfolgerungen aufbauen. Die zur Zeit wirkungsvollste Inhibitorenklasse ist das lineare Polymer Polyacrylamid, das über mehrere Kopien des C-Glycosids der Sialinsäure (SA) als Seitenkette verfügt (Abb. 26): Das wirksamste Polymer dieser Klasse verhindert die Hämagglutination (die Vernetzung von Erythrocyten) durch Viren bei einer Konzentration von 35 pM, wohingegen das monomere α -Methylsialosid die Hämagglutination bei einer Konzentration von >2 mM hemmt (zu Details dieser SA-HA-Wechselwirkung siehe Abschnitt 4.2).^[2, 335] Die 10⁸-fache Steigerung der Fähigkeit zur Hämagglutination ist unseres Wissens die größte bekannte Aktivitätssteigerung für ein synthetisches polyvalentes System überhaupt. Da wir die Zahl der Bindungsstellen

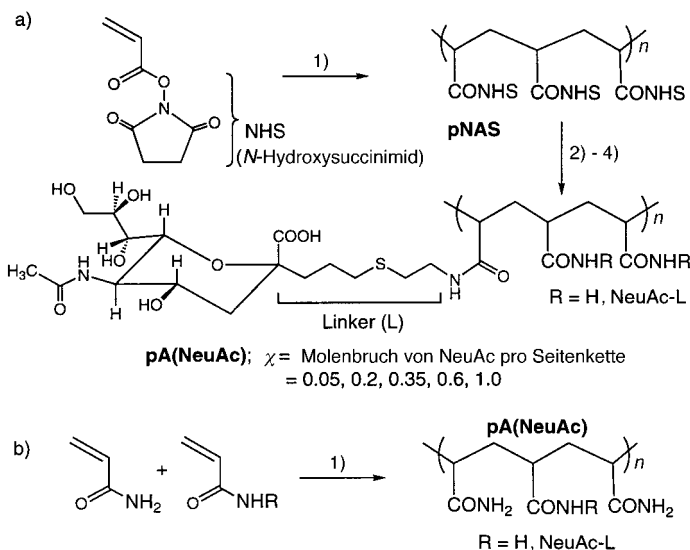


Abb. 26. Synthese von Polyacrylamiden, deren Seitenketten über mehrere Kopien von α -C-Sialosiden, pA(NeuAc), verfügen. a) Umsetzung eines aktivierten Esters von Poly(*N*-acryloyloxysuccinimid) (pNAS). 1) Radikalische Polymerisation; 2,2'-Azobisisobutyronitril (AIBN), Tetrahydrofuran (THF), 60 °C. 2) χ Moläquivalente NeuAc-L-NH₂ (pro Mol aktivierten Esters des Polymers), Triethylamin (Et₃N), *N,N*-Dimethylformamid (DMF), Raumtemp. 3) NH₃ im Überschuß, 4) Dialyse gegen destilliertes Wasser. Durch Variation der Zahl der Äquivalente an NeuAc-L-NH₂ wurden fünf Polymertypen, pA(NeuAc, χ = 0.05, 0.2, 0.35, 0.6, 1.0) hergestellt; hierbei gibt χ den Molenbruch von NeuAc in den Polymeren an und ist als die Zahl der NeuAc-tragenden Seitenketten dividiert durch die Gesamtzahl der Seitenketten definiert. b) Direkte radikalische Copolymerisation einer Mischung aus zwei oder mehreren monomeren Acrylamiden.

(*N*) zwischen dem Polymer und der viralen Oberfläche nicht kennen, können wir keine Aussage zum Kooperativitätsgrad α der Verbindung treffen [Gl. (8)]. Ungeachtet des Ausmaßes der Kooperativität sind die polyvalenten Inhibitoren aber bemerkenswert wirksam und könnten wegweisend für eine Strategie zur Hemmung von Wechselwirkungen zwischen zwei polyvalenten Oberflächen sein. Die β -Werte für eine Reihe von polymeren Inhibitoren sind viel größer als 1; daher sind sie als eine potentiell sehr nützliche Inhibitorenklasse anzusehen.

Dieses System ist hinsichtlich des Mechanismus der Wechselwirkung polyvalenter Inhibitoren am ausführlichsten erforscht worden, und die entscheidenden strukturellen Faktoren, die die Wirksamkeit bestimmen, sind gut bekannt. Der

Assay, der hauptsächlich zur Evaluierung polyvalenter polymerer Inhibitoren bei der Anlagerung von Influenzaviren genutzt wird, ist der Hämagglutinations-Inhibitions(HAI)-Assay. Dieser Test mißt die niedrigste Inhibitorenkonzentration (bezüglich Sialinsäuregruppen, die entweder frei in Lösung oder an einem polyvalenten Träger gebunden sind), die die Hemmung der viral vermittelten Vernetzung von Erythrocyten ermöglicht (Abb. 27).

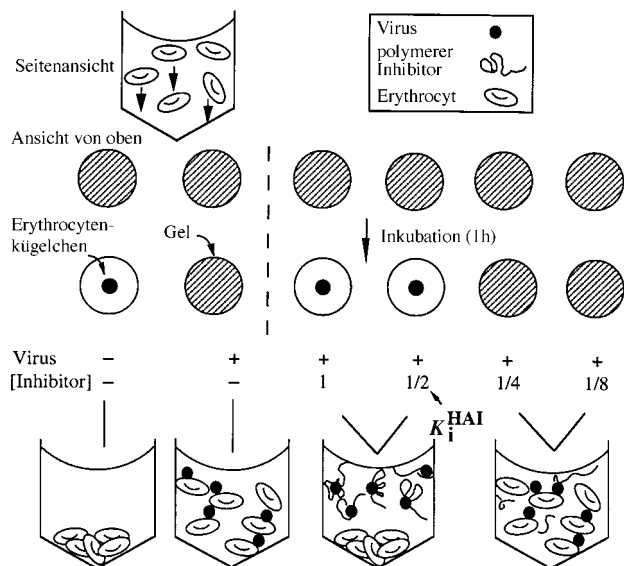


Abb. 27. Schematische Darstellung des HAI-Assays. Dieser Test erfordert ein aufeinanderfolgendes Mischen von drei Komponenten in der Mulde einer Mikrotiterplatte. 1. Inkubation (30 min) des Virus und Inhibitors (bei verschiedenen Konzentrationen), 2. Zugabe der Erythrocyten zur Mischung, anschließend ca. 1 h Inkubation. Die Mulde (250 μ L) wird von der Seite und von oben betrachtet. Die Hämagglutination (d. h. Gelbildung) ist durch die Striche im Kreis und ein Erythrocytenkügelchen ist als schwarzer Punkt dargestellt. Die Konzentration des Inhibitors beträgt in der dritten Mulde von links eine Einheit und ist dann in den rechts davon stehenden Mulden der Reihe nach jeweils um den Faktor 2 erniedrigt worden. Der Wert für die niedrigste Inhibitorenkonzentration, bei der die Hämagglutination noch gehemmt wird, betrug in diesem Fall 0.5 Einheiten.

Im Prinzip gibt es zwei verschiedene Wirkungsmechanismen für die polyvalente Hemmung des Influenzavirus an Erythrocyten, die als Summe zur ermittelten Inhibierungskonstante K_i^{HAI} beitragen (Abb. 28): 1. entropisch verstärkte kompetitive Inhibierung und 2. sterische Stabilisierung. Wir haben Experimente durchgeführt, bei denen die Ergebnisse der Hemmung der Hämagglutination in beide Beiträge aufgeschlüsselt wurden, und wir haben dabei gezeigt, daß beide Wirkungsmechanismen von Bedeutung sind.

5.2.2. Kompetitive Inhibierung

Wir definieren diesen Mechanismus als den Prozeß, der durch die Bindung des Inhibitors (eines strukturellen Analogons der Sialinsäure, SA) an HA beschrieben wird und deshalb kompetitiv die Bindung von zellulärer SA an virales HA verhindert. Die Fähigkeit eines über SA-Gruppen verfügenden Inhibitors, eine Wechselwirkung kompetitiv zu hemmen, hängt direkt mit der Dissoziation von der viralen Oberfläche zusammen. Abbildung 29 beschreibt drei zusammenhängende Gleichgewichte und ihre zugehörigen Bin-

Inhibierung der Anheftung

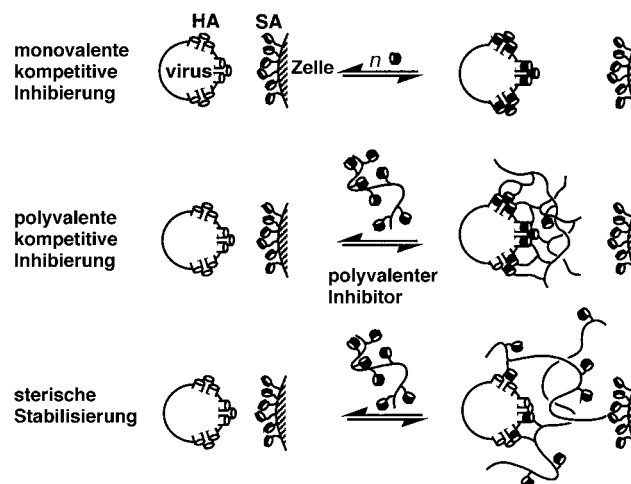


Abb. 28. Beispiel der Hemmung einer unerwünschten polyvalenten Wechselwirkung polyvalenter Moleküle. Das Influenzavirus lagert sich durch polyvalente Wechselwirkungen von HA mit SA an die Wirtszelle an. Monomere Moleküle, die über SA-Gruppen verfügen, hemmen die Anlagerung durch kompetitive Hemmung, wohingegen polymere Moleküle die Anlagerung durch die Kombination von zwei konzeptionell verschiedenen Grenzmechanismen hemmen: 1. hochaffine Bindung, bedingt durch Polyvalenz (polyvalente kompetitive Hemmung), und/oder 2. sterische Stabilisierung einer Oberfläche (sterische Hemmung).

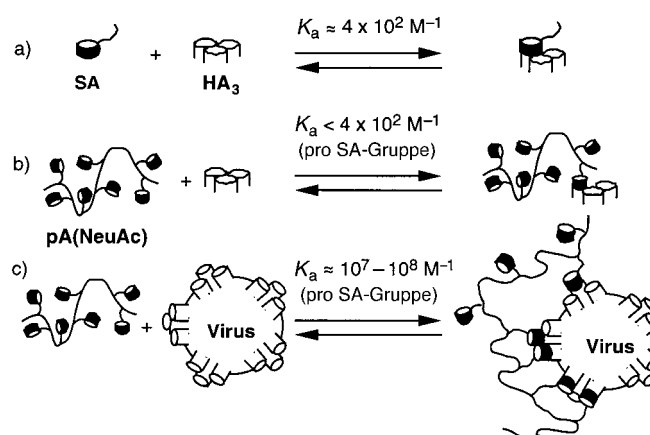


Abb. 29. Bindungskonstanten (K_a) für die Bindung zwischen Sialinsäure (SA, NeuAc) und Hämagglutinin (HA): a) monomeres SA und HA von HA₃; b) SA von polyvalentem Polyacrylamid, pA(NeuAc), und HA von HA₃; c) SA von polyvalentem Polyacrylamid, pA(NeuAc), und HA auf der Virusoberfläche.

dungskonstanten: Die Konstante für die Bindung zwischen monomerem SA und trimerem Hämagglutinin (HA₃) beträgt auf SA bezogen $4 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$; diejenige zwischen Polyacrylamid, das mehrere Kopien von SA vorweist, und HA₃ ist $< 10^2 \text{ M}^{-1}$ (unmeßbar klein bei Anwendung von NMR- und Fluoreszenz-Meßmethoden);^[1] die Konstante für die Bindung zwischen polymerem SA und HA von der viralen Oberfläche beträgt $10^7 - 10^8 \text{ M}^{-1}$.^[278] Der Vergleich der Größenordnungen dieser Gleichgewichte ist aufschlußreich: Trotz des höheren Polyvalenzgrades scheint das Polymer schwächer an HA₃ ($N=3$) zu binden als das monomere SA ($N=1$). Diese niedrigere Affinität des Polymers zu HA₃ könnte auf eine

sterische Hinderung bei der Wechselwirkung zwischen jeder SA-Gruppe und seiner Bindungstasche auf HA₃ zurückzuführen sein, die von dem großen, durch das Wasser gequollenen Polymerrückgrat herrührt. Die Bindung des polyvalenten SA an die polyvalente Oberfläche des Virus (die mehrere HA₃-Rezeptoren exprimiert) ist jedoch wesentlich wirksamer als die Bindung von polyvalentem SA an HA₃. Das heißt, durch Erhöhung des Polyvalenzgrades von $N=3$ auf $N \approx 10-10^2$ (die Zahl von HA-Rezeptoren, die an ein polymeres Molekül gebunden sind) ist jegliche sterische Behinderung bei der Bindung überkompensiert worden.

Da die Bindungskonstante K_a eine direkte Maßzahl für die Fähigkeit eines Inhibitors zur kompetitiven Hemmung ist, liefert der Vergleich der Werte von K_a und $1/K_i^{\text{HAI}}$ (K_i^{HAI} hat die Einheiten einer Dissoziationskonstante, $1/K_i^{\text{HAI}}$ die einer Bindungskonstanten) eine Maßzahl für die Bedeutung der kompetitiven Inhibierung für die Verhinderung der Hämagglutination. Wir haben die Bindung eines Virus an ein Polyacrylamid untersucht, bei dem 20 % der Seitenketten mit SA derivatisiert waren.^[278] Das Polymergemisch wurde in Fraktionen aufgeteilt, die sich in der Molmasse unterschieden. Wir haben gezeigt, daß die K_a -Werte dieser Polymere im Bereich von 10^6-10^8 M^{-1} lagen. Andererseits variierte der Wert für $1/K_i^{\text{HAI}}$ zwischen 10^7 und 10^9 M^{-1} . Die Fähigkeit des polyvalenten Inhibitors, fest an die virale Oberfläche zu binden, erklärt also einen Großteil, aber nicht das gesamte Ausmaß der gesteigerten Wirksamkeit im Vergleich zu monovalenten Inhibitoren.

5.2.3. Sterische Stabilisierung

Dieser Mechanismus umfaßt die Hemmung der Wechselwirkung zwischen der viralen Oberfläche und der zellulären Oberfläche, und zwar auf einem anderen Weg als durch kompetitive Besetzung der Bindungstaschen des Hämagglutinins. Wir stellen uns vor, daß das Polymer eine lose, durch Wasser gequollene, gelartige Schicht auf der viralen Oberfläche bildet. Diese Schicht verhindert sterisch die dichte Annäherung der zellulären Oberfläche. Ein analoger Mechanismus könnte eine wichtige Rolle beim Vorgang spielen, bei dem durch Addition von hydrophilen Polymeren wie etwa Polyethylenglykol oder Polyacrylsäure Mikropartikel in einer Suspension stabil gehalten werden, wie es häufig in der Nahrungsmittelindustrie getan wird. In einem Grenzfall könnte das Polymer, das SA-Gruppen aufweist, mit sehr niedriger Affinität binden, aber ein einzelnes Bindungsereignis bringt das große, durch Wasser gequollene Polymer an die virale Oberfläche heran.

Wir haben zwei Arten von Experimenten durchgeführt, die zeigen, daß sterische Stabilisierung bei der Hemmung von Virus-Zell-Wechselwirkungen durch polymere polyvalente Moleküle wichtig sein könnte: Das erste Experiment ist indirekter Natur, und wir beschreiben es weiter unten. Unser Ergebnis war: Selbst wenn das untersuchte Polymer bei der Hemmung der Hämagglutination $1/K_i^{\text{HAI}} \approx 10^7$ mal wirksamer war als analoge Monomer, so war die Affinität des Polymers zur viralen Oberfläche nur 10^6 mal höher. Das bedeutet, daß der zusätzliche Faktor von 10 wahrscheinlich auf einen anderen Mechanismus als den der Affinität zurückzuführen

war, und wir stellen die Hypothese auf, daß diese zusätzliche Verstärkung der sterischen Stabilisierung zuzuschreiben ist.

Das zweite Experiment ist direkter als das erste: Wir versuchten, die Fähigkeit eines gegebenen Polymers zu steigern, ein Virus sterisch zu stabilisieren und gleichzeitig die Affinität dieses Polymers zur Virusoberfläche zu vermindern.^[361] Zuerst beschreiben wir das Experiment und die Ergebnisse, dann betrachten wir diese Ergebnisse im Hinblick auf einen möglichen Mechanismus. Die SA-Gruppen am Polymer binden an zwei Stellen auf der Oberfläche des Virus: an HA und NA (Neuraminidase, ein zweites Protein auf der Oberfläche des Virus, das weniger häufig vorkommt als HA). Die Bindung von SA an beide Bindungsstellen könnte bei der Bestimmung der Affinität des Polymers zur Oberfläche des Virus wichtig sein. Wir synthetisierten drei verschiedene monomere Inhibitoren für NA, die nur untergeordnet an HA binden und die allein selbst bei so hohen Konzentrationen wie 40 mM die Agglutination nicht hemmen. Wir fanden heraus, daß die Addition aller drei NA-Inhibitoren zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der Wirksamkeit des Polymers führte, die virale Hämagglutination zu hemmen (Abb. 30). Dabei hing diese Wirkungssteigerung von der Affinität des NA-Inhibitors zu NA ab. Wir stellten außerdem fest, daß bei Polymeren mit hohem Sialinsäureanteil die Verstärkung in Gegenwart von NA-Inhibitoren 20fach war. Bei Polymeren, die ein niedrigeres Sialinsäure-Molverhältnis aufwiesen, war die Verstärkung zweifach oder weniger.

Der Austausch einer mit NA wechselwirkenden Sialinsäuregruppe auf dem Polymer gegen einen NA-Inhibitor würde zwei Folgen haben (Abb. 31): Er würde die Affinität des Polymers zur Virusoberfläche verringern (d.h. die Gesamtzahl der Liganden-Rezeptor-Wechselwirkungen vermindern) und würde die Größe der Polymerschleifen erhöhen, die von der Oberfläche des Virus abstehen, und somit die Fähigkeit des Polymers steigern, die Annäherung einer anderen Oberfläche an das Virus zu hemmen (sterische Stabilisierung). Die NA-Moleküle heben sich nur 50 Å von der viralen Oberfläche ab, während HA-Moleküle 100 Å von der Oberfläche abstehen. Das Lösen von tiefliegenden Bindungen des Polymers mit NA-Bindungsstellen könnte eine effektivere Barriere zwischen der Oberfläche des Erythrocyten und den SA-Bindungsstellen an den Spitzen der HA schaffen. Dieses Beispiel zeigt, daß sterische Stabilisierung nicht nur ein wichtiger Wirkungsmechanismus für polyvalente Inhibitoren ist, sondern auch moduliert werden kann.

Der Mechanismus der polyvalenten Inhibierung dürfte sicherlich vom betrachteten System abhängen, doch haben wir durch eine Auswahl an Experimenten gezeigt, daß eine hohe Affinität und ein hohes Maß an konformativer Flexibilität gewünschte Eigenschaften dieser polyvalenten Inhibitoren sind. Die sterische Stabilisierung könnte eine neue Strategie beim Design wirksamer Arzneimittel werden. Im Prinzip könnten wir z.B. im Fall von infektiösen Agentien polyvalente Inhibitoren gegen deren Anlagerung entwickeln, wobei jedes Molekül in Frage kommt, das fest an die Oberfläche des infektiösen Agens bindet. Wir sind dabei nicht auf Polymere mit Gruppen beschränkt, die bei der Anlagerung unmittelbar beteiligt sind. Zum Beispiel könnten monomere Inhibitoren der Neuraminidase, die nicht bei der

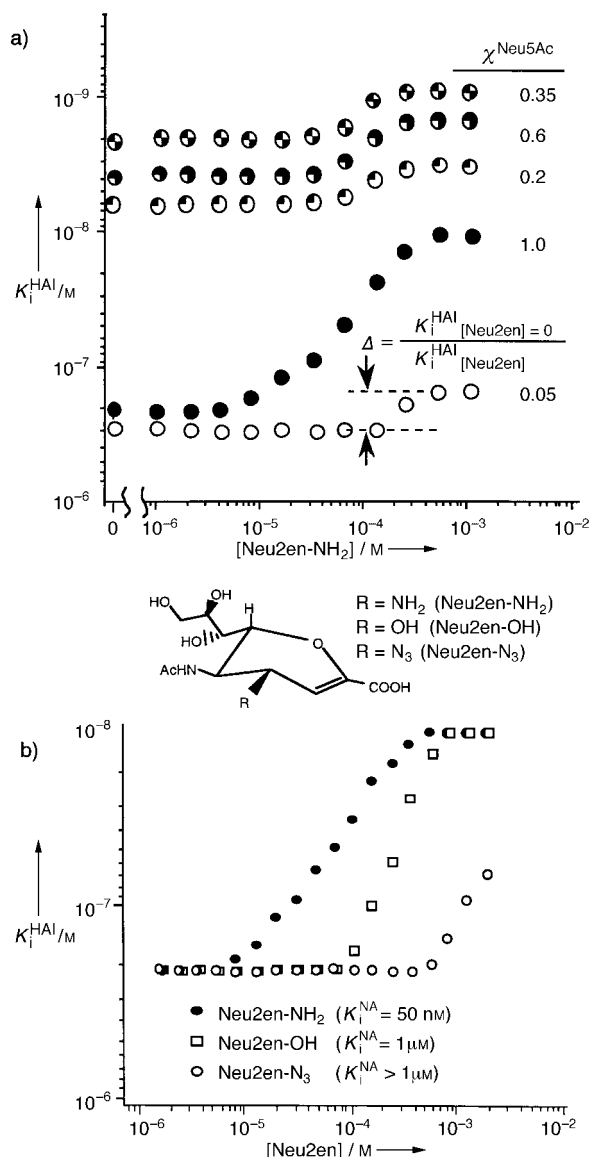


Abb. 30. Steigerung der Wirksamkeit des polymeren Sialinsäure-Inhibitors durch Zugabe monomerer Neuraminidase(NA)-Inhibitoren (Neu2en). a) Die Werte von pA(NeuAc) ($\chi^{\text{NeuAc}} = 0.05, 0.2, 0.35, 0.6, 1.0$) sind als Funktion der Konzentration von Neu2en-NH₂ (50 nm bis 50 mM) dargestellt. Die Gegenwart von Neu2en-NH₂ in Konzentrationen $\geq 0.5 \text{ mM}$ steigerte in dem System die Wirksamkeit der Hämagglutinationshemmung durch pA(NeuAc) um das 2–20fache (die Steigerung ist definiert als $\Delta = (K_i^{\text{HAI}}[\text{Neu2en}] = 0)/(K_i^{\text{HAI}}[\text{Neu2en}])$). Die Steigerung der Wirkung war mit dem Polymer pA(NeuAc, $\chi^{\text{NeuAc}} = 1.0$) am größten (etwa 20fach). b) Die Werte der Inhibierungskonstante K_i^{HAI} für pA(NeuAc, $\chi^{\text{NeuAc}} = 1.0$) wurden in Abhängigkeit von der Konzentration dreier verschiedener Neu2en gemessen (Neu2en-NH₂, -OH, und -N₃). Die erforderlichen Konzentrationswerte, die zum Erreichen der halbmaximalen Steigerung, $[\text{Neu2en}]/2\Delta$, notwendig waren, betrugen 70 μM , 300 μM und $\geq 2 \text{ mM}$ für Neu2en-NH₂, Neu2en-OH bzw. Neu2en-N₃. Die Datenmenge ist zwar gering, doch scheint eine Korrelation zwischen $[\text{Neu2en}]/2\Delta$ und den Werten von K_i^{HAI} zu bestehen.

Anlagerung von Influenza an Zellen beteiligt sind, an Polymere gebunden sein, um die Anlagerung sterisch zu verhindern.^[362, 363] Diese Polymere könnten durch Bindung an die Oberfläche und die Bildung einer wäßrigen Gelschicht auf der Oberfläche eines Virus oder Bakteriums wirken. Auf diese Weise könnten Polymere eines Arzneimittels dessen eigentlichen Wirkungsmechanismus verändern. Wenngleich

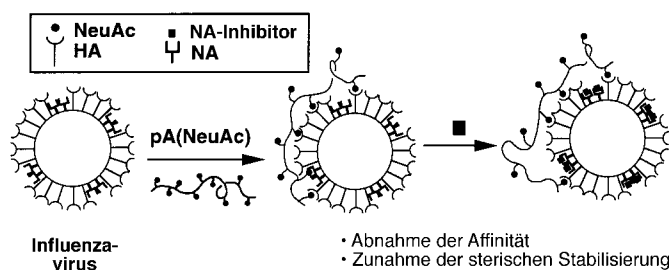


Abb. 31. Hypothetischer Mechanismus zur Beschreibung der Wirkungsarten von pA(NeuAc) bei der Inhibierung der Influenza-vermittelten Hämagglutination und die Auswirkung von NA-Inhibitoren auf die HAI-Aktivitäten von pA(NeuAc). Man nimmt an, daß die Gegenwart von NA-Inhibitoren NeuAc von aktiven Bindungsstellen löst, und zwar von NA-Bindungsstellen und/oder HA-Bindungsstellen, was dann zur Ausdehnung der Gelschichten führen könnte.

es für solche Wirkstoffe gegenwärtig keine Beispiele gibt, haben wir bei Verwendung von polymeren NA-Inhibitoren kürzlich einige vielversprechende Ergebnisse erhalten: Diese Polymere binden nicht HA, trotzdem hemmen sie wirkungsvoll die Hämagglutination.^[363]

Wir haben Experimente mit dem Influenzavirus beschrieben, deren Ergebnisse darauf hindeuten, daß die sterische Stabilisierung einen wichtigen Beitrag zu den Eigenschaften von großen polymeren Strukturen liefern könnte, die gegen die Bindung des Influenzavirus gerichtet sind. Unter der Annahme, daß unsere Vorstellungen über die möglichen biochemischen Mechanismen für sterische Stabilisierung zutreffen, stellen wir uns vor, daß kleinere Strukturen (etwa die „Glyocluster“ von Lee et al.^[205]) mit geringerer Wahrscheinlichkeit zu einer signifikanten sterischen Stabilisierung ihrer Zielmoleküle führen. Diese Strukturen sind beinahe so groß wie Antikörper, und die Bedeutung sterischer Inhibierung bleibt für beide Strukturen noch zu ergründen.

5.3. Polyvalente Promotion

In Abschnitt 5.2 wurden synthetische Agentien beschrieben, die eine unerwünschte Anheftung von zwei polyvalent wechselwirkenden Oberflächen hemmen. Bis heute gibt es wenige Beispiele für synthetische polyvalente Moleküle, die ein Signal nach erfolgter Bindung auslösen und dadurch eine gewünschte Wechselwirkung fördern. Vier Beispiele wären zu nennen:

1. Gong et al. beschrieben ein Polymer, das mehrere Kopien von GlcNAc aufwies und nach Wechselwirkung mit der Oberfläche eines Spermiums die akrosomale Reaktion auslöste (siehe Abschnitt 4.4.1).^[253]
2. Carrithers et al. beschrieben bivalente Peptide, die auf G-Protein-gekoppelte Rezeptoren gerichtet waren.^[343] Die Ligandendomäne war entweder ein alpha-Melanocyten-stimulierendes Hormon, ein alpha-MSH-Rezeptor-Antagonist (alpha-MSH-ANT), oder Bombesin. Diese Liganden wurden in einem Melanocyten-Dispersions-Assay charakterisiert.
3. Wie ebenfalls in Abschnitt 4.4.1 bereits erwähnt, beschrieben Dembo et al. eine Reihe bivalenter Antigen-Moleküle, die mit IgE-Molekülen auf der Oberfläche von Mastzellen wechselwirken und dadurch Degranulation auslösen.^[226, 227, 324]

4. Mehrere Insulinmoleküle wurden über eine Amidbrücke an Polyacrylsäure geheftet.^[364] Auf einen Liganden bezogen, war dieses polyvalente Insulin (als ein Mitogen) aktiver als monovalentes (natürliches) Insulin.

5.4. Assays zur polyvalenten Wechselwirkung

Es gibt eine Reihe von Methoden zur Untersuchung, Beurteilung und Quantifizierung polyvalenter Wechselwirkungen. In einigen Assays kann die Affinität direkt gemessen werden, von der man die Gibbs-Wechselwirkungsenergie ableiten könnte. In anderen Tests läßt sich eine komplexe Summe vieler Eigenschaften ermitteln, von denen nur eine die Gibbs-Wechselwirkungsenergie ist. Diese anderen Eigenschaften können das Ausmaß der Hydratisierung, die Fähigkeit, ein Molekül oder eine Oberfläche sterisch zu stabilisieren und/oder die Fähigkeit zur Vernetzung multivalenter Rezeptoren einschließen. Wir werden hier keine Tests polyvalenter Materialien diskutieren, die über die Untersuchung ihrer lokalen Wirksamkeit hinausgehen (d.h. Tests, in denen die oft sehr spezielle Pharmakodynamik und Pharmakokinetik polyvalenter Materialien untersucht wird, die groß sind im Vergleich zu monovalenten Materialien und selbst Proteinen).

5.4.1. Methoden zur Bestimmung der Gibbs-Wechselwirkungsenergie eines polyvalenten Systems

Zur thermodynamischen Ermittlung einer Bindungskonstante müssen die relativen Anteile an unkomplexiertem und komplexiertem Liganden oder Rezeptor direkt oder indirekt gemessen werden. In Abhängigkeit von der Stabilität des Komplexes können verschiedene Methoden zur Anwendung kommen. Tabelle 10 gibt Beispiele für eine Auswahl an Methoden, die zur Messung polyvalenter Wechselwirkungen eingesetzt worden sind.

5.4.2. Komplexere Methoden zur Untersuchung der Polyvalenz

In-vitro-Aggregation

Es stehen einige Assays zur Verfügung, mit denen man die Fähigkeit eines polyvalenten Liganden bestimmen kann, einen polyvalenten Rezeptor zu binden (Ausfällung, Gelbildung, Aggregation). Zum Beispiel kann ein bivalenter Antikörper polyvalente Proteine in Immunopräzipitations-Assays ausfällen (Abb. 32). Wenngleich die Affinität der bivalenten Einheit dabei wichtig ist, können andere Eigenschaften genauso wichtig oder sogar noch wichtiger sein: Bei niedriger Konzentration kann der Antikörper nicht an den Polyrezeptor binden, bei einer bestimmten Konzentration kommt es zu einer Fällung, bei höherer Konzentration ist jeder Polyrezeptor von einem Antikörper umgeben, und die Fällung bleibt wieder aus. Hierbei entscheidet nicht allein die Affinität darüber, wann eine Ausfällung stattfindet.

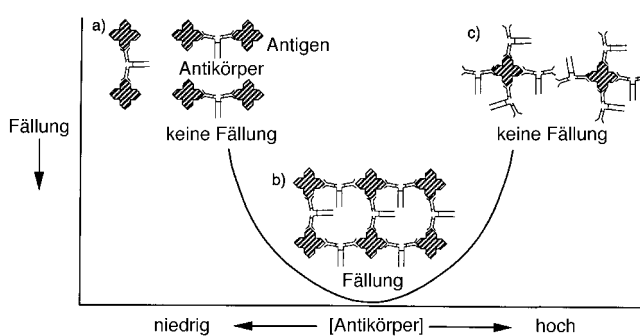


Abb. 32. Einfluß der Konzentration eines Antigens in einem Immuno-präzipitations-Assay. a) Bildung eines löslichen Antigen-Antikörper-Komplexes in Gegenwart eines Antigen-Überschusses. b) Bildung eines unlöslichen Komplexes (dargestellt durch ein weites Gitter) nahe dem Äquivalenzpunkt. c) Bildung eines löslichen Komplexes in Gegenwart eines Antikörper-Überschusses.

In-vitro-Inhibierung der Aggregation

Ein Beispiel eines Assays, der die Fähigkeit eines Moleküls mißt, zwei Oberflächen an der Wechselwirkung zu hindern, ist der HAI-Assay (Abb. 27). Wenn der Mechanismus der Inhibierung einer Wechselwirkung ausschließlich auf der kompetitiven Hemmung aller Liganden-Rezeptor-Paare basieren würde, wäre der Test nur von der durchschnittlichen Affinität eines jeden Liganden-Rezeptor-Paares im polyvalenten Molekül abhängig ($K_{\text{avg}}^{\text{poly}}$). In einem solchen Fall sollte ein identischer monovalenter Ligand (L) bei einer Konzentration $[L]^{\text{mono}} = K_{\text{avg}}^{\text{poly}}/K^{\text{mono}}$ die Wechselwirkung zweier Oberflächen mit gleicher Wirksamkeit verhindern. Wie wir gezeigt haben, kann aber die Fähigkeit eines polyvalenten Inhibitors, die Wechselwirkung zweier biologischer Oberflächen zu behindern, auch sterische Stabilisierung umfassen, wobei molekulare Eigenschaften wie etwa Größe, Grad der Hydratisierung und konformative Flexibilität eine Rolle spielen. Deshalb muß in Fällen, bei denen die sterische Stabilisierung eine wichtige Rolle bei der Inhibierung spielt, die Konzentration des monovalenten Analogons des Liganden höher sein als die effektive Ligandenkonzentration im polyvalenten Molekül ($[L]^{\text{mono}} > K_{\text{avg}}^{\text{poly}}/K^{\text{mono}}$), um genauso wirksam zu sein.

Eine Einschränkung des HAI-Assays ergibt sich durch die minimale Viruskonzentration, die zur Agglutination der Erythrocyten erforderlich ist.^[2] Diese Minimalkonzentration entspricht ungefähr 1 nM an Hämagglutinin-Protein im Meßgefäß. Der maximale Wert für K_i^{HAI} , der zuverlässig abgeschätzt werden kann, beträgt somit ungefähr 1 nM. Wir haben 1996 einen Assay beschrieben, bei dem zwei Teilchen, deren Abmessungen ungefähr 0.1–100 µm betragen, unter der genauen Kontrolle von zwei unabhängig geregelten „optischen Pinzetten“ miteinander kollidieren (Optically Controlled Collision, OPTCOL; Abb. 33–35).^[335] Dieser Assay ermöglicht die genaue Untersuchung der Anheftungswahrscheinlichkeit unter physiologischen Bedingungen. Nach einer Kollision sind die biochemisch und biomechanisch ausschlaggebenden Faktoren der Anheftung zwischen zwei biologischen Objekten sehr komplex und können vom einen zum anderen System variieren. Die Bestandteile der Lösung, die relative Orientierung, der Einschlagsparameter und die

Tabelle 10. Methoden zur Quantifizierung polyvalenter Wechselwirkungen.

Methode	Anwendungsbeispiel	ermöglicht Messung der			Bemerkungen
		Affinität	Hemmwirkung ^[a]	Kinetik	
Hämagglutinations-Inhibitions-Assay ^[2]	1. Inhibitoren der Influenza-Erythrocyten-Wechselwirkung, 2. Antikörper-Wechselwirkungen mit der Oberfläche zahlreicher Bakterien	nein	ja	nein	verbreitet, einfach durchführbar, im allgemeinen auf Inhibierungskonstanten > 1 nM beschränkt
ELISA-Assay ^[278]	Inhibitoren der Influenza-Erythrocyten-Wechselwirkung	ja	nein	nein	synthetisches Markieren der polyvalenten Spezies erforderlich, im allgemeinen auf Dissoziationskonstanten > 10–50 nM beschränkt
Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer ^[365]	Antikörper-Wechselwirkungen mit einer Zelloberfläche	ja	prinzipiell ja	nein	Modifizierung der Antikörper erforderlich, basiert auf Trennung und nachfolgender Quantifizierung gebundener und ungebundener Formen
OPTCOL-Assay ^[335]	Inhibitoren der Influenza-Erythrocyten-Wechselwirkung	nein	ja	nein	ermöglicht die Messung unter physiologisch relevanten Bedingungen (Kollisionsgeschwindigkeit von Zellen, relative Orientierung und andere Faktoren werden durch den Anwender kontrolliert); bei der Messung verwendet man eine einzelne Zelle und ein einziges Mikrokügelchen, das mit Viruspartikeln überzogen ist, die untere Grenze der meßbaren Inhibierungskonstante ist < 10 ⁻¹⁸ M
Affinitäts-Kapillar-Elektrophorese ^[333]	Dimere von Vancomycin wechselwirken mit D-Ala-D-Ala-Dimeren	ja	nein	nein	vielversprechende Methode, zahlreiche Erweiterungen mit anderen Systemen sind möglich und werden untersucht
Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR)	Antikörper-Bindung an synthetische Oberflächen mit unterschiedlichen Antigendichten (DNP, Anti-DNP-System); ^[366] Influenza-Bindung an immobilisiertes Hämagglutinin ^[367]	ja	nein	ja	mg-Mengen des polyvalenten Materials benötigt (bei den anderen hier aufgeführten Methoden sind die erforderlichen Mengen im allgemeinen hundertmal geringer); verwandte Methoden sind der Acoustic-Plate-Modus und der Oberflächenwellen-Modus, beide basieren auf der Erkennung kleiner Veränderungen der Dielektrizitätskonstante in der Nähe der Grenzfläche
Pipetten-Absaugen	1. zwei Erythrocyten, gebunden durch verschiedene Agglutinine, ^[368] 2. CD2-haltige Jurkatzellen, die an LFA-3 in einer planaren Membran haften ^[369]	prinzipiell ja	prinzipiell ja	nein	basiert auf der Quantifizierung der Deformationsenergie von komplementären Zelloberflächen während Adhäsion und Trennung (möglicherweise schwierig) oder auf Kräften, die zur Trennung zweier biologischer Oberflächen benötigt werden
Scherfluß ^[370–372]	Neutrophil-Wechselwirkung mit Oberflächen, die mit verschiedenen Selectinen nichtkovalent modifiziert sind	ja	prinzipiell ja	nein	basiert auf dem Zählen von Ereignissen (Bindung, keine Bindung) mit einem Lichtmikroskop; die Wahrscheinlichkeit der Anheftung wird in Abhängigkeit von der Fließgeschwindigkeit der Lösung an der Oberfläche gemessen
Dissoziation unter Gravitationseinfluß ^[373, 374]	Nierenzellen-Adhäsion an Wachstumsflächen (Nierenzellen aus grüner Vero-Meerkatze)	ja	nein	nein	Zeit bis zur Desorption von der Oberfläche wird gemessen und mit der Anheftungsstärke korreliert; fast immer werden Zentrifugalkräfte angewendet, um den Assay zu beschleunigen
lichtmikroskopisches Zählen der Aggregate ^[375]	Sperma-Ei-Wechselwirkung und Inhibierung dieser Wechselwirkungen	prinzipiell ja	ja	nein	basiert auf dem Zählen von Ereignissen (Bindung, keine Bindung) nach Schütteln; Wahrscheinlichkeit der Anheftung kann als Funktion der Inhibitorkonzentration gemessen werden (schwierig durchzuführen)
Kraftmikroskopie ^[376]	Streptavidin-haltige Oberflächen wechselwirken mit Biotin-haltigen Oberflächen	ja	prinzipiell ja	nein	hohe Empfindlichkeit (einzelne Molekül-Molekül-Wechselwirkungen können gemessen werden); teure Ausrüstung, erfordert die kovalente Anknüpfung kleiner Objekte
Lichtstreuung ^[377]	unseres Wissens nirgends	ja	prinzipiell ja	nein	

[a] Inhibierung von Oberflächen-Oberflächen-Wechselwirkungen. Die Wirksamkeit des Assays hängt sowohl von sterischer Stabilisierung als auch von der Affinitätssteigerung ab.

relative Geschwindigkeit unterliegen alle der Kontrolle des Experimentators. Genau diese Variablen beeinflussen aber auch die Adhäsionswahrscheinlichkeit in vivo. Wir haben den Nutzen des OPTCOL-Assays durch Bewertung der Wahrscheinlichkeit der Anheftung eines einzelnen Erythrocyten an ein einzelnes Virus-überzogenes Mikrokügelchen veranschaulicht, und zwar in Abwesenheit wie auch in Gegenwart eines Sialinsäuregruppen-tragenden Inhibitors (Abb. 34). Der

OPTCOL-Assay erfordert im Prinzip nur ein einzelnes Virus-überzogenes Mikrokügelchen und einen einzelnen Erythrocyten, und deshalb liegt die theoretische Obergrenze der Bindungskonstanten bei 10¹⁵ M⁻¹. Mit dem OPTCOL-Assay untersuchten wir Inhibitoren, deren Werte für 1/K_{avg}^{poly} zwischen 1 nM und 10 mM variierten. Bei Verwendung des HAI-Assays hatten vier Inhibitoren alle denselben Wert für die Inhibierungskonstante K_{avg}^{poly} geliefert (1 nM) und waren nicht

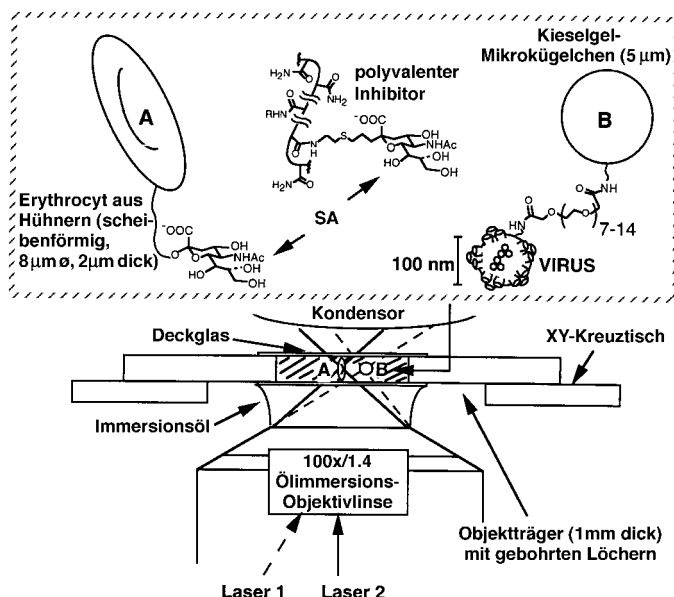


Abb. 33. Aufbau des OPTCOL-Experiments, bei dem Laser zur Quantifizierung der Wechselwirkung zwischen einem Erythrocyten („A“) und einem Mikrokügelchen, das kovalent mit einem Influenzavirus („B“) überzogen ist, eingesetzt werden. Ein 1 cm breites Loch wird in den Objektträger gebohrt und ein „Boden“ durch Verwendung eines Deckglases geschaffen. A, B und ein Inhibitor für die A-B-Wechselwirkung werden gepuffert in dieses so hergestellte 100- μ L-„Gefäß“ gefüllt. Ein zweites Deckglas wird zum Schließen des Gefäßes benutzt und der Objektträger in einem umgedrehten Mikroskop platziert. Das Mikroskop wird von zwei Laserquellen versorgt und jeder Laserstrahl durch eine Linse fokussiert. A und B werden in den Brennpunkten der beiden Laserstrahlen optisch „gefangen“ gehalten und können rasch und präzise in drei Dimensionen durch manuelle oder Computer-gestützte Bewegung der Brennpunkte bewegt werden. Dargestellt sind der Erythrocyt „A“ (mit SA, die kovalent an verschiedene Proteine und Lipide, eingebettet in der Zelloberfläche, gebunden ist), das Mikrokügelchen „B“ (an dessen Oberfläche das Virus kovalent angeheftet ist) und der polymere Inhibitor (siehe auch Abb. 34).

unterscheidbar. Mit dem OPTCOL-Assay konnten wir dagegen diese vier Inhibitoren einfach unterscheiden, und der beste Inhibitor verhinderte in 50 % der Fälle die Anlagerung bei einer Sialinsäurekonzentration von 35 pmol L^{-1} . Es ist der potenteste Inhibitor für die Anlagerung des Influenzavirus an Erythrocyten, der zur Zeit bekannt ist. Wir betonen, daß dieser Assay empirisch ist: Er funktioniert, weil er mit Daten kalibriert werden kann, die auf anderem Wege erhalten wurden.

Der OPTCOL-Assay ist ein nützlicher neuer Bioassay zur Untersuchung dynamischer Wechselwirkungen in der Biochemie. Er bietet einen Ansatz zur Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen sich bewegenden biologischen Objekten und liefert quantitative und interpretierbare Ergebnisse. Die Einfachheit der OPTCOL-Technik legt eine breite Anwendbarkeit beim Studium der Anheftung von 0.1–100 μm großen Teilchen nahe, wobei relevante Parameter aus der Zellbiologie, der Mikrobiologie, der medizinischen Chemie und der Biophysik einfließen können.

In-vivo-Assays

In-vivo-Assays messen den Gesamterfolg der Inhibierung beim Schutz von Tieren gegen Infektionen. Zu diesen Tests

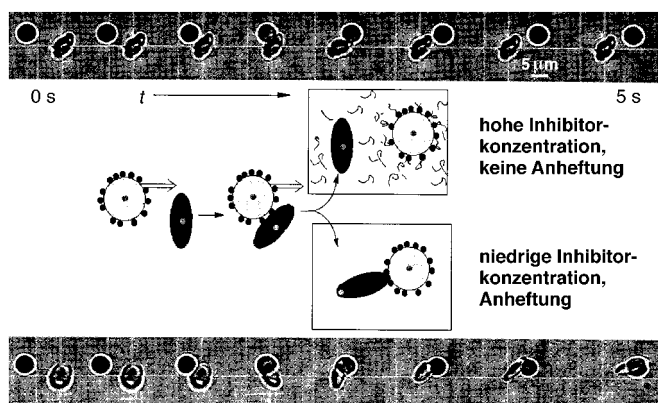


Abb. 34. Schematische Darstellung des OPTCOL-Assays.^[328] Das Virus-überzogene Mikrokügelchen (in der mobilen „Falle“) wird mit einem der Laser mit konstanter Geschwindigkeit bewegt und kollidiert mit dem Erythrocyten (in der stationären „Falle“) oberhalb seines Massenschwerpunktes. Während dieser Kollision rotiert der Erythrocyt, verbleibt aber in der stationären Falle (Zentrum des rechten Fadenkreuzes). Das Mikrokügelchen setzt die lineare Bewegung mit konstanter Geschwindigkeit fort, bis es einen Punkt erreicht hat, der etwa 20 μm von der ursprünglichen Position des Erythrocyten entfernt liegt. Wenn die Konzentration des Inhibitors ausreichend hoch ist, verliert die Zelle den anfänglichen Kontakt mit dem Kügelchen und verbleibt in der stationären Falle, während sich das Kügelchen vorbeibewegt. Ist kein oder zu wenig Inhibitor zugegen, heftet sich die Zelle fest an das vorbeiziehende Mikrokügelchen an, bewegt sich aus der stationären Falle heraus und ist „eingefangen“. Die Untersuchung der Anheftungswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit von der Sialinsäurekonzentration des Inhibitors lieferte die Inhibierungskonstante. Wir führten solche Kollisionsexperimente wiederholt für mehrere Paare von Mikrokügelchen und Erythrocyten durch. Die mikrophotographischen Aufnahmen zeigen das Virus-überzogene Mikrokügelchen vor und nach der Kollision mit dem Erythrocyten.

gehört auch (aber nicht nur) die Bestimmung des Ausmaßes, in dem der Inhibitor polyvalente Wechselwirkungen verhindert. So könnte der Inhibitor nicht nur die Infektion durch Blockieren der Anlagerung an Wirtrezeptoren verlangsamen, sondern könnte auch die Clearance durch Blockieren des Clearance-Mechanismus herabsetzen. In diesem Fall könnte der polyvalente Inhibitor sogar zu einer erhöhten Infektion führen! Der Gesamterfolg hängt also von diesen und anderen komplexen Kriterien ab, etwa der Toxizität, und macht es häufig erforderlich, daß der gesamte Organismus für den Assay verwendet wird.

5.5. Zukunftsperspektiven für polyvalente Inhibitoren

Für viele der natürlich vorkommenden polyvalenten Ziele werden gewiß polyvalente Liganden entworfen und synthetisiert werden. Die Mechanismen, die für den Erfolg monovalenter Agentien ausschlaggebend sind, sind auch für polyvalente Wirkstoffe wichtig; aber wenigstens ein anderer Mechanismus, der für monovalente Systeme irrelevant ist, spielt ebenfalls eine Rolle: die sterische Stabilisierung. Viele Fragen bleiben offen, bis das volle Potential der Polyvalenz zur Entwicklung und der Vorhersage der Wirkungen von polyvalenten Inhibitoren genutzt werden kann. Dabei könnten zentrale Fragen folgendermaßen lauten:

1. Welches Grundgerüst ist als Träger der vielen Kopien eines Liganden das beste? Zu den Möglichkeiten gehören sowohl

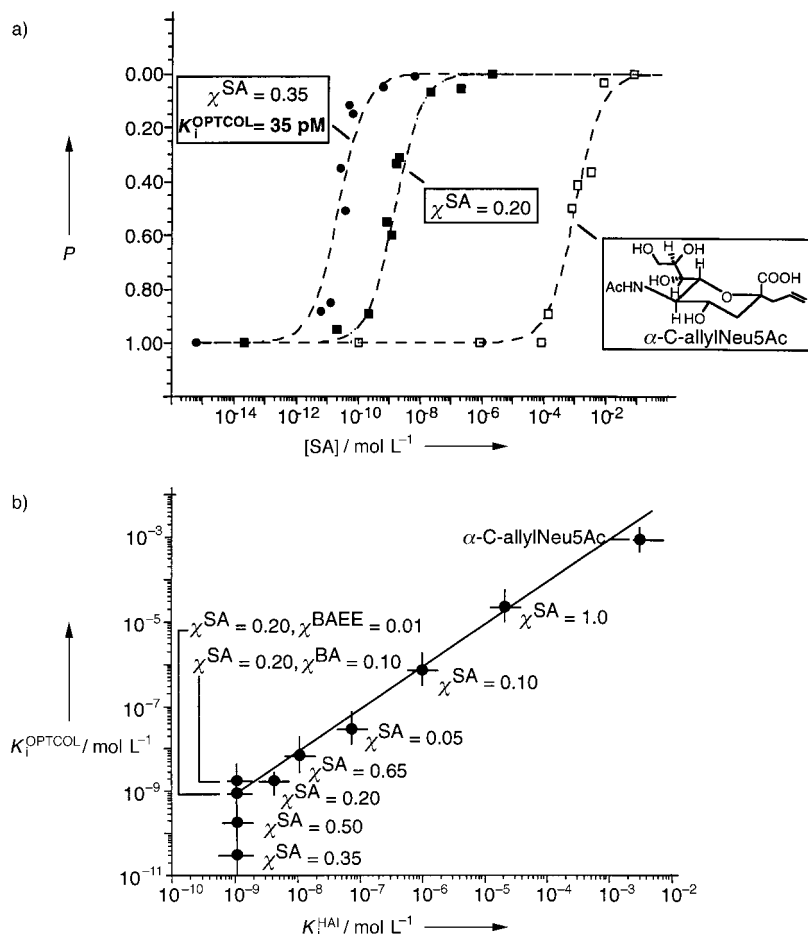


Abb. 35. a) Typische Inhibierungskurven von OPTCOL-Experimenten, die die Anheftungswahrscheinlichkeit P in Abhängigkeit von der Inhibitor-Konzentration (hier die Konzentration der SA-Gruppen) zeigen.^[328] Die Kurven durch die Meßwerte sind Bindungsisothermen (ohne Kooperativitäts-Terme); K_i diente bei der Regression als variabler Parameter. Der K_i^{OPTCOL} -Wert wurde als der Wert der SA-Konzentration definiert, bei dem die Anheftungswahrscheinlichkeit 50% betrug. b) Die Auftragung der gemessenen K_i^{OPTCOL} -Werte gegen K_i^{HAI} ergab eine gute Übereinstimmung für $K_i^{\text{OPTCOL}} > 1 \text{ nmol L}^{-1}$. BA = Benzylamin; BAEE = Bis(aminoethyl)ether. Die Fehlerbalken entsprechen einem Faktor ± 2 ; die Werte für K_i^{HAI} wurden der Literatur entnommen.^[5] Für alle Inhibitoren, für die $K_i^{\text{OPTCOL}} < 1 \text{ nmol L}^{-1}$ gilt, beträgt K_i^{HAI} ungefähr 1 nmol L^{-1} . Bei der durchgezogenen Linie gilt $K_i^{\text{HAI}} = K_i^{\text{OPTCOL}}$.

kovalent aufgebaute Gerüste (lineare und verzweigte Polymere, Dendrimere, Proteine und biologisch abbaubare Harze) als auch nichtkovalent aufgebaute Gerüste (Liposomen). Die „beste“ Wahl könnte von der Anwendung abhängen; so spielt die konformative Flexibilität des Grundgerüsts eine wichtige Rolle bei der Fähigkeit der polyvalenten Spezies, das Zielmolekül sterisch zu stabilisieren.

2. Was sind die ausschlaggebenden chemischen Faktoren, die über die Affinität zu einem Zielmolekül entscheiden? Was sind die chemischen Determinanten, die über die Fähigkeit der polyvalenten Spezies entscheiden, das Zielmolekül sterisch zu stabilisieren? Die Beantwortung dieser beiden Fragen ist eng damit verbunden, wie man am besten die Abstände, die Steifheit und die Hydrophilie eines Makromoleküls entwickelt. Trotz umfangreicher Arbeiten sind die genauen Gesetzmäßigkeiten, die über die spezifische (Liganden-Rezeptor-)Anlagerung eines Polymers an eine Oberfläche bestimmen, noch unklar. Auch ist die physikalische

Struktur und die Anordnung der an die Rezeptor-beladene Oberfläche „gebundenen“ Polymere weder von einem theoretischen noch von einem experimentellen Standpunkt geklärt.

3. Was sind die ausschlaggebenden chemischen Faktoren hinsichtlich der Toxizität polyvalenter Liganden? Zwischen diesen Determinanten und den bekannten Faktoren, die die Toxizität kleiner Moleküle beeinflussen, kann vielleicht keine einfache Beziehung hergestellt werden. Die Ursache könnte darin liegen, daß kleine Moleküle aus einer Reihe von Gründen häufig mit der Zielvorgabe entworfen werden, relativ hydrophob zu sein, um so z.B. die Halbwertszeit im Blutkreislauf durch nichtspezifische Proteinbindungen zu verlängern, da die rasche Filtration durch die Niere verhindert wird. Deshalb werden diese kleinen Moleküle vorwiegend durch die Leber eliminiert. Polyvalente Liganden können hydrophil sein und verbleiben aufgrund ihrer Größe längere Zeit im Blutkreislauf. Durch Variation der Größe dieser polyvalenten Spezies, möglicherweise durch Variation der Bioabbaubarkeit der Brücken, die die einzelnen Segmente verbinden, könnten diese Moleküle so gestaltet werden, daß die Clearance durch die Leber, Milz oder Niere möglich wird. Die chemischen Determinanten der Toxizität werden, zumindest teilweise, vom Weg der Clearance abhängen.

4. Welche Wege sind die besten, um dem Organismus polyvalente Liganden bereitzustellen? Da die polyvalenten Spezies oft groß sind, treten sie infolgedessen nicht rasch durch passiven Transport durch hydrophobe Membranen: Die Injektion könnte z.B. für Verabreichungen ins Gefäßsystem geeigneter sein als die Aufnahme über die Nahrung oder die Haut. Diese Fragen der Bereitstellung sind verwandt mit der Problematik bei Arzneimitteln auf Proteinbasis. Wir beginnen gerade erst, einige dieser Probleme zu verstehen, andere sind noch völlig unerforscht. Die Kinetik und die biophysikalischen Mechanismen der Passage polymerer Moleküle durch poröse Membranen ist in diesem Zusammenhang ebenfalls wichtig. Dieselben Herausforderungen, mit denen man bei der Bereitstellung polyvalenter Materialien konfrontiert ist, bieten vom pharmakokinetischen Standpunkt auch Vorteile: Ist ein polyvalentes Molekül ausreichender Größe in das Gefäßsystem eingebracht worden, erwartet man eine höhere biologische Lebensdauer (Halbwertszeit) als von einem monovalenten Analogon. Die Verlängerung der Lebensdauer bietet mehrere Vorteile, darunter die Erniedrigung der Verabreichungshäufigkeit (größeres Verabreichungsintervall und deshalb bessere Patienten-Compliance) und die Möglichkeit, Stoffe zu verwenden, die

intrinsisch niedrigere therapeutische Indizes aufweisen (bei gleicher Verabreichungshäufigkeit wird der Unterschied zwischen maximaler und minimaler Konzentration des aktiven Agens kleiner sein als für eines, das rascher eliminiert wird).

Die Anwendung polyvalenter Moleküle als Arzneimittel sollte möglich sein und sollte der Industrie neue Wege eröffnen. Wir können neue Anwendungsgebiete in diesem Aufsatz nicht erschöpfend darstellen, doch möchten wir anhand zweier Beispiele das Potential der Polyvalenz verdeutlichen.

Jede biologische Oberfläche, die mit einer anderen Oberfläche über mehrere Kontaktstellen wechselwirkt, kann Ansatzpunkt für die Entwicklung polyvalenter Arzneimittel sein. Natürlichen polyvalenten Wechselwirkungen kann also durch Verwendung von synthetischen polyvalenten Molekülen entgegengewirkt werden. Ein Beispiel wären Moleküle, die sich aus wiederholenden kleinen Einheiten zusammensetzen, die bei der Anlagerung und beim Eindringen von Viren essentiell sind. Dies könnte zu einer allgemeinen Strategie zur Hemmung von Virusinfektionen führen. Da man von der sterischen Stabilisierung annimmt, daß sie eine wichtige Rolle im Mechanismus spielt, könnten Inhibitoren, die mehrere Kopien eines einzelnen Liganden aufweisen, selbst gegenüber einem Virusteilchen aktiv sein, das mehr als einen oder alternative Rezeptoren für die primäre virale Anlagerung einsetzt (z.B. HIV). Ein zweites Beispiel ist die Wechselwirkung zwischen Thrombocyten untereinander oder zwischen Endothelzellen und Thrombocyten, die durch die Verwendung von polyvalenten Inhibitoren der Integrinbindung gehemmt werden könnte. Diese Agentien könnten besonders nützlich sein, wenn mehr als ein Ligandentyp in einer Weise am Grundgerüst angebracht ist, daß nur Regionen, die mehr als einen Rezeptortyp exprimieren (z.B. pathologisch veränderte Stellen), Ziele dieser hochspezifischen polyvalenten Agentien sind. Solche Agentien könnten bei der Behandlung von Krankheiten Anwendung finden, die auf Blutgerinnseln beruhen (z.B. Venenthrombose oder arterielle Thrombosen, die zum Herzinfarkt oder Schlaganfall führen können).

Eine weitere Anwendung ist es, nichtnatürlichen polyvalenten Wechselwirkungen durch Verwendung von synthetischen polyvalenten Molekülen entgegenzuwirken. Beispielsweise könnte man ein Molekül entwerfen, das mehrere Kopien von Acetylcholin oder Epinephrin trägt und sich sehr fest an cholinerge bzw. adrenerge Rezeptoren bindet. Diese polyvalenten Materialien könnten sehr nützliche Agonisten des Parasympathikus und Sympathikus sein. Die Affinität dieser Agentien wird höchstwahrscheinlich eine Funktion der Dichte und der Zugänglichkeit zu den Rezeptoren auf einer Oberfläche sein. Insofern bestünde die Möglichkeit, Moleküle zu entwickeln, deren Angriffsziel sich nicht danach richtet, ob die Zielzellen diese spezielle Rezeptorklasse exprimieren oder nicht, sondern nach der Konzentration, mit der die Rezeptoren exprimiert werden. Diese Strategie würde es erlauben, pharmazeutische Agentien mit einer Spezifität zu versehen, die völlig unabhängig von den besonderen Eigenschaften der einzelnen Liganden-Rezeptor-Wechselwirkungen ist.

6. Schlußfolgerungen

Polyvalenz trifft man in biologischen Systemen zwar häufig an, doch wird ihre Bedeutung häufig noch nicht richtig eingeschätzt. Polyvalente Wechselwirkungen weisen in der Biologie zu neuen Angriffszielen, wo Pharmazeutika wirken könnten, die selbst polyvalent sind. Die größten Hürden beim Design wirksamer polyvalenter Arzneimittel könnten der Mangel an Methoden zur Untersuchung polyvalenter Wechselwirkungen und ein unvollständiges Verständnis des theoretischen Hintergrunds sein. Erfolgreiches Design von synthetischen polyvalenten Systemen erfordert ein detailliertes Verständnis des subtilen Gleichgewichts zwischen Entropie und Enthalpie. Chemiker und Biochemiker verstehen Enthalpie sehr gut, Entropie und besonders Konformationsentropie dagegen weniger.

Durch Polyvalenz werden Systemen Eigenschaften verliehen, die bei monovalenten Wechselwirkung nicht vorhanden sind. Was Polyvalenz alles ermöglicht, zeigen die folgenden Beispiele: Erreichen sehr fester Bindungen mit Liganden mittlerer oder kleiner Oberfläche; das stufenweise (graduelle) Antworten auf biologische Signale, das mit nicht-linearer Abhängigkeit von der Signalstärke möglich ist; Schaffung neuer Wechselwirkungen durch Kombination, Zusammenführung und Vervielfachung bestehender Wechselwirkungen; Erzielen eines großen konformen Kontaktes zwischen Oberflächen z.B. von Zellen, und dadurch die Ermöglichung effizienter Signalübertragung; Auslösung von Morphologieänderungen großer Strukturen z.B. bei Zellen; Signalgebung durch die Induktion großer konformativer Änderungen eines Moleküls; Induktion von Veränderungen bei der Molekülverteilung in Membranen; Signalgebung durch Oligomerisierung oder Dimerisierung; Hemmung unerwünschter Wechselwirkungen, z.B. denen zwischen eindringenden Pathogenen (die selber polyvalent sind) und ihren Zielstrukturen.

Das Studium der Polyvalenz könnte neue Ziele und neue Strategien beim Design pharmazeutischer Wirkstoffe liefern. Auch wenn die detaillierte Untersuchung der aktiven Rezeptor-Bindungsstelle als eine Hilfe beim Design und der Synthese von fest bindenden Monomeren fortgesetzt wird, werden neue Strategien für das Design von Grundgerüsten entwickelt werden müssen, die mehrere Liganden zusammenhalten. Das Ausmaß der Flexibilität und der Hydratisierung sowie die Größe des Grundgerüsts werden eine wichtige Rolle beim Design erfolgreicher polyvalenter Arzneimittel spielen. In Anlehnung an Strategien, die am häufigsten bei kleinen Pharmazeutika verfolgt wurden, werden die ersten polyvalenten Liganden wahrscheinlich zur Hemmung einiger unerwünschter Prozesse entworfen werden. Eines der ersten Anwendungsgebiete wird wahrscheinlich die Entwicklung von Inhibitoren sein, die die Anlagerung von Viren und Bakterien hemmen. Andere Anwendungen, etwa im Bereich der Krebsbekämpfung (z.B. Hemmung der Metastasenbildung) sind eher spekulativ. Schließlich könnten, wie zur Zeit bei Arzneimitteln auf Proteinbasis, polyvalente Liganden entwickelt werden, die gewünschte Wirkungen fördern, etwa die Immunmodulation zur Unterstützung der klonalen Selektion.

Die Untersuchung einer polyvalenten Wechselwirkung bleibt eine große Herausforderung. Funktionsbezogene Assays könnten für polyvalente Wechselwirkungen wichtiger sein als für monovalente. Assays, die nur die Affinität eines polyvalenten Moleküls zu seiner Zielstruktur messen, sind also für die Vorhersage der biologischen Wirkung eventuell nicht zweckmäßig. Deshalb sollten Prüfungsmethoden die Eigenschaften polyvalenter Liganden evaluieren, die zum Erreichen des gewünschten Ziels von Bedeutung sind. So könnte sich ein wirksames bivalentes Molekül für die Aggregation eines polyvalenten Rezeptors (etwa für eine im großen Maßstab durchgeführte Zellreinigung via Immunopräzipitation, bei der sich wegen des hohen Preises der Einsatz von Antikörpern verbietet) aus zwei Liganden zusammensetzen, die durch eine lange flexible Brücke verbunden sind. Ein wirksames bivalentes Molekül für die bivalente Bindung an einen einzelnen polyvalenten Rezeptor (etwa zur festen Bindung an die Oberfläche eines Pathogens) könnte aus zwei Liganden bestehen, die von einer starren Brücke auseinandergehalten werden, deren Abstand ungefähr dem zweier Bindungsstellen auf der Oberfläche des polyvalenten Rezeptors entspricht. In diesem Beispiel erfordern beide Anwendungen die Entwicklung eines bivalenten Liganden, doch hängen die Grundsätze des Designs von der Anwendung ab. Die Eigenschaften der polyvalenten Spezies, die bei der Anwendung wichtig sind, müssen sich deshalb im Assay widerspiegeln.

Die Inhibierung der Anlagerung des Influenzavirus A an Erythrocyten durch Polyacrylamid, das mehrere Sialinsäure-Gruppen trägt, ist gegenwärtig das bestuntersuchte Beispiel für polyvalente Inhibierung. Die wichtigste Schlußfolgerung, zu der wir durch diese zahlreichen Studien gelangt sind, ist die, daß die Funktion polyvalenter, polymerer Inhibitoren mindestens auf zwei verschiedenen Grenzmechanismen beruht: hohe Affinität, entropisch verstärkte Bindung einerseits und die sterische Stabilisierung andererseits. Bei Untersuchungen des Modellsystems mit dem Influenzavirus zeigte sich, daß unsere wirksamsten Inhibitoren die Wechselwirkung zwischen Influenzaviren und Erythrocyten bei einer ungefähr 10^7 – 10^8 mal niedrigeren Konzentration wirksam hemmen als das entsprechende Monomer. In einer detaillierten Untersuchung dieser Polymere konnte die Wirkungssteigerung zu einem Anteil von etwa 10^6 auf die erhöhte Affinität des Polymers zur Virusoberfläche und zu einem Anteil von 10^2 auf die sterische Stabilisierung zurückgeführt werden.^[378]

Anhang: Liste der Abkürzungen

α	Kooperativitätskonstante, definiert durch Gleichung (7) und (8b)
β	Kooperativitätskonstante, geeignet für polyvalente Wechselwirkungen; definiert durch Gleichung (9), (10) und (11)
CD4	Glycoprotein auf der Oberfläche von T-Zellen
CD8	Glycoprotein auf der Oberfläche von cytotoxischen T-Zellen
CRBP	Cellular Retinol Binding Protein
DNP	Dinitrophenol

ELISA	enzyme-linked immunosorbant assay
Fab	monovalenter, Antigen-bindender Seitenarm eines Antikörpers
Fc	Abschnitt des Antikörpers, der von Fab strukturell verschieden und innerhalb einer Antikörperklasse relativ konstant ist
Gal	Galactose
GalTase	Galactosyltransferase
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
HA	Hämagglutinin
HAI	Hämagglutinations-Inhibierungs-Assay
hGH	humanes Wachstumshormon
HIV	Human Immunodeficiency Virus
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül
IgG	Immunglobulin Klasse E
IgE	Immunglobulin Klasse G
IgM	Immunglobulin Klasse M
MHC	Haupt-Histokompatibilitätskomplex
MSH	Melanocyten-stimulierendes Hormon
NA	Neuraminidase
Neu5Ac	5-Acetylneuraminsäure
OPTCOL	Optical Collision Assay
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SA	Sialinsäure
sLe ^x	Sialyl-Lewis ^x
TCR	T-Zellen-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
VSV	Vesiculäres Stomatitis-Virus

Unsere Arbeiten auf diesem Gebiet wurden von den National Institutes of Health (NIH, GM30367 und GM 39589) unterstützt. Die NMR-Abteilungen der Harvard University wurden ebenfalls durch die NIH (1-S10-RR04870-01) sowie durch die National Science Foundation (CHE88-14019) unterstützt. M.M. dankt den Firmen Eli Lilly und Johnson & Johnson für Doktorandenstipendien. Wir bedanken uns bei Eric E. Simanke für die zahlreichen wertvollen Diskussionen, bei Anna Poon für ihre Hilfe beim Erstellen des Manuskripts und bei Valeri Martichonok für seine Hilfe bei den Abbildungen und bei der Datenrecherche.

Eingegangen am 14. August 1997 [A 249]
Übersetzt von Dr. Jürgen Hain, Freiburg, und
Stefanie Hultsch, MD, Boston

- [1] W. J. Lees, A. Spaltenstein, W. J. E. Kingery, G. M. Whitesides, *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 3419–3433.
- [2] M. Mammen, G. Dahmann, G. M. Whitesides, *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 4179–4190.
- [3] L. C. Norkin, *Clin. Microbiol. Rev.* **1995**, 8, 293–315.
- [4] A. D. Miller, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 11407–11413.
- [5] J. M. Bergelson, R. W. Finberg, *Trends Microbiol.* **1993**, 1, 287–288.
- [6] T. Stehle, S. C. Harrison, *Structure* **1996**, 4, 183–194.
- [7] H. Fried, L. D. Cahan, J. C. Paulson, *Virology* **1981**, 109, 188–192.
- [8] H. Liebermann, R. Mentel, L. Dohner, S. Modrow, W. Seidel, *Virus Res.* **1996**, 45, 111–122.
- [9] D. Chatterjee, J. V. Maizel, Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, 81, 6039–6043.
- [10] M. Goldman, Q. Su, J. M. Wilson, *Gene Therapy* **1996**, 3, 811–818.

- [11] D. WuDunn, P. G. Spear, *J. Virol.* **1989**, 63, 52–58.
- [12] G. Dubin, S. Basu, D. L. P. Mallory, M. Basu, S. R. Tal, H. M. Friedman, *J. Virol.* **1994**, 68, 2478–2486.
- [13] D. C. Johnson, R. L. Burke, T. Gregory, *J. Virol.* **1990**, 64, 2569–2576.
- [14] R. Kumarasamy, H. A. Blough, *Arch. Biochem. Biophys.* **1985**, 236, 593–602.
- [15] W. C. Lee, A. O. Fuller, *J. Virol.* **1993**, 67, 5088–5097.
- [16] K. S. Rosenthal, M. D. Leuther, B. G. Barisas, *J. Virol.* **1984**, 49, 980–983.
- [17] M. T. Shieh, P. G. Spear, *J. Virol.* **1994**, 68, 1224–1228.
- [18] E. Trybala, T. Bergstroem, B. O. Svennerholm, S. Jeansson, J. C. Gloriosio, S. Olofsson, *J. Gen. Virol.* **1994**, 75, 743–752.
- [19] E. Trybala, B. O. Svennerholm, T. Bergstroem, S. Olofsson, S. Jeansson, J. L. Goodman, *J. Virol.* **1993**, 67, 1278–1285.
- [20] P. G. Spear, M. T. Shieh, B. C. Herold, D. WuDunn, T. I. Koshy, *Adv. Exp. Med. Biol.* **1992**, 313, 341–353.
- [21] V. Litwin, M. Sandor, C. Grose, *Virology* **1990**, 178, 263–272.
- [22] Z. Zhu, Y. Hao, M. D. Gershon, R. T. Ambron, A. A. Gershon, *J. Virol.* **1996**, 70, 6563–6575.
- [23] J. F. Wright, A. Kurosky, S. Wasi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, 198, 983–989.
- [24] C. S. Wright, J. Jaeger, *J. Mol. Biol.* **1993**, 232, 620–638.
- [25] J. E. Grundy, J. A. McKeating, P. J. Ward, A. R. Sanderson, P. D. Griffiths, *J. Gen. Virol.* **1987**, 68, 793–803.
- [26] G. R. Nemerow, M. D. Moore, N. R. Cooper, *Adv. Cancer Res.* **1990**, 54, 273–300.
- [27] G. R. Nemerow, R. A. Houghten, M. D. Moore, N. R. Cooper, *Cell* **1989**, 46, 429–436.
- [28] A. W. Hugin, C. Hauser, *J. Virol.* **1994**, 68, 8409–8412.
- [29] D. P. Barbis, C. R. Parrish, *Braz. J. Med. Biol. Res.* **1994**, 27, 401–407.
- [30] Y. Itoh, S. Kuroda, T. Miyazaki, S. Otake, Y. Fujisawa, *J. Biotechnol.* **1992**, 23, 71–82.
- [31] A. R. Neurath, N. Strick, P. Sproul, *J. Exp. Med.* **1992**, 175, 461–469.
- [32] U. Treichel, B. K. H. Meyer, R. J. Stockert, T. Poralla, G. Gerken, *J. Gen. Virol.* **1994**, 75, 3021–3029.
- [33] K. Kuroki, R. Cheung, P. L. Marion, D. Ganem, *J. Virol.* **1994**, 68, 2091–2096.
- [34] J. A. Bibb, G. Witherell, G. Bernhardt, E. Wimmer, *Virol.* **1994**, 201, 107–115.
- [35] M. Gromeier, H. H. Lu, G. Bernhardt, J. J. Harber, J. A. Bibb, E. Wimmer, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1995**, 753, 19–36.
- [36] M. J. Bouchard, V. R. Racaniello, *J. Virol.* **1997**, 71, 2793–2798.
- [37] K. S. Au, N. M. Mattion, M. K. Estes, *Virology* **1993**, 194, 665–673.
- [38] P. W. Mason, E. Rieder, B. Baxt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 1932–1936.
- [39] R. Zhao, D. C. Pevear, M. J. Kremer, V. L. Giranda, J. A. Kofron, R. J. Kuhn, M. G. Rossmann, *Structure* **1996**, 4, 1205–1220.
- [40] N. H. Olson, P. R. Kolatkar, M. A. Oliveira, R. H. Cheng, J. M. Greve, A. McClelland, T. S. Baker, M. G. Rossmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 507–511.
- [41] D. G. Scraba, *J. Struct. Biol.* **1990**, 104, 52–62.
- [42] S. A. Huber, *J. Virol.* **1994**, 68, 3453–3458.
- [43] M. D. Rolsma, H. B. Gelberg, M. S. Kuhlenschmidt, *J. Virol.* **1994**, 68, 258–268.
- [44] A. H. Choi, *Virology* **1994**, 200, 301–306.
- [45] J. E. Strong, D. Tang, P. W. K. Lee, *Virology* **1993**, 197, 405–411.
- [46] D. Tang, J. E. Strong, P. W. K. Lee, *Virology* **1993**, 197, 412–414.
- [47] F. Superti, G. Donelli, *J. Med. Virol.* **1995**, 47, 421–428.
- [48] E. Mendez, C. F. Arias, S. Lopez, *J. Virol.* **1996**, 70, 1218–1222.
- [49] J. M. Wahlberg, H. Garoff, *J. Cell Biol.* **1992**, 116, 339–348.
- [50] M. Suomalainen, H. Garoff, *J. Gen. Virol.* **1992**, 66, 5106–5109.
- [51] D. L. Huso, O. Narayan, G. W. Hart, *J. Virol.* **1988**, 62, 1974–1980.
- [52] K. S. Faaberg, G. A. Palmer, C. Even, G. W. Anderson, P. G. Plagemann, *Virus Res.* **1995**, 39, 331–340.
- [53] C. Even, R. R. Rowland, P. G. Plagemann, *Virus Res.* **1995**, 39, 355–364.
- [54] M. Carleton, H. Lee, M. Mulvey, D. T. Brown, *J. Virol.* **1997**, 71, 1558–1566.
- [55] K. S. Wang, R. J. Kuhn, E. G. Strauss, S. Ou, J. H. Strauss, *J. Virol.* **1992**, 66, 4992–5001.
- [56] J. A. Maassen, C. Terhorst, *Eur. J. Biochem.* **1981**, 115, 153–158.
- [57] P. Mastromarino, L. Cioe, S. Rieti, N. Orsi, *Med. Microbiol. Immunol.* **1990**, 179, 105–114.
- [58] P. Mastromarino, C. Conti, P. Goldoni, B. Hauttecoeur, N. Orsi, *J. Gen. Virol.* **1987**, 68, 2359–2369.
- [59] P. Bullough, F. Hughson, J. J. Skehel, D. C. Wiley, *Nature* **1994**, 371, 37–43.
- [60] S. J. Watowich, J. J. Skehel, D. C. Wiley, *Structure* **1994**, 2, 719–731.
- [61] M. N. Matrosovich, A. S. Gambaryan, A. B. Tuzikov, N. E. Byramova, L. V. Mochalova, A. A. Golbraikh, M. D. Shenderovich, J. Finne, N. V. Bovin, *Virology* **1993**, 196, 111–121.
- [62] I. Gunther, B. Glatthaar, G. Doller, W. Garten, *Virus Res.* **1993**, 27, 147–160.
- [63] W. Fitz, P. B. Rosenthal, C. H. Wong, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, 4, 1349–1353.
- [64] S. Bagai, D. P. Sarkar, *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, 1152, 15–25.
- [65] C. M. Sanderson, H. H. Wu, D. P. Nayak, *J. Virol.* **1994**, 68, 69–76.
- [66] R. M. Epand, S. Nir, M. Parolin, T. D. Flanagan, *Biochemistry* **1995**, 34, 1084–1089.
- [67] R. Heckert, J. Riva, S. Cook, J. McMillen, R. D. Schwartz, *Avian Dis.* **1996**, 40, 770–777.
- [68] A. Chiba, K. Matsumura, H. Yamada, T. Inazu, T. Shimizu, S. Kusunoki, I. Kanazawa, A. Kobata, T. Endo, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 2156–2162.
- [69] D. Nanche, T. F. Wild, C. C. Rabourdin, D. Gerlier, *J. Gen. Virol.* **1993**, 74, 1073–1091.
- [70] D. Nanche, G. Varior-Krishnan, F. Cervoni, T. F. Wild, B. Rossi, C. Rabourdin-Combe, D. Gerlier, *J. Virol.* **1993**, 67, 6025–6032.
- [71] J. Li, R. Ling, J. S. Randhawa, K. Shaw, P. J. Davis, K. Juhasz, C. R. Pringle, A. J. Easton, D. Cavanagh, *Virus Res.* **1996**, 41, 185–191.
- [72] C. Kreml, B. Schultze, G. Herrler, *Adv. Exp. Med. Biol.* **1995**, 380, 371–374.
- [73] R. L. Thimmig, J. V. Hughes, R. J. Kinders, A. G. Milenkovic, T. C. Johnson, *J. Gen. Virol.* **1980**, 50, 279–291.
- [74] J. M. Coll, *Arch. Virol.* **1995**, 140, 827–851.
- [75] T. L. Lentz, *J. Gen. Virol.* **1990**, 71, 751–766.
- [76] F. P. Hanssens, H. J. Nauwynck, M. B. Pensaert, *J. Virol.* **1993**, 67, 4492–4496.
- [77] R. A. Weiss, C. S. Taylor, *Cell* **1995**, 82, 531–533.
- [78] J. Gavalchin, N. Fan, M. J. Lane, L. Papsidero, B. J. Poiesz, *Virology* **1993**, 194, 1–9.
- [79] N. Hiraiwa, M. Hiraiwa, R. Kannagi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, 231, 183–186.
- [80] G. M. Crooks, D. B. Kohn, *Blood* **1993**, 82, 3290–3297.
- [81] L. Connolly, K. Ziegler, J. A. T. Young, *J. Virol.* **1994**, 68, 2760–2764.
- [82] P. Bates, J. A. Young, H. E. Varmus, *Cell* **1993**, 74, 1043–1051.
- [83] J. Choppin, D. L. Schaffar, P. Debre, J. P. Levy, *J. Immunol.* **1981**, 126, 2347–2351.
- [84] D. Kabat, *Virology* **1989**, 171, 467–474.
- [85] H. Wang, M. P. Kavanaugh, R. A. North, D. Kabat, *Nature* **1991**, 352, 729–731.
- [86] D. Ott, A. Rein, *J. Virol.* **1992**, 66, 4632–4638.
- [87] J. A. Smythe, B. Nardelli, P. Chatterjee, R. C. Gallo, J. M. Gershoni, *Protein Eng.* **1994**, 7, 145–147.
- [88] P. M. Cereda, G. Palu, M. Rassu, M. Toni, W. Malwood, M. Dettin, B. C. Di, *Antiviral Chem. Chemother.* **1991**, 2, 157–161.
- [89] T. N. Wells, A. E. Proudfoot, C. A. Power, M. Marsh, *Chem. Biol.* **1996**, 3, 603–609.
- [90] P. R. Clapham, A. McKnight, R. A. Weiss, *J. Virol.* **1992**, 66, 3531–3537.
- [91] L. Marcon, H. Choe, K. A. Martin, M. Farzan, P. D. Ponath, L. Wu, W. Newman, N. Gerard, C. Gerard, J. Sodroski, *J. Virol.* **1997**, 71, 2522–2527.
- [92] A. Angulo, A. Alcamí, E. Vinuela, *Arch. Virol. Suppl.* **1993**, 7, 169–183.
- [93] M. V. Borca, P. Irusta, C. Carrillo, C. L. Afonso, T. Burrage, D. L. Rock, *Virology* **1994**, 201, 413–418.
- [94] I. Connell, W. Agace, P. Klemm, M. Schembri, S. Marild, C. Svanborg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 9827–9832.
- [95] B. Westerlund, T. K. Korhonen, *Mol. Microbiol.* **1993**, 9, 687–694.
- [96] N. Stromberg, T. Boren, *Infect. Immun.* **1992**, 60, 3268–3277.
- [97] N. Stromberg, T. Boren, A. Carlen, J. Olsson, *Infect. Immun.* **1992**, 60, 3278–3286.
- [98] P. Sepulveda, J. L. Lopez, D. Gozalbo, A. Cervera, J. P. Martinez, W. L. Chaffin, *Infect. Immun.* **1996**, 64, 4406–4408.
- [99] F. D. Tosh, L. J. Douglas, *Infect. Immun.* **1992**, 60, 4734–4739.

- [100] C. Kuo, N. Takahashi, A. F. Swanson, Y. Ozeki, S. Hakomori, *J. Clin. Invest.* **1996**, 98, 2813–2818.
- [101] F. Qadri, A. Haque, S. M. Faruque, K. A. Bettelheim, R. Robins-Browne, M. J. Albert, *J. Clin. Microbiol.* **1994**, 32, 510–514.
- [102] M. J. Kuehn, J. Heuser, S. Normark, S. J. Hultgren, *Nature* **1992**, 356, 252–255.
- [103] X. R. Wu, T. T. Sun, J. J. Medina, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 9630–9635.
- [104] H. Schroten, F. G. Hanisch, R. Plogmann, J. Hacker, G. Uhlenbruck, R. Nobis-Bosch, V. Wahn, *Infect. Immun.* **1992**, 60, 2893–2899.
- [105] F. G. Hanisch, J. Hacker, H. Schroten, *Infect. Immun.* **1993**, 61, 2108–2115.
- [106] T. Boren, P. Falk, K. A. Roth, G. Larson, S. Normark, *Science* **1993**, 262, 1892–1895.
- [107] S. Hirno, S. Kelm, R. Schauer, B. Nilsson, T. Wadstrom, *Glycoconjugate J.* **1996**, 13, 1005–1011.
- [108] P. M. Simon, P. L. Goode, A. Mobasser, D. Zopf, *Infect. Immun.* **1997**, 65, 750–757.
- [109] G. Franzoso, P. C. Hu, G. A. Meloni, M. F. Barile, *Infect. Immun.* **1993**, 61, 1523–1530.
- [110] T. Feizi, *Trends Biochem. Sci.* **1994**, 19, 233–234.
- [111] T. Feizi, *Clin. Infect. Dis.* **1993**, 17, 63–65.
- [112] K. Sachse, H. Pflutzner, M. Heller, I. Hanel, *Vet. Microbiol.* **1993**, 36, 307–316.
- [113] E. Stimson, M. Virji, K. Makepeace, A. Dell, H. R. Morris, G. Payne, J. R. Saunders, M. P. Jennings, S. Barker, M. Panico, *Mol. Microbiol.* **1995**, 17, 1201–1214.
- [114] M. Virji, K. Makepeace, D. J. Ferguson, S. M. Watt, *Mol. Microbiol.* **1996**, 22, 941–950.
- [115] M. W. Raza, C. C. Blackwell, M. M. Ogilvie, A. T. Saadi, J. Stewart, R. A. Elton, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **1994**, 10, 25–30.
- [116] Y. Murakami, S. Hanazawa, K. Nishida, H. Iwasaka, S. Kitano, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, 192, 826–832.
- [117] H. B. Sheth, K. K. Lee, W. Y. Wong, G. Srivastava, O. Hindsgaul, R. S. Hodges, W. Paranchych, R. T. Irvin, *Mol. Microbiol.* **1994**, 11, 715–723.
- [118] C. Carnoy, R. Ramphal, A. Scharfman, J. M. Lo-Guidice, N. Houdret, A. Klein, C. Galabert, G. Lamblin, P. Roussel, *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **1993**, 9, 323–334.
- [119] I. J. Rosenstein, C. T. Yuen, M. S. Stoll, T. Feizi, *Infect. Immun.* **1992**, 60, 5078–5084.
- [120] J. P. Wisniewski, M. Monsigny, F. M. Delmotte, *Biochimie* **1994**, 76, 121–128.
- [121] J. Beuth, H. L. Ko, L. Tunggal, G. Pulverer, *Dtsch. Med. Wochenschr.* **1992**, 117, 687–691.
- [122] S. Haataja, K. Tikkanen, J. Liukkonen, C. Francois-Gerard, J. Finne, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 4311–4317.
- [123] J. Liukkonen, S. Haataja, K. Tikkanen, S. Kelm, J. Finne, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 21105–21111.
- [124] K. Hong, T. Harada, T. Nishimura, K. Inoue, *Immunology* **1993**, 80, 640–644.
- [125] P. A. Murray, A. Prakobphol, T. Lee, C. I. Hoover, S. J. Fisher, *Infect. Immun.* **1992**, 60, 31–38.
- [126] M. Mantle, S. D. Husar, *Infect. Immun.* **1993**, 61, 2340–2346.
- [127] K. Bock, K.-A. Karlsson, N. Stromberg, S. Teneberg, *Adv. Exp. Med. Biol.* **1988**, 228, 153–186.
- [128] M. J. Farthing, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1985**, 79, 569–576.
- [129] K.-A. Karlsson, *Annu. Rev. Biochem.* **1989**, 58, 309–350.
- [130] K. K. Lee, H. B. Sheth, W. Y. Wong, R. Sherburne, W. Paranchych, R. S. Hodges, C. A. Lingwood, H. Krivan, R. T. Irvin, *Mol. Microbiol.* **1994**, 11, 705–713.
- [131] T. Masuzawa, R. Suzuki, Y. Yanagihara, *Microbiol. Immunol.* **1991**, 35, 199–208.
- [132] N. V. Prasadarao, C. A. Wass, J. Hacker, K. Jann, K. S. Kim, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 10356–10363.
- [133] L. Saiman, A. Prince, *J. Clin. Invest.* **1993**, 92, 1875–1880.
- [134] V. Annaix, J. P. Bouchara, G. Larcher, D. Chabasse, G. Tronchin, *Infect. Immun.* **1992**, 60, 1747–1755.
- [135] J. Coburn, J. M. Leong, J. K. Erban, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 7059–7063.
- [136] E. Leininger, C. A. Ewanowich, A. Bhargava, M. S. Peppler, J. G. Kenimer, M. J. Brennan, *Infect. Immun.* **1992**, 60, 2380–2385.
- [137] A. R. Holmes, R. McNab, H. F. Jenkinson, *Infect. Immun.* **1996**, 64, 4680–4685.
- [138] H. Kobayashi, N. Shibata, S. Suzuki, *Infect. Immun.* **1992**, 60, 2106–2109.
- [139] N. Shibata, K. Hisamichi, T. Kikuchi, H. Kobayashi, Y. Okawa, S. Suzuki, *Biochemistry* **1992**, 31, 5680–5686.
- [140] K. Shibata, T. Mita, H. Nakamura, K. Yamashiro, S. Gotoh, K. Hiranuma, K. Higashi, H. Hirano, *Biochimie* **1993**, 75, 459–465.
- [141] H. Su, L. Raymond, D. D. Rockey, E. Fischer, T. Hackstadt, H. D. Caldwell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 11143–11148.
- [142] J. P. Zhang, R. S. Stephens, *Cell* **1992**, 69, 861–869.
- [143] J. C. Chen, J. P. Zhang, R. S. Stephens, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 11134–11140.
- [144] C. Pascu, W. Hryniewicz, T. Wadstrom, T. W. Zareba, *Curr. Microbiol.* **1997**, 34, 6–11.
- [145] R. Virkola, J. Parkkinen, J. Hacker, T. K. Korhonen, *Infect. Immun.* **1993**, 61, 4480–4484.
- [146] J. W. St. Geme III, S. Falkow, S. J. Barenkamp, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 2875–2879.
- [147] B. A. Butcher, L. A. Sklar, L. C. Seamer, R. H. Glew, *J. Immunol.* **1992**, 148, 2879–2886.
- [148] P. Valentin-Weigand, S. R. Talay, K. N. Timmis, G. S. Chhatwal, *Int. J. Med. Microbiol. Virol. Parasit. Infect. Dis.* **1993**, 278, 238–245.
- [149] P. Valentin-Weigand, K. M. Moriarty, *Res. Microbiol.* **1992**, 143, 75–79.
- [150] P. Peake, A. Gooley, W. J. Britton, *Infect. Immun.* **1993**, 61, 4828–4834.
- [151] S. P. Rao, K. R. Gehlsen, A. Catanzaro, *Infect. Immun.* **1992**, 60, 3652–3657.
- [152] K. R. Alugupalli, S. Kalfas, S. Edwardsson, A. Forsgren, R. R. Arnold, A. S. Naidu, *Oral Microbiol. Immunol.* **1994**, 9, 174–179.
- [153] S. K. Collinson, P. C. Doig, J. L. Doran, S. Clouthier, T. J. Trust, W. W. Kay, *J. Bacteriol.* **1993**, 175, 12–18.
- [154] S. Huff, Y. V. Matsuka, M. J. McGavin, K. C. Ingham, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 15563–15570.
- [155] B. Rozalska, T. Wadstrom, *Scand. J. Immunol.* **1993**, 37, 575–580.
- [156] M. J. McGavin, S. Gurusiddappa, P. E. Lindgren, M. Lindberg, G. Rucci, M. Hook, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 23946–23953.
- [157] M. H. McGavin, D. Krajewska-Pietrasik, C. Ryden, M. Hook, *Infect. Immun.* **1993**, 61, 2479–2485.
- [158] J. M. Patti, J. O. Boles, M. Hook, *Biochemistry* **1993**, 32, 11428–11435.
- [159] L. M. Switalski, W. G. Butcher, P. C. Caufield, M. S. Lantz, *Infect. Immun.* **1993**, 61, 4119–4125.
- [160] L. M. Switalski, J. M. Patti, W. Butcher, A. G. Gristina, P. Speziale, M. Hook, *Mol. Microbiol.* **1993**, 7, 99–107.
- [161] S. Bozzini, L. Visai, P. Pignatti, T. E. Petersen, P. Speziale, *Eur. J. Biochem.* **1992**, 207, 327–333.
- [162] J. M. Patti, H. Jonsson, B. Guss, L. M. Switalski, K. Wiberg, M. Lindberg, M. Hook, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 4766–4772.
- [163] P. Ciborowski, J. I. Flock, T. Wadstrom, *J. Med. Microbiol.* **1992**, 37, 376–381.
- [164] D. Mcdevitt, P. Francois, P. Vaudaux, T. J. Foster, *Mol. Microbiol.* **1994**, 11, 237–248.
- [165] C. R. Carneiro, E. Postol, C. Boilesen, R. R. Brentani, *Braz. J. Med. Biol. Res.* **1993**, 26, 689–697.
- [166] J. D. Lopes, M. dos Reis, R. R. Brentani, *Science* **1985**, 229, 275–277.
- [167] O. D. Liang, M. Maccarana, J. I. Flock, M. Paulsson, K. T. Preissner, T. Wadstrom, *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, 1225, 57–63.
- [168] L. G. Milagres, C. E. Melles, *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **1992**, 34, 315–321.
- [169] H. S. Courtney, C. von Hunolstein, J. B. Dale, M. S. Bronze, E. H. Beachey, D. L. Hasty, *Microb. Pathog.* **1992**, 12, 199–208.
- [170] J. B. Dale, R. W. Baird, H. S. Courtney, D. L. Hasty, M. S. Bronze, *J. Infect. Dis.* **1994**, 169, 319–323.
- [171] E. Hanski, P. A. Horwitz, M. G. Caparon, *Infect. Immun.* **1992**, 60, 5119–5125.
- [172] E. Hanski, M. Caparon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 6172–6176.
- [173] A. Berge, U. Sjobring, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 25417–25424.
- [174] K. H. Schmidt, K. Mann, J. Cooney, W. Kohler, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **1993**, 7, 135–143.

- [175] R. Poon-King, J. Bannan, A. Viteri, G. Cu, J. B. Zabriskie, *J. Exp. Med.* **1993**, 178, 759–763.
- [176] C. Von Hunolstein, M. L. Ricci, G. Orefici, *J. Med. Microbiol.* **1993**, 39, 53–57.
- [177] R. C. Tart, I. van de Rijn, *Infect. Immun.* **1993**, 61, 4994–5000.
- [178] M. Kostrzynska, T. Wadstrom, *Int. J. Med. Microbiol. Virol. Parasit. Infect. Dis.* **1992**, 277, 80–83.
- [179] G. C. Fogg, C. M. Gibson, M. G. Caparon, *Mol. Microbiol.* **1994**, 11, 671–684.
- [180] S. R. Talay, P. Valentin-Weigand, P. G. Jerlstrom, K. N. Timmis, G. S. Chhatwal, *Infect. Immun.* **1992**, 60, 3837–3844.
- [181] B. D. Winters, N. Ramasubbu, M. W. Stinson, *Infect. Immun.* **1993**, 61, 3259–3264.
- [182] J. R. Wang, M. W. Stinson, *Infect. Immun.* **1994**, 62, 442–448.
- [183] R. Watanabe-Ohnishi, J. Aelion, L. LeGros, M. A. Tomai, E. V. Sokurenko, D. Newton, J. Takahara, S. Irino, S. Rashed, M. Kotb, *J. Immunol.* **1994**, 152, 2066–2073.
- [184] S. Sela, A. Aviv, A. Tovi, I. Burstein, M. G. Caparon, E. Hanski, *Mol. Microbiol.* **1993**, 10, 1049–1055.
- [185] C. V. Hughes, R. N. Andersen, P. E. Kolenbrander, *Infect. Immun.* **1992**, 60, 1178–1186.
- [186] H. Schulze-Koops, H. Burkhardt, J. Heesemann, T. Kirsch, B. Swoboda, C. Bull, S. Goodman, F. Emmrich, *Infect. Immun.* **1993**, 61, 2513–2519.
- [187] J. B. Bliska, M. C. Copass, S. Falkow, *Infect. Immun.* **1993**, 61, 3914–3921.
- [188] A. Varki, *J. Clin. Invest.* **1997**, 99, 158–162.
- [189] J. B. Lowe, P. A. Ward, *J. Clin. Invest.* **1997**, 99, 822–826.
- [190] M. A. Gimbrone, T. Nagel, J. N. Topper, *J. Clin. Invest.* **1997**, 99, 2062–2070.
- [191] L. L. Kiessling, N. L. Pohl, *Chem. Biol.* **1996**, 3, 71–77.
- [192] S. M. Albelda, C. W. Smith, P. A. Ward, *FASEB J.* **1994**, 8, 504–512.
- [193] S. D. Rossen, C. R. Bertozzi, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1994**, 6, 663–673.
- [194] W. Spevak, C. Foxall, D. H. Charych, F. Dasgupta, J. O. Nagy, *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 1018–1020.
- [195] L. A. Lasky, *Annu. Rev. Physiol.* **1995**, 57, 827–872.
- [196] S. A. DeFrees, F. C. A. Gaeta, Y. C. Lin, Y. Ichikawa, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 7549–7550.
- [197] G. Kadmon, B. Imhof, P. Altevogt, M. Schachner, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, 214, 94–101.
- [198] L. Shapiro, A. M. Fannon, P. D. Kwong, A. Thompson, M. S. Lehmann, G. Grubel, J. Legrand, J. Als-Nielsen, D. R. Colman, W. A. Hendrickson, *Nature* **1995**, 374, 327–337.
- [199] J. McCluskey, L. F. Boyd, P. F. Highet, J. Inman, D. H. Margulies, *J. Immunol.* **1988**, 141, 1451–1455.
- [200] M. D. Kazatchkine, D. T. Fearon, *Immunodeficiency* **1990**, 2, 17–41.
- [201] P. P. Firpo, I. Axberg, M. Scheibel, E. A. Clark, *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **1992**, 8, 357–366.
- [202] S. A. Santoro, L. W. Cunningham, *J. Clin. Invest.* **1977**, 60, 1054–1060.
- [203] M. Kamiyama, Y. S. Arkel, K. Chen, K. Shido, *J. Lab. Clin. Med.* **1991**, 117, 209–217.
- [204] B. D. Shur, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1993**, 5, 854–863.
- [205] R. T. Lee, Y. C. Lee, Patentantrag, **1994**.
- [206] Y. Lee, R. Lee, *Acc. Chem. Res.* **1995**, 28, 321–327.
- [207] N. J. Dimmock, *Trends Biochem. Sci.* **1987**, 12, 70–74.
- [208] N. W. Boyce, S. R. Holdsworth, *Kidney Int.* **1989**, 36, 537–544.
- [209] S. K. Dower, C. DeLisi, J. A. Titus, D. M. Segal, *Biochemistry* **1981**, 20, 6326–6334.
- [210] W. Engelhardt, H. Gorczytza, A. Butterweck, H. Moenkemann, J. Frey, *Eur. J. Immunol.* **1991**, 21, 2227–2238.
- [211] Z. K. Indik, J. G. Park, S. Hunter, A. D. Schreiber, *Blood* **1995**, 86, 4389–4399.
- [212] K.-A. Karlsson, *Trends Biochem. Sci.* **1991**, 12, 265–272.
- [213] K.-A. Karlsson, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**, 5, 622–635.
- [214] B. Goins, E. Freire, *Biochemistry* **1988**, 27, 2046–2052.
- [215] V. Bhakuni, D. Xie, E. Freire, *Biochemistry* **1991**, 30, 5055–5060.
- [216] S. Kabir, *J. Med. Microbiol.* **1987**, 23, 9–18.
- [217] A. Abe, K. Komase, A. Bangtrakulnonth, O. A. Ratchtrachenchat, K. Kawahara, H. Danbara, *J. Clin. Microbiol.* **1990**, 28, 2616–2620.
- [218] L. Paoletti, M. R. Wessels, A. K. Rodewald, A. A. Shroff, H. J. Jennings, D. L. Kasper, *Infect. Immun.* **1994**, 62, 3236–3243.
- [219] C. Montecucco, E. Papini, G. Schiavo, *Experientia* **1996**, 52, 1026–1032.
- [220] C. C. Blackwell, A. T. Saadi, M. W. Raza, J. Stewart, D. M. Weir, *J. Clin. Pathol.* **1992**, 45, 20–24.
- [221] M. J. H. M. Wolfhagen, R. Torensma, A. C. Fluit, C. J. M. Aarsman, M. Jansze, J. Verhoef, *Toxicon* **1994**, 32, 129–132.
- [222] G. D. Armstrong, E. Fodor, R. Vanmaele, *J. Infect. Dis.* **1991**, 164, 1160–1167.
- [223] J. M. Richardson, P. D. Evans, S. W. Homans, A. Donohue-Rolfe, *Nature Struct. Biol.* **1997**, 4, 190–193.
- [224] L. D. Heerze, G. D. Armstrong, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, 172, 1224–1229.
- [225] P. E. Stein, A. Boodhoo, G. D. Armstrong, L. D. Heerze, S. A. Cockle, M. H. Klein, R. J. Read, *Nature Struct. Biol.* **1994**, 1, 591–596.
- [226] M. Dembo, B. Goldstein, A. K. Sobotka, L. M. Lichtenstein, *J. Immunol.* **1979**, 123, 1864–1872.
- [227] M. Dembo, B. Goldstein, A. K. Sobotka, L. M. Lichtenstein, *J. Immunol.* **1978**, 121, 354–358.
- [228] M. Dembo, B. Goldstein, *J. Immunol.* **1978**, 121, 345–353.
- [229] P. Kane, J. Erickson, C. Fewtrell, B. Baird, D. Holowka, *Mol. Immunol.* **1986**, 23, 783–790.
- [230] D. M. Sigal, J. D. Taurog, H. Metzger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, 74, 2993–2995.
- [231] M. W. Pantoliano, R. A. Horlick, B. A. Springer, D. D. E. Van, T. Tobery, D. R. Wetmore, J. D. Lear, A. T. Nahapetian, J. D. Bradley, W. P. Sisk, *Biochemistry* **1994**, 33, 10229–10248.
- [232] M. A. Lemmon, J. Schlessinger, *Trends Biochem. Sci.* **1994**, 19, 459–463.
- [233] T. F. Deuel, *Annu. Rev. Cell Biol.* **1987**, 3, 443–492.
- [234] H. Geyer, K. Himmelsbach, B. Kwiatkowski, S. Schlecht, S. Stirm, *Pure Appl. Chem.* **1983**, 55, 637–653.
- [235] H. Q. Miao, D. M. Ornitz, E. Aingorn, S. A. Bensasson, I. Vlodavsky, *J. Clin. Invest.* **1997**, 99, 1565–1575.
- [236] M. A. Lemmon, Z. M. Bu, J. E. Ladbury, M. Zhou, D. Pinchasi, I. Lax, D. M. Engelman, J. Schlessinger, *EMBO J.* **1997**, 16, 281–294.
- [237] M. A. Lemmon, D. Pinchasi, M. Zhou, I. Lax, J. Schlessinger, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 6311–6317.
- [238] O. Letourneur, J. F. Goetschy, M. Horisberger, M. G. Grutter, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, 224, 709–716.
- [239] D. L. Hynds, M. Summers, J. Vanbrocklyn, M. S. Odoriso, A. J. Yates, *J. Neurochem.* **1995**, 65, 2251–2258.
- [240] M. Mellado, J. M. Rodriguezfrade, L. Kremer, C. Vonkobbe, A. M. Deana, I. Merida, C. Martinez, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 9189–9196.
- [241] J. A. Wells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 1–6.
- [242] M. Sundstrom, T. Lundqvist, J. Rodin, L. B. Giebel, D. Milligan, G. Norstedt, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 32197–32203.
- [243] T. F. Zioncheck, L. Richardson, J. Liu, L. Chang, K. L. King, G. L. Bennett, P. Fugedi, S. M. Chamow, R. H. Schwall, R. J. Stack, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 16871–16878.
- [244] O. Livnah, E. A. Stura, D. L. Johnson, S. A. Middleton, L. S. Mulcahy, N. C. Wrighton, W. J. Dower, L. K. Jolliffe, I. A. Wilson, *Science* **1996**, 273, 464–471.
- [245] B. Barleon, F. Totzke, C. Herzog, S. Blanke, E. Kremmer, G. Siemeister, D. Marme, G. Martinybaron, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 10382–10388.
- [246] W. Somers, M. Stahl, J. S. Seehra, *EMBO J.* **1997**, 16, 989–997.
- [247] A. Duschl, W. Sebald, *Eur. Cytokine Network* **1996**, 7, 37–49.
- [248] K. Koths, *Mol. Reprod. Dev.* **1997**, 46, 31–38.
- [249] A. Gertler, J. Grosclaude, C. J. Strasburger, S. Nir, J. Djiane, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 24482–24491.
- [250] T. Horan, J. Wen, L. Narhi, V. Parker, A. Garcia, T. Arakawa, J. Philo, *Biochemistry* **1996**, 35, 4886–4896.
- [251] B. G. Barisas, S. J. Singer, J. M. Sturtevant, *Immunochemistry* **1977**, 14, 247–252.
- [252] R. Maggio, P. Barbier, F. Fornai, G. U. Corsini, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 31055–31060.
- [253] X. Gong, D. H. Dubois, D. J. Miller, B. D. Shur, *Science* **1995**, 269, 1718–1721.
- [254] E. Baba, M. Nakamura, Y. Tanaka, M. Kuroki, Y. Itoyama, S. Nakano, Y. Niho, *J. Immunol.* **1993**, 151, 1013–1024.

- [255] V. C. Gibbs, M. Takahashi, M. Aguet, A. Chuntharapai, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 28710–28716.
- [256] J. A. L. Greene, G. M. Leytze, J. Emswiler, R. Peach, J. Bajorath, W. Cosand, P. S. Linsley, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 26762–26771.
- [257] M. G. Surette, J. B. Stock, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 17966–17973.
- [258] H. Chen, M. L. Privalsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 422–426.
- [259] B. C. Cunningham, M. Ultsch, A. M. De Vos, M. G. Mulkerrin, K. R. Clausner, J. A. Wells, *Science* **1991**, *254*, 821–825.
- [260] N. Jones, *Cell* **1990**, *61*, 9–11.
- [261] R. P. Lawther, G. W. Hatfield, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, *77*, 1862–1866.
- [262] T. E. Ellenberger, C. J. Brandl, K. Struhl, S. C. Harrison, *Cell* **1992**, *71*, 1223–1237.
- [263] N. Benson, C. Adams, P. Youderian, *Mol. Microbiol.* **1994**, *11*, 567–579.
- [264] R. Li, M. R. Botchan, *Cell* **1993**, *73*, 1207–1221.
- [265] J. A. Ladas, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 5944–5951.
- [266] B. J. Cheskis, S. Karathanasis, C. R. Lyttle, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 11384–11391.
- [267] Y. Nomura, T. Nagaya, H. Tsukaguchi, J. Takamatsu, H. Seo, *Endocrinology* **1996**, *137*, 4082–4086.
- [268] R. C. Hoffman, S. J. Horvath, R. E. Klevit, *Protein Sci.* **1993**, *2*, 951–965.
- [269] A. C. Jamieson, H. Wang, S. H. Kim, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 12834–12839.
- [270] K. A. Connors, *Binding Constants: The Measurement of Molecular Complex Stability*, Wiley, New York, **1987**.
- [271] D. E. Koshland, K. Neet, *Annu. Rev. Biochem.* **1968**, *37*, 359–410.
- [272] B. Perlmutter-Hayman, *Acc. Chem. Res.* **1986**, *19*, 90–96.
- [273] E. N. Kaufman, R. K. Jain, *Cancer Res.* **1992**, *52*, 4157–4167.
- [274] A. Schoen, E. Freire, *Biochemistry* **1989**, *28*, 5019–5024.
- [275] Für eine polyvalente Wechselwirkung *N*-ter Ordnung ist die *i*-te Bindungskonstante, K_i , gleich $(N+1-i)/i$. Deshalb gilt für $N=5$: $K_2/K_1 = (5/1)/(4/2) = 5/2$.
- [276] T. Tanaka, R. Suzuno, K. Nakamura, A. Kuwahara, K. Takeo, *Electrophoresis* **1986**, *7*, 204–209.
- [277] A. Y. Karush, B. Dzantiev, *Mol. Immunol.* **1990**, *27*, 965–971.
- [278] G. B. Sigal, M. Mammen, G. Dahmann, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3789–3800.
- [279] G. Glick, J. R. Knowles, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4701–4703.
- [280] G. D. Glick, P. L. Toogood, D. C. Wiley, J. J. Skehel, J. R. Knowles, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 23660–23669.
- [281] M. Mammen, E. I. Shakhnovich, J. M. Deutch, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 3168–3175.
- [282] M. Mammen, E. Shakhnovich, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* **1998**, im Druck.
- [283] W. Blokzijl, J. B. F. N. Engberts, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 1610–1648; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1545–1579.
- [284] F. Karush, *Compr. Immunol.* **1978**, *5*, 85–116.
- [285] N. Agmon, R. D. Levine, *Chem. Phys. Lett.* **1977**, *52*, 197–201.
- [286] G. Weber, *Adv. Protein Chem.* **1975**, *29*, 1–83.
- [287] N. M. Green, *Adv. Protein Chem.* **1975**, *29*, 85–133.
- [288] D. Spillmann, M. M. Burger, *J. Cell. Biochem.* **1996**, *61*, 562–568.
- [289] G. J. Arlaud, M. G. Colomb, J. Gagnon, *Immunol. Today* **1987**, *8*, 1076–1077.
- [290] L. Stryer, *Biochemistry*, 4th ed., Freeman, New York, **1995**.
- [291] M. Tardieu, R. L. Epstein, H. L. Weiner, *Int. Rev. Cytol.* **1982**, *80*, 27–61.
- [292] A. Varki, *Glycobiology* **1993**, *3*, 97–130.
- [293] J. C. Paulson, J. E. Sadler, R. L. Hill, *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 2120–2124.
- [294] A. G. Dalglish, P. C. L. Beverley, P. R. Clapham, D. H. Crawford, M. F. Greaves, R. A. Weiss, *Nature* **1984**, *312*, 763–767.
- [295] J. M. Greve, G. Davis, A. M. Meyer, C. P. Forte, S. C. Yost, C. W. Marlor, M. E. Kamarck, A. McClelland, *Cell* **1989**, *56*, 839–847.
- [296] P. R. Clapham, J. N. Weber, D. Whitby, K. McIntosh, A. G. Dalglish, P. J. Maddon, K. C. Deen, R. W. Sweet, R. A. Weiss, *Nature* **1989**, *305*, 60–62.
- [297] P. Pontisso, M. A. Petit, M. J. Bankowski, M. E. Peeples, *J. Virol.* **1989**, *63*, 1981–1988.
- [298] R. M. H. V. Van, G. Hardie, *Immunochemistry* **1976**, *13*, 503–507.
- [299] I. Ofek, N. Sharon, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **1990**, *151*, 90–113.
- [300] I. Ofek, N. Sharon, *Infect. Immun.* **1988**, *56*, 539–547.
- [301] J. P. Duguid, D. C. Old in *Bacterial Adherence*, Vol. 6 (Hrsg.: E. H. Beachey), Chapman & Hall, London, **1980**, S. 185–217.
- [302] M. Lindahl, R. Brossmer, T. Wadstrom, *Glycoconjugate J.* **1987**, *4*, 51–58.
- [303] R. A. Finkelstein, L. F. Hanne, *Infect. Immun.* **1982**, *36*, 1199–1208.
- [304] F. Dell'Olivo, F. J. J. de Kanter, D. H. van den Eijnden, F. Serafini-Cessi, *Carbohydr. Res.* **1988**, *178*, 327–332.
- [305] C. L. Hornick, F. Karush, *Immunochemistry* **1972**, *9*, 325–340.
- [306] K. H. Schleifer, *Methods Microbiol.* **1985**, *18*, 125–156.
- [307] J. A. Wells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 1–6.
- [308] C. H. Heldin, *Cell* **1995**, *80*, 213–223.
- [309] C. F. Ware, S. Vanarsdale, T. L. Vanarsdale, *J. Cell. Biochem.* **1996**, *60*, 47–55.
- [310] K. E. Becker, T. Ishizaka, H. Metzger, K. Ishizaka, P. M. Grimley, *J. Exp. Med.* **1973**, *138*, 394–399.
- [311] R. P. Siraganian, W. A. Hook, B. B. Levine, *Immunochemistry* **1975**, *12*, 149–155.
- [312] M. Dembo, B. Goldstein, *Immunochemistry* **1978**, *15*, 307–313.
- [313] C. Wofsy, B. Goldstein, M. Dembo, *J. Immunol.* **1978**, *121*, 593–601.
- [314] J. C. Cambier, W. A. Jensen, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **1994**, *4*, 55–63.
- [315] L. Naldini, E. Vigna, R. Ferracini, P. Longati, L. Gandino, M. Prat, P. M. Comoglio, *Mol. Cell. Biol.* **1991**, *11*, 1793–1803.
- [316] P. Kanakaraj, S. Raj, S. A. Khan, S. Bishayee, *Biochemistry* **1991**, *30*, 1761–1767.
- [317] Y. Takahama, H. Suzuki, K. S. Katz, M. J. Grusby, A. Singer, *Nature* **1994**, *371*, 67–70.
- [318] S. Miyamoto, K. M. Yamada, *Science* **1995**, *267*, 883–885.
- [319] G. A. Brent, J. W. Harney, Y. Chen, R. L. Warne, D. D. Moore, P. R. Larsen, *Mol. Endocrin.* **1989**, *3*, 1996–2005.
- [320] A. K. Abbas, A. H. Lichtman, J. S. Pober, *Cellular and Molecular Immunology*, Saunders, Philadelphia, **1997**.
- [321] D. Barlocco, P. Fadda, W. Fratta, *Farmacol.* **1993**, *48*, 387–396.
- [322] H. E. Castagnino, J. Milei, F. A. Toranzo, V. Weiss, R. Beigelman, *Jpn. Heart J.* **1990**, *31*, 845–855.
- [323] T. Costa, M. Wuster, A. Herz, Y. Shimohigashi, H. C. Chen, D. Rodbard, *Biochem. Pharmacol.* **1985**, *34*, 25–30.
- [324] M. Dembo, B. Goldstein, A. K. Sobotka, L. M. Lichtenstein, *J. Immunol.* **1979**, *122*, 518–528.
- [325] P. Holliger, T. Prospero, G. Winter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 6444–6448.
- [326] A. Piergentili, W. Quaglia, S. K. Tayebati, F. Paparelli, L. Malmusi, L. Brasili, *Farmacol.* **1994**, *49*, 83–87.
- [327] P. S. Portoghesi, A. A. Garzon, H. Nagase, C. E. Lin, A. E. Take-mori, *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1292–1296.
- [328] H. Kizuka, R. N. Hanson, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *30*, 722–726.
- [329] L. V. Mochalova, A. B. Tuzikov, V. P. Marinina, A. S. Gambaryan, N. E. Byramova, N. V. Bovin, M. N. Matrosovich, *Antiviral. Res.* **1994**, *23*, 179–190.
- [330] K. H. Mortell, R. V. Weatherman, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2297–2298.
- [331] „Synthesis and Antigenic Properties of Sialic Acid-Based Dendrimers“: R. Roy, D. Zanini, S. J. Meunier, A. Romanowska, *ACS Symp. Ser.* **1994**, *560*, 114–119.
- [332] J. E. Kingery-Wood, K. W. Williams, G. B. Sigal, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7303–7305.
- [333] W. Spevak, J. O. Nagy, D. H. Charych, M. E. Schaefer, J. H. Gilbert, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 1146–1147.
- [334] A. Spaltenstein, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 686–687.
- [335] M. Mammen, K. Helmersson, R. Kishore, S.-K. Choi, W. D. Phillips, G. M. Whitesides, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 757–763.
- [336] K. H. Mortell, M. Gingras, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 12053–12054.
- [337] R. Roy, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, *6*, 692–702.
- [338] D. Zanini, R. Roy, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *119*, 2088–2095.
- [339] D. Zanini, R. Roy, *Bioconjugate Chem.* **1997**, *8*, 187–192.
- [340] T. D. Heath, R. T. Fraley, J. Bentz, E. W. Voss, J. N. Herron, D. Papahadjopoulos, *Biochim. Biophys. Acta* **1984**, *770*, 148–158.

- [341] P. Adler, S. J. Wood, Y. C. Lee, R. T. Lee, J. W. A. Petri, R. L. Schnaar, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 5164–5171.
- [342] R. Wunderlin, S. D. Sharma, P. Minakakis, R. Schwyzer, *Helv. Chim. Acta* **1985**, 68, 12–22.
- [343] M. D. Carrithers, M. R. Lerner, *Chem. Biol.* **1996**, 3, 537–542.
- [344] S. Tetsui, J. Zhao, S. Kimura, Y. Imanishi, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1996**, 48, 95–101.
- [345] K. Hanaoka, T. J. Pritchett, S. Takasaki, N. Kochibe, S. Sabeson, J. C. Paulson, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 9842–9849.
- [346] T. J. Pritchett, J. C. Paulson, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 9850–9858.
- [347] Y. C. Lee, R. R. Townsend, M. R. Hardy, J. Lönnngren, J. Arnarp, M. Haraldsson, H. Lönn, *J. Biol. Chem.* **1983**, 258, 199–202.
- [348] R. T. Lee, Y. C. Lee, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1988**, 155, 1444–1451.
- [349] E. A. L. Biessen, H. Broxterman, J. H. VanBoom, T. J. C. VanBerkel, *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 1846–1852.
- [350] H. Maaheimo, R. Renkonen, J. P. Turunen, L. Penttilä, O. Renkonen, *Eur. J. Biochem.* **1995**, 234, 616–625.
- [351] P. J. Belshaw, D. M. Spencer, G. R. Crabtree, S. L. Schreiber, *Chem. Biol.* **1996**, 3, 731–738.
- [352] K. L. LeBoulluec, R. J. Mattson, C. D. Mahle, R. T. McGovern, H. P. Nowak, A. J. Gentile, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, 5, 123–126.
- [353] a) J. Rao, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 10286–10290; b) J. Rao, J. Lahiri, L. Isaacs, R. M. Weis, G. M. Whitesides, *Science*, eingereicht.
- [354] L. Yan, J. Rao, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, im Druck.
- [355] E. F. Hahn, S. Nishimura, R. R. Goodman, G. W. Pasternak, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1985**, 235, 839–845.
- [356] M. N. Matrosovich, L. V. Mochalova, V. P. Marinina, N. E. Byramova, N. V. Bovin, *FEBS Lett.* **1990**, 272, 209–212.
- [357] R. Roy, D. Zanini, S. J. Meunier, A. Romanowska, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 213–217.
- [358] R. Roy, C. A. Laferriere, *Carbohydr. Res.* **1988**, 177, C1–C4.
- [359] A. Gamian, H. J. Jennings, C. A. Laferriere, R. Roy, *J. Carbohydr. Chem.* **1987**, 6, 161–165.
- [360] S. Sabesan, J. O. Duus, S. Neira, P. Domaille, S. Kelm, J. C. Paulson, K. Bock, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 8363–8375.
- [361] S.-K. Choi, M. Mammen, G. M. Whitesides, *Chem. Biol.* **1996**, 3, 97–104.
- [362] S.-K. Choi, G. M. Whitesides, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [363] S.-K. Choi, M. Mammen, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 4103–4111.
- [364] G. P. Chen, Y. Ito, Y. Imanishi, *Bioconjugates Chem.* **1997**, 8, 106–110.
- [365] P. Metzeau, *Biol. Cell* **1993**, 78, 129–134.
- [366] P. A. van der Merwe, A. N. Barclay, *Curr. Opin. Immunol.* **1996**, 8, 257–261.
- [367] D. K. Takemoto, J. J. Skehel, D. C. Wiley, *Virology* **1996**, 217, 452–458.
- [368] E. Evans, K. Ritchie, R. Merkel, *Biophys. J.* **1995**, 68, 2580–2587.
- [369] A. Tozeren, K. L. Sung, L. A. Sung, M. L. Dustin, P. Y. Chan, T. A. Springer, S. Chien, *J. Cell Biol.* **1992**, 116, 997–1006.
- [370] E. B. Finger, K. D. Puri, R. Alon, M. B. Lawrence, U. H. von Andrian, T. A. Springer, *Nature* **1996**, 379, 266–269.
- [371] R. Alon, R. C. Fuhlbrigge, E. B. Finger, T. A. Springer, *J. Cell Biol.* **1996**, 135, 849–865.
- [372] P. K. Gopalan, C. W. Smith, H. Lu, E. L. Berg, L. V. McIntire, S. I. Simon, *J. Immunol.* **1997**, 158, 367–375.
- [373] W. Hertl, W. S. Ramsey, E. D. Nowlan, *In Vitro* **1984**, 20, 796–801.
- [374] H. Ernst, M. K. Zanin, D. Everman, S. Hoffman, *J. Cell Sci.* **1995**, 108, 3807–3816.
- [375] M. B. Macek, L. C. Lopez, B. D. Shur, *Dev. Biol.* **1991**, 147, 440–444.
- [376] E. L. Florin, V. T. Moy, H. E. Gaub, *Science* **1994**, 264, 415–417.
- [377] N. C. Santos, M. A. Castanho, *Biophys. J.* **1996**, 71, 1641–1650.
- [378] Ergänzung bei der Korrektur: ein Lysogangliosid/Poly-L-glutaminsäure-Konjugat als picomolarer Inhibitor von Influenza-Hämagglutinin: H. Kamitakahara, T. Suzuki, N. Nishigori, Y. Suzuki, O. Kanie, C.-H. Wong, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 1607–1611; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 1524–1528.