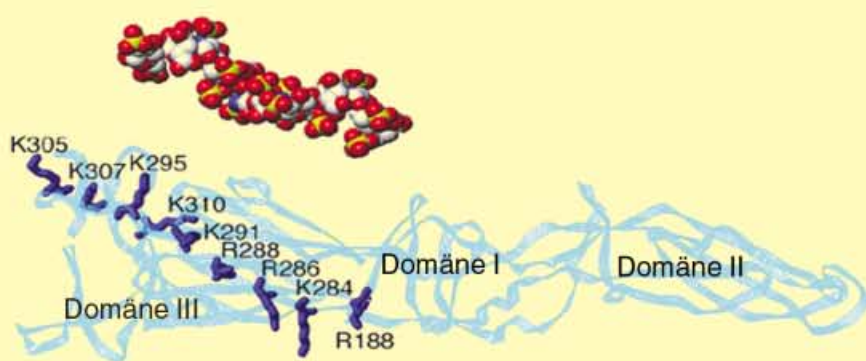
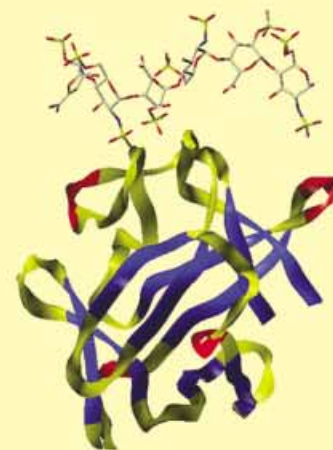


## *Heparin-Protein-Wechselwirkungen*



*virale Hüllproteine*



*Wachstumsfaktoren*

# Heparin-Protein-Wechselwirkungen

Ishan Capila und Robert J. Linhardt\*

Heparin, ein zu den Glycosaminoglycanen gehörendes sulfatiertes Polysaccharid, zeigt eine Reihe wichtiger biologischer Wirkungen, die aus der Wechselwirkung mit Proteinen resultieren. Da Heparin die Geschwindigkeit erhöht, mit der Antithrombin die Serinproteasen in der Blutgerinnungskaskade inhibiert, findet es breite Anwendung als Antikoagulant (Antiblutgerinnungsmittel). Heparin und das strukturverwandte Heparansulfat sind komplizierte lineare Polymere, die aus Ketten unterschiedlicher Länge und Sequenz bestehen. Heparansulfat, das an den Oberflächen tierischer Zellen und in der extrazellulären Matrix ubiquitär ist, vermittelt ebenfalls eine Reihe physiologischer und pathophy-

siologischer Prozesse. Die Schwierigkeiten bei der Beurteilung der Rolle von Heparin und Heparansulfat in vivo können zum Teil auf die Unkenntnis der genauen Struktur und Sequenz dieser Polysaccharide zurückgeführt werden. Abgesehen davon weiß man über Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen viel weniger als über die eingehend untersuchten Protein-Protein- und Protein-Nucleinsäure-Wechselwirkungen. Die neuere umfangreiche Forschung über strukturelle, kinetische und thermodynamische Aspekte der Proteinbindung von Heparin und Heparansulfat führte zu neuen Erkenntnissen über die Heparin-Protein-Wechselwirkungen. Viele dieser Wechselwirkungen sind hochspezi-

fisch, deshalb ist es für die Entwicklung neuer Therapeutika von grundlegender Bedeutung, sie auf molekularer Ebene zu verstehen. Dieser Aufsatz konzentriert sich auf die strukturellen und konformativen Eigenschaften von Heparin, die für die Wechselwirkungen mit Proteinen wichtig sind, außerdem wird die Wechselwirkung von Heparin und Heparansulfat mit ausgewählten Heparin-bindenden Proteingruppen behandelt.

**Stichwörter:** Blutkoagulation • Heparansulfat • Heparin • Kohlenhydrate • Medizinische Chemie • Molekulare Erkennung

## 1. Einleitung

Heparin, ein gerinnungshemmender Wirkstoff, wird allgemein als biologisch bedeutendes und chemisch einzigartiges Polysaccharid anerkannt. Es wurde 1916 von Jay McLean entdeckt, einem Medizinstudenten im zweiten Studienjahr, der unter der Anleitung des Physiologen William Howell an der Johns Hopkins University arbeitete.<sup>[1]</sup> Die Struktur von Heparin wurde erst nach und nach verstanden: Howell identifizierte 1928 einen der Zucker in Heparin als eine Uronsäure,<sup>[2]</sup> und in den Jahren 1935/36 erkannten Jorpes und Bergstrom Glucosamin als zweite Zuckerkomponente.<sup>[3]</sup> Jorpes und später Charles wiesen nach, dass Heparin einen hohen Anteil an kovalent gebundenem Sulfat enthält, der es zu einer der stärksten Säuren in der Natur macht.<sup>[4]</sup> Durch nachfolgende Untersuchungen erkannte man auch die

1→4-Verknüpfung zwischen dem C-1 des Glucosamins und dem C-4 der Uronsäure sowie die Stellung der O-Sulfogruppen in Heparin.<sup>[1]</sup> Die Uronsäure wurde 1968 von Perlin et al. NMR-spektroskopisch als L-Iduronsäure identifiziert.<sup>[5]</sup> So verstand man schließlich, dass Heparin ein sulfatiertes lineares Polysaccharid mit einer sich wiederholenden Disaccharideinheit aus Iduronsäure und Glucosamin ist.

1935 stellten Charles und Scott in Kanada zusammen mit Jorpes in Schweden Heparin in ausreichender Menge und Reinheit für die klinische Prüfung her. Die Arbeiten von Crafoord und Best zeigten, dass die Behandlung mit Heparin einer postoperativen Thrombose wirksam vorbeugt.<sup>[6]</sup> Diese medizinische Maßnahme setzte sich rasch durch und wird bis heute angewendet. Allerdings führt die Verwendung von Heparin auch zu unerwünschten Nebenwirkungen wie Blutungskomplikationen und der Heparin-induzierten Thrombocytopenie (HIT). Aufgrund dieser Komplikationen, einer besseren Kenntnis der Gerinnungskaskade und der Fraktionierung von Heparin wurden Heparinfraktionen niedriger Molekülmasse (LMW, low molecular weight) mit besser definierten chemischen und biologischen Eigenschaften entwickelt.<sup>[7]</sup> Diese Therapeutika haben besser vorhersehbare

[\*] Prof. R. J. Linhardt, Dr. I. Capila  
S328 College of Pharmacy  
University of Iowa  
115 S. Grand Avenue, Iowa City, IA 52242 (USA)  
Fax: (+1) 319-335-6634  
E-mail: robert-linhardt@uiowa.edu

pharmakologische Wirkungen, eine länger anhaltende Aktivität, verbesserte Bioverfügbarkeit und einen besseren therapeutischen Index ( $ED_{50}/LD_{50}$ ). Damit haben die LMW-Heparine zu Beginn des neuen Jahrtausend Heparin als wichtigstes klinisches Antikoagulans ersetzt.<sup>[8]</sup>

Rosenberg und Damus äußerten 1973 die Ansicht, dass Heparin an Antithrombin bindet und damit eine Konformationsänderung in Antithrombin III (AT III) bewirkt, die zu einer stark beschleunigten Reaktion mit Thrombin und der Bildung eines inaktiven Komplexes aus den beiden Proteinen führt.<sup>[9]</sup> Durch Affinitätschromatographie wurde die zur Bindung an AT III erforderliche Mindestsequenz in Heparin identifiziert.<sup>[10]</sup> Die Wechselwirkung von Heparin mit Antithrombin war der erste beschriebene Fall einer spezifischen Heparin-Protein-Wechselwirkung mit physiologischer Bedeutung. In den letzten zwanzig Jahren wurden immer mehr biologische Aktivitäten entdeckt, die durch Wechselwirkungen von Heparin und Heparansulfat mit Heparin-bindenden Proteinen gesteuert werden.<sup>[11]</sup> Diese Wechselwirkungen spielen in normalen physiologischen wie auch in pathologischen Prozessen eine wichtige Rolle.

Unsere Arbeiten auf diesem Gebiet begannen mit ersten Untersuchungen zur Charakterisierung der Substratspezifität von Heparin-Lyasen aus dem Bodenbakterium *Flavobacterium heparinum* und deren Reinigung.<sup>[12, 13]</sup> Um die Wirkung dieser Enzyme zu untersuchen, mussten wir neue Methoden zur Isolierung, Reinigung und strukturellen Charakterisierung von Oligosacchariden, die sich von Heparin und Heparansulfat ableiten, entwickeln.<sup>[14]</sup> Die Herstellung dieser strukturell definierten reinen Oligosaccharide war ein Durchbruch auf dem Weg zum Verständnis der Wechselwirkungen

von Heparin mit Proteinen und zu der Bestimmung der genauen Strukturbedingungen in Heparin, die für jede Wechselwirkung wesentlich sind.

## 2. Heparin

### 2.1. Die Strukturen von Heparin und Heparansulfat

Heparin ist ein lineares Polymer aus Wiederholungseinheiten von 1→4-verknüpften Pyranosyluronsäure- und 2-Amino-2-desoxyglucopyranose(Glucosamin)resten.<sup>[15]</sup> Die Uronsäurereste bestehen im Allgemeinen zu 90% aus L-Idopyranosyluronsäure (L-Iduronsäure) und zu 10% aus D-Glucopyranosyluronsäure (D-Glucuronsäure). Wegen seines hohen Anteils negativ geladener Sulfo- und Carboxylgruppen<sup>[6]</sup> hat Heparin die höchste Dichte negativer Ladungen aller bekannten biologischen Makromoleküle. Tatsächlich enthält das durchschnittliche Heparindisaccharid 2.7 Sulfonatgruppen. Die in Heparin am häufigsten vorkommende Struktureinheit ist das trisulfatierte Disaccharid (Schema 1). Allerdings existieren von diesem Disaccharid zahlreiche Strukturvariationen, die zur Mikroheterogenität von Heparin führen. Die Aminogruppe des Glucosaminrests kann durch eine Acetyl- oder Sulfogruppe substituiert oder frei sein. Die 3- und 6-Positionen der Glucosaminreste können entweder frei oder durch eine O-Sulfogruppe substituiert sein. Auch

[\*] In diesem Beitrag werden die allgemein gebräuchlichen Präfixe Sulfo- und Carboxyl- verwendet, statt der nach IUPAC-Regeln korrekten Präfixe Sulfonate- und Carboxylato-.

Robert J. Linhardt erhielt 1975 seinen BSc in Chemie an der Marquette University und promovierte 1979 in Organischer Chemie an der Johns Hopkins University. Bei einem Postdoc-Aufenthalt am Massachusetts Institute of Technology, an dem er unter Anleitung von Professor Robert Langer im Department „Biochemical Engineering“ arbeitete, wurde sein Interesse an Heparin-Lyasen geweckt. Dort reinigte er erstmals solche Enzyme, als er an der Entwicklung eines Bioreaktors zur Entfernung von Heparin aus dem Blut arbeitete. Als er 1982 an die Fakultät der University of Iowa berufen wurde, setzte er seine Arbeiten über Heparin fort, wobei das Hauptaugenmerk auf der Struktur lag und auf den biologischen Wirkungen, die durch seine Wechselwirkungen mit Proteinen vermittelt werden. Er ist derzeit F. Wendell Miller Distinguished Professor of Chemistry, Medicinal Chemistry and Chemical and Biochemical Engineering an der University of Iowa. Er wurde von der American Chemical Society mit dem Horace S. Isbell Award in Carbohydrate Chemistry geehrt und erhielt den AACP Volwiler Research Achievement Award for Pharmaceutical Research.

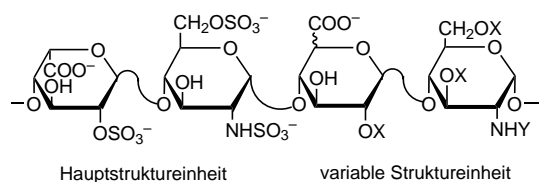


I. Capila

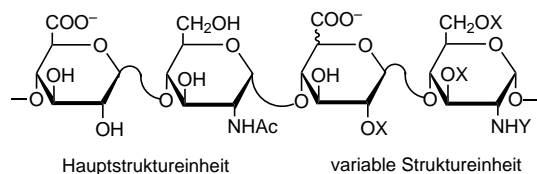


R. J. Linhardt

Ishan Capila erhielt seinen BSc in Chemie 1994 vom St. Stephen's College in Neu Delhi, Indien, und den MSc in Biotechnologie 1996 vom Indian Institute of Technology (IIT) in Bombay, wo er bei Professor Umesh Desai über die Modellierung der Wechselwirkung von Heparin mit Antithrombin III arbeitete. Er promovierte 2001 an der University of Iowa in Medizinischer und Naturstoffchemie; Thema seiner Arbeit in der Forschungsgruppe von Professor Linhardt war die Struktur von Glycosaminoglycanen und ihre Wechselwirkung mit Proteinen und Enzymen. Ishan Capila wechselte vor kurzem in die Arbeitsgruppe von Professor Merton Bernfield an der Harvard Medical School, um dort über die Biologie von Heparansulfat-Proteoglycanen zu arbeiten.



Heparin



Heparansulfat

Schema 1. Wiederholungseinheiten des Haupt- und Nebendisaccharids in Heparin und Heparansulfat (X = H oder  $\text{SO}_3^-$ , Y = Ac,  $\text{SO}_3^-$  oder H).

die Uronsäure, entweder L-Iduron- oder D-Glucuronsäure, kann eine 2-O-Sulfogruppe enthalten. Die Molmasse von Glycosaminoglycan-Heparin liegt zwischen 5 und 40 kDa, die durchschnittliche Molmasse beträgt ca. 15 kDa und die durchschnittliche negative Ladung ca.  $-75$ . Die Molmassenverteilung von Heparin ( $M_w/M_n$ ) entspricht seiner Polydispersität. Aufgrund dieser Strukturvielfalt ist Heparin eine äußerst schwierig zu charakterisierende Verbindung.

Die Komplexität der Heparinstruktur lässt sich auf mehreren Ebenen betrachten. Auf der Proteoglycan(PG)-Ebene können unterschiedlich viele Polysaccharid- oder Glycosaminoglycanketten (gegebenenfalls mit unterschiedlichen Saccharidsequenzen) an die verschiedenen Serinreste im Kernprotein von Heparin gebunden sein. Während ihrer Biosynthese sind Heparinketten an ein ungewöhnliches Kernprotein, Serglycin, gebunden, das nur in Mastzellen und einigen hämatopoetischen (blutbildenden) Zellen vorkommt. Gewebe-Proteasen setzen aus diesem Kernprotein Peptidoglycan-Heparin frei, ein kleines Peptid, an das eine einzelne lange Polysaccharidkette (100 kDa) gebunden ist. Dieses Peptidoglycan ist kurzlebig, denn eine  $\beta$ -Endoglucuronidase setzt es sofort zu einer Reihe kleinerer (um die 15 kDa) Polysaccharidketten um, dem Glycosaminoglycan(GAG)-Heparin.<sup>[11]</sup> Die meisten chemischen und physikalischen Eigenschaften von Heparin hängen mit der Struktur, Sequenz, Konformation, Kettenbeweglichkeit, relativen Molekülmasse und Ladungsdichte von GAG zusammen.

Heparansulfat ist ähnlich aufgebaut wie Heparin, aber weit weniger durch Sulfogruppen substituiert, und seine Struktur (und Sequenz) variiert stärker. Wie Heparin ist auch Heparansulfat ein lineares Copolymer mit einem 1 $\rightarrow$ 4-verknüpften Uronsäure-Glucosamin-Disaccharid als Wiederholungseinheit (Schema 1).<sup>[16]</sup> Die D-Glucuronsäure überwiegt in Heparansulfat, doch es kann auch beträchtliche Mengen an L-Iduronsäure enthalten. In Heparansulfaten kommt meistens nur eine Sulfogruppe pro Disaccharid vor, nur in einzelnen Fällen ist der Anteil an O-Sulfogruppen höher. Heparansulfatketten enthalten auch häufig Domänen mit

ausgedehnten Sequenzen niedriger oder hoher Sulfatierung.<sup>[17]</sup> Obwohl Heparansulfat alle Strukturvariationen enthält, die auch in Heparin auftreten (und umgekehrt), kommen die Nebensequenzvarianten häufiger vor als in Heparin, sodass die Struktur und die Sequenz von Heparansulfat wesentlich komplizierter ist. Heparansulfatketten sind ebenfalls polydispers, allgemein aber länger als Heparinketten, die Molmasse liegt zwischen 5 und 50 kDa (durchschnittlich ca. 30 kDa).<sup>[18]</sup>

Die Biosynthese von Heparansulfat erfolgt als Proteoglycan auf dem gleichen Weg wie die von Heparin, allerdings bleibt die Heparansulfat-GAG-Kette an ihr Kernprotein gebunden. Heparansulfat kommt auf Zelloberflächen ubiquitär vor und ist auch häufiger Bestandteil der extrazellulären Matrix.<sup>[17, 19]</sup> Gewöhnlich tragen zwei Arten von Kernproteinen Heparansulfat-GAG-Ketten: die Syndecane (integrale Membranproteine) und die Glypican (GPI-verankerte Proteine), die den beiden Hauptgruppen der Heparansulfat-Proteoglycane (Heparansulfat-PGs) entsprechen.<sup>[19, 20]</sup> Die Heparansulfatketten an diesen Heparansulfat-PGs binden zahlreiche Proteine und vermitteln eine Reihe physiologisch wichtiger Prozesse, darunter die Blutgerinnung, die Zelladhäsion, den Lipidstoffwechsel und die Regulierung von Wachstumsfaktoren.<sup>[21]</sup> Trotz ihrer ähnlichen Struktur lassen sich Heparin- und Heparansulfat-GAGs häufig anhand ihrer Empfindlichkeit gegenüber Heparin-Lyasen, einer Gruppe GAG abbauender mikrobieller Enzyme, unterscheiden.<sup>[22]</sup> Die meisten der in den folgenden Abschnitten behandelten Eigenschaften von Heparin gelten, wenn nicht anders vermerkt ist, auch für Heparansulfat.

## 2.2. Die Konformation von Heparin

Heparin ist ein lineares, unverzweigtes, hochsulfatiertes Polysaccharid, das hauptsächlich in der Helixform vorliegt (Abbildung 1).<sup>[23]</sup> Anders als bei Proteinen sind besondere Tertiärstrukturen von Heparin nicht bekannt. Die Spezifität seiner Wechselwirkung mit einer Vielfalt biologisch wichtiger Proteine lässt darauf schließen, dass seine Sulfo- und Carboxylgruppen bestimmte Muster bilden, um spezifische Proteinwechselwirkungen zu fördern.<sup>[24]</sup> Die konformative Beweglichkeit der L-Iduronsäurereste in Heparin wird als Ursache für das breite Spektrum spezifischer Proteinwechselwirkungen dieser GAG-Gruppe angesehen.<sup>[25]</sup>

Die Konformationsanalyse einzelner Zucker in Heparin lässt erkennen, dass die D-Glucosamin- und D-Glucuronsäurereste die bevorzugte  $^4C_1$ -Konformation einnehmen (Schema 2A).<sup>[26]</sup> Die Konformation des beweglichen L-Iduronsäure(DoA)-Rests variiert in Abhängigkeit von seinem Substitutionsmuster und seiner relativen Stellung in der Kette. Befindet sich der DoA-Rest am reduzierenden Ende eines Oligosaccharids, so lassen NMR-Daten drei mögliche Konformere erkennen: die  $^4C_1$ - und die  $^1C_4$ -Sesselform sowie die  $^2S_0$ -Form (schiefes Boot) (Schema 2B).<sup>[27]</sup> In der Innenposition kann der DoA-Rest nur zwei Konformationen einnehmen, nämlich die  $^1C_4$ -Sessel- und die  $^2S_0$ -Boot-Konformation.<sup>[28]</sup> Auch 2-O-Sulfo- $\alpha$ -L-idopyranosyluronat-

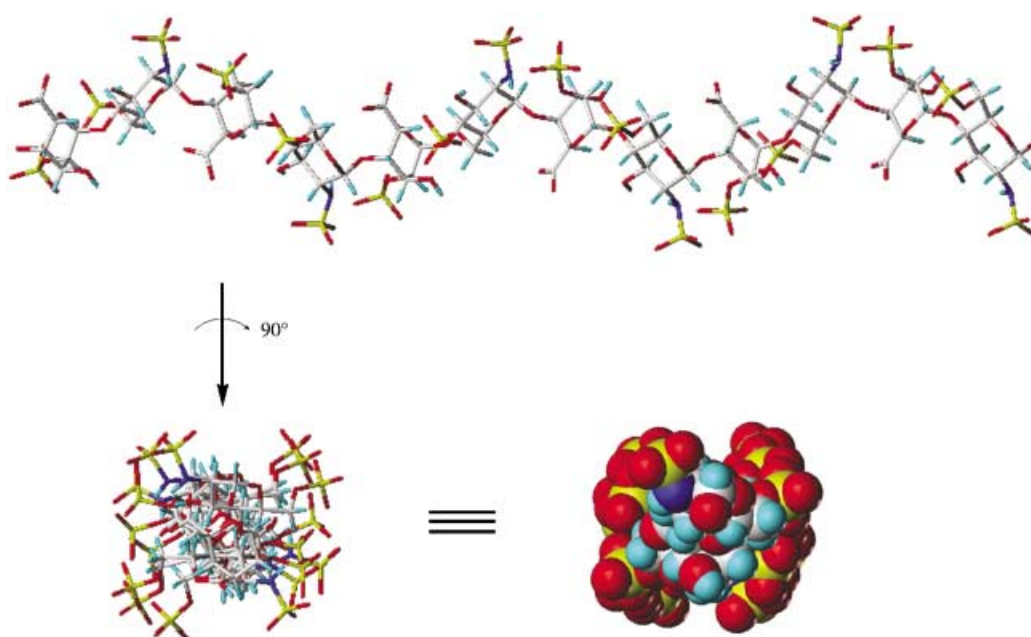


Abbildung 1. Helixkonformation eines Heparin-Dodecasaccharids mit der Wiederholungseinheit des Hauptdisaccharids aus Schema 1 (Schwefelatome gelb, Sauerstoffatome rot, Stickstoffatome blau und Wasserstoffatome violett).

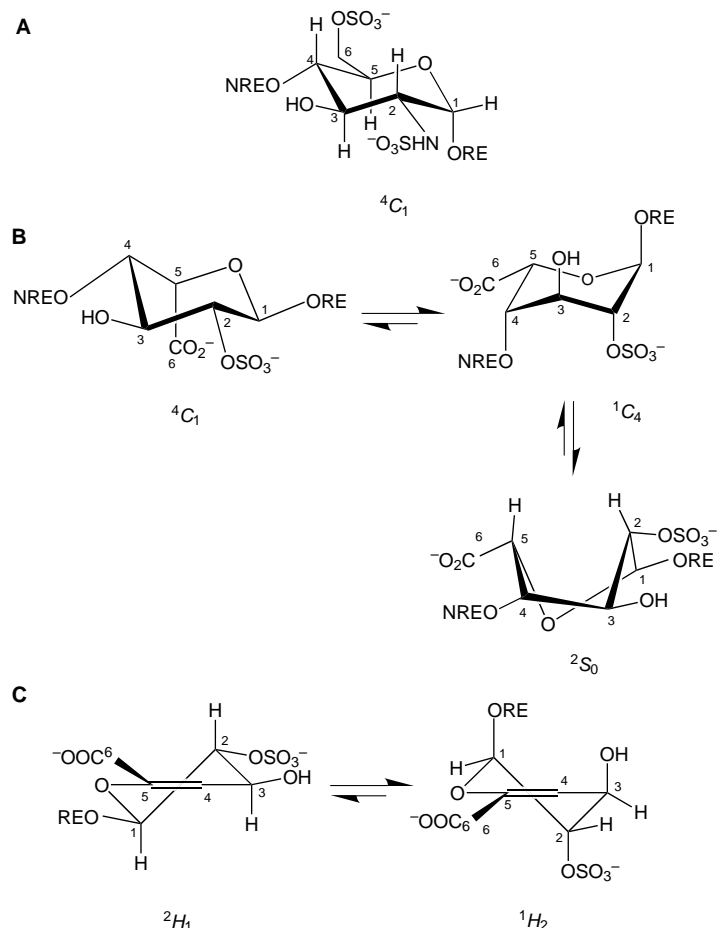
(L-IdoAp2S)-Reste können in diesen beiden Konformationen vorkommen, und NMR-spektroskopische Untersuchungen eines von Heparin abgeleiteten Hexasaccharids in Lösung zeigen, dass bei den inneren IdoAp2S-Resten ein Gleichgewicht zwischen der Sessel- und der  $^2S_0$ -Bootform vorliegt.<sup>[29]</sup> Die  $^2S_0$ -Form scheint konformativ etwas stabiler zu sein, denn sie trägt zur Minimierung der ungünstigen 1,3-diaxialen nichtbindenden Wechselwirkungen bei, die in der  $^1C_4$ -Form mit vier axialen Substituenten und der Carboxygruppe als einzigem äquatorialem Rest zu erwarten sind.<sup>[30]</sup> Allerdings ist die Energiebarriere zur  $^1C_4$ -Form nicht hoch, und der Iduronatring kann zwischen der  $^2S_0$ - und der  $^1C_4$ -Form wechseln,

sodass bei der Bindung an ein Protein günstige elektrostatische Wechselwirkungen mit basischen Aminosäuren des Proteins möglich sind.

Tatsächlich ändert sich zwar die räumliche Orientierung der 2-*O*-Sulfogruppe in den IdoAp2S-Resten bei der Umwandlung der  $^2S_0$ - und  $^1C_4$ -Konformationen ineinander, doch im Gerüst der Polysaccharidkette findet keine signifikante Konformationsänderung statt.<sup>[23]</sup> Die Struktur eines Heparin-Hexasaccharid-FGF-2-Komplexes im Kristall zeigt, dass ein innerer IdoAp2S-Rest in Kontakt zum Protein in der  $^1C_4$ -Konformation vorliegt, während der andere den Kontakt in der  $^2S_0$ -Form herstellt.<sup>[31]</sup> Obwohl die Iduronatringe beweglich sind und im nichtgebundenen Zustand ein Gleichgewicht zwischen der  $^2S_0$ - und der  $^1C_4$ -Konformation besteht, können sie demnach bei der Bindung an ein Protein in einer der beiden Konformation fixiert werden. Das Vorherrschen eines Iduronatkonformers wird vom Substitutionsmuster des D-Glucosaminrests an seinem reduzierenden Ende beeinflusst: Trägt beispielsweise der IdoAp2S-Rest ein in 4-Stellung substituiertes *N*-Acetylglucosamin (D-GlcNpAc), so liegt er fast ausschließlich als  $^1C_4$ -Sesselkonformer vor.<sup>[32]</sup>

Trotz der konformativen Beweglichkeit der L-Iduronatreste bleiben die Winkel  $\phi$  und  $\psi$  der Glycosidbindungen in Heparinsacchariden relativ unverändert. NMR-spektroskopische Untersuchungen an einer Reihe modifizierter Heparine mit systematisch verändertem Substitutionsmuster belegen, dass die Glycosidbindungen in allen Derivaten ungeachtet des Sulfatierungsmusters ähnliche Konformationen aufweisen.<sup>[33]</sup> Die durch Kristallstrukturanalyse bestimmten Helixparameter von Heparin-Oligosacchariden, die an Fibroblasten-Wachstumsfaktoren gebunden sind, ergaben ähnliche Werte.<sup>[31, 34]</sup>

Homogene, strukturell definierte Heparin- und Heparansulfat-Oligosaccharide werden gewöhnlich aus den GAGs



Schema 2. Konformative Beweglichkeit der Reste in Heparin und Heparansulfat. A) Die in Glucosamin vorherrschende  ${}^4C_1$ -Form. B)  ${}^4C_1$ ,  ${}^1C_4$ - und  ${}^2S_0$ -Konformere von Iduronsäure und C)  ${}^2H_1$ - und  ${}^1H_2$ -Formen der  $\Delta^4$ -Uronsäure am nichtreduzierenden Ende. RE und NRE stehen für das reduzierende bzw. nichtreduzierende Ende von Saccharidsequenzen.

enzymatisch mit Heparin-Lyasen hergestellt.<sup>[14]</sup> Diese Enzyme spalten Heparin in Oligosaccharide auf, die eine nicht-reduzierende 4-Desoxy- $\alpha$ -L-threo-2-sulfohex-4-enopyranosyluronsäure ( $\Delta^4$ -Uronsäure,  $\Delta$ UAp2S) als terminalen Rest enthalten.<sup>[35]</sup> Um mit diesen Oligosacchariden die Heparin-Protein-Wechselwirkungen zu untersuchen und um die ungewöhnliche Reaktivität der  $\Delta^4$ -Uronate zu verstehen, muss man ihre Konformation kennen.<sup>[36, 37]</sup> Aufgrund der Konformation der 4,5-Doppelbindung kann der  $\Delta$ UAp2S-Rest entweder in der  $^2H_1$ - oder in der  $^1H_2$ -Form vorliegen (Schema 2C), wobei die Lage des Gleichgewichts zwischen diesen beiden Konformeren von ihrem Substitutionsmuster abhängt.<sup>[37, 38]</sup> Aus kristallographischen Daten geht außerdem hervor, dass die beiden Formen in derselben Elementarzelle gemeinsam vorkommen, was darauf schließen lässt, dass sie nahezu energiegleich sind.<sup>[39]</sup> Allerdings lassen NMR-spektroskopische Untersuchungen von Heparin-Oligosacchariden in Lösung erkennen, dass der terminale  $\Delta$ UAp2S-Rest überwiegend in der  $^1H_2$ -Form und nur zu einem kleinen Anteil in der  $^2H_1$ -Form vorliegt.<sup>[29, 30]</sup>

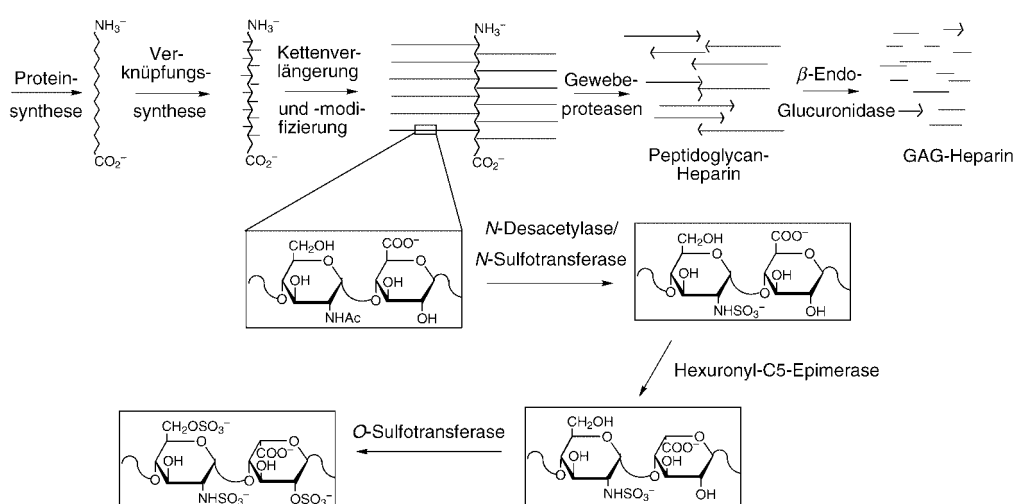
### 2.3. Die Heparin-Biosynthese

Die Biosynthese von Heparin und Heparansulfat und die Steuerungsmechanismen, die zum Einbau verschiedener Saccharidsequenzen in ihre Strukturen führen, sind nur zum Teil bekannt (Schema 3). Untersuchungen zur Biosynthese von Heparin wurden an einer Mastocytomzellkultur mit radioaktiv markierten Stoffwechselforstufen von Heparin durchgeführt.<sup>[40, 41]</sup> Das Kernprotein, Serglycin, enthält zahlreiche Serin- und Glycin-Wiederholungseinheiten und wird vor allem im rauen endoplasmatischen Reticulum synthetisiert.

Die Biosynthese der GAG-Kette findet hauptsächlich im Golgi-Apparat statt. Zuerst wird ein Tetrasaccharidbaustein mit einem Serinrest des Kernproteins verknüpft,<sup>[42]</sup> und es entsteht das Bindungsregion-Tetrasaccharid mit der Sequenz  $\beta$ -GlcAp(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -Galp(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -Galp(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -Xylp-1 $\rightarrow$ Ser.

An der Synthese sind vier Glycosyltransferasen beteiligt,<sup>[43]</sup> von denen die Glucuronyltransferase, die den terminalen Glucuronsäurerest (GlcAp) anknüpft,<sup>[44]</sup> und die Galactosyltransferase, die den zweiten Galactoserest (Galp) anbindet,<sup>[45]</sup> geklont und charakterisiert wurden. An diese neutrale Zuckerbindungsregion wird der erste GlcNpAc-Rest oder N-Acetylglucosamin (GalNpAc, bei der Biosynthese von Chondroitinsulfaten) gebunden. Diese Anlagerung entscheidet darüber, ob die Kette zu einem Glucosaminoglycan (Heparin und Heparansulfat) oder einem Galactosaminoglycan (Chondroitinsulfat und Dermatsulfat) wird. Vermutlich wirken die Peptidsequenzmotive in Nachbarschaft zu den substituierten Serinresten der Bindungsregion als Signal für die Anlagerung eines GlcNpAc-Rests und lösen so die Bildung von Heparin oder Heparansulfat aus; als Katalysator für diese Reaktion wird eine  $\alpha$ -GlcNpAc-Transferase angesehen.<sup>[46]</sup>

Nach der Anlagerung des ersten Restes werden abwechselnd GlcAp- und GlcNpAc-Reste von den zugehörigen UDP-Zuckernucleotiden auf die nichtreduzierenden Enden der wachsenden Ketten übertragen und bilden so die restliche GAG-Kette. Man nimmt an, dass ein aus einem heterooligomeren Komplex zweier Proteine (EXT1 und EXT2) gebildetes Enzym sowohl GlcAp-Transferase- als auch GlcNpAc-Transferase-Aktivität hat.<sup>[47]</sup> Annähernd 300 Zuckerreste werden an die lineare Polysaccharidkette angelagert, bevor die Synthese endet.<sup>[40]</sup> Während des Kettenwachstums finden weitere Modifizierungen statt.<sup>[48]</sup> So wird die N-Desacetylierung und N-Sulfatierung der GlcNpAc-Reste durch ein N-Desacetylase bzw. N-Sulfotransferase-Enzym eingeleitet. Die anschließenden Schritte erfolgen sequenziell entweder am N-Sulfoglucosamin(GlcNpS)-haltigen Rest oder in seiner Nähe. Danach katalysiert eine C-5-Epimerase die Umwandlung einiger D-Glucuronsäurereste in L-Iduronsäurereste.<sup>[49]</sup> Hierauf folgt die O-Sulfatierung der Iduronsäurereste an C-2 durch eine Iduronosyl-2-O-Sulfotransferase. IdoAp in einem IdoAp $\rightarrow$ GlcNpS-Disaccharid kann durch dieses Enzym sulfatiert werden, wenn der GlcNpS-Rest an C-6 keine O-Sulfogruppe enthält.<sup>[50]</sup> Weitere Untersuchungen haben außerdem ergeben, dass eine sehr aktive Glucuronosyl-2-O-Sulfotransferase aus den Mastocytomfraktionen der Maus die O-Sulfatierung von GlcAp-Resten an C-2 bewirkt.<sup>[51]</sup> Vermutlich ist die Glucuronosyl-2-O-Sulfotransferase das gleiche Enzym wie die Iduronosyl-2-O-Sulfotransferase.<sup>[52]</sup> An die 2-O-Sulfatierung der Uronsäure schließt sich die Wirkung der Glucosamin-6-O-Sulfotransferase an, die eine O-Sulfogruppe auf die C-6-Position von GlcNpAc und GlcNpS überträgt.<sup>[50]</sup>



Schema 3. Biosyntheseweg zu Heparin/Heparansulfat-Proteoglycanen und deren Abbau zu Peptidoglycanen und Glycosaminoglycanen. Die Proteinsynthese erfolgt im endoplasmatischen Reticulum, Verknüpfungssynthese, Kettenverlängerung und -modifizierung erfolgen im Golgi-Apparat, und Proteolyse und Abbau durch Glucuronidase finden in den Granula oder Lysosomen statt.

Abschließend modifiziert eine 3-O-Sulfotransferase bestimmte



GlcNpS6S-Reste.<sup>[53]</sup> Die 3-O-Sulfonierung ist für die gerinnungshemmende Wirkung von Heparin erforderlich, und die von der 3-O-Sulfotransferase gebildete Pentasaccharidsequenz ist die Mindeststruktur, die zur Bindung von Antithrombin III benötigt wird. Die 3-O-Sulfotransferase wurde geklont und gereinigt, und wie bei vielen anderen Biosyntheseezymen gibt es mehrere Isoformen mit unterschiedlicher Spezifität.<sup>[54]</sup> Alle oben beschriebenen Reaktionen der Sulfotransferase benötigen 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) als Sulfatdonor.

Die anscheinend zufällige und unvollständige erste N-Desacetylierung ist der Hauptgrund für die Einführung struktureller Heterogenität in das Polymer in einem frühen Stadium der Biosynthese. Die Spezifität dieses Enzyms nach seiner ersten Modifizierung ist auch für die Blockstrukturen in Heparansulfat verantwortlich, wo hochsulfatierte Sequenzen getrennt von Sequenzen nichtsulfatierter Disaccharide vorliegen.<sup>[42, 55]</sup> Die gesamte Strukturvielfalt der Heparin-/Heparansulfat-Polymere ist das Ergebnis unvollständiger Modifizierungen durch die Biosyntheseezyme, und noch ist nicht genau bekannt, welche zusätzlichen Faktoren als Regulierungselemente für diese Enzyme in der Biosynthese dienen.

## 2.4. Die medizinische Bedeutung von Heparin

Heparin und LMW-Heparine sind die klinisch am häufigsten verwendeten Antikoagulantien. Bei den meisten Extrakorporalverfahren (bei denen Blut aus dem Körper durch einen Apparat geleitet wird), wie der Dialyse und der bei Bypass-Operationen verwendeten Membranoxygenierung, wird Heparin intravenös verabreicht (LMW-Heparin kann intravenös oder subkutan verabreicht werden, was seine Anwendungsbreite verbessert).<sup>[56]</sup> Die Verwendung derartiger Apparate, die eine Heparinisierung erfordern, kann leicht zu hämorrhagischen Komplikationen führen. Die Heparinisierung des Körpers wird auch zur Behandlung der Thrombose in tiefen Beinvenen und bei vielen anderen chirurgischen Verfahren angewendet.<sup>[57]</sup> Die Heparin-induzierte Thrombocytopenie (HIT), ein komplizierter Vorgang, der zu Blutplättchenmangel führt, wurde kürzlich als eine der schwerwiegendsten Komplikationen bei der Heparinbehandlung erkannt.<sup>[58]</sup>

## 3. Die Wechselwirkung von Heparin mit Proteinen

Mit der Entdeckung von immer mehr Heparin-bindenden Proteinen wurde es nötig, die Moleküleigenschaften in den Proteinen und in Heparin zu bestimmen, die für die spezifische Erkennung verantwortlich sind (Tabelle 1). Die erste Untersuchung hinsichtlich allgemeiner Strukturbedingungen für GAG-Protein-Wechselwirkungen führten 1989 Cardin und Weintraub durch.<sup>[59]</sup> Sie verglichen die Heparin-bindenden Domänen der vier Proteine Apolipoprotein B, Apolipoprotein E, Vitronectin und Plättchenfaktor 4 und zeigten, dass die Proteine nicht nur ähnliche Sequenzen, sondern auch definierte Strukturmodule haben, die in die beiden Konsenssequenzen XBBXBX und XBBBXXBX (B ist ein

basischer und X ein hydrophatischer, d.h. neutraler und hydrophober Aminosäurerest) eingeteilt wurden. Diese Konsenssequenzen kommen auch in anderen Proteinen vor, die Heparin binden. Molecular-Modeling-Untersuchungen dieser Konsenssequenzen ergaben, dass ihre Anwesenheit in bestimmten Konformationen der Sekundärstruktur zu einer Ausrichtung der basischen Reste führt, sodass deren Wechselwirkung mit den negativ geladenen Sulfogruppen von Heparin erleichtert wird. Für eine XBBXBX-Sequenz in einer  $\beta$ -Strangkongformation ergab sich, dass die basischen Aminosäuren an einer Seite des  $\beta$ -Strangs angeordnet waren, während die hydrophatischen Aminosäuren in den Proteinkernen zeigen würden. Analog würden bei einer Faltung der XBBBXXBX-Sequenz zur  $\alpha$ -Helix die basischen Aminosäuren auf einer Seite der Helix stehen (Abbildung 2) und die

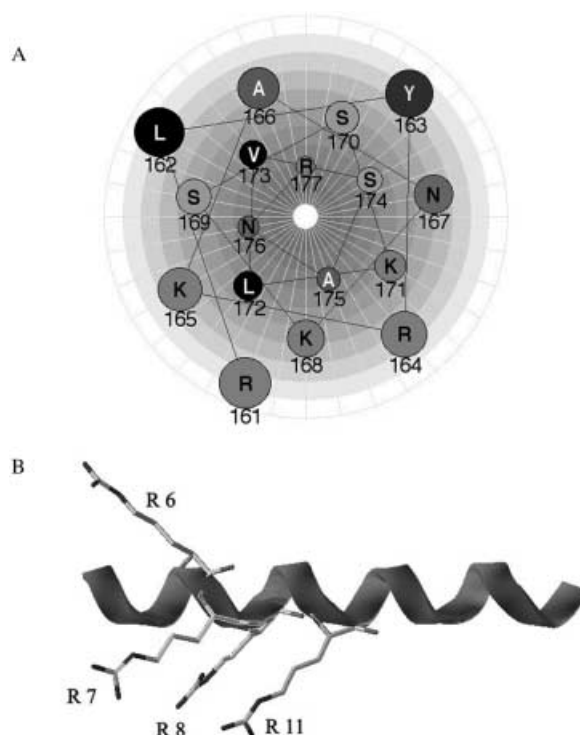


Abbildung 2. Bei den Cardin- und Weintraub-Strukturmodulen in einer  $\alpha$ -Helix weisen die basischen Reste R und K zu einer Seite. A) Helical-Wheel-Diagramm von Apolipoprotein E (Reste 161–177). B) Mit dem Programm SYBYL Version 6.3 erstelltes Helixmodell eines XBBBXXBX-Strukturmotivs.

hydrophatischen Reste in den Proteinkernen weisen. Ausgehend von diesem Modell schlugen Sobel et al. in dem Heparin-bindenden Protein Von-Willebrand-Faktor eine dritte Konsenssequenz, XBBBXXBBBXXBBX, vor.<sup>[60]</sup> Diese Strukturmodule dienen als erste Sequenzsensoren, um herauszufinden, ob ein Protein eventuell Heparin binden kann. Mit der Entdeckung weiterer Heparin-bindender Proteine stellte man jedoch fest, dass die Strukturmotivhypothese nicht immer zutrifft. Basische, in der Sequenz weiter entfernte Reste könnten im gefalteten Zustand enger zusammenrücken. Um das Heparinbindungsvermögen zu bestimmen, ist demnach die räumliche Orientierung der basischen Reste ein wichtiger Faktor als ihre Nähe in der Sequenz. Margalit et al.

Tabelle 1. Eigenschaften ausgewählter Heparin-bindender Proteine.

Heparin-bindende Proteine	physiologische/pathologische Funktion	Merkmale der Heparinbindung				
		$K_d$	Oligosaccharidgröße	Sequenzmerkmale <sup>[d]</sup>	Wirkung	Lit.
Proteasen/Esterasen						
AT III <sup>[a]</sup>	Serpin der Gerinnungskaskade	ca. 20 nM	5-mer	GlcNS6S3S	erhöht	[83, 104]
SLPI	inhibiert Elastase und Cathepsin G	ca. 6 nM	12-mer bis 14-mer	IS	erhöht	[76]
C1 INH	inhibiert C1-Esterase	ca. 100 nM	–	HS	erhöht	[87]
VCP	schützt Wirtszelle vor Komplement	nM	–		unklar	[114, 115]
Wachstumsfaktoren						
FGF-1 <sup>[a]</sup>	Zellproliferation, -differenzierung, -morphogenese und -angiogenese	nM	4-mer bis 6-mer	IdoA2S-GlcNS6S	aktiviert Signal-transduktion	[34, 93]
FGF-2 <sup>[a,b]</sup>	(wie FGF-1)	nM	4-mer bis 6-mer	IdoA2S-GlcNS	(wie FGF-1)	[31, 88]
Chemokine						
PF-4 <sup>[b]</sup>	Entzündung und Wundheilung	nM	12-mer	HS/LS/HS	inaktiviert Heparin	[136, 137]
IL-8	prä-inflammatorisches Cytokin	ca. 6 $\mu$ M	18-mer bis 20-mer	HS/LS/HS	fördert	[139]
SDF-1 $\alpha$ <sup>[c]</sup>	prä-inflammatorischer Vermittler	ca. 20 nM	12-mer bis 14-mer	HS	lokalisiert	[142, 143]
Lipid-bindende Proteine						
Annexin II	Rezeptor für TPA und Plasminogen, CMV und Tenascin C	ca. 30 nM	4-mer bis 5-mer	HS	unklar	[151]
Annexin V <sup>[a]</sup>	gerinnungshemmende Wirkung, Zelleintritt von Influenza- und Hepatitis-B-Viren	ca. 20 nM	8-mer	HS	zusammen-fügen	[85, 157]
ApoE <sup>[b]</sup>	Lipidtransport, AD-Risikofaktor	ca. 100 nM	8-mer	HS	lokalisiert	[166]
pathogene Proteine						
HIV-1 gp120	Vireneintritt	0,3 $\mu$ M	10-mer	HS	inhibiert	[173, 175]
CypA	Lokalisierung und Eintritt von Viren	–	–	–	inhibiert	[177]
Tat	transaktivierender Faktor, präpariert Zellen für eine HIV-Infektion	ca. 70 nM	6-mer	HS	wirkt entgegen	[181]
HSV gB und gC	Zelleintritt von Viren	–	–	–	inhibiert	[184, 186]
HSV gD	Eintritt von Viren und Verschmelzung	–	–	GlcNH <sub>2</sub> 3S	inhibiert	[70]
Dengue-Virus-Hüllprotein	Lokalisierung von Viren	ca. 15 nM	10-mer	HS	inhibiert	[187]
Malaria-CS-Protein	Anheften von Sporozoiten an Hepatocyten	ca. 40 nM	10-mer	HS	inhibiert	[193 – 195]
Adhäsionsproteine						
Selectine	Adhäsion, Entzündung und Metastasierung	$\mu$ M	$\geq$ 4-mer	HS mit GlcNH <sub>2</sub>	blockiert	[205, 206]
Vitronectin	Zelladhäsion und -wanderung	nM	–	–	entfernt	[200, 201]
Fibronectin	Adhäsion und Traktion	$\mu$ M	8-mer bis 14-mer	HS mit GlcNS	reorganisiert	[241]
HB-GAM <sup>[b]</sup>	Neuritenwachstum bei der Entwicklung	ca. 10 nM	16-mer bis 18-mer	HS	vermittelt	[86, 211]
AP	im Amyloidplaque	$\mu$ M	4-mer	HS	fügt zusammen	[152, 216]

[a] Die Struktur des Oligosaccharid-Protein-Komplexes als Cokristall ist erhältlich. [b] Die NMR-spektroskopisch bestimmte Struktur des Oligosaccharid-Protein-Komplexes in Lösung ist erhältlich. [c] Molecular-Modeling-Studien zur Bildung des Oligosaccharid-Protein-Komplexes sind erhältlich. [d] HS = hohe Sulfatierung, IS = mittlere Sulfatierung, LS = niedrige Sulfatierung.

nutzten ebenfalls Molecular-Modeling-Studien, um benachbarte Heparinbindungsstellen zu untersuchen, deren Wechselwirkung mit Heparin bekannt war. Sie stellten fest, dass in nachgewiesenen Heparinbindungsstellen mit bekannter Sekundärstruktur ein Abstand von etwa 20 Å zwischen den basischen Aminosäuren für die Wechselwirkung von Bedeutung ist, unabhängig davon, ob die Heparinbindungsstelle als  $\alpha$ -Helix oder als  $\beta$ -Strang vorliegt.<sup>[61]</sup> Da die meisten basischen Reste auf entgegengesetzten Seiten der Sekundärstruktur angeordnet waren, schlugen die Autoren ferner vor, dass sich Heparin um seine Bindungsdomäne windet, um mit den positiv geladenen Resten in Wechselwirkung zu treten. Außerdem nahmen sie an, dass dieses Knäueln zu Konformationsänderungen im Heparin-bindenden Protein führen kann.

Heparinbindungsstellen kommen im Allgemeinen an der äußeren Oberfläche von Proteinen vor und stimmen mit flachen Taschen positiver Ladung überein. Demnach ist die Topologie der Heparinbindungsstelle ebenfalls ein wichtiger Faktor in den Heparin-bindenden Konsenssequenzen. Die Strukturanalyse der Heparinbindungsstellen von saurem Fibroblasten-Wachstumsfaktor (fibroblast growth factor, FGF-1), basischem FGF (FGF-2) und dem trans-

formierenden Wachstumsfaktor  $\beta$ -1 (TGF  $\beta$ -1) ließ ein TXXBXXTBXXXTBB-Motiv (Abbildung 3) erkennen, in dem T eine Schleife (turn), B ein basischer Arginin- oder Lysinrest (oder gelegentlich ein Wasserstoff-bindendes Glutamin) und X ein hydrophatischer Rest ist.<sup>[62]</sup> Die Bedeutung

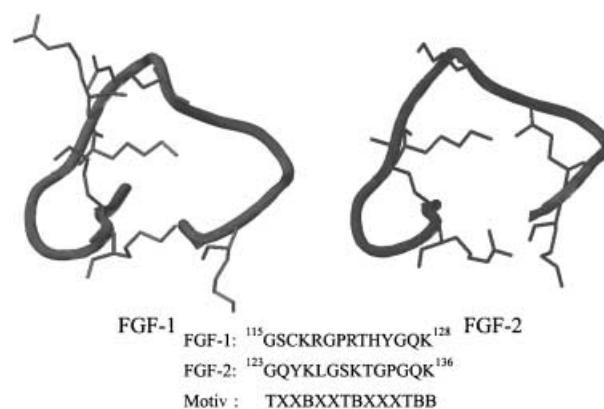


Abbildung 3. Windungsreiche, Heparin-bindende Strukturmodule der FGF-Proteine. Das Peptidgerüst ist als fette Linie dargestellt, und nur die Seitenketten der basischen Reste sind eingezeichnet.



der Form dieser Bindungsstelle in der FGF-Gruppe wurde auch anhand von Affinitätsstudien mit synthetischen linearen und cyclischen Peptiden nachgewiesen, die eine zur Heparinbindungsstelle in FGF analoge Sequenz hatten.<sup>[63]</sup> Das cyclische Peptid, dessen Struktur der Heparinbindungsstelle in FGF ähnelte, wurde fester an Heparansulfat gebunden als das acyclische Peptid mit der gleichen Sequenz oder ein cyclisches Peptid mit einer D-Prolin-Schleife. Nicht alle Heparinbindenden Proteine enthalten linear benachbarte Heparinbindungsstellen. Basische Aminosäuren, die in der Sequenz weiter entfernt sind, können durch Falten des Proteins in räumliche Nähe gebracht werden. Das ist bei Antithrombin III der Fall, bei dem eine linear nahe Heparinbindungsdomäne und in der Sequenz voneinander entfernte basische Aminosäuren so positioniert sind, dass sie Heparin binden.<sup>[64]</sup>

Wir untersuchten, welche Aminosäuren in den Heparinbindenden Domänen häufig vorkommen und die Bedeutung des Abstands basischer Aminosäuren bei der Bindung von Heparin. Mithilfe von Peptidbibliotheken bestimmten wir die Affinität von nach dem Zufallsprinzip synthetisierten Heptameren zu Heparin und Heparansulfat. Peptide, die reich an Arginin und Lysin, nicht aber an Histidin waren, hatten die höchste Affinität. Daneben enthielten die Peptide, die mit hoher Affinität an Heparin und Heparansulfat banden, einen hohen Anteil an anderen polaren Aminosäuren, darunter auch Serin.<sup>[65]</sup> Außerdem haben bekannte Heparinbindende Domänen Aminosäuren (Asparagin und Glutamin), die Wasserstoffbrückenbindungen bilden können. Ein Vergleich der relativen Stärke der Heparinbindung durch basische Aminosäurereste ergab, dass Argininreste 2,5-mal fester binden als Lysinreste. Diese enge Wechselwirkung scheint auf einer starken Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Guanidino-Gruppe in Arginin und einer Sulfogruppe in Heparin zu beruhen.<sup>[66]</sup>

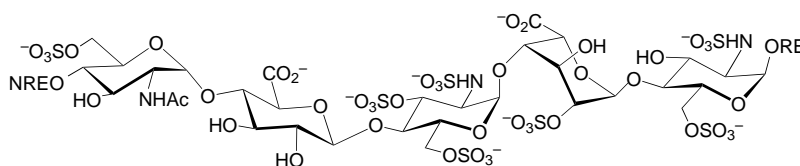
Mit einer Reihe synthetischer Peptide wurde ferner der Einfluss des Musters und des Abstands der basischen Aminosäuren in den Heparinbindungsstellen untersucht.<sup>[67]</sup> Dazu wurden die relativen Bindungsaffinitäten von zwei Peptidreihen, -RRG<sub>m</sub>RR- und -RRRG<sub>m</sub>R- (R ist Arginin und G Glycin) geprüft. Heparin wechselwirkte am stärksten mit Peptiden, die eine komplementäre Bindungsstelle mit hoher positiver Ladungsdichte enthielten, während niedrig sulfatiertes Heparansulfat die stärkste Wechselwirkung mit der Komplementärstelle eines Peptids hatte, in der zwischen den basischen Resten ein größerer Abstand war. Die Ergebnisse dieser Studie sind demnach völlig in Einklang mit unserer Kenntnis der Struktur von Heparin und Heparansulfat.

### 3.1. Protein-bindende Struktur motive in Heparin und Heparansulfat

Für die spezifische Erkennung zwischen Heparin und Proteinen werden auch bestimmte Sequenzen in der Heparinkette benötigt. Heparin und Heparansulfat nehmen bevorzugt lineare helixförmige Sekundärstrukturen ein, in

denen Sulfo- und Carboxylgruppen bestimmte Abstände und definierte Orientierungen entlang des Polysaccharidge-rüsts haben. Eine Heparin-bindende Domäne in einem Protein würde demnach eine Mindestzahl an Saccharidresten in der Heparinkette erfordern, um diese geladenen Gruppen so zu präsentieren, dass eine feste und spezifische Wechselwirkung erleichtert wird.

Das erste Beispiel für ein definiertes Protein-bindendes Strukturmotiv in Heparin war die Entdeckung einer Pentasaccharidsequenz, die zur Bindung von Antithrombin III benötigt wird.<sup>[10]</sup> Diese Pentasaccharidsequenz ist selten und kommt nur in etwa einem Drittel der Heparinketten vor. Ihr auffallendstes Merkmal ist die ungewöhnliche 3-O-Sulfogruppe an einem inneren GlcNpS6S-Rest (Schema 4), die für die



Schema 4. Struktur der AT-III-bindenden Pentasaccharidsequenz in Heparin.

hohe Bindungsaffinität zu Antithrombin III unbedingt erforderlich ist.<sup>[68]</sup> Die 3-O-Sulfatierung ist der letzte Schritt in der Biosynthese von Heparin und Heparansulfat, und es gibt viele Isoformen der 3-O-Sulfotransferase mit unterschiedlichen Substratspezifitäten. Wird ein an einem Biochip immobilisiertes Heparansulfat mit niedriger Affinität zu AT III mit einer dieser Isoformen behandelt, so entsteht eine strukturell modifizierte Kette mit hoher Affinität.<sup>[69]</sup> Ein durch eine andere 3-O-Sulfotransferase-Isoform an bestimmten Glucosaminresten verändertes Heparansulfat lieferte Bindungsstellen für das virale Hüllglycoprotein des Herpes-Simplex-Virus Typ 1 (HSV-1).<sup>[70]</sup> Diese Bindung soll für die Einleitung des Zelleintritts von HSV-1 Bedeutung haben. Ferner nimmt man an, dass die 3-O-Sulfogruppe in Heparansulfat für die spezifische Wechselwirkung mit dem Fibroblasten-Wachstumsfaktor 7 (FGF-7) wichtig ist.<sup>[71]</sup> Eine andere Untersuchung kommt zu dem Schluss, dass das Antithrombin-Bindungsmotiv in Heparansulfat zur Bildung eines Funktionskomplexes mit der Kinase-Ektodomäne im FGF-Rezeptor (fibroblast growth factor receptor, FGFR) notwendig ist.<sup>[72]</sup>

Die vermutlich am besten untersuchten Heparinbindenden Proteine gehören zur FGF-Gruppe. Anhand von kristallographischen Daten der FGF-1-<sup>[34]</sup> und FGF-2-Komplexe<sup>[31]</sup> mit Heparin-Oligosacchariden wurden die genauen Gruppen in Heparin bestimmt, die für diese biologisch wichtigen Wechselwirkungen von Bedeutung sind. Sowohl strukturelle als auch experimentelle Daten deuten darauf hin, dass die 6-O-Sulfogruppen in Heparin zwar nicht direkt die Bindung von FGF-2 an Heparin beeinflussen,<sup>[73]</sup> aber offenbar für die mitogene Wirkung von FGF-2 benötigt werden.<sup>[74]</sup> Die Wechselwirkung von FGF-1 mit Heparin wird hingegen direkt durch Kontakte mit den 6-O-Sulfogruppen des Heparins vermittelt. Diese Unterschiede lassen auf spezifische Wechselwirkungen mit verschiedenen Wachstumsfaktoren

aus der gleichen Familie schließen.<sup>[75]</sup> Auch wenn die Wechselwirkung zwischen Proteinen und Heparin in erster Linie ionisch ist und auf dem Vorhandensein und der passenden Anordnung von Sulfo- und Carboxygruppen beruht, muss dies nicht immer der Fall sein. Beispielsweise hat man festgestellt, dass bei der Wechselwirkung zwischen dem sekretorischen Leucocytenprotease-Inhibitor (SLPI) und Heparin unvollständig sulfatierte Heparin-Oligosaccharid-Sequenzen für die spezifische hohe Affinität erforderlich sind; möglicherweise spielen hier Wechselwirkungen durch Wasserstoffbrückenbindungen der Heparin-Hydroxygruppen eine wichtige Rolle.<sup>[76]</sup>

### 3.2. Wechselwirkungsarten

Die zweifellos herausragendste Art der Wechselwirkung zwischen Heparin und einem Protein ist die ionische. Cluster aus positiv geladenen basischen Aminosäuren in den Proteinen bilden Ionenpaare mit räumlich festgelegten negativ geladenen Sulfo- und Carboxylgruppen der Heparinkette. In manchen Fällen tragen aber auch nichtionische Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen signifikant zur Bindung bei. Bei der Untersuchung der Wechselwirkung des natriuretischen Peptids vom B-Typ (brain natriuretic peptide, BNP) mit Heparin durch isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) stellte sich heraus, dass nur ein kleiner Teil der Helmholtz-Energie dieser Wechselwirkung von ionischen Beiträgen herrührt. Den Hauptbeitrag lieferten Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den polaren Aminosäuren des BNP und von Heparin.<sup>[77]</sup> Auch hydrophobe Kräfte können in geringerem Maß zu Heparin-Protein-Wechselwirkungen beitragen. Bae et al. nahmen aufgrund von NMR-Daten an, dass ein Tyrosinrest in einem synthetischen Antithrombin-III-Peptid für eine offenbar spezifische hydrophobe Wechselwirkung mit der *N*-Acetylgruppe in der AT III-bindenden Pentasaccharidsequenz von Heparin aus der Schleimhaut von Schweinen Bedeutung hat.<sup>[78]</sup>

### 3.3. Kinetik, Thermodynamik und Messung von Heparin-Protein-Wechselwirkungen

Ähnlich wie die DNA ist Heparin ein hoch geladenes lineares Polymer mit Polyelektrolyteigenschaften. Die hohe Abstoßungsenergie von mehrfach negativ geladenen Gruppen in diesen Polyelektrolyten fördert die Bindung von Kationen (d.h. Na<sup>+</sup>), um diese Kräfte zu minimieren.<sup>[79]</sup> Die Bindung von Na<sup>+</sup>-Ionen durch einen Polyelektrolyten ist entropisch ungünstig. Wenn ein Polyelektrolyt wie Heparin an ein Protein bindet, wechselwirken die positiv geladenen Aminosäurereste des Proteins mit anionischen Stellen, was zur entropisch günstigen Freisetzung von Na<sup>+</sup>-Ionen führt. Demzufolge stammt die Helmholtz-Energie der Wechselwirkung von Heparin mit Proteinen größtenteils aus der entropisch günstigen Freisetzung von Na<sup>+</sup>-Ionen („Polyelektrolyteffekt“).<sup>[80]</sup> Zur Helmholtz-Energie der Wechselwirkung, die mit der gemessenen Dissoziationskonstante ( $K_d$ ) zusammenhängt, tragen somit der Polyelektrolyteffekt, Wasser-

stoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen bei.<sup>[81]</sup> Zwischen  $K_d$  und ionischen sowie nichtionischen Beiträgen besteht Beziehung (1), wobei  $K_{d, \text{nichtionisch}}$  die Dissoziationskonstante ohne den Polyelektrolyteffekt,  $m$  die Zahl der bei der Heparin-Protein-Bindung freigesetzten Na<sup>+</sup>-Ionen und  $f$  ein kleiner Anteil negativer Ladung am Polyelektrolyten ist, der nicht durch Na<sup>+</sup>-Ionen Ladungsneutralisiert ist. Bindungsmessungen bei einer 1M Salzkonzentration geben den Bindungsbeitrag wieder, der nicht vom Polyelektrolyten stammt, da  $\lg K_d = \lg K_{d, \text{nichtionisch}}$  ist. Bei physiologischen Salzkonzentrationen ist der Polyelektrolyteffekt ein entscheidender Faktor bei der Bindung von Heparin an Proteine.<sup>[82]</sup>

$$\lg K_d = \lg K_{d, \text{nichtionisch}} + m(1 - f) \lg [\text{Na}^+] \quad (1)$$

Die Kinetik der Wechselwirkung bei der Bindung von Heparin an Antithrombin III ist eingehend untersucht worden.<sup>[83]</sup> Da AT III bei der Bindung von Heparin eine Konformationsänderung erfährt<sup>[84]</sup> und diese anhand der Änderung der AT-III-Fluoreszenz verfolgt werden kann, lässt sich diese Wechselwirkung gut mit der Stopped-Flow-Fluorimetrie untersuchen. Bei den meisten anderen Heparin-bindenden Proteinen, bei denen eine derartige Änderung infolge der Bindung nicht beobachtet werden kann, ist es sehr schwierig, die Wechselwirkungskinetik zu untersuchen. Durch die Entwicklung der Oberflächenplasmonenresonanz (surface plasmon resonance, SPR), mit der Bindungsereignisse in Echtzeit gemessen werden können, gelang es allerdings, die Kinetik der Wechselwirkung von Heparin mit Proteinen zu untersuchen.<sup>[85–87]</sup>

Die Bindungsaffinität von Heparin zu Proteinen ist mit mehreren Methoden geprüft worden. Bei der Affinitätschromatographie, dem am häufigsten genutzten Verfahren, wird Heparin oder das Heparin-bindende Protein an einer festen Matrix immobilisiert und danach der Bindungspartner auf die Säule gegeben. Anschließend wird der Bindungspartner mit Salz freigesetzt, wobei die zur Elution benötigte Menge ein quantitatives Maß für die ionische Komponente der Bindungsaffinität ist. Bindungsbeiträge durch hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen können mit dieser Methode allerdings nicht erfasst werden. Wechselwirkungen, die von divalenten Kationen abhängen,<sup>[85]</sup> sind mit der Affinitätschromatographie nur schwer zu untersuchen und setzen die Immobilisierung eines Bindungspartners voraus. ITC-Untersuchungen liefern Informationen über die Thermodynamik von Heparin-Protein-Wechselwirkungen (Abbildung 4).<sup>[88]</sup> Bei dieser Methode wird einer der wechselwirkenden Partner in Lösung in eine thermostatisierte Zelle gegeben und der andere Partner in diese Zelle injiziert. Die nach jeder Injektion bei der Bindung freigesetzte Wärme wird gemessen und liefert eine sigmoide Titrationskurve. Durch Auswerten dieser Kurve erhält man Werte für die Enthalpie ( $\Delta H$ ), die Assoziationskonstante ( $K_a$ ) und die Bindungsstöchiometrie ( $n$ ). Die ITC erfordert normalerweise Milligrammmengen von jedem Wechselwirkungspartner; diese hohen Konzentrationen führen oft zur Bildung von Niederschlägen, außerdem ist sie nur für die Messung von Assoziationskonstanten im Bereich von  $10^4$  bis  $10^8$  brauchbar.

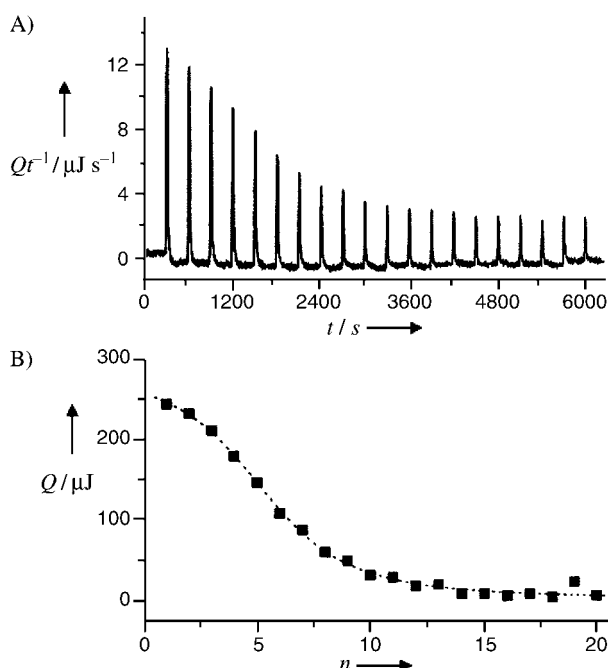


Abbildung 4. Ergebnisse des ITC-Experiments mit Heparin und BNP. A) Für jede Injektion die bei der Bindung freigesetzte Wärme in  $\mu J s^{-1}$  ( $Qr^{-1}$ ). B) Die ausgewerteten Wechselwirkungswärmen ergeben eine sigmoide Bindungskurve, wobei die frei werdende Wärme ( $Q$ ) gegen die Zahl der Injektionen ( $n$ ) aufgetragen ist.

Die NMR-Spektroskopie kann äußerst wertvolle Informationen über Heparin-Protein-Wechselwirkungen liefern.<sup>[78]</sup> Eine NMR-spektroskopische Analyse bietet in erster Linie Daten zu Struktur und Konformation, anhand derer die genauen Kontaktpunkte zwischen den wechselwirkenden Verbindungen bestimmt werden können. NMR-Versuche geben zwar ein ziemlich detailliertes Bild der Wechselwirkung zwischen Heparin und Protein, aber die Unempfindlichkeit dieser Methode erfordert Milligrammmengen der wechselwirkenden Verbindungen bei hohen Konzentrationen, was zu Löslichkeitsproblemen führt und die genaue Bestimmung der Assoziationskonstante ( $K_a$ ) erschwert.

Die Fluoreszenz-Spektroskopie ist eine sehr empfindliche Methode, die mit sehr kleinen Probenmengen eine Fülle an Informationen über Heparin-Protein-Wechselwirkungen liefern kann. Konformationsänderungen im Protein, die bei der Bindung von Heparin häufig auftreten, können anhand von Änderungen der Umgebung von intrinsischen Fluorophoren wie Tyrosin und Tryptophan gemessen werden.<sup>[78]</sup> Die Assoziationskonstante kann man erhalten, indem man die Fluoreszenzänderung verfolgt, wenn ein Wechselwirkungspartner in eine Lösung des anderen titriert wird. Diese Methode ist allerdings auf Protein-Heparin-Wechselwirkungen be-

grenzt, die zu einer Fluoreszenzänderung führen. Der Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET) zwischen dem intrinsischen Fluorophor eines Proteins und einem äußeren Fluorophor in Heparin (fluoreszenzmarkiertes Heparin) kann nicht nur  $K_a$  liefern, sondern auch Informationen zum Abstand zwischen den beiden Fluorophoren bis zu 80 Å.<sup>[89]</sup> Bei dieser Methode ist zu berücksichtigen, dass die Derivatisierung des Heparins (und besonders eines kleinen Oligosaccharids) mit einem äußeren Fluorophor sowohl seine Konformation als auch seine Wechselwirkung mit dem Protein stören kann.

Bei der Oberflächenplasmonenresonanz (SPR), einer effektiven Methode zur Untersuchung von Wechselwirkungen, wird einer der wechselwirkenden Partner an einer Chipoberfläche immobilisiert, über die der andere Bindungspartner strömt. Die entstehenden Wechselwirkungen ändern den Brechungsindex des Chips, was als Änderung der Intensität und des Winkels des von der Chipoberfläche reflektierten Lichts gemessen wird. Die Größe dieser Änderung ist direkt proportional zur Masse des gebundenen Bindungspartners und liefert eine Echtzeitmessung der Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeiten, aus denen die Dissoziationskonstante berechnet werden kann (Abbildung 5).<sup>[85, 86]</sup> Schon von Substanzmengen im Submikrogrammbereich sind leicht Signale zu erhalten. Dieses Verfahren kann zwar wichtige Informationen zur Bindungskinetik liefern, es hat aber den Nachteil möglicher Versuchsartefakte durch die Ligandenimmobilisierung.

Andere Verfahren, die zur Untersuchung von Heparin-Protein-Wechselwirkungen eingesetzt werden können, sind die Affinitätscoelektrophorese (ACE),<sup>[90]</sup> die zweidimensionale Affinitätstrennelektrophorese (two-dimensional affinity resolution electrophoresis, 2-DARE),<sup>[91]</sup> die Gleichgewichtsdialyse,<sup>[66]</sup> kompetitive Bindungsmethoden,<sup>[92]</sup> das analytische Zentrifugieren<sup>[93]</sup> und der Circular dichroismus.<sup>[94]</sup> Mit der Kristallstrukturanalyse von Komplexen aus Heparin-Oligosacchariden und Proteinen erhält man zwar sehr genaue

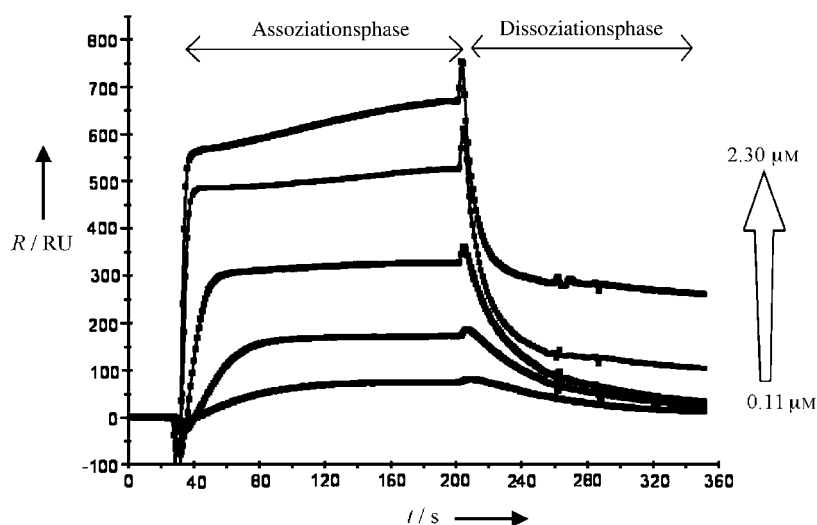


Abbildung 5. SPR-Sensorgramm für die Wechselwirkung der N-terminalen Domäne von ApoE4 mit Heparin. Lösungen mit dieser ApoE4-Domäne in unterschiedlichen Konzentrationen (0,11–2,30  $\mu M$ ) strömten über Heparin, das an einem Chip immobilisiert war. Aufgetragen ist die Änderung der Oberflächenantwort ( $R$ ) gegen die Zeit ( $t$ ).

Strukturinformationen,<sup>[31, 34]</sup> benötigt aber große Mengen der homogenen Wechselwirkungspartner.

### 3.4. Molecular Modeling von Heparin-Protein-Wechselwirkungen

Das Molecular Modeling kann zwar nützliche Informationen über molekulare Wechselwirkungen liefern, die Richtigkeit von Vorhersagen muss aber noch bewiesen werden. Der Wert des Modeling besteht darin, dass es komplizierte dynamische Einzelheiten von Ereignissen auf molekularer Ebene mit relativ geringem Zeit- und Kostenaufwand sichtbar machen kann. Ein Problem der Molekülmechanik und -dynamik ist die begrenzte Verfügbarkeit verlässlicher Potentialenergiefunktionen, besonders für Moleküle mit funktionellen Gruppen wie *N*- und *O*-Sulfogruppen. Es gibt eingeführte Modeling-Methoden und verlässliche Potentialenergiekurven zur Untersuchung von Proteinen und DNA, und viele empirische Kraftfelder wie AMBER, CHARMM, MM2 und TRIPOS werden häufig verwendet.

Das Modeling von Heparin erforderte zunächst die Herleitung der Potentialenergiefunktionen für die *N*-Sulfogruppe und die *O*-Sulfogruppen an den 2-, 3- und 6-Positionen der Pyranosyleinheiten durch Ab-initio-Rechnungen.<sup>[95]</sup> Auch die Entwicklung effizienter Modeling-Methoden, um die sterischen und räumlichen Gegebenheiten von Oligosacchariden zu verstehen, ist für die Untersuchung von Heparin-Protein-Wechselwirkungen von Bedeutung.<sup>[96]</sup> Die NMR-spektroskopisch erhaltene Struktur eines Heparin-Dodecasaccharids (Abbildung 1)<sup>[23]</sup> und hoch aufgelöste Strukturen von Heparin-Oligosacchariden im Kristall<sup>[31, 34]</sup> boten einen wichtigen Ausgangspunkt für das Modeling von Heparin-Protein-Wechselwirkungen. Weitere Strukturinformationen über diese Wechselwirkung können Untersuchungen zur Kupplung von Heparin-Oligosacchariden an ihre Protein-Bindungspartner liefern. Derartige Studien sind allerdings wegen der schwachen Oberflächenkomplementarität, der hohen Ladungsdichte von Heparin und seiner Bindungsstelle sowie der hohen Beweglichkeit der Heparinkette sehr schwierig.

Anhand der Kupplung zwischen den Heparin-bindenden Sequenzen von Antithrombin III und der AT-III-bindenden Pentasaccharidsequenz wurde die Struktur-Aktivitäts-Beziehung (SAR) dieser Wechselwirkung untersucht.<sup>[97]</sup> In einer neueren Arbeit wurden mehrere Verfahren zur Vorhersage von Heparinbindungsstellen an AT III, FGF-1 und FGF-2 geprüft und mit den kristallographischen Daten verglichen, die für Komplexe dieser Proteine mit ihren Oligosaccharid-Bindungspartnern zur Verfügung stehen. Zunächst wurde das ganze Protein mit sulfatierten Mono- und Disacchariden nach möglichen Bindungsstellen abgesucht, daran schloss sich das Binden eines Hexasaccharids an diese Stellen an. Nachdem die Bindungsstelle für die Testverbindungen richtig vorhergesagt werden konnte, wurden die Verfahren verwendet, um die Heparinbindungsstelle von Interleukin-8 (IL-8) vorherzusagen, einem Chemokin, dem bei der Immunantwort eine entscheidende Aufgabe zukommt.<sup>[98]</sup> Diese Strategie verringert die benötigte Rechenzeit gegenüber einer Verwendung des Hexasaccharids von Anfang an erheblich.

## 4. Die Regulierung von Proteasen und Esterasen

Die Wechselwirkung von Heparin mit Antithrombin III ist das erste gut untersuchte Beispiel für eine Heparin-Protein-Wechselwirkung. Vermutlich beruht die Wirkung von Heparin als Antikoagulans in erster Linie auf seiner Wechselwirkung mit AT III, durch die es die AT-III-vermittelte Inhibierung von Blutgerinnungsfaktoren wie Thrombin und Faktor Xa verstärkt. Diese Gerinnungsfaktoren sind Serin-Proteasen mit Trypsin-ähnlicher Spezifität für Arginylbindungen. AT III gehört zu den Serpinen (*Serin-Protease-Inhibitoren*), einer Obergruppe von Proteinen, zu der mehr als 40 Proteine gehören.<sup>[99]</sup> Die Serpine reagieren mit Serin-Proteasen zu inaktiven Komplexen, die anschließend aus dem Kreislauf entfernt werden. Alle Gerinnungsfaktoren (mit Ausnahme von Faktor VIIa) werden durch AT III unter Bildung eines kovalenten 1:1-Komplexes inhibiert. Die Inaktivierung dieser Proteasen durch AT III wird durch Bindung von Heparin erheblich beschleunigt. In einem ternären Komplex bindet Heparin an AT III und Thrombin, wodurch die bimolekulare Geschwindigkeitskonstante für die Inhibierung von Thrombin um das 2000fache steigt.<sup>[9]</sup> Die Wechselwirkung von Heparin mit AT III und Serin-Proteasen verläuft über mehrere Stufen. Die erste Bindung von Heparin an AT III beruht auf einer Wechselwirkung geringer Affinität, die von einer ganz bestimmten, ungewöhnlichen Pentasaccharidsequenz im Heparin vermittelt wird. Diese Bindung führt zu einer Konformationsänderung<sup>[84]</sup> in der Struktur von AT III, die zusätzliche Wechselwirkungen zwischen AT III und Heparin fördert, sodass eine stärkere Bindung resultiert. Die Konformationsänderung führt auch zur Ausstülpung einer Schleife mit einer Protease-reaktiven Stelle in AT III, welche die Reaktion der Zielprotease mit AT III erleichtert; dabei entsteht ein gespaltenes und konformativ verändertes AT III, das kovalent an die Wirkstelle der Serin-Protease als Acyl-Enzym-Zwischenstufe gebunden ist. Infolge der Spaltung ist die Affinität von AT III zu Heparin deutlich vermindert,<sup>[100]</sup> sodass Heparin in unveränderter Form dissoziiert und damit weitere Reaktionen zwischen AT III und dessen Ziel, den Serin-Proteasen, katalysieren kann. Der Acyl-Enzym-Komplex dissoziiert danach sehr langsam ( $t_{1/2} \approx 5$  Tage) in die unveränderte Serin-Protease und das gespaltenen Antithrombin, das nun kein aktives Serpin mehr ist und seine Bindungsaffinität zu Heparin verloren hat.<sup>[101]</sup>

Um die Reaktion von Antithrombin mit Thrombin zu beschleunigen, sind Heparinketten mit mindestens 16 Sacchariden erforderlich, auch wenn für die Bindung von AT III nur die Pentasaccharidsequenz nötig ist.<sup>[102]</sup> Dagegen können Heparinketten von der Größe des AT-III-bindenden Pentasaccharids die Inaktivierung der anderen Gerinnungsenzyme, z.B. des Faktors Xa, beschleunigen.<sup>[103]</sup> Die Bindung von Heparin an AT III induziert eine Konformationsänderung, welche die Fluoreszenz von AT III um 40% erhöht und so kinetische Untersuchungen mit der Stopped-Flow-Fluorimetrie erleichtert.<sup>[83]</sup> Anhand der Kristallstruktur eines AT-III-Pentasaccharid-Komplexes wurden die an der Wechselwirkung beteiligten Reste in AT III und wichtige funktionelle Gruppen im Pentasaccharid nachgewiesen (Abbildung 6).<sup>[104]</sup> Die für die Wechselwirkung wichtigen Reste wurden durch

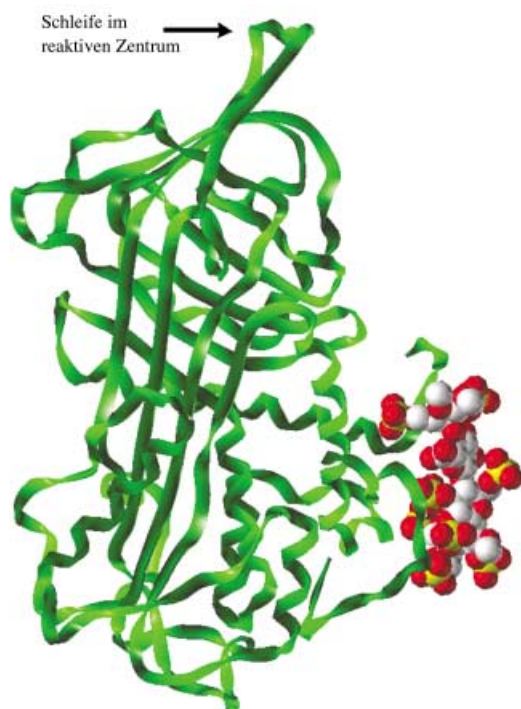


Abbildung 6. Struktur eines synthetischen AT-III-bindenden Pentasaccharids im Komplex mit Antithrombin III. Das Protein ist als grünes Band, das Pentasaccharid als Kalottenmodell mit gelben Schwefel- und roten Sauerstoffatomen dargestellt.

ortsgerichtete Mutagenese verändert und die relativen Beiträge dieser Reste zur Bindung durch kinetische Stopped-Flow-Messungen abgeschätzt.<sup>[105]</sup> Auch die Aufgabe der einzelnen Saccharidreste des Heparin-Pentasaccharids bei der allosterischen Aktivierung von AT III wurde bestimmt, indem man den Effekt untersuchte, den am reduzierenden oder nichtreduzierenden Ende verkürzte Pentasaccharidreste auf die Oligosaccharidbindung und die Induktion einer Konformationsänderung in AT III haben.<sup>[106]</sup> Dabei stellte sich heraus, dass die drei Saccharidreste am nichtreduzierenden Ende der Pentasaccharidsequenz AT III vollständig aktivieren können. Auch wenn die Reste am reduzierenden Ende für diese Aktivierung nicht unbedingt erforderlich sind, so stabilisieren sie doch die aktivierte Konformation. Die genaue Bestimmung der an dieser physiologisch wichtigen Wechselwirkung beteiligten Faktoren ist von Bedeutung für die Entwicklung von spezifischeren Heparinanaloga, die zwar die gerinnungshemmende Wirkung von Heparin, nicht aber seine unerwünschten Nebenwirkungen haben.

Heparin kommt hauptsächlich in den Granula von Gewebemastzellen vor, die eng mit der Immunantwort zusammenhängen. Besonderes Interesse gilt der Fähigkeit von Heparin, die Hauptwirkungen der Komplementkaskade zu regulieren.<sup>[107]</sup> Das Komplementsystem besteht aus ca. 20 Plasmaproteinen, die in zwei zusammenhängenden Reaktionswegen, dem Antikörper-abhängigen klassischen Reaktionsweg und dem Antikörper-unabhängigen Weg, wechselwirken. Ganz ähnlich wie der Blutgerinnungsmechanismus bestehen beide Wege aus der schrittweisen Aktivierung einer Reihe von Serin-Esterasen. Entscheidend für die Komplementregulierung ist die *O*-Sulfogruppe in Heparin und eine bestimmte

Mindestgröße der Oligosaccharide.<sup>[108]</sup> Der klassische Reaktionsweg wird initiiert, wenn die Komplementprotein-C1-Esterase, auch als Erkennungseinheit bezeichnet, spezifisch an ein Antigen-Antikörper-Aggregat an der Zelloberfläche bindet. Die C1-Esterase wird von einem natürlichen Inhibitor im Serum, dem C1-Esterase-Inhibitor (C1INH), reguliert.<sup>[109]</sup> Heparin und andere Glycosaminoglycane steigern in vitro die Aktivität von C1INH gegen C1-Komponenten.<sup>[110]</sup> Die Fähigkeit von Heparin und Heparansulfat, C1INH zu binden und seine Inhibitorwirkung zu erhöhen, wurde mit der Oberflächenplasmonenresonanz und In-vitro-Assays untersucht.<sup>[87]</sup> An einem Biosensorchip immobilisiertes Heparin wechselwirkte mit C1INH ( $K_d \approx 100$  nM), während zwischen Heparansulfat und C1INH keine Bindung auftrat. In-vitro-Assays belegten, dass Heparin und in etwas höherem Maß auch LMW-Heparin die Wirkung von C1INH auf zellgebundenes C1 erhöhten, wobei die Reaktionsordnung für einen ternären Komplex sprach, in dem zellgebundenes C1 mit Heparin und C1INH wechselwirkt. Heparin bindet vermutlich direkt an C1 und inhibiert seine Aktivität. Es gibt Hinweise, dass C1 die Heparinfraction erkennt, die eine hohe Affinität zu Antithrombin III hat.<sup>[111]</sup> Durch seine Wechselwirkung mit einer Reihe anderer Komplementproteine hat Heparin zudem einen äußerst starken Effekt auf die Komplementkaskade.<sup>[108]</sup>

Chemisch modifiziertes, N-acetyliertes Heparin inhibiert in vivo die Aktivierung der Komplementkaskade durch den Kobragiftfaktor.<sup>[112]</sup> Virus-infizierte Zellen sekretieren das Vacciniavirus-Komplement-Kontrollprotein (VCP), von dem man annimmt, dass es die Wirtszelle vor dem Komplementangriff schützt, bevor die Virusnachkommen freigesetzt werden.<sup>[113]</sup> VCP inhibiert beide Wege der Komplementaktivierung, indem es die dritte und vierte Komplementkomponente bindet. VCP, ein Heparin-bindendes Protein, kann Heparansulfat-PGs an der Oberfläche menschlicher Endothelzellen binden.<sup>[114]</sup> Eine neuere Kristallstrukturanalyse von VCP ließ eine mutmaßliche Heparin-bindende Stelle am C-Terminus erkennen, und Versuche deuten darauf hin, dass VCP Heparin binden und gleichzeitig die Komplementaktivierung steuern kann.<sup>[115]</sup>

## 5. Wechselwirkung von Heparin mit extrazellulären Signalmolekülen

### 5.1. Wechselwirkung von Heparin mit Wachstumsfaktoren

Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGFs) gehören zu einer großen Gruppe aus derzeit 21 Proteinen,<sup>[116]</sup> die an Entwicklungsprozessen und physiologischen Vorgängen wie Zellproliferation, -differenzierung, -morphogenese und -angiogenese beteiligt sind. FGFs sind Heparin-bindende Proteine mit hoher Affinität zu den Heparansulfat-Proteoglycanen an der Zelloberfläche. Keine anderen Heparin-bindenden Proteine, vielleicht mit Ausnahme von Antithrombin III, sind eingehender untersucht worden. Die FGFs von Wirbeltieren haben eine innere Kernregion aus 28 hoch konservierten und sechs



invarianten Aminosäuren, ihr Molekulargewicht liegt zwischen 17 und 34 kDa.<sup>[117]</sup>

Als erste Verbindungen aus dieser Gruppe wurden der saure (FGF-1) und der basische Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF-2) entdeckt und die Thermodynamik und Kinetik ihrer Wechselwirkung mit Heparin eingehend untersucht.<sup>[88, 93]</sup> Von Komplexen dieser Proteine mit Heparin-Oligosacchariden wurden kristallographische Daten veröffentlicht, die durch hochauflösende Röntgenspektroskopie erhalten wurden.<sup>[31, 34]</sup> Diese Wachstumsfaktoren üben ihre biologische Wirkung aus, indem sie an spezifische Oberflächenrezeptoren, die Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptoren (FGFR-1–FGFR-4), binden. Die FGFRs sind Transmembran-Tyrosin-Kinase-Rezeptoren, die als Mehrfachspießvarianten mit unterschiedlichen Affinitäten zu den FGFs exprimiert werden.<sup>[75]</sup> Da auch die FGFRs Heparin-bindende Proteine sind,<sup>[118]</sup> müssen FGF, FGFR und Heparansulfat simultan wechselwirken, um die Signaltransduktion einzuleiten.<sup>[119]</sup> Die durch FGF angeregte Signaltransduktion ist anderen Rezeptor-vermittelten Mechanismen insofern ähnlich, als sie über die Dimerisierung der FGFRs verläuft. Das Heparansulfat der Zellmembran bindet FGF-Mehrfachmoleküle, wodurch die Dimerisierung von FGFR und die Signalübermittlung unterstützt wird. Hochaufgelöste Kristallstrukturen von Komplexen aus FGF, FGFR und einem Heparin-Oligosaccharid geben einen Einblick in die Stöchiometrie und die Strukturbeziehungen dieser physiologisch wichtigen Wechselwirkung (Abbildung 7).<sup>[120, 121]</sup>

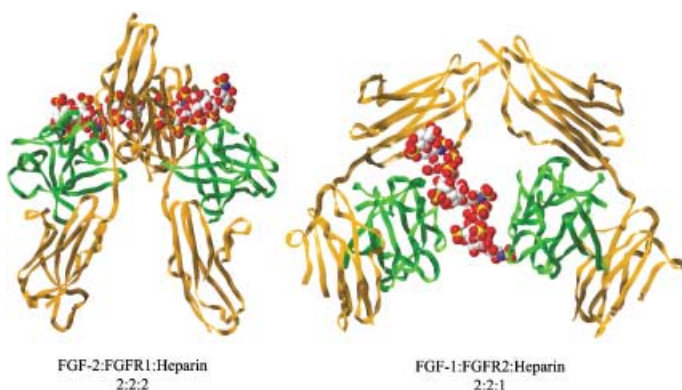


Abbildung 7. Die kürzlich aufgeklärten Strukturen von FGF-FGFR-Heparin-Komplexen. FGFR ist als goldfarbenes und FGF als grünes Band wiedergegeben. Die Heparin-Oligosaccharide sind als Kalottenmodelle mit gelben Schwefel-, roten Sauerstoff- und blauen Stickstoffatomen dargestellt.

In der ersten Arbeit wird die Kristallstruktur eines dimeren 2:2:2-Komplexes aus FGF-2, FGFR-1 und Heparin-Decasaccharid mit einer Auflösung von 3 Å beschrieben.<sup>[120]</sup> In jedem 1:1 FGF-FGFR-Komplex bildet Heparin zahlreiche Kontakte zu FGF-2 und FGFR1 und stabilisiert so die FGF-FGFR-Bindung. Ferner bestehen zwischen Heparin und dem FGFR1 des benachbarten FGF-FGFR-Komplexes Kontakte, welche die FGFR-Dimerisierung zu fördern scheinen. Die Art der Heparinbindung in diesem Komplex widerspricht früheren Ergebnissen über die Mindestlänge der Heparinkette, die genügt, um die Dimerisierung zu fördern,<sup>[122]</sup> sodass weitere

biochemische Untersuchungen erforderlich sind, um diese Beobachtungen zu stützen. Auf der Basis von biochemischen und kristallographischen Daten kann ein Modell erstellt werden, in dem Heparin über sein nichtreduzierendes Ende mit FGF-2 und FGFR-1 wechselwirkt und einen stabilen 1:1:1-Komplex aus FGF, FGFR und Heparin bildet. Dieser kann sich über direkte FGFR-FGFR-Kontakte, Sekundärwechselwirkungen zwischen FGFR-2 in einem und FGFR1 im benachbarten ternären Komplex und indirekte, Heparin-vermittelte FGFR-FGFR-Kontakte mit einem anderen 1:1:1-Komplex verbinden. Die zweite Arbeit beschreibt die Kristallstruktur eines 2:2:1-Komplexes aus FGF-1, FGFR-2 und einem Heparin-Decasaccharid bei einer Auflösung von 2.8 Å.<sup>[121]</sup> In diesem Fall ist der Komplex um ein zentrales Heparinmolekül angeordnet, das ähnlich wie in einem früher vorgeschlagenen Modell<sup>[34]</sup> zwei FGF-1-Liganden zu einem Dimer verknüpft. Zwischen diesen beiden Modellen bestehen hinsichtlich der relativen Orientierung von FGF-1 und Heparin erhebliche Unterschiede. Der 2:1-Komplex aus FGF-1 und Heparin wirkt als Brücke zwischen den beiden FGFR-2-Molekülen, und die asymmetrische Heparinkette hat in dieser Struktur nur Kontakt zu einem Rezeptormolekül. Auch Heparansulfat scheint bei dieser Art der Rezeptordimerisierung eine entscheidende Rolle zu spielen, da es nur sehr wenige Protein-Protein-Kontakte zwischen den beiden Hälften des pentameren Komplexes gibt.

Beide Arbeiten liefern wichtige Informationen über den Aufbau dieser Komplexe, aber die beiden Strukturen unterscheiden sich signifikant, was möglicherweise darauf zurückzuführen ist, dass verschiedene FGF-Liganden und ihre zugehörigen Rezeptoren unterschiedliche Wechselwirkungen mit Heparansulfatketten eingehen. Diese Unterschiede könnten auf unterschiedlichen Verteilungen und Strukturen von Heparansulfat-PGs und FGF-Rezeptoren an den Zelloberflächen unterschiedlicher Gewebe beruhen.

Der Gefäßendothelwachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor, VEGF) ist ein angiogener Faktor, der aus vier alternativ gespleißten Formen besteht, von denen drei mit Heparin wechselwirken.<sup>[123]</sup> Der Hepatocyten-Wachstumsfaktor (HGF) bindet Heparansulfat, um als Tumorsuppressor, Morphogen oder angiogener Faktor zu wirken.<sup>[124]</sup> Auch Heparin kann die biologische Wirkung des transformierenden Wachstumsfaktors  $\beta 1$  (transforming growth factor- $\beta 1$ , TGF- $\beta 1$ ) verändern. Dieser Faktor hat Bedeutung für die Migration und Proliferation von Zellen und für die Synthese der extrazellulären Matrix und ist an Immunprozessen beteiligt.<sup>[125]</sup> Andere Heparin-bindende Wachstumsfaktoren sind der PDFG (Platelet-derived growth factor) aus Blutplättchen sowie der epidermale Wachstumsfaktor HB-EGF.<sup>[126]</sup> Heparansulfat-PGs lokalisieren also Wachstumsfaktoren an der Zelloberfläche oder in der extrazellulären Matrix und unterstützen ihre biologischen Wirkungen.

## 5.2. Die Wechselwirkung von Heparin mit Chemokinen

Chemokine sind eine Gruppe kleiner Cytokin-ähnlicher Proteine mit vielfältigen biologischen Aufgaben, z.B. der selektiven Rekrutierung und Aktivierung von Zellen bei



Entzündungsprozessen.<sup>[127]</sup> Chemokine regen außerdem die Leukozytendegranulierung an und fördern die Angiogenese oder Angiostase.<sup>[128]</sup> Als erstes Protein dieser Gruppe der Chemokine wurde der Plättchenfaktor 4 (PF-4, jetzt CXCL4) entdeckt. Erst mit der Charakterisierung von Interleukin 8 (IL-8, jetzt CXCL8) erkannte man, dass Chemokine chemotaktische Verbindungen sind.<sup>[129]</sup> Die derzeit mehr als 40 bekannten Chemokine werden nach der Verteilung der Cysteinreste in der Nähe des NH<sub>2</sub>-Terminus in vier Hauptgruppen eingeteilt: CXC, CC, C und CX<sub>3</sub>C.<sup>[130]</sup> Die Wechselwirkung von Chemokinen mit bestimmten Zellarten wird durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen vermittelt. Chemokinrezeptoren spielen vermutlich auch bei der Metastasierung von Brustkrebs<sup>[131]</sup> und dem Eintritt von HIV-1 in Zellen<sup>[132]</sup> eine wichtige Rolle. Chemokine können ebenfalls Heparin und Zelloberflächen-GAGs am Gefäßendothel oder in der extrazellulären Matrix binden. Diese Wechselwirkung soll zur Bildung haptotaktischer Gradienten an der Oberfläche von Endothelzellen beitragen<sup>[133]</sup> und die lokale Chemokinkonzentration in der Nähe von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren erhöhen.<sup>[134]</sup>

Das von Blutplättchen freigesetzte PF-4 soll eine Reihe von Eigenschaften haben, die bei der Entzündung und Wundheilung eine Rolle spielen, man nimmt an, dass sie auf der Fähigkeit beruhen, die Wirkung von Heparin- und Heparansulfat-Proteoglycanen zu neutralisieren. Wenn therapeutisch verabreichtes Heparin an PF-4 bindet, kann dies zu einem gefährlichen immunologisch induzierten Blutplättchenmangel führen, der eine als Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT) bezeichnete Erkrankung hervorruft. Unter physiologischen Bedingungen liegt PF-4 hauptsächlich als Tetramer vor und bindet mit sehr hoher Affinität im Verhältnis 1:1 an Heparin und Heparansulfat.<sup>[135]</sup> Aus NMR-spektroskopischen Untersuchungen der Wechselwirkung einer Heparin-Dodecasaccharidkette mit PF-4 geht hervor, dass Reste in der Arg20-Arg22-Schleife an der Bindung von Heparin beteiligt sind.<sup>[136]</sup> Diese Arbeiten deuten auch darauf hin, dass bei bestimmten PF-4:Heparin-Verhältnissen die Heparinkette in PF-4 den Konformationsübergang zu einem partiell gefalteten, geschmolzenen Globuluszustand induziert. Dieser Konformationsübergang findet bei dem gleichen Verhältnis statt, bei dem auch die HIT-Antikörper-Bindung beobachtet wird; daraus lässt sich schließen, dass der HIT-Antikörper einen weniger gefalteten, niedrigeren Aggregatzustand des Proteins erkennt (Abbildung 8). In einer anderen Arbeit über die Wechselwirkung von Heparansulfat mit PF-4 wurde ein großes Heparansulfat-Oligosaccharid nachgewiesen, das an der Bindung des PF-4-Tetramers beteiligt ist.<sup>[137]</sup> Die Autoren dieser Untersuchung schlagen vor, dass sich diese Oligosaccharidkette um das PF-4-Molekül wickeln kann und dabei in Kontakt mit den an der Wechselwirkung beteiligten positiv geladenen Resten von allen vier Monomeren steht. Für die Bindung an PF-4 sind die 2-O-Sulfoiduronsäurereste in diesem Oligosaccharid von Bedeutung. Basische Reste, deren Ladung kreisförmig angeordnet sind wie an der Oberfläche von PF-4, sind bei CXC-Chemokinen, darunter IL-8, konserviert.<sup>[138]</sup> Aus Untersuchungen über die Wechselwirkung von IL-8 mit Heparansulfat geht hervor, dass für diese Bindung

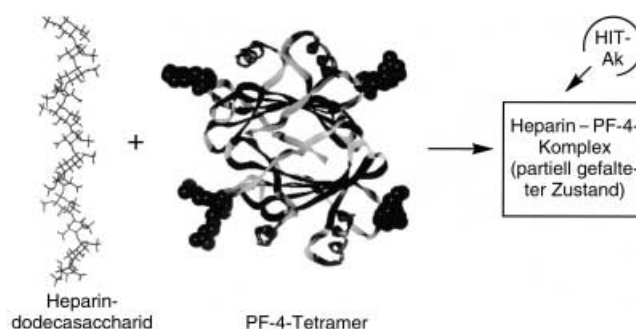


Abbildung 8. Schematische Darstellung der Ereignisse, die zur HIT führen. Die Seitenketten der an der Heparinbindung beteiligten Reste (Arg20 und Arg22) sind als Kalottenmodelle in der Bandstruktur des PF-4-Tetramers wiedergegeben.

eine Kettenlänge von ca. 20 Saccharidresten unbedingt erforderlich ist, wobei die Heparansulfatkette in Hufeisenform an das dimere Protein bindet.<sup>[139]</sup>

Der aus Stromazellen erhaltene Faktor 1 $\alpha$  (stromal cell derived factor-1 $\alpha$ , SDF-1 $\alpha$ ) gehört ebenfalls zur Gruppe der CXC-Chemokine. Dieser Faktor ist ein Mediator für Entzündungen, ein potenter Chemolockstoff für eine Reihe von Zellen wie Monocyten und T-Zellen und auch ein wirksamer Inhibitor des Zelleintritts von HIV.<sup>[140]</sup> Wie Untersuchungen ergeben haben, ist Heparansulfat an der Bindung und Lokalisierung von SDF-1 $\alpha$  an der Zelloberfläche beteiligt.<sup>[141]</sup> Durch Wirkort-gerichtete Mutationen an SDF-1 $\alpha$  wurden mehrere Reste in dem für diese Wechselwirkung wichtigen Protein identifiziert.<sup>[142]</sup> Aus Kupplungsversuchen geht hervor, dass die Bindung an SDF-1 $\alpha$  ein Dodecasaccharid oder Tetradecasaccharid von Heparin erfordert.<sup>[143]</sup> Diese großen Bindungsstellen in PF-4, IL-8 und SDF-1 $\alpha$  können auf eine Oligomerisierung des Chemokins zurückzuführen sein. Auch ein Heparin-bindendes Konsensmotiv des Typs BBXB wurde als wichtig für die Wechselwirkung erkannt. Dieses Strukturmotiv wird auch als Hauptbindungsstelle für Heparin in RANTES (regulated on secretion, normal T-cell expressed and secreted), einem Chemokin der CC-Gruppe, angesehen.<sup>[144]</sup> Zu dieser Chemokingruppe gehören auch das Monocyten-Chemolockstoff-Protein-1 (MCP-1) und die Makrophagen-Entzündungspeptide-1 (macrophage inflammatory peptides-1, MIP-1). Sie binden ebenfalls alle Heparin, wenn auch mit unterschiedlicher Affinität und Spezifität.<sup>[145]</sup> Wegen der niedrigen Konzentration dieser Chemokine im Blutkreislauf können Heparansulfat-PGs bei der Komplexierung dieser Verbindungen an der Zelloberfläche mitwirken und so deren effektive Konzentration in der Nähe ihrer Rezeptoren mit niedriger Affinität erhöhen.<sup>[146]</sup> Die Untersuchungen führen ferner zu dem Schluss, dass Heparansulfat-PGs an Zelloberflächen andere Aufgaben haben als freie Glycosaminoglycane. Lösliche Glycosaminoglycane können ein Chemokin in Lösung komplexieren und seine Bindung an den Rezeptor verhindern, sodass nachfolgende Rezeptor-vermittelte Zellantworten inhibiert werden.<sup>[145]</sup>

Die kürzlich entdeckten C-Chemokine und die CX<sub>3</sub>C-Gruppe, darunter Lymphotactin und Fractalkin,<sup>[147]</sup> scheinen Heparin zu binden, aber die Aufgabe dieser Wechselwirkung in vivo ist noch nicht genau bekannt. Wahrscheinlich sind die

Heparin-Chemokin-Bindungen an der Regulierung zahlreicher physiologisch wichtiger Vorgänge beteiligt.

## 6. Wechselwirkung von Heparin mit Lipid- und Membran-bindenden Proteinen

Die Wechselwirkung von Heparin mit Proteinen wie Antithrombin III und den Fibroblasten-Wachstumsfaktoren ist sehr gut untersucht und die Struktur- und Wirkungsbeziehungen sind beschrieben. Für eine Reihe von Proteingruppen gibt es umfangreiche Untersuchungen zu deren Wechselwirkungen mit Heparin, dagegen ist über die Wechselwirkung von Heparin mit Lipid- oder Membran-bindenden Proteinen nur wenig bekannt.

Die Annexine sind eine Gruppe homologer Proteine mit derzeit 32 Verbindungen, die weit verbreitet und in Eukaryoten an vielen Stellen vorkommen.<sup>[148]</sup> Eine charakteristische Eigenschaft der Annexine ist ihre Calcium-abhängige Bindung an die Oberfläche von Phospholipidmembranen. Annexine sind in Eukaryoten an einer Reihe von Aufgaben beteiligt, z.B. bei der Signalgebung von Zellen, dem Membrantransport, der Blutgerinnung und bei Entzündungen.<sup>[149]</sup> Obwohl Annexine hauptsächlich im Zellinnern vorkommen und keine Signalsequenzen haben, werden viele extrazelluläre Vorgänge inzwischen als Annexin-vermittelt angesehen.<sup>[150]</sup> Mehrere In-vitro-Untersuchungen haben die Calcium-abhängige Bindung von Glycosaminoglycanen an Annexine gezeigt.<sup>[85, 151]</sup> Derzeit sind zwar mehr als 100 an Heparin bindende Proteine bekannt,<sup>[11]</sup> aber nur wenige dieser Wechselwirkungen sind Calcium-abhängig. Außer bestimmten Annexinen sind als einzige Beispiele für die Calcium-abhängige Heparinbindung die Serumkomponente Amyloid P (SAP)<sup>[152]</sup> und P- und L-Selectine bekannt.<sup>[153]</sup> Die qualitative Untersuchung der Glycosaminoglycan-bindenden Eigenschaften der Annexine IV, V und VI ergab für jede dieser Verbindungen eine andere Spezifität.<sup>[154]</sup>

Die extrazelluläre Aufgabe von Annexin V ist gut untersucht und besteht in der Mitwirkung beim Zelleintritt und bei der Infektion durch Influenza- und Hepatitis-B-Viren.<sup>[155]</sup> Außerdem wirkt Annexin V in vitro stark gerinnungshemmend, wobei man von einem Mechanismus ausgeht, bei dem das Protein die placentaren Endothelzellen bedeckt und so einen Antithrombose-Schutzschild bildet.<sup>[156]</sup> Kinetische und thermodynamische Untersuchungen an Annexin V zeigen, dass an seiner Calcium-abhängigen Wechselwirkung mit Heparin und Heparansulfat eine Oligosaccharidsequenz aus 6–8 Saccharidresten beteiligt ist.<sup>[85]</sup> Nach Molecular-Modelling-Untersuchungen kommen drei Domänen in Annexin V für eine Beteiligung an der Heparinbindung infrage: eine an der Lipid-bindenden Oberfläche von Annexin V und die beiden anderen an der exponierten Oberfläche. Eine Kristallstrukturanalyse (1.9 Å Auflösung) von Annexin V mit gebundenen Heparin-Tetrasacchariden<sup>[157]</sup> lieferte die ersten Strukturinformationen zur Bedeutung von Calciumionen für eine Heparin-Protein-Wechselwirkung (Abbildung 9). Zwischen den Heparinresten und Calcium besteht ein indirekter Kontakt, zu dem Wasserstoffbrückenbindungen mit Wassermolekülen in der Nähe der Calcium-Koordinationsstellen

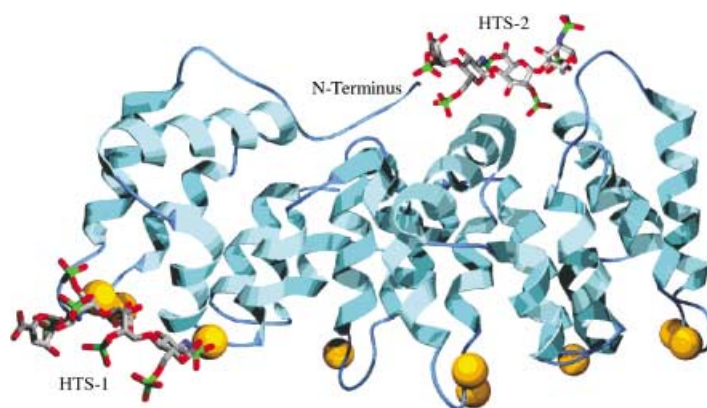


Abbildung 9. Struktur eines Annexin-V-Komplexes, in dem zwei Heparin-Tetrasaccharide an gegenüberliegende Seiten gebunden sind. Annexin V ist als blaugüne Linien- und Bandstruktur dargestellt, Calciumatome sind goldfarben, in den Heparin-Tetrasacchariden sind Sauerstoffatome rot, Schwefelatome grün und Stickstoffatome blau wiedergegeben.

beitragen. Die Calcium-Abhängigkeit der Annexin-Heparin-Wechselwirkung beruht hauptsächlich darauf, dass die zur Bindung von Heparin notwendige Konformation induziert wird. Die Struktur lässt Heparinbindungsstellen auf entgegengesetzten Proteinoberflächen erkennen. Die für die Wechselwirkung wichtigen Reste gehen aus der Kristallstruktur, vorherigen Modellstudien und biochemischen Untersuchungen an Wirkort-veränderten Mutanten hervor. Unter Berücksichtigung all dieser Daten wurde ein Modell vorgeschlagen, wonach sich das Heparansulfat-PG der Zelloberfläche um das Annexin-V-Molekül wickelt und so mit dessen drei Heparin-bindenden Bereichen in Kontakt tritt (Abbildung 10). Anschließend wird das Annexin-V-Molekül freigesetzt und in eine antithrombotische Anordnung an der Phospholipidmembran der Zelloberfläche eingefügt.

Apolipoprotein E (ApoE) ist ein wichtiges Lipidtransportprotein in menschlichem Plasma und Gehirn. Biochemischen, zellbiologischen und epidemiologischen Studien zufolge ist ApoE ein genetischer Hauptrisikofaktor für eine Reihe von Erkrankungen.<sup>[158]</sup> Das menschliche *APOE*-Gen hat drei häufiger vorkommende Allele ( $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  und  $\epsilon 4$ ). Die drei Isoformen unterscheiden sich durch die Aminosäuren 112 und 158 sowie durch ihre Stoffwechseleigenschaften und dem Zusammenhang mit Erkrankungen. ApoE4 (Arg112, Arg158) wird mit einem höheren Risiko für Herzkrankungen in Zusammenhang gebracht<sup>[159]</sup> und ist ein genetischer Hauptrisikofaktor für die Alzheimer-Krankheit.<sup>[160]</sup> Außerdem bindet ApoE LDL (low density lipoprotein)-Rezeptoren und hat eine zentrale Aufgabe im Plasmalipoprotein-Stoffwechsel und beim Cholesterintransport.<sup>[161]</sup> In der Leber vermittelt ApoE die Bindung eines Lipoproteinrestes an einen Komplex aus Heparansulfat-PG und dem LDL-Rezeptor-ähnlichen Protein und vereinfacht so die Lipoproteinaufnahme.<sup>[162]</sup>

Sowohl die N- als auch die C-terminalen Domänen enthalten eine vermutlich Heparin-bindende Stelle.<sup>[163, 164]</sup> Der N-terminale Bereich hat eine hochaffine Heparinbindungsstelle, die mit der Bindungsregion für den LDL-Rezeptor überlappt. Die Heparin-bindende Stelle in der C-terminalen Domäne steht für die Wechselwirkung nur im

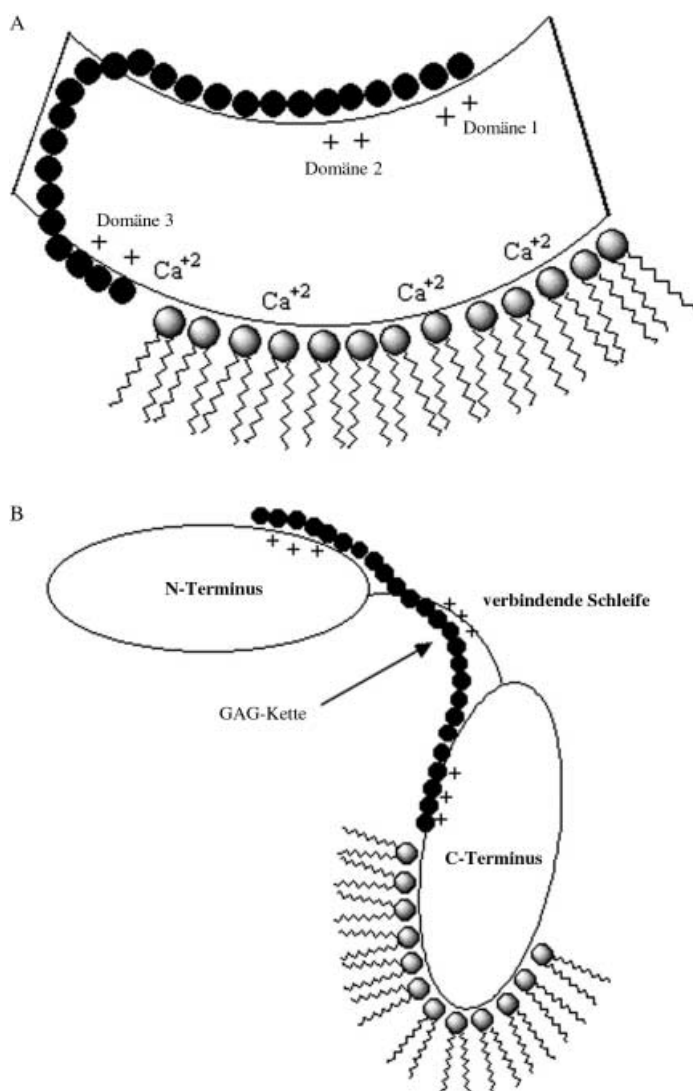


Abbildung 10. Modell für die Bindung von Heparinen an Lipid-bindende Proteine durch Umschlingen. A) Annexin V. B) Apolipoprotein E.

lipidfreien Zustand zur Verfügung.<sup>[164]</sup> Eine dritte Heparin-bindungsstelle wurde für den Proteinabschnitt vorgeschlagen, der den N-terminalen mit dem C-terminalen Bereich verbindet.<sup>[163]</sup> Die Aufgaben von ApoE und Heparansulfat-PG im Gehirn wurden an kultivierten Nervenzellen untersucht; danach werden die Auswirkungen der Alzheimer-Erkrankung durch die Wechselwirkung von ApoE mit dem Komplex aus Heparansulfat-PG und dem LDL-Rezeptor-related-Protein vermittelt.<sup>[162]</sup> Nach dieser Vorstellung interagiert ApoE zuerst mit dem Heparansulfat-PG an der Zelloberfläche und wird danach auf den LDL-Rezeptor-related-Proteinrezeptor zum Transport in die Zelle übertragen. Die Wechselwirkung mit Heparansulfat ist demnach der erste Erkennungsschritt, der ApoE an der Zelloberfläche lokalisiert. Die Wechselwirkung von Heparin mit den ApoE-Isoformen wurde mit der SPR-Methode untersucht,<sup>[165]</sup> und bei einer anderen Arbeit über die Energetik und Kinetik der Heparinbindung an die N-terminale Domäne von ApoE wurde eine Octasaccharidsequenz als Mindestbindungsstelle in Heparin nachgewiesen.<sup>[166]</sup> Die Analyse dieser Bindungsdaten

ließ erkennen, dass sich eine Heparansulfatkette um ApoE wickelt und dabei mit allen drei Heparin-bindenden Stellen in Kontakt tritt (Abbildung 10B). Dieses Modell gleicht dem der Heparinbindung an Annexin V, das andere Lipid-bindende Protein (Abbildung 10A).

## 7. Heparansulfat als Rezeptor für Pathogene

Die erste Bindung eines Virus an eine Zielzelle ist häufig der entscheidende Schritt bei der Entstehung von Krankheiten.<sup>[167]</sup> Die Bindung kann auf einer Rezeptor-ähnlichen Wechselwirkung zwischen einem viralen Hüllprotein und der an der Oberfläche von Zielzellen exprimierten Glycosaminoglycankette eines Proteoglycans beruhen. Heparansulfat-GAGs kommen an den äußeren Oberflächen der meisten Säugetiergewebe vor,<sup>[17, 19]</sup> und es überrascht daher nicht, dass Viren diese Verbindungen als Rezeptoren nutzen, um an bestimmte Zellen zu binden und in diese einzudringen.

Die Wechselwirkung der Hüllproteine von HIV-1 (human immunodeficiency virus type-1) mit Heparin und Heparansulfat war wegen des Potentials dieser sulfatierten Polysaccharide zur Therapie und Vorbeugung von HIV-1-Infektionen Gegenstand vieler Untersuchungen.<sup>[168]</sup> Alle physiologischen Zielzellen für die HIV-1-Infektion – CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, Monozyten/Makrophagen und einige Populationen von dendritischen Zellen – exprimieren das zelluläre Rezeptormolekül CD4.<sup>[169]</sup> Über eine Wechselwirkung mit dem viralen Oberflächen glycoprotein gp120 bindet HIV-1 an eine Schleife aus 20 Aminosäuren in der ersten CD4-Domäne.<sup>[170]</sup> Diese Wechselwirkung induziert vermutlich eine Konformationsänderung der HIV-Glycoproteine, wodurch Corezeptor-Bindungsstellen an gp120 hervorgekehrt werden.<sup>[171]</sup> Die Wechselwirkung von gp120 und vielleicht gp41 mit CD4 und den Corezeptormolekülen führt schließlich zum Verschmelzen von Virus- und Zellmembran.<sup>[172]</sup>

Heparin übt seine Anti-HIV-1-Wirkung aus, indem es an die V3-Schleife, ein Hauptepitop von gp120, bindet.<sup>[173]</sup> Die V3-Schleife ist zwar nicht an der Erstbindung zwischen gp120 und CD4 beteiligt, hat aber eine entscheidende Aufgabe bei den anschließenden Schritten, die zur Membranverschmelzung führen.<sup>[174]</sup> Untersuchungen an chemisch modifizierten Heparinen zeigen, dass die O-Sulfatierung, insbesondere die 6-O-Sulfatierung, und die N-Substitution (Acetylierung oder Sulfatierung) für diese Wechselwirkung essentiell sind.<sup>[175]</sup> Einer anderen Arbeit zufolge werden aufgrund einer Wechselwirkung zwischen gp120 und dem Heparansulfat der Zelloberflächen auch noch Zelllinien mit fehlendem CD4-Rezeptor durch HIV-1 infiziert. Hieraus lässt sich schließen, dass die CD4-Abhängigkeit der HIV-1-Bindung an Zielzellen stark von den Zelllinien abhängt und Heparansulfat in einigen Fällen als Zelloberflächenrezeptor für HIV-1 wirken kann.<sup>[176]</sup> Vor der gp120-CD4-Wechselwirkung gibt es möglicherweise einen weiteren Reaktionsschritt unter Beteiligung von Zelloberflächen-Heparansulfat und Cyclophilin A (CypA), der die Lokalisierung und Bindung von HIV-1 an die Zelloberfläche einleiten würde.<sup>[177]</sup> CypA ist ein in eukaryotischen Zellen ubiquitär exprimiertes, in großen Mengen vorhandenes Cytosolprotein, das beim Virusaufbau in entstehende

HIV-1 – Partikel gepackt wird.<sup>[178]</sup> CypA ist an der Virusmembran exponiert und hat eine ähnliche Domäne mit basischen Resten wie die bekannten Heparin-bindenden Struktur-motive.

Heparin und Heparansulfat haben auch in anderer Hinsicht Bedeutung für die HIV-1-Infektion. Eines der für die HIV-1-Replikation essentiellen Proteine ist das Tat-Protein, das aus Zellen freigesetzt werden kann und autokrine und parakrine (lokale Signalgebung) Wirkungen hat.<sup>[179]</sup> Das Tat-Protein kann in Zellen eindringen und soll bei der Sensibilisierung von Zellen für die Infektion eine Rolle spielen. Tat ist ein Heparin-bindendes Protein, das auch mit Heparansulfat-Protoglycanen an der Zelloberfläche und in der extrazellulären Matrix wechselwirkt.<sup>[180]</sup> Die Mindestgröße eines Tat-bindenden Heparinfragments ist zwar ein Hexasaccharid, aber die Bindungsaffinität steigt mit zunehmender Oligosaccharidgröße und erreicht bei ca. 18 Saccharidresten die Affinität von Heparin.<sup>[181]</sup> Heparin ist also ein „Mehrfachziel“, das auf unterschiedliche Aspekte einer HIV-Infektion Einfluss nimmt.

Das Herpes-simplex-Virus (HSV) verursacht viele Erkrankungszustände, darunter Schleimhautläsionen und Enzephalitis. Diese vielfältigen klinischen Manifestationen spiegeln die Fähigkeit des Virus wieder, sowohl Epithel- als auch Nervenzellen zu infizieren. Auch HSV nutzt Heparansulfat-PG, um Zellen anzugreifen<sup>[182]</sup> und zu infizieren.<sup>[183]</sup> Das Eindringen von HS-Viren in Säugetierzellen ist ein vielstufiger Prozess, der mit einem Verknüpfungsschritt beginnt, in dem die viralen Hüllglycoproteine gC und gB mit den Heparansulfatketten an den Zelloberflächenproteoglycanen wechselwirken.<sup>[184]</sup> HS-Viren der Typen 1 und 2 unterscheiden sich in der Wechselwirkung mit Heparansulfat, die sich auf den viralen Tropismus auswirken kann.<sup>[185]</sup> Die Ursache hierfür sind unterschiedliche Bedingungen von gC und gB in HSV-1 und HSV-2 für die Bindung von Heparin/Heparansulfat.<sup>[186]</sup> Der zweite Schritt beim Zelleintritt von HSV erfordert die Wechselwirkung des Glycoproteins gD mit einer spezifischen Sequenz in den HS-Ketten, die durch 3-O-Sulfatierung bestimmter Glucosaminreste modifiziert sind. Diese Wechselwirkung leitet den HSV-1-Eintritt in die Zelle ein.<sup>[170]</sup>

Auch das Dengue-Virus, ein von Moskitos verbreitetes Flavivirus, das Gelbfieber hervorruft, soll Zellen über die Wechselwirkung eines Hüllproteins mit einem hochsulfatierten Heparansulfat angreifen, was eine Erklärung für den Tropismus des Virus wäre.<sup>[187]</sup> Am C-Terminus der Hüllproteinsequenz des Dengue-Virus wurden zwei vermutlich Heparin-bindende Struktur-motive nachgewiesen (Abbildung 11). Heparin und eine Reihe kleinerer Analoga werden als potentielle Pharmazeutika zur Vorbeugung gegen eine Infektion mit dem Dengue-Virus geprüft.<sup>[187, 188]</sup> Andere Viren, z. B. das RS-Virus (respiratory syncytial virus),<sup>[189]</sup> das Cytomegalie-Virus,<sup>[190]</sup> das Adenovirus<sup>[191]</sup> und das Maul-und-Klauenseuche-Virus,<sup>[192]</sup> nutzen im ersten Infektionsschritt ebenfalls die Heparansulfatkette von Zelloberflächen-Proteoglycanen.

Heparin und Heparansulfat sollen auch für die Virulenz anderer Krankheitserreger Bedeutung haben. Das Circumsporozoiten(CS)-Protein ist ein Oberflächenprotein der Spo-

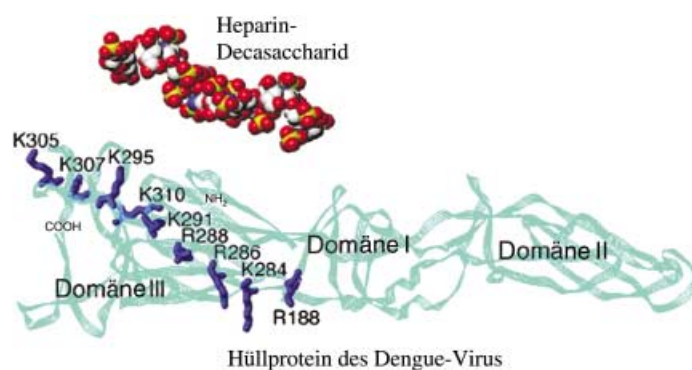


Abbildung 11. Homologiemodell für das Hüllprotein des Dengue-Virus mit einem strukturell modifizierten Heparin-Decasaccharid. Das Hüllprotein ist grün, die Seitenketten der basischen Aminosäuren (188 und 284–310) sind blau. Diese Reste bilden eine ausgedehnte positiv geladene Domäne, die nach außen zeigt. Im Kalottenmodell des Heparin-Decasaccharids mit einem Hauptdisaccharid als Wiederholungseinheit (Schema 1) sind die Schwefelatome gelb, Sauerstoffatome rot und Stickstoffatome blau.

rozoitenzelle des Parasiten *Plasmodium falciparum*, des Erregers der Malaria. Das CS-Protein wechselwirkt mit dem hochsulfatierten Heparansulfat an der Oberfläche von Leberzellen<sup>[193]</sup> und fördert die Sporozoitenanlagerung und die anschließende Invasion der Hepatocyten.<sup>[194, 195]</sup> Diese Wechselwirkung wird durch Heparin Dosis-abhängig inhibiert.<sup>[196]</sup> Das CS-Protein wurde geklont, gereinigt und als Heparin-bindendes Protein erkannt.<sup>[197]</sup> Die Aufnahme von Malaria-Sporozoiten durch Hepatocyten könnte nach demselben Mechanismus funktionieren wie die durch Apolipoprotein E vermittelte Beseitigung von Lipidresten im Blut durch die Leber.<sup>[198]</sup> Die Mindestsequenz für die CS-Protein-bindende Domäne ist ein Decasaccharid,<sup>[195]</sup> dessen Sequenz sich mit der eines Heparin-Octasaccharids deckt, das als kleinstes Oligosaccharid zur Bindung von ApoE erforderlich ist.<sup>[166]</sup>

Die Bindung von Heparin ist eine wirkungsvolle Strategie, die mikrobielle Krankheitserreger nutzen, um eine Reihe Heparin-bindender Säugetierproteine an ihre Oberflächen zu bringen, ohne für jedes dieser Proteine individuelle Rezeptoren synthetisieren zu müssen.<sup>[199]</sup> Tatsächlich bindet das menschliche Pathogen *Neisseria gonorrhoeae* Vitronectin, ein Protein der extrazellulären Matrix, ohne Mitwirkung eines spezifischen Vitronectinrezeptors an seiner Zelloberfläche.<sup>[200]</sup> In diesem Fall liegt vermutlich eine indirekte Vitronectinbindung vor, die durch eine Heparansulfatkette vermittelt wird, die zwei Heparin-bindende Proteine, das Bakterienoberflächen-Adhäsins OpaA und Vitronectin, stabil verbrückt.<sup>[201]</sup>

## 8. Die Wechselwirkung von Heparin mit Adhäsionsproteinen

Die Wechselwirkung von Heparin und Heparansulfat mit Adhäsionsproteinen steht im Zusammenhang mit einer Reihe von physiologischen und pathologischen Prozesse wie Entzündung, Wachstum von Nervengewebe, Invasion von Tumorzellen und Plaquebildung im Gehirn.

Die Selectine (L-, E- und P-Selectin) sind Transmembran-Glycoproteine, die im Endothel, in Blutplättchen und Leukocyten vorkommen.<sup>[202]</sup> Sie vermitteln die ersten Adhäsionsvorgänge, welche die Rückkehr von Lymphocyten in die Lymphorgane steuern, sowie die Wechselwirkung von Leukocyten mit dem Endothel bei Entzündungen und bei der Reperfusion von Verletzungen.<sup>[203]</sup> Selectinwechselwirkungen sind möglicherweise an der Metastasierung bestimmter Epithelcarcinome beteiligt.<sup>[204]</sup> Der mutmaßliche Ligand für die Wechselwirkung von Leukocyten mit Selectinen am Endothel ist zwar das Kohlenhydrat-Antigen Sialyl-Lewis-X (SLe<sup>x</sup>), doch auch Heparansulfat spielt hierbei eine Rolle.<sup>[153, 205]</sup> Heparansulfat wechselwirkt mit L- und P-Selectin, nicht aber mit E-Selectin.<sup>[153, 206]</sup> Die Wechselwirkung von Heparin mit L-Selectin ist Calcium-abhängig und benötigt mikromolare Konzentrationen an freiem Calcium. L-Selectin bindet Oligosaccharide, die stark modifizierte, hochsulfatierte, Iduronsäure-reiche Regionen enthalten, sowie Heparansulfatketten aus Endothelgewebe, die reich an freien Aminogruppen sind.<sup>[207]</sup> Die P-Selectin-bindenden Heparansulfate enthalten Ketten mit weniger stark modifizierten Domänen.<sup>[206]</sup> Indem sie die Wechselwirkungen von L- und P-Selectinen mit SLe<sup>x</sup>-haltigen Liganden spezifisch blockieren, wirken Heparin-Tetrasaccharide in vivo entzündungshemmend und verhindern zudem die Adhäsion von Darmkrebszellen an L- und P-Selectin.<sup>[205]</sup>

Das Heparin-bindende Wachstumsmolekül HB-GAM (heparin-binding growth-associated molecule) oder Pleiotrophin ist ebenfalls ein Protein der extrazellulären Matrix. HB-GAM soll das Neuritenwachstum verstärken, indem es für extrazelluläre Stränge sorgt, welche die Neuriten im sich entwickelnden Gehirn leiten.<sup>[208]</sup> Das Heparansulfat-PG Syndecan-3 bindet mit hoher Affinität an HB-GAM und kann der Rezeptor für diese Verbindung sein. Die Bindung löst Signale von wachsenden Neuriten aus, die ein schnelleres Neuritenwachstum fördern.<sup>[209]</sup> Lösliche Heparin- und Heparansulfat-GAGs wirken hemmend auf das Neuritenwachstum, und für diesen Inhibitoreffekt müssen 2-O-Sulfogruppen vorhanden sein. Das Heparin-Oligosaccharid musste für die Inhibierung des durch HB-GAM induzierten Neuritenwachstums ein Decasaccharid sein, die höchste Aktivität erreichte ein Octadecasaccharid.<sup>[210]</sup> Die Thermodynamik und die Kinetik der Heparin-HB-GAM-Wechselwirkung wurden mit ITC und SPR untersucht.<sup>[86]</sup> ITC-Studien ergaben für die Wechselwirkung eine Stöchiometrie, die einer Bindungsstelle für HB-GAM in Heparin von 12–16 Saccharidresten entspricht. Durch Affinitätschromatographie an HB-GAM-Sepharose konnte gezeigt werden, dass die stärksten Wechselwirkungen zu Oligosacchariden mit mehr als 18 Saccharidresten bestehen. CD- und NMR-Spektren sprechen dafür, dass die Bindung von Heparin zu einer Konformationsänderung in HB-GAM führt und hauptsächlich an dessen  $\beta$ -Faltblattdomänen erfolgt.<sup>[211]</sup> Eine Überprüfung der Sequenzdatenbanken ergab, dass die  $\beta$ -Faltblattbereiche von HB-GAM homolog zur Wiederholungseinheit von Thrombospondin Typ I (thrombospondin type I repeat, TSR) sind. Das TSR-Sequenzmotiv kommt in zahlreichen Proteinen vor (darunter dem Malaria-CS-Protein), die Zell-Zell-Kontakte und Wechselwirkungen zwischen Zelle und extrazellulärer Matrix ver-

mitteln, wobei die TSR-Domäne die spezifische Zelloberflächenbindung vermittelt.

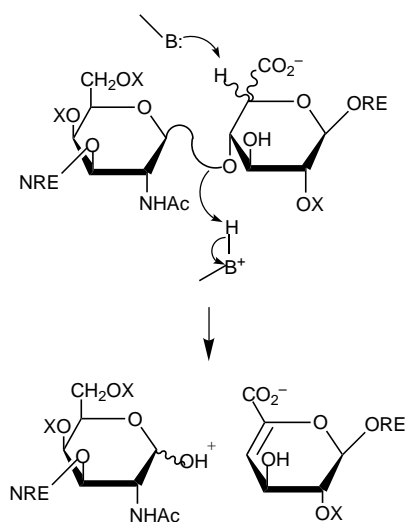
Heparin und Heparansulfat wirken wohl auch an der Bildung von Amyloidablagerungen bei der Alzheimer-Krankheit mit und kommen in den damit einhergehenden  $\beta$ -Amyloid-Plaques und Neurofibrillenbündeln vor.<sup>[212]</sup> Amyloid P (AP) ist ein Glycoprotein, das im Blutkreislauf, in den Basalmembranen und im Bindegewebe vorkommt und auch genereller Bestandteil der abnormen Gewebeeablagerungen bei Amyloidosen wie der Alzheimer-Krankheit ist.<sup>[213]</sup> AP bindet Calcium-abhängig an Heparin, Heparansulfat und Dermatan-sulfat.<sup>[152]</sup> Außerdem gibt es zwischen AP und Heparansulfat oder Dermatan-sulfat eine Calcium-unabhängige Bindung niedrigerer Affinität, die sich bei leicht abgesenktem pH-Wert vermutlich wegen der Protonierung der Histidinreste in AP verstärkt.<sup>[214]</sup> Bei der proteolytischen Spaltung von AP wurden zwei Heparin-bindende Bruchstücke nachgewiesen.<sup>[215]</sup> Die Sequenzen dieser Fragmente stimmen mit keiner bisher bekannten Heparin-bindenden Sequenz überein, und anders als AP benötigen diese Peptide kein Calcium für ihre Bindungsaktivität. Die Bindung des Peptids mit der höchsten Affinität zu Heparin wurde durch Affinitäts-Kapillarelektrophorese untersucht.<sup>[216]</sup> Diese Bindung erwies sich als hochspezifisch für Heparin und Heparin-Oligosaccharide bis hinunter zu Tetrameren und schien bei schwach alkalischem pH-Wert stärker zu sein. Mit Heparansulfat, Chondroitinsulfat und desulfatiertem Heparin konnte keine Bindung nachgewiesen werden. Obwohl die genaue Bedeutung von Heparin und Heparansulfat für die Pathologie der Alzheimer-Krankheit noch nicht bekannt ist, besteht die Möglichkeit, dass Heparin oder Heparin-Oligosaccharide nützlich sein könnten, um die durch die Alzheimer-Krankheit<sup>[217]</sup> oder durch Prionen<sup>[218]</sup> verursachte Plaquebildung im Gehirn zu verlangsamen oder umzukehren.

## 9. Heparin-abbauende Enzyme

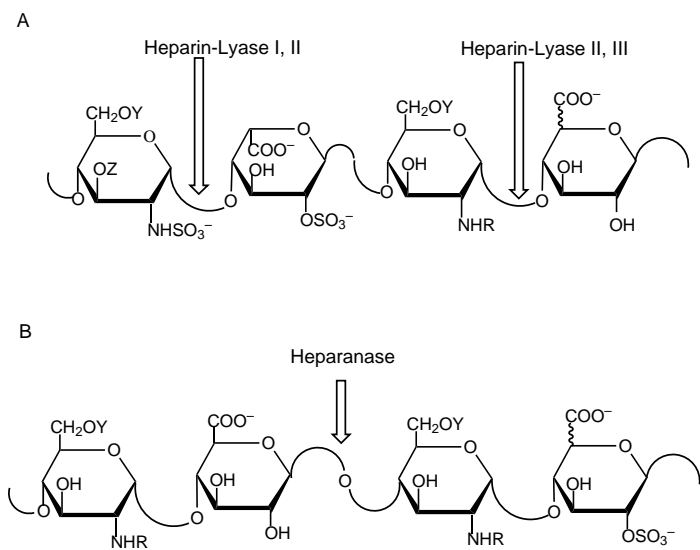
Auf Heparin und Heparansulfat wirken zwei Enzymarten: die prokaryotischen Polysaccharid-Lyasen, die über einen Eliminierungsmechanismus wirken,<sup>[35]</sup> und die eukaryotischen Glucuronyl-Hydrolasen, die über einen Hydrolysemechanismus wirken. Heparin-Lyasen depolymerisieren Heparin eliminativ zu ungesättigten Oligosacchariden (Schema 5). Drei große Polysaccharid-Lyasen, die aus *Flavobacterium heparinum* isolierten Heparin-Lyasen I, II und III, können die in Heparin und Heparansulfat vorhandenen Bindungen aufbrechen.<sup>[12]</sup> Die Substratspezifität jedes dieser Enzyme wurde mit Heparin-Oligosacchariden und chemisch modifizierten Heparinen eingehend untersucht (Schema 6A).<sup>[13]</sup>

Eine Gegenüberstellung der Primärsequenzen dieser Enzyme ergab sowohl auf der DNA-Stufe als auch auf der Aminosäurestufe nur eine geringe Sequenzhomologie.<sup>[219]</sup> In der Heparin-Lyase II gibt es drei basische Cluster, die Heparin-bindenden Konsenssequenzen gleichen. Sie sind homolog zu dem basischen Cluster in der Heparinbindungsstelle von Heparin-Lyase I und zu den zwei basischen Clustern in der Heparin-Lyase III. Die Heparin-Lyasen I





Schema 5. Angenommener Mechanismus für die eliminative Depolymerisation von Glycosaminoglycanen. B steht für eine basische Komponente, X = H oder  $\text{SO}_3^-$ .



Schema 6. Substratspezifität A) der Heparin-Lyasen I, II und III, B) der Säugetier-Heparanase (Y, Z = H oder  $\text{SO}_3^-$ , R = Ac oder  $\text{SO}_3^-$ ).

und III enthalten vermutlich zwei Calcium-koordinierende „EF-Hand“-Strukturmodule, Heparin-Lyase II hingegen keine;<sup>[219]</sup> dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass Calcium die Enzymaktivität der Heparin-Lyasen I und III erhöht, die von Heparin-Lyase II aber inhibiert.<sup>[12]</sup>

Die Gene, welche in *Flavobacterium heparinum* für die drei Heparin-Lyasen kodieren, wurden geklont und in *Escherichia coli* exprimiert.<sup>[220, 221]</sup> Enzymologische Untersuchungen an Heparinlyase I haben ergeben, dass ein Cystein- und ein Histidinrest zusammen einen Teil der katalytischen Domäne bilden<sup>[222]</sup> und dass drei Lysinreste an der Bindung von Heparin in der Nähe des katalytisch aktiven Zentrums beteiligt sind.<sup>[223]</sup> Die weitreichendste Substratspezifität der drei Enzyme hat Heparin-Lyase II mit zwei getrennten Wirkorten, von denen einer vermutlich für Heparin, der andere für Heparansulfat spezifisch ist.<sup>[224]</sup> Entscheidend für die Aktivität von Heparin-Lyase II sind ein Cystein- und drei Histidinreste.<sup>[225]</sup> Heparin-Lyase III hat hohe Spezifität für Heparan-

sulfat und ist insofern ungewöhnlich, als es keine Cysteinreste enthält,<sup>[221, 226]</sup> sondern stattdessen zwei für seine Aktivität gegenüber Heparansulfat entscheidende Histidinreste.<sup>[227]</sup> Die Heparin-Lyasen sind zur Aufklärung der Struktur von Heparin und Heparansulfat unentbehrlich, da sie diese Polysaccharide in definierte Oligosaccharide überführen.<sup>[14]</sup> Auch klinisch sind Heparin-Lyasen von Bedeutung: Sie wurden eingesetzt, um den Heparinblutspiegel zu kontrollieren,<sup>[228]</sup> um Heparin im Blut zu neutralisieren und um Heparine niedriger Molekülmasse zur Verwendung beim Menschen herzustellen.<sup>[8, 229]</sup> Neueren Untersuchungen zufolge können die Heparin-Lyasen I und II die AT-III-bindende Stelle in Heparin spalten, wobei nur ein Teil des aktiven Zentrums zurückbleibt, dem einige funktionelle Eigenschaften des Heparins mit intakter AT-III-Bindungsstelle fehlen.<sup>[230]</sup> Die Heparin-Lyasen I und III sind ferner wirksame Inhibitoren der Neovaskularisation (Gefäßneubildung), die mit der Regulierung der Gewebeentwicklung, der Wundheilung und der Metastasierung von Tumoren zusammenhängt.<sup>[231]</sup> Aus dem im menschlichen Darm vorkommenden *Bacteroides stercoris* HJ-15 wurde vor kurzem eine neue Art der Heparin-Lyase isoliert,<sup>[232]</sup> die dazu beitragen könnte, die orale Bioverfügbarkeit von pharmazeutischem Heparin zu verbessern.<sup>[233]</sup>

Menschliche Heparanase ist eine Heparansulfat-spaltende *endo*- $\beta$ -D-Glucuronidase, die gereinigt, geklont und charakterisiert wurde.<sup>[234]</sup> Die Heparanase ist eine Hydrolase und unterscheidet sich damit von den *Flavobacterium*-Heparin-Lyasen und wird mit Entzündung sowie Tumorangienese und -metastasierung in Verbindung gebracht, weshalb sie zu einem wichtigen Ziel für die Entwicklung von Inhibitoren geworden ist.<sup>[235]</sup> Die Heparanase spaltet Heparansulfat in charakteristische Fragmente mit hoher Molekülmasse.<sup>[236]</sup> Für die Substratspezifität scheinen die 2-O-Sulfogruppen an den Uronsäuren eine besondere Bedeutung zu haben (Schema 6B).<sup>[237]</sup> Der für die Heparanaseaktivität optimale pH-Wert von 4.2 lässt darauf schließen, dass das Enzym in den Lysosomen lokalisiert sein könnte.<sup>[237]</sup>

## 10. Neue klinische Anwendungen von Heparin

Die Wechselwirkung von Heparin mit zahlreichen Proteinen, die bei der Regulierung normaler physiologischer Vorgänge ebenso wie bei Erkrankungszuständen wichtige Aufgaben haben, weckte das Interesse an anderen Verwendungen von Heparin als der üblichen Anwendung als gerinnungshemmendes/antithrombotisches Mittel. Zufällig machte man bei Versuchen zur Wirksamkeit von LMW-Heparin gegenüber nichtfraktioniertem Heparin zur Behandlung der venösen Thromboembolie von Krebspatienten die überraschende Beobachtung, dass die Behandlung mit Heparin sich auf die Überlebensdauer von Patienten mit malignen Tumoren auswirken kann.<sup>[238]</sup> Krebspatienten, die gegen ihre Thrombose mit LMW-Heparin behandelt worden waren, hatten eine um drei Monate längere Überlebenszeit als Krebspatienten, die nichtfraktioniertes Heparin erhalten hatten. Heparin kann wahrscheinlich seine Aktivität an mehreren Stellen der Tumorprogression sowie in Prozessen,



die mit der Malignität zusammenhängen, ausüben. Es kann die Zellwucherung beeinflussen, die Adhäsion von Krebszellen am Gefäßendothel stören, das Immunsystem steuern und sowohl hemmend als auch anregend auf die Angiogenese wirken.<sup>[239]</sup> Neueren Ergebnissen zufolge verringert die Behandlung mit Heparin die Metastasenbildung von Tumoren bei Mäusen, indem es die durch P-Selectin vermittelten Wechselwirkungen von Blutplättchen mit Mucinliganden der Carcinomzelloberfläche inhibiert.<sup>[240]</sup>

Da eine Reihe physiologisch und pathophysiologisch wichtiger Proteine mit Heparin und Heparansulfat interagieren, bieten sich zahlreiche therapeutische Anwendungsmöglichkeiten für Heparin an. Die Haupteinschränkung ist die hohe Aktivität des Heparins als Antikoagulans, die nun zur Nebenwirkung wird und hämorrhagische Komplikationen verursachen kann. Die Einführung von LMW-Heparinen und die Herstellung von Heparin-Oligosacchariden und synthetischen Derivaten ohne gerinnungshemmende Wirkung eröffnen eine Vielzahl neuer therapeutischer Anwendungsmöglichkeiten bei der Behandlung von Krebs, viralen und bakteriellen Infektionen, der Alzheimer-Krankheit und der Abstoßung von Transplantaten.

## 11. Zusammenfassung und Ausblick

In den letzten Jahrzehnten erkannte man, dass Heparin und Heparansulfat mit einer Reihe biologisch wichtiger Proteine wechselwirken und so entscheidende Aufgaben bei der Regulierung von physiologischen Vorgängen haben (Abbildung 12). Für die Entwicklung hochspezifischer Therapeutika ist das Verständnis dieser Wechselwirkungen auf molekularer Ebene sehr wichtig. Zudem muss man die Heparin- und

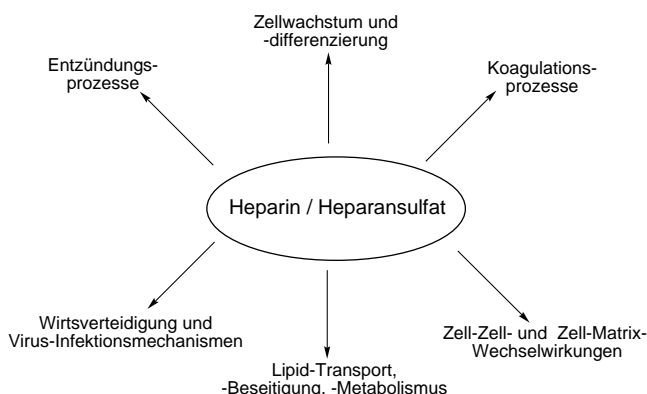


Abbildung 12. Wichtige physiologische Prozesse, an denen Heparin und Heparansulfat beteiligt sind.

Heparansulfatspezifität kennen, um normale physiologische und pathophysiologische Prozesse zu verstehen. Besondere Bedeutung haben diese Vorgänge dort, wo Zell-Zell-Wechselwirkungen eine wichtige Rolle spielen, z.B. in der Entwicklungsbiologie, bei Krebs, Wundheilung, Infektionserkrankungen, Entzündungsprozessen und dem Wachstum von Neuriten.

Eingegangen am 23. April 2001 [A 469]  
Übersetzt von Dr. Kathrin-M. Roy, Langenfeld

- [1] a) R. J. Linhardt, *Chem. Ind.* **1991**, 2, 45–50; b) L. Roden in Lit. 16, S. 1–24.
- [2] H. W. Howell, *Bull. Johns Hopkins Hosp.* **1928**, 42, 199.
- [3] E. Jorpes, S. Bergstrom, *Z. Physiol. Chem.* **1936**, 244, 253–256.
- [4] A. F. Charles, A. R. Todd, *Biochem. J.* **1940**, 34, 112–118.
- [5] A. S. Perlin, M. Mazurek, L. B. Jaques, L. W. Kavanaugh, *Carbohydr. Res.* **1968**, 7, 369–379.
- [6] a) L. Roden, D. S. Feingold, *Trends Biochem. Sci.* **1985**, 10, 407–409; b) C. H. Best, *Circulation* **1959**, 19, 79.
- [7] a) J. Choay, J. C. Lormeau, M. Petitou, P. Sinaÿ, J. Fareed, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1981**, 370, 644–649; b) R. Pixley, I. Danishefsky, *Thromb. Res.* **1982**, 26, 129–133; c) M. Höök, I. Björk, J. Hopwood, U. Lindahl, *FEBS Lett.* **1976**, 66, 90–93.
- [8] a) R. J. Linhardt, N. S. Gunay, *Semin. Thromb. Hemostasis* **1999**, 25, 5–16; b) J. Fareed, D. A. Hoppensteadt, R. L. Bick, *Semin. Thromb. Hemostasis* **2000**, 26, 5–21.
- [9] R. D. Rosenberg, P. S. Damus, *J. Biol. Chem.* **1973**, 248, 6490–6505.
- [10] a) U. Lindahl, G. Bäckström, M. Höök, L. Thunberg, L.-Å. Fransson, A. Linker, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1979**, 76, 3198–3202; b) R. D. Rosenberg, L. Lam, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1979**, 76, 1218–1222.
- [11] a) R. J. Linhardt, T. Toida in *Carbohydrates in Drug Design* (Hrsg.: Z. J. Witzczak, K. A. Nieforth), Marcel Dekker, New York, **1997**, S. 277–341; b) H. E. Conrad, *Heparin-Binding Proteins*, Academic Press, San Diego, **1998**, S. 3.
- [12] D. L. Lohse, R. J. Linhardt, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 24347–24355.
- [13] a) U. R. Desai, H. M. Wang, R. J. Linhardt, *Biochemistry* **1993**, 32, 8140–8145; b) U. R. Desai, H. M. Wang, R. J. Linhardt, *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, 306, 461–468.
- [14] a) A. Pervin, C. Gallo, K. Jandik, X.-J. Han, R. J. Linhardt, *Glycobiology* **1995**, 5, 83–95; b) R. E. Hileman, T. Toida, A. E. Smith, R. J. Linhardt, *Glycobiology* **1997**, 7, 231–239.
- [15] a) B. Casu, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1985**, 43, 51–134; b) W. D. Comper, *Heparin and Related Polysaccharides*, Vol. 7, Gordon and Breach, **1981**.
- [16] *Heparin: Chemical and Biological Properties, Clinical Applications* (Hrsg.: D. A. Lane, U. Lindahl), CRC, Boca Raton, **1989**.
- [17] J. T. Gallagher, J. E. Turnbull, M. Lyon, *Adv. Exp. Med. Biol.* **1992**, 313, 49–57.
- [18] C. C. Griffin, R. J. Linhardt, C. L. VanGorp, T. Toida, R. E. Hileman, R. L. Schubert, S. E. Brown, *Carbohydr. Res.* **1995**, 276, 183–197.
- [19] M. Bernfield, R. Kokeyes, M. Kato, M. T. Hinkes, J. Spring, R. L. Gallo, E. J. Lose, *Annu. Rev. Cell Biol.* **1992**, 8, 365–393.
- [20] a) U. Lindahl, K. Lindholt, D. Spillmann, L. Kjellén, *Thromb. Res.* **1994**, 75, 1–32; b) R. D. Rosenberg, N. W. Schworak, J. Liu, J. J. Schwartz, L. Zhang, *J. Clin. Invest.* **1997**, 99, 2062–2070.
- [21] M. Bernfield, M. Götte, P. W. Park, O. Reizes, M. L. Fitzgerald, J. Lincecum, M. Zako, *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, 68, 729–777.
- [22] R. J. Linhardt in *Current Protocols in Molecular Biology, Analysis of Glycoconjugates* (Hrsg.: A. Varki), Wiley Interscience, **1994**, 17.13.17–17.13.32.
- [23] B. Mulloy, M. J. Forster, C. Jones, D. B. Davies, *Biochem. J.* **1993**, 293, 849–858.
- [24] B. Mulloy, E. J. Linhardt, *Curr. Struct. Biol.* **2001**, 11, 623–628.
- [25] B. Casu, *Haemostasis* **1990**, 20, 62–73.
- [26] a) U. R. Desai, H. M. Wang, T. R. Kelly, R. J. Linhardt, *Carbohydr. Res.* **1993**, 241, 249–259; b) G. Torri, B. Casu, G. Gatti, M. Petitou, J. Choay, J.-C. Jacquinet, P. Sinaÿ, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1985**, 128, 134–140.
- [27] P. N. Sanderson, T. N. Huckerby, I. A. Nieduszynski, *Biochem. J.* **1987**, 243, 175–181.
- [28] a) D. R. Ferro, A. Provasoli, M. Ragazzi, G. Torri, B. Casu, J.-C. Jacquinet, P. Sinaÿ, M. Petitou, J. Choay, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 6773–6778; b) C. A. van Boeckel, S. F. van Aelst, G. N. Wagenaar, J.-R. Mellema, H. Paulsen, T. Peters, A. Pollex, V. Sinnwell, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1987**, 106, 19–29.
- [29] D. Mikhailov, R. J. Linhardt, K. H. Mayo, *Biochem. J.* **1997**, 328, 51–61.
- [30] D. Mikhailov, K. H. Mayo, I. R. Vlahov, T. Toida, A. Pervin, R. J. Linhardt, *Biochem. J.* **1996**, 318, 93–102.
- [31] S. Faham, R. E. Hileman, J. R. Fromm, R. J. Linhardt, D. C. Rees, *Science* **1996**, 271, 1116–1120.

- [32] C. A. van Boeckel, H. Lucas, S. F. van Aelst, M. W. P. van den Nieuwenhof, G. N. Wagenaars, J.-R. Mellema, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1987**, *106*, 581–591.
- [33] B. Mulloy, M. J. Forster, C. Jones, A. F. Drake, E. A. Johnson, D. B. Davies, *Carbohydr. Res.* **1994**, *255*, 1–26.
- [34] A. D. DiGabriele, I. Lax, D. I. Chen, C. M. Svahn, M. Jaye, J. Schlessinger, W. A. Hendrickson, *Nature* **1998**, *393*, 812–817.
- [35] R. J. Linhardt, P. M. Galliher, C. L. Cooney, *Appl. Biochem. Biotech.* **1986**, *12*, 135–176.
- [36] H. G. Bazin, R. J. Kerns, R. J. Linhardt, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 923–926.
- [37] H. G. Bazin, I. Capila, R. J. Linhardt, *Carbohydr. Res.* **1998**, *309*, 135–144.
- [38] M. Ragazzi, D. R. Ferro, A. Provasoli, P. Pumilia, A. Cassinara, G. Torri, M. Guerrini, B. Casu, H. B. Nader, C. P. Dietrich, *J. Carbohydr. Chem.* **1993**, *12*, 523–535.
- [39] S. E. B. Gould, R. O. Gould, D. A. Rees, A. W. Wight, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1975**, 392–399.
- [40] U. Lindahl, D. S. Feingold, L. Roden, *Trends Biochem. Sci.* **1986**, *11*, 221–225.
- [41] U. Lindahl, L. Kjellen, *The Biology of the Extracellular Matrix: Proteoglycans*, Academic Press, New York, **1987**.
- [42] M. Salmivirta, K. Lindholt, U. Lindahl, *FASEB J.* **1996**, *10*, 1270–1279.
- [43] K. Sugahara, H. Kitagawa, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, *10*, 518–527.
- [44] a) H. Kitagawa, Y. Tone, J. Tamura, K. W. Neumann, T. Ogawa, S. Oka, T. Kawasaki, K. Sugahara, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 6615–6618; b) Y. Tone, H. Kitagawa, S. Oka, T. Kawasaki, K. Sugahara, *FEBS Lett.* **1999**, *459*, 415–420.
- [45] a) T. Okajima, K. Yoshida, T. Kondo, K. Furukawa, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 22915–22918; b) R. Almeida, S. B. Levery, U. Mandel, H. Kresse, T. Schwientek, E. P. Bennett, H. Clausen, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 26165–26171.
- [46] a) L. Zhang, G. David, J. D. Esko, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 27127–27135; b) T. A. Fritz, M. M. Gabb, G. Wei, J. D. Esko, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 28809–28814.
- [47] C. McCormick, G. Duncan, K. T. Goutsos, F. Tufaro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 668–673.
- [48] K. Lindholt, U. Lindahl, *Biochem. J.* **1992**, *287*, 21–29.
- [49] U. Lindahl, G. Bäckström, A. Malmström, L.-Å. Fransson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1972**, *46*, 985–991.
- [50] I. Jacobsson, U. Lindahl, *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 5094–5100.
- [51] M. Kusche, G. Torri, B. Casu, U. Lindahl, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 15403–15409.
- [52] X. Bai, J. D. Esko, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 17711–17717.
- [53] R. D. Rosenberg, N. W. Shworak, J. Liu, J. J. Schwartz, L. Zhang, *J. Clin. Invest.* **1997**, *100*, S67–S75.
- [54] a) J. Liu, N. W. Shworak, L. M. Fritze, J. M. Edelberg, R. D. Rosenberg, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 27072–27082; b) N. W. Shworak, J. Liu, L. M. Petros, L. Zhang, M. Kobayashi, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, R. D. Rosenberg, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 5170–5184.
- [55] J. T. Gallagher, J. E. Turnbull, M. Lyon, *Int. J. Biochem.* **1992**, *24*, 553–560.
- [56] R. Langer, R. J. Linhardt, S. Hoffberg, A. K. Larsen, C. L. Cooney, D. Tapper, M. Klein, *Science* **1982**, *217*, 261–263.
- [57] M. D. Freedman, *J. Clin. Pharmacol.* **1992**, *32*, 584–596.
- [58] a) D. E. Wallis, B. E. Lewis, H. Messmore, W. H. Wehrmacher, *Clin. Appl. Thromb./Hemostasis* **1998**, *4*, 160–163; b) J. M. Walenga, R. L. Bick, *Med. Clin. North Am.* **1998**, *82*, 635–648.
- [59] A. D. Cardin, H. J. R. Weintraub, *Arteriosclerosis* **1989**, *9*, 21–32.
- [60] M. Sobel, D. F. Soler, J. C. Kermode, R. B. Harris, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 8857–8862.
- [61] H. Margalit, N. Fischer, S. A. Ben-Sasson, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 19228.
- [62] R. E. Hileman, J. R. Fromm, J. M. Weiler, R. J. Linhardt, *BioEssays* **1998**, *20*, 156–167.
- [63] J. R. Fromm, R. E. Hileman, J. M. Weiler, R. J. Linhardt, *Arch. Biochem. Biophys.* **1997**, *346*, 252–262.
- [64] J. A. Huntington, S. T. Olson, B. Fan, P. G. W. Gettins, *Biochemistry* **1996**, *35*, 8495–8503.
- [65] E. E. O. Caldwell, V. D. Nadkarni, J. R. Fromm, R. J. Linhardt, J. M. Weiler, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **1996**, *28*, 203–216.
- [66] J. R. Fromm, R. E. Hileman, E. E. O. Caldwell, J. M. Weiler, R. J. Linhardt, *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, *323*, 279–287.
- [67] J. R. Fromm, R. E. Hileman, E. E. O. Caldwell, J. M. Weiler, R. J. Linhardt, *Arch. Biochem. Biophys.* **1997**, *343*, 92–100.
- [68] a) U. Lindahl, G. Bäckström, L. Thunberg, I. G. Leder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, *77*, 6551–6555; b) M. Petitou, J. C. Lormeau, J. Choay, *Eur. J. Biochem.* **1988**, *176*, 637–640.
- [69] M. J. Hernàiz, J. Liu, R. D. Rosenberg, R. J. Linhardt, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *276*, 292–287.
- [70] D. Shukla, J. Liu, P. Blaiklock, N. W. Shworak, X. Bai, J. D. Esko, G. H. Cohen, R. J. Eisenberg, R. D. Rosenberg, P. G. Spear, *Cell* **1999**, *99*, 13–22.
- [71] S. Ye, Y. Luo, W. Lu, R. B. Jones, K. A. Mohamedali, R. J. Linhardt, I. Capila, T. Toida, M. Kan, H. Pelletier, W. L. McKeehan, *Biochemistry*, **2001**, *40*, 14429–14439.
- [72] W. L. McKeehan, X. Wu, M. Kan, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 21511–21514.
- [73] a) A. Walker, J. E. Turnbull, J. T. Gallagher, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 931–935; b) M. Ishihara, R. Takano, T. Kanda, K. Hayashi, S. Hara, H. Kikuchi, K. Yoshida, *J. Biochem.* **1995**, *118*, 1255–1260.
- [74] H. M. Wang, T. Toida, Y. S. Kim, I. Capila, R. E. Hileman, M. Bernfield, R. J. Linhardt, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *235*, 369–373.
- [75] S. Faham, R. J. Linhardt, D. C. Rees, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1998**, *8*, 578–586.
- [76] M. A. Fath, X. Wu, R. E. Hileman, R. J. Linhardt, W. M. Abraham, M. A. Kashem, R. M. Nelson, C. Wright, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 13563–13569.
- [77] R. E. Hileman, R. N. Jennings, R. J. Linhardt, *Biochemistry* **1998**, *37*, 15231–15237.
- [78] J. Bae, U. R. Desai, A. Pervin, E. E. O. Caldwell, J. M. Weiler, R. J. Linhardt, *Biochem. J.* **1994**, *301*, 121–129.
- [79] a) G. S. Manning, *Biopolymers* **1972**, *11*, 937–949; b) W. Sicinska, W. Adams, L. Lerner, *Carbohydr. Res.* **1993**, *242*, 29–51.
- [80] a) T. M. Record, T. M. Lohman, P. J. de Haseth, *Mol. Biol.* **1976**, *107*, 145–158; b) T. M. Lohman, D. P. Mascotti, *Methods Enzymol.* **1992**, *212*, 400–424.
- [81] a) S. T. Olson, H. R. Halvorson, I. Björk, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 6342–6352; b) B. Faller, Y. Mely, D. Gerard, J. G. Bieth, *Biochemistry* **1992**, *31*, 8285–8290.
- [82] D. P. Mascotti, T. M. Lohman, *Biochemistry* **1995**, *34*, 2908–2915.
- [83] S. T. Olson, K. R. Srinivasan, I. Björk, J. D. Shore, *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 11073–11079.
- [84] G. B. Villanueva, I. Danishefsky, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1977**, *74*, 803–809.
- [85] I. Capila, V. A. VanderNoot, T. R. Mealy, B. A. Seaton, R. J. Linhardt, *FEBS Lett.* **1999**, *446*, 327–330.
- [86] M. Fath, V. A. VanderNoot, I. Kilpeläinen, T. Kinnunen, H. Rauvala, R. J. Linhardt, *FEBS Lett.* **1999**, *454*, 105–108.
- [87] E. E. O. Caldwell, A. M. Andreason, M. A. Blietz, J. N. Serrahn, V. A. VanderNoot, Y. Park, G. Yu, R. J. Linhardt, J. M. Weiler, *Arch. Biochem. Biophys.* **1999**, *361*, 215–222.
- [88] a) L. D. Thompson, M. W. Pantoliano, B. A. Springer, *Biochemistry* **1994**, *33*, 3831–3840; b) E. Freire, O. L. Mayorga, M. Straume, *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 950A–959A.
- [89] K. G. Rice, P. Wu, L. Brand, Y. C. Lee, *Biochemistry* **1991**, *30*, 6646–6655.
- [90] M. Lee, A. D. Lander, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 2768–2772.
- [91] R. E. Edens, J. R. Fromm, S. J. Fromm, R. J. Linhardt, J. M. Weiler, *Biochemistry* **1995**, *34*, 2400–2407.
- [92] J. Dawes, *Anal. Biochem.* **1988**, *174*, 177–186.
- [93] H. Mach, D. B. Volkin, C. J. Burke, C. R. Middaugh, R. J. Linhardt, J. R. Fromm, D. Loganathan, L. Mattsson, *Biochemistry* **1993**, *32*, 5480–5489.
- [94] D. L. Evans, C. J. Marshall, P. B. Christey, R. W. Carrell, *Biochemistry* **1992**, *31*, 12629–12642.
- [95] C. J. M. Huige, C. Altona, *J. Comput. Chem.* **1995**, *16*, 56–79.
- [96] T. Kozar, C.-W. von der Lieth, *Glycoconjugate J.* **1997**, *14*, 925–933.
- [97] R. Tyler-Cross, M. Sobel, L. E. McAduy, R. B. Harris, *Arch. Biochem. Biophys.* **1996**, *334*, 206–213.
- [98] W. Bitomsky, R. C. Wade, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 3004–3013.

- [99] a) H. Rubin, *Nat. Med.* **1996**, 2, 632–633; b) E. J. Goldsmith, J. Mottonen, *Structure* **1994**, 2, 241–244.
- [100] a) L.-O. Andersson, L. Engman, E. Henningsson, *J. Immunol. Methods* **1977**, 14, 271–281; b) A.-S. Carlström, K. Liedén, I. Björk, *Thromb. Res.* **1977**, 11, 785.
- [101] a) W. W. Fish, Å. Danielson, K. Nordling, S. H. Miller, C. F. Lam, I. Björk, *Biochemistry* **1985**, 24, 1510–1517; b) I. Björk, Å. Danielson in *Proteinase Inhibitors* (Hrsg.: A. J. Barrett, G. Salvesen), Elsevier, Amsterdam, **1986**, S. 489.
- [102] M. Petitou, P. Duchaussoy, P.-A. Driguez, G. Jaurand, J.-P. Héroult, J.-C. Lormeau, C. A. A. van Boeckel, J.-M. Herbert, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 3186–3191; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 3009–3014.
- [103] J. Choay, M. Petitou, J. C. Lormeau, P. Sinaÿ, B. Casu, G. Gatti, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1983**, 116, 492–499.
- [104] L. Jin, J. P. Abrahams, R. Skinner, M. Petitou, R. N. Pike, R. W. Carrell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 14683–14688.
- [105] a) U. Desai, R. Swanson, S. C. Bock, I. Björk, S. T. Olson, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 18976–18984; b) B. Fan, I. V. Turko, P. G. W. Gettings, *Biochemistry* **1994**, 33, 14156–14161; c) V. Arocas, S. C. Bock, S. T. Olson, I. Björk, *Biochemistry* **1999**, 38, 10196–10204.
- [106] U. Desai, M. Petitou, I. Björk, S. T. Olson, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 7478–7487.
- [107] J. M. Weiler, R. E. Edens, R. J. Linhardt, D. P. Kapelanski, *J. Immunol.* **1992**, 148, 3210–3215.
- [108] R. E. Edens, J. M. Weiler, R. J. Linhardt, *Complement Profiles* **1993**, 1, 96–120.
- [109] O. D. Ratnoff, I. H. Lepow, *J. Exp. Med.* **1957**, 106, 327–343.
- [110] a) R. Rent, R. Myhrman, B. A. Fiedel, H. Gewurz, *Clin. Exp. Immunol.* **1976**, 23, 264; b) K. Nagaki, S. Inai, *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **1976**, 50, 172–180.
- [111] G. C. Calabrese, M. M. Recondo, M. E. Fernandez de Recondo, E. F. Recondo, *Cell Mol. Biol.* **1997**, 43, 237–242.
- [112] R. E. Edens, R. J. Linhardt, C. S. Bell, J. M. Weiler, *Immunopharmacology* **1994**, 27, 145–153.
- [113] S. T. Isaacs, G. J. Kotwal, B. Moss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 628.
- [114] D. Reynolds, K. Keeling, R. Molestina, R. Srisatajlu, J. H. Butterfield, W. Ehringer, D. E. Justus, G. J. Kotwal in *Advances in Animal Virology* (vorgetragen anlässlich des 2nd ICGB-UCI Virology Symposium, New Delhi, November 1998, Hrsg.: S. Jameel, L. Villarreal), Science Publishers, Enfield, **2000**, S. 337–342.
- [115] K. H. M. Murthy, S. A. Smith, V. K. Ganesh, K. W. Judge, N. Mullin, P. N. Barlow, C. M. Ogata, G. J. Kotwal, *Cell* **2001**, 104, 301–311.
- [116] T. Nishimura, Y. Nakatake, M. Konishi, N. Itoh, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, 1492, 203–206.
- [117] D. M. Ornitz, *BioEssays* **2000**, 22, 108–112.
- [118] M. Kan, F. Wang, J. Xu, J. W. Crabb, J. Hou, W. L. McKeehan, *Science* **1993**, 259, 1918–1921.
- [119] M. Fannon, K. E. Forsten, M. A. Nugent, *Biochemistry* **2000**, 39, 1434–1445.
- [120] J. Schlessinger, A. N. Plotnikov, O. A. Ibrahimi, A. V. Eliseenkova, B. K. Yeh, A. Yayon, R. J. Linhardt, M. Mohammadi, *Mol. Cell* **2000**, 6, 743–750.
- [121] L. Pellegrini, D. F. Burke, F. von Delft, B. Mulloy, T. L. Blundell, *Nature* **2000**, 407, 1029–1034.
- [122] a) D. M. Ornitz, A. B. Herr, M. Nilsson, J. Westman, C. M. Svahn, G. Waksman, *Science* **1995**, 268, 432–436; b) F.-Y. Zhou, M. Kan, R. T. Owens, W. L. McKeehan, J. A. Thompson, R. J. Linhardt, M. Höök, *Eur. J. Cell Biol.* **1997**, 73, 71–80.
- [123] H. Gitay-Goren, S. Soker, I. Vladovsky, G. Neufeld, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 6093–6098.
- [124] a) F. Bussolino, M. F. DiRenzo, M. Ziche, E. Bocchietto, M. Olivero, L. Naldini, G. Guadino, L. Tamagnone, A. Coffey, P. M. Comoglio, *J. Cell Biol.* **1992**, 119, 629–641; b) D. Naka, T. Ishii, T. Shimomura, T. Hishida, H. Hara, *Exp. Cell Res.* **1993**, 209, 317–324.
- [125] a) M. A. Palladino, R. E. Morris, H. F. Starnes, A. D. Levinson, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1990**, 593, 181–187; b) T. A. McCaffrey, D. J. Falcone, B. Du, *J. Cell Physiol.* **1992**, 152, 430–440.
- [126] a) S. A. Thompson, S. Higashiyama, K. Wood, N. S. Pollitt, D. Damm, G. McEnroe, B. Garrick, N. Ashton, K. Lau, N. Hancock, M. Klagsbrun, J. A. Abraham, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 2541–2549; b) E. Feyzi, F. Lustig, G. Fager, D. Spillman, U. Lindahl, M. Salmivirta, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 5518–5524.
- [127] a) A. D. Luster, *N. Engl. J. Med.* **1998**, 338, 436–445; b) T. N. C. Wells, C. A. Power, A. E. I. Proudfoot, *Trends Pharmacol. Sci.* **1998**, 19, 376–380.
- [128] J. A. Belperio, M. P. Keane, D. A. Arenberg, C. L. Addison, J. E. Ehlert, M. D. Burdick, R. M. Strieter, *J. Leukocyte Biol.* **2000**, 68, 1–8.
- [129] T. Yoshimura, K. Matsushima, S. Tanaka, E. A. Robinson, E. Appella, J. J. Oppenheim, E. J. Leonard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, 84, 9233–9237.
- [130] D. Rossi, A. Zlotnik, *Annu. Rev. Immunol.* **2000**, 18, 217–242.
- [131] A. Müller, B. Homey, H. Soto, N. Ge, D. Catron, M. E. Buchanan, T. McClanahan, E. Murphy, W. Yuan, S. M. Wagner, J. L. Barrera, A. Mohar, E. Verástegui, A. Zlotnik, *Nature* **2001**, 410, 50–56.
- [132] Y. Huang, W. A. Paxton, S. M. Wolinsky, A. U. Neumann, L. Zhang, T. He, S. Kang, D. Ceradini, Z. Jin, K. Yazdanbakhsh, K. Kunstman, D. Erickson, E. Dragon, N. R. Landau, J. Phair, D. Ho, R. A. Koup, *Nat. Med.* **1996**, 2, 1240.
- [133] a) D. P. Witt, A. D. Lander, *Curr. Biol.* **1994**, 4, 394–400; b) J. Middleton, S. Neil, J. Wintle, J. Clark-Lewis, H. Moore, C. Lam, M. Auer, E. Hub, A. Rot, *Cell* **1997**, 91, 385–395.
- [134] A. J. Hoogewerf, G. S. V. Kuschert, A. E. I. Proudfoot, F. Borlat, I. Clark-Lewis, C. A. Power, T. N. C. Wells, *Biochemistry* **1997**, 36, 13570–13578.
- [135] a) K. Ibel, G. A. Poland, J. P. Baldwin, D. S. Pepper, M. Luscombe, J. J. Holbrooke, *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, 870, 58–63; b) S. E. Marshall, M. Luscombe, D. S. Pepper, J. J. Holbrooke, *Biochim. Biophys. Acta* **1984**, 797, 34.
- [136] D. Mikhailov, H. C. Young, R. J. Linhardt, K. H. Mayo, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 25317–25329.
- [137] S. E. Stringer, J. T. Gallagher, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 20508–20514.
- [138] a) J. A. Stuckey, R. St. Charles, B. F. P. Edwards, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **1992**, 14, 277–287; b) L. M. C. Hill, M. U. Ehrenguber, I. Clarke-Lewis, M. Baggiolini, A. Rot, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 7158–7162.
- [139] D. Spillmann, D. Witt, U. Lindahl, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 15487–15493.
- [140] a) C. C. Bleul, R. C. Fuhlbrigge, J. M. Casasnovas, A. Aiuti, T. A. Springer, *J. Exp. Med.* **1996**, 184, 1101–1109; b) E. Oberlin, A. Amara, F. Bachelier, C. Bessia, J. L. Virelizier, F. Arenzana-Seisdedos, O. Schwartz, J. M. Heard, I. Clarke-Lewis, D. F. Legler, M. Loetscher, M. Baggiolini, B. Moser, *Nature* **1996**, 382, 833–835.
- [141] E. Mbemba, J. C. Gluckman, L. Gattegno, *Glycobiology* **2000**, 10, 21–29.
- [142] A. Amara, O. Lorthioir, A. Valenzuela, A. Magerus, M. Thelen, M. Montes, J. L. Virelizier, M. Delepierre, F. Baleux, H. Lortat-Jacob, F. Arenzana-Seisdedos, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 23916–23925.
- [143] R. Sadr, F. Baleux, A. Grosdidier, A. Imbert, H. Lortat-Jacob, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 8288–8296.
- [144] A. E. I. Proudfoot, S. Fritchley, F. Borlat, J. P. Shaw, F. Vibois, C. Zwahlen, A. Trkola, P. R. Clapham, T. N. C. Wells, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 10620–10626.
- [145] G. S. V. Kuschert, F. Coulin, C. A. Power, A. E. I. Proudfoot, R. E. Hubbard, A. J. Hoogewerf, T. N. C. Wells, *Biochemistry* **1999**, 38, 12959–12968.
- [146] S. Ali, A. C. V. Palmer, B. Banerjee, S. J. Fritchley, J. A. Kirby, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 11721–11727.
- [147] D. M. Hoover, L. S. Mizoue, T. M. Handel, J. Lubkowski, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 23187–23193.
- [148] J. Benz, A. Hofmann, *Biol. Chem.* **1997**, 378, 177–184.
- [149] a) B. A. Seaton, J. R. Dedman, *Biometals* **1998**, 11, 399–404; b) V. Gerke, S. E. Moss, *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, 1357, 129–154.
- [150] a) T. J. Yeatman, T. V. Updyke, M. A. Kaetzel, J. R. Dedman, G. L. Nicolson, *Clin. Exp. Metastasis* **1993**, 11, 37–44; b) K. Kimata, T. Shinomura, S. Asano, K. Ito, M. Ujita, M. Zako, *Glycoconjugate J.* **1995**, 12, 481.
- [151] G. Kassam, A. Manro, C. E. Braat, P. Louie, S. L. Fitzpatrick, D. M. Waisman, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 15093–15100.
- [152] H. Hamazaki, *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 1456–1460.
- [153] K. E. Norgard-Sumnicht, N. M. Varki, A. Varki, *Science* **1993**, 261, 480–483.

- [154] R. Ishitsuka, K. Kojima, H. Utsumi, H. Ogawa, I. Matsumoto, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 9935–9941.
- [155] a) R. T. Huang, B. Lichtenberg, O. Rick, *FEBS Lett.* **1996**, 392, 59–62; b) S. DeMeyer, Z. J. Gong, W. Suwandhi, J. van Pelt, A. Soumillon, S. H. Yap, *J. Viral Hepatitis* **1997**, 4, 145–153.
- [156] J. H. Rand, X. X. Wu, H. A. Andree, C. J. Lockwood, S. Guller, J. Scher, P. C. Harpel, *New. Engl. J. Med.* **1997**, 337, 154–160.
- [157] I. Capila, M. J. Hernáiz, Y. D. Mo, T. R. Mealy, B. Campos, J. R. Dedman, R. J. Linhardt, B. A. Seaton, *Structure* **2001**, 9, 57–64.
- [158] K. H. Weisgraber, R. W. Mahley, *FASEB J.* **1996**, 10, 1485–1494.
- [159] a) J. Davignon, J. S. Cohn, L. Mabile, L. Bernier, *Clin. Chim. Acta* **1999**, 286, 115–143; b) G. Luc, J.-M. Bard, D. Arveiler, A. Evans, J.-P. Cambou, A. Bingham, P. Amouyel, P. Schaffer, J.-B. Ruidavets, F. Cambien, J.-C. Fruchart, P. Ducimetiere, *Arterioscler. Thromb.* **1994**, 14, 1412–1419.
- [160] a) W. J. Strittmatter, A. M. Saunders, D. Schmechel, M. Pericak-Vance, J. Englund, G. S. Salvesen, A. D. Roses, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 1977–1981; b) E. H. Corder, A. M. Saunders, N. J. Risch, W. J. Strittmatter, D. E. Schmechel, P. C. Gaskell, Jr., J. B. Rimmer, P. A. Locke, P. M. Conneally, K. E. Schmechel, G. W. Small, A. D. Roses, J. L. Haines, M. A. Pericak-Vance, *Nat. Genet.* **1994**, 7, 180–184.
- [161] R. W. Mahley, *Science* **1988**, 240, 622–630.
- [162] R. W. Mahley, Z.-S. Ji, *J. Lipid Res.* **1999**, 40, 1–16.
- [163] A. D. Cardin, N. Hirose, D. T. Blankenship, R. L. Jackson, J. A. K. Harmony, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1986**, 134, 783–789.
- [164] K. H. Weisgraber, S. C. Rall, Jr., R. W. Mahley, R. W. Milne, Y. L. Marcel, J. T. Sparrow, *J. Biol. Chem.* **1986**, 261, 2068–2076.
- [165] V. V. Shuvaev, I. Laffont, G. Siest, *FEBS Lett.* **1999**, 459, 353–357.
- [166] J. Dong, C. A. Peters-Libeu, K. H. Weisgraber, B. W. Segelke, B. Rupp, I. Capila, M. J. Hernáiz, L. A. LeBrun, R. J. Linhardt, *Biochemistry* **2001**, 40, 2826–2834.
- [167] K. L. Tyler, B. N. Fields in *Fields Virology* (Hrsg.: B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley), Lippincott-Raven, Philadelphia, **1996**, S. 173–217.
- [168] a) C. C. Rider, *Glycoconjugate J.* **1997**, 14, 639–642; b) D. S. Newburg, R. J. Linhardt, S. A. Ampofo, R. H. Yolken, *J. Nutr.* **1995**, 125, 419–424.
- [169] Q. J. Sattentau, R. A. Weiss, *Cell* **1988**, 52, 631–632.
- [170] R. A. Sweet, A. Truneh, W. A. Hendrickson, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1991**, 2, 622–633.
- [171] a) A. Trkola, T. Dragic, J. Arthos, J. M. Binley, W. C. Olson, G. P. Allaway, C. Cheng-Mayer, J. Robinson, P. J. Maddon, J. P. Moore, *Nature* **1996**, 384, 184–187; b) L. Wu, N. P. Gerard, R. Wyatt, H. Choe, C. Parolin, N. Ruffing, A. Borsetti, A. A. Cardoso, E. Desjardin, W. Newman, C. Gerard, J. Sodroski, *Nature* **1996**, 384, 179–183.
- [172] J. P. Moore, B. A. Jameson, R. A. Weiss, Q. J. Sattentau in *The HIV-Cell Fusion Reaction* (Hrsg.: J. Bentz), CRC, Boca Raton, **1993**, S. 233–291.
- [173] a) H. A. Harrop, D. R. Coombe, C. C. Rider, *AIDS* **1994**, 8, 183; b) L. N. Callahan, M. Phelan, M. Mallinson, M. A. Norcross, *J. Virol.* **1991**, 65, 1543; c) D. Batinic, F. A. Robey, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 6664–6671.
- [174] P. L. Nara, R. R. Garrity, J. Goudsmit, *FASEB J.* **1991**, 5, 2437–2455.
- [175] C. C. Rider, D. R. Coombe, H. A. Harrop, E. F. Hounsell, C. Bauer, J. Feeney, B. Mulloy, N. Mahmood, A. Hay, C. R. Parish, *Biochemistry* **1994**, 33, 6974–6980.
- [176] I. Mondor, S. Ugolini, Q. J. Sattentau, *J. Virol.* **1998**, 72, 3623–3634.
- [177] A. C. S. Saphire, M. D. Bobardt, P. A. Gallay, *EMBO J.* **1999**, 18, 6771–6785.
- [178] a) E. K. Franke, H. E. H. Yuan, J. Luban, *Nature* **1994**, 372, 359–362; b) M. Thali, A. Bukovsky, E. Kondo, B. Rosenwirth, C. T. Walsh, J. Sodroski, H. G. Göttinger, *Nature* **1994**, 372, 363–365.
- [179] B. Ensoli, L. Buonaguro, G. Barillari, V. Fiorelli, R. Gendelman, R. A. Morgan, P. Wingfield, R. C. Gallo, *J. Virol.* **1993**, 67, 277–287.
- [180] a) M. Rusnati, D. Coltrini, P. Oreste, G. Zoppetti, A. Albini, D. Noonan, F. d'Adda di Fagnana, M. Giacca, M. Presta, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 11313–11320; b) H. C. Chang, F. Samaniego, B. C. Nair, L. Buonaguro, B. Ensoli, *AIDS* **1997**, 11, 1421–1431.
- [181] M. Rusnati, G. Tulipano, D. Spillman, E. Tanghetti, P. Oreste, G. Zoppetti, M. Giacca, M. Presta, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 28198–28205.
- [182] D. WuDunn, P. G. Spear, *J. Virol.* **1989**, 263, 52–58.
- [183] a) B. C. Herold, R. J. Visalli, N. Susmarski, C. R. Brandt, P. G. Spear, *J. Gen. Virol.* **1994**, 75, 1211–1222; b) B. C. Herold, S. I. Gerber, T. Polonsky, B. J. Belval, P. N. Shaklee, K. Holme, *Virology* **1995**, 206, 1108–1116.
- [184] P. G. Spear, M. T. Shieh, B. C. Herold, D. WuDunn, T. I. Koshy, *Adv. Exp. Med. Biol.* **1992**, 313, 341–353.
- [185] a) E. Trybala, J. A. Liljeqvist, B. Svennerholm, T. Bergstrom, *J. Virol.* **2000**, 74, 9106–9114; b) B. C. Herold, S. I. Gerber, B. J. Belval, A. M. Siston, N. Shulman, *J. Virol.* **1996**, 70, 3461–3469.
- [186] R. K. Williams, S. E. Straus, *J. Virol.* **1997**, 71, 1375–1380.
- [187] Y. Chen, T. Maguire, R. E. Hileman, J. R. Fromm, J. D. Esko, R. J. Linhardt, R. M. Marks, *Nat. Med.* **1997**, 3, 866–871.
- [188] R. M. Marks, H. Lu, R. Sundaresan, T. Toida, A. Suzuki, T. Imanari, M. J. Hernáiz, R. J. Linhardt, *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 2178–2187.
- [189] T. Krusat, H. J. Streckert, *Arch. Virol.* **1997**, 142, 1247–1254.
- [190] T. Compton, D. M. Nowlin, N. R. Cooper, *Virology* **1993**, 193, 834–841.
- [191] C. Summerford, R. J. Samulski, *J. Virol.* **1998**, 72, 1438–1445.
- [192] T. Jackson, F. M. Ellard, R. A. Ghazaleh, S. M. Brookes, W. E. Blakemore, A. H. Corteyn, D. I. Stuart, J. W. I. Newman, A. M. Q. King, *J. Virol.* **1996**, 70, 5282.
- [193] M. Lyon, J. A. Deakin, J. T. Gallagher, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 11208–11215.
- [194] a) C. Cerami, U. Frevert, P. Sinnis, B. Takacs, P. Clavijo, M. J. Santos, V. Nussenzweig, *Cell* **1992**, 70, 1021–1033; b) U. Frevert, P. Sinnis, C. Cerami, W. Shreffler, B. Takacs, V. Nussenzweig, *J. Exp. Med.* **1993**, 177, 1287–1298.
- [195] D. Rathore, T. F. McCutchan, D. N. Garboczi, M. J. Hernáiz, L. A. LeBrun, S. C. Lang, R. J. Linhardt, *Biochemistry* **2001**, 40, 11518–11524.
- [196] S. J. Pancake, G. D. Holt, S. Mellouk, S. L. Hoffman, *J. Cell Biol.* **1992**, 117, 1351–1357.
- [197] D. Rathore, T. F. McCutchan, *Mol. Biochem. Parasitol.* **2000**, 108, 253–256.
- [198] P. Sinnis, T. E. Willnow, M. R. Briones, J. Herz, V. Nussenzweig, *J. Exp. Med.* **1996**, 184, 945–954.
- [199] T. D. Duensing, J. S. Wing, J. P. M. van Putten, *Infect. Immun.* **1999**, 67, 4463.
- [200] T. D. Duensing, J. P. M. van Putten, *Biochem. J.* **1998**, 334, 133–139.
- [201] a) T. Chen, R. J. Belland, J. Wilson, J. Swanson, *J. Exp. Med.* **1995**, 182, 511; b) J. P. M. van Putten, T. D. Duensing, R. L. Cole, *Mol. Microbiol.* **1998**, 29, 369.
- [202] R. P. McEver, *Curr. Opin. Immunol.* **1994**, 6, 75–84.
- [203] a) A. Varki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 7390–7397; b) T. F. Tedder, D. A. Steeber, A. Chen, P. Engel, *FASEB J.* **1995**, 9, 866–873.
- [204] a) T. Matsusako, H. Muramatsu, T. Shirahama, T. Muramatsu, Y. Ohi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, 181, 1218–1222; b) A. Aruffo, M. T. Dietsch, H. Wan, K. E. Hellström, I. Hellström, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 2292.
- [205] R. M. Nelson, O. Cecconi, W. G. Roberts, A. Aruffo, R. J. Linhardt, M. P. Bevilacqua, *Blood* **1993**, 82, 3253–3258.
- [206] A. Koenig, K. E. Norgard-Sumnicht, R. J. Linhardt, A. Varki, *J. Clin. Invest.* **1998**, 101, 877–889.
- [207] K. E. Norgard-Sumnicht, A. Varki, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 12012–12024.
- [208] a) H. Rauvala, *EMBO J.* **1989**, 8, 2933–2941; b) M. D. Kuo, Y. Oda, J. S. Huang, S. S. Huang, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 18749–18752; c) E. Raulo, I. Julkunen, J. Merenmies, R. Pihlaskari, H. Rauvala, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 11408–11416.
- [209] E. Raulo, M. A. Chernousov, D. J. Carey, R. Nolo, H. Rauvala, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 12999–13004.
- [210] T. Kinnunen, E. Raulo, R. Nolo, M. Maccarana, U. Lindahl, H. Rauvala, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 2243–2248.
- [211] I. Kilpeläinen, M. Kaksonen, T. Kinnunen, E. Raulo, H. Avikainen, M. Fath, H. Rauvala, R. J. Linhardt, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 13564–13570.
- [212] a) L. Buee, W. Ding, A. Delacourte, H. Fillit, *Brain Res.* **1993**, 601, 154–163; b) A. D. Snow, J. Willmer, R. Kisilevsky, *Lab. Invest.* **1987**, 56, 120–123.

- [213] a) F. Coria, E. Castaño, F. Prelli, M. Larrondo-Lillo, S. van Duinen, M. L. Shelanski, B. Frangione, *Lab. Invest.* **1988**, 58, 454–457; b) R. N. Kalaria, P. G. Galloway, G. Perry, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **1991**, 17, 189–201.
- [214] B. Danielsen, I. J. Sorensen, M. Nybo, E. H. Nielsen, B. Kaplan, S. E. Svehag, *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, 1339, 73–78.
- [215] N. H. H. Heegaard, P. M. H. Heegaard, P. Roepstorff, F. A. Robey, *Eur. J. Biochem.* **1996**, 239, 850–856.
- [216] N. H. H. Heegaard, *Electrophoresis* **1998**, 19, 442–447.
- [217] R. Kisilevsky, L. J. Lemieux, P. E. Fraser, X. Kong, P. G. Hultin, W. A. Szarek, *Nat. Med.* **1995**, 1, 143–148.
- [218] K. C. Chadha, A. L. Kazim, R. Parthasarathy, E. Sulkowski, T. B. Tomasi, *BioChromatography* **1997**, 2, 211–223.
- [219] R. Godavarti, R. Sasisekharan, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, 229, 770.
- [220] a) R. Sasisekharan, M. Bulmer, K. W. Moremen, C. L. Cooney, R. Langer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 3660–3664; b) S. E. Ernst, G. Venkataraman, S. Winkler, R. Godavarti, R. Langer, C. L. Cooney, R. Sasisekharan, *Biochem. J.* **1996**, 315, 589–597.
- [221] R. Godavarti, M. Davis, G. Venkataraman, C. L. Cooney, R. Langer, R. Sasisekharan, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, 225, 751–758.
- [222] R. Godavarti, C. L. Cooney, R. Langer, R. Sasisekharan, *Biochemistry* **1996**, 35, 6846–6852.
- [223] R. Godavarti, R. Sasisekharan, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 248–255.
- [224] A. J. Rhomberg, Z. Shriver, K. Biemann, R. Sasisekharan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 12232–12237.
- [225] a) Z. Shriver, Y. Hu, R. Sasisekharan, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 10160–10167; b) Z. Shriver, Y. Hu, K. Pojasek, R. Sasisekharan, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 22904–22912.
- [226] H. Su, F. Blain, R. A. Musil, J. J. Zimmerman, K. Gu, D. C. Bennett, *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, 62, 2723–2734.
- [227] K. Pojasek, Z. Shriver, Y. Hu, R. Sasisekharan, *Biochemistry* **2000**, 39, 4012–4019.
- [228] L. Tejedor, D. Oman, J. Zimmerman, A. Russo, M. Rose, L. Borzhenskaya, H. Pelzer, *Thromb. Haemostasis* **1993**, 69, 866.
- [229] R. S. Langer, R. J. Linhardt, C. L. Cooney, G. Fitzgerald, A. Grant, *Heparinase Derived Anticoagulants*, US Pat. 4396762, **1983**.
- [230] a) Z. Shriver, M. Sundaraman, G. Venkataraman, J. Fareed, R. J. Linhardt, K. Biemann, R. Sasisekharan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 10365–10370; b) G. Yu, L. A. LeBrun, N. S. Gunay, D. Hoppensteadt, J. Walenga, J. Fareed, R. J. Linhardt, *Thromb. Res.* **2000**, 100, 549–556.
- [231] R. Sasisekharan, M. A. Moses, M. A. Nugent, C. L. Cooney, R. Langer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 1524–1528.
- [232] B. T. Kim, W. S. Kim, Y. S. Kim, R. J. Linhardt, D. H. Kim, *J. Biochem. (Tokyo)* **2000**, 128, 323–328.
- [233] H. Engelberg, *Clin. Appl. Thromb./Hemostasis* **1995**, 1, 283–285.
- [234] M. Toyoshima, M. Nakajima, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 24153–24160.
- [235] a) M. Nakajima, T. Irimura, G. L. Nicolson, *Cancer Lett.* **1986**, 31, 277–283; b) C. Freeman, C. R. Parish, *Biochem. J.* **1997**, 325, 229–237; c) L. A. Dempsey, G. J. Brunn, J. L. Platt, *Trends Biochem. Sci.* **2000**, 25, 349–351.
- [236] M. Nakajima, T. Irimura, D. DiFerrante, N. DiFerrante, G. L. Nicolson, *Science* **1983**, 220, 661.
- [237] a) X. Bai, K. J. Bame, H. Habuchi, K. Kimata, J. D. Esko, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 23172–23179; b) D. S. Pikas, J.-P. Li, I. Vlodavsky, U. Lindahl, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 18770–18777.
- [238] a) N. R. Bijsterveld, R. J. K. Hettiarachchi, R. Peters, M. H. Prins, M. Levi, H. R. Büller, *Thromb. Haemostasis* **1999**, 82, 139–147, Supplement 2; b) R. J. Hettiarachchi, S. M. Smorenburg, J. Ginsberg, M. Levine, M. H. Prins, H. R. Büller, *Thromb. Haemostasis* **1999**, 82, 947–952.
- [239] S. M. Smorenburg, C. J. F. van Noorden, *Pharmacol. Rev.* **2001**, 53, 93–105.
- [240] L. Borsig, R. Wong, J. Feramisco, D. R. Nadeau, N. M. Varki, A. Varki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 3352–3357.
- [241] J. Calaycay, H. Pande, T. Lee, L. Borsi, A. Siri, J. E. Shively, L. Zardi, *J. Biol. Chem.* **1985**, 260, 12136–12141.