

**Die Inhibition der Tumorzell-induzierten  
Thrombozytenaktivierung durch Heparine und  
synthetische Heparin-Mimetika zur Beeinflussung der  
antitumoralen Immunantwort**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)  
der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von  
**Lukas Maria Gockel**  
aus  
Köln

Bonn, Mai 2022



Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Gutachter: Prof. Dr. Gerd Bendas

Gutachter: PD Dr. Martin Schlesinger

Tag der Promotion: 12.08.2022

Erscheinungsjahr: 2022



*I would rather die of passion than boredom*

Vincent van Gogh



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2 Theorie</b>	<b>3</b>
2.1 Der Prozess der hämatogenen Metastasierung im Überblick . . . . .	3
2.2 Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung während der hämatogenen Metastasierung . . . . .	7
2.2.1 Thrombozytenaktivierung durch lösliche Mediatoren . . . . .	7
2.2.2 Thrombozytenaktivierung durch den direkten Zellkontakt . . . . .	10
2.3 Adhäsionsmoleküle in der hämatogenen Metastasierung . . . . .	13
2.3.1 P-Selectin . . . . .	13
2.3.2 E-Selectin . . . . .	15
2.3.3 Very Late Antigen-4 und Vascular Cell Adhesion Molecule 1 . . . . .	16
2.4 Die Rolle des Immunsystems in der Progression maligner Erkrankungen . .	17
2.4.1 CD4 <sup>+</sup> T-Zellen als Schlüsselfiguren der antitumoralen Immunität .	18
2.4.2 CD8 <sup>+</sup> T-Zellen als Schlüsselfiguren der antitumoralen Immunität .	23
2.4.3 Natürliche Killerzellen als Schlüsselfiguren der antitumoralen Im- munität . . . . .	24
2.5 Die tumorale Immunevasion . . . . .	27
2.5.1 Mechanismen der tumoralen Immunevasion im Überblick . . . . .	27
2.5.2 Der Beitrag der Thrombozyten zur tumoralen Immunevasion . . . . .	29
2.6 Thrombozyten als Akteure im Immunsystem . . . . .	31
2.6.1 Intrinsische Immunkompetenz . . . . .	31
2.6.2 Modulation immunkompetenter Zellen durch Thrombozyten . . . . .	32
2.7 Antikoagulantien . . . . .	34
2.7.1 Antikoagulantien in der onkologischen Therapie . . . . .	35
2.7.2 Antimetastatische Effekte des Heparins . . . . .	37
2.7.3 Nachteile des natürlichen Heparins . . . . .	41
2.7.4 Heparin-Mimetika . . . . .	43
<b>3 Ziel der Arbeit</b>	<b>46</b>
<b>4 Material und Methoden</b>	<b>48</b>
4.1 Material . . . . .	48
4.1.1 Chemikalien und Reagenzien . . . . .	48
4.1.2 Puffer und Lösungen . . . . .	53

4.1.3	Antikörper . . . . .	56
4.1.4	Antikoagulantien und Heparin-Mimetika . . . . .	56
4.1.5	Verbrauchsmaterialien . . . . .	57
4.1.6	Geräte und Instrumente . . . . .	60
4.1.7	Software . . . . .	63
4.2	Zellkultur . . . . .	65
4.2.1	Inkulturnahme . . . . .	65
4.2.2	Kryokonservierung . . . . .	65
4.2.3	Zellzahlbestimmung . . . . .	65
4.2.4	Allgemeine Subkultivierung . . . . .	66
4.2.5	Zelllinien . . . . .	66
4.2.5.1	MDA-MB-231 . . . . .	66
4.2.5.2	MV3 . . . . .	67
4.2.5.3	EA.hy926 . . . . .	67
4.2.5.4	K562 . . . . .	68
4.2.5.5	PBMC/CD4 <sup>+</sup> T-Zellen/CD8 <sup>+</sup> T-Zellen . . . . .	68
4.3	Zellisolation . . . . .	68
4.3.1	Thrombozyten . . . . .	68
4.3.2	Peripheral Blood Mononuclear Cells . . . . .	69
4.3.3	CD4 <sup>+</sup> T-Zellen und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen . . . . .	69
4.4	Herstellung der Thrombozyten-Suspension und der Thrombozyten-Releasates	70
4.5	Thrombingenerierungs-Assay . . . . .	71
4.6	Lichttransmissionsaggregometrie . . . . .	73
4.7	ATP Freisetzungs-Assay . . . . .	74
4.8	Olink Proximity Extension-Assay . . . . .	75
4.9	Surface Acoustic Wave Biosensorik . . . . .	76
4.9.1	Reinigung der Biosensor Quarze . . . . .	76
4.9.2	Beschichtung der Biosensor Quarze mit einer Modellmembran . . . . .	77
4.9.3	Immobilisierung eines Proteins an der Modellmembran . . . . .	79
4.9.4	Vermessung der Testsubstanzen . . . . .	80
4.9.5	Auswertung der Bindungskinetik . . . . .	81
4.10	VLA-4/VCAM-1 Adhäsions-Assay . . . . .	83
4.10.1	Apparaturaufbau . . . . .	83
4.10.2	Reinigung und Beschichtung der Glasplättchen . . . . .	84
4.10.3	Durchführung der Messung . . . . .	85
4.11	Artifizieller Endothel Adhäsions-Assay . . . . .	86
4.12	IL-10 ELISA . . . . .	87

4.13	Durchflusszytometrie . . . . .	88
4.13.1	Differenzierung regulatorischer T-Zellen . . . . .	90
4.13.2	CD8 <sup>+</sup> T-Zell Aktivierungsstatus . . . . .	92
4.13.3	NK-Zell Zytotoxizität . . . . .	93
4.14	Multiplex Protein Analyse . . . . .	95
4.15	Zellviabilitätsanalyse . . . . .	96
4.16	Statistik . . . . .	97
<b>5</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>98</b>
5.1	Antikoagulatorischer Einfluss Heparin-mimetischer Polymere auf die Tumorzell/Thrombozyten Interaktion . . . . .	98
5.1.1	Inhibition der Tumorzell-induzierten Thrombinbildung . . . . .	101
5.1.2	Inhibition der Tumorzell-vermittelten Thrombozytenaktivierung . . . . .	107
5.1.2.1	Blockade der Thrombozytenaggregation . . . . .	107
5.1.2.2	Bestimmung der ATP Freisetzung aus dichten Granula . . . . .	108
5.1.2.3	Untersuchung der Freisetzung thrombozytärer $\alpha$ -Granula . . . . .	110
5.1.3	Zwischenfazit der antikoagulatorischen Eigenschaften . . . . .	113
5.2	Bindung und Blockade metastasierungsassoziiertes Adhäsionssysteme . . . . .	114
5.2.1	Bindungskinetiken an P-Selectin . . . . .	114
5.2.2	Bindungskinetiken an E-Selectin . . . . .	115
5.2.3	Bindungskinetiken an VLA-4 . . . . .	117
5.2.4	Einfluss der Heparin-Mimetika auf die Zellviabilität . . . . .	118
5.2.5	Blockade der VLA-4-vermittelten Tumorzellbindung an immobilisiertes VCAM-1 . . . . .	118
5.2.6	Inhibition der Tumorzellbindung am artifiziellen Endothel . . . . .	121
5.2.7	Blockade der prometastatischen Heparanase-Aktivität . . . . .	122
5.2.8	Zwischenfazit antiadhäsive Eigenschaften . . . . .	124
5.3	Immunmodulatorische Eigenschaften Tumorzell-induzierter Thrombozyten-Releasates und der Einfluss durch Heparine/Heparin-Mimetika . . . . .	125
5.3.1	Thrombozyten verstärkte Sekretion des immunsuppressiven IL-10 aus PBMCs . . . . .	125
5.3.2	Beeinflussung der CD4 <sup>+</sup> T-Zell Differenzierung zu regulatorischen T-Zellen . . . . .	127
5.3.3	Diametrale Effekte auf die Aktivität zytotoxischer CD8 <sup>+</sup> T-Zellen . . . . .	129
5.3.4	Beeinflussung der zytolytischen Kapazität natürlicher Killerzellen . . . . .	136
5.3.5	Zwischenfazit immunmodulierender Eigenschaften . . . . .	140
5.4	Bindung an PF4 als Surrogatparameter einer HIT-II-Gefahr . . . . .	141

<b>6 Zusammenfassung</b>	<b>143</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>178</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>179</b>
<b>Publikationsliste</b>	<b>180</b>
<b>Danksagung</b>	<b>182</b>
<b>Verfassererklärung</b>	<b>184</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Ausgenommen von diesem Verzeichnis sind alle Abkürzungen von Produktbezeichnungen sowie Rechtsformen. Als bekannt vorausgesetzt werden chemische Abkürzungen, griechische Zahlen, römische Ziffern und im internationalen Einheitensystem festgelegte Basisgrößen sowie Dezimalpräfixe. Die Darstellung englischer Begriffe erfolgt kursiv.

°	Grad
°C	Grad Celsius
% (V/V)	Volumenprozent
7-AAD	7-Aminoactinomycin D
AA	Acrylsäure
ACD	<i>Acid-Citrate-Dextrose</i>
ADAM	<i>a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein</i>
ADO	Adenosin
ADP	Adenosindiphosphat
A <sub>eq</sub>	Gleichgewichtsmesssignal
A <sub>res</sub>	residuales Messsignal
AMC	7-Amino-4-Methylcoumarin
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPS	Natrium-2-acrylamido-2-methyl-1-propansulfonat
APC	antigenpräsentierende Zelle
APTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
ASF	<i>African Swine Fever</i>
ATIII	Antithrombin III
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	<i>area under the curve</i>
BSA	bovines Serumalbumin
BSE	bovine spongiforme Enzephalopathie
c	Konzentration
c <sub>max</sub>	maximale Konzentration
c <sub>min</sub>	minimale Konzentration
CAM-DR	<i>cell adhesion mediated drug resistance</i>
CAR	chimärer Antigenrezeptor
CCL	<i>C-C motif chemokine ligand</i>
CCR	<i>C-C motif chemokine receptor</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CEACAM1	<i>carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1</i>

## Abkürzungsverzeichnis

---

CFSE	Carboxyfluorescein-Succinimidylester
CHDP	<i>cationic host defense peptides</i>
CLEC-2	<i>C-type lectin receptor 2</i>
CTI	<i>Corn Trypsin Inhibitor</i>
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocytes-associated protein 4</i>
CXCL	<i>C-X-C motif chemokine ligand</i>
CXCR	<i>C-X-C chemokine receptor</i>
Đ	Polydispersitätsindex
Da	Dalton
DAMP	<i>damage-associated molecular pattern</i>
DC	dendritische Zelle
DGS-NTA(Ni)	<i>1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-[(N-(5-amino-1-carboxypentyl)iminodiacetic acid)succinyl)] (nickel salt)</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOAK	direktes orales Antikoagulans
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
DPPC	1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DR	<i>death receptor</i>
DTT	Dithiothreitol
E	Effektorzellen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
EMT	Epithelial-Mesenchymale Transition
EPCR	endothelialer Protein C Rezeptor
ESL-1	E-Selectin Ligand-1
ETP	<i>endogenous thrombin potential</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FasL	Fas-Ligand
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
FMO	<i>fluorescence-minus-one</i>
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer

FSC	<i>Forward Scatter</i>
g	mittlere Erdbeschleunigung
g	Gramm
GARP	<i>glycoprotein A repetitions predominant</i>
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GNLY	Granulysin
GZMA	Granzym A
GZMB	Granzym B
GP	Glykoprotein
h	Stunde
HBD	<i>human <math>\beta</math>-defensins</i>
hemITAM	<i>hemi-immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
HIF-1	Hypoxie induzierter Faktor 1
HIT	Heparin-induzierte Thrombozytopenie
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
HMGB1	<i>high-mobility-group-protein B1</i>
HNP	<i>human neutrophil peptides</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase
HTRF	<i>homogenous time resolved fluorescence</i>
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
Hz	Hertz
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
ICI	Immuncheckpoint-Inhibitor
I.E.	internationale Einheit
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
IGF1R	<i>Insulin-like growth factor 1 receptor</i>
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IR	Insulinrezeptor
ITAC	<i>International Initiative on Thrombosis and Cancer</i>
$K_D$	Gleichgewichtsdissoziationskonstante
$k_{\text{diss}}$	Gleichgewichtsdissoziationskonstante (berechnet nach $k_{\text{obs}}$ )
$k_{\text{obs}}$	Kinetikkonstante pseudoerster Ordnung
$k_{\text{off}}$	Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante

## Abkürzungsverzeichnis

---

$k_{\text{on}}$	Assoziationsgeschwindigkeitskonstante
L	Liter
LAG-3	<i>Lymphocyte-activation gene 3</i>
LCMV	Lyphozytäres Choriomeningitis-Virus
LMWH	<i>Low-molecular-weight Heparin</i>
LTA	Lichttransmissionsaggregometrie
M	Molar
MCP	<i>Monocyte Chemoattractant Protein</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
N	Newton
NCCN	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>
NKG2	<i>killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 1</i>
NKp44	NK-Zell-Protein mit 44 Kilodalton
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
OVA	Ovalbumin
PAR	Protease-aktivierter Rezeptor
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PD-1	<i>programmed cell death protein 1</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PD-L1	<i>programmed cell death protein 1 ligand-1</i>
PDPN	Podolanin
PE	Phycoerythrin
PEA	<i>Proximity Extension Assay</i>
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PF4	Plättchenfaktor 4
PFA	Paraformaldehyd
PGE2	Prostaglandin E2
PI-9	Proteinase Inhibitor-9
Plts	Thrombozyten
PPi	anorganisches Pyrophosphat
PRP	Thrombozytenreiches-Plasma
PSGL-1	<i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i>
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RAFT	<i>reversible addition-fragmentation chain-transfer</i>
RANK	<i>receptor activator of NF-<math>\kappa</math>B</i>

RANKL	<i>receptor activator of NF-<math>\kappa</math>B ligand</i>
RCT	randomisierte klinische Studie
Rel.	Releasate
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
SAM	<i>self-assambled monolayer</i>
SAW	<i>surface acousitc wave</i>
SCR	<i>short consensus repeat</i>
shRNA	<i>small hairpin ribonucleic acid</i>
sLe	sialyl Lewis
SPA	Kalium-3-sulfopropylacrylat
SPM	Kalium-3-sulfopropylmethacrylat
SSC	<i>Side Scatter</i>
SSS	Natrium-4-styrensulfonat
Stim. Abs.	Stimulierende Antikörper
T	Target-Zellen
t	Zeit
TCIPA	<i>tumour cell-induced platelet a ggregation</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor
TCT	Thrombinzeit
TF	<i>tissue factor</i>
Tfh	follikuläre T-Helferzellen
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor beta</i>
Th	T-Helferzelle
TIL	tumorinfiltrierende T-Lymphozyten
TKZ	Thrombozytenkonzentrat
TLR	Toll-like Rezeptor
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNBC	<i>triple-negative breastcancer</i>
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TNFSF14	<i>tumor necrosis factor ligand superfamily member 14</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TRAP-6	<i>thrombin receptor activator peptide-6</i>
T <sub>reg</sub>	regulatorische T-Zellen
t <sub>stop</sub>	Injektionsendpunkt
TxA2	Thromboxan-A2

## Abkürzungsverzeichnis

---

UFH	Unfraktioniertes Heparin
V	Volumen
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth fFactor</i>
VEGFR1	<i>vacular endothelial growth factor Rezeptor 1</i>
VLA-4	<i>very late antigen-4</i>
VTE	venöse Thromboembolie
wt	Wildtyp

## 1 Einleitung

Mit der fortschreitenden medizinischen Entwicklung stehen kontinuierlich verbesserte Prophylaxe- und Therapiemöglichkeiten auf verschiedenen medizinischen Gebieten, wie etwa bei den kardiovaskulären Erkrankungen zur Verfügung. Durch innovative Therapien, verbesserte Früherkennungsangebote und das gesteigerte Bewusstsein in der Bevölkerung können auch Erfolge im sogenannten „*War on Cancer*“ verzeichnet werden. Dennoch ist das Krankheitsbild der malignen Neoplasien auf dem Vormarsch. Mit etwa 10 Millionen Krebstoten jährlich stellen sie weltweit eine der häufigsten vorzeitigen Todesursachen dar. Speziell in den hochentwickelten Nationen Europas und Amerikas haben maligne Neoplasien die kardiovaskulären Ereignisse überholt und sich in 57 Ländern am ersten Platz der Todesstatistiken positioniert [1–3]. Eng mit dem letalen Ausgang einer Krebserkrankung verwoben ist die Ausbildung von Metastasen. Diese kann mit etwa 60 % der krebsbedingten Todesfälle assoziiert werden [4]. Dennoch gibt es bis heute keine effektive Therapie, welche gegen die Bildung metastatischer Herde gerichtet ist.

Im Zuge der hämatogenen Metastasierung wandern disseminierende Tumorzellen in die Blutgefäße ein und treten in Wechselwirkung mit einer Vielzahl zellulärer und löslicher Komponenten des Blutes. Dies bildet die Basis für die Entwicklung eines thromboembolischen Ereignisses, einer weiteren Komplikation im Verlauf einer Krebserkrankung. Das bis zu 9-fach erhöhte Auftreten venöser Thromboembolien im Zusammenhang mit malignen Tumoren stellt eine ernstzunehmende pathologische Situation dar, welche auch entscheidend für die Mortalität verantwortlich ist. So ist die 1-Jahres-Überlebensrate dieser Patienten auf ein Drittel der Vergleichspopulation reduziert [5, 6]. Folglich erhalten viele onkologische Patienten auf Grundlage der aktuellen Leitlinien eine Thromboseprophylaxe mit Antikoagulantien. Speziell die niedermolekularen Heparine haben hier eine feste Stellung und werden zur Prophylaxe bei krebserkrankten Patienten empfohlen [7, 8].

Unabhängig von der antithrombotischen Wirkung konnte in manchen klinischen Studien, unter einer Heparin-Prophylaxe, ein positiver Effekt auf das Gesamtüberleben der Patienten mit besserer Prognose bei Studienantritt beobachtet werden [9, 10]. Nicht zuletzt als Konsequenz dieser Beobachtungen wurden eine Reihe verschiedener Effekte beschrieben und untersucht, welche zu einer potentiell antimetastatischen Wirkung der Heparine beitragen können. Wichtige Interferenzpunkte stellen hier die Blockade der Zelladhäsion und die Hemmung der Thrombozytenaktivierung dar, welche durch vielfältige Mechanismen die Etablierung einer Metastase unterstützen können [11].

Trotz des langjährigen Einsatzes und seiner etablierten Stellung in der Medizin ist die Gewinnung des Heparins aus den natürlichen Quellen mit einer Reihe verschiedener Nachteile behaftet. Dazu gehören unter anderem pharmakokinetische Variabilitäten, die Gefahr von Kontaminationen und die limitierte Verfügbarkeit des Rohmaterials. Das Ziel, diese Nach-

teile zu überkommen und die mannigfaltigen Wirkungen des Heparins zu optimieren, stellt die rationale Grundlage für die Entwicklung synthetischer bzw. semi-synthetischer Heparin-Mimetika dar. Dieser Ansatz wurde auch durch die Arbeitsgruppe von Prof. Vito Ferro an der University of Queensland verfolgt. Mittels eines Polymerisationsverfahrens synthetisierten sie verschiedene nicht-Kohlenhydrat-basierte Heparin-Mimetika.

Die vorliegende Arbeit soll mit Hilfe der Heparin-mimetischen Polymere einen Beitrag zum Verständnis der antimetastatischen Effekte des Heparins leisten und eine erste Evaluation der Vor- bzw. Nachteile der Heparin-Mimetika im metastasierungsrelevanten Kontext bieten. Beim Vergleich der Heparin-Mimetika mit den kommerziellen Antikoagulantien Heparin, Enoxaparin und Fondaparinux wird unter anderem die Hemmung der Tumorzell-adhäsion betrachtet. Ein besonderer Fokus liegt jedoch auf dem aktivierenden Wechselspiel zwischen Tumorzellen und Thrombozyten sowie den daraus erwachsenden Konsequenzen für die antitumorale Immunantwort. So wird mit verschiedenen Testsystemen das Potential der untersuchten Substanzen bestimmt, in die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung einzugreifen. Weiterhin wird die funktionelle Konsequenz dieser Interferenz mit Blick auf die Modulation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen, CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie natürlicher Killerzellen evaluiert.

## 2 Theorie

### 2.1 Der Prozess der hämatogenen Metastasierung im Überblick

Der Begriff der Metastasierung beschreibt die Bildung eines sekundären Tumorherdes, welcher unter komplexen Bedingungen als Folge einer Dissemination entarteter Zellen des primären Tumors in entfernten Organen und Geweben entstehen kann. Dabei bedienen sich die metastasierenden Tumorzellen der weitverzweigten Gefäße der Lymphe und des Blutsystems. Im Falle einer blutgetragenen Dissemination bezeichnet man dies als hämatogene Metastasierung, welche in Form einer Kaskade verläuft. Deren einzelne Schritte wie die Vaskularisation, das Ablösen metastasierender Zellen aus dem soliden Primärverband, die Migration und Intravasation, sowie die Passage durch den Blutstrom mit anschließendem Arrest und der Etablierung eines sekundären Tumorherdes sollen in diesem Kapitel beleuchtet werden (vgl. Abbildung 1).

Zu Beginn der metastatischen Kaskade steht die Vaskularisation des primären Tumors. Ohne eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff ist eine maligne Neoplasie in ihrem Wachstum auf eine Größe von etwa  $1\text{-}2\text{ mm}^3$  limitiert [13]. Mit einer Progression des Wachstums unterliegt das Tumormilieu dem sogenannten „*angiogenic switch*“. Dabei verändert sich die Balance zwischen pro- und antiangiogenetischen Faktoren hin zu einem proangiogenetischen Charakter [14]. Eine Ursache die zur Expression proangiogenetischer Mediatoren führt ist der entstehende Sauerstoffmangel. Im Zuge der Hypoxie kommt es zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors Hypoxie-induzierter Faktor 1 (HIF-1), welcher die Expression des angiogenetischen Chemokins *vascular endothelial growth factor* (VEGF) induzieren kann [15]. Neben diesem Hauptmediator wird eine Vielzahl weiterer Modulatoren der Angiogenese durch eine Hypoxie induziert. Darunter befinden sich Faktoren wie der *platelet-derived growth factor* (PDGF) oder Mitglieder der Ephrin-Familie [16–18]. Nach der Diffusion dieser Botenstoffe werden die Endothelzellen der umliegenden Gefäße zur Ausbildung neuer Verzweigungen entlang des chemotaktischen Gradienten stimuliert. Im Vergleich zu normalen Blutgefäßen weisen diese pathophysiologisch gebildeten Blutgefäße eine erhöhte Fenestrierung und Permeabilität auf und können so die spätere Intravasation einer entarteten Zelle begünstigen [19, 20]. Des Weiteren ist die Wahrscheinlichkeit der erfolgreichen Intravasation einer metastasierenden Zelle durch die gesteigerte Zahl neugebildeter Gefäße erhöht.

Bevor eine maligne Zelle jedoch in ein umliegendes Blutgefäß einwandern kann, muss sich diese zunächst aus dem soliden Zellverband des Primärtumors herauslösen. Begünstigt wird die Ablösung einzelner Zellen bzw. kleiner Zellcluster durch die phänotypischen Veränderungen der Krebszellen. Diese reversible Veränderung wird als Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet, wobei die Zellen Komponenten ihrer epithelialen Charakte-

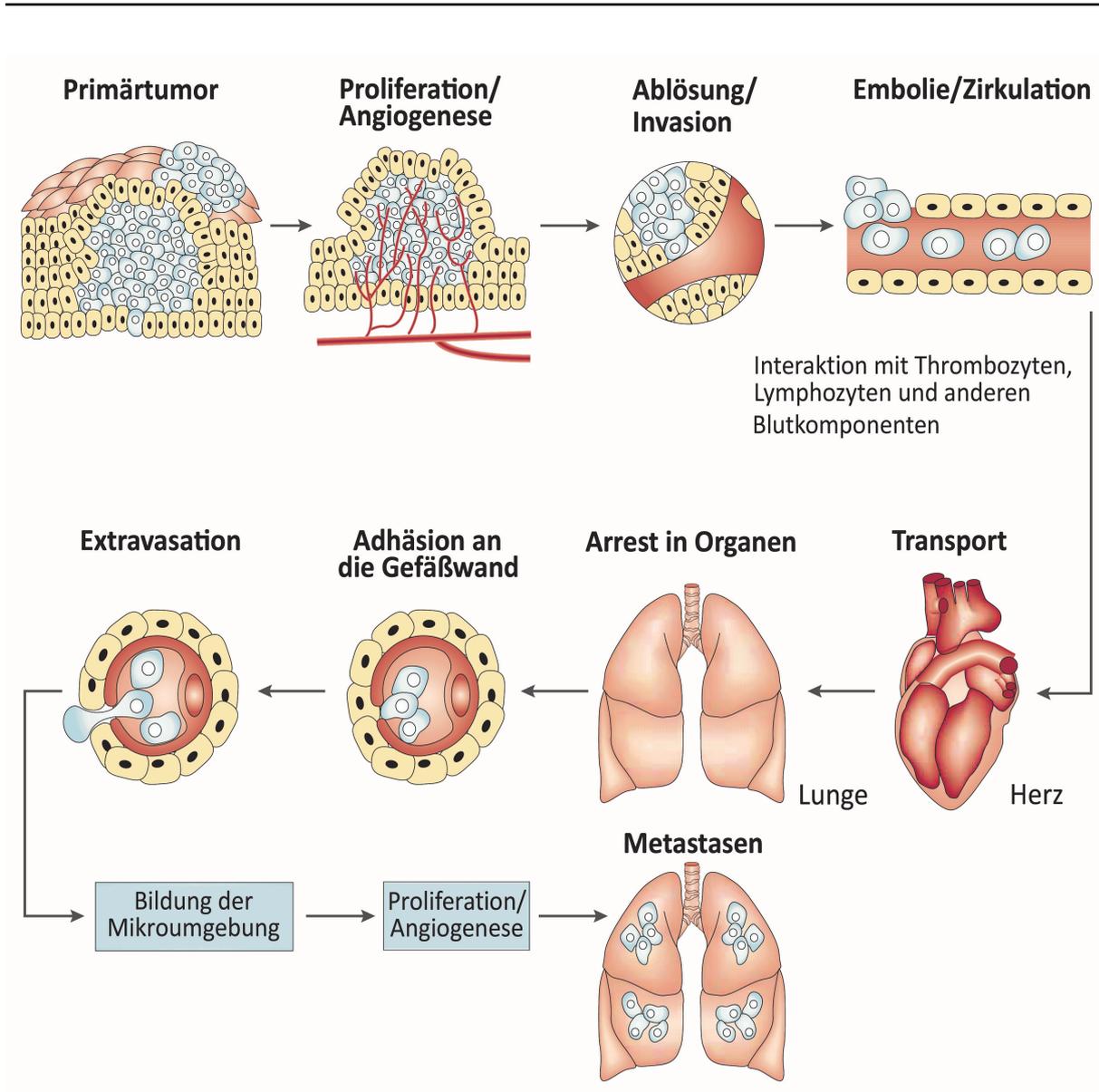


Abbildung 1: Gezeigt ist die schematische Darstellung des Ablaufs der metastatischen Kaskade, modifiziert nach Fidler et al. [12]

ristika verlieren und mesenchymale Eigenschaften erhalten [21]. Im Zuge der EMT werden wichtige, epitheliale Adhäsionsmoleküle wie etwa das Calcium-abhängige E-Cadherin und das Integrin  $\alpha_6\beta_4$  in ihrer Expression herunterreguliert, während hingegen mesenchymale Marker wie N-Cadherin oder das Integrin  $\alpha_5\beta_1$  induziert werden. Dies führt zur Hinderung bzw. dem Verlust der adhäsiven Interaktionen der Zellen untereinander sowie zwischen den Zellen und der umgebenden Extrazellulären Matrix (EZM) und erleichtert die Lösung von einzelner Zellen oder kleinen Zellclustern aus dem Zellverband [22–24]. Des Weiteren erlangen die sich vom Primärtumor ablösenden Zellen durch den Verlust des E-Cadherins eine essentielle Resistenz gegenüber der Anoikis, also der Einleitung des programmierten

Zelltods nach Verlust des Zell-Zell Kontaktes [22].

Nach der Lösung einer Zelle aus dem soliden Zellverband muss diese durch die umliegende EZM migrieren. Dabei bedienen sich die migrierenden Tumorzellen verschiedener Möglichkeiten. Eine schnelle Art der Fortbewegung stellt die amöboide Migration dar, bei welcher sich die Tumorzellen über physische Verformung durch die Lücken in der EZM hindurchwinden [25]. Während diese Art der Fortbewegung unabhängig von der Modulation der umgebenden EZM ist, benötigt die mesenchymale Migration eine aktive Degradierung der EZM. Hierzu greifen die metastasierenden Zellen auf verschiedene Proteasen wie die Matrix-Metalloproteinasen 2 und 9 oder die Heparanase zurück, welche ebenfalls durch die EMT reguliert sein können. Die rekrutierten Proteasen spalten die Bestandteile der EZM und der Basalmembran, wodurch die Migration durch die EZM sowie die Überwindung der Basalmembran vereinfacht werden [26, 27].

Trifft die Zelle im Zuge der Migration auf ein Blutgefäß, kann sie mit Hilfe der zuvor genannten Proteasen die Basalmembran passieren und durch das Endothel in das Innere des Blutgefäßes eindringen. Sobald die Tumorzelle das Lumen des Gefäßes erreicht, wird diese mit potentiell letalen Widrigkeiten konfrontiert. So sind die metastasierenden Zellen den hämodynamischen Scherkräften des Blutflusses unterworfen und stehen den Angriffen der Immunüberwachung gegenüber [28–30].

Bei Eintritt in das Gefäß trifft die Tumorzelle auf unterschiedliche hämatogene Zellpopulationen. Mit etwa  $1,5 \times 10^8$  bis  $4,0 \times 10^8$  pro Milliliter stellen Thrombozyten die zweithäufigste Zellfraktion des humanen Blutes dar. Sie sind mitunter die ersten Zellen, auf welche eine metastasierende Tumorzelle im Blutstrom trifft. Innerhalb von Minuten nach erfolgter Intravasation kommt es zu einer komplexen Interaktion zwischen der Tumorzelle und den Thrombozyten (vgl. Abschnitt 2.2). Auf unterschiedlichen Wegen nutzt die Tumorzelle die Thrombozyten um die Widrigkeiten im Blutstrom zu umgehen. Als Reaktion auf eine durch die Tumorzelle induzierte Aktivierung der Thrombozyten, die sogenannte „*Tumour Cell-Induced Platelet Aggregation*“ (TCIPA), ummanteln diese die Tumorzelle und bilden so einen mechanischen Schutz gegen die Scherkräfte des Blutes und fungieren als Tarnmantel um eine effiziente Überwachung des Immunsystems zu unterwandern [31–33]. Weiterhin kommt es im Zuge der Aktivierung zur Ausschüttung der thrombozytären Granula. Die freigesetzten Mediatoren der dichten und  $\alpha$ -Granula führen zu vielfältigen, prometastatischen Effekten. So können etwa Adenosindiphosphat (ADP) und Thromboxan-A2 (TxA2) zu einer Autoaktivierung weiterer Thrombozyten führen, VEGF eine Aktivierung des Endothels induzieren oder CXCL5 und CXCL7 an der Etablierung einer prometastatischen Nische beteiligt sein [34–37]. Neben den Tumorzellen und Thrombozyten können weitere Zellen wie Leukozyten in die entstehenden Heteroaggregate verflochten sein [38].

Wurde eine Tumorzelle über die Blutbahn in entfernte Körperregionen getragen, muss diese am Endothel adhären um aus dem Gefäß zu migrieren. Der Arrest der Tumorzelle kann dabei durch den gesteigerten Durchmesser eines Heteroaggregats unterstützt sein, welcher die Wahrscheinlichkeit eines mechanischen Arrests in den kleinen Gefäßen der Kapillarstrombetten steigert [39]. In größeren Gefäßen wird die Bindung aber auch durch verschiedene Adhäsionssysteme vermittelt. Dabei spielt die Bindung der auf Tumorzellen exprimierten Moleküle *P-selectin glycoprotein ligand-1* (PSGL-1) oder *very late antigen-4* (VLA-4) an ihre endothelialen Bindungspartner P-Selectin bzw. *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1) eine herausragende Rolle [40, 41]. Auch hier kommt die prometastatische Wirkung des Heteroaggregates zum Tragen, indem die aktivierten Thrombozyten durch die Bereitstellung einer vergrößerten Oberfläche und der gesteigerten Präsentation von Adhäsionsrezeptoren den Arrest am aktivierten Endothel unterstützen [42].

Auf den Arrest folgend kommt es zur Extravasation der metastasierenden Zelle. Dabei helfen zum einen die bereits angeführten Proteinasen und zum anderen ist der Austritt aus dem Gefäß durch die Retraktion der Endothelzellen als Konsequenz einer Aktivierung erleichtert [34, 43]. Hat eine Tumorzelle das umliegende Stroma infiltriert, kann sie unter günstigen Bedingungen eine Metastase ausbilden. Die Bildung einer aktiven Metastase kann zeitlich variieren, da disseminierte Tumorzellen in einen Ruhezustand verfallen können. Die Latenz kann dabei abhängig vom primären Tumor Monate bis Jahrzehnte betragen [44]. Weiterhin ist zu beachten, dass die Lokalisation einer Metastase nicht durch den reinen Zufall bestimmt zu sein scheint, sondern unterschiedliche Tumorentitäten in bestimmten Organmustern Metastasen bilden. So begründete Steven Paget bereits im Jahr 1889 die „*seed and soil*“ Theorie nach der eine disseminierte Tumorzelle (*seed*) präferiert in einer geeigneten Mikroumgebung (*soil*) eine Metastase ausformt [45]. Im Zuge der Bildung einer sogenannten prämetastatischen bzw. frühen metastatischen Nische kann diese Mikroumgebung bereits durch den primären Tumor, vor Ankunft einer metastasierenden Zelle, vorbereitet werden. So kann etwa durch die Sekretion von Mediatoren wie VEGF, TGF- $\beta$  oder TNF- $\alpha$  das hochkomplexe Zusammenspiel aus EZM, Fibroblasten, inhibiertem Immunsystem und weiteren Beteiligten, zum Vorteil der disseminierten Tumorzelle, alterniert werden [46]. Zusätzlich zur direkten Ausschüttung aus dem primären Tumorgewebe stellen die Granula, welche im Zuge der Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung sezerniert werden, eine relevante Quelle mannigfaltiger Mediatoren dar und tragen zur Vorbereitung des Ortes der Metastasierung bei [35, 47, 48].

Allgemein wird der beschriebene Prozess der hämatogenen Metastasierung als höchst ineffizient betrachtet, da in Mausmodellen lediglich ein geringer Bruchteil der intravenös injizierten Tumorzellen über einen längeren Zeitraum überlebt und zur Etablierung einer

Metastase befähigt ist [49, 50]. Jedoch stehen dieser Ineffizienz, nach Schätzungen einer Studie von Butler und Gullino,  $3,2 \times 10^6$  bis  $4,1 \times 10^6$  Tumorzellen gegenüber, die innerhalb von 24 h von einem Gramm Tumorgewebe in die Blutbahn abgegeben werden [51]. Diese Überzahl der täglich freigesetzten Zellen bietet einen Baustein in der Erklärung des häufigen Auftretens von Metastasen. Denn, wie bereits eingangs angeführt, stellt die Bildung einer Metastase eine schwerwiegende Entwicklung im Verlauf einer Krebserkrankung dar und kann bei etwa 60 % der soliden Tumore mit dem letalen Ausgang assoziiert werden [4].

## 2.2 Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung während der hämatogenen Metastasierung

Wie bereits im vorangegangenen Kapitel angeführt, stellen die Thrombozyten eine bedeutende Zellpopulation dar, mit welcher disseminierende Tumorzellen während der hämatogenen Metastasierung konfrontiert sind. Im folgenden Abschnitt soll nun ein tiefergehender Fokus auf die Kommunikation zwischen Tumorzellen und Thrombozyten gelegt werden. Grundsätzlich können Tumorzellen auf zwei verschiedene Weisen mit Thrombozyten in Wechselwirkung treten und zu deren Aktivierung führen. Zum einen kann die Interaktion auf der Basis der Ausschüttung löslicher Mediatorstoffe erfolgen, zum anderen kann eine Interaktion auf dem direkten Kontakt zwischen den beteiligten Zellen beruhen. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind in Abbildung 2 schematisch illustriert.

### 2.2.1 Thrombozytenaktivierung durch lösliche Mediatoren

Bei Betrachtung einer durch lösliche Mediatorstoffe vermittelten Interaktion stellt die Koagulation einen essentiellen Mechanismus dar. So ist der Zusammenhang zwischen einer Tumorerkrankung und dem Vorliegen eines prokoagulatorischen Status des Patienten lange bekannt und resultiert, nach Angaben einer aktuellen Studie von Mulder et al., in einer etwa 9-fach erhöhten Inzidenz venöser Thromboembolien (VTE) bei Krebspatienten [5]. Mechanistisch betrachtet können metastasierende Tumorzellen auf ihrer Oberfläche *tissue factor* (TF) exprimieren bzw. diesen zusätzlich in Form von TF tragenden Mikropartikeln in die Blutzirkulation einschleusen [52, 53]. Gelangt der membranständige *tissue factor* in Kontakt mit Blut, assoziiert er mit dem Gerinnungsfaktor VIIa (FVIIa) und initiiert den extrinsischen Weg der Blutgerinnungskaskade. Dabei katalysiert der gebildete Komplex aus TF und FVIIa die Umwandlung des Gerinnungsfaktors X zu Xa, welcher den Knotenpunkt zwischen dem extrinsischen und intrinsischen Arm der Gerinnung darstellt. Anschließend vermittelt ein aus FXa, FVa, Phospholipiden und Calcium gebildete Prothrombinase-Komplex die Konversion des Prothrombins zu Thrombin [54].

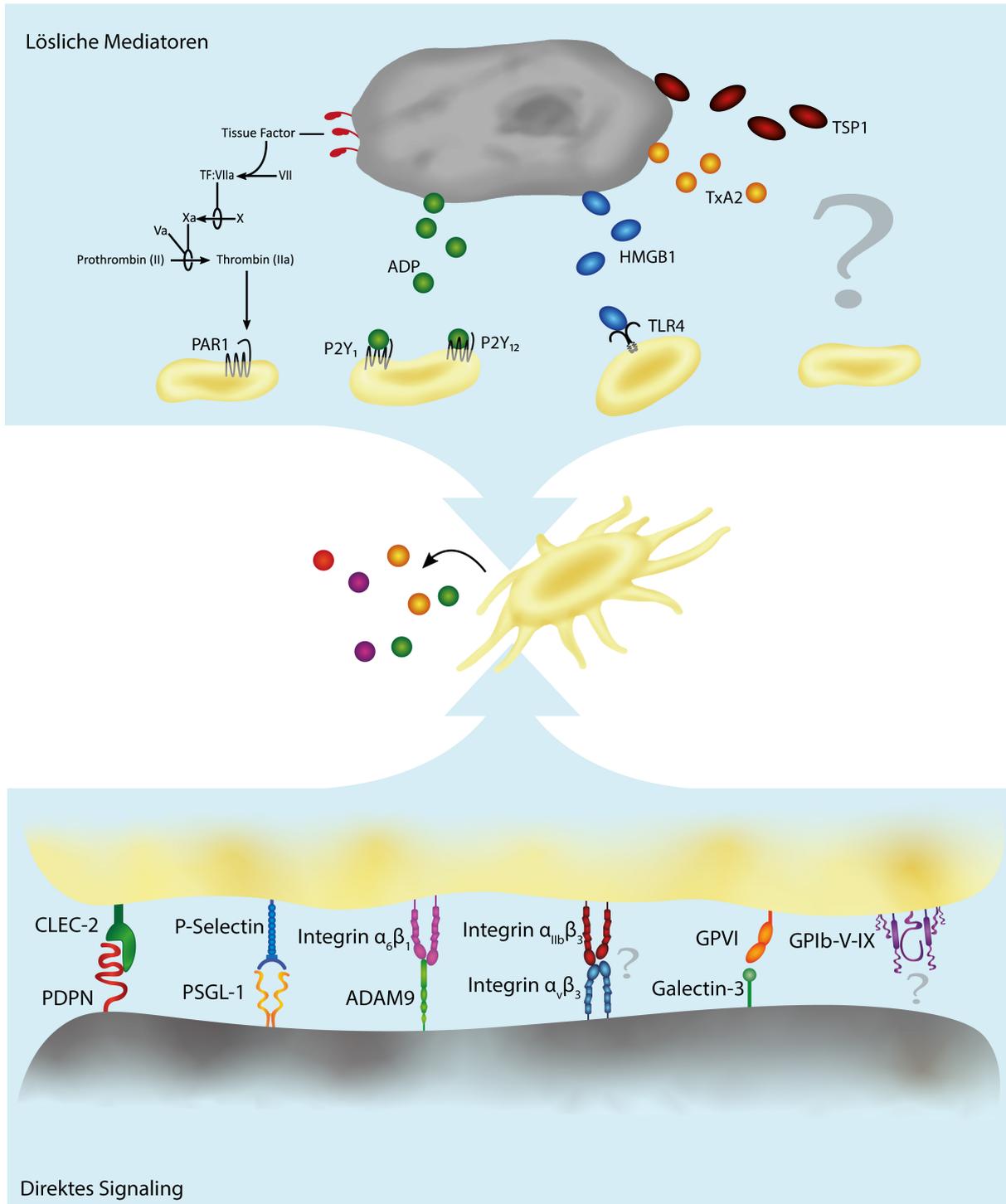


Abbildung 2: Illustriert ist die schematische Darstellung der Mechanismen einer Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung unterteilt nach einer Aktivierung über lösliche Mediatoren oder den direkten Zellkontakt

Neben seiner bedeutenden Rolle in der Hämostase und den physiologischen Prozessen ist Thrombin ebenso relevant im pathophysiologischen Szenario einer Krebserkrankung

[55, 56]. Fokussiert auf einen thrombozytären Effekt stellt Thrombin einen hochpotenten Aktivator dieser dar. Als Serinprotease ist Thrombin befähigt die auf Thrombozyten präsentierte Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR-1 und PAR-4) zu schneiden, wobei neue N-terminale Aminosäuresequenzen demaskiert werden und zur Eigenaktivierung führen. Dies resultiert in einer Aktivierung der Thrombozyten mit einhergehender Aggregation und Granula Sekretion [57, 58].

Ein weiterer löslicher Mediator der Thrombozytenaktivierung ist Adenosindiphosphat (ADP). Es wird physiologisch als sekundärer Mediator im Zuge einer initialen Thrombozytenaktivierung aus den dichten Granula sezerniert und führt zu einer auto- und parakrinen Stimulation weiterer Thrombozyten. Die Signaltransduktion erfolgt vorrangig über die G-Protein gekoppelte Rezeptoren P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>12</sub> [48, 59]. Eine Stimulation des G<sub>q</sub>-gekoppelten Rezeptors P2Y<sub>1</sub> führt über eine Ca<sup>2+</sup> Mobilisation zu einer reversiblen Aggregation und einem sogenannten „*shape change*“, also der Veränderung der discoidalen Morphologie durch Bildung von Pseudopodien, wodurch die Oberfläche signifikant vergrößert wird. Hingegen führt die Stimulation des G<sub>i</sub>-gekoppelten Signals des P2Y<sub>12</sub> Rezeptors zu einer potenten Aggregation, jedoch ohne Induktion eines *shape change*. Weiterhin wird die Sekretion der thrombozytären Granula potenziert [59–61]. Neben der Freisetzung aus Thrombozyten können auch Tumorzellen zur Sekretion von ADP befähigt sein und so eine Aktivierung der Thrombozyten, über die beschriebenen Rezeptoren induzieren [62, 63].

Ein weiteres Protein, welches an der Tumorzell-Thrombozyten Kommunikation beteiligt sein kann, ist das *High-Mobility-Group-Protein B1* (HMGB1). HMGB1 gehört zur Gruppe der *damage-associated molecular pattern* (DAMP), welche in Folge einer Gewebsverletzung eine Entzündungsreaktion induzieren können. Inzwischen konnten mannigfaltige Effekte des HMGB1 im inflammatorischen Geschehen beschrieben werden [64]. Ebenso wurde eine Vielzahl unterschiedlicher Wirkungen dieses Proteins im Kontext einer Tumorerkrankung untersucht. So konnte etwa die Expression von HMGB1 in verschiedenen Tumorentitäten, wie z.B. Brustkrebs, Ovarial- oder auch Kolonkarzinomen mit einer Steigerung der Migration, des Wachstums und der Metastasierung korreliert werden [65]. Der Nachweis einer Relevanz des HMGB1 im Zusammenhang der Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung wurde durch Yu et al. erbracht. Dabei zeigten sie, dass eine HMGB1-abhängige Metastasierung in Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) defizienten Mäusen signifikant reduziert wurde. In weiterführenden Experimenten wurde verdeutlicht, dass unter anderem die Thrombozytenadhäsion an B16F10 und LLC Zellen sowie die Ausbildung metastatischer Herde durch die Verwendung eines HMGB1 neutralisierenden Antikörpers in Wildtypmäusen auf ein ähnliches Niveau wie in TLR4<sup>-/-</sup> Mäusen gesenkt wurde [66].

Ähnlich wie ADP kann auch das, nach Aktivierung über vorangegangene Stimuli, durch Thrombozyten bereitgestellte Prostaglandin Thromboxan-A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) über die Stimulation

des Thromboxan-A2 Rezeptors eine auto- und parakrine Verstärkung der Thrombozytenaktivierung herbeiführen. Aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit von nur etwa 30 Sekunden wird in *in-vitro* Experimenten das stabile Derivat U46619 verwendet, welches eine Aggregation und Sekretion der Granula induzieren kann [37, 67]. Durch Aiktokallio-Tallberg et al. konnte sowohl in Brustkrebs als auch in malignem Ovarialgewebe eine erhöhte TxA2 Expression gezeigt werden. Dies lässt zwar grundsätzlich die Thrombozytenstimulation durch tumorsezerniertes TxA2 möglich erscheinen, jedoch wurde bis dato kein verlässlicher Nachweis einer TxA2-abhängigen Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung erbracht [68, 69].

Als ein weiterer Mediator für den sowohl ein Thrombozyten-aktivierender Effekt als auch eine erhöhte Expression in fortgeschritten Glioblastomen gezeigt werden konnte, soll Thrombospondin-1 lediglich eine kurze Erwähnung finden, da auch hier ein direkter Nachweis der Thrombozytenaktivierung ausstehend ist [70, 71].

### 2.2.2 Thrombozytenaktivierung durch den direkten Zellkontakt

Folgend sollen Thrombozyten- bzw. Tumorzell-ständige Rezeptoren und Liganden betrachtet werden, welche durch ihre Interaktion zu einer Aktivierung der Thrombozyten führen können. Der Vollständigkeit halber soll erwähnt sein, dass es eine Vielzahl weiterer Adhäsionsmoleküle gibt, welche an der Adhäsion und Aggregatbildung zwischen Tumorzellen und Thrombozyten beteiligt sein können, ohne jedoch im Sinne einer aktivierenden Signaltransduktion zu agieren.

Ein Rezeptor-Ligand System, für welches eine Thrombozytenaktivierung nachgewiesen ist, stellt das auf Tumorzellen exprimierte Glykoprotein Podoplanin (PDPN) und der thrombozytäre *C-type lectin receptor 2* (CLEC-2) dar. CLEC-2 ist ein Typ-2 Transmembranprotein, welches eine *C-type lectin-like* Bindungsdomäne besitzt. Physiologisch ist es unter anderem in der embryonalen Entwicklung von Bedeutung. Nach einer Stimulation wird die Signaltransduktion intrazellulär durch eine hemITAM Phosphorylierung initiiert und führt schlussendlich zur Aktivierung der Proteinkinase C und einer  $\text{Ca}^{2+}$  Freisetzung, die eine Aggregation und Granula-Sekretion der Thrombozyten vermitteln können [72]. Als Ligand für die CLEC-2-vermittelte Thrombozytenaggregation konnte durch Suzuki-Inoue et al. das tumorale Glykoprotein Podoplanin identifiziert werden [73], dessen Expression in einer Vielzahl verschiedener Tumorentitäten gezeigt wurde [74–76]. Die Relevanz der PDPN/CLEC-2 Achse wird durch unterschiedliche Berichte evident. So konnte durch Miyata et al. gezeigt werden, dass die Progression von Lungenkrebs Xenotransplantaten in Mäusen durch die Podoplanin-vermittelte Thrombozytenaktivierung gefördert wird [77]. Ähnliche Ergebnisse berichten Tagaki et al., welche eine Reduzierung der Tumorentität durch Thrombozyten unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen Podoplanin

beobachteten. Weiterhin postulierten sie, dass die reduzierte Progression der Xenotransplantate auf die Hemmung der Thrombozytenaktivierung und Infiltration zurückzuführen sei [78]. Wie bereits erwähnt, liegt der Fokus des Kapitels auf der Aktivierung der Thrombozyten, es sei jedoch angemerkt, dass es sich bei der Interaktion zwischen Podoplanin und CLEC-2 um ein bidirektionales Signaling handelt, wodurch z.B. die Migration der Tumorzelle beeinflusst werden kann [79].

Eine weitere Klasse wichtiger Adhäsionsmoleküle stellt die Familie der Selectine dar, welche ebenfalls eine *C-type lectin* Bindungsdomäne zur Erkennung von Kohlenhydratstrukturen aufweisen. Diese Familie besteht aus den Subtypen P-Selectin, E-Selectin und L-Selectin. Durch die Bindung ihrer korrespondierenden Liganden sind sie in einer Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Vorgänge involviert, wobei ihre Hauptaufgabe in der Vermittlung einer Zell-Zell Adhäsion besteht [80]. So vermitteln sie etwa das leukozytäre Rollen entlang des Endothels im Zuge einer Rekrutierung an den Ort eines inflammatorischen Geschehens [81]. Weiterhin spielt etwa thrombozytäres P-Selectin eine essentielle Rolle in der Vermittlung von Thrombozyten/Thrombozyten- bzw. Thrombozyten/Tumorzellbindungen und nimmt somit potentiellen Einfluss auf die Thrombosebildung sowie die hämatogene Metastasierung [82, 83].

Trotz seiner lang bekannten und umfassend untersuchten Rolle als Adhäsionsmolekül ist P-Selectin im Kontext einer Thrombozytenaktivierung nicht vollumfänglich untersucht. Jedoch wird durch Schwarz et al. postuliert, dass P-Selectin an einem aktivierendem Signaling in Brustkrebs-stimulierten Thrombozyten beteiligt ist. In ihrer Arbeit zeigten sie zum einen die P-Selectin-Involvierung in die Brustkrebs-induzierte Thrombozytenaggregation und Granula Sekretion, und zum anderen, dass die Aktivität mehrerer Phosphokinasen durch den Einsatz eines P-Selectin Inhibitors reduziert werden konnte [84]. Ebenso deuten die Befunde von Théorêt et al. auf einen aktivierenden Charakter einer P-Selectin Bindung hin, indem sie zeigten, dass die Inkubation mit rekombinantem humanen PSGL-1 eine Thrombozytenaggregation in Wildtypmäusen, jedoch nicht in P-Selectin Knockout-Mäusen induzierte [85]. Diese Thesen unterstützend zeigten Merten et al. eine Thrombozytenaktivierung durch Sulfatide, die durch den Einsatz monoklonaler P-Selectin Antikörper verhindert werden konnte. Angemerkt sei jedoch die Besonderheit, dass die Sulfatide allein keine stimulierende Aktivität besaßen sondern lediglich eine vorherige Präaktivierung der Thrombozyten verstärkten [86].

In inaktiven Thrombozyten liegt P-Selectin in den  $\alpha$ -Granula gespeichert vor und wird im Zuge einer Aktivierung der Thrombozyten an der Oberfläche präsentiert. Somit erscheint die Beteiligung des P-Selectins an einer initialen Aktivierung der Thrombozyten unwahrscheinlich und ist vermutlich auf die Effekte in präaktivierten Thrombozyten zurückzuführen.

Eine ebenfalls im Kontext der Metastasierung relevante Gruppe der Adhäsionsmoleküle sind die Integrine. Diese sind Heterodimere, die sich aus je einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit zusammensetzen. Durch die Kombination von 18  $\alpha$ -Untereinheiten mit 8  $\beta$ -Untereinheiten sind aktuell 24 verschiedene Integrine beschrieben, wobei lediglich fünf Integrine mit  $\beta_1$ - oder  $\beta_3$ -Untereinheiten auf humanen Thrombozyten exprimiert sind [87, 88]. Dort sind sie beispielsweise durch Bindung ihrer physiologischen Liganden, wie etwa zwischen Kollagen und dem Integrin  $\alpha_2\beta_1$  oder Fibrinogen/Fibrin und dem Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , an der effizienten Immobilisierung und Aggregation der Thrombozyten beteiligt [89, 90]. Im Kontext einer Aktivierung der Thrombozyten über den direkten Kontakt zu Tumorzellen konnten Mammadova-Bach und Kollegen die Bildung von Lungenmetastasen sowie eine Thrombozytenaktivierung durch die Bindung von tumoralem ADAM9 an das Integrin  $\alpha_6\beta_1$  zeigen [91]. Durch das sogenannte *outside-in Signaling* ist die Thrombozyten-aktivierende Kapazität des Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$  als Folge einer Ligand-Bindung bekannt [92]. Ebenfalls ist eine Beteiligung des thrombozytären Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$  und des auf Melanomzellen exprimierten Integrins  $\alpha_V\beta_3$  an einer Tumorzell/Thrombozyten Interaktion durch Lonsdorf et al. gezeigt [93]. Dennoch ist ein direkter Beweis der Tumorzell-vermittelten Aktivierung über das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  ausstehend, da die isolierte Betrachtung einer Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -vermittelten Aktivierung im komplexen Szenario der Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung äußerst anspruchsvoll ist [88].

Ebenfalls soll das Glykoprotein GPVI Erwähnung finden, welches als Konsequenz einer Bindung eines natürlichen Liganden, wie etwa Kollagen, eine Thrombozytenaktivierung vermittelt. Sowohl Dovizio als auch Mammadova-Bach und Kollegen konnten Thrombozyten-stimulierende und prometastatische Effekte durch die Bindung des GPVI über den tumoral exprimierten Liganden Galectin-3 zeigen [94–96]. Weiterhin ist der Glykoprotein-Komplex GPIb-V-IX zu erwähnen. Dieser kann durch eine Vielzahl physiologischer Liganden, darunter von-Willebrand-Faktor, Thrombin und P-Selectin, stimuliert werden und eine Aktivierung der Thrombozyten vermitteln [97]. Für die Inhibition dieses Adhäsionskomplex sind eine Reihe, teils widersprüchlicher, Beobachtungen in Bezug auf die Tumorprogression in murinen Modellen beschrieben. Jedoch wurde auch hier die direkte Aktivierung der Thrombozyten durch Tumorzellen nicht vollends aufgeklärt [42].

Somit stehen im komplexen Zusammenhang der Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung eine Reihe möglicher Stimulationswege bereit, die ihre Effekte alleine oder kombiniert entfalten können. Die Tumorzellen können dabei sowohl die Aggregation als auch die Sezernierung mannigfaltiger Mediatoren aus den thrombozytären Granula induzieren und folglich einen prometastatischen Effekt der Thrombozyten für sich beanspruchen.

## 2.3 Adhäsionsmoleküle in der hämatogenen Metastasierung

In den vorangegangenen Kapiteln deutete sich bereits an, dass eine große Zahl verschiedener Adhäsionsmoleküle in unterschiedlichen Stadien der Metastasierung von Bedeutung ist. Nachfolgend sollen die vier, in dieser Arbeit untersuchten, Adhäsionsmoleküle näher betrachtet und ihre Rolle im Kontext der hämatogenen Metastasierung erläutert werden. Eine schematische Übersicht der vermittelten Effekte des Zellrollens und des Zellarrests ist in Abbildung 3 gezeigt.

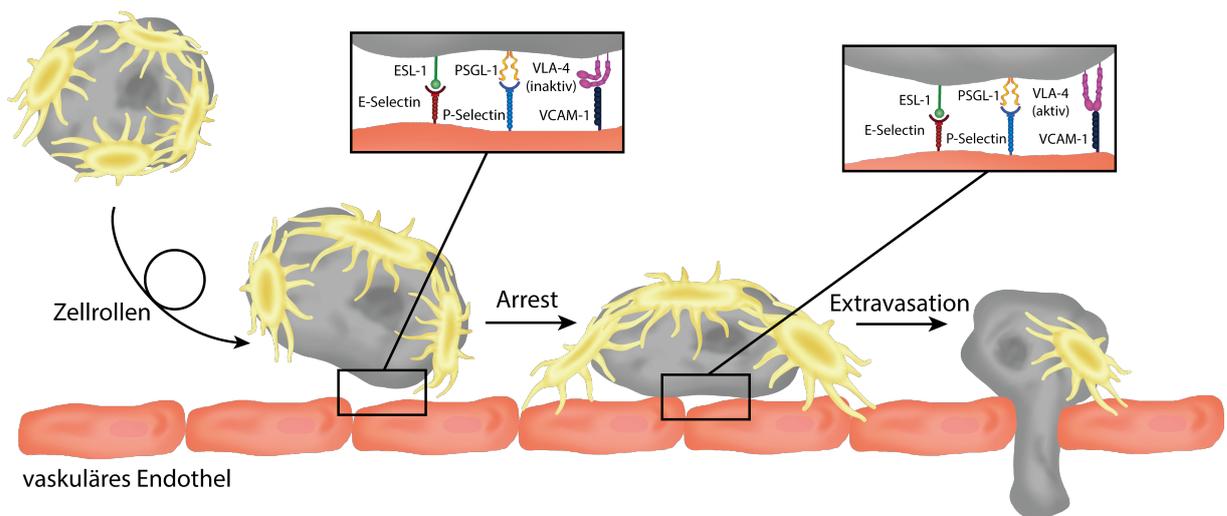


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Zellrollens und Zellarrests von Tumorzell-Thrombozyten Heteroaggregaten und die Beteiligung von VLA-4, VCAM-1 sowie P- und E-Selectin

### 2.3.1 P-Selectin

P-Selectin ist ein Mitglied der Familie der Selectine. Diese besteht aus insgesamt drei Mitgliedern, dem endothelial exprimierten E-Selectin, leukozytärem L-Selectin und dem auf Thrombozyten (engl. *platelets*) und Endothelzellen lokalisiertem P-Selectin. Gemein ist ihnen ihr Aufbau aus fünf Domänen. Sie besitzen einen kurzen zytoplasmatischen C-Terminus und eine transmembranäre Domäne. Extrazellulär folgt zunächst eine Region aus sogenannten *short consensus repeat* (SCR) Einheiten. Dabei besitzt P-Selectin mit neun SCRs im Vergleich zu E-Selectin (6 SCRs) und L-Selectin (2 SCRs) die längste Region. Die vierte Domäne ist eine *epidermal growth factor-like* Region. N-terminal befindet sich die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige *C-type lectin* Bindungsdomäne, welche die Erkennung und Bindung von Kohlenhydratstrukturen ermöglicht [98, 99]. Die minimale Struktur, welche zur Erkennung der Kohlenhydrate durch die Selectine benötigt wird, stellen die Isomere eines  $\alpha 2,3$ -sialysierten und  $\alpha 1,3/4$  fucosylierten Tetrasaccharids dar, welche als sialyl Lewis<sup>x</sup> (sLe<sup>x</sup>) und sialyl Lewis<sup>a</sup> (sLe<sup>a</sup>) bezeichnet werden [100]. Im Zusammenhang

physiologischer und pathophysiologischer Situationen wurden für die Selectine eine Reihe, diese Erkennungssequenz tragende, Liganden mit verschiedenen Funktionen beschrieben [101].

Neben der bereits in Kapitel 2.2.2 beschriebenen Beteiligung des P-Selectins an der Förderung einer Tumorprogression durch Vermittlung eines aktivierenden Signals in Thrombozyten, ist es ebenfalls durch seine rein adhäsiven Eigenschaften in die Förderung der Metastasierung involviert.

Durch Interaktion des auf aktivierten Thrombozyten präsentierten P-Selectins mit tumoral exprimierten Liganden können die Thrombozyten an der Ausbildung des initial gebildeten Schutzmantels zur Umgehung des hämodynamischen Scherstress und der Immunüberwachung beteiligt sein [32, 33, 102]. Durch Kim et al. konnte bspw. im murinen Modell gezeigt werden, dass sowohl ein P-Selectin Knockout als auch die Entfernung glykosylierter Mucine der Tumorzelle zur Reduktion einer Aggregatbildung führten [102]. In einer anderen Arbeit konnten sie weiterhin zeigen, dass eine Injektion aufbereiteter Mucine eine P-Selectin-abhängige Thrombozytenaggregation induzierte [103]. Ähnliche Befunde beschreiben Gong et al. für die Bildung von Heteroaggregaten zwischen Thrombozyten und Lungenkarzinomzellen, welche durch den Knockdown des P-Selectin-Liganden PSGL-1 reduziert werden konnte [104]. Ebenso zeigten Wei und Kollegen eine Inhibition der Bindung von Kolonkarzinomzellen an immobilisierten Thrombozyten durch Anwendung eines P-Selectin blockierenden Antikörpers bzw. P-Selectin bindender Heparin-Derivate [83].

Neben dieser initialen Interaktion sind auch im weiteren Verlauf der metastatischen Kaskade P-Selectin-abhängige bzw. unterstützte Mechanismen beschrieben. Ähnlich zu den  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten können auch Endothelzellen P-Selectin in ihren Vesikeln, den *Weibel-Palade Bodies*, speichern und bei einer Aktivierung an der Oberfläche präsentieren [105]. Physiologisch spielt dies eine bedeutende Rolle bei der Rekrutierung von Leukozyten in inflammatorische Regionen. P-Selectin vermittelt dort das Rollen der Leukozyten entlang des aktivierten Endothels und leitet somit den letztendlichen Arrest und die Extravasation der Leukozyten ein [41, 106]. Diesen physiologischen Prozess ausnutzend, können auch metastasierende Zellen endotheliales P-Selectin für ihren Arrest an der Gefäßwand beanspruchen. Beispielsweise zeigten Ludwig et al. eine starke Reduktion der am Endothel rollenden Melanomzellen in P-Selectin Knockout-Mäusen. Weiterhin nutzen sie Wildtypmäuse, welche eine Knochenmarkstransplantation aus Selectin Knockout-Mäusen erhielten, sodass lediglich deren Thrombozyten P-Selectin defizient waren. In diesem System war das Rollen der Melanomzellen nicht beeinflusst und konnte erst durch den Einsatz eines blockierenden P-Selectin Antikörpers reduziert werden [107]. Zusätzlich zur Vermittlung dieses direkten Kontaktes zwischen Tumorzelle und Endothel kann P-Selectin auch über die Brücke der Thrombozyten eine Adhäsion der Tumorzellen an das Endothel vermit-

teln. So konnten Dadrik et al. zeigen, dass die durch Koinkubation von Melanomzellen mit aktivierten Thrombozyten erreichte Steigerung der Endothelzellbindung durch die Blockade des P-Selectins inhibiert werden kann [108]. Neben diesen beispielhaft genannten Beobachtungen zeigen eine Reihe weiterer Arbeiten die Bedeutung des P-Selectins in der Metastasierung [109–111].

### 2.3.2 E-Selectin

Wie das P-Selectin gehört auch E-Selectin in die Familie der Selectine. E-Selectin wird nach Aktivierung des Endothels, durch inflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$ , exprimiert [112]. Durch die Bindung seiner verschiedenen Liganden wie PSGL-1, CD44 oder des E-Selectin Ligand-1 (ESL-1) auf Leukozyten, besteht seine physiologische Rolle vornehmlich aus der Vermittlung des leukozytären Rollens im Kontext eines inflammatorischen Szenarios [113, 114]. Ebenso wie für P-Selectin wurde eine prometastatische Wirkung des E-Selectins in einer Reihe verschiedener Studien beschrieben. Beispielsweise konnte durch Richter et al. ein E-Selectin-abhängiges Rollen und Adhärenzen verschiedener Zelllinien des kleinzelligen Bronchialkarzinoms am *in-vitro* Modell eines stimulierten Endothels gezeigt werden [115]. In einer weiteren Studie untersuchten Yasmin-Karim et al. sowohl das Zellrollen entlang eines endothelialen Monolayers als auch das metastatische Potential im Mausmodell für die Prostatakarzinomlinien PC-3 und DU145. Durch einen Knock-down des tumoral exprimierten ESL-1 konnten sie das Zellrollen signifikant reduzieren und mit dem metastatischen Potential der Prostatakarzinome korrelieren [116]. In ihrem Mausmodell adressierten Morita und Kollegen die Metastasierung von Brustkrebszellen. Dabei nutzten sie PEGylierte Thioaptamere, welche durch die Blockade des E-Selectins die Metastasierung nach Injektion humaner Brustkrebszellen hemmten [117]. Neben dieser Adhäsionsvermittlung wurde durch die Beobachtungen von Tremblay et al. evident, dass die Bindung des E-Selectins zu einer intrazellulären Signalweiterleitung führte, welche die Permeabilität des Endothels durch die Dissoziation des VE-Cadherins steigerte. Folglich beobachteten sie eine Erhöhung der transendothelialen Migration der untersuchten Kolonkarzinomzellen HT-29 [118]. Eine ebenfalls von E-Selectin und dem Liganden CD44v4 abhängige transendotheliale Migration konnte bei der vergleichenden Untersuchung von metastatischen Brustkrebszellen der MDA-Linien und dem wenig metastasierenden Modell MCF-7 beobachtet werden [119]. Unabhängig von einer Expression der E-Selectin Liganden auf Tumorzellen scheint auch eine Interaktion zwischen E-Selectin und monozytären E-Selectin Liganden einen Beitrag zur Metastasierung zu leisten. So zeigten Häuselmann und Kollegen, dass die Metastasierung von Tumorzellen, die keinen ESL-1 exprimieren, in E-Selectin defizienten Mäusen signifikant weniger Metastasen bildeten als in Wildtypmäusen. Weiterführend postulierten sie, dass die Metastasierung auf die erhöhte

Permeabilität des Endothels als Konsequenz einer E-Selectin-abhängigen Bindung von Monozyten zurückzuführen sei [120].

### 2.3.3 Very Late Antigen-4 und Vascular Cell Adhesion Molecule 1

Das Adhäsionsmolekül *very-late antigen 4* (VLA-4) ist ein Integrin, welches durch eine nicht-kovalente Assoziation der  $\alpha_4$ - und  $\beta_1$ -Untereinheit gebildet wird [121]. Durch die Expression auf Leukozyten ist es, ähnlich den zuvor beschriebenen Selectinen, während der Rekrutierung der Leukozyten in entzündliche Regionen von Bedeutung. Dort partizipiert es in seiner inaktiven Konformation sowohl am initialen Rollen der Leukozyten als auch am Arrest der Zellen am Endothel, der dann durch die aktive Konformation vermittelt wird [114, 122]. Neben den beiden Hauptliganden *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1) und Fibronectin wurden weitere Liganden wie z.B. Osteopontin oder ADAM7 beschrieben [123–126]. VCAM-1 ist ein Adhäsionsmolekül aus der Superfamilie der Immunglobuline, dessen beiden Spleißvarianten entweder sechs oder sieben Immunglobulin-ähnliche Domänen aufweisen, welche über eine transmembranäre Domäne an eine kurze zytoplasmatische Domäne geknüpft sind [127]. Es ist hauptsächlich auf der Oberfläche der Endothelzellen lokalisiert und in Folge einer Stimulation durch inflammatorische Zytokine in seiner Expression gesteigert [128, 129]. Als einer der physiologischen Hauptliganden des VLA-4 ist seine Bedeutung in der Rekrutierung der Leukozyten in inflammatorische Regionen schlüssig [114].

Eine Expression seitens der Tumorzellen konnte bereits für verschiedene Entitäten gezeigt werden. So wurde für verschiedene Melanom-, Osteosarkom- und Nierenkarzinomzellen eine VLA-4/VCAM-1 abhängige Bindung und Transmigration der Tumorzellen über das Endothel gezeigt [130–133]. Neben VLA-4 wurde ebenso eine Expression von VCAM-1 auf Tumorzellen beschrieben, sodass eine Interaktion der Tumorzelle mit VLA-4 tragenden körpereigenen Zellen ermöglicht ist. So konnte bspw. durch Chen und Kollegen gezeigt werden, dass die Bindung von VCAM-1 durch VLA-4 auf Monozyten zu einer Stimulation antiapoptotischer Signalwege in den untersuchten Brustkrebszelllinien führte [134]. In einer aktuellen Studie von Zhang et al. wurde weiterhin gezeigt, dass die transendotheliale Migration und die Metastasierung von Kolorektalkarzinomen durch eine VCAM-1-abhängige Induktion der EMT bedingt sein können [135].

Nicht nur in Prozessen der Adhäsion und Transmigration scheint VLA-4 und VCAM-1 eine bedeutende Rolle zuzukommen. In *in-vitro* Versuchen untersuchten Berrazouane und Kollegen den Einfluss der VLA-4/VCAM-1 Achse auf die Chemoresistenz der T-Zell akut lymphatischen Leukämie. Dabei zeigten sie, dass durch die Bindung von VLA-4 an immobilisiertes VCAM-1 ein durch (Protein) Tyrosin Kinase 2 vermittelter Signalweg aktiviert wird, welcher zu einem Efflux des eingesetzten Doxorubicins führt [132]. Ebenso

konnten Noborio-Hatano et al. VLA-4 mit einer *cell adhesion mediated drug resistance* (CAM-DR) gegenüber Bortezomib, Vincristin, Doxorubicin und Dexamethason in Verbindung bringen. In Zellen des multiplen Myeloms konnten sie die CAM-DR durch den Einsatz von blockierenden Antikörpern gegen die  $\alpha_4$ -Untereinheit des Integrins bzw. durch einen shRNA Knockdown der Untereinheit zurückdrängen [136].

Weiterhin konnte dem VLA-4 durch Kaplan und Kollegen eine Bedeutung in der Ausformung einer prämetastatischen Nische zugesprochen werden. Durch ihre Beobachtungen konnten sie zeigen, dass VEGFR1 positive, dem Knochenmark entspringende Zellen über VLA-4 an das, am Ort der zukünftigen Metastase vermehrt gebildete, Fibronectin binden und dort zur Etablierung einer prämetastatischen Nische beitragen [137].

Neben diesen prometastatischen Eigenschaften der VLA-4/VCAM-1 Achse wurde jedoch auch ein antimetastatischer Effekt der VLA-4 Expression auf die Invasivität von B16F10 Zellen gezeigt, für den eine Abhängigkeit von homotypischen VLA-4 Bindungen zwischen den Zellen eines Clusters postuliert wurde [138]. Auch als vorhersagender Biomarker zur Einschätzung der Ansprechbarkeit eines Patienten auf eine PD-L1 Therapie könnte VCAM-1 in Zukunft eine Bedeutung erlangen, da Riegler et al. mittels bildgebender Verfahren eine Korrelation zwischen Tumorperfusion bzw. endothelialer VCAM-1 Expression und der T-Zell Infiltration beobachteten [139].

## 2.4 Die Rolle des Immunsystems in der Progression maligner Erkrankungen

Das menschliche Immunsystem ist von essentieller Bedeutung in der Abwehr von Bakterien, Viren und Pilzen. Durch die Erkennung und Elimination exogener Antigene schützt es den Menschen vor Infektionen mit minderschwerem bis hin zu letalem Verlauf. Darüber hinaus kommt dem Immunsystem eine bedeutende Rolle in der Elimination endogener Risikofaktoren wie entarteten Zellen zu. Somit ist es auch an der Prävention und Bekämpfung von malignen Erkrankungen beteiligt [140]. Die Hypothese einer Involvierung des Immunsystems in das komplexe Geschehen einer malignen Erkrankung wurde erstmals vor über 150 Jahren begründet. Bereits im Jahr 1863 postulierte der deutsche Arzt und Wissenschaftler Rudolf Virchow den heutzutage erwiesenen Zusammenhang zwischen einer entzündlichen Gewebsirritation und der Entstehung eines Tumors [141–143]. Auch erste Versuche einer antitumoralen Immuntherapie gehen auf das Jahr 1891 zurück, als der amerikanische Chirurg William Bradley Coley bei seinem Patienten eine Tumorregression in Folge einer Streptokokken-Infektion beschrieb. Folgend versuchte er, durch die Injektion einer Bakterien-Mixtur das Immunsystem onkologischer Patienten zu stimulieren und so eine Tumorregression zu induzieren [144]. Dennoch rückte die Aufklärung der wechselseitigen Beziehung von Tumoren und dem Immunsystem erst in den vergangenen Jahrzehnten

in den Fokus der breiteren Forschung und resultierte in der Entwicklung moderner Immuntherapien.

Die Wechselwirkung zwischen Tumor und Immunsystem ist weder auf einzelne Komponenten des Immunsystems, noch auf bestimmte Stadien der malignen Erkrankung beschränkt. Es sind sowohl Effektoren der angeborenen Immunabwehr, wie Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) oder Makrophagen, als auch  $CD4^+$  bzw.  $CD8^+$  T-Lymphozyten als Vertreter des adaptiven Immunsystems involviert und beeinflussen nicht nur die Entstehung und Entwicklung eines soliden Tumors, sondern nehmen auch auf die Metastasierung Einfluss [145–147]. Dabei gilt es jedoch zu beachten, dass dieses Wechselspiel ein höchst komplexer Prozess ist und neben einer antitumoralen Aktivität des Immunsystems auch die Progression einer malignen Erkrankung durch Immunzellen befeuert werden kann. Beispielsweise können M1 polarisierte Makrophagen durch ihren antitumoralen Charakter die Tumorprogression hemmen, während M2 polarisierte Makrophagen durch eine Förderung der Neovaskularisation oder eine Immunsuppression die Progression des Tumors fördern können [146, 148]. Im Folgenden sollen  $CD4^+$  T-Zellen,  $CD8^+$  T-Zellen sowie NK-Zellen als Schlüsselfiguren der antitumoralen Immunität näher betrachtet werden.

#### **2.4.1 $CD4^+$ T-Zellen als Schlüsselfiguren der antitumoralen Immunität**

$CD4^+$  T-Zellen, auch als T-Helferzellen bezeichnet, stellen eine dem Knochenmark entspringende Gruppe der Lymphozyten dar, welche im Thymus durch die Expression des T-Zell-Rezeptors (TCR) heranreift und CD4 als Korezeptor des TCR auf ihrer Oberfläche exprimiert.  $CD4^+$  T-Zellen gehören zum adaptiven, also dem erworbenen Teil des Immunsystems, indem jede der Zellen zur Erkennung eines spezifischen Antigens ausgestattet ist. Als Helferzellen entfalten  $CD4^+$  T-Zellen ihre physiologischen Effekte durch die Initiation und die Unterstützung der Immunantwort anderer Effektoren des Immunsystems wie zytotoxischer T-Zellen, NK-Zellen oder Antikörper generierender B-Zellen [149–151]. Innerhalb der  $CD4^+$  T-Zellen können Subpopulationen unterschieden werden, welche unterschiedliche Zytokinprofile aufweisen und in ihren physiologischen Funktionen variieren. Beispielsweise unterstützen T-Helferzellen des Typs 1 (Th1) die Elimination intrazellulärer Pathogene durch die Sezernierung von Zytokinen wie  $IFN-\gamma$  oder IL-2 und einer damit einhergehenden Steigerung der zytolytischen Aktivität von Makrophagen bzw.  $CD8^+$  T-Zellen [152]. Th2 Zellen hingegen sind zwar an der Amplifikation der humoralen Immunabwehr beteiligt, sie können jedoch auch in pathophysiologischen Prozessen wie Allergien oder asthmatischen Erkrankungen involviert sein [153]. Neben den, die Immunabwehr fördernden  $CD4^+$  T-Zellen stellen regulatorische T-Zellen eine Subpopulation dar, welche zur Kontrolle der Immunantwort dient und den Organismus so vor übermäßigen Immunreaktionen schützt [154]. Eine Übersicht weiterer  $CD4^+$  T-Zellen ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Übersicht der CD4<sup>+</sup> T-Zell Subpopulationen und deren Rolle in physiologischen und pathophysiologischen Szenarien [155–158] (+) = Anzahl erhöht; (-) = Anzahl erniedrigt.

Subpopulation	physiologische Funktion	pathophysiologische Funktion
Th1	Abwehr bakterieller und viraler Pathogene	chronische Entzündungen / Autoimmunerkrankungen
Th2	humorale Abwehr / Abwehr von Helminthen	Allergien / Asthma
Th9	Abwehr von Helminthen	Allergische Entzündungen
Th17	Abwehr von Pilzen und Bakterien	chronische Entzündungen / Autoimmunerkrankungen
Th22	Wundheilung	Autoimmunerkrankungen
Tfh	Unterstützung der Antikörperproduktion in B-Zellen	Autoimmunerkrankungen (+) / Immundefizienz (-)
T <sub>reg</sub>	Immunhomöostase / Schutz vor Autoimmunerkrankungen	gehinderte Immunabwehr

Im Zuge eines Tumorleidens kann es zur Migration tumorinfiltrierender T-Lymphozyten (TIL) in das maligne Gewebe kommen. Für eine Vielzahl verschiedener Tumorentitäten konnte die Infiltration von Th1 Lymphozyten mit einer verbesserten Prognose des Patienten korreliert werden [159]. Hoepner et al. zeigten am Mausmodell, dass Tumorantigen spezifische Th1 Zellen die Infiltration und Aktivität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Gehirntumoren steigerten und so das Gesamtüberleben der Versuchstiere verbesserten [160]. Entgegen den Th1 TILs werden Th2 TILs mit einer schlechteren Prognose assoziiert und können durch die Hemmung des adaptiven Immunsystems eine Progression des Tumors begünstigen [159, 161–164]. Jedoch konnte durch Nishimura und Kollegen auch für Th2 Lymphozyten ein CD8<sup>+</sup> T-Zell-abhängiger Rückgang der Tumormasse beobachtet werden, nachdem sie Ovalbumin (OVA) antigenspezifische Th1 bzw. Th2 Lymphozyten in Mäuse injizierten, welche OVA-transfizierte A20 Tumore ausgebildet hatten [165]. Weiterhin zeigten Lorvik et al., dass Th2 Lymphozyten durch die Rekrutierung von Arginase exprimierenden M2-Makrophagen im Zuge einer Typ 2 Entzündungsreaktion zu einer Melanom-Eradikation führten [166]. Die Beteiligung von Th2 Lymphozyten kann somit pro- und antitumoraler Natur sein und verdeutlicht die hohe Komplexität der immunologischen Prozesse im Kontext maligner Erkrankungen.

Eine weitere Subpopulation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit einer antitumoralen Aktivität stellen die IL-9 exprimierenden Th9 Lymphozyten dar. Im Vergleich zu Th1, Th2 und Th17 Zellen konnte eine ausgeprägtere antitumorale Aktivität der Th9 Lymphozyten durch Purwar et al. beschrieben werden. Diese gesteigerte Aktivität führten sie durch die Verwendung von T-

und B-Lymphozyt-defizienten Rag1<sup>-/-</sup>-C57BL/6 Mäusen sowie Mastzell-defizienten Mäusen auf eine IL-9-abhängige Mastzellaktivierung zurück [167]. Durch Arbeiten von Lu und Kollegen wurde evident, dass der hyperproliferative Charakter und die Granzym-Expression der Th9 Lymphozyten durch eine damit verbundene, direkt zytolytische Aktivität zur antitumoralen Antwort beitragen. Sie zeigten weiterhin, dass Th9 Lymphozyten über die CCL20/CCR6 Achse dendritische Zellen in das tumorale Gewebe rekrutieren. Dies vermittelte einen antitumoralen Effekt durch die Steigerung der Aktivität tumorspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen [168, 169]. Neben diesen antitumoralen Eigenschaften zeigten verschiedene Studien, ähnlich wie bei Th2 Lymphozyten, eine Korrelation zwischen der Präsenz von Th9 Lymphozyten, einer protumoralen, immunsupprimierten Mikroumgebung und einer verschlechterten Prognose [170–172].

Als Subpopulation mit einer ebenfalls dualen Rolle in der antitumoralen Immunität wurden IL-17 exprimierende Th17 Lymphozyten beschrieben. In einer Vielzahl verschiedener Untersuchungen zeigte sich, dass sie über verschiedene Mechanismen wie etwa die Förderung der Angiogenese oder die Rekrutierung regulatorischer T-Zellen eine Progression des Tumors fördern können. Ebenso konnten antitumorale Effekte, etwa durch die Induktion einer zytotoxischen Antwort von CD8<sup>+</sup> T-Zellen oder eine direkte Tumorreduktion durch Th17 Lymphozyten in T- und B-Lymphozyten-defizienten Mäusen gezeigt werden. Des Weiteren bedingt die hohe Plastizität der Th17 Lymphozyten eine erschwerte Beurteilung ihrer Rolle im malignen Kontext, da sie durch die Stimulation unterschiedlicher Zytokin-Milieus dazu befähigt sind sich in andere CD4<sup>+</sup> Subpopulationen zu differenzieren. So ist es also möglich, dass Th17 Lymphozyten ihr immunmodulatorisches Potential z.B. als Th1 oder regulatorische T-Zellen entfalten [167, 173–175].

Neben den vorangegangenen CD4<sup>+</sup> Subpopulationen und deren zumeist dualen Rollen in der Tumorentwicklung konnte kürzlich eine direkt zytolytische Subpopulation der CD4<sup>+</sup> TILs beschrieben werden, welche, vergleichbar zu CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten, ihre zytolytische Aktivität durch Perforin und Granzym B vermittelt [176].

Ein besonderes Augenmerk dieser Arbeit liegt auf der Thrombozyten-vermittelten Differenzierung von naiven CD4<sup>+</sup> Lymphozyten zu regulatorischen T-Zellen. Regulatorische T-Zellen (T<sub>reg</sub>) stellen eine besondere Subpopulation der CD4<sup>+</sup> Lymphozyten dar, deren Hauptaufgabe im Erhalt der Immunhomöostase durch die Hemmung einer abgeschlossenen bzw. überschießenden Immunantwort liegt. Durch ihren CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/FoxP3<sup>+</sup> Phänotyp können sie von anderen Lymphozyten differenziert werden. Innerhalb ihrer Subpopulation kann zwischen natürlich vorkommenden regulatorischen T-Zellen (nT<sub>reg</sub>) und induzierten regulatorischen T-Zellen (iT<sub>reg</sub>) unterschieden werden. nT<sub>regs</sub> reifen im Thymus und exprimieren konstitutiv den essentiellen Transkriptionsfaktor FoxP3. Hingegen differenzieren iT<sub>regs</sub> in Folge eines TCR- und Zytokin-Stimulus, wie beispielsweise durch IL-2, IL-10

und/oder TGF- $\beta$ , in der Peripherie und exprimieren FoxP3 situativ [177–179]. Zur Ausübung ihrer immunsupprimierenden Aktivität stehen regulatorischen T-Zellen ein breites Repertoire unterschiedlicher Mechanismen zur Verfügung, welche in einer konzertierten Weise zu einer Hemmung der Effektorzellen im entzündlichen und tumoralen Kontext führen. Eine Übersicht der verschiedenen Mechanismen ist in Abbildung 4 skizziert.

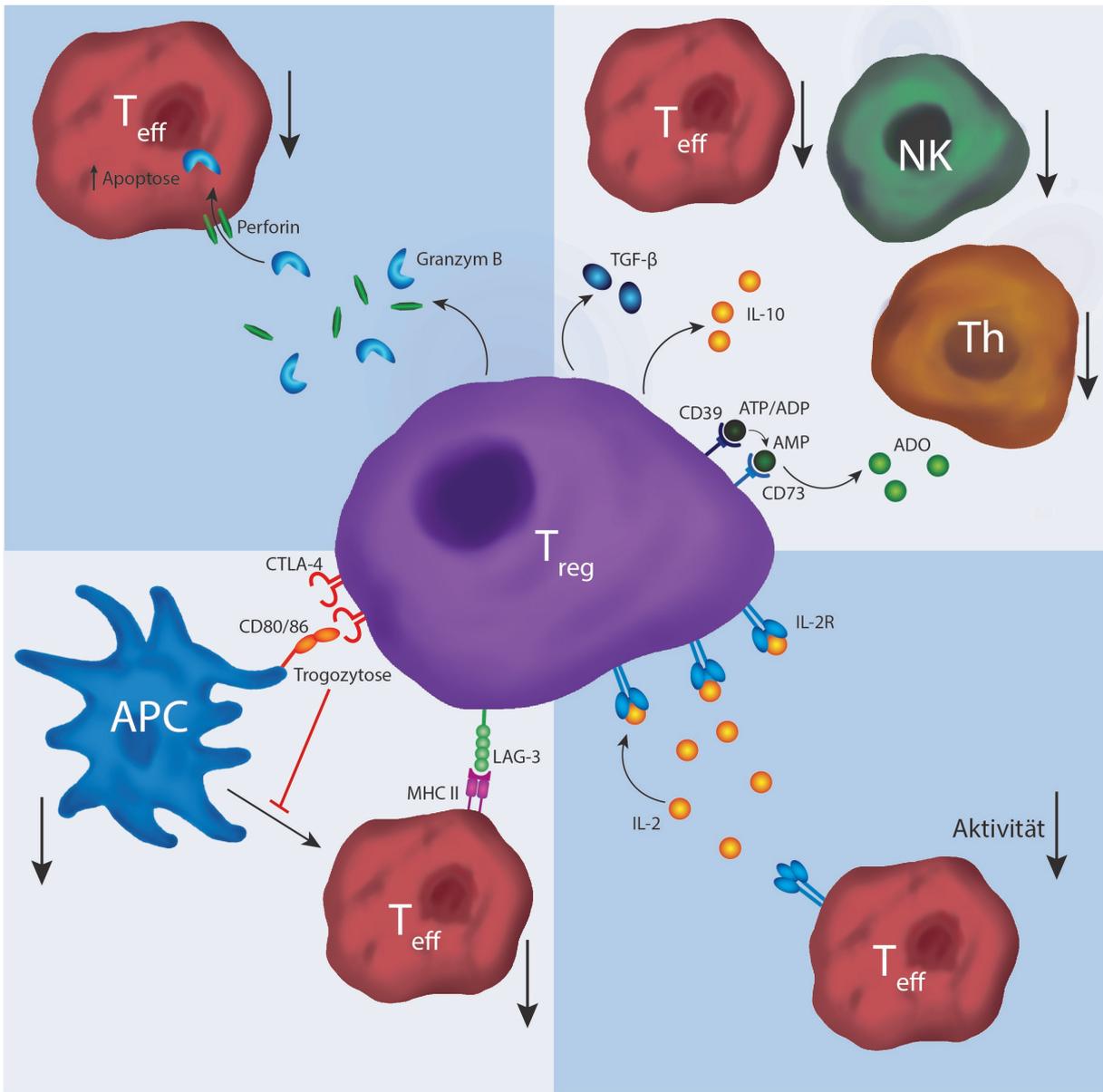


Abbildung 4: Dargestellt sind die unterschiedlichen Mechanismen der Immunhemmung durch regulatorische T-Zellen

Mit Blick auf das maligne Geschehen, konnte durch Liu et al. gezeigt werden, dass Tumorzellen durch die Freisetzung von TGF- $\beta$  eine Konversion naiver CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen zu FoxP3 exprimierenden CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen induzieren können [180].

Durch ihren immunsupprimierenden Charakter präsentieren sich tumorinfiltrierende  $T_{\text{regs}}$  als nachteilige Marker in der Prognose verschiedener Tumorentitäten und sind mit einem verschlechterten Gesamtüberleben assoziiert [181].

Ein humoraler Mechanismus der Immunsuppression, welchen sich  $T_{\text{regs}}$  zu eigen machen, ist der hohe Konsum an T-Zell-stimulierendem IL-2, wodurch dieses der Umgebung entzogen wird und somit nicht mehr zur Aktivierung weiterer Immunzellen zur Verfügung steht [182–184]. Neben der Bindung von IL-2 konnte weiterhin eine  $T_{\text{reg}}$ -vermittelte Suppression durch die Freisetzung immunmodulatorischer Zytokine wie TGF- $\beta$ , IL-10 oder IL-35 beschrieben werden. So zeigten etwa Collison et al., dass eine  $T_{\text{reg}}$ -dominierte Freisetzung von IL-35 die Proliferation von Effektor T-Zellen signifikant unterdrückte [185]. Ebenso zeigten Stewart und Kollegen in einem murinen IL-10 Knockout-Modell, dass über die  $T_{\text{reg}}$ -dominierte IL-10 Freisetzung eine Inflammation durch tumorinfiltrierende Th17 reduziert wird [186]. Während manche Studien eine maßgebliche Beteiligung des Zytokins TGF- $\beta$  an der  $T_{\text{reg}}$ -vermittelten Suppression von NK-Zellen und Effektor T-Zellen beschreiben, konnten andere Arbeiten die Beteiligung von TGF- $\beta$  nicht bestätigen, sodass ein TGF- $\beta$  Effekt möglicherweise situationsabhängig sein kann [187–189]. Als einen weiteren, durch lösliche Mediatoren vermittelten, Mechanismus der Immunsuppression konnten Maj et al. in ihrer Studie die Freisetzung von ATP aus apoptotischen  $T_{\text{regs}}$  als Folge oxidativen Stresses identifizieren. Dabei zeigten sie, dass freigesetztes ATP durch die Enzyme Ectonucleosidtriphosphatdiphosphohydrolase 1 (CD39) und die 5'-Nucleotidase (CD73) zu Adenosin umgesetzt wird, welches wiederum durch die Bindung des Adenosinrezeptors  $A_{2A}$  die Aktivität der T-Zellen hemmte. Dies hatte sogar in Versuchstieren unter Immuncheckpoint-Inhibition durch einen PD-L1 Antikörper eine erhöhte Progression des Tumors zur Folge [190]. Das Apoptose-induzierende Perforin/Granzym-System wird nicht nur von zytotoxischen T-Lymphozyten und NK-Zellen zur Eradikation maligner Zellen verwendet. In ihrer Studie zeigten Cao et al. durch die Verwendung verschiedener Knockout-Mausmodelle, dass regulatorische T-Zellen sich selbiges zu eigen machen, um antitumorale Effektorzellen zu eliminieren, was in einer Verschärfung der Tumorphase resultierte [191].

Ebenso können Immuncheckpoint-Moleküle durch  $T_{\text{regs}}$  zur Modulation der Immunantwort genutzt werden. So können  $T_{\text{regs}}$  etwa durch die Bindung des auf ihrer Oberfläche lokalisierten *cytotoxic T-lymphocytes-associated protein 4* (CTLA-4) das Aufkommen der auf antigenpräsentierenden Zellen (APC) exprimierten Liganden CD80 und CD86 im Zuge einer Trogozytose vermindern. Dies führt folgend zur Limitierung des kostimulatorischen Signals bei der T-Zell-Aktivierung [192]. Weiterhin kann der auf regulatorischen T-Zellen präsentierte Immuncheckpoint *Lymphocyte-activation gene 3* (LAG-3), durch Bindung an den *major histocompatibility complex class II* (MHC-II), die Proliferation von Effektorzellen

inhibieren [193].

Nicht zuletzt durch ihre große Heterogenität und mannigfaltigen Effekte im Zusammenhang maligner Erkrankungen rücken  $CD4^+$  T-Lymphozyten stetig weiter in den Fokus der Wissenschaft und finden zunehmend Beachtung in modernen Therapieansätzen wie der Immuncheckpoint Inhibition oder der CAR T-Zelltherapie.

#### **2.4.2 $CD8^+$ T-Zellen als Schlüsselfiguren der antitumoralen Immunität**

Ähnlich den  $CD4^+$  T-Lymphozyten gehören auch  $CD8^+$  T-Zellen zu den TCR-exprimierenden Lymphozyten und reifen im Thymus heran. An Stelle des CD4 der T-Helferzellen ist die Präsenz des Oberflächenproteins CD8 charakteristisch. Aktivierte  $CD8^+$  T-Lymphozyten werden auch als zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) bezeichnet und stellen die Effektorzellen des adaptiven Immunsystems dar. Ihre physiologische Hauptaufgabe besteht in der antigenspezifischen Erkennung und Elimination infizierter oder entarteter Zellen. Die Erkennung erfolgt dabei spezifisch durch die Bindung des TCR an den antigentragenden MHC-I Komplex der antigenpräsentierenden Zellen. Ähnlich wie die  $CD4^+$  T-Lymphozyten können auch die  $CD8^+$  T-Zellen anhand ihres Zytokinprofils differenziert werden, wobei Tc1, Tc2 und Tc22 einen zytotoxischen Charakter besitzen, welcher für die Subpopulationen Tc9 und Tc17 bisher nicht gezeigt werden konnte [151, 194].

Grundlegend können  $CD8^+$  T-Zellen durch Infiltration des tumoralen Gewebes nicht nur mit einer verbesserten Prognose korrelieren, sondern ebenso einen potentiellen Prädiktor für das Ansprechen und den Erfolg einer auf Immuncheckpoint-Inhibitoren (ICI) basierenden Therapie darstellen [195–197]. Trotz ihrer unumstrittenen Rolle als Schlüsselspieler in der tumorspezifischen Immunantwort sind die genauen Mechanismen, die den CTL zur Eradikation der entarteten Zellen zur Verfügung stehen, aufgrund teils unterschiedlicher Beobachtungen nicht abschließend aufgeklärt. So kann auf der einen Seite durch CTL ausgeschüttetes Perforin die Membranintegrität der Zielzelle bzw. bei gemeinsamer Endozytose die Integrität des Vesikels stören, sodass Granzym A oder B in die Zielzelle eindringen und eine Apoptose induzieren können [198]. Smyth et al. beschrieben jedoch, dass Granzym A und B defiziente Mausmodelle zur Unterdrückung einer Tumorausformung nach Injektion von B-Zell-Lymphom-Zellen befähigt sind. Hier schien die Präsenz von Perforin essentiell aber auch ausreichend für eine Unterdrückung des Tumors zu sein [199]. Das ebenfalls aus den zytolytischen Granula sezernierte Granulysin ist wie die Granzyme von der Perforin-vermittelten Störung der Membranintegrität abhängig und kann nach dem Eindringen den Zelltod durch endoplasmatischen Stress bzw. die Aktivierung der Caspase-7 induzieren [200, 201]. Einen alternativen Mechanismus stellt die Interaktion zwischen dem tumoralen Todesrezeptor Fas und dem auf  $CD8^+$  T-Lymphozyten exprimierten Fas-Liganden (FasL) dar, die intrazellulär zur Caspase-8-vermittelten Apoptose führt [202]. Eine Beteiligung

dieses Systems konnte beispielsweise durch Lowin et al. gezeigt werden, welche *in-vitro* eine verminderte Lyse verschiedener Tumormodelle durch Lymphozytenkulturen aus FasL-defizienten Mäusen beobachteten [203]. Weitere Evidenz der Fas/FasL Beteiligung wurde durch Seki et al. erbracht, die beschrieben, dass die *in-vitro* Lyse der verwendeten RenCa Zellen zwar Perforin dominiert verlief, Perforin-defiziente CTL aber eine im Vergleich zu Wildtyp-CTL ähnliche Unterdrückung von experimentellen Metastasen vermittelten [204]. Auch Caldwell und Kollegen konnten diese Beobachtungen bestätigen. Dabei zeigten sie anhand von FasL-defizienten gld-Mausmodellen und einer Concanamycin A Behandlung (Unterbindung der Perforin-abhängigen Zytotoxizität), dass die Fas/FasL-vermittelte Lyse besonders in fortgeschrittenen Stadien zur effizienten Eradikation des Tumors beiträgt [205]. Ein weiterer Mechanismus der Caspase-8-induzierten Apoptose verläuft über die Bindung des aus CTL sezernierten *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) an seine korrespondierenden Todesrezeptoren DR4 und DR5. Zwar ist die genaue physiologische Bedeutung des TRAIL-Signalweges im Kontext der malignen Erkrankungen aufgrund divergenter pro- und antitumorale Beobachtungen nicht abschließend aufgeklärt, dennoch konnte ein antitumoraler Effekt durch TRAIL in einigen Studien beschrieben werden [206–209]. Weitere Beiträge zur Tumoringhibition können durch sezerniertes IFN- $\gamma$  oder TNF- $\alpha$  geleistet werden. IFN- $\gamma$  vermittelt seine Effekte dabei zum Beispiel direkt durch die Induktion einer Caspase-vermittelten Apoptose oder indirekt durch die autokrine Verstärkung der Tötungseffizienz der CD8<sup>+</sup> T-Zellen selbst. Darüber hinaus fördert es die Polarisierung Tumor-assoziiertes Makrophagen zu einem antitumoralen M1 Phänotyp [210–213]. Ähnliche Mechanismen konnten auch für TNF- $\alpha$  beobachtet werden. So zeigten beispielsweise Nie et al., dass TNF- $\alpha$  regulatorische T-Zellen hemmt und somit einer Inhibition von Effektorzellen vorbeugt [214]. Auch ein TNF- $\alpha$ -vermittelter Hemmeffekt der M2 Polarisation Tumor-assoziiertes Makrophagen konnte durch Kratochvill und Kollegen gezeigt werden, der die Balance der Makrophagen-Subpopulation zu einem antitumoralen Charakter drängt [215]. Eine Induktion der Apoptose durch TNF- $\alpha$  konnte ebenfalls gezeigt werden [216]. Als ein weiterer gemeinsamer Mechanismus von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  wurde die Sensibilisierung von Tumorzellen für den Angriff durch das Fas/FasL-System beschrieben [204, 205]. Eine kurze Erwähnung soll IL-17 finden, für welches neben einigen antitumoralen vermehrt protumorale Effekte beschrieben werden. Generell gilt jedoch ebenso für die oben genannten Mediatoren, dass sie situations- bzw. konzentrationsabhängig auch einen protumoralen Effekt vermitteln können [217–219].

### 2.4.3 Natürliche Killerzellen als Schlüsselfiguren der antitumoralen Immunität

Im Gegensatz zu CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten gehören NK-Zellen zur angeborenen Immunabwehr. Durch komplexe Stimuli differenzieren sie über unterschiedliche Zwi-

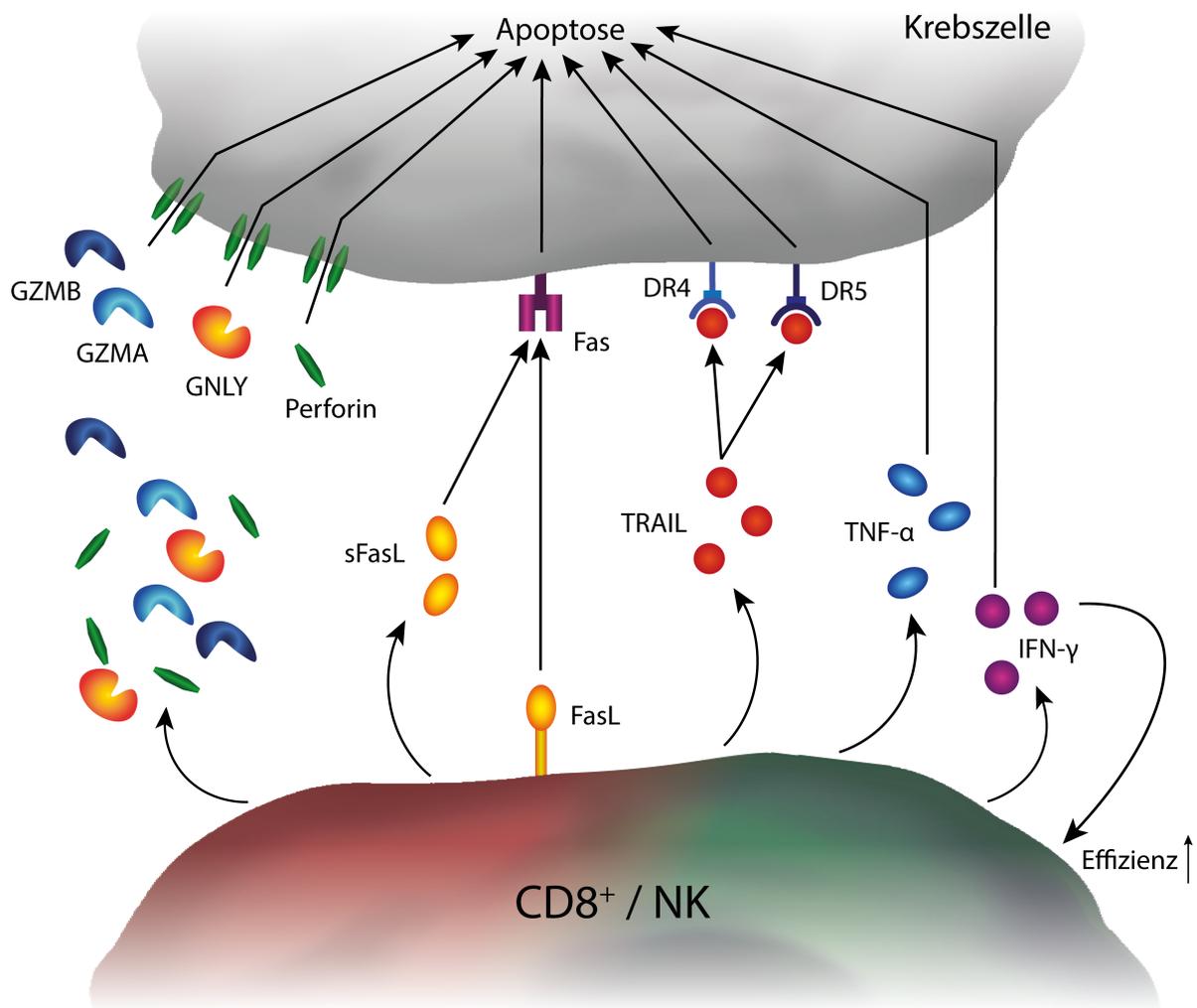


Abbildung 5: Schematische Illustration der durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen bzw. natürliche Killerzellen genutzten Mechanismen zur Eradikation maligner Zellen

schenstufen aus hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks [220]. Als Teil des angeborenen Immunsystems sind sie, im Gegensatz zu den Effektorzellen der adaptiven Immunabwehr, nicht von einer antigenspezifischen Stimulation abhängig. Die Erkennung und Differenzierung, zwischen körpereigenen und infizierten bzw. entarteten Zellen durch NK-Zellen, erfolgt über mehrere Mechanismen. Zum einen können sowohl aktivierende als auch inhibierende Rezeptoren der NK-Zelle die auf der Zielzelle exprimierten MHC-I Komplexe erkennen. Zum anderen können weitere Rezeptoren durch membranständige oder lösliche Liganden angesprochen werden und ihre inhibitorische oder aktivierende Wirkung entfalten. Solange die Balance zwischen den aktivierenden und inhibitorischen Reizen gewahrt ist bzw. die inhibitorischen Signale überwiegen, wird die Zielzelle nicht durch die

NK-Zelle eliminiert. Verliert jedoch eine infizierte oder entartete Zelle ihre Expression des MHC-I Komplexes, können inhibierende Rezeptoren wie NKG2A nicht mehr angesprochen werden und die Zielzelle wird im Zuge der sogenannten „*missing self-recognition*“ erkannt. Es überwiegen die aktivierenden Reize und die NK-Zelle entfaltet ihre lytische Aktivität. Im Zuge einer „*induced self-recognition*“ werden vermehrt aktivierende Rezeptoren wie NKG2D oder NKP44 durch stressinduzierte Liganden der Zielzelle angesprochen, was ebenfalls in der Aktivierung der lytischen Kapazität der NK-Zellen und der Ausformung einer immunologischen Synapse resultiert [221, 222].

Die Infiltration solider Tumore durch eine hohe Zahl NK-Zellen korreliert signifikant mit der Verbesserung des Gesamtüberlebens der malignen Patienten [223]. Ähnlich den zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen sezernieren NK-Zellen zur Eradikation maligner Zellen ihre lytischen Granula. Auch hier konnten Smyth et al. die Beteiligung von Perforin an der NK-Zell-abhängigen Tumorkontrolle in Mausmodellen der spontanen Metastasierung beobachten [224]. Folgend, wurde durch Pardo und Kollegen gezeigt, dass Perforin zwar alleine durch die Störung der Membranintegrität zur Tumorkontrolle befähigt ist, jedoch der Synergismus mit den Apoptose-induzierenden Granzymen A und B eine effektivere Abwehr begründet [225]. Die Abhängigkeit des Granzym B von der Anwesenheit Perforins wurde ebenso durch die Studie von Prager et al. evident. Darüber hinaus zeigten sie in Einzelzell-basierten Messungen, dass sich die Zytotoxizität der NK-Zellen gegenüber HeLa Zellen mit fortschreitender Zeit von einem Perforin/Granzym B-dominierten Mechanismus zu einer Perforin unabhängigen Tötung durch das Fas/FasL-System wandelt, welches über die Aktivierung der Caspase-8 eine Apoptose induziert [226]. Bereits Zhu et al. beschrieben eine essentielle Beteiligung von Fas/FasL an der Lyse der Osteosarkom Zelllinie U-2 OS, welche durch die NK92-MI Zellen auf einem Granzym B-dominierten Weg angegriffen wurden, wohingegen primäre NK-Zellen einen langsameren Fas/FasL-geprägten Mechanismus nutzten [227]. Als weiterer NK-zellulärer Todesligand trägt TRAIL zur Vermittlung der antitumoralen Antwort bei. So konnte die Beteiligung von löslichem, aus NK-Zellen sezerniertem TRAIL an der Unterdrückung der Tumorbildung in Kolonkarzinom-Xenografts durch Song et al. gezeigt werden. Eine Unterstützung der Granzym B Zytotoxizität durch membrangebundenen TRAIL gegenüber Neuroblastomzellen wurde durch Sheard und Kollegen beschrieben. Der unterstützende Effekt des membranständigen TRAIL konnte durch die exogene Zugabe von IFN- $\gamma$  verstärkt werden, was die Autoren auf die Induktion der Caspase-8 Expression, ein essentielles Enzym der TRAIL-induzierten Apoptose, innerhalb der Zielzellen zurückführten [228, 229]. Neben der Sekretion der lytischen Granula, sezernieren NK-Zellen weitere Zytokine wie IFN- $\gamma$  oder TNF- $\alpha$  [230]. Wie bereits im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, können sie über die direkte Induktion einer Apoptose der Zielzellen oder die Regulation weiterer in die Immunantwort eingebundener

Zellen die Tumoreradikation beeinflussen. Darüber hinaus beschrieben Wang et al. einen Mechanismus, nachdem NK-zellulär sezerniertes IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  zu einer Erhöhung der Expression des *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1) seitens der Zielzelle führt. Dies bedingt eine gesteigerte Adhäsion zwischen NK- und Zielzelle und unterstützt die Zellyse. Jedoch kommt der Effekt vor allem in Zielzellen, welche wenig ICAM-1 exprimieren, zum Tragen, wohingegen in Zellen die ein hohes ICAM-1 Basalniveau zeigen die Induktion inhibitorischer HLA-Moleküle zu überwiegen scheint [231]. Eine kurze Erwähnung soll auch das zytotoxische Granulysin finden. Wie bereits für CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten beschrieben kann es durch die Induktion von endoplasmatischem Stress und der Caspase-7 Aktivierung zum Tod der Zielzelle kommen, jedoch ist dieser Mechanismus für NK-Zellen weniger evident. So konnten etwa Huang et al. eine verstärkte Granulysin Expression in homozygoten, murinen Splenozyten im Vergleich zu Knockout Splenozyten beobachten, jedoch hatte die Expression keinen Einfluss auf die Zytotoxizität gegenüber den untersuchten Zielzellen [200, 201].

## 2.5 Die tumorale Immunevasion

Trotz der steten Bemühungen und den vielzähligen Mechanismen des Immunsystems zur Erkennung und Elimination maligner Zellen kommt es dennoch zur Entwicklung von malignen Neoplasien und der Etablierung metastatischer Herde. Dazu trägt bei, dass sich entartete Zellen durch intrinsische und adaptive Mechanismen bzw. die Modulation körpereigener Zellen der Überwachung und Elimination durch das Immunsystem entziehen.

### 2.5.1 Mechanismen der tumoralen Immunevasion im Überblick

Als intrinsischer Mechanismus der Immunevasion kann der Ausschluss von antitumoralen Lymphozyten aus dem Tumorgewebe betrachtet werden. Eine erhöhte Aktivität des Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweges ist ein Mechanismus, mit dem eine geminderte Präsenz von TILs in Melanomen korreliert werden konnte. Entsprechend der Studie von Spranger et al. basiert die verminderte Infiltration durch CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten auf der reduzierten CCL4 Expression der Tumorzellen. Somit konnte keine Rekrutierung von dendritischen Zellen erfolgen, was in einer Hemmung der T-Zell-Infiltration resultierte [232]. Dem gegenüber stehen jedoch die Beobachtungen von Ma und Kollegen, die eine Korrelation zwischen einer erhöhten  $\beta$ -Catenin Expression und der vermehrten Infiltration durch T-Lymphozyten in Brustkrebspatientinnen beschrieben [233]. Ein weiteres Beispiel dieser Immunhemmung ist die, durch eine lokale Hypoxie im tumoralen Gewebe hervorgerufene, VEGF-A Sezernierung, wodurch es zu einer Erhöhung der FasL Präsentation seitens des Tumorendothels kommt. Daraus folgt eine Elimination der T-Zellen und eine verminderte Akkumulation

der T-Zellen innerhalb der malignen Neoplasie [234].

Kommt es zur Infiltration des Tumors durch T-Lymphozyten, vermag dieser sich durch mannigfaltige, adaptive Mechanismen der Immunkontrolle zu entziehen. Ein häufig beobachtetes Phänomen ist dabei der Verlust oder die Reduktion der MHC-I Expression bzw. weiterer an der MHC-I-vermittelten Antigenpräsentation beteiligter Proteine, deren Häufigkeit je nach Entität und Studie variiert. So wurden etwa für Kolorektalkarzinome, Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Halsbereiches oder zervikal Tumore Häufigkeiten von 40 %, 80 % bzw. 90 % für die analysierten Proben beschrieben [235–237]. Ein weiterer Mechanismus der Immunevasion basiert auf der vermehrten Expression von immuninhibitorischen Checkpoint-Molekülen auf der Oberfläche der entarteten Zelle. Dazu zählen die tumoralen Liganden PD-L1, CD80 in geringen Konzentrationen bzw. CD86, die dem Krebs für die Hemmung der Immunantwort zur Verfügung stehen und bereits in der ICI-Therapie durch PD-L1, PD-1 bzw. CTLA-4 Antikörper targetiert werden [238–241]. Darüber hinaus stehen eine Vielzahl weiterer Checkpoints und inhibitorische Ligand-Rezeptor Interaktionen, welche die Tumorabwehr des Immunsystems unterdrücken, im Fokus der Forschung [242]. So ist etwa durch Chen et al. gezeigt, dass eine hohe Expression des *carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1* (CEACAM1) mit der intrazellulären Retention von Liganden des NK-Zell-aktivierenden Rezeptors NKG2D assoziiert ist und so eine Tumorabwehr unterwandert [243]. Zusätzlich zu dieser Hemmung der Erkennung und Aktivierung der Immunzellen kann ebenso durch die Inaktivierung des sezernierten Granzym B die Apoptose-Induktion gemindert werden. Sowohl Soriano et al. als auch Fritsch und Kollegen postulierten eine tumorale Expression des Granzym B inhibierenden Proteinase Inhibitor-9 (PI-9) als Mechanismus der Immunevasion, nachdem sie erhöhte PI-9 Expressionen im Tumorgewebe bzw. in Tumorzelllinien mit einer Verminderung der Granzym B Aktivität und Caspase-3 Aktivierung korrelierten [244, 245].

Ein weiteres Feld der Mechanismen zur Immunevasion ist die Sezernierung verschiedener löslicher Mediatorstoffe seitens der Tumorzellen, welche die Immunantwort modulieren. TGF- $\beta$  gehört durch seine ambivalenten Effekte zu einem der wichtigsten Zytokine im malignen Geschehen [246]. Im Kontext einer Immunsuppression konnte beispielsweise durch einen TGF- $\beta$  shRNA Knockdown in murinen B16 Zellen gezeigt werden, dass tumoraler TGF- $\beta$  über die Induktion der Differenzierung regulatorischer T-Zellen und die Inhibition zytotoxischer T-Lymphozyten zur Suppression des Immunsystems beiträgt [247]. Ebenso kann die Aktivität natürlicher Killerzellen sowie die Antigenpräsentation über dendritische Zellen durch eine tumorale TGF- $\beta$  Sekretion eingeschränkt sein [248–250]. In ähnlicher Weise kann die Sekretion des immunmodulatorischen IL-10 mit einer verschlechterten Prognose der Krebspatienten assoziiert werden, sodass die immunsuppressiven Eigenschaften des IL-10 zu überwiegen scheinen, auch wenn antitumorale Effekte durch die Unterstützung

und Aktivierung von NK-Zellen sowie CD8<sup>+</sup> Effektorzellen beschrieben sind [251–256]. Ähnlich dem sezernierten TGF- $\beta$  ist auch IL-10 in der Lage die Differenzierung immunsuppressiver, regulatorischer T-Zellen zu fördern und die Aktivität von CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> Effektorzellen zu hemmen [179, 257]. Darüber hinaus kann es in Synergie mit IL-4 zur Polarisierung der Makrophagen zum immunregulatorischen M2-Typ beitragen und folglich eine Progression der malignen Neoplasie begünstigen [258, 259]. Wie bereits in Kapitel 2.4.1 angedeutet kann ATP über CD39 und CD73 zu Adenosin abgebaut werden und so die T-Zell-vermittelte Immunantwort modulieren. ATP wird über eine Vielzahl verschiedener Mechanismen aus diversen Zellen freigesetzt und stellt einen der Hauptmediatorstoffe in der Tumormikroumgebung dar [260]. Ein Umsatz zu Adenosin kann beispielsweise durch die Tumorzellen selbst oder die Anwesenheit CD39 und CD73 positiver T<sub>regs</sub> erfolgen, wodurch es zum immunsuppressiven Charakter der Tumormikroumgebung beiträgt [261, 262]. So kann eine Tumorevasion durch die Adenosin-vermittelte Differenzierung naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu T<sub>regs</sub> bzw. die Polarisierung Tumor-assoziiierter Makrophagen zum M2-Typ begünstigt sein [263, 264]. Des Weiteren wurde durch Mastelic-Gavillet und Kollegen gezeigt, dass Adenosin zur Hemmung der Aktivität tumorinfiltrierender CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten befähigt ist [265]. Auch NK-Zellen als Effektoren der angeborenen Immunabwehr können durch Adenosin inhibiert werden. Young et al. zeigten, dass eine Stimulation des Adenosinrezeptors A<sub>2A</sub> zu einer Hemmung der NK-Zellreifung und Tumorabwehr beiträgt [266]. Eine schematische Übersicht wichtiger Evasionsmechanismen ist in Abbildung 6 illustriert.

### 2.5.2 Der Beitrag der Thrombozyten zur tumoralen Immunevasion

Folgend soll die Rolle der Tumorzell-Thrombozyten Interaktion in der Immunevasion betrachtet werden. Wie bereits in den Abschnitten 2.2.1 und 2.2.2 dieser Arbeit dargelegt, sind metastasierende Tumorzellen dazu befähigt Thrombozyten durch eine Vielzahl verschiedener Mechanismen zu aktivieren und dies zu ihrem Vorteil zu nutzen. Dabei können Thrombozyten durch die Ummantelung disseminierender Tumorzellen nicht nur einen mechanischen Schutz gegen die Scherkräfte des Blutes bieten, sondern die Zellen auch vor einer Erkennung durch das Immunsystem schützen [33]. Ein Weg dieses Schutzes wurde durch Placke et al. beschrieben und basiert auf dem Transfer thrombozytärer MHC-I Komplexe auf die Zelloberfläche metastasierender Tumorzellen. Als Folge dessen konnten sie nach einer Inkubation mit Thrombozyten eine geminderte lytische Reaktivität gegenüber den untersuchten Tumorzellen beobachten [31]. In ähnlicher Weise konnte auch für den thrombozytären *receptor activator of NF- $\kappa$ B Liganden* (RANKL) und seine Bindung an *receptor activator of NF- $\kappa$ B* (RANK) eine Minderung der lytischen Kapazität der NK-Zellen gezeigt werden [267]. Als ein weiterer Mechanismus der Immunevasion wurde

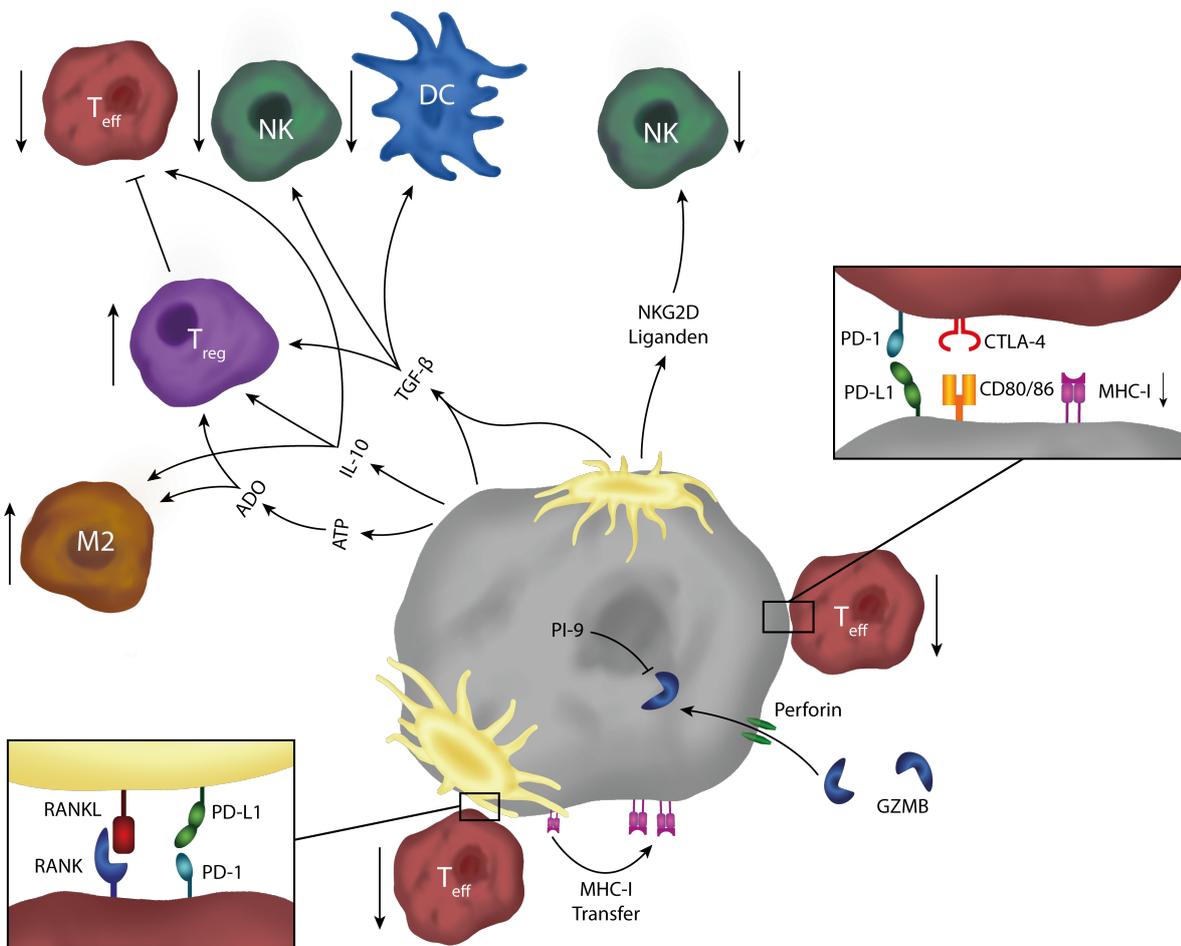


Abbildung 6: Dargestellt sich wichtige Mechanismen, derer sich eine Tumorzelle bedient um der antitumoralen Immunantwort zu entkommen

durch Maurer et al. postuliert, dass Thrombozyten durch die Freisetzung auf der Oberfläche maligner Zellen gebundener NKG2D Liganden die Reaktivität natürlicher Killerzellen herabsetzen [268]. Weiterhin beobachteten Zaslavsky et al., dass die Co-Inkubation PD-L1 negativer Tumorzellen mit Thrombozyten, welche zur Präsentation des PD-L1 befähigt sind, zu einer Hemmung der antitumoralen Immunantwort der untersuchten T-Zellen beiträgt. Interessanterweise konnte die Applikation von Acetylsalicylsäure diesen Beitrag zur Immunevasion in einem ähnlichen Ausmaß antagonisieren, wie der Einsatz eines PD-L1 neutralisierenden Antikörpers [269].

Neben diesen Effekten einer Ummantelung werden im Zuge der Thrombozytenaktivierung mannigfaltige Mediatoren aus den thrombozytären Granula sezerniert, welche zur immun-suppressiven Tumormikroumgebung beitragen können. Beispielhaft sei an dieser Stelle die durch Kopp et al. gezeigte Hemmung der zytolytischen Aktivität natürlicher Killerzellen als Konsequenz einer Thrombozyten Stimulation durch Tumorzellen genannt. Dabei

identifizierten sie die Freisetzung von aktivem TGF- $\beta$  aus thrombozytären  $\alpha$ -Granula als maßgeblichen Mediator der Inhibition einer NKG2D-abhängigen zytolytischen Aktivität der natürlichen Killerzellen [32].

Weitergehende Angaben über die immunmodulatorische Kapazität der Thrombozyten sind in den Abschnitten 2.6 und 2.6.1 aufgeführt.

## 2.6 Thrombozyten als Akteure im Immunsystem

Die Bedeutung der Thrombozyten als essentielle Akteure der Hämostase ist unumstritten und seit Langem bekannt. In den letzten Jahren werden Thrombozyten jedoch mehr und mehr als immunkompetente Zellen betrachtet und mit Blick auf ihre Rolle im entzündlichen und immunologischen Geschehen untersucht. In den folgenden Abschnitten soll ein kurzer Überblick über die intrinsischen, also die direkten Effektorfunktionen der Thrombozyten sowie über die modulierenden Eigenschaften gegenüber weiteren immunkompetenten Zellen gegeben werden.

### 2.6.1 Intrinsische Immunkompetenz

Eine direkte Abwehr von Pathogenen durch Thrombozyten ist nach aktuellem Stand nicht abschließend untersucht. Dennoch gibt es einige Studien, die vor allem eine potentielle Elimination von Viren und Mikroorganismen durch thrombozytäre Effekte beschreiben, wohingegen einzelne Studien auch antitumorale Aktivitäten beleuchten. Youssefian et al. zeigten in ihren Untersuchungen, dass Thrombozyten sowohl HI-Viren als auch *Staphylococcus aureus* internalisieren können. Dabei postulierten sie, dass eine Fusion der Vesikel mit den  $\alpha$ -Granula zur Elimination der Pathogene beitragen könnte, jedoch die intrazelluläre Lokalisation der Erreger ebenso einen schützenden Effekt haben und zum Erhalt der Infektion beitragen könnte [270]. Inzwischen konnte gezeigt werden, dass eine Vielzahl verschiedener antimikrobieller und antiviraler Moleküle in den thrombozytären  $\alpha$ -Granula präsent ist. Zu diesen sogenannten Kinocidinen gehören verschiedene Chemokine der CC und CXC Familie wie die CXCL7 Fragmente *thrombocytin 1* und *2*, PF4 (CXCL4) oder auch RANTES (CCL5) [271–273]. Darüber hinaus wurden *cationic host defense peptides* (CHDP) wie die *human  $\beta$ -defensins* (HBD), *human neutrophil peptides* (HNP) und LL-37 als antimikrobielle Mediatoren humaner Thrombozyten identifiziert [274–276]. Neben den antimikrobiellen Aktivitäten konnten für einige Substanzen auch Nachweise über die antitumoralen Kapazitäten erbracht werden. Gaspar et al. beschrieben etwa eine Schädigung der Zellmembran und Induktion der Apoptose durch die Behandlungen der humanen Prostatakarzinom-Zelllinie PC-3 mit HNP-1 [277]. Eine mögliche Rolle in der Tumorsuppression wird durch Sun et al. auch für HBD-1 postuliert [278]. Ebenso

konnte durch Okumura und Kollegen gezeigt werden, dass die Peptidsequenz 109-135 des LL-37 Proteins in der Lage ist, durch die Schädigung der mitochondrialen Membran eine Apoptose in oralen Plattenepithelkarzinomzellen zu induzieren, jedoch nicht karzinogene Zellen unbeeinflusst blieben [279]. Untermuert werden diese Daten durch die Befunde von Ren et al., welche eine p53-abhängige, aber Caspase-unabhängige Induktion der Apoptose in Kolonkarzinomen beschrieben und zeigten, dass Cathelicidin-defiziente Mäuse anfälliger für eine induzierte Karzinogenese sind [280]. Dennoch sind auch protumorale Effekte beschrieben, sodass eine abschließende Bewertung der LL-37 Rolle im Kontext maligner Erkrankungen ausstehend ist [281, 282]. Generell erweisen sich Thrombozyten somit als potentielle Akteure in der antitumoralen Antwort des Organismus. Zur Beurteilung ihrer Rolle bedarf es jedoch weiterer, tiefergehender Analysen der vielfältigen Mechanismen die durch direkte Interaktionen sowohl pro- als auch antitumorale Effekte vermitteln können.

### 2.6.2 Modulation immunkompetenter Zellen durch Thrombozyten

Wie bereits in den vorangegangenen Abschnitten angemerkt stellen die thrombozytären Granula Speicherorte für vielzählige bioaktive Mediatoren dar. Im Zuge einer Thrombozytenaktivierung werden diese freigesetzt und entfalten ihre Effekte auch auf Zellen des Immunsystems. Thrombozyten stellen die Hauptquelle des im peripheren Blut befindlichen TGF- $\beta$  dar [283]. Ergänzend zu den Ausführungen in den Abschnitten 2.4.1 und 2.5.1 ist nicht nur Tumor sezernierter, sondern auch thrombozytärer TGF- $\beta$  in der Lage die Differenzierung konventioneller CD4<sup>+</sup> T-Zellen zum regulatorischen Phänotyp zu induzieren, wodurch eine Proliferation von CD4<sup>+</sup> Effektorzellen unterdrückt wird [284, 285]. Nicht nur die Proliferation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen, sondern ebenfalls die Aktivität zytotoxischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen wird durch Thrombozyten-Releasates gemindert. Dies zeigten Rachidi et al. in ihrer Studie durch die Analyse verschiedener T-Zell-Zytokine und die Verwendung von Tumor-Mausmodellen. Dabei identifizierten sie TGF- $\beta$  und Laktat als die Hauptmediatoren der Immunsuppression Thrombin-induzierter Thrombozyten-Releasates. In Knockout-Versuchen präsentierte sich vor allem die Aktivierung von TGF- $\beta$  durch den auf Thrombozyten exprimierten Rezeptor *glycoprotein A repetitions predominant* (GARP) als essentiell für die Releasate-vermittelte CTL Inhibition [286]. Die Hemmung der zytotoxischen Aktivität und IFN- $\gamma$  Sekretion natürlicher Killerzellen, als weitere Effektoren des Immunsystems, konnten Kopp et al. durch die Verwendung von neutralisierenden Antikörpern auf die Präsenz von TGF- $\beta$  in den Releasates Thrombin-aktivierter Thrombozyten zurückführen [32]. Darüber hinaus ist im Kontext maligner Erkrankungen die bereits angeführte, durch TGF- $\beta$  forcierte, M2 Polarisation Tumor-assoziiierter Makrophagen relevant [287]. Neben diesen direkten Beeinflussungen der verschiedenen Effektoren, kann die Hemmung der Immunantwort ebenfalls durch eine TGF- $\beta$ -vermittelte Störung der

dendritischen Antigenpräsentation erfolgen [250].

Zusätzlich zu seinen antimikrobiellen Eigenschaften ist PF4 befähigt durch die Inhibition der Th17 Differenzierung auf die Immunantwort einzuwirken. Einhergehend mit der geringeren Verfügbarkeit von IL-17 in Knockout-Mäusen konnten Kryczek et al. eine geminderte Expression des immunstimulierenden IFN- $\gamma$  durch CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten sowie NK-Zellen in tumorableitenden Lymphknoten detektieren [288, 289]. Ein weiterer Mediator mit sowohl antimikrobiellen als auch indirekten, immunzellstimulierenden Eigenschaften ist RANTES. Weiterhin scheint RANTES in der Abwehr chronischer Infekte eine Rolle zu spielen, da seine Abwesenheit in Knockout-Modellen zu einer geringeren Zytokinproduktion und einer vermehrten Expression inhibitorischer Rezeptoren seitens der CD8<sup>+</sup> T-Zellen führte [290]. Durch von Hundelshausen et al. konnte etwa gezeigt werden, dass aus Thrombozyten sezerniertes RANTES am aktivierten Endothel arterieller Gefäße immobilisiert wird und durch die Bindung über die RANTES-Rezeptoren zum Arrest rekrutierter Monozyten beiträgt [291]. In ähnlicher Weise beschrieben Danese und Kollegen, dass durch die Bindung zwischen dem thrombozytären Rezeptor CD40 und des seitens der T-Zellen exprimierten CD40L eine Freisetzung von RANTES aus den stimulierten Thrombozyten induziert wird. Dieses vermittelte wiederum die Bindung der T-Zellen an aktivierte Endothelzellen, was ebenso wie die Bindung von Monozyten zur Extravasation der Immunzellen in entzündliche Gewebe essentiell ist [292]. CD40L wird von einer Reihe verschiedener Zellen, darunter auch Thrombozyten, exprimiert. Gegenüber der Störung einer Antigenpräsentation durch TGF- $\beta$  steht die Erkenntnis, dass thrombozytäres CD40L zu einer Reifung der dendritischen Zellen und zur Aktivierung zytotoxischer CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten beiträgt [293, 294]. Eine Beteiligung der Thrombozyten an der Verhinderung letaler Hämorrhagien konnten Iannacone et al. in einem mit Lymphozytären Choriomeningitis-Viren (LCMV) infiziertem Mausmodell beobachten. Dabei zeigten sie, dass Thrombozyten über CD40L effektiv die CTL-vermittelte Viruseradikation verstärkten [295]. Zusätzlich wurde in den Studien von Elzey und Kollegen sowie Cognasse et al. evident, dass thrombozytäres CD40L die Produktion von Immunglobulinen der Klasse G (IgG) in B-Lymphozyten steigern kann [293, 296]. Ein weiterer interessanter Mechanismus durch den Thrombozyten eine Immunantwort modulieren können, wurde durch Verschoor und Kollegen beschrieben. Demnach fungieren Thrombozyten als Transporter, welche über den Komplementfaktor C3 mit Gram-positiven Bakterien assoziieren und diese zu CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> DC transportieren. Einhergehend wurde die verstärkte Expansion viruspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen detektiert [297].

Die umfassende Rolle der Thrombozyten, mit wechselnden Funktionen, im Verlauf von Lungenentzündungen wird durch die Studien von Rossaint und Kollegen aus den Jahren 2016 und 2021 ersichtlich. So sind sie an der Einwanderung bzw. Aktivierung neutrophiler

Granulozyten zu Beginn einer bakteriellen Lungenentzündung und der damit einhergehenden Infektabwehr beteiligt [298]. Im Verlauf der Erkrankung ändert sich die Rolle der Thrombozyten, sodass sie schließlich auch für die Aufhebung der entzündlichen Reaktion essentiell sind. Dabei induzieren sie eine Apoptose der intraalveolären neutrophilen Granulozyten. Darüber hinaus zeigten sie, dass auch die  $T_{reg}$  Rekrutierung in die tiefen Atemwege und die damit einhergehende Präsenz antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10 und TGF- $\beta$  einer thrombozytären Interaktion unterliegt. Als einen weiteren Beitrag zur Aufhebung des entzündlichen Geschehens identifizierten Rossaint et al. eine Thrombozyten und  $T_{reg}$ -vermittelte Polarisation intraalveolärer Makrophagen zu einem antiinflammatorischen Phänotyp [299].

Erneut zeichnet sich auch hier ein divergentes Bild der verschiedenen situationsabhängigen Thrombozyteneffekte im immunologischen Kontext ab. Aufgrund ihrer Speicherkapazität für eine Vielzahl unterschiedlicher bioaktiver Moleküle stellen die aufgeführten Mechanismen mitnichten die vollumfängliche Breite der potentiell immunmodulatorischen Effekte dar, sodass es weiterer Studien bedarf um eine differenzierte Beurteilung der thrombozytären Rolle im Immungeschehen zu ermöglichen [300].

## 2.7 Antikoagulantien

Unter dem Begriff der Antikoagulantien wird eine Gruppe verschiedener Wirkstoffe vereint, welche durch die Interaktion mit den Blutgerinnungsfaktoren die Balance der Hämostase in Richtung eines antikoagulierten Stadiums drängen. Zum Einsatz kommt diese Wirkstoffgruppe bei einer Vielzahl unterschiedlicher Indikationen. So finden Antikoagulantien etwa Anwendung in der Therapie und Prophylaxe thromboembolischer Ereignisse wie tiefen Venenthrombosen oder Lungenembolien, in der Schlaganfall- und Reinfarktprophylaxe komorbider Patienten sowie in der postoperativen und immobilisationsbedingten Thromboseprophylaxe [292–294]. Die antikoagulatorischen Wirkungen der verschiedenen Stoffe basieren auf der Hemmung unterschiedlicher Schlüsselspieler der Gerinnungskaskade. Dabei lässt sich zwischen indirekten, also Kofaktor-abhängigen Antikoagulantien und direkten Antikoagulantien, welche direkt die Gerinnungsfaktoren hemmen, unterscheiden. Auf Seite der indirekten Antikoagulantien stehen zum Beispiel die peroral verfügbaren Vitamin-K-Antagonisten Phenprocumon und Warfarin, die durch die Hemmung der Vitamin-K-Epoxid-Reduktase die Synthese der Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X inhibieren [295]. Darüber hinaus stehen das subkutan injizierte Heparin, die degradierten niedermolekularen Heparine (LMWH) wie Enoxaparin oder Tinzaparin sowie das synthetische Pentasaccharid Fondaparinux zur Verfügung, welche Antithrombin III (ATIII)-abhängig die Aktivität von Thrombin bzw. Faktor Xa hemmen [296, 297]. Seitens der direkten Antikoagulantien erfolgt eine direkte Hemmung des Thrombins durch Hirudin-Derivate wie Bivalirudin

oder das *small molecule* Argatroban, welche zur intravenösen Antikoagulation bei der perkutanen Koronarintervention bzw. der Heparin-induzierten Thrombozytopenie Typ II (HIT-II) indiziert sind [298, 299]. Zur peroralen Therapie werden außerdem der direkte Thrombininhibitor Dabigatran sowie die direkten Faktor Xa Inhibitoren Rivaroxaban, Apixaban und Edoxaban verwendet, welche ohne den Bedarf weiterer Kofaktoren eine reversible Hemmung der Gerinnungsfaktoraktivität vermitteln [300].

### 2.7.1 Antikoagulantien in der onkologischen Therapie

Wie bereits in Abschnitt 2.2.1 dieser Arbeit dargelegt können Tumorzellen bzw. Tumormikropartikel TF auf ihrer Oberfläche präsentieren und so zur Aktivierung der Blutgerinnungskaskade beitragen [52, 53]. Dies resultiert in einer 9-fach erhöhten Inzidenz venöser Thromboembolien in Krebspatienten [5]. Je nach Entität des Krebsleidens führt diese Steigerung dazu, dass schätzungsweise zwischen 3 bis 20 % der Krebspatienten eine VTE entwickeln [301, 302]. Deutlich wird dies auch bei Betrachtung des Anteils maligner Neoplasien an der VTE-Inzidenz, welcher mit etwa 20 % beziffert wird [303]. Die besondere Bedeutung des Auftretens einer VTE im Kontext einer malignen Neoplasie wird durch die drastische Reduktion des Gesamtüberlebens der Patienten deutlich. So ist, im Vergleich zu Krebspatienten ohne Entwicklung einer VTE, die 1-Jahres-Überlebensrate auf ein Drittel reduziert [6]. Folglich werden in aktuellen Leitlinien der *International Initiative on Thrombosis and Cancer* (ITAC) sowie des *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) für die Therapie und Prophylaxe von VTE vor allem der Einsatz von LMWH, aber auch unfraktioniertem Heparin, Fondaparinux oder der neueren direkten oralen Antikoagulantien (DOAK) empfohlen [7, 8]. Bis heute wurden in einer Vielzahl verschiedener Studien die Sicherheit und Effektivität von LMWH zur Prävention thromboembolischer Ereignisse in malignen Erkrankungen untersucht [304–306]. Dabei konnte in einer nachfolgenden Analyse der Daten des Gesamtüberlebens, der im Jahr 2003 veröffentlichten CLOT Studie zum Vergleich von Dalteparin und VKA in Krebspatienten, keine Differenz im Überleben des gesamten Patientenkollektivs detektiert werden. In der Subgruppe der Patienten ohne bereits bekannte Metastasen brachte die Applikation von Dalteparin jedoch einen signifikanten Überlebensvorteil im Beobachtungszeitraum von 12 Monaten [307]. In der nachfolgenden randomisierten Studie (RCT) *Fragmin Advanced Malignancy Outcome Study* (FAMOUS) wurde der Effekt einer täglichen Dalteparin-Gabe auf das Überleben von 374 Patienten in fortgeschrittenen Krankheitsstadien verschiedener Tumorentitäten untersucht. Trotz einer leichten Tendenz konnte der Effekt einer Dalteparin-Therapie keine Signifikanz in der gesamten Studienpopulation erreichen. Dennoch konnte auch in dieser Studie Dalteparin einen signifikanten Überlebensvorteil für die Patienten erbringen, welche zu Beginn der Studie eine vergleichsweise gute Prognose hatten [10]. Eine ähnliche Studie

von Klerk et al. zeigte, dass eine 6-wöchige Gabe von Nadroparin das mediane Überleben der Studienpopulation über den Beobachtungszeitraum von einem Jahr signifikant steigert, wobei auch hier der Effekt in der Subpopulation mit einer Lebenserwartung von mehr als 6 Monaten ausgeprägter war [308]. Im Jahr 2015 präsentierten Pelzer et al. die Ergebnisse ihrer Studie CONKO-004. Ziel der Studie war die Evaluation einer prophylaktischen Enoxaparin-Gabe als Zusatz zur First-Line-Chemotherapie in ambulanten Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinomen. Wie zu erwarten, konnte die Inzidenz venöser Thromboembolien signifikant gesenkt werden, jedoch konnte weder für das progressionsfreie Überleben noch für das Gesamtüberleben ein Vorteil durch die zusätzliche Antikoagulation verzeichnet werden [309]. Ein Jahr später wurden die Ergebnisse der FRAGMATIC Studie vorgestellt, welche die Frage nach einem Überlebensvorteil durch die zusätzliche Gabe von Dalteparin zur Standardtherapie an einem 2202 Personen umfassenden, an Lungenkrebs erkranktem, Patientenkollektiv untersuchen sollte. Wie bereits die CONKO-004 Studie konnten auch hier durch Macbeth et al. weder ein Effekt auf das Gesamtüberleben noch auf die Ausbildung von Metastasen berichtet werden [310]. Bestätigung fanden diese Beobachtungen auch in zwei weiteren Studien an Lungenkrebspatienten. So konnte weder in der RASTEN Studie für das LMWH Enoxaparin noch in der TILT Studie für Tinzaparin ein signifikanter Vorteil gegenüber der Vergleichsbehandlung detektiert werden [311, 312]. Nach dieser Serie ernüchternder Studien brachte die kürzlich veröffentlichte PaCT Studie von Karamouzis und Kollegen eine erneute Wendung und befeuerte die Diskussion um mögliche Überlebensvorteile unter einer antikoagulativen Therapie. Untersucht wurde hier der Einfluss von Tinzaparin auf das progressionsfreie Überleben von Patienten mit fortgeschrittenen Pankreaskarzinomen. Karamouzis et al. berichten von einer signifikanten Steigerung des progressionsfreien Überlebens der Patienten unter einer Tinzaparin-Therapie. Dabei scheinen weitere Faktoren, wie die Lokalisation des Karzinoms am Pankreaskopf oder ein Body-Mass-Index unter 25, einen positiven Einfluss auf das progressionsfreie Überleben zu haben [9].

Bei der Beurteilung dieser Studienergebnisse gilt es jedoch einige wichtige Punkte zu berücksichtigen. So scheint es, dass insbesondere Patienten mit einer besseren Prognose und einer begrenzten Progression der Erkrankung bei Studienantritt von der Antikoagulation in der FAMOUS Studie und der Studie von Klerk et al. profitierten [10, 308]. In den Studien FRAGMATIC und RASTEN wurden beispielsweise überwiegend Patienten in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien rekrutiert [310, 312]. Darüber hinaus variieren die Behandlungszeiträume zwischen den Studien teils enorm, mit bis zu einem Jahr Dalteparin Therapie in der FAMOUS Studie bzw. maximal 6 Wochen in der Studie von Klerk und Kollegen [10, 308]. Als ein Nachteil der PaCT Studie sei etwa genannt, dass zur Schätzung des progressionsfreien Überlebens der Kontrollgruppe ein Datenpool aus 14 weiteren Stu-

dien herangezogen wurde, statt der Randomisierung eines eigenen Kontrollarms innerhalb der Studie [9].

Trotz den Bemühungen der verschiedenen Studien einen vorteilhaften Effekt der LMWH-Therapie auf das Gesamtüberleben der Krebspatienten zu evaluieren, bleibt diese Frage bis heute größtenteils unbeantwortet und umstritten. Nicht zuletzt auf Grundlage dieser Studienergebnisse bestehen große Bemühungen in der präklinischen Forschung potentielle antimetastatische Effekte der Heparine zu entschlüsseln (vgl. Abschnitt 2.7.2).

### 2.7.2 Antimetastatische Effekte des Heparins

Die Grundlage für den jahrzehntelangen Therapieerfolg des Heparins bereiteten die Entdeckungen des Medizinstudenten Jay McLean, der bereits im Jahr 1916 eine antikoagulatorische Wirkung verschiedener Organextrakte beobachtete [313]. Als Glykosaminoglykan stellt Heparin ein unverzweigtes Polysaccharid dar. Strukturell besteht es aus einer alternierenden Abfolge der drei Monomere  $\beta$ -D-Glucuronsäure,  $\alpha$ -L-Iduronsäure und N-acetyl- $\alpha$ -D-Glucosamin mit einem variierenden Grad an N-, 2-O- bzw. 6-O-Sulfatierungen [314]. Aufgrund seiner strukturellen Größe, im Mittel 16.000 Da, und der starken anionischen Ladung ist Heparin zur Interaktion mit einer Vielzahl verschiedener Zytokine und Rezeptoren befähigt. Nicht zuletzt durch die Anstrengungen der Grundlagenforschung konnten bis heute einige Zielstrukturen und Interferenzpunkte beschrieben werden, die zu einer potentiellen antimetastatischen Wirksamkeit des unfraktionierten Heparins und der kleineren, 4.500 bis 6.500 Da großen, LMWH beitragen könnten [11, 315–317].

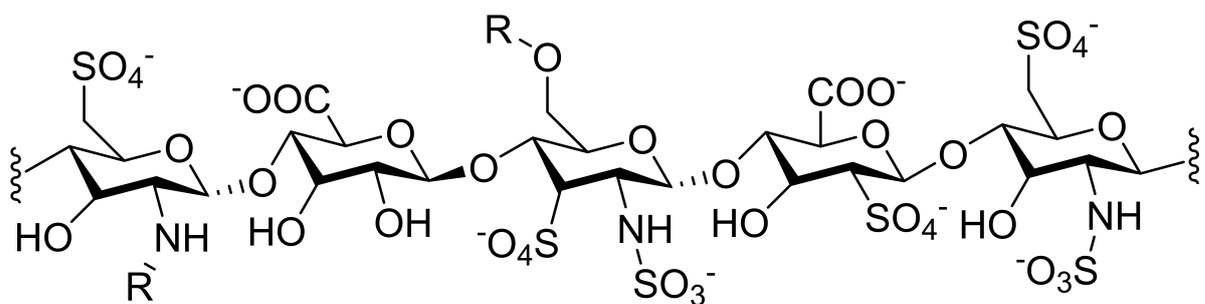


Abbildung 7: Dargestellt ist die essentielle Antithrombin-III-Bindungssequenz des Heparins

Eine sicherlich zentrale Rolle in der Ausbildung antimetastatischer Effekte spielt die Heparin-vermittelte Hemmung des Thrombins. Wie bereits wiederholt in den vorangegangenen Abschnitten dieser Arbeit angeführt, ist Thrombin, neben der Vermittlung der Koagulation, in der Lage Thrombozyten über die Aktivierung des PAR-1 Rezeptors zu stimulieren und so eine Ausbildung von Tumorzell/Thrombozyten Heteroaggregaten zu begünstigen [57, 318]. Folglich stellt die Hemmung des Thrombins einen Angriffspunkt

dar, der den Schutz der Tumorzelle vor dem intravaskulären Scherstress und der Immunerkennung adressiert. Neben der Expression des PAR-1 auf Thrombozyten ist dieser ebenso auf der Oberfläche endothelialer Zellen lokalisiert [319]. Im Zuge einer Aktivierung des PAR-1 Rezeptors durch Thrombin kommt es zu einer prometastatischen Modulation der Endothelbarriere. So werden etwa wichtige Adhäsionsmoleküle wie z.B. E-Selectin und VCAM-1 in ihrer Expression gesteigert oder P-Selectin und von Willebrand Faktor aus den endothelialen *Weibel-Palade-Bodies* an der Zelloberfläche präsentiert [320–322]. Wie bereits in den Abschnitten 2.3.1 bis 2.3.3 dargelegt, unterstützt dies im Kontext der hämatogenen Metastasierung den Arrest metastasierender Tumorzellen am Endothel. Darüber hinaus resultiert etwa die Bindung der Tumorzellen an E-Selectin, aber auch die direkte Aktivierung des PAR-1 durch Thrombin, in einer Störung der Integrität des endothelialen Monolayers, welche wiederum mit einer erleichterten Extravasation maligner Zellen einhergeht [118, 323]. Es sei jedoch erwähnt, dass bei einer gleichzeitigen Bindung des aktivierten Protein C an den PAR1-assoziierten endothelialen Protein C Rezeptor (EPCR) ebenfalls eine antimetastatische Modulation des Endothels erfolgen kann [324]. Aufgrund seiner verbreiteten Expression ist PAR-1 auch auf Tumorzellen zu finden. Dort konnten verschiedene protumorale Effekte durch eine Thrombin Stimulation gezeigt werden. Etwa fördert die PAR-1 Aktivierung die Proliferation bzw. die invasive Kapazität maligner Zellen und unterbindet die Apoptose [325, 326]. Alturkistani et al. beschrieben weiterhin, dass Enoxaparin selbst, durch die Beeinflussung des PAR-1 Rezeptors, die Proliferation und Migration von A549 Lungenkarzinomzellen senken kann [327]. Die genannten Effekte zeigen potentielle Interferenzpunkte auf und verdeutlichen die Komplexität einer Heparin-vermittelten Inhibition des Thrombins im Kontext antimetastatischer Effekte.

Deutlich direkteren Einfluss auf die Inhibition der Metastasierung nehmen Heparine durch die Bindung und Blockade metastasierungsrelevanter Adhäsionsmoleküle auf der Tumorzell/Endothel bzw. Tumorzell/Thrombozyten Ebene. Eine direkte Bindung des Heparins an P-Selectin wird durch Wang. et al. mit einem  $K_D$  Wert von  $115 \pm 6$  nM angegeben und resultiert in einer Hemmung der Adhäsion von A375 Melanomzellen an immobilisiertes P-Selectin ( $IC_{50} = 3 \mu\text{M}$ ) [328]. In Bezug auf die adhäsive Wechselwirkung zwischen Tumorzellen und Thrombozyten konnte durch Liebsch und Schillers in einer kürzlich erschienen Studie die Bedeutung der P-Selectin Blockade mittels Heparin durch die Verwendung der *Single Cell Force Spectroscopy* auf der Einzelzellebene veranschaulicht werden [329]. Weitere Evidenz findet die Relevanz der Heparin P-Selectin Bindung in den Experimenten von Ludwig und Kollegen. Sie zeigten, dass Heparin sowohl das P-Selectin-abhängige Rollen entlang des Endothels als auch die Ausbildung metastatischer Herde in Wildtypmäusen reduzierte. Jedoch war in P-Selectin Knockout-Mäusen kein Effekt des Heparins zu verzeichnen [107]. In einem ähnlichen Versuchsaufbau berichteten Borsig et al.

ebenfalls über die antimetastatische Eigenschaft des Heparins in Wildtyp- und P-Selectin Knockout-Versuchstieren. Darüber hinaus identifizierten sie auch eine prometastatische Rolle des auf Leukozyten exprimierten L-Selectins, welche gleichermaßen einer Inhibition durch Heparin unterliegt [110, 330]. Konträr verhält es sich mit dem ebenfalls metastasierungsrelevantem E-Selectin (vgl. Abschnitt 2.3.2). Entgegen den vorherigen Ausführungen zum Einfluss auf P-Selectin, scheint Heparin selbst keine Bindungsaffinität gegenüber E-Selectin zu besitzen, sodass die E-Selectin-vermittelte Adhäsion der Tumorzellen an die endotheliale Gefäßwand nicht beeinträchtigt wird [331, 332].

Neben dem Selectin-abhängigen Zellrollen wird auch der stärkere Arrest der Tumorzellen über die VLA-4/VCAM-1 Bindung durch Heparin bzw. LMWHs adressiert. Zum Beispiel beschrieben Fritzsche et al., dass murine B16F10 Melanomzellen in der Lage waren P-Selectin-unabhängig an Endothelzellen zu binden. An immobilisiertem VCAM-1 zeigten sie eine Hemmung der Zelladhäsion durch die Vorinkubation der B16F10 Zellen mit unfraktioniertem Heparin bzw. Enoxaparin und postulierten, dass die Inhibition auf der Bindung der Heparine an tumoral exprimiertes VLA-4 beruht [333]. In ihren nachfolgenden Arbeiten konnten Schlesinger et al. die Bindung des VLA-4 durch niedermolekulare Heparine wie Tinzaparin oder Enoxaparin als Mechanismus dieser Hemmung bestätigen und detektierten  $K_D$  Werte von 4,61 bzw. 2,22  $\mu\text{M}$  [334, 335]. Neben VLA-4 können auch weitere Intergrine mit einer Rolle in der Metastasierung durch Heparin in ihrer Funktion beeinträchtigt sein. So zeigten Zhang et al. etwa, dass die adhäsive Wechselwirkung zwischen Melanomzellen und Thrombozyten Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  dominiert ist und durch Heparin gestört werden kann. Folglich wurde die Assoziation der Thrombozyten und Tumorzellen reduziert, sodass zu erwarten war, dass die prometastatischen Effekte der Thrombozyten weniger zum Tragen kommen, was sich in der reduzierten Ausbildung metastatischer Läsionen bestätigte [336]. Die Überexpression der Heparanase ist in einer engen Weise mit einer limitierten Prognose und einer Progression der Erkrankung in Krebspatienten assoziiert [337–340]. Enzymatisch ist die Heparanase am Abbau der EZM beteiligt und schneidet Heparansulfate, wodurch eine weite Bandbreite an protumorigenen Wachstumsfaktoren und Zytokinen mit mannigfaltigen Effekten aus Heparansulfat-Proteoglykanen freigesetzt werden können. Darüber hinaus besitzt die Heparanase auch eine nicht-enzymatische Aktivität und vermittelt so beispielsweise eine Apoptoseresistenz [341, 342]. Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit gegenüber Heparansulfaten präsentieren sich Heparin und LMWHs als potente Inhibitoren der enzymatischen Aktivität der Heparanase [343, 344]. Im Kontext der Metastasierung wurde durch Cassinelli und Kollegen die Hemmung des *in-vivo* Tumolvolumens sowie der *in-vitro* Proliferation bzw. Invasion durch die Behandlung mit einem Heparanase-inhibierendem, supersulfatiertem LMWH beschrieben. Darüber hinaus beobachteten sie eine Reduktion der IGF1R/IR Phosphorylierung. Durch die gleichzeitige Applikation

des supersulfatierten Heparins und eines IGF1R Inhibitors konnten sie die Tumorprogression durch einen Synergismus weiter reduzieren [345]. Jedoch scheint diese Studie wenig ausreichend, um die antimetastatischen Effekte einer Heparanase-Inhibition durch Heparin zu belegen. Aufgrund der limitierten Datenlage und der breiten Bioaktivität des Heparins scheint es durch die Entwicklungen und Untersuchungen von Heparin-basierten spezifischen Heparanase-Inhibitoren dennoch plausibel, einen antimetastatischen Effekt der Heparanase-Hemmung durch Heparin zu postulieren [343, 346]. Beispielfhaft sei hier auf die Entwicklung von PG545 (Pixatimod) verwiesen [347]. Dieser hochpotente Inhibitor der Heparanase entfaltet in mehreren präklinischen Studien sein inhibitorisches Potential auf die Metastasierung und Tumorprogression und wurde bereits in Tumorpatienten in einer Phase I Studie untersucht [347–349].

Als ein weiteres Feld in den potentiell antimetastatischen Effekten lässt sich die Modulation löslicher Mediatorstoffe identifizieren, welche durch vielzählige Effekte Prozesse wie etwa die Angiogenese oder die Tumorprogression induzieren können. Dabei kann zum einen die indirekte Modulation durch die Hemmung der Mediatorfreisetzung aus Thrombozyten oder die direkte Modulation durch den Eingriff in die Ligand/Rezeptor Wechselwirkung vermittelt werden. Eine Hemmung der Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung und der damit einhergehenden Mediatorfreisetzung durch Antikoagulantien wie LMWH konnte in einigen Studien gezeigt werden [350–352]. Neben den verschiedenen prometastatischen, aber auch antimetastatischen Eigenschaften der thrombozytär sezernierten Mediatoren, die bereits in den vorherigen Abschnitten dieser Arbeit Erwähnung fanden, wird so auch die Sekretion von VEGF unterdrückt. Somit kann durch den Einsatz von Heparin und seinen Derivaten die für die Tumorprogression essentielle Angiogenese abgeschwächt werden [350, 351]. Als Beispiel einer direkten antimetastatischen Beeinflussung sei an dieser Stelle die Interferenz mit dem CXCL12/CXCR4 Signalweg genannt. Dieser ist mit einer generellen Progression des Tumors in Form einer gesteigerten Proliferation, Angiogenese und Metastasierung sowie einer verminderten Apoptose assoziiert [353]. Die Blockade dieses Signalwegs erfolgt durch die Bindung des Heparin-Derivats an CXCL12, wodurch seine aktivierende Kapazität inhibiert wird. Evident wird dies durch die Beobachtungen von Harvey und Kollegen an CXCR4 exprimierenden Brustkrebszellen. In ihren Experimenten zeigten sie zunächst *in-vitro*, dass sowohl unfraktioniertes Heparin als auch das LMWH Tinzaparin in der Lage ist die CXCL12/CXCR4-vermittelte intrazelluläre Calciumfreisetzung und den chemotaktischen Effekt zu inhibieren. Durch die Injektion von Tinzaparin *in-vivo* reduzierte sich die Anzahl und Größe der Lungenmetastasen im untersuchten Mausmodell signifikant [354, 355]. Auch in *in-vitro* und *in-vivo* Experimenten mit Kolorektalkarzinomzellen wurde durch den Einsatz des LMWH Enoxaparin die Proliferation, Koloniebildung und Migration der untersuchten Zelllinie effizient abgeschwächt. Interessanterweise konnte

die Enoxaparin Applikation nicht die Größe des subkutanen Primärtumors reduzieren, sie inhibierte jedoch signifikant die Ausbildung metastatischer Läsionen im Lungengewebe der Versuchstiere [356].

Subsumieren lässt sich, dass einige wichtige Interferenzpunkte in der metastatischen Kaskade durch Heparin und seine Derivate angesprochen werden. Zusammen bilden die angesprochenen Effekte wie die Hemmung der Adhäsion, die Inhibition metastasierungsrelevanter Signalwege, die Blockade prometastatischer Enzyme sowie die Beeinflussung nicht-tumoröser Wirtszellen, die rationale Basis für weitere experimentelle Anstrengungen auf dem Gebiet der antimetastatischen Kapazität heparinoider Substanzklassen.

### 2.7.3 Nachteile des natürlichen Heparins

Heparin sowie seine Derivate stellen seit Jahrzehnten einen festen Bestandteil im Repertoire der antikoagulatorischen Therapien dar. Obwohl Heparin generell einen sicheren Arzneistoff repräsentiert und ein jahrelanger therapeutischer Erfahrungsschatz besteht, müssen diverse wichtige Beeinträchtigungen berücksichtigt werden. Einige dieser Nachteile des natürlichen Heparins sind mit seiner chemischen Struktur assoziiert. Wie bereits in Abschnitt 2.7.2 erwähnt besitzt Heparin eine molekulare Größe von etwa 16.000 Dalton, wobei durch die hohe Polydispersität Moleküle zwischen 3.000 und 30.000 Dalton innerhalb der Präparationen enthalten sein können [357]. Aufgrund der Variation der molekularen Größe sowie der Verteilung und Anwesenheit der für die Wirkung essentiellen Antithrombin-III-Bindungssequenz ergeben sich pharmakokinetische bzw. pharmakodynamische Variabilitäten zwischen Heparin Präparationen und Chargen, welche die Präzision der Therapie beeinträchtigen können und eines *Drug Monitorings* bedürfen [358, 359]. Darüber hinaus verhindern die molekulare Größe sowie die hohe negative Ladung des Heparins die Resorption aus dem Gastrointestinaltrakt, wodurch die, in der Dauertherapie nachteilige subkutane Injektion erforderlich ist [360]. Eine weitere Limitierung der Therapie mit unfraktioniertem Heparin resultiert aus dem Auftreten einer Heparin-induzierten Thrombozytopenie. Während die nicht-immunologische HIT Typ I in aller Regel asymptomatisch mit einer geringen Abnahme der Thrombozyten verläuft, kann sich die HIT-II zu einer potentiell letalen Komplikation entwickeln. Mechanistisch kommt es bei der HIT-II zur einer größenabhängigen Bindung zwischen dem kationischen Protein PF4 und dem stark anionischen Heparin. Wird dieser Komplex als Antigen erkannt und durch Antikörper gebunden, lagern sich die Heparin/PF4/Antikörper-Komplexe auf Thrombozyten ab. Dies kann in einer Aktivierung der Thrombozyten über den Fc-Rezeptor resultieren, was wiederum durch die Aggregation und Granula-Sekretion zur Thrombozytopenie und Ausformung einer Thrombose führt [361, 362].

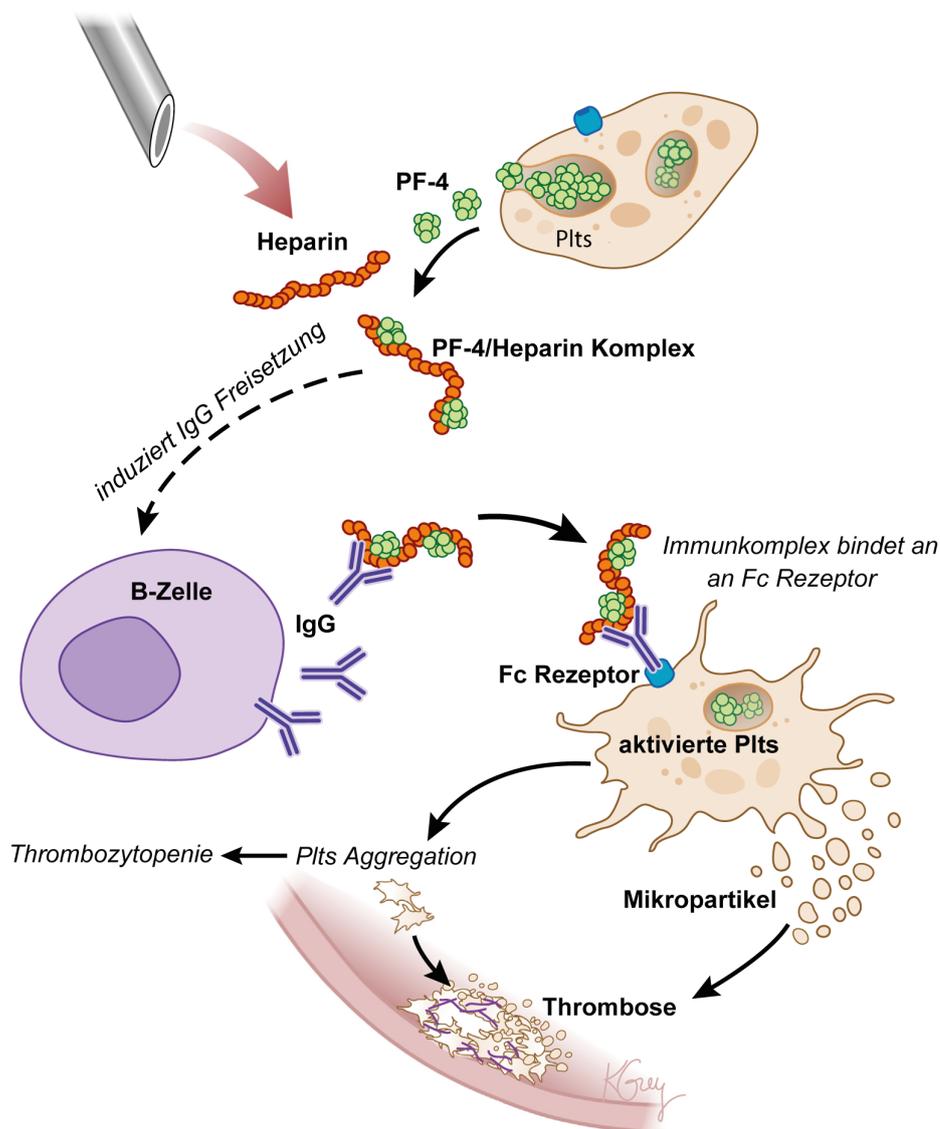


Abbildung 8: Schematisch illustriert ist der Pathomechanismus der Heparin-induzierten Thrombozytopenie Typ II [363]

Neben diesen physikochemischen bzw. pharmakologischen Nachteilen müssen weitere Aspekte berücksichtigt werden. Trotz moderner Technologien und steten Bemühungen in der Entwicklung von Expressionssystemen zur Gewinnung rekombinanten Heparins ist die Produktion von Heparin und LMWHs bis heute von der Extraktion aus natürlichen Quellen abhängig [364, 365]. Deutlich wird die Problematik anhand des Ausbruchs der afrikanischen Schweinegrippe (ASF) in China, das etwa 80 % des weltweit benötigten Rohmaterials für die Heparin-Produktion liefert [366]. Seinen Ursprung hat das ASF-Virus im Jahr 2007 und breitete sich im Laufe der Jahre global aus bis es 2018 erstmals in China nachgewiesen wurde. Innerhalb eines Jahres führte dies zum Tod von etwa einem

Drittel der ca. 440 Millionen Schweine umfassenden Population. Der enorme Einschnitt in die chinesische Herde beeinflusste entsprechend die Gewinnung und Produktion von Heparin und seinen Derivaten. Als Resultat dieses Mangels verfügbarer Heparin Präparate mussten zahlreiche Therapieempfehlungen kurzfristig auf alternative Wirkstoffe umgestellt werden [367, 368]. Zwar existieren auch Heparin Präparationen aus weiteren tierischen Ressourcen wie Rindern, Schafen oder Dromedaren, diese werden aktuell jedoch lediglich zu Forschungszwecken verwendet und sind, bis auf bovine Heparine, nicht zum therapeutischen Gebrauch zugelassen [365]. Zwar waren Rinder lange eine verwendete Quelle für die Heparin Produktion, jedoch wurden diese Heparine nahezu vollständig vom Markt genommen, da mit Verbreitung der bovinen spongiformen Enzephalopathie (BSE) in den 90er Jahren die Sorge einer Übertragung der Prionen durch kontaminierte Ausgangsstoffe entstand. Zusätzlich ist eine absolute Entfernung der potentiellen Kontamination durch den Herstellungsprozess bis heute nicht garantiert [369, 370]. Darüber hinaus kann eine ineffiziente Aufreinigung des Rohmaterials in einer Kontamination des Heparins durch andere Glykosaminoglykane resultieren. In den Jahren 2007 und 2008 wurde vermehrt von allergischen Symptomen bei Dialysepatienten berichtet, welche teils einen letalen Ausgang nahmen. Als Ursache konnten die verwendeten Heparine identifiziert werden, welche umgehend durch den Hersteller Baxter Healthcare zurückgerufen wurden. Nach umfangreicheren Untersuchungen stellte sich heraus, dass eine Vielzahl verschiedener Hersteller durch die Verunreinigung mit übersulfatiertem Chondroitinsulfat betroffen waren [371–373].

Aus rein praktischen Gesichtspunkten der täglichen Anwendung erfordert die subkutane Applikation des Heparins und seiner Derivate, gegenüber einer einfachen oralen Gabe, ein erhöhtes Maß an Eigenverantwortung und Adhärenzbereitschaft des Patienten. Zuletzt soll darauf verwiesen werden, dass die heute vorherrschende Gewinnung des Heparins aus der Darmmukosa des Schweins auch aus religiösen Gesichtspunkten zur Ablehnung des Präparates führen kann.

Resümieren lässt sich, dass Heparin trotz seiner etablierten Stellung in der effektiven Therapie und Prävention thromboembolischer Ereignisse, mit einigen nachteiligen Charakteristika behaftet ist, welche in zukünftigen Bestrebungen zur Verbesserung bestehender bzw. der Etablierung neuer Therapien adressiert werden müssen.

#### **2.7.4 Heparin-Mimetika**

Bestärkt durch die im vorangestellten Abschnitt dargelegten Nachteile der tierischen Heparin Quelle, bemühen sich global verschiedene Forschungsgruppen artifizielle Heparin-mimetische Substanzen zu entwickeln und deren Wirkungs- und Nebenwirkungsprofile zu optimieren. Das Spektrum der bis heute beschriebenen Heparin-Mimetika umfasst eine Bandbreite unterschiedlichster Strukturen. In einem semisynthetischen Ansatz werden na-

türlich vorkommende Polysaccharide wie Dextrane oder Alginate sulfatiert um die Struktur des tierischen Heparins abzubilden. Darüber hinaus konnten verschiedene Glykopolymere evaluiert werden, welche durch den Einsatz polymerisierbarer Monomere und die daran gekoppelten Saccharid-Substituenten eine Imitation des Heparins erreichen [374–376]. Die kurzkettigen Saccharide müssen dabei jedoch nicht zwangsläufig entlang eines Polymers lokalisiert sein. Sie können ebenfalls über die Kopplung an verschiedene Linker in eine räumliche Distanz bzw. Nähe zueinander gebracht werden [374, 375, 377]. Einen anderen Ansatz verfolgt die Synthese anionischer Polymere, welche durch die Verwendung aromatischer Carbonsäuren, die Ladungsdichte des Heparins mit ihren Carboxylgruppen imitieren [374, 375]. Der Fokus dieses Abschnitts liegt jedoch auf den in dieser Arbeit verwendeten Heparin-Mimetika, welche durch die Polymerisation bzw. Copolymerisation sulfonierter Monomere synthetisiert werden.

Die in dieser Arbeit verwendeten Heparin-mimetischen Polymere wurden dankenswerterweise durch die Arbeitsgruppe von Prof. Vito Ferro der University of Queensland in Brisbane bereitgestellt. Die monomeren Edukte für die Synthese der bereitgestellten Polymere sind Acrylsäure (AA), Natrium-2-acrylamido-2-methyl-1-propansulfonat (AMPS), Kalium-3-sulfopropylacrylat (SPA), Kalium-3-sulfopropylmethacrylat (SPM) sowie Natrium-4-styrenesulfonat (SSS). Für die Darstellung der polymeren Substanzen wurde die *Reversible Addition-Fragmentation chain Transfer* (RAFT) Polymerisation genutzt [378, 379]. Durch die Umsetzung konnte eine Substanzbibliothek verschiedener linearer Homo- und Copolymere aus den zuvor genannten Monomeren generiert werden, die in Abbildung 9 aufgeführt sind. Mittels der RAFT Polymerisation wurden Polymere mit den molekularen Größen von 5, 10, 20 bzw. 50 kDa generiert, welche eine geringe Polydispersität aufwiesen ( $\mathcal{D}$ : 1,08 – 1,53). Bereits durch Nahain et al. wurden verschiedene ihrer synthetisierten Polymere hinsichtlich einer antikoagulatorischen Kapazität *in-vitro* untersucht. In Untersuchungen der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (APTT) und der Thrombinzeit (TCT) konnten einige Polymere eine potentielle Antikoagulation vermitteln. Zur weiteren Bestätigung wurde die anti-FXa und anti-FIIa Aktivität bestimmt. Keines der untersuchten Mimetika vermochte es die FXa Aktivität zu unterbinden und lediglich das Copolymer poly(SSS-co-AA)-1:1 20kDa inhibierte die Thrombinaktivität. Darüber hinaus konnte eine Hemmung der durch rekombinanten TF-induzierten Thrombingenerierung für manche Polymere detektiert werden [378, 379]. Diese vorläufigen Untersuchungen bilden somit die Grundlage für die weitere Charakterisierung der sulfonierten Polymere als Heparin-Mimetika und ihrer potentiellen Rolle in antikoagulatorischen Therapien und der möglichen Interferenz mit der metastatischen Kaskade.

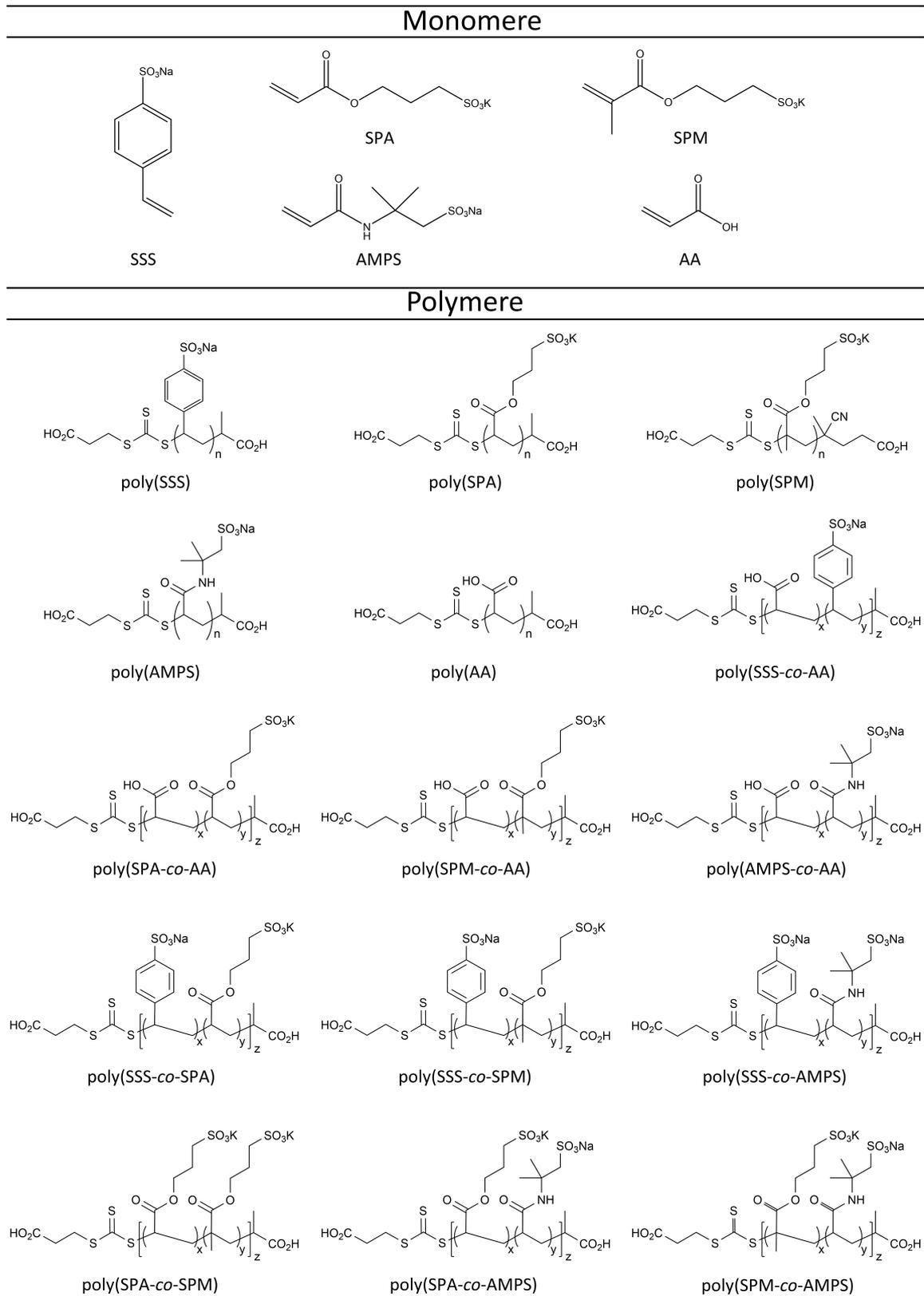


Abbildung 9: Gezeigt sind die Strukturen der monomeren Edukte sowie der verschiedenen Heparin-mimetischen Polymere, welche durch die RAFT Polymerisation gewonnen wurden

### 3 Ziel der Arbeit

Die Zielsetzung dieser Promotionsarbeit ist es einen weiteren Beitrag zum Verständnis der mannigfaltigen Effekte einer Tumorzell/Thrombozyten Interaktion auf den Prozess der hämatogenen Metastasierung zu leisten. Des Weiteren soll mit Hilfe von Antikoagulantien wie UFH, Enoxaparin und Fondaparinux ein tieferes mechanistisches Verständnis der molekularen Ansatzpunkte eines antimetastatischen Effektes der Heparine erlangt werden. Zudem sollen synthetische Heparin-mimetische Polymere erstmalig im Kontext eines antimetastatischen Szenarios evaluiert und mit den kommerziellen Antikoagulantien verglichen werden. Dadurch sollen nicht nur die antimetastatischen Effekte des Heparins besser verstanden, sondern ebenso die Möglichkeit einer Substitution der nachteilbehafteten Heparine beurteilt werden. Diese Arbeit ist in drei Projektabschnitte gegliedert.

Im ersten Teilprojekt liegt der Fokus auf der Betrachtung der Tumorzell/Thrombozyten Interaktion als essentieller Schritt der hämatogenen Metastasierungskaskade. Bekanntermaßen haben die Induktion der Blutgerinnung und die Aktivierung der Thrombozyten weitreichende, prometastatische Effekte. Das Potential der Antikoagulantien und Heparin-Mimetika in diese Schritte einzugreifen soll bestimmt werden. Dazu wird ihre Kapazität zur Inhibition der Tumorzell-induzierten Koagulation in einem Thrombingenerierungs-Assay untersucht. Das Ausmaß der Unterdrückung der Tumorzell-induzierten Thrombozytenaggregation bzw. -aktivierung wird mit Hilfe der Lichttransmissionsaggregometrie und der Quantifizierung thrombozytär sezernierter Mediatorstoffe beurteilt.

Im Zentrum des zweiten Teilprojektes dieser Forschungsarbeit steht die Blockade verschiedener Adhäsionssysteme, welche im Verlauf der hämatogenen Metastasierung den Arrest der Tumorzellen am Endothel vermitteln und so die Extravasation der malignen Zelle am Ort der Metastase erleichtern. Zunächst wird, mit Hilfe der SAW-Biosensorik, die Bindungskapazität der Antikoagulantien und Heparin-Mimetika gegenüber dem Integrin VLA-4 und den beiden Glykoproteinen P- und E-Selectin vermessen. Die funktionelle Konsequenz dieser Bindung soll anhand der Adhäsion VLA-4 exprimierender Melanomzellen an immobilisiertem VCAM-1 bestimmt werden. Eine weitere Annäherung an die *in-vivo* Bedingungen, durch die Analyse der Zellbindung an eine endotheliale Zellschicht im simulierten Blutfluss, soll die Beurteilung des kumulierten Effektes einer VLA-4, P- und E-Selectin Bindung ermöglichen.

Im dritten Teilprojekt soll der immunmodulierende Effekt von Thrombozyten bzw. Tumorzell-induzierten Thrombozyten-Releasates untersucht werden. Des Weiteren soll der Einfluss einer Interferenz der Antikoagulantien und Heparin-Mimetika in der initialen Tumorzell/Thrombozyten Kommunikation auf die Immunmodulation bestimmt werden. Auf zellulärer Ebene steht hier unter anderem die Differenzierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu regulatorischen T-Zellen im Fokus, welche durchflusszytometrisch quantifiziert wird. Die

Modulation der Aktivität zytolytischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen wird ebenfalls am Durchflusszytometer, aber auch durch die Multiplex-Analyse der Sekretion von zytolytischen und proinflammatorischen Mediatoren bestimmt. Zur Evaluation des Einflusses auf die Aktivität natürlicher Killerzellen wird deren zytolytische Kapazität gegenüber K562 Tumorzellen vermessen.

Zusammenfassend soll durch die drei Teilprojekte eine umfangreiche Evaluation der neuen Heparin-mimetischen Polymere und der bereits markterprobten Antikoagulantien im Licht der hämatogenen Metastasierung erfolgen. Diese Arbeit soll somit einen Beitrag dazu leisten, die metastasierungsrelevanten Effekte von Thrombozyten zu charakterisieren und antimetastatische Eingriffspunkte der untersuchten Substanzen zu identifizieren.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2: Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
1-Hexadecanethiol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
1-Step <sup>®</sup> Ultra TMB-ELISA Substrat Lösung	ThermoFisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA
1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-[(N-(5-amino- 1-carboxypentyl)iminodiacetic acid)succinyl] (nickel salt)	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
16:0 PC (DPPC), 1,2-dipalmitoyl-sn- glycero-3-phosphocholine, powder	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
20 × Reaction Buffer	ThermoFisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA
7-AAD Viability Staining Solution	BioLegend Inc. San Diego, CA, USA
Aceton	Merck Chemicals GmbH Darmstadt, Deutschland
Adenosin 5'-triphosphate	ThermoFisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA
Ammoniak 25 % Chemsolute <sup>®</sup>	Th.Geyer GmbH & Co.KG Renningen, Deutschland
Bacillo <sup>®</sup> AF	Paul Hartmann AG Heidenheim, Deutschland
Borsäure	Merck Chemicals GmbH Schwalbach, Deutschland
Bovines Serum-Albumin, BSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland

Bezeichnung	Hersteller
Calciumchlorid Dihydrat Cellpure <sup>®</sup> ≥ 99 %	Carl Roth GmbH + Co.KG Karlsruhe, Deutschland
CASY <sup>®</sup> ton	Schärfe System GmbH Reutlingen, Deutschland
CFSE Cell Devision Tracker Kit	BioLegend Inc. San Diego, CA, USA
Chloroform	VWR International LLC. Radnor, PA, USA
Corn Trypsin Inhibitor	Santa Cruz Biotechnology Inc. Santa Cruz, CA, USA
Cyanurchlorid	ACROS Organics Morris Plains, NJ, USA
D(+)-Glucose	Carl Roth GmbH + Co.KG Karlsruhe, Deutschland
D(+)-Trehalose Dihydrat	Carl Roth GmbH + Co.KG Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
Dithiothreitol	ThermoFisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA
D-Luciferin	ThermoFisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA
DPBS, w/o: Ca and Mg pH 7,4, steril	PAN-Biotech GmbH Aidenbach, Deutschland
Dulbecco's modified Eagle's medium - high glucose	PAN-Biotech GmbH Aidenbach, Deutschland
Dulbecco's modified Eagle's medium - low glucose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
Ethanol 99 % verg. mit Petrolether	Julius Hoesch GmbH & Co.KG Düren, Deutschland

Bezeichnung	Hersteller
Gigasept® Instru AF	Schülke & Mayr GmbH Norderstedt, Deutschland
Guava® Instrument Cleaning Fluid (ICF)	Luminex Corporation Austin, TX, USA
HEPES Pufferan® Cellpure® ≥ 99,5 %	Carl Roth GmbH + Co.KG Karlsruhe, Deutschland
Histopaque®-1077	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
Human IL-10 Mini ABTS ELISA Development Kit	PeproTech Inc. Rocky Hill, NJ, USA
Human SELP / selectin P / P-selectin Protein (His-Tag)	Sino Biological Inc. Peking, China
ImmunoCult™ Human CD3/CD28/CD2 T Cell Activator	STEMCELL Technologies Inc. Vancouver, Kanada
Innohep® 20000 Anit-Xa I.E./mL Fertigspritzen Injektionslösung	Leo Pharma A/S Ballerup, Dänemark
Isopropanol 100 %	Merck Chemicals GmbH Schwalbach, Deutschland
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH + Co.KG Karlsruhe, Deutschland
LEGENDplex™ Human CD8/NK Panel	BioLegend Inc. San Diego, CA, USA
L-Glutamin-Lösung	PAN-Biotech GmbH Aidenbach, Deutschland
Luciferase, firefly recombinant	ThermoFisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA
MACS® Comp Bead Kit, anti-mouse Igκ	Miltenyi Biotec B.V. & Co.KG Bergisch Gladbach, Deutschland
Magnesiumchlorid, wasserfrei ≥ 98,5 %	Carl Roth GmbH + Co.KG Karlsruhe, Deutschland

Bezeichnung	Hersteller
Manganchlorid Dihydrat	Merck Chemicals GmbH Darmstadt, Deutschland
Natirumhydrogencarbonat, Cellpure® ≥ 99,5 %	Carl Roth GmbH + Co.KG Karlsruhe, Deutschland
Natriumazid	Carl Roth GmbH + Co.KG Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid, Cellpure® ≥ 99,8 %	Carl Roth GmbH + Co.KG Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	Carl Roth GmbH + Co.KG Karlsruhe, Deutschland
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
Penicillin-Streptomycin-Lösung (10.000 I.E./mL, 10 mg/mL)	PAN-Biotech GmbH Aidenbach, Deutschland
Puromycin dihydrochloride	Carl Roth GmbH + Co.KG Karlsruhe, Deutschland
Recombinant Human CXCL4	Bon-Opus Biosciences LLC Millburn, NJ; USA
Recombinant Human E-Selectin/ELAM1/CD62E (C-6His)	Bon Opus Biosciences LLC. Millburn, NJ; USA
Recombinant Human IL-2	PeproTech Inc. Rocky Hill, NJ, USA
Recombinant Human VCAM-1-Fc Chimera (carrier-free)	BioLegend Inc. San Diego, CA, USA
Recombinant Human Integrin alpha 4 beta 1 Protein, CF	R&D systems Minneapolis, MN, USA
Roti®-CELL DPBS/EDTA	Carl Roth GmbH + Co.KG Karlsruhe, Deutschland
RPMI 1640® Nährmedium	PAN-Biotech GmbH Aidenbach, Deutschland

Bezeichnung	Hersteller
Saponin	Merck Chemicals GmbH Darmstadt, Deutschland
Schwefelsäure 95 % Chemsolute®	Th.Geyer GmbH & Co.KG Renningen, Deutschland
Sera Plus, Special processed FBS, Virus and mycoplasma tested	PAN-Biotech GmbH Aidenbach, Deutschland
Sterillium®	Bode Chemie GmbH Hamburg, Deutschland
StraightFrom® Buffy Coat CD4 MicroBead Kit, human	Miltenyi Biotec B.V. & Co.KG Bergisch Gladbach, Deutschland
StraightFrom® Buffy Coat CD8 MicroBead Kit, human	Miltenyi Biotec B.V. & Co.KG Bergisch Gladbach, Deutschland
Technothrombin® TGA CAL Set	Technoclone GmbH Wien, Österreich
Technothrombin® TGA RC high	Technoclone GmbH Wien, Österreich
Technothrombin® TGA SUB	Technoclone GmbH Wien, Österreich
Thiazolylblau - Tetrazoliumbromid (MTT) BioChemica	AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland
TRAP-6	Tocris Bioscience Bristol, UK
Trypsin 0.05 %/EDTA 0.02 % in PBS, w/o: Ca and Mg, w: Phenol red	PAN-Biotech GmbH Aidenbach, Deutschland
Tween®-20	AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland
Wasserstoffperoxid 35 %	Merck Chemicals GmbH Darmstadt, Deutschland
Zombie Aqua™ Fixable Viability Kit	BioLegend Inc. San Diego, CA, USA

---

#### 4.1.2 Puffer und Lösungen

Tabelle 3: Verwendete Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Komponenten	Menge
3 % PFA-Lösung (FACS)	DPBS	50 mL
	PFA	1,5 g
4 % BSA Lösung	DPBS	10 mL
	BSA	0,4 g
ATP Reaktionslösung	Aqua dest.	8,9 mL
	20 × Reaction Buffer	0,5 mL
	0,1 M DTT	0,1 mL
	10 mM D-Luciferin	0,5 mL
	5 mg/mL Firefly Luciferase	2,5 µL
Blockierungslösung (ELISA/FACS)	DPBS	50 mL
	BSA	1,5 g
Boratpuffer pH 8,8	Aqua dem.	100 mL
	Borsäure	0,618 g
	NaOH 1 mM	q.s.
CFSE Arbeitslösung	CFSE	3 µL
	Hungermedium	1497 µL
Diluent (ELISA)	DPBS	50 mL
	Tween <sup>®</sup> -20	25 µL
	BSA	0,05 g
FACS-Puffer	DPBS	50 mL
	BSA	0,5 g
	NaN <sub>3</sub>	0,005 g

## Material und Methoden

---

Bezeichnung	Komponenten	Menge
Fixierungspuffer (FACS)	3 % PFA-Lösung	10 mL
	Saponin	0,01 g
	Tween <sup>®</sup> -20	50 µL
1-Hexadecanthiol	Chloroform	q.s.
	1-Hexadecanthiol	10 mM
IL-2 Arbeitslösung	IL-2 (100 U/µL)	1,0 µL
	DPBS	499 µL
Laufpuffer (SAW)	Aqua dest.	q.s.
	MgCl <sub>2</sub>	1 mM
	CaCl <sub>2</sub>	1 mM
	MnCl <sub>2</sub>	0,5 mM
Permeabilisierungspuffer (FACS)	FACS-Puffer	10 mL
	Saponin	0,05 g
	Tween <sup>®</sup> -20	50 µL
Peroxomonoschwefelsäure	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> konz.	3 Teile
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30 %	1 Teile
Reinigungslösung 1	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> konz.	35 mL
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30 %	35 mL
Reinigungslösung 2	Aqua dem.	50 mL
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10 mL
	Ammoniak 26 %	10 mL
Separationspuffer	BSA	0,5 %
	EDTA	2 mM
	DPBS	q.s.

## Material und Methoden

---

Bezeichnung	Komponenten	Menge
Thrombozytenpuffer	Aqua dest.	q.s.
	NaCl	136,7 mM
	NaHCO <sub>3</sub>	13,8 mM
	HEPES	10 mM
	D-Glucose	5,5 mM
	KCl	2,6 mM
	MgCl <sub>2</sub>	1 mM
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O	0,36 mM
Tween Arbeitslösung	Tween <sup>®</sup> -20	10 µL
	DPBS	4990 µL
Waschpuffer (ELISA)	DPBS	500 mL
	Tween <sup>®</sup> -20	250 µL

---

### 4.1.3 Antikörper

Tabelle 4: Verwendete Antikörper

Antigen	Bezeichnung	Klon	Hersteller
CD69	FITC anti-human CD69 Antibody	FN50	BioLegend Inc. San Diego, CA, USA
FoxP3	FITC anti-human FOXP3 Antibody	206D	BioLegend Inc. San Diego, CA, USA
FITC Isotype	FITC Mouse IgG1, $\kappa$ Isotype Ctrl	MOPC-21	BioLegend Inc. San Diego, CA, USA
CD8	Pacific Blue anti-human CD8a Antibody	RPA-T8	BioLegend Inc. San Diego, CA, USA
CD25	PerCP/Cyanine5.5 anti-human CD25 Antibody	BC96	BioLegend Inc. San Diego, CA, USA
PerCP/ Cyanine5.5 Isotype	PerCP/Cyanine5.5 Mouse IgG1, $\kappa$ Isotype Ctrl	MOPC-21	BioLegend Inc. San Diego, CA, USA

### 4.1.4 Antikoagulantien und Heparin-Mimetika

Tabelle 5: Verwendete Antikoagulantien und Heparin-Mimetika

Bezeichnung	Hersteller
Arixtra <sup>®</sup> 2,5 mg/0,5 mL Injektionslösung, Fertigspritze	Aspen Pharma Trading Limited Dublin, Irland
Clexane <sup>®</sup> 4.000 I.E. (40 mg/0,4 mL) Injektionslösung in einer Fertigspritze	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH Frankfurt am Main, Deutschland
Heparin-Mimetika	Prof. Vito Ferro Brisbane, Australien
Heparin-Natrium-5000-ratiopharm	ratiopharm GmbH Ulm, Deutschland

#### 4.1.5 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 6: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
24 Well Plate 24-Well CytoOne® Platte, unbehandelt	Starlab GmbH Ahrensburg, Deutschland
6 Well Plate 6-Well CytoOne® Platte, unbehandelt	Starlab GmbH Ahrensburg, Deutschland
96 Well black 96F Non-Treated Black Microwell SH	ThermoFisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA
Sterile Platten 96 F 96-Well CytoOne® Platte, unbehandelt	STARLAB GmbH Hamburg, Deutschland
FACS 96 Well platten 96-Well Microtiter™ Microplates	ThermoFisher Scientific Inc. Rochester, NY, USA
Glas Slides (rund) Assistent® Deckgläser, rund, 18 mm	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG Sondheim vor der Rhön, Deutschland
CasyCups CASY® cups	Schärfe System GmbH Reutlingen, Deutschland
20 mL Spritze Einmalspritzen Braun Luer Solo (20 mL)	B.Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Multistepper Tips Eppendorf Combitips advanced®0,5 mL	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Nunc Maxisorb F96 Maxisorb Nunc-Immuno Plate	ThermoFisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA
Kryogefäße Cryo.S®	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland
Aggregometer Küvetten für APACT 4004	Haemochrom Diagnostica GmbH Essen, Deutschland
Cell Strainer Miltenyi MACS® SmartStrainer (30 µm)	Miltenyi Biotec B.V. & Co.KG Bergisch Gladbach, Deutschland

Bezeichnung	Hersteller
U-Platten Microplatte, 96-Well, PS, U-Boden, transparent	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland
V-Platten Microplatte, 96-Well, PS, V-Boden, transparent	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland
Butterfly Multify <sup>®</sup> -Kanüle Set 21 G 200mm Länge	Sarstedt AG & Co.KG Nümbrecht, Deutschland
96 well white Nunc <sup>™</sup> F96 MicroWell <sup>™</sup> Polystyrolplatte, weiß	ThermoFisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA
1000 µL Tip Pipettenspitzen (100-1000 µL), blau	Starlab GmbH Ahrensburg, Deutschland
200 µL Tip Pipettenspitzen (10-200 µL), gelb	Starlab GmbH Ahrensburg, Deutschland
10 µL Tip Pipettenspitzen (1-10 µL), natur	Starlab GmbH Ahrensburg, Deutschland
5000 µL Tip Pipettenspitzen (5 mL) Plastibrand <sup>®</sup> , natur	BRAND GmbH & Co. KG Wertheim, Deutschland
Wännchen Pipettierreservoir, PS, 50 mL für Mehrkanalpipetten	ratiolab GmbH Dreieich, Deutschland
Eppi 0,6 Reagiergefäße (0,6 mL)	Sarstedt AG & Co.KG Nümbrecht, Deutschland
Eppi 1,5 Reagiergefäße (1,5 mL)	Sarstedt AG & Co.KG Nümbrecht, Deutschland
Eppi 1,5 Braun Reagiergefäße (1,5 mL) braun	Sarstedt AG & Co.KG Nümbrecht, Deutschland
Eppi 2 Reagiergefäße (2,0 mL)	Sarstedt AG & Co.KG Nümbrecht, Deutschland
Eppi 5 Reagiergefäße (5,0 mL)	Sarstedt AG & Co.KG Nümbrecht, Deutschland
Rotilabo <sup>®</sup> Probenfläschchen 2mL	Carl Roth GmbH + Co.KG Karlsruhe, Deutschland

Bezeichnung	Hersteller
Biosensor Chip Sam5 Blue Chips Plain Gold	NanoTemper Technologies GmbH München, Deutschland
Serologische Pipette, wattiert, 10 mL, steril	Sarstedt AG & Co.KG Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipette, wattiert, 25 mL, steril	Sarstedt AG & Co.KG Nümbrecht, Deutschland
Sterilfilter Sterilfilter (0,2 µm)	Whatman GmbH Dassel, Deutschland
T25 Zellkulturflaschen T25 (25 cm <sup>2</sup> )	Sarstedt AG & Co.KG Nümbrecht, Deutschland
T75 Zellkulturflaschen T75 (75 cm <sup>2</sup> )	Sarstedt AG & Co.KG Nümbrecht, Deutschland
T175 Zellkulturflaschen T175 (175 cm <sup>2</sup> )	Sarstedt AG & Co.KG Nümbrecht, Deutschland
Falcon 15 Zentrifugenröhrchen (15 mL) CellStar Tubes	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland
Falcon 50 Zentrifugenröhrchen (50 mL) CellStar Tubes	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland

---

#### 4.1.6 Geräte und Instrumente

Tabelle 7: Verwendete Geräte und Instrumente

Bezeichnung	Hersteller
Absaugsystem BVC 21 NT	Vacuubrand GmbH & Co. KG Wertheim, Deutschland
Analysenwaage Sartorius basic BA210S	Sartorius AG Göttingen, Deutschland
APACT 4004	Haemochrom Diagnostica GmbH Essen, Deutschland
CD1008 Mini Zentrifuge	Phoenix Instrument GmbH Garbsen, Deutschland
Centrifuge 5430R	Eppendorf SE Hamburg, Deutschland
CO <sub>2</sub> -Brutschrank ICOMed	Memmert GmbH & Co.KG Schwabach, Deutschland
CSC-795 Camera	Pacific Corporation Tokyo, Japan
CytoFlex	Beckmann Coulter GmbH Krefeld, Deutschland
Eppendorf® Thermostat Plus	Eppendorf SE Hamburg, Deutschland
Finnpipette™F2 (5-50 µL)	ThermoFisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA
Fluoroskan Ascent®	ThermoFisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA
FLUOstar® Optima	BMG Labtech GmbH Ortenberg, Deutschland
Guava® easyCyte HT 11 Flow Cytometer	Merck Chemicals GmbH Darmstadt, Deutschland
Hamilton-Spritze 25 µL	Hamilton Company Reno, NV, USA

Bezeichnung	Hersteller
Laminar-Air-Flow-Werkbank Holten safe 2010	Heto-Holton A/S Allerød, Dänemark
Lichtmikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss Microscopy GmbH Jena, Deutschland
Lichtmikroskop Wilovert 30	Helmut Hund GmbH Wetzlar, Deutschland
MACSmix™ Tube Rotator	Miltenyi Biotec B.V. & Co.KG Bergisch Gladbach, Deutschland
MACSxpress™ Separator	Miltenyi Biotec B.V. & Co.KG Bergisch Gladbach, Deutschland
MDF-1156(ATN)-PE ULT Freezer	PHC Europe B.V. Etten-Leur, Niederlande
MidiMACS™ Separator	Miltenyi Biotec B.V. & Co.KG Bergisch Gladbach, Deutschland
Multipette® M4	Eppendorf SE Hamburg, Deutschland
Multiskan® EX	Thermo Scientific GmbH Langenselbold, Deutschland
New Brunswick™ Excella® E24	New Brunswick Scientific Edison, NJ, USA
pH-Meter S20 SevenEasy™ pH	Mettler-Toledo GmbH Gießen, Deutschland
Pipette (10 µL) Research®	Eppendorf SE Hamburg, Deutschland
Pipette (10 µL) Transferpette®S	BRAND GmbH & Co. KG Wertheim, Deutschland
Pipette (100 µL) Research®	Eppendorf SE Hamburg, Deutschland
Pipette (100 µL) Transferpette®S	BRAND GmbH & Co. KG Wertheim, Deutschland

Bezeichnung	Hersteller
Pipette (1000 $\mu$ L) Research <sup>®</sup>	Eppendorf SE Hamburg, Deutschland
Pipette (12 $\times$ 200 $\mu$ L) Transferpipette <sup>®</sup> S-12	BRAND GmbH & Co. KG Wertheim, Deutschland
Pipette (2,5 $\mu$ L) Research <sup>®</sup>	Eppendorf SE Hamburg, Deutschland
Pipette (20 $\mu$ L) Research <sup>®</sup>	Eppendorf SE Hamburg, Deutschland
Pipette (200 $\mu$ L) Research <sup>®</sup>	Eppendorf SE Hamburg, Deutschland
Pipette (5 mL) Transferpipette <sup>®</sup> S	BRAND GmbH & Co. KG Wertheim, Deutschland
Pipette (8 $\times$ 50 $\mu$ L) Transferpipette <sup>®</sup> S-8	BRAND GmbH & Co. KG Wertheim, Deutschland
Purelab <sup>®</sup> Plus Wasseraufbereitungsanlage	ELGA LabWater Celle, Deutschland
Sam5 Blue SAW Biosensor	SAW instruments GmbH Bonn, Deutschland
Spatel, diverse	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Trockenschrank 60°C	Heraeus Holding GmbH Hanau, Deutschland
Ultraschallbad Sonorex <sup>®</sup> Super RK 510 H	Bandelin electronic GmbH & Co. KG Berlin, Deutschland
VIP ECO ULT Freezer MDF-DU502VH-PE	PHC Europe B.V. Etten-Leur, Niederlande
Vortexer RS-VA 10	Phoenix Instrument GmbH Garbsen, Deutschland
Zellzähler CASY <sup>®</sup> 1 Model TT	Schärfe System GmbH Reutlingen, Deutschland

Bezeichnung	Hersteller
Zentrifuge Universal 32 R	Heraeus Holding GmbH Hanau, Deutschland
Zentrifuge Universal 320 R	Heraeus Holding GmbH Hanau, Deutschland

---

#### 4.1.7 Software

Tabelle 8: Verwendete Software

Bezeichnung	Hersteller
APACT LPC-Software	LABiTec GmbH Ahrensburg, Deutschland
CytExpert	Beckmann Coulter GmbH Krefeld, Deutschland
Fiji	Schindelin et al. (2012)
FitMaster <sup>®</sup>	SAW instruments GmbH Bonn, Deutschland
FlowJo v.10.5.3	BD Life Sciences Franklin Lakes, NJ, USA
GraphPad Prism 8	GraphPad Software La Jolla, CA, USA
GuavaSoft <sup>™</sup> 3.3	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
LEGENDplex <sup>™</sup> Data Analysis Software	BioLegend Inc. San Diego, CA, USA
Microsoft Office 2016 für Windows	Microsoft Corporation Redmond, WA, USA
Optima v.2.20R2	BMG Labtech GmbH Ortenberg, Deutschland
SamBlue FitMaster	SAW instruments GmbH Bonn, Deutschland

---

## *Material und Methoden*

---

Bezeichnung	Hersteller
THERMO Fluoroskan Ascent TGA Evaluation Software (+AUC)	Technoclone GmbH Wien, Österreich
Thermo Scientific™ Ascent™ Software	ThermoFisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA
ZEN Mikroskopie Software	Carl Zeiss Microscopy GmbH Jena, Deutschland

---

## 4.2 Zellkultur

### 4.2.1 Inkulturnahme

Zur langfristigen Vorratshaltung der verwendeten Zellen werden diese in einem Ultra Low Freezer bei  $-150^{\circ}\text{C}$  kryokonserviert. Bei Bedarf wurde ein Kryogefäß aus dem Ultra Low Freezer entnommen und bei  $37^{\circ}\text{C}$  aufgetaut. Um das im Kryomedium enthaltene zelltoxische DMSO zu entfernen, wurde die aufgetaute Zellsuspension unverzüglich in ein mit Nährmedium befülltes Zentrifugenröhrchen überführt und bei  $450 \times g$  und  $4^{\circ}\text{C}$  für 4 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das entstandene Zellpellet in einem Milliliter des Zellmediums resuspendiert und in eine mit Zellmedium befüllte T25 Kulturflasche überführt. Die Zellen wurden über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Zellmedium substituiert.

Sobald eine ausreichende Konfluenz erreicht war, wurden die Zellen analog den Ausführungen in Abschnitt 4.2.4 subkultiviert.

### 4.2.2 Kryokonservierung

Um die Zellen für die langfristige Vorratshaltung im Ultra Low Freezer vorzubereiten, wurden diese, wie in Abschnitt 4.2.4 beschrieben, abgelöst. Die Zellzahl wurde mittels des CASY® 1 Model TT bestimmt und die Zellsuspension bei  $450 \times g$  und  $4^{\circ}\text{C}$  für 4 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in der gewünschten Konzentration in einer Lösung aus 90 % (V/V) fetalem Kälberserum (FKS) und 10 % (V/V) DMSO resuspendiert. Je ein Milliliter der generierten Zellsuspension wurde in ein Kryogefäß überführt. Die Zellen sind zunächst für 24 h bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren worden und wurden anschließend bei  $-150^{\circ}\text{C}$  im Ultra Low Freezer kryokonserviert.

### 4.2.3 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde ein Zellzähler des Typs CASY® 1 Model TT der Firma Schärfe System GmbH verwendet. Bei dem Coulter Counter Verfahren, auf welchem die Zählung basiert, handelt es sich um eine Methode, welche die Messung eines Widerstandes zwischen zwei Platinelektroden nutzt. Die beiden Elektroden sind in unterschiedlichen Kammern lokalisiert, welche mit einer definierten Elektrolytlösung befüllt sind. Die Kammern der Elektroden sind durch eine kleine Kapillare verbunden. Zur Messung werden einzelne Zellen durch diese Kapillare gesaugt, was eine zellgrößenabhängige Änderung des Widerstandes zwischen den beiden Messelektroden bedingt und als Signal detektiert wird. Die Menge der Zellen in einer Probe kann durch die Anzahl der registrierten Widerstandsänderungen ermittelt werden. Zusätzlich zur Gesamtzellzahl kann weiterhin über die Membranintegrität der Zellen eine Größendifferenzierung in tote sowie lebendige Zellen

erfolgen. Signale im Bereich von 8  $\mu\text{m}$  bis 30  $\mu\text{m}$  wurden als lebende Zellen definiert. Für die Vermessung von mononukleären Blutzellen und isolierten T-Lymphozyten wurde die untere Messgrenze auf 6  $\mu\text{m}$  korrigiert. Als Messergebnis wurde sowohl die Größenverteilung, als auch die Anzahl der Zellen pro Milliliter Untersuchungslösung ausgegeben.

Zur Herstellung der Untersuchungslösung wurden 10 mL der CASY ton<sup>®</sup>- Elektrolytlösung in ein CASY-Röhrchen steril filtriert. Die Zellen wurden analog den Ausführungen in Abschnitt 4.2.4 aufbereitet, 20  $\mu\text{L}$  der Zellsuspension in das vorbereitete Röhrchen überführt und nach guter Durchmischung im CASY<sup>®</sup> Zellzähler vermessen.

#### 4.2.4 Allgemeine Subkultivierung

Die Kultivierung der verwendeten Zelllinien erfolgte in einem Inkubator bei 37°C und einer Begasung mit 5% CO<sub>2</sub>. Der Zustand der Zellkultur wurde in regelmäßigen Abständen lichtmikroskopisch begutachtet und das Zellmedium in sinnvollen Intervallen erneuert, um zelltoxische Stoffwechselprodukte zu entfernen und die Zellen mit ausreichend Nährstoffen zu versorgen.

Sobald der Boden der Zellkulturflasche mit einer konfluenten Schicht aus Zellen bedeckt war, wurden die Zellen für experimentelle Zwecke verwendet oder zur weiteren Kultivierung in neue Kulturflaschen überführt. Dazu wurde das alte Zellmedium entfernt und der Boden der Zellkulturflasche mit sterilem *Dulbecco's phosphate buffered saline* (DPBS) gewaschen. In Abhängigkeit der Flaschengröße wurde eine geeignete Menge EDTA-Lösung eingesetzt um die Zellen durch Komplexierung von Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> Ionen vom Flaschenboden zu lösen. Nach der Ablösung der Zellen wurden diese unverzüglich mit DPBS vom Flaschenboden heruntergespült und die so verdünnte Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte wie in Abschnitt 4.2.3 beschrieben und die Zellen wurden durch vierminütige Zentrifugation bei 450  $\times$  g und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in einem Milliliter DPBS bzw. dem entsprechenden Nährmedium resuspendiert. Die gewünschte Zellzahl wurde zur Subkultivierung in eine mit Nährmedium befüllte Kulturflasche verbracht oder für Experimente verwendet.

#### 4.2.5 Zelllinien

**4.2.5.1 MDA-MB-231** Die Zelllinie MDA-MB-231 entspringt einer Serie von kultivierten Brustkrebszellen, welche erstmalig durch das *M.D. Anderson Hospital and Cancer Institute* etabliert wurde. Die zugrundeliegende Probe wurde im Jahr 1973 einer 51 Jahre alten kaukasischen Frau entnommen [380]. Aufgrund einer geringen Expression der am Aufbau der *tight junctions* beteiligten Proteine Claudin-3, -4 und -7 werden die Zellen in die Klasse Claudin-low eingeordnet [381]. Eine weitere Klassifizierung der Zelllinie erfolgt durch die Abwesenheit von Estrogen- und Progesteron-Rezeptoren sowie des humanen

epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (HER2). Dies bedingt die Zuordnung in die Klasse der *triple-negative breast cancer* (TNBC), welche sich durch ein geringes Ansprechen auf Hormontherapien und eine, im Vergleich zu positiven Patienten, geringe Überlebensrate auszeichnet. Die Zelllinie MDA-MB-231 weist in Einklang mit diesen Befunden eine erhöhte *in-vitro* Invasivität auf [381, 382]. Die Basis des Nährmediums für die Kultivierung der Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 stellte das *Dulbecco's modified Eagle's – high glucose* Medium dar. Komplettiert wurde das Medium durch den Zusatz von 10 % (V/V) FKS, 1 % (V/V) Penicillin-Streptomycin-Lösung (10.000 I.E./mL, 10 mg/mL), 1 % (V/V) einer 200 mM L-Glutaminlösung und 1 % (V/V) einer 100 mM Natriumpyruvatlösung. Die Zelllinie wurde über Herrn Dr. Zeisig von der EPO GmbH Berlin bezogen.

**4.2.5.2 MV3** Die humane Melanomzelllinie MV3 ist ein lang etabliertes Modell für ein stark metastasierendes Melanom. Die Zelllinie wurde im Jahr 1991 durch Muijen et al. etabliert und entspringt einem Lymphknoten Biopsat, welches einem, an einem bösartigen Melanom erkrankten, 76-jährigem Patienten entnommen wurde. Die isolierten Zellen wurden als Xenograft in Nacktmäusen kultiviert. Die finale MV3 Zelllinie entstammt der dritten Passage [383]. Die Kultivierung der Melanomzellen erfolgte in RPMI 1640 Medium, welches durch den Zusatz von 10 % (V/V) FKS und 1 % (V/V) Penicillin-Streptomycin-Lösung (10.000 I.E./mL, 10 mg/mL) komplettiert wurde. Die Zelllinie MV3 wurde über die Firma EPO Berlin GmbH bezogen.

Um eine  $\beta 1$  Integrin defiziente Variante der MV3 Zellen zu generieren, wurde durch Frau Dr. Maria Bethania Rossi Piva ein lentiviraler Knockdown durchgeführt [384]. Für die Kultivierung der entstandenen MV3  $\beta 1$ kd Zelllinie sowie deren komplementären scramble Zelllinie (MV3 sc), welche eine nicht codierenden Kontrollvektor erhielt, wurde das beschriebene Medium durch den Zusatz von 3,25  $\mu$ M Puromycin ergänzt.

**4.2.5.3 EA.hy926** Die endotheliale Zelllinie EA.hy926 wurde 1983 durch Edgell et al. etabliert und entstammt einer Hybridisierung von Endothelzellen der humanen Nabelschnurvene mit der humanen Lungenkarzinom Zelllinie A549 [385]. Das adhärente Zellsystem ist gut charakterisiert und findet aufgrund seiner, im Vergleich zum primären HUVEC Zellsystem, verlängerten Lebensspanne häufig Anwendung in der *in-vitro* Kultivierung [386]. Mit der Bildung von *Weibel-Palade-Bodies*, VCAM-1 oder E-Selectin weist die immortalisierte Zelllinie endotheliale Charakteristika auf und wird in verschiedenen *in-vitro* Modellen zur Simulation des Endothels genutzt [386, 387].

Die verwendeten EA.hy926 Zellen wurden durch das *Institute of Cellular Biology and Pathology „Nicolae Simionescu“* in Bukarest bereitgestellt. Das zur Kultivierung verwendete Nährmedium basiert auf DMEM<sup>®</sup> – low glucose Medium der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH. Zur Herstellung des gebrauchsfertigen Medium werden 10 g (1 Vial)

des lyophilisierten Mediums in einem Liter sterilem Millipore® Wasser gelöst. Ergänzt wird das Medium durch den Zusatz von 3,7 g/L Natriumhydrogencarbonat, 100 mL FKS sowie 10 mL Penicillin-Streptomycin-Lösung in den Konzentrationen 10.000 I.E./mL bzw. 10 mg/mL.

**4.2.5.4 K562** Die Zelllinie K562 wurde im Jahr 1975 durch Lozzio und Lozzio etabliert. Die Zelllinie entstammt einer 53-jährigen Patientin, welche seit 4 Jahren aufgrund einer chronisch myeloischen Leukämie behandelt wurde. Die Isolation erfolgte aus einem Pleuraerguss während einer terminalen Blastenkrise [388]. Eine besondere Bedeutung erreichte die Zelllinie durch die geringe Expression der HLA Klasse I, in der Analyse der zytotoxischen Aktivität natürlicher Killerzellen [389]. Zur Kultivierung dieser Suspensionszellen wurde das Basismedium RPMI 1640 verwendet. Komplettiert wurde es durch den Zusatz von 10 % FKS und 1 % (V/V) Penicillin-Streptomycin-Lösung (10.000 I.E./mL, 10 mg/mL).

**4.2.5.5 PBMC/CD4<sup>+</sup> T-Zellen/CD8<sup>+</sup> T-Zellen** Zur Erhaltung der isolierten *Peripheral Blood Mononuclear Cells*, CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten sowie CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten über den Zeitraum der Probenherstellung, wurden diese in RPMI 1640 mit 10 % FKS und 1 % (V/V) Penicillin-Streptomycin-Lösung (10.000 I.E./mL, 10 mg/mL) kultiviert.

## 4.3 Zellisolation

### 4.3.1 Thrombozyten

Die in dieser Arbeit verwendeten human Thrombozyten wurden aus Thrombozytenkonzentraten (TKZs) gewonnen, welche freundlicherweise durch das Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Bonn bereitgestellt wurden. Diese Thrombozytenkonzentrate wurden nach Überschreiten des Datums, bis zu welchem sie zur Applikation am Patienten zugelassen sind, übernommen. Nach der Übernahme der mit *Acid-Citrate-Dextrose* (ACD) antikoagulierten TKZs wurden diese maximal für 4 Tage gelagert und für Versuche verwendet. Die TKZs wurden auf einem Lochblech gelagert um eine beidseitige Gasdiffusion in den Lagerungsbeutel zu ermöglichen. Das Lochblech ist in einem temperierten Orbitalschüttler lokalisiert. Somit war eine konstante Bewegung der Thrombozyten bei 21°C und 50 rpm gewährleistet. Zur Isolation der Thrombozyten wurde die benötigte Menge des Thrombozytenkonzentrats entnommen, wobei die ersten Milliliter verworfen wurden, um mögliche präaktivierte oder aktivierte Thrombozyten, welche im Entnahmeschlauch einer geringen Durchmischung ausgesetzt waren, zu entfernen. Das entnommene Volumen wurde bei Raumtemperatur für 10 min mit 670 × g zentrifugiert. Das überstehende Plasma wurde entfernt und das entstandene Pellet in Thrombozytenpuffer resuspendiert, wobei stets auf eine sachte Handhabung und

die Verwendung von Pipetten mit einem möglichst breiten Auslass geachtet wurde um eine Scherstress-bedingte Aktivierung der Thrombozyten zu verhindern. Für die weitere Verwendung (vgl. Abschnitt 4.4) wurden die Thrombozyten in einem geeigneten Volumen Thrombozytenpuffer bzw. Plasma resuspendiert.

### 4.3.2 Peripheral Blood Mononuclear Cells

Die Gewinnung humaner PBMCs erfolgte aus *Buffy Coats*, welche als Nebenprodukt bei der Verarbeitung von Blutspenden anfallen. Diese wurden komplett anonymisiert, sodass keine Rückschlüsse auf den Spender bzw. dessen Eigenschaften gezogen werden konnten. Zur Verfügung gestellt wurden die *Buffy Coats* durch das Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Bonn. Zur Gewinnung der PBMCs wurde eine entsprechende Menge des *Buffy Coats* entnommen und über einen 30 µm Nylonfilter gegeben. Der filtrierte *Buffy Coat* wurde mit DPBS im Verhältnis 3 zu 5 gemischt. Im Anschluss wurden 3 mL Histopaque®-1077 vorsichtig mit 8 mL des Gemisches überschichtet. Zur Trennung durch das Dichtemedium erfolgte eine Zentrifugation bei  $400 \times g$  und RT für 10 Minuten. Die abgetrennten PBMCs wurden mit Hilfe einer Pasteurpipette entnommen und in ein neues Zentrifugationsröhrchen überführt. Die entnommenen PBMCs wurden mit DPBS auf 12 mL verdünnt, erneut zentrifugiert und in DPBS resuspendiert. Nach Wiederholung dieses Schrittes wurde die Zellzahl der PBMCs am CASY® Zellzähler vermessen, wobei Zellen zwischen einer Größe von 6-30 µm berücksichtigt wurden. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die PBMCs zu einer Konzentration von  $2 \times 10^6$ /mL in Medium resuspendiert. Diese Suspension konnte über Nacht bis zur Versuchsdurchführung bei 5% CO<sub>2</sub> und 37°C in einer Zellkulturflasche gelagert werden.

### 4.3.3 CD4<sup>+</sup> T-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Zur Isolation von CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden ebenfalls die anonymisierten *Buffy Coats* des Universitätsklinikums Bonn verwendet. Die Isolation durch das verwendete StraightFrom™ Buffy Coat Micro Bead Kit basiert auf dem Prinzip der positiven Selektion. Genutzt wurden dazu anti-CD4 bzw. anti-CD8 Antikörper konjugierte, magnetische Mikropartikel. Durch die Bindung der Antikörper an ihr entsprechendes Oberflächen-Antigen werden die Zellen magnetisch markiert. Somit können diese in einer Säule, welche in einem magnetischen Feld platziert wird, retiniert und von unerwünschten Zellen abgetrennt werden.

Im Vorgang der Isolation wurden alle verwendeten Lösungen auf 4°C temperiert. Die benötigte Menge *Buffy Coat* wurde durch einen 30 µm Nylonfilter gegeben, um mögliche Zellaggregate abzutrennen und einerseits eine effizientere Markierung von Einzelzellen zu

gewährleisten sowie andererseits eine Verlegung der Säule zu verhindern. Im Anschluss wurde die zu isolierende Menge *Buffy Coat* entsprechend der Herstellerangaben mit dem Micro Bead Mix versetzt und für 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Währenddessen wurde eine Whole Blood Säule im Magnetfeld des MidiMACS™ Separators platziert und durch die Zugabe von 3 mL entgastem Separationspuffer konditioniert. Die magnetisch markierte Zellsuspension wurde auf die Säule verbracht und der Durchfluss, welcher die ungewollten Zellen enthält, aufgefangen. Sobald die Zellsuspension vollständig durch die Säule gelaufen war, wurde zweimal mit je 2 mL Separationspuffer gewaschen. Nun wurde die Säule, welche die benötigte Zellfraktion enthielt, aus dem Magnetfeld entnommen und auf ein neues Zentrifugenröhrchen gesetzt. Es wurden 4 mL des Elutionspuffers auf die Säule pipettiert und mit Hilfe des dazugehörigen Kolbens durch die Säule gedrückt. Der Durchfluss enthielt die gewünschte Zellfraktion und wurde hinsichtlich seiner Zellkonzentration und Viabilität am CASY® Zellzähler vermessen. Zellen einer Größe zwischen 6 µm und 30 µm wurden als lebendig definiert und in der Zellzählung berücksichtigt. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 400 × g und 4°C für 5 Minuten wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet zu einer gewünschten Konzentration in RPMI 1640 Medium resuspendiert.

#### **4.4 Herstellung der Thrombozyten-Suspension und der Thrombozyten-Releasates**

Je nach Versuchsaufbau wurden Thrombozyten-Suspensionen oder -Releasates, also die Überstände aktivierter Thrombozyten, verwendet. Die Präparation dieser Zellsysteme wird nachfolgend beschrieben. Durch die Verwendung von Thrombozyten-Suspensionen in Thrombozytenpuffer wurde eine ungewollte Fibrinbildung als Folge der Koagulation vermieden. Zur Herstellung der beiden Systeme wurden die Thrombozyten entsprechend den Ausführungen in Abschnitt 4.3.1 isoliert. Es wurde stets auf eine sachte Handhabung und die Verwendung von Pipetten mit einem möglichst breiten Auslass geachtet, um eine durch Scherstress-induzierte Aktivierung der Thrombozyten zu verhindern. Durch die Verwendung des calciumfreien Thrombozytenpuffers war die hergestellte Suspension für einige Stunden stabil. Die isolierten Thrombozyten wurden je nach Versuch auf eine Zellkonzentration von  $4 \times 10^8/\text{mL}$  oder  $1,25 \times 10^9/\text{mL}$  (immunologische Versuche) eingestellt. Zur Ermöglichung der Aktivierung wurde in den Suspensionen, durch die Zugabe einer  $\text{CaCl}_2$ -Lösung, eine  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration von 1 mM eingestellt. Je nach Versuch wurden die so hergestellten Suspensionen direkt für die Co-Inkubation verwendet oder für 30 min mit den in Tabelle 9 aufgeführten Testsubstanzen bei adaptierten therapeutischen Konzentrationen behandelt. Zur Untersuchung der Effekte löslicher Mediatoren, die bei einer Aktivierung durch Thrombozyten sezerniert werden, wurden in einem weiteren Schritt die benötigten Thrombozyten-Releasates hergestellt. Dazu wurden die vorbereiteten

Thrombozyten-Suspensionen durch die Zugabe von  $1 \times 10^4$  MDA-MB-231 Zellen pro Milliliter aktiviert. Für die erhöhte Thrombozytenzahl während der immunologischen Versuche, wurde die MDA-MB-231 Zellzahl der Thrombozytenkonzentration angepasst (z.B. Faktor 3,125 für  $1,25 \times 10^9$  Thrombozyten). Nach einer 20-minütigen Inkubation wurden die zellulären Bestandteile bei  $10.000 \times g$  für 10 min pelletiert. Die Releasates wurden entnommen und in ein neues Probengefäß verbracht. Bis zur Verwendung in den entsprechenden Versuchen wurden die Releasates bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Zur Herstellung Thrombozytenreichen Plasmas (PRP) wurde analog den obigen Ausführungen vorgegangen. Abweichend wurde das finale Zellpellet nicht in Thrombozytenpuffer, sondern in Plasma resuspendiert. Die Recalcifizierung erfolgte anschließend während der Durchführung der Versuche zur Thrombingenerierung.

Tabelle 9: Verwendete Konzentrationen der eingesetzten Substanzen

Substanz	Konzentration pro $4 \times 10^8$ Thrombozyten	Konzentration pro $1,25 \times 10^9$ Thrombozyten
UFH	1 I.E.	3,125 I.E.
Enoxaparin	1 I.E.	3,125 I.E.
Fondaparinux	775 ng	2441,25 ng
Heparin-Mimetika	50 $\mu\text{g}$	156,25 $\mu\text{g}$

## 4.5 Thrombingenerierungs-Assay

Zur Beurteilung der antikoagulatorischen Aktivität der untersuchten Heparin-mimetischen Polymere wurden diese, unter Verwendung eines Thrombingenerierungs-Assays, mit dem inhibitorischen Potential der kommerziellen Antikoagulanzen UFH, Enoxaparin und Fondaparinux in einem Tumorzell-aktivierten System verglichen.

Thrombozytenreiches Plasma wurde entsprechend den Angaben in Abschnitt 4.4 präpariert. Unverzüglich, wurde das PRP in neuen Reagiergefäße mit  $50 \mu\text{g}/\text{mL}$  *Corn Trypsin Inhibitor* (CTI) versetzt. Durch den Einsatz des spezifischen Faktor XII Inhibitors CTI kann der Einfluss der intrinsischen Gerinnung auf die Messung eliminiert werden, sodass das Messergebnis lediglich ein durch TF tragende Tumorzellen generiertes Signal darstellt. Nach einer 10-minütigen Inkubation mit CTI wurde das PRP aliquotiert und die Proben mit den entsprechenden Testsubstanzen versetzt und für weitere 30 Minuten inkubiert. Die für die Untersuchung eingesetzten Konzentrationen sind in Tabelle 9 aufgeführt. Während dieser Zeit wurden die zur Aktivierung der extrinsischen Gerinnung verwendeten Tumorzellen vorbereitet. Dazu wurden die Zellen einer konfluenten Kulturflasche unter Verwendung von EDTA/DPBS-Lösung abgelöst. Somit blieben relevante Oberflächenstrukturen der Zelle erhalten. Die Zellen wurden mit DPBS heruntergespült und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellzahl wurde entsprechend den Ausführungen in Abschnitt 4.2.3 bestimmt

und die Suspension bei  $450 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  für 4 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in DPBS resuspendiert und eine Zellkonzentration von 30.303 Zellen/mL eingestellt. Nach der erfolgten Inkubation der Proben mit den untersuchten Testsubstanzen, wurden diese in die entsprechenden Kavitäten einer 96F Non-Treated Black Microwell SH Platte überführt. Je nach Probe wurden die angegebenen Mengen Tumorzellsuspension, DPBS oder *tissue factor* Reagenz hinzugefügt (vgl. Tabelle 10).

Tabelle 10: Pipettierschema der Versuchsansätze der Thrombingenerierung

Probe	Reagenz				
	Plasma [ $\mu\text{L}$ ]	DPBS [ $\mu\text{L}$ ]	Tumorzellen [ $\mu\text{L}$ ]	TF-Reagenz [ $\mu\text{L}$ ]	Substrat [ $\mu\text{L}$ ]
Nullwert	17	33	—	—	50
pos. Kontrolle	34	6	—	10	50
Proben	17	—	33	—	50

Entstandene Luftblasen wurden vor der Messung entfernt. Unmittelbar vor Beginn der Messung wurden die Proben mit  $50 \mu\text{L}$  der Substrat-Lösung versetzt, wodurch gleichzeitig die für die Messung nötige Recalcifizierung der Proben erfolgte. Als Substrat diente ein Peptidgekoppeltes Derivat des 7-Amino-4-Methylcoumarins (AMC), welches nach der Abspaltung des Peptidrestes zur Fluoreszenz befähigt ist. Die Kinetik der Thrombin-vermittelten AMC-Freisetzung konnte mittels eines Fluoreszenz-Readers verfolgt werden. Die Änderung des Fluoreszenzsignals der Proben wurde über einen Zeitraum von 90 Minuten im Abstand von je einer Minute bestimmt. Um einen Rückschluss auf die *in-vitro* Thrombinaktivität zu erlangen, wurde vor den Messungen eine Kalibrierung durchgeführt, wodurch die gemessene Fluoreszenzintensität mit der Thrombinaktivität korreliert werden konnte. Zur Kalibrierung wurde das Kalibrator-Set Technothrombin<sup>®</sup> TGA CAL verwendet. Die seitens des Herstellers empfohlene Herstellung der Kalibrierlösungen ist in Tabelle 11 erläutert. Diese Kalibrierlösungen enthalten unterschiedliche Mengen Thrombin und setzen mit konstanter Geschwindigkeit das fluorogene AMC aus dem Substrat frei. Als Nullwert wurde die Aktivität von DPBS bestimmt. Pro Well wurden  $40 \mu\text{L}$  der Kalibrierlösung verwendet und die Umsetzung durch die Zugabe von  $50 \mu\text{L}$  Substrat-Lösung gestartet. Die Entstehung der Fluoreszenz wurde in einem Abstand von 30 Sekunden über einen Gesamtzeitraum von 10 Minuten verfolgt. Die Messungen der Fluoreszenzentwicklung erfolgten in einem Fluoreszenz-Reader bei einer konstanten Temperatur von  $37^\circ\text{C}$ . Als Positivkontrolle fungierte in diesem Versuch eine Plasmaprobe, welche durch den Zusatz von TF angereicherten Phospholipid-Mizellen (TGA RC high) aktiviert wurde. Die Aktivierung des extrinsischen Gerinnungssystems über *tissue factor* diente somit als Kontrolle der Aktivierbarkeit des verwendeten Plasmas. Die Auswertung der generierten Messwerte erfolgte durch die von der Technoclone GmbH bereitgestellte Software, sowie GraphPad Prism.

Tabelle 11: Pipettierschema der Kalibrierung des TGA

Verdünnung	V(Thrombin)	V(Puffer)
Verdünnung 1 (1:2)	200 µL Stammlösung	200 µL TGA Puffer
Verdünnung 2 (1:4)	100 µL Verdünnung 1	100 µL TGA Puffer
Verdünnung 3 (1:20)	20 µL Stammlösung	380 µL TGA Puffer
Verdünnung 4 (1:200)	20 µL Verdünnung 3	180 µL TGA Puffer

## 4.6 Lichttransmissionsaggregometrie

Das Testsystem zur Beurteilung einer Thrombozytenaggregation basiert auf dem Prinzip der Lichttransmissionsaggregometrie. Das Messprinzip ist in Abbildung 10 illustriert.

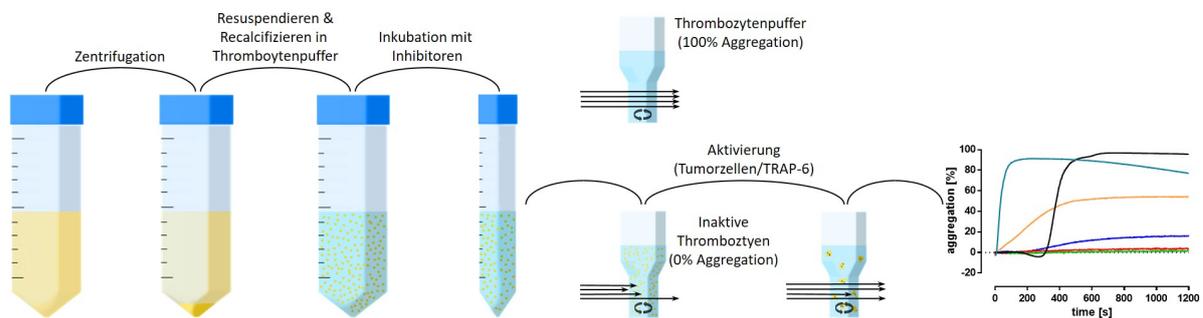


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Messprinzips der Lichttransmissionsaggregometrie einer Suspension der isolierter Thrombozyten

Inaktive Thrombozyten bedingen eine starke Trübung der Probenlösung, welche bei der photometrischen Messung deutlich mit dem eingebrachten Lichtstrahl interferiert. Die Lichttransmission ist gering. Bei einer Aktivierung der Thrombozyten lagern sich diese zusammen. Durch die Aggregation stehen weniger einzelne Zellen für die photometrische Interferenz zur Verfügung und können den eingebrachten Lichtstrahl weniger reflektieren, beugen oder brechen. Die Probenlösung verliert ihre Trübung. Die Lichttransmission steigt an und kann mit dem Maß der Aggregatbildung korreliert werden [390, 391].

Die analog der Ausführungen in Abschnitt 4.4 hergestellte Thrombozyten-Suspension wurde aliquotiert und mit den entsprechenden Testsubstanzen für 30 Minuten inkubiert. Die eingesetzten Konzentrationen der untersuchten Substanzen sind in Tabelle 9 aufgeführt. Zusätzlich zu den Testansätzen wurde stets ein Ansatz ohne beigefügte Substanzen als Negativkontrolle mitgeführt. Während der 30-minütigen Inkubation der Thrombozyten wurden die verwendeten Tumorzellen entsprechend den Ausführungen in Abschnitt 4.2.4 abgelöst und die Zellzahl analog des Abschnitts 4.2.3 bestimmt. Das generierte Tumorzellpellet wurde in DPBS resuspendiert und auf eine Zellkonzentration von  $1 \times 10^5$ /mL eingestellt. Im Vorfeld der Messung wurde das Aggregometer AFACT 4004 auf 37°C temperiert. Zu Beginn eines Versuchs wurde der Vergleichswert der maximalen Lichttransmission,

welcher eine Aggregation von 100 % darstellt, durch das Vermessen einer reinen Lösung des eingesetzten Puffers kalibriert. Vor jeder Probe musste der Vergleichswert der minimalen Lichttransmission, also einer Aggregation von 0 % separat erfasst werden. Dazu wurde eine Messküvette mit 200  $\mu$ L der entsprechenden Probe befüllt und die Transmission vor der Zugabe des Aktivators vermessen. Zur Aktivierung der Thrombozyten wurden 20  $\mu$ L der vorbereiteten Tumorzellsuspension in die Küvette pipettiert. Unter einer konstanten Rührgeschwindigkeit von 1.000 rpm wurde die Änderung der Lichttransmission kontinuierlich bestimmt. Zur Prüfung der Funktionsfähigkeit der eingesetzten Thrombozyten wurde eine Vergleichsprobe mit dem spezifischen PAR-1 Agonisten TRAP-6 bei einer Konzentration von 41  $\mu$ M stimuliert. Die Daten der photometrischen Messung wurden exportiert und mittels GraphPad Prism ausgewertet. Zur Darstellung der Messergebnisse wurde der prozentuale Wert der Aggregation gegen die Messzeit aufgetragen.

#### 4.7 ATP Freisetzungs-Assay

ATP wird in Thrombozyten in den dichten Granula gespeichert. Im Zuge einer Aktivierung der Thrombozyten und einer nachfolgenden Sezernierung dieser Granula kann das freigesetzte thrombozytäre ATP an den, auf der Oberfläche von Thrombozyten lokalisierten, ATP-Rezeptor P2X1 binden und durch nachgeschaltete Signalwege eine weitere Freisetzung der Granula und eine verstärkte Aggregation bedingen [392].

In diesem Versuch wird die etablierte Methode der ATP Bestimmung zur Messung einer Thrombozytenaktivierung angewendet. Das Testsystem basiert auf der Umsetzung von D-Luciferin zu Oxyluciferin. Diese Reaktion wird in Gegenwart von Sauerstoff ATP-abhängig durch das Enzym *Firefly Luciferase* katalysiert. Als Folge der Katalyse wird ein Biolumineszenzsignal generiert, das sich proportional zur freien Menge ATP in der untersuchten Probe verhält. Die Präparation der Thrombozyten-Suspension erfolgte entsprechend den Ausführungen in Abschnitt 4.4. Folgend wurde die Thrombozyten-Suspension aliquotiert und mit den untersuchten Substanzen für 30 Minuten inkubiert. Die verwendeten Konzentrationen können der Tabelle 9 entnommen werden. Während der Inkubation wurden die MDA-MB-231 Zellen entsprechend den Angaben in den Abschnitten 4.2.4 und 4.2.3 aufgearbeitet und gezählt. Nach einer Zentrifugation bei 4°C und  $450 \times g$  für 4 Minuten wurde das Zellpellet zu einer Konzentration von  $1 \times 10^5$ /mL in DPBS resuspendiert. Zur Aktivierung der Thrombozyten wurden diese nach Ablauf der Inkubationszeit mit der Tumorzellsuspension versetzt, sodass eine finale Konzentration von  $1 \times 10^4$  MDA-MB-231 Zellen pro Milliliter resultierte. Zusätzlich wurde eine der Proben mit 41  $\mu$ M TRAP-6 aktiviert und als Positivkontrolle geführt. Als Negativkontrolle dienten Thrombozyten, welchen kein Aktivator hinzugefügt wurde bzw. MDA-MB-231 Zellen in Thrombozytenpuffer. Während der Aktivierungszeit von 15 Minuten wurde analog den

Herstellerangaben des verwendeten ATP Determination Kits eine ausreichende Menge Reaktionslösung hergestellt (vgl. Tabelle Lösungen und Puffer). Alle Arbeitsschritte erfolgten nachgehend unter größtmöglichem Lichtausschluss.

Zur Quantifizierung wurden 50  $\mu\text{L}$  der aktivierten Probenlösungen in eine weiße Nunc™ F96 MicroWell™ Polystyrolplatte pipettiert und anschließend mit jeweils 40  $\mu\text{L}$  der Reaktionslösung versetzt. Das entstehende Lumineszenzsignal wurde unverzüglich an einem Plattenleser bei 560 nm vermessen.

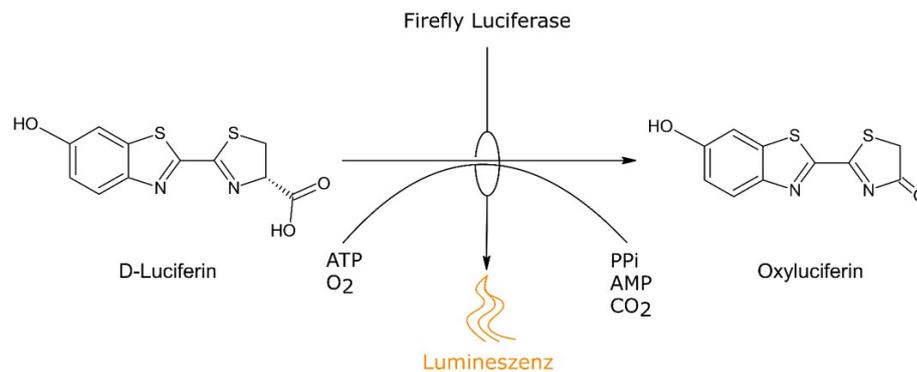


Abbildung 11: ATP-abhängige Umsetzung des D-Luciferins durch die Firefly Luciferase zu OxyLuciferin unter Lumineszenz Emission

## 4.8 Olink Proximity Extension-Assay

Zur Bestimmung der, im Zuge einer Thrombozytenaktivierung, aus den  $\alpha$ -Granula sezernierten Mediatoren wurde eine, den Angaben in Abschnitt 4.4 entsprechende, Thrombozyten-Suspension hergestellt. Diese wurde aliquotiert und mit den zu testenden Inhibitoren für 30 Minuten inkubiert. Die entsprechenden Inhibitor Konzentrationen können der Tabelle 9 entnommen werden. Während der Inkubation wurden analog des Abschnitts 4.2.4 MDA-MB-231 Brustkrebszellen abgelöst und für den Versuch vorbereitet. Die hergestellte Tumorzellsuspension wurde auf eine Konzentration von  $1 \times 10^5/\text{mL}$  eingestellt. Zur Aktivierung der Thrombozyten wurden diese so versetzt, dass eine finale Tumorzellkonzentration von  $1 \times 10^4$  Zellen/ $\text{mL}$  resultierte. Als Positivkontrolle wurden Thrombozyten mit 41  $\mu\text{M}$  TRAP-6 aktiviert. Nach einer Aktivierungszeit von 20 Minuten wurden die Proben bei  $10.000 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  für 10 Minuten zentrifugiert um jegliche Zellen abzutrennen. Der Überstand wurde in neue Eppendorf-Reagiergefäße überführt und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

Die Bestimmung der in den Proben enthaltenen Mediatoren wurde durch die Firma Olink Bioscience in Uppsala, Schweden, durchgeführt. Für die Untersuchung der hier verwendeten Proben wurde das Panel Inflammation herangezogen, welches 92 Entzündungs-assoziierte Protein-Biomarker simultan bestimmt. Das Prinzip der Messung basiert auf dem Proximity

Extension-Assay (PEA). Hierbei kommen für jeden Biomarker Antikörper zum Einsatz, wobei jeder Antikörper je eines von zwei aufeinander abgestimmten DNA-Tags trägt. Ist ein Analyt in der Probe enthalten, werden die DNA-Tags durch die Antikörper-vermittelte Bindung in eine räumliche Nähe zueinander gebracht und es kommt zur Hybridisierung der aufeinander abgestimmten DNA Abschnitte. Ausgehend vom hybridisierten Abschnitt werden die DNA Stränge verlängert. Die relative Quantifizierung der einzelnen Analyten zueinander erfolgt durch eine nachgeschaltete, standardisierte qPCR. Durch diese relative Quantifizierung können Aussagen über die Variation eines Biomarkers in verschiedenen Proben, jedoch keine Aussagen über das Verhältnis verschiedener Biomarker in einer Probe getroffen werden.

## 4.9 Surface Acoustic Wave Biosensorik

Eine unmittelbare Betrachtung eines Bindungsereignisses zwischen zwei Bindungspartnern, wie etwa Liganden und Rezeptoren bzw. wie in dieser Arbeit die Bindung zwischen einem potentiellen Inhibitor und einem Oberflächenprotein, lässt sich durch die Verwendung eines „*Surface Acoustic Wave*“-Biosensors vermessen. Der in dieser Arbeit verwendete Sam5 Blue SAW Biosensor ermöglicht es, geringste Masseauflagerungen auf den mit Gold bedampften Quarz Sensorchips zu detektieren. Zur Detektion werden auf dem Quarz Oberflächenwellen induziert, welche sich in Form einer horizontal polarisierten Scherwelle, der sogenannten Love-Welle, ausbreiten. In Folge einer Massenauflagerung kann eine Veränderung der Phase sowie der Amplitude der Love-Welle registriert werden [393, 394].

### 4.9.1 Reinigung der Biosensor Quarze

Die verwendeten Quarze müssen vor der Verwendung gereinigt werden, um mögliche Verunreinigungen und restliches 1-Hexadecanthiol aus vorherigen Messungen von der Goldoberfläche zu entfernen. Durch die Vermengung von einem Teil 30%igem Wasserstoffperoxid mit drei Teilen 96%iger Schwefelsäure, wurde unter Kühlung Peroxomonoschwefelsäure frisch hergestellt. Die Quarzoberfläche wurde für zwei Minuten mit der Peroxomonoschwefelsäure benetzt und anschließend mit demineralisiertem Wasser gespült. Dieser Waschschrift wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Bei der zweiten Wiederholung wurden die Quarze nach der Reinigung mit Wasser zusätzlich mit Aceton und Ethanol gespült. Bei der finalen Wiederholung wurde der Quarz abschließend mit Ethanol gespült und unter einem leichten Druckluftstrom getrocknet. Die gereinigten Quarze konnten bis zur nächsten Verwendung vor Feuchtigkeit und Staub geschützt gelagert werden.

#### 4.9.2 Beschichtung der Biosensor Quarze mit einer Modellmembran

Der Vorgang der Immobilisierung einer Modellmembran auf den Quarz-Sensoren ist in Abbildung 12 schematisch illustriert. Im Vorfeld der Membranübertragung wurde der Quarz für 12 Stunden in einer 10 mM 1-Hexadecanthal Lösung in Chloroform eingelegt. Durch die Reaktion des Thiols an der mit Gold bedampften Oberfläche des Quarzes formte sich ein sogenannter „*self assembled monolayer*“ (SAM), wodurch die Goldoberfläche hydrophobisiert wurde. Unmittelbar vor der Beschichtung mit der Modellmembran wurde der Quarz aus der 1-Hexadecanthal Lösung entnommen, mit Ethanol gespült und unter einem schwachen Luftstrom getrocknet. Zur Beschichtung des hydrophobisierten Quarzes fand eine Langmuir-Blodgett Filmwaage Anwendung. Zu Beginn wurde der Teflon Trog der Waage mit destilliertem Wasser befüllt. Als Modellmembran wurde ein Gemisch aus den Lipiden DPPC (80 %) und DGS-NTA(Ni) (20 %) verwendet. Dafür wurden die Lipide zu einer Gesamtkonzentration von 37,5 mmol/L in Chloroform gelöst. 10  $\mu$ L dieser Lösung wurden mit einer Hamilton-Spritze auf die Wasseroberfläche aufgebracht. Nach einer Wartezeit von 10 Minuten, in der das vorhandene Chloroform abdampfte, die Lipide sich entsprechend ihrer Polarität mit den hydrophilen Kopfgruppen in Richtung des Wassers ausrichteten und sich eine homogene Verteilung der Lipide einstellte, wurde der Lipidfilm auf der Oberfläche des Wassers durch die Bewegung eines Schiebers komprimiert. Mit einer, bei steigendem Druck abnehmenden, Geschwindigkeit verdichtete der Schieber den Lipidfilm bis der Druckaufnehmer einen Transferdruck von 42,5 mN/m registrierte. Dies entspricht Zweidrittel des Kollapsdruckes des Lipidgemisches. Bei einem konstanten Transferdruck wurde der Quarz mit einer Geschwindigkeit von 170  $\mu$ m/s senkrecht durch die Lipidmembran gesenkt und in einen Auffangbehälter abgeworfen. Dabei kommt es durch die hydrophoben Wechselwirkungen zur Anlagerung der Lipide an den 1-Hexadecanthal SAM und zur Ausbildung der Modellmembran auf der Goldoberfläche des Sensorquarzes (vgl. Abbildung 12). Das restliche Lipidgemisch wurde mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe von der Oberfläche der Waage entfernt. Der Quarz wurde mitsamt dem Auffangbehälter aus der Langmuir-Blodgett Filmwaage entnommen und das enthaltene Wasser durch eine 1,66  $\mu$ M Trehalose-Lösung ersetzt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min wurde der Quarz entnommen und mit etwas Trehalose-Lösung überschichtet. Durch die Assoziation der Trehalose an die hydrophilen Kopfgruppen der Lipide wurde ein Bruch der Modellmembran während des Trocknens unterbunden. Nachdem die Quarze bei Raumtemperatur vollständig getrocknet waren, konnten diese für die Messungen im Sam5 Blue SAW Biosensor verwendet werden.

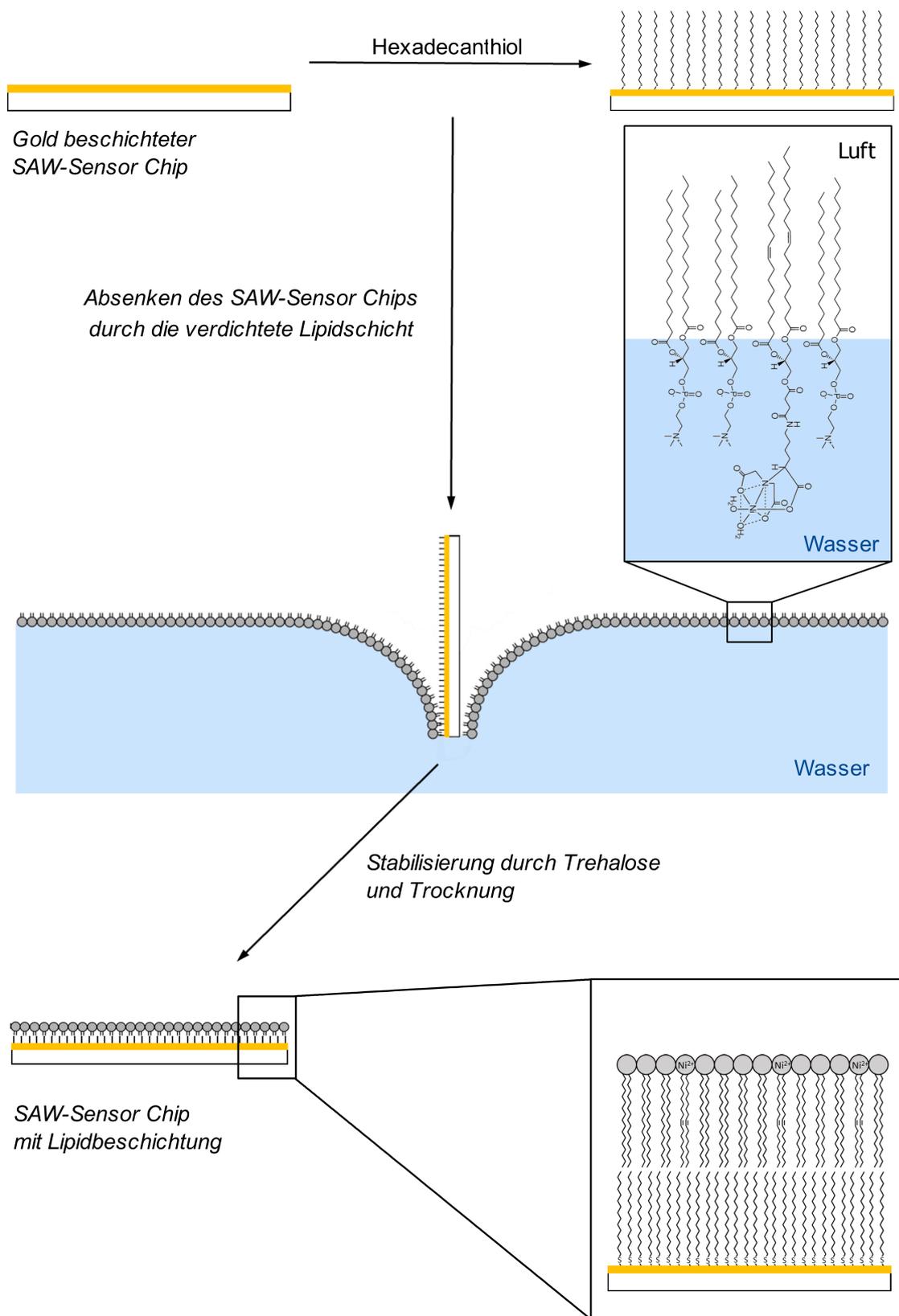


Abbildung 12: Schematische Darstellung des Prozesses einer Beschichtung des SAW-Biosensor Quarzes

### 4.9.3 Immobilisierung eines Proteins an der Modellmembran

Der trockene Sensor Quarz wurde in die Messkammer des Biosensors eingebaut. Zur Rekonstitution der Modellmembran wurde der Quarz mit Aqua dest. bei einer Flussgeschwindigkeit von 300  $\mu\text{L}/\text{min}$  überspült, wodurch die aufgelagerte Trehalose und etwaige Luftblasen entfernt wurden. Nach einer ausreichenden Spülzeit wurde das Aqua dest. gegen den Immobilisierungspuffer (1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ , 0,5 mM  $\text{Mn}^{2+}$  in Aqua dest.) ausgetauscht. Zur Prüfung der Integrität und der Funktionsfähigkeit des eingebauten Quarzes wurden Spektren der Phasen- und Amplitudenverschiebung über einen Frequenzbereich von 144 – 152 MHz aufgezeichnet. Bei einem gleichmäßigen Schwingungsverhalten der fünf Messkanäle des Quarzes konnte der Quarz für die Messung verwendet werden. Für die Messung wurden zwei Messfrequenzen bestimmt. Zum einen die Optimalfrequenz, zum anderen eine Frequenz, welche eine Phasendifferenz von  $180^\circ$  zur Optimalfrequenz aufweist (vgl. Abbildung 13).

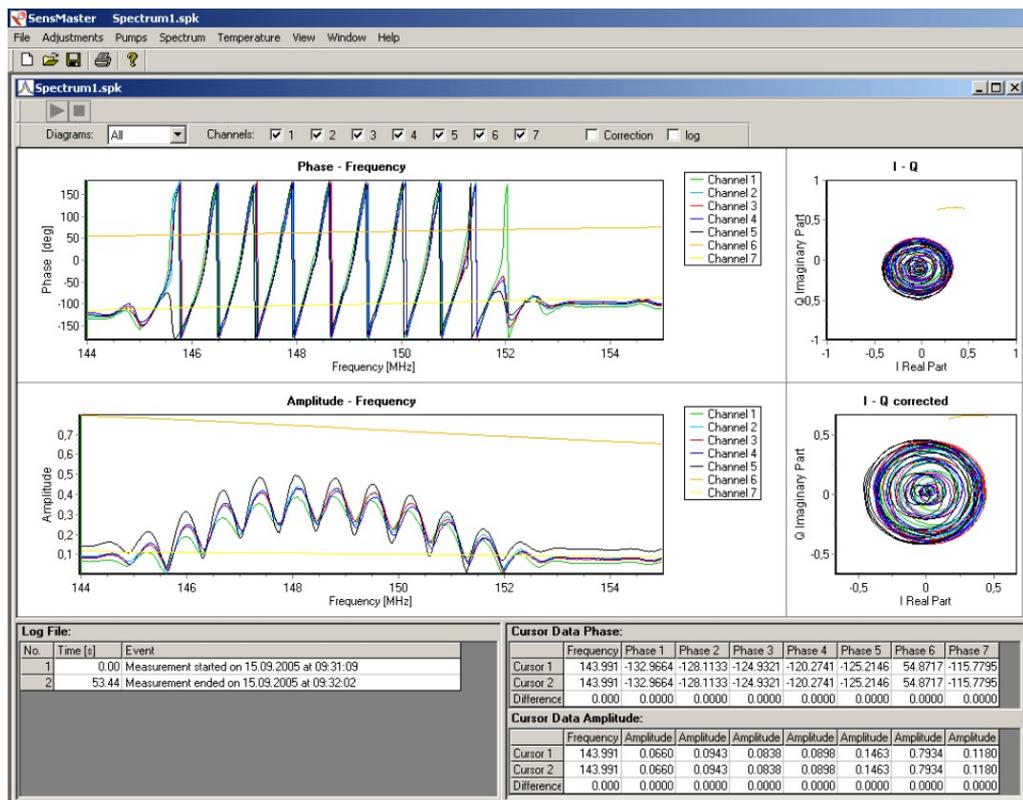


Abbildung 13: Darstellung der Aufzeichnung von Phasen- und Amplitudensignalen eines intakten Sensor Quarzes

Zur Immobilisierung der verwendeten, rekombinanten Proteine Integrin  $\alpha 4\beta 1$  (VLA-4), P-Selectin, E-Selectin und PF4 (CXCL4) wurden diese in Immobilisierungspuffer verdünnt. Durch den integrierten Autosampler wurden 2  $\mu\text{g}$  bzw. 2,5  $\mu\text{g}$  des jeweiligen Proteins

injiziert und bei einer Flussgeschwindigkeit von 20  $\mu\text{L}/\text{min}$  durch die Messzelle geleitet. Die verwendeten Proteine zeichnen sich durch mehrere, am C-Terminus befindliche, endständige Histidine aus. Diese sogenannten His-Tags binden durch Komplexierung an das Nickel-Atom des DGS-NTA(Ni), wodurch das untersuchte Protein in einer definierten Richtung in die Membran inkorporiert werden kann. Die Auflagerung des Proteins auf die artifizielle Membran wurde als erhebliche Massenauflagerung durch den SAW-Biosensor detektiert und äußert sich durch eine Änderung des Phasenwinkels (vgl. Abbildung 14). Nach der Immobilisation des Proteins folgte eine Equilibrierung des Systems bei einer Flussgeschwindigkeit von 40  $\mu\text{L}/\text{min}$ , bis die Verschiebung der Phase einen konstanten Wert erreicht hatte um die Verfälschung der Messung durch die Ablösung von ineffizient gebundenen Proteinen auszuschließen.

Tabelle 12: Immobilisierungsbedingungen und Mengen der untersuchten Proteine

Protein	Immobilisierungspuffer	Konzentration [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	Immobilisationsmenge [ $\mu\text{g}$ ]
VLA-4	1 mM $\text{CaCl}_2$ 1 mM $\text{MgCl}_2$ 0,5 mM $\text{MnCl}_2$ in Aqua Purificata	12,5	2
P-Selectin	1 mM $\text{CaCl}_2$ 1 mM $\text{MgCl}_2$ 0,5 mM $\text{MnCl}_2$ in Aqua Purificata	12,5	2
E-Selectin	1 mM $\text{CaCl}_2$ 1 mM $\text{MgCl}_2$ 0,5 mM $\text{MnCl}_2$ in Aqua Purificata	12,5	2
PF4	DPBS	15,625	2,5

#### 4.9.4 Vermessung der Testsubstanzen

Für die Detektion der Bindungsereignisse zwischen den untersuchten Testsubstanzen und den auf der Modellmembran immobilisierten Proteinen wurden Verdünnungsreihen zwischen den folgenden minimalen und maximalen Konzentrationen erstellt. Die Vermessung der Testsubstanzen erfolgte nach ansteigender Konzentration bei einer Flussgeschwindigkeit von 40  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Zunächst wurden 120  $\mu\text{L}$  der Verdünnung durch den Autosampler injiziert. Nach Beendigung der Injektion folgte eine Wartezeit von 10 min. Anschließend wurden 120  $\mu\text{L}$  (80  $\mu\text{L}$  bei PF4) einer 2 M NaCl (4 M bei PF4) Lösung injiziert um die gebundenen Heparin-Derivate bzw. Heparin-mimetischen Polymere vom immobilisierten Protein herunterzuwaschen. Nach dieser Rekonstitution der Proteine wurde die nächst höhere Konzentration der Testsubstanzen vermessen.

Tabelle 13: Verdünnungsreihen der untersuchten Substanzen für die Bindung an die analysierten Proteine

VLA-4			P-Selectin		
Substanz	$c_{\min}$ [M]	$c_{\max}$ [M]	Substanz	$c_{\min}$ [M]	$c_{\max}$ [M]
UFH	$5,20 \times 10^{-10}$	$5,20 \times 10^{-7}$	UFH	$1,04 \times 10^{-8}$	$4,16 \times 10^{-6}$
Enoxaparin	$1,1 \times 10^{-8}$	$2,22 \times 10^{-6}$	Enoxaparin	$1,04 \times 10^{-8}$	$3,12 \times 10^{-6}$
Fondaparinux	$1,04 \times 10^{-9}$	$8,32 \times 10^{-6}$	Fondaparinux	$5,20 \times 10^{-9}$	$6,76 \times 10^{-6}$
Heparin-Mimetika	$1,04 \times 10^{-8}$	$3,12 \times 10^{-6}$	Heparin-Mimetika	$1,04 \times 10^{-8}$	$3,12 \times 10^{-6}$

E-Selectin			PF4		
Substanz	$c_{\min}$ [M]	$c_{\max}$ [M]	Substanz	$c_{\min}$ [M]	$c_{\max}$ [M]
UFH	$5,20 \times 10^{-10}$	$5,20 \times 10^{-7}$	UFH	$1,04 \times 10^{-12}$	$1,04 \times 10^{-9}$
Enoxaparin	$5,20 \times 10^{-9}$	$5,20 \times 10^{-6}$	Enoxaparin	$1,04 \times 10^{-11}$	$7,80 \times 10^{-10}$
Fondaparinux	$5,20 \times 10^{-10}$	$5,20 \times 10^{-7}$	Fondaparinux	$1,04 \times 10^{-11}$	$1,04 \times 10^{-9}$
Heparin-Mimetika	$5,20 \times 10^{-9}$	$2,60 \times 10^{-6}$	Heparin-Mimetika	$1,04 \times 10^{-9}$	$5,20 \times 10^{-7}$

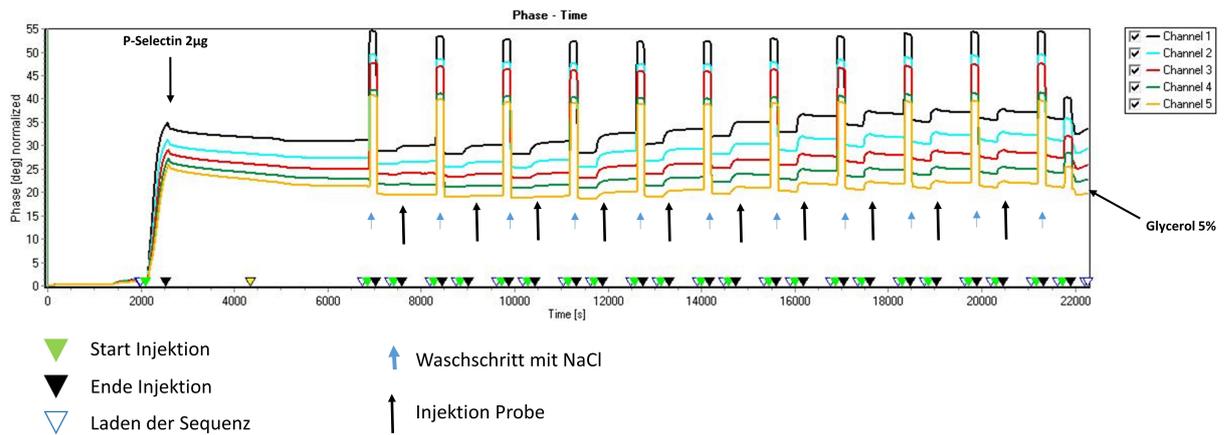


Abbildung 14: Schematische Darstellung des Injektionsablaufs der Probenlösungen und Waschschrte einer SAW Messung

#### 4.9.5 Auswertung der Bindungskinetik

Mittels der Software FitMaster<sup>®</sup> wurden die Parameter  $K_D$ ,  $k_{\text{on}}$  sowie  $k_{\text{off}}$  aus den aufgezeichneten Phasenverschiebungen extrahiert. Dazu wurden die Phasenänderungen im Bereich von 200 s vor und 600 s nach der Injektion eines Verdünnungsschrittes betrachtet. Mittels eines 1:1 Bindungsmodells und unter der Annahme einer verbleibenden Restbindung wurde eine Kurvenanpassung dieser Graphen durchgeführt (vgl. Abbildung 15). Die Gleichungen für die Assoziation und die Dissoziation sind in Formel 1 und 2 aufgeführt.

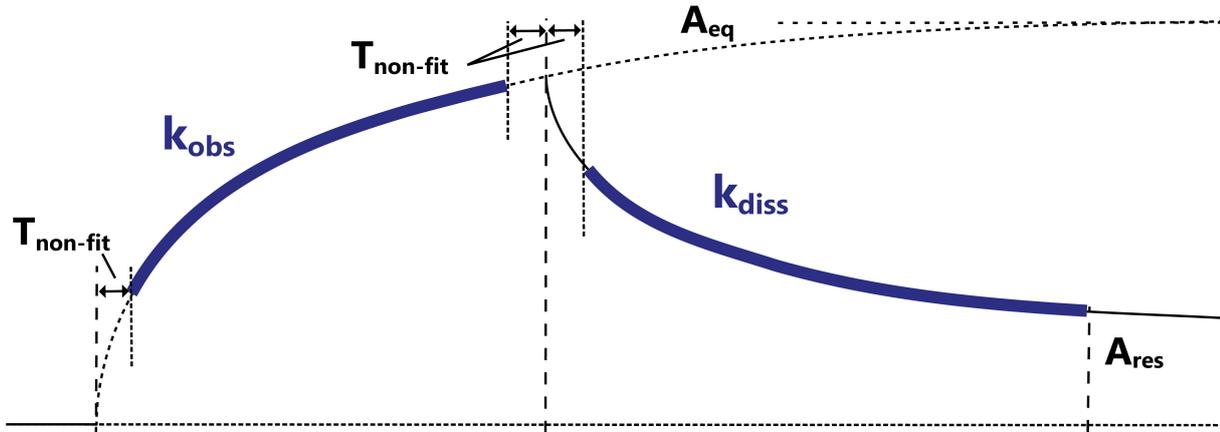


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Kurvenanpassung des ausgewählten Bindungsmodells mit relevanten Parametern

$$\text{Assoziation}; t \leq t_{stop} : A(t) = A_{eq} \times [1 - e^{(-k_{obs} \times t)}] \quad (1)$$

$$\text{Dissoziation}; t > t_{stop} : A(t) = A_{res} + [A(t_{stop}) - A_{res}] \times e^{(-k_{diss} \times (t - t_{stop}))} \quad (2)$$

Aus der Kurvenanpassung wurde nun für jede injizierte Konzentration der  $k_{obs}$  Wert bestimmt. Durch die Auftragung des  $k_{obs}$  Wertes gegen die Konzentration konnte eine lineare Regression durchgeführt werden. Anhand der Formel 3 konnten nun die Parameter  $k_{on}$  und  $k_{off}$  bestimmt werden. Weiterführend wurde mittels Formel 4 der  $K_D$  Wert errechnet.

$$k_{obs} = k_{on} \times c + k_{off} \quad (3)$$

$$K_D = \frac{k_{off}}{k_{on}} \quad (4)$$

## 4.10 VLA-4/VCAM-1 Adhäsions-Assay

Zur Evaluation der funktionellen Konsequenz einer Bindung des Integrins VLA-4 durch die Heparin-mimetischen Polymere und die kommerziellen Heparin-Derivate UFH, Enoxaparin sowie Fondaparinux, wurde die Adhäsionskapazität der VLA-4 exprimierenden Melanomzelllinie MV3 an den komplementären Liganden VCAM-1 bestimmt. Dazu wurde ein Apparaturaufbau verwendet, welcher in Abbildung 16 schematisch skizziert ist und die Untersuchung der Zelladhäsion unter physiologischen Flussbedingungen erlaubt.

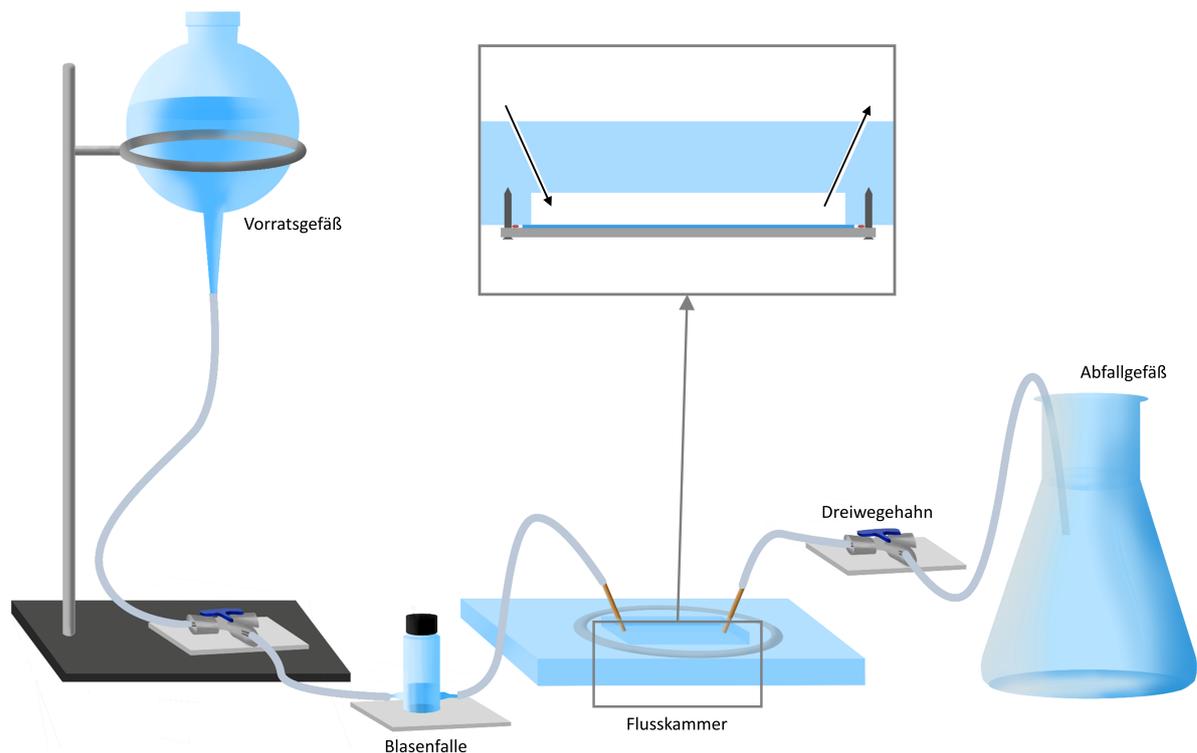


Abbildung 16: Schematische Darstellung des Aufbaus der Flusskammer zur Bestimmung der Adhäsion von MV3 Melanomzellen an immobilisiertes VCAM-1

### 4.10.1 Apparaturaufbau

Die Apparatur der Flusskammer besteht aus einem Vorratsgefäß, dessen Höhe zur Regulation des hydrostatischen Drucks und somit der Flussgeschwindigkeit des Puffers, adjustiert werden kann. Über einen Dreiwegehahn kann der Pufferfluss zur Montage des Glasplättchens oder der Zelinjektion unterbrochen werden. Folgend ist eine Blasenfalle zwischen dem Dreiwegehahn und der eigentlichen Flusskammer installiert. Diese dient zum einen dazu, etwaige im Puffer mitgetragene Luftblasen am Eintritt in die Flusszelle zu hindern,

zum anderen können die untersuchten Zellen über die Blasenfalle in den Pufferstrom injiziert werden. Die Flusskammer besteht aus einem Polyacrylatblock. An der Unterseite wurde eine Aussparung der Maße 12 mm × 6 mm × 0,45 mm eingefräst, welche, durch an der Oberseite eingebrachte Kapillaren, mit Puffer durchströmt wird. An der Unterseite der Flusskammer wird ein Glasplättchen mit einem Durchmesser von 18 mm und einer Dicke von 0,3 mm mittels einer Gummidichtung und eines Metallrings angeschraubt. Hinter der Flusskammer befindet sich ein weiterer Dreiwegehahn zur Regulierung des Pufferflusses, welcher anschließend in ein Auffanggefäß geleitet wird.

#### **4.10.2 Reinigung und Beschichtung der Glasplättchen**

Vor der Immobilisation eines Proteins auf der Glasoberfläche müssen die Glasplättchen gründlich gereinigt werden. Für den ersten Schritt dieser Reinigung wurden die Glasplättchen in einer Mischung aus 15 mL 30 %igem Wasserstoffperoxid und 35 mL konzentrierter Schwefelsäure (Reinigungslösung 1) für 30 Minuten im Ultraschallbad auf 80°C erhitzt. Anschließend wurden die Glasplättchen zehnmal mit demineralisiertem Wasser gewaschen. In einem zweiten Reinigungsschritt wurden die gespülten Glasplättchen in einer Lösung aus 10 mL 30 %igem Wasserstoffperoxid, 10 mL 26 %igem Ammoniak und 50 mL demineralisiertem Wasser (Reinigungslösung 2) bei 80°C für weitere 30 Minuten im Ultraschallbad gereinigt und im Nachgang erneut zehnmal mit demineralisiertem Wasser gespült. Die Glasplättchen wurden nun bei 80°C im Trockenschrank getrocknet.

Zur Immobilisation von Proteinen auf einer Glasoberfläche muss diese zunächst aktiviert werden. Dies geschieht durch die Verwendung von Cyanurchlorid (vgl. Abbildung 17). In wasserfreiem Chloroform wurde eine Spatelspitze Cyanurchlorid gelöst und auf die gereinigten Glasplättchen gegeben. Durch die Reaktion bei Raumtemperatur im Ultraschallbad wurde eine kovalente Bindung zwischen den Silanolgruppen der Glasoberfläche und dem eingesetzten Cyanurchlorid ausgebildet. Nach einer Reaktionszeit von 30 min wurden die Glasplättchen im Ultraschallbad mit wasserfreiem Chloroform für 20 min gespült und anschließend im Trockenschrank bei 80°C getrocknet. Die so aktivierten Glasplättchen konnten unter trockenen Bedingungen für zwei Monate gelagert werden.

Für die Beschichtung der Glasplättchen mit 0,2 µg VCAM-1 wurde eine Mischung aus 10 µL einer 4 %igen BSA Lösung, 60 µL Boratpuffer sowie 10 µL einer 0,02 µg/µL konzentrierten VCAM-1 Lösung hergestellt. Die Mischung wurde auf ein aktiviertes Glasplättchen übertragen. Nach einer Reaktionszeit von 12 h bei 4°C konnte das Glasplättchen in der Flusskammer montiert und für die Zellversuche verwendet werden.

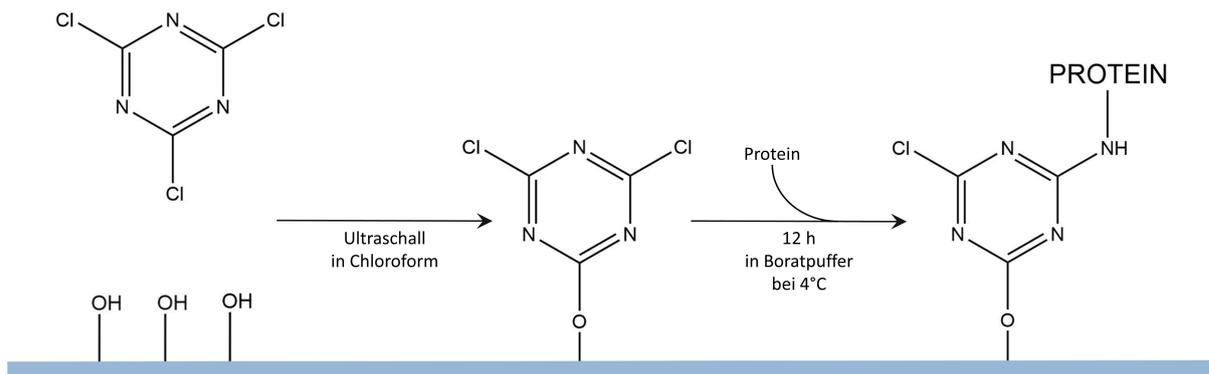


Abbildung 17: Schematische Darstellung der Immobilisation eines Proteins durch einen Cyanur-Linker an einer Glasoberfläche

#### 4.10.3 Durchführung der Messung

Die für die Versuche verwendeten Zellen wurden wie in Abschnitt 4.2.4 beschrieben vorbereitet und zu einer Konzentration von  $1 \times 10^6/100 \mu\text{L}$  in FKS-freiem Medium resuspendiert. Nachdem das mit VCAM-1 beschichtete Glasplättchen in korrekter Orientierung in die Zellkammer eingebaut war, wurde die Apparatur mit DPBS äquilibriert. Die Flusskammer wurde auf dem verwendeten Axiovert 200 Lichtmikroskop der Firma Carl Zeiss Microscopy GmbH arretiert. Durch die Variation der Aufhängungshöhe des Vorratsgefäßes konnte eine Flussgeschwindigkeit von 1 Tropfen pro 3 Sekunden eingestellt werden, wodurch innerhalb der Flusskammer eine Scherrate von etwa  $200 \text{ s}^{-1}$  resultiert, welche somit annähernd der Scherrate in venösen Kapillaren entspricht [395]. Um eine Bindung zwischen dem immobilisierten VCAM-1 und dem zellständigen VLA-4 zu ermöglichen, müssen die Zellen vor dem Versuch für 5 Minuten durch den Zusatz von  $\text{Mn}^{2+}$  Ionen in einer finalen Konzentration von 1 mM aktiviert werden. Während dieser VLA-4 Aktivierung konnten die Zellen ebenfalls mit den untersuchten Testsubstanzen inkubiert werden. Die eingesetzten Konzentrationen sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 14: Verwendete Konzentrationen der eingesetzten Substanzen

Substanz	Menge pro $1 \times 10^6$ MV3 Zellen	Konzentration
UFH	0,1 I.E.	1 I.E./mL
Enoxaparin	0,1 I.E.	1 I.E./mL
Fondaparinux	77,5 ng	775 ng/mL
Heparin-Mimetika	5,0 $\mu\text{g}$	50 $\mu\text{g/mL}$

Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen in die Blasenfalle injiziert. Durch das Öffnen der Dreiwegehähne wurden die Zellen durch die Flusskammer geleitet. Sind die Zellen in der Flusskammer angelangt, werden die Dreiwegehähne verschlossen und der Pufferstrom

somit gestoppt. Den Zellen war es so ermöglicht, über einen Zeitraum von 5 Minuten zum Boden der Flusskammer zu sedimentieren und mit VCAM-1 zu interagieren. Eine Videosequenz von 15 Sekunden wurde gestartet und erfasste so die Interaktion der Zellen mit den beschichteten Glasplättchen bei erneuter Öffnung der Dreiwegehähne. Nach Beendigung einer Messung konnten residuale Zellen durch die gezielte Injektion einer Luftblase von der Oberfläche des Glasplättchens entfernt werden, wodurch das Plättchen für die nächste Zelinjektion rekonstituiert war.

Zur Auswertung der VLA-4/VCAM-1 Interaktion wurden die aufgezeichneten Videosequenzen alle drei Sekunden auf die Anzahl adhärenter Zellen untersucht, wobei der erste Zeitpunkt unmittelbar vor Beginn des Pufferstroms liegt und für die Normalisierung der Ergebnisse als 100 % Wert fungiert. Die normalisierten Werte der adhärenter Zellen werden in einem Graphen gegen die Zeit dargestellt.

#### **4.11 Artifizierter Endothel Adhäsions-Assay**

Zur Evaluierung des Einflusses der Heparin-Mimetika und Heparin-Derivate auf die Adhäsion von MV3 Melanomzellen an die Endothelbarriere, wurden diese in einem System untersucht, welches sowohl die endotheliale Barriere als auch den physiologischen Blutfluss simuliert. Dieser Versuch wurde freundlicherweise durch Dr. Christian Gorzelanny am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Zur Vorbereitung des Versuchs wurden  $5 \times 10^5$  HUVEC Zellen auf Gelatine-beschichtete  $\mu$ -slides 0,2 Luer der Firma Ibidi GmbH ausgesät. Die Zellen wurden für 48 h in einem Medium, bestehend aus Zweidrittel M199 Medium, einem Drittel EGM-2 Medium, 10 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin, bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Anschließend wurden die Zellen über 4 h mit 10 ng/mL TNF- $\alpha$  stimuliert und das Oberflächenprotein CD31 mit Alexa Fluor 647 markiert. Des Weiteren wurde humanes Hirudin-Blut mit  $1 \times 10^6$  GFP-gelabelten und Mn<sup>2+</sup> (1 mM) aktivierten MV3 Zellen versetzt. Die Proben zur Untersuchung der Testsubstanzen wurden im Voraus mit den in Tabelle 14 aufgeführten Konzentrationen inkubiert. Nach Abschluss der Vorbereitungen wurden die aktivierten HUVEC Zellen über einen Zeitraum von 30 Minuten bei einem Scherstress von 2 Dyn/cm<sup>2</sup> mit dem MV3 Zellen enthaltenen Blut überspült. Die Anzahl adhärenter MV3 Zellen wurde fluoreszenzmikroskopisch bestimmt. Zur Auswertung der relativen Hemmwirkung der Testsubstanzen wurde die Zahl der adhärenter Zellen auf die Ergebnisse der lediglich mit MnCl<sub>2</sub> behandelten Proben normalisiert.

## 4.12 IL-10 ELISA

Zur ersten Einschätzung eines immunmodulatorischen Effektes von Thrombozyten und deren Releasates, wurde das Zytokin Interleukin-10 mittels eines *Enzyme-linked immunosorbent Assays* in den Überständen einer PBMC/Thrombozyten Co-Kultur bestimmt.

Unter variierenden Bedingungen und für unterschiedliche Zeiten wurden die in Abschnitt 4.3.2 isolierten PBMCs mit den nach Abschnitt 4.3.1 gewonnenen Thrombozyten oder deren Releasates co-kultiviert. In einem Gesamtvolumen von 3,0 mL wurden  $3,8 \times 10^6$  PBMCs mit Thrombozyten bzw. deren entsprechende Releasates in einem Verhältnis von 1:250 versetzt. Je nach Ansatz wurden zusätzlich 100 I.E./mL IL-2 oder 95  $\mu$ L des T-Zellen stimulierenden Antikörper-Mix ImmunoCult™ Human CD3/CD28/CD2 T Cell Activator beigemischt. Die Kultivierung dieser Proben erfolgte in 12-Well Platten. Je nach Versuchsaufbau wurden die Überstände nach einer Inkubationszeit von 48 h entnommen oder die Ansätze mit einem zweiten Thrombozyten bzw. Releasate Stimulus versetzt und für weitere 48 h inkubiert. Zur Gewinnung der Überstände wurden die Proben zentrifugiert um die restlichen Zellen abzutrennen. Anschließend wurden die Überstände in neue Eppendorf-Gefäße verbracht und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Für die Detektion des Zytokins wurde das Human IL-10 Mini ABTS ELISA Development Kit der Firma PeproTech Inc. verwendet. Zunächst wurde der sogenannte *Capture Antibody* über sein Fc-Fragment in einer F96 Maxisorb Nunc-Immuno Platte immobilisiert. Hierzu wurden 100  $\mu$ L einer 0,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  konzentrierten Antikörper-Lösung in die Kavitäten der Platte verbracht und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Platte, entsprechend der Herstellerangaben, viermal mit Waschpuffer gewaschen. Um die Verfälschung der Messung durch unspezifische Bindungen des Analyten an die Platte zu unterbinden, wurden diese durch eine Inkubation mit einer Blockierungslösung abgesättigt. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur erfolgten erneut vier Waschschritte. Anschließend wurden jeweils 100  $\mu$ L der entsprechenden Probe oder des, nach Angaben des Herstellers angefertigten, Standards in die Kavitäten der Platte pipettiert. Während einer zweistündigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur binden die Analyt-Moleküle an die spezifischen Fab-Fragmente des *Capture Antibody*. Nach einem weiteren Waschvorgang wurde jedes Well mit 100  $\mu$ L einer 1,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  konzentrierten Detektionslösung versetzt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Das Fab-Fragment des biotinylierten Detektionsantikörpers bindet an ein, zum *Capture Antibody* unterschiedliches Epitop, wodurch eine zweite Antikörper Bindung des Analyten ermöglicht ist. Folgend wurde die Platte erneut gewaschen und bei Raumtemperatur mit 100  $\mu$ L einer Avidin-HRP Lösung inkubiert. Durch die Bindung zwischen Biotin und Avidin wurde die Meerrettich-Peroxidase (HRP) an den Analyt-Antikörper-Komplex gebunden. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde abermals gewaschen. Der ELISA wurde durch die Zugabe von

100  $\mu$ L 1 Step<sup>®</sup>Ultra TMB ELISA Substrat Lösung entwickelt. Durch die Umsetzung des Substrates 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) durch die HRP entwickelte sich, unter simultanem Wasserstoffperoxid Verbrauch, eine dem Analytgehalt proportionale Blaufärbung. Bei ausreichender Entwicklung wurde die Reaktion durch den Zusatz von 50  $\mu$ L einer 2 M Schwefelsäure gestoppt. Es erfolgte ein Farbumschlag von blau zu gelb. Die Intensität der entstandenen Färbung wurde mittels des Multiskan<sup>®</sup> EX Plattenlesers bei 450 nm detektiert. Die gemessenen Absorptionswerte wurden um das Hintergrundsignal bei 590 nm sowie die Absorption des Nullwertes bzw. Diluents korrigiert. Anhand der vermessenen Standards konnten die Gehälter der Proben mittels einer 4-Parameter logistischen Regression ermittelt werden.

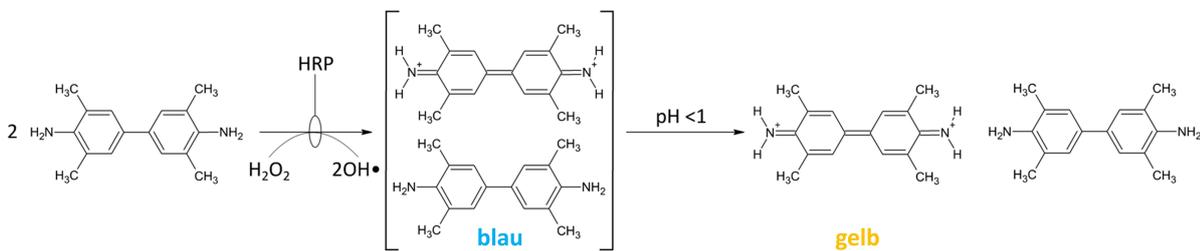


Abbildung 18: Umsetzung des Substrats TMB zur Detektion des IL-10 ELISA

### 4.13 Durchflusszytometrie

Die Methode der Durchflusszytometrie erlaubt es, anhand einzelzellbasierter Messungen, nicht nur zwischen verschiedenen Zellpopulationen eines Zellgemenges zu unterscheiden, sondern ermöglicht ebenso Einblicke in den Expressionsstatus bestimmter Zielproteine innerhalb einer Zellpopulation. Zur Erfassung einzelzellbasierter Daten wird die zu vermessende Zellsuspension durch eine Kapillare angesaugt und die separierten Zellen an einem Laser vorbei geleitet. Beim Passieren der Zelle durch den monochromatischen Strahl des Lasers können, durch eine komplexe Filter- und Detektoranordnung, verschiedene Signale registriert werden. Dies umfasst zum einen den *Forward Scatter* (FSC) sowie den *Side Scatter* (SSC), welcher in einem 90° Winkel zum Strahlengang des Lasers detektiert wird. Hierbei spiegelt der FSC die Größe der durchtretenden Zelle wider, wohingegen der SSC mit der Granularität der Zelle korreliert. Die Gegenüberstellung dieser beiden Parameter in Form eines Dot-Plots erlaubt eine Differenzierung verschiedener Zellpopulationen anhand ihrer morphologischen Unterschiede. Weiterhin ist es möglich, mithilfe Fluorophor-gekoppelter Antikörper die Expression eines Antigens zu bestimmen. Durch die Nutzung mehrerer Exzitationsquellen z.B. eines roten und eines blauen Lasers sowie der Verwendung diverser Bandpassfilter ist es möglich mit verschiedenen Fluorophoren eine

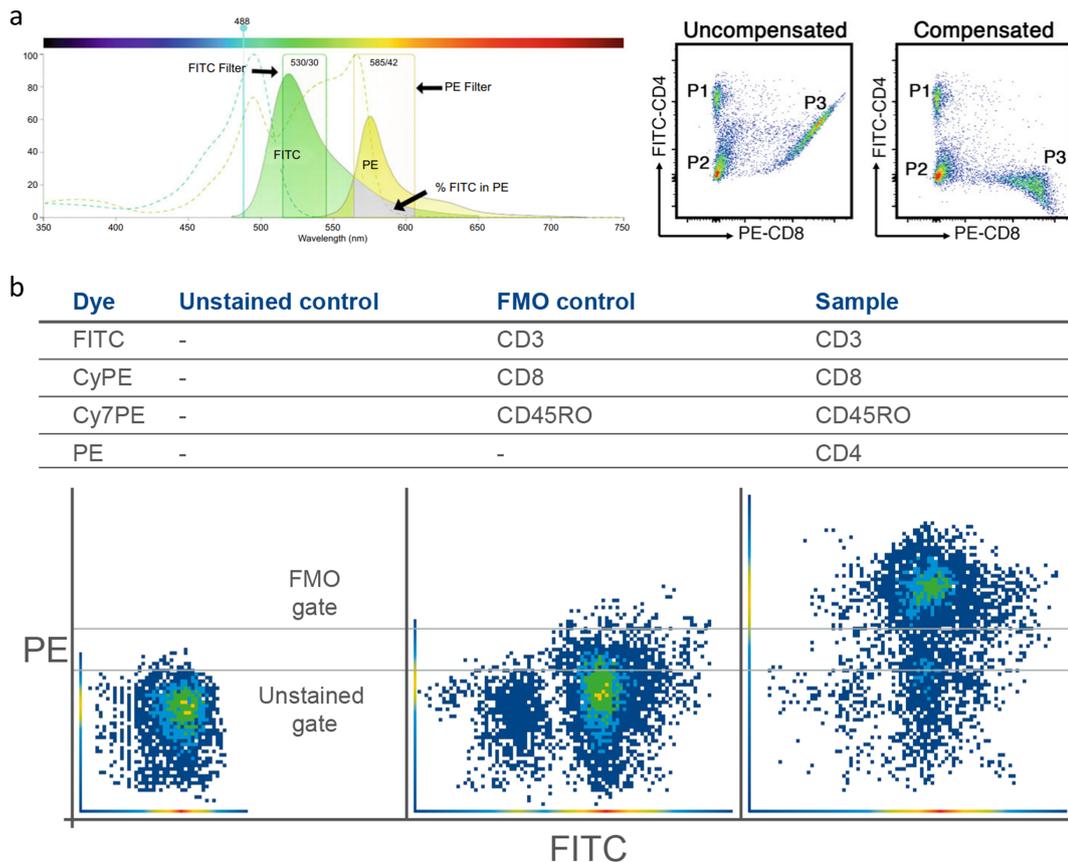


Abbildung 19: (a) Darstellung der Notwendigkeit einer Kompensation bei der Verwendung mehrerer Fluorophore zur Elimination falsch-positiver Signale. (b) Illustration der Verwendung einer FMO Kontrolle zur Verhinderung der Detektion falsch-positiver Zellen. Somit kann beispielsweise eine Verschiebung von nur mit FITC gefärbten Zellen in den PE-Kanal (Mitte) berücksichtigt werden. Eine Ausrichtung des Gates an einer gänzlich ungefärbten Kontrolle (links) würde zum Einschluss falsch-positiver Zellen führen und das Messergebnis einer vollständig gefärbten Probe (rechts) um den Betrag zwischen den beiden horizontalen Markierungen verzerren

Vielzahl an Zielstrukturen simultan zu detektieren. Das hierbei vermessene Emissionslicht wird ähnlich dem SSC in einem Winkel von 90° registriert.

Neben einer Detektion von Antigenen, welche auf der Oberfläche einer Zelle exprimiert sind, können durch eine Fixierung und Permeabilisierung der Zelle zytosolische sowie nukleäre Antigene für die Untersuchung zugänglich gemacht werden. Die Darstellung der detektierten Signale kann sowohl als Histogramm, welches die Fluoreszenzintensität gegen die Ereignishäufigkeit aufträgt, sowie als Dot-Plot zur simultanen Darstellung von zwei verschiedenen Antigenen erfolgen. Zur Ermöglichung einer tiefergehenden Analyse der Proben können durch Verwendung von Auswahlbereichen, sogenannten Gates, weitere Antigen-positive Subpopulationen wie CD8<sup>+</sup> Zellen oder dreifachpositive CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Zellen selektiert und untersucht werden. Besonders bei der Verwendung mehrerer Fluoro-

phore zur simultanen Determinierung verschiedener Antigene können störende Nebeneffekte auftreten. Einer dieser Effekte ist das Phänomen des *Spillovers*. Dieses entsteht dadurch, dass das Fluoreszenzspektrum eines Farbstoffes nicht nur einen Detektionskanal abdeckt, sondern auch von einem oder mehreren weiteren Detektionsfiltern erfasst wird. Das gängige Fluorophor Fluoresceinisothiocyanat (FITC) wird primär im grünen Wellenlängenbereich detektiert, strahlt jedoch auch deutlich in den gelben Detektionsbereich. So wird bei der Detektion von Phycoerythrin (PE) nicht nur die Fluoreszenz dieses Farbstoffes, sondern ein additives Signal aus FITC und PE registriert. Durch die Verwendung von einzelgefärbten Proben, den Kompensationskontrollen, können diese *Spillover*-Effekte errechnet und die Signale entsprechend bereinigt werden (vgl. Abbildung 19 a). Wie in Abbildung 19 b dargestellt, können trotz erfolgter Kompensation die Signale für Proben, welche keine PE markierten Antigene exprimieren, durch die Farbstoffe der anderen Antigene in den PE Detektionskanal verschoben sein. Zur Korrektur dieses Phänomens werden sogenannte *fluorescence-minus-one* Kontrollen (FMO) herangezogen. In diesen FMO Kontrollen wird jeweils ein Farbstoff aus dem *Multicolour*-Experiment ausgelassen. Die FMO Kontrollen sind von besonderer Bedeutung bei der korrekten Ausrichtung der Gates, welche positive Subpopulationen definieren, um eine falsch-positive Erfassung der Zellen auszuschließen.

#### 4.13.1 Differenzierung regulatorischer T-Zellen

Regulatorische T-Zellen stellen eine immunsuppressive Subpopulation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen dar und tragen zur Immuntoleranz gegenüber malignen Zellen bei. Der Effekt von isolierten Thrombozyten bzw. deren Releasates unter Einfluss von Heparin-Mimetika und Heparin-Derivaten auf die Differenzierung regulatorischer T-Zellen soll in folgendem Versuch bestimmt werden. Zur Identifizierung werden die  $\alpha$ -Untereinheit des IL-2 Rezeptors (CD25) sowie der Transkriptionsfaktor FoxP3 als etablierte T<sub>reg</sub>-Marker herangezogen. Die in diesem Versuch verwendeten Thrombozyten-Suspensionen bzw. Thrombozyten-Releasates wurden entsprechend der Angaben in Abschnitt 4.4 zubereitet. Zur Induktion einer Differenzierung zu regulatorischen T-Zellen wurden die nach Abschnitt 4.3.3 isolierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu einer Konzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen/mL resuspendiert. Folgend wurden  $7,5 \times 10^5$  CD4<sup>+</sup> Zellen (150  $\mu$ L) in die Kavitäten einer 12-Well Platte verbracht. Die Zellen wurden entweder mit 150  $\mu$ L Thrombozyten-Puffer, Thrombozyten-Suspension oder den entsprechenden Releasates versetzt, sodass ein Verhältnis von 1:250 zwischen CD4<sup>+</sup> Zellen und Thrombozyten resultierte. In den Fällen einer Antikörper-basierten Stimulation der CD4<sup>+</sup> Zellen wurden 25  $\mu$ L des Reagenzes ImmunoCult™ Human CD3/CD28/CD2 T Cell Activator hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 48 h erfolgte eine erneute Zugabe von Thrombozyten-Puffer bzw. der entsprechenden Suspensionen oder Releasates. Eine weitere Inkubation von 48 h folgte.

Zur Untersuchung der Differenzierung zu regulatorischen T-Zellen wurden je  $2,5 \times 10^5$  Zellen aus den Proben entnommen und bei  $6.000 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  für 5 min zentrifugiert. Die Zellen wurden durch Suspendieren in  $150 \mu\text{L}$  FACS-Puffer und erneutes Zentrifugieren gewaschen. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Zellen für 15 min in  $100 \mu\text{L}$  einer Blockierungslösung inkubiert. Die Markierung des IL-2 Rezeptorproteins als Teil der  $T_{\text{reg}}$  Anfärbung, erfolgte durch die Zugabe von  $125 \text{ ng}$  des entsprechenden anti-hCD25 Antikörpers. Die Proben wurden für 30 Minuten inkubiert und anschließend einmal mit FACS-Puffer gewaschen. Zur Fixierung der Zellen wurden diese in  $150 \mu\text{L}$  Fixierungspuffer resuspendiert und für 30 Minuten bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Es folgte ein Waschschritt mit  $150 \mu\text{L}$  Permeabilisierungspuffer. Zur Permeabilisierung der Zellmembranen wurden die Proben bei  $4^\circ\text{C}$  in  $75 \mu\text{L}$  Permeabilisierungspuffer inkubiert. Nach 30 Minuten wurden  $100 \text{ ng}$  des anti-hFoxP3 Antikörpers zu  $25 \mu\text{L}$  in DPBS verdünnt und je  $25 \mu\text{L}$  dieser Mischung den Proben beigemischt. Nach weiteren 30 Minuten Inkubation bei  $4^\circ\text{C}$  wurden die Zellen zweimal mit Permeabilisierungspuffer ( $150 \mu\text{L}$ ) gewaschen und final in einem Volumen von  $500 \mu\text{L}$  FACS-Puffer aufgenommen. Je  $200 \mu\text{L}$  wurden in die Kavitäten einer 96-Well Platte verbracht und am Durchflusszytometer Guava EasyCyte 11HT vermessen. Eine Kompensation der verwendeten Fluorophore FITC und PerCP/Cyanine5.5 erfolgte unter Verwendung von anti-mouse  $\text{Ig}\kappa$  MACS<sup>®</sup> Comp Beads. Die durchgeführte Gating-Strategie ist in Abbildung 20 skizziert. Durch die Auftragung der Fläche gegen die Höhe des Signals des *Forward Scatter* werden lediglich Einzellzellereignisse in die Auswertung aufgenommen. Anschließend werden Zelltrümmer sowie Thrombozyten, durch die Auftragung des *Side Scatter* gegen den *Forward Scatter*, aus der untersuchten Population exkludiert. Die folgende Identifizierung der CD25/FoxP3 doppelpositiven Population erfolgte durch die Anlegung der Quadranten an den entsprechenden FMO Kontrollen.

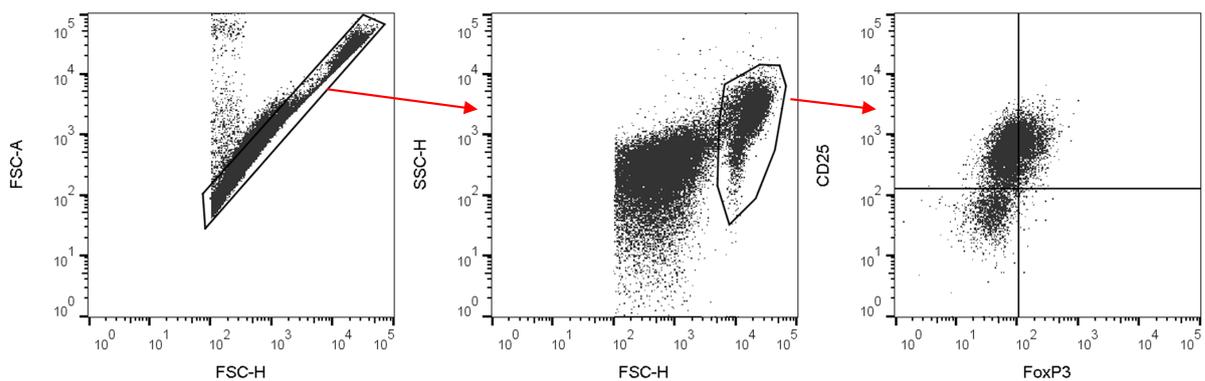


Abbildung 20: Gezeigt ist die Gating-Strategie zur Bestimmung von FoxP3/CD25 doppelpositiven  $\text{CD4}^+$  T-Lymphozyten an einer Probe stimulierter  $\text{CD4}^+$  Zellen nach Koinkubation mit Thrombozyten

#### 4.13.2 CD8<sup>+</sup> T-Zell Aktivierungsstatus

Als Teil des adaptiven Immunsystems stellen zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine wichtige Komponente in der antitumoralen Immunität dar. Durch die Bestimmung des Aktivierungsstatus der CD8<sup>+</sup> T-Zellen soll ein immunmodulatorischer Effekt von Thrombozyten bzw. den korrespondierenden Releasates untersucht werden. Als Marker einer Aktivierung dienen der frühe Aktivierungsmarker CD69 sowie das später, jedoch länger an der Zelloberfläche präsentierte Protein CD25.

Die Inkubation der CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit Thrombozyten bzw. Thrombozyten-Releasates entspricht dem Vorgehen in Abschnitt 4.13.1. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden je  $2,5 \times 10^5$  Zellen aus den Proben entnommen und bei  $6.000 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  für 5 min zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in  $300 \mu\text{L}$  DPBS resuspendiert und je  $150 \mu\text{L}$  als Duplikat in die Kavitäten einer 96-Well V-Platte pipettiert. Die Platte wurde bei  $600 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  für 5 min zentrifugiert. Nachfolgend wurden die Proben in einer 1:1.000 DPBS Verdünnung des Viabilitätsfarbstoffes Zombie Aqua™ resuspendiert. Lediglich für die entsprechende FMO Kontrolle und eine ungefärbte Probe wurde reines DPBS verwendet. Bei Raumtemperatur folgte eine 20-minütige Inkubation unter Lichtausschluss. Anschließend wurden die Proben mit  $50 \mu\text{L}$  FACS-Puffer versetzt, erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Zellen in  $100 \mu\text{L}$  Blockierungslösung resuspendiert und für 15 min inkubiert. Nach Ablauf der Blockierung wurden die Proben und Kontrollen mit den entsprechenden Antikörpern versetzt. Dabei wurden 125 ng des Pacific Blue anti-human CD8a Antikörpers, 62,5 ng des FITC anti-human CD69 Antikörpers und 62,5 ng des PerCP/Cyanine5.5 anti-human CD25 Antikörpers verwendet. Es folgte eine 20-minütige Inkubation bei  $4^\circ\text{C}$  in Dunkelheit. Die Proben wurden bei  $600 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  für 5 min zentrifugiert, der Überstand entfernt und die Proben in  $100 \mu\text{L}$  FACS-Puffer resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde ein zweites Mal wiederholt. Final wurden die Proben in  $200 \mu\text{L}$  FACS-Puffer resuspendiert und am Guava EasyCyte 11HT vermessen. Eine Kompensation der verwendeten Fluorophore Pacific Blue, FITC und PerCP/Cyanine5.5 erfolgte unter Verwendung von anti-mouse Igκ MACS® Comp Beads. Zur Kompensation des Viabilitätsfarbstoffes Zombie Aqua™ wurde eine 1:1 Mischung aus lebendigen CD8<sup>+</sup> T-Zellen und getöteten CD8<sup>+</sup> T-Zellen verwendet. Die Abtötung erfolgte für 12 Minuten bei  $70^\circ\text{C}$  und einer anschließenden, 5-minütigen Inkubation auf Eis. Die angewendete Gating-Strategie ist in Abbildung 21 dargestellt. Zu Beginn wurden lediglich Einzelzellen berücksichtigt und anschließend Zelltrümmer aus dem Datensatz exkludiert. Es folgte eine Identifizierung der CD8α positiven Zellen. Durch die weitere Auswahl Zombie Aqua™ negativer Zellen wurden lediglich lebendige Zellen in die Auswertung aufgenommen. Diese Population wurde weiter auf die Expression von CD25 bzw. CD69 analysiert. Die Auswahl der Gate-Grenzen zur Identifizierung positiv

markierter Zellen erfolgte unter Berücksichtigung der entsprechenden FMO Kontrolle.

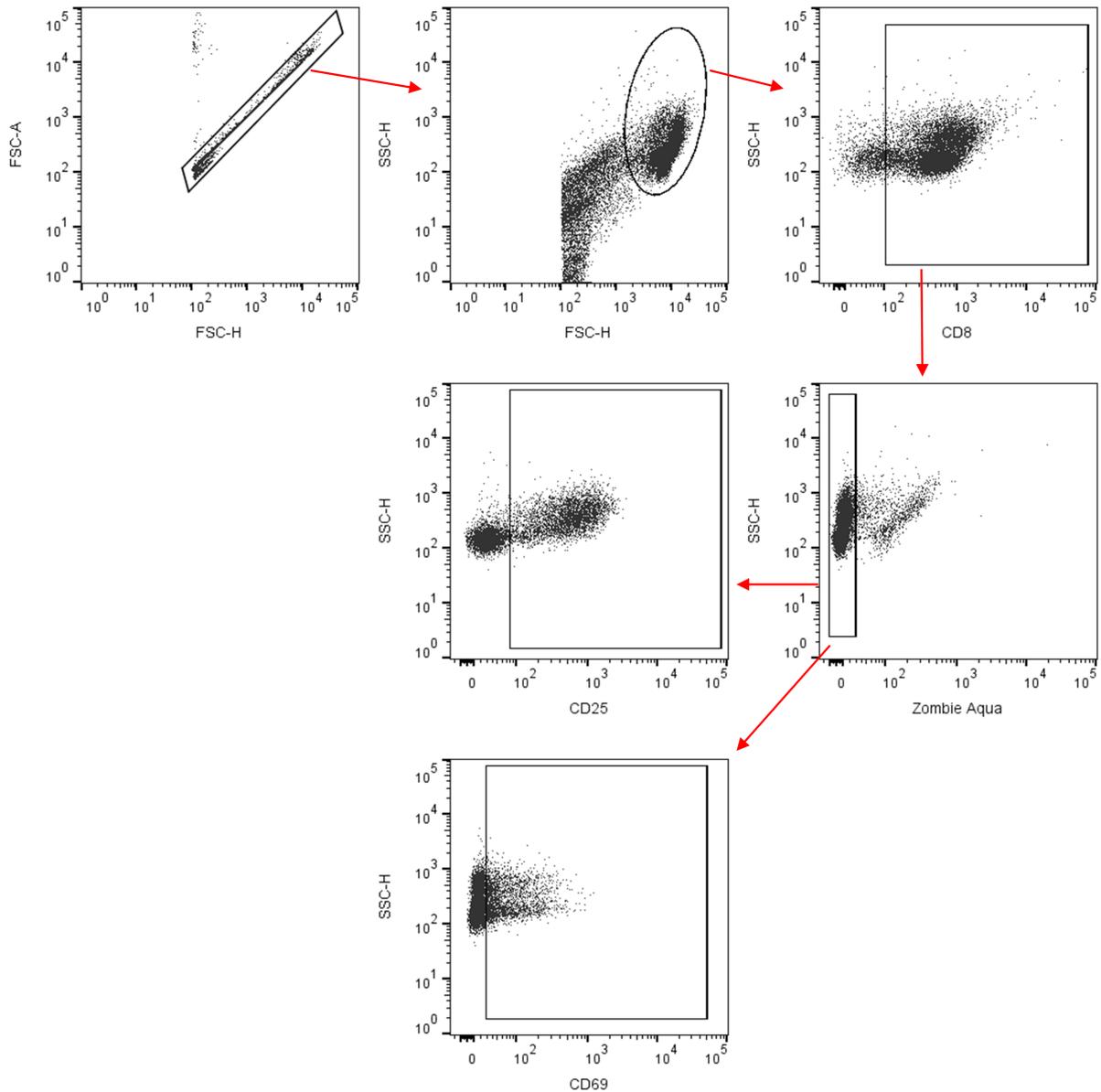


Abbildung 21: Dargestellt ist die Gating-Strategie zur Detektion der Aktivierungsmarker CD25 und CD69 auf CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten anhand einer Releasate inkubierten Probe stimulierter CD8<sup>+</sup> T-Zellen

#### 4.13.3 NK-Zell Zytotoxizität

NK-Zellen sind eine wichtige Komponente der angeborenen Immunität und spielen eine bedeutende Rolle in der antitumoralen Immunantwort. Ein Effekt des Thrombozyten-Releasates auf die lytische Aktivität der natürlichen Killerzellen, sowie der Einfluss von Heparinen und Heparin-Mimetika in diesem System wurden in folgendem Versuch unter-

sucht.

Die in diesem Versuch verwendeten Thrombozyten-Releasates wurden analog den Angaben in Abschnitt 4.4 hergestellt. Entsprechend den Angaben in Abschnitt 4.3.2 wurden PBMCs durch Dichtezentrifugation aus einem *Buffy Coat* isoliert. Die isolierten Zellen wurden für 18 Stunden in Medium gelagert. Am nächsten Morgen wurden  $2,5 \times 10^6$  Zellen in 2 mL in die Kavitäten einer 12-Well Platte pipettiert und mit 500  $\mu$ L des entsprechenden Releasates versetzt. Nach 24 h wurden zunächst K562 Zellen als Zielzellen vorbereitet. Dazu wurden  $1 \times 10^6$  Zellen der Kulturflasche entnommen, bei  $450 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  für 5 Minuten zentrifugiert und in 1 mL eines Mediums mit 1% FKS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit 1 mL CFSE Arbeitslösung (10  $\mu$ M) vermennt und für 15 min bei  $37^\circ\text{C}$  in der Dunkelheit inkubiert, um so die Zielzellen in der späteren Analyse von den Effektorzellen unterscheiden zu können. Durch die Zugabe von 5 mL Vollmedium wurde die Reaktion gequencht. Die Zellen wurden nun erneut zentrifugiert. Nach Aufnahme in 1 mL Vollmedium, wurde die Zellzahl bestimmt und eine Konzentration von  $1 \times 10^5$  /mL eingestellt. Parallel wurden die vorinkubierten PBMC Proben gezählt und mit Vollmedium auf eine Konzentration von  $5 \times 10^6$  /mL eingestellt. In einer 96-Well U Platte wurden für jede Probe die in Tabelle 15 aufgeführten Ansätze pipettiert. Dabei wurde die Tween-Arbeitslösung eingesetzt, um eine Kontrolle zu generieren, in welcher die Zielzellen abgetötet werden. Die IL-2 Arbeitslösung diente als Kontrolle einer Aktivierung der NK-Zellen.

Tabelle 15: Pipettierschema der vermessenen Ansätze

Ansatz	PBMC	Medium	Tween-20	IL-2	K562
ET 50:1 + IL-2	100 $\mu$ L	—	—	30 $\mu$ L	100 $\mu$ L
ET 50:1	100 $\mu$ L	—	—	—	100 $\mu$ L
T only	—	100 $\mu$ L	—	—	—
E only	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	—	—	—
T + Tween	—	—	100 $\mu$ L	—	100 $\mu$ L

Die Platte wurde für 2 min bei  $120 \times g$  zentrifugiert und anschließend für 4 h bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wurden alle Ansätze mit 5  $\mu$ L (entspricht 0,25  $\mu$ g 7-AAD) der 7-AAD Viability Staining Solution versetzt, resuspendiert und für 10 Minuten inkubiert. Da der Farbstoff lediglich die Membran apoptotischer Zellen überwinden kann, werden somit ausschließlich abgetötete Zellen durch DNA Interkalation angefärbt. Folgend wurden die Proben in eine 96-Well Flat Bottom Microtiter Platte überführt und am Guava EasyCyte 11HT vermessen. Die Gating-Strategie des Versuchs wird in Abbildung 22 skizziert. Die verwendeten K562 Zielzellen wurden zunächst als CFSE positive Population identifiziert und tote Zellen durch den Viabilitätsfarbstoff 7-AAD definiert.

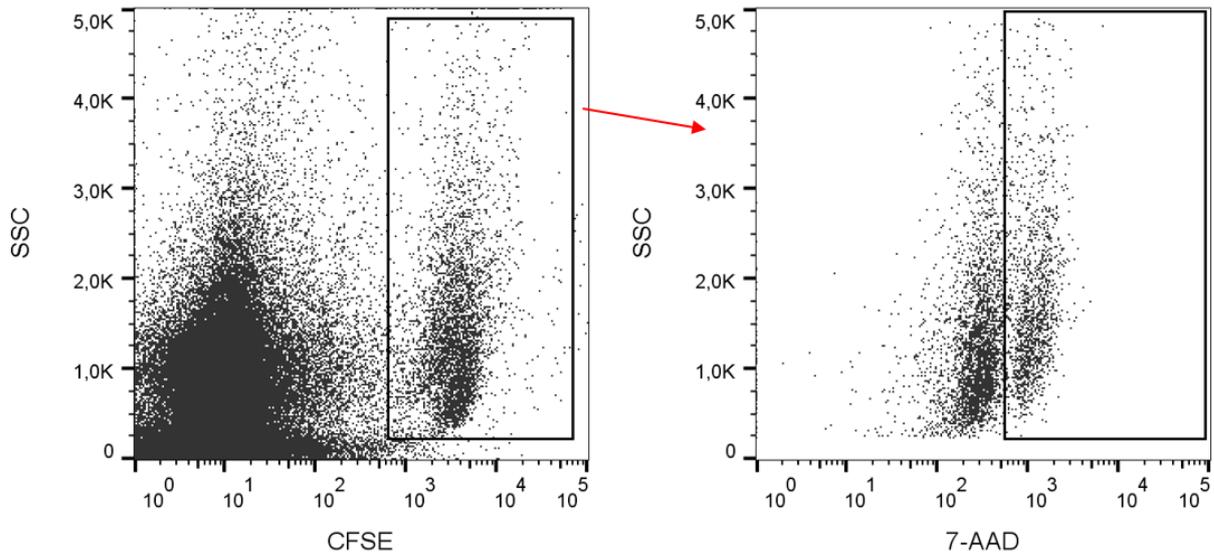


Abbildung 22: Gating-Strategie zur Quantifizierung toter K562 Zielzellen anhand ihrer positiven Färbung für CFSE und 7-AAD

#### 4.14 Multiplex Protein Analyse

Zur weitergehenden Untersuchung einer Aktivierung zytotoxischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden die Level verschiedener zytolytischer und pro-inflammatorischer Zytokine und Enzyme in den Zellkulturüberständen bestimmt. Verwendet wurde das LEGENDplex™ Human CD8/NK Panel der Firma BioLegend Inc.. Die Detektion basierte auf dem Prinzip einer Multiplex Analyse, welches die simultane Bestimmung von 13 Proteinen ermöglichte. Dabei werden Beads verwendet, die durch ihre intrinsische Fluoreszenz differenziert werden können und Antikörper auf ihrer Oberfläche tragen, welche spezifisch eines der untersuchten Proteine immobilisieren. Durch nachfolgende Kopplung der immobilisierten Zielproteine mit einem biotinylierten Antikörper und fluoreszenzmarkierten Streptavidin können die Gehalte anhand einer Standardkurve quantifiziert werden. Zur Generierung des Probenmaterials wurde analog den Angaben in Abschnitt 4.13.2 verfahren. Jedoch wurde nach der ersten Zentrifugation der Proben der Zellkulturüberstand nicht verworfen, sondern in ein neues Eppendorf-Reagiergefäß überführt und bis zur Analyse bei -80°C gelagert. Die Probenaufbereitung durch die Bindung und Fluoreszenzmarkierung der Proteine wurde entsprechend den Herstellerangaben in einer 96-Well V Platte durchgeführt. Zur Vermessung der Proben wurde ein CytoFLEX Durchflusszytometer der Firma Beckman Coulter Inc. verwendet. Die Auswertung der Messdaten wurde mit der bereitgestellten LEGENDplex™ Cloud-Based Software und GraphPad Prism durchgeführt.

## 4.15 Zellviabilitätsanalyse

Eine Möglichkeit zur Untersuchung des zelltoxischen Effekts einer Testsubstanz auf die untersuchte Zelllinie bietet der MTT-Assay. Dieser Test basiert auf der mitochondrialen Reduktion des Tetrazolium-Farbstoffes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromid (MTT) zum entsprechenden Formazan-Derivat. Die mitochondriale Gesamtaktivität steht in linearem Zusammenhang mit der Anzahl lebendiger Zellen. Folglich kann durch die Messung der optischen Dichte des gebildeten Formazans auf die Differenz der lebendigen Zellen zwischen verschiedenen Behandlungen geschlossen werden [396].

Zur Bestimmung des toxischen Effekts der Heparin-mimetischen Polymere auf die endotheliale Zelllinie EA.hy926 wurden die Zellen entsprechend den Ausführungen in Abschnitt 4.2.4 abgelöst und die Zellzahl analog zu Abschnitt 4.2.3 bestimmt. Die generierte Zellsuspension wurde mit FKS-haltigem Nährmedium auf eine Konzentration von 16.000 Zellen pro 90  $\mu\text{L}$  eingestellt. In jede Kavität einer 96-Well Platte wurden 16.000 Zellen ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte eine Zugabe von je 10  $\mu\text{L}$  der entsprechenden Verdünnung einer Behandlung (vgl. Tabelle 16). Die Proben wurden nun bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  für 72 h inkubiert. Zur Herstellung des MTT-Reagenzes wurden 5 mg/mL MTT-Salz in DPBS gelöst. Nach Ablauf der Inkubation wurden 20  $\mu\text{L}$  des MTT-Reagenzes in jede Kavität pipettiert und die Proben für eine weitere Stunde inkubiert, um die Umsetzung zu Formazan zu ermöglichen. Folgend wurde die Kulturplatte auf Zellstoff ausgeschlagen und die adhärennten Zellen mit 100  $\mu\text{L}$  DMSO pro Kavität lysiert. Die Messung der optischen Dichte der Proben erfolgte unverzüglich bei 570 nm und 690 nm. Nach Subtraktion des Hintergrundsignals (690 nm) wurde die Absorption der Proben auf den Wert der Negativkontrolle normalisiert und gibt so die Viabilität der Probe in Prozent wieder.

Tabelle 16: Behandlungen zur Bestimmung der Zelltoxizität der Heparin-mimetischen Polymere.

Verdünnung	Konzentration [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	Endkonzentration [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]
Stammlösung	60.000	—
Verdünnung 1	2.500	250
Verdünnung 2	1.000	100
Verdünnung 3	500	50
Verdünnung 4	250	25
Verdünnung 5	100	10
Verdünnung 6	50	5
neg. Kontrolle	DPBS	DPBS

## **4.16 Statistik**

Alle statistischen Untersuchungen wurden unter Verwendung der Software GraphPad Prism durchgeführt. Im Falle des Vergleichs zweier Proben wurde der Student's T-Test herangezogen. In Versuchen, welche den Vergleich mehrerer Behandlungen auf eine Referenzprobe benötigten, wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (One-Way ANOVA) sowie ein nachfolgender Dunnett bzw. Tukey Post-hoc Test verwendet. Bei der Bestimmung des Effekts verschiedener Behandlungen auf mehrere Untersuchungsmarker wurde eine zweifaktorielle ANOVA mit anschließendem Tukey Post-hoc Test durchgeführt. Nähere Angaben zu den in den jeweiligen Versuchen durchgeführten Tests können den entsprechenden Abbildungslegenden entnommen werden. Die Ergebnisse der statistischen Tests werden durch Asteriken indiziert. Dabei gilt: \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$  und ns: nicht signifikant.

## 5 Ergebnisse und Diskussion

### 5.1 Antikoagulatorischer Einfluss Heparin-mimetischer Polymere auf die Tumorzell/Thrombozyten Interaktion

Nicht nur aufgrund der erhöhten Inzidenz thromboembolischer Ereignisse im Verlauf einer malignen Erkrankung ist eine effektive Antikoagulation durch die klinisch eingesetzten Antikoagulantien essentiell. Ferner bieten sie das Potential, in die Thrombin-vermittelte Thrombozytenaktivierung einzugreifen und so die prometastatischen Effekte der Tumorzell/Thrombozyten Interaktion zu beeinträchtigen.

Um eine antikoagulationsbedingte Interferenz der Interaktion zwischen Tumorzellen und Thrombozyten zu evaluieren, wurden die klinisch verwendeten Antikoagulantien und die, unter Abschnitt 2.7.4 vorgestellten, potentiell Heparin-mimetischen Polymere in verschiedenen *in-vitro* Experimenten untersucht. So sollen nicht nur die Nachteile der natürlichen Heparine umgangen werden, sondern ebenso Einblicke in die Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Heparin-Mimetika erlangt werden. Als Tumormodell wurde in dieser Arbeit die Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 verwendet, welche aus vorherigen Studien aufgrund ihrer starken *tissue factor* Expression als ein zuverlässiger Induktor der Thrombingenerierung und Thrombozytenaggregation bekannt ist [351]. Zur ersten Abschätzung der Kapazitäten der Heparin-mimetischen Polymere, die koagulationsbasierte Interaktion der MDA-MB-231 Zellen mit isolierten Thrombozyten zu inhibieren, wurden diese hinsichtlich der Aggregationshemmung mittels der Lichttransmissionaggregometrie analysiert. Die initial verwendete Konzentration der Heparin-Mimetika wurde anhand der therapeutischen Blutspiegel einer Enoxaparin-Therapie gewählt [397]. Hier entspricht die im Plasma erreichte Konzentration von 1 I.E./mL unter der Berücksichtigung eines Molekulargewichts von 4,5 kDa einer Stoffmengenkonzentration von 2,2 nmol/mL. Eine adaptive Konzentration der Heparin-mimetischen Polymere wurde auf 50 µg/mL festgesetzt. Dies entspricht bei einem Molekulargewicht von 20 kDa einer molaren Konzentration von 2,5 nmol/mL.

Die Ergebnisse des LTA Screenings sind in Abbildung 23 als Aggregogramme dargestellt, welche das Ausmaß der thrombozytären Aggregation gegen die Messzeit auftragen. Vorherige Erkenntnisse bestätigend lässt sich beobachten, dass eine Zugabe von MDA-MB-231 Brustkrebszellen zur Thrombozyten-Suspension zu einer vollständigen Aggregation der Thrombozyten führt. Bei der Betrachtung der Homopolymere (Abbildung 23 a) zeigt sich, dass weder die Polymerisation der Acrylsäure (AA), noch der aliphatischen Sulfonate (SPA, SPM, AMPS) zu Polymeren führten, die eine Tumorzell-induzierte Thrombozytenaggregation effektiv unterdrücken. Gleichwohl sind die Mimetika poly(SPM) 20kDa und poly(AMPS) 20kDa in der Lage die Aggregation geringfügig hinauszuzögern. Eine effektive Inhibition der Aggregation vermittelt jedoch lediglich das Styren-basierte Polymer

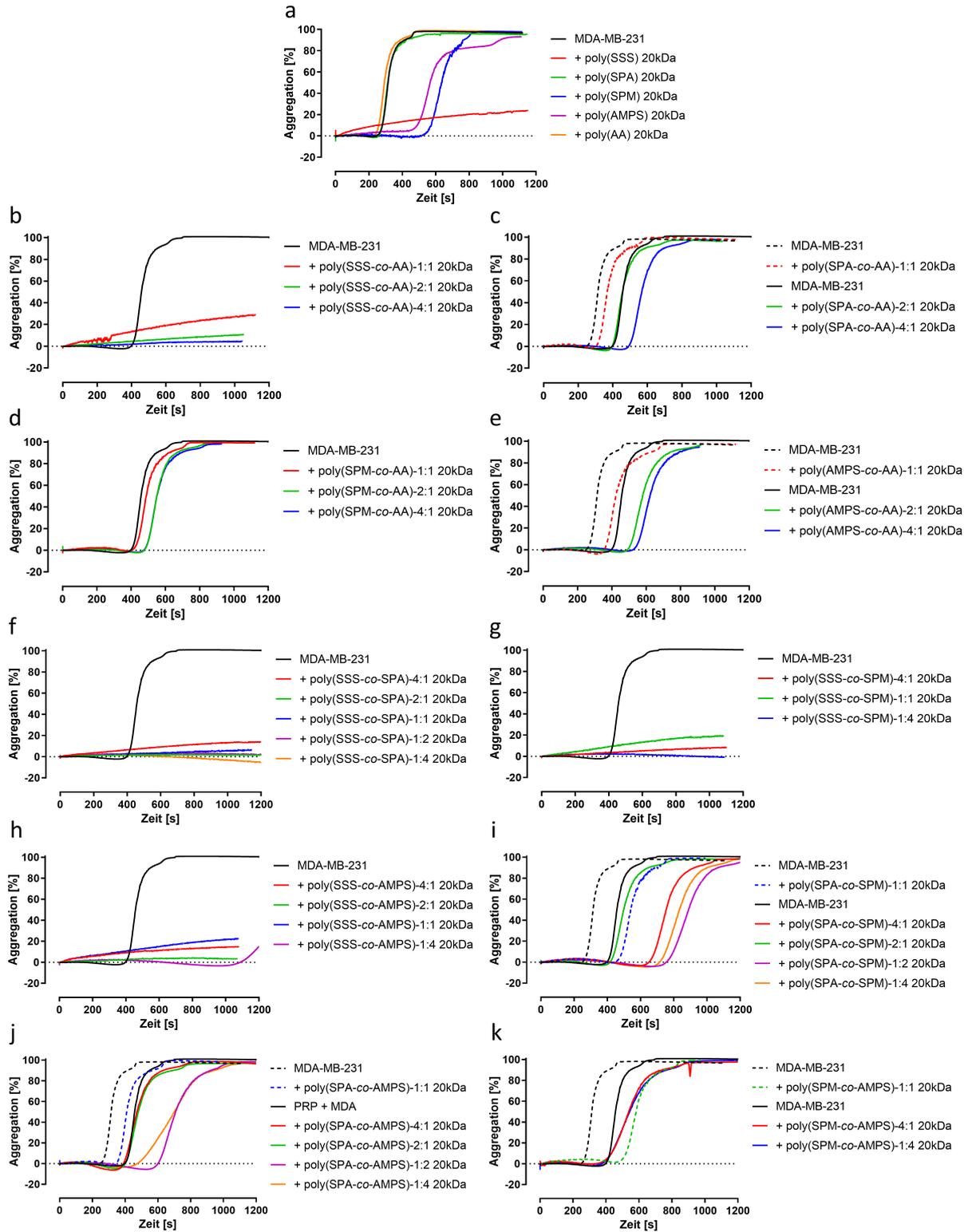


Abbildung 23: Aggregogramme der LTA Messungen der Tumorzell-induzierten Thrombozytenaggregation unter dem Einfluss einer 30-minütigen Präinkubation der Thrombozyten mit 50 µg/mL der Heparin-mimetischen Polymere

poly(SSS) 20kDa. Bei der Untersuchung der aus Acrylsäure bzw. aliphatischen Sulfonaten kombinierten Heteropolymere lässt sich erkennen (Abbildung 23 b - k), dass zwar auch hier einige Copolymere eine Verzögerung der Aggregation vermitteln, jedoch scheint dieser Effekt nicht die Inhibition der Homopolymere der entsprechenden Bausteine zu übersteigen. Wie in Abbildung 23 b, f, g und h zu sehen, unterdrücken auch die verschiedenen Copolymere des SSS-Bausteins die MDA-MB-231-vermittelte Aggregation. So scheint es, dass die Präsenz des Styrensulfonats essentiell für die inhibitorische Kapazität ist, jedoch eine Verminderung seines Anteils wie etwa bei poly(SSS-co-SPA)-1:4 20kDa (Abbildung 23 f) sich nicht nachteilig auf die Ausprägung des Effekts auswirkt.

Entgegen allen Anderen, spiegeln die Copolymere der poly(SSS-co-AA) Serie nicht nur die negative Ladung des Heparins durch Sulfonate wider, sondern enthalten die ebenfalls im Heparin vertretenen Carboxylgruppen. Aufgrund dessen wurden in weiteren Versuchen Verdünnungsreihen der repräsentativen Polymere poly(SSS) 20kDa, poly(SSS-co-AA)-1:1 20kDa sowie der kleineren Variante poly(SSS-co-AA)-1:1 10kDa vermessen, um eine eventuelle Anpassung der verwendeten Konzentration vorzunehmen. Darüber hinaus wurde das nicht aktive Copolymer poly(SPA-co-AA)-1:1 20kDa in diese Untersuchungen einbezogen. Die beobachteten Ergebnisse der Konzentrationsreihen sind in Abbildung 24 als Aggregogramme dargestellt.

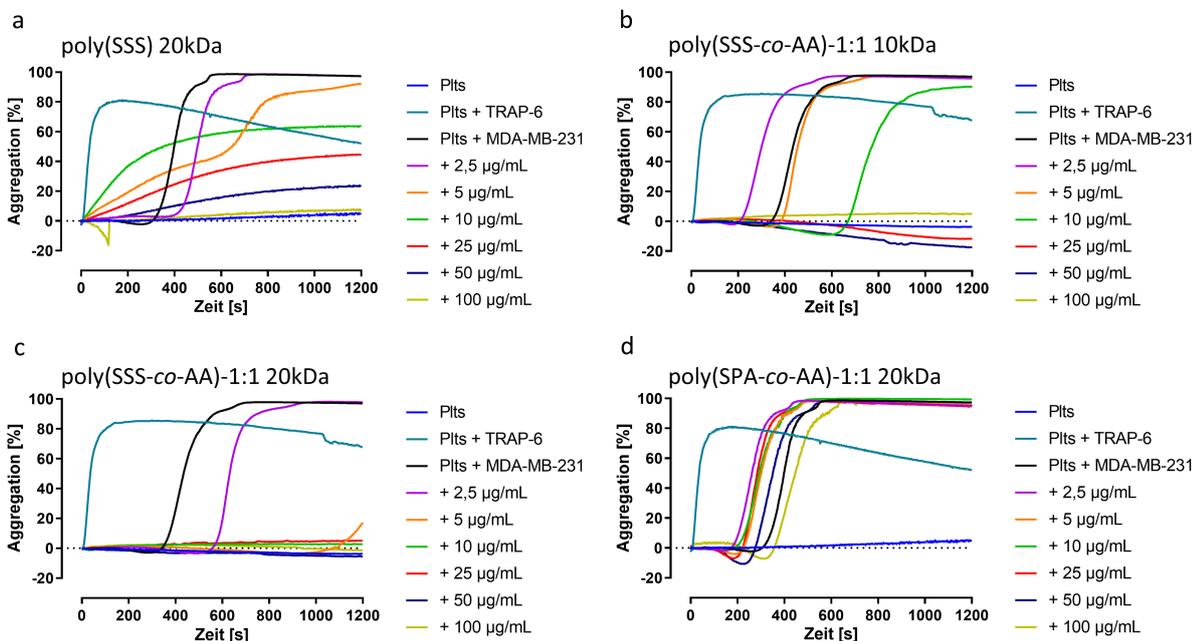


Abbildung 24: Gezeigt sind repräsentative Aggregogramme der Konzentrationsreihen ausgewählter Heparin-mimetischer Polymere nach einer MDA-MB-231-vermittelten Thrombozytenaktivierung

Anhand der mitgeführten Kontrollen lässt sich in allen Aggregogrammen erkennen, dass es zu keiner spontanen Aggregation nicht aktivierter Thrombozyten kam (Plts). Durch die Aktivierung der Thrombozyten mittels des PAR-1 Agonisten TRAP-6 (Plts + TRAP-6) konnte eine funktionelle Integrität der präparierten Thrombozyten bestätigt werden. Deutlich zu erkennen ist eine konzentrationsabhängige Abnahme der durch poly(SSS) 20kDa vermittelten Hemmung (Abbildung 24 a). So führt die Reduktion der Dosis auf 25 µg/mL nur noch zu einer ca. 60 %igen Inhibition und bei 2,5 µg/mL ist schlussendlich keine Hemmung mehr zu verzeichnen. Interessanterweise kann beobachtet werden, dass die Kurven der Aggregogramme aktiver poly(SSS) 20kDa Konzentrationen bereits vor dem Auftreten der MDA-MB-231-vermittelten Aggregation ansteigen. Dies könnte einen möglichen Hinweis auf eine Interaktion zwischen dem Homopolymer und den Thrombozyten darstellen. Auch die beiden Größenvarianten des aktiven Copolymers poly(SSS-*co*-AA)-1:1, vgl. Abbildung 24 b und c, zeigen eine konzentrationsabhängige Blockade der Aggregation, wobei das größere Polymer seine inhibitorische Kapazität unterhalb von 5 µg/mL verliert, während das Derivat mit einer kleineren molekularen Größe bereits ab 10 µg/mL keine Inhibition mehr vermittelt. Dies stellt einen ersten Hinweis auf eine Größenabhängigkeit der inhibitorischen Aktivität der Polymere dar. Bei der Betrachtung des inaktiven Polymers poly(SPA-*co*-AA)-1:1 20kDa erbrachte auch eine Verdoppelung der Konzentration keine Unterdrückung der MDA-MB-231-induzierten Thrombozytenaggregation. Aufgrund der verminderten Hemmung geringerer Konzentrationen des Homopolymers poly(SSS) 20kDa, dem Verlust der Aktivität des 10 kDa großen Copolymers ab einer Konzentration von 10 µg/mL und der vergleichbaren Stoffmengenkonzentration zur therapeutisch applizierten Dosis des Enoxaparins wurden die initial untersuchten 50 µg/mL als Standardkonzentration beibehalten.

### 5.1.1 Inhibition der Tumorzell-induzierten Thrombinbildung

Wie bereits in verschiedenen Abschnitten dieser Arbeit dargelegt, ist die Serinprotease Thrombin nicht nur essentiell an der Vermittlung der Blutgerinnung und der Thrombozytenaktivierung durch das Schneiden des PAR-1 N-Terminus beteiligt, sondern vermittelt auch eine breite Vielfalt prometastatischer Effekte. Folglich ist eine effiziente Unterbindung der Entstehung bzw. Aktivität des Thrombins eine substantielle Eigenschaft Heparin-mimetischer Entitäten. Zur Bestimmung der Inhibition einer durch TF exprimierende Tumorzellen induzierten Thrombinbildung bzw. -aktivität wurde die Kinetik der enzymatischen Aktivität des Thrombins anhand der Freisetzung des fluorogenen Substrats AMC vermessen. Aus Erfahrungen vorangegangener Studien ist die Inhibition einer Tumorzell-induzierten Thrombingenerierung anspruchsvoller als die Hemmung der Thrombingenerierung, welche durch einen rekombinanten humanen *tissue factor* (rhTF)

vermittelt wurde [351]. Auch wurden einige der betrachteten Polymere bereits durch die Arbeitsgruppe von Prof. Vito Ferro hinsichtlich einer Hemmung der rhTF-induzierten Thrombingenerierung evaluiert, wobei eine effektive Inhibition zumeist ab einer Konzentration von 600  $\mu\text{g}/\text{mL}$  erreicht wurde. Aufgrund dessen wurde auch in dieser Arbeit bei den Versuchen zur Untersuchung der Thrombingenerierung eine Konzentration von 600  $\mu\text{g}/\text{mL}$  eingestellt [398]. Als Beitrag zur Gewinnung weiterer Einblicke in die Struktur-Wirkungs-Beziehungen wurden das Homopolymer poly(SSS) und das Copolymer poly(SSS-co-AA) untersucht, wobei Variationen der Polymere in 5 kDa, 10 kDa, 20 kDa bzw. 50 kDa evaluiert wurden. Des Weiteren wurde das Verhältnis der Monomere des Copolymers zwischen 1:1, 2:1 und 4:1 alterniert. Zur verbesserten Einordnung der detektierten Effekte wurden ebenfalls die kommerziellen Antikoagulantien UFH, Enoxaparin sowie Fondaparinux hinsichtlich der Hemmung einer Tumorzell-induzierten Thrombingenerierung vermessen. Repräsentative Ergebnisse dieser Untersuchungen sowie der mitgeführten Kontrollen sind als Thrombogramme, die die gebildete Thrombinmenge gegen die Zeit auftragen, in den Abbildungen 25 und 26 illustriert.

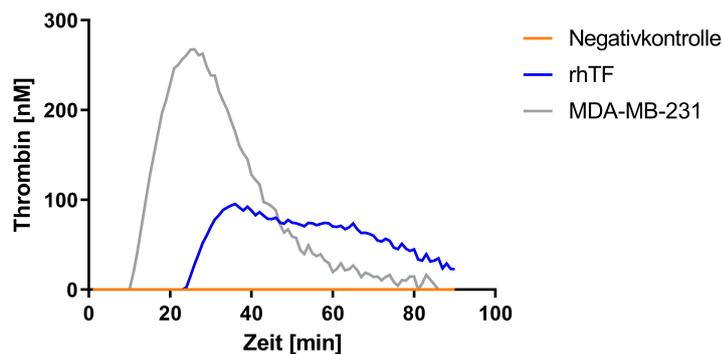


Abbildung 25: Dargestellt sind repräsentative Thrombogramme der mitgeführten Kontrollen, welche die funktionelle Integrität der durchgeführten Versuchswiederholung des Thrombingenerierungs-Assays sichern

Wie in Abbildung 25 gezeigt, konnte keine Thrombingenerierung in den Proben detektiert werden, denen kein aktivierendes Agens hinzugefügt wurde. Bestätigend zu vorherigen Beobachtungen wurde auch hier eine deutlich stärkere Induktion der Thrombingenerierung durch den Zusatz von MDA-MB-231 Zellen erreicht, als durch die Aktivierung mit rhTF. Dies könnte durch die hohe TF Expression der MDA-MB-231 Brustkrebszellen bedingt sein. So ist es denkbar, dass durch die Präsenz der Tumorzellen die absolute Quantität des verfügbaren TF die des Kontrollreagenzes übersteigt. Andererseits könnte dies aber auch darauf hinweisen, dass der direkte Kontakt von Tumorzellen und Thrombozyten als ein zusätzlicher Aktivierungsfaktor agiert.

Repräsentative Thrombogramme der kommerziellen Antikoagulantien sind in Abbil-

dung 26 a gezeigt. Auffällig ist hier eine scheinbare Größenabhängigkeit des hemmenden Effektes. So vermag es das synthetische Pentasaccharid Fondaparinux kaum die Tumorzell-induzierte Generierung des Thrombins zu mindern, auch wenn es in vorherigen Versuchen die Thrombingenerierung nach einer rhTF Zugabe effektiv unterdrückte [351]. Eine leicht gesteigerte Inhibition lässt sich für das etwa 2,6-fach größere Enoxaparin beobachten. Jedoch ist auch hier keine konsequente Unterdrückung der Thrombinbildung zu erreichen. Hingegen führt eine Präinkubation mit unfraktioniertem Heparin zu einer effektiven Hemmung. So ist etwa die sogenannte „lag time“, also die Zeit bis zum Beginn der Thrombinbildung, deutlich verlängert und das Maximum des Thrombogramms merklich vermindert.

Entgegen den kommerziellen Antikoagulantien ist eine klare Größenabhängigkeit des Hemmeffektes der Heparin-mimetischen Polymere nicht aus den repräsentativen Thrombogrammen (Abbildung 26 b – e) zu entnehmen. Dennoch lässt sich erkennen, dass die Verkürzung der Polymere auf eine molekulare Größe von 5 kDa zur Reduktion der inhibitorischen Kapazität führt. Bemerkenswerterweise scheint die Präinkubation durch die 5 kDa großen Varianten der Copolymere poly(SSS-co-AA)-1:1, poly(SSS-co-AA)-2:1 und poly(SSS-co-AA)-4:1 eine Verkürzung der lag time und somit einen früheren Einsatz der Thrombingenerierung zu vermitteln.

Zur übersichtlicheren Darstellung und einer erleichterten Beurteilung der kumulierten Ergebnisse der experimentellen Wiederholungen wurde das *endogenous thrombin potential* (ETP) sowie die Höhe des Peaks betrachtet. Das ETP spiegelt dabei die insgesamt über den Betrachtungszeitraum geleistete enzymatische Arbeit des Thrombins wider und wird als die *area under the curve* (AUC) bestimmt. Die prozentuale Veränderung der Parameter, bezogen auf die Thrombingenerierung durch MDA-MB-231 Zellen, sind für die ETP in Abbildung 27 und für die Höhe des Peaks in Abbildung 28 dargestellt. Grundsätzlich korrelieren die Effekte der untersuchten Substanzen auf das ETP gut mit der Verminderung der Peakhöhe des detektierten Thrombogramms.

Besonders für die kommerziellen Antikoagulantien lässt sich eine klare Abstufung der Hemmeffekte entsprechend der molekularen Größe erkennen. Das Homopolymer poly(SSS) scheint in den durchgeführten Experimenten den geringsten Einfluss auf die Aktivität und Bildung des Thrombins zu nehmen. Eine gewisse Abhängigkeit dieses Effektes von der Molekülgröße lässt sich jedoch auch für poly(SSS) verzeichnen (vgl. Abbildung 27 a und b). So ergibt sich für das 5 kDa große Polymer die geringste Hemmung. Es sei jedoch bemerkt, dass eine weitere Steigerung des molekularen Gewichts auf 50 kDa, im Vergleich zu 20 kDa, keine Steigerung der inhibitorischen Kapazität bedingt. Diese Beobachtung wird ebenfalls durch das Copolymer poly(SSS-co-AA)-1:1 unterstützt. Auch hier vermittelt das 5 kDa Polymer den geringsten Hemmeffekt. Ähnlich den Ergebnissen für poly(SSS) wirkt sich die

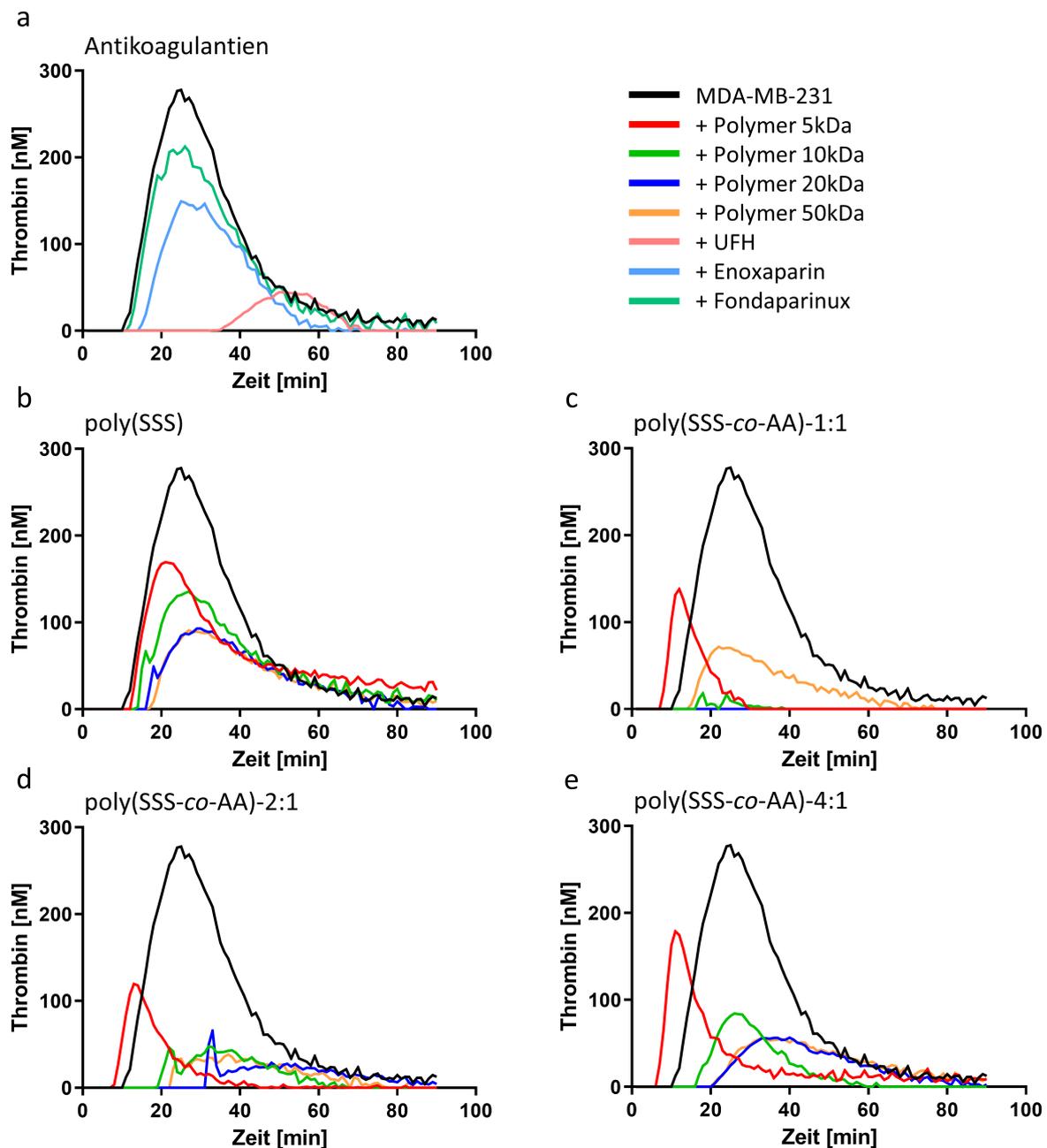


Abbildung 26: Dargestellt sind repräsentative Thrombogramme, welche die größenabhängige Hemmung der Tumorzell-induzierten Thrombingenerierung für die kommerziellen Antikoagulantien (a), das Homopolymer poly(SSS) (b) sowie die Copolymer poly(SSS-co-AA)-1:1 (c), poly(SSS-co-AA)-2:1 (d) und poly(SSS-co-AA)-4:1 (e) zeigen

Steigerung der Größe auf 50 kDa eher nachteilig aus. Die Größenabhängigkeit der Inhibition ist jedoch für die weiteren Polymere poly(SSS-co-AA)-2:1 sowie poly(SSS-co-AA)-4:1 kaum bis gar nicht zu detektieren. Grundlegend scheint allerdings die Kombination des SSS-Monomers mit der Acrylsäure einen deutlichen Vorteil gegenüber dem reinen SSS-Polymer zu erbringen. Dabei zeigt sich, dass die Steigerung des SSS-Anteils im Polymer zu einer

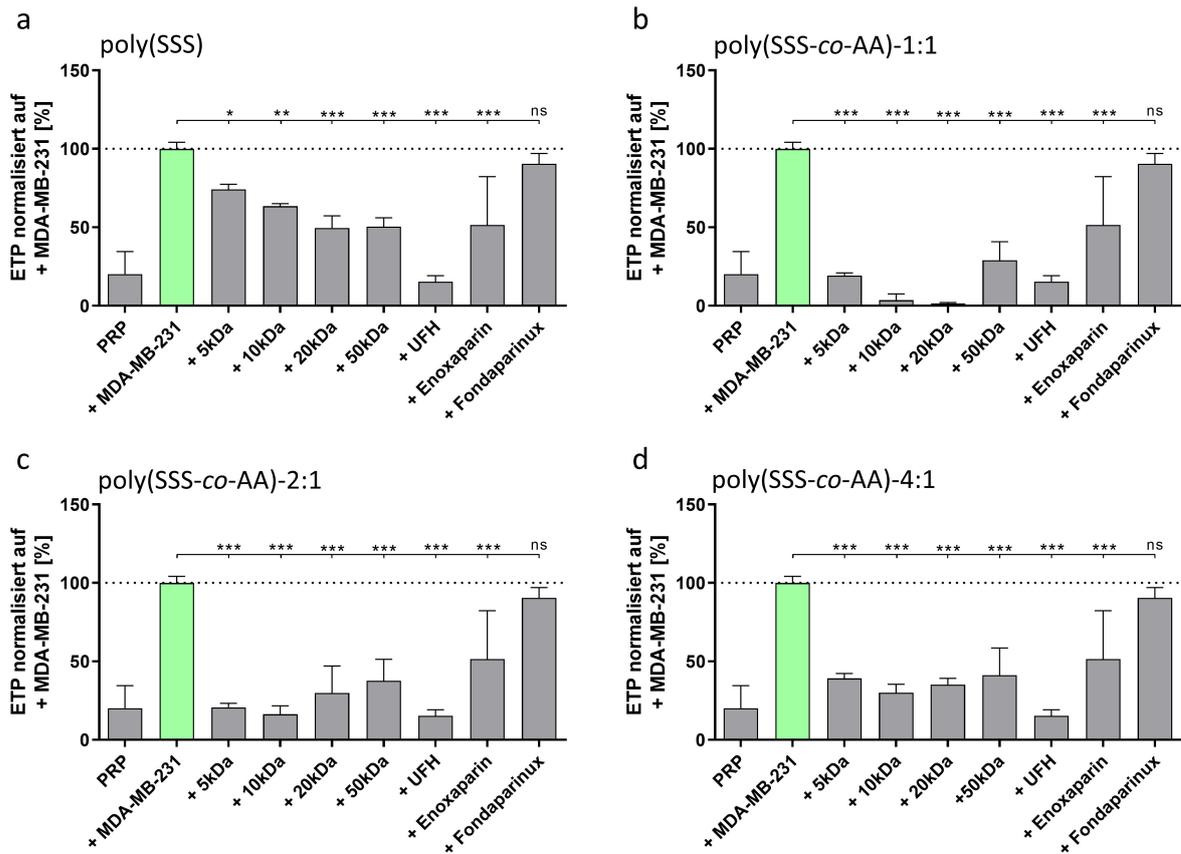


Abbildung 27: Dargestellt sind die normalisierten Werte des ETP der untersuchten Antikoagulantien und Heparin-Mimetika. Die Ergebnisse geben den Mittelwert sowie die Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente (N=3) wieder. Die Signifikanz wurde mittels einer One-Way ANOVA und eines Dunnett Post-hoc Tests bestimmt. ns: nicht signifikant; \*: p<0,05; \*\*: p<0,01; \*\*\*: p<0,001

Abnahme der Aktivität führt und sich, entsprechend der gesteigerten SSS-Präsenz, der geringeren Inhibition des Homopolymers annähert. Die Hemmeffekte der 10 bzw. 20 kDa großen Varianten der Heteropolymere präsentieren sich jedoch als besonders effektiv und drängen das ETP sowie die Peakhöhe auf das Niveau der Negativkontrolle PRP zurück. Resümieren lässt sich, dass besonders bei den therapeutisch verwendeten Antikoagulantien eine deutliche Größenabhängigkeit des Hemmeffektes besteht. Eine mögliche Erklärung bietet dabei die Betrachtung des Wirkmechanismus der unterschiedlichen Derivate. Dabei stellt Fondaparinux einen selektiven FXa-Inhibitor dar und ist lediglich indirekt zur Hemmung der Thrombinaktivität, durch die Blockade seiner Bildung befähigt. Das etwas aktiviere LMWH Enoxaparin besitzt ein anti-FXa/anti-FIIa Verhältnis von 3,9 und wirkt somit zwar vornehmlich durch die Blockade der FXa-vermittelten Thrombinbildung, ist allerdings auch in der Lage zu kleinen Teilen die Aktivität des Thrombins direkt über Antithrombin III zu unterdrücken. Deutlicher wird dies bei der Betrachtung des UFH,

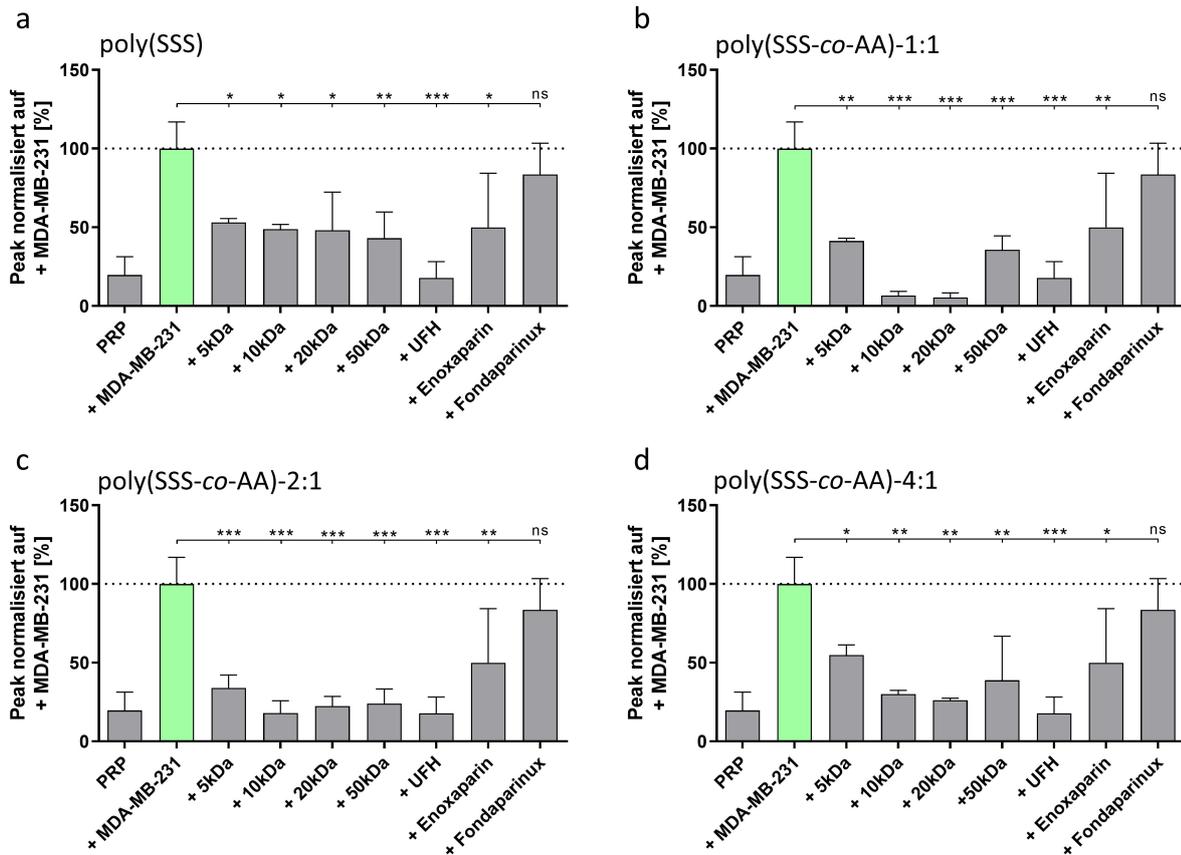


Abbildung 28: Gezeigt sind die normalisierten Werte der Peakhöhe für die untersuchten Antikoagulantien und Heparin-Mimetika. Die Ergebnisse geben den Mittelwert sowie die Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente (N=3) wieder. Die Signifikanz wurde mittels einer One-Way ANOVA und eines Dunnett Post-hoc Tests bestimmt. ns: nicht signifikant; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$

welches mit einem anti-FXa/anti-FIIa Verhältnis von 1 gleichermaßen die Aktivität des FXa und des Thrombins blockiert [399]. Somit könnte es sein, dass Tumorzellen eine so starke Induktion der Blutgerinnungskaskade vermitteln, dass eine reine Hemmung des FXa der Gerinnungsaktivierung nicht standhalten kann und ein zusätzlicher, direkter Hemmeffekt auf die Thrombinaktivität benötigt wird. Bemerkenswert in Bezug auf die Heparin-mimetischen Polymere ist, dass poly(SSS-co-AA)-1:1 20kDa, für welches zuvor eine anti-FIIa-Aktivität durch Nahain et al. gezeigt wurde, die Thrombinbildung am effektivsten unterdrückt. Jedoch weist auch poly(SSS) eine gewisse inhibitorische Kapazität auf, obwohl weder eine anti-FXa noch eine anti-FIIa Aktivität detektiert wurde [398]. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Heparin-mimetischen Polymere ihre inhibitorische Kompetenz über weitere Interferenzpunkte in der Gerinnungskaskade der Tumorzell-induzierten Thrombingenerierung vermitteln.

### 5.1.2 Inhibition der Tumorzell-vermittelten Thrombozytenaktivierung

Zwar ist die Induktion der Blutgerinnung ein wichtiger Schritt im Verlauf der metastatischen Kaskade und das damit einhergehend formierte Thrombin ein relevanter Vermittler prometastatischer bzw. protumorigener Effekte, jedoch spielt, wie in den vorherigen Abschnitten dieser Arbeit erläutert, die Aktivierung der Thrombozyten ebenfalls eine essentielle Rolle in der Ausformung metastatischer Herde (vgl. Abschnitt 2.1 und 2.5.2). Folglich wurden die zuvor selektierten Polymere poly(SSS) und poly(SSS-co-AA) in den molekularen Größen 5 kDa, 10 kDa, 20 kDa bzw. 50 kDa und den entsprechenden Monomer-verhältnissen hinsichtlich ihrer Kapazität zur Unterdrückung der Thrombozytenaktivierung untersucht. Dabei wurde methodisch zum einen auf die Thrombozytenaggregation und zum anderen wurde die Aktivierung der Thrombozyten fokussiert. Als Parameter der Thrombozytenaktivierung wurde die Freisetzung von ATP aus dichten Granula bzw. die Sekretion verschiedener Botenstoffe aus den thrombozytären  $\alpha$ -Granula vermessen.

**5.1.2.1 Blockade der Thrombozytenaggregation** Wie bereits bei der initialen Einschätzung der Heparin-Mimetika wird die Methode der Lichttransmissionsaggregometrie genutzt, um das Ausmaß einer Tumorzell-induzierten Thrombozytenaggregation unter Einfluss der selektierten Polymere sowie der kommerziellen Antikoagulantien zu verfolgen. Repräsentative Aggregogramme sind in Abbildung 29 dargestellt.

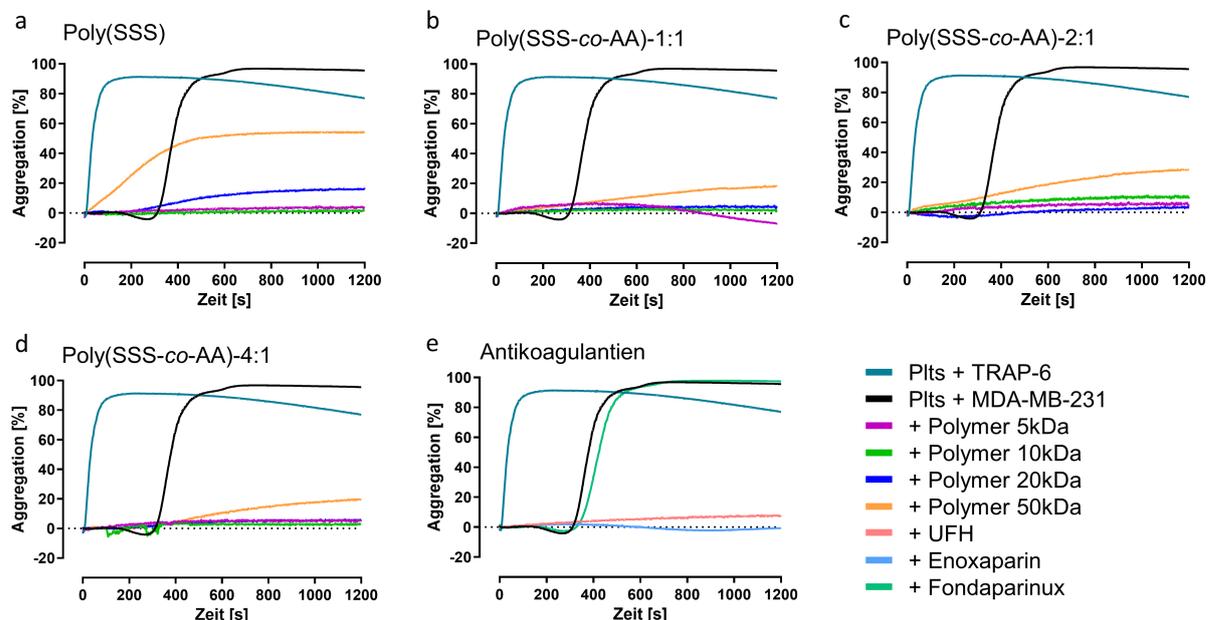


Abbildung 29: Veranschaulicht sind repräsentative Aggregogramme der untersuchten Heparin-Mimetika (a-d) sowie der therapeutischen Antikoagulantien (e) nach Stimulation der Thrombozyten mit MDA-MB-231 Brustkrebszellen

Die Betrachtung der Aggregogramme kommerzieller Antikoagulantien in Abbildung 29 e zeigt deutlich, dass Fondaparinux entgegen den beiden Heparinen UFH und Enoxaparin nicht zur Unterdrückung der Thrombozytenaggregation befähigt ist.

Ähnlich den Aggregogrammen der verschiedenen Konzentrationen des Homopolymers poly(SSS) 20kDa, scheint auch eine Steigerung der Molekülgröße auf 50 kDa bei der gleichbleibenden Konzentration von 50 µg/mL eine unerwünschte Aggregation der Thrombozyten zu vermitteln, da die detektierte Kurve bereits vor der MDA-MB-231-vermittelten Aggregation ansteigt (vgl. Abbildung 29 a). Die Reduktion der molekularen Größe ist jedoch nicht wie bei der Thrombingenerierung mit einer Verminderung des Hemmeffektes assoziiert. Unabhängig von den Verhältnissen der SSS- bzw. AA-Monomerverteilung in den untersuchten poly(SSS-co-AA) Verbindungen inhibieren die evaluierten Molekülgrößen von 5 bis 50 kDa die Tumorzell-vermittelte Thrombozytenaggregation effektiv. Jedoch sind auch hier die Copolymere mit 50 kDa jene, die einen schwächeren Hemmeffekt ausüben und, wie in Abbildung 29 c zu sehen, die Thrombozytenaggregation vor einer Induktion durch MDA-MB-231 Zellen auslösen. Zusammen mit den weiteren, bis hierhin vorgestellten Daten lässt sich postulieren, dass das Übersteigen einer kritischen molekularen Größe bzw. das Unterschreiten einer kritischen Konzentration bei der Größe von 20 kDa zu einer ungewollten Quervernetzung oder Aktivierung der Thrombozyten führen könnte. Grundsätzlich wird die Thrombozytenaggregation in den vermessenen Suspensionen durch die Homo- und Heteropolymere mit einem Gewicht  $\leq 20$  kDa effektiv unterdrückt. Sie können somit hinsichtlich dieses Assays als äquivalent zu den Heparinen UFH und Enoxaparin betrachtet werden.

**5.1.2.2 Bestimmung der ATP Freisetzung aus dichten Granula** Wie bereits in den Abschnitten 2.4.1 und 2.5.1 beschrieben, ist ATP unter anderem an der Modulation der antitumoralen Immunantwort beteiligt. Innerhalb der Thrombozyten wird es in den dichten Granula gespeichert. Die Detektion seiner Freisetzung durch das Luciferin/Luciferase System stellt einen etablierten Surrogatparameter zur Bestimmung der Thrombozytenaktivierung in der Forschung dar [400, 401]. Zur weiteren Evaluation der Heparin-Mimetika konnte so nicht nur die Aggregationshemmung, sondern auch die Inhibition der funktionell relevanten Ausschüttung thrombozytärer Mediatorstoffe bestimmt werden. Die Ergebnisse der Tumorzell-induzierten ATP Freisetzung sind in Abbildung 30 veranschaulicht. Zur erleichterten Einordnung der gemessenen Werte wurden diese auf die Probe einer TRAP-6 Aktivierung normalisiert, welche als Referenz einer vollständigen Thrombozytenaktivierung dient.

Die Inkubation der Thrombozyten mit MDA-MB-231 Brustkrebszellen führte im Vergleich zu TRAP-6 lediglich zu einer ATP Freisetzung von 67 %. Somit scheinen die hier ein-

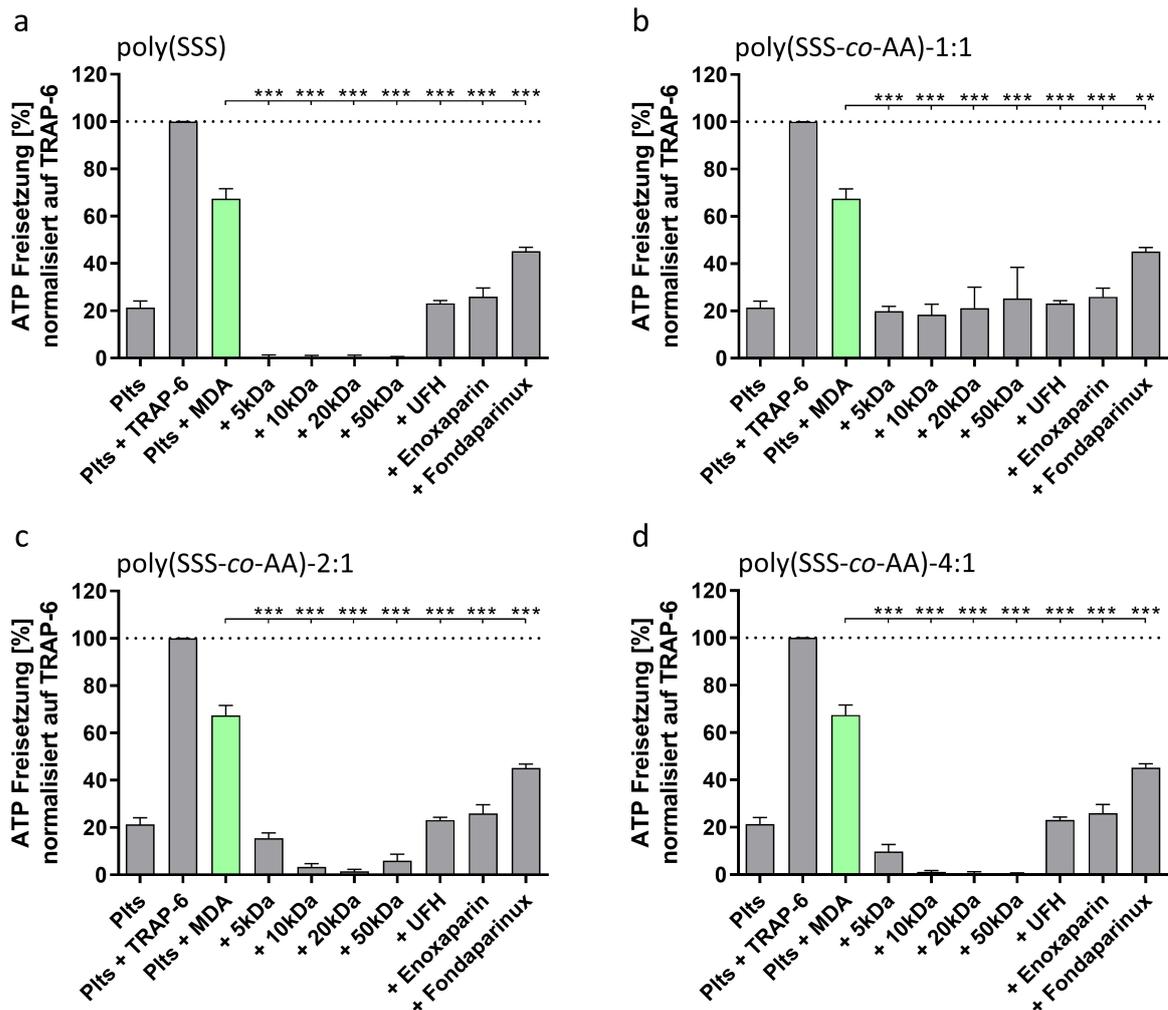


Abbildung 30: Dargestellt ist die ATP Freisetzung aus Thrombozyten im Zuge einer Aktivierung durch MDA-MB-231 Zellen und einer Behandlung mit den untersuchten Antikoagulantien und Heparin-mimetischen Polymeren. Eine Vollaktivierung der Thrombozyten durch den PAR-1 Agonisten TRAP-6 diente als Referenz der maximal induzierbaren Freisetzung. Dargestellt sind die Ergebnisse dreier unabhängiger Messungen (N=3) als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. Die Prüfung der Signifikanz erfolgte mittels der One-Way ANOVA und eines Dunnett Post-hoc Tests mit \*\*:  $p < 0,01$  und \*\*\*:  $p < 0,001$

gesetzten Tumorzellen nicht in der Lage eine restlose Sekretion der dichten Granula zu induzieren, auch wenn sie eine vollständige Aggregation der behandelten Thrombozyten vermitteln (vgl. Abbildung 29 und 30). Unter Berücksichtigung der im folgenden Abschnitt vorgestellten Daten zur Untersuchung der Sekretion der  $\alpha$ -Granula erscheint dies jedoch unwahrscheinlich, auch wenn die genauen Regulationen der Freisetzung thrombozytärer Granula bis heute nicht abschließend geklärt und Gegenstand der wissenschaftlichen Debatte sind [402]. Ein Baustein zur Erklärung dieser Diskrepanz der ATP Freisetzung durch TRAP-6 und Tumorzellen könnte die Expression von Ectonucleotidasen seitens der

MDA-MB-231 Zellen sein. So kann das freigesetzte ATP bereits während der Koinkubation der Thrombozyten mit den MDA-MB-231 Zellen degradiert werden und steht nicht mehr zur Detektion durch die Luciferase zur Verfügung [403].

Generell kann beobachtet werden, dass alle untersuchten Substanzen die Detektion des ATPs hoch signifikant unterdrücken. Beim Vergleich der kommerziellen Antikoagulantien senken sowohl UFH als auch Enoxaparin die ATP Freisetzung auf das Niveau der Negativkontrolle nicht-aktivierter Thrombozyten (20-25 %). Obwohl es eine deutliche Reduktion gegenüber der Plts + MDA Probe (67 %) vermittelt, präsentiert sich Fondaparinux mit einer Senkung auf 45 % vergleichsweise schlecht.

Besonders das Copolymer poly(SSS-*co*-AA)-1:1 zeigt eine effektive Hemmung der ATP Freisetzung und somit der Thrombozytenaktivierung, welche durch alle vier Größenvariationen auf das Basalniveau der Negativkontrolle reduziert wird. Dies ist im Einklang mit den zuvor erhobenen Daten der Thrombozytenaggregation. Bei einer näheren Betrachtung der Daten des Homopolymers fällt auf, dass die scheinbare ATP Freisetzung weit unter das Basalniveau auf etwa 0 % reduziert wird. Auch die 2:1 und 4:1 Derivate des poly(SSS-*co*-AA) reduzieren die detektierte Menge des ATPs unter das Level nicht-aktivierter Thrombozyten, wobei die Reduktion umso stärker ausfällt, je höher der Anteil des Monomers SSS gewählt wird. Dies deutet auf eine Störung des Detektionssystems durch die Struktur des SSS hin, da eine Reduktion unter das Basalniveau unwahrscheinlich erscheint und in ihrem Ausmaß mit dem SSS-Gehalt korreliert.

**5.1.2.3 Untersuchung der Freisetzung thrombozytärer  $\alpha$ -Granula** Neben der Freisetzung der dichten Granula wurde weiterhin die Sekretion verschiedener, immunmodulierender bzw. tumorrelevanter Botenstoffe aus den thrombozytären  $\alpha$ -Granula als Parameter der Thrombozytenaktivierung bestimmt. Unter den detektierten Mediatoren befinden sich sowohl immunsuppressive Botenstoffe wie CCL11, das eine  $T_{reg}$  Differenzierung induziert, als auch CXCL11, welches mit einer Steigerung der TIL assoziiert werden kann [404, 405]. Bezogen auf protumorale Effekte können beispielhaft VEGF, HGF oder MMP-1 genannt werden [406–408]. Neben den kommerziellen Antikoagulantien wurden in diesem Versuch, auf Grundlage der bisherigen Ergebnisse, poly(SSS-*co*-AA)-1:1 20kDa als vielversprechendster Kandidat, poly(SSS) 20kDa als Referenz sowie das Copolymer poly(SPA-*co*-AA)-1:1 20kDa als eine bis dato inaktive Kontrolle mitgeführt. Die Ergebnisse der Quantifizierung sind in Abbildung 31 illustriert.

Entgegen den Beobachtungen der ATP Freisetzung waren die MDA-MB-231 Zellen in der Lage, die Sekretion der  $\alpha$ -Granula in einem ähnlichen Ausmaß zu induzieren, wie die Positivkontrolle des PAR-1 Agonisten TRAP-6. Die bisher registrierte Abstufung der inhibitorischen Kapazität der kommerziellen Antikoagulantien in den verschiedenen

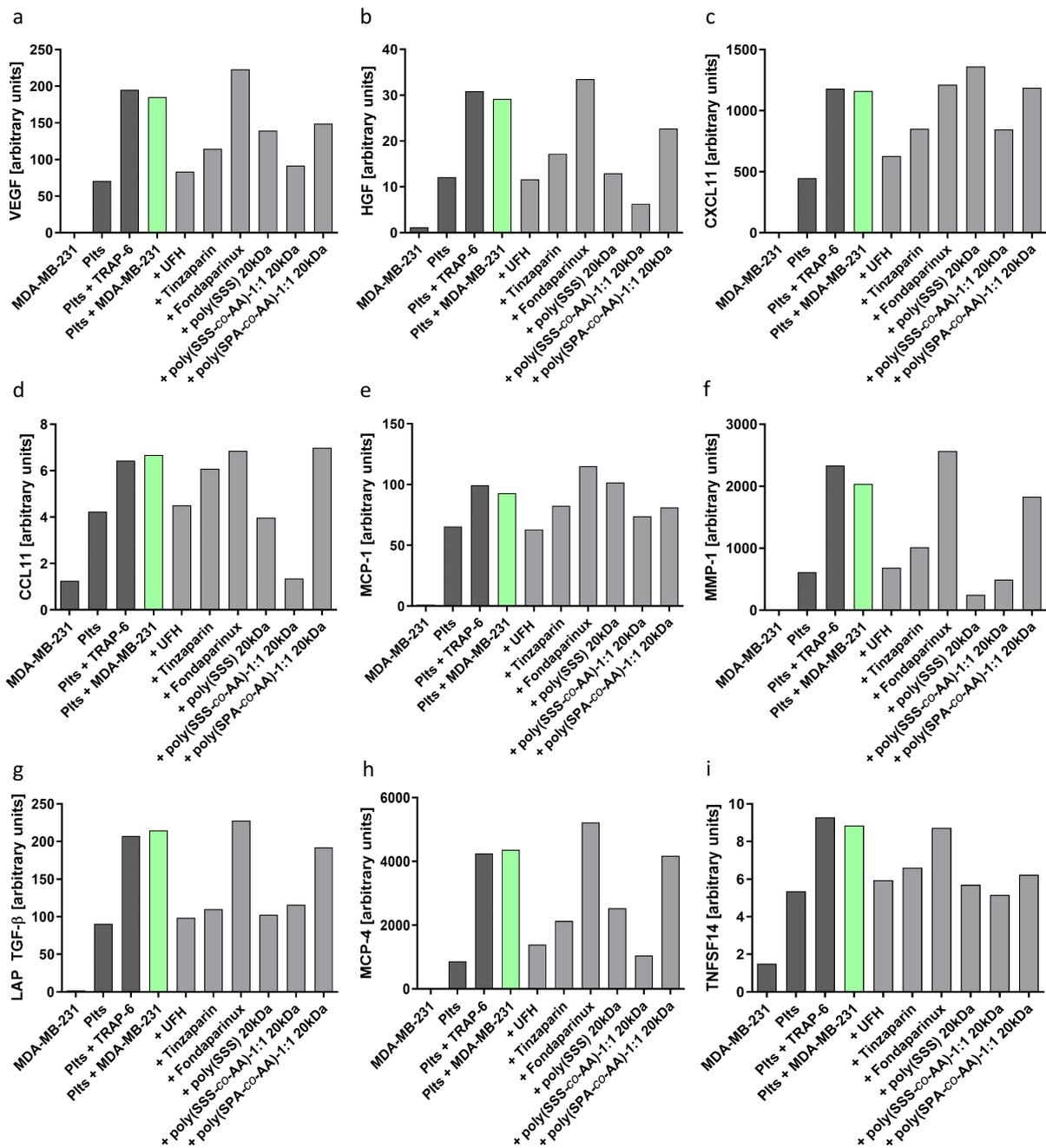


Abbildung 31: Dargestellt sind die relativen Gehälter unterschiedlicher, immunmodulierender bzw. tumor-relevanter Mediatoren in Tumorzell-induzierten Thrombozyten-Releasates. N=1

Assaysystemen kann auch hier bestätigt werden. So reduziert UFH die Freisetzung aller quantifizierten Mediatoren auf das Niveau nicht-aktivierter Thrombozyten, während das LMWH eine leicht schwächere aber dennoch effektive Hemmung vermittelt. Erneut kann keine Hemmung durch das Pentasaccharid Fondaparinux registriert werden.

Unabhängig vom detektierten Botenstoff kann durch poly(SSS-co-AA)-1:1 20kDa eine effiziente Reduktion der Freisetzung erreicht werden, sodass es seine Rolle als vielverspre-

chendes Heparin-Mimetikum in Bezug auf seine antikoagulatorischen bzw. aktivierungs-  
unterdrückenden Effekte weiter bestätigt. Ein differenzierteres Bild ergibt sich aus der  
Betrachtung des poly(SSS) 20kDa. Unter Einbeziehung aller Mediatoren zeichnet sich ein  
Hemmeffekt der Thrombozytenaktivierung ab. Bei genauerer Betrachtung fällt jedoch auf,  
dass sowohl CXCL11 als auch MCP-1 (Abbildung 31 c und e) keiner Freisetzungshem-  
mung durch poly(SSS) 20kDa zu unterliegen scheinen. Ebenso lässt sich eine lediglich  
moderate Inhibition der VEGF und MCP-4 Freisetzung verzeichnen (Abbildung 31 a  
und h). Ähnlich divergent präsentiert sich das in der Aggregometrie inaktive Copolymer  
poly(SPA-*co*-AA)-1:1 20kDa. Abweichend überwiegen hier jedoch die Mediatoren, welche  
nicht in ihren freigesetzten Mengen eingeschränkt werden. Eine moderate Hemmung lässt  
sich dennoch für VEGF und HGF verzeichnen (Abbildung 31 a und b). Einer deutlichen  
Inhibition unterliegen dagegen MCP-1 und TNFSF14 (Abbildung 31 e und i).

Aufgrund der Limitierung des Assays auf eine Einzelmessung ( $N=1$ ), ist es nicht einfach die  
Validität der Daten einzuschätzen. Zwar fügen sich die detektierten Effekte des Copolymers  
poly(SSS-*co*-AA)-1:1 20kDa gut in die bisherigen Beobachtungen ein, jedoch könnte die  
Divergenz innerhalb der Releasates, welche mit poly(SSS) 20kDa bzw. poly(SPA-*co*-AA)-  
1:1 20kDa präinkubiert wurden, auch aus der Ungenauigkeit einer einzelnen Messung  
herrühren. Wie bereits in Abschnitt 5.1.2.2 angedeutet ist die Präsenz unterschiedlich  
gepackter bzw. differenziert sezernierter  $\alpha$ -Granula Gegenstand der aktuellen wissenschaft-  
lichen Debatte [402]. Durch Battinelli et al. konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten  
nach einer Stimulation mit ADP bzw. MCF-7 Zellen durch die Sezernierung von VEGF  
proangiogenetisch agieren, während sie nach einer Stimulation mit TxA2 vermehrt das  
antiangiogenetische Endostatin freisetzen [409]. Entgegen diesen Beobachtungen, die eine  
kontextabhängige Freisetzung verschiedener Subtypen der  $\alpha$ -Granula vermuten lässt, steht  
die Studie von Jonnalagadda und Kollegen. In ihren Experimenten untersuchten sie die  
zeitabhängige Freisetzung verschiedener  $\alpha$ -granulärer Mediatoren nach der Stimulation  
mit unterschiedlichen Thrombozytenaktivatoren. Sie konnten zwar einen Unterschied in  
der Freisetzungsrates verzeichnen, eine kontextabhängige Sekretion konnten sie jedoch nicht  
bestätigen [410]. Auch diese kontrovers debattierte Frage nach der Sekretion differenzierter  
Subtypen der  $\alpha$ -Granula könnte zur Diskrepanz der beschriebenen Daten beitragen, da  
nicht nur eine aktivatorspezifische Freisetzung, sondern auch eine inhibitorspezifische  
Hemmung denkbar ist.

### 5.1.3 Zwischenfazit der antikoagulatorischen Eigenschaften

Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen der koagulationsabhängigen Testsysteme, dass die TF exprimierende Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 zu einer massiven Induktion der Thrombingenerierung befähigt ist. Darüber hinaus werden Thrombozyten in einem Ausmaß aktiviert, welches mit der Vollaktivierung durch den PAR-1 Agonisten TRAP-6 erzielt wird, was in einer Bildung stabiler Heteroaggregate aus Tumorzellen und Thrombozyten, sowie der Sezernierung der in dichten bzw.  $\alpha$ -Granula gespeicherten Mediatoren resultiert. Aufgrund der literaturbekannten Effekte der verschiedenen Mediatorstoffe und der Aggregatbildung kann eine weitreichende Beeinflussung der Metastasierung und eine Modulation der antitumoralen Immunantwort durch die Tumorzell-vermittelte Thrombozytenaktivierung vermutet werden.

Hinsichtlich der Inhibition durch die kommerziellen Heparin-Derivate lässt sich eine deutliche Größenabhängigkeit erkennen, in der die größeren Substanzen UFH und das LMWH dem essentiellen Pentasaccharid der Antithrombin-Bindungsdomäne Fondaparinux deutlich überlegen sind. Sie überzeugten in allen durchgeführten Assays durch ihre umfassende Hemmung der Tumorzell-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Lediglich in der Inhibition der MDA-MB-231-vermittelten Thrombingenerierung sind für das LMWH Enoxaparin Abstriche zu verzeichnen, welche die erhöhten Anforderungen an Moleküle verdeutlichen, die in die Interaktion zwischen TF exprimierenden Tumorzellen und der Gerinnungskaskade eingreifen.

Bei der Betrachtung des breiten Spektrums der potentiellen Heparin-Mimetika präsentiert sich das Monomer SSS als essentieller Baustein, der zur Einflussnahme auf das Wechselspiel der Tumorzellen mit der Gerinnungskaskade bzw. Thrombozytenaktivierung benötigt wird. Jedoch ist ein zu hoher Anteil an der Komposition der Polymere mit nachteiligen, unerwünschten Interferenzen behaftet. Im Einklang damit kristallisieren sich die acrylsäurebasierten Copolymere poly(SSS-*co*-AA)-1:1 in den Größen von 10 bzw. 20 kDa als potente Mimetika der heparinoiden Wirkung heraus. Währenddessen ist das als Negativkontrolle mitgeführte Copolymer poly(SPA-*co*-AA)-1:1 20kDa entsprechend den Erwartungen nach dem initialen *screening* in den darauffolgenden koagulationsabhängigen Assays als inaktiv zu bewerten.

Für weitere Untersuchungen potentieller antimetastatischer Effekte der Heparin-Mimetika wurden die Substanzen poly(SSS) 20kDa, poly(SSS-*co*-AA)-1:1 10kDa, poly(SSS-*co*-AA)-1:1 20kDa sowie poly(SPA-*co*-AA)-1:1 20kDa ausgewählt.

## 5.2 Bindung und Blockade metastasierungsassoziierter Adhäsionssysteme

Neben der Interaktion mit den Thrombozyten und der Blutgerinnungskaskade sind auch verschiedene Adhäsionsmoleküle essentiell für die erfolgreiche Etablierung metastatischer Herde. So nutzen Tumorzellen diese in der metastatischen Kaskade zur Anlagerung und dem anschließenden Arrest am Endothel, um eine Extravasation am Ort der Dissemination zu ermöglichen. Wie in Abschnitt 2.7.2 beschrieben, stellen die verschiedenen Adhäsionssysteme mögliche Ziele eines Eingriffs durch UFH und LMWHs innerhalb der Metastasierung dar und tragen zu einem potentiellen antimetastatischen Effekt bei. Entsprechend wurden die kommerziellen Antikoagulantien und synthetischen Polymere hinsichtlich des Ausmaßes ihrer Bindung an P-Selectin, E-Selectin und VLA-4 mittels der SAW-Biosensorik evaluiert. Weitergehend wurde die Adhäsion der Melanomzelllinie MV3 an isoliertem VCAM-1 bzw. einem artifiziellen Endothel unter dem Einfluss der verschiedenen Substanzen untersucht.

### 5.2.1 Bindungskinetiken an P-Selectin

Das durch P-Selectin vermittelte Rollen entlang des Endothels stellt den initialen Schritt in der Auswanderung von Leukozyten aus den Blutgefäßen dar, ist aber ebenso essentiell für die Extravasation maligner Zellen im metastatischen Geschehen. Zur ersten Abschätzung eines möglichen Hemmeffektes durch die Heparin-mimetischen Polymere wurden ihre Bindungsparameter an P-Selectin bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 17 aufgeführt.

Tabelle 17: Biosensorische Bestimmung der Bindungsaffinitäten kommerzieller Heparine und Heparinmimetischer Polymere an P-Selectin (N=3)

Substanz	$K_D$ [M]	$k_{on}$ [ $M^{-1}s^{-1}$ ]	$k_{off}$ [ $s^{-1}$ ]
UFH	$2,35 \times 10^{-8} \pm 0,39 \times 10^{-8}$	$3,15 \times 10^5 \pm 0,42 \times 10^5$	$7,64 \times 10^{-3} \pm 2,20 \times 10^{-3}$
Enoxaparin	$2,27 \times 10^{-7} \pm 0,32 \times 10^{-7}$	$9,97 \times 10^4 \pm 2,04 \times 10^4$	$1,86 \times 10^{-2} \pm 0,21 \times 10^{-2}$
Fondaparinux	n.d.	n.d.	n.d.
Poly(SSS) 20kDa	$2,50 \times 10^{-7} \pm 0,17 \times 10^{-7}$	$4,56 \times 10^4 \pm 0,55 \times 10^4$	$8,30 \times 10^{-3} \pm 3,60 \times 10^{-3}$
Poly(SSS-co-AA)-1:1 10kDa	$3,86 \times 10^{-7} \pm 1,69 \times 10^{-7}$	$5,08 \times 10^4 \pm 1,49 \times 10^4$	$1,80 \times 10^{-2} \pm 0,48 \times 10^{-2}$
Poly(SSS-co-AA)-1:1 20kDa	$2,19 \times 10^{-7} \pm 0,51 \times 10^{-7}$	$6,27 \times 10^4 \pm 0,61 \times 10^4$	$1,33 \times 10^{-2} \pm 0,19 \times 10^{-2}$
Poly(SPA-co-AA)-1:1 20kDa	$5,70 \times 10^{-7} \pm 1,77 \times 10^{-7}$	$5,34 \times 10^4 \pm 2,19 \times 10^4$	$2,95 \times 10^{-2} \pm 1,02 \times 10^{-2}$

Die stärkste Bindungsaffinität zu P-Selectin konnte für das unfraktionierte Heparin detektiert werden. Mit einem  $K_D$  Wert von  $2,35 \pm 0,39 \times 10^{-8}$  M liegt dieser leicht unter einem Vergleichswert von  $1,16 \pm 0,05 \times 10^{-7}$  M, welcher durch Wang et al. angegeben wird [328]. Eine etwas geringere Bindungsaffinität wird für das LMWH registriert, welche dennoch im nanomolaren Bereich detektierbar ist. Im Einklang mit den Daten von Ludwig und Kollegen, die nur einen marginalen Einfluss des Pentasaccharids Fondaparinux auf die Aktivität und Metastasierungsvermittlung des P-Selectins verzeichneten, konnte in den SAW-Biosensor Messungen keine Bindung des Fondaparinux an P-Selectin detektiert werden [411]. Zwar wird durch Nelson et al. beschrieben, dass bereits ein Tetrasaccharid zur Bindung des P-Selectins befähigt ist, jedoch unterscheidet sich das beschriebene Tetrasaccharid im Sulfatierungsmuster zu Fondaparinux [331]. Dies könnte die Unterschiede in der Bindungsdetektion bedingen, da besonders eine 2-O- bzw. 6-O-Sulfatierung für eine effektive Bindung der Heparine an P-Selectin als wichtig beschrieben wird [84, 332].

Die Bindung der untersuchten Heparin-mimetischen Polymere liegt im Bereich der Bindungsaffinität des LMWH Enoxaparin. Mit einem  $K_D$  Wert von  $2,19 \pm 0,51 \times 10^{-7}$  M zeigt poly(SSS-*co*-AA)-1:1 20kDa die größte Bindungsaffinität der Heparin-Mimetika. Eine Reduktion der molaren Größe auf 10kDa reduziert die Bindung an P-Selectin leicht, wobei kein signifikanter Unterschied detektiert werden kann. Da nicht nur die mitgeführte Vergleichssubstanz poly(SSS) 20kDa, sondern auch das bis dato inaktive poly(SPA-*co*-AA)-1:1 20kDa an P-Selectin bindet, ist eine zwangsläufige Präsenz des Monomers SSS nicht zu postulieren. Zwar ist der  $K_D$  Wert des Copolymers poly(SPA-*co*-AA)-1:1 20kDa deutlich erhöht, jedoch liegt auch dieser Wert noch im nanomolaren Bereich. So könnte im Fall der Bindung Heparin-mimetischer Polymere, welche nicht auf einer Kohlenhydratstruktur basieren, eine reine Anwesenheit multipler negativer Ladungen für eine Bindung an P-Selectin ausreichend sein.

### 5.2.2 Bindungskinetiken an E-Selectin

Wie P-Selectin ist auch E-Selectin als endothelial exprimiertes Adhäsionsmolekül am initialen Rollen metastasierender Tumorzellen beteiligt und unterstützt somit den Arrest und die Extravasation im Zuge der Ausformung einer metastatischen Läsion. Eine Beeinträchtigung der Metastasierung durch eine Heparin-vermittelte E-Selectin Blockade konnte aufgrund einer fehlenden Affinität des Heparins zu E-Selectin bis heute nicht beschrieben werden [331, 332]. Im Falle einer Bindung der Heparin-mimetischen Polymere stellt dies einen Vorteil gegenüber dem natürlichen Heparin in Bezug auf potentielle antimetastatische Effekte dar. Die Ergebnisse der SAW-biosensorischen Untersuchung sind in Tabelle 18 aufgeführt.

Tabelle 18: Biosensorische Bestimmung der Bindungsaffinitäten kommerzieller Heparine und Heparin-mimetischer Polymere an E-Selectin (N=3)

Substanz	$K_D$ [M]	$k_{on}$ [ $M^{-1}s^{-1}$ ]	$k_{off}$ [ $s^{-1}$ ]
UFH	$4,36 \times 10^{-7} \pm 1,59 \times 10^{-7}$	$2,08 \times 10^4 \pm 0,82 \times 10^4$	$8,27 \times 10^{-3} \pm 3,94 \times 10^{-3}$
Enoxaparin	n.d.	n.d.	n.d.
Fondaparinux	n.d.	n.d.	n.d.
Poly(SSS) 20kDa	$4,71 \times 10^{-7} \pm 2,51 \times 10^{-7}$	$3,83 \times 10^4 \pm 1,81 \times 10^4$	$8,27 \times 10^{-3} \pm 3,94 \times 10^{-3}$
Poly(SSS- <i>co</i> -AA)-1:1 10kDa	n.d.	n.d.	n.d.
Poly(SSS- <i>co</i> -AA)-1:1 20kDa	$4,59 \times 10^{-7} \pm 0,50 \times 10^{-7}$	$5,29 \times 10^4 \pm 0,92 \times 10^4$	$2,33 \times 10^{-2} \pm 0,43 \times 10^{-2}$
Poly(SPA- <i>co</i> -AA)-1:1 20kDa	$4,11 \times 10^{-7} \pm 4,05 \times 10^{-7}$	$4,87 \times 10^4 \pm 3,57 \times 10^4$	$1,17 \times 10^{-2} \pm 0,32 \times 10^{-2}$

Entgegen den bisherigen, in der Literatur beschriebenen Beobachtungen konnte in diesem Assay eine Bindung des E-Selectins durch UFH registriert werden. Im Vergleich zur Bindung an das verwandte P-Selectin ist der  $K_D$  Wert von  $4,36 \pm 1,59 \times 10^{-7}$  M für E-Selectin angehoben und spiegelt eine schwächere Bindung durch UFH wider. Eine Bindung des LMWH Enoxaparin konnte für dieses Adhäsionsmolekül nicht mehr detektiert werden. Wie bereits in der vorherigen Betrachtung des P-Selectins ist Fondaparinux nicht in der Lage an das endothelial exprimierte E-Selectin zu binden.

Interessanterweise scheinen die Bindungsaffinitäten der Heparin-mimetischen Polymere poly(SSS) 20kDa, poly(SSS-*co*-AA)-1:1 20kDa und poly(SPA-*co*-AA)-1:1 20kDa im Vergleich zu den kommerziellen Heparinen nicht beeinträchtigt zu sein und befinden sich noch immer im höheren nanomolaren Bereich. Lediglich das kleinere Polymer poly(SSS-*co*-AA)-1:1 10kDa ist nicht befähigt E-Selectin zu binden. Bei Betrachtung der Daten ist auffällig, dass mit der Reduktion der molekularen Größe des SSS-basierten Heteropolymers ein Verlust der Bindung einhergeht. Spekulativ könnte die Bindung des E-Selectins also von der Präsenz einer negativen Ladung sowie einer kritischen Mindestgröße abhängig sein, da bei einer reinen Abhängigkeit von einer negativen Ladung des Moleküls eine Bindung durch poly(SSS-*co*-AA)-1:1 10kDa bzw. Enoxaparin zu erwarten wäre.

### 5.2.3 Bindungskinetiken an VLA-4

Entgegen den Selectinen ist das Integrin VLA-4 nicht nur am initialen Rollen der metastasierenden Zellen entlang des Endothels beteiligt, sondern vermittelt in seiner aktiven Konformation durch die Bindung an VCAM-1 den stärkeren Arrest der Tumorzelle am Endothel. Bereits durch Schlesinger et al. konnten  $K_D$  Werte von  $4,61$  bzw.  $2,22 \times 10^{-6}$  M für die niedermolekularen Heparine Tinzaparin und Enoxaparin detektiert werden [334, 412]. Dadurch erscheint auch eine Bindung der Heparin-Mimetika plausibel. Die Bindungsparameter der VLA-4 Bindungen sind in Tabelle 19 gezeigt.

Tabelle 19: Biosensorische Bestimmung der Bindungsaffinitäten kommerzieller Heparine und Heparinmimetischer Polymere an das Integrin VLA-4 (N=3)

Substanz	$K_D$ [M]	$k_{on}$ [ $M^{-1}s^{-1}$ ]	$k_{off}$ [ $s^{-1}$ ]
UFH	$1,09 \times 10^{-6} \pm 0,24 \times 10^{-6}$	$3,41 \times 10^4 \pm 1,15 \times 10^4$	$3,21 \times 10^{-2} \pm 1,18 \times 10^{-2}$
Enoxaparin	n.d.	n.d.	n.d.
Fondaparinux	n.d.	n.d.	n.d.
Poly(SSS) 20kDa	$1,63 \times 10^{-7} \pm 0,09 \times 10^{-7}$	$7,82 \times 10^4 \pm 0,19 \times 10^4$	$1,25 \times 10^{-2} \pm 0,11 \times 10^{-2}$
Poly(SSS-co-AA)-1:1 10kDa	$4,07 \times 10^{-7} \pm 0,48 \times 10^{-7}$	$6,73 \times 10^4 \pm 0,71 \times 10^4$	$2,47 \times 10^{-2} \pm 0,19 \times 10^{-2}$
Poly(SSS-co-AA)-1:1 20kDa	$3,43 \times 10^{-7} \pm 1,08 \times 10^{-7}$	$5,94 \times 10^4 \pm 1,56 \times 10^4$	$1,78 \times 10^{-2} \pm 0,13 \times 10^{-2}$
Poly(SPA-co-AA)-1:1 20kDa	n.d.	n.d.	n.d.

Mit einem  $K_D$  Wert von  $1,09 \pm 0,24 \times 10^{-6}$  M liegt das unfraktionierte Heparin im Bereich der zuvor durch Schlesinger et al. beschriebenen Bindungen der niedermolekularen Heparine. Jedoch muss angemerkt werden, dass in diesen Untersuchungen keine Bindung des VLA-4 durch Enoxaparin detektiert werden konnte. Selbiges gilt für das Pentasaccharid Fondaparinux. Ähnlich wie für E-Selectin kann keine Bindung für das Copolymer poly(SPA-co-AA)-1:1 20kDa verzeichnet werden. Die  $K_D$  Werte der Heparin-Mimetika poly(SSS) 20kDa, poly(SSS-co-AA)-1:1 10kDa und poly(SSS-co-AA)-1:1 20kDa unterschreiten den des UFH und deuten somit auf eine stärkere Wechselwirkung mit VLA-4 hin. Der  $K_D$  Wert für poly(SSS) 20kDa konnte mit  $1,63 \pm 0,09 \times 10^{-7}$  M bestimmt werden und repräsentiert so die beste Bindungskapazität. Somit kann auch bei diesem Zielprotein ein Vorteil durch das Vorhandensein des SSS-Monomers beobachtet werden, wobei auch hier positive Effekte durch die Anwesenheit des  $\pi$ -Elektronen-Systems postuliert werden können.

### 5.2.4 Einfluss der Heparin-Mimetika auf die Zellviabilität

Essentiell für die Evaluation einer Substanz in *in-vitro* Modellen und für den potentiellen Einsatz in einem *in-vivo* Testsystem oder gar der weiteren Entwicklung zum Arzneistoffkandidaten ist die Beurteilung ihrer Toxizität gegenüber den Zellen des exponierten Organismus. Zur Abschätzung der Zelltoxizität der untersuchten Polymere wurde der Effekt von Verdünnungsreihen auf die Viabilität der immortalisierten Endothelzelllinie EA.hy926 vermessen. Die Auswahl einer Endothelzelllinie anstelle von Tumorzelllinien erfolgte unter der Annahme, dass Endothelzellen als Barriere des Blutes die Zellen darstellen, welche bei einer Applikation der Polymere über einen längeren Zeitraum einer potentiellen Toxizität der angewendeten Heparin-Mimetika ausgesetzt sind. Die Viabilitäten sind in Abbildung 32 gezeigt.

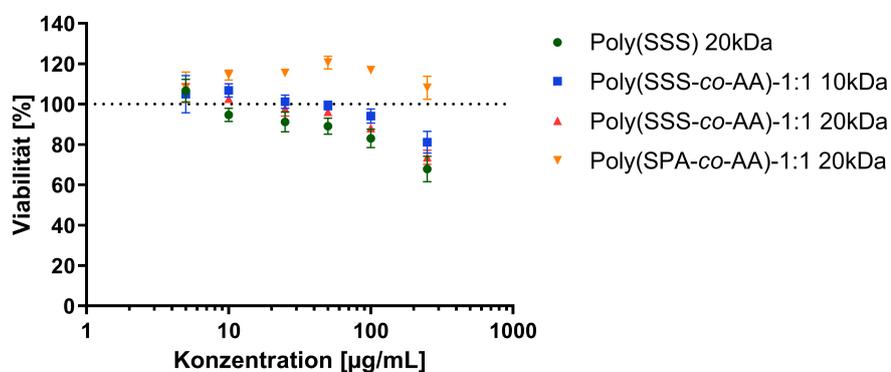


Abbildung 32: Illustriert ist die Viabilität der Endothelzelllinie EA.hy926 nach einer Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen der vier selektierten Heparin-Mimetika. Die Daten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchswiederholungen. N=3

Anhand der vorliegenden Viabilitätsdaten ist keine Zytotoxizität für die in den verwendeten Testsystemen, mit Ausnahme der Thrombingenerierung, vorliegenden Endkonzentrationen zu erkennen. Auch die für die Präinkubation der Thrombozyten eingestellte Konzentration von 50 µg/mL scheint keine ausgeprägte Zytotoxizität zu besitzen.

### 5.2.5 Blockade der VLA-4-vermittelten Tumorzellbindung an immobilisiertes VCAM-1

Basierend auf den zuvor mittels SAW-Biosensorik detektierten Bindungsparametern lässt sich für UFH sowie die SSS enthaltenden Polymere eine Bindung an VLA-4 nachweisen. Ein direkter Einfluss auf die VLA-4/VCAM-1 gestützte Zelladhäsion wird daraus jedoch nicht evident. Zur funktionellen Analyse der Bindungskonsequenz wurde die Adhäsion VLA-4 tragender MV3 Melanomzellen an immobilisiertes VCAM-1 unter simulierten,

physiologischen Flussbedingungen bestimmt. Zur Validierung des Messsystems wurden die Zellen sowohl ohne als auch mit einer vorherigen  $Mn^{2+}$ -vermittelten Überführung des VLA-4 in die aktive Konformation vermessen. Darüber hinaus wurden die durch Dr. Piva etablierten MV3-ITGB1kd Zellen, welche durch den Mangel an Integrin  $\beta 1$  stark in ihrer VLA-4 Expression beeinträchtigt sind, sowie die korrespondierende MV3 scramble Kontrolle vermessen [384]. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Abbildung 33 dargestellt. Aufgetragen ist der Anteil adhärenter Zellen an VCAM-1 als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dreier unabhängiger Versuchswiederholungen gegen die Zeit nach Beginn des Pufferstroms.

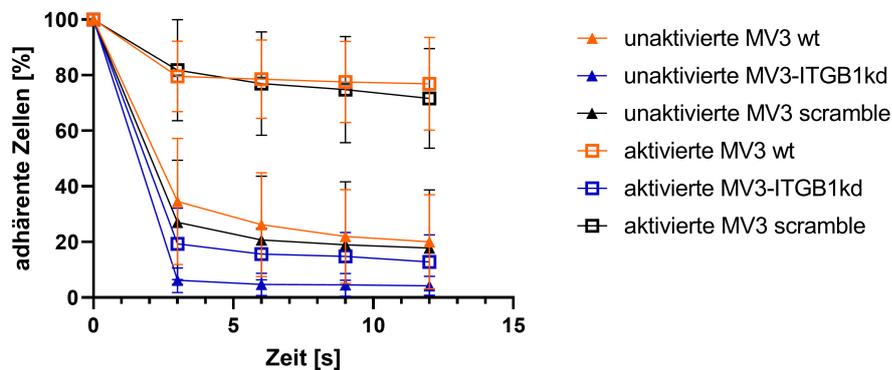


Abbildung 33: Dargestellt ist der Anteil adhärenter Zellen an immobilisiertem VCAM-1 gegen die Zeit nach Beginn des Pufferstroms. Zur Validierung des Messsystems wurden die Melanomzellen ohne oder mit einer Aktivierung des VLA-4 durch  $Mn^{2+}$  vermessen. Untersucht wurden MV3 Wildtypzellen, MV3 Zellen mit reduzierter VLA-4 Expression (MV3 ITGB1kd) sowie die entsprechende Vektorkontrolle (MV3 scramble). Die Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei (MV3-ITGB1kd), fünf (MV3 wt) bzw. sechs (MV3 scramble) unabhängigen Versuchswiederholungen gezeigt

Wie in Abbildung 33 zu erkennen, ermöglicht die Überführung des VLA-4 in die aktive Konformation eine effiziente Bindung der Zellen an das immobilisierte VCAM-1. Im Vergleich dazu ist die terminale Adhärenz unaktivierter MV3 wt Zellen von 77 % auf lediglich 20 % reduziert. Eine massive unspezifische Bindung der aktivierten MV3 wt Zellen an die Glasoberfläche, auf welcher VCAM-1 immobilisiert ist, kann durch die Verwendung  $Mn^{2+}$ -aktivierter MV3-ITGB1kd Zellen (13 %) ausgeschlossen werden. Ein geringfügiges Auftreten unspezifischer Bindungen kann jedoch nicht vollends ausgeschlossen werden, da auch die unaktivierten Knockdown-Zellen eine terminale Adhäsion von 4 % zeigen. Eine Störung des Versuchs durch den verwendeten lentiviralen Vektor kann durch den Vergleich der terminalen Adhäsionsraten der MV3 wt Zellen (77 % aktiviert, 20 % unaktiviert) und der MV3 scramble Kontrolle (71 % aktiviert, 18 % unaktiviert) ausgeschlossen werden. Zur Ermöglichung eines Vergleichs der Präinkubation  $Mn^{2+}$ -aktivierter Tumorzellen mit den untersuchten Testsubstanzen und einem Knockdown des Integrins  $\beta 1$  werden in den

nachfolgenden Untersuchungen MV3 scramble Zellen verwendet. Die Ergebnisse der Inhibitionsuntersuchung der kommerziellen Antikoagulantien sind in Abbildung 34 a gezeigt. Wie aufgrund der nicht detektierbaren Bindungsparameter in den Biosensormessungen zu erwarten, vermag es das synthetische Pentasaccharid Fondaparinux nicht die Bindung der MV3 scramble Zellen über die VLA-4/VCAM-1 Achse zu inhibieren. Die Bindung des VLA-4 durch UFH resultiert in einer Verminderung der Zelladhäsion auf 54 %. Bemerkenswerterweise führt die Präinkubation mit Enoxaparin, welches zuvor nicht an VLA-4 binden konnte, zur stärksten Reduktion der Zellbindung innerhalb der betrachteten kommerziellen Antikoagulantien (36 %).

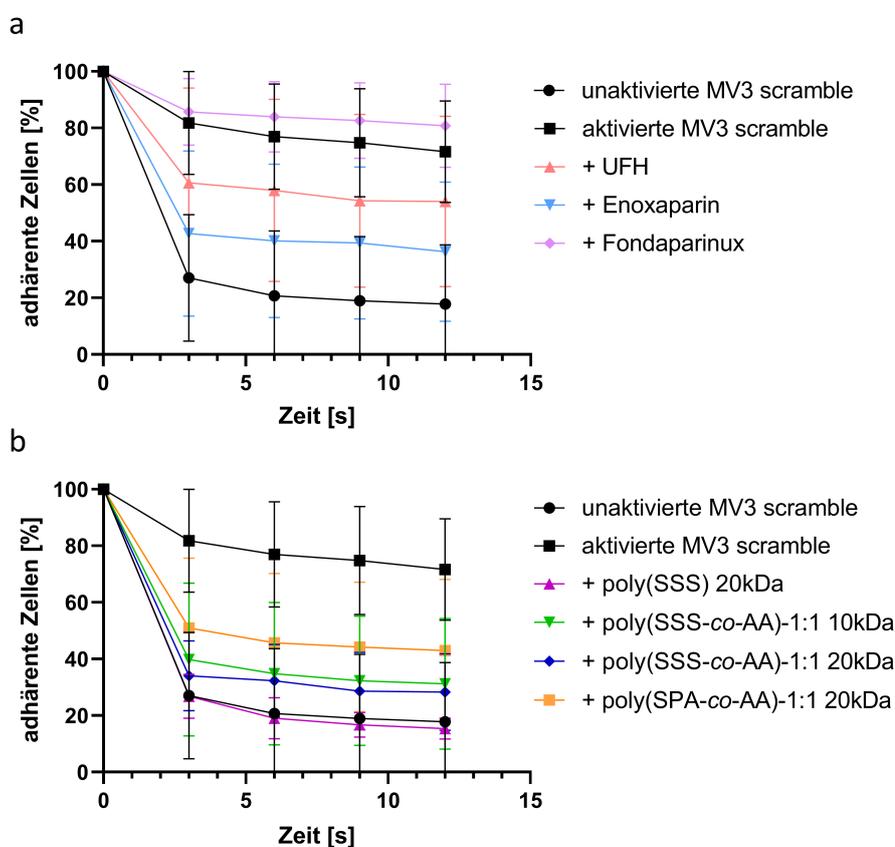


Abbildung 34: Illustriert sind die Anteile adhärenter,  $Mn^{2+}$ -aktivierter MV3 scramble Zellen unter dem Einfluss einer Präinkubation mit kommerziellen Antikoagulantien (a) oder den ausgewählten Heparin-mimetischen Polymeren (b). Die Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dreier unabhängiger Versuchswiederholungen gezeigt. ( $N=3$ )

Übereinstimmend mit den detektierten Bindungsparametern übersteigen die inhibitorischen Kapazitäten der SSS-basierten Polymere mit Adhäsionsraten von 15 % für poly(SSS) 20kDa, 31 % für poly(SSS-co-AA)-1:1 10kDa und 28 % für poly(SSS-co-AA)-1:1 20kDa die des unfraktionierten Heparins. Auffällig ist, dass auch hier eine Hemmung für das zuvor nicht bindende Polymer poly(SPA-co-AA)-1:1 20kDa zu verzeichnen ist. Mit einer residualen

Adhäsion von 43 % liegt es in einem ähnlichen Inhibitionsbereich wie bereits Enoxaparin. Grundlegend zeigen diese Ergebnisse, dass die Bindung des VLA-4 durch die kommerziellen Antikoagulantien und Heparin-mimetischen Polymere ebenfalls zu einer funktionellen Beeinträchtigung der von Tumorzellen genutzten VLA-4/VCAM-1 Adhäsionsachse führt. Darüber hinaus scheint es, dass auch Enoxaparin und poly(SPA-*co*-AA)-1:1 20kDa zur Interferenz befähigt sind, obwohl keine Bindung an VLA-4 detektiert werden konnte. Eine Bindung der Substanzen an VCAM-1 erscheint durch den hohen Verdünnungseffekt im Pufferstrom unwahrscheinlich. Ohne nähere Untersuchungen der Bindungsaffinität und tumoralen Expression wäre an dieser Stelle die Blockade des Integrins  $\alpha 4\beta 7$  als VCAM-1 Bindungspartner spekulativ, sodass der Hintergrund des Hemmeffektes von Enoxaparin und poly(SPA-*co*-AA)-1:1 20kDa nicht abschließend aufgeklärt werden kann.

### 5.2.6 Inhibition der Tumorzellbindung am artifiziellen Endothel

Nach der Betrachtung des isolierten Bindungssystems VLA-4/VCAM-1 wurde in einem weitergehenden artifiziellen Versuch, der die physiologischen Gegebenheiten realer abbildet, die MV3 Bindung an einem Endothelmonolayer betrachtet. In den, von Dr. Christian Gorzelanny am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchgeführten, Versuchen wurde die Bindung der  $Mn^{2+}$ -aktivierten MV3 Zellen an TNF- $\alpha$ -aktivierte Endothelzellen unter einem simulierten kapillaren Scherstrom in Vollblut untersucht. Somit konnte der kumulierte Hemmeffekt der P-Selectin, E-Selectin und VLA-4 Bindung betrachtet und auch weitergehende Strömungseffekte anderer Blutbestandteile berücksichtigt werden. Verglichen wurden die inhibitorischen Kapazitäten der selektierten Testsubstanzen Enoxaparin, poly(SSS-*co*-AA)-1:1 20kDa sowie poly(SPA-*co*-AA)-1:1 20kDa. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 35 als repräsentative mikroskopische Aufnahmen sowie als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen der Adhäsionsrate dargestellt.

Deutlich zu erkennen ist, dass jede der untersuchten Substanzen eine starke Reduktion der Adhäsion GFP-markierter MV3 Zellen an das aktivierte Endothel vermittelt. So ist eine Adhäsion von lediglich rund 10 % gegenüber der unbehandelten Vergleichskontrolle zu verzeichnen. Besonders poly(SSS-*co*-AA)-1:1 20kDa, welches mit P-Selectin, E-Selectin und VLA-4 alle drei Adhäsionsmoleküle bindet, präsentiert sich so als potenter Inhibitor, welcher nicht nur den Arrest der Zellen über VLA-4/VCAM-1 unterdrückt, sondern ebenfalls das Potential mitbringt, das durch Selectine vermittelte Zellrollen zu unterbinden. Ebenso bestätigen sich die Beobachtungen, dass Enoxaparin und das Copolymer poly(SPA-*co*-AA)-1:1 20kDa trotz einer fehlenden VLA-4 Bindung die Adhäsion der MV3 Zellen inhibieren. Durch ihre Bindung des P-Selectins bieten auch sie das Potential bereits vor der Ausformung eines festen Arrests das initiale Zellrollen zu unterbinden, und so in einem Synergismus den zuvor am isolierten VCAM-1 detektierten Effekt zu potenzieren.

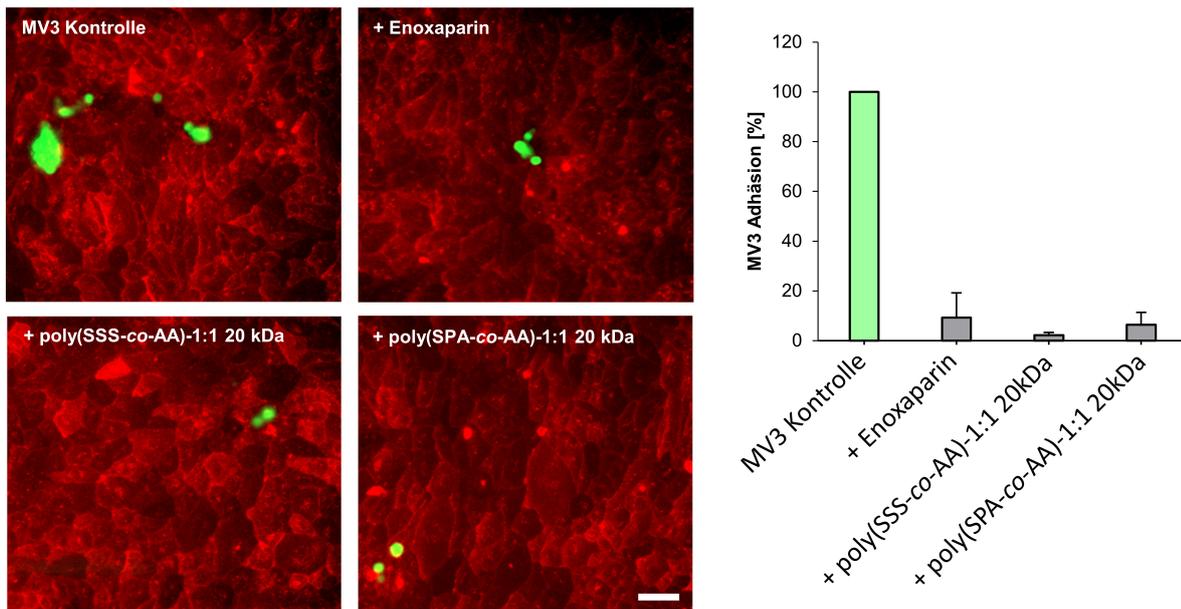


Abbildung 35: Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen der Adhäsion  $Mn^{2+}$ -aktivierter, GFP-markierter MV3 Zellen (grün) an aktiviertem, CD31-markiertem Endothel (rot) sowie die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen der adhärenen Zellen unter Einfluss selektierter Inhibitoren. Zur Normalisierung dienten unbehandelte MV3 Melanomzellen. (N=3)

### 5.2.7 Blockade der prometastatischen Heparanase-Aktivität

Als ein wichtiges Enzym ist die Heparanase in den Prozess der Metastasierung und der Tumorprogression involviert. Eine Adressierung durch Heparine stellt somit einen weiteren Interferenzpunkt dar, der zur potentiellen antimetastatischen Aktivität der Heparine beitragen kann und ebenso wie die Blockade der Adhäsionssysteme mit der Extravasation und Kolonisation metastasierender Zellen assoziiert wird. Im Zuge des internationalen Kooperationsprojektes, dessen Teil diese Arbeit ist, wurde durch die Arbeitsgruppe von Prof. Jin-ping Li an der Universität Uppsala die Inhibition der Heparanase durch die synthetischen Polymere bestimmt. Dazu nutzten sie einen *homogeneous time resolved fluorescence* (HTRF) Assay und verglichen die inhibitorische Kapazität der Polymere mit Enoxaparin und dem Heparanase-Inhibitor PG545 (Pixatimod) [413]. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 36 dargestellt.

Übereinstimmend mit der Literatur (vgl. Abschnitt 2.7.2), zeigt das niedermolekulare Heparin Enoxaparin einen inhibitorischen Effekt gegenüber der Heparanase, sodass ein  $IC_{50}$  Wert von 367,6 nM bestimmt werden kann. Entsprechend den Erwartungen zeigt der klinisch getestete Heparanase-Inhibitor PG545 eine gesteigerte Potenz mit einem  $IC_{50}$  Wert von 187,3 nM. Der Blick auf die Heparin-mimetischen Polymere offenbart, dass alle getesteten Heparin-Mimetika eine potente Inhibition der Heparanase vermitteln. Mit  $IC_{50}$  Werten im Bereich von 19,6 bis 26,6 nM besitzen sie eine untereinander vergleichbare

Aktivität, welche jedoch die des Enoxaparins und des Heparanase-Inhibitors PG545 deutlich übersteigt. Somit kann die Hemmung der Heparanase als Beitrag zu einer potentiellen antimetastatischen Wirkung der Heparine und Heparin-Mimetika postuliert werden, welcher in zukünftigen *in-vivo* Experimenten am Mausmodell weiterer Bestätigung bedarf.

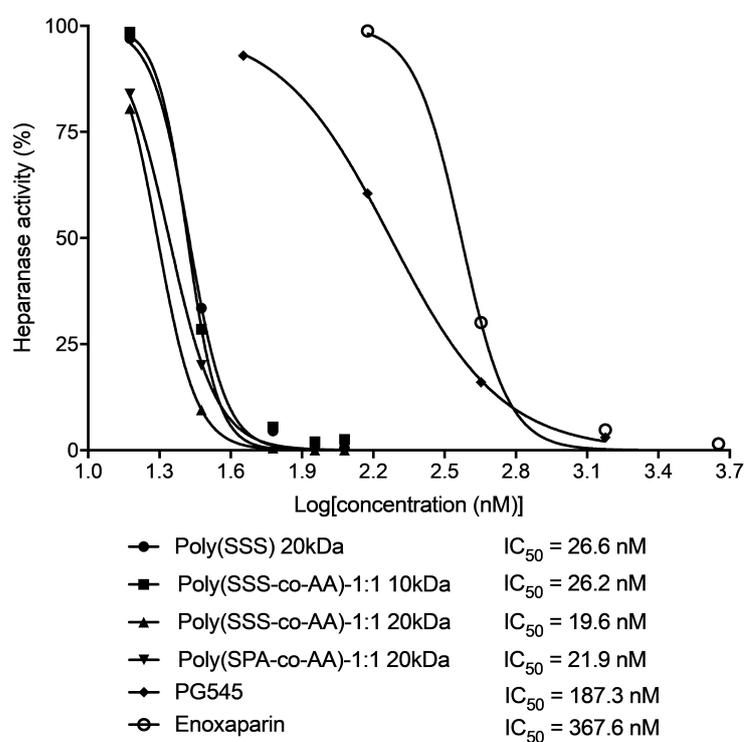


Abbildung 36: Dargestellt sind die Konzentrations-Inhibitions-Kurven sowie die bestimmten IC<sub>50</sub> Werte der Heparanase-Inhibition für die untersuchten Polymere und die Referenzen Enoxaparin und PG545

### 5.2.8 Zwischenfazit antiadhäsive Eigenschaften

Zusammenfassend lässt sich folgern, dass die Heparin-mimetischen Polymere, welche den SSS-Baustein enthalten, in besonderem Maße zur Bindung der drei untersuchten Adhäsionsmoleküle P-Selectin, E-Selectin und VLA-4 befähigt sind. Ähnlich verhält sich UFH, wobei es eine potentere Bindung zu P-Selectin aufweist, jedoch E-Selectin und VLA-4 schwächer bindet. Die inhibitorische Kapazität der Heparine bzw. deren Mimetika durch die Bindung und Blockade der Adhäsionsmoleküle finden in der Unterdrückung der MV3 Zelladhäsion am isolierten VCAM-1 und dem artifiziellen Endothelmonolayer Bestätigung. Mit Blick auf Enoxaparin und poly(SPA-co-AA)-1:1 20kDa lässt sich lediglich eine Bindungsaffinität gegenüber P-Selectin nachweisen. In den Adhäsionsuntersuchungen entfalteten sie jedoch ihren potenten inhibitorischen Effekt, welcher sich allerdings nicht eindeutig auf die Bindung des VLA-4 zurückführen lässt. Den Erwartungen entsprechend, konnte keine Bindung der Adhäsionsmoleküle durch Fondaparinux verzeichnet werden, was sich ebenso in der Abwesenheit einer Unterdrückung der Zelladhäsion an isoliertem VCAM-1 widerspiegelt.

Mit Blick auf die Blockade des metastasierungsassoziierten Enzyms Heparanase präsentieren sich die hier untersuchten Heparin-Mimetika als potente Inhibitoren und übertreffen sowohl das LMWH Enoxaparin als auch den klinisch getesteten Heparanase-Inhibitor PG545.

Schlussfolgern lässt sich, dass die untersuchten Substanzen durch die Bindung und Blockade der Adhäsionsmoleküle bzw. im Falle von Enoxaparin und poly(SPA-co-AA)-1:1 20kDa durch teils unbekannte Mechanismen in der Lage sind den Tumorzellarrest in einer *in-vitro* Umgebung zu unterdrücken. Folglich stellen die Interferenz mit der Tumorzelladhäsion und die Blockade der prometastatischen Heparanase Eingriffspunkte in die hämatogene Metastasierung dar, welche zu einem potentiellen antimetastatischen Effekt des Einsatzes der Heparine beitragen können. Beide Interferenzpunkte werden gleichermaßen bzw. teils effektiver durch die Heparin-Mimetika angesprochen. Mit Blick auf die strukturellen Anforderungen einer Blockade des P-Selectins scheint die reine Präsenz einer negativen Ladung des Moleküls und eine minimale Größe von 10 kDa ausreichend. Hingegen erfordert die Blockade von E-Selectin und VLA-4 weitere strukturelle Voraussetzungen. So ist die reine Präsenz der negativen Ladung nicht mehr ausreichend und scheint an eine molekulare Mindestgröße oder die entsprechende Verteilung bzw. die Präsenz eines aromatischen  $\pi$ -Elektronen-Systems gekoppelt zu sein.

### **5.3 Immunmodulatorische Eigenschaften Tumorzell-induzierter Thrombozyten-Releasates und der Einfluss durch Heparine/Heparin-Mimetika**

Wie eingehend in den Abschnitten 2.5.2 und 2.6 dieser Arbeit erläutert, rücken Thrombozyten zunehmend als immunkompetente Zellen in den Fokus der Forschung und Entwicklung. Zur Abschätzung eines pro- bzw. antimetastatischen Potentials der Thrombozyten und ihrer Tumorzell-induzierten Releasates werden verschiedene zelluläre Komponenten des angeborenen und adaptiven Immunsystems nach einer Koinkubation untersucht. Im Fokus der Untersuchung steht dabei die Beeinflussung der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie die Aktivität natürlicher Killerzellen. Darüber hinaus wird das Potential der kommerziellen Antikoagulantien und Heparin-mimetischen Polymere bestimmt, durch die Interferenz in der Tumorzell-/Thrombozyten Kommunikation, die immunmodulatorische Kapazität der Releasates therapeutisch zu beeinflussen.

#### **5.3.1 Thrombozyten verstärkte Sekretion des immunsuppressiven IL-10 aus PBMCs**

Eine initiale Abschätzung der Beeinflussung des Immunsystems erfolgte durch die Inkubation antikörperstimulierter PBMCs mit Thrombozyten bzw. mit Tumorzell-induzierten Thrombozyten-Releasates. Da nach aktuellem Wissensstand IL-2 nicht durch aktivierte Thrombozyten freigesetzt wird, wurde ebenfalls der Einfluss einer externen Zugabe dieses essentiellen T-Zell Wachstumsfaktors bestimmt. Als Marker der Immunmodulation wurde die Freisetzung des immunsuppressiven IL-10 nach variierenden Stimuli mittels eines ELISA quantifiziert. Die Ergebnisse der IL-10 Konzentrationsbestimmungen sind in Abbildung 37 dargestellt.

Anhand der Abbildung 37 a lässt sich erkennen, dass weder Thrombozyten (Plts) bzw. PBMCs alleine, noch die Kombination beider eine erhöhte Menge des IL-10 freisetzt. Da die Adressierung des TCR essentiell für die Aktivierung der T-Zellen ist, kann erst nach der Behandlung der PBMCs mit CD3/CD28/CD2 stimulierenden Antikörpern eine leicht gesteigerte Freisetzung von IL-10 verzeichnet werden. Die externe IL-2 Zugabe beeinflusste diese Behandlung jedoch nicht. Eine deutliche Steigerung der IL-10 Freisetzung gegenüber der reinen Antikörperstimulation (423 pg/mL) erbringt die kombinierte Koinkubation mit stimulierenden Antikörpern und Thrombozyten (1125 pg/mL). Eine Tendenz zur weiteren Steigerung auf 1430 pg/mL zeigt hier die Zugabe von IL-2, erreicht jedoch keine Signifikanz.

Bei Betrachtung der IL-10 Freisetzung nach einer Inkubation mit Tumorzell-induzierten Thrombozyten-Releasates (Abbildung 37 b) zeigen sich ähnliche Effekt. Eine basale Freisetzung konnte jedoch für PBMCs und deren Behandlung mit Releasates nicht detektiert

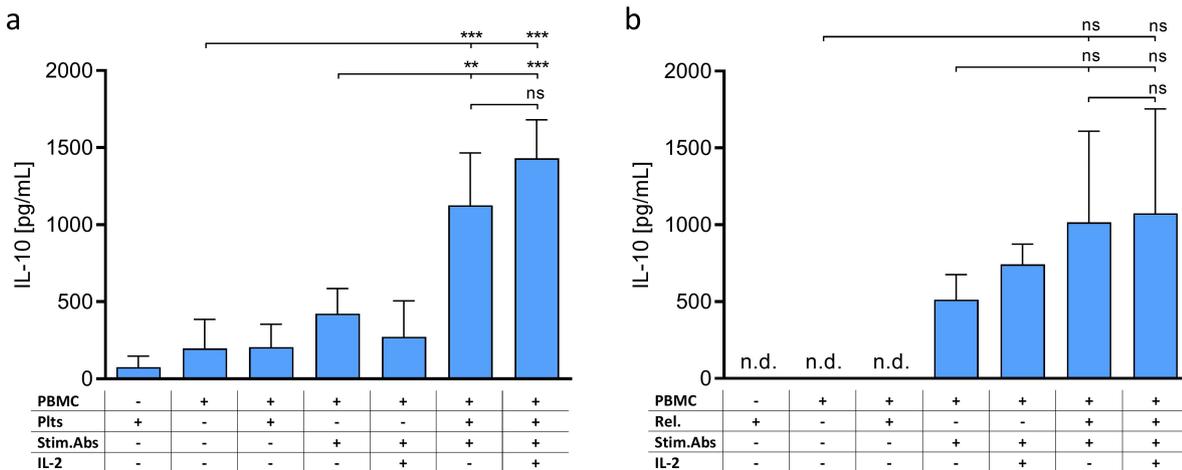


Abbildung 37: Dargestellt sind die IL-10 Konzentrationen in Überständen unterschiedlich inkubierter PBMCs. Die Behandlung erfolgte entweder durch ganze Thrombozyten (a) oder durch Tumorzell-induzierte Thrombozyten-Releasates (b). Die Daten repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen. N=3. Die Signifikanz wurde mittels einer One-Way ANOVA und eines Tukey Post-hoc Tests bestimmt. n.d.: nicht detektierbar; ns: nicht signifikant; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$

werden. Übereinstimmend konnte auch hier erst die Antikörperstimulation eine vermehrte Freisetzung des IL-10 induzieren. Entgegen der vorherigen Beobachtung erbrachte der Zusatz von IL-2 eine leichte Steigerung. Die höchsten Effekte werden erneut durch die Inkubation der PMBCs mit stimulierenden Antikörpern, Releasates und IL-2 erreicht. Zwar ist bei Betrachtung der Einzelmessungen eine deutliche Steigerung zu erkennen, aufgrund der Streuung zwischen den Messungen erreichen die freisetzungsteigernden Effekte jedoch keine Signifikanz.

Resümieren lässt sich, dass die alleinige Inkubation der PBMCs mit Thrombozyten oder deren Releasates nicht zu einer Modulation der IL-10 Freisetzung führt. Erst bei der Koinkubation mit aktivierten PBMCs entfalten die Thrombozyten und Thrombozyten-Releasates ihre modulatorische Kapazität und verschieben das Zytokinmilieu durch die Induktion der IL-10 Freisetzung in Richtung einer Immunsuppression. Aufgrund der heterogenen Zellpopulationen innerhalb der PBMCs lässt sich die Veränderung der IL-10 Sekretion nicht der Modulation einer definierten Leukozytenpopulation zuordnen. Zwar stellt IL-10 ein essentielles Effektorprotein regulatorischer T-Zellen dar, es kann jedoch auch aus weiteren Leukozyten sezerniert werden. So zeigten etwa Linke et al., dass thrombozytäres PGE2 eine IL-10 Freisetzung aus Monozyten induzieren kann [414]. Erwähnt sei auch, dass aufgrund der enormen Komplexität der Zusammensetzung der Thrombozyten-Releasates verschiedene Mediatoren diskutiert werden, welche zur Sezernierung des IL-10 aus PBMCs beitragen könnten. Etwa beschreiben Gerdes und Kollegen eine verstärkte Freisetzung des IL-10 aus CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch die Aktivierung mit RANTES oder PF4, jedoch

konnten Liu et al. keine IL-10 Sekretion nach einer Inkubation von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Zellen mit PF4 beobachten [415, 416]. Dies zeigt den Bedarf weiterer, zukünftiger Untersuchungen zur Identifikation potentieller Schlüsselmediatoren auf diesem Gebiet, was jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit ist.

Bezüglich einer externen IL-2 Zugabe lässt sich kein einheitlicher bzw. deutlicher Vorteil feststellen, sodass auf einen weiteren Zusatz von IL-2 in den nachfolgenden Testsystemen verzichtet wird.

### 5.3.2 Beeinflussung der CD4<sup>+</sup> T-Zell Differenzierung zu regulatorischen T-Zellen

IL-10 stellt eines der essentiellen Effektorproteine regulatorischer T-Zellen dar, welche im Kontext eines Krebsleidens eine besondere Rolle in der Unterdrückung des Immunsystems innehaben (vgl. Abschnitte 2.4.1 und 2.5.1). Basierend auf den Daten der IL-10 Freisetzung wurde der Effekt der Thrombozyten und Thrombozyten-Releasates auf die Differenzierung isolierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu regulatorischen T-Zellen bestimmt. Diese wurden in der Durchflusszytometrie als CD25 und FoxP3 doppelpositive CD4<sup>+</sup> T-Zellen definiert. Die Anteile der regulatorischen T-Zellen nach einer Koinkubation der isolierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit Thrombozyten oder Tumorzell-induzierten Thrombozyten-Releasates sind in Abbildung 38 dargestellt.

Anhand der Daten aus Abbildung 38 a und c lässt sich erkennen, dass auch hier die reine Inkubation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit Thrombozyten keinen Einfluss auf die Differenzierung zu regulatorischen T-Zellen entfaltet, und das Basallevel der T<sub>regs</sub> somit unter 0,5 % liegt. Wie bereits zuvor bedarf es der Stimulation durch CD3/CD28/CD2 aktivierende Antikörper um eine T<sub>reg</sub> Differenzierung einzuleiten. Durch die Inkubation mit Thrombozyten kann der Anteil von 8,9 % auf 18,7 % mehr als verdoppelt werden. Dabei scheint es, dass die Präsenz der Thrombozyten selbst zwar die Induktion der T<sub>reg</sub> Differenzierung verstärkt, jedoch nicht essentiell ist, da auch die Behandlung mit Releasates die Differenzierung stimulierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen von 9,0 % signifikant auf 13,2 % steigert. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Experimenten von Gerdes und Kollegen, welche ebenfalls einen T<sub>reg</sub>-differenzierenden Effekt der Thrombozyten zeigen konnten [415]. Mit Blick auf die Förderung des T<sub>reg</sub>-Anteils durch Thrombozyten werden diese Ergebnisse auch durch Rossaint et al. bestätigt. Jedoch konnten sie in ihrer Studie keine Differenzierung regulatorischer T-Zellen und eine damit einhergehende IL-10 Sekretion durch sCD40L aktivierte Thrombozyten-Releasates verzeichnen. Eine Divergenz zwischen den hier präsentierten Daten und den Ausführungen von Rossaint et al. scheint aber vor dem Hintergrund einer möglichen, differenzierten Granula-Sezernierung und der unterschiedlichen, für die Aktivierung der Thrombozyten genutzten Stimuli nicht unplausibel [299].

Um eine Inhibition der T<sub>reg</sub> Differenzierung als funktionelle Konsequenz der Interfe-

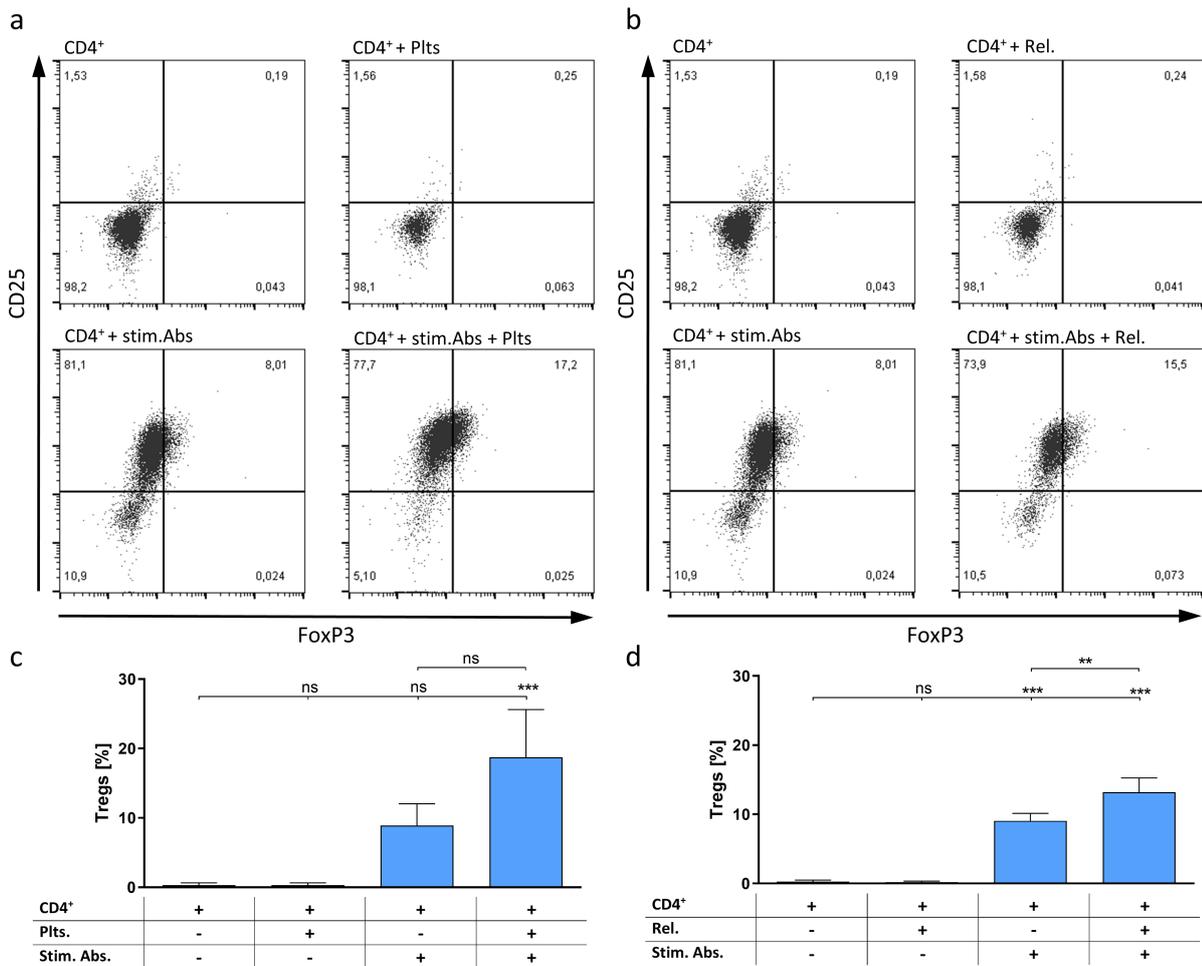


Abbildung 38: Abgebildet sind repräsentative Dotplots der Identifikation regulatorischer T-Zellen als CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> doppelpositive Events unter dem Einfluss von Thrombozyten (a) und Tumorzell-induzierten Thrombozyten-Releasates (b). Die kumulierten Daten sind für Thrombozyten (c) und Releasates (d) als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aufgetragen. N=3. Die Signifikanz wurde mittels einer One-Way ANOVA und einem Tukey Post-hoc Test bestimmt. ns: nicht signifikant; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$

renz kommerzieller Antikoagulantien und Heparin-mimetischer Polymere in der Tumorzell/Thrombozyten Kommunikation zu bestimmen, wurden die entsprechend präparierten Releasates zur Induktion der Differenzierung verwendet. Wie in Abbildung 39 b zu erkennen, vermögen es die Heparine UFH und Enoxaparin die Generierung Tumorzell-induzierter Releasates soweit zurückzudrängen, dass diese ihren stimulierenden Effekt nicht entfalten können. Trotz einer fehlenden Signifikanz der Ergebnisse zeigt sich ein klarer Effekt der Heparine zur Abschwächung der Immunsuppression. Im Gegensatz dazu lässt sich aber erkennen, dass das Pentasaccharid Fondaparinux kaum zur Reduktion der Effekte des Releasates befähigt ist. Die inhibitorische Kapazität des Homopolymers poly(SSS) 20kDa liegt auf einem vergleichbaren Niveau wie das von UFH und Enoxaparin. Eine leicht

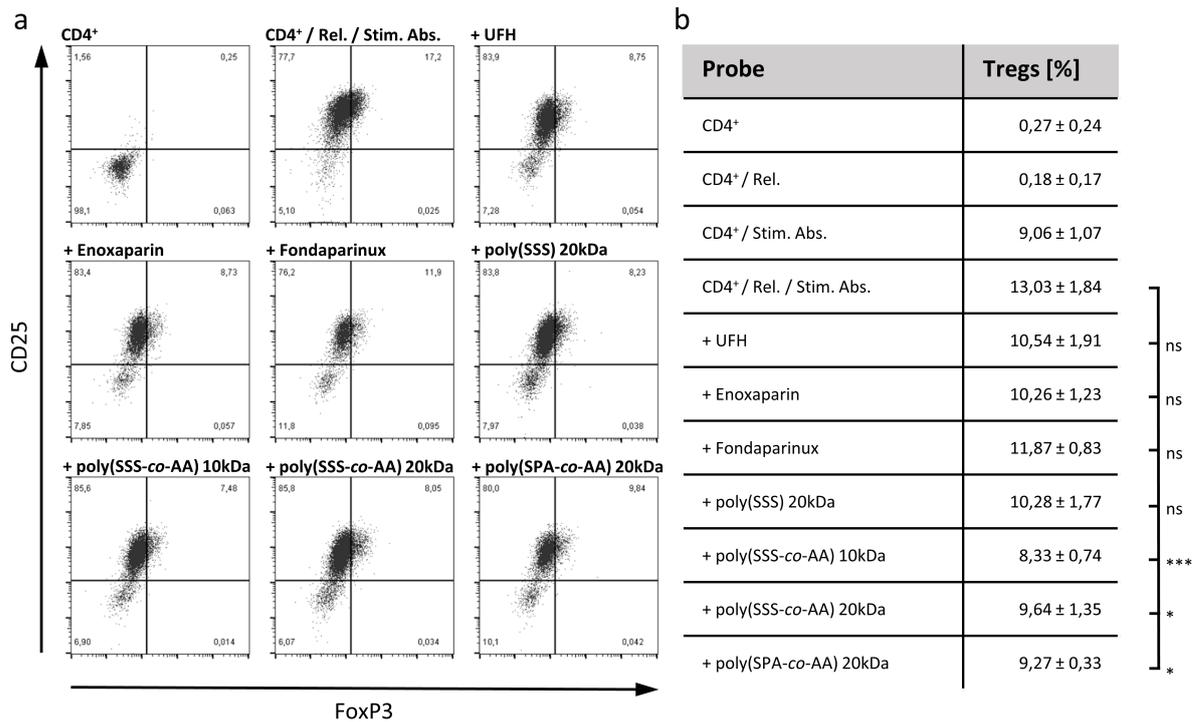


Abbildung 39: Dargestellt sind Einflüsse der unter Präsenz Heparin-mimetischer Polymere bzw. Antikoagulantien hergestellten Thrombozyten-Releasates auf die T<sub>reg</sub>-Anteile in isolierten CD4<sup>+</sup> T-Zellkulturen. Gezeigt sind repräsentative Dotplots zur Identifikation regulatorischer T-Zellen anhand der Marker CD25 und FoxP3 (a) sowie die Mittelwerte ± Standardabweichungen (b). N=3. Die Signifikanzen wurden mittels der One-Way ANOVA und eines Dunnett Post-hoc Tests bestimmt. ns: nicht signifikant; \*: p<0,05; \*\*\*: p<0,001

stärkere Reduktion des Releasate-Effektes durch die poly(SSS-co-AA)-1:1 Copolymere in den Größen 10 kDa und 20 kDa führt zu einer Signifikanz der Ergebnisse. Interessanterweise zeigt auch das Heparin-Mimetikum poly(SPA-co-AA)-1:1 20kDa eine signifikante Reduktion des T<sub>reg</sub>-Anteils an der CD4<sup>+</sup> Zellkultur, obwohl seine inhibitorische Kapazität in den initialen Untersuchungen zur Aktivierung der Thrombozyten kaum ausgeprägt war. Aufgrund der nicht klar definierten Mediatoren des Effektes der Tumorzell-induzierten Thrombozyten-Releasates und der starken negativen Ladung der Heparine bzw. Heparin-Mimetika ist es denkbar, dass sie auch bei einer Freisetzung der relevanten Mediatoren wie etwa RANTES, diese in Manier eines *scavengers* binden und ihrer funktionellen Aktivität berauben. Diese These bedarf einer nähergehenden Untersuchung in künftigen Arbeiten.

### 5.3.3 Diametrale Effekte auf die Aktivität zytotoxischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen

CD8<sup>+</sup> T-Zellen stellen die Hauptkomponente der antitumoralen Antwort des adaptiven Immunsystems dar und nehmen so maßgeblich Einfluss auf den Verlauf einer malignen Erkrankung. Um die Auswirkungen einer Interaktion mit Thrombozyten bzw. deren Re-

leasates zu evaluieren, wurde die Aktivität der CD8<sup>+</sup> T-Zellen anhand der Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD69 auf der Zelloberfläche bestimmt.

Die Ergebnisse des initialen Versuchs, aktivierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen als CD25<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> doppelpositive Zellen zu definieren, sind in Abbildung 40 dargestellt. Deutlich zu erkennen ist, dass mit einem Anteil von etwa 1 % kaum aktivierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen in einer unstimulierten Zellkultur präsent sind. Wie bereits bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen detektiert, wird dies nicht durch die alleinige Zugabe von Thrombozyten bzw. den Tumorzell-induzierten Thrombozyten-Releasates beeinflusst. Eine Stimulation mit den T-Zell-aktivierenden Antikörpern hingegen führt erwartungsgemäß zu einem starken Anstieg der doppelpositiven Zellen auf einen Anteil von 27 %. Weder die Inkubation der antikörperstimulierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit Thrombozyten (29 %) noch mit den Tumorzell-induzierten Releasates (27 %) beeinflusst die Aktivierung der untersuchten Zellkulturen. Dementsprechend zeigt auch die Verwendung der unter Einfluss der Antikoagulantien bzw. Mimetika hergestellten Releasates kaum differenzierbare Effekte.

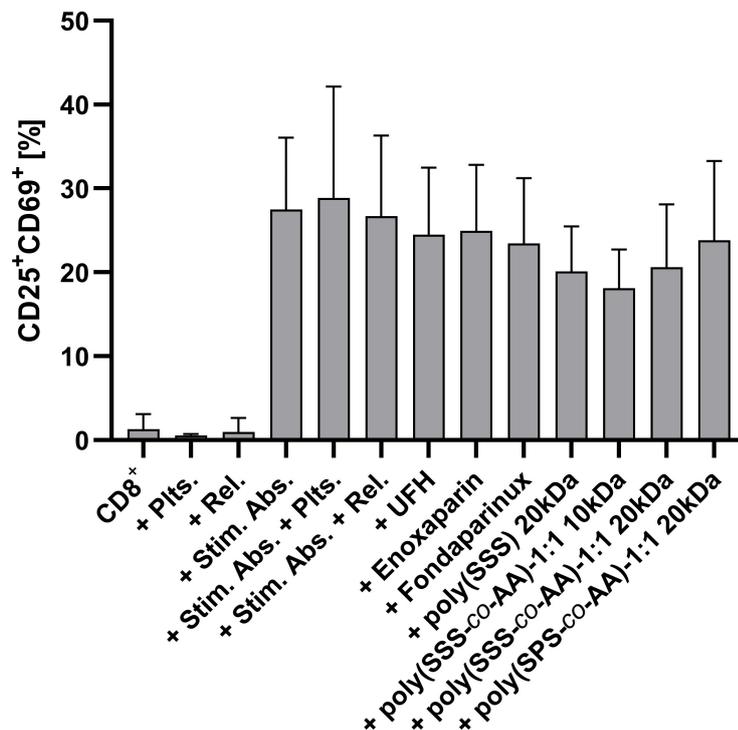


Abbildung 40: Dargestellt ist der Anteil CD25 und CD69 doppelpositiver CD8<sup>+</sup> T-Zellen in isolierten Zellkulturen nach der Aktivierung mit stimulierenden Antikörpern und einer Koinkubation mit Thrombozyten bzw. den entsprechenden Releasates. Die Daten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen dreier unabhängiger Versuchswiederholungen (N=3)

Bei einer nähergehenden Betrachtung der Daten zur Identifikation der doppelpositiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen zeigte sich aber, dass innerhalb der Dotplots ein deutlicher Anstieg CD25 positiver Zellen erkennbar ist (vgl. Abbildung 41). Aufgrund dessen wurden die

Daten anhand der in Abschnitt 4.13.2 beschriebenen Gating-Strategie analysiert, um die Expression von CD25 und CD69 separiert zu betrachten und ein differenzierteres Bild der CD8<sup>+</sup> Aktivierung zu erlangen. Die Ergebnisse der differenzierten Betrachtung der CD25 und CD69 Expression sind in den Abbildungen 42 und 43 dargestellt.

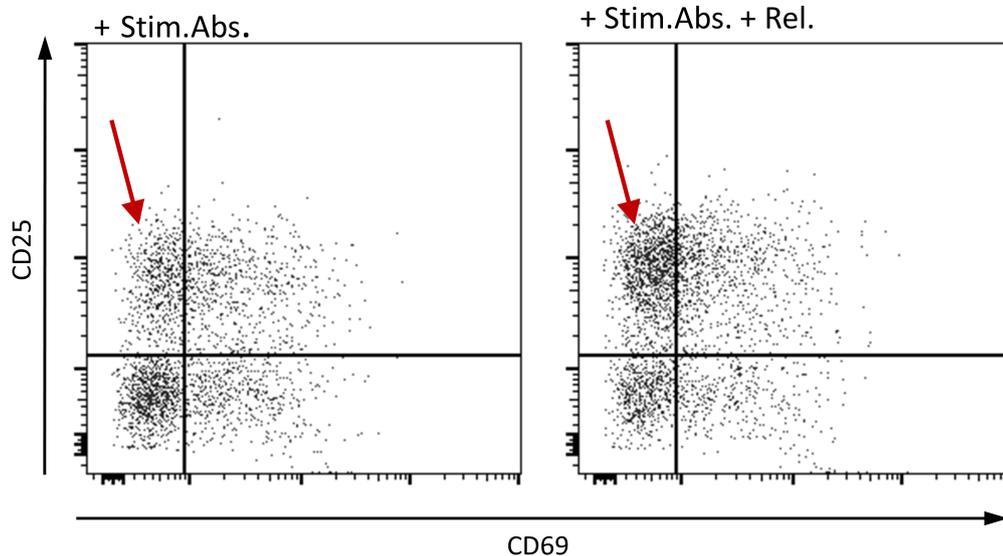


Abbildung 41: Repräsentative Darstellung der Dotplots zur Identifikation CD25<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> CTL, welche die Zunahme des Anteils CD25 positiver Zellen veranschaulichen

Wie in Abbildung 42 c zu erkennen, ist auch bei einer separaten Analyse der beiden Aktivierungsmarker CD25 und CD69 keine signifikante Steigerung der Expression durch die alleinige Koinkubation mit Thrombozyten detektierbar. Ein signifikanter Anstieg ist nach einer Aktivierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellkultur mit den stimulierenden Antikörpern zu beobachten und resultiert in einem Anteil von 46 % positiven Zellen für CD25 und 44 % für CD69. Durch die gleichzeitige Inkubation mit Thrombozyten kann bei der differenzierten Betrachtung der Aktivierungsmarker ein signifikanter Anstieg der CD25 Expression auf 75 % verzeichnet werden, wohingegen der Anteil CD69 positiver Zellen nicht signifikant auf 36 % reduziert wird. Ein sehr ähnliches Bild ergibt sich für die Inkubation mit Tumorzell-induzierten Thrombozyten-Releasates mit leicht abweichenden Anteilen von 65 % für CD25 bzw. 35 % für CD69. Somit scheint es, dass es zu einer gegenläufigen Beeinflussung der beiden Aktivierungsmarker kommt.

Bei Betrachtung der Einflüsse der verschiedenen Releasates in Abbildung 43 zeigt sich, dass keines der kommerziellen Antikoagulantien einen Einfluss auf die durch Tumorzell-induzierte Releasates vermittelte Modulation der CD25 Expression nimmt. Lediglich für die Heparin-mimetischen Polymere, welche das SSS-Monomer enthalten, kann eine Tendenz einer Inhibition des Releasate-vermittelten Effektes verzeichnet werden. Die einzige, moderat signifikante Reduktion der CD25 Expression wird durch den Einsatz

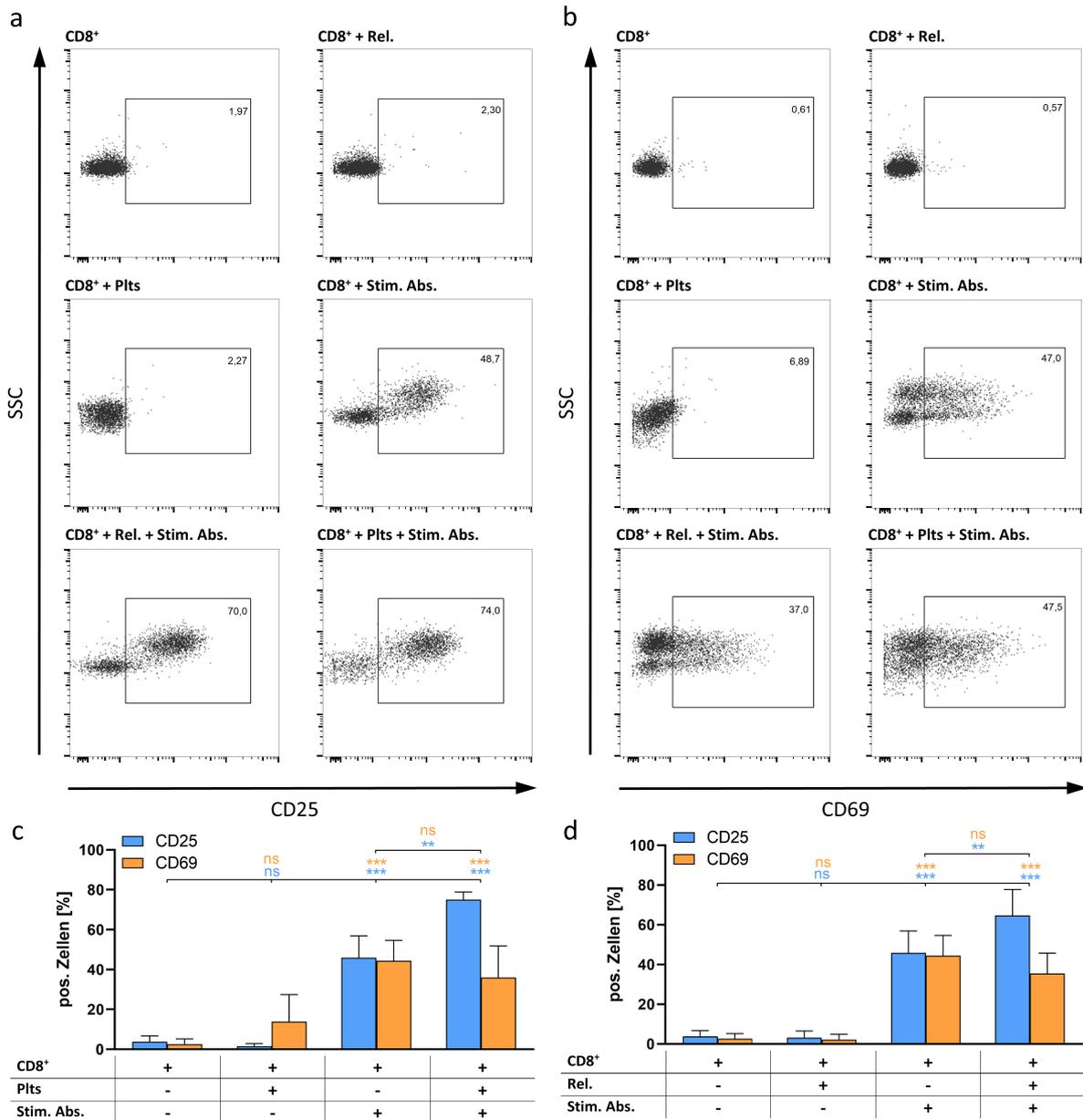


Abbildung 42: Gezeigt sind repräsentative Dotplots der Anteile CD25 (a) und CD69 (b) positiver Zellen. Die kumulierten Daten aus drei unabhängigen Experimenten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung für die Inkubation mit Thrombozyten (c) und Thrombozyten-Releasates (d) angegeben. Die Signifikanz wurde mittels einer Two-Way ANOVA und eines Tukey Post-hoc Test bestimmt. ns: nicht signifikant; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$

von poly(SSS-co-AA)-1:1 in der Größe von 10 kDa erreicht. Hinsichtlich des frühen Aktivierungsmarkers CD69 bestätigt sich die geminderte Expression unter dem Einfluss der Tumorzell-induzierten Thrombozyten-Releasates. Allerdings kann hier durch keine der untersuchten Testsubstanzen eine Verminderung des Releasate-vermittelten Effektes verzeichnet werden. Entsprechend lässt sich auf der Grundlage der durchflusszytometrischen

Untersuchungen keine klare Aussage treffen, ob Thrombozyten bzw. deren Releasates einen aktivierenden oder leicht inhibierenden Charakter gegenüber den CD8<sup>+</sup> T-Zellen besitzen.

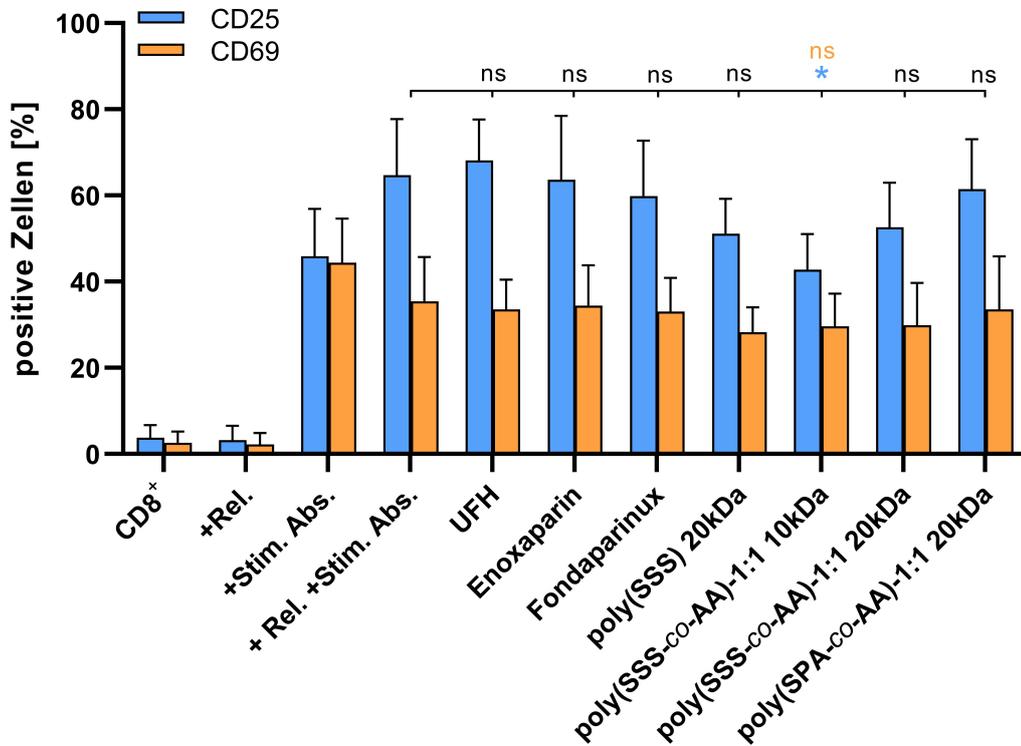


Abbildung 43: Illustriert sind die prozentualen Anteile CD25 bzw. CD69 exprimierender CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach einer Inkubation mit den unter Einfluss von Antikoagulantien bzw. Heparin-Mimetika hergestellten Releasates. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen dreier unabhängiger Versuche (N=3). Die Signifikanz der Ergebnisse wurde mittels einer One-Way ANOVA mit nachfolgendem Dunnett Post-hoc Test bestimmt. ns: nicht signifikant; \*: p<0,05

Als eine Möglichkeit zur Erklärung der gegensätzlichen Verhaltensweisen der beiden Aktivierungsmarker wurden die unterschiedlichen Expressionskinetiken in Betracht gezogen. Dabei wird CD69 generell als ein früher Aktivierungsmarker angesehen [417]. Zur Einordnung dieser Möglichkeit wurden CD8<sup>+</sup> T-Zellen 24 h, 48 h und 96 h nach der initialen Aktivierung der Zellen untersucht, wobei der Zeitpunkt der 96 h entsprechend 48 h nach der zweiten Thrombozyten- bzw. Releasatezugabe lag. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abbildung 44 dargestellt.

Wie anhand der Abbildungen 44 a und b zu erkennen ist, kann bei nicht mit Antikörpern stimulierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen lediglich für die 24 h Probe der Releasates und die 96 h Probe der Thrombozyten eine CD25 bzw. CD69 Expression registriert werden. Aufgrund der umliegenden Expressionswerte dieser Proben erscheint aber eine Messabweichung als Ursache des erhöhten Signals eher plausibel. Bei Betrachtung der Proben stimulierter CD8<sup>+</sup> T-Zellen zeigt sich, dass sowohl Thrombozyten als auch Tumorzell-induzierte

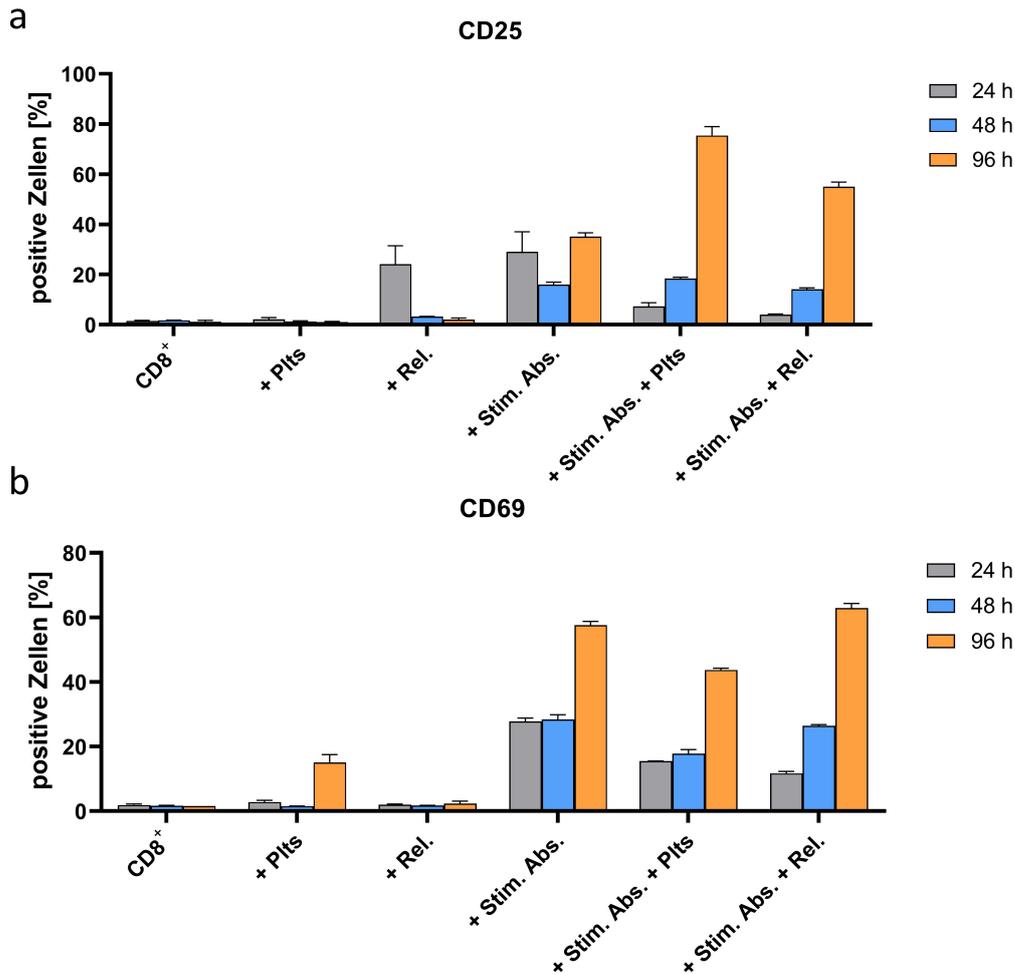


Abbildung 44: Dargestellt ist die Untersuchung der CD25 (a) und CD69 (b) Expression nach Antikörperstimulation und Inkubation mit Thrombozyten bzw. Thrombozyten-Releasates an den Zeitpunkten 24 h, 48 h und 96 h nach der initialen Aktivierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen. N=1

Thrombozyten-Releasates die frühe Expression der Marker nach 24 h inhibieren. Diese Inhibition scheint 48 h nach der Aktivierung langsam nachzulassen. Bei der CD25 Expression (Abbildung 44 a) führt die zweite Zugabe der Thrombozyten bzw. Releasates zu einem starken Anstieg der CD25 Expression. Während eine zweite Zugabe der Thrombozyten die CD69 Expression antikörperstimulierter CD8<sup>+</sup> T-Zellen reduziert, bleibt diese durch die Zugabe von Releasates unbeeinflusst, sodass keine eindeutige Modulation verzeichnet werden kann. Da auch nach der zweiten Zugabe des reinen Thrombozyten-Puffers zur + Stim. Abs. Probe eine gesteigerte CD69 Expression detektiert wird, scheint eine, im Vergleich zu CD25 verminderte Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69 nicht durch einen Unterschied in der Expressionskinetik erklärbar. Zusammenfassend ergibt sich auf der Grundlage der durchflusszytometrischen Untersuchungen zur Quantifizierung der membranständigen Aktivierungsmarker kein eindeutiges Bild der CD8<sup>+</sup> T-Zell Modulation

durch Thrombozyten bzw. die Tumorzell-induzierten Thrombozyten-Releasates. Um weitere Einblicke in die Modulation der CTL zu erlangen, wurde mittels einer Multiplex Analyse die Aktivierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen anhand der Sekretion zytolytischer und proinflammatorischer Mediatoren bestimmt. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 45 für Granulysin, Perforin, Granzym B, IFN- $\gamma$ , IL-17A sowie TNF- $\alpha$  dargestellt.

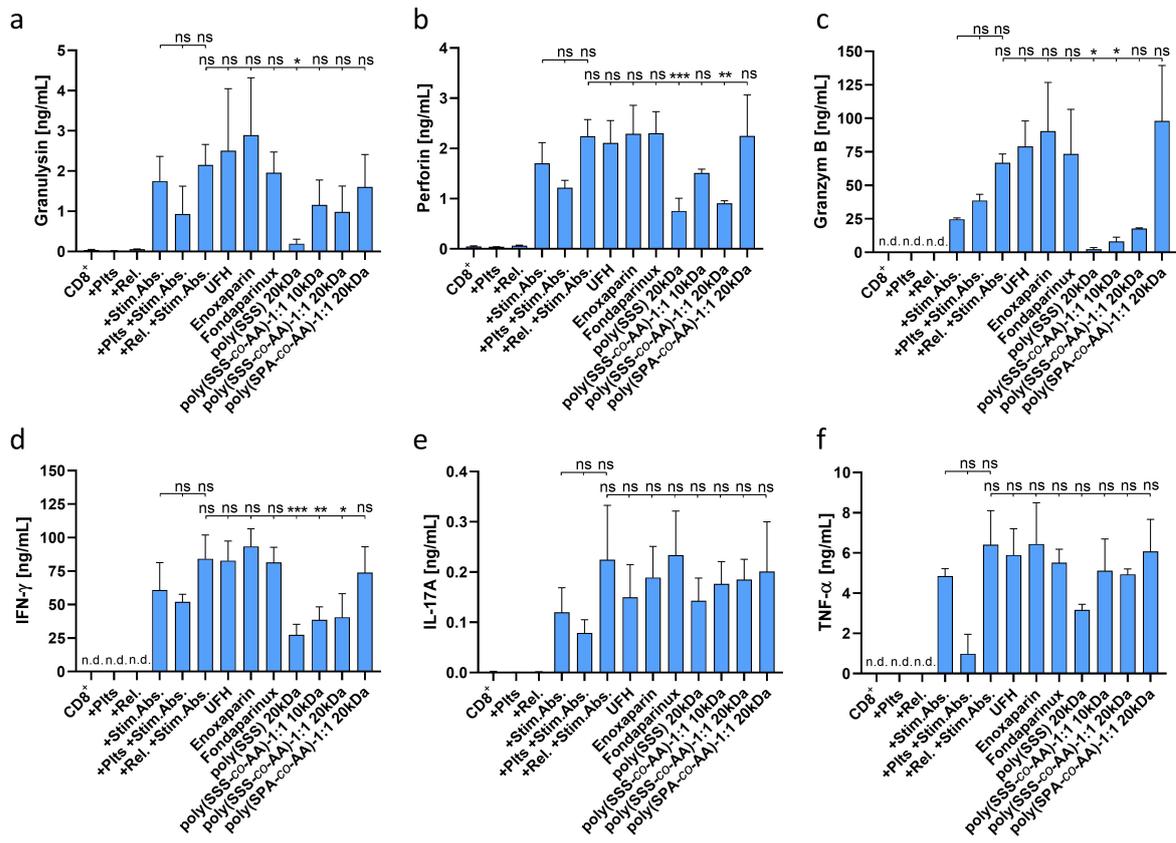


Abbildung 45: Dargestellt sind die Konzentrationen der Zytokine Granulysin (a), Perforin (b), Granzym B (c), IFN- $\gamma$  (d), IL-17A (e) und TNF- $\alpha$  (f) in Überständen der unterschiedlich stimulierten CD8<sup>+</sup> T-Zellkulturen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen für N=3. Die Signifikanz wurde mittels der One-Way ANOVA und eines Dunnett Post-hoc Tests bestimmt. n.d.: nicht detektierbar; ns: nicht signifikant; \*: p<0,05; \*\*: p<0,01; \*\*\*: p<0,001

Grundsätzlich lässt sich ein ähnliches Freisetzungsmuster für alle der sechs untersuchten Mediatoren erkennen. So werden entsprechend der auf den bisherigen Ergebnissen fußenden Erwartung keine bzw. nur marginale Mengen der Mediatoren durch die nicht mit Antikörpern stimulierten Proben sezerniert. Mit Blick auf die Modulation durch Thrombozyten bzw. Releasates werden divergente Effekte ersichtlich. Während in allen Proben, mit Ausnahme des Granzym B, die Koinkubation aktivierter CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit Thrombozyten zur Reduktion der Mediatorfreisetzung tendiert, wird durch den Einsatz der Tumorzell-induzierten Thrombozyten-Releasates eine Verstärkung der Freisetzung vermit-

telt. Die Inaktivität der kommerziellen Antikoagulantien zur Modulation der Expression von CD25 und CD69 spiegelt sich auch in der Freisetzung der zytolytischen und proinflammatorischen Mediatoren wider. Jedoch ist eine abschließende Bewertung aufgrund teils hoher Standardabweichungen erschwert. Ein klareres Bild zeichnet sich bei der Betrachtung der Heparin-mimetischen Polymere ab. Eine deutliche und teils signifikante Reduktion der Mediatorfreisetzung kann durch die SSS-Monomer enthaltenden Polymere bewirkt werden. Hingegen besitzt das nicht-antikoagulatorische Copolymer poly(SPA-co-AA)-1:1 20kDa keinen inhibitorischen Effekt auf die Releasate-vermittelte zytolytische Aktivität der CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Der Vergleich zu Beobachtungen anderer Wissenschaftler verdeutlicht die Komplexität des Einflusses auf die Aktivität der CTL. Elzey et al. sowie Chapman und Kollegen zeigten für Thrombozyten einen unterstützenden Effekt auf die zytolytische Aktivität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen [293, 418]. Hingegen zeigten Guo et al. im Modell einer Sepsis, dass Thrombozyten über MHC-I die Aktivität von CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten vermindern [419]. Des Weiteren konnte in aktuellen Studien gezeigt werden, dass PD-L1<sup>+</sup> Thrombozyten an der Regulation intratumoraler CD8<sup>+</sup> T-Zellen beteiligt sein und als prognostischer Marker dienen können [269, 420]. Auch die hier präsentierten, divergenten Daten zu den Effekten der Thrombozyten bzw. deren Releasates verdeutlichen, dass die Thrombozyten/CD8<sup>+</sup> T-Zell Interaktion von vielen Einflussfaktoren, wie etwa der Präsenz der Thrombozytenmembran oder den pathophysiologischen Umständen getragen wird. Eine generelle Definition des modulierenden Effektes scheint somit nahezu unmöglich.

#### **5.3.4 Beeinflussung der zytolytischen Kapazität natürlicher Killerzellen**

Da auf Grundlage der erhobenen Daten zur zytolytischen Aktivität der CD8<sup>+</sup> T-Zellen kein klarer Effekt ableitbar war, sollen in den folgenden Versuchen auch die Effekte auf natürliche Killerzellen einbezogen werden. Als zytolytische Komponente der angeborenen Immunabwehr sind natürliche Killerzellen essentiell in der Erkennung und Elimination maligner Zellen. Wie bereits in Abschnitt 2.6.2 beschrieben, kann die Aktivität der NK-Zellen über eine Reihe verschiedener Mechanismen durch Thrombozyten beeinflusst werden. Um den Einfluss der immunmodulierenden Eigenschaft der Tumorzell-induzierten Releasates in An- bzw. Abwesenheit der Antikoagulantien und Heparin-Mimetika zu evaluieren, wurden PBMCs mit den entsprechenden Releasates präinkubiert und anschließend hinsichtlich ihrer Fähigkeit zum Angriff gegen Tumorzellen untersucht. Durch die Verwendung der spezifisch durch NK-Zellen attackierten Zelllinie K562 konnte der Einfluss auf die zytolytische Kapazität der natürlichen Killerzellen bestimmt werden. Die Ergebnisse eines ersten Vorversuchs sind in Abbildung 46 dargestellt.

Entsprechend den Erwartungen lässt die Zytolyse mit sinkendem Gehalt an PBMCs im E:T Verhältnis nach. Auch die Kontrollen zur Bestimmung der maximalen Zytolyse (50:1 + IL2)

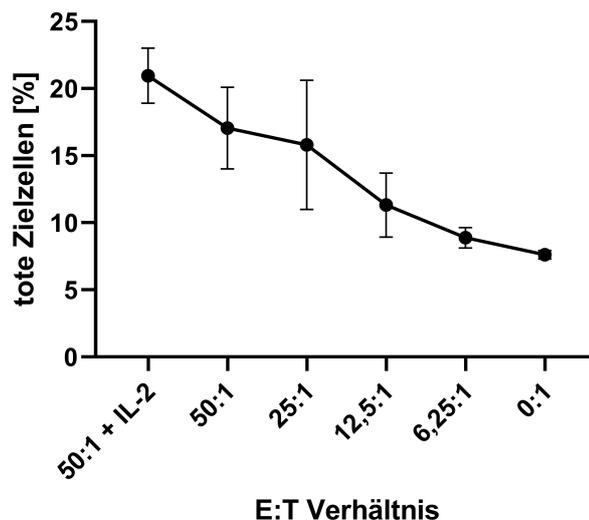


Abbildung 46: Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Anteile durch PBMCs abgetöteter Zielzellen aus zwei unabhängigen Versuchen. Zur Überprüfung der Funktionalität des Assaysystems wurden unterschiedliche E:T Verhältnisse sowie die Positivkontrolle IL-2 aktivierter PBMCs und die Negativkontrolle reiner K562 Zielzellen vermessen

und des basalen Anteils toter K562 Zielzellen (0:1) liegen in plausiblen Bereichen. Das Messsystem kann somit als valide betrachtet werden und kann entsprechend den Angaben in Abschnitt 4.13.3 zur Bestimmung des Einflusses der Thrombozyten-Releasates auf die zytolytische Aktivität der PBMCs und somit der NK-Zellen gegenüber den untersuchten Tumorzellen verwendet werden. Diese Einflüsse der Tumorzell-induzierten Thrombozyten Releasates sind in Abbildung 47 dargestellt.

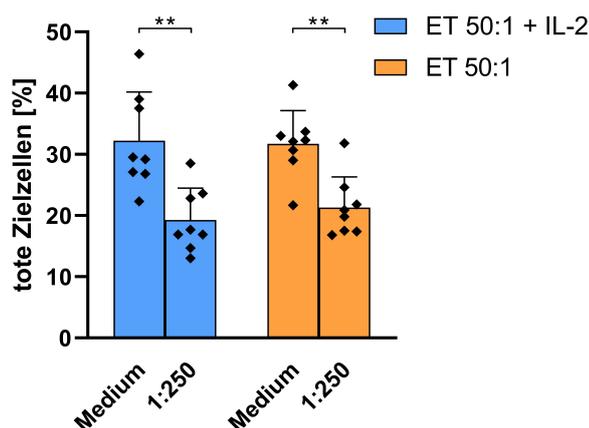


Abbildung 47: Gezeigt ist die Hemmung der zytolytischen Aktivität natürlicher Killerzellen durch die Inkubation mit Thrombozyten-Releasates in An- bzw. Abwesenheit des stimulierenden Zytokins IL-2. Die Daten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus N=8 Versuchen. Die Signifikanzen wurden mittels eines ungepaarten t-Tests bestimmt. \*\*:  $p < 0,01$

Eine Präinkubation der PBMCs mit Thrombozyten-Releasates, die einem PBMC zu Thrombozyten Verhältnis von 1:250 entsprechen, führt zu einer signifikanten Reduktion der zytolytischen Kapazität. So werden IL-2 stimulierte PBMCs in ihrer Aktivität von 32 % auf 19 % reduziert, während die Inkubation ohne IL-2 zur Reduktion von 32 % auf 21 % führt. Entgegen dem initialen Vorversuch führte die zusätzliche Inkubation mit IL-2 nicht zu einer merklichen Steigerung der zytolytischen Aktivität, sodass diese in den folgenden Untersuchungen zur inhibitorischen Kapazität der kommerziellen Antikoagulantien und der synthetischen Heparin-Mimetika nicht berücksichtigt wurde. Die Ergebnisse der Modulationen des Releasate Effektes durch die untersuchten Inhibitoren sind in Abbildung 48 gezeigt.

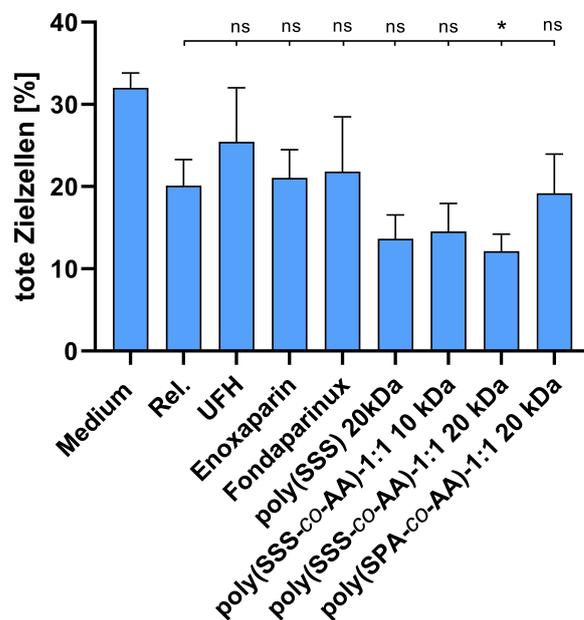


Abbildung 48: Dargestellt ist der Einfluss der Antikoagulantien und Heparin-Mimetika auf die Hemmung der zytolytischen Aktivität der NK-Zellen durch Thrombozyten-Releasates. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen für fünf unabhängige Versuchswiederholungen (N=5). Die Signifikanz wurde mittels einer One-Way ANOVA und eines Dunnett Post-hoc Tests analysiert. ns: nicht signifikant; \*:  $p < 0,05$

Unter den kommerziellen Antikoagulantien lässt sich lediglich für UFH eine Tendenz zur Inhibition des Releasate Effektes erkennen, welcher jedoch keine Signifikanz erreicht. Aktivitäten des LMWH Enoxaparin und des FXa-Inhibitors Fondaparinux zeigen sich nicht. Eine Besonderheit lässt sich bei Betrachtung der Heparin-mimetischen Polymere erkennen. Wie bereits in vielen der zuvor untersuchten Testsysteme kann auch mit Sicht auf die zytolytische Aktivität der NK-Zellen kein Effekt des Copolymers poly(SPA-co-AA)-1:1 20kDa erfasst werden. Entgegen der auf den bisherigen Beobachtungen beruhenden Erwartung zeigten die SSS enthaltenden Polymere eine scheinbare Verstärkung

der Releasate-vermittelten Hemmung und reduzierten die zytolytische Aktivität auf 14,5 bis 12,2%. Da diese Polymere jedoch die Ausschüttung thrombozytärer Mediatoren als Konsequenz einer Thrombozytenaktivierung unterbinden, scheint es unwahrscheinlich, dass sie, wie für die Bindung von TGF- $\beta$  durch UFH beschrieben, die funktionelle Aktivität der Mediatorstoffe steigern [421]. Somit scheint die plausibelste Erklärung dieser Effekte eine intrinsische Kapazität der Copolymere zur Hemmung der zytolytischen Aktivität der NK-Zellen zu sein, welche in zukünftigen Versuchen adressiert werden muss. Als potentielle Mechanismen dieser Hemmung sollten die Bindung und Alternierung der funktionellen Aktivität von thrombozytären Mediatoren oder die sterische Hinderung der Ausformung einer zytolytischen Synapse durch die Heparin-Mimetika in Betracht gezogen werden. Die Integrität des Testsystems wurde anhand der mitgeführten Kontrollen, die in Abbildung 49 illustriert sind, bestätigt. Entsprechend den Angaben nach Kandarian et al. liegen die Anteile toter Zellen in der unbehandelten Zielzellpopulation unter 15% und in reinen PBMCs unter 5%. Des Weiteren zeigen PBMCs als Effektorzellen keine positiven Ereignisse für CFSE, sodass eine sichere Identifikation der K562 Zielzellen gewährleistet ist. Die Effektivität der Färbung toter Zellen mit 7-AAD kann anhand der durch Tween-20 getöteten Zielzellen bestätigt werden [422].

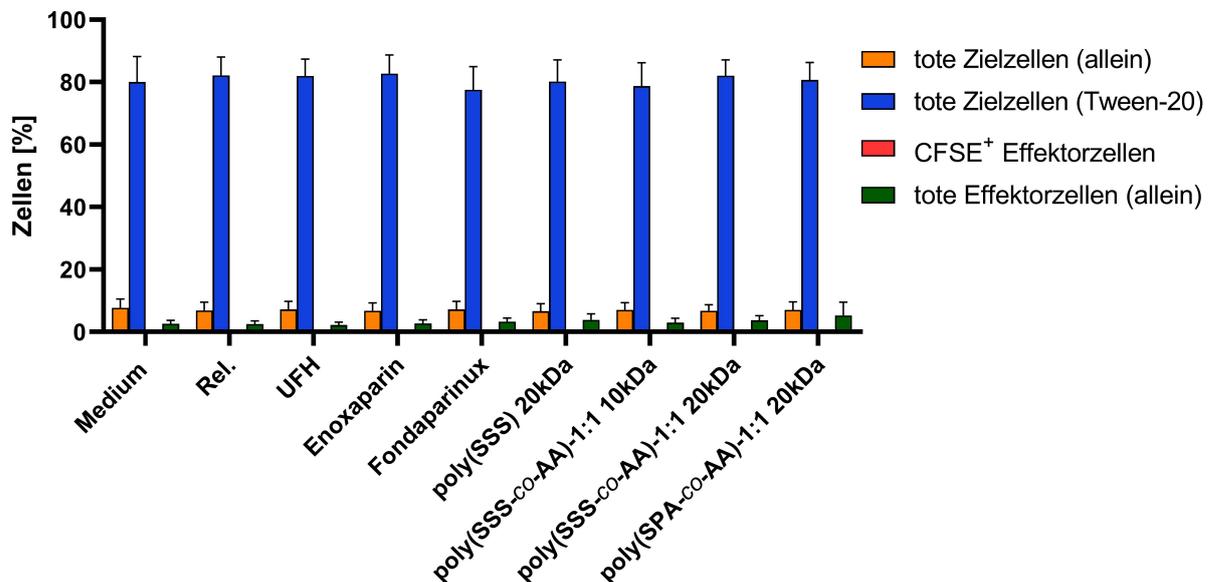


Abbildung 49: Dargestellt sind die mitgeführten Kontrollen zur Überprüfung der funktionellen Integrität der Zellen (orange, grün) und der verwendeten Färbungen (blau, rot). Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von fünf unabhängigen Versuchswiederholungen (N=5) für jede der untersuchten Behandlungen

### 5.3.5 Zwischenfazit immunmodulierender Eigenschaften

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse bestätigen die komplexen und teils divergenten Effekte auf das Immunsystem, die durch Thrombozyten und ihre Releasates vermittelt werden können. Dementsprechend können auch die Einflüsse der Antikoagulantien und Heparin-Mimetika während der Tumorzell-vermittelten Thrombozytenstimulation nicht klar als vorteilig oder nachteilig eingeordnet werden, sondern sind stark situationsabhängig. So kann hinsichtlich der Differenzierung  $CD4^+$  T-Zellen zu regulatorischen T-Zellen ein deutlicher Vorteil der Präsenz von Antikoagulantien bzw. Heparin-Mimetika postuliert werden. Sie reduzieren die Differenzierung zu  $T_{reg}$  deutlich, wodurch diese ihre immunsuppressiven Effekte, wie etwa die Ausschüttung des IL-10, nicht in vollem Ausmaß entfalten können. Dies birgt das Potential, dass das Immunsystem wieder effektiver zur antitumoralen Antwort befähigt ist.

Hinsichtlich der Aktivität der zytotoxischen  $CD8^+$  T-Zellen zeigt sich ein differenziertes Bild. Der direkte Kontakt zu Thrombozyten scheint nachteilig zu sein, da die Sekretion zytolytischer und proinflammatorischer Zytokine reduziert wird und somit die antitumorale Immunantwort beeinträchtigt ist. Der isolierte Effekt der ausgeschütteten Mediatoren aktivierter Thrombozyten führt hingegen zu einer Aktivierung der  $CD8^+$  T-Zellen und kann so einen vorteilhaften Effekt auf die Immunantwort vermitteln. Dieser wird nicht durch die kommerziellen Antikoagulantien beeinflusst, jedoch durch die SSS enthaltenden Heparin-mimetischen Polymere inhibiert. So präsentiert sich die scheinbare Inaktivität der kommerziellen Heparine, mit Blick auf einen antimetastatischen Effekt, als ein Vorteil gegenüber den Heparin-Mimetika.

Auch mit Fokus auf die zytolytische Aktivität der natürlichen Killerzellen kann festgestellt werden, dass UFH den Heparin-Mimetika überlegen ist. Es reduziert die inhibitorische Kapazität des Tumorzell-induzierten Thrombozyten-Releasates und kann so unterstützend auf die antitumorale Immunantwort einwirken. Hingegen muss für die Heparin-mimetischen Polymere, welche auf dem 4-Styrenesulfonat Monomer basieren, ein intrinsischer Hemmeffekt gegenüber den NK-Zellen postuliert werden.

Dies verdeutlicht, dass der Eingriff in die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung durch kommerzielle Antikoagulantien und die synthetischen Heparin-Mimetika zu einer komplexen und divergenten Modulation des Immunsystems führt. Auf Grundlage der hier präsentierten Ergebnisse lässt sich sowohl für die Heparine als auch für die mimetischen Polymere ein positiver Effekt auf die Immunantwort skizzieren. Eine abschließende Beurteilung der Überlegenheit einer Substanzklasse und die Frage inwieweit welcher der hier beschriebenen Effekte die überwiegende Relevanz besitzt, müssen künftige *in-vivo* Analysen zeigen.

## 5.4 Bindung an PF4 als Surrogatparameter einer HIT-II-Gefahr

Das Auftreten der HIT-II ist eine seltene, jedoch oft schwerwiegende und potentiell letale Komplikation einer Heparin-Therapie, die insbesondere bei Anwendung von UFH auftreten kann. Zugrunde liegt die Komplexbildung des positiv geladenen PF4 durch das große und stark anionische Heparin. Die Heparin-Mimetika präsentieren sich ähnlich potent in der Hemmung des protumoralen Effekts der Thrombozyten. Besonders in der Untersuchung der Bindungskinetiken erreichen sie ähnliche  $K_D$  Werte wie UFH. Folglich soll in einem Modellversuch ein direkter Vergleich der potentiellen HIT-II-Gefahr erfolgen. Zur Abschätzung dieser möglichen HIT-II-Gefahr wurde die Bindung der kommerziellen Antikoagulantien und der Heparin-mimetischen Polymere an PF4 vermessen. Die Ergebnisse dieser biosensorischen Analyse sind in Tabelle 20 aufgeführt.

Tabelle 20: Bindungsaffinitäten kommerzieller Heparine und Heparin-mimetischer Polymere an PF4

Substanz	$K_D$ [M]	$k_{on}$ [ $M^{-1}s^{-1}$ ]	$k_{off}$ [ $s^{-1}$ ]
UFH	$5,83 \times 10^{-11} \pm 3,05 \times 10^{-11}$	$3,45 \times 10^8 \pm 0,12 \times 10^8$	$1,71 \times 10^{-2} \pm 0,26 \times 10^{-2}$
Enoxaparin	n.d.	n.d.	n.d.
Fondaparinux	n.d.	n.d.	n.d.
Poly(SSS) 20kDa	$9,82 \times 10^{-8} \pm 0,29 \times 10^{-8}$	$3,98 \times 10^5 \pm 2,53 \times 10^5$	$3,54 \times 10^{-2} \pm 2,89 \times 10^{-2}$
Poly(SSS-co-AA)-1:1 10kDa	n.d.	n.d.	n.d.
Poly(SSS-co-AA)-1:1 20kDa	$1,40 \times 10^{-7} \pm 1,38 \times 10^{-7}$	$7,93 \times 10^5 \pm 3,41 \times 10^5$	$5,34 \times 10^{-2} \pm 1,53 \times 10^{-2}$
Poly(SPA-co-AA)-1:1 20kDa	n.d.	n.d.	n.d.

Die zu erwartende Bindung des UFH an PF4 konnte bestätigt werden und besitzt einen  $K_D$  Wert von  $5,82 \times 10^{-11}$  M. Diese beeindruckend hohe Bindungsaffinität des UFH spiegelt nicht nur das pathologisch relevante Auftreten der HIT-II unter einer Therapie mit unfraktioniertem Heparin wider, sondern verdeutlicht auch das Potential der SAW-Biosensorik zur Detektion höchstaffiner Bindungen. Entsprechend den klinischen Beobachtungen eines reduzierten Auftretens bzw. einer Abwesenheit der HIT-II-Gefahr bei der Anwendung eines LMWHs kann auch tatsächlich keine Bindung des LMWHs und des Pentasaccharids Fondaparinux an PF4 detektiert werden. Hinsichtlich der Bindung durch die Heparin-mimetischen Polymere scheint jedoch nicht nur die negative Ladung relevant zu sein. So kann für die Polymere poly(SSS) 20kDa und poly(SSS-co-AA)-1:1

20kDa der  $K_D$  Wert mit  $9,82 \times 10^{-8}$  bzw.  $1,40 \times 10^{-7}$  M bestimmt werden. Hingegen kann für das kleinere Copolymer poly(SSS-*co*-AA)-1:1 10kDa keine Bindung an PF4 verzeichnet werden. Selbiges trifft für das 20 kDa große Mimetikum poly(SPA-*co*-AA)-1:1 zu. Somit lässt sich postulieren, dass nicht nur die negative Ladung des Moleküls, sondern auch eine kritische Größe für die Bildung des Mimetikum/PF4 Komplexes wichtig ist. Auch die Relevanz der Ladungsverteilung bzw. Struktur des Polymers kann als relevant betrachtet werden, da die Präsenz des SPA-Monomers keine Bindung an PF4 vermittelt, dies jedoch für das SSS-Monomer der Fall zu sein scheint. Das Auftreten einer HIT-II im Zuge einer Applikation dieser beiden nichtbindenden Heparin-Mimetika ist somit nicht zu erwarten. Zwar kann für poly(SSS) 20kDa und poly(SSS-*co*-AA)-1:1 20kDa eine Bindung registriert werden, diese liegt jedoch deutlich unter dem Wert des UFH. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse lässt sich postulieren, dass die Bindung des PF4 von mehr Faktoren als der reinen Präsenz einer negativen Ladung und einer entsprechenden Größe des Moleküls abhängt, da die Heparin-Mimetika, welche mit 20 kDa im Größenbereich des Heparins liegen, weniger bis gar nicht an PF4 binden. Somit könnten auch Faktoren wie die dreidimensionelle Struktur der Mimetika und Heparine für eine Bindung des PF4 relevant sein. Weiterhin ist durch die reine Bindung des PF4 nicht gesichert, ob dieser Komplex auch durch Antikörper detektiert wird und somit zur klinischen Manifestation einer HIT-II führt. Aus struktureller Sicht reicht eine alleinige Bindung des PF4 durch UFH nicht aus um eine HIT-II zu induzieren. Es muss darüber hinaus in einem bestimmten stöchiometrischen Verhältnis zu PF4 vorliegen und dieses durch seine Größe umspannen um durch die Änderung der Konformation des PF4 neue Epitope freizulegen [423]. Folglich kann für diese beiden bindenden Polymere ein Auftreten einer HIT-II nicht endgültig bewertet werden. Es muss jedoch durch die, der HIT-II zugrundeliegende, Komplexierung des PF4 von einem Risiko der HIT-II Manifestation ausgegangen werden.

## 6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es einen Beitrag zum Verständnis der Tumorzell/Thrombozyten Interaktion in der hämatogenen Metastasierung zu leisten und so potentielle antimetastatische Effekte der untersuchten Antikoagulantien und der neuen, synthetischen Heparin-mimetischen Polymere zu identifizieren.

Zur Tumorzell-induzierten Thrombozytenaggregation bzw. -aktivierung und für die Induktion der Blutgerinnung, simuliert durch die Thrombingenerierung, wurden repräsentativ MDA-MB-231 Brustkrebszellen als potente Aktivatoren ausgewählt. So dienten sie in dieser Arbeit als zuverlässige „Arbeitspferde“ zur Generierung Tumorzell-induzierter Thrombozyten-Releasates. Obwohl die Verwendung einer einzigen Zelllinie zur Thrombozytenaktivierung einen potentiellen Kritikpunkt an dieser Arbeit darstellen könnte, kann aufgrund der bisherigen Untersuchungen und Erfahrungen der Arbeitsgruppe erwartet werden, dass diese Ergebnisse ohne Zweifel auch auf weitere Tumorentitäten extrapoliert werden können [351, 352].

Zunächst lässt sich resümieren, dass die synthetischen Polymere ihrem Versprechen als Heparin-mimetische Substanzen gerecht werden und hinsichtlich vieler Aspekte die Wirkungen des Heparins imitieren. Dabei sind sie nicht nur auf den wichtigen Effekt einer Inhibition der Blutgerinnung beschränkt, sondern sprechen auch die unterschiedlichen pleiotropen Zielstrukturen des Heparins an, wodurch sie tiefere Einblicke in die strukturellen Voraussetzungen dieser Effekte ermöglichen.

Zwar ist die Hemmung der Tumorzell-induzierten Thrombinbildung anspruchsvoller, als die nach einer Induktion durch rhTF [352], jedoch kann auch diese effektiv durch UFH und die Heparin-mimetischen Polymere, welche die SSS-Monomereinheit enthalten, unterbunden werden. Grundsätzlich lässt sich beobachten, dass die SSS-Einheit essentiell für die Interferenz im Tumorzell/Thrombozyten Wechselspiel ist. Dennoch erscheint eine 1:1 Mischung des SSS- und AA-Anteils in Copolymeren vorteilhaft gegenüber der Verwendung eines reinen SSS-Homopolymers. Hinsichtlich der molekularen Größe überzeugen besonders 10 kDa bzw. 20 kDa große Derivate, da die Reduktion auf 5 kDa die inhibitorische Kapazität in manchen Assaysystemen verringert und die Steigerung auf 50 kDa zum Auftreten ungewollter Nebeneffekte führt.

Wird auf die immunmodulierenden Eigenschaften fokussiert, lassen sich teils divergente Effekte von Thrombozyten und Tumorzell-induzierten Thrombozyten-Releasates beobachten. Gerade die Steigerung der Differenzierung regulatorischer T-Zellen und die Hemmung der zytolytischen Aktivität natürlicher Killerzellen tragen zur Schaffung einer protumoralen bzw. prometastatischen Umgebung bei. Deutlich differenzierter gestaltet sich das Bild mit Blick auf die CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Hier entfalten Thrombozyten nach einer längeren Expositionszeit eine prometastatische Hemmung der Sekretion zytolytischer und proinflammatorischer

Mediatorstoffe aus aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen, wohingegen Thrombozyten-Releasates diese Ausschüttung potenzieren und so das entstehende Milieu antimetastatisch modulieren. Folglich kommt es auch zu teils gegenläufigen Effekten bei einer Hemmung der initialen Präparation der Tumorzell-induzierten Thrombozyten-Releasates. Generell präsentiert sich UFH hier als vielversprechend, da es sowohl die Releasate-Effekte auf die T<sub>reg</sub> Differenzierung als auch auf die NK-Zellhemmung unterdrückt, aber nicht die Stimulation der CD8<sup>+</sup> T-Zellen moduliert. Diese Stimulation der CTL wird jedoch durch den Einsatz der Heparin-Mimetika unterdrückt. Auch scheinen vor allem die Heparin-mimetischen Polymere mit einem SSS-Anteil eine intrinsische Kapazität zur Hemmung der natürlichen Killerzellen zu besitzen, welche mit Blick auf die Metastasierung als nachteilig zu bewerten ist. Eine abschließende Beurteilung, ob ein prometastatischer oder antimetastatischer Effekt des Eingriffs in die Tumorzell/Thrombozyten Interaktion dominiert, kann auf Grundlage der vorliegenden *in-vitro* Daten kaum erfolgen und muss in künftigen *in-vivo* Experimenten adressiert werden.

Als weiterer Interferenzpunkt in der Metastasierung wurde die Blockade der Zelladhäsion betrachtet. Hier kann eine leichte Überlegenheit der synthetischen Heparin-Mimetika gegenüber den natürlichen Heparinen verzeichnet werden. Wie bereits zuvor, scheint auch für die Bindung an VLA-4 die Präsenz des SSS-Monomers essentiell. Interessanterweise wird die Tumorzelladhäsion über das VLA-4/VCAM-1 Adhäsionssystem durch Enoxaparin und das Copolymer poly(SPA-*co*-AA)-1:1 20kDa reduziert, obwohl für sie keine Bindung an VLA-4 detektiert werden konnte. Eine Erklärung dieses Effektes bleibt offen. In einem physiologischeren Versuchsszenario scheint bereits die Bindung an P-Selectin ausreichend um den adhäsionshemmenden Effekt der beiden Testsubstanzen zu erklären.

Als weiterer Eingriff in die metastatische Kaskade konnte eine potente Hemmung der Heparanase-Aktivität durch die Heparin-Mimetika identifiziert werden. Die Gefahr einer HIT-II als Komplikation kann aufgrund einer fehlenden Bindung bzw. stark reduzierten Bindung der Heparin-Mimetika an PF4 als ausgeschlossen bzw. als gemindert betrachtet werden.

Zusammenfassend konnten im Verlauf dieser Arbeit einige verschiedene Eingriffspunkte der Heparine und synthetischen Heparin-Mimetika aufgedeckt werden. Eine abschließende Beurteilung der Relevanz dieser Interferenzpunkte ist auf der Grundlage der reinen *in-vitro* Ergebnisse erschwert und muss in künftigen *in-vivo* Modellen näher betrachtet werden. Dennoch präsentieren sich die synthetischen Polymere als vielversprechende und potente Heparin-Mimetika, die durch die Modulationen in den untersuchten Testsystemen das Potential mitbringen, eine antimetastatische Wirkung zu entfalten und die Nachteile des natürlichen Ursprungs des Heparins zu überwinden. Sie empfehlen sich somit als eine ernstzunehmende Alternative des natürlichen Heparins und verlangen nach einer weiteren

Evaluation ihres therapeutischen Potentials.

Diese Arbeit bietet somit die Rationale für die Durchführung erster *in-vivo* Studien der Pharmakokinetik am Mausmodell, um nachfolgend antimetastatische Effekte untersuchen zu können. Ebenso erscheint es interessant, zu prüfen, ob die Heparin-Mimetika aufgrund ihrer starken Bindungsaffinität zu verschiedenen Adhäsionsproteinen auch in der Lage sind die aus Thrombozyten sezernierten Mediatoren in der Manier eines „scavengers“ zu binden. So könnten sie nicht nur die initiale Freisetzung inhibieren, sondern auch die funktionelle Aktivität bereits sezernierter Mediatoren modulieren.

## Literaturverzeichnis

- [1] Freddie Bray et al. „Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries“. In: *CA: a cancer journal for clinicians* 68.6 (2018), S. 394–424.
- [2] Freddie Bray et al. „The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide“. In: *Cancer* 127.16 (2021), S. 3029–3030.
- [3] Hyuna Sung et al. „Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries“. In: *CA: a cancer journal for clinicians* 71.3 (2021), S. 209–249.
- [4] Hanna Dillekås, Michael S. Rogers und Oddbjørn Straume. „Are 90% of deaths from cancer caused by metastases?“ In: *Cancer Medicine* 8.12 (2019), S. 5574–5576.
- [5] F. I. Mulder et al. „Venous thromboembolism in cancer patients: a population-based cohort study“. In: *Blood* 137.14 (2021), S. 1959–1969.
- [6] Henrik Toft Sørensen et al. „[Duplikat] Prognosis of Cancers Associated with Venous Thromboembolism“. In: *New England Journal of Medicine* 343.25 (2000), S. 1846–1850.
- [7] Dominique Farge et al. „2019 international clinical practice guidelines for the treatment and prophylaxis of venous thromboembolism in patients with cancer“. In: *The Lancet Oncology* 20.10 (2019), e566–e581.
- [8] Michael B. Streiff et al. „Cancer-Associated Venous Thromboembolic Disease, Version 2.2021, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology“. In: *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN* 19.10 (2021), S. 1181–1201.
- [9] Michalis V. Karamouzis et al. „[Duplikat] The Impact of Thromboprophylaxis on the Survival of Patients with Advanced Pancreatic Cancer. The Pancreatic Cancer and Tinzaparin (PaCT) Study“. In: *Cancers* 13.12 (2021).
- [10] Ajay K. Kakkar et al. „[Duplikat] Low Molecular Weight Heparin, Therapy With Dalteparin, and Survival in Advanced Cancer: The Fragmin Advanced Malignancy Outcome Study (FAMOUS)“. In: *Journal of Clinical Oncology* 22.10 (2004), S. 1944–1948.
- [11] Sai-Nan Ma et al. „The anti-cancer properties of heparin and its derivatives: a review and prospect“. In: *Cell Adhesion & Migration* 14.1 (2020), S. 118–128.
- [12] Isaiah J. Fidler. „The pathogenesis of cancer metastasis: the ‘seed and soil’ hypothesis revisited“. In: *Nature Reviews Cancer* 3.6 (2003), S. 453–458.
- [13] J. Folkman. „What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?“ In: *Journal of the National Cancer Institute* 82.1 (1990), S. 4–6.
- [14] D. Ribatti et al. „The history of the angiogenic switch concept“. In: *Leukemia* 21.1 (2007), S. 44–52.

- [15] J. A. Forsythe et al. „Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1“. In: *Molecular and Cellular Biology* 16.9 (1996), S. 4604–4613.
- [16] Luana Schito et al. „Hypoxia-inducible factor 1-dependent expression of platelet-derived growth factor B promotes lymphatic metastasis of hypoxic breast cancer cells“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109.40 (2012), E2707–16.
- [17] Tak L. Khong et al. „Identification of the angiogenic gene signature induced by EGF and hypoxia in colorectal cancer“. In: *BMC Cancer* 13 (2013), S. 518.
- [18] Sanne Kuijper, Christopher J. Turner und Ralf H. Adams. „Regulation of angiogenesis by Eph-ephrin interactions“. In: *Trends in cardiovascular medicine* 17.5 (2007), S. 145–151.
- [19] Elena I. Deryugina und William B. Kiosses. „Intratumoral Cancer Cell Intravasation Can Occur Independent of Invasion into the Adjacent Stroma“. In: *Cell reports* 19.3 (2017), S. 601–616.
- [20] W. G. Roberts und G. E. Palade. „Neovasculature induced by vascular endothelial growth factor is fenestrated“. In: *Cancer Research* 57.4 (1997), S. 765–772.
- [21] Ievgenia Pastushenko et al. „Identification of the tumour transition states occurring during EMT“. In: *Nature* 556.7702 (2018), S. 463–468.
- [22] Tamer T. Onder et al. „Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways“. In: *Cancer Research* 68.10 (2008), S. 3645–3654.
- [23] Xiaofang Yang et al. „Regulation of beta 4-integrin expression by epigenetic modifications in the mammary gland and during the epithelial-to-mesenchymal transition“. In: *Journal of Cell Science* 122.Pt 14 (2009), S. 2473–2480.
- [24] Sabine Maschler et al. „Tumor cell invasiveness correlates with changes in integrin expression and localization“. In: *Oncogene* 24.12 (2005), S. 2032–2041.
- [25] Erik Sahai und Christopher J. Marshall. „Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis“. In: *Nature cell biology* 5.8 (2003), S. 711–719.
- [26] Samy Lamouille, Jian Xu und Rik Derynck. „Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition“. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15.3 (2014), S. 178–196.
- [27] Yanhui Chen et al. „Evaluation of heparanase and matrix metalloproteinase-9 in patients with cutaneous malignant melanoma“. In: *The Journal of dermatology* 39.4 (2012), S. 339–343.
- [28] Qiong Huang et al. „Fluid shear stress and tumor metastasis“. In: *American journal of cancer research* 8.5 (2018), S. 763–777.
- [29] J. E. Talmadge et al. „Role of NK cells in tumour growth and metastasis in beige mice“. In: *Nature* 284.5757 (1980), S. 622–624.

- [30] Malte Mohme, Sabine Riethdorf und Klaus Pantel. „Circulating and disseminated tumour cells - mechanisms of immune surveillance and escape“. In: *Nature reviews. Clinical oncology* 14.3 (2017), S. 155–167.
- [31] T. Placke et al. „Platelet-Derived MHC Class I Confers a Pseudonormal Phenotype to Cancer Cells That Subverts the Antitumor Reactivity of Natural Killer Immune Cells“. In: *Cancer Research* 72.2 (2012), S. 440–448.
- [32] Hans-Georg Kopp, Theresa Placke und Helmut Rainer Salih. „Platelet-derived transforming growth factor-beta down-regulates NKG2D thereby inhibiting natural killer cell antitumor reactivity“. In: *Cancer Research* 69.19 (2009), S. 7775–7783.
- [33] Karl Egan, Niamh Cooke und Dermot Kenny. „Living in shear: platelets protect cancer cells from shear induced damage“. In: *Clinical & experimental metastasis* 31.6 (2014), S. 697–704.
- [34] Tae-Hee Lee et al. „Vascular endothelial growth factor modulates the transendothelial migration of MDA-MB-231 breast cancer cells through regulation of brain microvascular endothelial cell permeability“. In: *Journal of Biological Chemistry* 278.7 (2003), S. 5277–5284.
- [35] Myriam Labelle, Shahinoor Begum und Richard O. Hynes. „Platelets guide the formation of early metastatic niches“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111.30 (2014), E3053–61.
- [36] J. L. Daniel et al. „Molecular basis for ADP-induced platelet activation. I. Evidence for three distinct ADP receptors on human platelets“. In: *Journal of Biological Chemistry* 273.4 (1998), S. 2024–2029.
- [37] B. Z. Paul, J. Jin und S. P. Kunapuli. „Molecular mechanism of thromboxane A<sub>2</sub>-induced platelet aggregation. Essential role for p2t(ac) and alpha(2a) receptors“. In: *Journal of Biological Chemistry* 274.41 (1999), S. 29108–29114.
- [38] Laurie J. Gay und Brunhilde Felding-Habermann. „Contribution of platelets to tumour metastasis“. In: *Nature Reviews Cancer* 11.2 (2011), S. 123–134.
- [39] Ann F. Chambers, Alan C. Groom und Ian C. MacDonald. „Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites: Metastasis“. In: *Nature Reviews Cancer* 2.8 (2002), S. 563–572.
- [40] Ana B. García-Martín et al. „VLA-4 mediated adhesion of melanoma cells on the blood–brain barrier is the critical cue for melanoma cell intercalation and barrier disruption“. In: *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 39.10 (2018), S. 1995–2010.
- [41] Carina Strell und Frank Entschladen. „Extravasation of leukocytes in comparison to tumor cells“. In: *Cell communication and signaling : CCS* 6 (2008), S. 10.
- [42] Martin Schlesinger. „Role of platelets and platelet receptors in cancer metastasis“. In: *Journal of hematology & oncology* 11.1 (2018), S. 125.

- [43] Keiji Uchide et al. „Cancer cells cause vascular endothelial cell (vEC) retraction via 12(S)HETE secretion; the possible role of cancer cell derived microparticle“. In: *Annals of surgical oncology* 14.2 (2007), S. 862–868.
- [44] Roger R. Gomis und Sylwia Gawrzak. „Tumor cell dormancy“. In: *Molecular oncology* 11.1 (2017), S. 62–78.
- [45] Stephen Paget. „THE DISTRIBUTION OF SECONDARY GROWTHS IN CANCER OF THE BREAST“. In: *The Lancet* 133.3421 (1889), S. 571–573.
- [46] Héctor Peinado et al. „Pre-metastatic niches: organ-specific homes for metastases“. In: *Nature reviews. Cancer* 17.5 (2017), S. 302–317.
- [47] B. A. Kerr et al. „Platelets govern pre-metastatic tumor communication to bone“. In: *Oncogene* 32.36 (2013), S. 4319–4324.
- [48] Oliver Pagel et al. „Taking the stock of granule cargo: Platelet releasate proteomics“. In: *Platelets* 28.2 (2017), S. 119–128.
- [49] Isaiah J. Fidler. „Metastasis: Quantitative Analysis of Distribution and Fate of Tumor Emboli Labeled With 125I-5-Iodo-2'-deoxyuridine“. In: *Journal of the National Cancer Institute* 45 (1970), S. 773–782.
- [50] Christopher W. Wong et al. „Apoptosis: An Early Event in Metastatic Inefficiency“. In: *Cancer Research* 2001.61 (), S. 333–338.
- [51] T. P. Butler und P. M. Gullino. „Quantitation of cell shedding into efferent blood of mammary adenocarcinoma“. In: *Cancer Research* 35.3 (1975), S. 512–516.
- [52] Yascha W. van den Berg et al. „The relationship between tissue factor and cancer progression: insights from bench and bedside“. In: *Blood* 119.4 (2012), S. 924–932.
- [53] Jeffrey I. Zwicker et al. „Tumor-derived tissue factor-bearing microparticles are associated with venous thromboembolic events in malignancy“. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15.22 (2009), S. 6830–6840.
- [54] Sanjeev Palta, Richa Saroa und Anshu Palta. „Overview of the coagulation system“. In: *Indian Journal of Anaesthesia* 58.5 (2014), S. 515.
- [55] Brian Turpin et al. „Thrombin drives tumorigenesis in colitis-associated colon cancer“. In: *Cancer Research* 74.11 (2014), S. 3020–3030.
- [56] Kunihiro Asanuma et al. „The thrombin inhibitor, argatroban, inhibits breast cancer metastasis to bone“. In: *Breast cancer (Tokyo, Japan)* 20.3 (2013), S. 241–246.
- [57] Mark L. Kahn et al. „Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin“. In: *Journal of Clinical Investigation* 103.6 (1999), S. 879–887.

- [58] J. Chen et al. „Thrombin receptor activation. Confirmation of the intramolecular tethered liganding hypothesis and discovery of an alternative intermolecular liganding mode“. In: *Journal of Biological Chemistry* 269.23 (1994), S. 16041–16045.
- [59] C. Gachet. „Identification, characterization, and inhibition of the platelet ADP receptors“. In: *International journal of hematology* 74.4 (2001), S. 375–381.
- [60] B. Hechler et al. „The P2Y1 receptor, necessary but not sufficient to support full ADP-induced platelet aggregation, is not the target of the drug clopidogrel“. In: *British Journal of Haematology* 103.3 (1998), S. 858–866.
- [61] Carol Dangelmaier et al. „Potentiation of Thromboxane A2-induced Platelet Secretion by Gi Signaling through the Phosphoinositide-3 Kinase Pathway“. In: *Thrombosis and Haemostasis* 85.02 (2001), S. 341–348.
- [62] Min Soon Cho et al. „Role of ADP receptors on platelets in the growth of ovarian cancer“. In: *Blood* 130.10 (2017), S. 1235–1242.
- [63] H. Boukerche et al. „Human melanoma cell lines differ in their capacity to release ADP and aggregate platelets“. In: *British Journal of Haematology* 87.4 (1994), S. 763–772.
- [64] Helena Erlandsson Harris, Ulf Andersson und David S. Pisetsky. „HMGB1: a multi-functional alarmin driving autoimmune and inflammatory disease“. In: *Nature reviews. Rheumatology* 8.4 (2012), S. 195–202.
- [65] Alok Tripathi, Kriti Shrinet und Arvind Kumar. „HMGB1 protein as a novel target for cancer“. In: *Toxicology reports* 6 (2019), S. 253–261.
- [66] Le-Xing Yu et al. „Platelets promote tumour metastasis via interaction between TLR4 and tumour cell-released high-mobility group box1 protein“. In: *Nature Communications* 5 (2014), S. 5256.
- [67] Garret A. FitzGerald. „Mechanisms of platelet activation: Thromboxane A2 as an amplifying signal for other agonists“. In: *The American Journal of Cardiology* 68.7 (1991), B11–B15.
- [68] A. Aitokallio-Tallberg et al. „Prostacyclin and thromboxane in breast cancer: relationship between steroid receptor status and medroxyprogesterone acetate“. In: *British Journal of Cancer* 51.5 (1985), S. 671–674.
- [69] A. M. Aitokallio-Tallberg, L. U. Viinikka und R. O. Ylikorkala. „Increased synthesis of prostacyclin and thromboxane in human ovarian malignancy“. In: *Cancer Research* 48.9 (1988), S. 2396–2398.
- [70] Thomas Daubon et al. „Deciphering the complex role of thrombospondin-1 in glioblastoma development“. In: *Nature Communications* 10.1 (2019), S. 1146.
- [71] Wayne Roberts et al. „Thrombospondin-1 induces platelet activation through CD36-dependent inhibition of the cAMP/protein kinase A signaling cascade“. In: *Blood* 116.20 (2010), S. 4297–4306.

- [72] Julie Rayes, Steve P. Watson und Bernhard Nieswandt. „Functional significance of the platelet immune receptors GPVI and CLEC-2“. In: *The Journal of clinical investigation* 129.1 (2019), S. 12–23.
- [73] Katsue Suzuki-Inoue et al. „Involvement of the Snake Toxin Receptor CLEC-2, in Podoplanin-mediated Platelet Activation, by Cancer Cells“. In: *Journal of Biological Chemistry* 282.36 (2007), S. 25993–26001.
- [74] Ester Martín-Villar et al. „Characterization of human PA2.26 antigen (T1alpha-2, podoplanin), a small membrane mucin induced in oral squamous cell carcinomas“. In: *International Journal of Cancer* 113.6 (2005), S. 899–910.
- [75] Kazuhiko Mishima et al. „Increased expression of podoplanin in malignant astrocytic tumors as a novel molecular marker of malignant progression“. In: *Acta neuropathologica* 111.5 (2006), S. 483–488.
- [76] Vivien Schacht et al. „Up-Regulation of the Lymphatic Marker Podoplanin, a Mucin-Type Transmembrane Glycoprotein, in Human Squamous Cell Carcinomas and Germ Cell Tumors“. In: *The American Journal of Pathology* 166.3 (2005), S. 913–921.
- [77] Kenichi Miyata et al. „Podoplanin enhances lung cancer cell growth in vivo by inducing platelet aggregation“. In: *Scientific reports* 7.1 (2017), S. 4059.
- [78] Satoshi Takagi et al. „Platelets promote tumor growth and metastasis via direct interaction between Aggrus/podoplanin and CLEC-2“. In: *PloS one* 8.8 (2013), e73609.
- [79] Nobuo Watanabe et al. „Podoplanin is indispensable for cell motility and platelet-induced epithelial-to-mesenchymal transition-related gene expression in esophagus squamous carcinoma TE11A cells“. In: *Cancer cell international* 20 (2020), S. 263.
- [80] Benjamin A. H. Smith und Carolyn R. Bertozzi. „The clinical impact of glycobiology: targeting selectins, Siglecs and mammalian glycans“. In: *Nature reviews. Drug discovery* 20.3 (2021), S. 217–243.
- [81] Prithu Sundd et al. „Biomechanics of leukocyte rolling“. In: *Biorheology* 48.1 (2011), S. 1–35.
- [82] M. Merten und P. Thiagarajan. „P-selectin expression on platelets determines size and stability of platelet aggregates“. In: *Circulation* 102.16 (2000), S. 1931–1936.
- [83] Min Wei et al. „Modified Heparin Inhibits P-selectin-mediated Cell Adhesion of Human Colon Carcinoma Cells to Immobilized Platelets under Dynamic Flow Conditions“. In: *Journal of Biological Chemistry* 279.28 (2004), S. 29202–29210.
- [84] Svenja Schwarz et al. „Glycosaminoglycans as Tools to Decipher the Platelet Tumor Cell Interaction: A Focus on P-Selectin“. In: *Molecules* 25.5 (2020), S. 1039.
- [85] Jean-François Théorêt et al. „P-selectin ligation induces platelet activation and enhances microaggregate and thrombus formation“. In: *Thrombosis Research* 128.3 (2011), S. 243–250.

- [86] Michael Merten et al. „Sulfatides activate platelets through P-selectin and enhance platelet and platelet-leukocyte aggregation“. In: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 25.1 (2005), S. 258–263.
- [87] Malgorzata Barczyk, Sergio Carracedo und Donald Gullberg. „Integrins“. In: *Cell and tissue research* 339.1 (2010), S. 269–280.
- [88] Marion Lavergne et al. „Platelet Integrins in Tumor Metastasis: Do They Represent a Therapeutic Target?“. In: *Cancers* 9.10 (2017).
- [89] Kendra L. Sarratt et al. „GPVI and alpha2beta1 play independent critical roles during platelet adhesion and aggregate formation to collagen under flow“. In: *Blood* 106.4 (2005), S. 1268–1277.
- [90] Peter Höök et al. „Strong Binding of Platelet Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  to Fibrin Clots: Potential Target to Destabilize Thrombi“. In: *Scientific reports* 7.1 (2017), S. 13001.
- [91] Elmina Mammadova-Bach et al. „Platelet integrin  $\alpha_6\beta_1$  controls lung metastasis through direct binding to cancer cell-derived ADAM9“. In: *JCI insight* 1.14 (2016), e88245.
- [92] Jiansong Huang et al. „Platelet integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ : signal transduction, regulation, and its therapeutic targeting“. In: *Journal of hematology & oncology* 12.1 (2019), S. 26.
- [93] Anke S. Lonsdorf et al. „Engagement of  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (GPIIb/IIIa) with  $\alpha_V\beta_3$  integrin mediates interaction of melanoma cells with platelets: a connection to hematogenous metastasis“. In: *The Journal of biological chemistry* 287.3 (2012), S. 2168–2178.
- [94] M. G. Stepanyan et al. „Platelet Activation through GPVI Receptor: Variability of the Response“. In: *Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology* 15.1 (2021), S. 73–81.
- [95] Melania Dovizio et al. „Pharmacological inhibition of platelet-tumor cell cross-talk prevents platelet-induced overexpression of cyclooxygenase-2 in HT29 human colon carcinoma cells“. In: *Molecular pharmacology* 84.1 (2013), S. 25–40.
- [96] Elmina Mammadova-Bach et al. „Platelet glycoprotein VI promotes metastasis through interaction with cancer cell-derived galectin-3“. In: *Blood* 135.14 (2020), S. 1146–1160.
- [97] Ilaria Canobbio, Cesare Balduini und Mauro Torti. „Signalling through the platelet glycoprotein Ib-V-IX complex“. In: *Cellular signalling* 16.12 (2004), S. 1329–1344.
- [98] Mariana Silva, Paula A. Videira und Robert Sackstein. „E-Selectin Ligands in the Human Mononuclear Phagocyte System: Implications for Infection, Inflammation, and Immunotherapy“. In: *Frontiers in immunology* 8 (2017), S. 1878.
- [99] Thomas F. Tedder et al. „The selecting: vascular adhesion molecules“. In: *The FASEB Journal* 9.10 (1995), S. 866–873.

- [100] Marco Trinchera, Adele Aronica und Fabio Dall’Olio. „Selectin Ligands Sialyl-Lewis a and Sialyl-Lewis x in Gastrointestinal Cancers“. In: *Biology* 6.1 (2017).
- [101] Igor Tvaroška, Chandrabose Selvaraj und Jaroslav Koča. „Selectins-The Two Dr. Jekyll and Mr. Hyde Faces of Adhesion Molecules-A Review“. In: *Molecules* 25.12 (2020).
- [102] Y. J. Kim et al. „P-selectin deficiency attenuates tumor growth and metastasis“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95.16 (1998), S. 9325–9330.
- [103] Mark Wahrenbrock et al. „Selectin-mucin interactions as a probable molecular explanation for the association of Trousseau syndrome with mucinous adenocarcinomas“. In: *Journal of Clinical Investigation* 112.6 (2003), S. 853–862.
- [104] Liang Gong et al. „Activated platelets interact with lung cancer cells through P-selectin glycoprotein ligand-1“. In: *Pathology oncology research : POR* 18.4 (2012), S. 989–996.
- [105] U. Gotsch et al. „Expression of P-selectin on endothelial cells is upregulated by LPS and TNF-alpha in vivo“. In: *Cell adhesion and communication* 2.1 (1994), S. 7–14.
- [106] Tanya N. Mayadas et al. „Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice“. In: *Cell* 74.3 (1993), S. 541–554.
- [107] Ralf J. Ludwig et al. „Endothelial P-Selectin as a Target of Heparin Action in Experimental Melanoma Lung Metastasis“. In: *Cancer Research* 64.8 (2004), S. 2743–2750.
- [108] R. Dardik et al. „Thrombin promotes platelet-mediated melanoma cell adhesion to endothelial cells under flow conditions: role of platelet glycoproteins P-selectin and GPIIb-IIIa“. In: *British Journal of Cancer* 77.12 (1998), S. 2069–2075.
- [109] Cui-Ling Qi et al. „P-selectin-mediated platelet adhesion promotes the metastasis of murine melanoma cells“. In: *PloS one* 9.3 (2014), e91320.
- [110] L. Borsig et al. „Synergistic effects of L- and P-selectin in facilitating tumor metastasis can involve non-mucin ligands and implicate leukocytes as enhancers of metastasis“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99.4 (2002), S. 2193–2198.
- [111] Zhiqiang Yue et al. „Holothurian glycosaminoglycan inhibits metastasis via inhibition of P-selectin in B16F10 melanoma cells“. In: *Molecular and cellular biochemistry* 410.1-2 (2015), S. 143–154.
- [112] A. Rahman et al. „E-selectin expression in human endothelial cells by TNF-alpha-induced oxidant generation and NF-kappaB activation“. In: *The American journal of physiology* 275.3 (1998), S. L533–44.
- [113] Alexander Zarbock et al. „Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow“. In: *Blood* 118.26 (2011), S. 6743–6751.
- [114] Klaus Ley et al. „Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated“. In: *Nature reviews. Immunology* 7.9 (2007), S. 678–689.

- [115] Ulrich Richter et al. „Adhesion of small cell lung cancer cells to E- and P-selectin under physiological flow conditions: implications for metastasis formation“. In: *Histochemistry and cell biology* 135.5 (2011), S. 499–512.
- [116] Sayeda Yasmin-Karim et al. „E-selectin ligand-1 controls circulating prostate cancer cell rolling/adhesion and metastasis“. In: *Oncotarget* 5.23 (2014), S. 12097–12110.
- [117] Yoshihiro Morita et al. „E-selectin Targeting PEGylated-thioaptamer Prevents Breast Cancer Metastases“. In: *Molecular therapy. Nucleic acids* 5.12 (2016), e399.
- [118] P-L Tremblay, F. A. Auger und J. Huot. „Regulation of transendothelial migration of colon cancer cells by E-selectin-mediated activation of p38 and ERK MAP kinases“. In: *Oncogene* 25.50 (2006), S. 6563–6573.
- [119] Ke Zen et al. „CD44v4 is a major E-selectin ligand that mediates breast cancer cell transendothelial migration“. In: *PloS one* 3.3 (2008), e1826.
- [120] Irina Häuselmann et al. „Monocyte Induction of E-Selectin-Mediated Endothelial Activation Releases VE-Cadherin Junctions to Promote Tumor Cell Extravasation in the Metastasis Cascade“. In: *Cancer Research* 76.18 (2016), S. 5302–5312.
- [121] M. E. Hemler et al. „Characterization of the cell surface heterodimer VLA-4 and related peptides“. In: *Journal of Biological Chemistry* 262.24 (1987), S. 11478–11485.
- [122] Andrew D. Luster, Ronen Alon und Ulrich H. von Andrian. „Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets“. In: *Nature immunology* 6.12 (2005), S. 1182–1190.
- [123] Mariano J. Elices et al. „VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/Fibronectin binding site“. In: *Cell* 60.4 (1990), S. 577–584.
- [124] Y. Shimizu et al. „Costimulation of proliferative responses of resting CD4+ T cells by the interaction of VLA-4 and VLA-5 with fibronectin or VLA-6 with laminin“. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 145.1 (1990), S. 59–67.
- [125] K. J. Bayless et al. „Osteopontin is a ligand for the alpha4beta1 integrin“. In: *Journal of Cell Science* 111 ( Pt 9) (1998), S. 1165–1174.
- [126] Lance C. Bridges, Dean Sheppard und Ron D. Bowditch. „ADAM disintegrin-like domain recognition by the lymphocyte integrins alpha4beta1 and alpha4beta7“. In: *The Biochemical journal* 387.Pt 1 (2005), S. 101–108.
- [127] Joan M. Cook-Mills, Michelle E. Marchese und Hiam Abdala-Valencia. „Vascular cell adhesion molecule-1 expression and signaling during disease: regulation by reactive oxygen species and antioxidants“. In: *Antioxidants & Redox Signaling* 15.6 (2011), S. 1607–1638.
- [128] Laurelee Osborn et al. „Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes“. In: *Cell* 59.6 (1989), S. 1203–1211.

- [129] G. Haraldsen et al. „Cytokine-regulated expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human microvascular endothelial cells“. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 156.7 (1996), S. 2558–2565.
- [130] D. B. Taichman et al. „Tumor cell surface alpha 4 beta 1 integrin mediates adhesion to vascular endothelium: demonstration of an interaction with the N-terminal domains of INCAM-110/VCAM-1“. In: *Cell regulation* 2.5 (1991), S. 347–355.
- [131] Y. Tomita et al. „Possible significance of VLA-4 (alpha 4 beta 1) for hematogenous metastasis of renal-cell cancer“. In: *International Journal of Cancer* 60.6 (1995), S. 753–758.
- [132] Sofiane Berrazouane et al. „VLA-4 Induces Chemoresistance of T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Cells via PYK2-Mediated Drug Efflux“. In: *Cancers* 13.14 (2021).
- [133] Martin Klemke et al. „High affinity interaction of integrin alpha4beta1 (VLA-4) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) enhances migration of human melanoma cells across activated endothelial cell layers“. In: *Journal of Cellular Physiology* 212.2 (2007), S. 368–374.
- [134] Qing Chen, Xiang H-F Zhang und Joan Massagué. „Macrophage binding to receptor VCAM-1 transmits survival signals in breast cancer cells that invade the lungs“. In: *Cancer Cell* 20.4 (2011), S. 538–549.
- [135] Dan Zhang et al. „VCAM1 Promotes Tumor Cell Invasion and Metastasis by Inducing EMT and Transendothelial Migration in Colorectal Cancer“. In: *Frontiers in Oncology* 10 (2020), S. 1066.
- [136] K. Noborio-Hatano et al. „Bortezomib overcomes cell-adhesion-mediated drug resistance through downregulation of VLA-4 expression in multiple myeloma“. In: *Oncogene* 28.2 (2009), S. 231–242.
- [137] Rosandra N. Kaplan et al. „VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche“. In: *Nature* 438.7069 (2005), S. 820–827.
- [138] F. QIAN. „Expression of the integrin  $\alpha_4\beta_1$  on melanoma cells can inhibit the invasive stage of metastasis formation“. In: *Cell* 77.3 (1994), S. 335–347.
- [139] Johannes Riegler et al. „VCAM-1 Density and Tumor Perfusion Predict T-cell Infiltration and Treatment Response in Preclinical Models“. In: *Neoplasia (New York, N.Y.)* 21.10 (2019), S. 1036–1050.
- [140] Alexandre Corthay. „Does the immune system naturally protect against cancer?“ In: *Frontiers in immunology* 5 (2014), S. 197.
- [141] Fran Balkwill und Alberto Mantovani. „Inflammation and cancer: back to Virchow?“ In: *The Lancet* 357.9255 (2001), S. 539–545.

- [142] Laurent Beaugerie et al. „Risk of colorectal high-grade dysplasia and cancer in a prospective observational cohort of patients with inflammatory bowel disease“. In: *Gastroenterology* 145.1 (2013), 166–175.e8.
- [143] Xin Liu et al. „Chronic Inflammation-Related HPV: A Driving Force Speeds Oropharyngeal Carcinogenesis“. In: *PloS one* 10.7 (2015), e0133681.
- [144] W. B. Coley. „The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893“. In: *Clinical orthopaedics and related research* 262 (1991), S. 3–11.
- [145] Pankita H. Pandya et al. „The Immune System in Cancer Pathogenesis: Potential Therapeutic Approaches“. In: *Journal of immunology research* 2016 (2016), S. 4273943.
- [146] Hugo Gonzalez, Catharina Hagerling und Zena Werb. „Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression“. In: *Genes & Development* 32.19-20 (2018), S. 1267–1284.
- [147] Louise M. E. Janssen et al. „The immune system in cancer metastasis: friend or foe?“ In: *Journal for immunotherapy of cancer* 5.1 (2017), S. 79.
- [148] Jiuyang Liu et al. „New insights into M1/M2 macrophages: key modulators in cancer progression“. In: *Cancer cell international* 21.1 (2021), S. 389.
- [149] Jinfang Zhu und William E. Paul. „CD4 T cells: fates, functions, and faults“. In: *Blood* 112.5 (2008), S. 1557–1569.
- [150] Jean S. Marshall et al. „An introduction to immunology and immunopathology“. In: *Allergy, asthma, and clinical immunology : official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology* 14.Suppl 2 (2018), S. 49.
- [151] Ronald N. Germain. „T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision“. In: *Nature reviews. Immunology* 2.5 (2002), S. 309–322.
- [152] Francesco Annunziato et al. „Human Th1 dichotomy: origin, phenotype and biologic activities“. In: *Immunology* (2014).
- [153] Jennifer A. Walker und Andrew N. J. McKenzie. „TH2 cell development and function“. In: *Nature reviews. Immunology* 18.2 (2018), S. 121–133.
- [154] Angelika Schmidt, Nina Oberle und Peter H. Krammer. „Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression“. In: *Frontiers in immunology* 3 (2012), S. 51.
- [155] Xiaoliang Zhu und Jinfang Zhu. „CD4 T Helper Cell Subsets and Related Human Immunological Disorders“. In: *International Journal of Molecular Sciences* 21.21 (2020).
- [156] Jing Chen et al. „T Helper 9 Cells: A New Player in Immune-Related Diseases“. In: *DNA and cell biology* 38.10 (2019), S. 1040–1047.
- [157] Paula Licona-Limón et al. „Th9 Cells Drive Host Immunity against Gastrointestinal Worm Infection“. In: *Immunity* 39.4 (2013), S. 744–757.

- [158] Qi Jiang et al. „Role of Th22 Cells in the Pathogenesis of Autoimmune Diseases“. In: *Frontiers in immunology* 12 (2021), S. 688066.
- [159] Wolf Herman Fridman et al. „The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome“. In: *Nature reviews. Cancer* 12.4 (2012), S. 298–306.
- [160] Sabine Hoepner et al. „Synergy between CD8 T cells and Th1 or Th2 polarised CD4 T cells for adoptive immunotherapy of brain tumours“. In: *PloS one* 8.5 (2013), e63933.
- [161] Lucia de Monte et al. „Intratumor T helper type 2 cell infiltrate correlates with cancer-associated fibroblast thymic stromal lymphopoietin production and reduced survival in pancreatic cancer“. In: *The Journal of experimental medicine* 208.3 (2011), S. 469–478.
- [162] Min Dai et al. „Tumor Regression and Cure Depends on Sustained Th1 Responses“. In: *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)* 41.8 (2018), S. 369–378.
- [163] Hideyuki Ubukata et al. „Evaluations of interferon- $\gamma$  interleukin-4 ratio and neutrophil/lymphocyte ratio as prognostic indicators in gastric cancer patients“. In: *Journal of Surgical Oncology* 102.7 (2010), S. 742–747.
- [164] Tomoyo Kusuda et al. „Relative expression levels of Th1 and Th2 cytokine mRNA are independent prognostic factors in patients with ovarian cancer“. In: *ONCOLOGY REPORTS* (2005).
- [165] T. Nishimura et al. „Distinct role of antigen-specific T helper type 1 (Th1) and Th2 cells in tumor eradication in vivo“. In: *Journal of Experimental Medicine* 190.5 (1999), S. 617–627.
- [166] Kristina Berg Lorvik et al. „Adoptive Transfer of Tumor-Specific Th2 Cells Eradicates Tumors by Triggering an In Situ Inflammatory Immune Response“. In: *Cancer Research* 76.23 (2016), S. 6864–6876.
- [167] Rahul Purwar et al. „Robust tumor immunity to melanoma mediated by interleukin-9-producing T cells“. In: *Nature medicine* 18.8 (2012), S. 1248–1253.
- [168] Yong Lu et al. „Th9 Cells Represent a Unique Subset of CD4<sup>+</sup> T Cells Endowed with the Ability to Eradicate Advanced Tumors“. In: *Cancer Cell* 33.6 (2018), 1048–1060.e7.
- [169] Yong Lu et al. „Th9 cells promote antitumor immune responses in vivo“. In: *The Journal of clinical investigation* 122.11 (2012), S. 4160–4171.
- [170] Sushant Kumar et al. „The Th9 Axis Reduces the Oxidative Stress and Promotes the Survival of Malignant T Cells in Cutaneous T-Cell Lymphoma Patients“. In: *Molecular cancer research : MCR* 18.4 (2020), S. 657–668.
- [171] Li-Li Feng et al. „IL-9 contributes to immunosuppression mediated by regulatory T cells and mast cells in B-cell non-hodgkin’s lymphoma“. In: *Journal of clinical immunology* 31.6 (2011), S. 1084–1094.

- [172] Ylia Salazar et al. „Microenvironmental Th9 and Th17 lymphocytes induce metastatic spreading in lung cancer“. In: *The Journal of clinical investigation* 130.7 (2020), S. 3560–3575.
- [173] Zahra Asadzadeh et al. „The paradox of Th17 cell functions in tumor immunity“. In: *Cellular immunology* 322 (2017), S. 15–25.
- [174] Jiankun Liu et al. „IL-17 is associated with poor prognosis and promotes angiogenesis via stimulating VEGF production of cancer cells in colorectal carcinoma“. In: *Biochemical and biophysical research communications* 407.2 (2011), S. 348–354.
- [175] Pawel Muranski et al. „Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma“. In: *Blood* 112.2 (2008), S. 362–373.
- [176] Amélie Cachot et al. „Tumor-specific cytolytic CD4 T cells mediate immunity against human cancer“. In: *Science advances* 7.9 (2021).
- [177] Dario A. A. Vignali, Lauren W. Collison und Creg J. Workman. „How regulatory T cells work“. In: *Nature reviews. Immunology* 8.7 (2008), S. 523–532.
- [178] Maria A. Curotto de Lafaille und Juan J. Lafaille. „Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor?“ In: *Immunity* 30.5 (2009), S. 626–635.
- [179] Peter Hsu et al. „IL-10 Potentiates Differentiation of Human Induced Regulatory T Cells via STAT3 and Foxo1“. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 195.8 (2015), S. 3665–3674.
- [180] Victoria C. Liu et al. „Tumor evasion of the immune system by converting CD4+CD25- T cells into CD4+CD25+ T regulatory cells: role of tumor-derived TGF-beta“. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 178.5 (2007), S. 2883–2892.
- [181] Bin Shang et al. „Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis“. In: *Scientific reports* 5 (2015), S. 15179.
- [182] Anna Śledzińska et al. „Regulatory T Cells Restrain Interleukin-2- and Blimp-1-Dependent Acquisition of Cytotoxic Function by CD4+ T Cells“. In: *Immunity* 52.1 (2020), 151–166.e6.
- [183] Takatoshi Chinen et al. „An essential role for the IL-2 receptor in Treg cell function“. In: *Nature immunology* 17.11 (2016), S. 1322–1333.
- [184] Alice McNally et al. „CD4+CD25+ regulatory T cells control CD8+ T-cell effector differentiation by modulating IL-2 homeostasis“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108.18 (2011), S. 7529–7534.
- [185] Lauren W. Collison et al. „The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function“. In: *Nature* 450.7169 (2007), S. 566–569.
- [186] C. Andrew Stewart et al. „Interferon-dependent IL-10 production by Tregs limits tumor Th17 inflammation“. In: *The Journal of clinical investigation* 123.11 (2013), S. 4859–4874.

- [187] Kazuhiko Nakamura et al. „TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice“. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 172.2 (2004), S. 834–842.
- [188] Mei-Ling Chen et al. „Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF-beta signals in vivo“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102.2 (2005), S. 419–424.
- [189] François Ghiringhelli et al. „CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner“. In: *Journal of Experimental Medicine* 202.8 (2005), S. 1075–1085.
- [190] Tomasz Maj et al. „Oxidative stress controls regulatory T cell apoptosis and suppressor activity and PD-L1-blockade resistance in tumor“. In: *Nature immunology* 18.12 (2017), S. 1332–1341.
- [191] Xuefang Cao et al. „Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance“. In: *Immunity* 27.4 (2007), S. 635–646.
- [192] Murat Tekguc et al. „Treg-expressed CTLA-4 depletes CD80/CD86 by trogocytosis, releasing free PD-L1 on antigen-presenting cells“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 118.30 (2021).
- [193] Ching-Tai Huang et al. „Role of LAG-3 in regulatory T cells“. In: *Immunity* 21.4 (2004), S. 503–513.
- [194] Michael St Paul und Pamela S. Ohashi. „The Roles of CD8+ T Cell Subsets in Antitumor Immunity“. In: *Trends in cell biology* 30.9 (2020), S. 695–704.
- [195] Shota Shimizu et al. „Tumor-infiltrating CD8+ T-cell density is an independent prognostic marker for oral squamous cell carcinoma“. In: *Cancer Medicine* 8.1 (2019), S. 80–93.
- [196] Sahar M. A. Mahmoud et al. „Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer“. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29.15 (2011), S. 1949–1955.
- [197] Feng Li et al. „The association between CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and the clinical outcome of cancer immunotherapy: A systematic review and meta-analysis“. In: *EClinicalMedicine* 41 (2021), S. 101134.
- [198] Jamie A. Lopez et al. „Perforin forms transient pores on the target cell plasma membrane to facilitate rapid access of granzymes during killer cell attack“. In: *Blood* 121.14 (2013), S. 2659–2668.
- [199] Mark J. Smyth, Shayna E. A. Street und Joseph A. Trapani. „Cutting edge: granzymes A and B are not essential for perforin-mediated tumor rejection“. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 171.2 (2003), S. 515–518.

- [200] Reena V. Saini et al. „Granulysin delivered by cytotoxic cells damages endoplasmic reticulum and activates caspase-7 in target cells“. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 186.6 (2011), S. 3497–3504.
- [201] Lisa P. Huang et al. „Granulysin-mediated tumor rejection in transgenic mice“. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 178.1 (2007), S. 77–84.
- [202] Darren I. O’Brien et al. „Targeting the Fas/Fas ligand pathway in cancer“. In: *Expert opinion on therapeutic targets* 9.5 (2005), S. 1031–1044.
- [203] B. Lowin et al. „Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways“. In: *Nature* 370.6491 (1994), S. 650–652.
- [204] Naoko Seki et al. „Tumor-specific CTL kill murine renal cancer cells using both perforin and Fas ligand-mediated lysis in vitro, but cause tumor regression in vivo in the absence of perforin“. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 168.7 (2002), S. 3484–3492.
- [205] Sheila A. Caldwell et al. „The Fas/Fas ligand pathway is important for optimal tumor regression in a mouse model of CTL adoptive immunotherapy of experimental CMS4 lung metastases“. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 171.5 (2003), S. 2402–2412.
- [206] Ehsan Razeghian et al. „Harnessing TRAIL-Induced Apoptosis Pathway for Cancer Immunotherapy and Associated Challenges“. In: *Frontiers in immunology* 12 (2021), S. 699746.
- [207] Anne Grosse-Wilde et al. „TRAIL-R deficiency in mice enhances lymph node metastasis without affecting primary tumor development“. In: *Journal of Clinical Investigation* 118.1 (2008), S. 100–110.
- [208] Nadeen Zerafa et al. „Cutting edge: TRAIL deficiency accelerates hematological malignancies“. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 175.9 (2005), S. 5586–5590.
- [209] Ludmila Cardoso Alves et al. „The multifaceted role of TRAIL signaling in cancer and immunity“. In: *The FEBS journal* 288.19 (2021), S. 5530–5554.
- [210] Mengjia Song et al. „Low-Dose IFN- $\gamma$  Induces Tumor Cell Stemness in Tumor Microenvironment of Non-Small Cell Lung Cancer“. In: *Cancer Research* 79.14 (2019), S. 3737–3748.
- [211] Lucy Wall et al. „IFN-gamma induces apoptosis in ovarian cancer cells in vivo and in vitro“. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 9.7 (2003), S. 2487–2496.
- [212] Purnima Bhat et al. „Interferon- $\gamma$  derived from cytotoxic lymphocytes directly enhances their motility and cytotoxicity“. In: *Cell death & disease* 8.6 (2017), e2836.

- [213] Dorothée Duluc et al. „Interferon-gamma reverses the immunosuppressive and protumoral properties and prevents the generation of human tumor-associated macrophages“. In: *International Journal of Cancer* 125.2 (2009), S. 367–373.
- [214] Hong Nie et al. „Phosphorylation of FOXP3 controls regulatory T cell function and is inhibited by TNF- $\alpha$  in rheumatoid arthritis“. In: *Nature medicine* 19.3 (2013), S. 322–328.
- [215] Franz Kratochvill et al. „TNF Counterbalances the Emergence of M2 Tumor Macrophages“. In: *Cell reports* 12.11 (2015), S. 1902–1914.
- [216] Jing Zhu et al. „Nimotuzumab enhances the sensitivity of non-small cell lung cancer cells to tumor necrosis factor- $\alpha$  by inhibiting the nuclear factor- $\kappa$ B signaling pathway“. In: *Experimental and therapeutic medicine* 15.4 (2018), S. 3345–3351.
- [217] Gopal Murugaiyan und Bhaskar Saha. „Protumor vs antitumor functions of IL-17“. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 183.7 (2009), S. 4169–4175.
- [218] Dragica Jorgovanovic et al. „Roles of IFN- $\gamma$  in tumor progression and regression: a review“. In: *Biomarker Research* 8.1 (2020), S. 1–16.
- [219] Anne Montfort et al. „The TNF Paradox in Cancer Progression and Immunotherapy“. In: *Frontiers in immunology* 10 (2019), S. 1818.
- [220] Frank Cichocki, Bartosz Grzywacz und Jeffrey S. Miller. „Human NK Cell Development: One Road or Many?“ In: *Frontiers in immunology* 10 (2019), S. 2078.
- [221] Linda Quatrini et al. „Human NK cells, their receptors and function“. In: *European journal of immunology* 51.7 (2021), S. 1566–1579.
- [222] Lizeth G. Meza Guzman, Narelle Keating und Sandra E. Nicholson. „Natural Killer Cells: Tumor Surveillance and Signaling“. In: *Cancers* 12.4 (2020).
- [223] Shuo Zhang et al. „Prognostic Significance of Tumor-Infiltrating Natural Killer Cells in Solid Tumors: A Systematic Review and Meta-Analysis“. In: *Frontiers in immunology* 11 (2020), S. 1242.
- [224] M. J. Smyth et al. „Perforin is a major contributor to NK cell control of tumor metastasis“. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 162.11 (1999), S. 6658–6662.
- [225] Julián Pardo et al. „Granzymes are essential for natural killer cell-mediated and perfacilitated tumor control“. In: *European journal of immunology* 32.10 (2002), S. 2881–2887.
- [226] Isabel Prager et al. „NK cells switch from granzyme B to death receptor-mediated cytotoxicity during serial killing“. In: *The Journal of experimental medicine* 216.9 (2019), S. 2113–2127.
- [227] Yanting Zhu, Bo Huang und Jue Shi. „Fas ligand and lytic granule differentially control cytotoxic dynamics of natural killer cell against cancer target“. In: *Oncotarget* 7.30 (2016), S. 47163–47172.

- [228] Xinxin Song et al. „Secretory TRAIL-Armed Natural Killer Cell-Based Therapy: In Vitro and In Vivo Colorectal Peritoneal Carcinomatosis Xenograft“. In: *Molecular cancer therapeutics* 15.7 (2016), S. 1591–1601.
- [229] Michael A. Sheard et al. „Membrane-bound TRAIL supplements natural killer cell cytotoxicity against neuroblastoma cells“. In: *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)* 36.5 (2013), S. 319–329.
- [230] Esther Reefman et al. „Cytokine secretion is distinct from secretion of cytotoxic granules in NK cells“. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 184.9 (2010), S. 4852–4862.
- [231] Ruipeng Wang et al. „Natural killer cell-produced IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  induce target cell cytolysis through up-regulation of ICAM-1“. In: *Journal of leukocyte biology* 91.2 (2012), S. 299–309.
- [232] Stefani Spranger, Riyue Bao und Thomas F. Gajewski. „Melanoma-intrinsic  $\beta$ -catenin signalling prevents anti-tumour immunity“. In: *Nature* 523.7559 (2015), S. 231–235.
- [233] Xingcong Ma et al. „Tumor-infiltrating lymphocytes are associated with  $\beta$ -catenin overexpression in breast cancer“. In: *Cancer biomarkers : section A of Disease markers* 21.3 (2018), S. 639–650.
- [234] Gregory T. Motz et al. „Tumor endothelium FasL establishes a selective immune barrier promoting tolerance in tumors“. In: *Nature medicine* 20.6 (2014), S. 607–615.
- [235] Isabel Maleno et al. „Distribution of HLA class I altered phenotypes in colorectal carcinomas: high frequency of HLA haplotype loss associated with loss of heterozygosity in chromosome region 6p21“. In: *Immunogenetics* 56.4 (2004).
- [236] Markus Meissner et al. „Defects in the human leukocyte antigen class I antigen processing machinery in head and neck squamous cell carcinoma: association with clinical outcome“. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 11.7 (2005), S. 2552–2560.
- [237] L. A. Koopman et al. „Multiple genetic alterations cause frequent and heterogeneous human histocompatibility leukocyte antigen class I loss in cervical cancer“. In: *Journal of Experimental Medicine* 191.6 (2000), S. 961–976.
- [238] Sreya Bagchi, Robert Yuan und Edgar G. Engleman. „Immune Checkpoint Inhibitors for the Treatment of Cancer: Clinical Impact and Mechanisms of Response and Resistance“. In: *Annual review of pathology* 16 (2021), S. 223–249.
- [239] Vikram R. Juneja et al. „PD-L1 on tumor cells is sufficient for immune evasion in immunogenic tumors and inhibits CD8 T cell cytotoxicity“. In: *The Journal of experimental medicine* 214.4 (2017), S. 895–904.
- [240] D. R. Leach, M. F. Krummel und J. P. Allison. „Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade“. In: *Science (New York, N. Y.)* 271.5256 (1996), S. 1734–1736.

- [241] Iñigo Tirapu et al. „Low surface expression of B7-1 (CD80) is an immunoescape mechanism of colon carcinoma“. In: *Cancer Research* 66.4 (2006), S. 2442–2450.
- [242] Julian A. Marin-Acevedo, ErinMarie O. Kimbrough und Yanyan Lou. „Next generation of immune checkpoint inhibitors and beyond“. In: *Journal of hematology & oncology* 14.1 (2021), S. 45.
- [243] Zhangguo Chen et al. „CEACAM1 dampens antitumor immunity by down-regulating NKG2D ligand expression on tumor cells“. In: *The Journal of experimental medicine* 208.13 (2011), S. 2633–2640.
- [244] Cyd Soriano et al. „Increased proteinase inhibitor-9 (PI-9) and reduced granzyme B in lung cancer: mechanism for immune evasion?“ In: *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 77.1 (2012), S. 38–45.
- [245] Kristina Fritsch, Jürgen Finke und Carsten Grüllich. „Suppression of granzyme B activity and caspase-3 activation in leukaemia cells constitutively expressing the protease inhibitor 9“. In: *Annals of hematology* 92.12 (2013), S. 1603–1609.
- [246] Joan Seoane und Roger R. Gomis. „TGF- $\beta$  Family Signaling in Tumor Suppression and Cancer Progression“. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 9.12 (2017).
- [247] Zheng Li et al. „Tumor-derived transforming growth factor- $\beta$  is critical for tumor progression and evasion from immune surveillance“. In: *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 15.13 (2014), S. 5181–5186.
- [248] June-Chul Lee et al. „Elevated TGF-beta1 secretion and down-modulation of NKG2D underlies impaired NK cytotoxicity in cancer patients“. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 172.12 (2004), S. 7335–7340.
- [249] R. H. Rouce et al. „The TGF- $\beta$ /SMAD pathway is an important mechanism for NK cell immune evasion in childhood B-acute lymphoblastic leukemia“. In: *Leukemia* 30.4 (2016), S. 800–811.
- [250] James J. Kobie et al. „Transforming growth factor beta inhibits the antigen-presenting functions and antitumor activity of dendritic cell vaccines“. In: *Cancer Research* 63.8 (2003), S. 1860–1864.
- [251] Shuai Zhao et al. „Serum IL-10 Predicts Worse Outcome in Cancer Patients: A Meta-Analysis“. In: *PloS one* 10.10 (2015), e0139598.
- [252] S. Fujii et al. „Interleukin-10 promotes the maintenance of antitumor CD8(+) T-cell effector function in situ“. In: *Blood* 98.7 (2001), S. 2143–2151.
- [253] Eijun Itakura et al. „IL-10 expression by primary tumor cells correlates with melanoma progression from radial to vertical growth phase and development of metastatic competence“. In: *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 24.6 (2011), S. 801–809.

- [254] J. Zhou et al. „The expression of interleukin-10 in patients with primary ovarian epithelial carcinoma and in ovarian carcinoma cell lines“. In: *The Journal of international medical research* 35.3 (2007), S. 290–300.
- [255] Jian Qiao et al. „Targeting Tumors with IL-10 Prevents Dendritic Cell-Mediated CD8+ T Cell Apoptosis“. In: *Cancer Cell* 35.6 (2019), 901–915.e4.
- [256] Zixi Wang et al. „IL-10 Enhances Human Natural Killer Cell Effector Functions via Metabolic Reprogramming Regulated by mTORC1 Signaling“. In: *Frontiers in immunology* 12 (2021), S. 619195.
- [257] Sara S. Alhakeem et al. „Chronic Lymphocytic Leukemia-Derived IL-10 Suppresses Antitumor Immunity“. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 200.12 (2018), S. 4180–4189.
- [258] Naoyuki Makita et al. „IL-10 enhances the phenotype of M2 macrophages induced by IL-4 and confers the ability to increase eosinophil migration“. In: *International immunology* 27.3 (2015), S. 131–141.
- [259] Donghyun Kim et al. „Ubiquitin E3 Ligase Pellino-1 Inhibits IL-10-mediated M2c Polarization of Macrophages, Thereby Suppressing Tumor Growth“. In: *Immune network* 19.5 (2019), e32.
- [260] Valentina Vultaggio-Poma, Alba Clara Sarti und Francesco Di Virgilio. „Extracellular ATP: A Feasible Target for Cancer Therapy“. In: *Cells* 9.11 (2020).
- [261] Silvia Deaglio et al. „Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression“. In: *Journal of Experimental Medicine* 204.6 (2007), S. 1257–1265.
- [262] Alexandra Giatromanolaki et al. „Ectonucleotidase CD73 and CD39 expression in non-small cell lung cancer relates to hypoxia and immunosuppressive pathways“. In: *Life sciences* 259 (2020), S. 118389.
- [263] Akio Ohta et al. „The development and immunosuppressive functions of CD4(+) CD25(+) FoxP3(+) regulatory T cells are under influence of the adenosine-A2A adenosine receptor pathway“. In: *Frontiers in immunology* 3 (2012), S. 190.
- [264] Itsaso Del Montalbán Barrio et al. „Adenosine-generating ovarian cancer cells attract myeloid cells which differentiate into adenosine-generating tumor associated macrophages - a self-amplifying, CD39- and CD73-dependent mechanism for tumor immune escape“. In: *Journal for immunotherapy of cancer* 4 (2016), S. 49.
- [265] Beatris Mastelic-Gavillet et al. „Adenosine mediates functional and metabolic suppression of peripheral and tumor-infiltrating CD8+ T cells“. In: *Journal for immunotherapy of cancer* 7.1 (2019), S. 257.

- [266] Arabella Young et al. „A2AR Adenosine Signaling Suppresses Natural Killer Cell Maturation in the Tumor Microenvironment“. In: *Cancer Research* 78.4 (2018), S. 1003–1016.
- [267] Kim L. Clar et al. „Inhibition of NK Reactivity Against Solid Tumors by Platelet-Derived RANKL“. In: *Cancers* 11.3 (2019).
- [268] Stefanie Maurer et al. „Platelet-mediated shedding of NKG2D ligands impairs NK cell immune-surveillance of tumor cells“. In: *Oncoimmunology* 7.2 (2018), e1364827.
- [269] Alexander B. Zaslavsky et al. „Platelet PD-L1 suppresses anti-cancer immune cell activity in PD-L1 negative tumors“. In: *Scientific reports* 10.1 (2020), S. 19296.
- [270] Tayebeh Youssefian et al. „Host defense role of platelets: engulfment of HIV and Staphylococcus aureus occurs in a specific subcellular compartment and is enhanced by platelet activation“. In: *Blood* 99.11 (2002), S. 4021–4029.
- [271] J. Krijgsveld et al. „Thrombocidins, microbicidal proteins from human blood platelets, are C-terminal deletion products of CXC chemokines“. In: *Journal of Biological Chemistry* 275.27 (2000), S. 20374–20381.
- [272] Lei Yue et al. „CXCL4 contributes to host defense against acute Pseudomonas aeruginosa lung infection“. In: *PloS one* 13.10 (2018), e0205521.
- [273] Thauane Silva et al. „The Chemokine CCL5 Inhibits the Replication of Influenza A Virus Through SAMHD1 Modulation“. In: *Frontiers in cellular and infection microbiology* 11 (2021), S. 549020.
- [274] Bjoern F. Kraemer et al. „Novel anti-bacterial activities of  $\beta$ -defensin 1 in human platelets: suppression of pathogen growth and signaling of neutrophil extracellular trap formation“. In: *PLoS pathogens* 7.11 (2011), e1002355.
- [275] Y. Q. Xiong, M. R. Yeaman und A. S. Bayer. „In vitro antibacterial activities of platelet microbicidal protein and neutrophil defensin against Staphylococcus aureus are influenced by antibiotics differing in mechanism of action“. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 43.5 (1999), S. 1111–1117.
- [276] Maryam F. Salamah et al. „The endogenous antimicrobial cathelicidin LL37 induces platelet activation and augments thrombus formation“. In: *Blood Advances* 2.21 (2018), S. 2973–2985.
- [277] Diana Gaspar et al. „Apoptotic human neutrophil peptide-1 anti-tumor activity revealed by cellular biomechanics“. In: *Biochimica et biophysica acta* 1853.2 (2015), S. 308–316.
- [278] Carrie Q. Sun et al. „Discovery and mechanisms of host defense to oncogenesis: targeting the  $\beta$ -defensin-1 peptide as a natural tumor inhibitor“. In: *Cancer biology & therapy* 20.6 (2019), S. 774–786.

- [279] Kazuhiko Okumura et al. „C-terminal domain of human CAP18 antimicrobial peptide induces apoptosis in oral squamous cell carcinoma SAS-H1 cells“. In: *Cancer letters* 212.2 (2004), S. 185–194.
- [280] Shun X. Ren et al. „Host immune defense peptide LL-37 activates caspase-independent apoptosis and suppresses colon cancer“. In: *Cancer Research* 72.24 (2012), S. 6512–6523.
- [281] Huidan Zhang et al. „Cathelicidin hCAP18/LL-37 promotes cell proliferation and suppresses antitumor activity of 1,25(OH)2D3 in hepatocellular carcinoma“. In: *Cell death discovery* 8.1 (2022), S. 27.
- [282] Ewelina Piktel et al. „The Role of Cathelicidin LL-37 in Cancer Development“. In: *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 64.1 (2016), S. 33–46.
- [283] Kamil Karolczak und Cezary Watala. „Blood Platelets as an Important but Underrated Circulating Source of TGF- $\beta$ “. In: *International Journal of Molecular Sciences* 22.9 (2021).
- [284] Dipica Haribhai et al. „TGF- $\beta$ 1 along with other platelet contents augments Treg cells to suppress anti-FVIII immune responses in hemophilia A mice“. In: *Blood Advances* 1.2 (2016), S. 139–151.
- [285] L. Zhu et al. „Platelets provoke distinct dynamics of immune responses by differentially regulating CD4+ T-cell proliferation“. In: *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 12.7 (2014), S. 1156–1165.
- [286] Saleh Rachidi et al. „Platelets subvert T cell immunity against cancer via GARP-TGF- $\beta$  axis“. In: *Science immunology* 2.11 (2017).
- [287] Fan Zhang et al. „TGF- $\beta$  induces M2-like macrophage polarization via SNAIL-mediated suppression of a pro-inflammatory phenotype“. In: *Oncotarget* 7.32 (2016), S. 52294–52306.
- [288] Ilona Kryczek et al. „Endogenous IL-17 contributes to reduced tumor growth and metastasis“. In: *Blood* 114.2 (2009), S. 357–359.
- [289] Guanfang Shi et al. „Platelet factor 4 limits Th17 differentiation and cardiac allograft rejection“. In: *The Journal of clinical investigation* 124.2 (2014), S. 543–552.
- [290] Alison Crawford et al. „A role for the chemokine RANTES in regulating CD8 T cell responses during chronic viral infection“. In: *PLoS pathogens* 7.7 (2011), e1002098.
- [291] P. von Hundelshausen et al. „RANTES deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium“. In: *Circulation* 103.13 (2001), S. 1772–1777.
- [292] Silvio Danese et al. „Cutting edge: T cells trigger CD40-dependent platelet activation and granular RANTES release: a novel pathway for immune response amplification“. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 172.4 (2004), S. 2011–2015.
- [293] Bennett D. Elzey et al. „Platelet-Mediated Modulation of Adaptive Immunity“. In: *Immunity* 19.1 (2003), S. 9–19.

- [294] Meggan Czapiga, Allan D. Kirk und Julie Lekstrom-Himes. „Platelets deliver costimulatory signals to antigen-presenting cells: a potential bridge between injury and immune activation“. In: *Experimental Hematology* 32.2 (2004), S. 135–139.
- [295] Matteo Iannacone et al. „Platelets prevent IFN-alpha/beta-induced lethal hemorrhage promoting CTL-dependent clearance of lymphocytic choriomeningitis virus“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105.2 (2008), S. 629–634.
- [296] Fabrice Cognasse et al. „Human platelets can activate peripheral blood B cells and increase production of immunoglobulins“. In: *Experimental Hematology* 35.9 (2007), S. 1376–1387.
- [297] Admar Verschoor et al. „A platelet-mediated system for shuttling blood-borne bacteria to CD8 $\alpha$ + dendritic cells depends on glycoprotein GPIb and complement C3“. In: *Nature immunology* 12.12 (2011), S. 1194–1201.
- [298] Jan Rossaint et al. „Directed transport of neutrophil-derived extracellular vesicles enables platelet-mediated innate immune response“. In: *Nature Communications* 7 (2016), S. 13464.
- [299] Jan Rossaint et al. „Platelets orchestrate the resolution of pulmonary inflammation in mice by T reg cell repositioning and macrophage education“. In: *The Journal of experimental medicine* 218.7 (2021).
- [300] Daniel Duerschmied, Christoph Bode und Ingo Ahrens. „Immune functions of platelets“. In: *Thrombosis and Haemostasis* 112.4 (2014), S. 678–691.
- [301] Anders Erik Astrup Dahm. „Cancer and Thrombosis: New Treatments, New Challenges“. In: *Medical sciences (Basel, Switzerland)* 9.2 (2021).
- [302] Frits I. Mulder et al. „The Khorana score for prediction of venous thromboembolism in cancer patients: a systematic review and meta-analysis“. In: *Haematologica* 104.6 (2019), S. 1277–1287.
- [303] John A. Heit et al. „Relative impact of risk factors for deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population-based study“. In: *Archives of Internal Medicine* 162.11 (2002), S. 1245–1248.
- [304] Agnes Y. Y. Lee et al. „Low-molecular-weight heparin versus a coumarin for the prevention of recurrent venous thromboembolism in patients with cancer“. In: *The New England journal of medicine* 349.2 (2003), S. 146–153.
- [305] Agnes Y. Y. Lee et al. „Tinzaparin vs Warfarin for Treatment of Acute Venous Thromboembolism in Patients With Active Cancer: A Randomized Clinical Trial“. In: *JAMA* 314.7 (2015), S. 677–686.
- [306] Giancarlo Agnelli et al. „Apixaban for the Treatment of Venous Thromboembolism Associated with Cancer“. In: *The New England journal of medicine* 382.17 (2020), S. 1599–1607.

- [307] Agnes Y. Y. Lee et al. „Randomized comparison of low molecular weight heparin and coumarin derivatives on the survival of patients with cancer and venous thromboembolism“. In: *Journal of Clinical Oncology* 23.10 (2005), S. 2123–2129.
- [308] Clara P.W. Klerk et al. „The Effect of Low Molecular Weight Heparin on Survival in Patients With Advanced Malignancy“. In: *Journal of Clinical Oncology* 23.10 (2005), S. 2130–2135.
- [309] Uwe Pelzer et al. „Efficacy of Prophylactic Low-Molecular Weight Heparin for Ambulatory Patients With Advanced Pancreatic Cancer: Outcomes From the CONKO-004 Trial“. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 33.18 (2015), S. 2028–2034.
- [310] Fergus Macbeth et al. „Randomized Phase III Trial of Standard Therapy Plus Low Molecular Weight Heparin in Patients With Lung Cancer: FRAGMENT Trial“. In: *Journal of Clinical Oncology* 34.5 (2016), S. 488–494.
- [311] Guy Meyer et al. „Anti-tumour effect of low molecular weight heparin in localised lung cancer: a phase III clinical trial“. In: *The European respiratory journal* 52.4 (2018).
- [312] L. Ek et al. „[Duplikat] Randomized phase III trial of low-molecular-weight heparin enoxaparin in addition to standard treatment in small-cell lung cancer: the RASTEN trial“. In: *Annals of Oncology* 29.2 (2018), S. 398–404.
- [313] J. Mclean. „The Discovery of Heparin“. In: *Circulation* 19.1 (1959), S. 75–78.
- [314] Rebecca Lever, Barbara Mulloy und Clive P. Page. *Heparin - A Century of Progress*. Bd. 207. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2012.
- [315] Dallas L. Rabenstein. „Heparin and heparan sulfate: structure and function“. In: *Nat. Prod. Rep.* 19.3 (2002), S. 312–331.
- [316] Elaine Gray, Barbara Mulloy und Trevor W. Barrowcliffe. „Heparin and low-molecular-weight heparin“. In: *Thrombosis and Haemostasis* 99.5 (2008), S. 807–818.
- [317] Gerd Bendas und Lubor Borsig. „Cancer cell adhesion and metastasis: selectins, integrins, and the inhibitory potential of heparins“. In: *International Journal of Cell Biology* 2012 (2012), S. 676731.
- [318] E. Heinmöller et al. „Tumor cell-induced platelet aggregation in vitro by human pancreatic cancer cell lines“. In: *Scandinavian journal of gastroenterology* 30.10 (1995), S. 1008–1016.
- [319] C. A. Ellis et al. „Time course of recovery of endothelial cell surface thrombin receptor (PAR-1) expression“. In: *The American journal of physiology* 276.1 (1999), S. C38–45.
- [320] R. Shankar et al. „Thrombin receptor-activating peptides differentially stimulate platelet-derived growth factor production, monocytic cell adhesion, and E-selectin expression in human umbilical vein endothelial cells“. In: *Journal of Biological Chemistry* 269.19 (1994), S. 13936–13941.

- [321] T. Minami und W. C. Aird. „Thrombin stimulation of the vascular cell adhesion molecule-1 promoter in endothelial cells is mediated by tandem nuclear factor-kappa B and GATA motifs“. In: *Journal of Biological Chemistry* 276.50 (2001), S. 47632–47641.
- [322] John H. Cleator et al. „Differential regulation of endothelial exocytosis of P-selectin and von Willebrand factor by protease-activated receptors and cAMP“. In: *Blood* 107.7 (2006), S. 2736–2744.
- [323] Clemens Feistritzer und Matthias Riewald. „Endothelial barrier protection by activated protein C through PAR1-dependent sphingosine 1-phosphate receptor-1 crossactivation“. In: *Blood* 105.8 (2005), S. 3178–3184.
- [324] Jong-Sup Bae und Alireza R. Rezaie. „Thrombin inhibits nuclear factor  $\kappa$ B and RhoA pathways in cytokine-stimulated vascular endothelial cells when EPCR is occupied by protein C“. In: *Thrombosis and Haemostasis* (2009).
- [325] Daisuke Fujimoto et al. „The activation of Proteinase-Activated Receptor-1 (PAR1) mediates gastric cancer cell proliferation and invasion“. In: *BMC Cancer* 10 (2010), S. 443.
- [326] Ping Jiang et al. „The expression of protease-activated receptors in esophageal carcinoma cells: the relationship between changes in gene expression and cell proliferation, apoptosis in vitro and growing ability in vivo“. In: *Cancer cell international* 18 (2018), S. 81.
- [327] Azhaar Alturkistani et al. „Inhibition of PAR-1 Receptor Signaling by Enoxaparin Reduces Cell Proliferation and Migration in A549 Cells“. In: *ANTICANCER RESEARCH* 39.10 (2019), S. 5297–5310.
- [328] Jian-Guo Wang und Jian-Guo Geng. „Affinity and kinetics of P-selectin binding to heparin“. In: *Thrombosis and Haemostasis* 90.08 (2003), S. 309–316.
- [329] Aaron G. Liebsch und Hermann Schillers. „Quantification of heparin’s antimetastatic effect by single-cell force spectroscopy“. In: *Journal of molecular recognition : JMR* 34.1 (2021), e2854.
- [330] Heinz Läubli et al. „L-selectin facilitation of metastasis involves temporal induction of Fut7-dependent ligands at sites of tumor cell arrest“. In: *Cancer Research* 66.3 (2006), S. 1536–1542.
- [331] R. M. Nelson et al. „Heparin oligosaccharides bind L- and P-selectin and inhibit acute inflammation“. In: *Blood* 82.11 (1993), S. 3253–3258.
- [332] Lianchun Wang et al. „Heparin’s anti-inflammatory effects require glucosamine 6-O-sulfation and are mediated by blockade of L- and P-selectins“. In: *Journal of Clinical Investigation* 110.1 (2002), S. 127–136.
- [333] Juliane Fritzsche, Dirk Simonis und Gerd Bendas. „Melanoma cell adhesion can be blocked by heparin in vitro: Suggestion of VLA-4 as a novel target for antimetastatic approaches“. In: *Thrombosis and Haemostasis* 100.12 (2008), S. 1166–1175.

- [334] Martin Schlesinger et al. „The inhibition of the integrin VLA-4 in MV3 melanoma cell binding by non-anticoagulant heparin derivatives“. In: *Thrombosis Research* 129.5 (2012), S. 603–610.
- [335] Martin Schlesinger et al. „Binding between heparin and the integrin VLA-4“. In: *Thrombosis and Haemostasis* 102.5 (2009), S. 816–822.
- [336] ChunMei Zhang et al. „Modified heparins inhibit integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  mediated adhesion of melanoma cells to platelets in vitro and in vivo“. In: *International Journal of Cancer* 125.9 (2009), S. 2058–2065.
- [337] Tamar Zahavi et al. „Heparanase: a potential marker of worse prognosis in estrogen receptor-positive breast cancer“. In: *NPJ breast cancer* 7.1 (2021), S. 67.
- [338] Y. Shinyo et al. „Heparanase expression is an independent prognostic factor in patients with invasive cervical cancer“. In: *Annals of Oncology* 14.10 (2003), S. 1505–1510.
- [339] A. Koliopanos et al. „Heparanase expression in primary and metastatic pancreatic cancer“. In: *Cancer Research* 61.12 (2001), S. 4655–4659.
- [340] Esti Cohen et al. „Heparanase is overexpressed in lung cancer and correlates inversely with patient survival“. In: *Cancer* 113.5 (2008), S. 1004–1011.
- [341] Krishnath M. Jayatileke und Mark D. Hulett. „Heparanase and the hallmarks of cancer“. In: *Journal of translational medicine* 18.1 (2020), S. 453.
- [342] Deirdre R. Coombe und Neha S. Gandhi. „Heparanase: A Challenging Cancer Drug Target“. In: *Frontiers in Oncology* 9 (2019), S. 1316.
- [343] Annamaria Naggi et al. „Modulation of the heparanase-inhibiting activity of heparin through selective desulfation, graded N-acetylation, and glycol splitting“. In: *Journal of Biological Chemistry* 280.13 (2005), S. 12103–12113.
- [344] Oussama Achour et al. „Anti-heparanase activity of ultra-low-molecular-weight heparin produced by physicochemical depolymerization“. In: *Carbohydrate polymers* 135 (2016), S. 316–323.
- [345] Giuliana Cassinelli et al. „Supersulfated low-molecular weight heparin synergizes with IGF1R/IR inhibitor to suppress synovial sarcoma growth and metastases“. In: *Cancer letters* 415 (2018), S. 187–197.
- [346] Giuseppe Cassinelli, Giangiacomo Torri und Annamaria Naggi. „Non-Anticoagulant Heparins as Heparanase Inhibitors“. In: *Advances in experimental medicine and biology* 1221 (2020), S. 493–522.
- [347] Vito Ferro et al. „Discovery of PG545: A Highly Potent and Simultaneous Inhibitor of Angiogenesis, Tumor Growth, and Metastasis“. In: *Journal of Medicinal Chemistry* 55.8 (2012), S. 3804–3813.

- [348] Preeti Singh et al. „The Heparanase Inhibitor PG545 Attenuates Colon Cancer Initiation and Growth, Associating with Increased p21 Expression“. In: *Neoplasia (New York, N.Y.)* 19.3 (2017), S. 175–184.
- [349] Edward Hammond, Ralf Brandt und Keith Dredge. „PG545, a heparan sulfate mimetic, reduces heparanase expression in vivo, blocks spontaneous metastases and enhances overall survival in the 4T1 breast carcinoma model“. In: *PloS one* 7.12 (2012), e52175.
- [350] Elisabeth M. Battinelli et al. „Anticoagulation inhibits tumor cell-mediated release of platelet angiogenic proteins and diminishes platelet angiogenic response“. In: *Blood* 123.1 (2014), S. 101–112.
- [351] Lukas Gockel et al. „The Low Molecular Weight Heparin Tinzaparin Attenuates Platelet Activation in Terms of Metastatic Niche Formation by Coagulation-Dependent and Independent Pathways“. In: *Molecules* 23.11 (2018), S. 2753.
- [352] Jan Moritz Ponert et al. „Unfractionated and Low Molecular Weight Heparin Reduce Platelet Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Pancreatic and Prostate Cancer Cells“. In: *Molecules* 23.10 (2018).
- [353] F. Guo et al. „CXCL12/CXCR4: a symbiotic bridge linking cancer cells and their stromal neighbors in oncogenic communication networks“. In: *Oncogene* 35.7 (2016), S. 816–826.
- [354] Christopher T. Veldkamp et al. „The monomer-dimer equilibrium of stromal cell-derived factor-1 (CXCL 12) is altered by pH, phosphate, sulfate, and heparin“. In: *Protein science : a publication of the Protein Society* 14.4 (2005), S. 1071–1081.
- [355] James R. Harvey et al. „Inhibition of CXCR4-mediated breast cancer metastasis: a potential role for heparinoids?“ In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13.5 (2007), S. 1562–1570.
- [356] Lixin Ma et al. „Modulating the interaction of CXCR4 and CXCL12 by low-molecular-weight heparin inhibits hepatic metastasis of colon cancer“. In: *Investigational new drugs* 30.2 (2012), S. 508–517.
- [357] J. I. Weitz. „Low-molecular-weight heparins“. In: *New England Journal of Medicine* 337.10 (1997), S. 688–698.
- [358] Robert C. Gosselin et al. „Variability of plasma anti-Xa activities with different lots of enoxaparin“. In: *The Annals of pharmacotherapy* 38.4 (2004), S. 563–568.
- [359] Yetti Hernaningsih und Ersya Bayung Maulidan. „Examination of Laboratory for Monitoring Heparin Anticoagulant Therapy“. In: *Anticoagulation Drugs - the Current State of the Art*. Hrsg. von Mina Kelleni. IntechOpen, 2020.
- [360] Guihua Fang und Bo Tang. „Advanced delivery strategies facilitating oral absorption of heparins“. In: *Asian journal of pharmaceutical sciences* 15.4 (2020), S. 449–460.
- [361] Stephen Lanzarotti und John A. Weigelt. „Heparin-induced thrombocytopenia“. In: *The Surgical clinics of North America* 92.6 (2012), S. 1559–1572.

- [362] Andreas Greinacher. „CLINICAL PRACTICE. Heparin-Induced Thrombocytopenia“. In: *The New England journal of medicine* 373.3 (2015), S. 252–261.
- [363] Mary K. Roberts und Susan Chaney. „Heparin-induced Thrombocytopenia“. In: *The Journal for Nurse Practitioners* 14.5 (2018), 402–408.e3.
- [364] Bryan E. Thacker et al. „Multiplex genome editing of mammalian cells for producing recombinant heparin“. In: *Metabolic engineering* 70 (2022), S. 155–165.
- [365] Jan-Ytzen van der Meer, Edwin Kellenbach und Leendert J. van den Bos. „From Farm to Pharma: An Overview of Industrial Heparin Manufacturing Methods“. In: *Molecules* 22.6 (2017).
- [366] Eduardo Vilanova, Ana M. F. Tovar und Paulo A. S. Mourão. „Imminent risk of a global shortage of heparin caused by the African Swine Fever afflicting the Chinese pig herd“. In: *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 17.2 (2019), S. 254–256.
- [367] Sandra Blome, Kati Franzke und Martin Beer. „African swine fever - A review of current knowledge“. In: *Virus research* 287 (2020), S. 198099.
- [368] Rachel P. Rosovsky et al. „When Pigs Fly: A Multidisciplinary Approach to Navigating a Critical Heparin Shortage“. In: *The oncologist* 25.4 (2020), S. 334–347.
- [369] Cyrus Bett et al. „Eliminating Spiked Bovine Spongiform Encephalopathy Agent Activity from Heparin“. In: *Emerging infectious diseases* 26.10 (2020), S. 2478–2480.
- [370] Omozusi Andrews et al. „Processing bovine intestinal mucosa to active heparin removes spiked BSE agent“. In: *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization* 67 (2020), S. 56–61.
- [371] Marco Guerrini et al. „Oversulfated chondroitin sulfate is a contaminant in heparin associated with adverse clinical events“. In: *Nature biotechnology* 26.6 (2008), S. 669–675.
- [372] Takashi Kei Kishimoto et al. „Contaminated heparin associated with adverse clinical events and activation of the contact system“. In: *The New England journal of medicine* 358.23 (2008), S. 2457–2467.
- [373] Tanja Beyer et al. „Composition of OSCS-contaminated heparin occurring in 2008 in batches on the German market“. In: *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 40.4 (2010), S. 297–304.
- [374] Samantha J. Paluck, Thi H. Nguyen und Heather D. Maynard. „Heparin-Mimicking Polymers: Synthesis and Biological Applications“. In: *Biomacromolecules* 17.11 (2016), S. 3417–3440.
- [375] Abdullah Al Nahain et al. „Heparin mimetics with anticoagulant activity“. In: *Medicinal Research Reviews* 38.5 (2018), S. 1582–1613.
- [376] Young in Oh et al. „Tailored Glycopolymers as Anticoagulant Heparin Mimetics“. In: *Angewandte Chemie International Edition* 52.45 (2013), S. 11796–11799.

- [377] Olga V. Zubkova et al. „Dendrimer Heparan Sulfate Glycomimetics: Potent Heparanase Inhibitors for Anticancer Therapy“. In: *ACS Chemical Biology* 13.12 (2018), S. 3236–3242.
- [378] Abdullah Al Nahain et al. „Anticoagulant Heparin Mimetics via RAFT Polymerization“. In: *Biomacromolecules* 21.2 (2020), S. 1009–1021.
- [379] Abdullah Al Nahain et al. „Sulfonated RAFT Copolymers as Heparin Mimetics: Synthesis, Reactivity Ratios, and Anticoagulant Activity“. In: *Macromolecular Bioscience* (2020), S. 2000110.
- [380] Relda Cailleau, Matilde Olivé und Quita V. J. Cruciger. „Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: Preliminary characterization“. In: *In Vitro* 14.11 (1978), S. 911–915.
- [381] Deborah L. Holliday und Valerie Speirs. „Choosing the right cell line for breast cancer research“. In: *Breast Cancer Research* 13.4 (2011).
- [382] Kathryn J. Chavez et al. „Triple negative breast cancer cell lines: One tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer“. In: *Breast Disease* 32.1-2 (2011), S. 35–48.
- [383] Goos N. P. van Muijen et al. „Establishment and characterization of a human melanoma cell line (MV3) which is highly metastatic in nude mice“. In: *International Journal of Cancer* 48.1 (2007), S. 85–91.
- [384] Maria Bethania Rossi Piva. „The impact and underlying molecular mechanisms of cell adhesion molecules integrins and syndecans in the cisplatin chemoresistance of melanoma cells“. Diss. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- [385] C. J. Edgell, C. C. McDonald und J. B. Graham. „Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80.12 (1983), S. 3734–3737.
- [386] Diane Bouis et al. „Endothelium in vitro: A review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research“. In: *Angiogenesis* 4 (2001), S. 91–102.
- [387] Cora-Jean S. Edgell et al. „Endothelium specific Weibel-Palade bodies in a continuous human cell line, EA.hy926“. In: *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 26.12 (1990), S. 1167–1172.
- [388] C. B. Lozzio und B. B. Lozzio. „Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome“. In: *Blood* 45.3 (1975), S. 321–334.
- [389] Bismarck B. Lozzio und Carmen B. Lozzio. „Properties and usefulness of the original K-562 human myelogenous leukemia cell line“. In: *Leukemia Research* 3.6 (1979), S. 363–370.
- [390] G. V. R. Born. „Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal“. In: *Nature* 194 (1962), S. 927–929.

- [391] J. R. O'Brian. „Platelet aggregation: Part II Some results from a new method of study“. In: *Journal of Clinical Pathology* 15.5 (1962), S. 452–455.
- [392] C. Oury et al. „The platelet ATP and ADP receptors“. In: *Current Pharmaceutical Design* 12.7 (2006), S. 859–875.
- [393] G. Kovacs et al. „A love wave sensor for (bio)chemical sensing in liquids“. In: *Sensors and Actuators A: Physical* 43.1-3 (1994), S. 38–43.
- [394] M. Perpeet et al. „SAW Sensor System for Marker-Free Molecular Interaction Analysis“. In: *Analytical Letters* 39.8 (2006), S. 1747–1757.
- [395] Gerd Bendas et al. „A liposome-based model system for the simulation of lectin-induced cell adhesion“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1325.2 (1997), S. 297–308.
- [396] Johan van Meerloo, Gertjan J. L. Kaspers und Jacqueline Cloos. „Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay“. In: *Cancer Cell Culture*. Hrsg. von Ian A. Cree. Bd. 731. Totowa, NJ: Humana Press, 2011, S. 237–245.
- [397] „Fachinformation Clexane® Clexane® multidose. Stand: September 2021. Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland. Zulassungsnummer: 15854.01.00“. In: ().
- [398] Abdullah Al Nahain et al. „Anticoagulant Heparin Mimetics via RAFT Polymerization“. In: *Biomacromolecules* 21.2 (2020), S. 1009–1021.
- [399] G. T. Gerotziakas et al. „Effect of the anti-factor Xa and anti-factor IIa activities of low-molecular-weight heparins upon the phases of thrombin generation“. In: *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 5.5 (2007), S. 955–962.
- [400] Joseph H. Cho et al. „Functional Assessment of Platelet Dense Granule ATP Release“. In: *American Journal of Clinical Pathology* 155.6 (2021), S. 863–872.
- [401] Lili Wang et al. „Optimized bioluminescence analysis of adenosine triphosphate (ATP) released by platelets and its application in the high throughput screening of platelet inhibitors“. In: *PloS one* 14.10 (2019), e0223096.
- [402] H. Heijnen und P. van der Sluijs. „Platelet secretory behaviour: as diverse as the granules ... or not?“. In: *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 13.12 (2015), S. 2141–2151.
- [403] Carola Ledderose et al. „Adenosine arrests breast cancer cell motility by A3 receptor stimulation“. In: *Purinergic signalling* 12.4 (2016), S. 673–685.
- [404] Rong Wang und Keliang Huang. „CCL11 increases the proportion of CD4+CD25+Foxp3+ Treg cells and the production of IL-2 and TGF- $\beta$  by CD4+ T cells via the STAT5 signaling pathway“. In: *Molecular medicine reports* 21.6 (2020), S. 2522–2532.

- [405] Qun Gao et al. „Cancer-cell-secreted CXCL11 promoted CD8<sup>+</sup> T cells infiltration through docetaxel-induced-release of HMGB1 in NSCLC“. In: *Journal for immunotherapy of cancer* 7.1 (2019), S. 42.
- [406] Peter Carmeliet. „VEGF as a Key Mediator of Angiogenesis in Cancer“. In: *Oncology* 69.3 (2005), S. 4–10.
- [407] Chuan Xiang, Junxia Chen und Panfeng Fu. „HGF/Met Signaling in Cancer Invasion: The Impact on Cytoskeleton Remodeling“. In: *Cancers* 9.12 (2017), S. 44.
- [408] Ching-Ju Shen et al. „MMP1 expression is activated by Slug and enhances multi-drug resistance (MDR) in breast cancer“. In: *PloS one* 12.3 (2017), e0174487.
- [409] Elisabeth M. Battinelli, Beth A. Markens und Joseph E. Italiano. „Release of angiogenesis regulatory proteins from platelet alpha granules: modulation of physiologic and pathologic angiogenesis“. In: *Blood* 118.5 (2011), S. 1359–1369.
- [410] Deepa Jonnalagadda, Leighton T. Izu und Sidney W. Whiteheart. „Platelet secretion is kinetically heterogeneous in an agonist-responsive manner“. In: *Blood* 120.26 (2012), S. 5209–5216.
- [411] Ralf J. Ludwig et al. „The ability of different forms of heparins to suppress P-selectin function in vitro correlates to their inhibitory capacity on bloodborne metastasis in vivo“. In: *Thrombosis and Haemostasis* 95.3 (2006), S. 535–540.
- [412] Martin Schlesinger et al. „Binding between heparin and the integrin VLA-4“. In: *Thrombosis and Haemostasis* 102.11 (2009), S. 816–822.
- [413] Lukas M. Gockel et al. „Inhibition of Tumor-Host Cell Interactions Using Synthetic Heparin Mimetics“. In: *ACS Applied Materials & Interfaces* 13.6 (2021), S. 7080–7093.
- [414] Bona Linke et al. „Activated Platelets Induce an Anti-Inflammatory Response of Monocytes/Macrophages through Cross-Regulation of PGE2 and Cytokines“. In: *Mediators of inflammation* 2017 (2017), S. 1463216.
- [415] Norbert Gerdes et al. „Platelets regulate CD4<sup>+</sup> T-cell differentiation via multiple chemokines in humans“. In: *Thrombosis and Haemostasis* 106.2 (2011), S. 353–362.
- [416] Chao Yan Liu et al. „Platelet factor 4 differentially modulates CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (regulatory) versus CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (nonregulatory) T cells“. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 174.5 (2005), S. 2680–2686.
- [417] S. F. Ziegler, F. Ramsdell und M. R. Alderson. „The activation antigen CD69“. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 12.5 (1994), S. 456–465.
- [418] Lesley M. Chapman et al. „Platelets present antigen in the context of MHC class I“. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 189.2 (2012), S. 916–923.
- [419] Li Guo et al. „Platelet MHC class I mediates CD8<sup>+</sup> T-cell suppression during sepsis“. In: *Blood* 138.5 (2021), S. 401–416.

- [420] Clemens Hinterleitner et al. „Platelet PD-L1 reflects collective intratumoral PD-L1 expression and predicts immunotherapy response in non-small cell lung cancer“. In: *Nature Communications* 12.1 (2021), S. 7005.
- [421] T. A. McCaffrey et al. „Transforming growth factor-beta activity is potentiated by heparin via dissociation of the transforming growth factor-beta/alpha 2-macroglobulin inactive complex“. In: *The Journal of Cell Biology* 109.1 (1989), S. 441–448.
- [422] Fadi Kandarian et al. „A Flow Cytometry-Based Cytotoxicity Assay for the Assessment of Human NK Cell Activity“. In: *Journal of visualized experiments : JoVE* 126 (2017).
- [423] Jeanine M. Walenga et al. „Decreased prevalence of heparin-induced thrombocytopenia with low-molecular-weight heparin and related drugs“. In: *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 30 Suppl 1 (2004), S. 69–80.

## Abbildungsverzeichnis

1	Übersicht der metastatischen Kaskade . . . . .	4
2	Mechanismen der Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung . . . . .	8
3	Prozess der Zelladhäsion am Endothel . . . . .	13
4	Mechanismen der Immunhemmung durch regulatorische T-Zellen . . . . .	21
5	Zytolytische Mechanismen von NK und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen . . . . .	25
6	Mechanismen der tumoralen Immunevasion im Überblick . . . . .	30
7	Struktur des Heparins . . . . .	37
8	Mechanismus der Heparin-induzierten Thrombozytopenie Typ II . . . . .	42
9	Strukturen der untersuchten Heparin-Mimetika . . . . .	45
10	Messprinzip der Lichttransmissionsaggregometrie . . . . .	73
11	Detektionsreaktion der ATP Quantifizierung . . . . .	75
12	Beschichtung eines SAW-Biosensor Quarzes . . . . .	78
13	Biosensorische Messsignale der Phase bzw. Amplitude . . . . .	79
14	Messablauf der Bindungsdetektion . . . . .	81
15	Kurvenanpassung des 1:1 Bindungsmodells . . . . .	82
16	Apparativer Aufbau der Flusskammer . . . . .	83
17	Protein Immobilisation an einer Glasoberfläche . . . . .	85
18	Detektionsreaktion des ELISA . . . . .	88
19	Die Bedeutung der Kompensation und FMO Kontrollen . . . . .	89
20	Gating-Strategie zur Identifikation regulatorischer T-Zellen . . . . .	91
21	Gating-Strategie der Identifikation aktivierter CD8 <sup>+</sup> Zellen . . . . .	93
22	Gating-Strategie zur Identifikation toter Zielzellen . . . . .	95
23	Initiales LTA Screening der Heparin-Mimetika . . . . .	99
24	Evaluation der Standardkonzentration der Heparin-Mimetika . . . . .	100
25	Thrombogramm der Kontrollproben der TGA . . . . .	102
26	Repräsentative Thrombogramme der untersuchten Antikoagulantien und Heparin-Mimetika . . . . .	104
27	Relative Inhibition des ETP durch Antikoagulantien und Heparin-mimetische Polymere . . . . .	105
28	Relative Inhibition der Peakhöhe durch Antikoagulantien und Heparin-Mimetika . . . . .	106
29	Repräsentative Aggregogramme der Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung . . . . .	107
30	Inhibition der Freisetzung des ATP aus dichten Granula . . . . .	109
31	Inhibition der Freisetzung der Mediatoren aus $\alpha$ -Granula . . . . .	111
32	Einfluss der Heparin-Mimetika auf die Viabilität von EA.hy926 Zellen . . . . .	118

33	Validierung der Zelladhäsion über VLA-4/VCAM-1 . . . . .	119
34	Inhibition der VLA-4/VCAM-1 vermittelten Tumorzelladhäsion . . . . .	120
35	Hemmung der Adhäsion am artifiziellen Endothel . . . . .	122
36	Hemmung der enzymatischen Aktivität der Heparanase . . . . .	123
37	IL-10 Freisetzung aus PBMC Zellkulturen . . . . .	126
38	T <sub>reg</sub> Differenzierung unter Thrombozyten bzw. Releasates Inkubation . . .	128
39	Einfluss der Antikoaguantien und Heparin-Mimetika auf den T <sub>reg</sub> -Anteil . .	129
40	Anteil aktivierter CD8 <sup>+</sup> Lymphozyten als CD25 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> Zellen . . . . .	130
41	Darstellung der gesteigerten CD25 Expression . . . . .	131
42	CD25 und CD69 Expression auf CD8 <sup>+</sup> T-Zellen . . . . .	132
43	Effekte der Testsubstanzen auf die CD25 und CD69 Expression von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen . . . . .	133
44	Kinetik der CD25 und CD69 Expression auf stimulierten CD8 <sup>+</sup> T-Zellen .	134
45	Freisetzung zytolytischer und proinflammatorischer Mediatoren aus CD8 <sup>+</sup> T-Zellen . . . . .	135
46	Validierung des NK-Zell Zytotoxizitätstests . . . . .	137
47	Effekte von Thrombozyten-Releasates auf die NK-Zellzytotoxizität . . . .	137
48	Effekte von inhibierten Releasates auf die NK-Zellzytotoxizität . . . . .	138
49	Kontrollen des Versuchs der NK-Zellzytotoxizität . . . . .	139

## Tabellenverzeichnis

1	Übersicht der CD4 <sup>+</sup> T-Zell Subpopulationen und deren Rolle in physiologischen und pathophysiologischen Szenarien . . . . .	19
2	Chemikalien . . . . .	48
3	Verwendete Puffer und Lösungen . . . . .	53
4	Verwendete Antikörper . . . . .	56
5	Verwendete Antikoagulantien und Heparin-Mimetika . . . . .	56
6	Verwendete Verbrauchsmaterialien . . . . .	57
7	Verwendete Geräte und Instrumente . . . . .	60
8	Verwendete Software . . . . .	63
9	Verwendete Konzentrationen der eingesetzten Substanzen . . . . .	71
10	Pipettierschema der Versuchsansätze der Thrombingenerierung . . . . .	72
11	Pipettierschema der Kalibrierung des TGA . . . . .	73
12	Immobilisierungsbedingungen und Mengen der untersuchten Proteine . . .	80
13	Verdünnungsreihen der untersuchten Substanzen für die Bindung an die analysierten Proteine . . . . .	81
14	Verwendete Konzentrationen der eingesetzten Substanzen . . . . .	85
15	Pipettierschema der vermessenen Ansätze . . . . .	94
16	Behandlungen zur Bestimmung der Zelltoxizität der Heparin-mimetischen Polymere. . . . .	96
17	Biosensorische Bestimmung der Bindungsaffinitäten kommerzieller Heparine und Heparin-mimetischer Polymere an P-Selectin (N=3) . . . . .	114
18	Biosensorische Bestimmung der Bindungsaffinitäten kommerzieller Heparine und Heparin-mimetischer Polymere an E-Selectin (N=3) . . . . .	116
19	Biosensorische Bestimmung der Bindungsaffinitäten kommerzieller Heparine und Heparin-mimetischer Polymere an das Integrin VLA-4 (N=3) . . . . .	117
20	Bindungsaffinitäten kommerzieller Heparine und Heparin-mimetischer Polymere an PF4 . . . . .	141

## Publikationsliste

Gockel LM, Nekipelov K, Ferro V, Bendas G, Schlesinger M  
*Tumour cell-activated platelets modulate the immunological activity of CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, and NK cells, which is efficiently antagonized by heparin*  
Cancer Immunol. Immunother. **2022** doi: 10.1007/s00262-022-03186-5

Gockel LM\*, Pfeifer V\*, Baltés F, Bachmaier RD, Wagner KG, Bendas G, Gütschow M, Sosič I, Steinebach C  
*Design, synthesis, and characterization of PROTACs targeting the androgen receptor in prostate and lung cancer models*  
Arch Pharm **2022** doi: 10.1002/ardp.202100467

Haschemi R, Gockel LM, Bendas G, Schlesinger M  
*A Combined Activity of Thrombin and P-Selectin Is Essential for Platelet Activation by Pancreatic Cancer Cells*  
Int J Mol Sci **2021** 22(7):3323. doi: 10.3390/ijms22073323

Gockel LM, Heyes M, Li H, Al Nahain A, Gorzelanny C, Schlesinger M, Holdenrieder S, Li JP, Ferro V, Bendas G  
*Inhibition of Tumor-Host Cell Interactions Using Synthetic Heparin Mimetics*  
ACS Appl Mater Interfaces **2021** 13(6):7080-7093. doi: 10.1021/acsami.0c20744

Schwarz S, Gockel LM, Naggi A, Barash U, Gobec M, Bendas G, Schlesinger M  
*Glycosaminoglycans as Tools to Decipher the Platelet Tumor Cell Interaction: A Focus on P-Selectin*  
Molecules **2020** 25(5):1039. doi: 10.3390/molecules25051039

Gockel LM\*, Ponert JM\*, Schwarz S, Schlesinger M, Bendas G  
*The Low Molecular Weight Heparin Tinzaparin Attenuates Platelet Activation in Terms of Metastatic Niche Formation by Coagulation-Dependent and Independent Pathways*  
Molecules, **2018** 23(11):2753. doi: 10.3390/molecules23112753

Ponert JM, Gockel LM, Henze S, Schlesinger M  
*Unfractionated and Low Molecular Weight Heparin Reduce Platelet Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Pancreatic and Prostate Cancer Cells*  
Molecules **2018** 23(10):2690. doi: 10.3390/molecules23102690

Hoß SG, Grundmann M, Benkel T, Gockel LM, Schwarz S, Kostenis E, Schlesinger M, Ilan N, Vlodaysky I, Bendas G

*Pro-Angiogenic Effects of Latent Heparanase and Thrombin Receptor-Mediated Pathways—Do They Share a Common Ground in Melanoma Cells?*

Thromb Haemost **2018** 118(10):1803-1814. doi: 10.1055/s-0038-1669922

\*geteilte Erstautorenschaft

## **Danksagung**

Zunächst gilt besonderer Dank meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Gerd Bendas, für das in mich gelegte Vertrauen zur Erforschung der Thematik dieser Dissertation. Ich danke ihm sehr für seine stets professionelle und intensive Betreuung und dafür, dass er es mir ermöglicht hat als Teil seiner Arbeitsgruppe zu promovieren. Durch die stete Bereitschaft für die vielen konstruktiven und inspirierenden Diskussionen und Gespräche wurde diese Arbeit maßgeblich getragen.

Herrn PD Dr. Martin Schlesinger danke ich sehr für sein unermüdliches Engagement und die stete Unterstützung bei der Planung und Auswertung der durchgeführten Experimente. Seine fachliche Expertise und seine konstruktiven Ideen waren in unzähligen Gesprächen und Diskussionen eine zuverlässige Stütze, die die Durchführung dieser wissenschaftlichen Arbeit ermöglichten. Darüber hinaus möchte ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Dissertation bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Karl G. Wagner und Herrn Prof. Dr. Hanns Häberlein für ihre Tätigkeit in der Promotionskommission danken.

Eva Hanfland vom Institut für experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Bonn möchte ich für die stete Bereitstellung der Thrombozytenkonzentrate danken, durch welche die Durchführung dieser Arbeit maßgeblich erleichtert wurde.

Darüber hinaus möchte ich mich bei den verschiedenen Kooperationspartnern bedanken, welche zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Prof. Dr. Vito Ferro und Abdullah Al-Nahain von der University of Queensland danke ich sehr für die Bereitstellung der Heparin-mimetischen Polymer, welche einen essentiellen Teil dieser Arbeit darstellen. Prof. Dr. Jin-ping Li und Honglian Li von der Uppsala University danke ich für die Untersuchung der Heparanase-Inhibition. Dr. Christian Gorzelanny aus der Abteilung für Dermatologie und Venerologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf möchte ich für die Untersuchung der Zelladhäsion am artifiziellen Endothel danken. Ebenso danke ich Prof. Dr. Stefan Holdenrieder vom Institut für Laboratoriumsmedizin am Deutschen Herzzentrum München für die Ermöglichung der PEA-Proteinquantifizierung durch die Firma Olink.

Der Bonn International Graduate School of Drug Sciences (BIGS DrugS) danke ich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen dieser Arbeit.

Ebenfalls möchte ich mich bei den technischen Assistenten der Arbeitsgruppe bedanken. Besonders Angelika Fischer danke ich für die kompetente Unterstützung in allen technischen Fragen und die zuverlässige Beschaffung benötigter Arbeitsmaterialien.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei allen Kollegen und Kolleginnen aus der Arbeitsgruppe Bendas bedanken, die die Zeit unvergessen machen. Hervorzuheben sind hier meine ehemaligen Masteranden Martin Heyes und Katrin Nekipelov, die mich durch viele Hochs

und Tiefs dieser Arbeit unterstützt haben. Besonders danken möchte ich hier Jan-Moritz Ponert, Svenja Schwarz und Vladlena Pfeifer, durch die ich vieles lernen konnte und die mir über viele Stunden auch außerhalb des Labors zu guten Freunden geworden sind.

Ein besonderer Dank gilt Daniela für ihre Unterstützung und die langjährige Zeit an meiner Seite. Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern Peter und Andrea, meinen beiden Brüdern Philipp und Tobias sowie Anja und Sarah bedanken, ohne deren Unterstützung mein bisheriger Werdegang nicht möglich gewesen wäre und die mir stets den Rücken freihalten und mich stärken.

Bene.

## **Verfassererklärung**

Hiermit erkläre ich, Lukas Maria Gockel, dass ich die vorliegende Arbeit persönlich und selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die aus anderen verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen wurden von mir als solche gekennzeichnet.

Bonn, den

Lukas Maria Gockel