



# **Untersuchung der molekularen Mechanismen einer Thrombozytenaktivierung durch Karzinomzellen und die Rolle des Tumormarkers MACC1 in diesem Prozess**

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrads (Dr. rer. Nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Reza Haschemi**

aus Herat

Bonn, Dezember 2022



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

Promotionskommission:

1. Gutachter:	Prof. Dr. Gerd Bendas
2. Gutachter:	PD Dr. Martin Schlesinger
Tag der Promotion:	26.04.2023
Erscheinungsjahr:	2023



*Erfolg wächst aus dem Vertrauen und der Zuversicht der Liebenden–*  
Der Dank dafür gilt insbesondere meinen Eltern Roja und Jamil



## **Inhaltsverzeichnis**

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2. Theorie</b>	<b>3</b>
2.1 Grundlagen der hämatogenen Metastasierung .....	3
2.1.1 Gewebsinvasion nach Epithelial-Mesenchymaler Transition von Tumorzellen.....	3
2.1.2 Intra- und Extravasation von Tumorzellen in der Metastasierung.....	4
2.2 Tumorzellassoziierte Thrombozytenaktivierung.....	6
2.2.1 Die Rolle von Thrombozyten in der physiologischen Hämostase.....	6
2.2.2 Die tumorzellinduzierte Thrombozytenaggregation (TCIPA) .....	8
2.3 Beeinflussung der Aggregationsfähigkeit auf diversen Ebenen der Thrombozyten durch multiple Wirkstoffgruppen .....	11
2.3.1 Lösliche Faktoren der $\alpha$ -Granula .....	11
2.3.2 Oberflächenproteine.....	14
2.3.3 Zelluläre Pathways.....	17
2.4 Antikoagulanzen.....	18
2.4.1 Indirekte Antikoagulanzen: Heparine .....	18
2.4.2 Direkte Antikoagulanzen: DOAC .....	20
2.5 Klinischer Einsatz von Heparin sowie Thrombozytenaggregationshemmern.....	21
2.6 MACC1 .....	23
<b>3. Ziel der Arbeit</b>	<b>27</b>
<b>4. Material und Methoden</b>	<b>28</b>
4.1 Verwendete Materialien .....	28
4.1.1 Chemikalien und Ausgangsstoffe .....	28
4.1.2 Puffer und Lösungen.....	31
4.1.3 Inhibitoren, Testsubstanzen und Proteine .....	33
4.1.4 Antikörper .....	35
4.2 Verwendete Geräte und Software.....	35
4.2.1 Verbrauchsmaterialien .....	35
4.2.2 Geräte .....	37
4.2.3 Software .....	39

4.3	Zellkultur.....	40
4.3.1	Zelllinien.....	40
4.3.2	Revitalisierung und Subkultivierung .....	41
4.3.3	Zellzahlbestimmung.....	42
4.3.4	Kontaminationen.....	44
4.3.5	Kryokonservierung.....	44
4.4	Thrombozytengenerierung .....	44
4.5	Thrombozytenaggregations-Assay.....	45
4.6	Granula-Sekretions-Assay.....	47
4.7	Thrombozyten-Adhäsions-Assay .....	47
4.8	P-Selektin-Adhäsions-Assay.....	48
4.9	Durchflusszytometrie – FACS .....	48
4.10	Thrombingenerierungs-Assay .....	50
4.11	Quantitative Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR).....	51
4.12	Proteinanalytik.....	52
4.12.1	Generierung von Zelllysaten und Zellüberständen .....	52
4.12.2	Gesamtproteinbestimmung .....	53
4.12.3	SDS-PAGE .....	54
4.12.4	Western-Blot.....	55
4.12.5	<i>Sandwich</i> -ELISA .....	56
4.13	Wundheilungs-Assay.....	58
4.14	Invasions-Assay.....	59
4.15	Statistik.....	60
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>61</b>
5.1	Etablierung eines Messsystems zur Untersuchung der TCIPA.....	62
5.1.1	Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die Thrombozytenaggregation und Granulasekretion.....	62
5.1.2	Möglichkeit der konzentrationsabhängigen Verstärkung der Aktivierung der Thrombozyten durch Einsatz von IGF-I.....	66
5.2	Untersuchung der Rolle von Thrombozyten bei der hämatogenen Metastasierung von Pankreaskarzinomzellen.....	67
5.2.1	Einfluss von Pankreaskarzinomzellen (PCC) auf Thrombozytenaktivierung und TCIPA.....	67
5.2.2	Untersuchung der molekularen Mechanismen unter Verwendung unterschiedlicher inhibitorischer Angriffspunkte mithilfe des Thrombozytenaggregation-Assay ....	69
5.2.3	Erörterung der molekularen Mechanismen diverser Inhibitoren mithilfe des Granula-Sekretions-Assay .....	72

5.2.4	Quantifizierung der Expression von P-Selektin und <i>tissue factor</i> auf PCC mittels Durchflusszytometrie und die Bedeutung für die Koagulation.....	74
5.2.5	Kombinatorische Inhibition von Thrombin und P-Selektin.....	75
5.3	MACC1, ein prognostischer und prädiktiver Biomarker für Tumorprogression und Metastasierung.....	78
5.3.1	Einfluss von MACC1 auf die Interaktion zwischen CRC und Thrombozyten .....	78
5.3.2	Proteinanalytik von IGFBP2 in MACC1 überexprimierten SW620 CRC.....	81
5.3.3	Einfluss von IGFBP2 auf die Interaktion zwischen CRC und Thrombozyten .....	84
5.3.4	IGFBP2 als funktionell nachgeschaltete Komponente von MACC1 mit Einfluss auf die Zelldynamik .....	85
5.3.5	In vivo Ergebnisse.....	87
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>89</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>92</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang</b>	<b>112</b>
8.1	Abbildungsverzeichnis .....	112
8.2	Tabellenverzeichnis.....	118
8.3	Publikationen.....	119
8.4	Danksagung .....	120



## Abkürzungsverzeichnis

Mit Ausnahme von Angaben zu Produktbezeichnungen und Rechtsformen, sowie chemischen, mathematischen und physikalisch geläufigen Einheiten und Symbolen enthält das folgende Abkürzungsverzeichnis Angaben über alle verwendeten Abkürzungen. Dazu gehören auch römische und griechische Zahlen und Ziffern. Englische Begriffe werden in kursiv kenntlich gemacht.

% (V/V)	Volumenprozent
ACD	<i>advanced chemistry development</i>
ACS	<i>acute coronary syndrome</i>
ACT	<i>activated clotting time</i>
ADP	Adenosindiphosphat
AMC	7-Amino-4-Methyl-cumarin
aPTT	<i>activated partial thromboplastin time</i>
ASS	Acetylsalicylsäure
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATIII	Antithrombin III
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BM	Basalmembran
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
Calcein-AM	Calcein-Acetoxymethylester
CAM	<i>cell adhesion molecules</i>
CRC	<i>colorectal cancer</i>
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>

## Abkürzungsverzeichnis

---

CTCs	<i>circulating tumor cells</i>
CTI	<i>corn trypsin inhibitor</i>
CXCL5	<i>C-X-C motif chemokine ligand 5</i>
CXCL7	<i>C-X-C motif chemokine ligand 7</i>
DGK	Deutsche Gesellschaft für Kardiologie
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOACs	<i>direct oral anticoagulants</i>
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
DTT	Dithiothreitol
ECE	<i>electrical current exclusion</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>enzym-linked-immunosorbent-assay</i>
EMT	<i>epithelial-mesenchymal transition</i>
EZM	Extrazellulärmatrix
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
Fc-Fragment	<i>fragment crystallisable</i>
FcγRIIA	<i>Fc-receptor γ-chain</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FITC	Fluorescein-5-Isothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FSC	<i>forward scatter</i>
GPCR	<i>G-protein-coupled receptor</i>
G-Protein	GTP-bindendes Protein
HBD	Heparinbindungsdomäne
HEPES	<i>2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure</i>

## Abkürzungsverzeichnis

---

HIT	Heparin-Induzierte-Thrombozytopenie
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSP27	<i>heat shock protein 27</i>
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IGFBP	<i>Insulin-like growthfactor binding protein</i>
IGF-I	<i>Insulin-like growth factor I</i>
IGF-II	<i>Insulin-like growth factor II</i>
IGF-RI	Typ-I IGF-Rezeptor
IGF-RII	Typ-II IGF-Rezeptor
ITAM	<i>immunreceptor tyrosin-based activation motiv</i>
KD	<i>knock down</i>
KO	<i>knock out</i>
LAF	<i>laminar air flow</i>
LMWH	niedermolekulare Heparine
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lichttransmissionsaggregometrie
MACC1	<i>Metastasis Associated in Colon Cancer 1</i>
MDC	<i>Max Delbrück Center for molecular medicine</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex class I</i>
MMPs	Matrix Metalloproteasen
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
PADGEM	<i>platelet activation-dependent granule-external membrane</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAR	<i>protease activated receptor</i>
PCI	<i>percutaneous coronary intervention</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>

## Abkürzungsverzeichnis

---

PDA	<i>pancreatic ductal adenocarcinoma</i>
PF-4	<i>platelet factor 4</i>
PFB	<i>platelet free buffer</i>
PI3K	<i>phosphoinositide 3-kinase</i>
PIC	Protease Inhibitor Cocktail
plt	<i>platelet</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRB	<i>platelet rich buffer</i>
PRP	<i>platelet rich plasma</i>
PS	Polystyrol
PSGL-1	<i>p-selectin glycoprotein ligand-1</i>
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RBD	rezeptorbindende Domäne
RCT	<i>randomized controlled trial</i>
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RTKs	Rezeptor-Tyrosinkinase
SCD	<i>sickle cell disease</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfat</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SSC	<i>sideward scatter</i>
<i>sup.</i>	<i>supernatant</i>
SYK	<i>spleen tyrosin kinase</i>
TBS	<i>tris-buffered saline</i>

## Abkürzungsverzeichnis

---

TBS-T	<i>TBS with Tween 20</i>
TC	<i>tumor cells</i>
TCIPA	tumor cell-induced platelet aggregation
TEM	<i>transendothelial migration</i>
TF	<i>tissue factor</i>
TGA	<i>thrombin generation assay</i>
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor beta</i>
TKZ	Thrombozytenkonzentrat
TLR4	<i>Toll-like receptor 4</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
TP $\alpha$ R	Thromboxan Prostanoid $\alpha$ -Rezeptor
TRAP-6	<i>thrombin receptor activating protein</i>
TXA <sub>2</sub>	Thromboxan A <sub>2</sub>
UFH	unfraktioniertes Heparin
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VTE	<i>venous thromboembolism</i>
vWF	von-Willebrand-Faktor



### 1. Einleitung

Die Bezeichnung ‚Krebs‘ geht auf Hippokrates zurück, der um 400 v. Chr. das Auftreten und das gewebeinvasive Wachstum bösartiger Geschwulste mit Krebsen verglich, die sich in Sand eingraben [1]. In den letzten Jahren gab es immense Fortschritte in der Onkologie. Ein wichtiger Meilenstein wurde durch die Immunonkologie erreicht, für deren Entwicklungen im Jahr 2018 der Nobelpreis für Medizin verliehen wurde. Der dabei prämierte Einsatz von Checkpoint-Inhibitoren ermöglicht in der Klinik bereits signifikante Therapieerfolge [2]. Jedoch bleibt der Krebs eher behandelbar statt heilbar. Tumorerkrankungen waren im Jahr 2019 für ein Viertel aller Todesfälle in Deutschland verantwortlich [3]. Zu den vielen Ursachen für die Entstehung von Krebs gehören u.a. der Lebensstil, Krankheitserreger oder aber auch erbliche Faktoren. Ebenso kann ein zufälliger Ablesefehler des Erbguts zu einer unkontrollierten Zellvermehrung führen [4]. Dabei ist nicht der Primärtumor, sondern die Metastasenbildung solider Tumore die Hauptursache für die krebsbedingte Mortalität [5]. Statistisch sind 90 % aller durch Krebs verursachten Todesfälle durch Metastasen verschuldet [6]. Leitlinien unterstützen daher als wichtiges Instrument des Qualitätsmanagements die Früherkennung von Tumoren und bestimmen somit den weiteren Krankheitsverlauf [7].

Bereits 1865 erfasste Armand Trousseau eine tumorassoziierte Hämostasestörung [8]. Beim Prozess der hämatogenen Metastasierung verlassen isolierte Tumorzellen den Primärtumor, migrieren zur Gefäßwand und gelangen dann in den Blutkreislauf. Der endotheliale Scherstress stellt dabei eine starke mechanische Belastung dar. Sowohl bei der Intravasation als auch bei der Extravasation kommt es zu einer starken Deformation der Tumorzellen [9]. Die Interaktion zwischen Tumorzellen und den Thrombozyten begründen diverse Unregelmäßigkeiten der Blutgerinnung. So konnte von Gabriel Gasic et al. ein kausaler Zusammenhang zwischen einer induzierten Thrombozytopenie und dem Rückgang von Metastasen nachgewiesen werden [10]. Ein wichtiges Instrument für Prognosen zur Ausbildung von Metastasen sind prädiktive Biomarker. Ein bedeutender prognostischer Biomarker ist das MACC1, das sog. *Metastasis Associated in Colon Cancer 1* [11]. Es konnte von Stein et al. gezeigt werden, dass bei Patienten mit einem hohen MACC1-Wert die 5-Jahres-Überlebenszeit von 80 % auf 15 % reduziert ist [12].

Im Rahmen dieser Arbeit wird das Zusammenspiel zwischen Thrombozyten und Tumorzellen untersucht. Dazu werden drei verschiedene Pankreaskarzinomzellen verwendet. Der Einfluss des Biomarkers MACC1 auf die Thrombozyten-Tumorzell-Interaktion und dem Metastasierungsprozess wird unter Verwendung von Darmkrebszellen erörtert.

## 2. Theorie

### 2.1 Grundlagen der hämatogenen Metastasierung

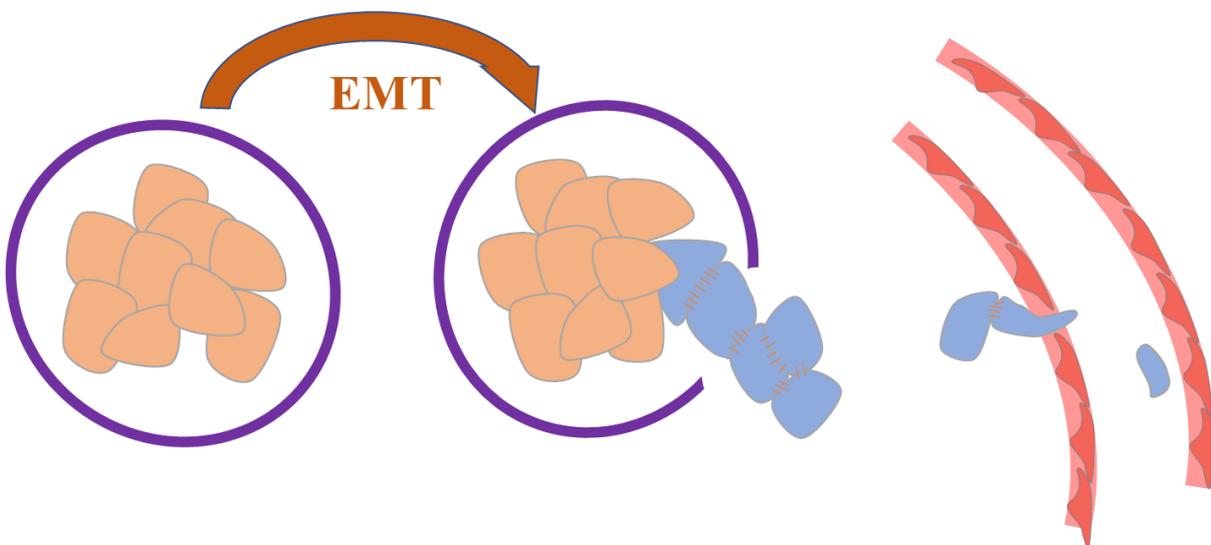
Die Metastasierung solider Tumore besteht aus einem vielstufigen Prozess. Jede Tumorzelle durchläuft dafür eine komplexe Kaskade mit dem Ziel der Kolonisation an sekundären und entfernten Organen. Diese Ausbreitung der entarteten Zellen kann über Gefäße des lymphatischen Systems oder über den Blutkreislauf geschehen. Der Befall der Lymphknoten ist nicht die Endstation, sondern unterstützt zusätzlich die Ausbreitung über Blutgefäße und die Ausbildung von Fernmetastasen [13]. Die Metastasierung gilt als entscheidender Faktor für die Mortalität maligner Tumore. Die Mortalität beispielsweise bei Bauchspeicheldrüsenkrebs ist nahezu identisch mit der Inzidenz, v.a. weil es keine eindeutige Methode der Früherkennung gibt [14]. Hauptsächlich jedoch besitzen Patienten mit dem hochaggressiven Pankreasadenokarzinom (PDA) eine äußerst geringe Überlebensrate von etwa 10 % aufgrund der früh gebildeten Metastasen, wodurch eine Operation oder Bestrahlungstherapie obsolet ist [15].

Voraussetzungen für eine erfolgreiche systemische Ausbreitung sind Migration und Gewebsinvasion von Tumorzellen. Die Fähigkeit Gewebe invasiv zu durchdringen und ihre Stellung im Gewebeverband zu verändern ist eine Besonderheit von Tumorzellen. Physiologisch spielt die Migration von Gewebezellen nur unter besonderen Bedingungen, beispielsweise bei der Reepithelialisierung im Rahmen der Wundheilung eine Rolle [16]. Eine Gefäßverletzung kann die Wanderung diverser Zellpopulationen durch die Endothelzellen auslösen. Immunzellen hingegen besitzen die Möglichkeit einer transzellulären oder aber auch einer parazellulären Diapedese, was entscheidend zu ihrer Immunfunktion beiträgt [17].

#### 2.1.1 Gewebsinvasion nach Epithelial-Mesenchymaler Transition von Tumorzellen

Der Primärtumor ist begrenzt in seinem Wachstum. Ab einer Größe von 1-2 mm<sup>3</sup> herrscht eine unzureichende Versorgung des Tumors mit Sauerstoff und Nährstoffen. Die Ausschüttung von wachstumsfördernden Faktoren, insbesondere des *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) stimuliert die Vaskularisierung des primären Zellverbands und bietet dem Primärtumor damit einen Zugang zum Blutkreislauf. Die klassische Darstellung des Übergangs der epithelialen Tumorzellen in eine mesenchymale Form (EMT) wird oft als Ausgang der Metastasierung beschrieben. Dazu gehört auch die reduzierte Expression von E-Cadherin, einem transmembranen Glykoprotein aus der Familie der calciumabhängigen Zelladhäsionsmolekülen (CAM), und der als Folge eintretende Verlust der Zell-Zell-Kontakte. Die Mikroumgebung am

Primärtumor beinhaltet u.a. Matrix-Metalloproteasen (MMPs), welche z.B. die Degradierung der extrazellulären Matrix (EZM) und der Basalmembran (BM) verantworten [18,19]. Während MMP-7 eher proteolytische Eigenschaften aufweist, unterstützt MMP-9 zusätzlich die Bildung neuer Blutgefäße [20]. Weitere EMT-fördernde Signalmoleküle sind *Transforming Growth Factor beta* (TGF- $\beta$ ), *Epidermal Growth Factor* (EGF) und *Insulin-like Growth Factor* (IGF). Einige Untersuchungen zeigen jedoch eine partielle Transformation in die migrative mesenchymale Form mit der Option, aufgrund externer Signale, in die epitheliale Form zurück zu wechseln [21]. Abhängig von der Tumorart besteht die Möglichkeit der Migration in einem Kollektiv oder aber auch als einzelne Tumorzelle. Für die gruppierte Migration ist dabei eine gesteigerte Kontrolle über die EZM-Interaktion durch diverse Integrine und MMPs notwendig [22].



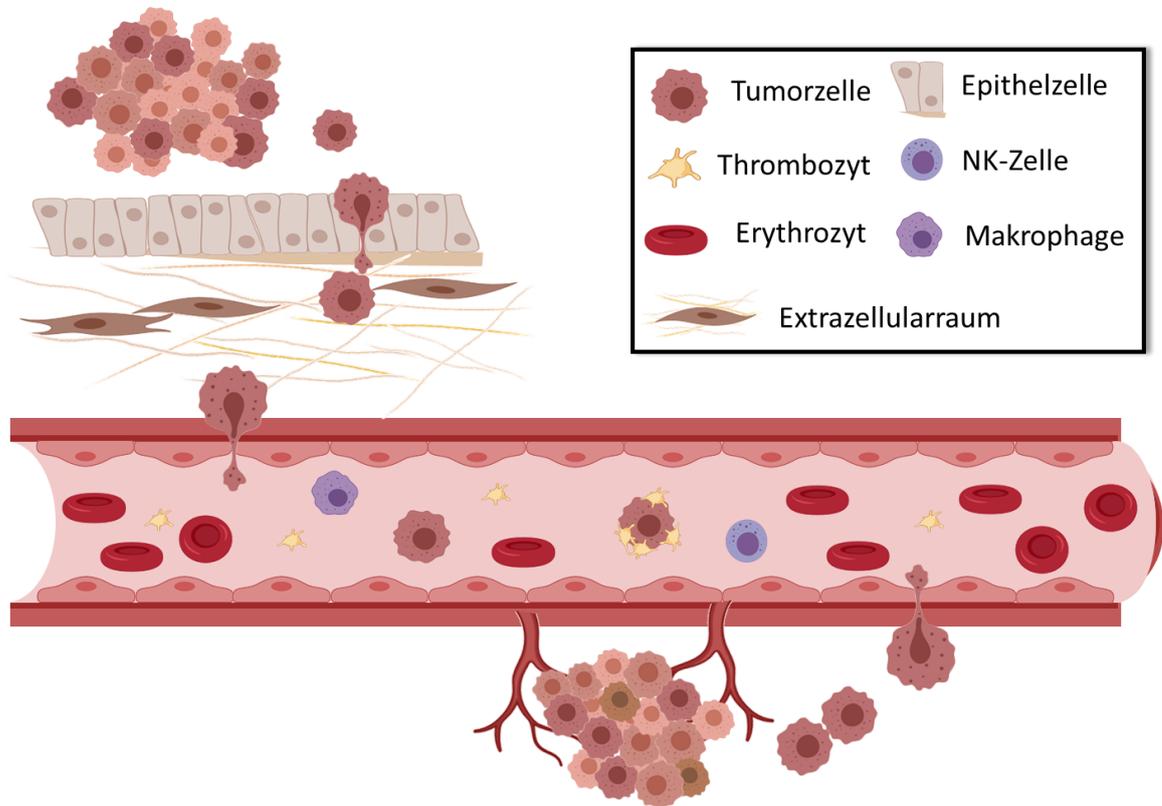
**Abbildung 1:** Verbreitung des Primärtumors nach partieller EMT einzelner Tumorzellen mit Durchbruch der BM, Migration durch die EZM und Einleitung der Invasion in den Blutkreislauf. Die Migration kann dabei sowohl als Kollektiv in einem Cluster oder aber auch von einer einzelnen Zelle ausgehen [21,22]

### 2.1.2 Intra- und Extravasation von Tumorzellen in der Metastasierung

Durch die Umstrukturierung des Zytoskeletts während des EMT ist es den Tumorzellen möglich die Endothelzellen zu überwinden. Sind die Tumorzellen in den systemischen Blutkreislauf eingedrungen, ist ihre Überlebenschance zunächst noch gering, da sie sowohl dem Scherfluss der Blutströmung als auch der Lyse durch natürliche Killerzellen ausgesetzt sind [23]. Durch thrombozytäre Ummantelung schützen sich die Tumorzellen vor dem Immunsystem und auch vor mechanischen Kräften direkt nach der Intravasation.

Durch Interaktionen mit den Thrombozyten und Leukozyten ist es ihnen nicht nur möglich sich abzuschirmen, sondern auch mithilfe von Integrinen und Selektinen mit dem Gefäßendothel in

Wechselwirkung zu treten [24]. Es kommt zu einem selektinvermittelten reversiblen Zellrollen des Tumorzell-Thrombozyten-Leukozyten-Agglomerates an der Endothelwand, welche durch die stärkere Bindung der Integrine stabilisiert wird [25]. Die Adhäsion der Tumorzellen an die Endothelzelle ist Voraussetzung für die Extravasation und ist gefolgt von der transendothelialen Migration [26].



**Abbildung 2:** Übersichtsdarstellung der metastatischen Kaskade mit den Schritten der Migration, Invasion, Intravasation, Extravasation, Kolonisation

Ähnlich der prämetastatischen Nische vor der Intravasation bildet sich am Ort der Extravasation ebenso eine Mikroumgebung, welche sich aber in ihrem Inhalt unterscheidet. Hier findet die Anpassung der Tumorzelle an die neuen Anforderungen statt [27].

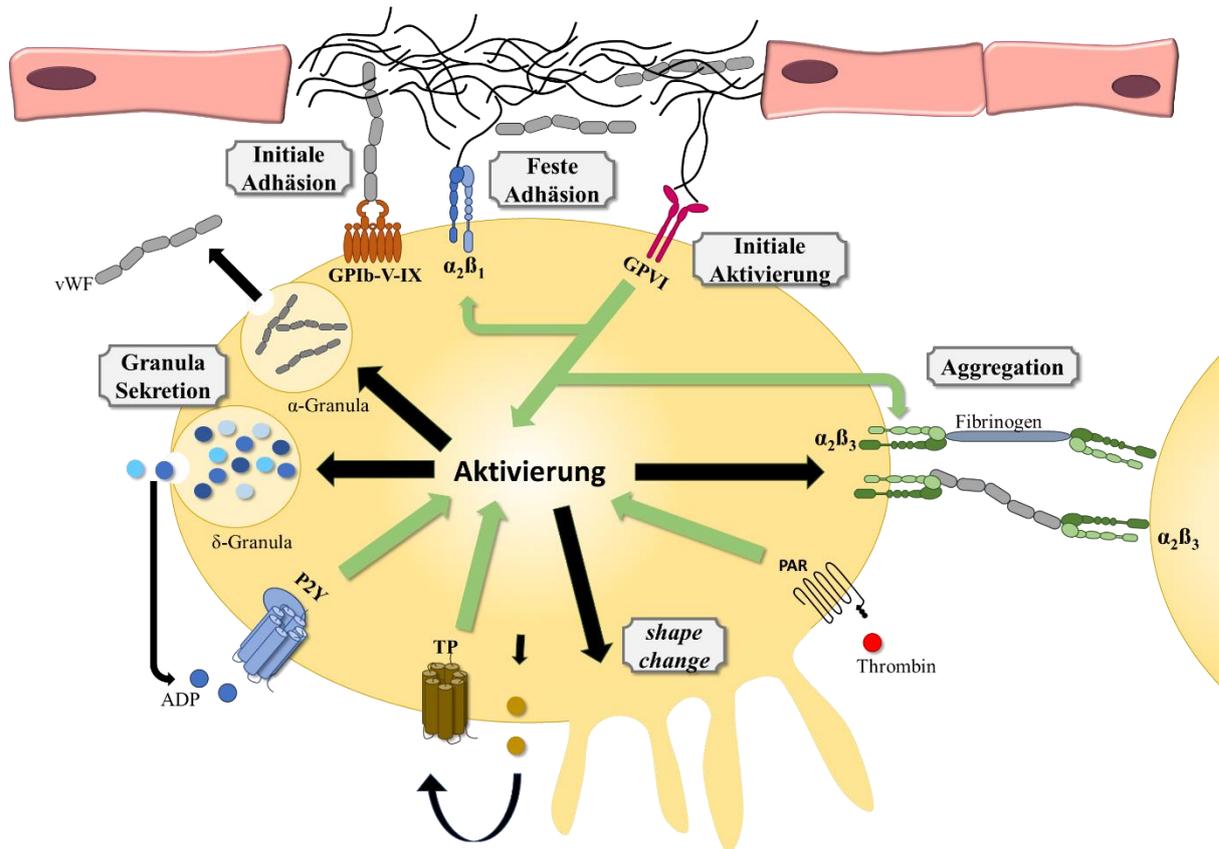
## 2.2 Tumorzellosoziierte Thrombozytenaktivierung

In Kapitel 2.1.1 wurde die Bedeutung der Migration und Invasion als erster Schritt der Metastasierung dargestellt. Die darauffolgende Phase der Intravasation in der metastatischen Kaskade verdeutlicht die Notwendigkeit der Tumor-Mikroumgebung für das Überleben der Tumorzelle. Die unmittelbare Interaktion der Tumorzellen mit Thrombozyten und Leukozyten ist ein essentieller Schritt der Metastasierung [23]. Thrombozyten besitzen physiologisch eine Vielzahl bioaktiver Substanzen für die spontane Einleitung der Blutgerinnung [28].

### 2.2.1 Die Rolle von Thrombozyten in der physiologischen Hämostase

Die diskoid geformten Thrombozyten stehen im Zentrum der primären und sekundären Hämostase. Die kernlosen Zellen haben eine Lebenserwartung von 7 – 10 Tagen und besitzen unterschiedliche Speichergranula, die nach Stimulation durch Exozytose zur Freisetzung gelangen [29]. Bei einer Gefäßverletzung dringen subendotheliale Strukturen in die Blutbahn, und so kommt es zum Kontakt der Thrombozyten mit z.B. Kollagen, von-Willebrand-Faktor (vWF), Vitronectin, Laminin und Thrombospondin. Der Rezeptorkomplex GPIb-XI-V interagiert mit dem an das Kollagen gebundenen vWF und leitet die Thrombozytenadhäsion ein [30,31]. Eine Thrombozytenaktivierung startet mit dem kollagenvermittelten Kontakt am Glykoprotein GPVI [32]. Das darauf in der Signalkaskade durch ein *Inside-Out-Signaling* aktivierte Glykoprotein GPIIb/IIIa, auch als  $\alpha_2\beta_3$  Integrin bezeichnet, bindet nun zusätzlich an Kollagen oder vWF. Diese Bindung verstärkt nicht nur die Adhäsion, sondern führt zu einem zusätzlichen *Outside-In-Signaling*, wodurch sich beim sog. *shape change* die Oberfläche der Thrombozyten durch Ausbildung von Pseudopodien vergrößert und so die Wunde abgedeckt werden kann. Da Thrombozyten nicht zur Proteinproduktion befähigt sind, besitzen sie drei unterschiedlich ausgestattete Speicherorganellen. Die Granulasekretion nach Aktivierung der Thrombozyten geschieht unter Verwendung der sog. *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor* (SNARE-Proteine), welche zum einen auf der zytosolischen Seite der Thrombozyten (*target-SNARE-Proteine*) und zum anderen in der Granulamembran (*vesicle-SNARE-Proteine*) lokalisiert sind. Über eine Komplexbildung der SNARE-Proteine kommt es zur Fusion der Granula mit der Thrombozytenmembran [33]. Die durch Formumwandlung freigesetzte  $\alpha$ -Granula sezerniert u.a. Fibrinogen, einige Gerinnungsfaktoren und es wird weiterhin das GPIIb/IIIa verstärkt in die Membran eingebaut. Durch die Bindung von GPIIb/IIIa an Fibrinogen kommt es schlussendlich zur Aggregation [34]. Die Rekrutierung weiterer Thrombozyten wird durch die Degranulation der  $\delta$ -Granula sichergestellt. Diese beinhaltet u.a. Adenosindiphosphat (ADP), und Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), welche die autokrine und parakrine

Aktivierung der Thrombozyten ermöglichen. Dabei bindet jeweils ADP an den G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GPCR)  $P2Y_{12}$  [35] und  $TXA_2$  an den Thromboxan Prostanoid  $\alpha$ -Rezeptor ( $TP\alpha R$ ) [36].

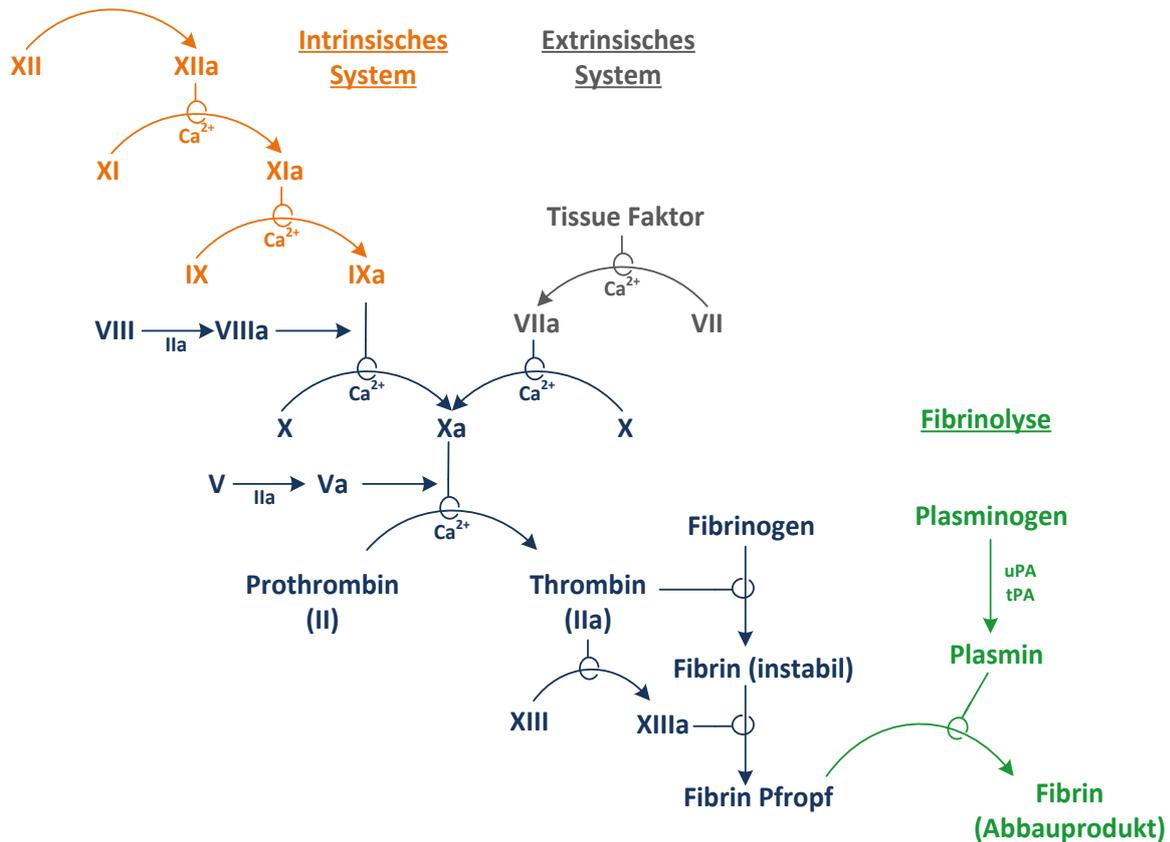


**Abbildung 3:** Darstellung eines Thrombozyten in Interaktion mit einer Endothelgefäßverletzung von der Adhäsion bis zur Aktivierung der Hämostase

Die primäre thrombozytäre Blutstillung durch Bildung eines Thrombozytenaggregats ist lediglich ein labiler Wundverschluss. Erst bei der sekundären Hämostase mit dem plasmatischen Gerinnungssystem sorgt das polymerisierte Endprodukt aus Fibrin für einen stabilen Thrombus. Durch eine Endothelverletzung wird ebenfalls der sich in der Tunica Media und Adventitia befindliche *tissue factor* (TF), ein Glykoprotein auch bekannt als Gewebsthromboplastin (Faktor III), in den Blutkreislauf freigesetzt. Dieser startet die extrinsische Gerinnungskaskade mit der Aktivierung von Faktor VII, welches wiederum den Stuart-Prower-Faktor (FX) anstößt. Bei der intrinsischen Gerinnungskaskade spielen die Serinproteasen Faktor XII und Faktor XI eine bedeutende Rolle, welche als Zymogen, also Vorstufen der aktiven Gerinnungsenzyme, bereits im Blut vorhanden sind. Nach Aktivierung von Faktor IX und Faktor VIII sind diese fähig mithilfe von Calcium und anionischen Phospholipiden ebenso FX zu aktivieren.

So spielt FXa eine zentrale Rolle in der sekundären Hämostase und verbindet die intrinsische mit der extrinsischen Blutgerinnung. Thrombin als Endprodukt der Gerinnungskaskade ist imstande

das Fibrinogen zu spalten [37,38]. Die Serinprotease Thrombin aktiviert weiterhin durch die proteolytische Spaltung der N-terminalen Exodomäne den GPCR Protease-aktivierten Rezeptor (PAR) [39].



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung der Gerinnungskaskade bestehend aus dem intrinsischen und extrinsischen System und die Auflösung der Thromben in der Fibrinolyse, eingeleitet durch Plasminogen [40]

Diese Eigenschaft verdeutlicht die besondere Rolle von Thrombin bei sowohl der primären als auch der sekundären Hämostase, welche zeitgleich und eng miteinander verflochten verlaufen. Daher wird neben ADP auch das Thrombin-Rezeptor-Aktivierende-Protein (TRAP-6), ein Hexapeptid, zur klinischen Prüfung der Thrombozytenfunktion herangezogen [41].

### 2.2.2 Die tumorzellinduzierte Thrombozytenaggregation (TCIPA)

Die TCIPA ist ein wiederholt beschriebener Schlüsselfaktor der Metastasierung [42–45]. Patienten mit einer Pankreaskarzinomkrankung besitzen eine erhöhte Wahrscheinlichkeit an einer Venenthrombose zu erkranken. Die eng verstrickte Interaktion zwischen Tumorzellen und Thrombozyten resultiert in einer Hyperkoagulabilität. So sagen Thromboembolien ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms voraus und fördern deren Metastasen [46].

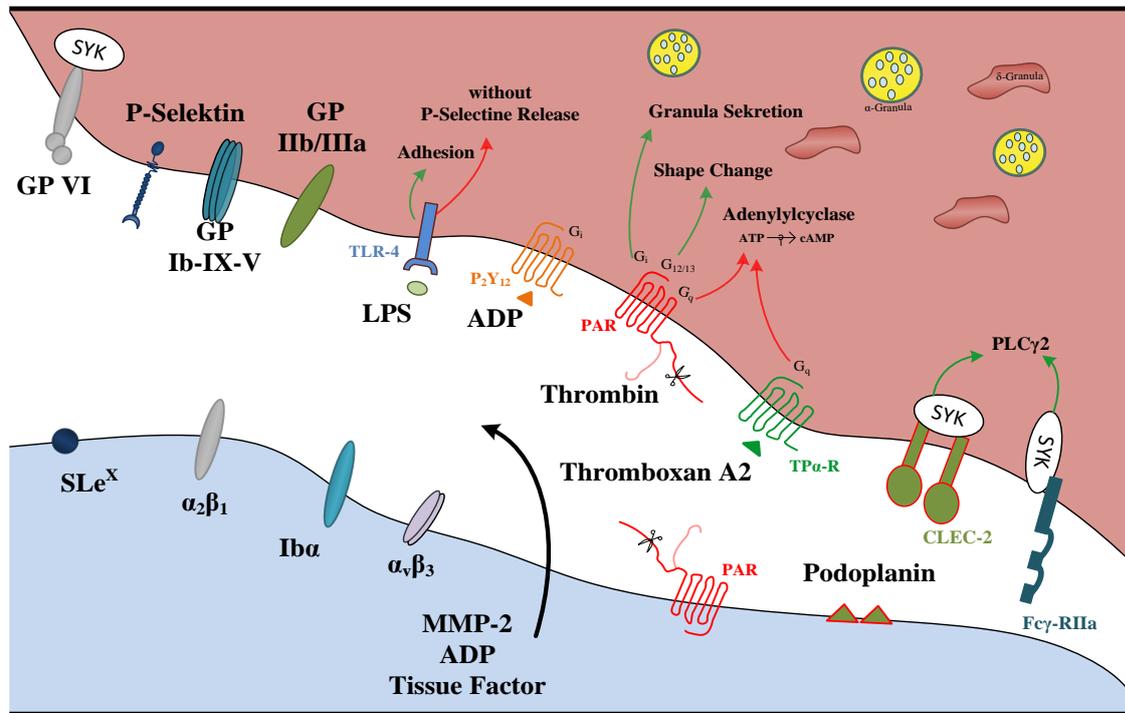
**Tabelle 1:** Thrombozyten-sezernierte Mediatoren und deren Einfluss auf die Tumoraktivität

	<i>Mediatoren</i>	<i>Einfluss</i>
<i>Lösliche Faktoren der <math>\delta</math>-Granula</i>	ADP	Pos. Rückkopplung über P2Y <sub>12</sub> Rezeptor [47,48]
	Calcium	Kofaktor für Aggregation und Adhäsion [49]
	TXA <sub>2</sub>	Invasion und Tumormetastase [50,51]
	PDMP	Angiogenese und Tumormetastasen [52,53]
<i>Wachstumsfaktoren der <math>\alpha</math>-Granula</i>	VEGF	Angiogenese und Tumovaskularisation [54,55]
	PDGF	Proliferation und Invasion [56]
	IGF	Proliferation, Differenzierung, Migration [57,58]
<i>Gerinnungsfaktoren der <math>\alpha</math>-Granula</i>	TF	Thrombingenerierung, Tumorinvasion [59,60]
	Prothrombin	Vorstufe Thrombin, Koagulation [61]
	FV, FVIII, FXI	Kofaktoren der Gerinnungskaskade [62,63]
<i>Adhäsionsproteine der <math>\alpha</math>-Granula</i>	vWF	Antimetastatisch [64,65]
	Fibronectin	Tumorzelladhäsion [66,67]
	TSP-1	Antiangiogene & prometastatisch [68–70]
<i>Antigenrezeptoren der <math>\alpha</math>-Granula</i>	P-Selektin	Tumorzelladhäsion, -metastasierung [71,72]
	GPIIb/IIIa	Tumorzelladhäsion, -invasion [73,74]
	GPIb-V-IX	Tumormetastasierung [75,76]
	GPVI	Tumorzelladhäsion, -invasion [77,78]

*ADP = Adenosindiphosphat; TXA<sub>2</sub> = Thromboxan A<sub>2</sub>; PDMP = Platelet-derived Microparticle; VEGF = Vascular Endothelial Growth Factor; PDGF = Platelet-derived Growth Factor; IGF = Insulin-like Growth Factor; TF = Tissue factor; vWF = von Willebrand Faktor; TSP-1 = Thrombospondin 1; GP = Glykoprotein*

Ohne den Schutz der Thrombozyten in Form eines Thrombus sind die zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) der Zelllyse durch natürliche Killerzellen (NK-Zellen) frei ausgesetzt [24]. Durch Expressierung des Haupthistokompatibilitätskomplex 1 (MHC 1) aus anhaftenden Thrombozyten umgehen Tumorzellen den Aktivierungsmechanismus von NK-Zellen [79]. Sogar die Extravasation der Tumorzellen ist vereinfacht durch Rekrutierung von Granulozyten mithilfe der von Thrombozyten stammenden Zytokine CXCL5 und CXCL7 [54]. Zusätzlich bieten die Thrombozyten einen Schutzmantel vor dem Scherstress im Blutkreislauf [80]. Daher stellte sich in der Vergangenheit eine kontinuierliche Behandlung von Patienten mit Aspirin als eine Präventivmaßnahme zur Vorbeugung von Metastasen heraus [81].

Während klinisch relevante Risikofaktoren eindeutig sind, sind die molekularen Mechanismen des erhöhten Gerinnungsstatus, die Tumor-Thrombozyten-Interaktion sowie die Aufklärung einzelner mechanistischer Angriffspunkte und deren Inhibierung nur ungenügend verstanden. Eine übergeordnete Rolle bei der Krebsentstehung und Angiogenese spielt TF als wesentlicher Bestandteil der Blutgerinnung.



**Abbildung 5:** Exemplarische Darstellung der molekularen Interaktionsmechanismen zwischen Tumorzellen (unten) und Thrombozyten (oben) [82,83]

Der membrangebundene TF kann einen Komplex mit den Integrinen  $\alpha_3\beta_1$  oder  $\alpha_6\beta_1$  und Faktor VIIa bilden, welcher seine zelluläre Wirkung über den PAR-2 ausübt. Dies führt zur *mitogen activated protein-kinases* (MAP) oder *phosphoinositide 3-kinase* (PI3K) Aktivierung und somit zum erhöhten Zellüberleben, zur Umstrukturierung des Zytoskeletts und der Sekretion proangiogener Faktoren wie VEGF, CXCL-1, IL-8 und vieles mehr [84–86].

Viele Tumorspezies, darunter auch Kolon- und Pankreaskarzinome, präsentieren TF auf ihrer Zelloberfläche, welche eine Thrombingenerierung initiiert [87,88]. Die tumorassoziierte TF Expression führt *in vivo* zur verstärkten Invasion und zum Wachstum des Primärtumors [89]. Hingegen kann Thrombospondin 1 (TSP-1) an Tumorzellen und Thrombozyten gleichermaßen binden, wodurch der adhäsive Kontakt hergestellt und zusätzlich die Tumorzellinvasion unterstützt wird. Ebenso kann aber matrixgebundenes TSP-1 über CD36 die Apoptose einleiten und die Angiogenese inhibieren [90]. Es konnte auch gezeigt werden, dass die Anwesenheit von vWF durch die Bindung an das Integrin  $\alpha_v\beta_3$  zu einer Reduzierung der Metastasenbildung führt, jedoch nicht zu einem verringerten Tumorwachstum [91]. Bereits dieser kurze Einblick in den multifaktoriellen hämatogenen Metastasierungsprozess verdeutlicht die vielen Eingriffsmöglichkeiten, was eine intensivere Erforschung der Mechanismen erforderlich macht.

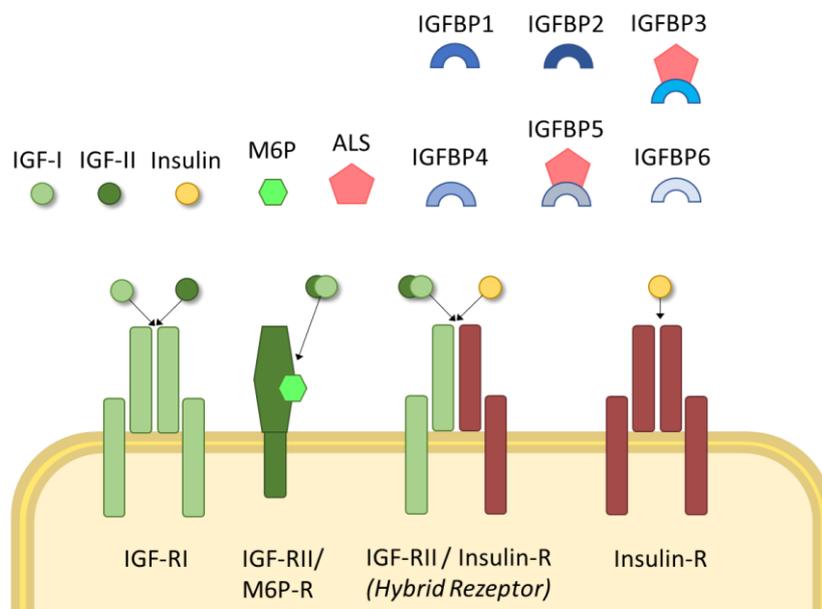
## **2.3 Beeinflussung der Aggregationsfähigkeit auf diversen Ebenen der Thrombozyten durch multiple Wirkstoffgruppen**

### **2.3.1 Lösliche Faktoren der $\alpha$ -Granula**

Laut Leitlinie der Deutsche Gesellschaft für Kardiologie (DGK) ist eine duale Thrombozytenhemmung mit Acetylsalicylsäure (ASS) und einem P2Y<sub>12</sub> Rezeptorblocker für Patienten mit koronarer Stentimplantation oder mit einem akuten Koronarsyndrom aufgrund der erheblichen Reduktion schwerwiegender thrombotischer Ereignisse empfohlen [92]. Bei dem P2Y<sub>12</sub> Inhibitor Clopidogrel handelt es sich um ein Prodrug, welcher in zwei Metabolisierungsschritten über den Cytochrom-P450-Enzymweg in seine aktive Form überführt wird [93]. Der Off-Label-Use von Clopidogrel gilt laut der Nationalen-Versorgungs-Leitlinie (NVL) zur Thrombozytenaggregationshemmung trotz der fehlenden Zulassung als medizinischer Standard [94]. Ein weiteres Thienopyridin ist Prasugrel, welches sich durch einen schnelleren Wirkungseintritt u.a. aufgrund nur eines Metabolisierungsschrittes auszeichnet [95]. Ticagrelor befindet sich bereits in seiner aktiven Form, im Gegensatz zu anderen ADP-Rezeptorblockern, und inhibiert den P2Y<sub>12</sub> Rezeptor reversibel [96]. Auf den Thrombozyten befinden sich weiterhin der von ADP aktivierte G $\alpha$ q-Rezeptor P2Y<sub>1</sub> und der von ATP aktivierte Rezeptor P2X<sub>1</sub>, welcher als Ionenkanal für einen schnellen Ca<sup>2+</sup> Anstieg sorgt [97]. Jedoch sind diese P2-Rezeptoren nicht von klinischer Relevanz. Ein synergistischer Effekt der ADP Rezeptoren konnte gezeigt werden [98]. Mit Seratrodast existiert ein effektiver Antagonist des TP $\alpha$ R, welcher jedoch ebenso nicht klinisch eingesetzt wird [99]. Seratrodast besitzt einen Zusatznutzen bei der Behandlung von Asthma mit Montelukast laut einer randomisierten, multizentrischen Vergleichsdoppelstudie und war bereits 1997 zur Behandlung von leichtem Asthma in Japan zugelassen [100–102].

Wie schon zuvor beschrieben ist IGF-I in der  $\alpha$ -Granula von Thrombozyten gespeichert und trägt nach seiner Freisetzung zur Thrombozytenaktivierung bei. Der IGF-RI befindet sich auf der Zelloberfläche der Thrombozyten [103]. Zum *Insulin-like Growth Factor* System gehören die einsträngigen Polypeptide IGF-I und IGF-II mit einer strukturellen Homologie zum Proinsulin [104]. Diese Wachstumsfaktoren regulieren die Proliferation und Differenzierung einer Vielzahl von Zellen, weswegen Sie eine wichtige Rolle bei der Embryonalentwicklung sowie während des gesamten postnatalen und adulten Lebens einnehmen [105]. Der Zusatz von IGF-I zum Kultivierungsmedium boviner Embryonen entfaltetet sogar einen anti-apoptotischen Effekt [106]. Die Wachstumsfaktoren agieren über den Typ-I IGF-Rezeptor (IGF-RI) und Typ-II IGF-Rezeptor (IGF-RII), sowie über einen hybriden IGF-Insulinrezeptor.

Ähnlich wie der Insulinrezeptor besteht der heterotetramere IGF-RI aus zwei transmembranären  $\beta$ -Untereinheiten, welche mit zwei extrazellulären  $\alpha$ -Untereinheiten zwecks Bindung des Liganden verbunden sind [107]. Aus einer Kombination der zu 70 % homologen Untereinheiten des IGF-RI und des Insulinrezeptors entsteht ein Hybridrezeptor, an welchem sowohl Insulin als auch IGFs die intrazelluläre Signalvermittlung über die Tyrosinkinase aktivieren können [108,109]. Die Bindungsaffinität von Insulin am IGF-RI ist um das 50-100 fache reduziert im Verhältnis zu den IGFs, wobei IGF-I eine stärkere Bindungsaffinität als IGF-II an den IGF-RI besitzt [110]. Insulin ist es hingegen nicht möglich an den transmembranären Glykoprotein IGF-RII zu binden und die Affinität von IGF-II ist hier die stärkste. Zusätzlich besitzt IGF-RII insgesamt drei Erkennungsstellen für Mannose 6-Phosphat (M6P) [111,112]. Die hauptsächliche Funktion von IGF-RII besteht in dem Transport lysosomaler Enzyme [113].



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung des *Insulin-like Growth Factor* Systems mit *Insulin-like Growth Factor-I* (IGF-I), *Insulin-like Growth Factor-II* (IGF-II), Typ-I IGF-Rezeptor (IGF-RI), Typ-II IGF-Rezeptor (IGF-RII), *Insulin-like Growth Factor Binding Proteins* (IGFBPs), Mannose-6-Phosphat (M6P), *Acid Labile Subunit* (ALS), Insulinrezeptor (Insulin-R) [114]

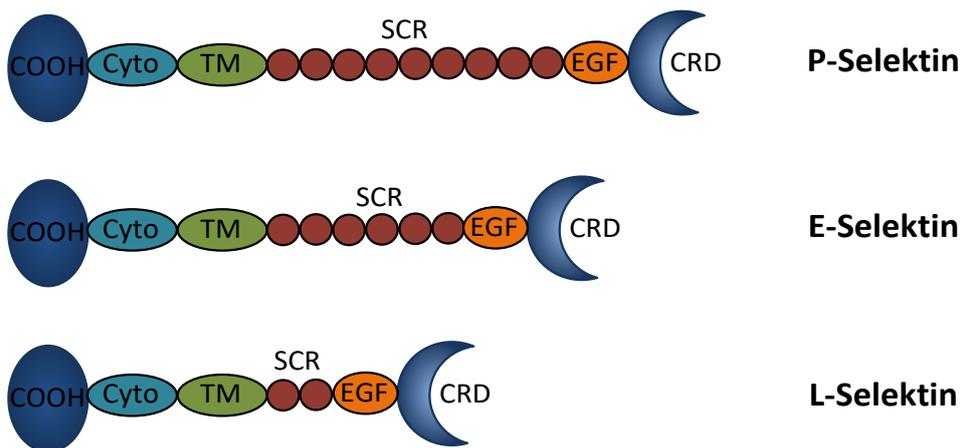
Der IGF-Spiegel wird vom *growth hormone* (GH) reguliert, indem es in der Leber die Synthese und Sekretion steuert [115]. Die Aktivierung des IGF-RI durch IGFs fördert kanzerogene Eigenschaften bezüglich der Apoptose, Zelldifferenzierung und Zellproliferation [116,117]. Weiterhin fördert IGF-I die integrinvermittelte Zellmigration eines Primärtumors und dessen Invasion [118,119]. Die IGF Aktivität wird in der Zirkulation von insgesamt sechs homologen Proteinen reguliert. Alle *Insulin-like Growth Factor Binding Proteins* (IGFBPs) besitzen eine hohe Bindungsaffinität zu IGF-I und IGF-II und sind in der Lage diese dadurch zu inhibieren [120]. Die Nomenklatur der Bindungsproteine von IGFBP1 bis IGFBP3 wurden 1989 aufgrund

des hohen Aufkommens in diversen Laboren festgelegt [121]. Die anfänglich als passive Transporter beschriebenen Proteine spielen eine wesentliche Rolle sowohl extra- als auch intrazellulär. Faktisch werden 75 % des im Serum befindlichen IGFs als ternärer Komplex mit IGFBP3 und einer säurelabilen Untereinheit, der *acid labile subunit*, (ALS), transportiert. IGFBP1, IGFBP2 und IGFBP4 binden die restlichen IGFs in Form eines dualen Komplexes [122]. Eigenschaften wie die IGF-Bindungsaffinität oder auch IGF-unabhängige zelluläre Effekte sind dabei von posttranslationalen Modifikation wie einer Glykosylierung oder Phosphorylierung abhängig [123]. Die IGF-unabhängige Wirkung von IGFBPs wird durch eigene Rezeptoren vermittelt, so wie z.B. durch den IGFBP3-Rezeptor oder TGF- $\beta$ -Rezeptor. Zudem sind IGFBPs imstande nach Internalisierung in den Zellkern einzudringen und die Genexpression zu initiieren [124].

Das am häufigsten exprimierte IGFBP in humanen Tumorentitäten ist das IGFBP2. Dieses spielt eine Schlüsselrolle bei der Regulation von Zellmigration und Invasion auch aufgrund seiner Expression in Geweben mit schneller Zellteilung und Motilität [125]. Neben der Expression von IGFBP2 im Blutserum, konnte seine Anwesenheit auch im Tumorgewebe nachgewiesen werden. Aufgrund seiner häufigen Korrelation mit der Tumoraggressivität wird IGFBP2 daher ebenso als prognostischer Biomarker anerkannt [126–128]. Eine der drei funktionellen Domänen von IGFBP2 ist die Heparinbindungsdomäne (HBD) zur Erkennung von Glykosaminoglykanen. Diese Domäne spielt eine wichtige Rolle bei der Bindung an Komponenten der EZM und vermittelt die Zellproliferation und Migration [129]. Die Interaktion mit der extrazellulären Matrix ermöglicht die Konzentrierung von IGF-gebundenem IGFBP2 und vermittelt so die Freisetzung von bioaktivem IGF und die Modulation der Interaktion mit dem IGF-RI [130]. Zur Ausübung von IGF-unabhängigen Effekten gewährleistet die Kernlokalisationssequenz (NLS) den Eintritt von IGFBP2 in den Nucleus [131]. Auf diese Weise wird die Genexpression induziert und die Invasion von Tumorzellen gefördert [132]. Beispielsweise ist die dadurch gesteigerte Expression von MMP-2 aufgrund der proteolytischen Aktivität notwendig für das Durchbrechen der Basalmembran [133]. Ebenso unterstützt die transkriptionell gesteigerte VEGF Expression die Tumorzellangiogenese [114].

### 2.3.2 Oberflächenproteine

Bereits 1978 entdeckten Gartner et al. ein sich auf der Thrombozytenoberfläche befindliches Protein mit einer Lektinaktivität [134]. Hsu-Lin et al. verwiesen ebenso auf ein 140 kDa schweres Protein, welches lediglich nach einer Thrombinaktivierung signifikant nachzuweisen war [135]. Kurze Zeit später wurde eben dieses Protein als *platelet activation-dependent granule-external membrane* (PADGEM) bezeichnet, da sich die als Glykoprotein identifizierte Struktur in der  $\alpha$ -Granula befindet und erst nach Aktivierung der Thrombozyten sekretiert und in die Membran eingebaut wird [136]. Das heute zu der Klasse der *cell adhesion molecule* (CAMs) gehörende P-Selektin ist u.a. für die Größe und Stabilität der Thrombozytenaggregate verantwortlich. Dessen bevorzugter Bindungspartner *P-selectin glycoprotein ligand-1* (PSGL-1) ist auch auf der Oberflächenmembran der Thrombozyten integriert. Jedoch befindet sich die bis zu 100-fache Menge des PSGL-1 auf Leukozyten [137,138]. Dadurch dient das Adhäsionsprotein ebenso der Rekrutierung von Leukozyten bei Gefäßverletzungen und Entzündungsreaktionen [139]. Das P-Selektin vermittelt dabei das Zellrollen der Thrombozyten und Leukozyten auf aktivierten Endothelzellen [140,141]. Trotz des Scherstress ermöglicht eine hohe Assoziations- und Dissoziationsrate des P-Selektins an das PSGL-1 in Kombination mit einer hohen Zugfestigkeit das Zellrollen der Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate [142].



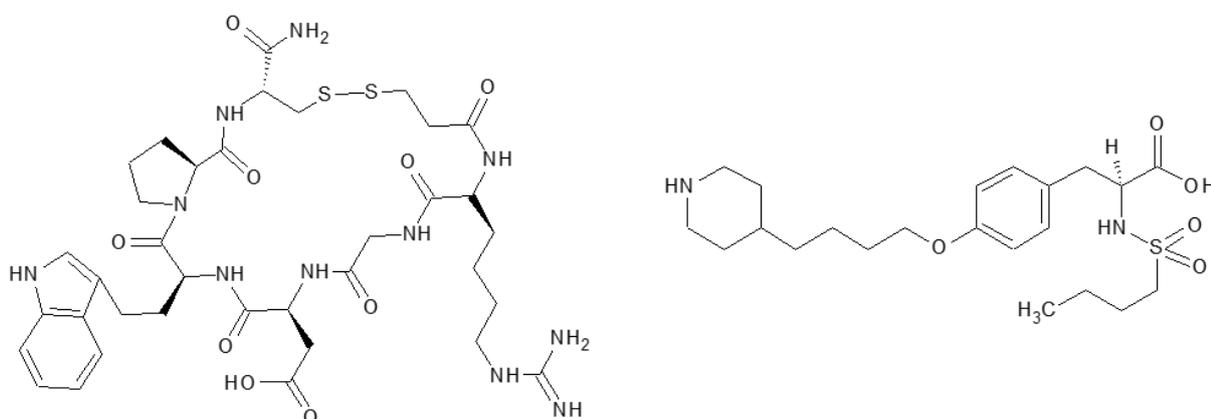
**Abbildung 7:** Struktureller Aufbau der verschiedenen Selektine (CD62) aus der calciumabhängigen *C-type lectin family*; COOH = Carboxylgruppe; Cyto = zyttoplasmatische Domäne zur Signaltransduktion, TM = Transmembrandomäne zur Fixierung; SCR = *short consensus repeats*; EGF = *Epidermal-Growth-Factor-like* Domäne; CRD = *Carbohydrate Recognition Domain* bzw. Lektindomäne zur Erkennung des Liganden [143]

In **Abbildung 7** wird der schematische Aufbau der drei Selektine dargestellt, welche sich entweder auf den Thrombozyten und Endothelzellen befinden können (P-Selektin), auf der Oberfläche der Endothelzellen nach Stimulierung exprimiert werden (E-Selektin) oder in der Membran der Leukozyten eingebaut sind (L-Selektin) [144]. P-Selektin besitzt im Vergleich zu

den anderen beiden Selektinen die höchste Affinität und Bindungsselektivität zu PSGL-1 [145]. Dabei ist es bedeutend zu erwähnen, dass das auf den Thrombozyten befindliche GPIIb ebenso eine Bindung mit dem P-Selektin eingeht, auch wenn diese eine geringere Affinität besitzt [146]. Generell erkennt P-Selektin sialylierte und fucosylierte Kohlenhydrate [147]. Vor allem ist das Tetrasaccharid *Sialyl Lewis<sup>x</sup>* (sLe<sup>x</sup>), bestehend aus N-Acetylneuraminsäure, Galaktose, N-Acetylglucosamin und Fucose an einer Untereinheit des PSGL-1 und die Sulfatierung des N-terminalen Tyrosins an der zweiten Untereinheit für eine starke Adhäsion notwendig [148–150]. Auf u.a. primären Kolonkarzinomzellen wurde vielfach die Expression von *Sialyl Lewis<sup>a</sup>* (sLe<sup>a</sup>) entdeckt [151,152]. Aufgrund der Ähnlichkeit seiner Struktur dient Heparin ebenso als Angriffspunkt. Somit ist der Einsatz von Heparin zur antimetastatischen Therapie nicht verwunderlich [153,154]. In *in vivo* Analysen konnte die Metastasierung bei P-Selektin defizienten Mäusen und bei Verwendung von Anti-P-Selektin Antikörpern höchst signifikant reduziert werden [147]. Ebenso zeigte der P-Selektin Inhibitor PSI-697 eine signifikante Abnahme von Venenthrombosen bei Mäusen [155]. Eine neue Variante des Inhibitors in Nanopartikelform zeigte in einer aktuellen Veröffentlichung verbesserte pharmakokinetische Eigenschaften und einen besseren inhibitorischen Effekt [156]. Für experimentelle Versuche in dieser Arbeit wurde das *small molecule* Bimosiamose, ein synthetischer Pan-Selektin Antagonist, verwendet.

Wie schon in Kapitel 2.2.1 erläutert ist das GPIIb/IIIa essentiell für die Thrombozytenaggregation. Das Integrin besteht aus den zwei nichtkovalent miteinander verknüpften  $\alpha$ - und  $\beta$ -Einheiten. Beide Untereinheiten sind mit einer transmembranen Region verankert und bestehen nach erfolgter Exozytose aus einer großen extrazelluläre Domäne mit zahlreichen kationischen Bindungsstellen, welche kohäsive Bindungen eingehen kann [157]. Über die kleinere zytoplasmatische Domäne der  $\beta$ 3 Untereinheit lässt sich das Integrin nach Aktivierung der Thrombozyten in seine aktivierte Form überführen [158]. Für den klinischen Gebrauch wurden bereits 1999 drei verschiedene Arzneimittel von der *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassen. Der monoklonale Antikörper Abciximab und das Peptid Eptifibatid erhielten eine Zulassung für die Anwendung einer perkutanen koronaren Intervention (PCI), sprich einer Revaskularisierung der stenosierten Koronararterien, und für die Indikation eines akuten Koronarsyndrom (ACS), welcher von einer instabilen Angina pectoris bis hin zu einem Myokardinfarkt reichen kann. Der oral zu verabreichende *small molecule* Wirkstoff Tirofiban ist ebenso für eine ACS zugelassen worden [159,160].

Abciximab stellte sich im Vergleich zu den anderen Antagonisten als ein höchst effektiver Inhibitor heraus v.a. aufgrund seiner Reaktivität zu zusätzlichen Oberflächenrezeptoren [161]. Aufgrund dessen wurde vermutet, dass Abciximab als Inhibitor für die Integrine GPIIb/IIIa und  $\alpha v\beta 3$  ebenfalls antiangiogenetische und antimetastatische Eigenschaften aufweist [162]. Allerdings wurde der Vertrieb von Abciximab (ReoPro<sup>®</sup>) im Jahr 2018 aufgrund von Lieferengpässen eingestellt [163].



**Abbildung 8:** Chemische Struktur des Hexapeptids Eptifibatid zur parenteralen Verabreichung und des *small molecule* Tirofiban als oraler GPIIb/IIIa Inhibitor

Eptifibatid hingegen wird zusätzlich unter der Bezeichnung Integrilin<sup>®</sup> zu Heparin und Acetylsalicylsäure bei instabiler Angina Pectoris und einer PCI laut dem Ausschuss für Humanarzneimittel (CHMP) der EMA empfohlen [164].

Eine ebenso entscheidendes Oberflächenprotein ist das bei Patienten aufgrund mangelnder Aggregation und Adhäsion entdeckte GPVI [165]. Das transmembranäre Protein aus der Immunglobulin-Superfamilie besitzt zwei extrazelluläre Bindungsdomänen für Kollagen. Das positiv geladene Arginin im transmembranären Teil ermöglicht die Assoziation des GPVI mit dem Fc-Rezeptor  $\gamma$ -chain (Fc $\gamma$ RIIA, CD32A), einem Immunglobulin-Rezeptor [166,167]. Die Bindung von GPVI Dimeren an Kollagen auf inaktiven Thrombozyten führt zu der Initiierung der Signalkaskade und damit zur Aktivierung der Thrombozyten [168–170].

### 2.3.3 Zelluläre Pathways

Die Milztyrosinkinase (SYK) fördert als zentraler Immunmodulator die allergische Atemwegsinflammation und führt zudem zu einer Bronchokonstriktion [171]. Aktuell wird der seit 2020 in Europa zugelassene SYK-Inhibitor Fostamatinib (Tavalisse®) zur Reduzierung einer Antikörper-vermittelten Zerstörung bei einer Immunthrombozytopenie als Zweitlinientherapie angewendet [172]. SYK spielt eine wesentliche Rolle bei der kollagenvermittelten Thrombozytenaktivierung und -aggregation [173]. Die Aktivierung von GPVI führt zur Bindung an den FcγRIIA, welcher über einen *immunreceptor tyrosin-based activation motif* (ITAM) verfügt [174]. Die Phosphorylierung von ITAM durch die *Src family kinases* (SFK) führt wiederum zur Rekrutierung und Aktivierung von SYK [175]. Das Resultat dieser Signalkaskade ist die Phosphorylierung diverser Proteine beispielsweise wie die *phospholipase C γ2* (PLCγ2), *linker for T-cell activation* (LAT) und PI3K und die schlussendliche Aktivierung der Thrombozyten [176,177]. Neben FcγRIIA besitzt zudem der *C-type lectin-like type II receptor* (CLEC-2) die Möglichkeit SYK mithilfe des hemITAM zu aktivieren [178]. Der Ligand für die Aktivierung von CLEC-2 ist Podoplanin und wurde bereits mehrfach mit einem Mundhöhlenkarzinom in Verbindung gebracht [179–181].

Thrombozyten besitzen nennenswerter Weise auch die Möglichkeit das in der Zellwand gram-negativer Bakterien vorkommende Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS) zu erkennen. Es wird eine Ausschüttung spezifischer Immunmodulatoren durch Thrombozyten nach Aktivierung des *Toll-like receptor 4* (TLR4) vermutet [182]. Eine verstärkte Bindung der Thrombozyten an Fibrinogen ist auch eine Reaktion auf die Aktivierung von TLR4, jedoch ohne die Expression von P-Selektin zu beeinflussen [183].

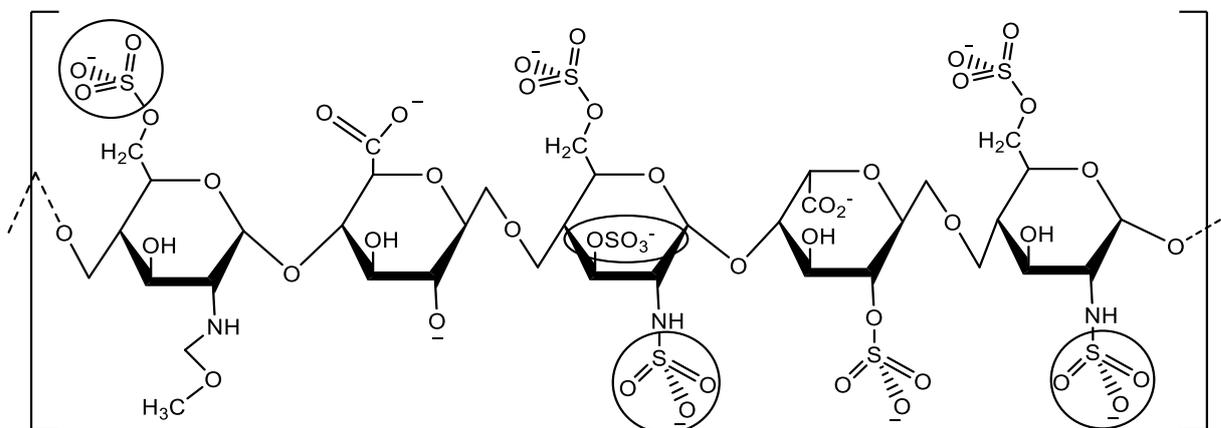
## 2.4 Antikoagulanzen

Eine Venöse Thromboembolie (VTE) ist eine häufig auftretende Komplikation der Tumorthherapie. Dazu gehören die Krankheitsbilder der tiefen Beinvenenthrombose und der Lungenarterienembolie. Eine Tumorerkrankung vervierfacht dabei bekanntermaßen das Risiko einer VTE und für Tumorpatienten mit einer VTE ist die Mortalität im Vergleich zu Patienten ohne eine VTE sogar doppelt so hoch [184]. Aus diesem Grund wird die Wahrscheinlichkeit einer tumorassoziierten VTE patientenspezifisch anhand des sog. *Khorana score* ermittelt [185]. Beispielsweise empfiehlt die DGK in der *European Society Guideline* bei einer bereits mittleren Wahrscheinlichkeit einer Lungenembolie die direkte Einleitung einer Antikoagulation [186]. Für die Standardtherapie kommen Unfraktioniertes Heparin (UFH), Niedermolekulare Heparine (LMWH) und ebenso das synthetische Pentasaccharid Fondaparinux zum Einsatz. Arzneimittel der Gruppe der Direkten Oralen Antikoagulanzen (DOACs) haben sich neben den klassischen Antikoagulanzen in der Klinik aufgrund einer optimierten Dosierbarkeit und eines geringeren Monitoringaufwandes bereits als sehr effizient und sicher herausgestellt [187]. Die Therapie mit Antikoagulanzen geht jedoch auch einher mit der erhöhten Wahrscheinlichkeit eines Blutungsrisikos bei Krebspatienten.

### 2.4.1 Indirekte Antikoagulanzen: Heparine

Als sog. multivalente Biomodulatoren besitzen Heparine neben der Hämostase ein breites Wirkspektrum. Der Einfluss der Heparine beläuft sich ebenso auf Entzündungsprozesse, Angiogenese sowie der Tumormetastasierung [188]. Die Ursache der vielfältigen Wirkung der polysulfatierten Glykosaminoglykane, bestehend aus glykosidisch miteinander verknüpften D-Glucosaminen und Uronsäuren, liegt in ihrer Ähnlichkeit zu den körpereigenen Strukturen der Heparan-Proteoglykane [189]. So führt z.B. der tumorassoziierte Einbau von Fibrin in die EZM des primären Tumors zur Bindung von unterschiedlichen Wachstumsfaktoren und infolgedessen zur Unterstützung der Adhäsion, Proliferation und Migration. Durch Blockade des Fibrins und Inhibierung von Enzymsystemen unterbinden Heparine den Vorgang der Migration und Invasion [190]. Der antitumorale Effekt beruht u.a. auf Unterbindung der Thrombin-vermittelten Aktivierung der Thrombozyten sowie dessen Wirkung als potenter Wachstumsfaktor [191]. Einen antiangiogenetischen und antiadhäsiven Effekt weisen Heparine durch Stimulation des *tissue factor pathway inhibitor* (TFPI) und dadurch die Runterregulierung von *tissue factor* (TF) [192].

Das unfraktionierte Heparin (UFH) besitzt ein Molekulargewicht von durchschnittlich 15.000 Dalton und besteht aus mehr als 18 Monomeren. Aufgrund der Größe und der starken Bindung an diverse Plasmaproteine besitzt UFH eine geringe Bioverfügbarkeit und Halbwertszeit (HWZ) im Vergleich zu den niedermolekularen Heparinen (LMWH), welche durch chemische oder enzymatische Modifikation hergestellt werden und nur noch aus 5-17 Monomeren bestehen. Enoxaparin beispielsweise besitzt ein Molekulargewicht von 4500 Dalton und wird durch alkalische Depolymerisation von Heparin-Benzylestern hergestellt [193]. Die biogenen Stoffe UFH und LMWH steigern durch Bindung an das in der Leber gebildete Antithrombin III (ATIII) dessen Aktivität, welches physiologisch die Gerinnung durch Inhibierung der Serinproteasen IIa (Thrombin), VIIa, Xa (Stuart-Prower-Faktor), XIa und XIIa hemmt. Die Molekülgröße korreliert bekanntermaßen mit dem Anti-FIIa Effekt der Heparine, sodass die kleineren LMWH nur einen geringeren Anti-FIIa Effekt, aber einen verhältnismäßig höheren Anti-FXa Effekt aufweisen. Alle indirekten Antikoagulanzen haben ein spezifisches Pentasaccharid gemeinsam, welches für die Wirkung verantwortlich ist. Das auf dieser Basis synthetisch hergestellte Fondaparinux besteht aus lediglich den fünf notwendigen Monomeren, wie Sie in **Abbildung 9** dargestellt sind. Durch die chemische Synthese ist eine Chargenvariabilität ausgeschlossen. Der Effekt auf Thrombin und die direkte Wirkung auf Thrombozyten bleibt bei diesem synthetischen Glykosaminglykan vollständig aus. Anders als UFH und LMWH ist Fondaparinux dementsprechend ein selektiver Faktor Xa Inhibitor und verstärkt die Aktivität von Antithrombin III um das 300-fache, wohingegen UFH diesen um das 700-fache vervielfacht.



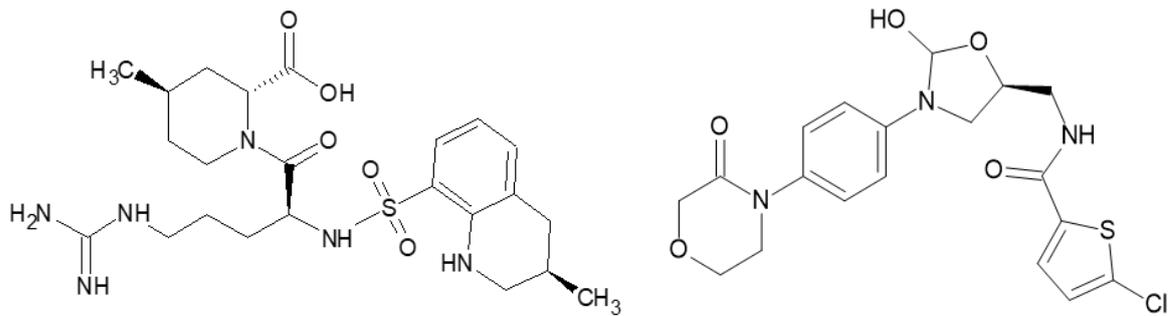
**Abbildung 9:** Grundbaugerüst der indirekten Antikoagulanzen und somit die Struktur von Fondaparinux

Aufgrund ihrer Chargenvariabilität und Unterschiede in ihrem Sulfatierungsgrad werden UFH und LMWH in der internationalen Einheit ihrer Aktivität dosiert [194]. Die negative Ladung der

Heparine erfordert eine subkutane Applikation. Eine Überdosierung oder Kombination mit weiteren Gerinnungshemmern führt zu einer unerwünschten Blutung und kann mit einer Protamin-Gabe durch Komplexbildung von UFH aufgehoben werden, da es sich bei Protamin um ein polykationisches Protein handelt. Aufgrund der ebenfalls antikoagulativen Eigenschaften ist die Dosierung von Protamin abhängig von der Menge und des zeitlichen Abstands der Heparin-Gabe, wobei Protamin auch eine HWZ von sieben Minuten besitzt [195]. Die am häufigsten auftretende und somit nennenswerte Nebenwirkung einer Therapie mit Heparinen, v.a. mit UFH mit einer Inzidenz zwischen 1 – 5 %, ist die Heparin-Induzierte-Thrombozytopenie (HIT) [196]. Beim HIT Typ II werden Antikörper gegen das Heparin-Protein-Komplexe gebildet, wobei besonders der Komplex aus Heparin und *platelet factor 4* (PF-4) als auslösender Faktor angesehen wird [197]. Als Folge kommt es zur Thrombenbildung im arteriellen und venösen Blutsystem. Eine weitere Therapie mit Heparinen ist daher nicht mehr möglich, weswegen andere Gerinnungshemmer verwendet werden müssen.

#### **2.4.2 Direkte Antikoagulanzen: DOAC**

Bereits 1981 wurde Argatroban in Japan entwickelt und seit 1990 sowohl in Japan als auch in Korea zur Therapie der arteriellen Verschlusskrankheit und später auch zur Therapie akuter zerebraler Thrombosen zugelassen. Die USA erteilte Argatroban im Jahr 2000 eine Zulassung zur Behandlung von HIT Typ II [198]. Der parenteral verabreichte und selektive Thrombininhibitor wurde 2001 im Rahmen der ARG-911 Studie bei 304 Patienten mit HIT Typ II angewendet [199]. Aufgrund der Resultate soll auch heute noch Argatroban laut der S3 Leitlinie zur Prophylaxe der VTE als wirksames Medikament bei HIT Typ II eingesetzt werden [200]. Der Struktur in **Abbildung 10** ist zu entnehmen, dass L-Arginin das Grundgerüst des sog. *small molecule* bildet. Dadurch entfaltet Argatroban seine inhibitorische Wirkung durch reversible Bindung im aktiven Zentrum des Thrombins, der sog. katalytischen Triade bestehend aus Serin-Histidin-Aspartat. Argatroban bindet frei zirkulierendes und an Fibrin gebundenes Thrombin hochselektiv und hemmt somit die Umsetzung des löslichen Fibrinogens zu Fibrin [198]. Zur Kontrolle einer Heparin-Therapie und beim Einsatz von Argatroban beim HIT Typ II wird die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) und die aktivierte Gerinnungszeit (ACT) herangezogen [201].



**Abbildung 10:** Argatroban als direkter Thrombininhibitor (links) und Rivaroxaban als direkter FXa-Inhibitor (rechts)

Rivaroxaban wurde 2008 zur Prophylaxe venöser Thromboembolien bei Erwachsenen in den Markt eingeführt. Es handelt sich dabei um einen direkten Faktor-Xa-Inhibitor. Hierdurch wird die Gerinnungskaskade unterbrochen, jedoch blockiert es im Gegensatz zu Argatroban nicht die thrombininduzierte Thrombozytenaggregation. In randomisierten Doppelblindstudien der Phase III (RCT), den sog. RECORD-Studien, wurde Rivaroxaban mit Enoxaparin verglichen in Bezug auf die Prävention einer VTE. In allen vier Studien wurde eine relative Risikoreduktion für Rivaroxaban festgestellt [202–205]. Auch im Bereich der Sekundärprävention von Schlaganfällen bei älteren Patienten mit Vorhofflimmern ist bereits seit 2016 nach europäischer Leitlinie die bevorzugte Gabe von DOACs empfohlen. Die US-amerikanischen Leitlinien folgten 2019 diesem Beispiel. Die Entscheidung basiert auf den Ergebnissen der PROSPER-Studie, einer retrospektiven Kohortenstudie mit insgesamt 11662 Patienten, bei der u.a. ein geringeres Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse und ein geringeres Sterberisiko gezeigt worden ist [206].

## 2.5 Klinischer Einsatz von Heparin sowie Thrombozytenaggregationshemmern

Laut der aktuellen Empfehlung (05.10.2021) der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaft e.V. (AWMF) sollen hospitalisierte Patienten mit COVID-19 in Abwesenheit von Kontraindikationen eine standardmäßige medikamentöse Thromboembolieprophylaxe mit LMWH erhalten. Alternativ kann Fondaparinux zur Anwendung kommen [207]. Es konnte in einer retrospektiven, multizentrischen Kohortenstudie mit 191 stationären COVID-19-Patienten aus Wuhan gezeigt werden, dass das Vorhandensein des Fibrin-Spaltprodukts D-Dimer eine 18-fach erhöhte Mortalität zur Folge hat [208].

Die Bildung von Mikrothromboembolien in den Bronchiengefäßen wird von McGonagle et al. mit der Freisetzung von *tissue factor* auf Endothelzellen, Makrophagen und Neutrophile durch eine COVID-19 Infektion in Verbindung gebracht. Dies führt zu einer Thrombenbildung in den Kapillaren der Bronchien und ist vermutlich der Grund für einen starken D-Dimer Anstieg und

der schlechten Möglichkeit der Beatmung der Patienten [209]. Durch eine Heparinbehandlung lässt sich laut einer Analyse mit 449 schwerkranken COVID-19 Patienten mit erhöhtem D-Dimer-Wert die Mortalität im Vergleich zu Patienten ohne Heparinprophylaxe signifikant senken [210]. Ergänzend wird auf die Notwendigkeit einer prospektiven Studie zur Bestätigung der Ergebnisse hingewiesen.

Es konnte bei symptomatischen COVID-19 Patienten zudem eine erhöhte Bildung von Thrombozyten-Monozyten-Aggregaten festgestellt werden. Das auf den Thrombozyten befindliche P-Selektin und Integrin GPIIb/IIIa sind dabei die Auslöser für die TF Expression durch Monozyten und die anschließende Aggregation. Beim Patienten resultiert dies in einer thromboembolische Komplikation [211]. Eine Interaktion zwischen P-Selektin und PSGL-1 konnte bereits sehr früh durch den *small molecule antagonist* PSI-697 unterbunden werden [212]. In einer randomisierten placebokontrollierten Doppelblindstudie konnte jedoch kein inhibitorischer Effekt auf die Gerinnung von Thrombozyten-Monozyten-Aggregaten festgestellt werden, im Gegensatz zu gegen P-Selektin gerichteten Antikörpern [213].

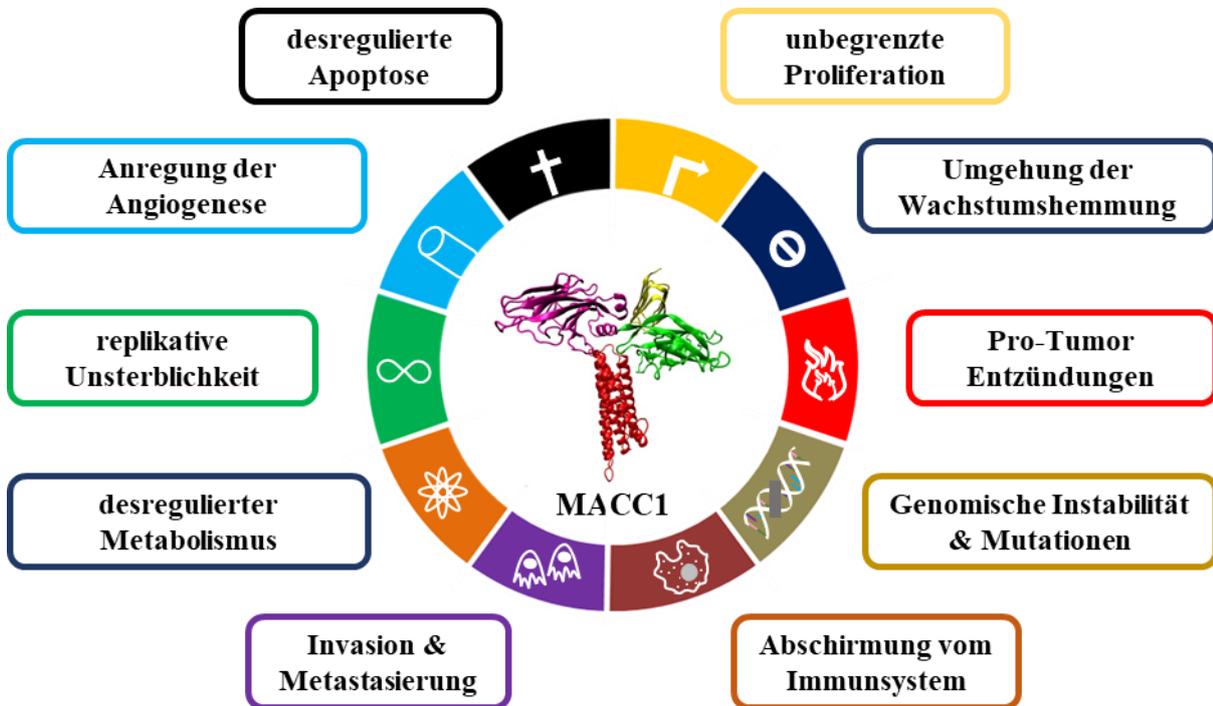
Der monoklonale Antikörper Crizanlizumab (Adakveo®) ist ein erfolgreicher P-Selektin Inhibitor, welcher die Interaktion zwischen P-Selektin und Leukozyten signifikant unterbindet [214]. Somit erhielt Novartis nach der doppelblinden, randomisierten und placebokontrollierten Phase-II-Studie SUSTAIN an 198 Patienten mit der Sichelzellerkrankung (SCD) eine Zulassung für das Arzneimittel Adakveo® [215]. Bei SCD handelt es sich um eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung der Hämoglobinsynthese, bei der das Hämoglobin unter Sauerstoffmangel in eine Sichelform übergeht. Das Resultat ist ein schmerzhafter Gefäßverschluss, einer sog. vaso-okklusiven Krise (VOC), aufgrund erhöhter Aggregatbildung. Crizanlizumab reduziert in einer Zusatztherapie die Rate der VOC signifikant und wird von der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und medizinische Onkologie (DGHO) empfohlen [216]. Weiterhin wurde bei COVID-19 Patienten das *acute respiratory distress syndrom* (ARDS) mit einer erhöhten Mortalität festgestellt [217]. Bei ARDS Patienten ist das Level an löslichem P-Selektin im Plasma deutlich erhöht [218].

## 2.6 MACC1

Solide Tumore entstehen durch vielfältige genetische Mutationen aus den physiologischen Zellen des betreffenden Gewebes. Aus funktioneller Sicht unterscheiden sich die Tumorzellen dann von den gesunden Gewebezellen, was ihnen vielfältige Überlebensvorteile verschafft und die Grundlage des invasiven Wachstums darstellt. Diese funktionellen Besonderheiten wurden in einer bahnbrechenden Arbeit von Hanahan und Weinberg im Jahr 2000 erstmals als die „*Hallmarks of Cancer*“ zusammengestellt. Auf dieser Basis existiert das Verständnis einer Anzahl an verschiedenen Regulierungsmechanismen für die Transformation einer gesunden Zelle in einen malignen Tumor. Unter der Annahme, dass fast alle Säugetierzellen ähnliche molekulare Mechanismen zur Vermehrung, Differenzierung und dem Zelltod aufweisen, wurden anfänglich insgesamt sechs relevante physiologische Anpassungen der Zellphysiologie für das bösartige Wachstum vermutet. Dazu gehört eine eigenständige Versorgung mit Wachstumsfaktoren, Desensitivität gegenüber wachstumshemmenden Signalen, Verhinderung der Apoptose, unbegrenztes Vermehrungspotenzial, kontinuierliche Angiogenese und letztendlich eine erfolgreiche Gewebsinvasion und Metastasierung [219]. Die Fähigkeiten zur Tumorprogression wurden 2011 auf insgesamt zehn Eigenschaften erweitert und erst 2022 wurde die „*Hallmarks of Cancer: New Dimensions*“ veröffentlicht, in der weitere vier Charakteristika hinzugefügt worden sind [220,221]. Zu den neuen tumorfördernden Eigenschaften gehören u.a. die Entschlüsselung der phänotypischen Plastizität und polymorphe Mikrobiome.

Der Kolorektalkarzinom (CRC) ist die dritthäufigste Krebserkrankung und der zweittödlichste Tumor weltweit [222]. Ein hoher Anteil von etwa 90 % der Krebstodesfälle ist auf die metastatische Ausbreitung ausgehend vom Primärtumor zurückzuführen. Das wichtigste Instrument zur Früherkennung ist die Koloskopie und die auf hauptsächlich histopathologische Untersuchungen begrenzte Patientenprognose. Die Erforschung molekularer Schlüssel-moleküle kann die Effizienz der Diagnose, Prognose und Therapie signifikant steigern [223,224]. Ein 2009 identifizierter prognostischer Biomarker zur Metastasierungsprognose stellt das *metastasis-associated in colon cancer-1* (MACC1) dar. Das MACC1-Gen ist in Kolonkarzinomzellen und deren Metastasen überexprimiert. Die Expression der MACC1 mRNA im Primärtumor korreliert mit der metachronen Metastasierung. Während Patienten ohne MACC1-Expression im Primärtumor eine 5-Jahres-Überlebensrate von 80 % aufweisen, liegt sie bei Patienten mit hoher MACC1-Expression bei 15 % [225].

Patienten mit niedrigen MACC1-Werten zeigen zudem eine signifikant reduzierte Rezidivrate in Höhe von 15 %, verglichen mit 69 % bei Patienten mit hohem MACC1-Wert [226]. Darüber hinaus konnte MACC1 auch bei einer Vielzahl von soliden Tumoren identifiziert werden [227]. Zudem führt abhängig vom MACC1-Level eine Therapie von Darmkrebszellen gegenüber Standardtherapeutika wie Doxorubicin zu einer Resistenzentwicklung. Eine Überexpression von MACC1 erhöht nämlich die Präsenz des Effluxtransporters *ATP-binding cassette subfamily B member 1* (ABCB1), welches das Zytostatika in den extrazellulären Raum befördert [228].



**Abbildung 11:** Erweiterte Darstellung des Einflusses vom MACC1-Protein auf die Charakteristika von Krebs durch Beteiligung und Aktivierung verschiedener Signalmechanismen [229]

In Anlehnung an die von Hanahan und Weinberg 2011 erweiterte Darstellung der Schlüsselkomponenten für die Transformation von normalem Gewebe in einen aggressiven Tumor in „*Hallmark of Cancer: Next generation*“ spielt das MACC1-Gen eine zentrale Rolle bei der Ausstattung von Zellen mit einem bösartigen Phänotyp [220,229]. Laut D. R. Welch ist aufgrund der Komplexität einer Tumorentstehung eine einzelne genetische Veränderung unzureichend [230]. Das MACC1-Gen jedoch löst eine Vielzahl an charakteristischen Fähigkeiten aus und fördert diese. Das daraus resultierende gleichnamige Protein ist mit seinen 852 Aminosäuren insgesamt 97 kDa groß und befindet sich größtenteils im Zytoplasma, wobei etwa 20 % im Zellkern lokalisiert sind [231]. MACC1 besitzt vielfältige Eigenschaften, u.a. als Transkriptionsfaktor zur Deregulation der Apoptose über die *Signal transducers and activators of transcription 1/3* (STAT1/3) Signalwegaktivierung. Ein MACC1 *knockdown* erhöhte in

diesem Versuch die Empfindlichkeit der Tumorzellen für eine durch den Fas-Rezeptor vermittelte Apoptose, welcher zur Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Familie gehört [232]. Ein relevantes transkriptionelles Ziel von MACC1 ist das Proto-Onkogen MET, welcher den Rezeptor für den Liganden *Hepatocyte Growth Factor* (HGF) kodiert [233]. Die 50 kDa große extrazelluläre  $\alpha$ -Kette der Rezeptor-Tyrosinkinase (RTKs) c-Met ist über eine Disulfidbrücke mit der 145 kDa  $\beta$ -Kette an die Membran gebunden [234]. Die MACC1 vermittelte Aktivierung des HGF/c-Met Signalwegs ist ein wesentlicher Einflussfaktor für die Ausbreitung von Primärkarzinomen [235]. c-Met reguliert die Stimulierung der Zellproliferation und die Angiogenese [236]. Die überexprimierte HGF/c-Met Signaltransduktion im CRC ist eine treibende Kraft der Invasion und erhöht das Metastasierungspotenzial erheblich [237]. Der HGF/c-Met Signalweg ist Teil der Embryogenese und der Wundheilung. Daher ist es nicht verwunderlich, dass hierdurch die Motilität, Zellpolarität und Adhäsion gesteuert wird [238]. Aktuelle Studien unterstützen die bisherigen Erkenntnisse und zeigen, dass eine c-Met Aktivierung eine EMT durch Hochregulierung des Chemokinrezeptors CXCR7 fördert [239].

Trotz dieses umfassenden und zunehmenden Verständnisses zur Rolle von MACC1 als Malignitätsfaktor für vielfältige solide Tumore ist bisher völlig offen, ob die onkogene Wirkung des MACC1, insbesondere zur Förderung der Metastasierung, auch mit einer erhöhten Koagulabilität und insbesondere durch eine verstärkte TCIPA gesteuert wird.



### **3. Ziel der Arbeit**

Thrombozyten tragen durch zahlreiche Mechanismen zur Krebsentwicklung und insbesondere zur hämatogenen Metastasierung von Tumoren bei. Die molekularen Mechanismen einer Thrombozytenaktivierung durch Tumore können sehr vielfältig und auch gewebespezifisch unterschiedlich sein. Eine pharmakologische Hemmung der TCIPA hätte aber ein großes Potenzial, die Progression von Tumoren und deren Metastasierung zu unterdrücken. Inwieweit dies durch die klassischen antikoagulativen Therapiestrategien erfüllt wird, oder ob auch weitere Targets adressiert werden müssten, bleibt bisher noch nicht in Zusammenhang gesetzt. In dieser Arbeit soll anhand von *in vitro* Experimenten ein tieferer Einblick in die Tumorzell-Thrombozyten-Interaktion v.a. beim Bauchspeicheldrüsenkrebs gewonnen werden, um so mögliche Targetierungsstrategien zu verdeutlichen. Dabei soll insbesondere der Ansatz einer Kombinationstherapie unterschiedlicher Aggregationsmechanismen getestet werden, wodurch wir Hinweise auf neue Biomarker erhalten können.

Die für diese Zwecke entwickelten Methoden sollen des Weiteren zur Untersuchung des bekannten prognostischen Biomarker MACC1 angewendet werden. Ungeachtet der vielfältigen prometastatischen Effekte von MACC1, ist dessen Einfluss auf die Thrombozytenaktivierung und die Interaktion mit den entsprechenden Tumorzellen weitestgehend unerforscht. Mögliche Auswirkungen der MACC1 Aktivität auf der Ebene der Blutzirkulation und Thrombozyten-Interaktion sollen erörtert werden

In Bezug auf der hämatogenen Metastasierung kommt ein weiteres Onkogen, nämlich das IGFBP2, in Betracht, welches überraschender Weise weder mit dem Biomarker MACC1 noch mit der TCIPA bis dato in Verbindung gebracht worden ist. Die Erkenntnisse, welche im ersten Schritt bei der Thrombozyten-Tumorzell-Interaktion gesammelt worden sind, werden zur Herstellung eines systemischen Zusammenhangs zwischen MACC1 und dem bei CRC Patienten bekannterweise überexprimierten IGFBP2 herangezogen [240].

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Verwendete Materialien

#### 4.1.1 Chemikalien und Ausgangsstoffe

Substanzbezeichnung	Hersteller
Bacillo1 <sup>®</sup> AF	Paul-Hartmann AG, Heidenheim
Biozym cDNA Synthesis Kit <sup>®</sup>	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Blasticidin [10 mg*mL <sup>-1</sup> ]	InvivoGen, San Diego, USA
BSA, pH 7, ≥98%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Calcein-AM	VWR International, Pennsylvania, USA
Calciumchlorid-Dihydrat	AppliChem GmbH, Darmstadt
CASYclean <sup>®</sup>	Omni Life Science GmbH & Co. KG, Bremen
CASYton <sup>®</sup>	Omni Life Science GmbH & Co. KG, Bremen
Clarity <sup>™</sup> Western ECL Substrate Kit	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Corn Trypsin Inhibitor, ≥95%	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Corning <sup>®</sup> Collagen I Rat Tail [10.80 mg*mL <sup>-1</sup> ]	Discovery Labware Inc., Bedford, USA
Direct-zol <sup>™</sup> RNA PreWash	Zymo Research, Irvine, CA, USA
DMEM w:4,5 g*L <sup>-1</sup> Glucose, 3,7 g*L <sup>-1</sup> NaHCO <sub>3</sub> , w/o: L-Glutamine, Sodium Pyruvate	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
DMSO, Dimethylsulfoxid > 99.5 % zur Synthese	Carl Roth GmbH & Co, KG, Karlsruhe
DNase/RNase-Free Water	Zymo Research, Irvine, CA, USA
DTT, Dithiothreitol	Thermo Fisher Scientific GmbH, Langenselbold
D-Luciferin	Thermo Fisher Scientific GmbH, Langenselbold
DPBS, 1×, w/o Ca und Mg, steril	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat, ≥ 99 % USP	Carl Roth GmbH & Co, KG, Karlsruhe

<b>Substanzbezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Fetales Kälberserum F7524	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Formaldehyd Lösung, 37 %	Merck KGaA, Darmstadt
Geneticin - G418 [100 mg*mL <sup>-1</sup> ]	InvivoGen, San Diego, USA
Gigasept® Instru AF	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt
Glucose	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Halt™ Protease Inhibitor Cocktail, 100× (PIC)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Langenselbold
HEPES [1 M]	Thermo Fisher Scientific GmbH, Langenselbold
Human IGF-I Quantikine® ELISA Kit	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
Human IGFBP2 Quantikine® ELISA Kit	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
Isopropanol, 100%	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH & Co, KG, Karlsruhe
L-Glutamin Lösung [200 mM]	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Laemml-Probepuffer, 2×	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Luciferase, firefly recombinant	Thermo Fisher Scientific GmbH, Langenselbold
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Methanol, 100.0 %	VWR International, Pennsylvania, USA
Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Gels	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Molecular Probes® ATP Determination Kit	Thermo Fisher Scientific GmbH, Langenselbold
Mycoplasma Off™	Minerva Biolabs GmbH, Berlin
MycosPY®	Biontex Laboratories GmbH, München
Natriumazid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

## Material und Methoden

Substanzbezeichnung	Hersteller
Natriumcitrat-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumorthovanadat	Thermo Fisher Scientific GmbH, Langenselbold
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumpyruvat [100 mM]	Life Technologies Corporation, New York, USA
Penicillin-Streptomycin Lösung [10.000 U*mL <sup>-1</sup> / 10 mg*mL <sup>-1</sup> ]	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific GmbH, Langenselbold
Pierce™ RIPA Buffer	Thermo Fisher Scientific GmbH, Langenselbold
Precision Plus Protein™ Unstained Standards	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Precision Protein™ StrepTactin-HRP Conjugate	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Puromycin [10 mg*mL <sup>-1</sup> ]	Invivogen, Kalifornien, USA
RNA PreWash Buffer	Zymo Research, Irvine, CA, USA
RNA Wash Buffer	Zymo Research, Irvine, CA, USA
RPMI-1640® w: L-Glutamine, w: 2.0 g*L <sup>-1</sup> NaHCO <sub>3</sub>	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Sterillium®	Bode Chemie GmbH, Hamburg
TRI Reagent®	Zymo Research, Irvine, CA, USA
TRIS-Base Pufferan® ≥99,9%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Triton® X 100	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Trypan Blau Lösung [4,0 g*L <sup>-1</sup> ]	SAFC Biosciences, Buchs, Schweiz

Substanzbezeichnung	Hersteller
Tween® 20	AppliChem GmbH, Darmstadt
Trypsin / EDTA [0,05 % / 0,02 %] in DPBS w/o: Ca und Mg, w: Phenolrot	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach

**Tabelle 2:** Chemikalien und Ausgangsstoffe

#### 4.1.2 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung	Anteile
ADP Lösung [1 mM]	ADP Millipore® Wasser	4,272 mg ad 10,0 mL
ATP Determination Kit Reaktionslösung	Reaction Buffer (20x) DTT SL D-Luciferin SL Luciferase, firefly (5 mg*mL <sup>-1</sup> ) Millipore® Wasser	500 µL 100 µL 500 µL 2,5 µL 8,9 mL
BCA Lösung	BCA Reagenz A, Puffer BCA Reagenz B, Kupfersulfat	196,1 µL ad 10,0 mL
Blocking Lösung <i>Western-Blot</i>	Magermilchpulver DBPS	5,0 g ad 100,0 mL
Blocking Lösung <i>P-Selektin-Adhäsion</i>	BSA PBS+	300 mg ad 10 mL
BSA Lösung, 3 %	BSA Natriumazid DPBS	1,50 g 0,05 g ad 50 mL
Calciumchlorid Lösung [0,5 mol*L <sup>-1</sup> ]	Calciumchlorid-Dihydrat Millipore® Wasser	1,47 g ad 100,0 mL
Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> - Lösung [0,5 mol*L <sup>-1</sup> ]	Calciumchlorid-Dihydrat Magnesiumchlorid Millipore® Wasser	3,675 g 2,380 g ad 50,0 mL
Calcein-AM Lösung [1 mmol*L <sup>-1</sup> ]	Calcein-AM DMSO	50,0 µg 50,0 µL
DTT Stammlösung [0,1 mol*L <sup>-1</sup> ]	DTT Millipore® Wasser	25 mg 1 mL
D-Luciferin Stammlösung [10 mmol*L <sup>-1</sup> ]	D-Luciferin Reaction Buffer (1x)	3 mg 1 mL

Material und Methoden

Bezeichnung	Zusammensetzung	Anteile
EDTA Lösung	EDTA DPBS	326,8 mg ad 1000 mL
Elektrodenpuffer, 1×	Elektrodenpuffer, 10x Millipore® Wasser	100,0 mL ad 1000,0 mL
Elektrodenpuffer, 10×	Glycin Tris-Base SDS Millipore® Wasser	72,0 g 15,0 g 5,0 g ad 500 mL
Fixierungslösung	Formaldehyd Lösung 37 % PBS	40 µl ad 1,0 mL
Glycin Lösung [0,1 mol*L <sup>-1</sup> ]	Glycin DPBS	0,375 g 50,0 mL
hP-Selektin SL [0,25µg/µL]	hP-Selektin-Fc-Tag Millipore® Wasser	50,0 µg 200 µL
Kryokonservierungs- Medium	FKS DMSO	45,0 mL 5,0 ml
Luminol-Peroxidlösung	Clarity™ Luminol/enhancer solution Clarity™ Peroxid solution	4,0 ml 4,0 ml
PBS+	Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> - Lösung DPBS	0,1 mL ad 50,0 mL
Proteinstandard-Lösung [0,2 mg*mL <sup>-1</sup> ]	BSA Aqua millipore	2 mg Ad 10 ml
RIPA-Lysepuffer	HALT™ PIC [100x] PMSF [200 nM] Natriumorthovanadat [100µM] Pierce™ RIPA Buffer	20 µl 10 µl 10 µl ad 1000 µl
TBS Puffer, 1×	TBS-Puffer 10x Millipore® Wasser	100,0 ml ad 1000,0 ml
TBS Puffer, 10×	Natriumchlorid Tris-Base Millipore® Wasser pH-Einstellung mit 1M Salzsäure auf 7,3	40,0 g 6,060 g ad 500,0 ml
TBS-T Puffer	TBS-Puffer 10x Tween™ 20 Millipore® Wasser	100 mL 2 mL ad 1000 mL

Bezeichnung	Zusammensetzung	Anteile
Thrombozyten Puffer	HEPES [10 mM]	2,383 g
	NaCl [136,7 mM]	7,989 g
	KCl [2,6 mM]	0,194 g
	MgCl <sub>2</sub> [1 mM]	0,095 g
	NaHCO <sub>3</sub> [13,8 mM]	1,159 g
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O [0,36 mM]	0,050 g
	Glucose [5,5 mM]	0,991 g
	Millipore® Wasser	1000,0 ml
Transfer Puffer	Transferpuffer 10x	100,0 ml
	Millipore® Wasser	ad 1000,0 ml
Transfer Puffer, 10x	Glycin	72,0 g
	TRIS-Base	15,0 g
	Millipore® Wasser	ad 500,0 ml
TRAP-6 Stammlösung [3,3 mmol*L <sup>-1</sup> ]	TRAP-6	5,0 mg
	Millipore® Wasser	2,0 mL
Triton® X 100 Lösung, 1 % (m/v)	Triton® X 100	1,0 g
	Millipore® Wasser	ad 100,0 mL
Waschpuffer FACS, 0,5 %	BSA	0,25 g
	Natriumazid	0,05 g
	PBS	ad 50 ml
Zellsuspension FACS	BSA	0,6 g
	PBS	ad 20 ml

**Tabelle 3:** Puffer und Lösungen

#### 4.1.3 Inhibitoren, Testsubstanzen und Proteine

Substanzbezeichnung	Zielstruktur	Hersteller
ADP, Aktivator [50 µM]	P2Y <sub>12</sub>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
Argatroban [MD-805] [10 µM]	Thrombin	MedChemExpress®, New Jersey, USA
SYK Inhibitor IV [BAY61-3606] [10 µM]	Spleen Tyrosin Kinase (SYK)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
BPTU [10 µM]	P2Y <sub>1</sub> Rezeptor	Prof. Müller, Universität Bonn
Enoxaparin [1 IE*mL <sup>-1</sup> ]	Thrombin, FXa, FVIIa, FIIa	Sanofi Aventis®, Frankfurt

Substanzbezeichnung	Zielstruktur	Hersteller
Eptifibatid [HY-B0686] [10 µg*mL <sup>-1</sup> ]	GPIIb/IIIa	MedChemExpress®, New Jersey, USA
IGF-I [100-11] (rekombinant, human)	IGF-IR, IGF-IIR	PeproTech Inc., New Jersey, USA
IGFBP2 [674-B2] (rekombinant, human)	IGF	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
Kollagen Typ I, Aktivator [5 µg*mL <sup>-1</sup> ]	GPVI, GB1b-XI-V, vWF	Haemochrom Diagnostica GmbH, Essen
Losartan [3798] [20 µM]	GPVI	Tocris Bioscience GmbH, Bristol, UK
PSB-18164 [10 µM]	P2X <sub>1</sub> Rezeptor	Prof. Müller, Pharmazeutisches Institut, Bonn
P-Selektin-Fc-Tag [13025- H02H] (rekombinant, human)	PSGL-1	Sino Biological, Eschborn
P-Selektin-Fc Chimera [137-PS] (rekombinant, human)	PSGL-1	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
PSGL-1-Fc Chimera [3345-PS] (rekombinant, human)	P-Selektine	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
Rivaroxaban [BAY 59-7939] [0,5 nM]	Faktor Xa	MedChemExpress®, New Jersey, USA
RO-Heparin [5 µg*mL <sup>-1</sup> ]	P-Selektin	Dr. Giangiacomo Torri, Institut for Chemical and Biochemical Research, Milan, Italy
Seratrodast [AA 2414] [10 µg*mL <sup>-1</sup> ]	TPαR	MedChemExpress®, New Jersey, USA
Resatorvid [TAK-242] [5 µM]	Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4)	MedChemExpress®, New Jersey, USA
Bimosiamose [TBC-1269] [100 µg*mL <sup>-1</sup> ]	E-, L-, P-Selektin	Revotar Biopharmaceuticals, Hennigsdorf
Ticagrelor [1 µM]	P2Y <sub>12</sub> Rezeptor	Prof. Müller, Universität Bonn
TRAP-6, Aktivator [42,5 µM]	PAR	Tocris Bioscience GmbH, Bristol, UK
U46619, Aktivator [20 µM]	TPαR	Tocris Bioscience, GmbH, Bristol, UK
unfraktioniertes Heparin [1 IE*mL <sup>-1</sup> ]	Thrombin, FXIIa, FXIa, FXa, FVIIa, FVa, FIIa	Ratiopharm® Ulm, Deutschland

**Tabelle 4:** Inhibitoren, Testsubstanzen und Proteine

**4.1.4 Antikörper**

<b>Antikörper</b>	<b>Epitop</b>	<b>Eigenschaften</b>	<b>Hersteller</b>
Human Factor III/TF [AF2339]	Mensch-IgG	Ziege, polyklonal, IgG, primär	R&D
Human IGFBP2 [EPR18012-257]	Mensch-IgG	Hase, monoklonal, IgG, primär	Abcam plc, Cambridge, UK
Human IGFBP2 [sc-25285]	Mensch-IgG	Maus, monoklonal, IgG, primär	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Human $\alpha$ -Tubulin [sc-5286]	Mensch-IgG	Maus, monoklonal, IgG primär	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Donkey anti goat IgG [ab150129]	Ziegen-IgG	Esel, polyklonal, Alexa Fluor <sup>®</sup> 488, sekundär	Abcam plc, Cambridge, UK
Goat anti-human IgG [#62-8411]	Menschen-IgG	Ziege, polyklonal, FITC konjugiert, sekundär	Thermo Fisher Scientific GmbH, Langenselbold
Goat anti-mouse IgG [BD554001]	Maus-IgG	Ziege, polyklonal, FITC konjugiert, sekundär	BD Biosciences, New Jersey, USA
Rabbit anti goat IgG [sc-2777]	Ziegen-IgG	Hase, polyklonal, FITC konjugiert, sekundär	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg

**Tabelle 5:** Antikörper

**4.2 Verwendete Geräte und Software**

**4.2.1 Verbrauchsmaterialien**

<b>Verbrauchsmaterialienbezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
96F Non-Treated Black Microwell SH	Thermo Fisher Scientific GmbH, Langenselbold
APACT 4004 Küvetten	Haemochrom Diagnostica GmbH, Essen
CASY <sup>®</sup> cups	Schärfe System GmbH, Reutlingen
CELLSTAR <sup>®</sup> sterile Zentrifugenröhrchen, 15 mL	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
CELLSTAR <sup>®</sup> sterile Zentrifugenröhrchen, 50 mL	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

<b>Verbrauchsmaterialienbezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
CELLSTAR® TC sterile Zellkulturflaschen 25 cm <sup>2</sup> , 50 mL, PS	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
CELLSTAR® TC sterile Zellkulturflaschen 75 cm <sup>2</sup> , 250 mL, PS	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
CELLSTAR® TC sterile Zellkulturflaschen 175 cm <sup>2</sup> , 550 mL, PS	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Collection Tubes	Zymo Research, Irvine, CA, USA
CytoOne® 6-Well-Platte, TC-behandelt, steril	Starlab GmbH, Ahrensburg
CytoOne® 24-Well-Platte, TC-behandelt, steril	Starlab GmbH, Ahrensburg
CytoOne® 96-Well-Platte, TC-behandelt, steril	Starlab GmbH, Ahrensburg
Deckgläser Stärke No. 1, eckig	Paul Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen
Einmalspritzen Injekt® Solo, 10 mL	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Einmalspritzen Injekt® Solo, 20 mL	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Filterpapier 50/PKG, Mini T/B	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Gel-Pipettenspitzen MultiFlex Round	Sorenson BioScience Inc., Utah, USA
Kryogefäße Cryo.S®	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Microplatte 96-Well, PS, U-bottom	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Mini-PROTEAN® TGX™ stainfree	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Mini Trans-Blot® Filter Paper	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Multifly®-Kanüle Set 21 G 200 mm Länge	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Nunc™ F96-MicroWell™, PS, schwarz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Nunc™ F96-MicroWell™, PS, weiß	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Nunc-Immuno® MicroWell® 96-well solid plates	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Nunc MaxiSorp® flat-bottom	Thermo Fisher Scientific GmbH, Langenselbold
Nunc™ Polycarbonat-Membraneinsätze in Multischalen, 24-well, 8 µM	Thermo Fisher Scientific GmbH, Langenselbold

<b>Verbrauchsmaterialienbezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Objektträger Stärke ca. 1 mm	Paul Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen
PARAFILM® M	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Pasteurpipetten, Glas	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Pipettenspitzen TipOne®, 10 µL, natur	Starlab GmbH, Ahrensburg
Pipettenspitzen TipOne®, 200 µL, gelb	Starlab GmbH, Ahrensburg
Pipettenspitzen TipOne®, 1000 µL, blau	Starlab GmbH, Ahrensburg
Pipettenspitzen, 5 mL, Plastibrand®, natur	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Reagiergefäße, 0,6 mL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Reagiergefäße, 1,5 mL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Reagiergefäße, 1,5 mL, SafeSeal, braun	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Reagiergefäße, 2,0 mL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Reagiergefäße, 5,0 mL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Roti®-PVD, 0,45 µm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
S-Monovette® 8,2 mL 9NC	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Serologische Pipetten, 10 mL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Serologische Pipetten, 25 mL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Spritzenvorsatzfilter steril, 0,2 µm	Berrytec GmbH, Harthausen
Sterillium®	Bode Chemie GmbH, Hamburg
Zymo-Spin™ IIC Columns	Zymo Research, Irvine, CA, USA

**Tabelle 6:** Verbrauchsmaterialien

#### 4.2.2 Geräte

<b>Gerätebezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Absaugsystem BVC 21 NT	Vacuubrand GmbH & Co. KG, Wertheim
Absaugvorrichtung BVC professional	Vacuubrand GmbH & Co. KG, Wertheim
Accu-Jet®	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Accu-Jet® pro	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Analysenwaage Kern 770	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern

<b>Gerätebezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Analysenwaage Sartorius Research	Sartorius AG, Göttingen
Analysenwaage Sartorius basic BA210S	Sartorius AG, Göttingen
APACT 4004	Haemochrom Diagnostica GmbH, Essen
ChemiDoc™ XRS+ System	BioRad, Hercules, CA, USA
CO <sub>2</sub> -Brutschrank ICO 105	Memmert GmbH & Co. KG, Schwachbach
Colibri Microvolume Spectrometer	Titertek Berthold, Bad Wildbad
Cryogenic Freezer - MDF-C2156VANC-PA	PHC Holdings Corporation, Tokyo
Excella E24 Incubater Shaker Series	New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA
Fluoroskan Ascent®	Thermo Fisher Scientific GmbH, Langenselbold
Guava® easyCyte HT Flow Cytometer	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt
Laborschüttler KS-15	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
LAF Werkbank Holten Safe 2010	Heto-Holton A/S, Allerød, Dänemark
Lichtmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss, Oberkochen
Lichtmikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss, Oberkochen
Lichtmikroskop Wilovert Standard HF/K	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
Mini-PROTEAN® Tetra Cell and Blotting Module mit PowerPac 300	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Multiskan® EX	Thermo Scientific GmbH, Langenselbold
Multipette® M4	Eppendorf AG, Hamburg
Multiwell Reader FLUOstar™ OPTIMA	BMG Labtech GmbH, Ortenberg
Neubauer Improved® Zählkammer	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
pH-Meter S20 SevenEasy™ pH	Mettler-Toledo GmbH, Giessen
Pinzetten, diverse	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Pipette (1-5 mL) Finnpipette®	Thermo Fisher Scientific GmbH, Langenselbold
Pipette (10 µL) Research® plus	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette (100 µL) Research® plus	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette (1000 µL) Research® plus	Eppendorf AG, Hamburg

<b>Gerätebezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Pipette (10 µL) Transferpipette® S	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Pipette (100 µL) Transferpipette® S	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Pipette (100 µL) Transferpipette® S	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Pipette (200 µL) Transferpipette® S-8	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Pipette (200 µL) Transferpipette® S-12	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Pipette (200 µL) Transferpipette® S-12 electr.	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Purelab® Plus Wasseraufbereitungsanlage	ELGA LabWater, Celle
Purelab® Flex Wasseraufbereitungsanlage	ELGA LabWater, Celle
Spatel, diverse	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
SHP Laborautoklav LABOKLAV 100-Serie	SHP Steriltechnik AG, Detzel Schloß
Thermomixer comfort (IsoTherm 1,5 mL)	Eppendorf AG, Hamburg
Trockenschrank 60°C	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Ultraschallbad Sonorex® Super RK 103 H	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin
Vortex-Genie 2	Scientific industries, New York, USA
Zellzähler CASY® 1 Model TT	Schärfe System GmbH, Reutlingen
Zentrifuge Mini Spin	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Universal 32 R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Zentrifuge Universal 320R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen

**Tabelle 7:** Geräte

#### 4.2.3 Software

<b>Bezeichnung, Version</b>	<b>Urheber</b>
APACT LPC-Software	© LABiTec GmbH, Ahrensburg, Deutschland
ACD/ChemSketch	© ACD/Labs, Toronto, Kanada
GraphPad Prism® 8	© GraphPad Software, San Diego, CA, USA

Bezeichnung, Version	Urheber
guavaSoft™ 3.1.1	© Merck Millipore, Burlington, MA, USA
ImageLab™ 6.0 Software	© Bio-Rad Laboratories 2010
ImageJ	Rasband, W.S., NIH, Bethesda, Maryland, USA
Inkscape 1.1	Software Freedom Conservancy
Microsoft 365:	© Microsoft Corporation, Washington, USA
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Microsoft® Excel</li> <li>• Microsoft® PowerPoint</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Microsoft® Visio</li> <li>• Microsoft® Word</li> </ul>
ZEN 3.0 ( <i>blue edition</i> )	© Carl Zeiss GmbH, Oberkochen
Zotero 5.0.96.2	© Roy-Rosenzweig-Center for History and New Media

**Tabelle 8:** Software

### 4.3 Zellkultur

Zur Einhaltung der aseptischen Bedingungen und Vermeidung einer Kontamination mit Bakterien und Pilzen werden alle zellulären Arbeiten unter einer Laminar-Air-Flow (LAF) Werkbank durchgeführt. Es werden ausschließlich steril autoklavierte Arbeitsmaterialien und 70 % (V/V) Isopropanol zur Desinfektion verwendet. Zur Vermeidung von Mykoplasmen wird die Werkbank regelmäßig zu Beginn und zum Schluss mit Mycoplasma Off behandelt.

#### 4.3.1 Zelllinien

Bereits 1975 wurden die Karzinomzellen MIA PaCa-2 (ATCC® CRL-1420™) von A. Yunis aus dem Pankreasgewebe eines 65-jährigen Kaukasiers entnommen [241]. Die undifferenzierten Tumorzellen besitzen eine Verdopplungszeit von 40 h und kennzeichnen sich durch einen triploiden Chromosomensatz aus.

Die Pankreaskarzinomzellen AsPC-1 (ATCC® CRL-1682™) entstammen einer 62-jährigen Kaukasierin [242]. Die aus der Aszites entnommenen Zellen wurden in Nacktmäusen transplantiert und aus dem daraus resultierenden Tumor isoliert [243]. Im Vergleich zu den MIA PaCa-2 Zellen bilden die AsPC-1 Zellen nach direkter Injektion in die Bauchspeicheldrüse von Nacktmäusen kleinere Tumore aus [244]. Die Wahrscheinlichkeit einer Tumorentwicklung bei AsPC-1 liegt bei 100% und bei den MIA PaCa-2 Zellen bei 83% [245].

Die ebenfalls adhärennten Adenokarzinomzellen Capan-2 (ATCC® HTB-80™) entspringen dem Primärtumor eines 56-jährigen Kaukasiers [246]. Im Gegensatz zu den AsPC-1 Zellen, welche schlecht differenziert sind, besitzen die Capan-2 Zellen eine hohe Differenzierung mit einer hohen Übereinstimmung mit dem Ursprungsgewebe [247].

Bei den SW480 Zellen (ATCC® CCL-228™) handelt es sich ursprünglich um ein primäres kolorektales Adenokarzinom eines 50-jährigen Kaukasiers [248]. Die Zelllinie wird nach der Dukes-Klassifikation [249] ins Stadium B eingeordnet, da die Infiltration des Tumors bis zum perirektalen Gewebe reicht. Die ebenfalls adhärennten SW620 (ATCC® CCL-227™) entstammen der Zelllinie SW480 nach erfolgter Metastasierung in den Lymphknoten [250]. Aufgrund dessen werden die SW620 als Dukes Stadium C Zellen klassifiziert.

### **4.3.2 Revitalisierung und Subkultivierung**

Zur Langzeitkonservierung werden die Zelllinien in Kryogefäße bei  $-196^{\circ}\text{C}$  in flüssigem Stickstoff oder bei  $-152^{\circ}\text{C}$  in einem Tiefkühler gelagert. Diese werden zur Inkulturnahme bei Raumtemperatur (RT) aufgetaut und schnellstmöglich in 9 mL Zellkulturmedium in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert. Nach Zentrifugation bei 450 g für 4 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  wird das im Überstand befindliche DMSO, welches eine Zellschädigung verursachen kann, entfernt und das Pellet wird in eine T75 Zellkulturflasche überführt. Die Lagerung jeglicher Zellkulturflaschen erfolgt im Inkubator bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  Gehalt.

Die Zellkulturflasche wird nun täglich visuell und lichtmikroskopisch überprüft. Das im Zellmedium vorhandene Phenolrot zeigt dabei den pH-Wert des Mediums an und deutet damit indirekt auf den Umsatz der Stoffwechselprodukte und die Nährstoffkonzentration hin [251]. Bei einer Gelbfärbung des Mediums muss dieses gewechselt werden. Dabei wird der Überstand aus der Zellkulturflasche abgesaugt, die adhärennte Monolayerkultur wird mit einem Phosphatpuffer (DPBS) gewaschen und mit frischem Medium versehen. Sobald circa 80 % der gesamten Wachstumsfläche der Zellkulturflasche mit einem Zellrasen bedeckt ist, können die Zellen passagiert werden. Dazu werden die Zellen nach einem Waschvorgang mit DPBS in einer Trypsin/EDTA (0,05 %/0,02 %) Lösung bei  $37^{\circ}\text{C}$  für ca. 5 min inkubiert. Die Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) komplexiert dabei die für die Zell-Zell-Bindung notwendigen Calcium- und Magnesiumionen und das Trypsin als Endopeptidase löst die Zell-Matrix-Verbindung. Nach leichtem Abklopfen der Zellkulturflasche können die nun vom Flaschenboden ersichtlich gelösten Zellen in Zellmedium aufgenommen werden. Das dem Medium zugesetzte fetale Kälberserum (FKS) deaktiviert dabei das Trypsin. Zur Entfernung des

EDTA aus der Lösung wird dieses bei 450 g für 4 min bei 4°C zentrifugiert und das entstehende Zellpellet wird in nährstoffreichem Zellmedium resuspendiert und mit einer Konfluenz von 20 % in eine neue Zellkulturflasche ausgesät.

Bei Untersuchungen von Oberflächenproteinen wird beim Lösen der Zellen auf Trypsin verzichtet und lediglich EDTA verwendet, um diese nicht zu zerstören. Die Zellen werden dann im Anschluss in DPBS statt in Medium aufgenommen.

Der gentechnische *knock out* des MACC1-Gens wurde im *Max Delbrück Center for molecular medicine* (MDC) in Berlin mit der CRISPR/Cas-Technologie durchgeführt. Durch eine RNA-vermittelte Verschiebung des Leserasters wird so der Genabschnitt deaktiviert. Zur Selektion der erhaltenen transfizierten SW620 MACC1 Kontrollzellen und der SW620 KO-Variante wird in regelmäßigen Abständen das Medium mit dem Antibiotikum Blastocidin [ $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ] versetzt. Da den transfizierten Zellen, sowohl der KO-Variante als auch den Kontrollzellen, der für eine Antibiotikaresistenz notwendige Genabschnitt hinzugefügt worden ist, können diese auch nach mehreren Passagen der Subkultivierung von den ursprünglichen Zellen selektiert werden. Ebenso wurde im MDC unter Verwendung von siRNA ein IGFBP2 *knockdown* Variante erstellt. Dem Selektionsmedium der SW620 IGFBP2 Kontrollzellen und der KD-Variante wird das Antibiotikum Puromycin [ $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ] hinzugegeben.

**Tabelle 9:** Zusammensetzung des für jede Zelllinie spezialisierten Kulturmediums

Zelllinie	Kulturmedium-Bestandteile	Volumina [mL]
MIA PaCa-2	DMEM Nährmedium	500 mL
	FKS	50 mL
	Penicillin/Streptomycin-Lösung	5 mL
	L-Glutaminlösung (200 mM)	5 mL
AsPC-1 & Capan-2	RPMI-1640 Nährmedium	500 mL
	FKS	50 mL
	Penicillin/Streptomycin-Lösung	5 mL
SW620	DMEM Nährmedium	500 mL
	FKS	50 mL
	L-Glutaminlösung (200 mM)	10 mL
	Natriumpyruvat-Lösung (100 mM)	5 mL

### 4.3.3 Zellzahlbestimmung

Eine definierte Einstellung der Zellkonzentration ist in allen folgenden Untersuchungen unabdingbar. Hierfür wird der Durchflusszytometer CASY® 1 Model TT Cell Counter

verwendet. Das *coulter principle*, welches bereits in den 1940er Jahren von Wallace H. Coulter zwecks Blutzellanalysen entwickelt wurde [252], beruht auf Widerstandsänderungen zwischen zwei Platinelektroden beim Durchtritt partikulärer Teilchen [253]. Die Impedanzänderung ist dabei proportional zum Volumen der Partikel und gibt damit nicht nur die Quantität der Zellen wieder, sondern auch die Vitalität [254]. Die Technik zur Differenzierung zwischen toten und lebenden Zellen wird auch als Stromausschlussverfahren (ECE<sup>®</sup>) bezeichnet.

Die Zellen werden gelöst (s. Kapitel 4.3.2 ), in Medium aufgenommen und zentrifugiert. Von der Suspension, bestehend aus einem Tumorzellpellet im Medium, werden nun 20 µL in 10 mL einer steril filtrierten isotonischen Pufferlösung (CASYton<sup>®</sup>) überführt und vermessen. Aus der Größenverteilung lässt sich die Zellviabilität in [%] und die Zellzahl in [counts\*mL<sup>-1</sup>] bestimmen.

#### 4.3.4 Kontaminationen

Das Zellmedium wird stets zur Vermeidung von Kontaminationen mit Antibiotika versehen. Für gewöhnlich wird eine Kombination aus Penicillin und Streptomycin verwendet. Zusätzlich werden die Zellen regelmäßig lichtmikroskopisch untersucht. Jedoch besteht immer die Gefahr einer Kontamination der Zellkultur mit Mykoplasmen. Diese Bakterien aus der Klasse der Mollicutes [255] sind lichtmikroskopisch nicht erfassbar und resistent gegenüber Standardantibiotika. Kontaminationsquellen können tierische Produkte wie das FKS oder Trypsin sein, oder aber auch das Laborpersonal selbst. Eine breites Spektrum verschiedener Stämme lassen sich mithilfe des PCR-basierten Detektionskits MycoSPY® [256] bestimmen.

#### 4.3.5 Kryokonservierung

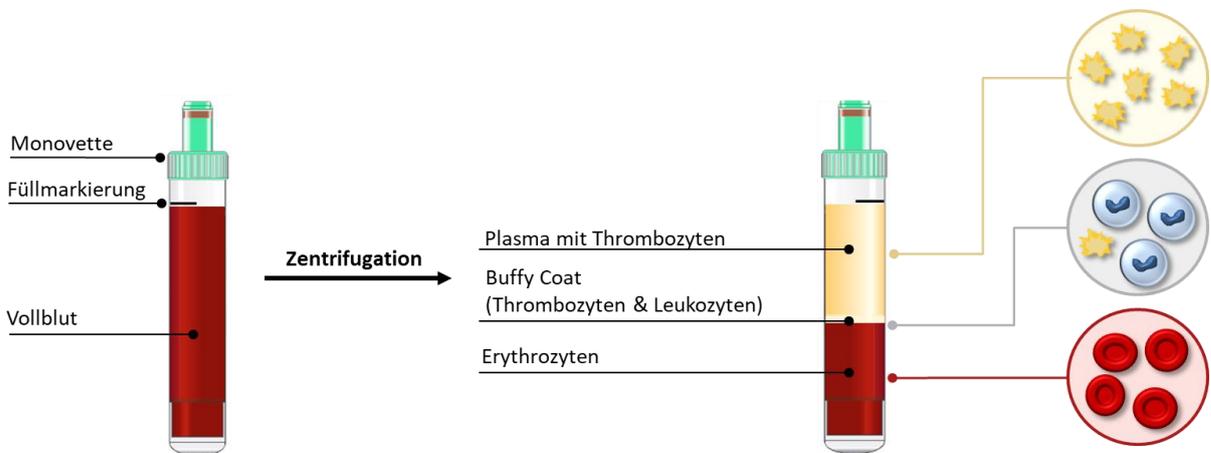
Durch ein dauerhaftes Passagieren unter bestimmten Kultur- und Selektionsbedingungen nimmt die Homogenität einer Zelllinie durch z.B. genetischen Veränderungen ab [257]. Zur Konservierung werden die Zellen gelöst und quantifiziert (s. Kapitel 4.3.2 / 4.3.3). Nach wiederholter Zentrifugation bei 450 g für 4 min bei 4°C werden die Zellen in speziellem Gefriermedium mit einer Zellkonzentration von  $2 \times 10^6 \text{ TC} \cdot \text{mL}^{-1}$  resuspendiert. Das im Kryomedium enthaltene DMSO dient dem Schutz der Zellen vor einer Beschädigung aufgrund einer Kristallbildung [258]. Ab einer Temperatur von -130°C laufen keine biochemischen Reaktionen ab, weswegen die Lagerung bei -196°C in flüssig Stickstoff oder bei -152°C im Tiefkühler stattfindet. Eine schrittweise Abkühlung der Zellsuspension auf 0°C und anschließend auf -80°C schont die Zellen vor der anschließenden Langzeitlagerung.

#### 4.4 Thrombozytengenerierung

Thrombozyten stellen ein zentrales Element der Untersuchungen dieser Arbeit dar. Eine regelmäßige Versorgung mit Thrombozytenkonzentrat (TKZ) war durch das Universitätsklinikum Bonn aus der Abteilung „Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin“ gewährleistet. Nach Übergabe der für Patienten nicht mehr geeigneten TKZ werden diese bei 22°C und unter Gewährleistung von ausreichendem Gasaustausch und stetiger leichter Bewegung gelagert. Die Konzentration der Thrombozyten wird bereits im Universitätsklinikum ermittelt und vor jedem Versuch auf die Obergrenze der physiologischen Konzentration [259] von  $4 \times 10^5 \text{ plt} \cdot \text{mL}^{-1}$  eingestellt. Dafür wird das Konzentrat bei 670 g für 10 min bei RT zentrifugiert, vom Überstand getrennt und in Thrombozytenpuffer (PFB) resuspendiert.

Das frisch hergestellte thrombozytenreiche Puffer (PRB) wird kurz vor dem Einsatz noch mit einer Calciumchlorid-Lösung ( $\text{CaCl}_2$ ) [ $0,5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ] zu einer Endkonzentration von 1 mM recalcifiziert.

Lediglich für den Thrombingenerierungs-Assay sind frische Thrombozyten notwendig. Dazu wird unter Einhaltung der aktuellen Leitlinie [260,261] eine Vollblutprobe entnommen. Auf ein vollständiges Befüllen der S-Monovette und vorsichtiges Invertieren ist zu achten. Die erste Monovette wird aufgrund des erhöhten Stresses an der Einstichstelle verworfen. Die Probe wird anschließend bei 210 g für 20 min bei  $20^\circ\text{C}$  zentrifugiert und die obere thrombozytenreiche Schicht (PRP) wird vorsichtig isoliert. Ein Verschleppen von Leukozyten aus dem sog. „buffy coat“ ist strengstens zu vermeiden. Bei jeder Entnahme handelt es sich bereits um eine physiologische Konzentration. Zur Qualitätswahrung werden stets Kontrollmessungen durchgeführt.

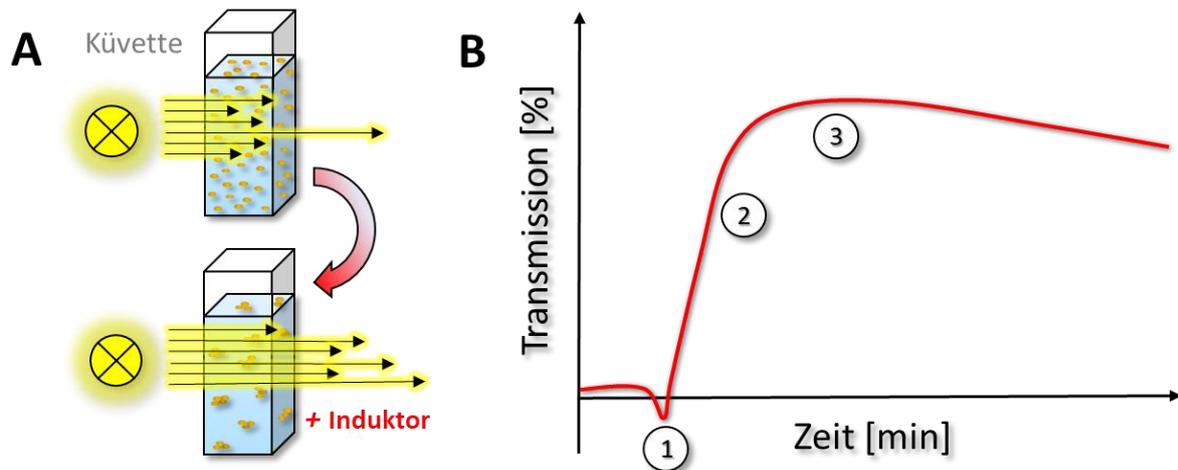


**Abbildung 12:** Isolierung von PRP nach Zentrifugation und Auftrennung von Vollblut in seine Bestandteile

#### 4.5 Thrombozytenaggregations-Assay

Thrombozytenfunktionsstörungen werden bereits in der Klinik mittels Aggregometer diagnostiziert. Ein besonders wichtiger Parameter bei Interaktionen zwischen Tumorzellen und Thrombozyten ist somit die Ausbildung von Thrombozytenaggregate. Die TCIPA korreliert, soweit bekannt ist, mit dem metastatischen Potenzial der jeweiligen Tumorzellen [262]. Die Lichttransmissionsaggregometrie (LTA) nach Born basiert auf Messung einer sich zeitlich ändernden Lichttransmission mithilfe der im AFACT 4004 eingebauten LED-Photometer [263,264]. Der in einer Küvette befindliche Magnetrührer dient der Homogenisierung der Thrombozytenlösung. Es lassen sich insgesamt vier Küvetten mit max.  $220 \mu\text{L}$  Lösungsvolumen gleichzeitig und v.a. unabhängig voneinander vermessen.

Die Kalibrierung einer 100%igen Transmission geschieht einmalig mit dem Thrombozytenpuffer in einer separaten Küvette. Das frisch hergestellte PRB (s. Kapitel 4.4) definiert hingegen vor jeder Messung die 0%ige Transmission. Nach Zugabe eines bekannten Induktors wie z.B. TRAP-6 (**Abbildung 13**) oder der jeweiligen Tumorzelle kommt es zu einem charakteristischen Kurvenverlauf. Beim anfänglichen sog. „shape change“ nimmt die Transmission aufgrund der Oberflächenvergrößerung durch Ausbildung von Pseudopodien ab. Darauf folgt die primäre reversible und dann die sekundäre Aggregation.



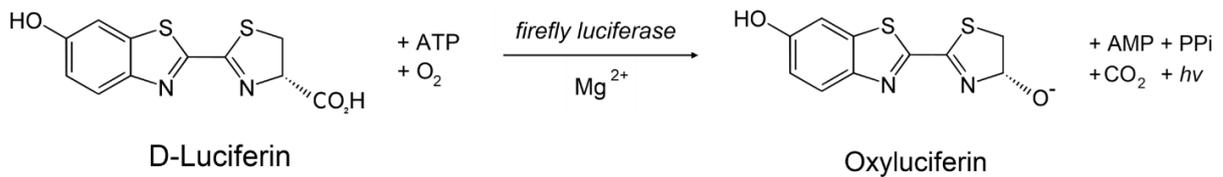
**Abbildung 13:** Kalibrierung der Transmission (0%-Wert) und Messung des Transmissionsverlaufs nach Induktorzugabe (A) und Darstellung des Kurvenverlaufs mit Shape Change (1), primärer (2) und irreversibler (3) Aggregation (B)

Die Tumorzellen werden für jede Versuchsdurchführung mit DPBS gewaschen (s. Kapitel 4.3.2) und ausschließlich mit EDTA gelöst, zentrifugiert und in gewünschter Konzentration in DPBS resuspendiert. Es werden 20  $\mu\text{L}$  der Tumorzelllösung zu 200  $\mu\text{L}$  des PRB hinzugegeben. Die Endkonzentration der Tumorzellen beträgt  $1 \times 10^4 \text{ TC} \cdot \text{mL}^{-1}$  in der Küvette. Der Induktor TRAP-6 wird einmalig in einer Endkonzentration von 42,5  $\mu\text{M}$  eingesetzt, um die Thrombozyten auf Funktionsfähigkeit zu prüfen. Die simultane Vermessung einer reinen PRB Lösung dient stets zum Ausschluss einer Spontanaggregation.

Zwecks Untersuchungen des Einflusses von Inhibitoren wird das frisch erstellte PRB mit einem der Testsubstanzen aus **Tabelle 4** für insgesamt 30 min präinkubiert. Sofern nichts anderes erwähnt wird, kann die eingesetzte Endkonzentration ebenfalls der Tabelle entnommen werden. Eine Vergleichsprobe wird mit dem jeweiligen Lösungsmittel behandelt.

## 4.6 Granula-Sekretions-Assay

Ein weiterer Indikator für die Thrombozytenaktivierung ist die thrombozytäre Granulasekretion. Das sich u.a. in der  $\delta$ -Granula befindliche Adenosin-5'-triphosphat (ATP) wird dabei unter Verwendung des Enzyms Luciferase durch Bestimmung eines Biolumineszenzsignals quantifiziert. Das lichtemittierende Enzym Firefly-Luciferase stammt ursprünglich aus dem Glühwürmchen *Photinus pyralis* und erzeugt durch Umwandlung von D-Luciferin in Oxyluciferin eine Biolumineszenz, welche in ihrer Intensität mit der ATP Konzentration korreliert. Das Emissionsmaximum bei pH 7,8 liegt bei 562 nm [265].



**Abbildung 14:** Chemische Umsetzung von D-Luciferin mithilfe des Enzyms Luciferase in Oxyluciferin und Freisetzung eines zum ATP proportionalen Biolumineszenzsignals [266]

Zum Start werden, analog und simultan zur LTA (s. Kapitel 4.5), 20  $\mu$ L der vorbereiteten Tumorzelllösung zu 200  $\mu$ L des PRB hinzugegeben. Die Inkubationszeit ist dabei tumorspezifisch und wird beim Vergleich verschiedener Tumorzelllinien zuvor ermittelt. Nach der Inkubationszeit wird das Gesamtvolumen auf drei Wells mit je 50  $\mu$ L aufgeteilt und kurz vor der Messung mit dem Reagenzgemisch aus dem *ATP Determination Kit* versetzt. Die Lumineszenzmessung findet im Multiwell Reader FLUOStar™ Optima statt. Als Maximalwert dient wiederum die TRAP-6 Zugabe zu 200  $\mu$ L PRB in einer Endkonzentration von 42,5  $\mu$ M nach ca. 4 min Inkubationszeit. Die Vermessung einer reinen PRB Lösung dient als Nullwert.

## 4.7 Thrombozyten-Adhäsions-Assay

Hierbei handelt es sich um einen calceinbasierten Assay zur Ermittlung einer kontaktvermittelten Thrombozytenaktivierung durch Tumorzellen [267]. Zur Vorbereitung auf diesen Versuch werden Tumorzellen mit Trypsin gelöst (s. Kapitel 4.3.2) und auf eine Konzentration von  $1 \times 10^5$  TC\*mL<sup>-1</sup> eingestellt. Von dieser Tumorzelllösung wird 1 mL pro Well für 72 h in eine 96-Well Platte ausgesät und kultiviert. Am Versuchstag wird TKZ mit 1  $\mu$ L\*mL<sup>-1</sup> Calcein-Acetoxy-methylester (Calcein-AM) versetzt und bei 37°C für 30 min unter ständigem leichtem Schütteln und Lichtausschluss inkubiert. In dieser Zeit passiert Calcein-AM die Plasmamembran und wird von Esterasen der lebenden Zelle hydrolysiert [268].

Das nun hydrophile, fluoreszierende Calcein verbleibt in der Zelle und markiert die Thrombozyten [269], welche anschließend in einer Konzentration von  $4 \times 10^5$   $\text{pl}t \cdot \text{ml}^{-1}$  das PRB darstellen (s. Kapitel 4.4). Die mit Tumorzellen konfluent bewachsene 96-Well Platte kann nun abgeklopft und einmal mit 200  $\mu\text{L}$  DPBS gewaschen werden, bevor 1 mL des mit Calcein gelabelten PRB vorsichtig hinzugegeben wird. Nach 15-minütiger Inkubation unter leichtem Schütteln wird die Platte zweimalig gewaschen, um nicht am Zellrasen adhärenierte Thrombozyten zu entfernen. Durch 15-minütiger Inkubation mit 100  $\mu\text{L}$  einer 1%igen Triton<sup>®</sup> X-Lösung werden jegliche Zellen in der 96-Well Platte lysiert und das freigesetzte Calcein wird in eine schwarzen Nunc<sup>™</sup> F96 MicroWell<sup>™</sup> Platte überführt und am FLUOstar<sup>™</sup> OPTIMA Multiwell Reader bei einer Emission von 519 nm (Exzitation 485 nm) quantifiziert.

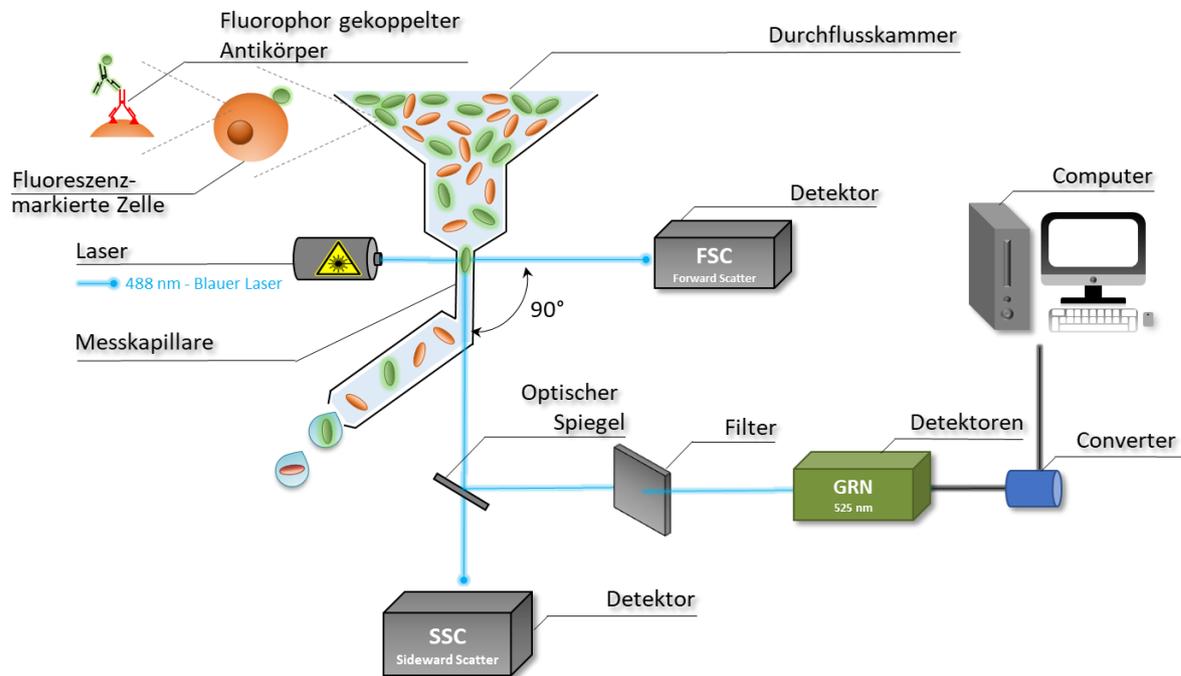
### 4.8 P-Selektin-Adhäsions-Assay

Aufgrund der besonderen Rolle von P-Selektin bei der TCIPA wird beim statischen Adhäsionsassay die Bindungsfähigkeit von Zellen an immobilisiertem P-Selektin ermittelt. Zur Beschichtung einer Nunc MaxiSorp<sup>®</sup> F96 Platte mit einem besonders hohen Proteinbindungsvermögen werden 50  $\mu\text{L}$  pro Well des rekombinanten humanen Proteins P-Selektin-Fc-Tag [20  $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ] pipettiert und über Nacht bei 4°C gelagert. Es folgt ein Waschvorgang mit PBS+ und die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit 3% (m/V) Rinderserumalbumin (BSA) in PBS+ für 1 h bei RT. Die Tumorzellen werden in der Zwischenzeit ausschließlich mit EDTA abgelöst und auf eine Konzentration von  $4 \times 10^4$   $\text{TC} \cdot \text{mL}^{-1}$  eingestellt (s. Kapitel 4.3.2), bevor diese für 30 min mit 2  $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$  Calcein-AM inkubiert und nach einem Waschvorgang auf eine Konzentration von  $1 \times 10^5$   $\text{TC} \cdot \text{mL}^{-1}$  in PBS+ eingestellt werden (s. Kapitel 4.7). Nach Zugabe von 100  $\mu\text{L}$  der Tumorzelllösung für eine Inkubationszeit von 2 h bei 4°C und zwei darauffolgenden Waschvorgängen mit 100  $\mu\text{L}$  PBS+, kann die Anzahl der mit Calcein gelabelten und adhärenierten Tumorzellen quantifiziert werden. Die Messung erfolgt am FLUOstar<sup>™</sup> OPTIMA Multiwell Reader bei einer Emission von 519 nm (Exzitation 485 nm).

### 4.9 Durchflusszytometrie – FACS

Der Durchflusszytometer dient der Charakterisierung verschiedener Tumorpopulationen anhand ihrer Zellgröße und Oberflächenbeschaffenheit. Durch eine immer schmäler werdende Messkapillare ist es möglich Zellen zu vereinzeln, bevor sie einen Laserstrahl (488 nm) passieren und dieses Licht in verschiedene Richtungen streuen. Das Vorwärtsstreulicht (FSC) definiert dabei die Zellgröße in einem Bereich zwischen 0,2 – 150  $\mu\text{M}$  und das Seitwärtsstreulicht (SSC),

welches im 90° Winkel vermessen wird, charakterisiert die Granularität [270]. Zellen können ebenso beim FACS unter Verwendung eines Fluorophors differenziert werden, was es ermöglicht Zellen spezifisch zu isolieren. Der grüne Xanthen-Farbstoff FITC (Fluorescein-5-Isothiocyanat) ist ein häufig verwendetes Fluorophor, welches an diverse Antikörper gekoppelt werden kann, wodurch Oberflächenproteine auf der Zellmembran erfasst werden können. Das Absorptionsmaximum beträgt 488 nm und das Emissionsmaximum 525 nm [271].



**Abbildung 15:** Aufbau eines Durchflusszytometers zur Ermittlung der Zellgröße, Zellgranularität und Expression von Oberflächenproteine

Die Strahlungsintensität (*gain*), die Messzeit oder die Zahl der insgesamt gemessenen Ereignisse (*Count*) sind einige Variablen, welche voreingestellt werden. So reduziert ein anfänglich definierter Schwellenwert (*threshold*) das Hintergrundrauschen, indem abgestorbene Zellbestandteile aus der Messung aufgrund ihrer Größe ausgeschlossen werden.

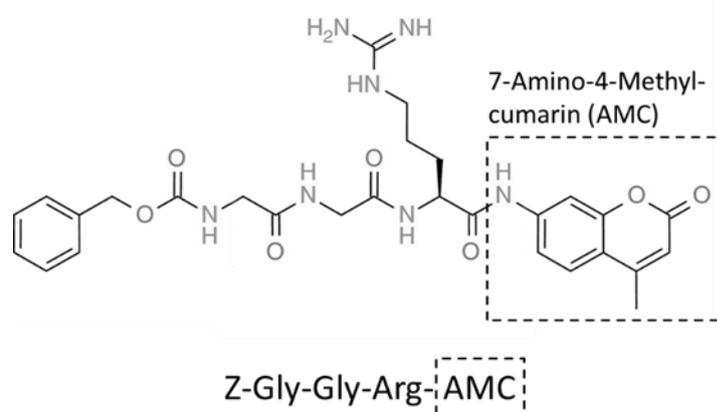
Für die Versuchsdurchführung zur Bestimmung der zellulären *tissue factor* Expression werden Tumorzellen mit EDTA gelöst und mit DPBS gewaschen (s. Kapitel 4.3.2). Dies wird zwei Mal mit Waschpuffer (BSA-Lösung 0,5%) wiederholt, bevor die Zellen gezählt (s. Kapitel 4.3.3) und  $5 \times 10^6$  TC $\cdot$ mL $^{-1}$  in 3%iger BSA-Lösung resuspendiert werden. Eine darauffolgende 15-minütige Inkubation mit BSA dient der Absättigung unspezifischer Bindungsstellen. Nach Aliquotierung der Zellsuspension zu je 100  $\mu$ L werden je Ansatz 1,25  $\mu$ g des monoklonalen primären gegen *tissue factor* gerichteten Antikörpers hinzugegeben und die Zellsuspension wird unter Lichtausschluss für 45 min bei RT inkubiert. Zur Entfernung nicht konjugierter Antikörper

werden die Tumorzellen in einem Waschschrift bei 600 g für 4 min und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird in 100 µL Waschpuffer aufgenommen und mit 0,5 µg eines FITC-gelabelten sekundären *anti-goat* Antikörpers für 45 min lichtgeschützt bei RT inkubiert. Nach abschließenden zwei Waschschriften werden die nun vorbereiteten Zellen in 300 µL Waschpuffer in eine 96-Well-Platte pipettiert und am Guava® easyCyte HT Flow Cytometer vermessen.

Im sog. Dot-Plot, bei dem der FSC gegen den SSC aufgetragen wird, kann die Zellpopulation mit einem *gate* selektiert werden und diese ausgewählten *Counts* werden in einem Histogramm gegen die logarithmische Fluoreszenzintensität dargestellt. Lediglich mit sekundärem Antikörper behandelte Tumorzellen dienen als Nullwert. Eine Expression des *tissue factors* bei der Probe ist gekennzeichnet durch eine Verschiebung der Gauß'schen Normalverteilung im Vergleich zum Nullwert.

#### 4.10 Thrombingenerierungs-Assay

*Tissue factor* stellt einen potenten Initiator der extrinsischen Gerinnungskaskade dar [272]. Das aufgrund einer Endothelverletzung, Entzündung oder Hypoxie in den Blutkreislauf freigesetzte Glykoprotein führt über mehrere Stufen zur Aktivierung der Serinprotease Thrombin. Hauptsächlich aktiviert dieses den GPCR PAR-4 und fungiert somit als Surrogatparameter für eine Thrombozytenaktivierung [273]. Der Thrombingenerierungs-Assay (TGA) nutzt die Proteasefunktion von Thrombin zur Spaltung des fluorogenen Substrats Z-Gly-Gly-Arg-AMC und das daraus resultierende Fluoreszenzsignal wird zur Quantifizierung herangezogen.



**Abbildung 16:** Die Strukturformel der modifizierten TGA Substrat® Lösung mit dem für das Fluoreszenzsignal verantwortliche 7-Amino-4-Methyl-cumarin (AMC)

Für die Versuchsdurchführung wird frisch gewonnenes PRP (s. Kapitel 4.4) eingesetzt. Zwecks Hemmung der intrinsischen Gerinnungskaskade wird das PRP mit 50 µg\*mL<sup>-1</sup> des spezifische

Faktor XIIa-Inhibitors *corn trypsin inhibitor* (CTI) versetzt [274,275]. Tumorzellen werden mit ausschließlich EDTA gelöst und mit einer Konzentration von  $2 \times 10^6$  TC\* $\text{mL}^{-1}$  vorbereitet (s. Kapitel 4.3.2). Jede Messung beinhaltet eine Negativkontrolle, um Thrombozyten-aktivierende Artefakte, z.B. durch verschleppte Erythrozyten, auszuschließen und eine Positivkontrolle zur Sicherstellung der Funktionsfähigkeit der PRP-Lösung. Das dafür eingesetzte TGA-Reagenz C High<sup>®</sup> (RCH) beinhaltet eine Mischung aus *tissue factor* und hoch konzentrierten Phospholipid-Mizellen. Von besonderer Bedeutung für die Messung und im TGA-Substrat<sup>®</sup> ebenso enthalten sind  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen [276]. Jede Tumorzelllinie wird ebenfalls ohne Thrombozyten als Nullwert vermessen.

**Tabelle 10:** Pipettierschema für den Thrombingenerierungs-Assay

Reagenz	Negativkontrolle	Positivkontroll e	Nullwert TC	Probe TC
PRP	17 $\mu\text{l}$	17 $\mu\text{l}$	-	17 $\mu\text{l}$
Tumorzellen	-	-	<b>5 <math>\mu\text{l}</math></b>	<b>5 <math>\mu\text{l}</math></b>
DPBS	33 $\mu\text{l}$	23 $\mu\text{l}$	45 $\mu\text{l}$	28 $\mu\text{l}$
TGA RCH <sup>®</sup>	-	<b>10 <math>\mu\text{l}</math></b>	-	-
TGA Substrat <sup>®</sup>	50 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$
	<i>100 <math>\mu\text{l}</math> Gesamtvolumen</i>			

#### 4.11 Quantitative Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Zur Quantifizierung spezifischer Gene in Tumorzellen wurde eine *real time* qPCR durchgeführt. Die dafür notwendige RNA wurde aus den Tumorzellen unter Verwendung des *RNA Isolations Kits* separiert. Hierfür wurden  $3 \times 10^5$  TC für 5 min bei 1000 g zentrifugiert und anschließend unter Inhibierung der RNase für 5 min mit 500  $\mu\text{L}$  TRI Reagent<sup>®</sup> lysiert. Nach zweiminütiger Zentrifugation bei 12.000 g wird die benötigte RNA im Überstand isoliert und mit weiteren 500  $\mu\text{L}$  96%-igem Ethanol versetzt. Unter Verwendung der im Kit enthaltenen Zymo-Spin<sup>™</sup> Säule wird die RNA durch dreimaliges waschen aufgereinigt und mit DNA/RNA-freiem Wasser aus der Säule eluiert. Die Probe kann nun bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert werden. Der Zielproteinkoeffizient ( $A_{260}/A_{280}$ ) bei der photometrischen Konzentrationsbestimmung am *Colibri Microvolume Spectrometer* soll zwischen 1,90-2,10 liegen.

Nach Einstellung der Konzentration der isolierten RNA auf  $50 \text{ ng} \cdot 3 \mu\text{L}^{-1}$  wird diese auf insgesamt 20  $\mu\text{L}$  aufgefüllt mit 1,25  $\mu\text{M}$  Random Hexamers, 1 mM dNTP Mixtur, 1 U\* $\mu\text{L}^{-1}$  RNase inhibitor, 10 U\* $\mu\text{L}^{-1}$  MuMLV Reverse Transkriptase und 1XRT-Puffer. Die Reaktion zur

Generierung der cDNA erfolgt für 10 min bei 30°C, für 40 min bei 50°C, für 5 min bei 99°C und wird abschließende auf 4°C abgekühlt. Gemäß Herstelleranweisung wird die erzeugte cDNA mithilfe des *HotStart DNA Master SYBR Green I Kit*<sup>®</sup> beim genspezifisch PCR analysiert. Die Vervielfältigung der cDNA beginnt mit einer initialen Denaturierung bei 95°C (5 s). Der Primer bindet nun beim sog. *Annealing* bei 60°C (45 s) an die in Einzelstränge geteilte Matrize und die Polymerase synthetisiert den komplementären DNA-Strang. Dieser Zyklus wird insgesamt 40fach wiederholt. Die für die *real time* PCR verwendeten Primer sind in der u.a. Tabelle wiedergegeben.

**Tabelle 11:** Zur genspezifischen *real time* PCR (rtPCR)verwendeten Primer

MACC1 fow.	5'-TTC TTT TGA TTC CTC CGG TGA-3'
MACC1 rev.	5'-ACT CTG ATG GGC ATG TGC TG-3'
IGFBP2 fow.	5'-GCC CTC TGG AGC ACC TCT ACT-3'
IGFBP2 rev.	5'-CAT CTT GCA CTG TTT GAG GTT GTA C-3'
G6PDH fow.	5'-ATC GAC CAC TAC CTG GGC AA-3'
G6PDH rev.	5'-TTC TGC ATC ACG TCC CGG A-3'

Zur Quantifizierung wird eine Verdünnungsreihe der Zielgen-exprimierenden Zelllinien als Standardkurve verwendet. Es wurden in jeder Versuchsdurchführung Duplikate verwendet und unter Verwendung des Housekeeping-Genes G6PDH normalisiert. Die Ergebnisse stammen von drei unabhängigen Durchgängen.

## 4.12 Proteinanalytik

Durchgeführte Transfektionen beeinflussen die genetische Kodierung und somit auch die Zusammensetzung des Proteoms. Zum Verständnis der zellulären Signalweiterleitung werden ausgesuchte Proteine mittels Elektrophorese aufgetrennt und nach Übertragung im Western-Blot untersucht. Von Zellen sezernierte Proteine lassen sich mittels Enzym-linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) quantifizieren.

### 4.12.1 Generierung von Zelllysaten und Zellüberständen

Die Isolierung der Proteine kann mechanisch, z.B. durch eine Ultraschall-Behandlung, oder auch chemisch stattfinden. Letzteres bietet eine schonende Variante der Separation der Zellbestandteile und wird im Folgenden durchgeführt. Die verwendeten Detergenzien im RIPA-Lysepuffer solubilisieren die Proteine und stören dabei die Lipid-Lipid-, Protein-Protein- sowie Protein-Lipid-Interaktion [277]. Zur Vermeidung des enzymatischen Abbaus oder

Desphosphorylierung findet die Herstellung des Lysats bei 4°C und unter Verwendung diverser Protease-Inhibitoren (PIC, PMSF) und des Phosphatase-Inhibitors Natriumorthovanadat statt [278].

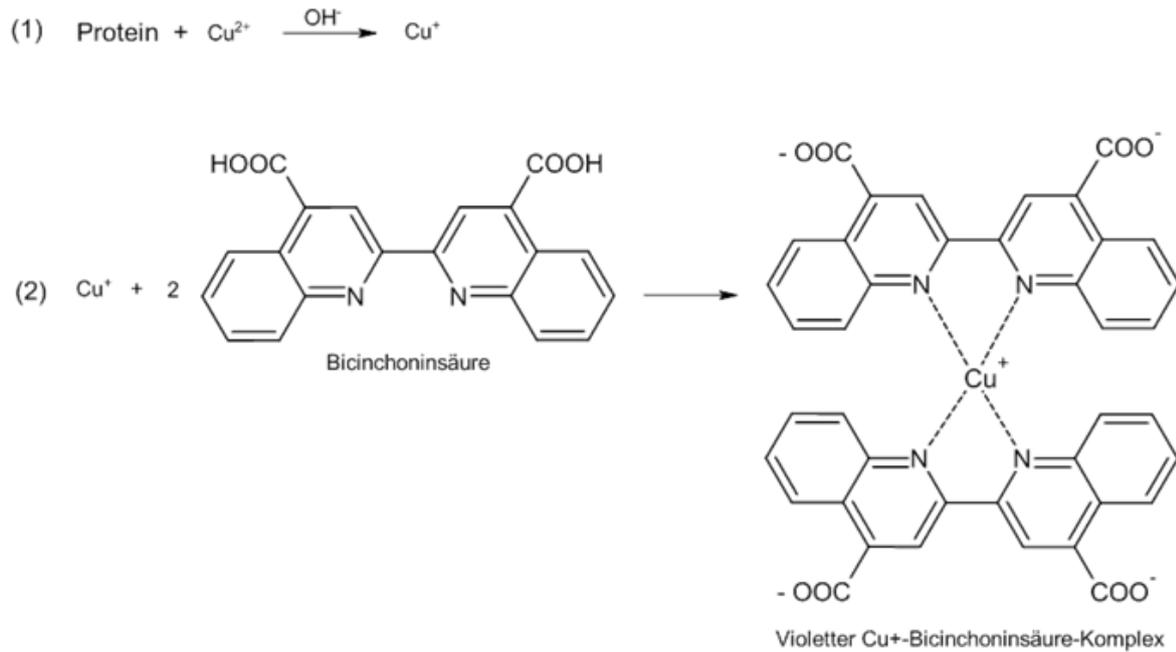
Die Tumorzellen werden mit eiskaltem DPBS gewaschen und mit EDTA gelöst (s. Kapitel 4.3.2). Nach erneutem Waschschrift und Zellzählung (s. Kapitel 4.3.3) wird das Pellet mit dem fertigen Lysepuffer-Gemisch zu  $5 \times 10^6$  TC\*mL<sup>-1</sup> resuspendiert und für 30 min bei 4°C mit 800 U\*min<sup>-1</sup> im ThermoMixer® unter ständigem Schütteln inkubiert. Die Lösung wird anschließend am Vortexer gemischt und bei 14.000 g bei 4°C für 15 min zentrifugiert. Die im klarem Überstand befindlichen solubilisierten Proteine werden vorsichtig von den unlöslichen Zellbestandteilen getrennt und nach der Aliquotierung bei -80°C gelagert.

Während der Erstellung des in Kapitel 4.4 beschriebenen PRB wird nach Zentrifugation des TKZ bei 670 g für 10 min bei RT der Überstand des Plasmas für weitere Untersuchungen abgezweigt. Neben dem Thrombozytenplasma wird auch der Thrombozytenüberstand vermessen, welcher nach Recalcifizierung des frisch gefertigten PRB mit TRAP-6 in einer Endkonzentration von 42,5 µM aktiviert wird. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wird der Überstand der aktivierten und einer unbehandelten Probe durch Zentrifugation bei 1500 g für 10 min bei RT vom Pellet entfernt.

Zur Generierung von Zellüberständen von Tumorzellen werden  $2 \times 10^6$  TC pro T75-Zellkulturflasche ausgesät und nach 6 h wird das Medium entfernt, die Zellen werden mit DPBS gewaschen und es wird FKS-freies Medium hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 48 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt wird der Überstand vorsichtig entnommen, bei 14.000 g bei 4°C für 15 min zentrifugiert und der Überstand anschließend aliquotiert. Dieser kann für insgesamt 6 Monate bei -80°C gelagert werden.

### 4.12.2 Gesamtproteinbestimmung

Zur anschließenden Bestimmung der Proteingesamtmenge wurde der Pierce™ BCA Protein Assay Kit verwendet, um das Volumen für 20 µg Proteinmenge zu ermitteln. Peptide bilden im alkalischen einen farbigen Chelatkomplex mit Cu<sup>2+</sup> Ionen aus, vergleichbar mit der Biuret-Reaktion. Bei 37°C reduzieren die Aminosäuren Cystin, Cystein, Tryptophan und Tyrosin das Cu<sup>2+</sup> zum einwertigen Kupfer Ion. Bei 60°C findet die Reduktion der Cu<sup>2+</sup> Ionen ebenfalls durch Peptidbindungen statt, woraus sich eine verringerte Abhängigkeit der Proteinkonzentration von der Proteinzusammensetzung ergibt [279]. Das farbige BCA-Kupfer(I)-Komplex kann photometrisch bei 570 nm vermessen werden.



**Abbildung 17:** Farbreaktion von einwertigem Kupfer mit BCA zu einem violetten Komplex

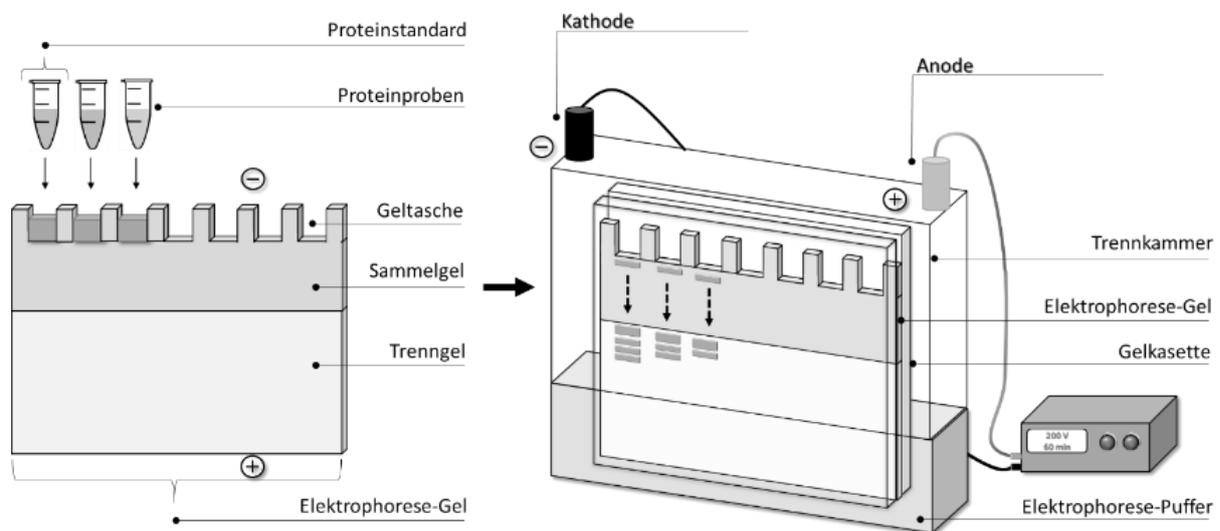
Für die Durchführung werden vier Verdünnungen (1:10, 1:20, 1:50, 1:100), erstellt aus 20  $\mu\text{L}$  des zuvor hergestellten Lysats, in einer 96-Well Platte vermessen. Zur Quantifizierung wird eine Kalibriergerade vom BSA in verschiedenen Konzentrationen (50/75/100/200/300/400  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) inkl. Nullwert erstellt. Als Qualitätskontrolle dienen drei Konzentrationen von BSA (150/250/350  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Der Korrelationskoeffizient ist dabei  $\geq 0,99$  und die Abweichung der Qualitätskontrolle rangiert zwischen  $\pm 5\%$  insgesamt. Alle Werte sind Mittelwerte eines Duplikates. BCA-Reagenz und Kupfersulfat-Lösung werden in einem Verhältnis von 50:1 zu 200  $\mu\text{L}$  je Well hinzugefügt und für 60 min bei 60°C unter Lichtausschluss inkubiert. Die Messung findet am Multiskan<sup>®</sup> EX Plattenleser bei RT statt.

#### 4.12.3 SDS-PAGE

Die Natriumdodecylsulfat – Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ermöglicht eine saubere Auftrennung der zuvor isolierten Proteine durch Anlegen eines elektrischen Felds [280]. Das SDS ist dabei zum einen für die Denaturierung der Tertiär- und Sekundärstruktur der Proteine notwendig, zum anderen maskiert es die Eigenladung der nun geradlinigen Proteinkette. Dabei bindet in Abhängigkeit der Proteingröße eine definierte Menge SDS an das Protein und bildet anionische Mizellen. Der Zusatz von Mercaptoethanol dient der zusätzlichen Reduzierung der Disulfidbrücken. Das verwendete Gel für die Elektrophorese wird aus den Bestandteilen Acrylamid und *N,N'*-Methylenbisacrylamid in einer radikalischen Polymerisation hergestellt, wobei das Mischungsverhältnis die Porengröße bestimmt. Bei der durchgeführten

diskontinuierlichen Elektrophorese wird die Probe im weitporigen Sammelgel aufkonzentriert, indem der pH-Wert nahe dem isoelektrischen Punkt von Glycin liegt und eine abnehmende Feldstärke bis zum Erreichen des Trenngels aufgebaut wird. Beim verwendeten Chlorid/Glycin-Puffersystem dient dabei das neutrale Zwitterion Glycin mit einer geringen elektrophoretischen Mobilität nämlich als Folge-Ion, während das Chlorid Ion durch seine hohe Ladung das Leit-Ion darstellt. Beim Trenngel ändert sich der pH-Wert und damit auch die Ladung und elektrophoretische Mobilität von Glycin. Nun können die aufkonzentrierten Proteine in einem feinporigen Gel bei konstanter Feldstärke durch unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit der Proteingröße nach getrennt werden [281].

Mittels eines Standards bekannter Proteine lässt sich im Anschluss die Proteingröße bestimmen. In die Taschen werden 20  $\mu\text{g}$  des Lysats oder 1,5  $\mu\text{L}$  des Standards pipettiert. In der mit Elektrophoresepuffer gefüllten Trennkammer erfolgt die Trennung für 60 min bei 200 V.



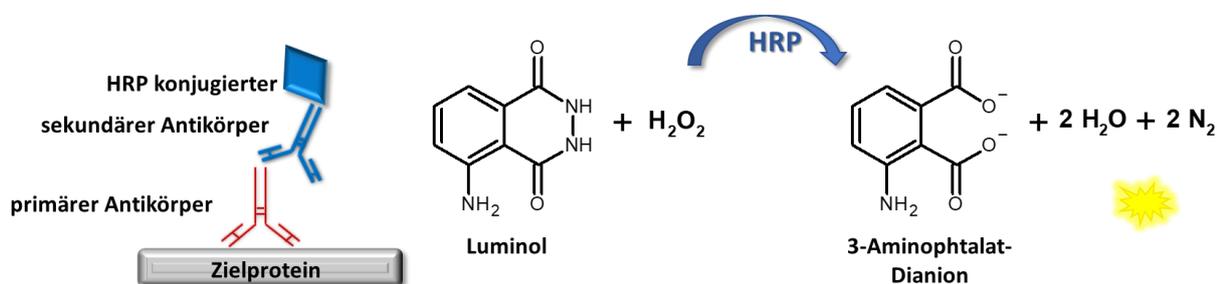
**Abbildung 18:** Aufbau der Elektrophorese Apparatur und Durchführung der Gelelektrophorese mit einem diskontinuierlichen Polyacrylamidgel

Nach Trennung wird zur Normalisierung der Gesamtproteinmenge eine *stain-free detektion* durchgeführt. Diese basiert auf die Verknüpfung kovalenter Bindungen zwischen Trihalogen-Komponenten im Gel und der Aminosäure Tryptophan nach UV-Aktivierung, welche anhand der erzeugten Fluoreszenz quantifiziert werden.

#### 4.12.4 Western-Blot

Zur Identifizierung der Proteine im Western-Blot werden Antikörper eingesetzt. Die sich im Polyacrylamidgel befindlichen Proteine sind jedoch nicht zugänglich, weswegen diese auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran übertragen werden [282]. Zur Aktivierung der stark

hydrophoben PVDF-Membran wird diese für 20 s in Methanol inkubiert und im *blotting-sandwich*, bestehend aus zwei Schwämmen, zwei Filterpapieren, der Membran und dem Gel, eingesetzt. Die Migration der Proteine erfolgt bei 100 V für 1 h unter Verwendung des Transferpuffers (TBS-T). Anschließend werden unspezifische Bindungsstellen mit einer 5% igen (m/V) Magermilchlösung in TBS-T für 1 h blockiert und nach drei Waschvorgängen mit TBS-T folgt die Inkubation des primären gegen IGFBP2 gerichteten Antikörpers über Nacht. In einem einstündigem Zeitintervall bindet ein mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) konjugierter sekundärer Antikörper an die rezeptorbindende Domäne (RBD) des Fc-Fragments des primären Antikörpers. Überschüssige Antikörper werden nach jeder Inkubation in einem dreifachen Waschvorgang mit TBS-T entfernt. Die Detektion im letzten Schritt erfolgt durch Zugabe eines Luminol-Peroxidreagenz zur PVDF-Membran für fünf Minuten. Durch die von HRP katalysierte Oxidation des Luminol geht das Zwischenprodukt 3-Aminophtalat-Dianion hervor. Das dabei erzeugte Chemolumineszenz-Signal bei 430 nm wird vom ChemiDoc™ XRS+ System visualisierte [283].



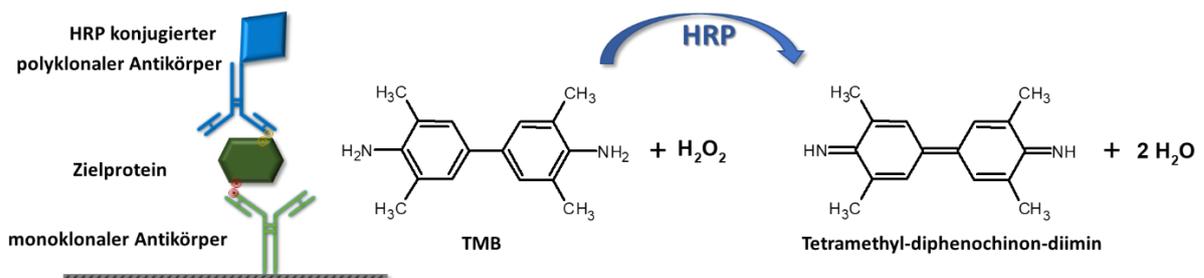
**Abbildung 19:** Detektion des IGFBP2 mittels primären und HRP-konjugierten sekundären Antikörper und die durch Luminol als Substrat ausgelöste Chemolumineszenz

Zur Auswertung erfolgt zunächst die Normalisierung der Gesamtproteinmenge mittels *stainfree detection*. Weiterhin wird als interner Standard neben dem Zielprotein das von der Behandlung einer Zelllinie unbeeinflusste, zytosolische *housekeeping* Protein  $\alpha$ -Tubulin eingesetzt. Aufgrund seines Molekulargewichts von 50 kDa kommt es mit IGFBP2, dessen Molekulargewicht bei 33 kDa liegt, zu keiner Überlappung. Die Auswertung erfolgt mit der Software ImageLab.

#### 4.12.5 Sandwich-ELISA

Der *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) erlaubt im Vergleich zum Western-Blot die zusätzliche Quantifizierung von Proteinen aus dem Zellüberstand (*sup.*). Eine 96-Well Platte ist dafür mit einem monoklonalen Antikörper beschichtet, an welches das Zielprotein während einer zweistündigen Inkubationszeit bindet. Nach dreimaligem Auswaschen der nicht gebundenen

Bestandteile wird ein mit HRP konjugierter polyklonaler Antikörper zur Bindung an dasselbe Zielprotein hinzu pipettiert. In der einstündigen Inkubationszeit ergibt sich ein sog. *sandwich*, in dem z.B. das *human* IGFBP2 zwischen den zwei Antikörpern eingebunden wird. Sobald das Well dreifach gewaschen wurde, kann nun durch Zugabe des Substrats die enzymatische Farbreaktion starten. Die vorher frisch hergestellte Substratlösung ist eine Kombination aus Wasserstoffperoxid und dem eigentlichen Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), welches durch das Enzym HRP oxidiert wird. Als Stopplösung für die enzymatische Reaktion und zur Einstellung des pH-Werts wird eine 1 M Schwefelsäurelösung eingesetzt.

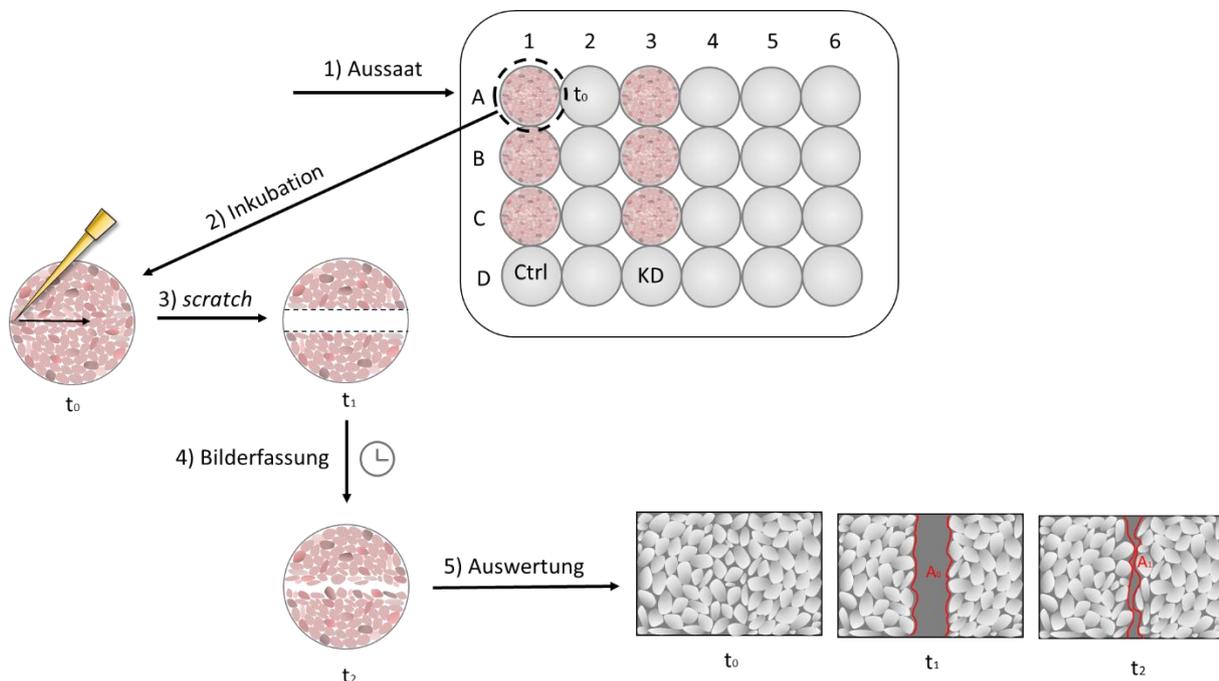


**Abbildung 20:** Schematischer Aufbau eines *sandwich*-ELISA und Darstellung der enzymatischen Farbreaktion mit TMB

Für den Assay wurde das Quantikine<sup>®</sup> ELISA-Kit von R&D System verwendet, welche eine ausführliche Herstelleranweisungen enthält. Zur Erstellung einer Kalibriergerade wurden sieben Konzentrationen in der Spanne zwischen 20 ng/mL bis 0,313 ng/mL vermessen. Als Nullwert dient zusätzlich der sog. *Calibrator Diluent RD5-20*, welcher auch für die Verdünnungsreihe eingesetzt wurde.

### 4.13 Wundheilungs-Assay

Der Wundheilung- oder Scratchassay ist ein einfaches und anerkanntes Verfahren, um die Migrationsfähigkeit von Zellen in einer zweidimensionalen Betrachtung zu detektieren [284]. Da Migrationsmechanismen einzelner Zellen aus dem Primärtumor in der Bewegung zum Blut- und Lymphsystem erfolgen müssen [22], spielt die Migration und der Übergang von der epithelialen in die mesenchymale Form der Zellen eine besondere Rolle bei der Metastasierung. Die Aufzeichnung einer zweidimensionalen Wundschließung ist eine bedeutende und standardisierte *in vitro* Methode in der Zellbiologie, durch die ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Faktoren widergespiegelt werden kann [285]. Bereits 1968 wurde beim Prozess der Wundheilung am Hornhautepithel festgestellt, dass die als *lateral sliding* beschriebene Migration noch vor der Zellproliferation auftritt [286]. So wird die Migration als limitierender Faktor neben der Proliferation beschrieben [287].



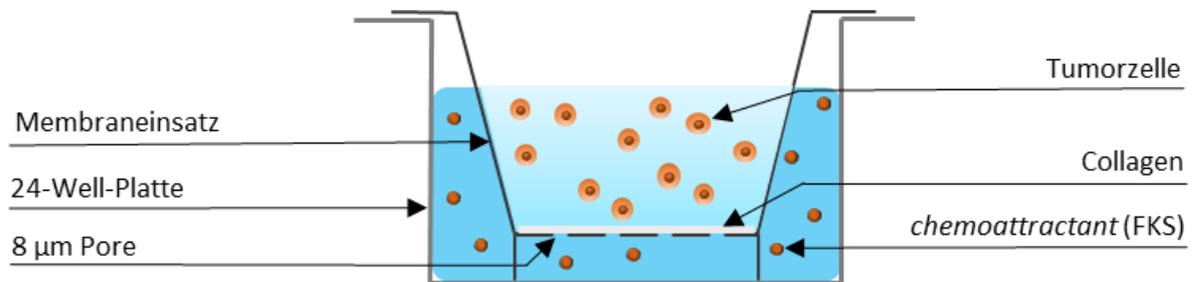
**Abbildung 21:** Darstellung der Durchführung des Wundheilungs-Assay

Für die Durchführung werden Tumorzellen gelöst (s. Kapitel 4.3.2) und in eine 24-Well-Platte mit  $6 \times 10^5 \text{ TC} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{Well}^{-1}$  für 24 h bei  $37^\circ\text{C}$  mit 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Nach Erreichen einer Konfluenz von mindestens 80 – 90 % kann mithilfe einer  $200 \mu\text{L}$  Pipettenspitze eine künstliche Wunde induziert werden (*scratch*). Die Pipettenspitze wird dazu senkrecht mit ausreichend Druck diagonal durch das Well gezogen und erzeugt eine  $50 \mu\text{m}$  breiten Spalt, welcher von Zellen befreit ist. Nicht adhäsive und abgestorbene Zellen können nun mit  $\text{DPBS}^{\text{®}}$  gereinigt werden, bevor 1 mL FKS-freies Medium jedem Well hinzugefügt wird. Die Abwesenheit von

FKS reduziert den Proliferationsprozess und hebt den Migrationseinfluss auf die Wundheilung hervor [288]. Direkt im Anschluss erfolgt zum Zeitpunkt  $t=0$  eine Aufnahme der Wundfläche mit dem Lichtmikroskop Axiovert 200 unter Verwendung dazugehörigen Software ZEN<sup>®</sup>. Die Bewegung des Wundrandes wird in regelmäßigen Abständen mikroskopisch dokumentiert. Zur Auswertung wird die Reduktion des Wundraums mit ImageJ<sup>®</sup> bestimmt und mit GraphPrism<sup>®</sup> als rel. Fläche (%) gegen die Zeit (h) aufgetragen. Dabei entspricht die Anfangsfläche ( $t=0$ ) dem 100 %-Wert.

#### 4.14 Invasions-Assay

Die Bestimmung einer zweidimensionalen Migration kann die Bewegung von Tumorzellen und deren Invasion in das Gewebe nur ungenügend simulieren. [289]. Die Zellbeweglichkeit und Invasivität einer Tumorzelllinie wird im Folgenden mit dem Invasions-Assay analysiert. Hierbei wird eine gerichtete Zellmigration durch eine extrazelluläre Matrix unter dem direkten Einfluss eines *chemoattractant* vermessen [290]. Die sog. Boyden-Kammer wurde ursprünglich zur Untersuchung der Leukozyten-Chemotaxis entwickelt und dient als Grundlage für das verwendete Zwei-Kammernsystem [291], welche ein Polycarbonat-Membraneinsatz besitzt. Diese mit Corning<sup>®</sup> Collagen beschichtete Membran stellt die Matrix-Barriere dar, durch welche die Tumorzellen aufgrund der unterschiedlichen Konzentration an Wachstumsfaktoren migrieren [292,293].



**Abbildung 22:** Aufbau eines Zwei-Kammernsystems zur gerichteten Zellmigration

Zum Einsatz kommen die Kultureinsätze Nunc<sup>™</sup> von Thermo Fisher mit einer Porengröße von 8 µm, einer Porendichte von  $0,85 \times 10^5$  Poren\* $\text{cm}^{-2}$  und einer Fläche von  $0,47 \text{ cm}^2$  [294]. Die Einsätze werden zuvor mit Kollagen Typ I mit einer Endkonzentration von  $15 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$  verdünnt in DPBS<sup>®</sup> zu je 50 µL beschichtet. Nach Trocknung unter der LAF wird die Kollagenschicht mit nochmals 50 µL DPBS<sup>®</sup> gewaschen. Tumorzellen werden mit EDTA gelöst (s. Kapitel 4.3.2) und quantifiziert zu  $5 \times 10^5$  TC\* $200 \mu\text{L}^{-1}$  in FKS-freies Medium (s. Kapitel 4.3.3). Jeder Einsatz wird mit 200 µL der Tumorzellsuspension befüllt und in die 24-Well-Platte gepackt. Nach den abgeschlossenen Vorbereitungen kann die 24-Well-Platte mit 500 µL Medium (5% FKS) gefüllt

werden. Es folgt eine Inkubation über 3 h bei 37°C im Inkubator. Die Zellzahl der oberen und unteren Kammer wird am Durchflusszytometer Guava® easyCyte HAT quantifiziert. Die Inserts werden mit 200 µL DPBS® gewaschen und die an der Membran haftenden Zellen mit Formaldehyd fixiert. Nach zwei Waschschritten wird Trypanblau zur Färbung der Zellen eingesetzt. Der Überschuss wird nach 20 min entfernt und die Membran nochmals gewaschen. Die Visualisierung geschieht am Lichtmikroskop Axiovert 200. Für die Auswertung werden die reziproken *counts* ( $count^{-1}$ ) in ein Balkendiagramm aufgetragen.

### 4.15 Statistik

Alle im folgenden durchgeführten Experimente dieser Arbeit wurden mindestens mit einer Stichprobenzahl (n) von drei durchgeführt. Jeder Versuch wurde an einem unterschiedlichen Tag unter Verwendung unterschiedlicher Proben in einem identischen Versuchsaufbau durchgeführt. Die Proben für die Versuche zur Granulasekretion, P-Selektin-Adhäsion, Thrombozytenadhäsion und Wundheilung wurden in Triplikaten vermessen. Die Proben für die Versuche zur Thrombozytenaggregation, Durchflusszytometer, Thrombingenerierung, Western Blot, Sandwich-ELISA und Invasion wurden in Duplikaten durchgeführt. Die jeweilige Darstellung der Versuchsergebnisse zur Thrombozytenaggregation, Thrombingenerierung, Durchflusszytometrie und Western Blot ist repräsentativ. Die weitere Darstellung der Versuchsergebnisse als Histogramm repräsentiert den Mittelwert der gesamten Stichprobenzahl sowie die Standardabweichung. Sofern eine Normalisierung notwendig war, wurde diese stets in der versuchsbezogenen Stichprobe durchgeführt. Die Signifikanz wurde mit einem ungepaarten T-Test geprüft. Die errechneten Signifikanzen sind mit Sternen (\*) dargestellt. Dabei gilt: \*p < 0,05 (signifikant); \*\*p < 0,01 (hoch signifikant); \*\*\*p < 0,001 (höchst signifikant).

## 5. Ergebnisse und Diskussion

Während einige der für die TCIPA verantwortlichen Signalwege bereits identifiziert wurden, bleiben einzelne Wege und vor allem deren Zusammenwirken noch unerforscht [295]. Die enge Wechselwirkung zwischen Tumorzellen und Thrombozyten ist für die Blutgerinnung von Patienten mit Bauchspeicheldrüsenkrebs höchst relevant. Insbesondere könnten Ansätze, die verschiedene Hemmstrategien kombinieren, dazu beitragen die synergistischen Signalwege bei der Thrombozytenaktivierung aufzuklären.

Zu Beginn des Ergebnisteiles wird eine Thrombozytenaktivierung zellunabhängig durch verschiedene Aktivatoren induziert und der Einfluss diverser bekannter und experimenteller Gerinnungshemmer auf die Thrombozytenaggregation und die Granulasekretion untersucht. Dadurch soll eingangs ein Einblick in die Relevanz und das Zusammenwirken der Aktivierungswege gewonnen werden.

Zwecks Evaluierung der molekularen Mechanismen der TCIPA werden drei unterschiedliche Pankreaskarzinomzellen herangezogen, welche in Differenzierungsgrad und Malignität variieren. Das primäre Ziel ist die Beeinflussung der Interaktion zwischen Tumorzellen und Thrombozyten anhand einer gezielten Kombinationstherapie der Testsubstanzen. Die verwendeten Inhibitoren und Aktivatoren mit der jeweiligen Zielstruktur sind in **Tabelle 4** zusammengefasst.

Darüber hinaus sollen die Erkenntnisse auf klinisch relevante Biomarker in der Onkologie angewendet und der molekulare Einfluss der Thrombozyten während der Metastasierung erforscht werden. Hierfür wird das an der Pathogenese des CRC beteiligte Onkogen MACC1 herangezogen, welches die Motilität und Metastasierung bekanntermaßen beeinflusst.

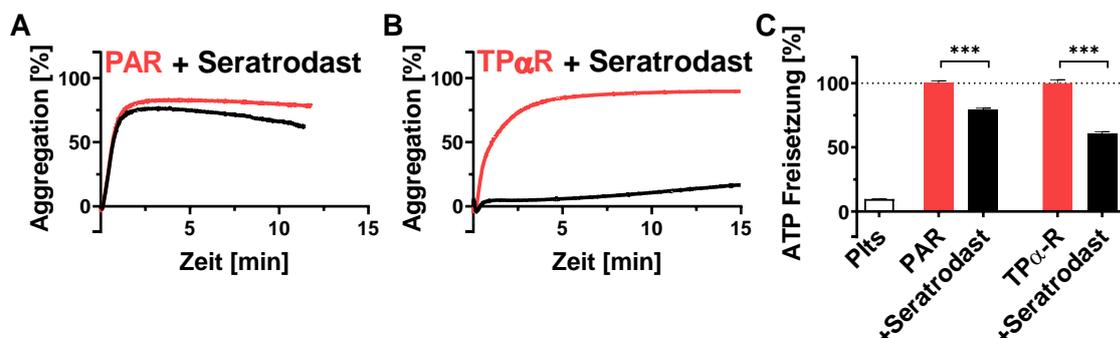
Der Fokus wird neben der für die Metastasierung relevanten Koagulation auch auf kontaktvermittelte Umstrukturierung der epithelialen Tumorform gesetzt. Die gesammelten *in vitro* Daten aus den Thrombozytenaktivierungs-Assays und Migrations-Assays sollen mithilfe eines mausbasierten *in vivo* Versuchs kontrolliert werden, um Puzzleteile der Metastasierungsfrage zu beleuchten.

## 5.1 Etablierung eines Messsystems zur Untersuchung der TCIPA

### 5.1.1 Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die Thrombozytenaggregation und Granulasekretion

Zu Beginn bildet die Etablierung eines geeigneten Testsystems die Grundlage für weitere Versuchsdurchführungen. Zu diesem Zweck wurden, unabhängig von den Tumorzellen, die in Kapitel 2.3 und 2.4 dargestellten Inhibitoren auf ihr Interaktionspotenzial mit der Thrombozytenaktivierung untersucht. Der Einfluss der Testsubstanzen auf die Thrombozytenaggregation wurde parallel zur ATP-Freisetzung durchgeführt, sodass der Prozess der Thrombozytenaktivierung simultan auf zwei Ebenen beurteilt werden kann.

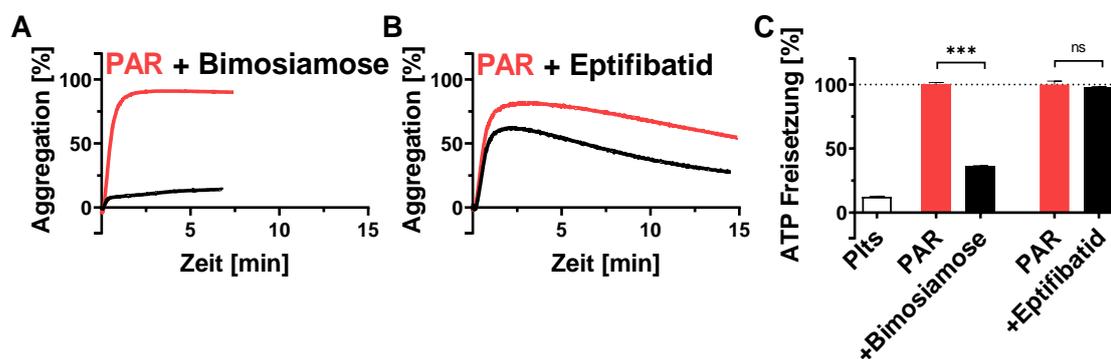
Die Präinkubation der Thrombozyten mit Seratrodast als TP $\alpha$ -R Inhibitor zeigte in der **Abbildung 23 B** einen eindeutig inhibitorischen Effekt auf die Thrombozytenaggregation, sofern die Induktion durch U46619, einem TP $\alpha$ -R Aktivator, geschieht. Eine Hemmung des TP $\alpha$ -R zeigt jedoch keine Wirkung bei Einsatz eines PAR-Aktivators, wie in **Abbildung 23 A** deutlich wird. Die **Abbildung 23 C** bildet die parallel ablaufende ATP-Freisetzung aus der Granula ab. Die Granulafreisetzung der Thrombozyten angestoßen durch U46619 wird aufgrund der Inhibierung durch Seratrodast auf die Hälfte reduziert, kann jedoch nicht gänzlich blockiert werden. Die Rolle der positiven Rückkopplung wird hier durch den Fokus auf die Granulasekretion deutlich, denn die Aktivierung von mit Seratrodast vorbehandelten Thrombozyten lässt sich nach Einsatz des PAR-Aktivators signifikant leicht reduzieren, hat aber keinen Einfluss auf die zuvor erwähnte Thrombozytenaggregation. Durch Hemmung des TP $\alpha$ -R kann eine Granulasekretion stark genug reduziert werden, sodass auch die Aggregation sichtlich beeinflusst wird.



**Abbildung 23:** Einfluss des TP $\alpha$ -R Inhibitors Seratrodast auf die Aggregation nach Aktivierung der Thrombozyten mit einem PAR Aktivator (TRAP-6) (A) und einem TP $\alpha$ -R Aktivator (U46619) (B) mit der dazugehörige ATP-Freisetzung (C); n=5; statistische Signifikanz: \*\*\*  $p < 0.001$

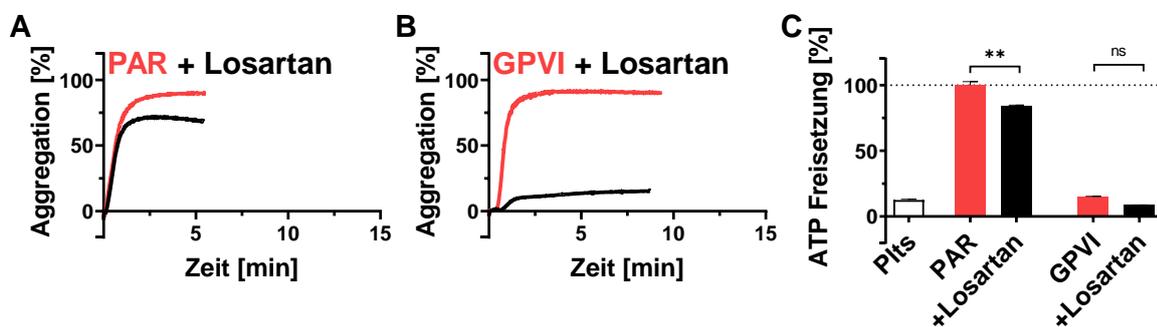
Diese Versuchsergebnisse deuten bereits auf eine Korrelation zwischen der ATP-Freisetzung und der Aggregation der Thrombozyten hin, welche nicht zwingend direkt verlaufen muss. Es wird die Vermutung aufgestellt, dass für die Thrombozytenaktivierung sowohl die löslichen Faktoren als auch der direkte Kontakt eine wesentliche Rolle für die Bildung von Aggregaten spielen. Im o.g. Beispiel wird die Granulafreisetzung in jedem Fall nach Aktivierung durch lösliche Faktoren angestoßen. Eine Aggregation kann jedoch unter bestimmten Umständen verschoben werden.

Die Relevanz der kontaktvermittelten Thrombozytenaktivierung wird durch die Ergebnisse aus **Abbildung 24** verdeutlicht, in denen die Inhibierung des Oberflächenproteins P-Selektin unter Verwendung der Testsubstanz Bimosiamose sowohl die Thrombozytenaggregation als auch die Granulafreisetzung höchst signifikant hemmt. So scheint das auf den Thrombozyten befindliche P-Selektin eine zentrale Rolle bei der Thrombozytenaktivierung zu spielen. Eptifibatid hingegen, welches als GPIIb/IIIa Inhibitor eingesetzt wird, reduziert zwar die Thrombozytenaggregation deutlich, die Granulafreisetzung wird jedoch absolut nicht beeinflusst. Das größtenteils in seiner inaktiven Form vorliegende GPIIb/IIIa geht nach einer initialen Aktivierung in seine aktive Form über, in der es gehemmt werden kann. Durch das Outside-In-Signaling des Glykoproteins jedoch wird die Aktivierung weiterhin verstärkt und es kommt zu keiner Beeinflussung der Granulafreisetzung, auch wenn die Bildung von Aggregaten eingeschränkt ist.



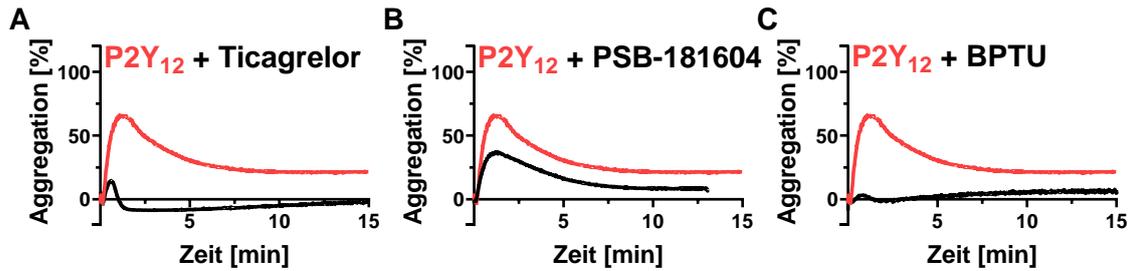
**Abbildung 24:** Aktivierung der Thrombozyten mit einem PAR Aktivator (TRAP-6) und der Einfluss des P-Selektin Inhibitors Bimosiamose auf die Aggregation (A) und der Einfluss des GPIIb/IIIa Inhibitors Eptifibatid auf die Aggregation (B) mit der dazugehörige ATP-Freisetzung (C); n=5, statistische Signifikanz: ns  $p \geq 0,05$ , \*\*\*  $p < 0.001$

Durch die Blockierung des GPVI mithilfe von Losartan kann, wie in **Abbildung 25** zu sehen ist, ebenso effektiv eine Thrombozytenaggregation gehemmt werden, wenn diese durch den Induktor des GPVI, nicht aber durch einen PAR Agonisten ausgelöst worden ist. Eine Granulafreisetzung konnte durch Kollagen als Agonisten für GPVI nicht ausgelöst werden. Dies könnte darin begründet liegen, dass es sich hier um spezifisches Kollagen vom Typ I handelt, während das im Blutsystem freigesetzte Kollagen eine Mischung verschiedener Typen repräsentiert, die in Kombination mit dem vWF die Granulafreisetzung durch Thrombozyten fördert. Unabhängig davon dient Kollagen selbstverständlich, wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben, zur Vernetzung der Thrombozyten. Aus dem Versuchsergebnis kann gefolgert werden, dass es sich bei der Thrombozytenaggregation und auch der Granulafreisetzung nicht um einen isolierten Prozess handelt, sondern diverse Faktoren zusammenspielen und in Synergie eine erfolgreiche Gerinnung auslösen.



**Abbildung 25:** Einfluss des GPVI Inhibitors Losartan auf die Thrombozytenaggregation nach Aktivierung mit dem Agonisten für PAR (TRAP-6) (A) und dem Agonisten für GPVI (Kollagen Typ I) (B) und die jeweils zugehörige Granulafreisetzung (C); n=5, statistische Signifikanz: *ns*  $p \geq 0,05$ ,  $**p < 0,01$

Zur abschließenden Optimierung der Untersuchungsmethode wurde jeweils der Einfluss des P2Y<sub>12</sub> Antagonisten Ticagrelor, des experimentellen P2Y<sub>1</sub> Antagonisten BPTU und des P2X<sub>1</sub> Inhibitors PSB-181604 auf die Thrombozytenaggregation untersucht. Entgegen der Literaturbeschreibung spielt der P2Y<sub>1</sub> Rezeptor keine untergeordnete Rolle in der Thrombozytenfunktion und die Inhibierung beeinflusst die Aggregation dementsprechend im Versuchsaufbau erheblich. Dahingegen ist eine Hemmung des P2X<sub>1</sub> Antagonist bei einer ADP-vermittelte Aggregation der Thrombozyten beinah ausbleibend, im gegensatz zum bekannten P2Y<sub>12</sub> Inhibitor Ticagrelor.

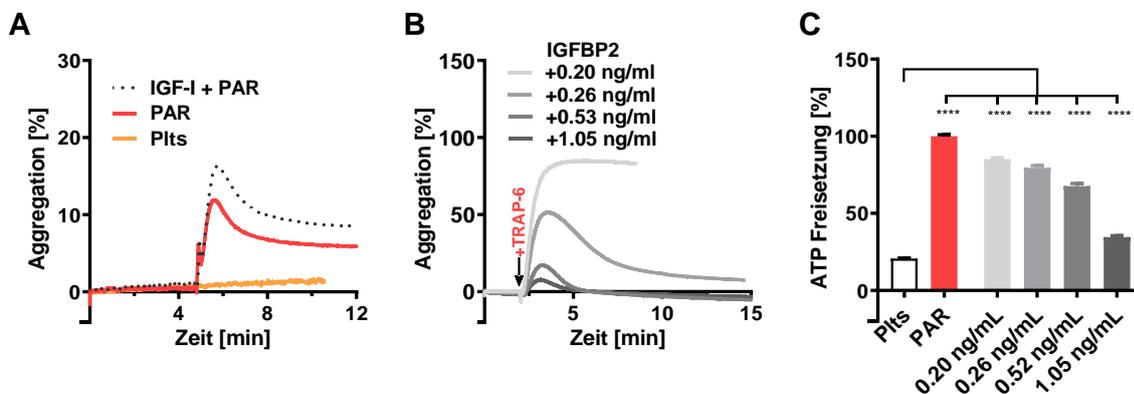


**Abbildung 26:** Einfluss des P2Y<sub>12</sub> Antagonisten Ticagrelor (A), des P2X<sub>1</sub> Antagonisten PSB-181604 (B) und des P2Y<sub>1</sub> Antagonisten BPTU (C) nach Aktivierung der Thrombozytenaggregation mit ADP als P2Y<sub>12</sub> Agonisten; n=5

Die regulatorischen Möglichkeiten einer Thrombozytenaktivierung sind vielfältig. Eine kontaktvermittelte Aktivierung scheint obligatorisch für die Granulasekretion und Aggregation. Ebenso spielen jedoch lösliche Faktoren eine immense Rolle bei der Granulafreisetzung, wodurch eine Vielzahl an Adhäsionsmoleküle freigesetzt werden können.

### 5.1.2 Möglichkeit der konzentrationsabhängigen Verstärkung der Aktivierung der Thrombozyten durch Einsatz von IGF-I

Die Einleitung der Aggregation ist von der Konzentration verschiedener Faktoren abhängig. So kann eine anfängliche Thrombozytenaggregation durch den starken PAR-Agonisten TRAP-6 durch die Zugabe von IGF-I zusätzlich verstärkt werden. Dadurch ist eine geringere Konzentration an TRAP-6 zum Auslösen der Aggregatbildung notwendig. Hierzu wurde eine reduzierte Konzentration von TRAP-6 [10  $\mu$ M] zu einer mit IGF-I präinkubierten Probe im Vergleich zu einer unbehandelten Probe zugegeben, um eine Aggregation anzustoßen. IGF-I besitzt die Besonderheit, dass es alleinig keine Thrombozytenaggregation auszulösen vermag. Eine Präinkubation der Thrombozyten mit IGF-I jedoch erhöht deutlich das Aggregationsniveau, wie in **Abbildung 27 A** zu sehen ist. Da sich IGF-I auch in der Granula befindet, ist es möglich nach Präinkubation der Thrombozyten mit IGFBP2 sowohl die Aggregation als auch die Granulasekretion konzentrationsabhängig zu reduzieren.



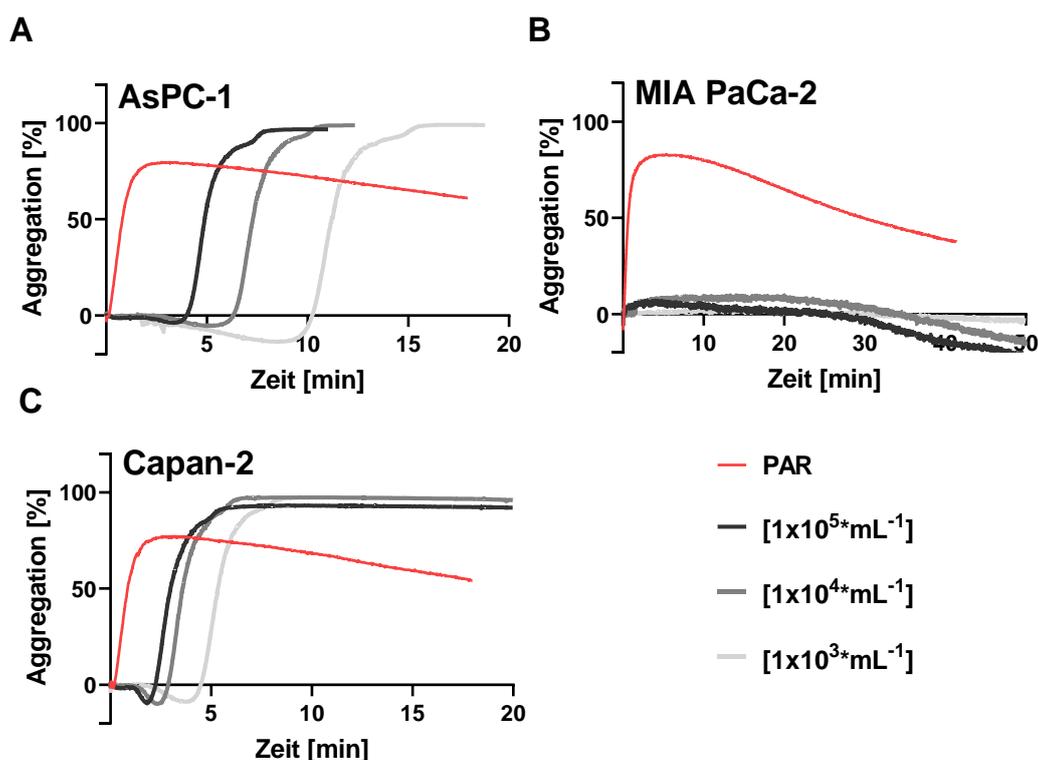
**Abbildung 27:** Einfluss von IGF-I als Kostimulator für die Thrombozytenaggregation nach Aktivierung der Thrombozyten mit TRAP-6 in einer Konzentration von 10  $\mu$ M (**A**) und die konzentrationsabhängige Blockierung der 42,5  $\mu$ M TRAP-6 induzierten Thrombozytenaggregation (**B**) und Granulasekretion (**C**) durch die Zugabe des rekombinanten IGFBP2; n=5, statistische Signifikanz: \*\*\*\*  $p < 0.0001$

Eine Konzentration von 1,05  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  des Bindeproteins IGFBP2 zeigt in **Abbildung 27 B, C** eine fast vollständige Hemmung der durch TRAP-6 induzierte Thrombozytenaggregation und ATP-Freisetzung. Das IGFBP2 ist wahrscheinlich imstande das von den Thrombozyten sezernierte IGF-I zu binden und eine Aggregation und Granulasekretion signifikant zu reduzieren.

## 5.2 Untersuchung der Rolle von Thrombozyten bei der hämatogenen Metastasierung von Pankreaskarzinomzellen

### 5.2.1 Einfluss von Pankreaskarzinomzellen (PCC) auf Thrombozytenaktivierung und TCIPA

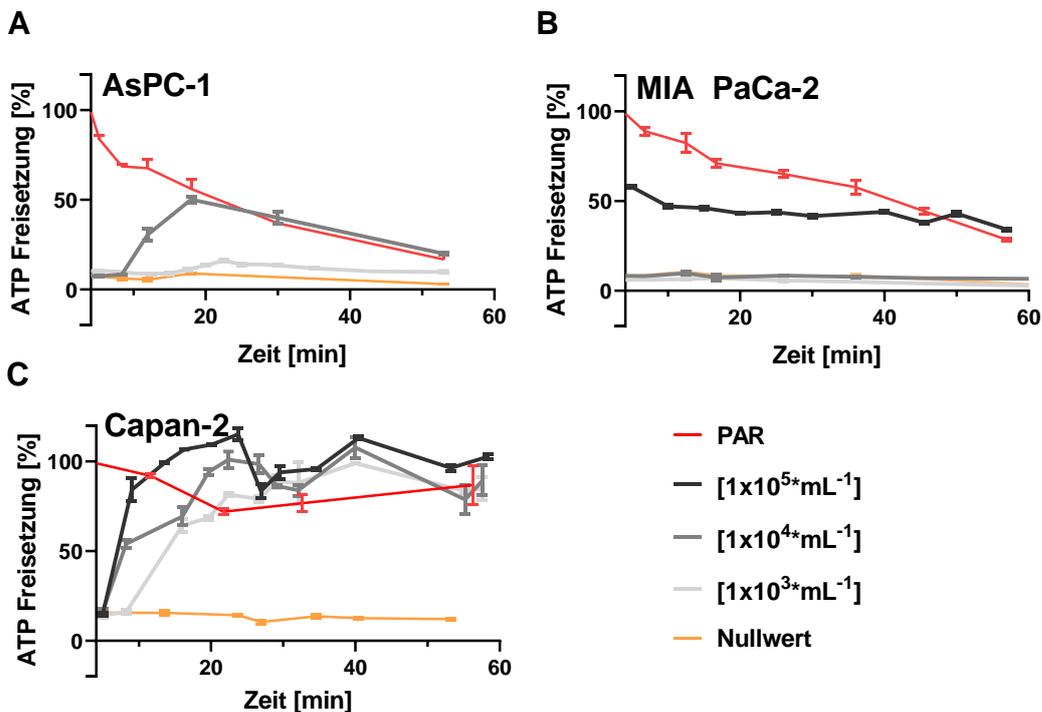
Um einen Einblick in die Interaktion zwischen Tumorzellen und Thrombozyten zu erhalten, wurden im Folgenden drei verschiedene Zelllinien herangezogen. In **Abbildung 28** wurde die für eine Thrombozytenaggregation notwendige Konzentration der AsPC-1, MIA PaCa-2 und Capan-2 PCC ermittelt.



**Abbildung 28:** Repräsentative Kurven zeigen die Thrombozytenaggregation als Reaktion auf ansteigende Konzentrationen der PCC AsPC-1 (A), MIA PaCa-2 (B) und Capan-2 (C) oder zum Vergleich mit TRAP-6 für einen Zeitintervall von 20 bzw. 50 min; n=5

Die Zugabe von TRAP-6 löst zur Kontrolle der Funktionsfähigkeit der Thrombozyten in jedem Fall eine sofortige Thrombozytenaggregation aus, wohingegen die Tumorzellen abhängig von der Zelllinie unterschiedlichen Aggregationszeiten aufweisen. Die AsPC-1 Zellen benötigen in der höchsten Konzentration von  $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$  lediglich 4 min zum Triggern einer Aggregation. Abhängig von der Konzentration kann es jedoch auch bis zu 10 min dauern. Noch stärker sind die Capan-2 Zellen befähigt eine Aggregatbildung anzustoßen, bei denen bereits die geringste Konzentration von  $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$  in weniger als 5 min eine volle Aggregation erreicht wird.

Lediglich den MIA PaCa-2 Zellen gelingt keine Indizierung einer Thrombozytenaggregation, auch nach einer Gesamtdauer von 50 min in maximaler Konzentration.



**Abbildung 29:** Repräsentative Darstellung der Quantifizierung der freigesetzten ATP-Konzentration aus Thrombozyten nach Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen der PCC AsPC-1 (A), MIA PaCa-2 (B) und Capan-2 (C) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und der zusätzlichen Vermessung von TRAP-6 als Positivkontrolle und PBS als Nullwert; n=3

Die Ergebnisse spiegeln sich in der konzentrations- und zeitabhängigen Messung der ATP-Freisetzung wider. Hierzu wurde zu verschiedenen Inkubationszeiten mit den PCC die sezernierte ATP-Konzentration aus den Thrombozyten quantifiziert. Eine Konzentration von  $1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$  der AsPC-1 Zellen löst bereits eine ausreichend starke ATP-Freisetzung aus, weswegen in allen weiteren Versuchen diese Konzentration standardmäßig verwendet wurde. Bei der anschließenden Quantifizierung der ATP-Freisetzung ergab der Einsatz von  $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$  MIA PaCa-2 PCC eine ATP-Konzentration von 50 % im Vergleich zu TRAP-6, welches möglicherweise aus den MIA PaCa-2 Zellen stammt. Eine geringere Zellzahl hatte hier keinen Effekt. Diese Erkenntnis verstärkt die Annahme, dass die MIA PaCa-2 im Vergleich zu den AsPC-1 offensichtlich unzureichende Thrombozytenaktivatoren sind. Abgeleitet von den Aggregationsdaten der Capan-2 Zellen, sind diese in ihrer Fähigkeit eine Granulasekretion auszulösen nahezu unabhängig von der Konzentration und besitzen unter den verwendeten PCC die höchste Potenz in Bezug auf die Thrombozyteneinfluss. Äquivalent zu den AsPC-1 Zellen

wurde in den folgenden Versuchsdurchführungen lediglich die Konzentration von  $1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$  verwendet.

### **5.2.2 Untersuchung der molekularen Mechanismen unter Verwendung unterschiedlicher inhibitorischer Angriffspunkte mithilfe des Thrombozytenaggregation-Assay**

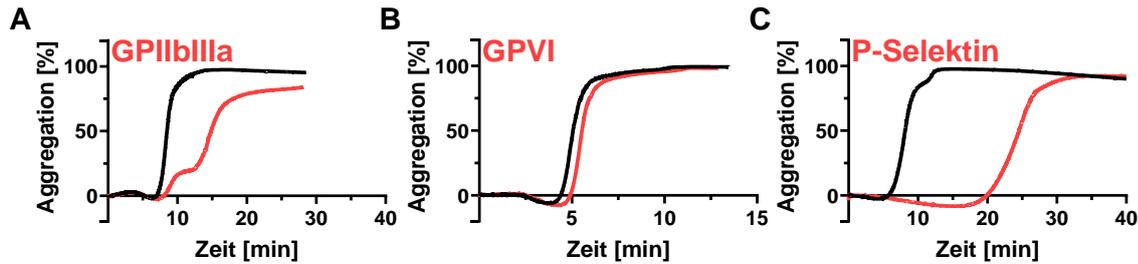
Aufgrund der vorangegangenen Ergebnisse wird der Fokus auf die Inhibierung der Interaktion zwischen PCC und Thrombozyten unter Verwendung der AsPC-1 Zellen in einer mittleren Konzentration von  $1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$  gesetzt. In einem breit angelegten Screening wird hierfür jeder potenziell aktive Inhibitor individuell auf den Einfluss auf die Thrombozytenaggregation untersucht. Aufgrund der Variabilität der Thrombozyten wird für jede Testsubstanz die unbehandelte Tumorzellprobe als Vergleichskontrolle parallel vermessen. In der Regel liegt die durchschnittliche Zeit bis zum *shape change* für die AsPC-1 Zellen zwischen 5 bis 10 min und führt zu einer 100 %-igen Aggregation.

Ein positiver Funktionstest der Thrombozyten mit TRAP-6 und einer unbehandelten Nullprobe laufen als Qualitätssicherungsmaßnahme simultan zur Messung, werden jedoch zum Erhalt der Übersicht nicht in den Abbildungen dargestellt.

Der klinisch relevante GPIIb/IIIa Inhibitor zeigte bereits in **Abbildung 30 A** einen für die Substanz spezifischen Kurvenverlauf. Durch die dreißigminütige Präinkubation der Thrombozyten mit Eptifibatid stagnierte nach Zugabe der AsPC-1 Zellen der Kurvenanstieg nach der primären Aggregation und es kam zur Ausbildung eines Plateaus. Durch die Blockade des GPIIb/IIIa kann also eine primäre Aggregatbildung unterdrückt werden. Da die Granulafreisetzung jedoch trotz des Einsatzes von Eptifibatid uneingeschränkt stattfinden kann, so wie es in Kapitel 5.1.1 bereits beschrieben wurde, konnten auch weitere molekulare Mechanismen angestoßen werden, was eine sekundäre irreversible Aggregation zu Folge hatte.

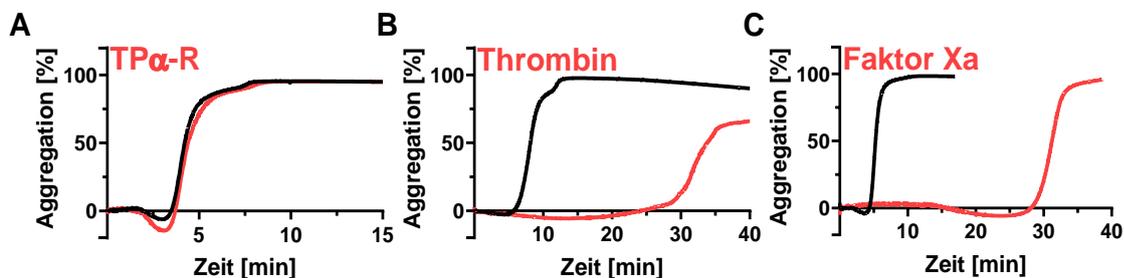
Übereinstimmend mit den bereits erhaltenen Ergebnisse aus Kapitel 5.1.1 konnte Bimosiamose durch Inhibierung von P-Selektin auf den Thrombozyten erfolgreich eine starke Verschiebung der Aggregation hervorrufen, so in **Abbildung 30 C**.

Die Blockierung des GPVI in **Abbildung 30 B** hatte ebenso wenig einen Einfluss auf die Interaktion zwischen AsPC-1 Zellen und den Thrombozyten wie der Einsatz von Seratrodist als TP $\alpha$ -R Inhibitor in **Abbildung 31 A**.



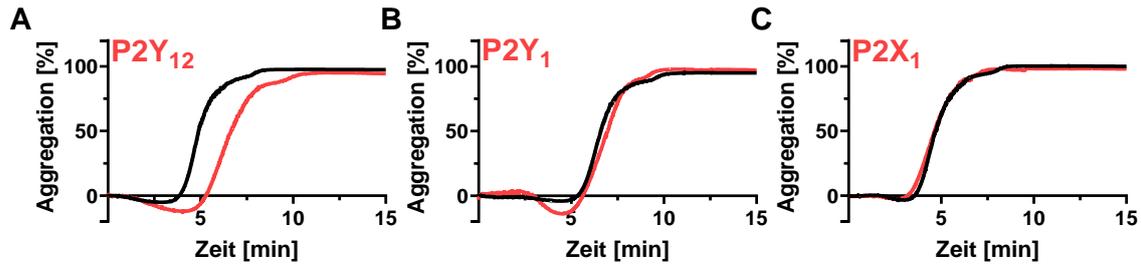
**Abbildung 30:** Inhibierung der AsPC-1 zellvermittelten Thrombozytenaggregation. Repräsentative Darstellung der Aggregationskurven von unbehandelten Thrombozyten mit  $1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$  (schwarze Kurve) oder präinkubierten Thrombozyten (rote Kurve) mit Eptifibatid (A), Losartan (B) oder Bimosiamose (C); n=5

Die absolut größte Verschiebung der halbmaximalen Aggregation ging in **Abbildung 31 B** und **C** von Argatroban und Rivaroxaban als DOAK aus. Daraus wird ersichtlich, dass die TCIPA durch die PCC AsPC-1 nicht nur abhängig von der kontaktvermittelten Aktivierung der Thrombozyten ist, sondern entscheidend auch durch die klassische Gerinnungskaskade induziert wird.



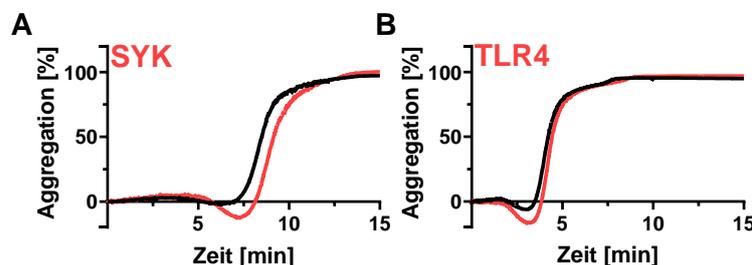
**Abbildung 31:** Inhibierung der AsPC-1 zellvermittelten Thrombozytenaggregation. Repräsentative Darstellung der Aggregationskurven von unbehandelten Thrombozyten mit  $1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$  (schwarze Kurve) oder präinkubierten Thrombozyten (rote Kurve) mit Seratrodast (A), Argatroban (B) oder Rivaroxaban (C); n=5

Unter der Familie der Purinorezeptoren konnte eine Verschiebung des Kurvenverlaufs einzig von Ticagrelor in einem geringen Maß induziert werden. So können die molekularen Aktivierungsmechanismen durch die AsPC-1 aus **Abbildung 32 B, C** über ADP/ATP Rezeptoren vernachlässigt werden. Das Ergebnis aus der **Abbildung 32 A** stimmt jedoch mit der Theorie von P.Ballerini und Co., dass neben Thrombozyten auch Tumorzellen zu einer ADP Sezernierung imstande sind, überein. Zudem wird von zusätzlichen  $P2Y_{12}$  Rezeptoren auf den Tumorzellen ausgegangen. Weitere Untersuchungen wären an diesem Punkt notwendig.



**Abbildung 32:** Inhibierung der AsPC-1 zellvermittelten Thrombozytenaggregation. Repräsentative Darstellung der Aggregationskurven von unbehandelten Thrombozyten mit  $1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$  (schwarze Kurve) oder präinkubierten Thrombozyten (rote Kurve) mit Ticagrelor (A), PSB18164 (B) oder BPTU (C); n=5

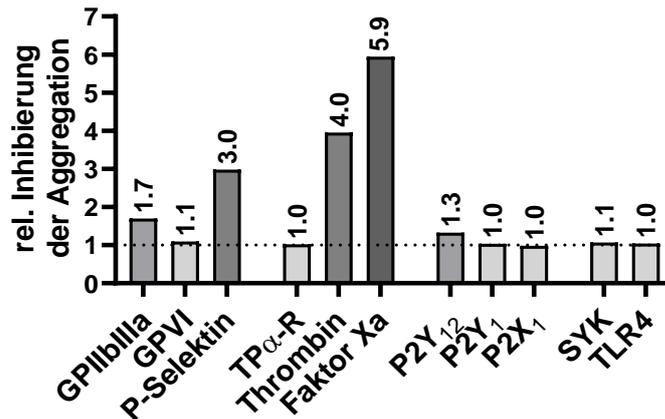
Die abschließende Untersuchung des SYK Inhibitors und Resatorvid zeigt im Verhältnis zur Vergleichskontrolle eine identische Zeit bis zum Erreichen der halbmaximalen Aggregation und somit keinen relevanten Hemmeffekt.



**Abbildung 33:** Inhibierung der AsPC-1 zellvermittelten Thrombozytenaggregation. Repräsentative Darstellung der Aggregationskurven von unbehandelten Thrombozyten mit  $1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$  (schwarze Kurve) oder präinkubierten Thrombozyten (rote Kurve) mit SYK Inhibitor IV (A) oder Resatorvid (B); n=5

In **Abbildung 34** sind alle bisher erörterten Ergebnisse zusammengefasst. Hierbei wurde das Verhältnis zwischen der Zeit, die eine mit Inhibitor behandelte Probe zum Erreichen der halbmaximalen Aggregation benötigt, im Verhältnis mit der jeweiligen ausschließlich mit Tumorzellen behandelte Variante gesetzt.

Bei der halbmaximalen Aggregation handelt es sich um den Zeitpunkt, in dem 50 % der Aggregation erreicht worden ist. Die Darstellung der relativen Inhibierung der Aggregation als *ratio* zeigt anschaulich über welche molekularen Mechanismen die AsPC-1 Zellen eine Thrombozytenaggregation vorzugsweise induzieren. Die Aktivierung der koagulativen Mechanismen über Thrombin und Faktor Xa und die kontaktvermittelte Aggregatbildung über P-Selektin dominieren bei der TCIPA durch die PCC AsPC-1.



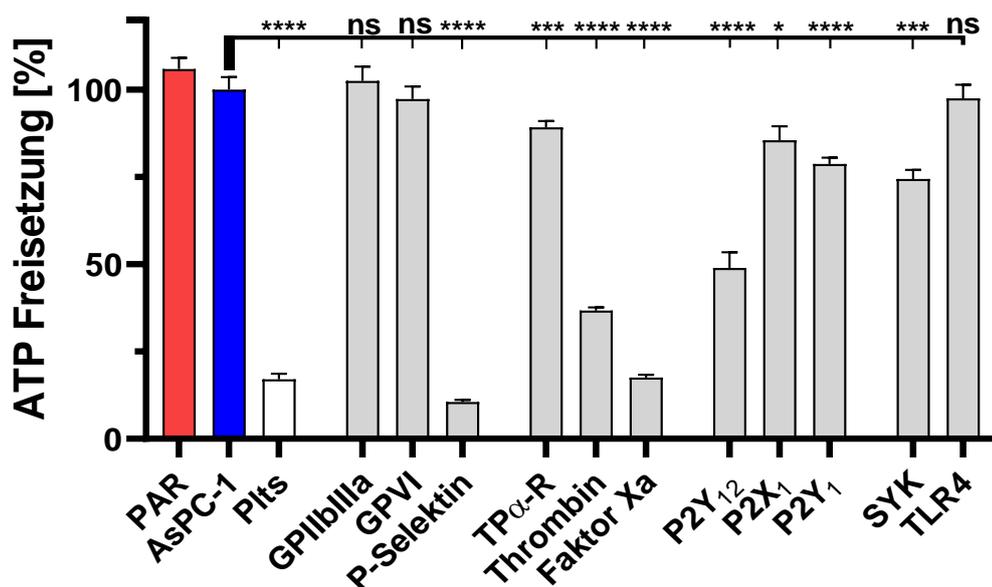
**Abbildung 34:** Inhibierung der AsPC-1 zellvermittelten Thrombozytenaggregation. Darstellung der Auswirkungen der verschiedenen o.g. Hemmstoffe auf die Thrombozytenaggregation als Verhältnis der Zeit bis zur halbmaximalen Aggregation der behandelten gegenüber den unbehandelten Thrombozyten

Zumindest auf die Thrombozytenaggregation besitzen Hemmstoffe von P2X- und P2Y-Rezeptoren keinen ausschlaggebenden Einfluss. Ebenso ist der Einsatz von SYK-Inhibitoren zur Unterbindung der Aggregation zu vernachlässigen.

### 5.2.3 Erörterung der molekularen Mechanismen diverser Inhibitoren mithilfe des Granula-Sekretions-Assay

Zur Bestätigung der oben aufgeführten Resultate wurden Daten zur Quantifizierung der aus AsPC-1 Zellen freigesetzten ATP-Konzentration nach Inkubation mit dem jeweiligen Inhibitor erhoben. Die Untersuchung der Thrombozyten fand parallel zu der Thrombozytenaggregation statt, sodass eine direkte Abhängigkeit der Daten besteht.

Die absolute ATP-Konzentration nach Inhibierung durch die jeweiligen Inhibitoren wurde in **Abbildung 35** in Verhältnis zu der Vergleichsprobe, in der die Tumorzellen uneingeschränkt eine Thrombozytenaktivierung auslösen, gesetzt. Die Vergleichsprobe stellt hierbei eine 100%ige relative Aktivierung der Thrombozyten dar. Zur Funktionsfähigkeit der Thrombozyten wurde stets TRAP-6 als Aktivator eingesetzt.

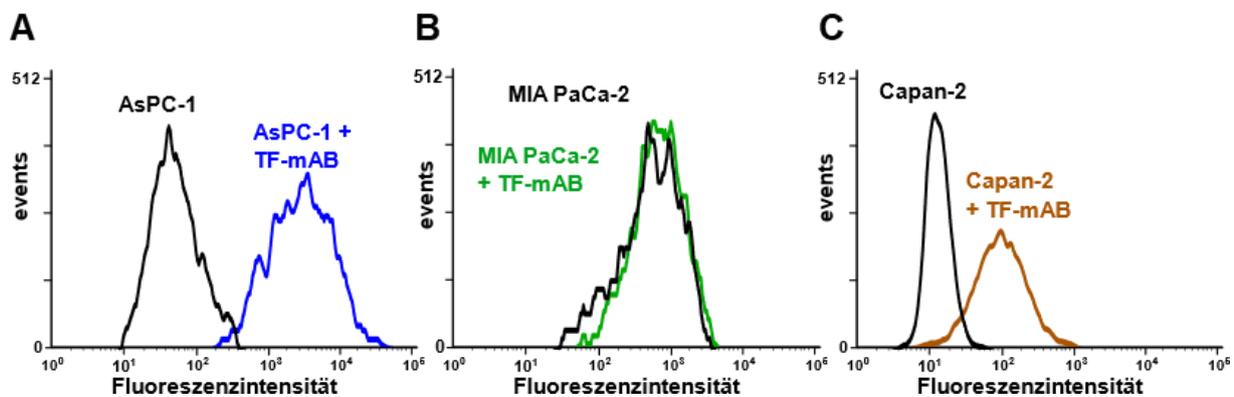


**Abbildung 35:** Inhibierung der AsPC-1 zellinduzierte Thrombozyten-Granulafreisetzung. Quantifizierung der ATP-Freisetzung von unbehandelten, mit  $1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$  AsPC-1 Zellen inkubierten oder mit TRAP-6 aktivierten Thrombozyten nach 20 min. Eine Präinkubation der Thrombozyten mit dem Inhibitor für GPIIb/IIIa, GPVI, P-Selektin, TP $\alpha$ -R, Thrombin, Faktor Xa, P2Y<sub>12</sub>, P2X<sub>1</sub>, P2Y<sub>1</sub>, SYK und TLR4 erfolgte 30 min vor Zugabe der AsPC-1 Zellen; n=5, statistische Signifikanz: \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$

Durch eine P-Selektin Inhibierung konnte die freigesetzte ATP-Konzentration um 90 % und im Falle einer Thrombinhemmung durch Argatroban um 60 % im Vergleich zu unbehandelten durch AsPC-1 aktivierten Thrombozyten reduziert werden. Das Ergebnis stimmt mit einem *in vivo* Versuch an P-Selektin defizienten Mäusen überein, welche nach Inkubation mit B16 Melanomzellen im Vergleich zum Wildtyp eine verringerte Konzentration an VEGF aufwiesen [296]. Bedenkt man, dass VEGF ebenso aus der Thrombozytengranula nach Aktivierung freigesetzt wird, so spielt der Kontakt über P-Selektin eine wesentliche Rolle bei der TCIPA. Es konnte ebenso dargelegt werden, dass Eptifibatid eine wesentliche Rolle bei der Aggregatbildung spielt, jedoch nicht die Granulafreisetzung zu beeinflussen vermag. Der hauptsächlich auf Thrombozyten vorkommende ADP-Rezeptor P2Y<sub>12</sub> hingegen besitzt verständlicherweise eine größere Rolle in der Freisetzung löslicher Mediatoren als für die Aggregatbildung. Eine weitere Erörterung der onkologischen Mechanismen ist daher weiter zu verfolgen, v.a. mit dem Hintergrund der klinischen Relevanz von Ticagrelor in der Hämatologie.

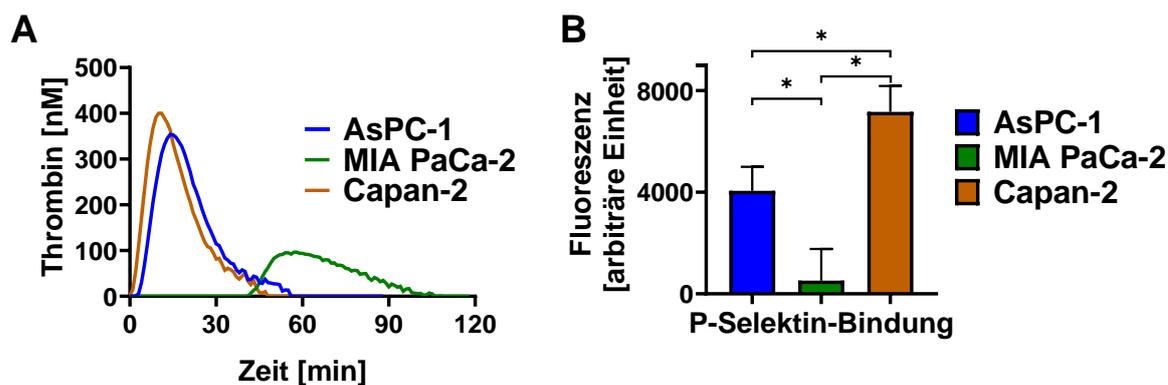
### 5.2.4 Quantifizierung der Expression von P-Selektin und *tissue factor* auf PCC mittels Durchflusszytometrie und die Bedeutung für die Koagulation

Aus klinischer Sicht korreliert die TF Expression mit dem Differenzierungsgrad von Tumorzellen. Immunhistochemische Untersuchungen zeigten für schwach differenzierte PCC eine TF Expression, wohingegen stark differenzierte Tumorzellen eine geringe TF Expressionsrate aufweisen. Eine erhöhte TF Expression geht einher mit einem aggressiveren Subtyp. So gilt TF für das Pankreaskarzinom als Biomarker und relevantes Target hinsichtlich der Hyperkoagulabilität und Tumorprogression. Die obligatorische Expression von TF für die Thrombingenerierung wurde bereits in Kapitel 2.2.1 erläutert. Zur Bestätigung, inwieweit die Gerinnungskaskade möglicherweise an der AsPC-1 und Capan-2 induzierten Thrombozytenaktivierung beteiligt ist, wurde mittels Durchflusszytometrie die TF-Expression auf den jeweiligen Zelllinien detektiert und mit den MIA PaCa-2 Zellen verglichen. Aus dem Experiment geht, wie in **Abbildung 36** zu sehen ist, eine erhöhte Expression von TF auf der Zellmembran der AsPC-1 und Capan-2 Zelllinien hervor. Die Abwesenheit von TF auf der Zelloberfläche der MIA PaCa-2 bestätigt die bisherigen Ergebnisse.



**Abbildung 36:** Quantifizierung der TF Expression auf den AsPC-1 (A), MIA PaCa-2 (B) und Capan-2 (C). Repräsentative Darstellung aus fünf identischen Experimenten, n=5

Das durch die Gerinnungskaskade generierte Thrombin führt zur Fibrinspaltung, sorgt aber auch über den PAR-Rezeptor für eine verstärkte Faktor X Aktivierung. Zur Untermauerung der Bedeutung der TF-Expression als Auslöser für die nachgeschaltete Thrombinbildung wurde der Thrombingenerierungs-Assay durchgeführt. Das Ergebnis in **Abbildung 37 A** verdeutlicht eine induzierte schnelle Thrombinbildung bereits fünf Minuten nach Zugabe der PCC, die von AsPC-1 und Capan-2 Zellen ausgehen. Im Gegensatz dazu zeigten MIA PaCa-2 Zellen eine langsame und geringe Thrombinbildung, die erst 40 min nach der Zugabe der Tumorzellen einsetzte.



**Abbildung 37:** Quantifizierung der Thrombingenerierung durch die AsPC-1, MIA PaCa-2 und Capan-2 in PRP ohne Recalcifizierung (A) und Quantifizierung der P-Selektin Liganden auf den AsPC-1, Capan-2 und MIA PaCa-2 PCC durch den P-Selektin-Adhäsions-Assay durch Einsatz von immobilisierten, rekombinanten humanem P-Selektin (B). Abbildung A stellt eine repräsentative Darstellung aus fünf identischen Experimenten dar und Daten der statischen Adhäsion in Abbildung B bestehen aus dem Mittelwerte von  $n=5$  ( $\pm$ SD); statistische Signifikanz: \*  $p < 0.05$

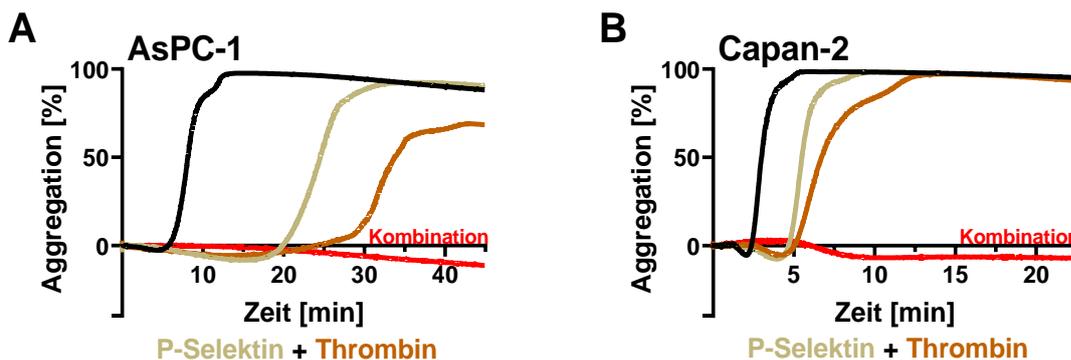
Zur näheren Untersuchung der kontaktvermittelten Aktivierung von Thrombozyten durch PCC wurde zusätzlich ein statischer Adhäsions-Assay durchgeführt. Aufgrund der starken Inhibierungseffekte auf die Thrombozytenaktivierung nach Blockierung von P-Selektin wurde der Fokus auf diesen Adhäsionsrezeptor gesetzt. Offensichtlich nimmt P-Selektin eine Schlüsselrolle bei dem Prozess der TCIPA ein und ist seit geraumer Zeit ein bekannter Mediator für die Interaktion zwischen Thrombozyten und Tumorzellen [297–299]. Immer mehr Beweise deuten auf eine Signalfunktion des P-Selektins hin, welche über den Beitrag zur Aggregatbildung und -stabilität hinausgeht und den Status der Thrombozytenaktivität reguliert. Aus **Abbildung 37 B** geht deutlich hervor, dass die AsPC-1 Zelllinie im Vergleich zu den in der Thrombozytenaggregation inaktiven MIA PaCa-2 Zellen eine signifikant hohe P-Selektin-Bindung aufweisen. Der Ausschluss thrombozytärer Einflüsse bei diesem Versuchsaufbau ist hervorzuheben. Das P-Selektin-Bindungsvermögen der Capan-2 Zellen bestätigt die besonders ausgeprägte Fähigkeit zur Aktivierung von Thrombozyten.

### 5.2.5 Kombinatorische Inhibition von Thrombin und P-Selektin

Alle bisher gesammelten Daten deuten auf einen individuellen Beitrag von P-Selektin und Thrombin auf die Thrombozytenaktivierung durch PCC hin, weshalb die kombinatorische Inhibition der Zielstrukturen die Thrombozytenaktivität effektiv hemmen könnte. Daraus resultiert die Fragestellung nach einer synergistischen oder einer additiven Verstärkung der jeweiligen Effekte, sofern eine Korrelation besteht. Abhängig davon soll die Option einer

vollständigen Hemmung der durch AsPC-1 oder Capan-2 induzierten Thrombozytenaktivierung erörtert werden.

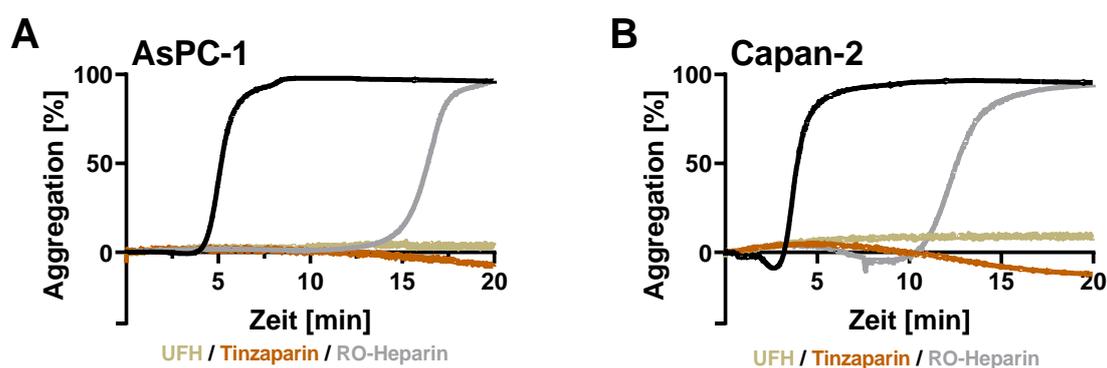
Eine vollständige Blockierung der Aggregation konnte durch die Kombination der beiden Hemmstoffe für mind. 60 min bei den AsPC-1 Zellen und den Capan-2 Zellen erfolgreich durchgeführt werden, wie in der rot dargestellten Kurve in **Abbildung 38** gezeigt ist. Folglich ist das Resultat der Kombination aus Adhäsionsblockade mittels Bimosiamose und Hemmung der plasmatischen Gerinnungskaskade durch Argatroban eine wahrscheinlich synergistische Wirkung auf die Verringerung der Thrombozytenaggregation durch beide PCC.



**Abbildung 38:** Einfluss einer kombinatorischen Inhibierung der Thrombozytenaggregation. Repräsentative Aggregationskurven nach Thrombozytenaktivierung mit  $1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$  AsPC-1 Zellen (A) oder Capan-2 (B) mit unbehandelten Thrombozyten (schwarz), präinkubiert mit lediglich Bimosiamose als P-Selektin-Inhibitor, mit lediglich Argatroban als Thrombininhibitor oder einer Kombination beider Testsubstanzen (rot),  $n=5$

Die gleichzeitige Hemmung von P-Selektin sowie von Thrombin erscheint durch die Anwendung von Heparin realisiert, da Heparin als Glycosaminoglycan eine bekannte Bindungsfähigkeit für P- und L-Selektin aufweist und durch seine antikoagulatorische Aktivität auch die Thrombinbildung hemmt [300]. Für das weitere Vorgehen wurden UFH, das oxidativ reduzierte RO-Heparin und das LMWH Tinzaparin herangezogen. Für Tinzaparin wurde bereits eine abschwächende Thrombozytenaktivierung in Bezug auf metastatische Nischenbildung erörtert [301]. Im Vergleich zu den LMWH besitzt UFH jedoch eine höhere Bindungsaffinität [302,303]. In *in vivo* Versuchen konnte unter Verwendung von P-Selektin-defizienten Mäusen die Bindung von P-Selektin durch UFH gezeigt werden [153], wie schon in Kapitel 2.3.2 angesprochen.

In **Abbildung 39** zeigen UFH und das LMWH Tinzaparin eine vollständige Blockierung der Thrombozytenaggregation ausgelöst durch die AsPC-1 und Capan-2 Tumorzellen. Die Hemmung durch die Monotherapie mit den Heparinen, welche sowohl Thrombin/Faktor Xa als auch P-Selektin inhibieren, hielt über die maximale Messdauer von 60 min an. Durch Oxidation des UFH mit Periodat und die darauffolgende Reduktion mittels Borhydrid ergibt sich das sog. *reduced oxyheparin*, also RO-Heparin [304,305]. Das RO-Heparin ist aufgrund der chemischen Modifikation stark in seinen antikoagulatorischen Fähigkeit eingeschränkt, es stellt aber weiterhin einen potenten P-Selektin Inhibitor da. Als Ergebnis wird die TCIPA durch den konzentrationsäquivalenten Einsatz von RO-Heparin verzögert, wie es zuvor durch die Testsubstanz Bimosiamose der Fall war, jedoch nicht blockiert.



**Abbildung 39:** Einfluss einer kombinatorischen Inhibierung der Thrombozytenaggregation. Repräsentative Aggregationskurven nach Thrombozytenaktivierung mit  $1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$  AsPC-1 Zellen (**A**) oder Capan-2 (**B**) mit unbehandelten Thrombozyten (schwarz), präinkubiert mit UFH oder Tinzaparin oder RO-Heparin,  $n=5$

Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die TF-Expression auf den PCC und die anschließende Bildung von Thrombin zu einem prokoagulierenden zellulären Phänotyp beitragen. Darüber hinaus trägt die Expression von P-Selektin auf Tumorzellen möglicherweise zur Interaktion mit Thrombozyten und der anschließenden Thrombozytenaktivierung bei. Die Vorstellung einer direkten antikoagulatorischen Funktion von Rivaroxaban oder Argatroban wurde durch die Versuchsdurchführungen bestätigt, jedoch konnte eine Aggregatbildung nicht vermieden werden. Der Einsatz von Heparin bietet eine vielversprechende antikoagulatorische Behandlungsoption für Pankreastumorpatienten durch die simultane Blockierung des juxtakrinen Kontaktes und der plasmatischen Gerinnungskaskade.

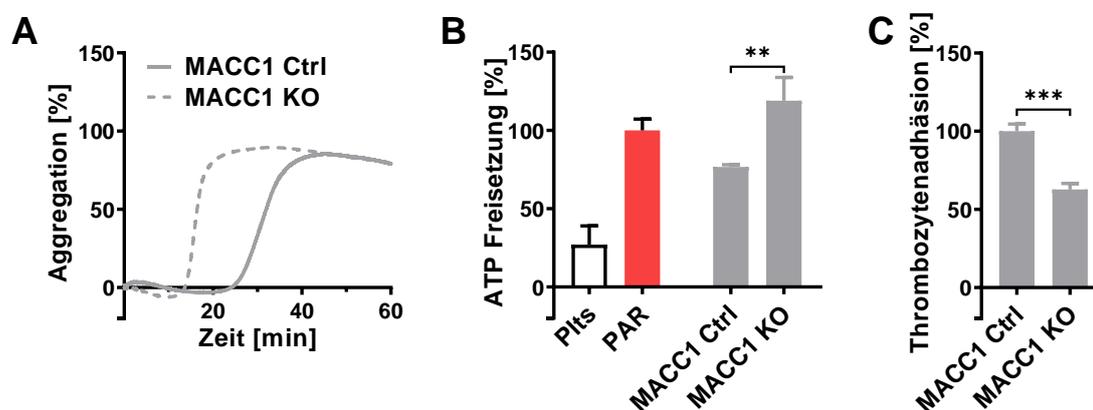
### **5.3 MACC1, ein prognostischer und prädiktiver Biomarker für Tumorprogression und Metastasierung**

Der Biomarker *Metastasis Associated in Colon Cancer 1* nimmt eine Schlüsselrolle in der Malignität von CRC ein. Inzwischen ist der Biomarker als prognostischer und prädiktiver Faktor für Metastasierung bei mehr als zwanzig verschiedenen soliden Krebsarten akzeptiert [229]. Die Vermehrung und das Zellwachstum werden durch die Aktivität entweder als Transkriptionsfaktor oder als zelluläres Anpassungsprotein gefördert. So trägt es zur Therapieresistenz oder zur Dysregulation der Apoptose bei [228,232]. Eine erhöhte Invasivität der Zellen wird durch die transkriptionell aktivierte EMT hervorgerufen [306]. Die mit der EMT verbundenen Veränderung der extrazellulären Matrix ist wahrscheinlich die Folge einer intensivierten Kommunikation mit der Mikroumgebung. Wie bereits ausgeführt, ist die Interaktion des Tumors mit seiner Mikroumgebung beispielsweise durch die Sekretion bioaktiver Moleküle eine Voraussetzung, um die verschiedenen Schritte in der komplexen Kaskade der hämatogenen Metastasierung zu erfüllen. Vor allem nach der Invasion in die Blutpassage sind die Tumorzellen auf die zellulären Komponenten in der Umgebung angewiesen, um ein günstiges Milieu für den Schutz vor der Immunabwehr und den Scherkräften sicherzustellen.

#### **5.3.1 Einfluss von MACC1 auf die Interaktion zwischen CRC und Thrombozyten**

Obwohl MACC1 bekanntermaßen die Tumormetastasierung auf verschiedenste Wege fördert, bleibt dessen Rolle in der Kommunikation der CRC mit ihrer Mikroumgebung offen. Dies gilt insbesondere bei der Kontaktvermittlung und der anschließenden Aktivierung der Thrombozyten. Aus diesem Grund wird der Fokus zu Beginn auf den Einfluss der CRC auf die Thrombozytenaggregation gesetzt. Hierzu wurden die MACC1 positiven SW620 CRC (*MACC1 Ctrl*) verglichen mit der *MACC1 knockout* Variante der SW620 Tumorzellen (*MACC1 KO*). Das zuvor validierte Thrombozytenaggregations-Assay gilt als wertvoller Indikator für die Überwachung der durch Tumorzellen ausgelösten Thrombozytenaktivierung. Ein Funktionstest der Thrombozyten mit dem PAR Aktivator und eine unbehandelte Probe wurden stets parallel vermessen, jedoch nicht mit abgebildet. Es ist überraschend, dass als Resultat die SW620 *MACC1 Ctrl* Zellen im Vergleich zu den *MACC1 KO* Zellen eine geringere Aktivität zur Auslösung der Thrombozytenaggregation aufweisen.

Dies spiegelt sich in einem zeitlich verzögerten Auslösen der Aggregation durch die *MACC1 Ctrl* im Vergleich zu den *MACC1 KO* wider, wie in **Abbildung 40 A** dargestellt. Beide Zelllinien erreichen abschließend ein identisch hohes Aggregationslevel.

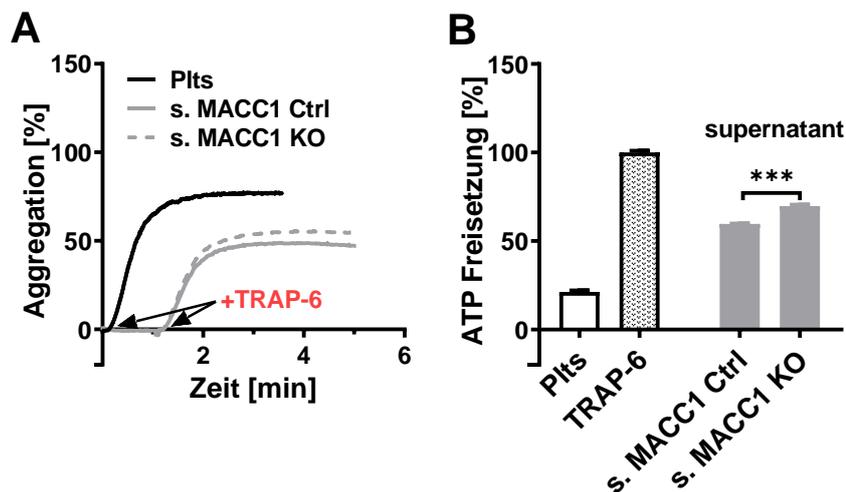


**Abbildung 40:** Abhängigkeit der Thrombozytenaktivierung durch SW620 CRC von der *MACC1* Expression. Darstellung der mit je  $1 \times 10^4$  mL<sup>-1</sup> verwendeten SW620 *MACC1* positiven Kontrollzellen (*MACC1 Ctrl*) und SW620 *MACC1 knockout* Zellen (*MACC1 KO*) als repräsentative Aggregationskurven von Thrombozyten (**A**), als ATP-Quantifizierung nach Granulafreisetzung durch Thrombozyten (**B**) und der Thrombozytenadhäsion wie im Thrombozyten-Adhäsions-Assay beschrieben (**C**), n=5; statistische Signifikanz: \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$

Das Ergebnis der Thrombozytenaggregation kann durch die parallele Quantifizierung der freigesetzten ATP-Konzentration aus der dichten Granula der Thrombozyten in **Abbildung 40 B** bestätigt werden. Bei der Versuchsdurchführung dienen die unbehandelten Thrombozyten als Kontrollgruppe und die PAR Aktivierung durch TRAP-6 als Positivkontrolle. Die signifikant höhere ATP-Freisetzung durch die SW620 *MACC1 knockout* Zellen widerspricht einer bekannten Korrelation zwischen Metastasierungspotenzial und Thrombozytenaktivierung. Dies hat die Aufklärung des zugrundeliegenden molekularen Mechanismus zum Anlass.

Den Fokus auf einen molekularen Mechanismus gerichtet, durch den sich das erhöhte Potenzial zur Thrombozytenaktivierung durch die *MACC1 KO* Variante erklären lässt, soll differenziert werden zwischen dem Auftreten einer hemmenden, löslichen Komponente in den *MACC1* positiven Zellen und einer gestörten physikalischen Kontaktvermittlung. Durch den statischen Thrombozyten-Adhäsions-Assay wurde Letzteres adressiert. Dabei werden beide Varianten der SW620 Tumorzellen in einer konfluenten Zellschicht fixiert und mit fluoreszenzmarkierte Thrombozyten versetzt. Die **Abbildung 40 C** erbringt dabei den Beweis einer signifikant erhöhten Bindungsfähigkeit der *MACC1* positiven SW620 Zellen.

Das Defizit zur Adhäsionsfähigkeit an Thrombozyten durch SW620 *MACC1 KO* schließt somit eine gestörte Kontaktvermittlung seitens der SW620 *MACC1 Ctrl* aus und begründet nicht die abgeschwächte Thrombozytenaktivierung. Somit bleibt es nun bei der Überprüfung des Überstandes der Tumorzellen. Um einen vermuteten inhibitorischen Effekt nachzuweisen, wurde das PRB mit dem jeweiligen Überstand präinkubiert. Die Zugabe einer reduzierten TRAP-6 Konzentration von 8,5  $\mu\text{M}$  führt zu einer unvollständigen Thrombozytenaggregation von etwa 70 % des Maximallevels, wie in **Abbildung 41 A** gezeigt.



**Abbildung 41:** Beeinträchtigung der Thrombozytenaktivierung durch Präinkubation des PRP mit dem Zellüberstand von SW620 CRC in Abhängigkeit von der MACC1 Expression. Darstellung der Zugabe von TRAP-6 [8,5  $\mu\text{M}$ ] zu unbehandelten Thrombozyten, zu den mit dem Überstand (supernatant) von SW620 *MACC1* positiven Kontrollzellen (s. *MACC1 Ctrl*) und SW620 *MACC1 knockout* Zellen (s. *MACC1 KO*) behandelten Thrombozyten als repräsentative Aggregationskurve (**A**) und als ATP-Quantifizierung nach Thrombozyten-Granulafreisetzung (**B**), n=5; statistische Signifikanz: \*\*\*  $p < 0.001$

Während der Überstand selbst keinen Einfluss auf die Aggregatbildung aufweist, kann die durch TRAP-6 ausgelöste Aggregationskurve deutlich auf etwa 50 % reduziert werden. Der bei der Aggregation tendenziell stärkere inhibitorische Effekt von *MACC1 Ctrl* Zellen wird erst bei der Granulafreisetzung deutlich. In **Abbildung 41 B** zeigt sich eine durch *MACC1 Ctrl* signifikant stärkere Hemmung der ATP-Freisetzung aus den Thrombozyten. Obwohl der molekulare Mechanismus noch immer unklar ist, kann mit Sicherheit behauptet werden, dass eine lösliche Komponente im Überstand der *MACC1 Ctrl* Zellen die Thrombozytenaktivierung beeinflusst.

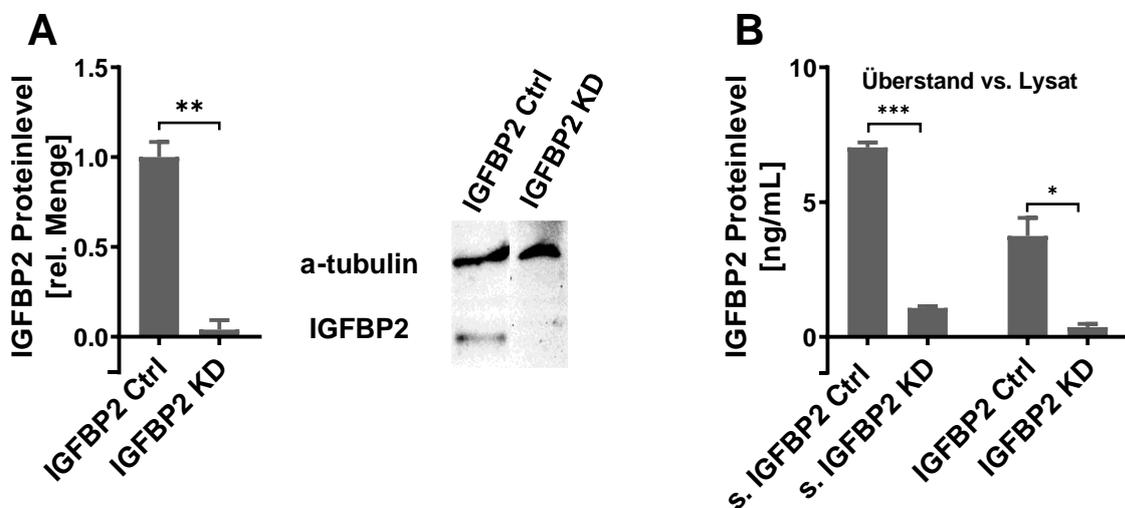


Zelllysaten der SW620 Zellen ein höchst signifikanter Unterschied in der Gesamtproteinmenge auf. Der starke Überschuss am IGFBP2 Protein im Überstand der MACC1 Ctrl Zellen wird besonders deutlich. Abschließend konnte das IGF-I Proteinlevel in einem hohen Maße im Thrombozytenplasma und -überstand gemessen werden, während der Überstand beider SW620 CRC-Varianten kein IGF-I aufweist.

Die tumorfördernde Aktivität von IGFBP2 beruht entweder auf IGF-I unabhängigen Mechanismen und/oder auf die Modulation der Aktivität von IGF-I als Transporter. Letzteres erscheint aufgrund des Ergebnisses in **Abbildung 27 A** sehr wahrscheinlich. Demnach verstärkt IGF-I nachweislich eine unvollständige Thrombozytenaggregation nach Induzierung durch 6,5  $\mu\text{M}$  TRAP-6, während die alleinige Zugabe von IGF-I keinerlei Effekt aufweist.

Die bereits dargestellten Daten aus **Abbildung 27 B** und **C**, in dem das PRB mit zunehmender Konzentration von rekombinantem IGFBP2 präinkubiert wurde, können zur abschließenden Beweisführung für die Beziehung von IGFBP2 zu Thrombozyten und seiner antagonistischen Funktion herangezogen werden. In diesem Versuchsaufbau konnte eine konzentrationsabhängige Blockierung der Thrombozytenaggregation und Granulasekretion durch IGFBP2 nach einer 42,5  $\mu\text{M}$  TRAP-6 Zugabe demonstriert werden.

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse steigt die Wahrscheinlichkeit für eine Korrelation zwischen der Überexpression von MACC1 und IGFBP2, weswegen IGFBP2 als mögliches Funktionsprotein von MACC1 angesehen werden kann.



**Abbildung 43:** Erfassung des IGFBP2 Proteins bei SW620 CRC in Abhängigkeit des IGFBP2 Gens. Darstellung der mit je  $1 \times 10^4$   $\text{mL}^{-1}$  verwendeten SW620 IGFBP2 positiven Kontrollzellen (IGFBP2 Ctrl) und SW620 IGFBP2 *knockdown* Zellen (MACC1 KD) als Quantifizierung der rel. IGFBP2

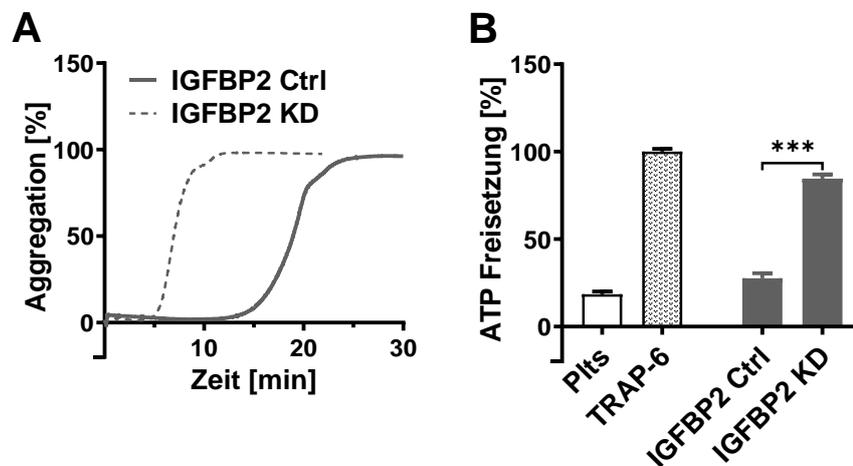
Proteinmenge mittels Western Blot (A) und Quantifizierung der IGFBP2 Gesamtproteinmenge bei den IGFBP2-Varianten und des dazugehörigen Überstandes mittels ELISA (B); n=3, statistische Signifikanz: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$

Zur Entkopplung von MACC1 von der IGFBP2 Aktivität wurde in den etablierten SW620 *MACC1 Ctrl* Zellen IGFBP2 durch shRNA downreguliert. Dies erlaubt die Verschiebung des Schwerpunkts auf die Regulierung der Sekretionsproteine durch IGFBP2 bei gleichbleibender MACC1 Konzentration.

Ein signifikanter IGFBP2 *knockdown* der Zelllinie konnte im Western Blot bewiesen werden, wie in **Abbildung 43 A** dargestellt. Eine Überexpression von IGFBP2 wurde sowohl bei den Überständen als auch bei den Lysaten der IGFBP2 Ctrl im Vergleich zu den IGFBP2 KD im ELISA bestätigt werden, unabhängig vom MACC1-Level.

### 5.3.3 Einfluss von IGFBP2 auf die Interaktion zwischen CRC und Thrombozyten

Nach erfolgreicher Validierung des SW620 *IGFBP2 KD* im Vergleich zu den SW620 IGFBP2 positiven Zellen, wurde, in Anlehnung an die ersten Versuche mit den MACC1-Varianten, der Einfluss der Tumorzellen auf die Thrombozytenaggregation und Granulasekretion wiederholt. Bemerkenswerterweise ergab sich bei der *IGFBP2 KD*-Variante des SW620 CRC ein hohes Thrombozytenaktivierungspotenzial, was sich in einer schnellen Induktion der Aggregation in **Abbildung 44 A** und einer signifikant höheren ATP-Freisetzung aus den Thrombozytengranula in **Abbildung 44 B** im Vergleich zu den SW620 *IGFBP2 Ctrl* widerspiegelt. Dies bestätigt nicht nur die bisher vermutete Theorie über den Einfluss von IGFBP2 auf die Thrombozytenaktivierung durch den SW620 CRC, sondern verdeutlicht die Relevanz von IGFBP2 als funktionell nachgeschaltete Komponente von MACC1 in den Tumorzellen.

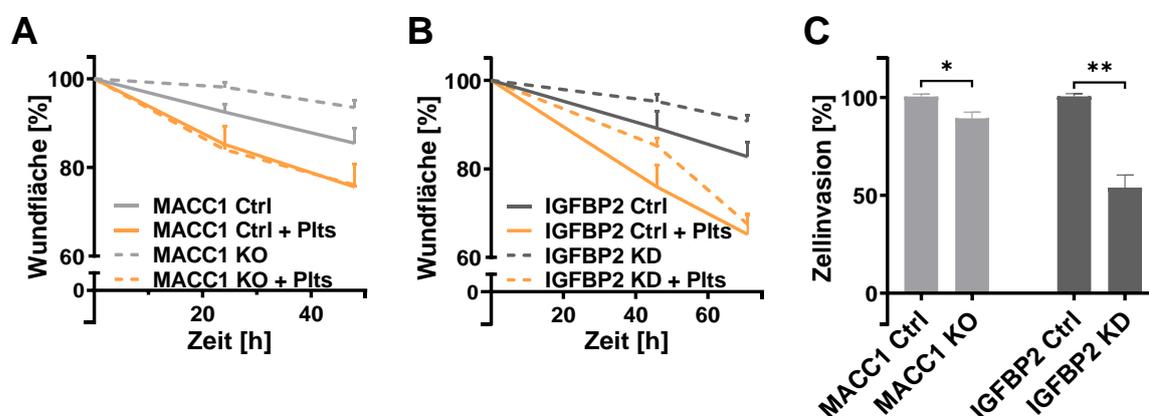


**Abbildung 44:** Thrombozytenaktivierung durch SW620 CRC in Abhängigkeit von der IGFBP2 Expression. Darstellung der mit je  $1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$  verwendeten SW620 IGFBP2 positiven Kontrollzellen (IGFBP2 Ctrl) und SW620 IGFBP2 *knockdown* Zellen (IGFBP2 KD) als repräsentative Aggregationskurven von Thrombozyten (A) und als ATP-Quantifizierung nach Granulafreisetzung durch Thrombozyten (B);  $n=5$ , statistische Signifikanz: \*\*\*  $p < 0.001$

Selbstverständlich müssen die Ergebnisse in einem breiteren Kontext als der Thrombozytenaktivierung betrachtet werden. Es stellt sich die Frage, ob und wie IGFBP2 als *downstream* Komponente der MACC1 Aktivität wirkt und wie diese beiden bekannten onkogenen Marker in einer funktionellen Beziehung zueinanderstehen.

### 5.3.4 IGFBP2 als funktionell nachgeschaltete Komponente von MACC1 mit Einfluss auf die Zelldynamik

IGFBP2 wurde ursprünglich in einem onkologischen Kontext als Regulator der IGF-Funktionen im perizellulären Raum entdeckt und identifiziert. Eine ungewöhnliche Expression von IGFBP2 konnte in den letzten Jahrzehnten bei einer Vielzahl von Tumorarten festgestellt und mit der Förderung wichtiger onkogener Prozesse assoziiert werden. In diesem Sinne ist eine IGF-unabhängige Wirkungsweise in der Tat denkbar, was eine intrazelluläre und nukleäre regulatorische Aktivität voraussetzt [309]. Daher wird im Folgenden die MACC1-abhängige IGFBP2 Aktivität auf die Zellumstrukturierung in den Mittelpunkt gestellt, indem die Zellmigration und Zellinvasion der SW620 CRC über mind. 48 h vermessen wurde. Neben dem Vergleich zwischen der MACC1- bzw. IGFBP2-Varianten, wurde der zusätzliche Einfluss von Thrombozyten auf die Zellmigration untersucht.

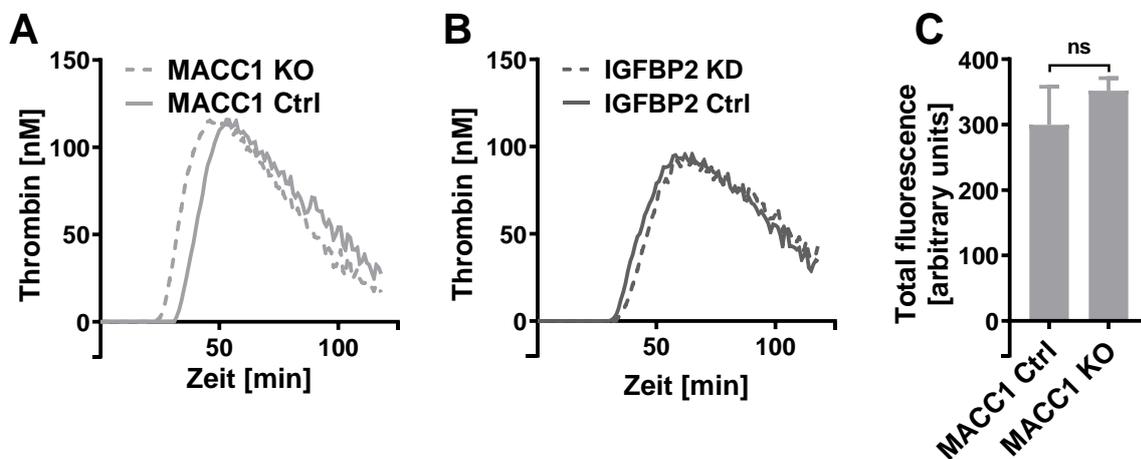


**Abbildung 45:** Einfluss von MACC1 und IGFBP2 auf die Zelldynamik. Detektion der Zellmigration und der Einfluss von Thrombozyten auf die Migration im Wundheilungs-Assay unter Verwendung von MACC1-Varianten (**A**) und IGFBP2-Varianten (**B**). Untersuchung des Einflusses von MACC1 oder IGFBP2 auf die Transmigration im Invasions-Assay (**C**); n=3; statistische Signifikanz: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$

Den Ergebnissen aus **Abbildung 45 A** nach sind die *MACC1 KO* Tumorzellen mit einer verminderten Zellmigrationsdynamik verbunden, was frühere Erkenntnisse über eine erhöhte Zellmotilität von MACC1 positiven Zellen bestätigt. In **Abbildung 45 B** wird der Einfluss von IGFBP2 auf die Migration dargestellt, wobei der Ausgangspunkt beider Varianten die MACC1 positiven Tumorzellen sind. Interessanterweise zeigt der *IGFBP2 KD* ein identisches Erscheinungsbild wie zuvor die *MACC1 KO* Tumorzellen, was die Vermutung bestärkt, dass IGFBP2 als Funktionsprotein von MACC1 fungiert und die Zellmigration vermittelt.

Zusätzlich steigert die Präinkubation der Tumorzellen mit Thrombozyten insgesamt die migratorischen Eigenschaften, unabhängig von der Variante der Tumorzellen. So ist das Level der erhöhten Zellmigration durch Thrombozyten identisch bei *MACC1 Ctrl* und *IGFBP2 Ctrl*, sowie bei den Varianten *MACC1 KO* und *IGFBP2 KD*. Die fehlende Regulierung durch *MACC1/IGFBP2* wird durch die Anwesenheit der Thrombozyten bezüglich der Motilität vollständig ausgeglichen.

Der funktionelle Zusammenhang zwischen *MACC1* und *IGFBP2* wird durch die Daten zur Transmigration in **Abbildung 45 C** bestätigt. Es kann die Behauptung aufgestellt werden, dass die höhere Invasivität der *MACC1* Zellen mit der *IGFBP2* Aktivität korreliert. Der Verlust von *MACC1* ist mit einer verringerten Invasion verbunden, während der *IGFBP2 KD*, trotz der Gegenwart von *MACC1*, ebenso eine deutliche Reduzierung der invasiven Eigenschaften zur Folge hat, wodurch *IGFBP2* als Schlüsselmolekül für die gesteigerte Zelldynamik hervorzuheben ist.



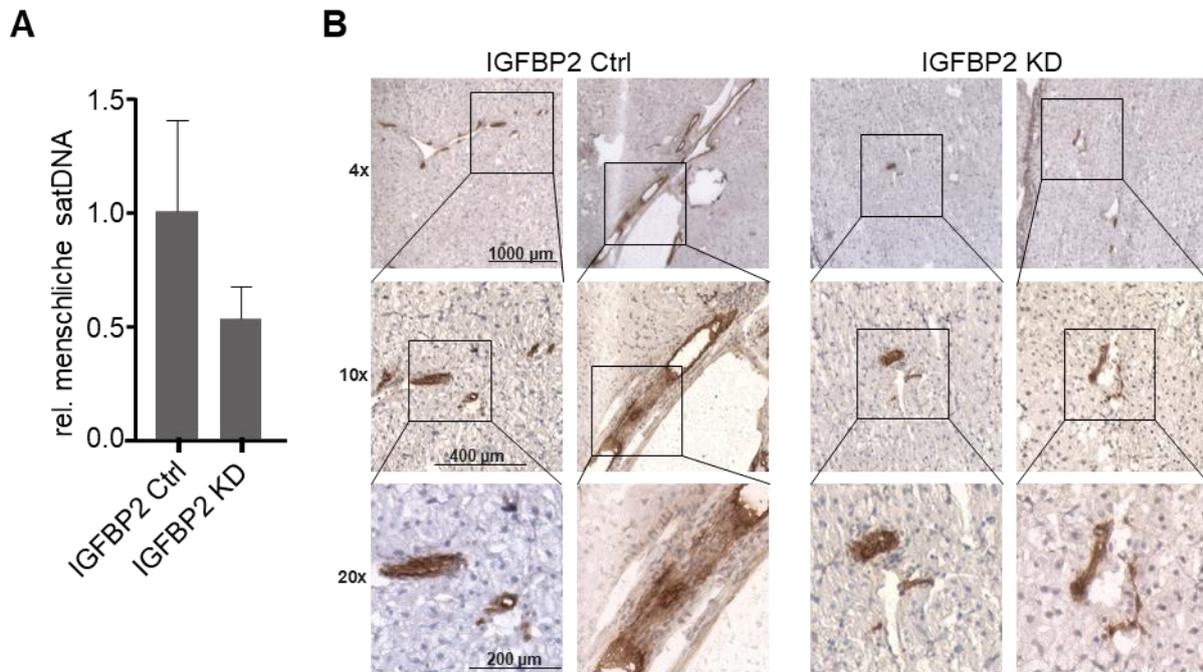
**Abbildung 46:** Untersuchung der koagulativen Eigenschaften von *MACC1*- und *IGFBP2*-Varianten. Einfluss auf die Thrombinbildung von *MACC1 Ctrl* im Vergleich zu *MACC1 KO* (**A**) und von *IGFBP2 Ctrl* im Vergleich zu *IGFBP2 KD* (**B**) im Thrombingenerierungs-Assay. Vergleich der TF Expression auf der Zelloberfläche von SW620 *MACC1 Ctrl* und *MACC1 KO* mittels Durchflusszytometrie (**C**); n=3, statistische Signifikanz: ns  $p \geq 0,05$

Um einen detaillierten Eindruck während der Metastasierung zu gewinnen, wurden die thrombogenen Eigenschaften der Zelllinien untersucht. Die Thrombozytenaktivierung ist ein entscheidender Faktor, der zur tumorzellinduzierten Gerinnung beiträgt, während die Thrombinbildung durch den TF/FVII Signalweg hauptsächlich zur Förderung der Gerinnung und damit der Metastasierung beiträgt. In **Abbildung 46 A und B** ist eine nahezu identische Kapazität der Thrombingenerierung von *MACC1 KO* und *IGFBP2 KD* zu den jeweiligen

Kontrollen zu beobachten. Unterstützt wird das Resultat durch die Daten zur TF Expression in **Abbildung 46 C**. Die Datenlage beweist, dass die ermittelte geringere Thrombozytenaktivierung durch die MACC1/IGFBP2-Achse keine funktionelle Auswirkung auf die Gerinnungsfähigkeit hat und somit nicht im Widerspruch zu dem höheren metastatischen Potenzial steht, welches mit MACC1 assoziiert ist. Eine abschließende *in vivo* Studie zur experimentellen Metastasierung in Mäusen soll die Relevanz von IGFBP2 für das Metastasierungspotenzial bestätigen.

### 5.3.5 In vivo Ergebnisse

Um die Wirkung von IGFBP2 auf die Fähigkeit von Tumorzellen zur Bildung von Metastasen *in vivo* zu testen, wurde die *IGFBP2 KD* Variante des SW620 CRC mit der *IGFBP2 Ctrl* Zelllinie bezüglich des metastatischen Verhaltens verglichen. Die humanen Zellen wurden in die Milz der Mäuse xenotransplantiert und hinsichtlich Tumorwachstum und Metastasenbildung beleuchtet. Der Tierversuch wurde beendet, sobald der ethische Endpunkt beim ersten Tier erreicht war, was einem Tumolvolumen von etwa 0,5 mm<sup>3</sup> entspricht. Für die molekulare Analyse wurde die Leber verwendet. Im Kryozustand wurde das Gewebe sektioniert und die DNA isoliert. Die quantifizierte menschliche Satelliten-DNA in der Mäuseleber dient als Marker für die erfolgte Metastasierung der humanen Zellen. Im Vergleich zu den Kontrollzellen war die menschliche DNA-Last nach IGFBP2 KD reduziert, wie in **Abbildung 47 A** dargestellt. In **Abbildung 47 B** bestätigt die immunhistochemische Darstellung des 40 kDa großen humanen Typ I Keratin (KRT19) die verringerte Anzahl von Metastasen in der Leber. Die deutlich reduzierte Menge menschlicher Zellen in der Mausleber nach Ausschaltung von IGFBP2 spricht eindeutig für den Einfluss von IGFBP2 auf die Verstärkung des metastatischen Verhaltens von SW620 CRC.



**Abbildung 47:** IGFBP2 als metastatischer Faktor bei der *in vivo* Untersuchung: Metastasenbildung durch den *IGFBP2 KD* im Vergleich zu den *IGFBP2 Ctrl* nach Xenotransplantation der SW620 Tumorzellen dargestellt durch die Quantifizierung der menschlichen Satelliten-DNA in der Mäuseleber (**A**) und der immunhistochemischen Färbung von KRT19 (**B**)

Die vorangegangenen Daten beziehen sich auf gezielte *in vitro* Untersuchungen der Interaktion zwischen Tumorzellen und Thrombozyten, wobei der Unterschied im Aktivierungspotenzial beispielsweise durch den Zeitpunkt des Aggregationsbeginns hervorgehoben wird. Den daran anschließenden *in vivo* Daten tragen mehrere Faktoren zusätzlich zur Thrombozytenaktivierung bei. Fundamentale Bestandteile wie beispielsweise das subendotheliale Kollagen, welches im Verlauf der Tumor-Intravasation in die Blutbahn gelangt, kann den Prozess der Thrombozytenaktivierung fördern.

Somit konnte in der vorliegenden Studie der Nachweis für IGFBP2 als Funktionsprotein von MACC1 in CRC erbracht werden. Dadurch wird deutlich, dass IGFBP2 eine erhöhte Zellmobilität und Metastasierung bewirkt. Auf diese Weise konnten MACC1 und IGFBP2, zwei anerkannte Biomarker für erhöhte Malignität, Invasivität und Metastasierung verschiedener solider Tumore, zum ersten Mal in einem kombinierten Ansatz und in ihrer funktionellen Beziehung aufgeführt werden. Auch wenn nicht alle molekularen Mechanismen im Zusammenspiel zwischen MACC1 und IGFBP2 geklärt wurden, so konnte ein grundlegender Teilaspekt zum Verständnis der MACC1 Funktion bei der Krebserkrankung aufgeklärt werden.

## 6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression von TF und dem P-Selektin Liganden auf der Zelloberfläche von Pankreaskarzinomzellen im Prozess der Thrombozytenaggregation und Granulasekretion eng miteinander verbunden ist. Zum Nachweis der gerinnungsfördernden Eigenschaften der Pankreaskarzinoma AsPC-1, MIA PaCa-2 und Capan-2 wurde der Fokus auf die TF Expression durch Tumorzellen als positiver Faktor der plasmatischen Gerinnungskaskade gesetzt. Ein hohes Level an TF konnte auf den AsPC-1 und Capan-2 Zelllinien nachgewiesen werden und korrelierte mit einer erhöhten Thrombingenerierung und verstärkten Thrombozytenaktivierung. Die Blockade der Gerinnungskaskade mit Thrombin oder Faktor Xa als Zielstrukturen führte zu einer verzögerten Aggregation und reduzierten ATP-Freisetzung. Zudem konnte aufgrund der nachgewiesenen hohen Bindungsaffinität der AsPC-1 und Capan-2 PCC an P-Selektin durch Einsatz des P-Selektin-Inhibitors Bimosiamose die Aggregatbildung und Sekretion eingeschränkt werden. Zuvor konnte bereits von Kollegen der Einfluss von P-Selektin durch Brustkrebszelllinien auf die Thrombozytenaktivierung unter Beteiligung von *Src-family kinases FYN* und *HCK*, *protein kinase B* (Akt) und *extracellular signal-regulated kinase* (Erk) demonstriert werden [72]. P-Selektin besitzt demnach eine umfassende Funktion bei der Adhäsion, intrazellularen Signalübertragung und der Rezeptorinteraktion bei Thrombozyten. Eine Kombination der beiden molekularen Signalwege verhinderte die Thrombozytenaggregation und -sekretion vollständig. Die beinahe absolute Abwesenheit von TF und des P-Selektin Liganden auf den MIA PaCa-2 Zellen erklärt die Unfähigkeit einer Initiierung der Aggregation und Granulasekretion.

Nichtsdestotrotz können Untersuchungen weiterer Pankreaskarzinomzellen neue Kombinationsmöglichkeiten der molekularen Mechanismen zur Thrombozytenaktivierung enthüllen. Verglichen zu unseren Untersuchungen ist die *in vivo* Situation wesentlich komplexer aufgrund der Anwesenheit weiterer Zellverbände, wie beispielsweise Endothelzellen und Leukozyten mit einem enormen Einfluss auf die Thrombozytenaktivierung. Ungeachtet dessen heben unsere Daten die Rolle von Heparin aufgrund der antithrombotischen und antiadhäsiven Eigenschaften hervor und bieten ein Argument für den Einsatz in der antitumoralen Therapie in der klinischen Anwendung.

Nach Anwendung der bisherigen Erkenntnisse, erhielten wir ein unerwartet inverses Ergebnis bei der Untersuchung der Thrombozytenaggregation und Granulasekretion von MACC1 positiven SW620 CRC Zellen, einem anerkannten Biomarker für erhöhte Malignität, im Vergleich zum *MACC1 knockout*. Durch nähere Untersuchungen kristallisierte sich der inhibitorische Effekt, ausgehend vom Überstand der Tumorzellen, aus. IGFBP2 wurde stark im Überstand von MACC1 positiven SW620 CRC exprimiert und zeigt offensichtlich sowohl IGF-abhängige als auch IGF-unabhängige Aktivitäten. Was Ersteres betrifft, so war die abgeschwächte Thrombozytenaktivierung durch die MACC1 positiven Tumorzellen ein unerwarteter Befund, der schließlich zur Identifikation von IGFBP2 als verantwortliches Funktionsprotein im Zellüberstand verhalf. Ein Zusammenspiel von IGFBP2 und der Thrombozytenaktivierung wurde bisher noch nicht berichtet. Die Daten deuten auf einen Abfangmechanismus für IGF-I und damit auf eine abgeschwächte Thrombozytenaktivierung aufgrund der Überexpression von IGFBP2. Bedenkt man, dass die Thrombozytenaktivierung ein Schlüsselfaktor für die Ausbreitung von Metastasen darstellt, scheint eine reduzierte Thrombozytenaktivierung durch IGFBP2 nicht der erhöhten Malignität von MACC1-regulierten Zellen aus diversen Gründen zu widersprechen. Die Deregulierung von MACC1/IGFBP2 hat beispielsweise keinen Einfluss auf die tumorzellinduzierte Thrombinbildung, die für die tumorbedingte Thrombose und Metastasierung von übergeordneter Bedeutung ist.

Die IGF-unabhängigen Aktivitäten von IGFBP2 scheinen sehr komplex in einem onkogenen Netzwerk verstrickt zu sein. Sie beeinflussen in einer Reihe von Signalwegen Tumorwachstum und -progression. Es konnte bereits eine von IGFBP2 abhängige verringerte Migration beim Kolonkarzinom gezeigt werden, ähnlich zu unseren Ergebnissen [310]. Obwohl der molekulare Mechanismus noch unerforscht ist, scheinen Integrine Schlüsselmediatoren für die Mechanotransduktion der IGFBP2-bezogenen Effekte zu sein. So werden Integrine beschrieben als Kollektoren für extrazelluläres IGFBP2 zwecks Übertragung des tumorfördernden Signals in die Zelle, beispielsweise durch Hemmung der Tumorsuppressoraktivität von PTEN [311,312]. In diesem Zusammenhang wurde berichtet, dass IGFBP2 die nukleäre Translokation und Aktivierung von NF- $\kappa$ B über den PI3K/Akt Signalweg induziert [313]. Hinzu kommt die Entdeckung von IGFBP2 als ein nachgeschaltetes Ziel von überexprimiertem HSP27 in hepatozellulären Karzinomzellen, welches vermittelt durch Vimentin, dem Transkriptionsfaktor Snail and  $\beta$ -Catenin die Tumorprogression fördert [314]. Die funktionelle Beziehung zwischen IGFBP2, NF- $\kappa$ B und  $\beta$ -Catenin, die den Wnt-Signalweg begünstigt, wurde auch bei CRC nachgewiesen [315,316]. Folglich ist das Spektrum der wahrscheinlichen IGFBP2-Aktivität

breit gefächert und eine Aufklärung des Mechanismus zur metastatischen Ausbreitung von SW620 Zellen erfordert weitere Studien.

Wie dem auch sei, die funktionelle Kombination von IGFBP2 und MACC1 wirft ein neues Licht auf frühere Studien, die entweder IGFBP2 oder MACC1 in ihrer individuellen Rolle als prognostische Biomarker bei verschiedenen soliden Tumorarten hervorgehoben haben. Es wird interessant sein zu klären, ob andere Tumorzellen IGFBP2 und MACC1 als tumorfördernde Mediatoren in synergistische Weise nutzen.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Was ist Krebs? Available online: <https://www.bayerische-krebsgesellschaft.de/informationen/fakten-ueber-krebs/was-ist-krebs/?L=0> (accessed on 25 July 2021).
2. Hargadon, K.M.; Johnson, C.E.; Williams, C.J. Immune Checkpoint Blockade Therapy for Cancer: An Overview of FDA-Approved Immune Checkpoint Inhibitors. *International Immunopharmacology* **2018**, *62*, 29–39, doi:10.1016/j.intimp.2018.06.001.
3. Krebs war 2019 für ein Viertel aller Todesfälle in Deutschland verantwortlich Available online: [https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2021/02/PD21\\_N010\\_231.html](https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2021/02/PD21_N010_231.html) (accessed on 1 October 2021).
4. Krebsforschungszentrum, K., Deutsches Wie entsteht Krebs? Available online: <https://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/grundlagen/krebsentstehung.php> (accessed on 1 October 2021).
5. Vatandoust, S.; Price, T.J.; Karapetis, C.S. Colorectal Cancer: Metastases to a Single Organ. *World J Gastroenterol* **2015**, *21*, 11767–11776, doi:10.3748/wjg.v21.i41.11767.
6. Metastasierung von Tumoren Available online: <https://www.gesundheitsindustrie-bw.de/fachbeitrag/dossier/metastasierung-von-tumoren> (accessed on 1 October 2021).
7. Haring, A. (AZQ) S3-Leitlinie Prostatakarzinom. **2021**, 373.
8. Varki, A. Trousseau’s Syndrome: Multiple Definitions and Multiple Mechanisms. *Blood* **2007**, *110*, 1723–1729, doi:10.1182/blood-2006-10-053736.
9. Mitchell, M.; King, M. Computational and Experimental Models of Cancer Cell Response to Fluid Shear Stress. *Frontiers in Oncology* **2013**, *3*, 44, doi:10.3389/fonc.2013.00044.
10. Gasic, G.J.; Gasic, T.B.; Stewart, C.C. Antimetastatic Effects Associated with Platelet Reduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1968**, *61*, 46–52.
11. Biomarker zeigen Aggressivität des Tumors an Available online: <https://www.mdc-berlin.de/de/news/2017/biomarker-zeigen-aggressivitaet-des-tumors-an> (accessed on 16 October 2021).
12. Stein, U.; Walther, W.; Arlt, F.; Schwabe, H.; Smith, J.; Fichtner, I.; Birchmeier, W.; Schlag, P.M. MACC1, a Newly Identified Key Regulator of HGF-MET Signaling, Predicts Colon Cancer Metastasis. *Nat Med* **2009**, *15*, 59–67, doi:10.1038/nm.1889.
13. Chaffer, C.L.; Weinberg, R.A. A Perspective on Cancer Cell Metastasis. *Science* **2011**, *331*, 1559–1564, doi:10.1126/science.1203543.
14. Ilic, M.; Ilic, I. Epidemiology of Pancreatic Cancer. *World J Gastroenterol* **2016**, *22*, 9694–9705, doi:10.3748/wjg.v22.i44.9694.
15. Oberstein, P.E.; Olive, K.P. Pancreatic Cancer: Why Is It so Hard to Treat? *Therap Adv Gastroenterol* **2013**, *6*, 321–337, doi:10.1177/1756283X13478680.
16. Santoro, M.M.; Gaudino, G. Cellular and Molecular Facets of Keratinocyte Reepithelization during Wound Healing. *Exp Cell Res* **2005**, *304*, 274–286, doi:10.1016/j.yexcr.2004.10.033.
17. Chiang, S.P.H.; Cabrera, R.M.; Segall, J.E. Tumor Cell Intravasation. *Am J Physiol Cell Physiol* **2016**, *311*, C1–C14, doi:10.1152/ajpcell.00238.2015.
18. Brooks, S.A.; Lomax-Browne, H.J.; Carter, T.M.; Kinch, C.E.; Hall, D.M.S. Molecular Interactions in Cancer Cell Metastasis. *Acta Histochemica* **2010**, *112*, 3–25, doi:10.1016/j.acthis.2008.11.022.
19. Peinado, H.; Lavotshkin, S.; Lyden, D. The Secreted Factors Responsible for Pre-Metastatic Niche Formation: Old Sayings and New Thoughts. *Semin Cancer Biol* **2011**, *21*, 139–146, doi:10.1016/j.semcancer.2011.01.002.

20. Jakubowska, K.; Pryczynicz, A.; Januszewska, J.; Sidorkiewicz, I.; Kemon, A.; Niewiński, A.; Lewczuk, Ł.; Kędra, B.; Guzińska-Ustymowicz, K. Expressions of Matrix Metalloproteinases 2, 7, and 9 in Carcinogenesis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Dis Markers* **2016**, *2016*, 9895721, doi:10.1155/2016/9895721.
21. Gloushankova, N.A.; Rubtsova, S.N.; Zhitnyak, I.Y. Cadherin-Mediated Cell-Cell Interactions in Normal and Cancer Cells. *Tissue Barriers* **2017**, *5*, e1356900, doi:10.1080/21688370.2017.1356900.
22. Friedl, P.; Wolf, K. Tumour-Cell Invasion and Migration: Diversity and Escape Mechanisms. *Nat Rev Cancer* **2003**, *3*, 362–374, doi:10.1038/nrc1075.
23. Joyce, J.A.; Pollard, J.W. Microenvironmental Regulation of Metastasis. *Nat Rev Cancer* **2009**, *9*, 239–252, doi:10.1038/nrc2618.
24. Nieswandt, B.; Hafner, M.; Echtenacher, B.; Männel, D.N. Lysis of Tumor Cells by Natural Killer Cells in Mice Is Impeded by Platelets. *Cancer Res* **1999**, *59*, 1295–1300.
25. Schlesinger, M.; Bendas, G. Contribution of Very Late Antigen-4 (VLA-4) Integrin to Cancer Progression and Metastasis. *Cancer Metastasis Rev* **2015**, *34*, 575–591, doi:10.1007/s10555-014-9545-x.
26. Reymond, N.; d'Água, B.B.; Ridley, A.J. Crossing the Endothelial Barrier during Metastasis. *Nat Rev Cancer* **2013**, *13*, 858–870, doi:10.1038/nrc3628.
27. Psaila, B.; Lyden, D. The Metastatic Niche: Adapting the Foreign Soil. *Nat Rev Cancer* **2009**, *9*, 285–293, doi:10.1038/nrc2621.
28. Gay, L.J.; Felding-Habermann, B. Contribution of Platelets to Tumour Metastasis. *Nat Rev Cancer* **2011**, *11*, 123–134, doi:10.1038/nrc3004.
29. Quach, M.E.; Chen, W.; Li, R. Mechanisms of Platelet Clearance and Translation to Improve Platelet Storage. *Blood* **2018**, *131*, 1512–1521, doi:10.1182/blood-2017-08-743229.
30. Mojzisch, A.; Brehm, M.A. The Manifold Cellular Functions of von Willebrand Factor. *Cells* **2021**, *10*, 2351, doi:10.3390/cells10092351.
31. Du, X. Signaling and Regulation of the Platelet Glycoprotein Ib-IX-V Complex. *Curr Opin Hematol* **2007**, *14*, 262–269, doi:10.1097/MOH.0b013e3280dce51a.
32. Stepanyan, M.G.; Filkova, A.A.; Garzon Dasgupta, A.K.; Martyanov, A.A.; Sveshnikova, A.N. Platelet Activation through GPVI Receptor: Variability of the Response. *Biochem. Moscow Suppl. Ser. A* **2021**, *15*, 73–81, doi:10.1134/S1990747820050074.
33. Golebiewska, E.M.; Poole, A.W. Platelet Secretion: From Haemostasis to Wound Healing and Beyond. *Blood Rev* **2015**, *29*, 153–162, doi:10.1016/j.blre.2014.10.003.
34. Jurk, K.; Kehrel, B.E. Die zentrale Rolle der Thrombozyten im neuen Verständnis der Hämostase. *Hamostaseologie* **2005**, *25*, 39–49, doi:10.1055/s-0037-1619643.
35. Gachet, C. P2Y12 Receptors in Platelets and Other Hematopoietic and Non-Hematopoietic Cells. *Purinergic Signal* **2012**, *8*, 609–619, doi:10.1007/s11302-012-9303-x.
36. Habib, A.; FitzGerald, G.A.; Maclouf, J. Phosphorylation of the Thromboxane Receptor  $\alpha$ , the Predominant Isoform Expressed in Human Platelets \*. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274*, 2645–2651, doi:10.1074/jbc.274.5.2645.
37. Gardiner, C.; Harrison, P.; Belting, M.; Böing, A.; Campello, E.; Carter, B.; Collier, M.; Coumans, F.; Ettelaie, C.; Van Es, N.; et al. Extracellular Vesicles, Tissue Factor, Cancer and Thrombosis - Discussion Themes of the ISEV 2014 Educational Day. *2015* **2015**, *4*, doi:10.3402/jev.v4.26901.
38. Azma, T.; Tuluc, F.; Ito, T.; Aoyama-Mani, C.; Kawahito, S.; Kinoshita, H. Mechanisms of Action of Anesthetics for the Modulation of Perioperative Thrombosis: Evidence for Immune Mechanisms from Basic and Clinical Studies. *Current pharmaceutical design* **2014**, *20*, 5779–5793, doi:10.2174/1381612820666140204102044.
39. Ghosh, A. Role of CD36 in Platelet Function. 146.

40. Budnik, I.; Brill, A. Immune Factors in Deep Vein Thrombosis Initiation. *Trends in Immunology* **2018**, *39*, 610–623, doi:10.1016/j.it.2018.04.010.
41. Streif, W.; Knöfler, R. Diagnose von Thrombozytenfunktionsstörungen Thrombozytopathien Available online: [https://register.awmf.org/assets/guidelines/086-0031\\_S2k\\_Diagnostik\\_Thrombozytenfunktionsstoerungen\\_Thrombozytopathien\\_2018-09-abgelaufen.pdf](https://register.awmf.org/assets/guidelines/086-0031_S2k_Diagnostik_Thrombozytenfunktionsstoerungen_Thrombozytopathien_2018-09-abgelaufen.pdf) (accessed on 5 May 2022).
42. Haschemi, R.; Gockel, L.M.; Bendas, G.; Schlesinger, M. A Combined Activity of Thrombin and P-Selectin Is Essential for Platelet Activation by Pancreatic Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, *22*, 3323, doi:10.3390/ijms22073323.
43. Borsig, L. The Role of Platelet Activation in Tumor Metastasis. *Expert Rev Anticancer Ther* **2008**, *8*, 1247–1255, doi:10.1586/14737140.8.8.1247.
44. Sørensen, H.T.; Mellekjaer, L.; Olsen, J.H.; Baron, J.A. Prognosis of Cancers Associated with Venous Thromboembolism. *N Engl J Med* **2000**, *343*, 1846–1850, doi:10.1056/NEJM200012213432504.
45. Honn, K.V.; Tang, D.G.; Crissman, J.D. Platelets and Cancer Metastasis: A Causal Relationship? *Cancer Metastasis Rev* **1992**, *11*, 325–351, doi:10.1007/BF01307186.
46. Nakchbandi, I.A.; Löhr, J.-M. Coagulation, Anticoagulation and Pancreatic Carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **2008**, *5*, 445–455, doi:10.1038/ncpgasthep1184.
47. Ballerini, P.; Dovizio, M.; Bruno, A.; Tacconelli, S.; Patrignani, P. P2Y<sub>12</sub> Receptors in Tumorigenesis and Metastasis. *Frontiers in Pharmacology* **2018**, *9*.
48. McNicol, A.; Israels, S.J. Platelet Dense Granules. *Thrombosis Research* **1999**, *95*, 1–18, doi:10.1016/S0049-3848(99)00015-8.
49. Varga-Szabo, D.; Braun, A.; Nieswandt, B. Calcium Signaling in Platelets. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2009**, *7*, 1057–1066, doi:10.1111/j.1538-7836.2009.03455.x.
50. Nie, D.; Lamberti, M.; Zacharek, A.; Li, L.; Szekeres, K.; Tang, K.; Chen, Y.; Honn, K.V. Thromboxane A<sub>2</sub> Regulation of Endothelial Cell Migration, Angiogenesis, and Tumor Metastasis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2000**, *267*, 245–251, doi:10.1006/bbrc.1999.1840.
51. Chen, Y.Q.; Liu, B.; Tang, D.G.; Honn, K.V. Fatty Acid Modulation of Tumor Cell-Platelet-Vessel Wall Interaction. *Cancer Metast Rev* **1992**, *11*, 389–409, doi:10.1007/BF01307189.
52. Mezouar, S.; Mege, D.; Darbousset, R.; Farge, D.; Debourdeau, P.; Dignat-George, F.; Panicot-Dubois, L.; Dubois, C. Involvement of Platelet-Derived Microparticles in Tumor Progression and Thrombosis. *Seminars in Oncology* **2014**, *41*, 346–358, doi:10.1053/j.seminoncol.2014.04.010.
53. Brill, A.; Dashevsky, O.; Rivo, J.; Gozal, Y.; Varon, D. Platelet-Derived Microparticles Induce Angiogenesis and Stimulate Post-Ischemic Revascularization. *Cardiovascular Research* **2005**, *67*, 30–38, doi:10.1016/j.cardiores.2005.04.007.
54. Ponert, J.M.; Schwarz, S.; Haschemi, R.; Müller, J.; Pötzsch, B.; Bendas, G.; Schlesinger, M. The Mechanisms How Heparin Affects the Tumor Cell Induced VEGF and Chemokine Release from Platelets to Attenuate the Early Metastatic Niche Formation. *PLoS One* **2018**, *13*, e0191303, doi:10.1371/journal.pone.0191303.
55. Salgado, R.; Benoy, I.; Bogers, J.; Weytjens, R.; Vermeulen, P.; Dirix, L.; Van Marck, E. Platelets and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF): A Morphological and Functional Study. *Angiogenesis* **2001**, *4*, 37–43, doi:10.1023/a:1016611230747.
56. Goubran, H.A.; Stakiw, J.; Radosevic, M.; Burnouf, T. Platelets Effects on Tumor Growth. *Seminars in Oncology* **2014**, *41*, 359–369, doi:10.1053/j.seminoncol.2014.04.006.
57. Delafontaine, P.; Song, Y.-H.; Li, Y. Expression, Regulation, and Function of IGF-1, IGF-1R, and IGF-1 Binding Proteins in Blood Vessels. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **2004**, *24*, 435–444, doi:10.1161/01.ATV.0000105902.89459.09.

58. Hers, I. Insulin-like Growth Factor-1 Potentiates Platelet Activation via the IRS/PI3K $\alpha$  Pathway. *Blood* **2007**, *110*, 4243–4252, doi:10.1182/blood-2006-10-050633.
59. Hoffman, R.; Haim, N.; Brenner, B. Cancer and Thrombosis Revisited. *Blood Reviews* **2001**, *15*, 61–67, doi:10.1054/blre.2001.0149.
60. Chiang, H.S.; Swaim, M.W.; Huang, T.F. Characterization of Platelet Aggregation Induced by Human Breast Carcinoma and Its Inhibition by Snake Venom Peptides, Trigramin and Rhodostomin. *Breast Cancer Res Treat* **1995**, *33*, 225–235, doi:10.1007/BF00665947.
61. Haynes, L.M.; Bouchard, B.A.; Tracy, P.B.; Mann, K.G. Prothrombin Activation by Platelet-Associated Prothrombinase Proceeds through the Prethrombin-2 Pathway via a Concerted Mechanism \*. *Journal of Biological Chemistry* **2012**, *287*, 38647–38655, doi:10.1074/jbc.M112.407791.
62. Baumgartner, C.K.; Mattson, J.G.; Weiler, H.; Shi, Q.; Montgomery, R.R. Targeting Factor VIII Expression to Platelets for Hemophilia A Gene Therapy Does Not Induce an Apparent Thrombotic Risk in Mice. *J Thromb Haemost* **2017**, *15*, 98–109, doi:10.1111/jth.13436.
63. Heemskerk, J.W.M.; Mattheij, N.J.A.; Cosemans, J.M.E.M. Platelet-Based Coagulation: Different Populations, Different Functions. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2013**, *11*, 2–16, doi:10.1111/jth.12045.
64. Terraube, V.; Pendu, R.; Baruch, D.; Gebbink, M.F.B.G.; Meyer, D.; Lenting, P.J.; Denis, C.V. Increased Metastatic Potential of Tumor Cells in von Willebrand Factor-Deficient Mice. *J Thromb Haemost* **2006**, *4*, 519–526, doi:10.1111/j.1538-7836.2005.01770.x.
65. Terraube, V.; Marx, I.; Denis, C.V. Role of von Willebrand Factor in Tumor Metastasis. *Thrombosis Research* **2007**, *120*, S64–S70, doi:10.1016/S0049-3848(07)70132-9.
66. Karpatkin, S.; Pearlstein, E.; Ambrogio, C.; Collier, B.S. Role of Adhesive Proteins in Platelet Tumor Interaction in Vitro and Metastasis Formation in Vivo. *J. Clin. Invest.* **1988**, *81*, 1012–1019, doi:10.1172/JCI113411.
67. Malik, G.; Knowles, L.M.; Dhir, R.; Xu, S.; Yang, S.; Ruoslahti, E.; Pilch, J. Plasma Fibronectin Promotes Lung Metastasis by Contributions to Fibrin Clots and Tumor Cell Invasion. *Cancer Res* **2010**, *70*, 4327–4334, doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3312.
68. Garside, S.A.; Harlow, C.R.; Hillier, S.G.; Fraser, H.M.; Thomas, F.H. Thrombospondin-1 Inhibits Angiogenesis and Promotes Follicular Atresia in a Novel in Vitro Angiogenesis Assay. *Endocrinology* **2010**, *151*, 1280–1289, doi:10.1210/en.2009-0686.
69. Kerr, B.A.; Harris, K.S.; Shi, L.; Willey, J.S.; Soto-Pantoja, D.R.; Byzova, T.V. Platelet TSP-1 Controls Prostate Cancer-Induced Osteoclast Differentiation and Bone Marrow-Derived Cell Mobilization through TGF $\beta$ -1. *Am J Clin Exp Urol* **2021**, *9*, 18–31.
70. Tuszyński, G.P.; Gasic, T.B.; Rothman, V.L.; Knudsen, K.A.; Gasic, G.J. Thrombospondin, a Potentiator of Tumor Cell Metastasis. 5.
71. Fabricius, H.-Å.; Starzonek, S.; Lange, T. The Role of Platelet Cell Surface P-Selectin for the Direct Platelet-Tumor Cell Contact During Metastasis Formation in Human Tumors. *Frontiers in Oncology* **2021**, *11*.
72. Schwarz, S.; Gockel, L.M.; 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*, 1039, doi:10.3390/molecules25051039.
73. Lavergne, M.; Janus-Bell, E.; Schaff, M.; Gachet, C.; Mangin, P.H. Platelet Integrins in Tumor Metastasis: Do They Represent a Therapeutic Target? *Cancers* **2017**, *9*, 133, doi:10.3390/cancers9100133.
74. Grossi, I.M.; Hatfield, J.S.; Fitzgerald, L.A.; Newcombe, M.; Taylor, J.D.; Honn, K.V. Role of Tumor Cell Glycoproteins Immunologically Related to Glycoproteins Ib and IIb/IIIa in Tumor Cell-Platelet and Tumor Cell-Matrix Interactions. *The FASEB Journal* **1988**, *2*, 2385–2395, doi:10.1096/fasebj.2.8.2452113.

75. Erpenbeck, L.; Nieswandt, B.; Schön, M.; Pozgajova, M.; Schön, M.P. Inhibition of Platelet GPIIb<sub>3</sub> and Promotion of Melanoma Metastasis. *Journal of Investigative Dermatology* **2010**, *130*, 576–586, doi:10.1038/jid.2009.278.
76. Echtler, K.; Konrad, I.; Lorenz, M.; Schneider, S.; Hofmaier, S.; Plenagl, F.; Stark, K.; Czermak, T.; Tirniceriu, A.; Eichhorn, M.; et al. Platelet GPIIb Supports Initial Pulmonary Retention but Inhibits Subsequent Proliferation of Melanoma Cells during Hematogenic Metastasis. *PLOS ONE* **2017**, *12*, e0172788, doi:10.1371/journal.pone.0172788.
77. Mammadova-Bach, E.; Gil-Pulido, J.; Sarukhanyan, E.; Burkard, P.; Shityakov, S.; Schonhart, C.; Stegner, D.; Remer, K.; Nurden, P.; Nurden, A.T.; et al. Platelet Glycoprotein VI Promotes Metastasis through Interaction with Cancer Cell-Derived Galectin-3. *Blood* **2020**, *135*, 1146–1160, doi:10.1182/blood.2019002649.
78. Perrella, G.; Nagy, M.; Watson, S.P.; Heemskerk, J.W.M. Platelet GPVI (Glycoprotein VI) and Thrombotic Complications in the Venous System. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **2021**, *41*, 2681–2692, doi:10.1161/ATVBAHA.121.316108.
79. Chapman, L.M.; Aggrey, A.A.; Field, D.J.; Srivastava, K.; Ture, S.; Yui, K.; Topham, D.J.; Baldwin, W.M.; Morrell, C.N. Platelets Present Antigen in the Context of MHC Class I. *J Immunol* **2012**, *189*, 916–923, doi:10.4049/jimmunol.1200580.
80. Placke, T.; Kopp, H.-G.; Salih, H.R. Modulation of Natural Killer Cell Anti-Tumor Reactivity by Platelets. *JIN* **2011**, *3*, 374–382, doi:10.1159/000323936.
81. Rothwell, P.M.; Wilson, M.; Price, J.F.; Belch, J.F.; Meade, T.W.; Mehta, Z. Effect of Daily Aspirin on Risk of Cancer Metastasis: A Study of Incident Cancers during Randomised Controlled Trials. *The Lancet* **2012**, *379*, 1591–1601, doi:10.1016/S0140-6736(12)60209-8.
82. Schlesinger, M. Role of Platelets and Platelet Receptors in Cancer Metastasis. *Journal of Hematology & Oncology* **2018**, *11*, 125, doi:10.1186/s13045-018-0669-2.
83. Braun, A.; Anders, H.-J.; Gudermann, T.; Mammadova-Bach, E. Platelet-Cancer Interplay: Molecular Mechanisms and New Therapeutic Avenues. *Frontiers in Oncology* **2021**, *11*.
84. van den Berg, Y.W.; Osanto, S.; Reitsma, P.H.; Versteeg, H.H. The Relationship between Tissue Factor and Cancer Progression: Insights from Bench and Bedside. *Blood* **2012**, *119*, 924–932, doi:10.1182/blood-2011-06-317685.
85. Ruf, W.; Yokota, N.; Schaffner, F. Tissue Factor in Cancer Progression and Angiogenesis. *Thromb Res* **2010**, *125 Suppl 2*, S36–38, doi:10.1016/S0049-3848(10)70010-4.
86. Versteeg, H.H.; Schaffner, F.; Kerver, M.; Petersen, H.H.; Ahamed, J.; Felding-Habermann, B.; Takada, Y.; Mueller, B.M.; Ruf, W. Inhibition of Tissue Factor Signaling Suppresses Tumor Growth. *Blood* **2008**, *111*, 190–199, doi:10.1182/blood-2007-07-101048.
87. Lwaleed, B.A.; Chisholm, M.; Francis, J.L. Urinary Tissue Factor Levels in Patients with Breast and Colorectal Cancer. *J Pathol* **1999**, *187*, 291–294, doi:10.1002/(SICI)1096-9896(199902)187:3<291::AID-PATH213>3.0.CO;2-8.
88. Egan, K.; Crowley, D.; Smyth, P.; O’Toole, S.; Spillane, C.; Martin, C.; Gallagher, M.; Canney, A.; Norris, L.; Conlon, N.; et al. Platelet Adhesion and Degranulation Induce Pro-Survival and pro-Angiogenic Signalling in Ovarian Cancer Cells. *PLoS One* **2011**, *6*, e26125, doi:10.1371/journal.pone.0026125.
89. Kakkar, A.K.; Chinswangwatanakul, V.; Lemoine, N.R.; Tebbutt, S.; Williamson, R.C.N. Role of Tissue Factor Expression on Tumour Cell Invasion and Growth of Experimental Pancreatic Adenocarcinoma. *British Journal of Surgery* **1999**, *86*, 890–894, doi:10.1046/j.1365-2168.1999.01153.x.
90. Mechanisms of Thrombospondin-1-Mediated Metastasis and Angiogenesis. *Semin Thromb Hemost* **2004**, *30*, 127–136, doi:10.1055/s-2004-822977.

91. Luo, G.-P.; Ni, B.; Yang, X.; Wu, Y.-Z. Von Willebrand Factor: More Than a Regulator of Hemostasis and Thrombosis. *AHA* **2012**, *128*, 158–169, doi:10.1159/000339426.
92. Gawaz, M.; Geisler, T. Update orale Plättchenhemmer: Positionspapier der deutschen Gesellschaft für Kardiologie. *Kardiologe* **2012**, *6*, 195–209, doi:10.1007/s12181-012-0419-6.
93. Geisler, T.; Gawaz, M.; Steinhubl, S.R.; Bhatt, D.L.; Storey, R.F.; Flather, M. Current Strategies in Antiplatelet Therapy — Does Identification of Risk and Adjustment of Therapy Contribute to More Effective, Personalized Medicine in Cardiovascular Disease? *Pharmacology & Therapeutics* **2010**, *127*, 95–107, doi:10.1016/j.pharmthera.2010.04.017.
94. 7 Medikamentöse Therapie (2019) Available online: <https://www.leitlinien.de/themen/khk/5-auflage/kapitel-7> (accessed on 23 February 2022).
95. Murphy, S.A.; Antman, E.M.; Wiviott, S.D.; Weerakkody, G.; Morocutti, G.; Huber, K.; Lopez-Sendon, J.; McCabe, C.H.; Braunwald, E. Reduction in Recurrent Cardiovascular Events with Prasugrel Compared with Clopidogrel in Patients with Acute Coronary Syndromes from the TRITON-TIMI 38 Trial. *Eur Heart J* **2008**, *29*, 2473–2479, doi:10.1093/eurheartj/ehn362.
96. Husted, S.; Van Giezen, J. j. j. Ticagrelor: The First Reversibly Binding Oral P2Y12 Receptor Antagonist. *Cardiovascular Therapeutics* **2009**, *27*, 259–274, doi:10.1111/j.1755-5922.2009.00096.x.
97. Gachet, C. REGULATION OF PLATELET FUNCTIONS BY P2 RECEPTORS. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2006**, *46*, 277–300, doi:10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141207.
98. Gremmel, T.; Yanachkov, I.B.; Yanachkova, M.I.; Wright, G.E.; Wider, J.; Undyala, V.V.R.; Michelson, A.D.; Frelinger, A.L.; Przyklenk, K. Synergistic Inhibition of Both P2Y1 and P2Y12 Adenosine Diphosphate Receptors As Novel Approach to Rapidly Attenuate Platelet-Mediated Thrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **2016**, *36*, 501–509, doi:10.1161/ATVBAHA.115.306885.
99. Samara, E.E. Seratrodast (AA-2414)—A Novel Thromboxane-A2 Receptor Antagonist. *Cardiovascular Drug Reviews* **1996**, *14*, 272–285, doi:10.1111/j.1527-3466.1996.tb00231.x.
100. Dewan, B.; Navale, S.; Shah, D. Efficacy of Seratrodast, a Thromboxane A2 Receptor Inhibitor in a Double Blind Comparative Clinical Trial with Monteluklast. *Journal of Advances in Medicine and Medical Research* **2016**, 1–13, doi:10.9734/BJMMR/2016/22917.
101. Pitchford, S.; Cleary, S.; Arkless, K.; Amison, R. Pharmacological Strategies for Targeting Platelet Activation in Asthma. *Current Opinion in Pharmacology* **2019**, *46*, 55–64, doi:10.1016/j.coph.2019.03.012.
102. Samara, E.; Cao, G.; Locke, C.; Granneman, G.R.; Dean, R.; Killian, A. Population Analysis of the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Seratrodast in Patients with Mild to Moderate Asthma. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **1997**, *62*, 426–435, doi:10.1016/S0009-9236(97)90121-1.
103. Hartmann, K.; Baier, T.G.; Loibl, R.; Schmitt, A.; Schönberg, D. Demonstration of Type I Insulin-Like Growth Factor Receptors on Human Platelets. *Journal of Receptor Research* **1989**, *9*, 181–198, doi:10.3109/10799898909066053.
104. Cohick, W.S.; Clemmons, D.R. The Insulin-like Growth Factors. *Annu Rev Physiol* **1993**, *55*, 131–153, doi:10.1146/annurev.ph.55.030193.001023.
105. Bauer, M.K.; Harding, J.E.; Bassett, N.S.; Breier, B.H.; Oliver, M.H.; Gallaher, B.H.; Evans, P.C.; Woodall, S.M.; Gluckman, P.D. Fetal Growth and Placental Function. *Molecular and Cellular Endocrinology* **1998**, *140*, 115–120, doi:10.1016/S0303-7207(98)00039-2.

106. Wasielak, M.; Bogacki, M. Apoptosis Inhibition by Insulin-like Growth Factor (IGF)-I during in Vitro Maturation of Bovine Oocytes. *J Reprod Dev* **2007**, *53*, 419–426, doi:10.1262/jrd.18076.
107. Hakuno, F.; Takahashi, S.-I. IGF1 Receptor Signaling Pathways. *J Mol Endocrinol* **2018**, *61*, T69–T86, doi:10.1530/JME-17-0311.
108. Moxham, C.; Duronio, V.; Jacobs, S. Insulin-like Growth Factor I Receptor  $\beta$ -Subunit Heterogeneity. Evidence for Hybrid Tetramers Composed of Insulin-like Growth Factor I and Insulin Receptor Heterodimers. *The Journal of biological chemistry* **1989**, *264*, 13238–13244.
109. Sepp-Lorenzino, L. Structure and Function of the Insulin-like Growth Factor I Receptor. *Breast Cancer Res Treat* **1998**, *47*, 235–253, doi:10.1023/a:1005955017615.
110. Germain-Lee, E.L.; Janicot, M.; Lammers, R.; Ullrich, A.; Casella, S.J. Expression of a Type I Insulin-like Growth Factor Receptor with Low Affinity for Insulin-like Growth Factor II. *Biochem J* **1992**, *281* ( Pt 2), 413–417, doi:10.1042/bj2810413.
111. Nolan, C.M. Igf2r Locus. In *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)*; Maloy, S., Hughes, K., Eds.; Academic Press: San Diego, 2013; pp. 15–17 ISBN 978-0-08-096156-9.
112. Le Roith, D.; Adamo, M.L. Insulin-like Growth Factors. In *Encyclopedia of Endocrine Diseases*; Martini, L., Ed.; Elsevier: New York, 2004; pp. 32–35 ISBN 978-0-12-475570-3.
113. Zhu, Y.; Doray, B.; Poussu, A.; Lehto, V.P.; Kornfeld, S. Binding of GGA2 to the Lysosomal Enzyme Sorting Motif of the Mannose 6-Phosphate Receptor. *Science* **2001**, *292*, 1716–1718, doi:10.1126/science.1060896.
114. Russo, V.C.; Azar, W.J.; Yau, S.W.; Sabin, M.A.; Werther, G.A. IGFBP-2: The Dark Horse in Metabolism and Cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **2015**, *26*, 329–346, doi:10.1016/j.cytogfr.2014.12.001.
115. Rinderknecht, E.; Humbel, R.E. The Amino Acid Sequence of Human Insulin-like Growth Factor I and Its Structural Homology with Proinsulin. *Journal of Biological Chemistry* **1978**, *253*, 2769–2776, doi:10.1016/S0021-9258(17)40889-1.
116. Baserga, R.; Peruzzi, F.; Reiss, K. The IGF-1 Receptor in Cancer Biology. *Int J Cancer* **2003**, *107*, 873–877, doi:10.1002/ijc.11487.
117. Hermanto, U.; Zong, C.S.; Li, W.; Wang, L.-H. RACK1, an Insulin-Like Growth Factor I (IGF-I) Receptor-Interacting Protein, Modulates IGF-I-Dependent Integrin Signaling and Promotes Cell Spreading and Contact with Extracellular Matrix. *Molecular and Cellular Biology* **2002**, doi:10.1128/MCB.22.7.2345-2365.2002.
118. Kiely, P.A.; O’Gorman, D.; Luong, K.; Ron, D.; O’Connor, R. Insulin-Like Growth Factor I Controls a Mutually Exclusive Association of RACK1 with Protein Phosphatase 2A and B1 Integrin To Promote Cell Migration. *Molecular and Cellular Biology* **2006**, doi:10.1128/MCB.01868-05.
119. Mira, E.; Mañes, S.; Lacalle, R.A.; Márquez, G.; Martínez-A, C. Insulin-like Growth Factor I-Triggered Cell Migration and Invasion Are Mediated by Matrix Metalloproteinase-9. *Endocrinology* **1999**, *140*, 1657–1664, doi:10.1210/endo.140.4.6623.
120. Baxter, R.C. Insulin-like Growth Factor (IGF)-Binding Proteins: Interactions with IGFs and Intrinsic Bioactivities. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **2000**, *278*, E967–E976, doi:10.1152/ajpendo.2000.278.6.E967.
121. Baxter, R.C.; Binoux, M.A.; Clemmons, D.R.; Conover, C.A.; Drop, S.L.; Holly, J.M.; Mohan, S.; Oh, Y.; Rosenfeld, R.G. Recommendations for Nomenclature of the Insulin-like Growth Factor Binding Protein Superfamily. *J Clin Endocrinol Metab* **1998**, *83*, 3213, doi:10.1210/jcem.83.9.5083.

122. Juul, A.; Holm, K.; Kastrup, K.W.; Pedersen, S.A.; Michaelsen, K.F.; Scheike, T.; Rasmussen, S.; Müller, J.; Skakkebaek, N.E. Free Insulin-Like Growth Factor I Serum Levels in 1430 Healthy Children and Adults, and Its Diagnostic Value in Patients Suspected of Growth Hormone Deficiency<sup>1</sup>. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **1997**, *82*, 2497–2502, doi:10.1210/jcem.82.8.4137.
123. Firth, S.M.; Baxter, R.C. Cellular Actions of the Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins. *Endocrine Reviews* **2002**, *23*, 824–854, doi:10.1210/er.2001-0033.
124. Varma, S.; Bhardwaj, A.; Pathak, K.; Shrivastav, A. Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3 (IGFBP-3): Unraveling the Role in Mediating IGF-Independent Effects Within the Cell. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **2020**, *8*, 286, doi:10.3389/fcell.2020.00286.
125. Azar, W.J.; Azar, S.H.X.; Higgins, S.; Hu, J.-F.; Hoffman, A.R.; Newgreen, D.F.; Werther, G.A.; Russo, V.C. IGFBP-2 Enhances VEGF Gene Promoter Activity and Consequent Promotion of Angiogenesis by Neuroblastoma Cells. *Endocrinology* **2011**, *152*, 3332–3342, doi:10.1210/en.2011-1121.
126. Elmlinger, M.W.; Deininger, M.H.; Schuett, B.S.; Meyermann, R.; Duffner, F.; Grote, E.H.; Ranke, M.B. In Vivo Expression of Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-2 in Human Gliomas Increases with the Tumor Grade. **2001**, *142*, 7.
127. Zumkeller, W.; Westphal, M. The IGF/IGFBP System in CNS Malignancy. *Mol Pathol* **2001**, *54*, 227–229, doi:10.1136/mp.54.4.227.
128. Cohen, P.; Peehl, D.M.; Stamey, T.A.; Wilson, K.F.; Clemmons, D.R.; Rosenfeld, R.G. Elevated Levels of Insulin-like Growth Factor-Binding Protein-2 in the Serum of Prostate Cancer Patients. *J Clin Endocrinol Metab* **1993**, *76*, 1031–1035, doi:10.1210/jcem.76.4.7682560.
129. Russo, V.C.; Schütt, B.S.; Andaloro, E.; Ymer, S.I.; Hoeflich, A.; Ranke, M.B.; Bach, L.A.; Werther, G.A. Insulin-like Growth Factor Binding Protein-2 Binding to Extracellular Matrix Plays a Critical Role in Neuroblastoma Cell Proliferation, Migration, and Invasion. *Endocrinology* **2005**, *146*, 4445–4455, doi:10.1210/en.2005-0467.
130. Arai, T.; Busby, W.; Clemmons, D.R. Binding of Insulin-like Growth Factor (IGF) I or II to IGF-Binding Protein-2 Enables It to Bind to Heparin and Extracellular Matrix. *Endocrinology* **1996**, *137*, 4571–4575, doi:10.1210/endo.137.11.8895319.
131. Azar, W.J.; Zivkovic, S.; Werther, G.A.; Russo, V.C. IGFBP-2 Nuclear Translocation Is Mediated by a Functional NLS Sequence and Is Essential for Its pro-Tumorigenic Actions in Cancer Cells. *Oncogene* **2014**, *33*, 578–588, doi:10.1038/onc.2012.630.
132. Wang, H.; Wang, H.; Shen, W.; Huang, H.; Hu, L.; Ramdas, L.; Zhou, Y.-H.; Liao, W.S.-L.; Fuller, G.N.; Zhang, W. Insulin-like Growth Factor Binding Protein 2 Enhances Glioblastoma Invasion by Activating Invasion-Enhancing Genes. *Cancer Res* **2003**, *63*, 4315–4321.
133. Liu, Y.; Li, F.; Yang, Y.T.; Xu, X.D.; Chen, J.S.; Chen, T.L.; Chen, H.J.; Zhu, Y.B.; Lin, J.Y.; Li, Y.; et al. IGFBP2 Promotes Vasculogenic Mimicry Formation via Regulating CD144 and MMP2 Expression in Glioma. *Oncogene* **2019**, *38*, 1815–1831, doi:10.1038/s41388-018-0525-4.
134. Gartner, T.K.; Williams, D.C.; Minion, F.C.; Phillips, D.R. Thrombin-Induced Platelet Aggregation Is Mediated by a Platelet Plasma Membrane-Bound Lectin. *Science* **1978**, *200*, 1281–1283, doi:10.1126/science.663608.
135. Hsu-Lin, S.; Berman, C.L.; Furie, B.C.; August, D.; Furie, B. A Platelet Membrane Protein Expressed during Platelet Activation and Secretion. Studies Using a Monoclonal Antibody Specific for Thrombin-Activated Platelets. *J Biol Chem* **1984**, *259*, 9121–9126.
136. Berman, C.L.; Yeo, E.L.; Wencel-Drake, J.D.; Furie, B.C.; Ginsberg, M.H.; Furie, B. A Platelet Alpha Granule Membrane Protein That Is Associated with the Plasma Membrane

- after Activation. Characterization and Subcellular Localization of Platelet Activation-Dependent Granule-External Membrane Protein. *J Clin Invest* **1986**, 78, 130–137, doi:10.1172/JCI112542.
137. Frenette, P.S.; Denis, C.V.; Weiss, L.; Jurk, K.; Subbarao, S.; Kehrel, B.; Hartwig, J.H.; Vestweber, D.; Wagner, D.D. P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 (PSGL-1) Is Expressed on Platelets and Can Mediate Platelet-Endothelial Interactions in Vivo. *J Exp Med* **2000**, 191, 1413–1422, doi:10.1084/jem.191.8.1413.
138. Merten, M.; Thiagarajan, P. P-Selectin Expression on Platelets Determines Size and Stability of Platelet Aggregates. *Circulation* **2000**, 102, 1931–1936, doi:10.1161/01.CIR.102.16.1931.
139. Geng, J.G.; Heavner, G.A.; McEver, R.P. Lectin Domain Peptides from Selectins Interact with Both Cell Surface Ligands and Ca<sup>2+</sup> Ions. *Journal of Biological Chemistry* **1992**, 267, 19846–19853, doi:10.1016/S0021-9258(19)88632-5.
140. Frenette, P.S.; Johnson, R.C.; Hynes, R.O.; Wagner, D.D. Platelets Roll on Stimulated Endothelium in Vivo: An Interaction Mediated by Endothelial P-Selectin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1995**, 92, 7450–7454.
141. Mehta, P. Potential Role of Platelets in the Pathogenesis of Tumor Metastasis. *Blood* **1984**, 63, 55–63, doi:10.1182/blood.V63.1.55.55.
142. Alon, R.; Hammer, D.A.; Springert, T.A. Lifetime of the P-Selectin- Carbohydrate Bond and Its Response to Tensile Force in Hydrodynamic Flow. **1995**, 374, 4.
143. Moog, K.E. Synthese von polymergebundenen Sialyl-Lewis x-Strukturen und deren Mimetika als Zelladhäsionsinhibitoren für E-, L- und P-Selektin, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 2013.
144. Kansas, G.S. Selectins and Their Ligands: Current Concepts and Controversies. *Blood* **1996**, 88, 3259–3287, doi:10.1182/blood.V88.9.3259.bloodjournal8893259.
145. Varki, A. Selectin Ligands: Will the Real Ones Please Stand Up? Available online: <https://www.jci.org/articles/view/119142/pdf> (accessed on 1 February 2022).
146. Romo, G.M.; Dong, J.-F.; Schade, A.J.; Gardiner, E.E.; Kansas, G.S.; Li, C.Q.; McIntire, L.V.; Berndt, M.C.; López, J.A. The Glycoprotein Ib-IX-V Complex Is a Platelet Counterreceptor for P-Selectin. *Journal of Experimental Medicine* **1999**, 190, 803–814, doi:10.1084/jem.190.6.803.
147. Erpenbeck, L.; Schön, M.P. Deadly Allies: The Fatal Interplay between Platelets and Metastasizing Cancer Cells. *Blood* **2010**, 115, 3427–3436, doi:10.1182/blood-2009-10-247296.
148. McEver, R.P.; Cummings, R.D. Perspectives Series: Cell Adhesion in Vascular Biology. Role of PSGL-1 Binding to Selectins in Leukocyte Recruitment. *J. Clin. Invest.* **1997**, 100, 485–491, doi:10.1172/JCI119556.
149. Tousi, F. The Pursuit of Cancer Biomarkers: Liquid Chromatography and Mass Spectrometry Platforms for Glycomic Characterization of Biospecimens, 2013.
150. Li, F.; Wilkins, P.P.; Crawley, S.; Weinstein, J.; Cummings, R.D.; McEver, R.P. Post-Translational Modifications of Recombinant P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 Required for Binding to P- and E-Selectin. *Journal of Biological Chemistry* **1996**, 271, 3255–3264, doi:10.1074/jbc.271.6.3255.
151. Nakayama, T.; Watanabe, M.; Katsumata, T.; Teramoto, T.; Kitajima, M. Expression of Sialyl Lewis x as a New Prognostic Factor for Patients with Advanced Colorectal Carcinoma. *Cancer* **1995**, 75, 2051–2056, doi:10.1002/1097-0142(19950415)75:8<2051::AID-CNCR2820750804>3.0.CO;2-4.
152. Kim, Y.J.; Borsig, L.; Han, H.-L.; Varki, N.M.; Varki, A. Distinct Selectin Ligands on Colon Carcinoma Mucins Can Mediate Pathological Interactions among Platelets,

- Leukocytes, and Endothelium. *The American Journal of Pathology* **1999**, *155*, 461–472, doi:10.1016/S0002-9440(10)65142-5.
153. Ludwig, R.J.; Boehme, B.; Podda, M.; Henschler, R.; Jager, E.; Tandi, C.; Boehncke, W.-H.; Zollner, T.M.; Kaufmann, R.; Gille, J. Endothelial P-Selectin as a Target of Heparin Action in Experimental Melanoma Lung Metastasis. *Cancer Res* **2004**, *64*, 2743–2750, doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-1054.
154. Nelson, R.; Cecconi, O.; Roberts, W.; Aruffo, A.; Linhardt, R.; Bevilacqua, M. Heparin Oligosaccharides Bind L- and P-Selectin and Inhibit Acute Inflammation. *Blood* **1993**, *82*, 3253–3258, doi:10.1182/blood.V82.11.3253.3253.
155. Myers, D.D.; Rectenwald, J.E.; Bedard, P.W.; Kaila, N.; Shaw, G.D.; Schaub, R.G.; Farris, D.M.; Hawley, A.E.; Wroblewski, S.K.; Henke, P.K.; et al. Decreased Venous Thrombosis with an Oral Inhibitor of P Selectin. *Journal of Vascular Surgery* **2005**, *42*, 329–336, doi:10.1016/j.jvs.2005.04.045.
156. Feng, Q.; Wang, M.; Muhtar, E.; Wang, Y.; Zhu, H. Nanoparticles of a New Small-Molecule P-Selectin Inhibitor Attenuate Thrombosis, Inflammation, and Tumor Growth in Two Animal Models. *Int J Nanomedicine* **2021**, *16*, 5777–5795, doi:10.2147/IJN.S316863.
157. Topol, E.J.; Byzova, T.V.; Plow, E.F. Platelet GPIIb-IIIa Blockers. *Lancet* **1999**, *353*, 227–231, doi:10.1016/S0140-6736(98)11086-3.
158. Bennett, J.S. AIIb $\beta$ 3 (GPIIb/IIIa) Structure and Function. In *Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders*; Gresele, P., Kleiman, N.S., Lopez, J.A., Page, C.P., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2017; pp. 99–112 ISBN 978-3-319-47460-1.
159. Cook, S.; Walker, A.; Hügli, O.; Togni, M.; Meier, B. Percutaneous Coronary Interventions in Europe. *Clin Res Cardiol* **2007**, *96*, 375, doi:10.1007/s00392-007-0513-0.
160. Mahtta, D.; Bavry, A.A. 52 - AIIb $\beta$ 3 (GPIIb-IIIa) Antagonists. In *Platelets (Fourth Edition)*; Michelson, A.D., Ed.; Academic Press, 2019; pp. 957–971 ISBN 978-0-12-813456-6.
161. Romagnoli, E.; Burzotta, F.; Trani, C.; Biondi-Zoccai, G.G.L.; Giannico, F.; Crea, F. Rationale for Intracoronary Administration of Abciximab. *J Thromb Thrombolysis* **2007**, *23*, 57–63, doi:10.1007/s11239-006-9000-0.
162. Cohen, S.A.; Trikha, M.; Mascelli, M.A. Potential Future Clinical Applications for the GPIIb/IIIa Antagonist, Abciximab in Thrombosis, Vascular and Oncological Indications. *Pathol. Oncol. Res.* **2000**, *6*, 163–174, doi:10.1007/BF03032368.
163. Paul-Ehrlich-Institut - Homepage - Informationsschreiben: Freiwillige VertriebsEinstellung von ReoPro (Abciximab) in Deutschland Zum 15.12.2018 Available online: <https://www.pei.de/SharedDocs/Downloads/DE/newsroom/veroeffentlichungen-arzneimittel/anhaenge-am-sik-infos/2018-12-13-schreiben-reopro.html> (accessed on 18 February 2022).
164. EMA Integrilin Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/integrilin> (accessed on 19 February 2022).
165. Moroi, M.; Jung, S.M.; Okuma, M.; Shinmyozu, K. A Patient with Platelets Deficient in Glycoprotein VI That Lack Both Collagen-Induced Aggregation and Adhesion. *J Clin Invest* **1989**, *84*, 1440–1445, doi:10.1172/JCII14318.
166. Ben Mkaddem, S.; Benhamou, M.; Monteiro, R.C. Understanding Fc Receptor Involvement in Inflammatory Diseases: From Mechanisms to New Therapeutic Tools. *Frontiers in Immunology* **2019**, *10*.
167. Dütting, S.; Bender, M.; Nieswandt, B. Platelet GPVI: A Target for Antithrombotic Therapy?! *Trends in Pharmacological Sciences* **2012**, *33*, 583–590, doi:10.1016/j.tips.2012.07.004.

168. Loyau, S.; Dumont, B.; Ollivier, V.; Boulaftali, Y.; Feldman, L.; Ajzenberg, N.; Jandrot-Perrus, M. Platelet Glycoprotein VI Dimerization, an Active Process Inducing Receptor Competence, Is an Indicator of Platelet Reactivity. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **2012**, *32*, 778–785, doi:10.1161/ATVBAHA.111.241067.
169. Jung, S.M.; Moroi, M.; Soejima, K.; Nakagaki, T.; Miura, Y.; Berndt, M.C.; Gardiner, E.E.; Howes, J.-M.; Pugh, N.; Bihan, D.; et al. Constitutive Dimerization of Glycoprotein VI (GPVI) in Resting Platelets Is Essential for Binding to Collagen and Activation in Flowing Blood \*. *Journal of Biological Chemistry* **2012**, *287*, 30000–30013, doi:10.1074/jbc.M112.359125.
170. Poulter, N.S.; Pollitt, A.Y.; Owen, D.M.; Gardiner, E.E.; Andrews, R.K.; Shimizu, H.; Ishikawa, D.; Bihan, D.; Farndale, R.W.; Moroi, M.; et al. Clustering of Glycoprotein VI (GPVI) Dimers upon Adhesion to Collagen as a Mechanism to Regulate GPVI Signaling in Platelets. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2017**, *15*, 549–564, doi:10.1111/jth.13613.
171. Tabeling, C.; Herbert, J.; Hocke, A.C.; Doehn, J.M.; Hippenstiel, S.; Kübler, W.M.; Suttorp, N.; Witzernath, M. Der Milztyrosinkinase-Inhibitor BAY 61 – 3606 ist ein effektiver Bronchodilatator in der isolierten Mauslunge. *Pneumologie* **2015**, *69*, V461, doi:10.1055/s-0035-1544603.
172. Connell, N.T.; Berliner, N. Fostamatinib for the Treatment of Chronic Immune Thrombocytopenia. *Blood* **2019**, *133*, 2027–2030, doi:10.1182/blood-2018-11-852491.
173. Jooss, N.J.; De Simone, I.; Provenzale, I.; Fernández, D.I.; Brouns, S.L.N.; Farndale, R.W.; Henskens, Y.M.C.; Kuijpers, M.J.E.; ten Cate, H.; van der Meijden, P.E.J.; et al. Role of Platelet Glycoprotein VI and Tyrosine Kinase Syk in Thrombus Formation on Collagen-Like Surfaces. *Int J Mol Sci* **2019**, *20*, 2788, doi:10.3390/ijms20112788.
174. Rayes, J.; Watson, S.P.; Nieswandt, B. Functional Significance of the Platelet Immune Receptors GPVI and CLEC-2. *J Clin Invest* **2019**, *129*, 12–23, doi:10.1172/JCI122955.
175. Watson, S.P.; Auger, J.M.; McCARTY, O.J.T.; Pearce, A.C. GPVI and Integrin AIIb $\beta$ 3 Signaling in Platelets. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2005**, *3*, 1752–1762, doi:10.1111/j.1538-7836.2005.01429.x.
176. Zheng, T.J.; Lofurno, E.R.; Melrose, A.R.; Lakshmanan, H.H.S.; Pang, J.; Phillips, K.G.; Fallon, M.E.; Kohs, T.C.L.; Ngo, A.T.P.; Shatzel, J.J.; et al. Assessment of the Effects of Syk and BTK Inhibitors on GPVI-Mediated Platelet Signaling and Function. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **2021**, *320*, C902–C915, doi:10.1152/ajpcell.00296.2020.
177. Hughes, C.E.; Auger, J.M.; McGLADE, J.; Eble, J.A.; Pearce, A.C.; Watson, S.P. Differential Roles for the Adapters Gads and LAT in Platelet Activation by GPVI and CLEC-2. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2008**, *6*, 2152–2159, doi:10.1111/j.1538-7836.2008.03166.x.
178. Manne, B.K.; Badolia, R.; Dangelmaier, C.; Eble, J.A.; Ellmeier, W.; Kahn, M.; Kunapuli, S.P. Distinct Pathways Regulate Syk Protein Activation Downstream of Immune Tyrosine Activation Motif (ITAM) and HemITAM Receptors in Platelets \*. *Journal of Biological Chemistry* **2015**, *290*, 11557–11568, doi:10.1074/jbc.M114.629527.
179. de Vicente, J.C.; Rodrigo, J.P.; Rodriguez-Santamarta, T.; Lequerica-Fernández, P.; Allonca, E.; García-Pedrero, J.M. Podoplanin Expression in Oral Leukoplakia: Tumorigenic Role. *Oral Oncol* **2013**, *49*, 598–603, doi:10.1016/j.oraloncology.2013.02.008.
180. Hwang, B.-O.; Park, S.-Y.; Cho, E.S.; Zhang, X.; Lee, S.K.; Ahn, H.-J.; Chun, K.-S.; Chung, W.-Y.; Song, N.-Y. Platelet CLEC2-Podoplanin Axis as a Promising Target for Oral Cancer Treatment. *Front Immunol* **2021**, *12*, 807600, doi:10.3389/fimmu.2021.807600.

- 
181. Kawaguchi, H.; El-Naggar, A.K.; Papadimitrakopoulou, V.; Ren, H.; Fan, Y.-H.; Feng, L.; Lee, J.J.; Kim, E.; Hong, W.K.; Lippman, S.M.; et al. Podoplanin: A Novel Marker for Oral Cancer Risk in Patients with Oral Premalignancy. *J Clin Oncol* **2008**, *26*, 354–360, doi:10.1200/JCO.2007.13.4072.
182. Berthet, J.; Damien, P.; Hamzeh-Cognasse, H.; Arthaud, C.-A.; Eyraud, M.-A.; Zéni, F.; Pozzetto, B.; McNicol, A.; Garraud, O.; Cognasse, F. Human Platelets Can Discriminate between Various Bacterial LPS Isoforms via TLR4 Signaling and Differential Cytokine Secretion. *Clinical Immunology* **2012**, *145*, 189–200, doi:10.1016/j.clim.2012.09.004.
183. Andonegui, G.; Kerfoot, S.M.; McNagny, K.; Ebbert, K.V.J.; Patel, K.D.; Kubes, P. Platelets Express Functional Toll-like Receptor-4. *Blood* **2005**, *106*, 2417–2423, doi:10.1182/blood-2005-03-0916.
184. Park, D.Y.; Khorana, A.A. Risks and Benefits of Anticoagulation in Cancer and Noncancer Patients. *Semin Thromb Hemost* **2019**, *45*, 629–637, doi:10.1055/s-0039-1693474.
185. Mulder, F.I.; Candeloro, M.; Kamphuisen, P.W.; Di Nisio, M.; Bossuyt, P.M.; Guman, N.; Smit, K.; Büller, H.R.; van Es, N. The Khorana Score for Prediction of Venous Thromboembolism in Cancer Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Haematologica* **2019**, *104*, 1277–1287, doi:10.3324/haematol.2018.209114.
186. Konstantinides, S.V.; Meyer, G.; Becattini, C.; Bueno, H.; Geersing, G.-J.; Harjola, V.-P.; Huisman, M.V.; Humbert, M.; Jennings, C.S.; Jiménez, D.; et al. 2019 ESC Guidelines for the Diagnosis and Management of Acute Pulmonary Embolism Developed in Collaboration with the European Respiratory Society (ERS). *European Heart Journal* **2020**, *41*, 543–603, doi:10.1093/eurheartj/ehz405.
187. Mosarla, R.C.; Vaduganathan, M.; Qamar, A.; Moslehi, J.; Piazza, G.; Giugliano, R.P. Anticoagulation Strategies in Patients With Cancer. *Journal of the American College of Cardiology* **2019**, *73*, 1336–1349, doi:10.1016/j.jacc.2019.01.017.
188. Ludwig, R.; Alban, S.; Boehncke, W.-H. Structural Requirements of Heparin and Related Molecules to Exert a Multitude of Anti-Inflammatory Activities. *MRMC* **2006**, *6*, 1009–1023, doi:10.2174/138955706778195180.
189. Sarrazin, S.; Lamanna, W.C.; Esko, J.D. Heparan Sulfate Proteoglycans. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2011**, *3*, a004952, doi:10.1101/cshperspect.a004952.
190. A, F.; M, M.; A, V.; D, B. Clotting Mechanisms and Cancer: Implications in Thrombus Formation and Tumor Progression. *Clinical advances in hematology & oncology : H&O* **2003**, *1*.
191. Tsopanoglou, N.E.; Maragoudakis, M.E. Role of Thrombin in Angiogenesis and Tumor Progression. *Semin Thromb Hemost* **2004**, *30*, 63–69, doi:10.1055/s-2004-822971.
192. Mousa, S.A.; Mohamed, S. Inhibition of Endothelial Cell Tube Formation by the Low Molecular Weight Heparin, Tinzaparin, Is Mediated by Tissue Factor Pathway Inhibitor. *Thromb Haemost* **2004**, *92*, 627–633, doi:10.1160/TH04-02-0069.
193. Li, L.; Zhang, F.; Zaia, J.; Linhardt, R.J. Top-Down Approach for the Direct Characterization of Low Molecular Weight Heparins Using LC-FT-MS. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 8822–8829, doi:10.1021/ac302232c.
194. Alban, S. Kohlenhydrate III: Aminoglykane und Glykosaminoglykane. In *Pharmakognosie — Phytopharmazie*; Hänsel, R., Sticher, O., Eds.; Springer-Lehrbuch; Springer: Berlin, Heidelberg, 2010; pp. 591–637 ISBN 978-3-642-00963-1.
195. Pai, M.; Crowther, M.A. Neutralization of Heparin Activity. In *Heparin - A Century of Progress*; Lever, R., Mulloy, B., Page, C.P., Eds.; Handbook of Experimental Pharmacology; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2012; Vol. 207, pp. 265–277 ISBN 978-3-642-23055-4.
196. Pöttsch, B.; Madlener, K. Management von Patienten mit heparininduzierter Thrombozytopenie. *Hamostaseologie* **2006**, *26*, 22–26, doi:10.1055/s-0037-1616872.
-

197. Favaloro, E.J.; McCaughan, G.; Pasalic, L. Clinical and Laboratory Diagnosis of Heparin Induced Thrombocytopenia: An Update. *Pathology* **2017**, *49*, 346–355, doi:10.1016/j.pathol.2017.02.005.
198. Schönfeld, H.; Hein, O. Pharmakotherapie - Antikoagulanzen - Argatroban - Alternative zu Heparin bei HIT II. *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* **2006**, *41*, 376–377, doi:10.1055/s-2006-947303.
199. Lewis, B.E.; Wallis, D.E.; Berkowitz, S.D.; Matthai, W.H.; Fareed, J.; Walenga, J.M.; Bartholomew, J.; Sham, R.; Lerner, R.G.; Zeigler, Z.R.; et al. Argatroban Anticoagulant Therapy in Patients With Heparin-Induced Thrombocytopenia. *Circulation* **2001**, *103*, 1838–1843, doi:10.1161/01.CIR.103.14.1838.
200. S3-Leitlinie Prophylaxe der venösen Thromboembolie (VTE), 2. komplett überarbeitete Auflage. 238.
201. Hursting, M.J.; Alford, K.L.; Becker, J.P.; Brooks, R.L.; Joffrion, J.L.; Knappenberger, G.D.; Kogan, P.W.; Kogan, T.P.; Mckinney, A.A.; Schwarz, R.P. Novastan® (Brand of Argatroban): A Small-Molecule, Direct Thrombin Inhibitor. *Semin Thromb Hemost* **1997**, *23*, 503–516, doi:10.1055/s-2007-996128.
202. Eriksson, B.I.; Borris, L.C.; Friedman, R.J.; Haas, S.; Huisman, M.V.; Kakkar, A.K.; Bandel, T.J.; Beckmann, H.; Muehlhofer, E.; Misselwitz, F.; et al. Rivaroxaban versus Enoxaparin for Thromboprophylaxis after Hip Arthroplasty. *N Engl J Med* **2008**, *358*, 2765–2775, doi:10.1056/NEJMoa0800374.
203. Kakkar, A.K.; Brenner, B.; Dahl, O.E.; Eriksson, B.I.; Mouret, P.; Muntz, J.; Sogliano, A.G.; Pap, A.F.; Misselwitz, F.; Haas, S.; et al. Extended Duration Rivaroxaban versus Short-Term Enoxaparin for the Prevention of Venous Thromboembolism after Total Hip Arthroplasty: A Double-Blind, Randomised Controlled Trial. *Lancet* **2008**, *372*, 31–39, doi:10.1016/S0140-6736(08)60880-6.
204. Lassen, M.R.; Ageno, W.; Borris, L.C.; Lieberman, J.R.; Rosencher, N.; Bandel, T.J.; Misselwitz, F.; Turpie, A.G.G.; RECORD3 Investigators Rivaroxaban versus Enoxaparin for Thromboprophylaxis after Total Knee Arthroplasty. *N Engl J Med* **2008**, *358*, 2776–2786, doi:10.1056/NEJMoa076016.
205. Turpie, A.G.; Lassen, M.R.; Davidson, B.L.; Bauer, K.A.; Gent, M.; Kwong, L.M.; Cushner, F.D.; Lotke, P.A.; Berkowitz, S.D.; Bandel, T.J.; et al. Rivaroxaban versus Enoxaparin for Thromboprophylaxis after Total Knee Arthroplasty (RECORD4): A Randomised Trial. *The Lancet* **2009**, *373*, 1673–1680, doi:10.1016/S0140-6736(09)60734-0.
206. Xian, Y.; Xu, H.; O'Brien, E.C.; Shah, S.; Thomas, L.; Pencina, M.J.; Fonarow, G.C.; Olson, D.M.; Schwamm, L.H.; Bhatt, D.L.; et al. Clinical Effectiveness of Direct Oral Anticoagulants vs Warfarin in Older Patients With Atrial Fibrillation and Ischemic Stroke: Findings From the Patient-Centered Research Into Outcomes Stroke Patients Prefer and Effectiveness Research (PROSPER) Study. *JAMA Neurology* **2019**, *76*, 1192–1202, doi:10.1001/jamaneurol.2019.2099.
207. Kluge, S.; Janssens, U.; Welte, T.; Weber-Carstens, S.; Schälte, G.; Spinner, C.D.; Malin, J.J.; Gastmeier, P.; Langer, F.; Wepler, M.; et al. S3-Leitlinie - Empfehlungen zur stationären Therapie von Patienten mit COVID-19. **2021**, 89.
208. Zhou, F.; Yu, T.; Du, R.; Fan, G.; Liu, Y.; Liu, Z.; Xiang, J.; Wang, Y.; Song, B.; Gu, X.; et al. Clinical Course and Risk Factors for Mortality of Adult Inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: A Retrospective Cohort Study. *The Lancet* **2020**, *395*, 1054–1062, doi:10.1016/S0140-6736(20)30566-3.
209. McGonagle, D.; O'Donnell, J.S.; Sharif, K.; Emery, P.; Bridgewood, C. Immune Mechanisms of Pulmonary Intravascular Coagulopathy in COVID-19 Pneumonia. *The Lancet Rheumatology* **2020**, *2*, e437–e445, doi:10.1016/S2665-9913(20)30121-1.

- 
210. Tang, N.; Bai, H.; Chen, X.; Gong, J.; Li, D.; Sun, Z. Anticoagulant Treatment Is Associated with Decreased Mortality in Severe Coronavirus Disease 2019 Patients with Coagulopathy. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2020**, *18*, 1094–1099, doi:10.1111/jth.14817.
211. Hottz, E.D.; Azevedo-Quintanilha, I.G.; Palhinha, L.; Teixeira, L.; Barreto, E.A.; Pão, C.R.R.; Righy, C.; Franco, S.; Souza, T.M.L.; Kurtz, P.; et al. Platelet Activation and Platelet-Monocyte Aggregate Formation Trigger Tissue Factor Expression in Patients with Severe COVID-19. *Blood* **2020**, *136*, 1330–1341, doi:10.1182/blood.2020007252.
212. Bedard, P.W.; Clerin, V.; Sushkova, N.; Tchernychev, B.; Antrilli, T.; Resmini, C.; Keith, J.C.; Hennan, J.K.; Kaila, N.; Debernardo, S.; et al. Characterization of the Novel P-Selectin Inhibitor PSI-697 [2-(4-Chlorobenzyl)-3-Hydroxy-7,8,9,10-Tetrahydrobenzo[h]Quinoline-4-Carboxylic Acid] in Vitro and in Rodent Models of Vascular Inflammation and Thrombosis. *J Pharmacol Exp Ther* **2008**, *324*, 497–506, doi:10.1124/jpet.107.128124.
213. Japp, A.G.; Chelliah, R.; Tattersall, L.; Lang, N.N.; Meng, X.; Weisel, K.; Katz, A.; Burt, D.; Fox, K.A.A.; Feuerstein, G.Z.; et al. Effect of PSI-697, a Novel P-Selectin Inhibitor, on Platelet–Monocyte Aggregate Formation in Humans. *Journal of the American Heart Association* **2020**, *9*, e006007, doi:10.1161/JAHA.112.006007.
214. Man, Y.; Goreke, U.; Kucukal, E.; Hill, A.; An, R.; Liu, S.; Bode, A.; Solis-Fuentes, A.; Nayak, L.V.; Little, J.A.; et al. Leukocyte Adhesion to P-Selectin and the Inhibitory Role of Crizanlizumab in Sickle Cell Disease: A Standardized Microfluidic Assessment. *Blood Cells Mol Dis* **2020**, *83*, 102424, doi:10.1016/j.bcmd.2020.102424.
215. Ataga, K.I.; Kutlar, A.; Kanter, J.; Liles, D.; Cancado, R.; Friedrisch, J.; Guthrie, T.H.; Knight-Madden, J.; Alvarez, O.A.; Gordeuk, V.R.; et al. Crizanlizumab for the Prevention of Pain Crises in Sickle Cell Disease. *New England Journal of Medicine* **2017**, *376*, 429–439, doi:10.1056/NEJMoa1611770.
216. Crizanlizumab bei Sichelzellerkrankheit Available online: <https://www.dgho.de/aktuelles/news/newsarchiv/2021/crizanlizumab-bei-sichelzellerkrankheit> (accessed on 15 February 2022).
217. Neri, T.; Nieri, D.; Celi, A. P-Selectin Blockade in COVID-19-Related ARDS. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **2020**, *318*, L1237–L1238, doi:10.1152/ajplung.00202.2020.
218. Sakamaki, F.; Ishizaka, A.; Handa, M.; Fujishima, S.; Urano, T.; Sayama, K.; Nakamura, H.; Kanazawa, M.; Kawashiro, T.; Katayama, M. Soluble Form of P-Selectin in Plasma Is Elevated in Acute Lung Injury. *Am J Respir Crit Care Med* **1995**, *151*, 1821–1826, doi:10.1164/ajrccm.151.6.7539327.
219. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **2000**, *100*, 57–70, doi:10.1016/S0092-8674(00)81683-9.
220. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of Cancer: The next Generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
221. Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery* **2022**, *12*, 31–46, doi:10.1158/2159-8290.CD-21-1059.
222. Xi, Y.; Xu, P. Global Colorectal Cancer Burden in 2020 and Projections to 2040. *Transl Oncol* **2021**, *14*, 101174, doi:10.1016/j.tranon.2021.101174.
223. Stein, U.; Schlag, P.M. Clinical, Biological, and Molecular Aspects of Metastasis in Colorectal Cancer. *Recent Results Cancer Res* **2007**, *176*, 61–80, doi:10.1007/978-3-540-46091-6\_7.
224. S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom. **2019**, 120.
225. Arlt, F.; Stein, U. Colon Cancer Metastasis: MACC1 and Met as Metastatic Pacemakers. *Int J Biochem Cell Biol* **2009**, *41*, 2356–2359, doi:10.1016/j.biocel.2009.08.001.
-

226. Isella, C.; Mellano, A.; Galimi, F.; Petti, C.; Capussotti, L.; De Simone, M.; Bertotti, A.; Medico, E.; Muratore, A. MACC1 mRNA Levels Predict Cancer Recurrence After Resection of Colorectal Cancer Liver Metastases. *Annals of Surgery* **2013**, *257*, 1089–1095, doi:10.1097/SLA.0b013e31828f96bc.
227. Stein, U. MACC1 - a Novel Target for Solid Cancers. *Expert Opin Ther Targets* **2013**, *17*, 1039–1052, doi:10.1517/14728222.2013.815727.
228. Dahlmann, M.; Werner, R.; Kortüm, B.; Kobelt, D.; Walther, W.; Stein, U. Restoring Treatment Response in Colorectal Cancer Cells by Targeting MACC1-Dependent ABCB1 Expression in Combination Therapy. *Frontiers in Oncology* **2020**, *10*.
229. Radhakrishnan, H.; Walther, W.; Zincke, F.; Kobelt, D.; Imbastari, F.; Erdem, M.; Kortüm, B.; Dahlmann, M.; Stein, U. MACC1—the First Decade of a Key Metastasis Molecule from Gene Discovery to Clinical Translation. *Cancer Metastasis Rev* **2018**, *37*, 805–820, doi:10.1007/s10555-018-9771-8.
230. Welch, D.R.; Hurst, D.R. Defining the Hallmarks of Metastasis. *Cancer Res* **2019**, *79*, 3011–3027, doi:10.1158/0008-5472.CAN-19-0458.
231. Arlt, F. Das neu identifizierte Gen MACC1 ist ein Regulator des HGF/Met-Signalweges und ist prognostisch für die Metastasierung des Kolonkarzinoms. **2009**, doi:10.18452/15974.
232. Radhakrishnan, H.; Ilm, K.; Walther, W.; Shirasawa, S.; Sasazuki, T.; Daniel, P.T.; Gillissen, B.; Stein, U. MACC1 Regulates Fas Mediated Apoptosis through STAT1/3 - Mcl-1 Signaling in Solid Cancers. *Cancer Lett* **2017**, *403*, 231–245, doi:10.1016/j.canlet.2017.06.020.
233. Bottaro, D.P.; Rubin, J.S.; Faletto, D.L.; Chan, A.M.; Kmieciak, T.E.; Vande Woude, G.F.; Aaronson, S.A. Identification of the Hepatocyte Growth Factor Receptor as the C-Met Proto-Oncogene Product. *Science* **1991**, *251*, 802–804, doi:10.1126/science.1846706.
234. Goetsch, L. Biological Significance and Targeting of C-Met Tyrosine Kinase Receptor in Cancer. *Front Biosci* **2013**, *18*, 454, doi:10.2741/4114.
235. Takeuchi, H.; Bilchik, A.; Saha, S.; Turner, R.; Wiese, D.; Tanaka, M.; Kuo, C.; Wang, H.-J.; Hoon, D.S.B. C-MET Expression Level in Primary Colon Cancer: A Predictor of Tumor Invasion and Lymph Node Metastases. *Clin Cancer Res* **2003**, *9*, 1480–1488.
236. Sierra, J.R.; Tsao, M.-S. C-MET as a Potential Therapeutic Target and Biomarker in Cancer. *Ther Adv Med Oncol* **2011**, *3*, S21–S35, doi:10.1177/1758834011422557.
237. Bradley, C.A.; Dunne, P.D.; Bingham, V.; McQuaid, S.; Khawaja, H.; Craig, S.; James, J.; Moore, W.L.; McArt, D.G.; Lawler, M.; et al. Transcriptional Upregulation of C-MET Is Associated with Invasion and Tumor Budding in Colorectal Cancer. *Oncotarget* **2016**, *7*, 78932–78945, doi:10.18632/oncotarget.12933.
238. Chmielowiec, J.; Borowiak, M.; Morkel, M.; Stradal, T.; Munz, B.; Werner, S.; Wehland, J.; Birchmeier, C.; Birchmeier, W. C-Met Is Essential for Wound Healing in the Skin. *J Cell Biol* **2007**, *177*, 151–162, doi:10.1083/jcb.200701086.
239. Chakraborty, S.; Balan, M.; Pal, S. Abstract 1039: C-Met Activation Promotes Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) in Renal Cancer Cells through the Upregulation of the Chemokine Receptor CXCR7. *Cancer Research* **2019**, *79*, 1039, doi:10.1158/1538-7445.AM2019-1039.
240. Renehan, A.G.; Jones, J.; Potten, C.S.; Shalet, S.M.; O'Dwyer, S.T. Elevated Serum Insulin-like Growth Factor (IGF)-II and IGF Binding Protein-2 in Patients with Colorectal Cancer. *Br J Cancer* **2000**, *83*, 1344–1350, doi:10.1054/bjoc.2000.1462.
241. MIA PaCa-2 ATCC ® CRL-1420™ Homo Sapiens Pancreas Carcinoma Available online: [https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1420.aspx?geo\\_country=de#](https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1420.aspx?geo_country=de#) (accessed on 16 April 2021).

- 
242. AsPC-1 ATCC ® CRL-1682™ Homo Sapiens Pancreas; Derived From Available online: [https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1682.aspx?geo\\_country=de#](https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1682.aspx?geo_country=de#) (accessed on 16 April 2021).
243. Deer, E.L.; González-Hernández, J.; Coursen, J.D.; Shea, J.E.; Ngatia, J.; Scaife, C.L.; Firpo, M.A.; Mulvihill, S.J. Phenotype and Genotype of Pancreatic Cancer Cell Lines. *Pancreas* **2010**, *39*, 425–435, doi:10.1097/MPA.0b013e3181c15963.
244. Bhargava, S.; Stummeyer, T.; Hotz, B.; Hines, O.J.; Reber, H.A.; Buhr, H.J.; Hotz, H.G. Selective Inhibition of Endothelin Receptor A as an Anti-Angiogenic and Anti-Proliferative Strategy for Human Pancreatic Cancer. *J Gastrointest Surg* **2005**, *9*, 703–709, doi:10.1016/j.gassur.2004.11.007.
245. Hotz, H.G.; Reber, H.A.; Hotz, B.; Yu, T.; Foitzik, T.; Buhr, H.J.; Cortina, G.; Hines, O.J. An Orthotopic Nude Mouse Model for Evaluating Pathophysiology and Therapy of Pancreatic Cancer. *Pancreas* **2003**, *26*, e89.
246. Capan-2 ATCC ® HTB-80™ Homo Sapiens Pancreas Adenocarcinoma Available online: [https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-80.aspx?geo\\_country=de](https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-80.aspx?geo_country=de) (accessed on 16 April 2021).
247. Deer, E.L.; Gonzalez-Hernandez, J.; Coursen, J.D.; Shea, J.E.; Ngatia, J.; Scaife, C.L.; Firpo, M.A.; Mulvihill, S.J. Phenotype and Genotype of Pancreatic Cancer Cell Lines. *Pancreas* **2010**, *39*, 425–435, doi:10.1097/MPA.0b013e3181c15963.
248. SW480 [SW-480] ATCC ® CCL-228™ Homo Sapiens Colon Dukes' Typ Available online: <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-228.aspx#characteristics> (accessed on 16 April 2021).
249. Tachibana, M.; Kinugasa, S.; Dhar, D.K.; Yoshimura, H.; Shibakita, M.; Ohno, S.; Ueda, S.; Kubota, H.; Kohno, H.; Nagasue, N. Dukes' Classification as a Useful Staging System in Resectable Squamous Cell Carcinoma of the Esophagus. *Virchows Arch* **2001**, *438*, 350–356, doi:10.1007/s004280000370.
250. SW620 [SW-620] ATCC ® CCL-227™ Homo Sapiens Colon; Derived f Available online: [https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-227.aspx?geo\\_country=de#characteristics](https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-227.aspx?geo_country=de#characteristics) (accessed on 16 April 2021).
251. Gstraunthaler, G.; Lindl, T. Zellbiologische Grundlagen der Zell- und Gewebekultur. In *Zell- und Gewebekultur: Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen*; Gstraunthaler, G., Lindl, T., Eds.; Springer: Berlin, Heidelberg, 2013; pp. 51–52 ISBN 978-3-642-35997-2.
252. Graham, M.D. The Coulter Principle: Imaginary Origins. *Cytometry A* **2013**, *83*, 1057–1061, doi:10.1002/cyto.a.22398.
253. Cell Counter & Analyzer CASY | OMNI Life Science Available online: <https://www.ols-bio.de/products/cell-counter-casy> (accessed on 21 April 2021).
254. Green, R.; Wachsmann-Hogiu, S. Development, History, and Future of Automated Cell Counters. *Clinics in Laboratory Medicine* **2015**, *35*, 1–10, doi:10.1016/j.cll.2014.11.003.
255. Berman, J.J. Mollicutes. In *Taxonomic Guide to Infectious Diseases*; Elsevier, 2012; pp. 61–63 ISBN 978-0-12-415895-5.
256. MycoSPY® Mykoplasmen PCR Detektionskit Available online: [https://www.biontex.com/media/manuals/Biontex\\_Manual\\_MycoSPY\\_de\\_0318.pdf](https://www.biontex.com/media/manuals/Biontex_Manual_MycoSPY_de_0318.pdf) (accessed on 26 May 2021).
257. Gstraunthaler, G.; Lindl, T. Allgemeine Aspekte der Primärkultur. In *Zell- und Gewebekultur: Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen*; Gstraunthaler, G., Lindl, T., Eds.; Springer: Berlin, Heidelberg, 2013; pp. 151–162 ISBN 978-3-642-35997-2.
258. Gstraunthaler, G.; Lindl, T. Einfrieren, Lagerung und Versand von Zellen. In *Zell- und Gewebekultur: Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen*; Gstraunthaler, G.,
-

- Lindl, T., Eds.; Springer: Berlin, Heidelberg, 2013; pp. 137–142 ISBN 978-3-642-35997-2.
259. Nebe, T. Hämatologische Labordiagnostik bei Thrombozyten. *LaboratoriumsMedizin* **2014**, *38*, 259–279, doi:10.1515/labmed-2014-0034.
260. Harrison, P.; Mackie, I.; Mumford, A.; Briggs, C.; Liesner, R.; Winter, M.; Machin, S.; British Committee for Standards in Haematology Guidelines for the Laboratory Investigation of Heritable Disorders of Platelet Function. *Br J Haematol* **2011**, *155*, 30–44, doi:10.1111/j.1365-2141.2011.08793.x.
261. Meyer, A. von; Cadamuro, J.; Streichert, T.; Gurr, E.; Fiedler, G.M.; Leichtle, A.; Petersmann, A.; Pick, K.-H.; Orth, M.; Risch, L.; et al. Standard-Arbeitsanleitung Zur Peripher Venösen Blutentnahme Für Die Labormedizinische Diagnostik. *LaboratoriumsMedizin* **2017**, *41*, 333–340, doi:10.1515/labmed-2017-0127.
262. Jurasz, P.; Alonso-Escolano, D.; Radomski, M.W. Platelet–Cancer Interactions: Mechanisms and Pharmacology of Tumour Cell-Induced Platelet Aggregation. *Br J Pharmacol* **2004**, *143*, 819–826, doi:10.1038/sj.bjp.0706013.
263. LABiTec® - Labor BioMedical Technologies GmbH - Datenblatt APACT 4004 Available online: [https://www.labitec.de/wp-content/uploads/2017/11/Datenblatt\\_APACT\\_4004\\_DE\\_11-2017.pdf](https://www.labitec.de/wp-content/uploads/2017/11/Datenblatt_APACT_4004_DE_11-2017.pdf) (accessed on 26 May 2021).
264. Born, G.V.R.; Cross, M.J. The Aggregation of Blood Platelets. *J Physiol* **1963**, *168*, 178–195.
265. Gould, S.J.; Subramani, S. Firefly Luciferase as a Tool in Molecular and Cell Biology. *Anal Biochem* **1988**, *175*, 5–13, doi:10.1016/0003-2697(88)90353-3.
266. ONE-Glo™ Luciferase Assay System Available online: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/one-glo-luciferase-assay-system-protocol.pdf> (accessed on 1 June 2021).
267. Braut-Boucher, F.; Pichon, J.; Rat, P.; Adolphe, M.; Aubery, M.; Font, J. A Non-Isotopic, Highly Sensitive, Fluorimetric, Cell-Cell Adhesion Microplate Assay Using Calcein AM-Labeled Lymphocytes. *Journal of Immunological Methods* **1995**, *178*, 41–51, doi:10.1016/0022-1759(94)00239-S.
268. Tenopoulou, M.; Kurz, T.; Doulias, P.-T.; Galaris, D.; Brunk, U.T. Does the Calcein-AM Method Assay the Total Cellular ‘Labile Iron Pool’ or Only a Fraction of It? *Biochem J* **2007**, *403*, 261–266, doi:10.1042/BJ20061840.
269. Lichtenfels, R.; Biddison, W.E.; Schulz, H.; Vogt, A.B.; Martin, R. CARE-LASS (Calcein-Release-Assay), an Improved Fluorescence-Based Test System to Measure Cytotoxic T Lymphocyte Activity. *Journal of Immunological Methods* **1994**, *172*, 227–239, doi:10.1016/0022-1759(94)90110-4.
270. Jaroszeski, M.J.; Radcliff, G. Fundamentals of Flow Cytometry. *Mol Biotechnol* **1999**, *11*, 37–53, doi:10.1007/BF02789175.
271. Gompf, A. *1. Grundlagen der Durchflusszytometrie*; De Gruyter, 2015; pp. 1–28; ISBN 978-3-11-034407-3.
272. Prydz, H. *Triggering of the extrinsic blood coagulation system*; De Gruyter, 2019; pp. 325–336; ISBN 978-3-11-087195-1.
273. Fender, A.C.; Rauch, B.H.; Geisler, T.; Schrör, K. Protease-Activated Receptor PAR-4: An Inducible Switch between Thrombosis and Vascular Inflammation? *Thromb Haemost* **2017**, *117*, 2013–2025, doi:10.1160/TH17-03-0219.
274. Stroo, I.; Ding, C.; Novak, A.; Yang, J.; Roelofs, J.J.T.H.; Meijers, J.C.M.; Revenko, A.S.; van 't Veer, C.; Zeerleder, S.; Crosby, J.R.; et al. Inhibition of the Extrinsic or Intrinsic Coagulation Pathway during Pneumonia-Derived Sepsis. *American Journal of Physiology-*

- Lung Cellular and Molecular Physiology* **2018**, *315*, L799–L809, doi:10.1152/ajplung.00014.2018.
275. Naudin, C.; Burillo, E.; Blankenberg, S.; Butler, L.; Renné, T. Factor XII Contact Activation. *Semin Thromb Hemost* **2017**, *43*, 814–826, doi:10.1055/s-0036-1598003.
276. Thrombin Generation for Ceveron® Alpha TGA | Technoclone.Com Available online: <https://www.technoclone.com/de/product/thrombin-generation-ceveronr-alpha-tga> (accessed on 11 June 2021).
277. Ngoka, L.C.M. Sample Prep for Proteomics of Breast Cancer: Proteomics and Gene Ontology Reveal Dramatic Differences in Protein Solubilization Preferences of Radioimmunoprecipitation Assay and Urea Lysis Buffers. *Proteome Sci* **2008**, *6*, 30, doi:10.1186/1477-5956-6-30.
278. Western Blot Sample Preparation | Abcam Available online: <https://www.abcam.com/protocols/sample-preparation-for-western-blot#preparation-of-lysate-from-cell-culture> (accessed on 21 June 2021).
279. Wiechelmann, K.J.; Braun, R.D.; Fitzpatrick, J.D. Investigation of the Bicinchoninic Acid Protein Assay: Identification of the Groups Responsible for Color Formation. *Analytical Biochemistry* **1988**, *175*, 231–237, doi:10.1016/0003-2697(88)90383-1.
280. Gallagher, S.R. One-Dimensional SDS Gel Electrophoresis of Proteins. *Current Protocols in Molecular Biology* **2006**, *75*, 10.2.1-10.2A.37, doi:10.1002/0471142727.mb1002as75.
281. Elektrophorese Leicht Gemacht - ISBN: 9783527695140 - (Ebook) - von Reiner Westermeier, Verlag: Wiley-VCH - Details - Wiley-VCH eBooks Available online: <https://wiley-vch.e-bookshelf.de/elektrophorese-leicht-gemacht-8129038.html> (accessed on 22 June 2021).
282. Bass, J.; Wilkinson, D.; Rankin, D.; Phillips, B.; Szewczyk, N.; Smith, K.; Atherton, P. An Overview of Technical Considerations for Western Blotting Applications to Physiological Research. *Scand J Med Sci Sports* **2017**, *27*, 4–25, doi:10.1111/sms.12702.
283. Heindl, D.; Josel, H.-P. Chemiluminescent Detection with Horseradish Peroxidase and Luminol. In *Nonradioactive Analysis of Biomolecules*; Kessler, C., Ed.; Springer Lab Manuals; Springer: Berlin, Heidelberg, 2000; pp. 258–261 ISBN 978-3-642-57206-7.
284. Liang, C.-C.; Park, A.Y.; Guan, J.-L. In Vitro Scratch Assay: A Convenient and Inexpensive Method for Analysis of Cell Migration in Vitro. *Nat Protoc* **2007**, *2*, 329–333, doi:10.1038/nprot.2007.30.
285. Jonkman, J.E.N.; Cathcart, J.A.; Xu, F.; Bartolini, M.E.; Amon, J.E.; Stevens, K.M.; Colarusso, P. An Introduction to the Wound Healing Assay Using Live-Cell Microscopy. *Cell Adh Migr* **2014**, *8*, 440–451, doi:10.4161/cam.36224.
286. Khodadoust, A.A.; Silverstein, A.M.; Kenyon, K.R.; Dowling, J.E. Adhesion of Regenerating Corneal Epithelium. *American Journal of Ophthalmology* **1968**, *65*, 339–348, doi:10.1016/0002-9394(68)93082-1.
287. Stamm, A.; Reimers, K.; Strauß, S.; Vogt, P.; Scheper, T.; Pepelanova, I. In Vitro Wound Healing Assays – State of the Art. *BioNanoMaterials* **2016**, *17*, 79–87, doi:10.1515/bnm-2016-0002.
288. Cory, G. Scratch-Wound Assay. In *Cell Migration*; Wells, C.M., Parsons, M., Eds.; Methods in Molecular Biology; Humana Press: Totowa, NJ, 2011; Vol. 769, pp. 25–30 ISBN 978-1-61779-206-9.
289. Martin, T.A.; Ye, L.; Sanders, A.J.; Lane, J.; Jiang, W.G. *Cancer Invasion and Metastasis: Molecular and Cellular Perspective*; Landes Bioscience, 2013;
290. Justus, C.R.; Leffler, N.; Ruiz-Echevarria, M.; Yang, L.V. In Vitro Cell Migration and Invasion Assays. *J Vis Exp* **2014**, 51046, doi:10.3791/51046.

- 
291. Boyden, S. The Chemotactic Effect of Mixtures of Antibody and Antigen on Polymorphonuclear Leucocytes. *J Exp Med* **1962**, *115*, 453–466, doi:10.1084/jem.115.3.453.
292. Marshall, J. Transwell® Invasion Assays. In *Cell Migration: Developmental Methods and Protocols*; Wells, C.M., Parsons, M., Eds.; Methods in Molecular Biology; Humana Press: Totowa, NJ, 2011; pp. 97–110 ISBN 978-1-61779-207-6.
293. Falasca, M.; Raimondi, C.; Maffucci, T. Boyden Chamber. *Methods Mol Biol* **2011**, *769*, 87–95, doi:10.1007/978-1-61779-207-6\_7.
294. Thermo Fisher - Nunc Cell Culture Inserts and Carrier Plates Available online: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/brochures/cell-culture-inserts-carrier-plates-brochure.pdf> (accessed on 6 July 2021).
295. Campello, E.; Ilich, A.; Simioni, P.; Key, N.S. The Relationship between Pancreatic Cancer and Hypercoagulability: A Comprehensive Review on Epidemiological and Biological Issues. *Br J Cancer* **2019**, *121*, 359–371, doi:10.1038/s41416-019-0510-x.
296. Qi, C.-L.; Wei, B.; Ye, J.; Yang, Y.; Li, B.; Zhang, Q.-Q.; Li, J.-C.; He, X.-D.; Lan, T.; Wang, L.-J. P-Selectin-Mediated Platelet Adhesion Promotes the Metastasis of Murine Melanoma Cells. *PLoS One* **2014**, *9*, e91320, doi:10.1371/journal.pone.0091320.
297. Kim, Y.J.; Borsig, L.; Varki, N.M.; Varki, A. P-Selectin Deficiency Attenuates Tumor Growth and Metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1998**, *95*, 9325–9330, doi:10.1073/pnas.95.16.9325.
298. Varki, A.; Varki, N.M. P-Selectin, Carcinoma Metastasis and Heparin: Novel Mechanistic Connections with Therapeutic Implications. *Braz J Med Biol Res* **2001**, *34*, 711–717, doi:10.1590/s0100-879x2001000600003.
299. Coupland, L.A.; Chong, B.H.; Parish, C.R. Platelets and P-Selectin Control Tumor Cell Metastasis in an Organ-Specific Manner and Independently of NK Cells. *Cancer Res* **2012**, *72*, 4662–4671, doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-4010.
300. Borsig, L. Antimetastatic Activities of Modified Heparins: Selectin Inhibition by Heparin Attenuates Metastasis. *Semin Thromb Hemost* **2007**, *33*, 540–546, doi:10.1055/s-2007-982086.
301. Gockel, L.; Ponert, J.; 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*, 2753, doi:10.3390/molecules23112753.
302. Simonis, D.; Christ, K.; Alban, S.; Bendas, G. Affinity and Kinetics of Different Heparins Binding to P- and L-Selectin. *Semin Thromb Hemost* **2007**, *33*, 534–539, doi:10.1055/s-2007-982085.
303. Varki, N.M.; Varki, A. Heparin Inhibition of Selectin-Mediated Interactions during the Hematogenous Phase of Carcinoma Metastasis: Rationale for Clinical Studies in Humans. *Semin Thromb Hemost* **2002**, *28*, 53–66, doi:10.1055/s-2002-20564.
304. Gao, Y.; Li, N.; Fei, R.; Chen, Z.; Zheng, S.; Zeng, X. P-Selectin-Mediated Acute Inflammation Can Be Blocked by Chemically Modified Heparin, RO-Heparin. *Mol Cells* **2005**, *19*, 350–355.
305. Casu, B.; Vlodaysky, I.; Sanderson, R.D. Non-Anticoagulant Heparins and Inhibition of Cancer. *Pathophysiol Haemost Thromb* **2008**, *36*, 195–203, doi:10.1159/000175157.
306. Schmid, F.; Wang, Q.; Huska, M.R.; Andrade-Navarro, M.A.; Lemm, M.; Fichtner, I.; Dahlmann, M.; Kobelt, D.; Walther, W.; Smith, J.; et al. SPON2, a Newly Identified Target Gene of MACC1, Drives Colorectal Cancer Metastasis in Mice and Is Prognostic for Colorectal Cancer Patient Survival. *Oncogene* **2016**, *35*, 5942–5952, doi:10.1038/onc.2015.451.
-

- 
307. Kim, S.; Garcia, A.; Jackson, S.P.; Kunapuli, S.P. Insulin-like Growth Factor-1 Regulates Platelet Activation through PI3-K $\alpha$  Isoform. *Blood* **2007**, *110*, 4206–4213, doi:10.1182/blood-2007-03-080804.
  308. Hunter, R. w.; Hers, I. Insulin/IGF-1 Hybrid Receptor Expression on Human Platelets: Consequences for the Effect of Insulin on Platelet Function. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **2009**, *7*, 2123–2130, doi:10.1111/j.1538-7836.2009.03637.x.
  309. Li, T.; Forbes, M.E.; Fuller, G.N.; Li, J.; Yang, X.; Zhang, W. IGFBP2: Integrative Hub of Developmental and Oncogenic Signaling Network. *Oncogene* **2020**, *39*, 2243–2257, doi:10.1038/s41388-020-1154-2.
  310. Zhu, H.; Zhang, Y.; Geng, Y.; Lu, W.; Yin, J.; Li, Z.; Huang, L.; Liu, H.; Xu, N. IGFBP2 Promotes the EMT of Colorectal Cancer Cells by Regulating E-Cadherin Expression. *Int J Clin Exp Pathol* **2019**, *12*, 2559–2565.
  311. Perks, C.M.; Vernon, E.G.; Rosendahl, A.H.; Tonge, D.; Holly, J.M.P. IGF-II and IGFBP-2 Differentially Regulate PTEN in Human Breast Cancer Cells. *Oncogene* **2007**, *26*, 5966–5972, doi:10.1038/sj.onc.1210397.
  312. Mehrian-Shai, R.; Chen, C.D.; Shi, T.; Horvath, S.; Nelson, S.F.; Reichardt, J.K.V.; Sawyers, C.L. Insulin Growth Factor-Binding Protein 2 Is a Candidate Biomarker for PTEN Status and PI3K/Akt Pathway Activation in Glioblastoma and Prostate Cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2007**, *104*, 5563–5568, doi:10.1073/pnas.0609139104.
  313. Gao, S.; Sun, Y.; Zhang, X.; Hu, L.; Liu, Y.; Chua, C.Y.; Phillips, L.M.; Ren, H.; Fleming, J.B.; Wang, H.; et al. IGFBP2 Activates the NF-KB Pathway to Drive Epithelial–Mesenchymal Transition and Invasive Character in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Research* **2016**, *76*, 6543–6554, doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-0438.
  314. Hung, C.-S.; Huang, C.-Y.; Lee, C.-H.; Chen, W.-Y.; Huang, M.-T.; Wei, P.-L.; Chang, Y.-J. IGFBP2 Plays an Important Role in Heat Shock Protein 27-Mediated Cancer Progression and Metastasis. *Oncotarget* **2017**, *8*, 54978–54992, doi:10.18632/oncotarget.18989.
  315. Ben-Shmuel, A.; Shvab, A.; Gavert, N.; Brabletz, T.; Ben-Ze'ev, A. Global Analysis of L1-Transcriptomes Identified IGFBP-2 as a Target of Ezrin and NF-KB Signaling That Promotes Colon Cancer Progression. *Oncogene* **2013**, *32*, 3220–3230, doi:10.1038/onc.2012.340.
  316. Cheriyaundath, S.; Ben-Ze'ev, A. Wnt/ $\beta$ -Catenin Target Genes in Colon Cancer Metastasis: The Special Case of LICAM. *Cancers* **2020**, *12*, 3444, doi:10.3390/cancers12113444.

## 8. Anhang

### 8.1 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Verbreitung des Primärtumors nach partieller EMT einzelner Tumorzellen mit Durchbruch der BM, Migration durch die EZM und Einleitung der Invasion in den Blutkreislauf. Die Migration kann dabei sowohl als Kollektiv in einem Cluster oder aber auch von einer einzelnen Zelle ausgehen [21,22]
- Abbildung 2:** Übersichtsdarstellung der metastatischen Kaskade mit den Schritten der Migration, Invasion, Intravasation, Extravasation, Kolonisation
- Abbildung 3:** Darstellung eines Thrombozyten in Interaktion mit einer Endothelgefäßverletzung von der Adhäsion bis zur Aktivierung der Hämostase
- Abbildung 4:** Schematische Darstellung der Gerinnungskaskade bestehend aus dem intrinsischen und extrinsischen System und die Auflösung der Thromben in der Fibrinolyse, eingeleitet durch Plasminogen [40]
- Abbildung 5:** Exemplarische Darstellung der molekularen Interaktionsmechanismen zwischen Tumorzellen (unten) und Thrombozyten (oben) [82,83]
- Abbildung 6:** Schematische Darstellung des *Insulin-like Growth Factor* Systems mit *Insulin-like Growth Factor-I* (IGF-I), *Insulin-like Growth Factor-II* (IGF-II), Typ-I IGF-Rezeptor (IGF-RI), Typ-II IGF-Rezeptor (IGF-RII), *Insulin-like Growth Factor Binding Proteins* (IGFBPs), Mannose-6-Phosphat (M6P), *Acid Labile Subunit* (ALS), Insulinrezeptor (Insulin-R) [114]
- Abbildung 7:** Struktureller Aufbau der verschiedenen Selektine (CD62) aus der calciumabhängigen *C-type lectin family*; COOH = Carboxylgruppe; Cyto = zytoplasmatische Domäne zur Signaltransduktion, TM = Transmembrandomäne zur Fixierung; SCR = *short consensus repeats*; EGF = *Epidermal-Growth-Factor-like* Domäne; CRD = *Carbohydrate Recognition Domain* bzw. Lektindomäne zur Erkennung des Liganden [143]
- Abbildung 8:** Chemische Struktur des Hexapeptids Eptifibatid zur parenteralen Verabreichung und des *small molecule* Tirofiban als oraler GPIIb/IIIa Inhibitor
- Abbildung 9:** Grundbaugerüst der indirekten Antikoagulantien und somit die Struktur von Fondaparinux
- Abbildung 10:** Argatroban als direkter Thrombininhibitor (links) und Rivaroxaban als direkter FXa-Inhibitor (rechts)

- Abbildung 11:** Erweiterte Darstellung des Einflusses vom MACC1-Protein auf die Charakteristika von Krebs durch Beteiligung und Aktivierung verschiedener Signalmechanismen [229]
- Abbildung 12:** Isolierung von PRP nach Zentrifugation und Auftrennung von Vollblut in seine Bestandteile
- Abbildung 13:** Kalibrierung der Transmission (0%-Wert) und Messung des Transmissionsverlaufs nach Induktorzugabe (**A**) und Darstellung des Kurvenverlaufs mit Shape Change (1), primärer (2) und irreversibler (3) Aggregation (**B**)
- Abbildung 14:** Chemische Umsetzung von D-Luciferin mithilfe des Enzyms Luciferase in Oxyluciferin und Freisetzung eines zum ATP proportionalen Biolumineszenzsignals [266]
- Abbildung 15:** Aufbau eines Durchflusszytometers zur Ermittlung der Zellgröße, Zellgranularität und Expression von Oberflächenproteine
- Abbildung 16:** Die Strukturformel der modifizierten TGA Substrat® Lösung mit dem für das Fluoreszenzsignal verantwortliche 7-Amino-4-Methyl-cumarin (AMC)
- Abbildung 17:** Farbreaktion von einwertigem Kupfer mit BCA zu einem violetten Komplex
- Abbildung 18:** Aufbau der Elektrophorese Apparatur und Durchführung der Gelelektrophorese mit einem diskontinuierlichen Polyacrylamidgel
- Abbildung 19:** Detektion des IGFBP2 mittels primären und HRP-konjugierten sekundären Antikörper und die durch Luminol als Substrat ausgelöste Chemolumineszenz
- Abbildung 20:** Schematischer Aufbau eines *sandwich*-ELISA und Darstellung der enzymatischen Farbreaktion mit TMB
- Abbildung 21:** Darstellung der Durchführung des Wundheilungs-Assay
- Abbildung 22:** Aufbau eines Zwei-Kammernsystems zur gerichteten Zellmigration
- Abbildung 23:** Einfluss des TP $\alpha$ -R Inhibitors Seratrodast auf die Aggregation nach Aktivierung der Thrombozyten mit einem PAR Aktivator (TRAP-6) (**A**) und einem TP $\alpha$ -R Aktivator (U46619) (**B**) mit der dazugehörige ATP-Freisetzung (**C**); n=5; statistische Signifikanz: \*\*\*  $p < 0.001$
- Abbildung 24:** Aktivierung der Thrombozyten mit einem PAR Aktivator (TRAP-6) und der Einfluss des P-Selektin Inhibitors Bimosiamose auf die Aggregation (**A**) und der Einfluss des GPIIbIIIa Inhibitors Eptifibatid auf die Aggregation (**B**) mit der dazugehörige ATP-Freisetzung (**C**); n=5, statistische Signifikanz: *ns*  $p \geq 0,05$ , \*\*\*  $p < 0.001$

- Abbildung 25:** Einfluss des GPVI Inhibitors Losartan auf die Thrombozytenaggregation nach Aktivierung mit dem Agonisten für PAR (TRAP-6) (**A**) und dem Agonisten für GPVI (Kollagen Typ I) (**B**) und die jeweils zugehörige Granulafreisetzung (**C**); n=5, statistische Signifikanz: *ns*  $p \geq 0,05$ ,  $** p < 0,01$
- Abbildung 26:** Einfluss des P2Y<sub>12</sub> Antagonisten Ticagrelor (**A**), des P2Y<sub>1</sub> Antagonisten PSB-181604 (**B**) und des P2X<sub>1</sub> Antagonisten BPTU (**C**) nach Aktivierung der Thrombozytenaggregation mit ADP als P2Y<sub>12</sub> Agonisten; n=5
- Abbildung 27:** Einfluss von IGF-I als Kostimulator für die Thrombozytenaggregation nach Aktivierung der Thrombozyten mit TRAP-6 in einer Konzentration von 10 µM (**A**) und die konzentrationsabhängige Blockierung der 42,5 µM TRAP-6 induzierten Thrombozytenaggregation (**B**) und Granulasekretion (**C**) durch die Zugabe des rekombinanten IGFBP2; n=5, statistische Signifikanz:  $**** p < 0.0001$
- Abbildung 28:** Repräsentative Kurven zeigen die Thrombozytenaggregation als Reaktion auf ansteigende Konzentrationen der PCC AsPC-1 (**A**), MIA PaCa-2 (**B**) und Capan-2 (**C**) oder zum Vergleich mit TRAP-6 für einen Zeitintervall von 20 bzw. 50 min; n=5
- Abbildung 29:** Repräsentative Darstellung der Quantifizierung der freigesetzten ATP-Konzentration aus Thrombozyten nach Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen der PCC AsPC-1 (**A**), MIA PaCa-2 (**B**) und Capan-2 (**C**) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und der zusätzlichen Vermessung von TRAP-6 als Positivkontrolle und PBS als Nullwert; n=3
- Abbildung 30:** Inhibierung der AsPC-1 zellvermittelten Thrombozytenaggregation. Repräsentative Darstellung der Aggregationskurven von unbehandelten Thrombozyten mit  $1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$  (schwarze Kurve) oder präinkubierten Thrombozyten (rote Kurve) mit Eptifibatid (**A**), Losartan (**B**) oder Bimosiamose (**C**); n=5
- Abbildung 31:** Inhibierung der AsPC-1 zellvermittelten Thrombozytenaggregation. Repräsentative Darstellung der Aggregationskurven von unbehandelten Thrombozyten mit  $1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$  (schwarze Kurve) oder präinkubierten Thrombozyten (rote Kurve) mit Seratrodist (**A**), Argatroban (**B**) oder Rivaroxaban (**C**); n=5
- Abbildung 32:** Inhibierung der AsPC-1 zellvermittelten Thrombozytenaggregation. Repräsentative Darstellung der Aggregationskurven von unbehandelten

Thrombozyten mit  $1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$  (schwarze Kurve) oder präinkubierten Thrombozyten (rote Kurve) mit Ticagrelor (**A**), PSB18164 (**B**) oder BPTU (**C**);  $n=5$

**Abbildung 33:** Inhibierung der AsPC-1 zellvermittelten Thrombozytenaggregation. Repräsentative Darstellung der Aggregationskurven von unbehandelten Thrombozyten mit  $1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$  (schwarze Kurve) oder präinkubierten Thrombozyten (rote Kurve) mit SYK Inhibitor IV (**A**) oder Resatorvid (**B**);  $n=5$

**Abbildung 34:** Inhibierung der AsPC-1 zellvermittelten Thrombozytenaggregation. Darstellung der Auswirkungen der verschiedenen o.g. Hemmstoffe auf die Thrombozytenaggregation als Verhältnis der Zeit bis zur halbmaximalen Aggregation der behandelten gegenüber den unbehandelten Thrombozyten

**Abbildung 35:** Inhibierung der AsPC-1 zellinduzierte Thrombozyten-Granulafreisetzung. Quantifizierung der ATP-Freisetzung von unbehandelten, mit  $1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$  AsPC-1 Zellen inkubierten oder mit TRAP-6 aktivierten Thrombozyten nach 20 min Eine Präinkubation der Thrombozyten mit dem Inhibitor für GPIIb/IIIa, GPVI, P-Selektin, TP $\alpha$ -R, Thrombin, Faktor Xa, P2Y<sub>12</sub>, P2X<sub>1</sub>, P2Y<sub>1</sub>, SYK und TLR4 erfolgte 30 min vor Zugabe der AsPC-1 Zellen;  $n=5$ , statistische Signifikanz: \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$

**Abbildung 36:** Quantifizierung der TF Expression auf den AsPC-1 (**A**), MIA PaCa-2 (**B**) und Capan-2 (**C**). Repräsentative Darstellung aus fünf identischen Experimenten,  $n=5$

**Abbildung 37:** Quantifizierung der Thrombingenerierung durch die AsPC-1, MIA PaCa-2 und Capan-2 in PRP ohne Recalcifizierung (**A**) und Quantifizierung der P-Selektin Liganden auf den AsPC-1, Capan-2 und MIA PaCa-2 PCC durch den P-Selektin-Adhäsions-Assay durch Einsatz von immobilisierten, rekombinanten humanem P-Selektin (**B**). Abbildung **A** stellt eine repräsentative Darstellung aus fünf identischen Experimenten dar und Daten der statischen Adhäsion in Abbildung **B** bestehen aus dem Mittelwerte von  $n=5$  ( $\pm$ SD); statistische Signifikanz: \*  $p < 0.05$

**Abbildung 38:** Einfluss einer kombinatorischen Inhibierung der Thrombozytenaggregation. Repräsentative Aggregationskurven nach Thrombozytenaktivierung mit  $1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$  AsPC-1 Zellen (**A**) oder Capan-2 (**B**) mit unbehandelten Thrombozyten (schwarz), präinkubiert mit lediglich Bimosiamose als P-

Selektin-Inhibitor, mit lediglich Argatroban als Thrombininhibitor oder einer Kombination beider Testsubstanzen (rot), n=5

- Abbildung 39:** Einfluss einer kombinatorischen Inhibierung der Thrombozytenaggregation. Repräsentative Aggregationskurven nach Thrombozytenaktivierung mit  $1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$  AsPC-1 Zellen (A) oder Capan-2 (B) mit unbehandelten Thrombozyten (schwarz), präinkubiert mit UFH oder Tinzaparin oder RO-Heparin, n=5
- Abbildung 40:** Abhängigkeit der Thrombozytenaktivierung durch SW620 CRC von der MACC1 Expression. Darstellung der mit je  $1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$  verwendeten SW620 MACC1 positiven Kontrollzellen (MACC1 Ctrl) und SW620 MACC1 *knockout* Zellen (MACC1 KO) als repräsentative Aggregationskurven von Thrombozyten (A), als ATP-Quantifizierung nach Granulafreisetzung durch Thrombozyten (B) und der Thrombozytenadhäsion wie im Thrombozyten-Adhäsions-Assay beschrieben (C), n=5; statistische Signifikanz: \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$
- Abbildung 41:** Beeinträchtigung der Thrombozytenaktivierung durch Präinkubation des PRP mit dem Zellüberstand von SW620 CRC in Abhängigkeit von der MACC1 Expression. Darstellung der Zugabe von TRAP-6 [ $8,5 \mu\text{M}$ ] zu unbehandelten Thrombozyten, zu den mit dem Überstand (supernatant) von SW620 MACC1 positiven Kontrollzellen (s. MACC1 Ctrl) und SW620 MACC1 *knockout* Zellen (s. MACC1 KO) behandelten Thrombozyten als repräsentative Aggregationskurve (A) und als ATP-Quantifizierung nach Thrombozyten-Granulafreisetzung (B), n=5; statistische Signifikanz: \*\*\*  $p < 0.001$
- Abbildung 42:** Darstellung der rel. IGFBP2 mRNA Menge bei MACC1 Ctrl vs. MACC1 KO Zellen mittels qPCR (A), des Gesamtproteinlevels an IGFBP2 in den SW620 CRC und dem jeweiligem Überstand mittels *Sandwich*-ELISA (B) und der rel. IGF-I Proteinmenge im thrombozytenfreiem Plasma, Thrombozytenüberstand und dem Überstand der CRC-Varianten mittels *Sandwich*-ELISA (C); n=5, statistische Signifikanz: \*\*\*  $p < 0.001$
- Abbildung 44:** Erfassung des IGFBP2 Proteins bei SW620 CRC in Abhängigkeit des IGFBP2 Gens. Darstellung der mit je  $1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$  verwendeten SW620 IGFBP2 positiven Kontrollzellen (IGFBP2 Ctrl) und SW620 IGFBP2 *knockdown* Zellen (MACC1 KD) als Quantifizierung der rel. IGFBP2 Proteinmenge mittels Western Blot (A) und Quantifizierung der IGFBP2 Gesamtproteinmenge bei

den IGFBP2-Varianten und des dazugehörigen Überstandes mittels ELISA (**B**); n=3, statistische Signifikanz: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$

**Abbildung 45:** Thrombozytenaktivierung durch SW620 CRC in Abhängigkeit von der IGFBP2 Expression. Darstellung der mit je  $1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$  verwendeten SW620 IGFBP2 positiven Kontrollzellen (IGFBP2 Ctrl) und SW620 IGFBP2 *knockdown* Zellen (IGFBP2 KD) als repräsentative Aggregationskurven von Thrombozyten (**A**) und als ATP-Quantifizierung nach Granulafreisetzung durch Thrombozyten (**B**); n=5, statistische Signifikanz: \*\*\*  $p < 0.001$

**Abbildung 46:** Einfluss von MACC1 und IGFBP2 auf die Zelldynamik. Detektion der Zellmigration und der Einfluss von Thrombozyten auf die Migration im Wundheilungs-Assay unter Verwendung von MACC1-Varianten (**A**) und IGFBP2-Varianten (**B**). Untersuchung des Einflusses von MACC1 oder IGFBP2 auf die Transmigration im Invasions-Assay (**C**); n=3; statistische Signifikanz: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0.01$

**Abbildung 47:** Untersuchung der koagulativen Eigenschaften von MACC1- und IGFBP2-Varianten. Einfluss auf die Thrombinbildung von MACC1 Ctrl im Vergleich zu MACC1 KO (**A**) und von IGFBP2 Ctrl im Vergleich zu IGFBP2 KD (**B**) im Thrombingenerierungs-Assay. Vergleich der TF Expression auf der Zelloberfläche von SW620 MACC1 Ctrl und MACC1 KO mittels Durchflusszytometrie (**C**); n=3, statistische Signifikanz: ns  $p \geq 0,05$

**Abbildung 48:** IGFBP2 als metastatischer Faktor bei der *in vivo* Untersuchung; Metastasenbildung durch den *IGFBP2 KD* im Vergleich zu den *IGFBP2 Ctrl* nach Xenotransplantation der SW620 Tumorzellen dargestellt durch die Quantifizierung der menschlichen Satelliten-DNA in der Mäuseleber (**A**) und der immunhistochemischen Färbung von KRT19 (**B**)

## 8.2 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Thrombozyten-sezernierte Mediatoren und deren Einfluss auf die Tumoraktivität ..	8
<b>Tabelle 2:</b> Chemikalien und Ausgangsstoffe.....	31
<b>Tabelle 3:</b> Puffer und Lösungen .....	33
<b>Tabelle 4:</b> Inhibitoren, Testsubstanzen und Proteine.....	35
<b>Tabelle 5:</b> Antikörper .....	35
<b>Tabelle 6:</b> Verbrauchsmaterialien.....	37
<b>Tabelle 7:</b> Geräte .....	39
<b>Tabelle 8:</b> Software.....	40
<b>Tabelle 9:</b> Zusammensetzung des für jede Zelllinie spezialisierten Kulturmediums.....	42
<b>Tabelle 10:</b> Pipettierschema für den Thrombingenerierungs-Assay.....	51
<b>Tabelle 11:</b> Zur genspezifischen <i>real time</i> PCR (rtPCR)verwendeten Primer.....	52

### 8.3 Publikationen

R. Haschemi, L.M. Gockel, G. Bendas, M. Schlesinger

*A Combined Activity of Thrombin and P-Selectin Is Essential for Platelet Activation by Pancreatic Cancer Cells*

Int. J. Mol. Sci. 22 (2021) 3323. <https://doi.org/10.3390/ijms22073323>

R. Haschemi, D. Kobelt, E. Steinwarz, M. Schlesinger, U. Stein, G. Bendas

*Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-2 (IGFBP2) Is a Key Molecule in the MACC1-Mediated Platelet Communication and Metastasis of Colorectal Cancer Cells*

Int. J. Mol. Sci. 22 (2021) 12195. <https://doi.org/10.3390/ijms222212195>

L. Schäker-Hübner, R. Haschemi, T. Büch, F.B. Kraft, B. Brumme, A. Schöler, R. Jenke, J. Meiler, A. Aigner, G. Bendas, F.K. Hansen

*Balancing Histone Deacetylase (HDAC) Inhibition and Drug-likeness: Biological and Physicochemical Evaluation of Class I Selective HDAC Inhibitors*

ChemMedChem. 17 (2022) e202100755. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202100755>

C. Steinebach, Y.L.D. Ng, I. Sosič, C.-S. Lee, S. Chen, S. Lindner, L.P. Vu, A. Bricelj, R. Haschemi, M. Monschke, E. Steinwarz, K.G. Wagner, G. Bendas, J. Luo, M. Gütschow, J. Krönke

*Systematic exploration of different E3 ubiquitin ligases: an approach towards potent and selective CDK6 degraders*

Chem. Sci. 11 (2020) 3474–3486. <https://doi.org/10.1039/D0SC00167H>

J.M. Ponert, S. Schwarz, R. Haschemi, J. Müller, B. Pöttsch, G. Bendas, M. Schlesinger

*The mechanisms how heparin affects the tumor cell induced VEGF and chemokine release from platelets to attenuate the early metastatic niche formation*

PLOS ONE. 13 (2018) e0191303. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191303>

## 8.4 Danksagung

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. Gerd Bendas meinen tief empfundenen Dank ausdrücken. Mein Dankeschön gilt nicht nur der professionellen und motivierenden Unterstützung, sondern auch den spannenden Unterhaltungen und einem kollegialen sowie freundschaftlichen Beisammensein.

Ebenso danke ich Dr. Martin Schlesinger herzlichst für die Einführung in eine spannende Welt voller Thrombozyten und den wohlbedachten und hilfreichen Ratschlägen in schwierigen Phasen. Darüber hinaus bedanke ich mich für die lehrreiche gemeinsame Betreuung des 4. Semsters mit Dr. Martin Schlesinger und allen beteiligten Assistenten.

Prof. Karl Wagner und Prof. Hans Häberlein danke ich dafür, dass sie sich bereit erklärt haben als Mitglieder der Prüfungskommission zu fungieren. Prof. Dr. Finn Hansen danke ich für die kurze, jedoch erfreuliche Zusammenarbeit miteinander. Mein Dank git auch Prof. Ulrike Stein und dem gesamten Arbeitskreis im MDC in Berlin, welcher mich herzlichst in den Laboren aufgenommen hat. Auch bedanke ich mich bei Dr. Dennis Kobelt für die Unterstützung während der einjährigen Kooperation mit dem MDC in Berlin. Der Bonn International Graduate School of Drug Sciences (BIGS DrugS) danke ich für das einjährige Stipendium zur Finanzierung dieser Arbeit.

Dem gesamten Arbeitskreis Bendas danke ich für eine unvergessliche Zeit und den wertvollen Erinnerungen. Ein besonderes Dankeschön gilt meinem stetigen Büropartner Max Schuh für die vielen unterhaltsamen Stunden. Zudem bedanke ich mich bei meiner Masterstudentin Elisabeth Steinwarz für die fleißige Zusammenarbeit. Bei Eva Hanfland bedanke ich mich für die stete und zuverlässige Versorgung mit Thrombozytenkonzentraten. Iris Jusen, Dieter Baumert und Svenja Henze danke ich für die Unterstützung bei allen technischen Fragen, der Durchführung von Bestellungen und alles darüber hinaus.

Meinen Eltern danke ich ganz besonders für die unaufhörliche Unterstützung. Ich danke meiner Mutter Roja Haschemi für die bedingungslose Liebe, die u.a. durch den Magen geht, und der ständigen Motivation und meinem Vater Jamil Haschemi für die wertvollen Lebensweisheiten, die mir in schwierigen Zeiten geholfen haben. Zu guter Letzt danke ich meiner Frau Elika Assari, die mich über die Hälfte meines Leben nicht nur begleitet, sondern auch ertragen und geliebt hat.