

**Untersuchungen zur Hemmung der Ectonucleotidase NPP1 auf
Tumorzellen durch Heparinderivate und deren Konsequenzen für
eine Deregulierung der antitumoralen Immunreaktion**

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

vorgelegt von
Hermann Josef Maximilian Schuh
aus
Siegen

Bonn, November 2023

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

Gutachter/Betreuer: Prof. Dr. Gerd Bendas

Gutachterin: Prof. Dr. Christa E. Müller

Tag der Promotion: 26.04.2024

Erscheinungsjahr: 2024

*Die Definition von Wahnsinn ist,
immer wieder das Gleiche zu tun
und andere Ergebnisse zu erwarten.*

Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Abkürzungsverzeichnis | V |
| 1 Einleitung | 1 |
| 2 Theoretische Grundlagen | 3 |
| 2.1 Heparin in der Onkologie | 3 |
| 2.1.1 Hämatogene Metastasierung | 3 |
| 2.1.2 Heparine und ihre Struktur und Funktion | 6 |
| 2.1.3 Einordnung des Heparins als Antikoagulans | 10 |
| 2.1.4 Heparin zur Prophylaxe venöser Thromboembolien | 11 |
| 2.1.5 Antimetastatische Effekte des Heparins..... | 13 |
| 2.1.6 Antiinflammatorische und immunonkologische Eigenschaften des Heparins... | 16 |
| 2.2 Immunonkologie..... | 20 |
| 2.2.1 Immunsystem | 20 |
| 2.2.2 Angeborenes Immunsystem | 20 |
| 2.2.3 Adaptives Immunsystem | 24 |
| 2.2.4 T-Helferzellen | 25 |
| 2.2.5 Immunevasion und Tumormikroumgebung..... | 29 |
| 2.2.6 Regulatorische T-Lymphozyten im Tumorgeschehen | 31 |
| 2.2.7 Checkpointinhibitoren..... | 34 |
| 2.3 Purinerge Signalkaskade..... | 36 |
| 2.3.1 Purinrezeptoren | 36 |
| 2.3.2 Immunsuppressive Eigenschaften des Adenosins in der TMU..... | 36 |
| 2.3.3 Neoplastische Eigenschaften des Adenosins..... | 38 |
| 2.3.4 Immunmodulierende Eigenschaften des ATP | 39 |
| 2.4 Ektonukleotidasen | 41 |
| 2.4.1 Enzymkatalysierter extrazellulärer Abbau des ATP | 41 |
| 2.4.2 Ektonukleotidtriphosphatdiphosphohydrolase NTPD (CD39) | 42 |
| 2.4.3 5'-Ektonukleotidase NT5E (CD73) | 43 |
| 2.4.4 Ektonukleotidpyrophosphatase 1 NPP1 (CD203a)..... | 44 |
| 2.4.5 Inhibitoren der Ektonukleotidasen | 45 |
| 2.4.6 Heparine als NPP1-Inhibitor | 46 |
| 3 Ziel der Arbeit | 49 |
| 4 Material und Methoden | 51 |
| 4.1 Material..... | 51 |
| 4.1.1 Chemikalien und Reagenzien..... | 51 |
| 4.1.2 Lösungen und Puffer | 56 |
| 4.1.3 Primer | 59 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------|--|-----|
| 4.1.4 | Antikörper | 60 |
| 4.1.5 | Antikoagulantien und EN-Enzyminhibitoren..... | 60 |
| 4.1.6 | Geräte und Instrumente | 61 |
| 4.1.7 | Verbrauchsmaterialien | 64 |
| 4.1.8 | Software | 67 |
| 4.2 | Zellkultur | 69 |
| 4.2.1 | Inkulturnahme | 69 |
| 4.2.2 | Kryokonservierung..... | 69 |
| 4.2.3 | Zellzahlbestimmung..... | 70 |
| 4.2.4 | Subkultivierung | 70 |
| 4.2.5 | Zelllinien | 72 |
| 4.3 | Zellisolation..... | 73 |
| 4.3.1 | Peripheral Mononuclear Blood Cells | 73 |
| 4.3.2 | CD4 ⁺ T-Lymphozyten..... | 74 |
| 4.4 | MTT-Assay..... | 76 |
| 4.4.1 | Grundlage | 76 |
| 4.4.2 | Probenvorbereitung Ovarialkarzinome A2780/A2780cis und W1/W1CR..... | 77 |
| 4.4.3 | Probenvorbereitung MDA-MB-231-Zellen | 78 |
| 4.4.4 | Auswertung | 79 |
| 4.5 | Quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion..... | 81 |
| 4.5.1 | Grundlage | 81 |
| 4.5.2 | Zellyse und RNA-Extraktion | 83 |
| 4.5.3 | cDNA-Synthese..... | 83 |
| 4.5.4 | Bestimmung der Primereffizienz | 84 |
| 4.5.5 | qRT-PCR..... | 85 |
| 4.5.6 | Auswertung nach $\Delta\Delta Cq$ | 86 |
| 4.6 | Kapillarelektrophorese..... | 90 |
| 4.6.1 | Grundlage | 90 |
| 4.6.2 | Probenvorbereitung | 95 |
| 4.6.3 | Durchführung | 95 |
| 4.6.4 | Auswertung | 97 |
| 4.7 | cDNA-Sequenzierung NPP1-Gen U87 | 100 |
| 4.8 | Durchflusszytometrie..... | 102 |
| 4.8.1 | Grundlagen | 102 |
| 4.8.2 | Transporteraktivität bei modifiziertem Purinstoffwechsel..... | 104 |
| 4.8.3 | Erzeugung der Tumorüberstände zur <i>in-vitro</i> -Modellierung der Immunantwort | 105 |
| 4.8.4 | Differenzierung regulatorischer T-Zellen | 107 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 4.8.5 | Zytotoxizität der natürlichen Killerzellen | 110 |
| 4.9 | IL-10 ELISA..... | 114 |
| 4.9.1 | Generierung der Überstände..... | 114 |
| 4.9.2 | Durchführung | 114 |
| 4.10 | Multiplex Analyse des Zytokinprofils | 118 |
| 4.11 | Statistik | 119 |
| 5 | Ergebnisse und Diskussion | 120 |
| 5.1 | Quantitative Analyse der EN-Expression auf Tumorzellen | 120 |
| 5.1.1 | Bestimmung der Primereffizienzen..... | 120 |
| 5.1.2 | Quantifizierung der EN-Expression auf U87-Zellen | 123 |
| 5.1.3 | Quantifizierung der EN-Expression auf MDA-MB-231-Zellen | 124 |
| 5.1.4 | Zusammenfassung EN-Expression auf Tumorzellen:..... | 125 |
| 5.2 | Entwicklung des CE-Assays zur Testung potenzieller NPP1-Inhibitoren | 127 |
| 5.3 | Sequenzanalyse des NPP1-Gens | 132 |
| 5.4 | CE-Analytik der Heparine und Derivate zur NPP1-Inhibition..... | 134 |
| 5.4.1 | Natürliche Sulfopolysaccharide | 134 |
| 5.4.2 | Testung der kommerziellen Heparine | 139 |
| 5.4.3 | Chemisch modifizierte Heparinderivate und Analoga | 143 |
| 5.4.4 | Abgeleitete synthetische Sulfosaccharide | 149 |
| 5.4.5 | Zusammenfassung: CE-Analytik der Heparine und Analoga bezüglich NPP1-Inhibition..... | 153 |
| 5.5 | Analyse der EN-Induktion durch Zytostatikaresistenz..... | 156 |
| 5.5.1 | EN-Induktion durch eine Cisplatinresistenz in den Ovarialkarzinomzelllinien A2780/A2780cis und W1/W1CR | 156 |
| 5.5.2 | EN-Induktion durch resistenzfördernde Faktoren an TNBC MDA-MB-231 Zellen | 158 |
| 5.5.3 | Einfluss der purinergen Signaltransduktion auf die Anthrazyklinresistenz und Zellviabilität der MDA-MB-231 | 160 |
| 5.5.4 | Durchflusszytometrische Untersuchung der purinergen Signaltransduktion und Resistenz durch potenzielle ABC-Transporteraktivität | 163 |
| 5.5.5 | Zusammenfassung: EN-Induktion und Zytostatikaresistenz in Tumorzellen .. | 165 |
| 5.6 | Immunmodulatorische Eigenschaften der Ektonukleotidasen in der TMU | 168 |
| 5.6.1 | Modulation der CD4 ⁺ T-Zelldifferenzierung in regulatorische T-Zellen anhand der Purinderivate ADO und ATP sowie deren nukleosidischen Analoga | 168 |
| 5.6.2 | Modulation der CD4 ⁺ T-Zelldifferenzierung in regulatorische T-Zellen anhand heparinisierter Tumorzellüberstände..... | 170 |
| 5.6.3 | Modulation der Zytotoxizität der natürlichen Killerzellen anhand der purinergen Signaltransduktion | 173 |
| 5.6.4 | Modulation der Zytotoxizität der natürlichen Killerzellen anhand der purinergen Signaltransduktion durch heparinisierte U87-Tumorzellüberstände | 175 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|------------|
| 5.6.5 | Zusammenfassung der immunmodulatorischen Eigenschaften der EN in der TMU..... | 176 |
| 5.7 | Beeinflussung der IL-10-Sekretion durch den purinergen Metabolismus in der TMU | 180 |
| 5.8 | Modulation des CD4 ⁺ Zytokinprofils durch Intervention des purinergen Metabolismus in der TMU | 183 |
| 6 | Zusammenfassung..... | 193 |
| | Quellenverzeichnis | 197 |
| | Abbildungsverzeichnis | 233 |
| | Formelverzeichnis | 236 |
| | Tabellenverzeichnis | 237 |
| | Publikationsliste | 239 |
| | Danksagung..... | 240 |
| | Verfassererklärung | 242 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------|---|
| % (V/V) | Volumenprozent |
| ° | Grad |
| °C | Grad Celsius |
| μEM | Elektrophoretische Mobilität |
| 7-AAD | 7-Aminoactinomycin |
| A | Ampere |
| ABC | <i>ATP-binding cassette</i> |
| ABTS | 2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) |
| ADA | Adenosindesaminase |
| ADC | Analog-zu-Digital-Konverter |
| ADCC | <i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i> |
| ADO | Adenosin |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| ADPR | Adenosinphosphatribose |
| AMP | Adenosinmonophosphat |
| ANOVA | Einfaktorielle Varianzanalyse |
| AOPCP | Adenosin-5'-(α , β -methylen)diphosphat |
| <i>APC</i> | <i>antigen presenting cell</i> |
| APC | Allophycocyanin |
| APD | Avalanche-Photodioden |
| AT | Antithrombin |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| AUC | <i>area under the curve</i> / Integral |
| B | Longitudinaldiffusion |
| BCR | B-Zellrezeptor |
| bp | Basenpaar |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| BzATP | Benzoyl-Benzoyl-Adenosintriphosphat |
| c | Stoffmengenkonzentration |
| cAMP | Zyklisches Adenosinmonophosphat |
| CAR | chimärer Antigenrezeptor |
| CCL | C-C-Motiv Chemokinligand |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|--|
| CD | Differenzierungscluster |
| CDS | Kodierende Sequenz |
| CE | Kapillarelektrophorese |
| CEACAM | <i>carcinoembryotic antigen related cell adhesion molecule</i> |
| CFSE | 6-Carboxyfluorescein-Succinimidylester |
| cGAMP | Zyklisches Guanosin-Adenosinmonophosphat |
| Cq | <i>Quantification Cycle</i> |
| CS | Chondroitinsulfat |
| Ct | <i>Threshold Cycle</i> |
| CTL | <i>cytotoxic T lymphocyte</i> |
| CTLA-4 | <i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i> |
| CW | Cardin-Weintraub |
| CXCL | C-X-C-Motiv Chemokinligand |
| CXCR | C-X-C-Motiv Chemokinrezeptor |
| Cy5.5 | Cyanin 5.5 |
| Da | Dalton |
| DAD | Diodenarraydetektor |
| DAMP | <i>damage-associated molecule pattern</i> |
| DBPS | <i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i> |
| DC | Dendritische Zellen |
| D-GlcA | D-Glucuronsäure |
| D-GlcN | D-Glucosamin |
| DMEM | <i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DOAK | Direkte orale Antikoagulantien |
| DP | Dipyridamol |
| E | Primereffizienz |
| EC ₅₀ | mittlere effektive Konzentration |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EHNA | Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenin-Hydrochlorid |
| ELISA | <i>enzyme linked immunosorbent assay</i> |
| EMT | Epitheliale-mesenchymale Transition |
| EN | Ektonukleotidasen |
| ENP | Einzelnukleotid-Polymorphismus |

| | |
|--------|---|
| ENT | Equilibrativer Nukleosidtransporter |
| EOF | Elektroosmotischer Fluss |
| EZM | Extrazelluläre Matrix |
| EZR | Extrazellulärraum |
| Fab | Antigenbindendes Fragment |
| FACS | <i>fluorescence-activated cell sorting</i> |
| Fc | Kristallisierbares Fragment |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| FKS | Fetales Kälberserum |
| FMO | <i>fluorescence minus one</i> |
| FoxP3 | Forkhead-Box-Protein P3 |
| FRET | Förster-Resonanzenergietransfer |
| FSC | <i>Forward Scatter</i> |
| g | mittlere Erdbeschleunigung |
| g | Gramm |
| GAG | Glykosaminoglykan |
| Gal-9 | Galectin |
| GalNAc | N-Acetylgalactosamin |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase |
| GATA3 | GATA-Sequenz bindendes Protein 3 |
| GBM | <i>Glioblastoma multiforme</i> |
| GOI | <i>gene of interest</i> / Zielgen |
| GPCR | G-Protein-gekoppelter Rezeptor |
| h | Stunde |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| HER | Humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor |
| HIF | Hypoxie-induzierter Faktor |
| HIT | Heparin-induzierte Thrombozytopenie |
| HKG | <i>Housekeeping Gene</i> / Haushaltsgen |
| HPLC | <i>High performance liquid chromatography</i> |
| HPSE | Heparanase |
| HPSG | Heparansulfat-Proteoglykan |
| HRP | Meerrettichperoxidase |
| HS | Heparansulfat |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|---|
| I.E. | Internationale Einheit |
| IC ₅₀ | Mittlere inhibitorische Konzentration |
| ICAM | Intrazelluläres Zelladhäsionsmolekül |
| ICD | Immunogener Zelltod |
| ICI | Immuncheckpointinhibitor |
| IDO | Indolamin-2,3-Deoxygenase |
| IFN | Interferon |
| IL | Interleukin |
| INO | Inosin |
| IS | Interner Standard |
| K _D | Diffusionskoeffizient |
| K _i | Mittlere inhibitorische Konzentration |
| KIR | Killerzell-immunoglobulinartige Rezeptoren |
| l | Liter |
| LAG-3 | Lymphozyten-Aktivierungsgen 3 |
| LC ₅₀ | Mittlere letale Dosis |
| L-IdoA | L-Iduronsäure |
| LMWH/NMH | niedermolekulares Heparin |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| M | Molar |
| m | Meter |
| MACS | <i>magnetic activated cell sorting</i> |
| MAK | Membranangriffskomplex |
| MBL | Mannose-bindendes Lektin |
| MDSC | Myeloide Suppressorzelle |
| MEKC | Mizellare elektrokinetische Chromatographie |
| MHC | Haupthistokompatibilitätskomplex |
| min | Minute |
| MMP | Matrix-Metalloprotease |
| N | Versuchsanzahl |
| N | Theoretische Bodenzahl |
| NAD | Nicotinamidadenindinukleotid |
| NADP | Nicotinamidadenindinukleotidphosphat |
| NCR | Natürliche Zytotoxizitätsrezeptoren |

| | |
|-----------------|--|
| NECA | 5'-(N-Ethylcarboxamido)adenosin |
| NET | Neutrophile extrazelluläre Trap |
| NKp46 | NK-Zell-Protein mit 46 Kilodalton |
| NKZ | Natürliche Killerzellen |
| NPP | Ektonukleotidpyrophosphatase |
| NRT | Negativkontrolle (Reverse Transkription) |
| NT5E | 5'-Ektonukleotidase |
| NTC | <i>no template control</i> |
| NTP | Nukleosidtriphosphat |
| NTPD | Ektonukleotidtriphosphatdiphosphohydrolase |
| P | Purinrezeptor |
| PAMP | <i>pathogen-associated molecular pattern</i> |
| PBMC | <i>Peripheral mononuclear blood cell</i> |
| PC-1 | <i>plasma cell antigen 1</i> |
| PD-1 | programmiertes Zelltod Protein 1 |
| PDGF | <i>Platelet-derived Growth Factor</i> |
| PD-L | Programmierter Zelltodligand |
| PE | Phycoerythrin |
| PerCP | Peridinin-Chlorophyll-Protein-Komplex |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PGP | Permeabilitäts-Glykoprotein |
| P _i | Anorganisches Phosphat |
| PMT | <i>Photomultiplier Tubes</i> |
| POM | Polyoxometallat |
| PP _i | Pyrophosphat |
| PRR | <i>pattern recognition receptor</i> |
| PSI | <i>pound-force per square inch</i> |
| qPCR | Quantitative Polymerasekettenreaktion |
| R | Rezeptor |
| R ² | Bestimmtheitsmaß |
| RCT | Randomisierte Kontrollstudie |
| RF | Resistenzfaktor |
| RFU | <i>relative fluorescence unit</i> |
| ROR γ T | Retinoinsäure-verwandter orphaner Rezeptor- γ T |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|--|
| RPMI | <i>Roswell Park Memorial Institute</i> |
| RT | Reverse Transkriptase |
| s | Sekunde |
| SD | Standardabweichung |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SEM | Standardfehler |
| SSC | <i>Side Scatter</i> |
| STING | Stimulator-der-Interferongene-Signalweg |
| T | Temperatur |
| TAH | Thrombozytenaggregationshemmer |
| TAM | Tumorassoziierte Makrophagen |
| TAN | Tumorassoziierte Neutrophile |
| T-bet | T-box exprimiert in T-Zellen |
| TCIPA | Thrombozyten-induzierte Plättchenaktivierung |
| TCR | T-Zellrezeptor |
| T _{eff} | Effektor-T-Zelle |
| TF | <i>Tissue Factor</i> / Gewebefaktor |
| T _{FH} | follikuläre T-Helferzellen |
| TFPI | <i>tissue-factor-pathway-inhibitor</i> |
| TGF- β | <i>Transforming Growth Factor β</i> |
| T _H | T-Helferzelle |
| TIDC | Tumordinfiltrierende dendritische Zellen |
| TIM-3 | T-Zell-Immunglobulin-und-Mucindomäne 3 |
| TLR | Toll-like-Rezeptor |
| T _m | Schmelzpunkt |
| TMB | Tetramethylbenzidin |
| TMU | Tumormikroumgebung |
| TNBC | <i>triple negative breast cancer</i> |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| TRAIL | <i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i> |
| T _{reg} | regulatorische T-Zellen |
| TRIS | Tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| TVT | Tiefe Venenthrombosen |
| UAW | Unerwünschte Arzneimittelwirkung |

| | |
|------------------|---|
| UDO | Uridin |
| UFH | Unfraktioniertes Heparin |
| UTP | Uridintriphosphat |
| UV | Ultraviolett |
| V | Volt |
| VCAM | Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül |
| VEGF | Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor |
| VKA | Vitamin-K-Antagonisten |
| VLA | <i>very-late antigen</i> |
| VTE | Venöse Thromboembolie |
| WPK | Weibel-Palade-Körperchen |
| wt | Wildtyp |
| λ | Wellenlänge |
| λ_{\max} | Spezifische Wellenlänge maximaler Absorption/Exzitation |

1 Einleitung

Maligne Tumore stellen auch in der heutigen Zeit eine schwerwiegende Erkrankung mit häufiger Todesfolge dar. Weltweit betrachtet ist es die zweithäufigste Todesursache nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen. In 57 Ländern mit hohem Human-Development-Index liegen maligne Erkrankungen bei der Letalitätsrate auf dem vordersten Platz, was auf eine zunehmend alternde Demographie zurückzuführen ist (1). Trotz dieser schwerwiegenden Entwicklung sind die absoluten Todeszahlen über einen längeren Zeitraum von 1991 bis 2018 in den USA um 31 % zurückgegangen. Dies lässt sich auf ein höheres Bewusstsein der Bevölkerung gegenüber Risikofaktoren wie Rauchen, aber auch auf eine verbesserte Vorsorge und medizinische Behandlung zurückführen (2). Jedoch lassen sich deutliche Unterschiede in Bezug auf die Art und Entität der Tumorerkrankung feststellen, die in Kohärenz mit dem Therapieerfolg und der resultierenden Lebenserwartung steht.

Neoplastische Erkrankungen des zentralen Nervensystems sowie des Gehirns sind schwer zugänglich und können nicht durch operative Eingriffe entfernt werden. Bestimmte Mammakarzinome neigen vorzugsweise zur Metastasierung in Knochen, Leber, Lunge sowie Gehirn und schränken auf diese Weise den Therapieerfolg und die Überlebenschancen der Betroffenen deutlich ein (3). Ein weiteres Problem resultiert aus dem komplexen Nebenwirkungsprofil der etablierten klassischen Zytostatika (4). Wegen deren systemischer Zytotoxizität erzeugen sie einen zusätzlichen Leidensdruck, der konzentriert mit einem mangelnden Ansprechen des Tumors aufgrund multifaktorieller Resistenzentwicklungen den Therapieerfolg verhindert (5–7). Demzufolge herrscht ein reges Bestreben neue Therapieansätze, insbesondere für Neoplasien mit einer hohen Inzidenz und Mortalitätsrate unter den Betroffenen zu entwickeln.

Neben der klassischen Chemotherapie rückt die Immunonkologie zunehmend in den Fokus. Schon 1863 ermittelte der Arzt Rudolf Virchow den Befund einer Tumorerkrankung mit einer simultan erhöhten Leukozytenzahl. Er stellte damit einen ersten Zusammenhang zwischen der Entstehung und Progression von Tumoren und chronisch entzündlichen Gewebe her. Dieser Sachverhalt konnte heutzutage anhand eines erhöhten Aufkommens von Immunzellen sowie diverser Wachstumsfaktoren und immunologischer Botenstoffe in Tumorgewebe nachgewiesen werden (8). Die Entwicklung aktiver Immuntherapien in Form der Tumorstimmulierung, des adoptiven Zelltransfers und insbesondere der Immuncheckpoint-Inhibitoren (ICI) hat in den letzten Jahren einen deutlichen Einfluss auf die onkologische Therapie entfaltet. Während sich antitumorale RNA-Vakzine noch in verschiedenen Phasen der

Einleitung

Klinischen Studien befinden, wurde der Zelltransfer als CAR-T-Zelltherapie (CAR = chimärer Antigenrezeptor) bereits erfolgreich realisiert (9,10).

Im Gegensatz zu den beiden tumorantigenbasierten Therapiestrategien richten sich die ICI nicht ausschließlich gegen Tumorantigene. Die sogenannten Immuncheckpoints stellen Regulationspunkte zur suppressiven oder stimulierenden Modulation der Immunantwort dar. Den beiden Forschern James Allison und Tasaku Honjo wurde für die Entdeckung der Immuncheckpoints zytotoxisches T-Lymphozyten assoziiertes Protein 4 (CTLA-4 = *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) und programmiertes Zelltod Protein 1 (PD-1) als Meilensteine der Immunonkologie im Jahr 2018 der Nobelpreis für Medizin verliehen (11). Verschiedene Tumore kompromittieren über die Beeinflussung der beiden Immuncheckpoints die Immunantwort und entziehen sich dieser. Der therapeutische Einsatz von ICI in Form von Antikörpern nivelliert den suppressiven Effekt und stellt die antitumorale Immunantwort wieder her. Allerdings wurden auch bei dieser Therapie Autoimmunität und Resistenzen festgestellt, weshalb die Ergründung neuer Checkpoints stetig avisiert wird (12,13).

Deshalb ist das purinbasierte Nukleosid Adenosin zunehmend in den Fokus gerückt, da es im Tumorgewebe aufgrund des extrazellulären enzymatischen Metabolismus des Nukleotids Adenosintriphosphat (ATP) durch Ektonukleotidasen (EN) entsteht und akkumuliert vorkommt (14). In Bezug auf die Regulation des Immunsystems verhalten sich die beiden Purine als funktionelle Antipoden. Dabei moduliert ATP proinflammatorische und Adenosin antiinflammatorische, neoangiogenetische Effekte, die das Tumorwachstum fördern (14,15). Des Weiteren stellt die purinerge Achse einen Verknüpfungspunkt zu den kohärenten Abläufen der Wundheilung und Neoangiogenese zur Versorgung des Tumorgewebes dar. In diesem Kontext werden Tumore auch als permanente nicht heilende Wunde bezeichnet, da sie zahlreiche vaskuläre Komplikationen verursachen (14,16).

In dieser Arbeit wird die Beeinflussung der ATP / Adenosin-Balance durch Hemmung von EN auf zellulärer Ebene untersucht. Im Mittelpunkt steht dabei die Frage, inwieweit Heparin, als ein etabliertes Antikoagulans in der Onkologie, durch Hemmung von EN in dieses Gleichgewicht eingreifen und durch eine reduzierte Adenosinbildung auch immunonkologische Wirksamkeiten entfalten kann (17,18).

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Heparin in der Onkologie

2.1.1 Hämatogene Metastasierung

Das Auftreten maligner Tumore ist bei den betroffenen Patienten oft mit einer verstärkten Gerinnungsaktivität verbunden. Der enge Zusammenhang zwischen malignen Erkrankungen und einer Hyperkoagulation wurde bereits im Jahr 1865 durch den französischen Arzt Armand Trousseau beobachtet. Seither bezeichnet man die Kombination beider Krankheitsbilder als Trousseau-Syndrom (19,20). Mittlerweile ist die tumorassoziierte, erhöhte Koagulabilität auch als entscheidender Faktor der hämatogenen Metastasierung bekannt und steht diesbezüglich im Fokus der Forschung (21). Die Entwicklung einer tumorassoziierten Thrombose ist dabei auf multifaktoriellen, komplexen Mechanismen begründet, die eng mit dem Prozess der Metastasierung einhergehen. Patienten mit bösartigen Tumorerkrankungen haben dabei ein bis zu neunfach höheres Risiko, thromboembolische Komplikationen zu entwickeln als gesunde Menschen (22). Dies deutet auf ein tumoral bedingtes Ungleichgewicht innerhalb der Hämostase hin.

Die Hämostase beschreibt den Prozess der Blutungsstillung, welcher in eine primäre, zelluläre Blutstillung und eine sekundäre, plasmatische Blutgerinnung differenziert werden kann. Auslöser der primären Hämostase sind hauptsächlich Thrombozyten, geschädigtes Endothel sowie der freigesetzte *Tissue Factor* (TF). Dagegen wird die sekundäre Hämostase durch die unmittelbare Aktivierung löslicher Gerinnungsfaktoren des Blutplasmas ausgelöst. Ersteres bezeichnet man daher auch als extrinsische und Letzteres als intrinsische Aktivierung der Blutgerinnungskaskade (23).

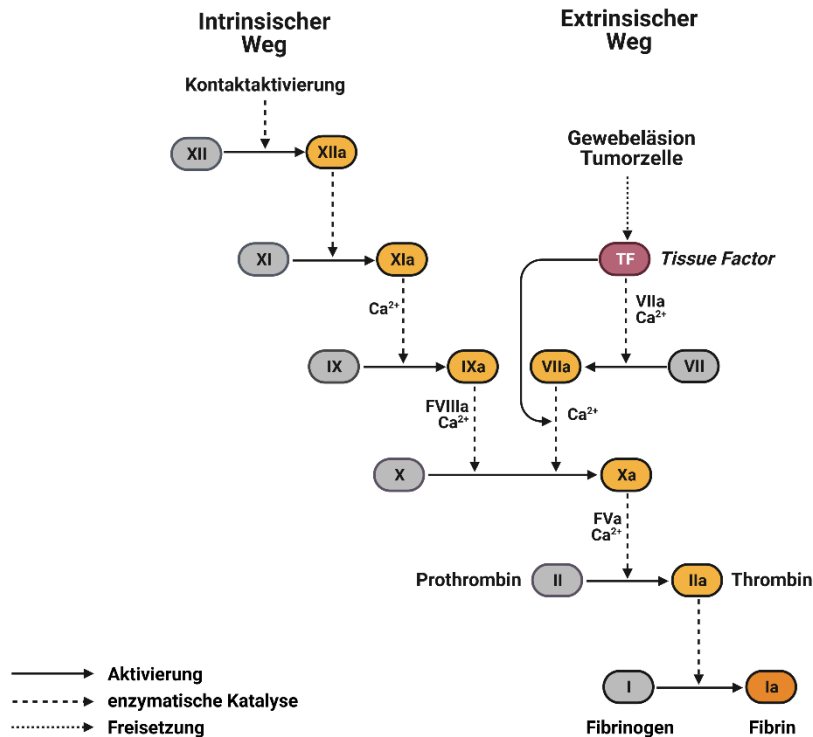


Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der Blutgerinnungskaskade und die Möglichkeiten zur Aktivierung. Die Abbildung wurde mit Hilfe von BioRender.com erstellt.

Die Metastasierung bezeichnet einen Prozess, in welchem sich Tumorzellen aus ihrem primären Verband lösen und durch das Endothel sowie die extrazelluläre Matrix (EZM) in Blutgefäße gelangen (24). Dies gelingt ihnen durch Umwandlung in einen mesenchymalen Phänotyp, welcher über eine höhere Motilität und Invasivität verfügt. Dieser Prozess wird auch als Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet. Es folgt die Verteilung der Tumorzellen über das Blut, bis zu einer Lokalisierung, an welcher günstige Bedingungen zum Verlassen des Gefäßsystems vorherrschen. In dieser sogenannten prämetastatischen Nische findet eine Adhäsion am Endothel und eine Extravasation ins Gewebe statt. Die Proliferation bewirkt die Entstehung eines Sekundärtumors (25). Der erfolgreiche Abschluss des Prozesses hängt dabei von der jeweiligen Tumorentität ab (26).

Metastasierungen sind multifaktoriell bedingt und werden unter anderem mit der Expression und Sekretion von TF in Zusammenhang gebracht, welcher auch als Gewebefaktor und Gewebethromboplastin bekannt ist. Hierbei handelt es sich um ein Protein, welches hauptsächlich intrazellulär vorkommt und als Kofaktor des Gerinnungsfaktors VII/VIIa (FVII/FVIIa) extrinsisch, prokoagulatv in die Gerinnungskaskade eingreift (27,28). In diversen humanen Tumorgeweben wie Mammakarzinomen, Glioblastomen sowie kolorektalen Karzinomen ist TF stark überexprimiert und fördert über multiple Signalwege neben der tumorassoziierten Thrombenbildung zusätzlich deren Wachstum und Metastasierung (28–31).

Hierfür ist ein Synergismus aus den beteiligten Tumorzellen, Endothel, Thrombozyten und Immunzellen notwendig, die sich aufgrund sezernierter Wachstumsfaktoren und Zytokine wechselseitig beeinflussen und Effekte verstärken können. Dieses Zusammenspiel ermöglicht es der Tumorzelle, den intravaskulären Transport zu überleben. Der Proteinkomplex aus TF/FVIIa/FXa erzeugt Thrombin, das zur Plättchenaktivierung, Fibrinbildung aus Fibrinogen sowie einer Verklumpung beider Komponenten führt. Diese Agglomerate aus aktivierten Thrombozyten und Fibrin schirmen die Tumorzelle vor intravaskulären Scherkräften ab und hindern natürliche Killerzellen (NKZ) an der Ausübung ihrer antitumoralen Funktion (32,33). Additiv werden Monozyten und Makrophagen über Zytokine, wie den durch Endothelzellen ausgeschütteten CC-Chemokin Liganden 5 (CCL5) zur Stärkung des Agglomerats rekrutiert (34). Die Kommunikation mit anderen Zelltypen des Blutes ist daher zur Ausbildung der prämetastatischen Nische, für das Überleben der Tumorzelle und der folgenden Extravasation unerlässlich.

Durch TF und Thrombin aktivierte Thrombozyten weisen mehrere Arten von Granula auf, aus denen sie verschiedene Signalmoleküle freisetzen. Dichte Granula enthalten unter anderem die Nukleotide Adenosindiphosphat (ADP) und ATP. Die α -Granula enthalten neben Adhäsionsmolekülen, Wachstumsfaktoren und Gerinnungsfaktoren auch Chemokine und Zytokine, die maßgeblichen Einfluss auf die Tumorzellen, Endothelzellen und Leukozyten ausüben. Unter den Wachstumsfaktoren vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF) und *Platelet-derived Growth Factor* (PDGF) befindet sich auch die Zytokinfamilie des *Transforming Growth Factor β* (TGF- β 1-3) (35,36). TGF- β 1 ermöglicht als Induktor der EMT den Tumorzellen die Intravasation ins Blutgefäß (37,38), wobei TGF- β neben der Freisetzung aus den α -Granula der Thrombozyten auch intrinsisch aus der Tumorzelle hierfür sezerniert werden kann (39). Zusätzlich wird TGF- β 1 auch mit dem Auftreten von Thromboembolien und der Immunsuppression assoziiert (40,41). Aktivierte Thrombozyten können somit über Chemokine sowie Zytokine sowohl das Endothel als auch Monozyten, Makrophagen und vor allem Neutrophile Granulozyten in ihrer Aktivität beeinflussen (35). Es wird daher ein kausaler Zusammenhang zwischen dem Ablauf inflammatorischer Prozesse durch Zellen des angeborenen Immunsystems und der unmittelbaren Tumorumgebung beschrieben. Monozyten werden durch Chemotaxis zur Inflammation oder Gewebsläsion gerufen und differenzieren dort zu Makrophagen. Diese wiederum tragen neben ihrer immunologischen Funktion ebenso zur Regeneration des Gewebes bei und akkumulieren daher aufgrund entzündlicher Prozesse und Gewebeschädigungen im Umfeld des Tumors (42). Normalerweise verfügen Makrophagen über die Fähigkeit zur Antigenpräsentation gegenüber NK-Zellen und T-Lymphozyten,

Sekretion proinflammatorischer Zytokine zur Stimulation Selbiger und die Eigenschaft zur Phagozytose. Folglich müssten Makrophagen das Tumorwachstum und die Intravasation disseminierter Tumorzellen verhindern. Stattdessen wirken diese tumorassoziierten Makrophagen (TAM) immunsuppressiv und prometastatisch (43–45). Dieser Subtyp wird unter Beteiligung von Zytokinen wie TGF- β 1 ausgebildet und zeichnet sich durch wachstumsfördernde Eigenschaften gegenüber Tumorgewebe und immunsuppressive Eigenschaften gegenüber T-Lymphozyten aus. Neutrophile Granulozyten werden per Chemotaxis durch tumorzellaktivierte Thrombozyten oder Gewebsläsionen attrahiert. Über zahlreiche Adhäsionsmoleküle binden und aggregieren sie mit den aktivierten Thrombozyten und schirmen die metastasierende Tumorzelle so gegen äußere Einflüsse ab.

Allgemein wird angenommen, dass Leukozyten des angeborenen Immunsystems lokal erheblich an der Bildung von tumorassoziierten Thrombosen beteiligt sind (46,47). Hierbei desintegrieren Neutrophile durch Bildung sogenannter neutrophiler extrazellulärer Traps (NET), die als extrazelluläres DNA-Netzwerk vielfältige Pathogene enzymatisch deaktivieren (48). Die NETose kann jedoch auch durch tumorzellaktivierte Thrombozyten ausgelöst werden und somit die Bildung von Thromben fördern. Monozyten sezernieren den prokoagulativen TF und TAM fördern die Angiogenese und Wachstum mittels VEGF (49,50).

Somit tragen die Zellen des angeborenen Immunsystems zur Angiogenese und dem Tumorwachstum bei (42). Die zur Kommunikation, Aktivierung, oder Stimulation benötigten Chemokine und Zytokine der beteiligten Interaktionspartner tragen ebenfalls enorm zur hämatogenen Metastasierung und Bildung tumorassoziiertes Thrombosen bei (51). Auf Basis der genannten Aspekte ist eine antithrombotische Prophylaxe und akute Behandlung ein wesentlicher Bestandteil der Onkologie, insbesondere bei bestimmten Risikopatientengruppen.

2.1.2 Heparine und ihre Struktur und Funktion

Die Heparine stellen als polysulfatierte Glykosaminoglykane eine Untergruppe der natürlich vorliegenden Polysaccharide dar. Im Jahr 1916 wurden die thromboplastischen Eigenschaften der von Jay McLean als „Cephalin“ bezeichneten Substanzgruppe entdeckt, die kurze Zeit später durch William Henry Howell 1918 in Heparin umbenannt wurde (52–54). Auch über 100 Jahre nach ihrer Erstbeschreibung wird Heparin für die therapeutische Anwendung heute noch aus der Mucosa des Schweinedarms aus den dortigen Mastzellen isoliert, aufgereinigt und gegebenenfalls durch chemische oder enzymatische Spaltung weiterverarbeitet (55). Aufgrund der Tatsache, dass es sich nach der Isolation und Aufreinigung um ein Gemisch mit heterogenen Kettenlängen handelt, werden sie anhand ihrer mittleren Molekülmasse differenziert.

Natürlich vorliegendes Heparin weist eine Molekülmasse von 5000 – 35000 Da auf, wohingegen sich Heparin zur pharmazeutischen Anwendung im Bereich von 12000 – 16000 Da bewegt (56,57). Neben diesem unfraktionierten Heparin (UFH) mit hoher mittlerer Molekülmasse und Varianz der Kettenlänge werden die durch enzymatische oder chemische Kettenspaltung modifizierten niedermolekulare Heparine (NMH = *LMWH*) mit kleinerer mittlerer Molekülmasse medizinisch eingesetzt (58).

Der strukturelle Aufbau der Heparine besteht aus linearen, unverzweigten Ketten, die sich aus repetitiven Disaccharideinheiten in ihrer Pyranoseform zusammensetzen. Je eine Einheit besteht aus D-Glucosamin (D-GlcN), das über eine α -1,4-glykosidische Bindung alternierend an eine der beiden Uronsäuren D-Glucuronsäure (D-GlcA) oder L-Iduronsäure (L-IdoA) geknüpft ist. Beide Uronsäuren sind wiederum α -1,4 oder β -1,4-glykosidisch an D-Glucosamin gebunden. L-Iduronsäure stellt dabei ein Epimer der D-Glucuronsäure dar (59). Strukturelle Modifikationen sind an multiplen Positionen innerhalb der Monomere möglich. Das Stickstoffatom des D-Glucosamins kann sowohl durch Acetylierung als auch Sulfatierung verändert werden. Des Weiteren können die Hydroxygruppen an Kohlenstoffatom 2 (C2) der Uronsäuren oder C3 und C6 des D-Glucosamins durch Sulfatierung modifiziert werden (60). Aufgrund der multiplen freien Carboxyl- und vor allem Schwefelsäureesterfunktionen in der Molekülkette besitzen Heparine in einem physiologischen pH-Milieu eine hohe negative Ladungsdichte und durch die glykosidischen Bindungen eine flexible Konformation. Im Vergleich zum strukturell verwandten natürlichen Biomakromolekül Heparansulfat ist das D-Glucosamin der Heparine nicht acetyliert. Auch weisen Heparine ein höheres Vorkommen an L-Iduronsäure sowie einen deutlich erhöhten Sulfatierungsgrad auf (61,62). Abbildung 2 enthält eine Darstellung über die Struktur und Aufbau des Heparins.

Theoretische Grundlagen

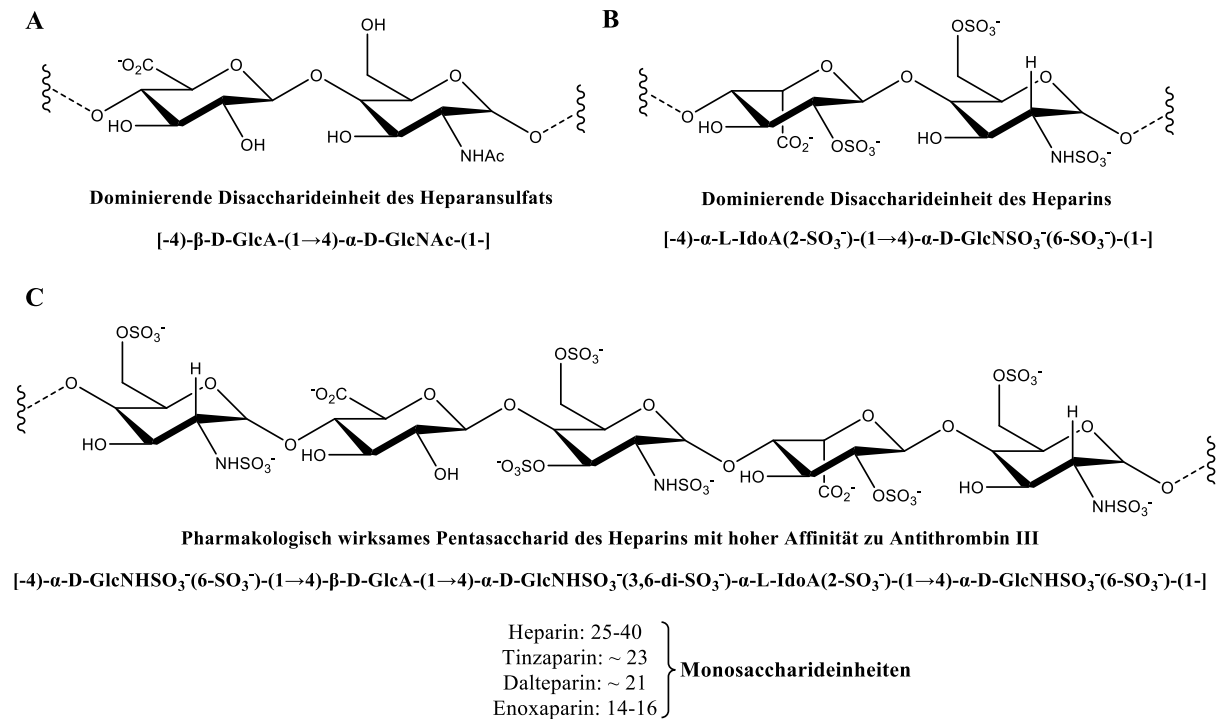


Abbildung 2: Im oberen Teil sind die jeweiligen Disaccharide aus Heparansulfat (A) und Heparin (B) dargestellt. Der untere Teil ist eine Darstellung des Pharmakophors in Form der antithrombinbindenden Pentasaccharidsequenz aus den Heparinen (C), welche in ca. einem Drittel aller Heparinketten vorhanden ist. Modifiziert nach (63)

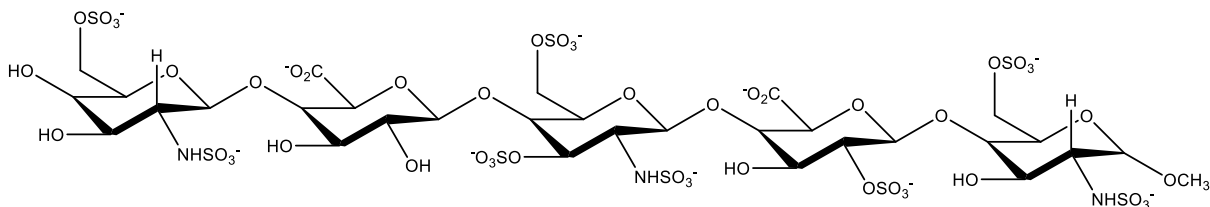
Unfraktioniertes Heparin zeichnet sich durch die größte Varianz bezogen auf die Kettenlänge aus und stellt mit einer mittleren Molekülmasse von 15.000 Da den schwersten Vertreter aus der Klasse der Heparine dar. Aufgrund seines starken anionischen Charakters bindet es mit einer hohen Affinität zu Proteinen mit hohem Aminanteil, wie beispielsweise Zytokine und verursacht eine Vielzahl an Interaktionen (64). Eine besonders hohe Affinität besteht zum ubiquitären, proteinischen Serinprotease-Inhibitor Antithrombin III (AT III). Dessen physiologische Funktion besteht in der Gerinnungshemmung durch Inhibition über eine Komplexierung der aktivierten Serinproteasen XIIa, XIa, Xa, VIIa und insbesondere IIa (Thrombin). Heparin übt seine Funktion als Antikoagulans daher indirekt über die Bindung und Modulation der Protease Antithrombin III aus. Es vermag über die Komplexbildung mit AT III dessen enzymatische Aktivität um den Faktor 700 zu steigern (65).

Aus UFH wird durch chemische oder enzymatische Spaltung sowie einer Abfolge aus Fraktionierung und Aufreinigung LMWH gewonnen. Zu dieser Klasse der niedermolekularen Heparine gehören beispielsweise Tinzaparin, Dalteparin und Enoxaparin, deren mittleres Molekulargewicht in einem Bereich zwischen 3500 und 6500 Da liegt (52,66). Ein weiteres Kriterium zur Definition als LMWH ist, dass ein > 60 % Anteil der durch Depolymerisation produzierten Ketten ein Molekulargewicht < 8000 Da aufweist. Zusätzlich werden die LMWH über den Quotienten aus ihrer Anti-Faktor-Xa-Aktivität zur Antifaktor-IIa-Aktivität

pharmakologisch definiert, der $> 1,5$ betragen muss (67). Hierbei stellt Tinzaparin mit einem mittleren Molekulargewicht von 6500 Da einen längerkettigen Vertreter der LMWH dar. Die Herstellung erfolgt aus einer enzymkatalysierten Depolymerisation durch die Heparinase in Form einer β -Eliminierung der Molekülketten des unfraktionierten Heparins. Eine indirekte Hemmung der Gerinnungskaskade wird über AT III und die Gerinnungsfaktoren Xa und IIa erzielt, wobei die Inhibition von Faktor Xa gegenüber IIa im Verhältnis 1,5-2,5 überwiegt (68,69). Auf die Kettenlänge bezogen ist Dalteparin mit einem mittleren Molekulargewicht von 6000 Da zwischen dem größeren Tinzaparin und dem kleineren Enoxaparin angesiedelt. Die Herstellung erfolgt anhand einer chemischen Spaltung durch Desaminierung mit Salpetriger Säure (70). Ähnlich dem Tinzaparin ist die antikoagulatorische Aktivität des Dalteparins an die Kettenlänge bzw. das Molekulargewicht gekoppelt und wird indirekt über AT III vermittelt. Dessen Aktivität bezogen auf Faktor IIa nimmt mit abnehmendem Molekulargewicht ebenfalls ab, steigert somit die Prävalenz zur Inhibition von Faktor Xa, im Verhältnis von 2,5 zu dessen Gunsten (63,71). Enoxaparin hat eine mittlere Molekülmasse von 4500 Da und gehört daher zu den kurzkettigen Varianten innerhalb der LMWH. Es wird mittels Fraktionierung und basenkatalysierter Spaltung durch β -Eliminierung der Heparin-Benzylester erzeugt. Ähnlich der enzymatischen β -Eliminierung des Tinzaparins sind Anfang und Ende der Polysaccharidstruktur des Enoxaparins dabei am nicht-reduzierenden Ende durch eine ungesättigte 2-O-Sulfo-4,5-enpyranosuronsäure sowie am reduzierenden Ende durch ein 2-N,6-O-Disulfo-D-glucosamin definiert (69,72). Der gerinnungshemmende Effekt wird ebenso wie bei zuvor genannten Vertretern indirekt über AT III erzielt, wobei durch das kleinere mittlere Molekulargewicht die Prävalenz für Faktor Xa im Verhältnis von 3,6 überwiegt (66,73,74). Durch chemische Modifikation kann das antikoagulatorische Potenzial der Heparine herabgesetzt werden, ohne dessen Polysaccharidgrundgerüst grundlegend zu verändern. Dies ist bei der Betrachtung von weiteren potenziellen Effekten der Heparine auf Basis der Interaktion mit Proteinen als *multi-target drug* von Relevanz. Mit Hilfe des Oxidationsmittels Periodat wird eine oxidative Spaltung der Pyranosestruktur katalysiert, um die Ringöffnung einer Uronsäure zu erzielen. Die beiden erzeugten endständigen Aldehydfunktionen werden durch Aufarbeitung mittels Borhydrid zu primären Hydroxygruppen reduziert, ohne dass das Sulfatierungsmuster der Saccharidstruktur verändert wird. Auf diese Weise durch Glykospaltung hergestellte Heparinderivate werden als reduzierte Oxyheparine (RO-Heparin) bezeichnet (75). Eine weitere Option stellt die Substitution der Schwefelsäureester an den Hydroxylgruppen der C2-, C3-, C6-Atome der Pyranosen sowie des Amins dar. Hierzu wird mittels Substitution bzw. Desulfatierung der Hydroxygruppen der Pyranosen an den Atomen

C2, C3, C6 oder der Aminogruppe des D-GlcN bzw. D-GlcA und L-IdoA eine selektive Veränderung des Sulfatierungsmusters erzielt (76,77). Dies trägt maßgeblich zur Reduktion der antikoagulatorischen Eigenschaften der Heparine bei (78).

Additiv zu den bereits genannten Heparinen sei deren vollsynthetischer Abkömmling Fondaparinux erwähnt, dessen Struktur das Pharmakophor der Heparinketten zur Bindung an AT III repräsentiert. Das α -Methyl-Pentasaccharid verfügt gegenüber den Heparinen natürlichen Ursprungs als Syntheseprodukt alleinig über eine klar definierte Struktur, was mit 1728 Da ebenfalls auf die Molekülmasse zutrifft (79). Fondaparinux ist aus drei Bausteinen des D-Glucosamin mit hoher Sulfatierung sowie D-Glucuronsäure und L-Iduronsäure aufgebaut (80). Aufgrund der kurzen Molekülkette handelt es sich bei Fondaparinux um einen indirekten, selektiven Faktor Xa-Inhibitor, der im Gegensatz zu den Heparinen Thrombin über AT III nicht zu hemmen vermag (81).



Das synthetische Pentasaccharid Fondaparinux

Abbildung 3: Strukturformel des synthetischen Pentasaccharids Fondaparinux. Dessen Struktur ist dabei bis auf die α -Methylierung am reduzierenden Ende des disulfatierten D-Glucosamins analog zur Pentasaccharidsequenz der Heparine, deren Komplexbildung mit AT III synergetisch in die Gerinnungskaskade eingreift.

2.1.3 Einordnung des Heparins als Antikoagulans

Die Wirkstoffgruppe der Antikoagulantien bezeichnet eine Gruppe heterogener Substanzen, die in Wechselwirkung vor allem mit den Gerinnungsfaktoren des Blutes stehen. Durch die Antikoagulantien wird auf direktem oder indirektem Wege in die Gerinnungskaskade der Hämostase eingegriffen, indem diverse Gerinnungsfaktoren inhibiert oder der essentielle Vitamin-K-Spiegel abgesenkt werden (82).

Mechanistisch sind die beiden Gruppen der Antikoagulantien von den Thrombozytenaggregationshemmern (TAH), wie Acetylsalicylsäure, Clopidogrel, Prasugrel und Ticagrelor zu differenzieren, die sich zwar nicht in Bezug auf die therapeutische Zielsetzung, aber ihrem Wirkmechanismus und Target unterscheiden. Während Erstere ihre Wirkung über die Intervention in die Kaskade löslicher Gerinnungsfaktoren entfalten, hemmen Letztere die Fähigkeit der Thrombozyten zu verklumpen (83,84). Folglich erschließt sich ein breites Indikationsgebiet für Herz-Kreislauf-Erkrankungen, welche sich durch eine erhöhte Gerinnungsneigung, auch Hyperkoagulabilität genannt, gekennzeichnet sind. Therapeutische

und prophylaktische Anwendungszwecke stellen dabei sowohl akute thromboembolische Ereignisse wie tiefe Venenthrombosen (TVT) als auch sekundäre Myokardinfarkt-, Schlaganfallprophylaxe sowie postoperativer Thromboseprophylaxe dar (85–88).

Eine weitere Differenzierung der Antikoagulantien wird einerseits anhand deren direkter Interaktion mit den Gerinnungsfaktoren und andererseits des indirekten, kofaktorabhängigen Wirkmechanismus vorgenommen. Eine direkte Hemmung des Thrombins wird unter anderem mit Hilfe des natürlichen Polypeptids Hirudin und seines synthetischen Derivats Bivalirudin erzielt. Die intravenöse Therapie erfolgt bei Gefahr einer Heparin-induzierten Thrombozytopenie Typ II (HIT-II) (89). Zur Klasse der direkten oral wirksamen Antikoagulantien (DOAK) werden sowohl der direkte Thrombininhibitor Dabigatran als auch die direkten Faktor Xa-Inhibitoren Apixaban, Edoxaban und Rivaroxaban gezählt. Alle DOAK inhibieren den jeweiligen Gerinnungsfaktor direkt am aktiven Zentrum (90–92).

Zur Klasse der indirekten Antikoagulantien, die ihre Wirkung auf die Gerinnungskaskade über einen Kofaktor entfalten, gehören die bereits genannten Heparine UFH, Tinzaparin, Dalteparin und Enoxaparin sowie das synthetische Derivat Fondaparinux. Heparine und Fondaparinux werden subkutan injiziert und erzielen über die Wirkverstärkung von Antithrombin III die Inhibition der Gerinnungsfaktoren Thrombin bzw. Faktor Xa. Die allosterische Bindung und darauffolgende Komplexbildung mit AT III bewirken eine Konformationsänderung der Serinprotease, die deren Aktivität um ein Vielfaches steigert (83).

Des Weiteren sind die peroral gegebenen VKA den indirekten Antikoagulantien zuzuordnen. Die beiden 4-Hydroxycumarine Phenprocoumon und Warfarin hemmen die Vitamin-K-Epoxidreduktase kompetitiv, die das oxidierte Vitamin-K-Epoxid reduziert. Das Enzym steht am Beginn einer zweistufigen Enzymkaskade, die durch Reduktion das Epoxid in sein biologisch aktives Derivat Vitamin-K-Hydrochinon umwandelt. Dieses wiederum ermöglicht als Kofaktor des Enzyms γ -Glutamylcarboxylase die Bioaktivierung der Gerinnungsfaktoren Thrombin (II), VII, IX und X (82,93).

2.1.4 Heparin zur Prophylaxe venöser Thromboembolien

Wie auch in 2.1.1 aufgeführt, besitzen Patienten mit bösartigen Tumorerkrankungen ein bis zu neunfach höheres Risiko, thromboembolische Komplikationen zu entwickeln, als Gesunde (22). In den meisten Fällen handelt es sich mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit um eine venöse Thromboembolie (VTE), die sich am häufigsten in Form einer tiefen Venenthrombose (TVT) oder Lungenembolie äußert (94,95). Die Entstehungsmechanismen sind individuell und werden in tumor-, patienten- und therapiebezogene Kategorien eingeteilt. Patientenbezogene Faktoren

sind unter anderem Alter, Fettleibigkeit und Thrombozytenzahl. Insbesondere durch antitumorale Therapien wie Zytostatika, aber auch durch hormonelle Behandlungen oder Wachstumsfaktoren steigt das Risiko für Thrombosen an. Zusätzlich wirken sich Art des Tumors, sowie dessen Entität und Stadium auf das Thromboserisiko aus (96–99). Rund 15 % aller Tumorpatienten entwickelt eine VTE, die die 1-Jahres-Überlebensrate auf ungefähr ein Drittel im Vergleich zur Überlebensrate der VTE-freien Patienten reduziert. Gleichzeitig sind 20 % aller VTE auf tumorassoziierte Thrombosen zurückzuführen. Aufgrund dessen tragen VTE-Komplikationen in hohem Maße zur Krebsmortalität bei, sodass VTE als zweithäufigste Todesursache bei diesen Patienten gilt (100,101).

Folglich ist eine antithrombotische Prophylaxe oder akute Behandlung ein wesentlicher Bestandteil der klinischen Onkologie, insbesondere bei bestimmten Risikopatientengruppen. Bereits ab 1966 konnte gezeigt werden, dass die prophylaktische Gabe von Heparin das Auftreten vor allem von postoperativen Lungenembolien stark reduziert (17,102). Im Zuge dessen wurde niedrig dosiertes UFH in Kombination mit VKA in Therapiestrategien implementiert und stetig auch in Bezug auf tumorassoziierte Thrombosen weiterentwickelt (103–106). Mittlerweile werden LMWH und Fondaparinux besonders ambulant zunehmend als Erstempfehlung auf Kosten von UFH angewendet. Dies kann auf einige Faktoren zurückgeführt werden. Ausschlaggebend für LMWH sind die höhere Halbwertszeit und eine höhere therapeutische Breite. Daraus folgt ein geringeres Nebenwirkungsprofil bezogen auf Blutungen und HIT sowie der Vorteil, dass aufgrund der stabileren Pharmakodynamik der LMWH keine Notwendigkeit besteht den Koagulationsstatus zu überwachen. Aus der längeren Halbwertszeit folgt eine seltenere Applikation der LMWH und folglich eine höhere Adhärenz der Patienten. Zusätzlich tragen LMWH aufgrund ihrer erhöhten Faktor Xa-Inhibition im Vergleich zu Faktor IIa in geringerem Maße zur Thrombingenerierung bei und inhibieren die Plättchenaktivierung (107–109).

In der CLOT-Studie von 2003 wurde ermittelt, dass das LMWH Dalteparin in der Langzeittherapie therapeutische Vorteile gegenüber VKA bei gleichem Blutungsrisiko besitzt (110). Ebenfalls werden VKA zunehmend durch DOAK ersetzt (111). Die Internationale Initiative gegen Thrombose und Krebs (ITAC) sowie die Europäische Sozietät für Medizinische Onkologie (ESMO) weisen LMWH und Fondaparinux als Mittel der Wahl und Erstempfehlung in ihren Behandlungsrichtlinien bei kurz- und langfristiger Behandlung von tumorassoziierten VTE aus (112,113).

Obwohl der klinische Einsatz von Heparin und insbesondere der LMWH über Jahrzehnte etabliert ist, blieb offen, ob die Heparinbehandlung über die Antikoagulation hinaus weitere

antitumorale Eigenschaften hat. Zwar zeigte die CLOT-Studie keine Differenz der Überlebensrate der Tumorpatienten unter Behandlung mit Dalteparin und VKA, allerdings erhöhte die Gabe von Dalteparin die Überlebensrate der Patienten ohne bekannte Metastasen signifikant (110). Die folgende randomisierte Kontrollstudie (RCT) *Fragmin Advanced Malignancy Outcome Study* (FAMOUS) untersuchte die Korrelation einer täglichen Dalteparin-Intervention auf die Überlebensrate der Patienten unterschiedlicher Tumorstadien und -entitäten. Die Dalteparin-Therapie zeigte ebenfalls kein verbessertes Resultat für die Gesamtheit aller Patienten. Dennoch wies die Population mit guter Prognose abermals eine signifikant höhere Überlebensrate der Patienten mit guter Prognose auf (114). Spätere RCT wie FRAGMATIC aus dem Jahr 2016, sowie RASTEN aus 2018, welche die zusätzliche Gabe von Dalteparin bzw. Enoxaparin einer an Lungenkrebs erkrankten Patientenpopulation analysierten, zeigten weder einen Vorteil bezüglich des Gesamtüberlebens der Patienten noch gegenüber der Ausbildung von Metastasen (115,116). Erst die PaCT-Studie aus 2021 konnte an die These des Überlebensvorteils unter antikoagulative Behandlung aus der CLOT und FAMOUS-Studie anknüpfen. Karamouzis et al. erbrachten den Nachweis, dass die Gabe von Tinzaparin das progressionsfreie Überleben der Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom signifikant erhöht (117). In den letzten beiden Jahrzehnten gab es daher ein erhebliches Interesse an der präklinischen Forschung zur Identifizierung potenzieller antimetastatischer Effekte von LMWH, um die Entwicklung und Progression von Malignomen zu beeinträchtigen.

2.1.5 Antimetastatische Effekte des Heparins

Bei der Suche nach potentiellen Angriffspunkten von Heparin und LMWH für eine Hemmung der Tumormetastasierung wurde primär auf Adhäsionsrezeptoren aus der Selektin- und Integrinfamilie fokussiert. Zu Ersteren zählen die Adhäsionsmoleküle P-, L- und E-Selektin, welche als wichtige Kontaktbildner zwischen Tumorzellen, Endothel, Thrombozyten und Leukozyten dienen (118). P-Selektin befindet sich hauptsächlich in Vesikeln, wie den sogenannten Weibel-Palade-Körperchen (WPK) des Endothels sowie den α -Granula der Thrombozyten, und wird nach Aktivierung an der Oberfläche präsentiert. Über P-Selektin können Tumorzellen Thrombozyten zur Bildung von Heteroaggregaten immobilisieren um einen Schutzmantel ausbilden, der den hämodynamischen Scherstress reduziert (35,119,120). Physiologisch ist P-Selektin auch an inflammatorischen Prozessen über die Rekrutierung der Leukozyten beteiligt (35). Nach der Endothelaktivierung leitet P-Selektin das „Rollen“ der Leukozyten über Adhäsionsmoleküle bis hin zum Arrest und der Leukodiapedese am Entzündungsherd ein (121). Dabei konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass durch

Heparin-Gabe sowohl das P-Selektin induzierte Rollen der Leukozyten als auch die Ausbildung von Metastasen in Mäusen reduziert wurde (122,123). L-Selektin kommt ubiquitär auf Leukozyten vor und ermöglicht das Rollen der Leukozyten am aktivierten Endothel (119). Es konnte gezeigt werden, dass UFH und LMWH eine hohe Bindungsaffinität gegenüber P- und L-Selektin aufweisen (124). Borsig et al. zeigten in einer *in-vivo*-Studie, dass die konzertierte Blockade von murinem L- und P-Selektin durch Heparin Metastasen erheblich reduziert (125). Einen Einfluss auf das primär durch Endothelzellen exprimierte E-Selektin hat die Behandlung mit Heparinen nicht (126).

Bezüglich der Integrine sticht das leukozytäre *very-late antigen 4* (VLA-4) hervor, das auch durch Tumorzellen exprimiert werden kann (127). Dieses bindet das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül 1 (VCAM-1), das als Immunglobulin klassifiziert und hauptsächlich durch Endothelzellen nach Stimulation inflammatorischer Zytokine exprimiert wird. Die tumorseitige Expression des VLA-4 ermöglicht diesen die Anhaftung an Endothelzellen, um die Transmigration und Extravasation einzuleiten (128). In Versuchen konnte gezeigt werden, dass UFH und Enoxaparin die Bindung der B16F10 Melanomzellen an immobilisiertes VCAM-1 verhindert (129). Weitere Untersuchungen bestätigten, dass die beiden LMWH Tinzaparin und Enoxaparin die Interaktion der beiden Integrine maßgeblich durch die Blockade von VLA-4 inhibieren (130,131).

Wie bereits in Kapitel 2.1.1 ausgeführt, ist die TF-Expression in verschiedenen Tumorgeweben stark erhöht (29–31). Heparine induzieren bei Kontakt zu den Endothelzellen die Liberation des sogenannten *tissue-factor-pathway-inhibitor* (TFPI), der sich inhibitorisch auf die Gerinnungskaskade über die Faktoren VIIa und Xa auswirkt (132,133). In diesem Kontext wurde Enoxaparin mit einem modifizierten, nicht antikoagulativen LMWH verglichen. Beide LMWH erreichten eine Freisetzung von TFPI, sodass sie sich in Bezug auf die Reduktion der Anzahl an Lungenmetastasen nicht unterschieden (134).

Als weiterer Ansatzpunkt dient das Enzym Heparanase (HPSE), dessen im Zusammenhang mit malignen Erkrankungen gesteigerte Expression mit einer schlechten Prognose und Voranschreiten des Tumors assoziiert ist (135). In ihrer enzymatischen Funktion als Endoglykosidase katalysiert die HPSE die Spaltung der Heparansulfate (HS). Diese sind ein wesentlicher Bestandteil der EZM und besitzen aufgrund ihres polyanionischen Charakters zahlreiche Möglichkeiten an basische Aminosäuren der Plasmaproteine zu binden. Die Glykosaminoglykane sind in hohem Maße an Proteine gebunden und bilden mit diesen aufgrund einer besonders starken Glykosylierung die Klasse der Proteoglykane. Auf diese Weise stellen die Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) ein Depot für zahlreiche

Wachstumsfaktoren und Zytokine dar und schützen diese vor der Proteolyse und Denaturierung. Durch den HPSE-induzierten Abbau der HSPG werden diese aus der EZM freigesetzt (136,137). Über die Liberation der Wachstumsfaktoren VEGF und PDGF induziert die Aktivität der HPSE auf direktem und indirektem Wege die Angiogenese und erleichtert die Extravasation des Tumors (138). Additiv trägt HPSE ebenfalls über nicht-enzymatische Aktivität durch Transkription von TF, der Matrix-Metalloproteasen (MMP) und proangionetischer, prometastatischer, proinflammatorischer, Wachstumsfaktoren und Zytokinen wie VEGF, TGF- β 1 und Tumornekrosefaktor α (TNF- α), IL-8 und IL-10 zur Metastasierung bei (139–142).

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von UFH und LMWH zu HS besitzen diese eine hohe Affinität zur HPSE. Da Heparine im Gegensatz zum Substrat HS nicht durch die HPSE umgesetzt werden können, eignen sie sich als potente Inhibitoren. In einer Studie an MDA-MB-231 Zellen wurde gezeigt, dass das Vorkommen der HPSE durch die Behandlung mit UFH reduziert wird (143). Darauf abzielend, die antithrombotische Wirkung der LMWH von anderen unerwünschten Arzneimittelwirkungen (UAW) wie Blutungen gezielt zu trennen, wurden per chemischer Modifikation nicht gerinnungshemmende Heparinderivate entwickelt (Kapitel 2.1.2). In Bindungsstudien zeigte die jeweilige partielle Desulfatierung an C2, C3 und C6 bei stark reduzierter antikoagulatorischer Aktivität die gleiche IC_{50} an der HPSE wie ein kommerzielles Heparin. Selbiges konnte mittels glykolgespaltenenem RO-Heparin dargelegt werden. Eine N-Acetylierung des Stickstoffrests und somit Substitution des Sulfats erbrachte eine Minderung sowohl der antikoagulatorischen Potenz als auch bezüglich der Inhibition der HPSE (144). Untersuchungen der HPSE-Aktivität zum EZM-Abbau durch Naggi und Kollegen bestätigten die Resultate. Die Testung von RO-Heparinen ergab eine deutliche Steigerung der HPSE-Inhibition bezogen auf die relative Häufigkeit der Glykolspaltung in der Molekülkette. Es wird ein Zusammenhang der Bildung der Glykolspaltreste mit einer höheren sterischen Flexibilität der Struktur und Konformationsänderungen postuliert (145). Weitere Untersuchungen beschäftigen sich mit der gezielten Isolation und Aufreinigung einzelner Molekülketten definierter Länge aus UFH und LMWH. In Bezug auf die Funktionsweise als HPSE-Inhibitor führte dies bereits zur Entwicklung klinischer Arzneimittelkandidaten (137). Als ein weiterer Aspekt bezogen auf antimetastatische Effekte kristallisieren sich lösliche Mediatorstoffe heraus, die an einigen tumorassoziierten Prozessen beteiligt sind. Das Zusammenspiel des Chemokins CXCL12 und dessen Rezeptor CXCR4 ist in die Angiogenese, Metastasierung, und Tumorproliferation sowie dessen verminderte Apoptose involviert (146). In einem *in-vitro*-Versuchsansatz mit CXCR4⁺ Mammakarzinomzellen konnten sowohl UFH

als auch das LMWH Tinzaparin die chemotaktische Leukozytenrekrutierung zu blockieren. Dies wurde durch eine Bindung des Heparins an dessen Liganden CXCL12 erreicht. In einem weiteren *in-vivo*-Experiment bewirkte die Applikation von Tinzaparin eine Reduktion der Größe und Anzahl der Metastasen in Mäusen (147,148). Ebenso war die Inkubation von Kolorektalkarzinomzellen mit dem LMWH Enoxaparin sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in Bezug auf eine deutliche Abschwächung der Migration und Proliferation der Zelllinie erfolgreich (149). In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass Heparine die Mediatorfreisetzung aus aktivierten Thrombozyten beeinflussen. Es wurde festgestellt, dass eine verringerte VEGF-Freisetzung mit einer veränderten Zusammensetzung der Mediatoren von proangiogenetisch hin zu antiangiogenetisch einhergeht (150,151). In einer Versuchsreihe zur Blockade der VEGF/VEGF-Rezeptor-Interaktion durch Heparine kam der Kettenlänge eine entscheidende Bedeutung zu. Es wurde nachgewiesen, dass eine Kettenlänge von > 22 Saccharideinheiten (UFH) die Bindungsfähigkeit von VEGF leicht erhöht, wohingegen Moleküle mit < 18 Saccharideinheiten (LMWH) die VEGF/VEGFR-Interaktion besonders stark interferieren (152). Außerdem zeigte eine weitere Studie, dass UFH und insbesondere LMWH im Peritoneum die Angiogenese durch eine reduzierte Expression von VEGF, Hypoxie-induzierter Faktor 1 α (HIF-1 α) und TGF- β 1 absenkt (153). Des Weiteren wurde *in vitro* an Pankreaskarzinomzellen und Prostatakarzinomzellen analysiert, dass die EMT-Induktoren wie PDGF und TGF- β 1 durch Behandlung mit UFH und Enoxaparin reduziert wurden (154,155).

2.1.6 Antiinflammatorische und immunonkologische Eigenschaften des Heparins

Bei einer Sepsis besteht trotz der indizierten Gabe von Antibiotika eine erhöhte Sterblichkeit. Obwohl die Pathogenese eines septischen Schocks bis heute nicht vollends aufgeklärt ist, wurde festgestellt, dass die Mortalität mit Gerinnungsstörungen korreliert (156,157). Durch kleine Gewebläsionen werden winzige Thromben gebildet, die wiederum aus dem Synergismus entzündlicher Mediatoren und einer aktivierten Gerinnungskaskade resultieren (158). Der therapeutische Einsatz des Heparins gegen Sepsis erwies sich in mehreren Studien als wirksames Adjuvans, um die Mortalität der Patienten mit Gerinnungsstörungen zu senken (159). Neben des erhöhten Überlebensvorteils durch Verbesserung der Gerinnungsparameter ließ sich die Wiederherstellung der EZM und eine Reduktion inflammatorischer Zytokine wie TNF- α und IL-6 beobachten (160,161). Daraus leitete sich ein zunehmendes Interesse ab die direkten intrinsischen Effekte des Heparins auf das Immunsystem zu analysieren.

Heparine weisen als polyanionische Makromoleküle ein hohes Potenzial zur elektrostatischen Interaktion mit Plasmaproteinen auf. Weiteres Interaktionspotenzial besteht mit membrangebundenen Proteinen und Rezeptoren, sowie Liganden aus intrazellulären Kompartimenten oder Vesikeln (162).

Das Komplementsystem repräsentiert den humoralen Teil der angeborenen Immunantwort und besteht ausschließlich aus löslichen Plasmaproteinen. In seiner Funktion ist es maßgeblich an der Beseitigung von Pathogenen, Rekrutierung weiterer Immunzellen und der Auslösung der adaptiven Immunantwort beteiligt (163). Durch die elektrostatischen Kräfte beeinflussen die Wechselwirkungen der Heparine die einzelnen Komplementfaktoren des klassischen und alternativen Aktivierungswegs. Dabei werden sowohl die Bildung der C3-Konvertase und des Membranangriffskomplexes (MAK) reduziert (164). Zusätzlich wird die verringerte Thromboseneigung bei Tumorpatienten aufgrund einer Inhibition des Komplementsystems durch Heparin diskutiert. In einem Mausmodell wurde die Annahme einer Reduktion der beiden prothrombotischen Komplementfaktoren C3 und C5 und resultierender verringerter Gerinnung bestätigt (165). Durch eine Aktivierung des C3a-Rezeptores durch den Komplementfaktor C3a auf Neutrophilen wurde die Induktion der NETose nachgewiesen, die eng mit tumorassoziierten Thrombosen verknüpft ist (166). Weitere Hypothesen benennen das Komplementsystem als Faktor eines protumoralen Milieus, indem Leukozyten rekrutiert und phänotypisch manipuliert werden (167). Das Komplementsystem stellt daher eine Verbindung zwischen den Neutrophilen und der zellulären adaptiven Immunantwort her. Es besitzt Möglichkeiten zur Aktivierung der zellulären Komponenten wie Endothel, Thrombozyten und der Neutrophilen sowie der Modulation der adaptiven Immunantwort (168,169). In diesem Kontext wird daher auch von sogenannten „Immunothrombosen“ gesprochen, um ein Zusammenspiel zwischen der zellulären und humoralen Bestandteile der Hämostase sowie des Immunsystems zu verdeutlichen (170).

Wie bereits in 2.1.1 beschrieben tragen Neutrophile Granulozyten auf verschiedenen Wegen zur hämatogenen Metastasierung bei. Dabei ist die Funktionalität der β_2 -Integrinfamilie essentiell, die hauptsächlich auf Neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Makrophagen vorkommt und deren Kontakt zum Endothel und Plättchen ermöglichen (171). Eine Aktivierung der Neutrophilen durch proinflammatorische Mediatoren wie IL-8, C5a oder aus Plättchen fördert die Expression und Translokation an die Zellmembran. Folglich ist eine starke Endotheladhäsion über dessen natürlichen Liganden Intrazelluläres Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1) und die anschließende Leukodiapedese möglich (172). Heparin und seine modifizierten Derivate greifen sowohl über die Expression und direkte Bindung an ICAM-1 als

auch über den CD11/CD18-Komplex (CD = *cluster of differentiation*) regulierend ein, indem sie direkte Interaktionen über die Glykoproteine verhindern (173–175).

Insbesondere der über Neutrophile Granulozyten initiierte Prozess der NETose ist mit der Thrombogenese assoziiert (47). Dabei können Neutrophile sowohl direkt durch den Tumor über TF, mittels Thrombozyten oder mit Hilfe des Komplementsystems zur NETose angeregt werden. Das breitgefächerte DNA-Netzwerk selbst trägt wiederum zur Bildung von Thrombosen bei. Aufgrund der Tatsache, dass es sich hierbei um positiv geladene Filamente handelt, besitzen die polyanionischen Heparine eine hohe Bindungsaffinität zu diesen und schirmen sie gegenüber anderen Einflussfaktoren ab (176,177). Insbesondere nichtantikoagulative Heparinderivate konnten hier einen Beitrag anhand eines Mausmodells aufzeigen (178).

Neben den Neutrophilen Granulozyten werden auch die NK-Zellen in ihrer Zytotoxizität durch Heparine und dessen chemisch modifizierte Analoga beeinflusst. Higai et al. zeigten in einer Studie, dass Heparine und weitere sulfatierte Polysaccharide eine hohe Bindungsaffinität zu rekombinanten Peptidsequenzen von NKG2D und der CD94-Rezeptorfamilie aufweisen (Kapitel 2.2.2). Vor allem die O- und N-Sulfatierungen stellten sich als essentiell für die Bindungsaffinität heraus (179). Zusätzlich wird der Einfluss der Bindung von Heparin und HS an weitere natürliche Zytotoxizitätsrezeptoren (NCR) auf die Modulation der NK-Zytotoxizität durch Autostimulation mit IFN- γ diskutiert (180,181).

Wie in 2.1.1 erläutert, hat die tumorinduzierte Plättchenaktivierung mitsamt der aus Granula sezernierten Mediatoren erhebliche Auswirkung auf die NK-vermittelte Zytotoxizität. Kopp et al. zeigten, dass insbesondere der Einfluss von TGF- β 1 die Expression des aktivierenden NKG2D-Rezeptors und dadurch die NK-vermittelte Lyse unterdrückt (182). Gockel und Kollegen demonstrierten die unterschiedlich starken Effekte der Heparine auf die Aktivität von CD8⁺ und NK-Zellen sowie auf das Differenzierungsverhalten der CD4⁺ T-Lymphozyten in regulatorische T-Zellen unter Einfluss von tumorzellaktivierten Plättchen. Dabei wurde festgestellt, dass insbesondere UFH die Zytotoxizität der CD8⁺ Lymphozyten und NK-Zellen wiederherstellen konnte. Additiv zeigten UFH, LMWH und Fondaparinux eine signifikante Reduktion der Differenzierung CD4⁺ T-Zellen in immunsuppressive T_{reg} (183).

Im Zuge der Tumorthérapien mit Immuncheckpoint-Inhibitoren (ICI) tritt eine erhöhte Inzidenz an Thrombosen auf. Welcher Mechanismus diesem Effekt zugrunde liegt, ist nach wie vor unklar (184). Allerdings besteht eine Wechselwirkung zwischen Thrombozyten, Monozyten und Makrophagen, da eine simultane Gabe des direkten FXa-Inhibitors Rivaroxaban sowohl die Rekrutierung und lokale Zytotoxizität der CD8⁺ T-Zellen verstärkten als auch die Anti-PD-

1-Therapie verbesserten (185,186). Dadurch rücken die Thrombozyten in den Fokus, zumal diese über die PD-L1-Expression direkten Einfluss auf die die T-Zellen ausüben und somit die Wirksamkeit der ICI-Therapie mit PD-1-Antikörpern über die Freisetzung von TGF- β 1 abschwächen könnten (187,188). Neutrophile Granulozyten zeichnen sich ebenfalls durch PD-L1-Expression aus (189). Ein hohes Verhältnis der Neutrophilen im Vergleich zu Lymphozyten ist daher mit einer geringen Überlebensrate von Tumorpatienten assoziiert. In verschiedenen Studien setzten sie sowohl die Tumorinfiltrationsrate der T-Zellen in pankreatischen Adenokarzinomen herab und limitierten zusätzlich das Ansprechen der indizierten PD-1-Therapie, sowie der CTLA-4-Therapie in bösartigen Melanomen (190–192).

Heparine interferieren an vielen Schnittstellen zwischen Thrombosen, Immunsystem und Tumor und eignen sich daher sowohl als direktes wie indirektes Agens.

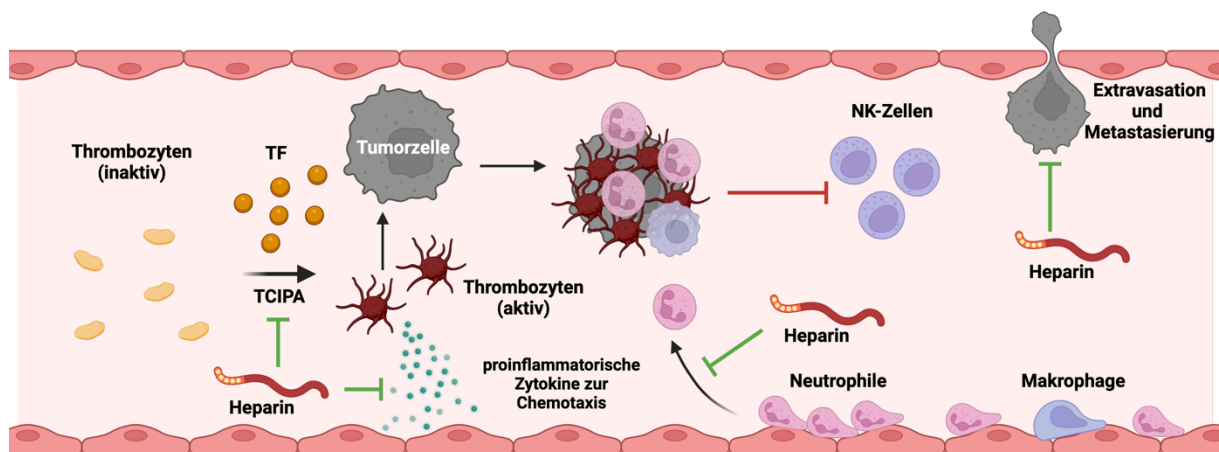


Abbildung 4: Darstellung der antitumoralen Interventionspunkte (grün) für Heparin in der hämatogenen Metastasierung. Heparine hemmen die TCIPA ausgelöst durch TF. Die ladungsinduzierte Bindung proinflammatorischer Zytokine inhibiert die Endothelaktivierung und verhindert so die Rekrutierung der Granulozyten und Makrophagen durch die Verminderung der Chemotaxis. Zusätzlich wird über die Bindung diverser Adhäsionsmoleküle die Bildung eines Agglomerats aus Thrombozyten, Immun- und Tumorzelle gefördert, das Letztere vor Scherstress und der Zytotoxizität der NKZ schützt (rot). Additiv wird die Extravasation der Tumorzelle und damit die Ausbildung eines Sekundärtumors reduziert. Die Abbildung wurde mit Hilfe von BioRender.com erstellt.

2.2 Immunonkologie

2.2.1 Immunsystem

Das Immunsystem dient dem Körper in seiner primären Funktion der Abwehr exogener Krankheitserreger. Gleichfalls wird es zur Eliminierung deregulierter endogener Körperstrukturen wie beispielsweise Tumorzellen benötigt. Dessen Aufbau besteht aus mehreren redundanten Abwehrmechanismen, die sich in ihrer Funktionsweise aber auch synergistisch in der Beseitigung der Pathogene ergänzen. Den ersten wichtigen Abwehrmechanismus stellen Haut und Schleimhäute des Organismus dar, indem sie sich als mechanische, sowie chemische Barriere gegen exogene Pathogene wie Bakterien, Pilze und Viren erweisen. Wird diese physiologische Barriere überwunden setzt unmittelbar die angeborene Immunantwort ein und beseitigt die Pathogene unspezifisch. Reicht diese Sofortreaktion nicht aus schaltet sich die sogenannte adaptive Immunantwort dazu. Diese erlaubt eine spezifische Erkennung und Beseitigung der Erreger und stellt über die Ausbildung des immunologischen Gedächtnisses einen verbesserten Schutz gegenüber demselben Erreger bei einer Reinfektion sicher (193).

2.2.2 Angeborenes Immunsystem

Das angeborene Immunsystem ist, wie die Eigenbezeichnung suggeriert, bereits bei einem Neugeborenen aktiv. Es setzt sich aus den zwei humoralen, löslichen Bestandteilen des sogenannten Komplementsystems und den Zytokinen sowie einer zellulären Komponente zusammen. Zur zellulären angeborenen Immunantwort werden myeloische Zellen wie die Neutrophilen, Eosinophilen und Basophilen Granulozyten, Mastzellen, Monozyten mitsamt den ausdifferenzierten Makrophagen, sowie dendritische Zellen (DC) und NK-Zellen gezählt. Zur Erkennung der Pathogene bedient sich die angeborene Immunantwort der sogenannten Mustererkennungsrezeptoren (PRR = *pattern recognition receptor*). Dabei sind die PRR wie die Toll-like-Rezeptoren (TLR) auf der Zelloberfläche lokalisiert. Sie erlauben die Erkennung exogener, pathogenspezifischer Molekülmuster (PAMP = *pathogen-associated molecular pattern*) wie bspw. Lipopolysaccharide (LPS), die auf zahlreichen gramnegativen Erregern vorhanden sind. Die Aktivierung der TLR führt zu einer gesteigerten Expression proinflammatorischer Zytokine wie Chemokine, Tumornekrosefaktoren (TNF), Interleukine (IL) und Interferone (IFN). Diese können weitere Immunzellen rekrutieren und durch deren Stimulation Immunreaktionen modulieren. Des Weiteren aktivieren PRR über die korrespondierenden Liganden auf Phagozyten zur Internalisierung und Abbau des Pathogens. Dieser Prozess wird dementsprechend als Phagozytose bezeichnet (194).

Ein weiterer Teil des humoralen Systems stellt die Proteinkaskade des Komplementsystems dar. Das Komplementsystem besteht aus löslichen Proteinen deren Basis aus den Komplementfaktoren C1-9 besteht. Eine Aktivierung kann über den klassischen Weg durch Antikörper, den Lektin-Weg durch Mannose-bindendes Lektin (MBL) oder den alternativen Weg ohne Antikörper erreicht werden (195). Allen Aktivierungswegen ist gemein, dass nach einer mehrstufigen Enzymkaskade aus Spaltungen und Zusammenlagerungen der Faktoren die Serinprotease C3-Konvertase vorliegt. Von dieser ausgehend werden in einer weiteren Enzymkaskade Effektorproteine generiert, die als Anaphylatoxine fungieren, chemotaktisch Leukozyten rekrutieren und als Opsonine die Phagozytose unterstützen, sowie durch die Bildung des Membranangriffskomplex (MAK) selbst lytische Aktivität entfalten (168).

Die Phagozytose kann durch mehrere Zellarten der angeborenen Immunantwort wie den Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und der DC, sowie den antigenpräsentierenden Zellen (*APC = antigen presenting cell*) bewerkstelligt werden. Die Makrophagen machen dabei den Hauptanteil unter den Phagozyten aus. Sie nehmen die Pathogene und Zelltrümmer über vesikuläre Phagosomen auf, die mit den zytosolischen Lysosomen verschmelzen, woraufhin hydrolytische Enzyme wie die Proteasen das Pathogen verdauen. Zusätzlich können Makrophagen per Sekretion inflammatorischer Zytokine weitere Immunzellen wie Monozyten, Neutrophile und Lymphozyten zum Entzündungsherd rekrutieren. Zusätzlich können Makrophagen die Antigenpräsentation übernehmen, indem sie abgebaute Fragmente der Pathogene auf der Oberfläche über den Haupthistokompatibilitätskomplex (*MHC = major histocompatibility complex*) externalisieren (196).

Durch ihre zahlreichen intrazellulären Granula erscheinen Granulozyten nach außen hin als polymorphkernige Zellen. Sie machen den größten Anteil unter den Leukozyten aus und werden wiederum am häufigsten durch die Neutrophilen repräsentiert. Die Bezeichnungen Basophile und Eosinophile begründen sich durch das Färbungsverhalten ihres Zytoplasmas gegenüber verschiedenen basischen oder sauren Farbstoffen (197). Neben ihrer Eigenschaft als Phagozyt zeichnet sich die Aktivität der Basophilen und Eosinophilen hauptsächlich durch die Freisetzung ihrer intrazellulären Granula aus. Erstere setzen dabei ähnlich den Mastzellen Botenstoffe wie Histamin, Heparin, IL-4 und Proteasen frei, die der unspezifischen Bekämpfung von Parasiten oder einer allergischen Reaktion Vorschub leisten (198,199). Eosinophile sezernieren kationische Proteine wie das *Major Basic Protein* und Kathepsine, die sich ebenfalls unspezifisch gegen Parasiten richten (200). Neutrophile sind der erste Zelltyp der auf Basis chemotaktischer Signale wie IL-8 zum Entzündungsherd gelangt. Ihre Eigenschaft

als Immunzelle weisen sie durch Phagozytose, Sekretion proteolytischer, antimikrobieller Enzyme wie die neutrophile Elastase und dem Erstellen der NET in Blutgefäßen aus (201).

Dendritische Zellen übernehmen neben ihrer Fähigkeit zur Phagozytose den Hauptanteil der Antigenpräsentation. Unreife DC erkennen PAMP über PRR und nehmen diese auf, woraufhin die interne Prozessierung eine Reifung der DC zur APC induziert. In der Folge steigt die Expression und Externalisation der MHC-Moleküle zur Präsentation der prozessierten Peptidfragmente. Die simultane Expressionssteigerung der sogenannten kostimulatorischen Moleküle ermöglichen den Kontakt und die Aktivierung der T-Lymphozyten, wodurch die APC eine wichtige Schnittstelle zwischen der angeborenen und adaptiven Immunantwort darstellen (202).

Ein weiterer wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunantwort sind NK-Zellen mit ihrer Fähigkeit Pathogene, infizierte körpereigene Zellen und Tumorzellen zu eliminieren. Die Zytotoxizität der NK-Zellen als Teil des angeborenen Immunsystems wird im Gegensatz zur adaptiven Immunantwort unabhängig der spezifischen Antigenpräsentation gesteuert. Dementsprechend erfolgt die Differenzierung der NK-Zelle zwischen endogenen, gesunden Zellen und infizierten, entarteten Zellen über Interaktionen des MHC-I-Komplexes der Zielzelle mit der NKG2-Rezeptorfamilie (CD94), die sich in inhibitorische und stimulatorische Rezeptoren aufteilt. Die Inhibition der NK-Zytotoxizität wird durch Interaktion des MHC-I-Komplexes der Zielzelle mit dem NKG2A-Rezeptor vermittelt. Der Verlust des MHC-I-Komplexes bei einer infizierten oder entarteten Zelle bedingt analog den Verlust der Kommunikation mit den inhibitorischen Rezeptoren wie NKG2A, die das austarierte Gleichgewicht in Richtung der stimulatorischen Reize verschiebt. In der Folge der *missing self-recognition* wird die entartete Zelle erkannt und aufgrund eines Überwiegens der aktivierenden Reize durch die lytische NK-Aktivität eliminiert. Zusätzlich entfalten NK-Zellen aufgrund einer *induced self-recognition* über aktivierende Rezeptoren wie NKG2D mit den entsprechenden Liganden der entarteten Zielzelle ihre lytische Aktivität.

Weitere Rezeptoren, die nach einer Aktivierung die NK-Zytotoxizität durch Freund/Feind-Differenzierung vermitteln, sind die drei natürlichen zytotoxischen Rezeptoren (NCR) NKp46, NKp44 und NKp30 (203–205). Der nach dem Schema des biologischen Differenzierungsclusters der Zellen als CD16 titulierte Fc γ -Rezeptor III erlaubt den NK-Zellen die Zerstörung antikörpermarkierter Zellen (206). Neben der als antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC = *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) üben NK-Zellen ihre zytotoxische Funktion über die Liberation der in Granula gelagerten Proteine wie Perforin und den Granzymen aus. Hierbei handelt es um einen Synergismus, indem die

Perforine analog ihrer Bezeichnung die Membran der Zielzelle durchlöchern und folglich den Granzymen über den Zugang ins Zytoplasma die Einleitung der Apoptose ermöglichen (207). Durch weitere ligandenvermittelte Mechanismen wie das Fas/FasL-System und TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) wird unabhängig von Perforin über Caspase-8 ebenfalls die Apoptose der Zielzelle ausgelöst (208,209).

Anhand der Expression des ADCC-Markers CD16 lassen sich NK-Zellen in zwei unterschiedlich zytotoxische Subtypen klassifizieren. Der weniger zytotoxische Subtyp lässt sich über eine erhöhte Expression des Adhäsionsmoleküls CD56 bei simultan verringerter Expression von CD16 von der Hauptgruppe unterscheiden. Sie werden daher im Gegensatz zu den zytotoxischen $CD16^+CD56^{dim}$ NK-Zellen als $CD16^-CD56^{bright}$ bezeichnet (210). Zusätzlich zur Sekretion zytotoxischer Granula sezernieren NK-Zellen die proinflammatorischen Zytokine $IFN-\gamma$ und $TNF-\alpha$, die die Aktivität weiterer Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems modulieren. Dabei induziert $TNF-\alpha$ die Apoptose der Zielzelle, wohingegen $IFN-\gamma$ eine autoregulative Stimulation der NK-Zellen bewirkt (211).

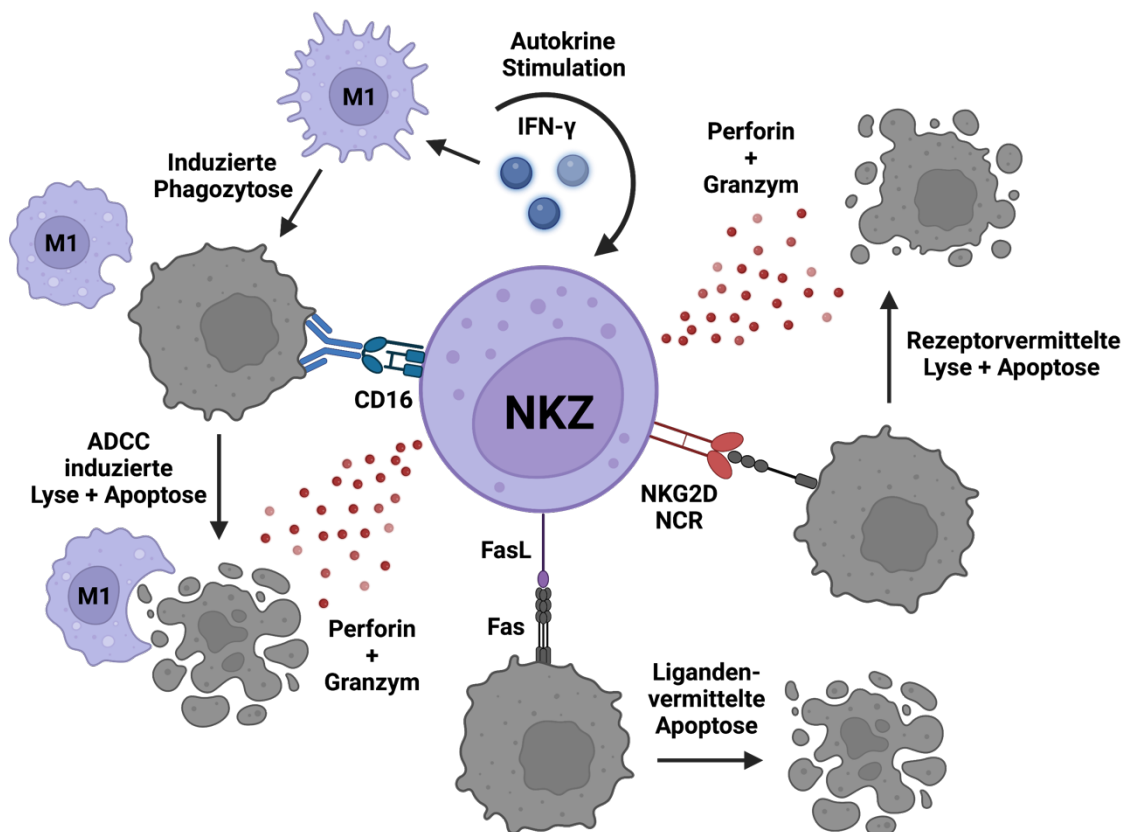


Abbildung 5: Darstellung ausgewählter zytotoxischer Funktionen der NK-Zellen in der TMU. NK-Zellen üben ihre Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen aus, indem sie deren Apoptose einleiten. Dies geschieht rezeptorgesteuert über die CD94/NKG2-Rezeptorfamilie und NCR sowie per ADCC über CD16 indem die zytotoxischen Synergisten Perforin und Granzyme sezerniert werden. Des Weiteren wird die Apoptose ligandenvermittelt über das Fas-FasL-System induziert. Additiv sezernieren NK-Zellen $IFN-\gamma$ zur Induktion der M1-Makrophagen und autokrinen Stimulation. Die Abbildung wurde mit Hilfe von BioRender.com erstellt.

2.2.3 Adaptives Immunsystem

Die adaptive oder auch erworbene Immunantwort stellt die Weiterführung zur Bekämpfung einer Infektion dar, falls diese nicht durch die angeborene Immunantwort allein beseitigt werden kann. Dabei bietet die adaptive Immunantwort durch ihre Fähigkeit der Anpassung an ein Pathogen eine weitaus spezifischere Erkennung und gezielte Eliminierung der Erreger oder infizierter Zellen. Pathogenassoziierte Antigene wie Peptidfragmente werden an der Zelloberfläche der *APC* den Lymphozyten präsentiert, welche die Hauptakteure der adaptiven Immunantwort im Blut, der Lymphe und lymphatischen Organen darstellen. Lymphozyten werden in die beiden Subtypen der B- und T-Lymphozyten klassifiziert, die gemäß der Hämatopoese eine gemeinsame Vorläuferzelle aufweisen. Analog zum Angeborenen wird auch das Adaptive Immunsystem in eine humorale und zelluläre Komponente unterteilt (194).

Die humorale Komponente wird durch die B-Zellen in Form deren sezernierten Antikörper repräsentiert. B-Zellen verfügen aufgrund des B-Zellrezeptors (BCR) über die Fähigkeit zur Phagozytose von exogenen Pathogenen. Nach der Internalisierung und Prozessierung kann das Antigen über den MHC-II-Komplex präsentiert werden, weshalb B-Zellen auch als *APC* fungieren können. Nach der Erkennung über den BCR differenzieren B-Lymphozyten in Plasmazellen, die antigenspezifische Antikörper produzieren und sezernieren (212). Diese markieren das Pathogen einerseits als Opsonine zur Phagozytose durch Makrophagen oder bewirken über ADCC deren unmittelbare Lyse (193). Nach Beseitigung des Pathogens wandelt sich ein Teil der B-Zellen in sogenannte ruhende B-Gedächtniszellen umgewandelt, die bei erneuter Exposition eine schnellere, stärkere Immunantwort auslösen. Die Fähigkeit der B-Gedächtniszellen macht man sich bei einer Vakzinierung zu nutze (213).

Die zelluläre adaptive Immunantwort wird seitens der T-Zellen vermittelt. Auf die Bildung im Knochenmark folgt die Migration in den Thymus mit anschließendem Reifungsprozess. Hierbei werden der T-Zellrezeptor (TCR), sowie dessen Korezeptoren ausgebildet, die entsprechend des Differenzierungsstatus und der späteren Funktion als CD4 und CD8 bezeichnet werden. In einem mehrstufigen Selektionsprozess werden die zunächst doppelt positiven CD4⁺CD8⁺ T-Zellen hinsichtlich der Funktionsfähigkeit ihres TCR zur Antigenerkennung überprüft und nicht-funktionale T-Zellen durch Einleitung der Apoptose entfernt (194).

Der wichtigste Schritt zur Aktivierung und Differenzierung naiver T-Zellen in Effektor-T-Zellen findet über den Kontakt zu *APC* statt. Hierbei wird das erste Signal der *APC* über den TCR, der die prozessierten Peptide der *APC* an deren MHC-Komplexen erkennt. Der TCR bildet gemeinsam mit CD3 den TCR/CD3-Rezeptorkomplex, in dem Letzteres zur Signalverstärkung des TCR dient. Die beiden Korezeptoren CD4 oder CD8 des TCR/CD3-

Rezeptorkomplexes stabilisieren durch ihre zusätzliche Bindung an den MHC-Komplex den Kontakt zwischen *APC* und naiver T-Zelle (214). Dabei unterstützt der CD4-Korezeptor die Bindung an MHC-II-Moleküle, wohingegen CD8 eine Affinität zu MHC-I-Molekülen besitzt (215). Ein zweites Signal bewirkt eine zusätzliche Stimulation der naiven T-Zelle durch die beiden an der Oberfläche der *APC* lokalisierten kostimulatorischen B7-Moleküle. Die kostimulatorischen Liganden CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) interagieren mit dem B7-Rezeptor CD28 der T-Zelle. Die stabile Verbindung zweier Immunzellen über die Rezeptorkomplexe und weitere Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 wird auch als immunologische Synapse bezeichnet. Daraufhin werden per Aktivierung von CD28 einige Zytokine wie IL-2 exprimiert und sezerniert, sowie die Expression von CD25 gesteigert (216). Da es sich bei CD25 um eine Seitendomäne des IL-2-Rezeptors handelt, der dessen Sensitivität für IL-2 erhöht, induziert dessen erhöhte Expression die Proliferation der T-Zellen autokrin (217).

Ein drittes Signal zur endgültigen Differenzierung in die jeweilige Effektor-T-Zelle wird durch verschiedene Zytokine ausgelöst (216,218). Die Aktivierung durch MHC-I-Peptidkomplexe der *APC* lässt naive CD8⁺ T-Zellen in zytotoxische T-Lymphozyten differenzieren (CTL = *cytotoxic T lymphocyte*). Weitere benötigte Zytokine für diesen Prozess sind Typ I Interferone und IL-12. Die Funktionalität der CTL besteht in der Erkennung der infizierten Wirts- und Tumorzellen über ihre MHC-I-Peptidkomplexe mittels TCR, die in der Folge über verschiedene Mechanismen pathogenspezifisch beseitigt werden. Hierbei nutzen CTL ähnlich den NK-Zellen sowohl den Synergismus der lytischen Enzyme Perforin und Granzym, als auch das ligandenvermittelte Fas/FasL-System zur Induktion der Apoptose. Des Weiteren sezernieren CTL proinflammatorische Zytokine wie IFN- γ , TNF- α und IL-2 (219).

Im Gegensatz zu den NK-Zellen sind CTL für eine zielgerichtete Erkennung der Zielzelle auf das Vorhandensein des MHC-I-Antigenkomplexes angewiesen, um infizierte oder entartete Zellen zu erkennen und eliminieren. Die Differenzierung der CD4⁺ T-Zellen in verschiedene Subpopulationen der CD4⁺ Effektor-T-Zellen wird auch synonym unter dem Sammelbegriff der T-Helferzellen (T_H) zusammengefasst (220).

2.2.4 T-Helferzellen

Die Funktionalität der CD4⁺ Effektor-T-Zellen besteht darin, durch direkten Zellkontakt oder mittels sezernierter Zytokine weitere Immunzellen und deren Effektorfunktionen zu koordinieren. T-Helferzellen interagieren dabei sowohl mit Zellen des angeborenen Immunsystems wie NK-Zellen und Makrophagen als auch mit B-Zellen und CTL aus der adaptiven Immunantwort. Die Differenzierung in verschiedene Subtypen der T-Helferzellen je

nach Einfluss der kostimulatorischen Moleküle und des vorhandenen Zytokinstimulus erlaubt eine besonders zielgerichtete Immunantwort (221).

Folglich lassen sich die Subpopulationen der CD4⁺ T-Helferzellen anhand ihrer Zytokinprofile verschiedene physiologische Funktionen zuordnen. Der Typ 1 der T-Helferzellen (T_{H1}) richtet sich primär gegen intrazelluläre Erreger und Tumorzellen. Die Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen in T_{H1}-Zellen wird über die Stimulation mit IFN- γ und IL-12 erreicht. IL-12 wird in großen Mengen seitens der APC sezerniert, das wiederum die IFN- γ -Produktion durch NK-Zellen fördert. Außerdem regt IFN- γ über den STAT-1-Signalweg die Expression des Haupttranskriptionsfaktors T-box exprimiert in T-Zellen (T-bet) für T_{H1}-Zellen an. Der Transkriptionsfaktor T-bet verhindert die direkte Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen in weitere Subtypen wie T_{H2} und T_{H17}-Zellen und fördert die Expression des IFN- γ und IL-12-Rezeptors, was in einer positiven Rückkopplung zur Verstärkung der T-bet-Expression und der zellulären Immunabwehr führt. Des Weiteren moduliert die Sekretion von IFN- γ und IL-2 eine erhöhte zytotoxische Aktivität und Proliferation von CTL und Makrophagen. Zusätzlich können Makrophagen unter IFN- γ auch direkt über den Liganden CD40L der T_{H1}-Zellen an CD40 aktiviert und verstärkt zur Phagozytose angeregt werden (222).

T_{H2}-Zellen sind an der humoralen Immunantwort gegen extrazelluläre Erreger beteiligt und bilden sich durch Differenzierung aus naiven CD4⁺ T-Zellen unter Einfluss von IL-4. Die Stimulation durch IL-4 bewirkt die Expression des Transkriptionsfaktors GATA-Sequenz bindendes Protein 3 (GATA3), der die Produktion der T_{H2}-Effektorzytokine IL-4, IL-5 und IL-13 anregt. Additiv blockiert GATA3 die Expression des Transkriptionsfaktors T-bet und somit die Differenzierung in T_{H1}-Zellen. Über die T_{H2}-Effektorzytokine wird die Degranulierung der Eosinophilen und Mastzellen und damit die humorale Immunabwehr unterstützt. Dadurch sind T_{H2}-Zellen aufgrund der geringeren Spezifität auch an pathophysiologischen Prozessen wie Allergien und Asthma beteiligt (223).

T_{H17}-Zellen sind hauptsächlich in Schleimhäuten vorzufinden, in denen sie zur Immunabwehr gegen Pilze und Bakterien beitragen. Ihre Differenzierung aus naiven CD4⁺ T-Zellen wird hauptsächlich durch den Transkriptionsfaktor Retinoinsäure-verwandter orphaner Rezeptor- γ T (ROR γ T) reguliert (224). Es folgt die Autostimulation mit IL-21, das T_{H17}-Zellen zur Amplifikation benötigen. IL-6 und IL-21 induzieren die Expression des IL-23-Rezeptors, der zur finalen Stabilisierung benötigt wird (225). ROR γ T reguliert die Expression der proinflammatorischen Effektorzytokine IL-17A und F, die über weitere Zytokine und Chemokine insbesondere zur Rekrutierung von Makrophagen beitragen. IL-21 ist in die Aktivierung von T-Zellen, NK-Zellen und Differenzierung der B-Zellen zu Plasmazellen involviert (226,227).

Neben der Pathogenabwehr in Schleimhäuten stößt eine Deregulierung der T_H17 -Zellen chronische Entzündungen und Autoimmunerkrankungen an (228).

Neben den Genannten können naive $CD4^+$ T-Zellen in IL-9 exprimierende T_H9 differenzieren, die hauptsächlich an der Abwehr gegen Helminthen beteiligt sind. In Abhängigkeit der Tumorart werden pro- und antitumorale Eigenschaften der T_H9 -Zellen diskutiert (229). Die folliculären T-Helferzellen (T_{FH}) interagieren unmittelbar mit den B-Zellen und unterstützen damit die humorale Immunabwehr. Die Produktion hochspezifischer Antikörper wird ebenso induziert, wie die Differenzierung der B-Zellen in Plasmazellen (220).

Ein Sonderfall unter den T-Helferzellen stellen die regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) dar, deren Differenzierung aus naiven $CD4^+$ T-Zellen alleinig durch TGF- β stimuliert wird (220). Die Stimulation durch TGF- β bewirkt die Expression des T_{reg} -spezifischen Transkriptionsfaktor Forkhead-Box-Protein P3 (FoxP3), sodass eine Differenzierung in T_H17 unterbunden wird (230). FoxP3 verstärkt die Expression der IL-2-Rezeptoreinheit CD25 der T_{reg} , was eine starke Expansion insbesondere während der späten Phase der adaptiven Immunantwort bewirkt. Der erhöhte IL-2-Konsum der T_{reg} senkt die allgemeine IL-2-Verfügbarkeit für T-Zellen und stellt folglich einen wichtigen Faktor der Immunhomöostase dar (231). Induzierte T_{reg} -Zellen (iT_{reg}) der Peripherie lassen sich gegenüber ihren natürlichen im Thymus gereiften Pendanten (nT_{reg}) durch die Oberflächenmarker und den Transkriptionsfaktor als $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T-Zellen klassifizieren (232). Die Expression der antiinflammatorischen T_{reg} -Effektorzytokine IL-10, IL-35 und TGF- β wird ebenfalls durch den Transkriptionsfaktor FoxP3 gesteuert.

Die Kombination aus einer verstärkten CD25-Expression und Sezernierung antiinflammatorischer Zytokine bildet einen Synergismus bezogen auf die Immunhomöostase. In Folge dessen werden die anderen T_H -Subtypen in ihrer Aktivität eingeschränkt und durch unmittelbaren Zellkontakt deren Proliferation inhibiert (233). Dieser Prozess wird hauptsächlich über CTLA-4 initiiert, das häufig auf iT_{reg} exprimiert wird. CTLA-4 stellt ein physiologisches Analogon zu CD28 der T-Zellen dar und besitzt eine höhere Affinität und Avidität gegenüber den kostimulatorischen Molekülen CD80 und CD86 der APC als der aktivierende Ligand CD28. Im Gegensatz zu CD28 löst CTLA-4 ein inhibitorisches Signal aus und vermindert durch funktionale Beschränkung der APC die Aktivierung und Differenzierung naiver T-Zellen (234). Weitere Moleküle zur Regulation der Immunhomöostase stellen die beiden programmierten Zelltodliganden 1 und 2 (PD-L1 und PD-L2) dar. Die beiden sind die natürlichen Liganden des PD-1, der zahlreich auf Immunzellen und insbesondere aktivierten B- und T-Zellen exprimiert wird (235). Ein weiterer Mechanismus in die T-Zellaktivierung einzugreifen besteht über das oberflächliche Lymphozyten-Aktivierungsgen-3 (LAG-3). LAG-

Theoretische Grundlagen

3 unterbindet über die Bindung an den MHC-II-Komplex der *APC* die Antigenpräsentation und folglich die T-Zellaktivierung (236). Die Mechanismen über CTLA-4/B7, PD-1/PD-L1 und LAG-3/B7 stellen wichtige Regulative, der Immunhomöostase dar und werden dementsprechend auch als sogenannte Immuncheckpoints bezeichnet.

Tabelle 1: Übersicht einiger Subtypen der T-Helferzellen und ihrer unterschiedlichen immunologischen Funktionen in Physiologie und Pathophysiologie

| Subtyp | IL-Stimulus | IL-Sekretion | Physiologie | Pathophysiologie |
|------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|---|--|
| T _{H1} | IFN- γ , IL-12, IL-2 | IFN- γ , IL-2, TNF- α | Abwehr intrazellulärer bakterieller, viraler Pathogene, Tumorzellen | Chronische Entzündung Autoimmunerkrankung |
| T _{H2} | IL-4, IL-2 | IL-4, IL-5, IL-13 | Humorale Abwehr gegen Parasiten | Allergien und Asthma |
| T _{H9} | IL-2, IL-4, TGF- β | IL-9 | Abwehr gegen Helminthen | Allergische Reaktionen |
| T _{H17} | IL-6, TGF- β , IL-21, IL-23 | IL-17, IL-22 | Abwehr von Pilzen und Bakterien in Schleimhäuten | Chronische Entzündung Autoimmunerkrankung |
| T _{FH} | IL-6, IL-21 | | Unterstützung der B-Zellen in der Antikörperproduktion | Autoimmunerkrankungen oder Immundefizienz |
| T _{reg} | TGF- β , IL-2 | IL-10, IL-35, TGF- β | Immunhomöostase | Immunsuppression |

2.2.5 Immunevasion und Tumormikroumgebung

Das Mikromilieu einer Tumorerkrankung wird schon seit langem als ein Zustand einer chronischen Entzündung beschrieben. Folglich halten sich im Tumorgewebe und dessen Umfeld eine bedeutende Anzahl an Immunzellen auf. Bis heute konnten einige Risikofaktoren identifiziert werden, die sowohl zur Entstehung von chronischen Entzündungen, als auch von Tumoren beitragen (237). Das Tumorgewebe ist mitsamt dessen lokalen Umfelds außerdem geprägt durch einen erhöhten Stoffwechsel, der aufgrund der resultierenden Unterversorgung eine Hypoxie erzeugt. Eine Hypoxie induziert über Wachstumsfaktoren wie VEGF die Neoangiogenese zur Verbesserung der Versorgungslage. Aufgrund des durch sezernierte Zytokine und Chemokine vermittelten chronisch inflammatorischen Milieus in Tumorgeweben wird eine bedeutende Anzahl an Leukozyten, insbesondere der angeborenen Immunantwort rekrutiert (238). Diese besitzen entsprechend des lokalen Zytokinmilieus in Folge ihrer Aktivierung Subtypen unterschiedlicher Ausprägung und Funktionen. Auf diese Weise wird durch den Tumor über eine proangiogenetische, inflammatorische Umgebung ein lokales Mikromilieu geschaffen, das die rekrutierten Leukozyten von einem proinflammatorischen, tumorfeindlichen in einen proangiogenetischen, tumorfördernden Zustand versetzt (239,240). Zusätzlich exprimieren einige Tumorarten Immuncheckpoints wie CTLA-4, PD-L1 und greifen somit selbst regulatorisch in die Immunhomöostase ein (241).

Die sogenannte Tumormikroumgebung (TMU) erzeugt im Zuge des Zytokinprofils eine Polarisierung der Makrophagen zwischen den Subtyp M1 und M2. Bei den M1-Makrophagen handelt es sich aufgrund der Fähigkeit zur Antigenpräsentation, der Förderung einer T_H1 -dominierten Immunantwort und der Sekretion von IL-12 um einen antitumoralen Subtyp. Im Gegensatz hierzu ist der M2-Subtyp nicht zur Antigenpräsentation befähigt und sezerniert statt T_H1 -förderndem IL-12 in hohem Maße immunsuppressives IL-10, sowie IL-4 und IL-13 zur Induktion einer T_H2 -Antwort. Aufgrund der Förderung antiinflammatorischer, protumoraler Prozesse wie Angiogenese, Gewebereparatur und Zellproliferation, die dem Tumor nutzen, bezeichnet man sie als tumorassoziierte Makrophagen (TAM) (242,243).

Analog zu den Makrophagen findet nach der Rekrutierung zur TMU durch IL-8 eine Polarisierung der Neutrophilen Granulozyten zwischen einem antitumoralen Typ N1 und einem protumoralen Typ N2 (TAN) statt. Die antitumoralen N1 modulieren ihre Funktion über die Aktivierung von CTL, $CD4^+$ T-Zellen, M1-Makrophagen und NK-Zellen (244–246). Demgegenüber entfalten die TAN ihre Wirkung durch Inhibition der NK-Zellen, Rekrutierung von TAM und T_{reg} , sowie der Sekretion protumoraler Faktoren VEGF und MMP-9 (247,248).

Einen wichtigen Modulator der adaptiven Immunantwort in der TMU stellen die tumorinfiltrierenden DC (TIDC) dar. Sie lassen sich weiter in einen proinflammatorischen und immunsuppressiven Phänotyp klassifizieren. Aufgrund des Zytokinmilieus der TMU überwiegt der unreife, immunsuppressive Typ, der sich durch den Mangel an kostimulatorischen B7-Molekülen durch eine verminderte Antigenpräsentation und Expression von IL-10 und VEGF auszeichnet. Hierdurch wird insbesondere die Differenzierung der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in effektorische T-Helferzellen und CTL herunterreguliert (249).

Im Zusammenhang mit malignen Erkrankungen stehen insbesondere die T_H1-Zellen im Fokus. Durch die Infiltration der T_H1-Zellen in das Tumorgewebe wird die Prognose der Patienten bezüglich des Überlebens signifikant verbessert (250–252). Sie fördern durch die Sezernierung von IFN- γ und IL-2 die Zytotoxizität der CTL und Makrophagen gegenüber dem Tumorgewebe. Anhand einer *in-vivo*-Studienreihe mit Mäusen konnte gezeigt werden, dass T_H1-Zellen die Rekrutierung und Zytotoxizität der CTL in den Hirntumoren steigern und folglich die Überlebensrate der Tiere verbessern (253). Der Antagonismus in der T_H1- und T_H2-Differenzierung kommt in der TMU besonders durch das Zytokinmilieu zum Tragen und bestimmt maßgeblich über eine erfolgreiche Elimination des Tumors. Eine erhöhte Anzahl an T_H2-Zellen korreliert häufig mit einer Progression des Tumors (252,254), auch wenn in einigen Studien antitumorale Effekte T_H2-Zellen gegenüber Non-Hodgkin-Lymphomen und Brustkarzinomen aufgezeigt werden konnten (255–257). Insgesamt überwiegen jedoch die T_H1-gesteuerte Immunantwort in den antitumoralen Effekten (258). Die Funktion der T_H9-Zellen im Kontext einer malignen Erkrankung ist momentan noch nicht final geklärt. So steigerte einerseits eine IL-9 abhängige Mastzellaktivierung und Granzymexpression die antitumorale Aktivität und Zytotoxizität (259,260). Andererseits besteht eine Korrelation zwischen der Präsenz der T_H9-Zellen und eines protumoralen, immunsuppressiven Milieus ähnlich den T_H2-Zellen (261,262). Der Subtyp T_H17 verhält sich ebenfalls situativ janusköpfig bei malignen Erkrankungen und besitzt damit keine klare Zuordnung in einem pro- oder antitumoralem Kontext (263). T_H17-Zellen tragen je nach Tumorart und Entität einerseits über die Sezernierung von VEGF zur Angiogenese oder Rekrutierung von T_{reg} zum Tumorwachstum bei (264,265). Andererseits können T_H17 über die Rekrutierung von CTL oder direkt gegenüber Tumoren zytotoxisch aktiv werden (266,267). Das unterschiedliche Verhalten der T_H17 lässt sich gegebenenfalls erklären, dass ihr Zustand nicht einer finalen Ausdifferenzierung entspricht, sondern diese eine gewisse Plastizität aufweisen (268). Je nach Zytokinstimulus exprimieren sie zusätzlich zu ihrem Transkriptionsfaktor ROR γ T, FoxP3 oder T-bet, woraufhin sie sich in

ihrer Funktionalität und Zytokinfreisetzung den immunsuppressiven T_{reg} oder antitumoralen T_{H1} -Subtypen annähern (269,270).

Zur adäquaten Eradikation des Tumors tragen vor allem infiltrierende CTL durch ihre zytotoxischen Mechanismen bei. Hierfür ist jedoch die Expression der MHC-I-Moleküle zur Antigenpräsentation essentiell, um die zytotoxische Aktivität der CTL zu provozieren. In verschiedenen Tumoren konnte allerdings eine starke Reduktion der MHC-I-Expression beschrieben werden (271). Außerdem werden tumorinfiltrierende CTL durch antiinflammatorische Zytokine, sowie Interaktionen des zur Aktivierung benötigten CD28 mit negativen Regulatorproteinen in einen inaktiven Zustand der Anergie versetzt (272). Zusätzlich bewirkt die VEGF-Sekretion, ausgelöst durch eine Hypoxie, eine verstärkte Präsentation des Fas-Liganden auf der Oberfläche des Tumors. Auf diese Weise werden durch eine invertierte Fas/FasL-Interaktion CTL, T-Helferzellen und NK-Zellen innerhalb des Tumors eliminiert (273).

Wie bereits in 2.2.2 ausgeführt benötigen NK-Zellen zur Ausübung ihrer zytotoxischen Funktionen keine Antigenpräsentation, da ihre Aktivität über aktivierende oder inhibitorische Signale gesteuert werden. In der TMU wird unter anderem der stimulatorische Rezeptor NKG2D durch tumoral sezernierte lösliche Liganden gebunden. Hierdurch wird die Interaktion von NKG2D mit dem MHC-I-Komplex der Tumorzelle verhindert und zusätzlich dessen Expression herunterreguliert (203,274). Das Zytokinmilieu der TMU wird dominiert durch die immunsuppressiven Moleküle TGF- β und IL-10 (275). Als Quelle hierfür dienen T_{reg} , MDSC, TAM oder die Tumorzellen selbst. In der Folge werden die Funktionen der NK-Zellen wie Sekretion zytotoxischer Granula und inflammatorischer Zytokine eingeschränkt (276,277). Zusätzlich wird die NK-Zytotoxizität durch die lokale Hypoxie herabgesetzt, die einen Abbau von Granzym B und verminderte Zytokinsekretion bewirkt (278).

2.2.6 Regulatorische T-Lymphozyten im Tumorgeschehen

Insbesondere den T_{reg} als physiologische Bewahrer der Immunhomöostase kommt in der TMU und bei der Immunevasion des Tumors eine Schlüsselrolle zu. Naive $CD4^+$ T-Zellen differenzieren in der Peripherie nach TCR-Aktivierung durch einen gezielten Zytokinstimulus mit IL-2, IL-10 und vor allem TGF- β mittels spontaner Expression von FoxP3 in iT_{reg} . Die erforderlichen Zytokine werden sowohl von den TMU beeinflussten Leukozyten als auch von den Tumorzellen selbst generiert. Diese bewirken eine lokale Differenzierung und Expansion der iT_{reg} , die aufgrund ihres immunsuppressiven Charakters bei vielen Tumorentitäten in einer geringen Überlebensrate der Patienten resultiert.

Wie in Abschnitt 2.2.4 erläutert, besteht ein Mechanismus in dem übermäßigen IL-2 Konsum auf Basis der stark erhöhten CD25-Expression der iT_{reg}. Aufgrund der kompetitiven Bindung von IL-2 steht dieses als essentieller Modulator der Aktivierung und Proliferation den anderen T_H-Subtypen nicht zur Verfügung (279,280). Neben IL-2 stellen die sezernierten T_{reg}-Effektorzytokine IL-10, IL-35, TGF- β potente Regulatoren zur Immunsuppression insbesondere der Effektor-T-Zellen dar (281). IL-10 zeigte sowohl in einem IL-10 K.o.-Mausmodell immunsupprimierende Effekte auf proinflammatorische T_H17 als auch in Kombination mit IL-35 die Erschöpfung intratumoraler CTL (282,283). TGF- β 1 wird in den meisten Studien als Vermittler von immunsuppressiven Eigenschaften insbesondere bezogen auf CTL- und NK-Zytotoxizität, sowie T_H1-gesteuerte Immunantworten beschrieben. Jedoch wird in anderen Studien von einem stimulierenden Einfluss auf CTL berichtet. Offensichtlich ist der Einfluss von TGF- β in verschiedenen Inflammations- und Tumorstadien kontextabhängig unterschiedlich ausgeprägt (284–286). Ein weiterer Mechanismus zur Immunsuppression auf Basis zytotoxischer Granula richtet sich nach Zellkontakt durch gezielte Lyse gegen CTL, NK-Zellen und Effektor-T-Zellen (287,288).

Neben dem kompetitiven IL-2-Konsum stellt die Freisetzung von ATP aus apoptotischen T_{regs} einen weiteren immunsuppressiven Mechanismus dar. Oxidativer Stress leitet die Apoptose ein, woraufhin intrazelluläres ATP in den Extrazellulärraum gelangt. Die membranständige Enzymklasse der Ektonukleotidasen wandelt in einer mehrstufigen Katalyse durch die beiden Enzyme CD39 und CD73 proinflammatorisches ATP in antiinflammatorisches Adenosin (ADO) um. Auf diese Weise lokal synthetisiertes Adenosin moduliert über die Klasse der Adenosinrezeptoren die Aktivität der zellulären Immunantwort. Dies ist im Zuge eines autoregulativen Schutzmechanismus bei einer starken chronischen Entzündungsreaktion erwünscht, trägt in einer deregulierten Form durch Immunsuppression jedoch zu pathophysiologischen Prozessen wie Tumorerkrankungen bei (289,290).

Diverse Immuncheckpoints stehen im Zusammenhang einer Deregulation der T_{regs} und einer Immunevasion durch Tumorerkrankungen im Fokus. Denn im Gegensatz zum stimulatorischen CD28 der Effektor-T-Zellen löst das CTLA-4 der T_{regs} ein inhibitorisches Signal auf Seiten der APC aus, dass einerseits die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 herunterregelt und andererseits deren Präsenz auf der Oberfläche der APC durch Trogozytose entfernt. Folglich wird die Aktivierung und Differenzierung naiver T-Zellen durch APC unterbunden. Additiv wird die Expression von PD-L1 und PD-L2 im Zuge der CTLA-4-Interaktion mit CD80/CD86 der APC hochreguliert (291). Eine Aktivierung von PD-1 durch seinen Liganden PD-L1 leitet die Apoptose der betroffenen T-Zelle ein (235). Dieser

Mechanismus limitiert insbesondere die $CD8^+$ -gesteuerte zytotoxische Immunantwort gegen Tumore (292). Zusätzlich reduziert LAG-3 über die Verminderung der MHC-II-Komplexe die Antigenpräsentation der *APC* und damit die antitumorale Fähigkeit der zellulären adaptiven Immunantwort (293).

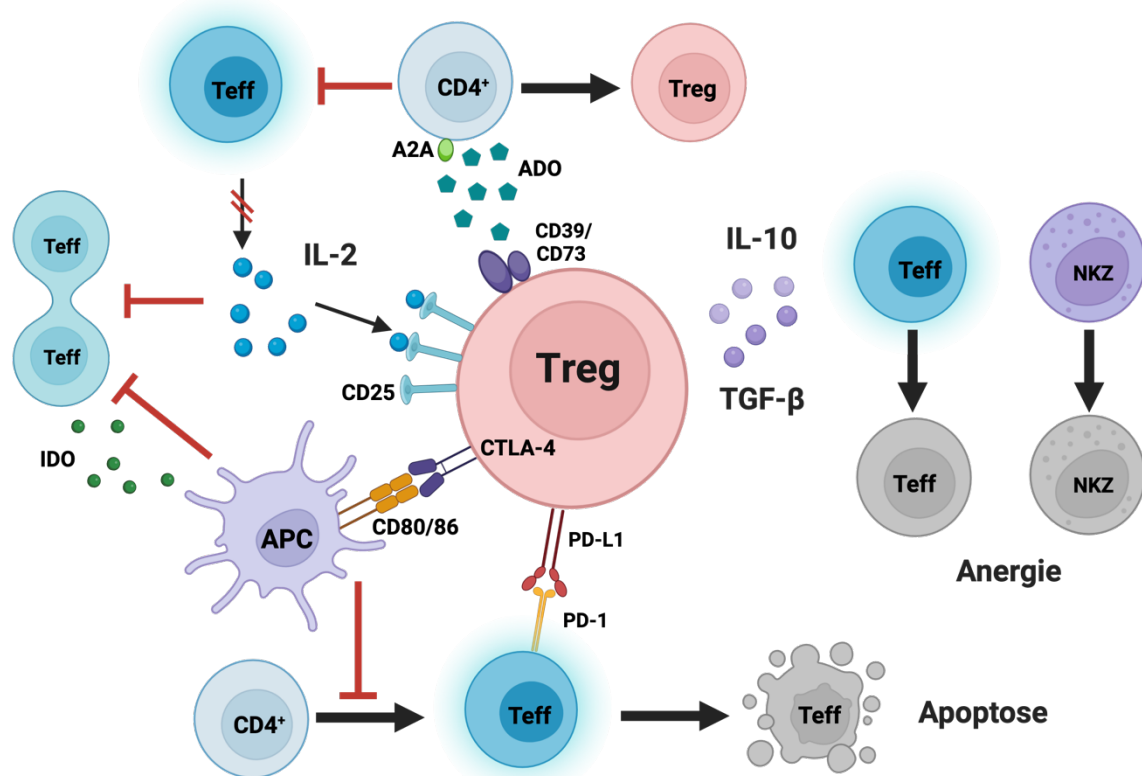


Abbildung 6: Darstellung der immunsuppressiven Mechanismen der T_{reg} in der TMU. T_{reg} inhibieren die antitumorale Immunantwort über die Zytokine IL-10 und TGF- β , die Immuncheckpoints CTLA-4 und PD-L1, die lokale IL-2-Verarmung sowie den Purinmetabolismus der Ektonukleotidasen, indem die Aktivierung oder Differenzierung in T-Effektorzellen (T_{eff}), deren Proliferation verhindert oder sie in einen Zustand der Anergie oder Apoptose versetzt werden. Die Abbildung wurde mit Hilfe von BioRender.com erstellt.

2.2.7 Checkpointinhibitoren

Neben den beiden genannten aktiven Immuntherapien sind die ICI als Regulatoren des Immunsystems im Kontext maligner Erkrankungen zunehmend in den Fokus gerückt. Die Vorteile der ICI sind, dass im Gegensatz zur Tumorstabilisierung bereits Präparate zugelassen und keine patientenindividuelle Extraktion der T-Zellen und Transduktion des CAR durchzuführen sind (294,295). Sie dienen als therapeutisches Regulativ zur Immunhomöostase, die in der TMU supprimiert wird. Die beiden T_{reg} Immuncheckpoints CTLA-4 und LAG-3 interferieren mit dem Prozess der T-Zellaktivierung über die Bindung der kostimulatorischen B7-Moleküle und der Verminderung der Antigenpräsentation. Des Weiteren limitiert vor allem die Überexpression des PD-L1 in zahlreichen Tumorarten, MDSC, TIDC die zelluläre Immunantwort. Die Aktivierung von PD-1 bewirkt die Reduktion proinflammatorischer Zytokine, einen anergischen, inaktiven Zustand und letztendlich die Apoptose der Effektor-T-Zellen, CTL und NK-Zellen. Dies führte folgerichtig zur klinischen Entwicklung der ersten ICI, die sich gegen CTLA-4 und PD-1/PD-L1 richten. So blockieren die beiden humanen mAb Ipilimumab und Tremelimumab den inhibitorischen Checkpoint CTLA-4 und stärken damit die Immunantwort (296,297). Ebenso tragen die zugelassenen Nivolumab und Pembrolizumab zur Immunstimulation durch Blockade von PD-1 bei (298). Auch gegen dessen Liganden PD-L1 sind in Form der beiden Antikörper Atezolizumab und Avelumab ICI zur Tumorthherapie zugelassen (299,300). Den genannten ICI ist gemein, dass sie in ihrer Funktion die Übertragung inhibitorischer Signale an gegen den Tumor gerichtete Akteure unterbinden, oder diese im Falle des Avelumabs durch ADCC zur Phagozytose und Lyse markieren (301,302).

Aufgrund von Resistenzentwicklungen und nicht ansprechenden Therapien wird an der Identifikation weiterer Immuncheckpoints, sowie der Entwicklung weiterer ICI und Kombinationstherapien geforscht (303). Für LAG-3 befinden sich mehrere Arzneimittelkandidaten in den klinischen Phasen I, II und III (304,305). Neben LAG-3 dient der Nukleotidrezeptors T-Zell-Immunglobulin-und-Mucindomäne 3 (TIM-3) ebenfalls als inhibitorischer Checkpoint. Durch Bindung an Liganden wie HMGB1 senkt TIM-3 die Antigenpräsentation auf Basis von Nukleinsäuren (306). Zusätzliche Regulative bestehen über Galectin-9 (Gal-9) in einer reduzierten Aktivität und Proliferation der T_H1-Zellen und über das *carcinoembryotic antigen related cell adhesion molecule 1* (CEACAM-1) in anergischen T-Zellen (307,308). Des Weiteren wird durch eine hohe Expression von CEACAM-1 die NK-Zytotoxizität reduziert, indem es die Lokalisation der Aktivierungsliganden für NKG2D auf der Oberfläche reduziert und die Granulafreisetzung der NK-Zellen inhibiert (309). Über die Blockade der inhibitorischen Killerzell-immunoglobulinartigen Rezeptoren (KIR) kann die

granulavermittelte Zytotoxizität der NK-Zellen ebenfalls gesteigert werden (310). Als weiterer Ansatz wird neben inhibitorischen Ligand-Rezeptor-Checkpoints die Entwicklung aktivierender Ligand-Checkpoints wie CD137, OX40, ICOS und Induktoren der Phagozytose verfolgt (311–313).

Neben den ligandgesteuerten Checkpoints bieten Enzyme aus verschiedenen Metabolismen der TMU ebenfalls Ansatzpunkte. Neben der Verknappung der essentiellen Aminosäure L-Arginin spielt das Enzym Indolamin-2,3-Deoxygenase (IDO) auf T1DC eine Rolle. IDO katalysiert die Umsetzung der essentiellen Aminosäure L-Tryptophan in Kynurenin und beeinträchtigt damit die Proliferation der Effektor-T-Zellen bei simultaner Induktion von T_{reg} (314–316).

Die purinbasierte ATP/ADO-Achse stellt mit den Ektonukleotidasen und den Adenosinrezeptoren eine regulatorische Funktion in der Immunhomöostase und folglich einen vielversprechenden Ansatz als Tumorthherapie sowohl allein, als auch in Kombination mit herkömmlichen ICI dar. Ebenso werden ICI in Kombination mit Signaltransduktionsinhibitoren in klinischen Studien untersucht (317).

2.3 Purinerge Signalkaskade

2.3.1 Purinrezeptoren

Im menschlichen Organismus sind purinbasierte Moleküle in mannigfaltige Prozesse eingebunden. So sind sie essentielle Bestandteile in Nukleinsäuren und Koenzymen und spielen eine zentrale Rolle als Energieüberträger in der Zellatmung. Zusätzlich fungieren sie über verschiedene Rezeptoren als Botenstoffe und sind somit in zahlreiche physiologische und pathophysiologische Stoffwechselprozesse des Körpers involviert (318).

Die Purinrezeptoren werden anhand ihrer Liganden in zwei Klassen unterteilt. Das Nukleosid Adenosin (ADO) ist der physiologische Ligand für die P1-Rezeptoren, bei denen es sich ausschließlich um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) handelt. Die membranständigen ADO-bindenden GPCR werden in die vier Subtypen A1, A2A, A2B und A3 eingeteilt. Dahingegen werden die P2-Rezeptoren aufgrund ihrer Funktionalität in die beiden Untergruppen mit den Bezeichnungen P2X und P2Y unterschieden. Bei den sieben P2X-Rezeptoren (P2X1-7) handelt es sich um ionotrope Rezeptoren, die durch den Liganden ATP aktiviert werden. Die acht identifizierten P2Y-Rezeptoren repräsentieren metabotrope GPCR, die neben ATP auch durch ADP und weitere Nukleotide aktiviert werden können. Beide Rezeptorklassen sind sowohl auf verschiedenen Immunzellen als auch Tumorzellen lokalisiert und bilden somit ein wechselseitiges Regulativ (319,320).

2.3.2 Immunsuppressive Eigenschaften des Adenosins in der TMU

Das Nukleosid ADO dient bei starken Entzündungsreaktionen als Regulator der Homöostase zur Begrenzung von Immunreaktionen. Der Abbau des proinflammatorischen ATP aus apoptotischen Zellen zu ADO schirmt daher umliegende Zellen gegenüber der Immunreaktion ab und ermöglicht somit die Gewebereparatur. Neben den A2B-Rezeptoren (A2BR) werden insbesondere die A2AR ubiquitär auf Immunzellen exprimiert. Die beiden Subtypen beeinflussen über die stimulatorischen G_s-Untereinheiten die Bildung des zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP) sowie die Aktivierung der Proteinkinase A, die die Reifung, Differenzierung und Aktivität der Immunzellen abschwächen. Ein großer Unterschied zwischen A2AR und A2BR liegt in dem unterschiedlichen Ansprechverhalten durch den physiologischen Liganden ADO. Bereits niedrige Konzentration an ADO aktivieren den A2AR, jedoch kann ADO in der TMU aufgrund metabolischer Deregulation beträchtlich akkumulieren und oberhalb von 10 µM den A2BR zusätzlich aktivieren (321).

Aufgrund der massiven Proliferation solider Tumore entsteht innerhalb des Tumorgewebes häufig eine lokale Hypoxie, ausgelöst durch eine Mangelversorgung. Die resultierende

Freisetzung von HIF-1 α bewirkt eine Erhöhung der Expression von VEGF, Ektonukleotidasen sowie der A2AR und A2BR. Somit wird in der TMU die Neovaskularisation gefördert und extrazelluläres ATP in ADO umgewandelt, das wiederum über die P1-Rezeptoren auf die Immunzellen einwirkt (322). In Folge dessen wird die Entstehung und Funktionalität der T_{eff} über den A2AR inhibiert. Dadurch werden die Aktivität des TCR und des IL2R herabgesetzt und so weniger proinflammatorische Zytokine wie IL-2 und IFN- γ sezerniert, was eine Reduktion der essentiellen antitumoralen T_{H1}-gesteuerten Immunantwort zur Folge hat. Simultan differenzieren naive CD4⁺ T-Zellen vermehrt in T_{reg} durch Expression von FoxP3. Ebenfalls wird durch A2AR die Zytotoxizität der CTL durch verminderte Sekretion der Zytokine wie IFN- γ und zytotoxischer Granula reduziert. In A2AR defizienten Mausmodellen wurde die CTL-Infiltrationsrate erhöht, was sowohl das Tumorwachstum als auch die Metastasierung reduzierte (323). Weitere *in-vivo*-Versuche zeigten, dass die Blockade des A2AR die Motilität und Zytotoxizität der CTL bei simultaner Verringerung der T_{reg} wiederherstellte (324). Die Suppression der NK-Zellen durch A2AR wurde ebenfalls anhand mehrerer Studien aufgezeigt. Anhand der Untersuchung von A2AR-Knockout-Mäusen und A2A und A2B-Agonisten konnte aufgezeigt werden, dass NK-Zellen sowohl in ihrer Reifung als auch Funktionalität nach A2AR-Aktivierung eingeschränkt werden (325). Diese Resultate konnten in weiteren Studien sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bezogen auf die Freisetzung zytotoxischer Granula und die ligandenvermittelte Apoptose über Fas/FasL-System der NK-Zellen bestätigt werden (326,327).

Weiteren Einfluss auf Zelltypen der angeborenen Immunantwort übt ADO in Form der Polarisierung der Makrophagen aus. So wird über den A2AR der proinflammatorische Subtyp M1 inhibiert, und dahingegen hauptsächlich durch A2BR die Polarisierung in M2-TAM mitsamt den immunsuppressiven und proangiogenetischen Mediatoren IL-10, Arginase sowie VEGF gefördert (328,329).

Ebenfalls tragen DC unter einem A2AR/A2BR-Stimulus zur Immunsuppression bei. Durch Aktivierung des A2BR wird einerseits die Expression der proangiogenetischen und immunsuppressiven Faktoren VEGF, IL-10, TGF- β sowieIDO befördert und andererseits die Antigenpräsentation und T-Zellaktivierung durch die Reduktion der MHC-II-, B7-Moleküle und IFN- γ vermindert. Additiv wird die Expression von PD-L1 durch A2AR erhöht (330,331). Die MDSC-Expansion nach A2BR-Stimulation trägt durch ein analoges Zytokinprofil ebenfalls gegen eine T_{H1}-Immunantwort und zur immunsuppressiven TMU bei (332).

Eine Schlüsselrolle in der Regulation der Immunhomöostase und der Purin-Signalwege der TMU kommt den T_{reg} zu, deren Aktivität durch die Stimulation der A2AR gefördert wird. Dies

äußert sich in Form einer erhöhten Proliferation, der Sekretion der immunsuppressiver Zytokine IL-10 und TGF- β , sowie der Expression der Immuncheckpoints CTLA-4, LAG-3 und PD-1 (290). Des Weiteren steigert der ADO-Stimulus die Expression der beiden Ektonukleotidasen CD39 und CD73 auf den T_{reg}, die extrazelluläres ATP in einer mehrstufigen Katalyse zu ADO umsetzen. Zu einem steigenden ADO-Spiegel der TMU tragen insbesondere T_{reg} bei, deren Apoptose wegen des oxidativen Stresses in der hypoxischen TMU induziert wird. Diese setzen ATP erst durch Kanäle wie Pannexin-1 frei und anschließend über die CD39/CD73-Achse in ADO um. Durch diesen additiven Mechanismus können weitere T_{reg} der TMU in einer positiven Rückkopplungsschleife autokrin stimulieren (289,333).

2.3.3 Neoplastische Eigenschaften des Adenosins

Neben den Immunzellen werden die beiden ADO-Rezeptoren A2A und A2B ebenfalls durch Tumorzellen exprimiert. Eine Hypoxie im Tumorgewebe, ausgelöst durch starkes Wachstum und resultierende Unterversorgung, fördert die Expression der beiden ADO-Rezeptoren. Dass die Aktivierung von A2BR in einigen Tumorarten mit enthemmtem Wachstum sowie einer Metastasierung korreliert, konnte in einigen Studien anhand der hochregulierten ERK, JNK und MAPK-Signalwege festgestellt werden. In *triple negative breast cancer* (TNBC) erhöhte eine Hypoxie über HIF-1 α die Expression von A2BR und beförderte damit insbesondere die Metastasierung (334,335). Diese Zusammenhänge konnten auch in Prostatakarzinomzellen und Glioblastomzellen verifiziert werden (336,337). Auch A2AR steigern die Neigung zur Metastasierung. Anhand eines Magenkarzinoms konnte die Beteiligung des PI3K-AKT-Signalwegs an der Metastasierung nach A2AR-Aktivierung aufgezeigt werden (338,339). Der A2AR konnte in einem A2A-defizienten Mausmodell auch mit einer Neoangiogenese in Verbindung gebracht werden (340). Einen weiteren Beitrag zur Tumometastasierung liefern A2AR und A2BR, indem sie die Expression von CXCR4 *in vitro* steigern und somit über die folgende Bindung an CXCL12 den Arrest und Extravasation zur Bildung eines Sekundärtumors ermöglichen (341).

2.3.4 Immunmodulierende Eigenschaften des ATP

Das Nukleotid ATP nimmt neben seinen Funktionen als Universalenergieträger des Organismus ebenfalls eine regulatorische Funktion innerhalb des Purin-Signalings über die P2XR und P2YR ein (342). ATP gehört zu den sogenannten Schadens-assoziierten Molekülmustern (DAMP = *damage associated molecule patterns*). Im Gegensatz zu den Pathogenmustern (PAMP) handelt es sich bei den DAMP um endogene, intrazelluläre Strukturen, die im Zuge einer Beschädigung, Infektion oder Apoptose der Zellen freigesetzt werden (343). Im Tumorgewebe wird die ATP-Freisetzung hauptsächlich durch eine Hypoxie oder Apoptose eingeleitet (344). Die Bindung eines DAMP an den zugehörigen Rezeptor bewirkt eine Entzündungsreaktion, indem über eine Art Ortungssignal die Zellen der angeborene Immunantwort rekrutiert und anschließend effektorisch induziert werden.

Über P2Y2R werden Makrophagen, Monozyten und Neutrophile chemotaktisch zum Zielort rekrutiert und zur Phagozytose angeregt (345). Neben P2Y2R kommt dem P2X7R eine enervierende Rolle zu. Der ATP-Stimulus über P2X7R unterstützt DC bei der Antigenpräsentation für T-Zellen und fördert die Sekretion des proinflammatorischen IL-1 β auch bei Makrophagen (346,347). Des Weiteren kann ATP seinen antitumorale Effekt synergetisch mit Zytostatika wie den Anthrazyklinen und Platinderivaten entfalten. Die zytostatikainduzierte Apoptose der Tumorzellen setzt ATP frei, das über seine Funktion als DAMP die APC zur Antigenpräsentation anregt. In der Folge wird mittels CTL und CD4⁺ T_{eff} eine zytotoxische Immunantwort über die Präsentation der tumorassoziierten Antigene apoptotischer Zellen durch aktivierte APC provoziert. Die Induktion der Immunantwort durch eine zytostatikainduzierte Apoptose wird auch als immunogener Zelltod (ICD) bezeichnet (348,349). Additiv setzen T_{eff} nach ihrer Aktivierung ATP frei, dass durch eine autokrine Stimulation über P2X7 deren Proliferation und IL-2-Sekretion fördert. Im Gegensatz hierzu wird ein Zusammenhang der Aktivierung des P2X7 und der Apoptose bei T_{reg} vermutet (350,351). Zusätzlich bewirkt die P2X7-Aktivierung die Differenzierung in T_H17 zu Ungunsten der T_{reg}.

Theoretische Grundlagen

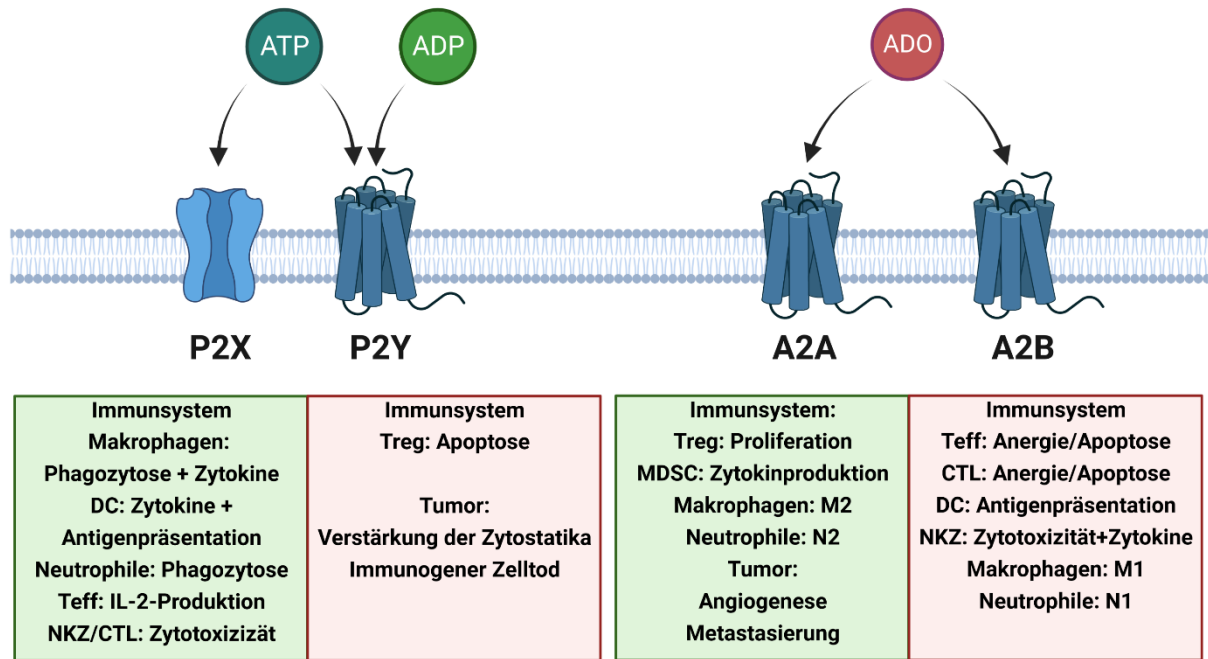


Abbildung 7: Immunregulatorische Funktion der ionotropen und metabotropen Purinrezeptoren in der TMU. In den grünen Kästen sind jeweils die Stimulatorischen und in den roten Kästen inhibitorische bzw. apoptotische Prozesse der jeweiligen Rezeptorklassen auf die Akteure der TMU aufgeführt. Die Abbildung wurde mit Hilfe von BioRender.com erstellt.

2.4 Ektonukleotidasen

2.4.1 Enzymkatalysierter extrazellulärer Abbau des ATP

Um den proinflammatorischen Einfluss des ATP als DAMP lokal auf einen Inflammations- oder Infektionsherd zu begrenzen, exprimiert das umliegende Gewebe die Enzymklasse der Ektonukleotidasen (EN). EN katalysieren in einem mehrstufigen Prozess die Umwandlung des proinflammatorischen ATP in antiinflammatorisches ADO und setzen somit im Zuge der Gewebshomöostase die Aktivität einer proinflammatorischen Immunantwort lokal herab. Dieser physiologische Schutzmechanismus wird vor allem in soliden Tumoren durch eine Expressionssteigerung der EN dereguliert und zur Immunevasion zweckentfremdet (352).

In der hypoxischen TMU gelangt ATP über das Transmembranprotein Pannexin-1 oder über apoptotische Zellen auf direktem Wege in den Extrazellulärraum (EZR), wo es über die P2XR und P2YR seine Funktion als DAMP entfaltet. In einigen Tumoren werden Konzentrationen von bis zu 700 μM ATP im EZR erreicht (353). Anderenfalls wird ATP über die EN CD39 in einem zweistufigen Prozess unter Abspaltung zweier Phosphatreste (P_i) in AMP überführt. Im Gegensatz zum AMP zeigt das Zwischenprodukt ADP Affinität zu einigen P2YR und ist in die Thrombozytenaktivierung involviert. Im letzten Schritt wird durch die EN CD73 der letzte Phosphatrest abgespalten, sodass dann das im Kontext mit A2AR/A2BR immunsuppressive ADO entsteht. Die Verschaltung der beiden EN wird als Hauptachse des ATP-Abbaus angesehen (354). Neben der CD39/CD73-Achse kann extrazelluläres ADO über zwei weitere Enzymkaskaden generiert werden. Das Koenzym Nicotinamidadenindinukleotid (NAD^+) kann in einer dreistufigen Katalyse ebenfalls in das Nukleosid ADO umgewandelt werden. Hierbei degradiert das als NAD^+ -Nukleotidase benannte CD38 Selbiges unter Abspaltung von Nictotinamid in Adenosinphosphatbose (ADPR), bevor CD203a das Intermediat zu AMP umsetzt (355). Die EN CD203a ermöglicht neben der Umsetzung des Substrats ADPR auch die direkte Darstellung von AMP aus ATP. In dieser enzymatischen Degradationskaskade setzt CD73 ebenfalls AMP konsekutiv in ADO um, womit es über die A2AR und A2BR in der TMU seine immunsuppressive Wirkung entfaltet (355).

Die ATP-Degradation kann sowohl durch eine EN-Kaskade auf derselben Zelle als auch durch Verschaltung auf unterschiedlichen Zellen der TMU bewerkstelligt werden. Das enzymatisch generierte ADO wird der TMU auf zwei Arten entzogen. Extrazelluläres ADO wird entlang, oder unter Energiewand auch entgegen des Konzentrationsgradienten durch equilibrative Nukleosidtransporter (ENT), z.B. der SLC29-Transporterfamilie für weitere Stoffwechselprozesse in das Zytosol überführt (356). Zusätzlich wird ADO durch den Adenosindesaminase-CD26-Enzymkomplex (ADA) verstoffwechselt, der neben Tumorzellen

ubiquitär auf T-Zellen lokalisiert ist. Das Enzym ADA ist dabei an das membranständige CD26 gebunden und setzt ADO per oxidativer Desaminierung in Inosin (INO) um. In einigen Tumorarten ist die Expression von ADA herunterregelt und korreliert daher mit einer schlechten Prognose. In T_{reg} ist die Expression der ADA im Verhältnis zu anderen T-Zellen ebenfalls deutlich reduziert, sodass diese extrazelluläres ADO nicht abbauen (357,358).

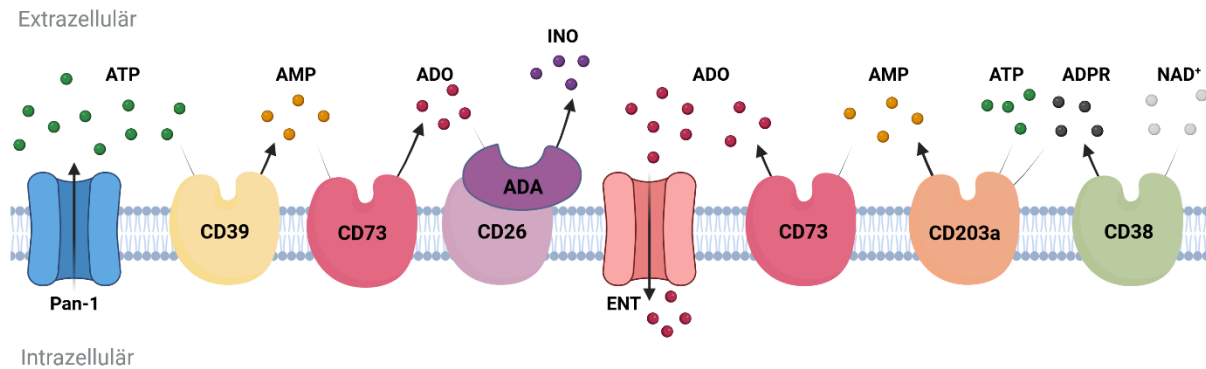


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Enzymkaskade als EN-Hauptachse und alternativer Weg des purinergen Metabolismus auf einer Tumorzelle. Nach seiner Freisetzung in den extrazellulären Raum durch Zellyse, Apoptose oder stressinduziert über Pannexin-1 wird ATP durch CD39 konsekutiv über das Intermediat ADP zu AMP umgewandelt. CD73 wandelt in einem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt AMP in das immunsuppressive ADO um. Neben der Hauptachse existiert zusätzlich der alternative Metabolisierungsweg, der eine CD39-unabhängige Umwandlung des proinflammatorischen ATP ermöglicht. CD38 katalysiert den Abbau von NAD⁺ zu ADPR. Durch eine Verschaltung mit CD203a wird ADPR neben ATP zu AMP hydrolysiert. In der Folge setzt CD73 das generierte AMP wiederum zu ADO um. Zur Eliminierung wird das extrazelluläre ADO über ENT entweder in die Zelle aufgenommen oder durch den CD26-ADA-Enzymkomplex zu INO desaminiert (359). Die Abbildung wurde mit Hilfe von BioRender.com erstellt.

2.4.2 Ektonukleotidtriphosphatdiphosphohydrolase NTPD (CD39)

Es existieren acht bekannte Subtypen des Enzyms Ektonukleotidtriphosphatdiphosphohydrolase (NTPD), von denen NTPD1, 2, 3 und 8 membranständig lokalisiert sind. Alle Subtypen katalysieren die zweistufige Hydrolyse von ATP und UTP unter sukzessiver Abspaltung zweier Phosphatreste. Der Abbau des Substrats ATP stellt somit den limitierenden Faktor für das Signaling über P2-Rezeptoren dar. Die Subtypen weisen unterschiedliche Geschwindigkeiten beim Umsatz von ATP auf. So setzt NTPD1 ATP und ADP in derselben Geschwindigkeit in das jeweilige Produkt um. Dahingegen besitzen NTPD3 und 8 eine höhere Affinität zu ATP, sodass für eine kurze Zeitspanne ADP akkumuliert (360,361).

NTPD1 wird auf einer Vielzahl von Gewebe- und Zelltypen exprimiert, sodass es neben der Immunantwort auch Thrombozyten beeinflussen kann (362). In einer großangelegten Genomstudie wurde die Expression von NTPD1 in verschiedenen Tumorarten im Verhältnis zu den entsprechenden nicht bösartigen Geweben verglichen. Das Resultat zeigt eine verstärkte

Expression von NTPD1 in verschiedene Tumorarten, wie z.B. Brust-, Magen-, Pankreasduktuskarzinomen oder Glioblastomen. Die häufige Koexpression von CD73 ermöglicht somit Immunevasion über die Erzeugung von ADO (363). Neben der Expression auf einigen Tumoren wird es in der zellulären Immunantwort durch T-Zellen, DC und Makrophagen exprimiert (364). Die simultane Expression von NTPD1 und P2X7R auf Makrophagen und DC dient unter Normalbedingungen einer Autoregulation der Aktivität, da nach einem langen ATP-Stimulus NTPD1 hochreguliert wird (365). Unter pathophysiologischem Einfluss der TMU führt dies jedoch zu einer Verminderung der Phagozytose, sowie durch verminderte Antigenpräsentation zur Limitierung der CTL- und CD4⁺ T_{eff}-modulierten Immunantwort (364,366). Diese können durch Blockade von NTPD1 in ihrer Funktionalität wiederhergestellt werden. Die Kostimulation durch TGF- β und den Transkriptionsfaktor FoxP3 stößt eine besonders starke Expression von NTPD1 auf den T_{reg} an (367,368). Die unmittelbare Reduktion des ATP bewirkt einerseits die Verminderung der proinflammatorischen Effekte über den P2X7R bei T_{eff} und fördert andererseits die Aktivität der T_{reg} (350,351).

2.4.3 5'-Ektonukleotidase NT5E (CD73)

Das Enzym CD73 wird entsprechend seiner Funktion auch 5'-Ektonukleotidase (NT5E) bezeichnet. Es ist in der Enzymkaskade dem CD39 nachgeschaltet und wandelt AMP per Dephosphorylierung am C5 der Ribose irreversibel in ADO um. Dadurch fungiert CD73 als essentielle Schnittstelle für die Modulation einer A2AR/A2BR-gesteuerten immunsuppressiven TMU. Ein wichtiger Induktor zur Expression von CD73 ist die Hypoxie über HIF-1 α (369). Neben seiner membranständigen Lokalisierung kann es ebenfalls in Form von Vesikeln in die TMU abgegeben werden (370). Im Blut von Tumorpatienten wird ein erhöhtes Auftreten dieser Form festgestellt, das mit Tumor- und Gewebshypoxien assoziiert wird. Ein Indiz hierfür könnte der erhöhte Blutspiegel von ADO und löslicher CD73 sein, der induziert durch große Höhe über dem Meeresspiegel induziert wird (371,372). Zudem ist CD73 in die Aktivierung der Thrombozyten und die Angiogenese involviert (373).

Bezüglich der Expression in Tumorgeweben stechen unter anderem Melanome, Mammakarzinome, lymphatische Leukämie, Glioblastom und Prostatakarzinom besonders hervor. In diesen Tumoren korreliert die erhöhte Expression in der TMU mit einer verstärkten Tumorprogression sowie ungünstiger Prognose (363,374). Zudem wurde in einigen Studien die Expression von CD73 mit der Resistenz des Tumors gegen Zytostatika in Verbindung gebracht. So zeigten Nevedomskaya und Kollegen anhand verschiedener Ovarialkarzinomzellen die

Korrelation zwischen CD73 und einer induzierten Cisplatinresistenz (375). Eine wichtige Rolle spielt CD73 ebenfalls bei der Resistenzentwicklung von TNBC gegenüber Anthrazyklinen wie Doxorubicin. Loi et al. untersuchten verschiedene TNBC-Zelllinien und stellten anhand einiger *in-vitro*- und *in-vivo*-Modellierungen eine Induktion von CD73 fest. Dabei korrelierte die Induktion von CD73 durch Doxorubicin mit der Aktivierung des A2AR und einer reduzierten adaptiven Immunantwort. Dieser Effekt ließ sich durch einen A2A-Inhibitor oder Blockade mit einem CD73-Antikörper wieder aufheben (376).

Neben den Tumorzellen kommt CD73 auch auf einigen Immunzellen vor. Bei der Expression von CD73 ist neben der Hypoxie durch HIF-1 α insbesondere TGF- β ein bestimmender Faktor. Dieser fördert die Expression von CD73 auf regulatorischen Immunzellen wie MDSC und T_{reg}. Bei MDSC führt der TGF- β -Stimulus der TMU zur Induktion von CD73 und Generierung von ADO (377). Vor allem bei T_{reg} bewirkt der Einfluss von TGF- β eine erhöhte Expression von CD73 und folglich über die Erzeugung von ADO eine autokrine Stimulation. Dahingegen reduziert die TGF- β -induzierte Expression von CD73 die T-Zellaktivierung und Differenzierung in T_{eff} ebenso wie ein proinflammatorisches Milieu aus den T_H1-Zytokinen IFN- γ und IL-12 (378). Zusätzlich korreliert eine erhöhte Expression von CD73 und CD39 mit einer Verminderung oder Abwesenheit des CD26-ADA-Komplexes auf T_{reg}, was wiederum mehr ADO in der TMU bedeutet (379,380).

Infolgedessen wird CD73 sowohl allein als auch zusammen mit CD39 in der Forschung als Immuncheckpoint für Immuntherapien untersucht (374).

2.4.4 Ektonukleotidpyrophosphatase 1 NPP1 (CD203a)

Neben der vielbeachteten Enzymfamilie NTPD existiert in Form der Nukleotidpyrophosphatasen (NPP) eine weitere Enzymklasse mit der Funktionalität des Nukleotidabbaus. Innerhalb der Enzymfamilie konnten bisher sieben Subtypen (NPP1-7) mit einer breiten Substratspezifität für Phosphodiester identifiziert werden. Das Enzym NPP1 ist ebenfalls unter den Synonymen CD203a und Plasma Cell Antigen 1 (PC-1) bekannt und ist neben seiner Funktion in der Knochenmineralisation aufgrund der Fähigkeit des ATP-Abbaus für die tumorale Immunevasion von Relevanz (381). Neben der Hydrolyse des Hauptsubstrats ATP unter Abspaltung von Pyrophosphat (PP_i) ist NPP1 katalytisch in die Degradation der Nukleotide NAD⁺, ADPR, cAMP und zyklisches Guanosinmonophosphat-AMP (2',3'-cGAMP) involviert (355,382,383). Das zyklische Dinukleotid 2',3'-cGAMP ist ein Modulator des Stimulator-der-Interferongene-Signalwegs (STING) zur Expression der Typ I Interferone, die die Aktivität der angeborene Immunantwort und CTL induzieren (384).

Die Expression von NPP1 wird über verschiedene Wachstumsfaktoren und Zytokine reguliert. TGF- β -Signalwege tragen zu einer verstärkten Expression und intrazellulären Transport zur Zellmembran bei, wohingegen das Zytokin IL-1 β den Stimulus unterdrückt (385). Neben der Vermittlung der Insulinresistenz ist NPP1 auch in die Progression einiger Hirntumorerkrankungen involviert (386). So wurde eine erhöhte Expression sowohl in C6-Gliomzellen aus Ratten als auch in humanen astrozytischen Hirntumoren mit hohem Schweregrad und stammzellartigen Glioblastomzellen nachgewiesen (387–389). Anhand eines lentiviralen shRNA-Knockdowns wurde die Korrelation zwischen NPP1-Expression und Bösartigkeit der Hirntumore aufgezeigt, da ein Knockdown des Enzyms in einer reduzierten Zellproliferation und induziertem Zelltod resultierte (389). Auf einigen untersuchten Melanomen ist NPP1 zusammen mit CD39, CD73 und CD38 koexprimiert. Morandi und Kollegen zeigten auf, dass die Melanomzellen *in vitro* ADO aus den beiden Substraten ATP und NAD⁺ darstellten und dieses die Proliferation der CD4⁺ T_{eff} und CTL stark einschränkte (390). Auf aktivierten T-Zellen wurde NPP1 ebenfalls nachgewiesen und ein Zusammenhang mit der Wiederaufnahme der Spaltprodukte Nicotinamid und ADO zur intrazellulären Metabolisierung vermutet (391). Im Kontrast dazu zeigt eine Subpopulation der NK-Zellen Auffälligkeiten bezüglich der Expression von EN. Es handelt sich dabei um den CD16⁻CD56^{bright} Subtyp mit verminderter Zytotoxizität in Relation zu den CD16⁺CD56^{dim} NK-Zellen. Anhand von *in-vitro*-Modellierungen zeigten Morandi et al., dass der NK-Subtyp CD16⁻CD56^{bright} über die Koexpression von NPP1 und CD73 ATP in ADO umwandelt und die Proliferation der CD4⁺ T_{eff} stark inhibiert (392). Aufgrund dessen kann NPP1 als alternativer oder auch zusätzlicher Ansatzpunkt zu CD39 angesehen werden, um die Umwandlung von ATP in immunsuppressives ADO initial zu unterbinden und dessen proinflammatorische Wirkung zu erhalten.

2.4.5 Inhibitoren der Ektonukleotidasen

Aufgrund der immunmodulatorischen Funktion der enzymatischen Kaskade des purinergen Signalwegs werden dessen Bestandteile als Immuncheckpoints angesehen. Deshalb liegt der Fokus auf der Entwicklung von Inhibitoren, die in Form von Antikörpern oder chemischen Molekülen die Aktivität inhibitorischer Komponenten wie den EN CD39, NPP1 und CD73 sowie den P1-Rezeptoren A2A und A2B zu reduzieren oder stattdessen modulierende Komponenten wie den P2X7R und des CD26-ADA-Enzymkomplexes potenziell zu verstärken. NPP1 wird in die Superfamilie der phospho-/sulfo-koordinierenden Metalloenzyme eingeordnet (393). In dessen katalytischem Zentrum werden zwei Zn²⁺-Ionen durch

koordinative Bindungen an den Aminosäuren Asparaginsäure und Histidin fixiert (394). Aufgrund der Ähnlichkeit zum Substrat ATP werden nukleotidische Inhibitoren in Form von modifizierten ATP-Derivaten entwickelt. Allerdings blockiert der CD39-Inhibitor ARL67156 ebenfalls die Aktivität von CD73 und NPP1, wenn auch deutlich schwächer (395,396). Auch der CD73-Inhibitor Adenosin-5'-(α,β -methylendiphosphat (α,β -metADP oder AOPCP) zeigte ebenfalls geringe inhibitorische Eigenschaften an NPP1, weshalb aufgrund der geringen Selektivität der Nukleotidanaloga auch nicht-nukleotidische Substanzen entwickelt werden (397,398). Hierunter fallen unter anderem die Substanzklassen der Benzimidazol-derivate, Polysulfonate, Polyoxometallate (POM) und einige Polysaccharide, wovon die letzteren beiden Gruppen besonders durch inhibitorischer Potenz und Selektivität hervorstechen (398,399).

Die POM lassen sich als negativ geladene anorganische Clusterverbindungen mit hohem Molekulargewicht charakterisieren, deren Zentrum aus Schwermetallatomen wie Wolfram (W), Molybdän (Mo) oder Vanadium (V) besteht und von Sauerstoffatomen umgeben ist (400). Aus dieser Substanzgruppe wurden einige Vertreter als potente Inhibitoren der EN CD39 und NPP1-3 identifiziert. Unter diesen kristallisierte sich die Verbindung $K_6H_2[TiW_{11}CoO_{40}] \times 13 H_2O$ mit der Bezeichnung PSB-POM-141 sowohl bezüglich der Selektivität gegenüber CD39 als auch durch einen K_i -Wert von 1,46 nM als potenter Inhibitor von NPP1 heraus (401).

2.4.6 Heparine als NPP1-Inhibitor

Eine Studie zur NPP1-Aktivität auf Jurkat T-Zellen zeigte, dass diese durch GAG wie HS, Hyaluronsäure partiell und insbesondere durch Heparin stark in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration herabgesetzt wurde. Dabei blieb unklar, ob die Inhibition auf kompetitiver Hemmung oder auf der Funktion als falscher Metabolit beruhte (402). Hierbei stellte sich die Frage, ob und inwieweit eine Korrelation zwischen der NPP1-Inhibition, der Saccharidstruktur sowie der Verteilung und Häufigkeit der Ladungen im Molekül bestand. Anhand weiterer Untersuchungen bezüglich der großen sowie heterogenen Klasse der Polysaccharide konnte ebenfalls Potenzial zur Inhibition der Ektonukleotidasen festgestellt werden.

Laut neueren Untersuchungen eignen sich isolierte sulfatierte Polysaccharide aus Rot- und Braunalgen zur Inhibition der CD39- und NPP1-Enzymaktivität. In dieser Studie wurde anhand der extrahierten und getesteten Xylogalactane und Fucoideane aufgezeigt, dass sowohl NPP1 als auch CD39 in Enzymassays effektiv geblockt werden. Das Ergebnis wurde für ein Fucoidan konzentrationsabhängig *in vitro* an einer Glioblastomzelllinie bestätigt (403). Neben den Algenextrakten stellen die Glykosaminoglykane wichtige Vertreter der natürlichen

Polysaccharide dar. Weitere *in-vivo*-Studien widmeten sich der Aktivität von NPP1-3 auf CHO-Zellen und synaptischen Membranen des Rattengehirns sowie der selektiven Inhibition durch Heparin. Hierin wurde einerseits das Potenzial des Heparins als Inhibitor von NPP1 bestätigt und dessen Selektivität bezüglich NPP1 dargelegt (404,405).

Aufgrund dessen stellen Heparin und LMWH als mögliche ICI des Checkpoints NPP1 einen Ansatz zur Tumorthherapie dar.

3 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Promotionsarbeit ist es, neue Beiträge zur Aufklärung der Immunevasion von Tumoren sowie deren Resistenzentwicklung gegenüber Zytostatika zu leisten. Hierzu wird als verbindender Aspekt der beiden Fragestellungen der Purinmetabolismus in Form der Enzymklasse der Ektonukleotidasen sowie deren Substrat ATP und dessen Abbauprodukt ADO adressiert. Schwerpunktmäßig soll mittels diverser Verbindungen aus der Substanzklasse der Sulfopolysaccharide das Potenzial zur NPP1-Blockade ermittelt werden. Ziel ist es, die Purinhomeostase unabhängig vom bekannten CD39 in Richtung eines proinflammatorischen, antitumoralen Milieus zu verschieben und so die Immunevasion zu unterbinden. Dafür werden sowohl kommerzielle als auch partialsynthetische Heparine eingesetzt. Daraus sollen Erkenntnisse abgeleitet werden, inwieweit die als Antikoagulanzen in der Onkologie verwendeten Heparine auch eine immunonkologische Wirksamkeit entfalten können und ob dies strukturell zu optimieren ist. Zu diesem Zweck ist die Arbeit in mehrere Projektteile gegliedert.

Der erste Abschnitt umfasst die Identifikation einer geeigneten Tumorzelllinie zur Analyse der vorangestellten Fragestellungen. Dafür werden verschiedene Tumorzelllinien hinsichtlich ihrer EN-Expression mit Fokus auf NPP1 und CD73 untersucht. Zusätzlich soll mit Hilfe der Kapillarelektrophorese eine Methode zur qualitativen und quantitativen Analytik der zellulären ATP-Konversion und ADO-Bildung etabliert werden.

Im zweiten Projektabschnitt liegt der Fokus auf der Evaluation der NPP1-Blockade der zu analysierenden Verbindungen. Hierzu wird mit Hilfe der Kapillarelektrophorese die Konversion des NPP1-Substrats ATP in ADO betrachtet. Diese Methode wurde ausgesucht, da es sich hierbei um einen mehrstufigen Abbau mit Zwischenprodukten handelt, der die simultane Detektion geladener und ungeladener Moleküle erfordert.

Der dritte Abschnitt zielt auf einen potenziellen Zusammenhang zwischen einer EN-Expression, EN-Aktivität und einer klassischen Resistenzinduktion gegenüber Zytostatika ab. Es sollen einerseits Ovarialkarzinomzellpärchen bestehend aus Wildtyp und resistentem Subtyp hinsichtlich der EN-Expression miteinander verglichen und eine mögliche EN-Induktion durch Zytostatika betrachtet werden. Des Weiteren soll eine mögliche EN-Induktion anhand der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 nach Exposition gegenüber Doxorubicin und dem resistenzfördernden Faktoren Kollagen untersucht werden.

Im letzten Projektteil wird die Immunmodulation durch behandelte Tumorüberstände analysiert werden. Hierzu werden die per kapillarelektrophoretischer Untersuchung vielversprechendsten Verbindungen zur NPP1-Blockade als Tumorzellüberstand mit Immunzellen inkubiert. Auf

Ziel der Arbeit

zellulärer Ebene werden daraufhin mit Hilfe der Durchflusszytometrie sowohl die CD4⁺ T-Zelldifferenzierung in regulatorische T-Zellen als auch die PBMC hinsichtlich der zytolytischen Kapazität der NK-Zellen gegenüber der K562-Leukämiezellen betrachtet. Bezüglich der humoralen Ebene werden die CD4⁺-Überstände weitergehend auf die Zytokinsekretion von IL-10 als Mediator der Kommunikation zwischen Tumorzellen und T_{reg} untersucht. Des Weiteren wird durch Evaluation der interzellulären Kommunikation per Multiplex-Analyse auf ein breiteres Zytokinprofil erweitert, um anhand dessen die Immunmodulation in Richtung Immunsuppression oder Immunstimulation zu beleuchten.

Insgesamt soll durch die vier Projektteile ein Beitrag zur zellbiologischen Charakterisierung der EN NPP1 als Immuncheckpoint und Resistenzinduktor geleistet und ein mögliches therapeutisches Potential zu dessen Hemmung mittels Heparin beleuchtet werden.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Chemikalien und Reagenzien

| Bezeichnung | Hersteller |
|--|---|
| 1 -Step [®] Ultra TMB-ELISA Substratlösung Lösung | ThermoFisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA |
| 7-AAD Viability Staining Solution | BioLegend Inc. San Diego, CA, USA |
| Adenosin | Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland |
| Adenosin-3',5'-cyclisches-monophosphat | Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland |
| Adenosin-3'-monophosphat Dinatriumsalz | Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland |
| Adenosin-3'-diphosphat Dinatriumsalz | Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland |
| Adenosin-5'-[(α,β)-methyleno]diphosphat (AMPCP) | Jena Bioscience GmbH Jena, Deutschland |
| Adenosin-5'-triphosphat Dinatriumsalz Monohydrat | Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland |
| Bacillo [®] AF | Paul Hartmann AG Heidenheim, Deutschland |
| 2'/3'-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat (BzATP) | Jena Bioscience GmbH Jena, Deutschland |
| Biozym LE Agarose | Biozym Scientific GmbH Hessisch Oldendorf, Deutschland |
| Bovines Serum-Albumin, BSA | Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland |
| Calciumchlorid-Dihydrat | Carl Roth GmbH + Co.KG Karlsruhe, Deutschland |

Material und Methoden

| | |
|--|---|
| CFSE Cell Division Tracker Kit | BioLegend Inc. San Diego, CA, USA |
| Cisplatin | Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland |
| Collagen Type I Rat Tail | Corning Bedford, MA, USA |
| D(+)-Glucose | Carl Roth GmbH + Co.KG Karlsruhe, Deutschland |
| DH5 α kompetente Zellen zur Subklonierung | ThermoFisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland |
| Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat | Carl Roth GmbH + Co.KG Karlsruhe, Deutschland |
| Dipyridamol | Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland |
| Direct-zol™ RNA MiniPrep Kit | Zymo Research Irvine, CA, USA |
| dNTP-Mix (je 10 μ M) | ThermoFisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA |
| Doxorubicin HEXAL 2 mg/ml | Hexal AG Holzkirchen, Deutschland |
| Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS), w/o: Ca ²⁺ and Mg ²⁺ pH 7,4, steril | PAN-Biotech GmbH Aidenbach, Deutschland |
| Dulbecco's modified Eagle's medium – high glucose 4,5 g/l (DMEM®) | PAN-Biotech GmbH Aidenbach, Deutschland |
| Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenin-Hydrochlorid (EHNA) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland |
| Essigsäure 100% | Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland |
| Ethanol, absolut \geq 99% | Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland |

| | |
|---|--|
| Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA) | Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland |
| GelRed Nucleic Acid Stain 10000X | Biotium Inc. Fremont, CA, USA |
| Gigasept® Instru AF | Schülke & Mayr GmbH Norderstedt, Deutschland |
| Guava® Instrument Cleaning Fluid (ICF) | Luminex Corporation Austin, TX, USA |
| 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) | Carl Roth GmbH + Co.KG Karlsruhe, Deutschland |
| Histopaque®-1077 | Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland |
| Humanes IL-2, rekombinant | ThermoFisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA |
| Human IL-10 Mini ABTS ELISA Development Kit | PeptoTech Inc. Rocky Hill, NJ, USA |
| ImmunoCult™ Human CD3/CD28/CD2 T Cell Activator | STEMCELL Technologies Inc. Vancouver, Kanada |
| Inosin | Carl Roth GmbH + Co.KG Karlsruhe, Deutschland |
| iScript Advanced cDNA Synthesis Kit für RT-qPCR | Bio-Rad Laboratories Hercules, CA, USA |
| Isopropanol 100% | Merck Chemicals GmbH Darmstadt, Deutschland |
| Kaliumchlorid | Carl Roth GmbH + Co.KG Karlsruhe, Deutschland |
| Kaliumdihydrogenphosphat | Carl Roth GmbH + Co.KG Karlsruhe, Deutschland |
| L-Glutamin 200 mM | PAN-Biotech GmbH Aidenbach, Deutschland |
| MACS® Comp Bead Kit, anti-mouse Igk | Miltenyi Biotec B.V. & Co.KG Bergisch Gladbach, Deutschland |

Material und Methoden

| | |
|---|---|
| Magnesiumsulfat-Heptahydrat | Carl Roth GmbH + Co.KG Karlsruhe, Deutschland |
| Melsept [®] SF | B.Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland |
| Milchpulver Blotting Grade, fettarm | Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland |
| 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-(diphenyltetrazoliumbromid) (MTT) | AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland |
| Natriumazid | Carl Roth GmbH + Co.KG Karlsruhe, Deutschland |
| Natriumchlorid, Cellpure [®] ≥ 99,8% | Carl Roth GmbH + Co.KG Karlsruhe, Deutschland |
| Natriumhydrogencarbonat, Cellpure [®] ≥ 99,5% | Carl Roth GmbH + Co.KG Karlsruhe, Deutschland |
| Natriumhydroxid 0,1 N | Carl Roth GmbH + Co.KG Karlsruhe, Deutschland |
| Natriumhydroxid 5 N | Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland |
| Natriumlaurylsulfat (SDS) | Carl Roth GmbH + Co.KG Karlsruhe, Deutschland |
| 5'-(N-Ethylcarboxamido)adenosin (NECA) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland |
| Oligo (dT) Primer | ThermoFisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA |
| Paraformaldehyd | Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland |
| Penicillin-Streptomycin-Lösung (10.000 I.E./ml, 10 mg/ml) | PAN-Biotech GmbH Aidenbach, Deutschland |
| Phusion [®] High-Fidelity DNA-Polymerase | New England Biolabs Inc. Ipswich, MA, USA |
| Pyruvat Natrium (100 mM) | Life Technologies Corporation New York, NY, USA |

| | |
|--|--|
| RNaseOUT™, rekombinanter Ribonuklease-Hemmer | ThermoFisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA |
| Roti®-CELL DPBS/EDTA | Carl Roth GmbH + Co.KG Karlsruhe, Deutschland |
| RPMI 1640®-Nährmedium | PAN-Biotech GmbH Aidenbach, Deutschland |
| Salzsäure, konzentriert ≥ 37% | Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland |
| Saponin | Merck Chemicals GmbH Darmstadt, Deutschland |
| Schwefelsäure ≥ 95% Chemsolute® | Th. Geyer GmbH & Co.KG Renningen, Deutschland |
| Sera Plus, Special processed FBS, Virus and mycoplasma tested | PAN-Biotech GmbH Aidenbach, Deutschland |
| SuperScript™ IV Reverse Transkriptase Kit | ThermoFisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA |
| Sterillium® | Bode Chemie GmbH Hamburg, Deutschland |
| StraightFrom® Buffy Coat CD4 MicroBead Kit, human | Miltenyi Biotec B.V. & Co.KG Bergisch Gladbach, Deutschland |
| SYBR GreenER™ qPCR SuperMix | ThermoFisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA |
| TRI Reagent® | Zymo Research Irvine, CA, USA |
| Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) | Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland |
| Trypsin/EDTA 0,05%/0,02 % in PBS | PAN-Biotech GmbH Aidenbach, Deutschland |
| Tween®-20 | AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland |
| Uridin | Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland |

Material und Methoden

XR9577 (WK-X-24) P-gp Inhibitor

Pharmazeutisches Institut Bonn
Bonn, Deutschland

Zymoclean Gel Recovery Kit

Zymo Research
Irvine, CA, USA

4.1.2 Lösungen und Puffer

| Bezeichnung | Komponenten | Menge |
|---------------------------------|--|--------------------|
| 1% Agarosegel | Agarose TAE-Puffer | 1,2 g 120 ml |
| 3% PFA-Lösung (FACS) | PFA DPBS | 1,5 g 50,0 ml |
| 4% BSA-Lösung | BSA DPBS | 0,4 g 10,0 ml |
| A2780-Vollmedium | Fötale Kälberserum | 50 ml |
| CD4/K562/NK-Vollmedium | Penicillin/Streptomycin-Lsg (10.000 I.E./ml) | 5 ml |
| W1/W1CR-Vollmedium | RPMI 1640®-Nährmedium | 500 ml |
| A3875-G6 Stammlösung 3 mM | A3875-G6 Reinstwasser | 5,4 mg 1,0 ml |
| A3875-H6 Stammlösung 3 mM | A3875-H6 Reinstwasser | 7,2 mg 1,0 ml |
| A3875-I6 Stammlösung 3 mM | A3875-I6 Reinstwasser | 9,4 mg 1,0 ml |
| Adenosin-Lösung 10 mM | Adenosin Krebs-HEPES-Puffer | 26,7 mg 10,0 ml |
| ADP-Lösung 10 mM | ADP Krebs-HEPES-Puffer | 42,7 mg 10,0 ml |
| AMP-Lösung 10 mM | AMP Krebs-HEPES-Puffer | 34,7 mg 10,0 ml |
| ATP-Lösung 10 mM | ATP Krebs-HEPES-Puffer | 55,1 mg 10,0 ml |
| Blockierungslösung (ELISA/FACS) | BSA DPBS | 1,5 g 10,0 ml |

| | | |
|-------------------------------------|------------------------------------|----------|
| cAMP-Lösung 10 mM | cAMP | 32,9 mg |
| | Krebs-HEPES-Puffer | 10,0 ml |
| CFSE-Arbeitslösung | CFSE | 3 µl |
| | Hungermedium | 1497 µl |
| Cisplatin-Stammlösung 5 mM | Cisplatin | 15,0 mg |
| | DPBS | 10,0 ml |
| Diluent/Lösungsmittel (ELISA) | BSA | 50 mg |
| | Tween [®] -20 | 25 µl |
| | DPBS | 50 ml |
| Dipyridamol-Lösung 10 mM | Dipyridamol | 50,5 mg |
| | DMSO | 10,0 ml |
| Doxorubicin-Stammlösung 30 µM | Doxorubicin | 0,815 ml |
| | DPBS | 9,185 ml |
| EHNA-Lösung | EHNA-Hydrochlorid | 10,8 mg |
| | DPBS | 10,0 ml |
| Enoxaparin-Stammlösung 4000 I.E./ml | Clexane [®] 40 mg | 0,4 ml |
| | DPBS | 0,6 ml |
| FACS-Puffer | BSA | 500 mg |
| | NaN ₃ | 5 mg |
| | DPBS | 50,0 ml |
| Fixierungspuffer (FACS) | Saponin | 10 mg |
| | Tween [®] -20 | 50 µl |
| | 3% PFA-Lösung | 10,0 ml |
| Fondaparinux-Stammlösung 2,5 mg/ml | Arixtra [®] 2,5 mg/0,5 ml | 0,5 ml |
| | DPBS | 0,5 ml |
| IL-2-Arbeitslösung | IL-2-Stammlösung (100 U/µl) | 1 µl |
| | DPBS | 499 µl |
| Inosin-Lösung 10 mM | Inosin | 26,8 mg |
| | Krebs-HEPES-Puffer | 10,0 ml |
| Kollagenbeimpflösung | Collagen Type I (10,8 mg/ml) | 8 µl |
| | DPBS | 1792 µl |

Material und Methoden

| | | |
|---|--|-----------|
| Krebs-HEPES-Puffer (CE) | Natriumchlorid | 2772,4 mg |
| | Kaliumchlorid | 140,2 mg |
| | Kaliumdihydrogenphosphat | 65,3 mg |
| | Natriumhydrogencarbonat | 141,1 mg |
| | D-Glucose | 1585,4 mg |
| | HEPES | 953,2 mg |
| | Calciumchlorid-Dihydrat | 76,5 mg |
| | Magnesiumsulfat-Heptahydrat | 266,2 mg |
| | Reinstwasser | 400 ml |
| Kryomedium | Fötale Kälberserum | 9,0 ml |
| | DMSO | 1,0 ml |
| MDA-MB-231-Vollmedium | Fötale Kälberserum | 50 ml |
| | Penicillin/Streptomycin-Lsg (10.000 I.E./ml) | 5 ml |
| | L-Glutamin-Lsg (200 mM) | 5 ml |
| | Pyruvat-Lsg (100 mM) | 5 ml |
| | DMEM [®] -Nährmedium | 500 ml |
| MTT-Reagenz (5 mg/ml) | MTT | 50,0 mg |
| | DPBS | 10,0 ml |
| Permeabilisierungspuffer (FACS) | Saponin | 50 mg |
| | Tween [®] -20 | 50 µl |
| | FACS-Puffer | 10,0 ml |
| PSB-19316-Lösung 1 mM (CD73-Inhibitor) | PSB-19316 | 6,12 mg |
| | Reinstwasser | 10,0 ml |
| PSB-POM-141-Lösung 5 mM (NPP1-Inhibitor) | PSB-POM141 | 162 mg |
| | Reinstwasser | 10,0 ml |
| SDS-Phosphat-Puffer | Natriumlaurylsulfat (SDS 100 mM) | 5767,6 mg |
| | Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat | 356,0 mg |
| | Reinstwasser | 200 ml |
| Separationspuffer | BSA | 200 mg |
| | EDTA-Dihydrat | 29,76 mg |
| | DPBS | 40,0 ml |
| TAE-Puffer | Tris(hydroxymethyl)aminomethan | 121 g |
| | Essigsäure | 28,5 ml |
| | EDTA-Dihydrat | 9,3 mg |
| | Reinstwasser | 500 ml |
| Tinzaparin-Stammlösung 8000 I.E./ml | Innohep [®] 8000 I.E./0,4ml | 0,4 ml |
| | DPBS | 0,6 ml |

| | | |
|------------------------------|--|---------|
| Tween-20-Arbeitslösung | Tween [®] -20 | 10 µl |
| | DPBS | 4990 µl |
| U87-Vollmedium | Fötale Kälberserum | 50 ml |
| | Penicillin/Streptomycin-Lsg (10.000 I.E./ml) | 5 ml |
| | L-Glutamin-Lsg (200 mM) | 5 ml |
| | DMEM [®] -Nährmedium | 500 ml |
| UFH-Stammlösung 5000 I.E./ml | Heparin ratiopharm 5000 I.E./0,2 ml | 0,2 ml |
| | DPBS | 0,8 ml |
| Waschpuffer (ELISA) | Tween [®] -20 | 250 µl |
| | DPBS | 500 ml |

4.1.3 Primer

| Bezeichnung | Hersteller |
|---------------------------------------|---|
| β-Actin (ACTB) Human Primer | OriGene Technologies Inc. Rockville, MD, USA |
| GAPDH Human Primer | OriGene Technologies Inc. Rockville, MD, USA |
| NPP1 (CD203a) Human Primer | OriGene Technologies Inc. Rockville, MD, USA |
| NPP1 (CD203a) Human Sequencing Primer | OriGene Technologies Inc. Rockville, MD, USA |
| NPP2 Human Primer | OriGene Technologies Inc. Rockville, MD, USA |
| NPP3 Human Primer | OriGene Technologies Inc. Rockville, MD, USA |
| NT5E (CD73) Human Primer | OriGene Technologies Inc. Rockville, MD, USA |
| NTPD1 (CD39) Human Primer | OriGene Technologies Inc. Rockville, MD, USA |
| NTPD2 Human Primer | OriGene Technologies Inc. Rockville, MD, USA |
| NTPD3 Human Primer | OriGene Technologies Inc. Rockville, MD, USA |

Material und Methoden

NTPD8 Human Primer

OriGene Technologies Inc.
Rockville, MD, USA

4.1.4 Antikörper

| Antigen | Bezeichnung | Klon | Hersteller |
|-----------------------------|---|-------------|--------------------------------------|
| FoxP3 | FITC anti-human FOXP3 Antibody | 206D | BioLegend Inc. San Diego, CA, USA |
| FITC Isotype | FITC Mouse IgG, κ Isotype Ctrl | MOPC-21 | BioLegend Inc. San Diego, CA, USA |
| CD25 | PerCP/Cyanine5.5 anti-human CD25 Antibody | BC96 | BioLegend Inc. San Diego, CA, USA |
| PerCP/Cyanine5.5 Isotype | PerCP/Cyanine5.5 Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl | MOPC-21 | BioLegend Inc. San Diego, CA, USA |

4.1.5 Antikoagulantien und EN-Enzyminhibitoren

| Bezeichnung | Hersteller |
|--|---|
| Arixtra® 2,5 mg/0,5 ml Injektionslösung, Fertigspritze | Aspen Pharma Trading Limited Dublin, Irland |
| Clexane® 4.000 I.E. (40 mg/0,4 ml) Injektionslösung, Fertigspritze | Sanofi-Aventis Deutschland GmbH Frankfurt am Main, Deutschland |
| Desulfatierte Heparine | Prof. Giangiacomo Torri, Ronzoni Institut Mailand, Italien |
| Fraktionierte Dalteparinderivate | Prof. Annamaria Naggi, Ronzoni Institut Mailand, Italien |
| Heparin-Natrium-5000 I.E./0,2 ml-ratiopharm Injektionslösung, Fertigspritze | ratiopharm GmbH Ulm, Deutschland |
| Innohep® 8000 Anti-Xa I.E./ml Injektionslösung, Fertigspritze | Leo Pharma A/S Ballerup, Dänemark |
| PSB-19316 (CD73-Inhibitor) | G. Rolshoven (Prof. Christa Müller) Bonn, Deutschland |
| PSB-POM 141(= POM 141) NPP1-Inhibitor | Prof. Christa Müller, Universität Bonn Bonn, Deutschland |
| Reduziertes Oxyheparin | Prof. Giangiacomo Torri, Ronzoni Institut Mailand, Italien |

Seealgenextrakte

Prof. Susanne Alban, CAU Kiel
Kiel, Deutschland

Synthetische GAG-Trisaccharide

Prof. Hien Nguyen, Wayne State University
Detroit, MI, USA**4.1.6 Geräte und Instrumente**

| Bezeichnung | Hersteller |
|---|---|
| 48-Vial Proben-tray (CE) | Beckman Coulter Instruments Fullerton, CA, USA |
| Absaugsystem BVC 21 NT | Vacuubrand GmbH & Co. KG Wertheim, Deutschland |
| Accu-Jet [®] pro | Brand GmbH & Co. KG Wertheim, Deutschland |
| Analysenwaage Sartorius basic | Sartorius AG Göttingen, Deutschland |
| Beckman Coulter P/ACE MDQ Capillary Electrophoresis System | Beckman Coulter Instruments Fullerton, CA, USA |
| C1000 [™] Thermal cycler | Bio-Rad Laboratories Hercules, CA, USA |
| CD1008 Mini Zentrifuge | Phoenix Instrument GmbH Garbsen, Deutschland |
| Centrifuge 5430R | Eppendorf SE Hamburg, Deutschland |
| CFX 96 Real Time System | Bio-Rad Laboratories Hercules, CA, USA |
| ChemiDoc [™] Imaging System | Bio-Rad Laboratories Hercules, CA, USA |
| CO ₂ -Brutschrank ICOver | Memmert GmbH & Co.KG Schwabach, Deutschland |
| Colibri Microvolume Spectrometer | Berthold Detection Systems GmbH Pforzheim, Deutschland |
| CytoFlex | Beckmann Coulter GmbH Krefeld, Deutschland |

Material und Methoden

| | |
|---|--|
| Eppendorf® Thermostat Plus | Eppendorf SE Hamburg, Deutschland |
| Finnpipette™F2 (5-50 µl) | ThermoFisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA |
| Guava® easyCyte HT 11 Flow Cytometer | Merck Chemicals GmbH Darmstadt, Deutschland |
| Kapillaren-Halterung | Beckman Coulter Instruments Fullerton, CA, USA |
| Laminar-Air-Flow-Werkbank Holten safe 2010 | Heto-Holton A/S Allerød, Dänemark |
| Lichtmikroskop Axiovert 200 | Carl Zeiss Microscopy GmbH Jena, Deutschland |
| Lichtmikroskop Wilovert 30 | Helmut Hund GmbH Wetzlar, Deutschland |
| MDF-1156(ATN)-PE ULT Freezer | PHC Europe B.V. Etten-Leur, Niederlande |
| MidiMACS™ Separator | Miltenyi Biotec B.V. & Co.KG Bergisch Gladbach, Deutschland |
| Mr. Frosty™ Gefrierbehälter | ThermoFisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA |
| Multipette® M4 | Eppendorf SE Hamburg, Deutschland |
| Multiskan® EX | ThermoFisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA |
| peqSTAR 96X Thermocycler | VWR International Radnor, PA, USA |
| pH-Meter S20 SevenEasy™ pH | Mettler-Toledo GmbH Gießen, Deutschland |
| Pipette (10 µl) Research® | Eppendorf SE Hamburg, Deutschland |
| Pipette (10 µl) Transferpette®S | BRAND GmbH & Co. KG Wertheim, Deutschland |

| | |
|--|--|
| Pipette (100 µl) Research [®] | Eppendorf SE Hamburg, Deutschland |
| Pipette (100 µl) Transferpette [®] S | BRAND GmbH & Co. KG Wertheim, Deutschland |
| Pipette (1000 µl) Research [®] | Eppendorf SE Hamburg, Deutschland |
| Pipette (12×200 µl) | BRAND GmbH & Co. KG Wertheim, Deutschland |
| Pipette (2,5 µl) Research [®] | Eppendorf SE Hamburg, Deutschland |
| Pipette (20 µl) Research [®] | Eppendorf SE Hamburg, Deutschland |
| Pipette (200 µl) Research [®] | Eppendorf SE Hamburg, Deutschland |
| Pipette (5 ml) Transferpette [®] S | BRAND GmbH & Co. KG Wertheim, Deutschland |
| Pipette (8×50 µl) Transferpette [®] S-8 | BRAND GmbH & Co. KG Wertheim, Deutschland |
| Purelab [®] Plus Wasseraufbereitungsanlage | ELGA LabWater Celle, Deutschland |
| Severin Mikrowelle MW 7752 | Severin Elektrogeräte Sundern, Deutschland |
| Spatel, diverse | Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland |
| Tecan Spark | Tecan Group AG Männedorf, Schweiz |
| T-Personal 48 Thermocycler | Biometra GmbH Göttingen, Deutschland |
| Trockenschrank 60°C | Heraeus Holding GmbH Hanau, Deutschland |
| Ultraschallbad Sonorex [®] Super RK 510 H | Bandelin electronic GmbH & Co. KG Berlin, Deutschland |

Material und Methoden

| | |
|---|--|
| VIP ECO ULT Freezer MDF-DU502VH-PE | PHC Europe B.V. Etten-Leur, Niederlande |
| Vortexer RS-VA 10 | Phoenix Instrument GmbH Garbsen, Deutschland |
| Zellzähler CASY [®] 1 Model TT | Schärfe System GmbH Reutlingen, Deutschland |
| Zentrifuge Universal 32 R | Hettich GmbH & Co. KG Tuttlingen, Deutschland |
| Zentrifuge Universal 320 R | Hettich GmbH & Co. KG Tuttlingen, Deutschland |

4.1.7 Verbrauchsmaterialien

| Bezeichnung | Hersteller |
|---|--|
| 10 µl Tip Pipettenspitzen (1-10 µl), natur | Starlab GmbH Ahrensburg, Deutschland |
| 1000 µl Tip Pipettenspitzen (100-1000 µl), blau | Starlab GmbH Ahrensburg, Deutschland |
| 12 Well Plate 12-Well CytoOne [®] Platte, unbehandelt | Starlab GmbH Ahrensburg, Deutschland |
| 20 ml Spritze Einmalspritzen Braun Luer Solo (20 ml) | B.Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland |
| 200 µl Tip Pipettenspitzen (10-200 µl), gelb | Starlab GmbH Ahrensburg, Deutschland |
| 24 Well Plate 24-Well CytoOne [®] Platte, unbehandelt | Starlab GmbH Ahrensburg, Deutschland |
| 5000 µl Tip Pipettenspitzen (1000-5000 µl), natur | Starlab GmbH Ahrensburg, Deutschland |
| 5000 µl Tip Pipettenspitzen (5 ml) (1000-5000 µl) Plastibrand [®] , natur | BRAND GmbH & Co. KG Wertheim, Deutschland |
| 6 Well Plate 6-Well CytoOne [®] Platte, unbehandelt | Starlab GmbH Ahrensburg, Deutschland |

| | |
|---|--|
| Biosphere Filter Tips (100-1000 µl) | Sarstedt AG & Co.KG Nümbrecht, Deutschland |
| Biosphere Filter Tips (10-100 µl) | Sarstedt AG & Co.KG Nümbrecht, Deutschland |
| Biosphere Filter Tips (1-10 µl) | Sarstedt AG & Co.KG Nümbrecht, Deutschland |
| CasyCups CASY® cups | Schärfe System GmbH Reutlingen, Deutschland |
| Cell Strainer Miltenyi MACS® SmartStrainer (30 µm) | Miltenyi Biotec B.V. & Co.KG Bergisch Gladbach, Deutschland |
| Dual Solution™ Reservoirs | Heathrow Scientific Vernon Hills, IL, USA |
| Eppi 0,6 Reagiergefäße (0,6 ml) | Sarstedt AG & Co.KG Nümbrecht, Deutschland |
| Eppi 0,6 Reagiergefäße (0,6 ml) DNase/RNase frei | Sarstedt AG & Co.KG Nümbrecht, Deutschland |
| Eppi 1,5 Braun Reagiergefäße (1,5 ml), braun | Sarstedt AG & Co.KG Nümbrecht, Deutschland |
| Eppi 1,5 Reagiergefäße (1,5 ml) | Sarstedt AG & Co.KG Nümbrecht, Deutschland |
| Eppi 1,5 Reagiergefäße (1,5 ml) DNase/RNase frei | Sarstedt AG & Co.KG Nümbrecht, Deutschland |
| Eppi 2 Reagiergefäße (2,0 ml) | Sarstedt AG & Co.KG Nümbrecht, Deutschland |
| Eppi 2 Reagiergefäße (2,0 ml) DNase/RNase frei | Sarstedt AG & Co.KG Nümbrecht, Deutschland |
| Eppi 5 Reagiergefäße (5,0 ml) | Sarstedt AG & Co.KG Nümbrecht, Deutschland |
| Falcon 15 Zentrifugenröhrchen (15 ml) CellStar Tubes | Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland |
| Falcon 50 Zentrifugenröhrchen (50 ml) CellStar Tubes | Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland |

Material und Methoden

| | |
|--|--|
| Hard Shell® PCR Platten, 96 Wells | Bio-Rad Laboratories Hercules, CA, USA |
| Kryogefäße Cryo.S® | Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland |
| Microseal® B Filme für PCR-Platten | Bio-Rad Laboratories Hercules, CA, USA |
| Multistepper Tips Eppendorf Combitips advanced® 0,5 ml | Eppendorf AG Hamburg, Deutschland |
| Nunc Maxisorb F96 Maxisorb Nunc-Immuno Plate | ThermoFisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA |
| Pasteurpipetten, Glas | Brand GmbH & Co. KG Wertheim, Deutschland |
| Polymicro Flexible Fused Silica Capillary 1068150019 | Molex Lisle, IL, USA |
| RNaseZap™ | ThermoFisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA |
| Sapphire PCR Reaktionsgefäße (0,2 ml), natur | Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland |
| Serologische Pipette, wattiert, 10 ml, steril | Sarstedt AG & Co.KG Nümbrecht, Deutschland |
| Serologische Pipette, wattiert, 25 ml, steril | Sarstedt AG & Co.KG Nümbrecht, Deutschland |
| Sterile Platten 96 F 96-Well CytoOne® Platte, unbehandelt | Starlab GmbH Ahrensburg, Deutschland |
| Sterilfilter Sterilfilter (0,2 µm) | Whatman GmbH Dassel, Deutschland |
| T175 Zellkulturflaschen T175 (175 cm ²) | Sarstedt AG & Co.KG Nümbrecht, Deutschland |
| T25 Zellkulturflaschen T25 (25 cm ²) | Sarstedt AG & Co.KG Nümbrecht, Deutschland |
| T75 Zellkulturflaschen T75 (75 cm ²) | Sarstedt AG & Co.KG Nümbrecht, Deutschland |

| | |
|---|--|
| U-Platten Microplatte, 96-Well, PS, U-Boden, transparent | Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland |
| V-Platten Microplatte, 96-Well, PS, V-Boden, transparent | Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland |
| Wännchen Pipettierreservoir, PS, 50 ml für Mehrkanalpipetten | ratiolab GmbH Dreieich, Deutschland |
| Zellkulturflaschen, 650 ml, (175 cm ²), CELLCOAT Collagen Type I | Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland |
| Zymo-Spin™ IIC Column | Zymo Research Irvine, CA, USA |

4.1.8 Software

| Bezeichnung | Hersteller |
|---------------------------------------|--|
| Bio-Rad CFX Manager 2.3 | Bio-Rad Laboratories Hercules, CA, USA |
| ChemDraw 19.1 | Perkin Elmer LAS GmbH, Rodgau, Deutschland |
| CytExpert | Beckmann Coulter GmbH Krefeld, Deutschland |
| FlowJo v.10.5.3 | BD Life Sciences Franklin Lakes, NJ, USA |
| GraphPad Prism 8.4.0 | GraphPad Software La Jolla, CA, USA |
| GuavaSoft™ 3.3 | Merck KGaA Darmstadt, Deutschland |
| Image Lab™ Software 2.4 | Bio-Rad Laboratories Hercules, CA, USA |
| LEGENDplex™ Data Analysis Software | BioLegend Inc. San Diego, CA, USA |
| LibreOffice Calc 3.6 | The Document Foundation Berlin, Deutschland |
| Microsoft Office 2016 für Windows | Microsoft Corporation Redmond, WA, USA |

Material und Methoden

Microsoft Windows 10

Microsoft Corporation
Redmond, WA, USA

Spark Control Software

Tecan Group AG
Männedorf, Schweiz

Thermo Scientific™ Ascent™ Software

ThermoFisher Scientific Inc.
Waltham, MA, USA

Zotero 6.0

George Mason University
Washington DC, USA

4.2 Zellkultur

4.2.1 Inkulturnahme

Um eine langfristige Lagerhaltung der verwendeten Zelllinien zu gewährleisten, werden diese bei -150 °C in einem Ultratiefkühlschrank in Kryogefäßen aufbewahrt. Zur Inkulturnahme entnimmt man ein Kryogefäß und lässt es langsam bis auf 37 °C auftauen. Das Kryogefäß fasst ungefähr ein Milliliter (ml) Zellsuspension, welche in ein mit geeignetem Zellmedium vorgelegtes Zentrifugenröhrchen überführt und bei 4 °C sowie 450 g zentrifugiert wird. Im Anschluss ist der Überstand zu entfernen, das Zellpellet in 1 ml des vorgesehenen Mediums zu resuspendieren und in eine mit weiterem Medium vorgelegte T25-Zellkulturflasche zu transferieren. Zur Adhäsion und Wachstum der Zellpopulation wird diese bei 37 °C und 5% CO_2 inkubiert. Am folgenden Tag ist das Medium auszutauschen, um den zehnpromzentigen Anteil des im Kryomedium enthaltenen zelltoxischen Dimethylsulfoxid (DMSO) zu entfernen. Alternativ kann man die Zentrifugation überspringen und die Suspension aus Zell- und verdünntem Kryomedium direkt in eine Zellkulturflasche überführen. Nach etwa drei Stunden sind die Zellen adhärirt, woraufhin das Gemisch aus Zell- und verdünntem Kryomedium abgesaugt wird, um auch in dieser Variante den Anteil an zelltoxischem DMSO zu entfernen. Das abgesaugte Medium wird entsprechend mit frischem Zellmedium substituiert. Ist das Wachstum des adhärenen Zellrasens bis zur Konfluenz vorangeschritten, werden die Zellen analog zu Abschnitt 4.2.4 subkultiviert.

4.2.2 Kryokonservierung

Zur Vorbereitung der Kryokonservierung behandelt man die Zellen analog zu Abschnitt 4.2.4 und bestimmt deren Anzahl im Medium. Im Anschluss zentrifugiert man die Zellsuspension bei 4 °C sowie 450 g für 4 Minuten (min) . Nach Abnahme des Überstandes wird der Zelniederschlag in der gewünschten Konzentration in Kryomedium resuspendiert, um je einen Milliliter in ein Kryogefäß zu überführen. Das erforderliche Medium besteht aus 90% (V/V) fetalem Kälberserum (FKS) und 10% DMSO. Zunächst werden die Kryogefäße 24 h im Mr. Frosty™ Gefrierbehälter gelagert, um eine schonende Abkühlung von -1 °C/min bis auf -80 °C im Gefrierschrank zu gewährleisten und sie dann in den -150 °C Ultratiefkühlschrank zu transferieren.

4.2.3 Zellzahlbestimmung

Für die Standardisierung und Reproduzierbarkeit der Versuche ist eine konstante Zellzahl nötig. Hierfür kann man den Zellzähler CASY® 1 Model TT verwenden, dessen Verfahren auf der Methodik des Coulter-Zählers basiert. Hierbei wird der elektrische Widerstand mit Hilfe zweier Platinelektroden gemessen. Die Messelektroden befinden sich jeweils in einer durch eine Kapillare voneinander getrennten Kammer und tauchen in eine spezifische Elektrolytlösung ein. Werden Zellen während einer Messung durch die Kapillare gesaugt, vermindert sich folglich der zuvor konstante Stromfluss. Aufgrund der isolatorischen Eigenschaften einer intakten Zellmembran im Vergleich zum Elektrolyten erhöht sich proportional zur Größe der Zelle der Widerstand, welcher als Signal detektiert wird. Die Anzahl der ermittelten Änderungen des Widerstandes stellt dabei die Zellzahl der vermessenen Probe dar. Neben der Zellzahl ist parallel eine Bestimmung der Viabilität möglich. Bei defekten Zellen ist die strukturelle Integrität soweit herabgesetzt, dass lediglich der wesentlich kleinere Zellkern detektiert wird. Für die lebendigen Tumorzellen ergibt sich daraus eine Größenverteilung im Bereich von 8 µm bis 30 µm. Für kleinere Zelltypen wie isolierte T-Lymphozyten und mononukleäre Blutzellen ist eine Erweiterung des Bereichs auf 6 µm erforderlich. Das Resultat einer vermessenen Probe wird somit als Zellzahl je Milliliter, die Größenverteilung und Viabilität angegeben. Zur Bestimmung der Zellzahl werden je 10 ml der CASYton®-Elektrolytlösung per Sterilfiltration in einem CASY-Röhrchen vorgelegt. Nach Aufbereitung der Zellen analog zu Abschnitt 4.2.4 werden 20 µl Zellsuspension in die vorgelegte Elektrolytlösung gegeben und die Probe am CASY®-Zellzähler vermessen.

4.2.4 Subkultivierung

Zur Kultivierung der eingesetzten Zelllinien wird ein Inkubator mit einer Innentemperatur von 37 °C und einem Gehalt von 5 % CO₂ der Luft verwendet. Durch regelmäßige lichtmikroskopische Kontrolle werden sowohl das Wachstum der Zellpopulation als auch der Zustand des Zellmediums überprüft. Bei einem Farbwechsel des zugesetzten Indikators Phenolrot von Rot zu Gelb aufgrund saurer Stoffwechselprodukte ist ein Wechsel des Mediums nötig. Sobald adhärente Zellen einen konfluenten Rasen ausgebildet haben, können sie zu experimentellen Zwecken eingesetzt oder erneut in Medium kultiviert werden. Dazu wird das alte Medium entfernt und der Zellrasen mit sterilem Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) gewaschen, um tote Zellen zu entfernen. Je nach Größe der verwendeten Zellkulturflasche ist ein geeignetes Volumen einer Lösung aus Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) einzusetzen um die adhärenen Zellen durch die Komplexbildung der Ca²⁺ und Mg²⁺-

Ionen abzulösen. Bei starker Adhärenz der Zelllinien an der Kulturflasche ist der zusätzliche Einsatz der Peptidase Trypsin nötig, um die Zellen aus der Flasche durch Spalten der Proteinbindungen zu lösen. Die Dauer der Ablösung variiert zwischen den Zelllinien. Nach der Ablösung werden die Zellen mit DPBS oder Medium zügig von dem Flaschenboden abgespült und in ein Zentrifugenröhrchen transferiert. Es folgt die Zellzahlbestimmung analog zu Abschnitt 4.2.3 mit Hilfe des CASY[®]-Zellzählers. Die Zellsuspension wird bei 4 °C mit 450 g für vier Minuten zentrifugiert. Danach ist der Überstand zu verwerfen und das Zellpellet in 1 ml DPBS oder Medium aufzunehmen. Abschließend wird die erforderliche Zellzahl zum Passagieren in eine mit Medium vorgelegte Kulturflasche überführt oder zu experimentellen Zwecken eingesetzt.

4.2.5 Zelllinien

A2780/A2780cis Bei den beiden Zelllinien A2780 und A2780cis handelt es sich um Gewebeproben aus einem Ovarialkarzinom, die aus dem Tumorgewebe einer unbehandelten Patientin entnommen wurden. Bezogen wurden die Zellen von der ECACC (A2780 Katalognummer: 93112519, A2780cis Katalognummer: 93112517). Zur Kultivierung ist das Nährmedium RPMI 1640 mit den Zusätzen 10 % (V/V) FKS, und 1 % (V/V) Penicillin-Streptomycin-Lösung (10.000 I.E./ml, 10 mg/ml) verwendet worden. Die Cisplatinresistenz der Variante A2780cis ist durch wiederholte Exposition steigender Konzentrationen des Zytostatikums generiert worden. In regelmäßigen Intervallen ist die Resistenz durch Zytotoxizitätsassays (Abschnitt 4.4.1) zu überprüfen. Des Weiteren wurden die A2780/A2780cis Zellen über maximal 12 Passagen kultiviert, weil darüber hinaus eine Abnahme der Resistenz festgestellt wurde.

MDA-MB-231 Die Zelllinie MDA-MB-231 gehört zur Klasse der Brustkrebszelllinien und ist 1973 erstmals durch das *M.D. Anderson Hospital and Cancer Institute* etabliert worden. Sie entstammt einer 51-jährigen kaukasischen Frau. Innerhalb der Klasse der Brustkrebszelllinien wird die Zelllinie den TNBC zugeordnet, da sie im Gegensatz zu anderen Brustkrebsarten weder über Estrogen- noch Progesteron-Rezeptoren oder den humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (HER2) verfügen. Folglich weist diese im Falle einer Erkrankung im Vergleich zu den rezeptorpositiven Mammakarzinomen durch ein geringes Ansprechen der sonst indizierten Hormontherapien dementsprechend eine höhere Letalitätsrate aus. Dies steht unter anderem im Zusammenhang mit einer hohen Invasivität und hohen Inzidenz an Rezidiven (406). Zur Kultivierung der Zelllinie MDA-MB-231 wird als Grundlage das Zellmedium *Dulbecco's modified Eagle medium – high glucose* (DMEM) eingesetzt. Der Basis sind die Zusätze 10 % (V/V) FKS, 1 % (V/V) Penicillin-Streptomycin-Lösung (10.000 I.E./ml, 10 mg/ml), 1 % (V/V) L-Glutaminlösung 200 mM und 1 % (V/V) Natriumpyruvatlösung 100 mM hinzuzufügen.

K562 Die Zelllinie K562 entstammt einer 53-jährigen Patientin, welche bereits vier Jahre lang gegen chronisch myeloische Leukämie therapiert wurde. Lozzio und Lozzio konnten die Suspensionszelllinie im Jahr 1975 etablieren, indem die Gewebeprobe aus einem Pleuraerguss während einer Blastenkrise isoliert wurde (407). Sie eignet sich aufgrund der geringen Expression der Klasse-I-HLA zur Analyse der Zytotoxizität natürlicher Killerzellen (408). Die Kultivierung ist in RPMI 1640 mit den Zusätzen 10 % (V/V) FKS, und 1 % (V/V) Penicillin-Streptomycin-Lösung (10.000 I.E./ml, 10 mg/ml) erfolgt.

U87 Die Zelllinie U87, auch bekannt als U87 MG, entstammt einem Glioblastom eines nicht näher genannten männlichen Patienten. Der Namenszusatz MG bezieht sich hierbei auf die Bezeichnung Glioblastoma multiforme (GBM), da die Zelllinie histologische Ähnlichkeiten zu den Gliazellen des Gehirns aufweist. Gemäß der histologischen Kategorisierung der Hirntumore (Grad I-IV) der WHO repräsentiert die GBM-Zelllinie U87 ein Grad IV-Gliom (409). Sie zeichnet sich im Vergleich zu niederen Graden durch eine Hyperzellularität, stark erhöhte Angiogenese und Invasivität sowie eine sehr geringe Überlebensrate der Patienten aus. Somit stellt U87 MG aufgrund der eingeschränkten Therapierbarkeit, etwa durch Strahlen- und Chemotherapie, sowie schneller Resistenzentwicklung zusammen mit anderen GBM eine der aggressivsten Tumorarten dar (410). Als Nährmedium diente DMEM zuzüglich der Additive 10 % (V/V) FKS, 1 % (V/V) Penicillin-Streptomycin-Lösung (10.000 I.E./ml, 10 mg/ml), sowie 1 % (V/V) L-Glutaminlösung 200 mM.

W1/W1CR Ähnlich den A2780/A2780cis Zellen handelt es sich bei den W1/W1CR um Zelllinien, die aus dem Gewebe eines Ovarialkarzinoms einer unbehandelten Patientin isoliert worden sind. Die Bereitstellung übernahm hierbei Herr Dr. Januchowski von der *University of Medical Sciences* in Posen. Als Zellmedium wurde RPMI 1640 mit den Additiven 10 % (V/V) FKS, und 1 % (V/V) Penicillin-Streptomycin-Lösung (10.000 I.E./ml, 10 mg/ml) eingesetzt. Den W1CR-Zellen ist in kontinuierlichen Abständen 1 µg/ml Cisplatinlösung zugesetzt worden, um die Resistenz gegenüber Cisplatin aufrechtzuerhalten. Die Resistenz ist wiederum mit Hilfe eines Zytotoxizitätsassays (Abschnitt 4.4.1) regelmäßig überprüft worden.

PBMC/CD4⁺ T-Zellen Zur Kultivierung der zu experimentellen Zwecken isolierten *Peripheral Mononuclear Blood Cells* und CD4⁺ T-Lymphozyten sind diese mit RPMI 1640 und den Additiven 10 % (V/V) FKS, und 1 % (V/V) Penicillin-Streptomycin-Lösung (10.000 I.E./ml, 10 mg/ml) behandelt worden.

4.3 Zellisolation

4.3.1 Peripheral Mononuclear Blood Cells

Die in dieser Arbeit verwendeten humanen PBMC sind aus *Buffy Coat* isoliert worden, der über das Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Bonn bezogen wurde. Es handelt sich hierbei um anonymisierte Blutspenden, sodass keinerlei Rückschlüsse auf den Spender gezogen werden konnten. Der Leukozytenfilm entsteht durch Aphaese als Nebenprodukt bei der Verarbeitung von Blutspenden, da diese vor der Gabe an die Patienten entfernt werden müssen. Aufgrund der Dichtegradientenzentrifugation entstehen mehrere Phasen im Röhrchen, woraufhin man die undurchsichtige PBMC-Phase mit Hilfe einer Pasteurpipette extrahiert. Hierfür entnimmt man

ein adäquates Volumen aus dem Blutbeutel und gibt dieses auf einen 30 µm Nylonfilter um beispielsweise aggregierte Thrombozyten zu entfernen. Anschließend wird das Filtrat im Verhältnis 3:5 mit DPBS verdünnt. Auf je 3 ml einer im Zentrifugenröhrchen vorgelegten Histopaque®-1077-Lösung schichtet man vorsichtig 8 ml des Blut-Puffer-Gemisches auf. Die Trennung per Dichtegradientenzentrifugation erfolgt bei 400 g bei Raumtemperatur für 10 Minuten mit anschließender Entnahme des trüben, farblosen PBMC-Films. Die extrahierte Menge PBMC wird mit DPBS auf 12 ml eingestellt und abermals unter den genannten Bedingungen zentrifugiert. Es erfolgen nach Entfernen des Überstandes eine Resuspendierung in DPBS und eine Zellzählung der PBMC am CASY®. Dabei gilt es, wie bereits in Abschnitt 4.2.3 beschrieben, den kleineren Zelldurchmesser der PBMC von 6 µm zu berücksichtigen. Im Anschluss an einen weiteren Waschschrift stellt man die PBMC auf eine Konzentration von 2×10^6 /ml im Zellmedium ein. Bis zur Versuchsdurchführung am folgenden Tag wird die Zellsuspension stehend in einer Zellkulturflasche kultiviert.

4.3.2 CD4⁺ T-Lymphozyten

Die Extraktion humaner CD4⁺ T-Zellen ist analog den PBMC aus anonymisierten *Buffy Coats* erfolgt. Hierzu ist das StraightFrom™ Buffy Coat Micro Bead Kit der Firma Miltenyi Biotec eingesetzt worden. Der Isolation liegt das Prinzip der Positivselektion durch MACS (*magnetic activated cell sorting*) zugrunde. Dabei werden die CD4⁺ T-Zellen mit einem anti-CD4-Antikörper markiert, der über seine Fc-Region (kristallisierbares Fragment) kovalent an ein Eisenpartikel der Größe 50 nm gebunden ist. Nach Bindung der Fab-Fragmente (antigenbindendes Fragment) des Antikörpers an das Epitop CD4 nutzt man ein ferromagnetisches Feld, um die markierten CD4⁺-T-Zellen in der Säule zurückzuhalten und die unerwünschten Zellen abzutrennen.

Die verwendeten Lösungen des Kits sind für die Isolation auf 4 °C temperiert. Vor der Isolation wird ein ausreichendes Volumen *Buffy Coat* mit Hilfe eines 30 µm Nylonfilters aufgereinigt, um potenziell vorhandene Aggregate abzuschneiden. Das Filtrat wird analog der Herstelleranleitung mit der nötigen Menge an Micro Bead Mix versetzt und bei 4 °C für 15 min im Kühlschrank inkubiert. Simultan wird die MACS™ Säule im Magnetfeld des MidiMACS™ Separators positioniert und durch Zugabe von 3 ml entgastem Separationspuffer vorbereitet. Nach Ablauf der Inkubation wird die Zellsuspension auf die Säule aufgetragen. Der Durchfluss mit den nicht markierten Zellen wird aufgefangen, während die Bead-Antikörperkonjugate die CD4⁺-T-Lymphozyten im Magnetfeld zurückhalten. Nach vollständigem Durchlauf wird die Säule zweimal mit je 2 ml Separationspuffer gewaschen, um Rückstände nicht markierter

Zellen zu entfernen. Im Anschluss müssen die aufgereinigten CD4⁺ T-Zellen aus der Säule eluiert werden. Hierfür wird die Säule auf einem neuen Zentrifugenröhrchen platziert, bevor man 4 ml Elutionspuffer aufträgt. Mit Hilfe eines dazugehörigen Stempels wird die Suspension durch die Säule gedrückt. Es folgen die Zellzahl- und Viabilitätsbestimmungen der Fraktion per CASY[®] Zellzähler, wobei ein Zelldurchmesser zwischen 6 µm und 30 µm als Indiz für eine vitale Zellfraktion gilt. Der Überstand kann nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 4 °C und 400 g abgenommen und die Zellen in RPMI 1640 Medium zur weiterführenden Behandlung aufgenommen werden.

4.4 MTT-Assay

4.4.1 Grundlage

Mit Hilfe des MTT-Assays sind im Rahmen dieser Arbeit Analysen zur Viabilität der Zelllinien A2780/A2780cis, W1/W1CR und MDA-MB-231 durchgeführt und der Einfluss verschiedener Testsubstanzen auf deren Vitalität geprüft worden. Als essentiell für die kolorimetrische Viabilitätsanalyse erweist sich das namensgebende Salz MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid). Lebendige Zellen setzen das wasserlösliche, gelbliche Tetrazoliumsalz durch Reduktion und folgende Ringöffnung in ein violettfarbenes Formazan um (411). Der exakte Reaktionsmechanismus konnte bisher noch nicht final aufgeklärt werden. Bislang galt die Vermutung, dass an der Reaktion die mitochondriale Succinat-Dehydrogenase beteiligt ist. Neuere Untersuchungen kommen jedoch andererseits zum Resultat, dass die pyridinhaltigen Coenzyme NADH und NADPH als biochemische Elektronendonatoren die Schlüsselrolle in der enzymatischen Reduktion spielen (412).

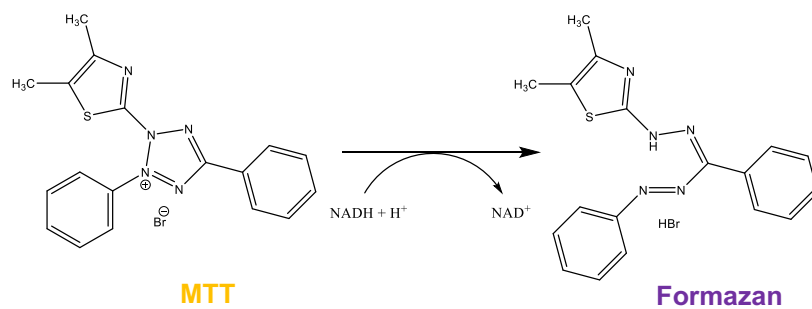


Abbildung 9: Reduktive Umsetzung des namensgebenden MTT-Salzes per Koenzym $\text{NADH}^+ + \text{H}^+$ in ein quantifizierbares, violette Formazan

Das gebildete Formazan ist wasserunlöslich und reichert sich daher in den Zellen als Präzipitat an. In DMSO gelöst kann die Absorption des gebildeten Formazans bei $\lambda_{\text{max}} = 570 \text{ nm}$ photometrisch vermessen werden. Die Reduktion des Tetrazoliumsalzes in ein Formazan ist dabei proportional zur metabolischen Aktivität vitaler Zellen. Deshalb stellt das gemessene Absorptionssignal eine Korrelation zur Zellvitalität her, die man zur Analyse zytotoxischer Substanzen nutzen kann (413). Folglich erlaubt der MTT-Assay Erkenntnisse über das Widerstandsverhalten untersuchter Tumorzelllinien gegenüber den indizierten Zytostatika. Ebenfalls können der Wildtyp und die resistente Variante durch Ermittlung des EC_{50} -Wertes (*effective concentration*) miteinander verglichen werden. Hierzu werden die verwendeten Tumorzellen steigenden Konzentrationen des nach indizierter Therapie korrespondierenden

Zytostatikums ausgesetzt. Der EC_{50} -Wert stellt die Konzentration an Zytostatikum dar, die die Hälfte aller Zellen abtötet. Nach Sicherstellung eines signifikanten Resistenzunterschieds zwischen Wildtyp und resistenter Variante kann in der Folge mittels qPCR eine Korrelation zwischen Expressionsverhalten der Ektonukleotidasen und Zytostatikaresistenz analysiert werden.

4.4.2 Probenvorbereitung Ovarialkarzinome A2780/A2780cis und W1/W1CR

Die Vorbereitung der Zellen folgt den Ausführungen in Abschnitt 4.2.3, und die Konzentration wird auf 125 Zellen/ μ l eingestellt. Als Verdunstungsschutz werden in die 36 umrandenden Kavitäten der 96-Wellplatte 90 μ l DPBS-Puffer gegeben. In die weiteren Kavitäten der Platte werden jeweils 80 μ l Zellsuspension pipettiert, was einer Gesamtzahl von 10.000 Zellen entspricht. Nach einer Inkubation von 24 h bei 37 °C und 5 % CO_2 sind die Zellen adhären und können mit Cisplatin behandelt werden. Zuvor wird eine halblogarithmische Verdünnungsreihe von Cisplatin mit Konzentrationen zwischen $10^{-7,5}$ und $10^{-3,5}$ mol/l erstellt.

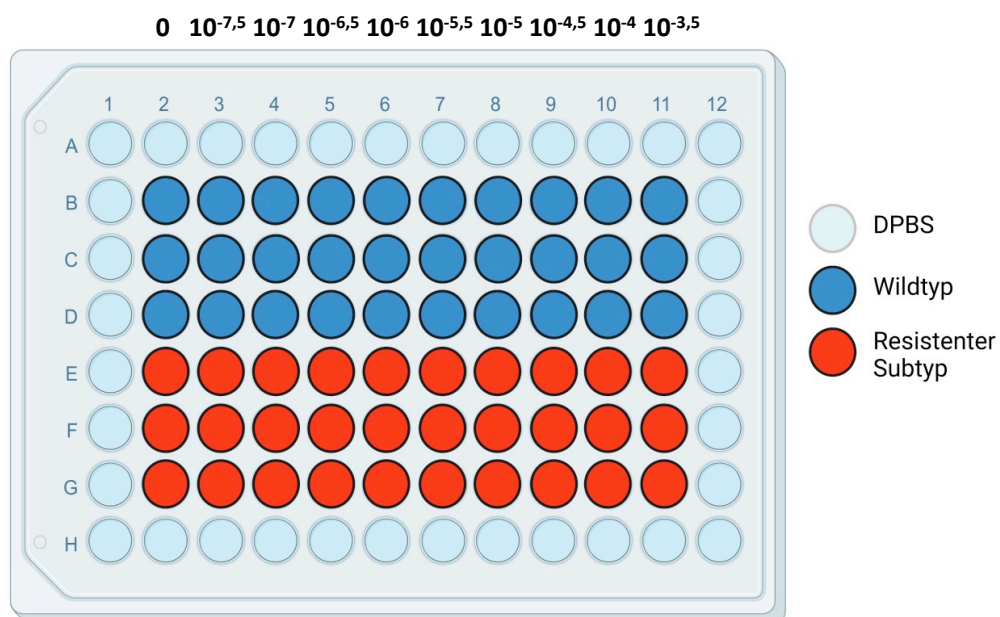


Abbildung 10: Darstellung des Pipettierschemas einer Konzentrationsreihe zur Zytotoxizitätsanalyse einer Wildtyp-Tumorzelllinie und ihres cisplatinresistenten Subtyps. Die Abbildung wurde mit Hilfe von BioRender.com erstellt.

In die zweite Spalte werden 20 μ l DPBS hinzugegeben, weshalb diese als Negativkontrolle ohne Cisplatin dient. Die übrigen Spalten 3 – 11 werden in aufsteigender Konzentration mit 10 μ l DPBS und 10 μ l der jeweiligen Cisplatinverdünnung beimpft. Es folgt eine weitere Inkubation unter Cisplatin für weitere 72 h, bevor die Proben vermessen werden.

4.4.3 Probenvorbereitung MDA-MB-231-Zellen

Neben den Ovarialkarzinomen wurde auch die Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 hinsichtlich Zytotoxifizierung und Ektonucleotidase-Aktivität untersucht. Die Fragestellung lautet, ob der ektoenzymatische ATP-Abbau und dessen Inhibition einen Beitrag zur gesteigerten Resistenz gegenüber dem Zytostatikum Doxorubicin leistet. Additiv wird der Einfluss des Kollagens auf die Resistenzentwicklung betrachtet. Obwohl die Probenvorbereitung einige Modifikationen im Vergleich zu den Ovarialkarzinomzellen erfordert, wird diese aber nahezu analog durchgeführt. Zur Blockade des Abbaus von ATP wurden der NPP1-Inhibitor PSB-POM-141 und der CD73-Inhibitor PSB-19316 verwendet. In Vorversuchen galt es zunächst festzustellen, ob die Inhibitoren eine Toxizität gegenüber den MDA-MB-231 Zellen aufweisen. Als entscheidender Parameter der Versuchsreihe dient abermals der EC_{50} -Wert um die Sensitivität gegenüber Doxorubicin zu charakterisieren.

Aufgrund der breiteren Testung als bei der Versuchsreihe mit den Ovarialkarzinomzellen wurde die Zellzahl je Kavität auf 5000 adjustiert, so dass 70 μ l Zellsuspension in jedes Well pipettiert wurden. Im Rahmen der Vorversuche wurden nach einer 24-stündigen Inkubation 20 μ l DPBS sowie 10 μ l Lösung eines Ektonukleotidaseninhibitors zugesetzt. PSB-POM-141 und PSB-19316 sind dabei in Konzentrationen von jeweils 5 und 10 μ M beziehungsweise 100 und 200 nM getestet worden. Im Anschluss erfolgte eine weitere Inkubation über 72 h bis zur Vermessung. Bei beiden Inhibitoren konnte auch in der höheren Konzentration keine Toxizität nachgewiesen werden, weshalb diese für den weiteren Verlauf berücksichtigt wurden.

Im Hauptteil der Versuchsreihe wurden die Inhibitoren dann jeweils mit ATP, dem Substrat der Ektoenzyme in Kombination mit einer Verdünnungsreihe Doxorubicin analysiert. Die Konzentrationsreihe des Doxorubicins hatte dabei eine Varianz von $10^{-8,5}$ bis $10^{-4,5}$ mol/l, während ATP auf 300 μ M eingestellt wurde. Alle Stammlösungen sind so zu verdünnen, dass bei Zugabe von 10 μ l auf ein Gesamtvolumen von 100 μ l/Well die gewünschte Konzentration erreicht wird. Des Weiteren wird in verschiedenen Publikationen der Zusammenhang zwischen Expression der Ektonukleotidasen, Wachstum auf Kollagen und Sensitivität diskutiert. Hierzu sind 96-Wellplatten vor Versuchsbeginn mit Kollagen beschichtet worden. Anhand der folgenden Formel kann die benötigte Kollagenkonzentration berechnet werden.

$$c(\text{Kollagen}) = \frac{\text{Fläche [cm}^2\text{]} \times \text{Beschichtungsdichte } \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{cm}^2}\right]}{\text{Beschichtungsvolumen } [\mu\text{l}]}$$

Formel 1: Berechnung der benötigten Kollagenkonzentration zur Plattenbeschichtung

Dabei erfolgt eine Zugabe an $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Kollagen mit einem empfohlenen Beschichtungsvolumen von $30 \mu\text{l}$ einer verdünnten Kollagenlösung je Kavität. Die Grundfläche der Kavität einer 96-Wellplatte beträgt $0,143 \text{ cm}^2$. Setzt man die Parameter ein, erhält man eine Kollagenkonzentration von $0,0477 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Die Stammlösung wird entsprechend mit DPBS verdünnt um die $30 \mu\text{l}$ Beschichtungsvolumen zu erreichen. Nach Zugabe der Kollagenlösung müssen die Platten bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5% CO_2 im Inkubator getrocknet und anschließend im Kühlschrank gelagert werden. Die weitere Vorgehensweise verhält sich analog zu nicht beschichteten Platten.

4.4.4 Auswertung

Auf die Inkubation mit Zytostatika sowie diversen Testsubstanzen folgt die Zugabe des Reagenzes MTT. Hierfür wird zuvor eine Lösung der Konzentration 5 mg/ml mit DPBS angefertigt, wovon $20 \mu\text{l}$ in jedes Well gegeben werden. Die Ovarialkarzinomzellen werden für 45 Minuten bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5% CO_2 inkubiert, wohingegen für die MDA-MB-231 60 Minuten Inkubationszeit erforderlich sind. Währenddessen wird MTT durch die lebendigen Zellen zum violetten Formazan reduziert. Der flüssige Inhalt wird vorsichtig durch Ausklopfen entfernt und die wasserunlöslichen Formazankristalle in $200 \mu\text{l}$ DMSO aufgenommen und gelöst. Mittels des Multiskan EX Reader wird die Absorption der Proben bei $\lambda_{\text{max}} = 570 \text{ nm}$ vermessen und eine weitere Hintergrundmessung bei $\lambda = 690 \text{ nm}$ aufgenommen. Die Absorptionswerte der Hintergrundmessung stellen die Blindwerte dar und werden zur Korrektur der Messwerte bei $\lambda_{\text{max}} = 570 \text{ nm}$ von diesen subtrahiert. Für die Auswertung ist es erforderlich, dass die subtrahierten Absorptionswerte ≤ 1 sind, da nach dem Lambert-Beerschen Gesetz eine lineare Korrelation zwischen Absorption und Konzentration nur in dem Absorptionsbereich von $0,2$ – $1,0$ besteht. Die Triplikate werden gemittelt und im Anschluss auf den höchsten gemessenen Mittelwert normalisiert, welcher dann 100% Viabilität definiert. Zur Erstellung einer Konzentrations-Effekt-Kurve (*dose response*) werden mit Hilfe der Graphpad PRISM Software die normalisierten Werte gegen die dekadisch logarithmierten Konzentrationen des verwendeten Zytostatikums aufgetragen. Anhand des sigmoidalen Kurvenlaufs der nichtlinearen Regression kann der halbmaximale Effekt beziehungsweise die mittlere effektive Konzentration EC_{50} über den Wendepunkt bestimmt werden. Im Falle dieser Versuchsreihe kann aufgrund der Letalität als definiertem Effekt die EC_{50} auch als LC_{50} bezeichnet werden. Für eine übersichtliche Darstellung der Sensitivität gegenüber dem Zytostatikum werden durch Logarithmierung die pEC_{50} -Werte berechnet und als Säulendiagramm aufgeführt. Ein weiterer Parameter zur Evaluation der Sensitivität insbesondere bei Zellpärchen oder zur Akzentuierung

Material und Methoden

unterschiedlicher Behandlungen stellt der Resistenzfaktor RF dar. Dieser ergibt sich in dieser Versuchsreihe aus dem Quotienten aus den EC_{50} der A2780cis und W1CR zu den jeweiligen Schwesterzelllinien A2780 und W1. Der RF kann mittels der aufgeführten Formel 2 berechnet werden.

$$\text{Resistenzfaktor } RF = \frac{EC_{50} (\text{resistent oder behandelt})}{EC_{50} (\text{nicht resistent oder unbehandelt})}$$

Formel 2: Berechnung des Resistenzfaktors RF

Um eine ausreichende Differenzierung der Eigenschaften der Wildtypzelllinie und des zytostatikaresistenten Subtyps hinsichtlich der Resistenz zu gewährleisten, sollte der Resistenzfaktor $RF \geq 2$ betragen.

4.5 Quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion

4.5.1 Grundlage

Die quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) ermöglicht es, Erkenntnisse über das Ausmaß an der Expression *genes of interest* (GOI = Zielgene) zu gewinnen und diese direkt miteinander zu vergleichen. Zu diesem Zweck wird RNA (Ribonukleinsäure) aus den Zellen isoliert und mit Hilfe der Reversen Transkriptase in cDNA (komplementäre Desoxyribonukleinsäure) transkribiert und mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) vervielfältigt. Im Vergleich zur genomischen DNA des Zellkerns ist die zytosolische, reife mRNA (*messenger* Ribonukleinsäure) geeigneter zur Analyse aufgrund der Tatsache, dass sie nur aus den kodierenden Exons zusammengesetzt ist. Die nicht kodierenden Introns sind nach der Transkription durch das Spleißen im Spleißosom bereits im Zellkern entfernt worden (414). Dadurch ermöglicht die qPCR der mRNA quantitative Aussagen über die Häufigkeit der Transkriptionen und erlaubt somit eine Aussage über die Häufigkeit der Expression verschiedener Proteine. Durch Lyse der Zellen kann die mRNA extrahiert und durch das Enzym Reverse Transkriptase in cDNA überschrieben werden. Mit Hilfe der RNase H wird die mRNA des hybridisierten Stranges abgebaut, sodass die cDNA wieder als Einzelstrang vorliegt (415). Der cDNA-Strang dient während der qRT-PCR als Vorlage bzw. Matrize zur Vervielfältigung. An der Matrize lagern sich komplementär kurze Oligonukleotide an, die als Primer bezeichnet werden. Sie dienen einer hitzebeständigen DNA-Polymerase als Startpunkt zur DNA-Synthese mittels freier Nukleosidtriphosphate (dNTP) in 5'→3'-Richtung. Die Polymerasekettenreaktion teilt man in drei Phasen unterschiedlicher Temperatur ein. In der als Denaturierung bezeichneten ersten Phase wird der Matrizendoppelstrang durch Erhitzen auf 95 °C in Einzelstränge geteilt. In der folgenden Primerhybridisierung, auch als Annealing bezeichnet, lagern sich bei 50 °C – 65 °C die Primer komplementär nach ihrem Design an die vorgesehene Stelle der DNA-Matrize an. Die Elongation ist die letzte Phase, in der die hitzebeständige DNA-Polymerase den komplementären DNA-Strang bei ca. 70 °C in 5'→3'-Richtung vervollständigt. Die drei genannten Phasen aus Denaturierung, Annealing (Hybridisierung) und Elongation bilden einen PCR-Zyklus, in welchem die Menge an DNA verdoppelt wird. Folglich steigt je Zyklus die vorhandene Menge der DNA exponentiell um den Faktor 2 an (416). In Abbildung 11 ist der Ablauf der drei aufeinanderfolgenden Phasen eines PCR-Zyklus mit dem Endergebnis einer qPCR skizziert.

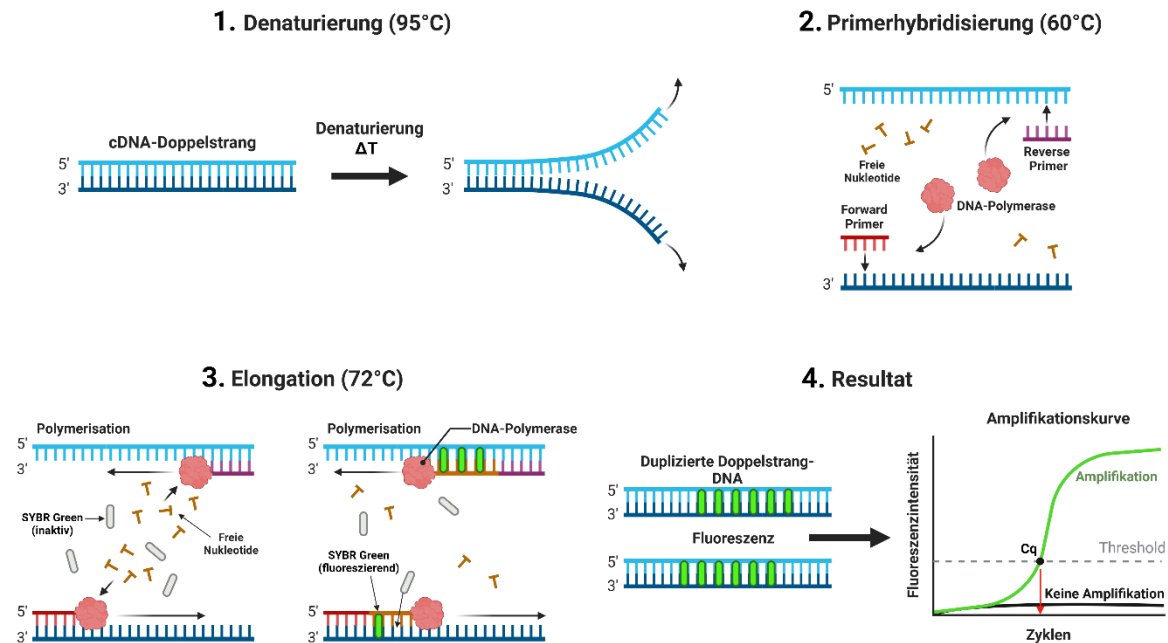


Abbildung 11: Schematischer Ablauf der Phasen eines PCR-Zyklus einer qPCR mitsamt dem Endergebnis. Durch Hitze erfolgt eine Denaturierung des DNA-Doppelstrangs in Einzelstränge (Phase 1). Hybridisierung des forward- und reverse-Primers an der vorliegenden DNA-Matrize und Anlagerung der DNA-Polymerase (Phase 2). Ausgehend von den Primern, synthetisiert die DNA-Polymerase aus freien Nucleotiden den komplementären Strang in 5'→3'-Richtung, der mit dem vorliegenden Matrizenstrang eine Doppelhelix bildet. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green (grau) kann in diese interkalieren (grün) und emittiert daraufhin Fluoreszenz (Phase 3). Darstellung einer Amplifikationskurve nach vollständigem Ablauf der qPCR mit Bestimmung des Cq-Wertes anhand der Fluoreszenzintensität und des gesetzten Thresholds (Phase 4). Die Abbildung wurde mit Hilfe von BioRender.com erstellt.

Je nach vorliegender Menge DNA zu Beginn der qRT-PCR wird eine unterschiedliche Zahl an Zyklen benötigt, bevor diese mit Hilfe eines interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs nachgewiesen werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit ist hierfür SYBR Green I eingesetzt worden. Nach Interkalation des Fluoreszenzfarbstoffs in die α -Doppelhelixstruktur der DNA kann dessen emittierte Fluoreszenz bei $\lambda_{\max} = 521 \text{ nm}$ während der Elongation detektiert werden, da sich die Intensität mit Interkalation um den Faktor 1.000 erhöht (417). Die Messung der Fluoreszenzintensität findet während der laufenden PCR-Zyklen in Echtzeit statt. Derjenige Zyklus, in welchem die Fluoreszenzintensität einen zuvor festgelegten Schwellenwert (*threshold*) durch ausreichende DNA-Amplifikation überschreitet, wird als Messpunkt genommen. Dieser Wert wird als Cq-Wert (*Quantification Cycle*) bezeichnet und dient als Endpunkt der Analyse. Die frühere Bezeichnung Ct-Wert (*Threshold Cycle*) kann synonym verwendet werden, ist zur Vereinheitlichung der Nomenklatur nach den MIQE-Richtlinien allerdings nicht mehr gebräuchlich (418).

4.5.2 Zellyse und RNA-Extraktion

Die Proben sind analog der Beschreibung in den Abschnitten 4.4.2 bzw. 4.4.3 generiert und mit Hilfe der Anleitung des Direct-zol™ RNA Mini Prep Kit der Firma Zymo Research bearbeitet worden. Zur Zellyse sind die Zellpellets in 500 µl in TRI Reagent® aufgenommen worden. Das Detergenz TRI Reagent® enthält die beiden chaotropen Verbindungen Guanidiniumthiocyanat und Phenol, mit deren Hilfe die Zellmembran lysiert und das Enzym RNase inhibiert werden (419). Um die festen zellulären Bestandteile nach der Lyse abzutrennen, folgt eine Zentrifugation für eine Minute bei 12.000 g. Der klare Überstand wird in ein neues Reagiergefäß überführt, anschließend mit 500 µl absolutem Ethanol versetzt und auf einem Laborschüttler homogenisiert. Im nächsten Schritt wird die Mischung auf eine Zymo-Spin™ IIC Säule gegeben, auf ein Sammelgefäß gesteckt, erneut bei 12.000 g für eine Minute zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die extrahierte mRNA ist dadurch auf der Säule immobilisiert. Sie wird in einem weiteren Arbeitsschritt weiter aufgereinigt, um potenziell vorhandene DNA-Reste zu entfernen. Hierzu wird zuerst mit 400 µl Direct-zol™ RNA PreWash-Puffer gewaschen und der Puffer durch eine Zentrifugation bei 12.000 g für eine Minute entfernt. Eine Mischung aus 5 µl DNase I und 75 µl DNA Digestions-Puffer gibt man direkt auf die Säule und inkubiert für eine Viertelstunde bei Raumtemperatur. Es folgen zwei Waschschrte mit 400 µl Direct-zol™ RNA PreWash-Puffer, bevor die Säule abschließend mit 700 µl RNA Waschpuffer beladen und für zwei Minuten zentrifugiert wird. Der Durchfluss aus den Waschschrten wird nach jeder Zentrifugation entfernt. Nach der Aufreinigung wird die mRNA mit 50 µl nukleasefreiem Wasser aus der Säule in ein ebenfalls nukleasefreies Reagiergefäß eluiert. Sofern die isolierte mRNA nicht unmittelbar weiter aufgearbeitet wird, kann sie bei -80 °C gelagert werden.

4.5.3 cDNA-Synthese

Der Elution der mRNA aus der Säule folgt eine Konzentrationsbestimmung mit Hilfe eines photometrischen Verfahrens auf Basis des Lambert-Beer-Gesetzes am *Colibri Microvolume Spectrometer*. Hierzu wird 1 µl Probenvolumen aufgetragen und der für einzelsträngige RNA spezifische Extinktionskoeffizient von 40 eingestellt, bevor im UV-Bereich bei dem Absorptionsmaximum von DNA/RNA bei $\lambda_{\max} = 260$ nm vermessen wird. Nach der RNA-Extraktion ist eine Zielkonzentration von 500 – 1500 ng/µl für die cDNA-Synthese anvisiert worden. Zur Reinheitsbestimmung wird der Quotient aus den Absorptionsmaxima bei 260 nm und 280 nm gebildet, der das Verhältnis an Nukleotiden zu Proteinen angibt. Dieser dient als Qualitätsmerkmal für eine saubere RNA-Extraktion und sollte in einem Zielkorridor von 1,90

bis 2,10 liegen (420). Es folgt eine weitere Entfernung potenzieller DNA-Rückstände, die sich bei der cDNA-Synthese als störend erweisen. Hierfür werden aus jedem Ansatz 2 µg RNA entnommen, mit 2 µl zehnfach konzentriertem MgCl₂ Reaktionspuffer und 1 µl DNase I versetzt. Anschließend wird mit nukleasefreiem Wasser ad 20 µl aufgefüllt. Die Mischung wird für eine Viertelstunde bei Raumtemperatur inkubiert zum DNA-Abbau. Zur Inaktivierung der DNase I werden 2 µl EDTA-Lösung (25 µM) zugesetzt und für 10 Minuten bei 65 °C inkubiert. Das EDTA wird als Komplexbildner hinzugegeben, um während der DNase-Inaktivierung eine temperaturbedingte Hydrolyse der mRNA, katalysiert durch überschüssige Magnesiumionen, vorzubeugen (421). Die cDNA-Synthese wird mit Hilfe des iScript Advanced cDNA Synthesis Kit for RT-PCR durchgeführt. Zuvor teilt man die 22 µl DNase-Verdau auf jeweils zwei Ansätze auf, sodass beide über 1 µg mRNA verfügen. Einem Ansatz wird 1 µl iScript Reverse Transkriptase hinzugefügt, während dem anderen stattdessen 1 µl nukleasefreies Wasser zugesetzt wird. Letzterer Ansatz dient als Negativkontrolle (NRT = keine reverse Transkriptase), um potenzielle Verunreinigungen während der Probenaufbereitung zu detektieren, da die Negativkontrolle NRT keine nachweisbare cDNA erzeugen darf. Des Weiteren erhalten beide Ansätze 4 µl iScript Advanced Reaction Mix und werden abschließend mit nukleasefreiem Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Ersterer enthält die zur cDNA-Synthese benötigten freien Nukleotide (dNTP). Zur reversen Transkription am Thermocycler wurde ein dreistufiges Temperaturprogramm verwendet. In der Phase werden die Proben für 5 Minuten auf 25 °C erhitzt, um die Temperatur in der folgenden Phase für 30 Minuten auf 42 °C zu steigern. Abschließend werden die Ansätze für 5 Minuten bei 85 °C gehalten. Nach der reversen Transkription erfolgt durch Zugabe von 1 µl RNase H und einer Inkubation bei 37 °C für 20 Minuten die Prozessierung des noch vorhandenen mRNA-Stranges. Mit Hilfe des nukleasefreien Wassers werden die Ansätze auf 5 ng cDNA verdünnt und können bei -80 °C gelagert werden.

4.5.4 Bestimmung der Primereffizienz

Die Primereffizienz gibt an, ob und wie exakt ein Primer an die zu amplifizierende cDNA bindet. Bei der PCR handelt es sich um eine exponentielle Amplifikation der ursprünglichen Menge. Binden die Primer optimal und fehlerfrei ohne Dimerisierung an die Matrize, beträgt die Effizienz (E) 100 %, weshalb es zu einer exakten Verdoppelung des Produktes und damit der Fluoreszenzintensität innerhalb eines Zyklus kommt. Zur Bestimmung der Effizienz (E) wird eine Verdünnungsreihe der DNA vermessen. Die C_q-Werte werden graphisch gegen die logarithmierte DNA-Konzentration (Quantität) aufgetragen und durch lineare Regression eine

Gerade errechnet. Dabei kann aus der Steigung m der Regressionsgeraden die Effizienz (E) ermittelt werden. Ein errechneter Wert zwischen 90 % und 110 % Primereffizienz bestätigt dabei eine ausreichende Qualität der Primer. Formel 3 ermöglicht nach der graphischen Auswertung der Steigung die Berechnung der Effizienz.

$$\text{Effizienz } E [\%] = \left(10^{-\frac{1}{m}} - 1 \right) \times 100$$

Formel 3: Formel zur Berechnung der Primereffizienz. Die Effizienz E gibt an wie stark der Primer an die DNA-Matrize bindet. Die Steigung m kann aus der linearen Regression der logarithmierten C_q -Werte abgeleitet werden.

4.5.5 qRT-PCR

Bevor die eigentliche Messung stattfindet, müssen zuerst die Arbeitslösungen der verwendeten Primer und die primerspezifische Mastermischung angefertigt werden. Zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der Zytostatikaresistenz und der Genexpression der Ektonukleotidasenfamilien NPP, NTPD und CD73 sind die Ovarialkarzinomzellen A2780/A2780cis und die Mammakarzinomzellen MDA-MB-231 verschiedenen Einflüssen exponiert worden. Die Behandlung der Zelllinien wurde in den Abschnitten 4.4.2 und 4.4.3 bereits erläutert. Zur Analyse sind daher Primer von NPP1, NPP2, NPP3, NTPD1, NTPD2, NTPD3, NTPD8 und CD73 verwendet worden. Jedes Primerpaar besteht aus einem *forward* und *reverse* Primer, die an einen ausgewählten Abschnitt der denaturierten, gegenläufigen cDNA binden. Der f- bzw. r-Primer dienen dabei an den beiden komplementären, gegenläufigen Strängen als Startpunkt der zu amplifizierenden DNA-Sequenz, die einen Genabschnitt des zu untersuchenden Enzyms kodiert. Zuvor muss aus den Stammlösungen der Primer und nukleasefreiem Wasser eine verdünnte Arbeitslösung mit einer finalen Konzentration von 5 ng an Oligonukleotid entsprechend der cDNA-Menge der Proben angefertigt werden. Die Mastermischung aus dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I, der verdünnten Primerlösungen und nukleasefreiem Wasser wird auf die Anzahl der in Duplikaten untersuchten Proben hochgerechnet. Je Kavität werden dabei folgende Volumina an 7,5 µl SYBR Green I, 0,75 µl f- und r-Primerlösung sowie 4 µl nukleasefreies Wasser zusammenpipettiert. Die primerspezifischen Mastermischungen werden zu 13 µl je Well in eine Hard-Shell® 96-Well PCR Platte transferiert. Zum Abschluss pipettiert man 2 µl der jeweiligen Probe hinzu und verschließt die Platte mit dem adhäsiven Microseal® 'B' PCR Plate Sealing Film. Neben den Proben mit und ohne reverse Transkriptase ist es ebenso notwendig, als weitere Negativkontrolle das verwendete nukleasefreie Wasser ohne Probenmaterial (NTC = *no template control*) auf potenzielle Verunreinigungen zu testen. Ebenso kann durch die NTC

sichergestellt werden, dass die verwendeten Primerlösungen nicht extern verunreinigt sind. Die qRT-PCR wird mittels eines CFX 96 Real Time Systems der Firma Bio-Rad Laboratories durchgeführt. Das Programm zur qRT-PCR kann folgender Tabelle entnommen werden.

Tabelle 2: Temperaturmoderierte Arbeitsschritte eines PCR-Zyklus und deren Dauer. Im Anschluss an die qPCR wird eine Schmelzpunktbestimmung der hybridisierten Produkte durchgeführt, wofür die Temperatur in 0,5-°C-Intervallen erhöht wird.

| Phase | Temperatur | Dauer |
|----------------------------------|------------|------------|
| Initiale cDNA-Denaturierung | 95 °C | 300 s |
| Denaturierung | 95°C | 20 s |
| Primerhybridisierung (Annealing) | 60°C | 20 s |
| Elongation | 68 °C | 40 s |
| Ende der PCR | 95 °C | 30 s |
| Abkühlung | 65 °C | 30 s |
| Schmelzpunktbestimmung | 60 – 95 °C | 0,5 °C/5 s |

Nach 50 PCR-Zyklen wird die PCR beendet und es folgt eine abschließende Schmelzpunktbestimmung der erzeugten PCR-Produkte. Hierzu wird die Temperatur nach einer Abkühlung in Intervallen von 5 Sekunden um 0,5 °C angehoben. Dies geschieht in einem Temperaturbereich von 60 – 95 °C.

4.5.6 Auswertung nach $\Delta\Delta Cq$

Nach Beendigung des PCR-Programms erstellt die Software Bio-Rad CFX Manager ein Diagramm, in dem die Fluoreszenzintensität in relativen Einheiten (RFU) graphisch gegen die Quantifikationszyklen (Cq) aufgetragen ist. Durch eine Basislinienanpassung wird den Messwerten die mittlere Fluoreszenzintensität der Zyklen 3 – 10 abgezogen. Die gestrichelte Linie repräsentiert den *threshold*, der dem festgelegten Schwellenwert der Fluoreszenzintensität entspricht. Anhand des Schnittpunktes der Kurve mit dem *threshold* wird der Quantifikationszyklus Cq festgelegt, indem beispielsweise durch ausreichende Amplifikation die Fluoreszenzintensität das Signal-Rausch-Verhältnis signifikant übersteigt. Als Qualitätsmerkmal gilt es, dass der Cq-Wert im exponentiellen Verlauf der Kurve liegt. Obwohl bei der qPCR das Produkt exponentiell amplifiziert wird, geht die Kurve der Fluoreszenzintensität während der späteren Zyklen in ein nicht-exponentielles Plateau über

(422). Dies lässt sich durch den zunehmenden Verbrauch einer oder mehrerer Nukleotide herleiten, welche die PCR limitieren (423). Je nach Ausgangsmenge an cDNA-Transkripten erhält man einen niedrigen oder höheren Cq-Wert, wobei sich die Ausgangsmenge reziprok zum Cq-Wert verhält. In Abbildung 12 ist das Endresultat eines qPCR-Experiments mit weiteren Ergebnissen der anschließenden Schmelzpunktanalyse dargestellt.

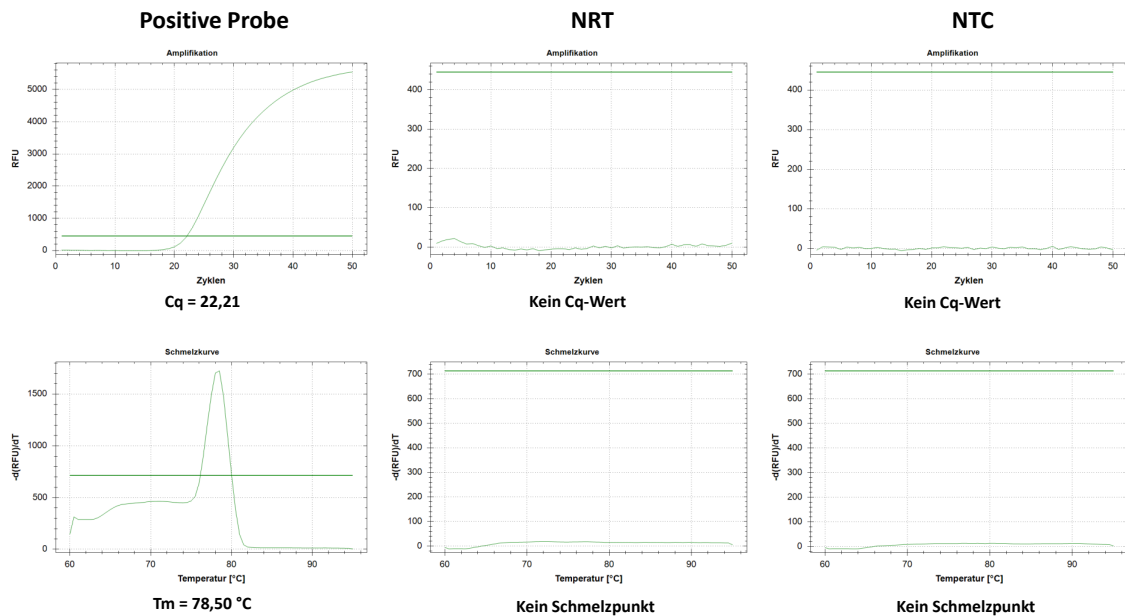


Abbildung 12: Graphische Darstellung des Endresultats eines qPCR-Experiments, in der eine positive Probe mit den beiden Negativkontrollen NRT und NTC verglichen wird. Die obere Zeile zeigt die Fluoreszenzintensität, die gegen die Anzahl der PCR-Zyklen aufgetragen ist. Die Steigerung der Fluoreszenzintensität resultiert aus der DNA-Interkalation von SYBR-Green auf Basis der ablaufenden DNA-Amplifikation. In den beiden Negativkontrollen NRT und NTC kann keine Fluoreszenz detektiert werden, da Primer nicht an eine kompatible cDNA-Matrize binden und daher keine Amplifikation stattfindet. In der unteren Zeile ist das Ergebnis der anschließenden Schmelzpunktanalyse der positiven Probe sowie der Negativkontrollen NRT und NTC exemplarisch dargestellt. Aus der Analyse lässt sich schließen, dass in der Probe keine weiteren unspezifischen DNA-Fragmente mit Primern hybridisieren konnten. Ebenso wurde keine DNA von außen oder durch Verunreinigungen eingetragen. Cq = Quantifizierungszyklus; Tm = Schmelzpunkt

Aufgrund der Tatsache, dass der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I unspezifisch in jede DNA-Doppelhelix interkaliert, müssen die ermittelten Cq-Werte durch eine Schmelzpunktanalyse der Amplifikationsprodukte validiert werden (417). Hierzu wird analog zur qRT-PCR kontinuierlich die Fluoreszenzintensität gemessen, während die gebildeten PCR-Produkte in kleinen Temperaturintervallen stetig erhitzt werden. Dabei kommt es zu einer temperaturmodulierten Abnahme der Fluoreszenz, die aus der Denaturierung des Doppelhelix-SYBR-Green-Komplexes resultiert. Trägt man die Fluoreszenzintensität in RFU gegen die Temperatur in °C gegeneinander auf, erhält man die Schmelzkurven der PCR-Produkte, die in Abbildung 13 nachzuvollziehen sind.

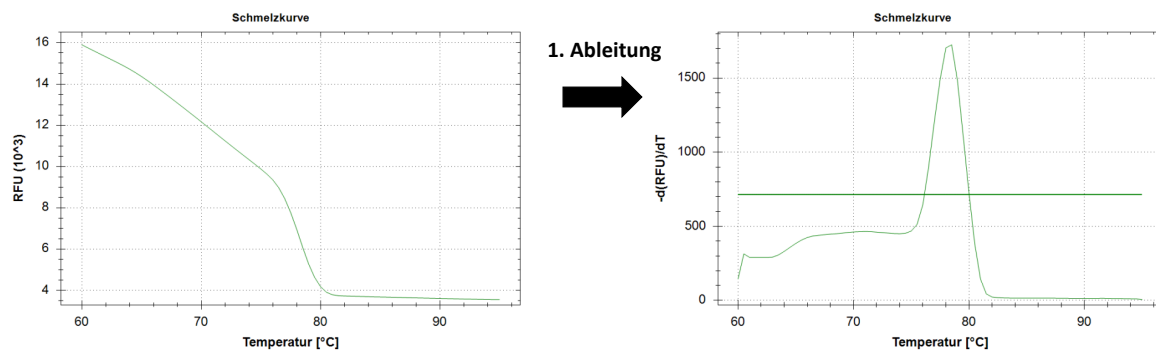


Abbildung 13: Darstellung der Schmelzdiagramme einer positiven Probe. Nach dem Abschluss der Schmelzpunktbestimmung wird die Fluoreszenzintensität gegen die Temperatur aufgetragen. Durch die zunehmende Denaturierung der erzeugten DNA-Produkte wird SYBR-Green aus der α -Helixstruktur freigesetzt, woraufhin sich die Fluoreszenzintensität reduziert. Bildet man die 1. Ableitung aus der Steigung und trägt diese graphisch auf, kann man anhand des vorherigen Wendepunktes den Schmelzpunkt bestimmen.

Trägt man die Steigung der Schmelzkurve und den Temperaturgradienten graphisch gegeneinander auf und bildet daraus den Quotienten ($-\Delta\text{RFU}/-\Delta T$), erhält man ein weiteres Diagramm. Dieses stellt die Ableitung 1. Grades dar und ermöglicht es, die Schmelzpunkte der dimerisierten cDNA-Produkte zu ermitteln. Der Schmelzpunkt jedes individuellen Produktes resultiert dabei aus dem Verhältnis der Basenpaare Adenin-Thymin zu Guanin-Cytosin. Zeigt die 1. Ableitung der Fluoreszenzintensitäts-Temperaturkurve zwei deutliche Peaks, ist dies ein Indiz dafür, dass beispielsweise durch Primerdimerisierung oder Eintragung von außen ein weiteres PCR-Produkt entstanden ist. Diese Proben sind zur Auswertung nicht in Betracht gezogen worden.

Um das Ausmaß der Genexpression zu ermitteln wird es in ein Verhältnis zu sogenannten Haushaltsgen/Housekeeping Genes (HKG) gesetzt. HKG/Referenzgenen ubiquitär besitzen die Eigenschaft, dass sie von verschiedenen Zelltypen ubiquitär exprimiert werden. Die Festlegung auf die beiden Kandidaten Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und β -Aktin (β -Act) ist aufgrund einiger Studien zum Thema HKG-Expression getroffen worden (424). Zum Vergleich der relativen Genexpression untereinander wurde die $\Delta\Delta\text{Cq}$ -Methode oder auch Livak-Methode angewendet (Formelsammlung 4) Das Endresultat bildet den Faktor ab, der ausdrückt, um das Wievielfache das Gen durch eine Behandlungsmethode stärker oder schwächer exprimiert wird (425). Als Referenz zur Berechnung der Expressionssteigerung dienten jeweils die unbehandelten Tumorzellen.

$$Cq \text{ Mittelwert } Cq_M = \frac{Cq_1 + Cq_2}{2} \quad (1)$$

$$\Delta Cq = Cq_M(\text{Zielgen}) - Cq_M(\text{Referenzgen}) \quad (2)$$

$$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq(\text{behandelt}) - \Delta Cq(\text{unbehandelt}) \quad (3)$$

$$\text{Veränderte Genexpression} = 2^{-\Delta\Delta Cq} \quad (4)$$

Formel 4: Formelsammlung zur Berechnung des $\Delta\Delta Cq$ -Wertes nach Livak, der eine quantitative Aussage über die Veränderung der Genexpression nach einer durchgeführten Behandlung erlaubt (425). Die Berechnung wird mit Hilfe der bereitgestellten Software Bio-Rad CFX Manager 2.3 durchgeführt

4.6 Kapillarelektrophorese

4.6.1 Grundlage

Zur Analyse der Eignung und Potenz der Inhibitoren des ektoenzymatischen ATP-Abbaus durch eine Kaskade aus Ektonukleotidasen auf Tumorzellen, wird im Rahmen dieser Arbeit die Methodik der Kapillarelektrophorese (CE) angewendet. Der Fokus der Versuchsreihe liegt dabei auf der Inhibition von NPP1, das den ektoenzymatischen Abbau von ATP initiiert. Das dabei entstehende AMP wird durch CD73-Aktivität weiter zum biologisch aktiven ADO abgebaut, das aufgrund seiner immunmodulierenden Eigenschaften den Endpunkt der Messung darstellt (359).

Die CE basiert, wie andere elektrophoretische Methoden auch, auf der Auftrennung der Substanzen innerhalb eines elektrischen Feldes aufgrund ihrer unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften und den daraus resultierenden Wanderungsgeschwindigkeiten. Ausschlaggebende Eigenschaften der Substanzen sind dabei die Art und Anzahl an Ladungen sowie das Verhältnis der Ladungen zur Molekülgröße. Zur Separation werden die Proben in einer Pufferlösung unter Spannung, beispielsweise durch eine Quarzglas Kapillare aus amorphem Siliciumdioxid, an einem Detektor vorbeigeleitet. Ein geringer Durchmesser von 25 μm – 100 μm ermöglicht dabei die Anlegung einer hohen Spannung, ohne dass sich der Mediator (Puffer), wie bei anderen elektrophoretischen Methoden, durch die Joulesche Wärme zu stark erhitzt. Des Weiteren besitzt die CE zur effizienten Wärmeabfuhr ein Kühlsystem, um den wichtigen temperaturabhängigen Parameter der Mobilität der Ionen während des Versuchslaufs konstant zu halten (426). Die beiden Enden der Kapillare tauchen in räumlich getrennte Pufferlösungen ein. Anode und Kathode sind ebenfalls räumlich separiert und ermöglichen einen Stromfluss durch die Kapillare nach dem Anlegen einer Spannung. Aus der Kapillarlänge ergibt sich nach der van-Deemter-Gleichung die theoretische Bodenzahl N und daraus folgend die Trennleistung (427). Die effektive Länge bezeichnet dabei die Wegstrecke vom Einlass der Kapillare bis zum Detektionspunkt. Zur zusätzlichen Stabilisierung ist die Quarzglas Kapillare mit einer Kunststoffummantelung aus Polyimid versehen. Allerdings ist die Polyimidbeschichtung an dem Detektionspunkt der Kapillare zu entfernen, da die Lichtquelle die Proben sonst nicht erreicht (428).

Das Applizieren der Proben findet durch elektrokinetische oder hydrodynamische Injektion statt. Erstere zeichnet sich durch ein kurzes Anlegen einer hohen Spannung aus, was die Sammlung geladener Ionen am Eingang der Kapillare bewirkt. Die elektrokinetische Injektion bewirkt dabei allerdings eine Ionendiskriminierung, da elektrisch neutrale Moleküle in deutlich verringertem Ausmaß appliziert werden. Dieses Problem kann durch die hydrodynamische

Injektion umgangen werden, die durch Anlegen einer Druckdifferenz die Kapillare mit neutralen und geladenen Molekülen belädt (429). Eine Determinante, welche die Wanderungsgeschwindigkeit innerhalb des elektrischen Feldes während der Separation bestimmt, ist die elektrophoretische Mobilität (μ_{EM}) des jeweiligen Moleküls bzw. Ions. Diese wird unter anderem durch das Verhältnis der Ladungszahl zur Größe des Moleküls und der elektrischen Feldstärke bestimmt. Nach der van-Deemter-Gleichung kann die elektrophoretische Mobilität mit der Longitudinaldiffusion B ergänzt werden, welche die Beweglichkeit der Moleküle im Puffersystem zusätzlich zum Wanderungsverhalten in Richtung der Elektroden definiert (430). Die allgemeine Fließrichtung des Puffersystems einer Normalphasen-CE verläuft durch die Anlegung eines elektrischen Feldes entsprechend von der Anode in Richtung Kathode. Die Kationen, insbesondere mehrfach positiv geladene, besitzen hier eine hohe elektrophoretische Mobilität und passieren die Kapillare in Richtung negativ geladener Kathode am schnellsten. Damit Neutralstoffe und negativ geladene Substanzen die Kapillare ebenfalls passieren können, wird einerseits eine Druckdifferenz angelegt und zusätzlich in Quarzglas Kapillaren in wässriger Umgebung ein elektroosmotischer Fluss (EOF) erzeugt (431). Quarzglas besteht aus Siliciumdioxid, das in wässrigem Milieu durch Hydratisierung Silanolgruppen bildet. Durch Anhebung des pH-Wertes werden die Silanolgruppen partiell deprotoniert, sodass die Innenseite der Kapillare negativ geladen ist. Dies begünstigt durch Anlagerung einen lokalen Überschuss von Kationen des Puffersystems an die negativ geladene Innenseite der Kapillare, wodurch sich die immobile Helmholtz-Schicht ausbildet (431). Weitere Kationen des Puffersystems liegen solvatisiert vor und wandern konzertiert mit den Anionen entlang der Helmholtz-Schicht zur negativ geladenen Kathode. Die somit gebildete mobile Phase wird als Debye-Hückel-Schicht bezeichnet und lagert sich an der Helmholtz-Schicht an. Dieses Zusammenspiel aus immobilierter und mobiler (diffuser) Schicht wie in Abbildung 14 skizziert, wird auch Stern-Doppelschicht genannt und generiert somit beim Anlegen einer Spannung den EOF, der mit der gesamten Lösung innerhalb der Kapillare in Richtung Kathode fließt (432).

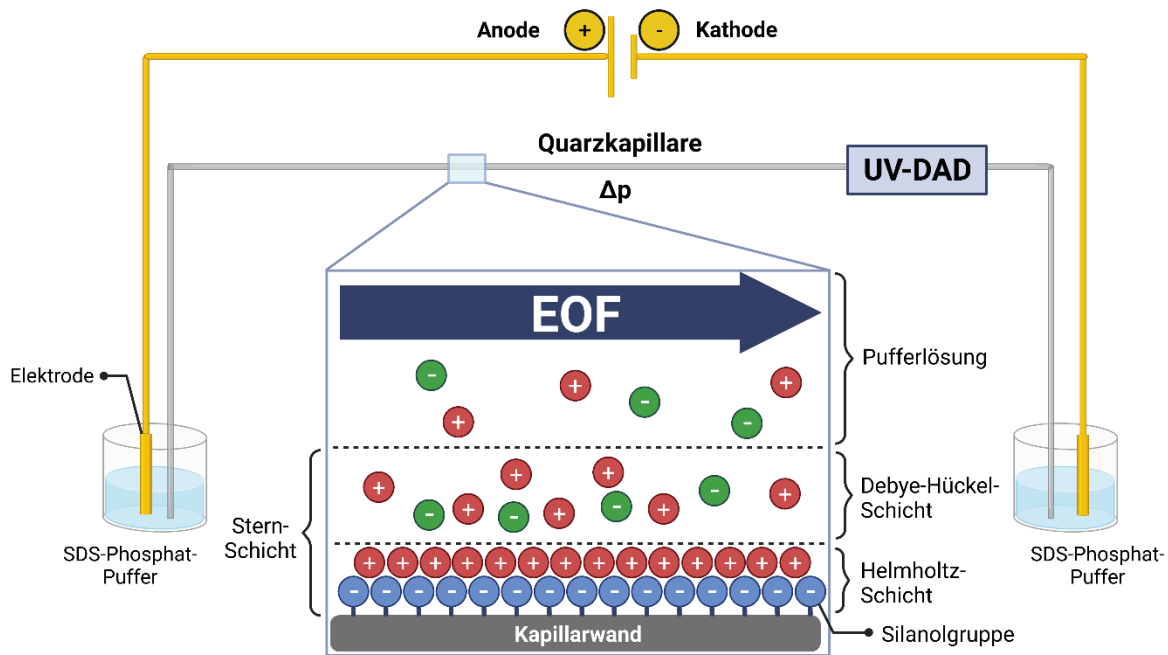


Abbildung 14: Schematische Darstellung einer Kapillarelektrophorese. Nach Anlegen einer Spannung und Erzeugung einer Druckdifferenz zwischen Ein- und Auslass werden die Proben appliziert. Durch Adjustierung des pH-Wertes wird ein EOF erzeugt, der zusätzlich zur elektrischen Feldstärke die Moleküle und Ionen durch die Kapillare transportiert. Die Separation erfolgt auf Basis der unterschiedlichen effektiven Mobilität, resultierend aus Ladungszahl und Ladungsverteilung. Die Abbildung wurde mit Hilfe von BioRender.com erstellt. EOF = elektroosmotischer Fluss, Δp = Druckgradient zwischen Ein- und Auslass, UV-DAD = UV-Diodenarraydetektor

Folglich wird die effektive Mobilität (μ_{eff}) eines jeden Moleküls durch die Addition der vektoriellen Kräfte der elektrophoretischen Mobilität (μ_{EM}) und der elektroosmotischen Mobilität (μ_{EOF}) definiert, resultierend aus der Stärke des EOF. Dabei ist die Kraft des EOF stärker als die elektrophoretische Mobilität der Anionen, weshalb diese ebenfalls die Kapillare passieren und detektiert werden können (431). Zur Detektion kann die CE unter anderem mit photometrischen Verfahren wie UV-Spektroskopie, laserinduzierter Fluoreszenzspektroskopie oder mit Massenspektrometrie gekoppelt werden. Bei den spektroskopischen Verfahren dient die Quarzglas Kapillare bei der Kopplung mit UV-Detektion simultan als Küvette (433). Aufgrund der Tatsache, dass bei der CE durch die Stern-Doppelschicht eine geringe Reibung an der Wand vorherrscht, erzeugt der EOF im Gegensatz zu anderen hydrodynamischen Methoden, wie der HPLC, eine flache, stempelförmige Fließfront. Dementsprechend resultieren nach der Detektion schmale Peaks im Elektropherogramm und ermöglichen somit eine hohe Auflösung (431). Zur Auftrennung mehrerer Neutralstoffe ist der EOF allein nicht ausreichend, da diese aufgrund ihrer nicht vorhandenen Ladung keine elektrophoretische Mobilität aufweisen und ihre effektive Mobilität ausschließlich durch den EOF bestimmt wird. Folglich weisen alle Neutralstoffe die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit auf, weshalb bei

einer normalen CE keine Auftrennung und separate Detektion stattfindet. Zur Umgehung der Problematik ist eine Modifikation der Methodik CE mittels der mizellaren elektrokinetischen Chromatographie (MEKC) notwendig. Oberflächenaktive Substanzen, wie das Tensid Natriumdodecylsulfat (SDS), bilden bei Überschreitung einer kritischen Konzentration in wässriger Umgebung aufgrund ihrer amphiphilen Eigenschaften Mizellen aus. Die polaren, endständigen Kopfgruppen der Mizellen aus Sulfatester sind negativ geladen und verlangsamen die effektive Wanderungsgeschwindigkeit im EOF, dessen Einfluss nach Aufsummierung aller vektoriellen Kräfte allerdings weiterhin überwiegt ($\mu_{EOF} > \mu_{EM \text{ Mizelle}}$) (431).

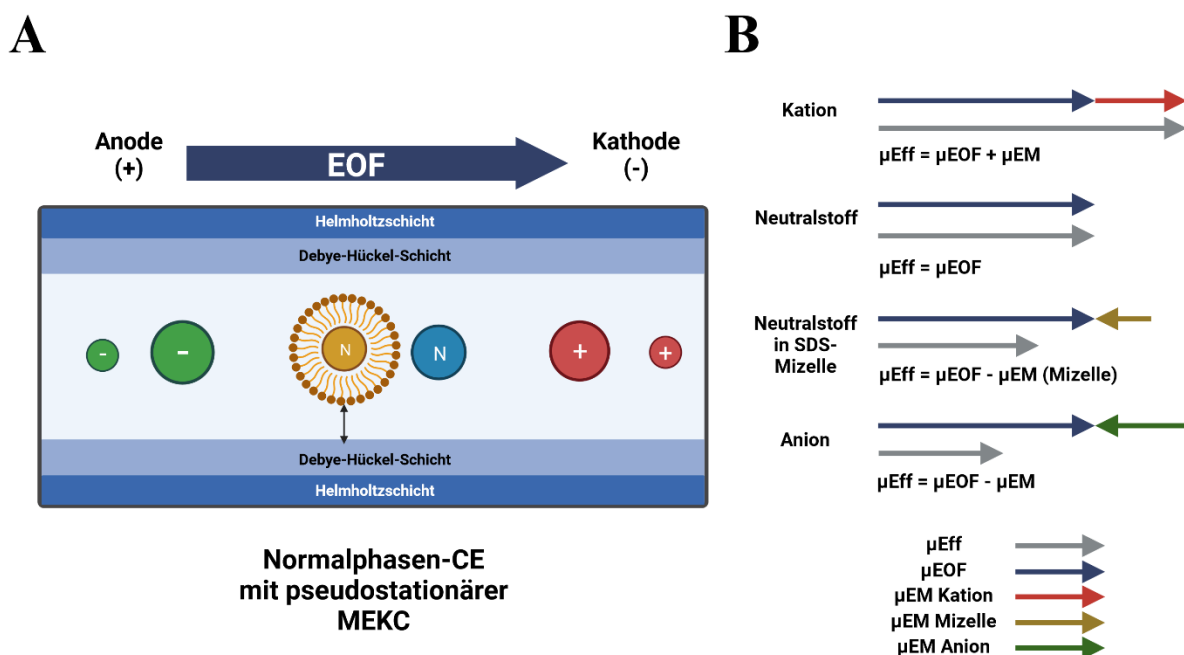


Abbildung 15: A) Schematische Darstellung der Elutionsreihenfolge mehrerer unterschiedlich geladener Moleküle und Ionen in einer Quarzglas Kapillare mit pH-adjustiertem Puffersystem. Die Kationen besitzen aufgrund ihrer positiven Ladung eine hohe elektrophoretische Mobilität in Richtung der Kathode. Eine hohe Ladungsdichte ist ebenso ausschlaggebend für eine hohe Wanderungsgeschwindigkeit. Neutralstoffe werden mit der Geschwindigkeit des EOF transportiert, da sie keine elektrophoretische Mobilität aufweisen, wobei Neutralstoffe in SDS-Mizellen nach dem Prinzip der MEKC leicht retiniert werden. Anionen weisen die geringste Wanderungsgeschwindigkeit auf, da sie aufgrund ihrer μ_{EM} in Richtung der Anode im EOF abgebremst werden. B) Graphische Darstellung der elektrophoretischen Mobilität μ_{EM} der Neutralstoffe und Ionen, sowie der elektroosmotischen Mobilität μ_{EOF} als vektorielle Kräfte, woraus sich durch Vektoraddition die individuelle effektive Mobilität μ_{Eff} der einzelnen Verbindungen zur Separation im Puffersystem ergibt. Die Abbildung wurde mit Hilfe von BioRender.com erstellt.

Das Verteilungsverhalten der Neutralstoffe zwischen Mizelle und Pufferlösung wird durch deren Polarität bestimmt. Das Verteilungsverhalten kann vereinfacht durch das Nernst'sche Verteilungsgesetz definiert werden, das den Verteilungskoeffizient K_D für die Konzentrationen

einer Substanz zwischen zwei nicht mischbaren flüssigen Phasen (beispielsweise c_{org} = SDS-Mizelle und c_{aq} = wässriger Puffer) beschreibt.

$$\text{Verteilungskoeffizient } K_D = \frac{c_{org}}{c_{aq}}$$

Formel 5: Nernst'sches Verteilungsgesetz zur Beschreibung des Verteilungsverhaltens der Neutralstoffe zwischen SDS-Mizelle (c_{org}) und wässrigem Puffersystem (c_{aq}) auf Basis ihrer Lipophilie

Folglich erhöht ein hydrophober Charakter die Konzentration des Neutralstoffs in der SDS-Mizelle (431). Dementsprechend werden bei einer Normalphasen-CE polare Neutralstoffe gegenüber unpolaren zuerst detektiert, da letztere eine höhere Verweildauer in den Mizellen aufweisen und somit in diesen als pseudostationärer Phase stärker retiniert werden.

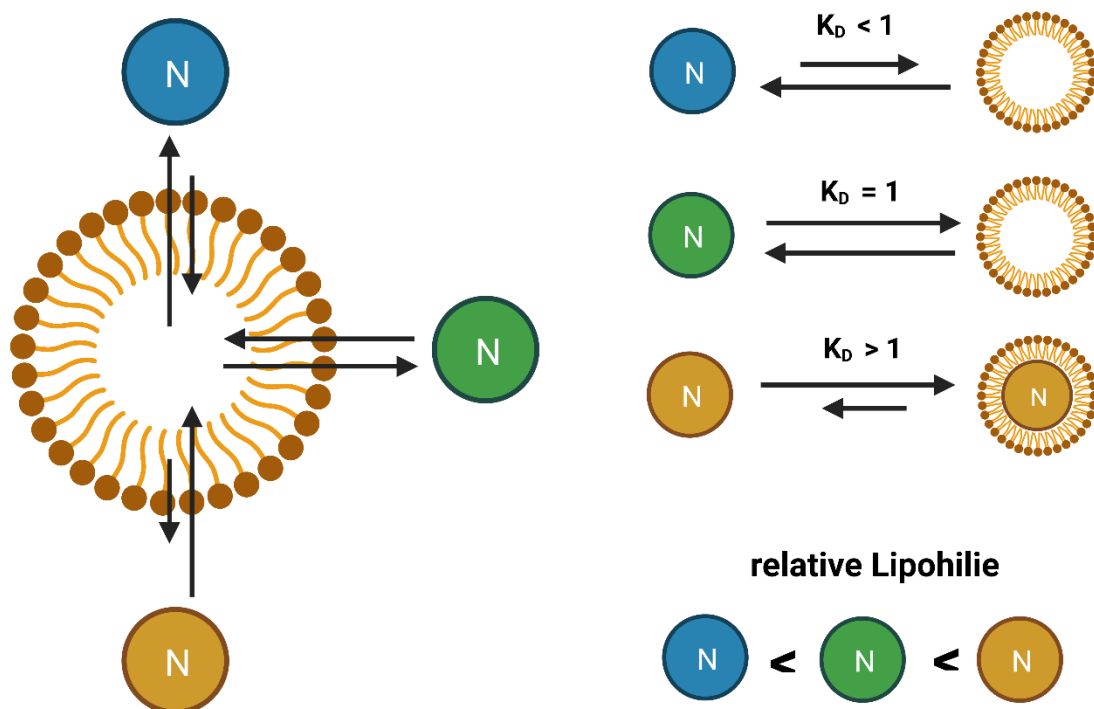


Abbildung 16: Verteilungsverhalten unterschiedlich lipohiler Neutralstoffe bezogen auf eine SDS-Mizelle. Lipophile Neutralstoffe weisen dabei einen hohen Verteilungskoeffizient $K_D > 1$ für SDS-Mizellen auf, weshalb diese sich im Gegensatz zu Neutralstoffen mit balancierter Polarität bzw. Hydrophilie und resultierendem $K_D \leq 1$ bevorzugt in den Mizellen aufhalten. Die Abbildung wurde mit Hilfe von BioRender.com erstellt.

4.6.2 Probenvorbereitung

Die Zellen der Zelllinien U87 werden analog den Ausführungen in den Abschnitten 4.2.3 und 4.2.4, abgelöst, gezählt und gewaschen. Nach dem Waschen werden die Zellen in einer Konzentration von 10^6 Zellen/ml in Krebs-HEPES-Puffer resuspendiert. Der verwendete Krebs-HEPES-Puffer stellt einen sogenannten *Good*-Puffer dar, welcher sich im Gegensatz zum Zellmedium durch eine hohe und temperaturstabile Pufferkapazität, geringe UV-Absorption und durch stark verminderte Interaktionen mit Proteinen auszeichnet. Jeweils einen Milliliter der Zellsuspension transferiert man in die Kavitäten einer 24-Wellplatte. Zur Etablierung der Methodik und Gewährleistung der Reproduzierbarkeit gilt es sicherzustellen, dass die Transporteraktivität der Tumorzellen für Nukleotide und Nukleoside sowie der weitere enzymatische Abbau des Adenosins weitestgehend eliminiert werden. Daher werden die Zellen vor dem eigentlichen Experiment mit $20 \mu\text{M}$ Dipyridamol (DP) und $1 \mu\text{M}$ Erythro-9-amino- β -hexyl- α -methyl-9H-purin-9-ethanol Hydrochlorid (EHNA) für 30 Minuten bei 37°C und 5% CO_2 vorinkubiert. Bei Dipyridamol handelt es sich um einen Inhibitor der equilibrativen Nukleosidtransporterfamilie (ENT), die für die Aufnahme extrazellulärer Nukleoside wie Adenosin verantwortlich ist (434). EHNA dient als Hemmstoff des extrazellulär lokalisierten Enzyms Adenosin-Desaminase (ADA), das als Teil innerhalb des extrazellulären Purinstoffwechsels Adenosin in Inosin umwandelt (435). Im Anschluss werden die zu analysierenden Inhibitoren der Ektonukleotidasen, gefolgt von ATP, zugesetzt.

Aufgrund der Tatsache, dass die lokale ATP-Konzentration in der Tumormikroumgebung unter bestimmten hypoxischen Bedingungen $100 \mu\text{M}$ deutlich überschreitet, ist in diesem Assay eine Konzentration von $300 \mu\text{M}$ angewendet worden (353). Die folgende Inkubationszeit beträgt 3 h bei 37°C und 5% CO_2 . Im Anschluss werden $300 \mu\text{l}$ Aliquots der Zellsuspension als technische Triplikate in Reagiergefäße überführt und für 10 Minuten bei 95°C erhitzt, um weitere Enzymaktivität durch deren Denaturierung zu unterbinden. Unlösliche Bestandteile wie Zelltrümmer werden per Zentrifugation bei 4°C und $600 g$ für 30 Minuten vom Überstand abgetrennt. Bis zur Messung werden die Proben bei -20°C gelagert.

4.6.3 Durchführung

Die Referenzlösungen der Nukleotide (ATP, ADP, AMP, cAMP) und Nukleoside (Adenosin, Inosin, Uridin) dienen als externe Standards, um eine effiziente Trennung der CE zu überwachen. Die Substanzen werden dafür in Krebs-HEPES-Puffer gelöst, auf eine Konzentration von $10 \mu\text{M}$ eingestellt und bei -20°C gelagert. Alle Messungen der Versuchsreihe werden mit einer Kapillare aus Quarzglas (SiO_2) ohne innere Beschichtung

Material und Methoden

durchgeführt. Der Kapillardurchmesser beträgt dabei 75 μm auf einer Länge von 40 cm, wovon 30 cm effektiv als stationäre Phase zur Trennung bis zum Detektionspunkt nutzbar sind. Ein SDS-Phosphat-Puffersystem, bestehend aus 100 mM SDS und 10 mM Dinatriumhydrogenphosphat, wird mit Salzsäure (HCl) auf pH 8,0 eingestellt und trägt als mobile Phase zur Erzeugung der Stern-Doppelschicht bei, die den EOF ermöglicht. Aufgrund der leicht basischen Bedingungen bei pH 8,0 werden die Nukleotide deprotoniert, weshalb ATP vierfach, ADP dreifach und AMP zweifach negativ geladen vorliegt. Auf die Nukleoside Adenosin, Inosin und Uridin hat die pH-Anhebung keine Auswirkung. Uridin fungiert als interner Qualitätsstandard (IS) für die Trennleistung, weshalb es in einer finalen Konzentration von 25 μM jeder Probe zugesetzt wird.

Zur Vorbereitung der Kapillare auf einen Sequenzlauf muss diese zunächst konditioniert werden. Hierfür wird im ersten Konditionierungsschritt für 5 Minuten bei 30 PSI mit 0,1 M Natriumhydroxidlösung gespült. Dieser Prozess erhöht durch Deprotonierung der Silanolgruppen die Ionisierung der Kapillare und verstärkt somit den EOF. Im Anschluss folgt ein fünfminütiger Waschschrift bei weiterhin konstantem Druck mit hochreinem Wasser, bevor abschließend für 15 Minuten mit dem SDS-Phosphat-Puffersystem gespült wird. Der letzte Schritt besteht dabei aus zwei Abschnitten, wovon im ersten für 5 Minuten mit 30 PSI und im letzteren für 10 Minuten bei 90 Mikroampere und 10 Kilovolt (kV) gespült wird.

Eine Einzelmessung der CE besteht mit dem Spülen, der Injektion und der Separation aus insgesamt drei unterschiedlichen Phasen, die hintereinander ablaufen. Der gesamte Ablauf einer Einzelmessung ist in Tabelle 3 skizziert. Jeder einzelnen Messung sind in der ersten Spülphase drei aufeinanderfolgende Waschschriffe mit 0,1 M NaOH-Lösung, hochreinem Wasser und SDS-Phosphat-Puffer vorangestellt, um einheitliche Bedingungen zu schaffen. Darauf folgt, als zweite Phase, die hydrodynamische Injektion mit einem angelegten Druck von 0,1 PSI über 30 Sekunden, da eine elektrokinetische Injektion aufgrund der Ionendiskriminierung der Neutralstoffe nicht indiziert ist. In der abschließenden Phase erfolgt die Separation bei 10 kV, 90 μA über 600 Sekunden mit simultaner Detektion.

Tabelle 3: Zeitlicher Ablauf der drei Phasen einer Einzelmessung der Kapillarelektrophorese

| Phase | Bedingung | Dauer |
|---------------------|----------------------------|-------|
| Spülen | | |
| 0,1 M NaOH | 20 PSI | 120 s |
| Hochreines Wasser | 20 PSI | 120 s |
| SDS-Phosphat-Puffer | 20 PSI | 120 s |
| Injektion | | |
| Probelösung | 0,1 PSI | 30 s |
| Separation | | |
| SDS-Phosphat-Puffer | 0,1 PSI/ 10 kV/ 90 μ A | 600 s |

Da diese Versuchsreihe mit einer Normalphasen-CE betrieben wird, gelangen die ungeladenen Nukleoside in der Reihenfolge ihrer Aufenthaltswahrscheinlichkeit in den Mizellen als pseudostationärer Phase vor den negativ geladenen Nukleotiden zum Detektor. Dabei steigt die Retentionszeit der Neutralstoffe mit zunehmender Lipophilie und die der negativ geladenen Substanzen mit ihrer Ladungszahl und Ladungsverteilung. Zur Detektion und Quantifizierung werden die Nukleoside und Nukleotide mittels UV-Diodenarraydetektor bei ihrem spezifischen Absorptionsmaximum der Wellenlänge $\lambda_{\max} = 260$ nm vermessen und das Ausmaß der absorbierten Strahlung detektiert (436).

4.6.4 Auswertung

Nach Abschluss einer Messung werden die Anzahl und Intensität der ermittelten Absorptionen der untersuchten Substanzen in Form eines Elektropherogramms dargestellt. Somit ist es möglich, aufgrund der unterschiedlichen Retentionszeiten sowohl qualitative als auch durch die Integrale der detektierten Peaks quantitative Resultate zu erzielen. Das Elektropherogramm stellt dabei die bei $\lambda_{\max} = 260$ nm gemessenen Absorptionen graphisch dar. Aufgrund der ATP-Degradation durch die konzertierte Aktivität der Ektonukleotidasen NPP1, CD73 und ADA auf den Tumorzellen U87 treten diverse Peaks auf. Diese stehen für die Nukleoside Inosin, Adenosin und die Nukleotide AMP, ADP und ATP. Des Weiteren wird der interne Qualitätsstandard Uridin detektiert. Mittels der obligatorischen Referenzmessung werden die Nukleoside und Nukleotide als externe Standards zwecks der Kontrolle einer ausreichenden Trennleistung der Kapillare vermessen. Eine nachlassende Trennleistung ist durch eine Peakverbreiterung sichtbar. In einem solchen Fall kam es zum Austausch der Kapillare. In dieser Referenzmessung kann cAMP inkludiert werden, das bei der regulären

Material und Methoden

Probenvermessung nicht auftreten darf, weil es als intrazelluläres Molekül ein Indiz für eine unbeabsichtigte Zellyse durch falsche Handhabung darstellt. Durch Variation der Mischungen und Konzentrationen der externen Standards ist eine qualitative Analyse der Nukleoside und Nucleotide und die Bestimmung der Migrationsreihenfolge möglich.

Zur Auswertung werden in den Elektropherogrammen der gemessenen Proben jeweils die Fläche unter der Kurve (AUC) manuell mit Hilfe der Betriebssystemsoftware 32 Karat Version 8.0 anhand der Basislinie integriert. Hierzu werden jeweils die AUC der detektierten Peaks des Substrats ATP, des Intermediats AMP und des Endprodukts Adenosin bestimmt. Aus dem Verhältnis der jeweiligen AUC zueinander kann quantitativ bestimmt werden, wie viel ATP zu Adenosin umgesetzt worden ist. Daraus lässt sich anhand Formel 6 die Konversionsrate des Substrats ATP ableiten.

$$\text{Konversionsrate [\%]} = \frac{\text{AUC (ADO)}}{\text{AUC (ADO)} + \text{AUC (AMP)} + \text{AUC (ATP)}} \times 100$$

Formel 6: Berechnung der Konversionsrate von ATP über das Intermediat AMP in Adenosin durch die Ektonukleotidasen auf den Tumorzellen U87 bzw. MDA-MB-231 anhand der AUC. Bei der Zelllinie MDA-MB-231 wird zur Berechnung der Konversionsrate im Nenner der Summand für die AUC des Intermediats ADP ergänzt, der auf die Expression von CD39 zurückzuführen ist.

Zur Vereinheitlichung der in zellulären Modellen leicht variierenden Aktivitäten wird innerhalb jeder Messreihe auf die maximale Enzymaktivität bzw. Konversionsrate normalisiert. Die Referenz zur Normalisierung stellt dabei die Probe dar, die ohne Ektonukleotidaseinhibitor, sondern lediglich mit dem Substrat ATP, sowie Dipyridamol und EHNA zur Steigerung des extrazellulär verfügbaren Adenosins, behandelt wurde. Formel 7 zeigt die Berechnung der normalisierten Konversionsrate mittels der Referenzmessung.

$$\text{Normalisierte Konversionsrate} = \frac{\text{Konversionsrate (Testsubstanz + ATP + DP + EHNA)}}{\text{Referenz Konversionsrate (ATP + DP + EHNA)}}$$

Formel 7: Normalisierung der Konversionsrate zur Vereinheitlichung und Vereinfachung der Analyse unterschiedlicher Sequenzläufe/Messreihen

Um die Eignung und Potenz der getesteten Substanzen zu bestimmen, gilt es die prozentuale Enzyminhibition zu ermitteln. Aufgrund der Tatsache, dass kein potenzieller Inhibitor in den verwendeten Konzentrationen die Enzymaktivität komplett ausschaltet, war dies zuvor sicherzustellen. Durch Einsatz des synthetischen NPP1-Inhibitors PSB-POM-141 in einer Konzentration von 10 μM wird der ATP-Abbau auf null reduziert. Definiert man diesen Nullwert als komplette Inhibition (100 %) der NPP1-Enzymaktivität, kann der bisherige Referenzwert (ATP + DP + EHNA), der für den maximalen Substratumsatz steht, mit 0 %

Inhibition bzw. maximaler Enzymaktivität korreliert werden. Folglich erlaubt diese Korrelation die Bestimmung der prozentualen Enzyminhibition von NPP1 durch die zu analysierenden Hemmstoffe. Der Sachverhalt ist in der folgenden Formel zur Berechnung der Enzyminhibition angegeben.

$$\text{Enzyminhibition [\%]} = \frac{AUC (\text{Referenz}) - AUC (\text{Inhibitor})}{AUC (\text{Referenz}) - AUC (\text{PSB} - \text{POM} - 141)}$$

Formel 8: Berechnung der Potenz der eingesetzten Inhibitoren in Form der prozentualen Enzyminhibition

4.7 cDNA-Sequenzierung NPP1-Gen U87

Der funktionelle CE-Assay wurde mittels der Tumorzelllinie U87 durchgeführt. Tumorzelllinien besitzen aufgrund ihres enthemmten Metabolismus und veränderter Physiologie eine erhöhte Neigung zur Mutagenität. Diese Untersuchung dient der Kontrolle und Feststellung von möglichen Mutationen, die wiederum Auswirkungen auf die Funktionsweise des Enzyms NPP1 nach sich ziehen können. Zur Analyse des kodierenden Gens für NPP1 wird eine cDNA-Sequenzierung desselbigen durchgeführt. Dabei extrahiert man die RNA aus 5×10^6 U87-Zellen mit Hilfe des Direct-zol™ RNA Miniprep Kit, wie auch im Abschnitt 4.5.2 beschrieben. Im Anschluss wandelt man die gesamte mRNA mit Hilfe des SuperScript Reverse Transcriptase IV Kit in cDNA um. Die reverse Transkription wird gemäß der Anleitung des Herstellers mit einer Gesamtmenge von 1 µg RNA und 50 pmol Oligo d(T)20 Primer durchgeführt. Die PCR-Amplifikation der NPP1-cDNA erfolgt durch den Einsatz der Phusion DNA-Polymerase. Als Startpunkt der Polymerase dient der genspezifische Vorwärtsprimer 5'-GCCAAGGACCCCAACACCTATAAAG-3', der strangabwärts der besonders GC-reichen Region am Beginn der kodierenden Sequenz von NPP1 bindet. Bei den verwendeten Primerdesigns, die strangaufwärts an frühere Basenpaare binden, ist keine PCR-Amplifikation möglich. Dadurch werden die ersten 204 Basenpaare (bp) der Gensequenz ausgelassen, weshalb ein etwas kürzeres PCR-Produkt entsteht. Als Rückwärtsprimer wird die folgende Sequenz 5'-CGACAGTTTGAACAATGCAATAG-3' verwendet. Die Gesamtlänge der kodierenden Sequenz (CDS) beträgt 2778 bp, von denen die ersten 204 bp abzuziehen sind. Da der Rückwärtsprimer erst hinter der CDS bindet, beträgt die Gesamtlänge des amplifizierten Produkts 2671 bp. Anschließend werden die entstandenen PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese in einem 1 % Agarosegel und dem TAE-Puffersystem (TRIS, Essigsäure, EDTA) aufgetrennt. Die gewünschte Bande in dem Bereich unter 3000 bp visualisiert man unter UV-Licht durch Fluoreszenz mittels DNA-interkalierendem GelRed-Fluorophor. Identifiziert wird das Produkt anhand der Referenzbanden des Standards mit definierter Länge, bevor es aus dem Gel herausgeschnitten wird. Mit Hilfe des Zymoclean Gel DNA Recovery Kit wird das entsprechende Produkt durch Auflösen des Gels extrahiert und auf einer Säule aufgereinigt. Anschließend kloniert man die aufgereinigte cDNA in den pJet1.2-Vektor, wobei das Blunt-End-Klonierungsprotokoll des Herstellers befolgt wird. In der Folge transformiert man das Reaktionsprodukt in kompetente DH5α-Zellen. Durch Selektion auf Ampicillin-beschichteten Kulturplatten überleben lediglich DH5α-Zellen mit erfolgreicher Transformierung, da sie über eine mittels pJet1.2 Vektor genetisch erlangte Resistenz verfügen. Mehrere Klone werden mit den Standard-Primern pJet1.2for und pJet1.2rev sowie dem NPP1-

Gen-spezifischen Primer 5'-GGATTGTATCCAGAATCTCATGGC-3' sequenziert. Die Sequenzen werden mit der Software SnapGene (www.snapgene.com) und Clustal Omega analysiert (437).

4.8 Durchflusszytometrie

4.8.1 Grundlagen

Die Methodik der Durchflusszytometrie ermöglicht eine Vielfalt an Möglichkeiten Zellpopulationen auf der Ebene einzelner Zellen/Partikel (Beads) zu charakterisieren. Dabei können sowohl heterogene Mischpopulationen gesondert betrachtet als auch vermeintlich homogene Populationen aufgrund ihrer unterschiedlichen Proteinexpression, Freisetzung diverser Signalmoleküle, Transkriptionsfaktoren usw. differenziert werden. Hierzu werden die Zellen durch hydrodynamische Fokussierung in der Fließzelle ausgeeinzelt und dort durch einen Laser mit einer monochromatischen Wellenlänge bestrahlt (438). Häufig verwendete Emissionswellenlängen der Laser sind 405 nm im violetten Bereich, 488 nm im blauen Bereich und 633 nm im roten Bereich des sichtbaren Lichts. Trifft der monochromatische Laserstrahl auf eine passierende Zelle oder auch Partikel, wird dieser je nach Beschaffenheit der Zelle/Partikel abgelenkt und durch verschieden angeordnete Detektoren aufgezeichnet. Das sogenannte Vorwärtsstreulicht, auch *Forward Scatter* (FSC), passiert die Zelle und wird von einem Detektor hinter der Zelle registriert. Dabei ist der Durchmesser der Zelle umgekehrt proportional zur Intensität des gemessenen Vorwärtsstreulichts. Ein weiterer Parameter stellt das Seitwärtsstreulicht *Side Scatter* (SSC) dar. Je nach Heterogenität der Oberflächenstruktur und Vorkommen intrazellulärer Vesikel wird der Laserstrahl umso stärker abgelenkt und im 90°-Winkel zum ursprünglichen detektiert (439). Trägt man die Parameter in einem kartesischen Koordinatensystem mit SSC gegen FSC gegeneinander auf, erhält man durch die Software eine Punktwolke (Dotplot). Während jeder Einzelmessung einer Zelle wird die Korrelation der Intensität des jeweiligen Parameters ermittelt und graphisch als einzelner Punkt dargestellt. Handelt es sich wie bei PBMC um eine heterogene Zellpopulation, kann man die jeweiligen Teilpopulationen anhand der unterschiedlichen Größe und Granularität in verschiedenen Gruppen im Koordinatensystem als Dotplot lokalisieren. Dies erlaubt eine Differenzierung der Populationen anhand ihrer unterschiedlichen Morphologie, die durch Selektieren von Auswahlbereichen (Gating) gesondert betrachtet werden können (440). Die Diskriminierung unerwünschter toter Zellen oder beschädigter Partikel ist somit ebenfalls möglich. Möchte man die Zellteilung, Apoptose oder das Expressionsverhalten diverser Zielproteine in einer oder mehrerer Teilpopulationen analysieren, kann man die Eigenschaften der Fluorophore oder Fluorophor-gekoppelter Antikörper nutzen. Neben Antigenen auf der Zelloberfläche können durch Fixierung der Proteine und Permeabilisierung der Membranen ebenfalls zytosolische und nukleäre Zielstrukturen markiert werden. Zusätzlich zur klassischen Antigen-Antikörper-Reaktion mittels fluoreszenzgekoppelter Antikörper kann dies ebenso

durch fluoreszierende DNA-Interkalatoren oder intrazellulär, proteinbindende Fluoreszenzfarbstoffe erreicht werden.

Bei der Durchflusszytometrie kommt ein System aus mehreren partiell lichtdurchlässigen Spiegeln zum Einsatz, wobei die Passierbarkeit der Spiegel von der Wellenlänge der Lichtstrahlung abhängig ist. Aufgrund der Eigenschaften der emittierten Fluoreszenz sind die Spiegelsysteme und Detektoren im 90°-Winkel zum bestrahlten Objekt angeordnet. Nach der Reflexion der Strahlung durch einen partiell durchlässigen Spiegel wird die Strahlung durch einen Detektor registriert, dem ein Bandbreitenfilter vorgeschaltet ist, um den zu registrierenden Wellenlängenbereich einzugrenzen (441). Gängig ist die Verwendung roter, gelber, grüner, blauer und violetter Kanäle sowie eine zusätzliche Abdeckung im nahinfraroten und UV-Bereich, womit vielfältige Möglichkeiten bestehen, verschiedene Zielstrukturen simultan zu vermessen. Bei den Detektoren handelt es sich um Photoelektronenvervielfacher (*photomultiplier tubes* = *PMT*) oder Avalanche-Photodioden (APD), die durch den photoelektrischen Effekt samt interner Verstärkung eine Registrierung schwacher Strahlung im Wellenlängenbereich $\lambda = 250 - 1700$ nm ermöglichen (442). Eine Regulation der PMT-Spannung bewirkt eine Änderung der Sensitivität, wodurch wiederum die Auflösung der detektierten Signale erhöht werden kann. Der PMT-Detektor registriert eine Signaländerung in Form eines Spannungspulses, der durch Fluoreszenz oder Zellen/Partikel generiert wird. Dabei ist der erzeugte Strom proportional zur Intensität des Signals. Das Pulssignal wird durch die drei Merkmale Höhe (H), Weite (W) und die aus dem Integral resultierende Fläche (A) charakterisiert. Deshalb kann beispielsweise im FSC oder SSC die Fläche A des Signals gegen dessen Höhe H oder Weite W aufgetragen werden, die bei singulären Ereignissen in einem proportionalen Zusammenhang stehen. Auf diese Weise kann man Dubletten und Multipletten diskriminieren, da hier die resultierende Fläche des detektierten Signals wesentlich größer ist (443). Ein Analog zu Digital Konverter (ADC) wandelt das analoge Signal in ein Digitales um (444). Die gemessene Fluoreszenzintensität des Antigens/Targets wird logarithmiert angegeben und kann sowohl in einem Histogramm gegen die Ereignishäufigkeit aufgetragen als auch in einem Dotplot gegen den FSC, SSC oder die Intensität einer weiteren parallel detektierten Zielstruktur dargestellt werden. Das gezielte Selektieren durch Gating nach Fluoreszenzkanal oder Fluoreszenzintensität erlaubt ebenfalls eine gezielte Betrachtung der Subpopulationen wie CD4⁺ T-Zellen oder verschiedener Antigene wie die dreifach positiven CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen (440).

4.8.2 Transporteraktivität bei modifiziertem Purinstoffwechsel

Die Durchflusszytometrie wurde in dieser Arbeit angewandt, um den Einfluss des Purinstoffwechsels durch die Ektonukleotidasen auf die ABC-Transporteraktivität im Modell der mit Doxorubicin-behandelten MDA-MB-231 Zellen zu untersuchen. Hierzu werden die Zellen analog den Ausführungen in den Abschnitten 4.2.3 und 4.2.4 gelöst, gezählt und anschließend zweimal mit Krebs-HEPES-Puffer gewaschen, um störende Elemente wie beispielsweise das Phenolrot des Mediums zu entfernen. Vor dem Ausplattieren wird die Zellsuspension auf eine Konzentration von 250.000 Zellen/ml eingestellt. Die Testsubstanzen werden in Duplikaten in einer 96-Wellplatte vorgelegt. Dabei sind die Konzentrationen der Lösungen so zu wählen, dass die gewünschte Konzentration durch finale Zugabe von 10 µl bei einem Gesamtvolumen von 200 µl erreicht wird. Anschließend werden final 160 µl Zellsuspension in jede Kavität der Platte pipettiert. Die entsprechende Anzahl von 40.000 wird zusammen mit den Testsubstanzen bei 37 °C und 5 % CO₂ lichtgeschützt inkubiert. Als Referenzen dienen verschieden kombinierte Ansätze, die in Tabelle 4 aufgeführt sind, um intrinsische Effekte der verwendeten Substanzen zu ermitteln. Zur Messung der Hintergrundfluoreszenz wurde eine Zellsuspension in DPBS angesetzt (Ansatz 1). Ein weiterer Ansatz besteht lediglich aus 3 µM Doxorubicin, um die Aufnahmekapazität der unbehandelten Tumorzellen zu überprüfen (Ansatz 2). Als weitere Kontrollen dienten Proben, die zusätzlich mit jeweils 60 µM ADO und 300 µM ATP behandelt wurden (Ansatz 3 und 4). Die Werte sind aus den Untersuchungen der CE abgeleitet, bei denen 300 µM ATP als Substrat verwendet und dieses durch den enzymatischen Abbau in 30 – 100 µM ADO umgewandelt wurde. Mit Hilfe der synthetischen Inhibitoren PSB-POM-141 und PSB-19316 in Anwesenheit des Substrats ATP ist jeweils überprüft worden, ob die Reduktion des Produktes ADO aus der Abbau-Kaskade einen Unterschied auf den intrazellulären Gehalt des Zytostatikums hat (Ansatz 5 und 6). Des Weiteren wird neben dem Nukleosidtransporterhemmstoff DP (Ansatz 7) der etablierte Inhibitor XR9577 des ABC-Transporters P-Glykoprotein (PGP) in den Konzentrationen 3 µM und etablierten 10 µM eingesetzt (445). In der Folge wird dieser Ansatz als Positivkontrolle zur Evaluation der maximal möglichen zytosolischen Doxorubicinkonzentration herangezogen (Ansatz 8).

Tabelle 4: Schema aus Kontroll- und Referenzmessung zur Untersuchung des Effekts der purinergen Kaskade auf die ABC-Transporteraktivität *in vitro* anhand der Zelllinie MDA-MB-231

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|--------------------------------------|---|----------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|-------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Zellsuspension aus 40.000 MDA-MB-231 | | | | | | | | | |
| / | / | / | | PSB- 19316 0,2 μM | POM- 141 10 μM | DP 20 μM | XR9577 10 μM | XR9577 10 μM | XR9577 10 μM |
| / | / | ADO 60 μM | ATP 300 μM | ATP 300 μM | ATP 300 μM | ADO 60 μM | | ADO 60 μM | ATP 300 μM |
| / | Doxorubicin 3 μM ($\lambda_{\text{max}} = 590 \text{ nm}$) | | | | | | | | |

Für den eigentlichen Messvorgang am Durchflusszytometer wird zunächst die Eigenfluoreszenz der unbehandelten Zellen aufgenommen und mit den positiven Zellen verglichen. Hierbei nutzt man die intrinsische Fluoreszenzeigenschaft des Doxorubicins aus. Nach Anregung befindet sich dessen Emissionswellenlänge bei $\lambda_{\text{max}} = 590 \text{ nm}$ und kann deshalb im roten Kanal detektiert werden (445). Die Fluoreszenzintensität korreliert mit der zytosolischen Konzentration des Zytostatikums Doxorubicin in den Tumorzellen. Die Korrelation zwischen der Ektonukleotidasenaktivität und ABC-Transporteraktivität wird vereinfacht mit den Ansätzen 9 und 10 evaluiert.

4.8.3 Erzeugung der Tumorüberstände zur *in-vitro*-Modellierung der Immunantwort

Die verwendete Zelllinie U87 wird gemäß den Ausführungen in den Abschnitten 4.2.3 und 4.2.4 abgelöst, gewaschen und gezählt. Im Anschluss an die Zellzahlbestimmung wird die Suspension mit dem Zellmedium auf eine Konzentration von $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt und 5×10^6 Zellen in jede Kavität einer 6-Wellplatte pipettiert. Über Nacht werden die Zellen bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5 \% CO_2 kultiviert, um konfluent zu adhären und um den regulären Stoffwechsel wiederherzustellen. Die Zwischenräume der Platte werden mit 10 ml DPBS als Verdunstungsschutz versehen. Nach 24 h werden die U87-Zellen in einer Vorinkubation zuerst mit $20 \text{ } \mu\text{M}$ des SLC-29-Inhibitors DP und $1 \text{ } \mu\text{M}$ des ADA-Hemmstoffs EHNA für 30 Minuten bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5 \% CO_2 vorinkubiert. Erst anschließend erfolgt die Zugabe des Heparins und seiner Derivate. Hierbei sind sowohl UFH, die beiden niedermolekularen Fraktionen Tinzaparin und Enoxaparin als auch das Pentasaccharid Fondaparinux verwendet worden. Die

Material und Methoden

Heparine und Fondaparinux wurden dafür analog zu den Versuchen mit der CE in DPBS verdünnt. UFH, Tinzaparin und Enoxaparin wurden jeweils gemäß ihrer antikoagulatorischen Aktivität auf eine Konzentration von 5 I.E./ml eingestellt. Die finale Konzentration des Pentasaccharids Fondaparinux betrug schlussendlich 10 µg/ml.

Tabelle 5: Aufgeführt sind die Konzentrationen der getesteten, kommerziell verfügbaren Heparine, sowie des Pentasaccharids Fondaparinux. Die internationalen Einheiten werden zur besseren Vergleichbarkeit mit dem vollsynthetischen Pentasaccharid Fondaparinux in die Massenkonzentration und molare Konzentration umgerechnet.

| Heparin | UFH | Tinzaparin | Enoxaparin | Fondaparinux |
|--------------------------|-----------|-------------|-------------|--------------|
| Internationale Einheiten | 5 I.E./ml | 5 I.E./ml | 5 I.E./ml | / |
| Massenkonzentration | / | 60,31 µg/ml | 50,00 µg/ml | 10,00 µg/ml |
| Molare Konzentration | / | 9,279 µM | 11,11 µM | 5,790 µM |

Das Volumen der Kavitäten wurde nach Zugabe von 20 µM ATP mit Medium auf 5 ml Gesamtvolumen aufgefüllt und für 3 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 500 g für 10 Minuten zentrifugiert, um Zellen und weitere unlösliche, feste Bestandteile aus dem Überstand entfernen zu können. Es folgte der Transfer des Überstandes in neue 15 ml Zentrifugenröhrchen. Die generierten Überstände sind, sofern nicht unmittelbar verwendet, für maximal 4 Wochen bei -20 °C gelagert worden. Die Erzeugung der Tumorüberstände dient der *in-vitro*-Modellierung, um die immunmodulierenden Eigenschaften der ATP/ADO-Achse auf ein aktives Zellsystem zu übertragen. Einerseits soll damit untersucht werden, inwiefern die Differenzierung naiver CD4⁺ T-Lymphozyten beeinflusst wird, und andererseits, welche Auswirkungen auf die Zytotoxizität der NK-Zellen erzielt werden. Des Weiteren wird untersucht, inwiefern Heparin und seine Derivate den immunstimulierenden Effekt des ATP durch Verhinderung des Abbaus wiederherzustellen vermögen.

4.8.4 Differenzierung regulatorischer T-Zellen

Bei den regulatorischen T-Zellen handelt es sich um einen immunsuppressiven Subtyp der CD4⁺-T-Zellen, welcher im Normalfall zur Terminierung der erfolgreichen adaptiven Immunantwort beiträgt. Lokal in der TMU kann die immunsuppressive Wirkung der T_{reg} über das natürliche Maß dereguliert werden und so enorm zu einer Immuntoleranz des Tumors beitragen. Im Rahmen der Voruntersuchung zur Aktivitätsbestimmung der purinerigen Signaltransduktion auf die CD4⁺ T-Zelldifferenzierung werden aktivierte CD4⁺ T-Zellen mit den endogenen Antagonisten ADO und ATP behandelt. Dabei werden seitens der immunlimitierenden Faktoren ADO und sein synthetisches Analogon 5'-(N-Ethylcarboxamido)adenosin (NECA) als A2AR-Agonist eingesetzt. Additiv werden ATP sowie dessen synthetisches Derivat Benzoyl-Benzoyl-ATP (BzATP) zur Immunstimulation des P2X7R untersucht (446,447). Zur weiteren Analyse werden die in Abschnitt 4.8.3 erläuterten Überstände aus heparinisierten Tumorzellen mit naiven, aus Buffy Coat isolierten CD4⁺-T-Zellen (Abschnitt 4.3.2) kokultiviert und deren Differenzierungsverhalten in T_{reg} analysiert. Als Analysemarker zur Identifizierung der T_{reg} dienen die membranständige α -Untereinheit des IL-2-Rezeptors, auch als CD25 bekannt, und der nukleäre Transkriptionsfaktor FoxP3. Die durch Differenzierung induzierten T_{reg} (iT_{reg}) unterscheiden sich durch oberflächige Expression von CD25 von den bereits natürlich vorliegenden T_{reg}, die in einer späten Phase der adaptiven Immunantwort IL-2 abfängt und durch Ausschüttung von IL-10 die Immunantwort herunterregelt (448).

Nach der Vorbereitung werden die isolierten CD4⁺ zu 5×10^6 Zellen/ml in Medium resuspendiert und abschließend 150 μ l äquivalent zu $7,5 \times 10^5$ CD4⁺-T-Zellen in die Kavitäten einer 12-Wellplatte pipettiert. Zur Induktion der CD4⁺-Differenzierung werden 25 μ l der Antikörpermixtur ImmunoCult™ Human CD3/CD28/CD2 T Cell Activator hinzugefügt, da diese sonst in einem anergischen Zustand verweilen. Des Weiteren werden 1000 μ l der generierten Überstände in die Kavitäten gegeben und mit Medium auf ein Gesamtvolumen von 3 ml aufgefüllt. Die Zwischenräume der Platte werden mit DPBS als Verdunstungsschutz versehen und für 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine erneute Zugabe von 1000 μ l der generierten Tumorüberstände, bevor abschließend weitere 48 h Inkubation folgen. Zur Analyse des Differenzierungsverhaltens der CD4⁺-T-Zellen werden $2,5 \times 10^5$ Zellen aus den jeweiligen Proben entnommen und bei 4 °C für 5 Minuten mit 600 g zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes werden die T-Zellen in 150 μ l FACS-Puffer aufgenommen und abermals zentrifugiert. Zur Blockade potenzieller unspezifischer Bindungsstellen für die Detektionsantikörper werden die CD4⁺-T-Zellen für 15 Minuten mit

Material und Methoden

100 μl einer 3 % BSA-Lösung bei Raumtemperatur behandelt. Es folgt das Markieren des spezifischen IL-2-Rezeptorproteins mittels 125 ng des Anti-hCD25 Antikörpers. Die Inkubationsdauer beträgt 30 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird mit 150 μl FACS-Puffer gewaschen, um die Reste des Detektionsantikörpers zu entfernen.

Um den nukleären Transkriptionsfaktor FoxP3 für eine Markierung zugänglich zu machen, müssen zuvor die Membranen permeabilisiert werden. Zum Erhalt der Gewebsintegrität und -rigidität sowie der Fluoreszenzintensität des markierten Antigens CD25 werden die Proteine der CD4⁺-T-Zellen zuvor mit Fixierpuffer fixiert (449,450). Durch vernetzende Fixiermittel wie p-Formaldehyd werden lösliche Zielproteine wie FoxP3 im Zytoskelett der Membranen mittels einer kovalenter Bindung verankert (451). Hierzu wird in 150 μl Fixierpuffer resuspendiert und für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Um Rückstände zu entfernen, folgt erneut ein Waschschriff mit Permeabilisierungspuffer. Die eigentliche Permeabilisierung der Zellmembran und der doppeImembranigen Kernhülle wird durch Zugabe von 75 μL Permeabilisierungspuffer bei 4 °C erzielt. Nach einer 30-minütigen Permeabilisierung werden 100 ng des Anti-hFoxP3 Antikörpers in 25 μl DPBS verdünnt und je 25 μl den einzelnen Proben zugesetzt. Anschließend an 30 Minuten Inkubation bei 4 °C folgen zwei Waschschriffe mit 150 μL Permeabilisierungspuffer, bevor die CD4⁺ T-Zellen in einem finalen Volumen von 500 μL FACS-Puffer resuspendiert werden. Je 150 μl einer Probe werden in die Kavitäten einer 96-Wellplatte transferiert und am Durchflusszytometer analysiert.

Die eingesetzten Detektionsantikörper sind jeweils mit einem anderen Fluorophor gekoppelt und können daher in unterschiedlichen Kanälen betrachtet werden. Der Anti-hFoxP3-Antikörper ist mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) konjugiert, das sein Emissionsmaximum bei der Wellenlänge $\lambda_{\text{max}} = 519$ nm aufweist und daher primär im grünen Kanal aufgenommen wird (452). Der Antikörper zur Detektion von CD25 ist mit einem proteinhaltigen Fluorophor-Mischkomplex mit der Bezeichnung Peridinin-Chlorophyll-Protein-Komplex (PerCP) verbunden, der wiederum an den Polymethin-Farbstoff Cyanin5.5 gekoppelt ist. Ein solches Konstrukt bezeichnet man auch als Tandemfarbstoff, innerhalb dessen gemäß Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) der meist proteinische Bindungspartner durch Absorption als Donor (PerCP) und ein weiterer kleinerer durch strahlungsfreie Übertragung die resultierende Emission abgibt, als Akzeptor (Cy5.5) funktioniert. Aufgrund der Kopplung als PerCP-Cy5.5 wird der Stoke-Shift vergrößert und die emittierte Wellenlänge von $\lambda_{\text{max}} = 677$ nm auf 695 nm leicht rotverschoben (453,454). Deshalb findet die Detektion der markierten Antigene im roten Kanal statt.

Während der simultanen Nutzung mehrerer Fluorophore kann es zu einem unerwünschten Nebeneffekt mit der Bezeichnung *Spillover* kommen. Beispielsweise werden bei Multistainingassays mehrere Fluoreszenzfarbstoffe wie FITC, Phycoerythrin (PE) und PerCP-Cy5.5 miteinander kombiniert, die durch den gleichen Laser angeregt werden. Folglich werden im gelben Kanal (PE) Fluoreszenzsignale durch FITC aus dem grünen Kanal, im roten wiederum (PerCP-Cy5.5) durch PE aus dem gelben Wellenlängenbereich registriert, die sich additiv überlagern. Aufgrund der breiten Emissionsspektren der Fluorophore FITC (grün) und PerCP-Cy5.5 (rot) wird das resultierende Signal nicht nur im Wellenlängenbereich eines einzelnen Detektionskanals erfasst, sondern ebenfalls durch weitere Detektionsfilter registriert.

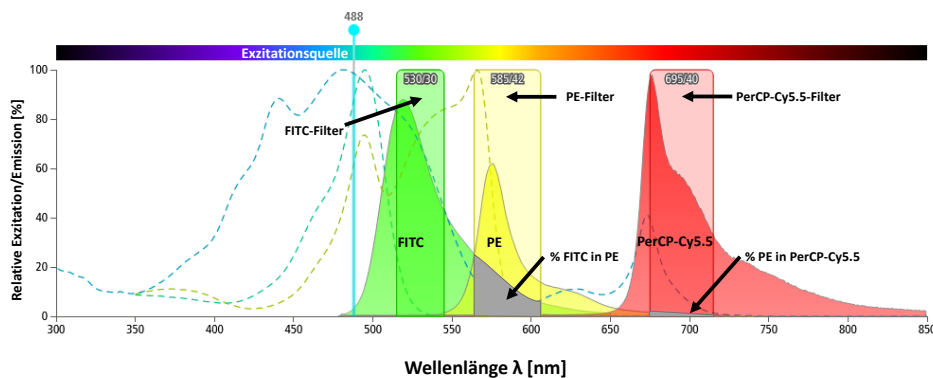


Abbildung 17: Darstellung eines sogenannten Spillovers der überlappenden Fluoreszenzspektren mehrerer Fluorophore. Hieraus ergibt sich die Notwendigkeit zur Kompensation mit Hilfe der FMO-Kontrollen, um falsch-positive Signale aus den jeweiligen Detektionskanälen zu eliminieren.

Zur Umgehung der Problematik werden einfach gefärbte Kompensationskontrollen erstellt, aus deren Messungen man die *Spillover*-Effekte berechnen und eliminieren kann. Zur Erstellung der Kompensationskontrollen für FITC und PerCP/Cy5.5 wurden anti-mouse Igκ MACS® Comp Beads entsprechend dem Protokoll eingesetzt. Des Weiteren können die entsprechenden Antigen-negativen Proben durch Markierung mit anderen Fluoreszenzfarbstoffen des Multistainingassays trotz Kompensation in dem jeweiligen Detektionskanal registriert werden. Hierzu werden die sogenannten *fluorescence-minus-one* Kontrollen (FMO-Kontrollen) erstellt, wobei jeweils ein Farbstoff des Multistainings ausgelassen wird, um den Einfluss der anderen im jeweiligen Detektionskanal zu determinieren. Folglich dienen die FMO-Kontrollen zur Korrektur des Gatings sowie der Definition der positiven Subpopulationen und der Exklusion falsch-positiver Proben. Zur Auswertung wird im ersten Schritt die Fläche des FSC-Signals (FSC-A) gegen dessen Höhe (FSC-H) aufgetragen, um mittels Gating auftretende Dubletten zu exkludieren. Im nächsten Schritt erfolgt mittels Auftragung des SSC gegen den FSC die Abtrennung der CD4⁺-T-Zellen von Zelltrümmern und weiteren Partikeln. Die

Material und Methoden

Subpopulationsanalyse zur Identifikation der $CD25^+FoxP3^+$ T_{reg} findet durch das Erstellen der Quadranten auf Basis der FMO-Kontrollen statt.

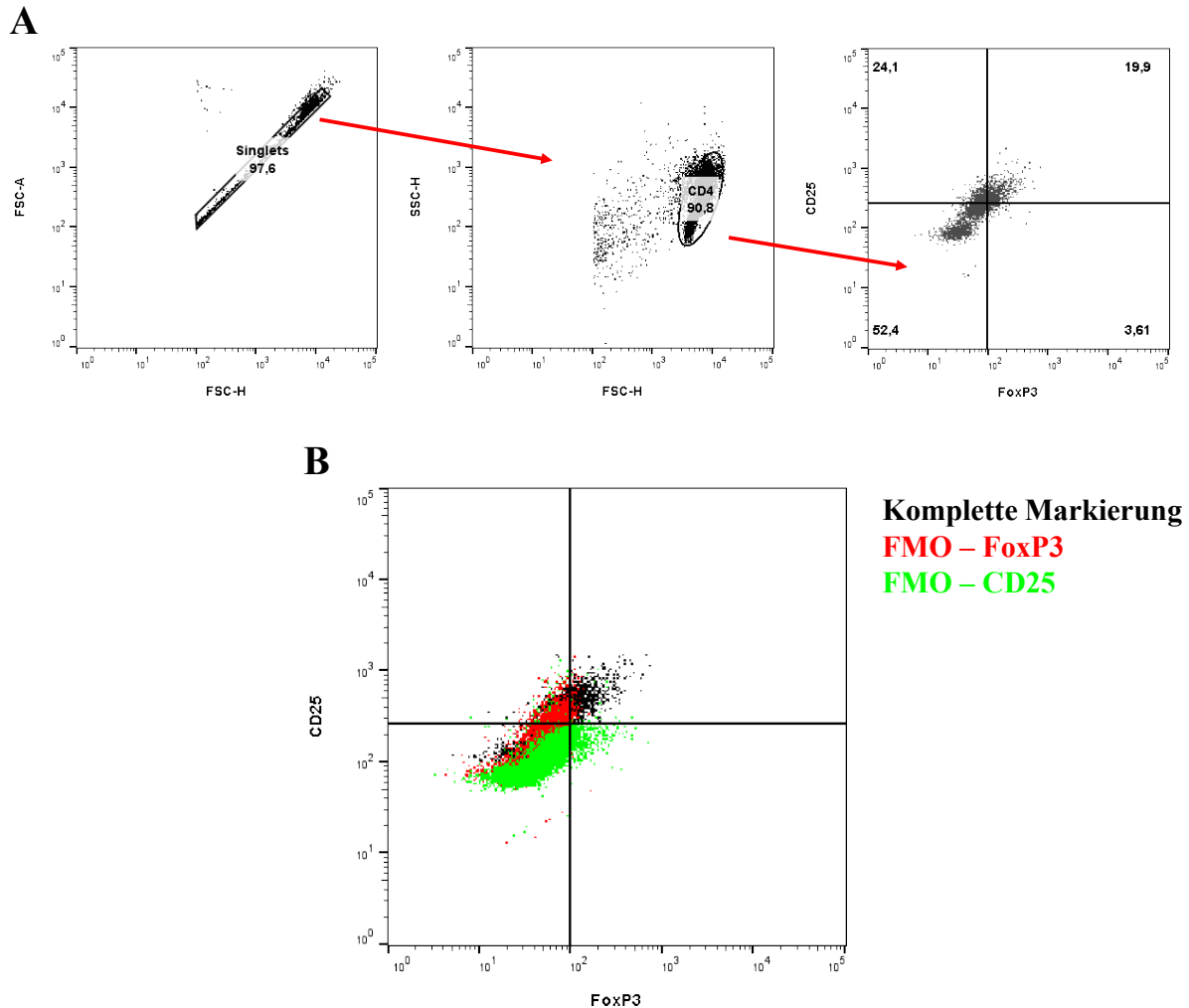


Abbildung 18: A) Illustriert ist die Gating-Strategie zur Analyse der FoxP3/CD25 positiven CD4 T-Lymphozyten nach Aktivierung und Kokultivierung mit Überständen der behandelten Tumorzelllinie U87. Auf die Dublettendiskriminierung erfolgt das gezielte Gaten auf die intakte CD4-Population, um weitere Partikel und tote Zellen aus der Gesamtbetrachtung zu entfernen. Abschließend wird die Subpopulationsanalyse der nach Gating isoliert betrachteten CD4-Gesamtpopulation zur Bestimmung des Anteils an immunsuppressiver T_{reg} durchgeführt. B) Abgebildet ist ein Vergleich der FMO-Kontrollen der verwendeten Fluorophore mit derjenigen zur Identifizierung der benötigten Doppelmarkierung. Die FMO-Kontrollen ermöglichen die Subpopulationsanalyse durch Anlegung der Quadranten zur Bestimmung des Anteils an iT_{reg} .

4.8.5 Zytotoxizität der natürlichen Killerzellen

Die natürlichen Killerzellen stellen eine bedeutende Komponente der zellulären angeborenen Immunantwort dar, weshalb sie einen erheblichen Einfluss auf eine erfolgreiche Bekämpfung eines Tumors haben. Zu diesem Zweck werden die in 4.8.3 generierten, mit Heparin behandelten Überstände der humanen Glioblastomzellen U87 im Zusammenhang mit den zytotoxischen Eigenschaften der NK-Zellen untersucht. Als Quelle der NK-Zellen für diese

Versuchsreihe dienen mittels Dichtezentrifugation nach 4.3.1 isolierte PBMC aus Buffy Coat. Vor dem Versuch werden sie 18 h in Medium inkubiert, um den aus der Isolation generierten Stress zu kompensieren. Zu Anfang werden 5×10^6 Zellen in 2,5 ml in die Kavitäten einer 6-Wellplatte transferiert. Im Anschluss folgt eine Vorinkubation für 30 Minuten mit 10 μM DP und 1 μM EHNA bei den Proben, die mit den Substanzen ADO, ATP und dem A2AR-Agonisten NECA oder dem P2X7R-Agonisten BzATP behandelt werden (446,447). Danach erfolgt die Zugabe der genannten Testsubstanzen beziehungsweise der Überstände zusammen mit Medium, sodass ein Gesamtvolumen von 5 ml je Kavität erreicht wird. Die Zwischenräume der Platte wurden mit ausreichend DPBS als Verdunstungsschutz versehen, bevor die Proben für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert werden. Am folgenden Tag zählt man die inkubierten PBMC und stellt sie anschließend auf eine Konzentration von 5×10^6 PBMC/ml ein. Parallel werden 1×10^6 der myeloischen Leukämiezellen K562 aus der Zellkulturflasche extrahiert und mit 450 g bei 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes erfolgt die Resuspension in 1 ml Medium mit Zusatz an 1 % FKS. Zur Anfärbung der K562-Suspension setzt man 1 ml CFSE-Arbeitslösung (10 μM) zu, woraufhin die Mixtur für 15 Minuten lichtgeschützt inkubiert wird, um sie bei der Messung von den Effektorzellen (NK-Zellen) zu unterscheiden. Bei CFSE oder dessen synonym verwendeter Bezeichnung CFDA-SE handelt es sich um das Fluorophor 6-Carboxyfluorescein-Succinimidylester bzw. dessen modifizierte Variante, bei der die beiden freien Hydroxylgruppen des Fluoresceins mit Essigsäure verestert sind. CFDA-SE ist im Gegensatz zu CFSE nicht intrinsisch fluoreszierend und relativ lipophil, weshalb es eine hohe Permeabilität gegenüber Zellmembranen aufweist (455). Durch zytosolische Esterasen werden die beiden Essigsäurereste abgespalten und CFDA-SE in das Fluorophor CFSE umgewandelt. Die unveränderte freie Succinimidylester-Funktion des Moleküls begünstigt aufgrund ihrer Reaktivität eine kovalente Bindung an Amine, insbesondere an die Lysine zytosolischer Proteine. Aufgrund der durch Esterhydrolyse verringerten Lipophilie und der stabilen kovalenten Bindung an intrazelluläre Proteine ist CFSE in der Zelle gefangen und emittiert nach Exzitation bei $\lambda_{\text{max}} = 517$ nm im grünen Kanal Fluoreszenz (455). Zur Beendigung des Markiervorgangs durch extrazelluläre Fluoreszenzlöschung fügt man 5 ml Vollmedium hinzu. Nach Zentrifugation wurden die K562 mit Vollmedium auf eine Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml eingestellt. In der Folge werden die Proben der PBMC und K562 nach den in Tabelle 6 dargestellten Ansätzen in eine 96-Wellplatte mit U-Boden pipettiert.

Material und Methoden

Tabelle 6: Pipettierschema der vermessenen Ansätze der NK-Zytotoxizitätsassays

| Ansatz | Medium | PBMC (E) | Tween 20 | IL-2 | K562 (T) |
|--------------------|--------|----------|----------|-------|----------|
| E:T 50:1 + IL-2 | / | 100 µl | / | 30 µl | 100 µl |
| E:T 50:1 | / | 100 µl | / | / | 100 µl |
| E | 100 µl | 100 µl | / | / | / |
| T | 100 µl | / | / | / | 100 µl |
| T + Tween- 20 | / | / | 100 µl | / | 100 µl |

Mit Hilfe der Tween-20-Arbeitslösung ermittelt man den maximalen Anteil der Zielzellen (K562), welcher sich abtöten lässt. Der Zusatz an IL-2-Arbeitslösung definiert als Kontrolle die maximale NK-vermittelte Zytotoxizität. Vor der vierstündigen Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wird die beschickte Platte für 2 Minuten bei 120 g zentrifugiert, damit sich Effektor- und Zielzellen in unmittelbarer Nähe zueinander befinden. Im Anschluss an die vollendete Inkubation erfolgt ein Zusatz von 5 µl der 7-AAD Viability Staining Solution zu jeder Probe. Anschließend werden die Proben in eine 96-Wellplatte mit flachem Boden transferiert und am Durchflusszytometer vermessen. 7-Aminoactinomycin (7-AAD) ist ein synthetisches Derivat des Peptid-Antibiotikums Actinomycin D/Dactinomycin, welches seine zusätzliche zytostatische Wirkung durch DNA-Interkalation zwischen den Basen Cytosin und Guanin samt Blockade der RNA-Synthese entfaltet (456). Nach DNA-Interkalation und Exzitation emittiert 7-AAD bei $\lambda_{\text{max}} = 647 \text{ nm}$ eine im roten Kanal detektierbare Fluoreszenz. Aufgrund der Polypeptid-Grundstruktur zeichnet sich das Molekül insgesamt durch Hydrophilie aus, weshalb 7-AAD nicht membrangängig ist und folglich nur bei apoptotischen Zellen die DNA interkaliert (457). Zur Analyse der Messreihe werden in einem Dotplot-Diagramm SSC gegen CFSE aufgetragen. In dem resultierenden Diagramm wird zunächst die Zielpopulation K562 mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs CFSE identifiziert. Durch Anlegen eines Gates kann die gesuchte Subpopulation der K562 in einem weiteren Diagramm, welches den SSC gegen 7-AAD darstellt, isoliert betrachtet werden. Zur abschließenden Viabilitätsbestimmung wird der prozentuale Anteil der toten Zellen an der Gesamtpopulation durch deren erhöhte Fluoreszenzintensität im roten Kanal definiert.

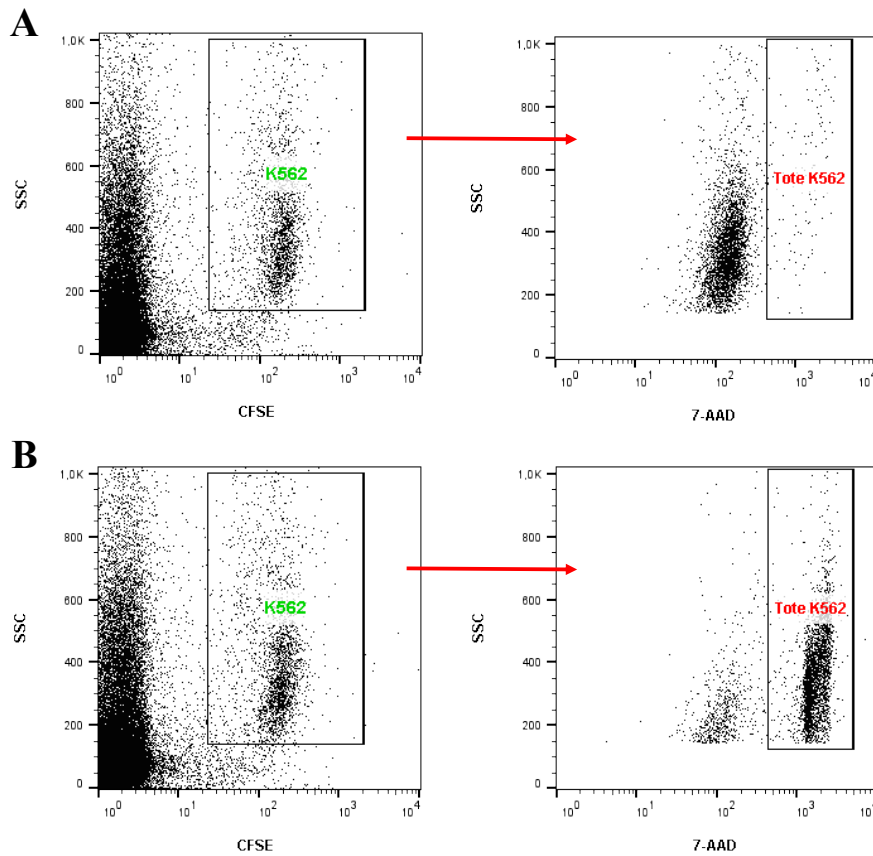


Abbildung 19: Dargestellt ist die Gatingstrategie zur Bestimmung der NK-vermittelten Zytotoxizität. Über die Selektion der mit CFSE markierten K562 werden diese von den PBMC abgetrennt. Durch das Anlegen eines weiteren Gates im roten Kanal kann der Anteil toter K562 durch die DNA-Interkalation des Fluorophors 7-AAD bestimmt werden. A) Exemplarische Darstellung eines Versuchs mit geringer NK-Aktivität. B) Kontrolle zur Festlegung der maximalen NK-Zytotoxizität, indem die Apoptose der K562 mit Hilfe des Tensids Tween-20 forciert wird.

4.9 IL-10 ELISA

4.9.1 Generierung der Überstände

Der Human IL-10 ABTS ELISA der Firma Peprotech Inc. wird zur quantitativen Analyse des IL-10-Gehalts in Zellkulturmedien von CD4⁺ Zellen oder PBMC eingesetzt, die mit Heparin und seinen aufgearbeiteten und synthetischen Derivaten oder Tumorzellüberständen behandelt wurden. Die Überstände der Tumorzelllinie wurden analog den Ausführungen in 4.8.3 erzeugt. Die Sekretion des Zytokins IL-10 ist spezifisch mit der Differenzierung und Aktivität des immunsupprimierenden CD4⁺-Subtyps T_{reg} korreliert. Deshalb werden zur Analyse der IL-10-Ausschüttung zu Beginn PBMC und CD4⁺-T-Zellen aus Buffy Coat isoliert. Die jeweiligen Populationen werden gemäß den Abschnitten 4.3.1 und 4.3.2 per Dichtezentrifugation und MACS extrahiert. Im Anschluss an die Zellzahlbestimmung gibt man die PBMC/CD4⁺ zu $1,5 \times 10^6$ Zellen je 1,5 ml Medium in die Kavitäten einer 12-Wellplatte. Zur Aktivierung der T-Zelldifferenzierung stimuliert man die Proben bis auf die unbehandelte Negativkontrolle mit 25 µl der Antikörpermixtur ImmunoCult™ Human CD3/CD28/CD2 T Cell Activator. Bei den Testsubstanzen ADO, ATP, NECA, BzATP erfolgt eine Vorinkubation mit DP 10 µM und EHNA 1 µM für 30 Minuten, um die Aktivität der ENT und der ADA entsprechend zu blockieren. Anschließend fügt man die Testsubstanzen hinzu und stellt mit Medium auf ein Gesamtvolumen von 3 ml ein. Bei den Tumorüberständen erfolgt eine Zugabe von 500 µl Medium und 1000 µl Überstand, sodass dasselbe Gesamtvolumen erreicht wird. Nach 48 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ erfolgt eine erneute Zugabe der Testsubstanzen und der jeweiligen Überstände. Die entsprechende Menge der Testsubstanzen mischt man zuvor mit einem Milliliter Medium, um die Volumenzugabe an die Überständen anzugleichen. Es wird für weitere 48 h inkubiert. Zur Abschöpfung der PBMC/CD4⁺-Überstände werden die Proben nach Ablauf der Inkubation in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und durch Zentrifugation die festen und zellulären Bestandteile abgetrennt. Die Lagerung erfolgt nach dem Transfer in frische Zentrifugenröhrchen bis zur Anwendung bei -80 °C.

4.9.2 Durchführung

Das Akronym ELISA steht für *Enzyme-linked immuno-sorbent-Assay*, mit dessen Hilfe eine quantitative Bestimmung eines ausgewählten Zielproteins ermöglicht wird. Dabei wird das Zielprotein mit der *Sandwich*-Methode detektiert (458). Im ersten Schritt findet am Boden einer unbeschichteten Platte die Immobilisierung des Fc-Fragmentes des *Capture*-Antikörpers statt. Dazu werden 100 µl der *Capture*-Antikörperlösung der Konzentration 0,25 µg/ml in die Kavitäten einer F96 Maxisorb Nunc-Immuno Platte pipettiert und bei Raumtemperatur über

Nacht inkubiert. Zur Entfernung des ungebundenen *Capture*-Antikörpers werden nach Anleitung des Herstellers vier aufeinanderfolgende Waschschrte mit Waschpuffer durchgeführt. Zur Absättigung potenzieller unspezifischer Bindungsstellen des IL-10-Detektionsantikörpers und der Vermeidung falsch-positiver Resultate werden 100 µl einer 3 % BSA-Lösung in die Kavitäten der Platte eingebracht. Nach einstündiger Inkubation wäscht man erneut viermal. Im Anschluss an die Waschschrte folgt die Probenauftragung. Hierzu werden einerseits 100 µl der PBMC/CD4⁺-Überstände und andererseits eine Verdünnungsreihe des nach Herstellerangaben vorbereiteten Standards zur Kalibrierung des Gehalts in die Kavitäten der Platte verbracht. Im Zeitraum einer zweistündigen Inkubation bindet das IL-10 aus den Standards und der Proben als Epitop an die spezifischen Fab-Fragmente des *Capture*-Antikörpers. Alternativ kann die Inkubation bei 4 °C im Kühlschrank über Nacht durchgeführt werden. Danach erfolgt erneut ein vierteiliger Waschschrte, bevor in jede Kavität 100 µl einer 1,0 µg/ml konzentrierten Lösung des IL-10-Detektionsantikörpers eingebracht werden. Dabei binden die spezifischen Fab-Fragmente des Detektionsantikörpers an eine andere Zielstruktur als der *Capture*-Antikörper. Dadurch wird eine weitere Bindung an den Analyten ermöglicht, wodurch während der zweistündigen Inkubation bei Raumtemperatur der *Sandwich*-Komplex aus Antikörpern und Analyt komplettiert wird (458). Überschüssigen Antikörper entfernt man in einem weiteren vierteiligen Waschschrte, bevor mit 100 µl einer Avidin-HRP-Lösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wird. Das Fc-Fragment des Detektionsantikörpers ist dabei kovalent an das natürliche Verknüpfungsmolekül Biotin gebunden. Nach der Bildung des *Sandwich*-Komplexes erleichtert die endständige Position des Fc-Fragmentes des Detektionsantikörpers die Konjugation des biotinylierten Antikörpers mit dem basischen Glykoprotein Avidin. Dieser Prozess ist auf die hohe Bindungsaffinität des Biotins zu Proteinen und insbesondere Avidin zurückzuführen (459,460). Des Weiteren wird durch Bildung des Immunkonjugats das Reporterenzym Meerrettichperoxidase (HRP) in den *Sandwich*-Komplex eingebracht. In Abbildung 20 ist der schematische Ablauf eines *Sandwich*-ELISA in fünf Phasen dargestellt.

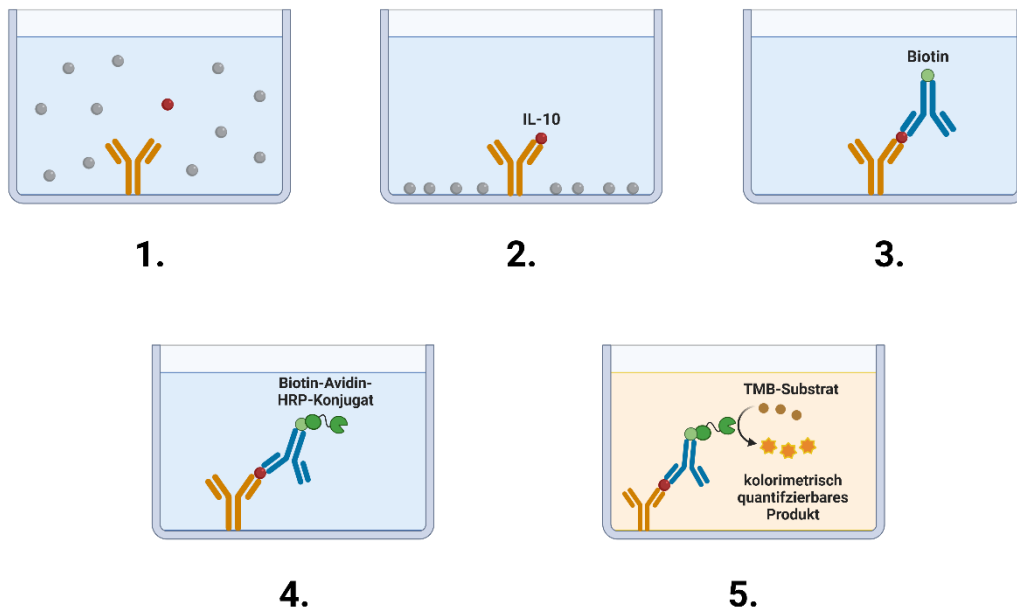


Abbildung 20: Schematischer Ablauf des IL-10 Sandwich-ELISA. Immobilisierung des Capture-Antikörpers mit dem Fc-Fragment am Plattenboden (1). Bindung des Targets an den Capture-Antikörper (2). Bildung des Sandwich-Komplexes aus Capture-Ak, IL-10 und biotinyliertem Detektionsantikörper (3). Konjugation des Avidin-HRP-Komplexes mit dem Sandwichkomplex über das Linkermolekül Biotin (4). Enzymatischer Umsatz des HRP-Substrats TMB in ein kolorimetrisch quantifizierbares Produkt (5). Die Abbildung wurde mit Hilfe von BioRender.com erstellt.

Reporterenzyme zeichnen sich durch Umsetzung ihres Substrats in ein Produkt aus, das nach einer Farbreaktion durch Vis-Absorption oder Fluoreszenz und Chemilumineszenz quantifiziert werden kann (461). Nach erneutem Waschen wird die Entwicklung des *Sandwich*-ELISA durch Zugabe von 100 μl 1 Step[®] Ultra TMB ELISA Substrat Lösung eingeleitet. Das Reporterenzym Meerrettichperoxidase katalysiert die Oxidation des chromogenen Substrats 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) unter simultanem Umsatz des zweiten Eduktes Wasserstoffperoxid und Ausbildung eines konjugierten π -Elektronensystems. Auf diese Weise wird eine Blaufärbung der Lösung durch das Produkt 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidindiimin bewirkt, die eine Proportionalität zum Gehalt des Analyten IL-10 aufweist. Entgegen dem Herstellerprotokoll ist für die Versuchsreihe TMB anstatt 2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS) verwendet worden, da Ersteres gegenüber ABTS über eine höhere Sensitivität verfügt (462). Bei fortgeschrittener Entwicklung des ELISA beendet man die enzymkatalysierte Farbreaktion durch Zugabe von 50 μl 2 M Schwefelsäure. Resultierend aus der pH-Verschiebung in das saure Milieu ($\text{pH} < 1$), kommt es zu einem Farbumschlag von blau zu gelb, der ebenfalls eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 370 nm auf $\lambda_{\text{max}} = 450 \text{ nm}$ hervorruft (463).

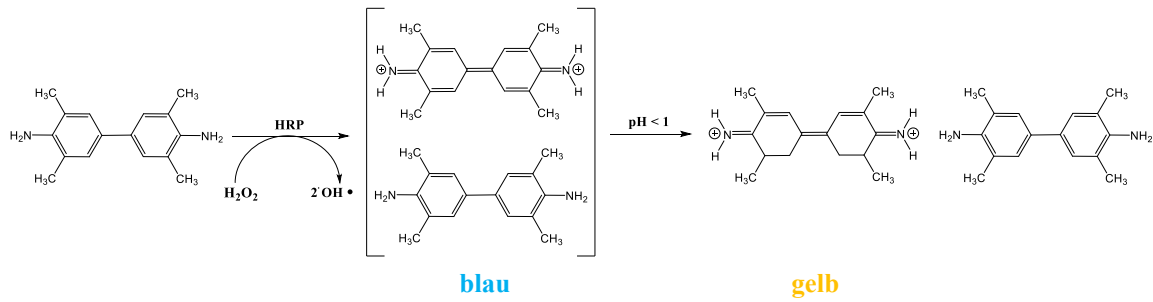


Abbildung 21: Enzymatische Umsetzung des Substrats TMB in ein farbiges Produkt zur kolorimetrischen Quantifizierung des IL-10 mittels ELISA

Unmittelbar an das Abstoppen der ELISA-Entwicklung werden die Intensität der Absorption bei 450 nm am Spektrometer bestimmt. Mittels Differenzbildung erfolgt eine Korrektur der Messwerte durch eine Aufnahme der Nullwerte des Lösungsmittels bei 590 nm, wodurch das Hintergrundrauschen eliminiert wird. Die gemessenen Absorptionswerte der Standards liegen teils außerhalb des durch das Lambert-Beer-Gesetz definierten Absorptionsbereichs von 0,2 – 1,0 mit linearer Korrelation der Absorption zur Konzentration. Folglich wird die nichtlineare, 4-Parameter logistische Regression zur Erstellung der Standardkurve ausgewählt, um die Korrelation der Absorption zur Konzentration zu ermitteln und die Analytengehälter der Proben absolut zu bestimmen.

4.10 Multiplex Analyse des Zytokinprofils

Zur ausführlicheren Analyse der generierten Tumorüberstände der Zelllinie U87 und einer damit zusammenhängenden möglichen CD4⁺ T-Zellplastizität werden die Gehalte verschiedener regulatorischer Zytokine bestimmt. Dabei werden ausgewählte Zytokine aus dem LEGENDplex™ Human Essential Immune Response Panel des Unternehmens BioLegend Inc. quantifiziert. Das Prinzip der Multiplex Analyse basiert in diesem Fall auf einer simultanen Detektion von fünf Proteinen aus der Klasse der Zytokine. Hierzu differenziert man diverse Bead-Antikörperkonjugate anhand ihrer Größe sowie der unterschiedlichen, intrinsischen Fluoreszenz.

Die fünf untersuchten Zytokine IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-17A und TGF- β 1 werden durch den jeweiligen spezifischen, konjugierten Antikörper auf den Beads immobilisiert. Im Anschluss erfolgt eine Kopplung der gebundenen Zytokine an ein Konjugat aus biotinyliertem Antikörper und fluoreszenzmarkiertem Streptavidin. Das jeweilige Zytokin kann durch Kombination aus unterschiedlicher Größe und diverser intrinsischer Fluoreszenz der markierten Beads identifiziert und quantifiziert werden. Hierbei wird eine Kombination aus drei Fluorophoren FITC, PE und APC verwendet, die durch Laser unterschiedlicher Wellenlängen (488 nm, 633 nm) angeregt werden. Aus Letzterem folgt die Bestimmung der jeweiligen Gehalte anhand einer Regression mit Standardkurven bekannter Konzentrationen. Die Generierung der Proben wird entsprechend den Abschnitten 4.8.3 für die U87-Überstände und 4.9.1 für die CD4⁺ und CD4⁺-U87-Überstände durchgeführt. Um sicherzustellen, dass sich die zu analysierenden Zytokingehalte im Konzentrationsbereich entsprechend den Herstellerangaben befinden, wurden die U87-Überstände zur Messung 1:2 und die CD4⁺-Überstände 1:4 verdünnt.

Additiv werden vier weitere Vertreter aus der Klasse der synthetischen, polysulfatierten Heparin-Mimetika mit unterschiedlichen Strukturen untersucht. Bis zur Messung werden die Proben bei -80 °C gelagert. Die Probenaufbereitung wird analog dem Herstellerprotokoll in einer 96-Wellplatte mit V-Böden durchgeführt. Als Messinstrument dient das Durchflusszytometer CytoFLEX der Firma Beckman Coulter Inc. mit einer Bestückung aus drei Lasern der Wellenlängen 405 nm, 488 nm und 633 nm. Zur Evaluation des Datensatzes wird die zum Multiplex Assay bereitgestellte LEGENDplex™ Cloud-Based Software sowie Graphpad Prism 8 verwendet.

4.11 Statistik

Zur statistischen Auswertung aller Versuche wurden die Programme Bio-Rad CFX Manager und Graphpad PRISM verwendet. Die Expressionsanalysen der EN wurden mit Hilfe der Software Bio-Rad CFX Manager erstellt. In Versuchsansätzen mit zwei Vergleichproben wurde der Student's Test (t-Test) angewendet. Für Versuchsreihen in denen mehrere Behandlungen auf eine Referenz bezogen wurden, wurde die Methodik der einfaktoriellen Varianzanalyse (One-Way ANOVA) in Kombination mit dem Dunnett Post-hoc Test verwendet. Weitere Angaben bezüglich der statistischen Analyse können der jeweiligen Abbildungsbeschriftung entnommen werden. Die Resultate der statistischen Analyse werden graphisch als Asteriken für die jeweiligen Signifikanzniveaus dargestellt. Für diese gilt: ns: nicht signifikant; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Quantitative Analyse der EN-Expression auf Tumorzellen

5.1.1 Bestimmung der Primereffizienzen

Für die mittels qPCR durchzuführende Untersuchung der EN-Expression der Tumorzellen musste eingangs zur Gewährleistung einer zufriedenstellenden Qualität der Primer eine Bestimmung der Primereffizienz E durchgeführt werden. Hierzu wurde das jeweilige spezifisch zu analysierende Primerpaar in einem dekadisch logarithmierten Verdünnungsansatz mit der komplementären Ziel-DNA quantifiziert. In Tabelle 7 sind die entsprechend designten Primersequenzen der untersuchten humanen EN aufgeführt.

Tabelle 7: Tabellarische Auflistung der entsprechenden komplementären f- und r-Primer mitsamt ihrer Basensequenzen zur Expressionsanalyse der beiden HKG und der EN auf den Tumorzellen.

| Bezeichnung | Primer | Basensequenz |
|---------------|----------|-----------------------------------|
| GAPDH (HKG) | f-Primer | 5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3' |
| | r-Primer | 5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3' |
| β-Aktin (HKG) | f-Primer | 5'-CCAACCGCGAGAAGATGA-3' |
| | r-Primer | 5'-CCAGAGGCGTACAGGGATAG-3' |
| NPP1 | f-Primer | 5'-TTGGGAACTGTCGCTGTG-3' |
| | r-Primer | 5'-ACCTGAATTTGTTGCAAGTCC-3' |
| NPP2 | f-Primer | 5'-GCACATCGAATTAAGAGAGCAG-3' |
| | r-Primer | 5'-GGGGGAGTCTGATAGCACTG-3' |
| NPP3 | f-Primer | 5'-ATATCACCCACGGCTTCCT-3' |
| | r-Primer | 5'-TCATATTGGCTATCTGATGTTCTATTG-3' |
| NT5E | f-Primer | 5'-CCAGTCCACTGGAGAGTTCC-3' |
| | r-Primer | 5'-CGACACTTGGTGCAAAGAAC-3' |
| NTPD1 | f-Primer | 5'-CAGGAAAAGGTGACTGAGATGA-3' |
| | r-Primer | 5'-CCTTTACTCCAGCGTAAGATGTTT-3' |
| NTPD2 | f-Primer | 5'-CAGCTCCTGTGATGTTCCAG-3' |
| | r-Primer | 5'-GCCCCAGAAGGGTTGTCT-3' |
| NTPD3 | f-Primer | 5'-ACCACTTGTTTGTGAACGGTTA-3' |
| | r-Primer | 5'-GCTATGCTGCTATTCCCCACT-3' |
| NTPD8 | f-Primer | 5'-ACAGAAGCGTCTAAGCACAGC-3' |
| | r-Primer | 5'-TGCAGGTGGTACTGGTTCCT-3' |

Aus den resultierenden Cq-Werten wurde mit Hilfe der linearen Regression die Steigung bestimmt und mittels Formel 4 die Effizienz E berechnet. Dabei wurden für den Parameter des Bestimmtheitsmaßes der Zielwert $R^2 > 0,99$ als ausreichende Modellgüte der linearen Regression und für die Effizienz der Zielkorridor $E = 90 - 110 \%$ als Erfüllungskriterium für den Qualitätsmaßstab der Primerdesigns definiert.

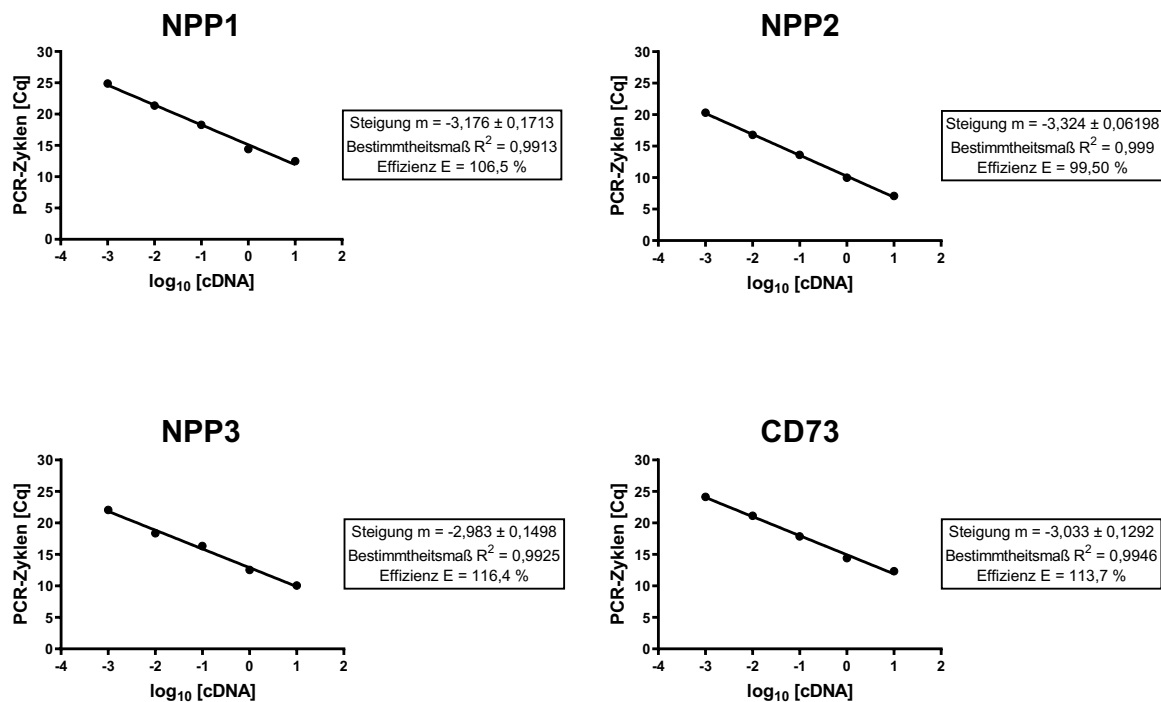


Abbildung 22: Graphische Darstellung der linearen Regression zur Bestimmung der Effizienz E der Primerpaare der NPP-Subtypen 1, 2, 3 und CD73. Hierbei ist die Konzentration der angewendeten zu replizierenden Ziel-DNA halblogarithmisch gegen die PCR-Zyklen aufgetragen. Aus der Regressionsgeraden wird die Steigung m abgelesen, um mit Hilfe der Formel 4 die Effizienz zu errechnen. Das Bestimmtheitsmaß R^2 gibt die Güte des linearen Regressionsmodells an. Die Messwerte wurden als Quadruplikate innerhalb eines Versuchsansatzes verifiziert.

In Abbildung 22 sind die Resultate aus der Analyse der Primereffizienz zu den NPP-Subtypen 1-3 und CD73 dargestellt, die den funktionellen ATP-Abbau als alternativen Weg unabhängig von CD39 auf einer Tumorzelle abbilden. Für NPP1 ließ sich eine Effizienz $E = 106,5 \%$ errechnen, bei einem Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,9913$ der linearen Korrelation. Somit gelten die Qualitätskriterien als erfüllt. Bezüglich NPP2 und 3 erfüllen die beiden Werte für R^2 mit 0,9925 und 0,9946 jeweils die Kriterien. Im Gegensatz dazu liegen bei beiden NPP-Subtypen die errechneten Effizienzen mit 113,7 % und 116,4 % außerhalb des festgelegten Zielkorridors. Dementsprechend ist es schwierig, die Primerpaare für eine exakte Quantifizierung der jeweiligen Enzymexpression heranzuziehen. Jedoch sind die Daten ausreichend, um eine qualitative Aussage über die Expression der jeweiligen Zielgene durch eine Tumorzelllinie zu

Ergebnisse und Diskussion

treffen. Für CD73 ergibt sich mit dem Subtyp NPP1 der konsekutive ATP-Abbau zu ADO über den alternativen Weg.

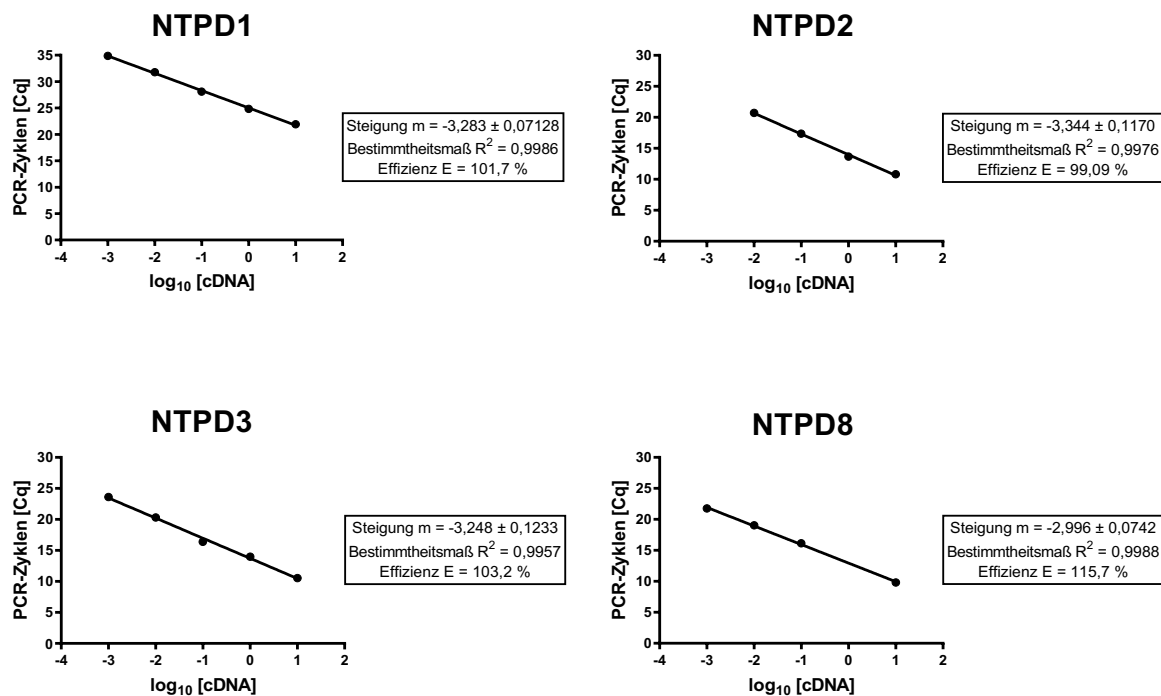


Abbildung 23: Graphische Darstellung der linearen Regression zur Bestimmung der Effizienz E der Primerpaare der CD39-Subtypen 1, 2, 3 und 8. Hierbei ist die Konzentration der aufgewendeten zu replizierenden Ziel-DNA halblogarithmisch gegen die PCR-Zyklen aufgetragen. Aus der Regressionsgeraden wird die Steigung m abgelesen, um mit Hilfe der Formel 4 die Effizienz zu errechnen. Das Bestimmtheitsmaß R² gibt die Güte des linearen Regressionsmodells an. Die Messwerte wurden als Quadruplikate innerhalb eines Versuchsansatzes verifiziert.

In Abbildung 23 sind die Ergebnisse der Bestimmung der Primereffizienz der CD39 Subtypen 1, 2, 3 und 8 aufgeführt. Die jeweiligen Primerpaare der extrazellulären CD39-Subtypen 1, 2, 3 und 8 dienen der Expressionsanalyse der potenziellen CD39-Aktivität auf den zu untersuchenden Tumorzellen. Für den Subtyp NTPD1 wurde ein Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,9986$ und eine Effizienz $E = 101,7\%$ ermittelt. Die entsprechenden Primereffizienzen der weiteren Subtypen NTPD2 und 3 betragen jeweils $99,09\%$ und $103,2\%$ bei Bestimmtheitsmaßen R^2 von $0,9976$ und $0,9957$. Die Qualitätskriterien gelten daher als erfüllt. Hinsichtlich der Primerpaarungen der Subtypen NTPD2 und 8 ist zu erwähnen, dass zur Erstellung der Regressionsgeraden lediglich vier Parameter verwendet wurden, da der jeweils fünfte Parameter aufgrund einer schlechten Korrelation exkludiert wurde. Im Gegensatz zu den drei vorigen Subtypen liegt die Effizienz des Subtypen 8 mit $115,7\%$ außerhalb des festgelegten Intervalls von $90 - 110\%$. Da der adjustierte R^2 -Wert mit $0,9988$ die Kriterien

erfüllt, wurde die Primerpaarung jedoch zur Expressionsanalyse des Zielgens NTPD8 herangezogen.

5.1.2 Quantifizierung der EN-Expression auf U87-Zellen

Nach der Ermittlung der Bestimmung der Primereffizienz wurden verschiedene Tumorzelllinien hinsichtlich der mRNA-Expression der EN untersucht. Im Fokus standen dabei Zelllinien, die insbesondere die EN NPP1 und CD73 des alternativen Weges zur ATP-Degradation, nicht aber CD39-Subtypen exprimieren, um das Potenzial geeigneter NPP1-Inhibitoren anhand des Zellsystems zu evaluieren. Im Ergebnis einer ersten Voruntersuchung wurde die Glioblastomzelllinie U87 näher betrachtet.

In Tabelle 8 ist das Ergebnis der qualitativen Expressionsanalyse der EN-Zielgene in U87-Zellen ausgewiesen. Aufgrund der Tatsache, dass die gemessenen Cq-Werte relativ hoch ausfielen, wurden verschiedene Intervalle als Maß der Expression definiert, die sich an den Werten der HKG orientieren. Auf der zugrundeliegenden Annahme, dass bei optimalen PCR die quantifizierbare Menge cDNA exakt verdoppelt wird, wurde die Intervallgrenze auf eine Differenz von fünf Zyklen bestimmt, da dies einer Vervielfachung der Ausgangsmenge um den Faktor 32 entspricht.

Tabelle 8: Tabellarische Zusammenfassung der quantitativen Expressionsuntersuchung der EN-Zielgene an U87-Zellen in Form der Mittelwerte und SEM für die Versuchszahl N=3. Die hervorgehobenen Zahlenwerte repräsentieren die qualitativ exprimierten EN-Zielgene.

| Zielgen | Cqm | SEM |
|---------|--------------|--------|
| hENPP1 | 30,88 | 0,4236 |
| hENPP2 | 35,48 | 1,988 |
| hENPP3 | 48,94 | 0,7392 |
| hNT5E | 28,52 | 0,5297 |
| GAPDH | 26,56 | 0,3532 |
| β-Aktin | 27,77 | 0,4813 |
| hENTPD1 | 42,71 | 0,7363 |
| hENTPD2 | 47,65 | 1,094 |
| hENTPD3 | 46,62 | 1,133 |
| hENTPD8 | 50,00 | ± 0 |

Folglich gelten Werte analog der Expression der HKG GAPDH und β -Aktin innerhalb des Cq-Intervalls 25 – 30 als hoch exprimiert. Dementsprechend wurden die Cq-Intervalle 30 – 35 als mittelstark und > 35 als gering bis nicht exprimiert eingestuft. Infolgedessen wurden die beiden HKG sowie CD73 (NT5E) aufgrund ihrer Cq-Werte von 26,56 (GAPDH), 27,77 (β -Aktin) und 28,52 (NT5E) des Versuchsansatzes als stark exprimiert angesehen. NPP1 wurde anhand des Cq-Wertes von 30,88 als mittelstark exprimiert betrachtet. Im Gegensatz dazu wurden die weiteren NPP-Subtypen 2 und 3 basierend auf deren Cq-Werten > 35 als nicht exprimiert klassifiziert. Die extrazellulären Subtypen von CD39 wurden auf Basis ihrer Cq-Werte oberhalb von 35 ebenfalls als nicht exprimiert eingeordnet.

5.1.3 Quantifizierung der EN-Expression auf MDA-MB-231-Zellen

Neben der Glioblastomzelllinie U87 wurde auch die hinsichtlich der Resistenzentwicklungen im Tumorgeschehen gut etablierte Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 auf die Expression der EN untersucht. Zur Charakterisierung der Expressionsniveaus wurden die entsprechenden Kriterien aus der Versuchsreihe mit den U87-Zellen übernommen. Die Daten zur qualitativen Expressionsanalyse der EN-Zielgene anhand der MDA-MB-231-Zellen sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Tabellarische Zusammenfassung der quantitativen Expressionsuntersuchung der EN-Zielgene an MDA-MB-231-Zellen in Form der Mittelwerte und SEM für die Versuchsanzahl N=3. Die hervorgehobenen Zahlenwerte repräsentieren die qualitativ exprimierten EN-Zielgene.

| Zielgen | Cqm | SEM |
|----------------|--------------|--------|
| hENPP1 | 31,97 | 0,5996 |
| hENPP2 | 41,57 | 1,509 |
| hENPP3 | 46,26 | 1,129 |
| hNT5E | 29,55 | 0,4085 |
| GAPDH | 24,51 | 0,4491 |
| β -Aktin | 27,75 | 0,7298 |
| hENTPD1 | 45,74 | 0,9512 |
| hENTPD2 | 46,71 | 1,556 |
| hENTPD3 | 33,04 | 0,5013 |
| hENTPD8 | 49,12 | 0,6747 |

Auffällig erscheint die Differenz zwischen den beiden Cq-Werten der HKG GAPDH und β -Aktin, die bei Mittelwerten von 24,51 und 27,75 um den Faktor 8 recht deutlich ausfällt. Neben diesen liegt der Mittelwert von CD73 (NT5E) mit 29,55 ebenfalls noch im Cq-Intervall, das eine starke Expression darstellt. Aus der Enzymklasse der NPP wurde für NPP1 ein Cq-Wert von 31,97 ermittelt, der für eine mäßige Expression des Enzyms steht. Die beiden weiteren extrazellulären Subtypen NPP2 und 3 wurden hingegen als nicht exprimiert klassifiziert. In der Betrachtung der CD39-Subtypen werden die Subtypen NTPD1, 2 und 8 ebenfalls als nicht exprimiert eingeordnet. Im Gegensatz dazu weist der Subtyp NTPD3 einen Mittelwert von 33,04 auf. Auf Basis der festgelegten Kriterien wird NTPD3 als mäßiges Expressionsniveau beschrieben.

5.1.4 Zusammenfassung EN-Expression auf Tumorzellen:

In Bezug auf die EN-Expressionsanalyse kann zusammenfassend gesagt werden, dass mit den U87-Glioblastomzellen und den MDA-MB-231-Mammakarzinomzellen zwei Zelllinien aus unterschiedlichen Geweben identifiziert wurden. Hervorzuheben ist, dass bei den U87-Zellen mit NPP1 und CD73 lediglich die EN exprimiert werden, die die alternative Achse des extrazellulären ATP-Abbaus darstellen. Somit wurde ein mögliches Zellmodell identifiziert, um Eignung und Potenz potentieller Inhibitoren des purinergen Metabolismus unabhängig von der bereits bekannten CD39/CD73-Hauptachse zu untersuchen.

Bezüglich den TNBC MDA-MB-231 wurde ebenfalls die kombinierte Expression aus NPP1 und CD73 verifiziert. Zusätzlich wurde jedoch die Expression des CD39-Subtyps festgestellt, weshalb diese Zelllinie sich nur bedingt zur *in-vitro*-Identifikation potenzieller NPP1-Inhibitoren eignet. Stattdessen erlaubt diese Zelllinie die Untersuchung einer möglichen Verknüpfung zwischen der EN-Expression und resistenzfördernden Mechanismen gegenüber dem indizierten Zytostatikum Doxorubicin. Derartiges wurde bereits hinsichtlich CD39 und CD73 auf Ovarialkarzinomzellen in der Literatur beschrieben (7,375).

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 10: Zusammenfassung der qPCR-Resultate zur EN-Expressionsanalyse der beiden Tumorzelllinien U87 und MDA-MB-231. Entsprechend der Expression der beiden HKG GAPDH und β -Aktin wurden der Cq-Bereiche von **20-30 = starke Expression**; **30-35 = mäßige Expression** und **>35 = keine Expression** definiert. Ausgewiesen sind lediglich die HKG und Proben der exprimierten EN.

| Gewebe | NPP1 | NT5E | NTPD3 | GAPDH | β -Aktin |
|------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| U87 | 30,88 \pm 0,42 | 28,52 \pm 0,53 | >35 | 26,56 \pm 0,35 | 27,77 \pm 0,48 |
| MDA-MB-231 | 31,97 \pm 0,45 | 29,55 \pm 0,41 | 33,04 \pm 0,50 | 24,51 \pm 0,45 | 27,75 \pm 0,73 |

5.2 Entwicklung des CE-Assays zur Testung potenzieller NPP1-Inhibitoren

Nach der Auswahl der geeigneten Zelllinie U87 aufgrund deren Expression der EN des alternativen Weges NPP1 und CD73 galt es ein passendes CE-Testsystem zu entwickeln, um das Potenzial der untersuchten Inhibitoren auf Purinmetabolismus zu analysieren.

Hierfür wurde zuerst eine adäquate Arbeitskonzentration ermittelt, um ein stabiles Readout zu gewährleisten. Zusätzlich diente dies der Einschätzung der EN-Aktivität, um die enzymatische Konversionsrate der EN zu bestimmen. Vor der eigentlichen Messung war jedoch die Aufnahme einer Mischung externer Purinstandards notwendig (Abb. 24), um eine ausreichende Trennleistung nachzuweisen, da diese in Folge der Alterung der verwendeten Quarzglaskapillare abnimmt.

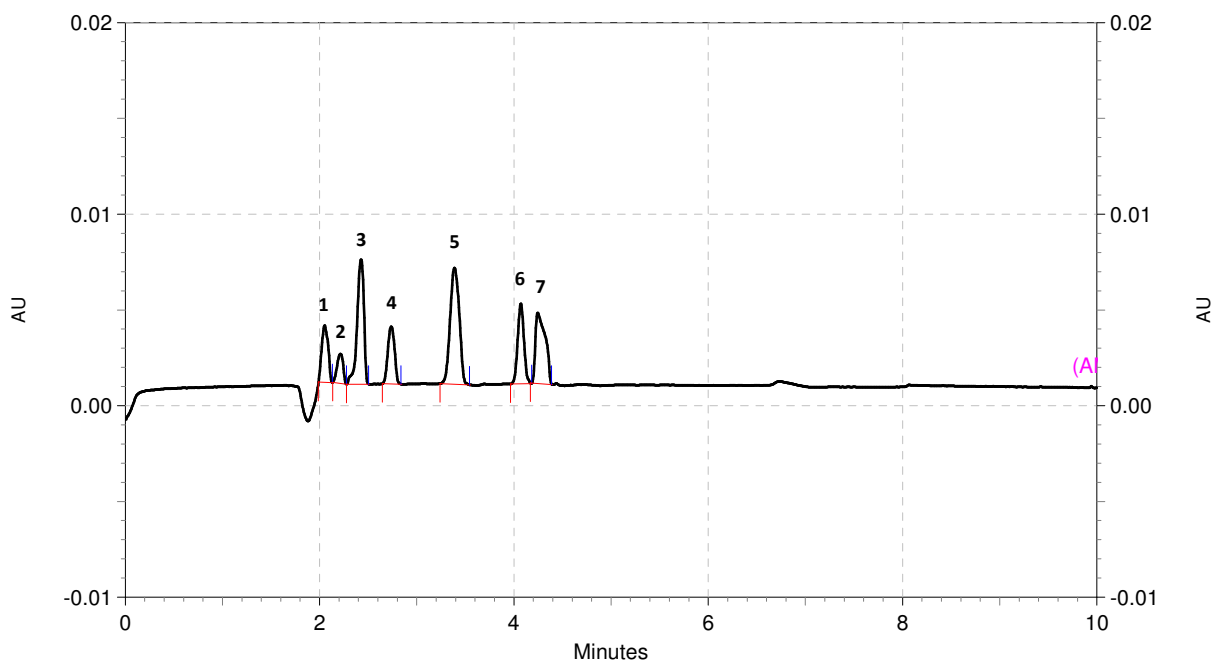


Abbildung 24: Das Elektropherogramm zur Identifizierung der enzymatischen Abbauprodukte zeigt das Substrat ATP und in Folge dessen seine Derivate, Intermediate und Endprodukte, gemessen durch CE. Die Verbindungen werden neben ihrer Funktion als externe Standards hinzugesetzt, um eine ausreichende Trennleistung sicherzustellen. 1 = Uridin (UDO) 50 μM , 2 = Inosin (INO) 50 μM , 3 = Adenosin (ADO) 100 μM , 4 = cAMP 50 μM , 5 = AMP 100 μM , 6 = ADP 50 μM , 7 = ATP 50 μM

Abbildung 24 zeigt die vollständige Auftrennung einer Mischung aller verwendeten externen Standards mit variierenden Konzentrationen. War die Auftrennung gewährleistet, konnte in der Folge mit der Vermessung der Überstände begonnen werden. Wurde keine adäquate Trennung der externen Standards festgestellt, musste die Kapillare getauscht und vor der eigentlichen Messung erneut konditioniert werden.

Ergebnisse und Diskussion

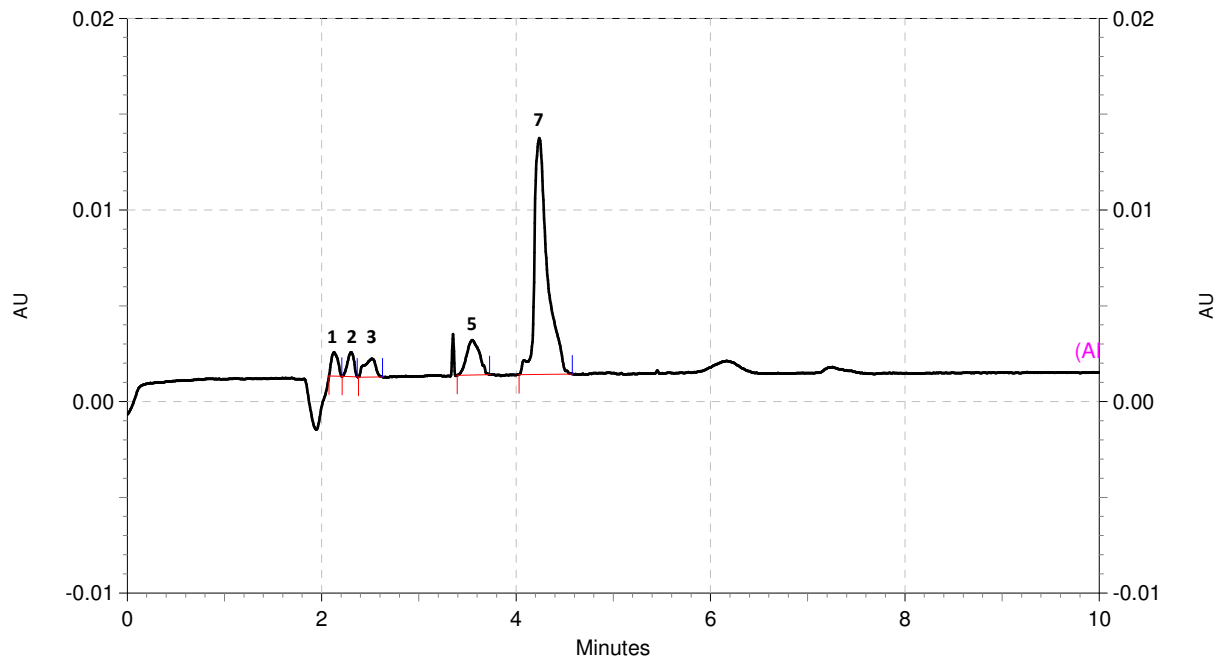


Abbildung 25: Das Elektropherogramm eines U87-Überstandes, der mit $300 \mu\text{M}$ ATP und $20 \mu\text{M}$ des ENT-Inhibitors DP behandelt wurde. Die Probe wurde nach einer dreistündigen Inkubation in Präsenz des internen Standards Uridin ohne eingesetzte Inhibitoren zur Hemmung der EN-Aktivität vermessen. 1 = Uridin, 2 = Inosin, 3 = Adenosin, 5 = AMP, 7 = ATP

Das Elektropherogramm aus Abbildung 25 zeigt die Messung eines U87-Überstandes ohne Einfluss der zu analysierenden Inhibitoren. Aus der Behandlung der U87-Zellen mit $300 \mu\text{M}$ ATP in Kombination mit $20 \mu\text{M}$ des ENT-Inhibitors DP resultieren in Folge der EN-Aktivität zunächst fünf Peaks inklusive des IS Uridin. Aus dem Verhältnis der Ladungszahl zur Molekülmasse ergibt sich die Migrationsreihenfolge des IS Uridin, gefolgt von zwei physikochemisch ähnlichen Produkten sowie zwei weiteren, die später detektiert werden. Da der letzte Peak eine wesentlich größere AUC als die vorangegangenen aufweist, liegt die Hypothese nahe, dass dieser das Substrat ATP repräsentiert. Diese Hypothese wurde durch die Analyse der Migrationsreihenfolge der externen Standards zusätzlich bestätigt. Folglich verteilen sich die weiteren Zuordnungen entsprechend der EN-Expression und Migrationsreihenfolge auf das Intermediat AMP, das Produkt ADO und ein weiteres, bei dem es sich mit Inosin sehr wahrscheinlich um ein weiteres Nukleosid aus der EN-Kaskade handelt. Zur eindeutigen Identifikation sowie der Zuordnung der Peaks zu Substrat, Intermediaten und Produkten des Purinmetabolismus sind jedoch weitere Maßnahmen nötig. Aus diesem Grund wurde in einem ersten Schritt der bekannte NPP1-Inhibitor PSB-POM-141 sowohl zur Identifikation von ATP als auch zur Bestimmung des maximalen intrinsischen Effekts der NPP1-Inhibition herangezogen.

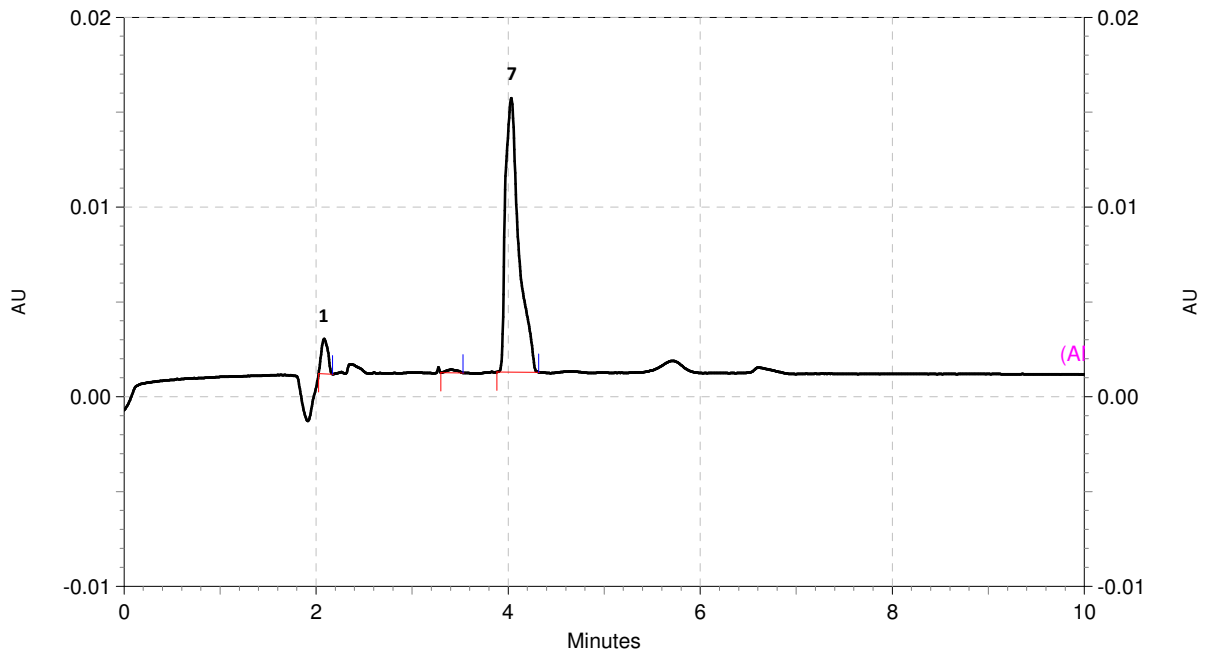


Abbildung 26: Das Elektropherogramm der Messung eines U87-Überstandes, der mit $300 \mu\text{M}$ ATP, $20 \mu\text{M}$ DP und $10 \mu\text{M}$ des NPP1-Inhibitors PSB-POM-141 behandelt wurde. Die Messung wurde drei Stunden nach der Inkubation mit ATP aufgenommen. 1 = Uridin, 7 = ATP

Aus der Behandlung der U87-Zellen mit PSB-POM-141 resultieren in dem aufgenommenen Elektropherogramm (Abb. 26) zwei Peaks mit einem Absorptionsmaximum $\lambda = 260 \text{ nm}$, die oberhalb des Hintergrundrauschens liegen. Dementsprechend repräsentieren die beiden AUC das Substrat ATP und den IS Uridin.

Des Weiteren galt es sicherzustellen, dass es sich bei Peak 2 in Abbildung 25 um ein Folgeprodukt des ADO aus der EN-Kaskade und nicht um ein anderes Nukleosid oder weitere Analoga aus intrazellulären Quellen handelt. Hierzu wurden die U87-Zellen neben dem ENT-Inhibitor DP und ATP mit dem synthetischen CD73-Inhibitor PSB-19316 behandelt (464).

Ergebnisse und Diskussion

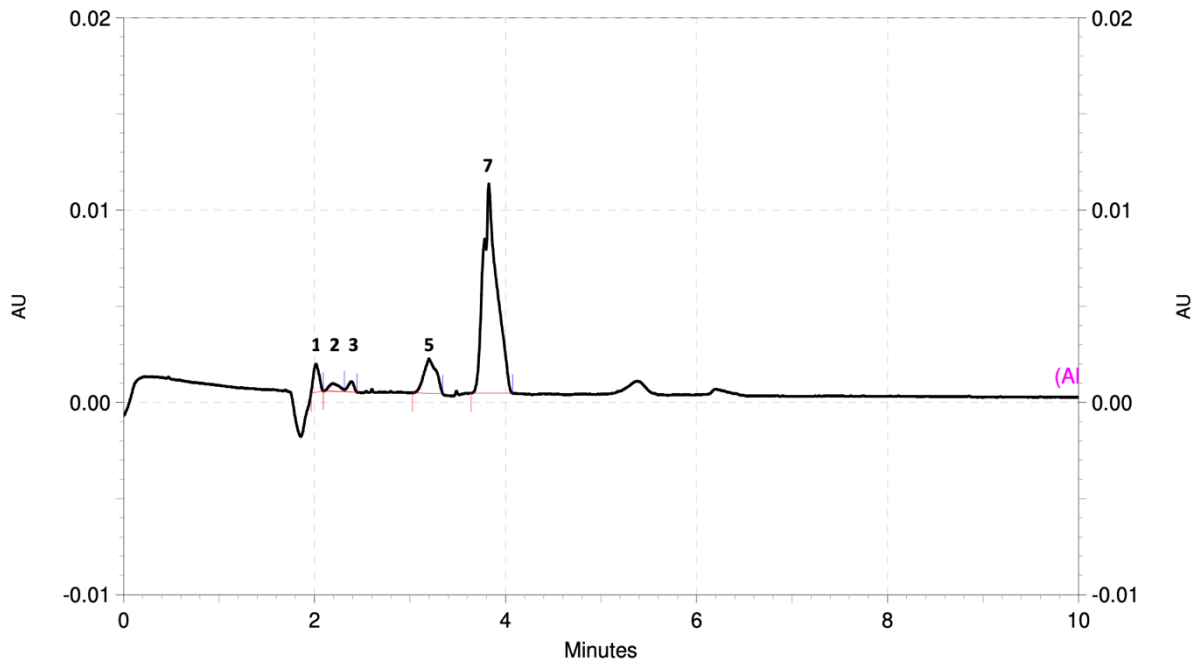


Abbildung 27: Das Elektropherogramm der Messung eines U87-Überstandes, der mit 300 μM ATP, 20 μM DP und 0,2 μM des CD73-Inhibitors PSB-19316 behandelt wurde. Die Messung wurde drei Stunden nach der Inkubation mit ATP aufgenommen. 1 = Uridin, 2 = Inosin, 3 = Adenosin, 5 = AMP, 7 = ATP

Das erhaltene Elektropherogramm aus der Behandlung des U87-Überstandes mit 0,2 μM PSB-19316 zeigt analog zum unbehandelten U87-Überstand (Abb. 25) die fünf bereits bekannten Peaks in derselben Migrationsreihenfolge. Jedoch ist die detektierte AUC der Peaks 2 und 3 wesentlich kleiner als in dem Elektropherogramm der Abbildung 25. Dieser Sachverhalt deutet auf eine partielle Inhibition der Aktivität der EN CD73 hin und beweist damit, dass es sich bei dem nicht zugeordneten Produkt um das Nukleosid Inosin handelt. Folglich galt es sicherzustellen, dass die Bildung von Inosin zu unterbinden ist, um ADO als Endpunkt der EN-Kaskade zu definieren.

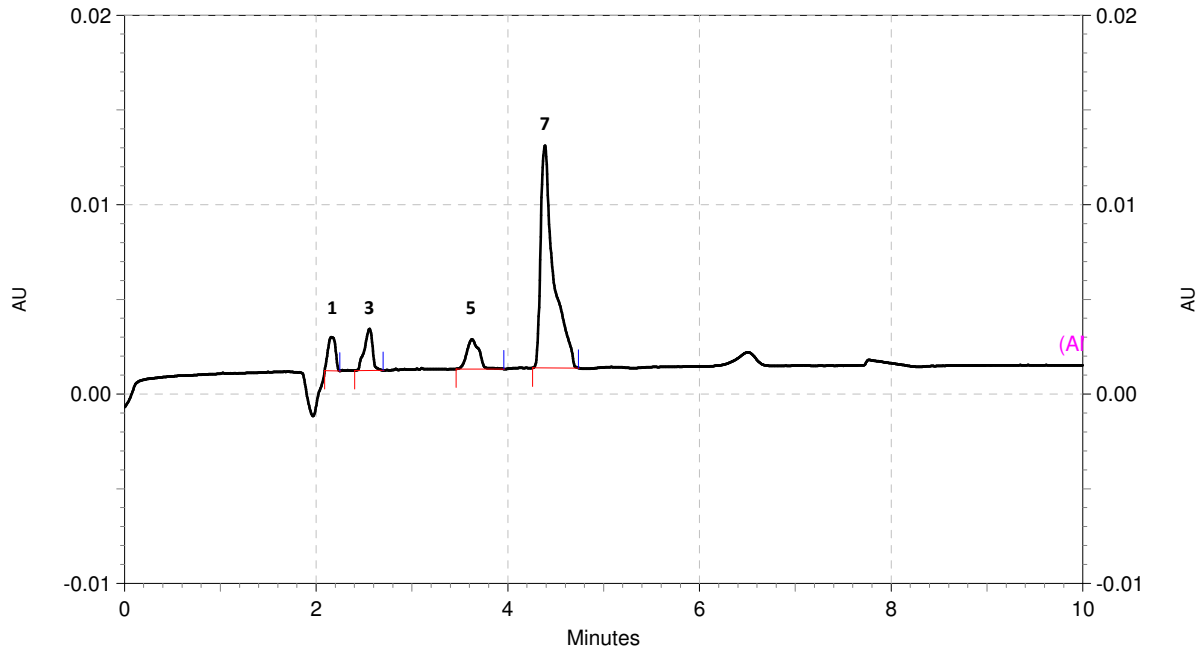


Abbildung 28: Das Elektropherogramm der Messung eines U87-Überstandes, der mit $300 \mu\text{M}$ ATP, $20 \mu\text{M}$ DP und $1 \mu\text{M}$ des ADA-Inhibitor EHNA behandelt wurde. Die Messung wurde drei Stunden nach der Inkubation mit ATP aufgenommen. 1 = Uridin, 3 = Adenosin, 5 = AMP, 7 = ATP

Die im Elektropherogramm der unbehandelten U87-Zellen gezeigte Menge an Inosin (Abb. 25) deutet auf eine Aktivität des Enzyms ADA hin, das extrazelluläres ADO in Inosin umwandelt. Um die Konzentration an Inosin resultierend aus der ADA-Aktivität auf den U87-Zellen zu eliminieren, wurden diese parallel zu DP mit dem ADA-Inhibitor EHNA in der Stärke $1 \mu\text{M}$ vorinkubiert. Der Nachweis der kombinierten Aktivität von abgeschwächter ADO-Aufnahme durch DP und gehemmter ADO-Umwandlung in Inosin mit EHNA spiegelt sich anhand einer adäquaten Nachweismenge des ADO bei simultanem Verschwinden jeglichen Inosins im Elektropherogramm wider.

Daraus ergibt sich ein Elektropherogramm mit vier detektierten AUC, die jeweils die Nucleoside Uridin und ADO sowie die beiden Nucleotide AMP und ATP repräsentieren. Anhand dieses Versuchsdesigns wurde die Eignung der U87-Zellen als *in-vitro*-Modell zur Potenzialanalyse geeigneter NPP1-Inhibitoren anhand der EN-Aktivität festgestellt. Bei ähnlicher EN-Expression ließe sich dieses funktionelle zellbiologische Modell auf weitere Tumorzelllinien übertragen.

von NPP1 angeordnet. Aufgrund des hohen Anteils an Guanin-Cytosin-Basenpaarungen zu Beginn der NPP1-Gensequenz wurden die Primer so konzipiert, dass sie sich strangabwärts erst an Codon 69 anlagern. Daraus resultiert eine im Vergleich zum wt um 204 bp kürzere Basensequenz der untersuchten Allele 1 und 2. Die Analyse der Aminosäuresequenz des zweiten Allels ergab eine Mutation in der Basensequenz. Eine Punktmutation der ersten Base (517 bp) des Codons 173 von Adenin zu Cytosin bewirkte nach der Translation einen Austausch der Aminosäure Lysin (K) zu Glutamin (G). Entsprechend dieser Position des betroffenen Codons der Basensequenz und des Einbuchstabencodes für Aminosäuren wird diese Mutation als K173Q (Lys173Gln) bezeichnet. Dabei handelt es sich um einen bereits in der Literatur beschriebenen Einzelnukleotid-Polymorphismus (ENP). Aufgrund der Tatsache, dass das Startcodon an Position 52 (156 bp) der Basensequenz liegt, wird die festgestellte Mutation basierend auf dem verkürzten Peptid-Transkript auch als K121Q bezeichnet.

Diese verringert die Enzymaktivität bis auf 66 % in Relation zum Wildtyp (465). Dagegen wurde das andere Allel als wt-Sequenz identifiziert, sodass die verminderte Aktivität der Genvariante nicht im vollen Umfang die Enzymfunktionalität beeinflussen kann. Innerhalb der fehlenden Sequenzen existieren keine weitere bekannten ENPs, womit eine adäquate Funktion des Enzyms über den Versuchszeitraum gewährleistet war.

5.4 CE-Analytik der Heparine und Derivate zur NPP1-Inhibition

5.4.1 Natürliche Sulfopolysaccharide

In vorigen Publikationen wurde gezeigt, dass einige Verbindungen aus der Klasse der anionischen Sulfopolysaccharide Potenzial zur Inhibition des isolierten NPP1-Enzyms aufweisen. Hosoda et al. wiesen die Inhibition der Enzymfunktion bereits 2001 auf Jurkat-T-Zellen nach. Aus der Gruppe der untersuchten GAG stachen unter anderem die Heparine hervor (402). Aufgrund dessen stellte sich die Frage, ob es sich hierbei um eine begrenzte Eigenschaft dieser Molekülgruppe oder eine inhärente Funktion der Substanzgruppe der Polysaccharide handelte. Zur Evaluation der NPP1-Inhibitoren wurde ein breites Spektrum natürlicher und synthetischer Substanzklassen herangezogen. Hierunter fielen neben Heparinen und dessen Derivaten auch aufgereinigte Polysaccharide aus verschiedenen Seealgenextrakten. Diese hochmolekularen negativ geladenen Makromoleküle wurden als Vertreter der Polysaccharide gewählt, um die These einer generellen Effektivität der Substanzklasse der Polysaccharide als NPP1-Inhibitoren zu überprüfen. Als wichtiges Kriterium wurde durch Lopez et al. ermittelt, dass verschiedene Seealgenextrakte zwar mehrere EN inhibieren, jedoch eine klare Präferenz zugunsten von NPP1 aufweisen (403).

Tabelle 11: Aufstellung der untersuchten Seealgenextrakte. Neben der Stammpflanze der Extrakte sind das molekulare Grundgerüst und die Molekularmasse angegeben. Die aufgeführten Daten sind der entsprechenden Publikation entnommen (403).

| Extrakt | Grundgerüst | Stammpflanze | Molekularmasse [kDa] |
|---------|--------------|---------------------------------------|-------------------------|
| 1 | Xylogalactan | <i>Delesseria</i> <i>Sanguinea</i> | 214 ± 28 |
| 2 | Fucoidan | <i>Fucus</i> <i>Vesiculosus</i> | 38 ± 1 |

Hierzu wurden zwei sulfatierte Polysaccharide aus verschiedenen Algenarten gewonnen und als Inhibitoren der EN auf den U87-Zellen untersucht. Die extrahierte Verbindung 1 repräsentiert die Gruppe der sulfatierten Xylogalactane und entstammt der Rotalge *Delesseria sanguinea*. Dagegen handelt es sich bei der Substanz 2 um ein Fucoidan der Braunalge *Fucus vesiculosus*. In Tabelle 12 sind Informationen zur glykosidischen Zusammensetzung der extrahierten Verbindungen aufgeführt.

Tabelle 12: Glykosidische Zusammensetzung der untersuchten Seealgenextrakte. Die Zusammensetzung wurde nach der Methode von Blakeney bestimmt. Die aufgeführten Daten sind der entsprechenden Publikation entnommen (403).

| Extrakt | Grundgerüst | Fucose | Galactose | Xylose | Mannose | Glukose | Rhamnose |
|---------|--------------|--------|-----------|--------|---------|---------|----------|
| | | [mol%] | [mol%] | [mol%] | [mol%] | [mol%] | [mol%] |
| 1 | Xylogalactan | 0,0 | 75,3 | 16,1 | 2,5 | 6,1 | 0,0 |
| 2 | Fucoidan | 83,1 | 7,3 | 6,5 | 2,0 | 0,4 | 0,7 |

Neben den jeweils hohen molaren Massenanteilen der repräsentativen determinierenden Hexosen Galactose von 75,3 % bei Substanz 1 und Fucose mit 83,1 % bei Substanz 2 enthält letztere Verbindung zusätzlich einen Anteil von 7,3 % an Galactose. Additiv wurden in beiden Verbindungen die Pentose Xylose mit molaren Massenanteilen zwischen 6,5 – 16,1 % sowie die weiteren Hexosen Mannose, Glukose und Rhamnose nachgewiesen. Hierunter ist lediglich der unterschiedliche Massenanteil der Hexose Glucose auffällig, der bei Verbindung 1 mit 6,1 % deutlich oberhalb der 0,7 % von Verbindung 2 liegt. Mannose und Rhamnose weisen bezüglich des Massenanteils kaum Unterschiede auf. Der Tabelle 13 können weitere Informationen zu den chemischen Charakteristika der beiden Polysaccharide wie dem durchschnittlichen Sulfatierungsgrad der Monosaccharide, dem Restproteingehalt und dem Gehalt der Uronsäuren innerhalb der Polysaccharidstruktur entnommen werden.

Tabelle 13: Die Grundcharakteristika der analysierten sulfatierten Polysaccharide. Dabei ist die durchschnittliche Anzahl der Sulfatgruppen je Disaccharid bezogen auf den Gesamtglykangehalt angegeben. Ebenfalls aufgeführt sind der molare Massenanteil an Restprotein sowie der molare Massenanteil der Uronsäuren an der Gesamtstruktur. Die aufgeführten Daten sind der entsprechenden Publikation entnommen (403).

| Extrakt | Molekularmasse | Sulfatierungsgrad | Proteingehalt | Uronsäuren |
|---------|----------------|-------------------|---------------|-------------|
| | [kDa] | | [mol %] | [mol %] |
| 1 | 214 ± 28 | 0,65 ± 0,02 | 7,24 ± 0,07 | 3,96 ± 0,54 |
| 2 | 38 ± 1 | 0,59 ± 0,01 | 7,07 ± 1,59 | 0,27 ± 0,27 |

Hierbei zeigt sich, dass sich die beiden Verbindungen in Bezug auf ihre Molekularmasse deutlich unterscheiden. So beläuft sich der Unterschied in der Molekularmasse der Substanzen 1 und 2 mit 214 kDa und 38 kDa um einen Faktor ~ 6. In Bezug auf die Zusammensetzung und Ladungsbilanz sind sich die beiden Polysaccharide strukturell ähnlicher, denn der durchschnittliche Sulfatierungsgrad liegt bei den Verbindungen in einem Bereich zwischen 0,59 – 0,65 je Monosaccharid. Der verbliebene molare Massenanteil an Protein beträgt 7,07 – 7,24 %. Kleinere Unterschiede stellen sich in Form des molaren Massenanteils der

Ergebnisse und Diskussion

Uronsäuren heraus. Diese bringen unter physiologischen pH-Konditionen durch Deprotonierung eine weitere negative Ladung ein. Hierbei liegt der molare Massenanteil der Substanz 1 bei 3,96 %. Dahingegen weist Substanz 2 mit 0,27 % unter Berücksichtigung der Schwankungsbreite einen molaren Massenanteil von 0 auf.

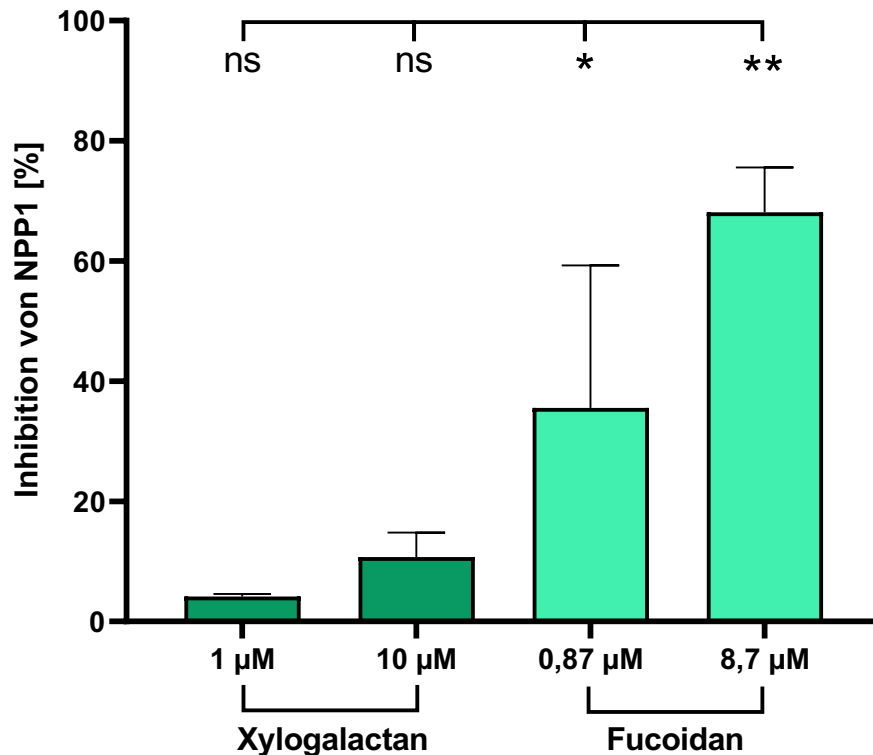


Abbildung 30: Graphische Darstellung der Resultate der getesteten Seetalgenverbindungen. Die Inhibition der NPP1-Enzymaktivität ist als relativer Prozentwert angegeben, dessen Berechnung analog der Formel 8 erfolgt. Die beiden Verbindungen wurden in jeweils zwei Konzentrationen getestet, um eine potenzielle Dosisabhängigkeit des Effektes zu ermitteln. Die dargestellten Daten entsprechen den Mittelwerten \pm SEM aus $N=3$ Versuchen für das Xylogalactan und $N=2$ Versuchen für das Fucoidan. Die Signifikanz wurde mittels einer One-Way-ANOVA und Dunnett Post-hoc Test analysiert. ns: nicht signifikant; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$ (403)

Beide eingesetzten extrahierten Algenverbindungen zeigten einen Effekt auf die Aktivität der EN NPP1. Diese wurden in jeweils zwei unterschiedlichen Konzentrationen getestet, um eine mögliche Konzentrationsabhängigkeit des Effektes zu demonstrieren. Das Xylogalactan wurde hierbei in den beiden Konzentrationen 1 µM und 10 µM getestet. Bei dem Einsatz von 1 µM resultierte eine NPP1-Inhibition von 4,12 %. Eine Erhöhung auf 10 µM Xylogalactan ließ die Inhibition auf 10,71 % ansteigen. Der Vertreter der Fucoidane wurde ebenfalls in den zwei Konzentrationen 0,87 µM und 8,7 µM evaluiert. Hierbei konnte der Effekt als Inhibitor im Vergleich zum Xylogalactan deutlich gesteigert werden. Bei dem Einsatz von 0,87 µM Fucoidan fiel die partielle Inhibition mit 35,55 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

bereits signifikant aus. Diese steigerte sich nach der Verzehnfachung der eingesetzten Menge mit 68,08 % intrinsischer Aktivität deutlich.

Auffällig ist, dass die kleinere der beiden betrachteten Algenverbindungen ein wesentlich höheres inhibitorisches Potenzial an NPP1 aufwies. Da an dieser Stelle jedoch nur zwei Verbindungen betrachtet wurden, galt es diese Tendenz mit der Analyse weiterer Verbindungen variabler Kettenlänge zu untersuchen. Ebenfalls kann aus dem Versuchsansatz nicht unmittelbar abgeleitet werden, ob die Größe das einzige ausschlaggebende Kriterium für das inhibitorische Potenzial ist, sondern diese Eigenschaft durch weitere chemische Parameter bestimmt wird. Weitere Einflussfaktoren könnten ebenso die Abfolge und Zusammensetzung der Saccharidstruktur sowie deren Substitution mit negativ geladenen funktionellen Gruppen sein.

Tabelle 14: Tabellarische Zusammenfassung der Resultate aus den Untersuchungen der extrahierten sulfatierten Polysaccharide aus Rot- und Braunalgen zur NPP1-Aktivität auf U87-Zellen. Angegeben sind die getesteten Konzentrationen und gemittelten Messwerte mitsamt des zugehörigen SEM.

| Verbindung | Konzentration [μM] | Inhibition \pm SEM [%] |
|--------------|---------------------------------|--------------------------|
| Xylogalactan | 1 | 4,14 \pm 0,31 |
| | 10 | 10,71 \pm 2,89 |
| Fucoidan | 0,87 | 35,55 \pm 16,77 |
| | 8,7 | 68,08 \pm 5,28 |

Neben den Algenextrakten wurde das natürliche Struktur analogon der Heparine Chondroitinsulfat hinsichtlich dessen inhibitorischer Kapazität auf die NPP1-Enzymaktivität untersucht. Bei Chondroitinsulfat handelt es sich ebenfalls um eine natürliche Verbindung, die einen wichtigen Bestandteil des Knorpelgewebes darstellt.

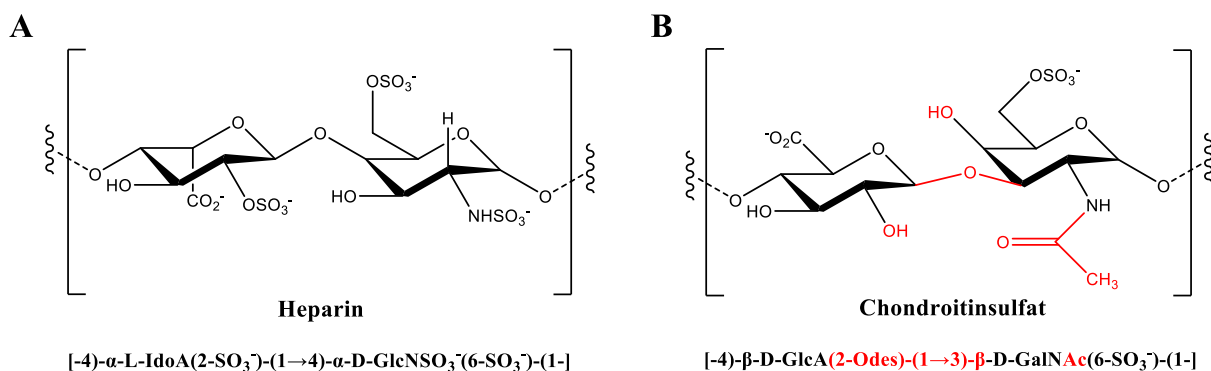


Abbildung 31: Graphische Darstellung des charakteristischen Disaccharid-Bausteins der Heparine (A). Im Vergleich dazu besitzt Chondroitinsulfat eine leicht veränderte Grundstruktur, da die beiden Monomere D-GlcA und D-GalNAc β -1,3-glykosidisch verknüpft sind (B).

Ergebnisse und Diskussion

Im Gegensatz zum Xylogalactan und Fucoidan aus den Seealgen weist diese Verbindung eine deutlich geringere Varietät in der Zusammensetzung der Saccharidstruktur auf. Als Vertreter der GAG besteht die Grundstruktur aus einer alternierenden Reihenfolge des Saccharids N-Acetylgalactosamin (D-GalNAc), das mit der Uronsäure D-GlcA über β -1,4 und umgekehrt durch β -1,3-glykosidische Bindung verknüpft ist. Dementsprechend handelt es sich um ein Struktur analogon der Heparine. Aufgrund der N-Acetylierung der Galactose und der nicht sulfatierten Uronsäure ist der Sulfatierungsgrad mit 0,8 leicht höher als der der Seealgenextrakte, aber deutlich unterhalb der Heparine (Tab. 16).

Die aufgewendeten Mengen Chondroitinsulfat zur NPP1-Hemmung wurden ebenfalls wie die betrachteten Algenverbindungen als Stoffmengenkonzentration ausgewiesen. Zur Bestimmung einer potenziellen Korrelation zwischen Konzentration und Inhibition der Enzymaktivität wurde die natürliche vorkommende Verbindung in drei Konzentrationen in einem Bereich von 10 – 50 μ M betrachtet.

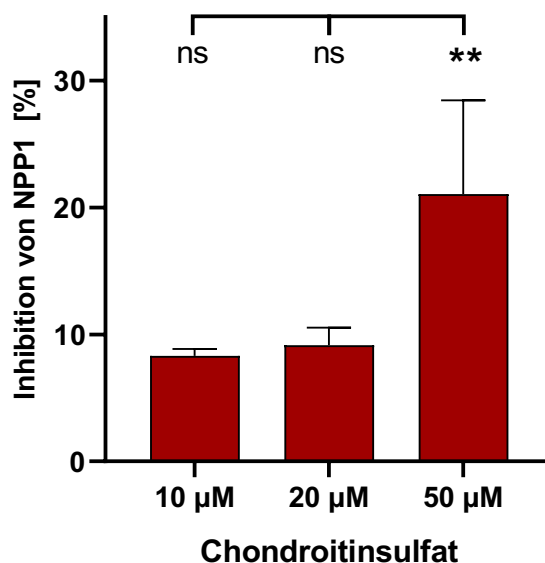


Abbildung 32: Graphische Darstellung der Resultate des natürlichen Struktur analogons der Heparine Chondroitinsulfat. Die Inhibition der NPP1-Enzymaktivität ist als relativer Prozentwert angegeben, dessen Berechnung analog der Formel 8 erfolgt. Die drei Verbindungen wurden in jeweils drei Konzentrationen getestet, um eine potenzielle Dosisabhängigkeit des Effektes zu ermitteln. Die dargestellten Daten entsprechen den Mittelwerten \pm SEM aus N=3 Versuchen. Die Signifikanz wurde mittels einer One-Way-ANOVA und Dunnett Post-hoc Tests analysiert. ns: nicht signifikant; **: $p < 0,01$

Abbildung 32 enthält die Resultate der Testung von Chondroitinsulfat als NPP1-Inhibitor anhand der *in-vitro*-Modellierung von U87-Zellen. Hierbei wiesen alle aufgewendeten Substanzmengen regulatorische Eigenschaften in Bezug auf die Enzymfunktion von NPP1 auf. Insgesamt betrug die festgestellte Inhibition zwischen 8 – 21 %. Die beiden niedrigeren

Dosierungen von 10 μM und 20 μM bewirkten eine Reduktion der Enzymaktivität von 8,32 % sowie 9,15 %. Unter Einsatz von 50 μM Chondroitinsulfat wurde die Beschränkung der NPP1-Funktion dahingegen leicht auf 21,06 % erhöht. Aufgrund dessen könnte ein Zusammenhang zwischen der Molarität und der Potenz des Inhibitors bestehen, auch wenn für eine eindeutige Aussage weitere Daten erforderlich sind. Insgesamt bleibt die Kapazität zur Inhibition der EN NPP1 deutlich hinter dem Fucoidan zurück und bewegt sich etwa in dem Bereich des wesentlich größeren Xylogalactans.

Tabelle 15: Tabellarische Zusammenfassung der Resultate der Untersuchungen des natürlichen Strukturanalogs der heparine Chondroitinsulfat zur NPP1-Aktivität auf U87-Zellen. Angegeben sind die getesteten Konzentrationen und gemittelten Messwerte mitsamt des zugehörigen SEM.

| Bezeichnung | Konzentration [μM] | Inhibition \pm SEM [%] |
|-------------------|---------------------------------|--------------------------|
| Chondroitinsulfat | 10 | 8,32 \pm 0,56 |
| | 20 | 9,15 \pm 2,40 |
| | 50 | 21,06 \pm 7,39 |

5.4.2 Testung der kommerziellen Heparine

Auf Basis der genannten Erkenntnisse, dass die natürlichen sulfatierten Polysaccharide eine Hemmwirkung auf die EN-Enzymkaskade bewirken können, sollte nun untersucht werden, inwieweit dies auch für die therapeutisch relevanten Heparine als Vertreter der Glykosaminoglykane zutreffend ist. Hierfür wurden die angegebenen kommerziellen Heparine UFH, die beiden LMWH-Produkte Tinzaparin und Enoxaparin sowie das aus Heparin abgeleitete vollsynthetische Pentasaccharid Fondaparinux ausgewählt.

Tabelle 16: Angegeben sind die chemischen Charakteristika der drei kommerziell verwendeten Heparine und des synthetischen Pentasaccharids Fondaparinux. Dabei ist neben der Molekularmasse einer Polysaccharidkette ebenfalls deren ungefähre Länge sowie der durchschnittliche Sulfatierungsgrad je repetitiver Disaccharideinheit angegeben. Aufgrund der definierten Struktur ist für Fondaparinux die Anzahl aller Sulfatgruppen ausgewiesen. Die aufgeführten Daten sind der entsprechenden Publikation entnommen (466).

| Molekülbezeichnung | Molekularmasse [kDa] | Kettenlänge | Sulfatierungsgrad |
|--------------------|-------------------------|-------------|-------------------|
| UFH | 12 – 16 | 25 – 40 | 2,7 |
| Tinzaparin | 6,5 | \pm 23 | 2,5 |
| Enoxaparin | 4,5 | 14 – 16 | 2,3 |
| Fondaparinux | 1,728 | 5 | 8 bzw 3,2 |

Ergebnisse und Diskussion

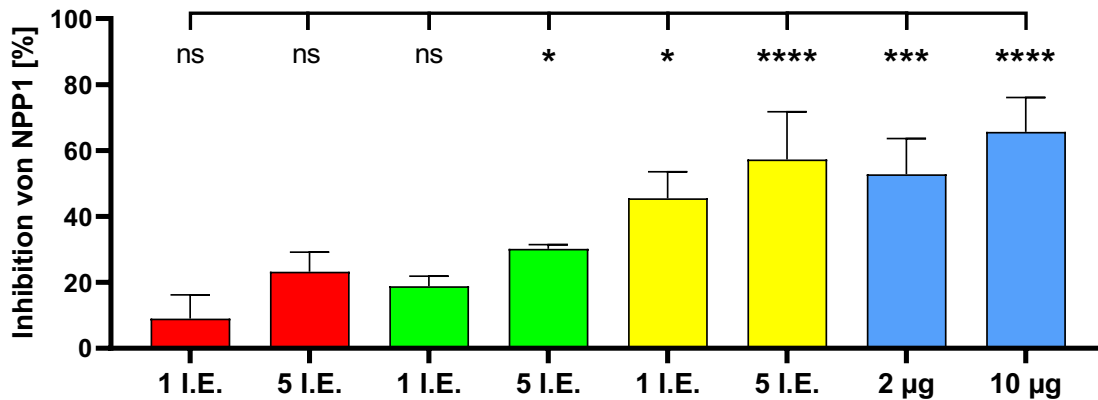
Heparine unterscheiden sich vor allem durch ihre in 2.1.2 beschriebene durchschnittliche Molekularmasse und Kettenlänge. Insbesondere bei UFH mit seiner sehr variierenden Kettenlängen und hohen Dispersität kann laut Herstellerinformationen keine genaue Angabe hinsichtlich einer exakten Molekularmasse gemacht werden. Dahingegen sind in Bezug auf das Sulfatierungsmuster der Glykosaminoglykanstruktur genauere Aussagen möglich. UFH und die beiden LMWH Tinzaparin und Enoxaparin weisen einen durchschnittlichen Sulfatierungsgrad von 2,3 – 2,7 je repetitiver Disaccharideinheit bestehend aus D-Glucosamin und einer Uronsäure auf. Im Gegensatz dazu besitzt das Pentasaccharid Fondaparinux mit insgesamt acht Sulfatgruppen einen höheren Sulfatierungsgrad von 3,2.

Tabelle 17: Aufgeführt sind die Konzentrationen der getesteten, kommerziell verfügbaren Heparine sowie das abgeleitete Pentasaccharid Fondaparinux. Aufgrund der Tatsache, dass die Heparine Gemische mit heterogenen Kettenlängen sind, werden diese in Internationalen Einheiten dosiert. Da dies jedoch bei Fondaparinux mit seiner synthetischen, definierten Struktur nicht möglich ist, rechnet man die Therapeutischen Einheiten zur besseren Vergleichbarkeit in Massenkonzentration und molare Konzentration um. Die Substanzen wurden in den jeweils zwei angegebenen Konzentrationen getestet. Die aufgeführten Daten sind der entsprechenden Publikation entnommen (466).

| Einheit | UFH | | Tinzaparin | | Enoxaparin | | Fondaparinux | |
|--------------------------------|--------|--------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-------------|
| | 1 I.E. | 5 I.E. | 1 I.E. | 5 I.E. | 1 I.E. | 5 I.E. | / | / |
| Internationale Einheiten je ml | 1 I.E. | 5 I.E. | 1 I.E. | 5 I.E. | 1 I.E. | 5 I.E. | / | / |
| Massenkonzentration je ml | / | / | 12,06 µg | 60,31 µg | 10,00 µg | 50,00 µg | 2,00 µg | 10,00 µg |
| Molare Konzentration | / | / | 1,856 µM | 9,279 µM | 2,222 µM | 11,11 µM | 1,158 µM | 5,790 µM |

Durch die strukturelle Variabilität musste zur Quantifizierung des potenziellen Effektes der Heparine auf die NPP1-Aktivität sowie zur besseren Vergleichbarkeit der Substanzen untereinander auf andere Faktoren zurückgegriffen werden. Daher wurden die getesteten Konzentrationen mit den klinisch relevanten Konzentrationen in Korrelation gesetzt, die für Heparine als I.E. definiert werden. Zur Verwendung einer vergleichbaren Skala fiel die Wahl auf eine mittlere therapeutische Konzentration sowie eine höhere, die leicht über den therapeutischen Dosierungen liegt. Diese betragen jeweils 1 I.E./ml und 5 I.E./ml für UFH, Tinzaparin und Enoxaparin sowie 2 µg/ml und 10 µg/ml für Fondaparinux. Da für die LMWH neben den therapeutisch aktiven I.E. eine mittlere molare Masse der Molekülketten seitens des Herstellers angegeben ist, können hieraus zur Vergleichbarkeit mit Fondaparinux sowohl die Massenkonzentration je Milliliter als auch die molare Konzentration abgeleitet werden.

Aufgrund der Tatsache, dass zwei unterschiedliche Konzentrationen bezüglich der eingesetzten Heparine angegeben wurden, sind diese zur besseren Vergleichbarkeit, sofern möglich, in die jeweilige Massenkonzentration und molare Konzentration umgerechnet worden. Bezogen auf die Massenkonzentration wurden die beiden LMWH mit 12,06 µg/ml und 60,31 µg/ml für Tinzaparin sowie 10 µg/ml und 50 µg/ml für Enoxaparin in einer ähnlichen Größenordnung eingesetzt. Die Massenkonzentration des Pentasaccharids Fondaparinux liegt mit einer Größenordnung um den Faktor 5 niedriger. Rechnet man die Massenkonzentration anhand der gegebenen Daten aus Tabelle 17 in die molare Konzentration um, ergeben sich geringere Größenunterschiede in den angewendeten Konzentrationsfenstern. Die molaren Konzentrationen des LMWH Tinzaparin betragen 1,856 µM und 9,279 µM sowie 2,222 µM und 11,11 µM für Enoxaparin. Fondaparinux liegt in dieser molaren Konzentrationseinheit mit 1,158 µM bzw. 5,79 µM um den Faktor 2 darunter.



| Einheit | UFH | | Tinzaparin | | Enoxaparin | | Fondaparinux | |
|---------|-----|---|------------|-------|------------|-------|--------------|-------|
| I.E./ml | 1 | 5 | 1 | 5 | 1 | 5 | / | / |
| µg/ml | / | / | 12,06 | 60,31 | 10,00 | 50,00 | 2,00 | 10,00 |
| µM | / | / | 1,856 | 9,279 | 2,222 | 11,11 | 1,158 | 5,790 |

Abbildung 33: Graphische Darstellung der Resultate der getesteten kommerziellen Heparine und des Pentasaccharids Fondaparinux. Die Inhibition der NPP1-Enzymaktivität ist als relativer Prozentwert angegeben, dessen Berechnung analog der Formel 8 erfolgt. Die beiden Verbindungen wurden in jeweils zwei Konzentrationen getestet, um eine potenzielle Dosisabhängigkeit des Effektes zu ermitteln. Die dargestellten Daten entsprechen den Mittelwerten \pm SEM aus N=3 Versuchen. Die Signifikanz wurde mittels einer One-Way-ANOVA und Dunnett Post-hoc Tests analysiert. ns: nicht signifikant; *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$ (466).

In der durchgeführten Versuchsreihe unterdrückten alle untersuchten Heparine und das Pentasaccharid Fondaparinux in U87-Glioblastomzellen die Bildung des ADO aus ATP konzentrationsabhängig und in unterschiedlichem Ausmaß.

Ergebnisse und Diskussion

So hemmten UFH und das LMWH Tinzaparin die ADO-Bildung in einem Bereich von 10 – 30 %. Bezogen auf die therapeutisch aktiven Konzentrationen inhibieren UFH und Tinzaparin die ADO-bildung jeweils um 9,05 % und 18,85 % bei 1 I.E./ml. Die höhere Konzentration von 5 I.E./ml vermag die NPP1-Enzymaktivität stärker zu inhibieren, was sich bei UFH in einer um 23,54 % reduzierten ADO-Bildung und 30,18 % durch Tinzaparin manifestiert.

Deutlich stärker hemmen das LMWH Enoxaparin sowie das Pentasaccharid Fondaparinux. Hierbei wird bereits mit der geringeren Konzentration von 1 I.E./ml Enoxaparin und 2 µg/ml Fondaparinux eine Inhibition > 40 % erzielt. Für 1 I.E./ml Enoxaparin wurde eine Hemmung der ADO-Bildung von 45,54 % und für 2 µg/ml Fondaparinux 52,76 % ermittelt. Diese ließ sich dosisabhängig bei eingesetzten 5 I.E./ml Enoxaparin und 10 µg/ml Fondaparinux auf 56,99 % bzw 65,63 % steigern. Für die jeweils höher dosierte Behandlung der LMWH Tinzaparin und Enoxaparin fallen die Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle signifikant aus. Bezüglich des Pentasaccharids Fondaparinux konnte bei beiden eingesetzten Konzentrationen ein signifikanter Unterschied ermittelt werden.

Betrachtet man die gemessenen Effekte der kommerziellen Heparine und Fondaparinux untereinander, ergibt sich ähnlich den Seealgenextrakten eine Tendenz, wonach die kleineren Molekülstrukturen die Enzymaktivität stärker reduzieren als die größeren. So zeigen die beiden LMWH eine stärkere Inhibition von NPP1 als das langkettigere, hochdisperse UFH. Auch im Vergleich der beiden LMWH untereinander erwies sich das kürzere Enoxaparin potenter als das etwas längere Tinzaparin. Insbesondere das kurzkettige und strukturell klar definierte Pentasaccharid Fondaparinux erzielte bei einer aufgewendeten molaren Konzentration von 5,79 µM mit 65,63 % den Spitzenwert unter den kommerziellen Heparinen. Des Weiteren wurde im untersuchten Konzentrationsbereich eine Korrelation zwischen Konzentration und Inhibition festgestellt, da die höhere Konzentration einen stärkeren Effekt erzielte.

Im Verhältnis zum natürlichen Strukturanalogon Chondroitinsulfat fällt auf, dass die Heparine bei geringeren Konzentrationen die NPP1-Aktivität stärker unterbinden. Eine ähnlich deutliche Diskrepanz wurde ebenfalls bei den analysierten Seealgenextrakten ermittelt, die neben der Größe auch Unterschiede in der Zusammensetzung der Molekülstruktur aufwiesen. Somit wird das Potenzial zur NPP1-Inhibition nicht allein durch die Größe des Moleküls, sondern auch durch weitere Parameter wie der Saccharidstruktur und deren Substitution determiniert.

Tabelle 18: Tabellarische Zusammenfassung der Resultate der Untersuchungen der kommerziellen Heparinderivate und des synthetischen Pentasaccharids Fondaparinux mit therapeutischer Relevanz zur NPP1-Aktivität auf U87-Zellen. Angegeben sind die getesteten Konzentrationen und gemittelten Messwerte mitsamt des zugehörigen SEM.

| Verbindung | Konzentration | Inhibition \pm SEM [%] |
|--------------|---------------|--------------------------|
| UFH | 1 I.E./ml | 9,05 \pm 7,12 |
| | 5 I.E./ml | 23,54 \pm 5,94 |
| Tinzaparin | 1 I.E./ml | 18,85 \pm 2,99 |
| | 5 I.E./ml | 30,18 \pm 1,30 |
| Enoxaparin | 1 I.E./ml | 45,54 \pm 5,72 |
| | 5 I.E./ml | 56,99 \pm 14,73 |
| Fondaparinux | 2 μ g/ml | 52,76 \pm 10,86 |
| | 10 μ g/ml | 65,63 \pm 10,43 |

5.4.3 Chemisch modifizierte Heparinderivate und Analoga

Neben den kommerziellen antikoagulatorischen Heparinen wurde mittels chemisch modifizierter Derivate untersucht, inwieweit Einsichten in strukturelle Zusammenhänge der NPP1-Inhibition gewonnen werden. Des Weiteren sollte eine mögliche Kohärenz zwischen intrinsischer Aktivität als Antikoagulans und der NPP1-Blockade evaluiert werden. Hierzu wurden chemisch modifizierte Derivate sowie chemisch verwandte Strukturen eingesetzt, deren antikoagulatorische Eigenschaften stark herabgesetzt wurden, oder deren inhärente antikoagulatorische Eigenschaft komplett eliminiert wurde. Diese wurden entsprechend der chemischen Methoden aus Abschnitt 2.1.2 erstellt. Die Strukturformeln der chemisch modifizierten Heparine sind in Abbildung 34 aufgeführt.

Ergebnisse und Diskussion

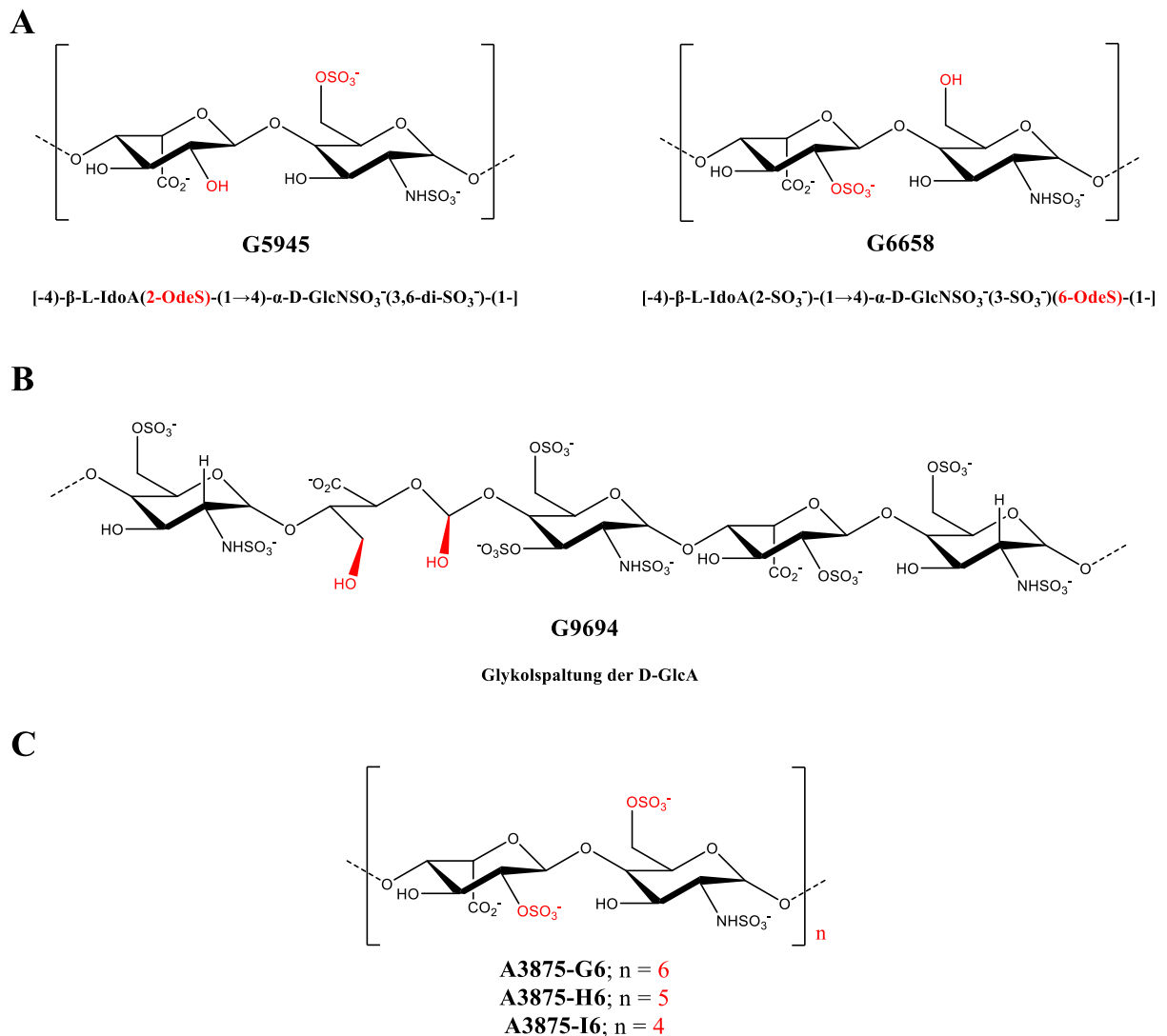


Abbildung 34: Graphische Darstellung der Strukturen der chemisch modifizierten Heparine, der isolierten Dalteparinderivate und Chondroitinsulfat in Form der charakteristischen Disaccharideinheiten. Bei G5945 und G6658 (beide A) handelt es sich um jeweils an den Positionen C2 der L-IdoA und C6 des D-GlcN desulfatierte Derivate. G9694 wurde oxidativ an der D-GlcA gespalten (B). Die isolierten Molekülketten der Dalteparinfraktion unterscheiden sich in Bezug auf ihre Kettenlänge (C).

Diese Derivate weisen chemische Modifikationen in Form von Desulfatierungen der Pyranosen an den Kohlenstoffatomen C2 L-IdoA (G5945) oder C6 des D-GlcN (G6658) auf, sodass anstatt der endständigen Sulfatfunktion ein primärer Alkohol vorliegt. Hierbei gilt es zu beachten, dass es sich um partielle Desulfatierungen handelt. Die 2-O-Desulfatierung in der Verbindung G5945 ist zu 100 % und die 6-O-Desulfatierung der Verbindung G6658 zu 85 % vervollständigt. Im RO-Heparin G9694 wurde durch eine konsekutive Oxidation und Reduktion der Ring einer Uronsäure geöffnet und die resultierenden endständigen Aldehydfunktionen zu primären Alkoholen reduziert. Bezüglich des Sulfatierungsgrades sind zwischen G5945 und G6658 nur leichte Unterschiede festzustellen. Dieser liegt aufgrund der partiellen Desulfatierung mit 1,1 und 0,7 jedoch deutlich unterhalb der Sulfatierung der

kommerziellen Heparine und Fondaparinux. Das RO-Heparin G9694 ist mit durchschnittlichen 2,2 Sulfatgruppen je Disaccharid im Bereich der natürlichen Heparine angesiedelt.

Neben den chemisch modifizierten Heparinen zur Reduktion der antikoagulatorischen Eigenschaften wurde ebenfalls der Aspekt der Kettenlänge in Bezug auf die NPP1-Inhibition betrachtet, da das kurzkettige Pentasaccharid Fondaparinux unter den kommerziellen Heparinen die größte Effektivität aufwies. Zur weiteren Analyse dieser Tendenz wurden aufgereinigte Fraktionen des LMWH Dalteparin untersucht, die bezüglich ihrer Kettenlänge variieren. Die repräsentativen Fraktionen sind unter der gemeinsamen Bezeichnung A3875 deklariert und liegen in Form eines Dodecasaccharids (G6), eines Decasaccharids (H6) und eines Octasaccharids (I6) vor. Der Sulfatierungsgrad entspricht mit 2,6 Sulfatgruppen je Disaccharid in etwa dem der kommerziellen Heparine und liegt um den Faktor 0,6 unterhalb von Fondaparinux. Weitere Daten sind in der zugehörigen Tabelle 19 zusammengefasst.

Tabelle 19: Tabellarische Übersicht einiger Daten der chemisch modifizierten Heparinderivate. Diese wurden entweder durch Desulfatierung, einer Kombination aus Oxidation und Reduktion oder Fraktionierung und Aufreinigung gewonnen. Die aufgeführten Daten sind der entsprechenden Publikation entnommen (466).

| Bezeichnung | Molekularmasse [kDa] | Struktur Modifikation | Sulfatierungsgrad |
|-------------|-------------------------|----------------------------------|-------------------|
| G5945 | 16,6 | 2-O-Desulfatierung der D-GlcA | 1,1 |
| G6658 | 15,4 | 6-O-Desulfatierung des D-GlcN | 0,7 |
| G9694 | 16,6 | RO-Heparin (Uronsäure) | 2,2 |
| A3875-G6 | 3,6 | Dodecasaccharid (Dalteparin) | 2,6 |
| A3875-H6 | 3,0 | Decasaccharid (Dalteparin) | 2,6 |
| A3875-I6 | 2,4 | Octasaccharid (Dalteparin) | 2,7 |

Zur besseren Vergleichbarkeit der derivatisierten Verbindungen untereinander sowie der Tatsache, dass deren antikoagulatorisches Potenzial stark reduziert oder gänzlich eliminiert wurde, wurden diese als molare Konzentrationen ausgewiesen. Die desulfatierten Derivate und

das RO-Heparin wurden in drei Konzentrationen in einem Bereich von 20 – 100 μM analysiert, um eine eventuell vorhandene Dosisabhängigkeit ermitteln zu können.

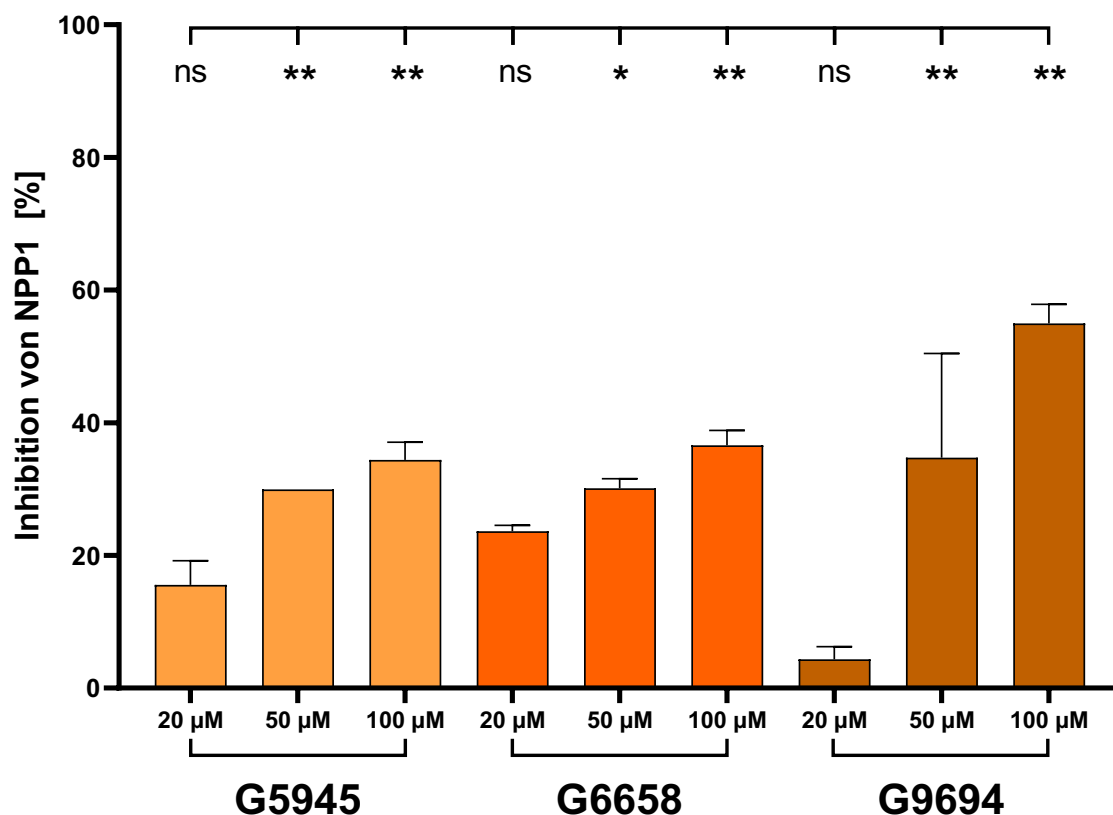


Abbildung 35: Graphische Darstellung der Resultate der getesteten, chemisch modifizierten Heparine mit herabgesetzter antikoagulatorischer Potenz. Die Inhibition der NPP1-Enzymaktivität ist als relativer Prozentwert angegeben, dessen Berechnung analog der Formel 8 erfolgt. Die drei Verbindungen wurden in jeweils drei Konzentrationen getestet, um eine potenzielle Dosisabhängigkeit des Effektes zu ermitteln. Die dargestellten Daten entsprechen den Mittelwerten \pm SEM aus $N=3$ Versuchen. Die Signifikanz wurde mittels einer One-Way-ANOVA und Dunnett Post-hoc Tests analysiert. ns: nicht signifikant; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$ (466)

Für die jeweils niedrigste Konzentration der Testsubstanzen schwankt die Inhibition der ADO-Bildung zwischen 4 – 24 %. Das RO-Heparin besitzt mit 4,35 % bei 20 μM kaum eine inhibitorische Aktivität für NPP1, wohingegen die Enzymaktivität durch eine Steigerung auf 50 μM erheblich gesenkt werden konnte. Die beiden desulfatierten Derivate, das 2-O-desulfatierte G5945 sowie das 6-O-desulfatierte Derivat G6658 weisen bereits bei der kleinsten Konzentration von 20 μM eine deutlich höhere Hemmwirkung auf, zeigen dann aber bei Steigerung der Konzentration gegenüber dem RO-Heparin keinen Vorteil mehr auf. Somit stieg die jeweilige Inhibition von NPP1 nicht proportional zur Konzentration der Testsubstanzen. Im Verhältnis zu den kommerziellen Heparinen und Fondaparinux wiesen die chemisch abgewandelten Heparine eine verringerte Enzymblockade an NPP1 als die beiden LMWH und das Pentasaccharid Fondaparinux auf. Zwar liegt die Inhibition der modifizierten Heparine mit

30 – 50 % bei den höheren Konzentrationen über derjenigen von UFH und Tinzaparin, allerdings war die eingesetzte Menge in diesem Versuch um den Faktor 10 – 20 höher. Bei den erhöhten Konzentrationen konnte jedoch effektive Inhibition erzielt werden. Zusätzlich wurde der Nachweis erbracht, dass die intrinsische Fähigkeit der Heparine zur Antikoagulation nicht die entscheidende Determinante des Potenzials zur NPP1-Blockade ist.

Tabelle 20: Tabellarische Zusammenfassung der Resultate der Untersuchungen der chemisch modifizierten Heparinderivate mit verminderter antikoagulatorischer Potenz zur NPP1-Aktivität auf U87-Zellen. Angegeben sind die getesteten Konzentrationen und gemittelten Messwerte mitsamt des zugehörigen SEM.

| Verbindung | Konzentration [μM] | Inhibition \pm SEM [%] |
|------------|---------------------------------|--------------------------|
| G5945 | 20 | 15,56 \pm 2,50 |
| | 50 | 29,94 \pm 0,42 |
| | 100 | 34,42 \pm 2,66 |
| G6658 | 20 | 23,66 \pm 0,74 |
| | 50 | 30,11 \pm 1,47 |
| | 100 | 36,58 \pm 2,28 |
| G9694 | 20 | 4,346 \pm 1,91 |
| | 50 | 34,74 \pm 15,70 |
| | 100 | 54,98 \pm 2,97 |

Neben den chemisch derivatisierten Heparinen wurde ebenfalls die intrinsische Aktivität der aufgereinigten Dalteparinfraktionen evaluiert. Zur Analyse der fraktionierten Dalteparinderivate wurden die Konzentrationen der Testverbindungen ebenfalls als Molarität angegeben. Die jeweiligen Fraktionen wurden in zwei unterschiedlichen Konzentrationen getestet, um eine potenzielle Dosisabhängigkeit zu untersuchen.

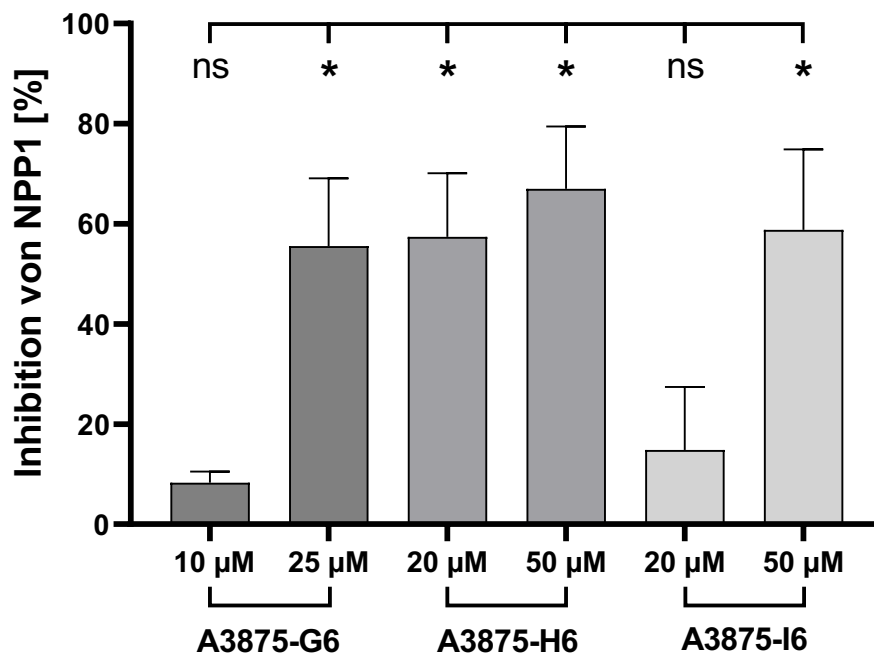


Abbildung 36: Graphische Darstellung der Resultate der Testung der fraktionierten Dalteparinmolekülketten. Die Inhibition der NPP1-Enzymaktivität ist als relativer Prozentwert angegeben, dessen Berechnung analog der Formel 8 erfolgt. Die beiden Verbindungen wurden in jeweils zwei Konzentrationen getestet, um eine potenzielle Dosisabhängigkeit des Effektes zu ermitteln. Aufgrund eines Deklarationsfehlers der Molekülmasse der Testverbindung A3875-G6 und nachträglicher Korrektur ist diese rückwirkend betrachtet in einem anderen Konzentrationsfenster analysiert worden. Die dargestellten Daten entsprechen den Mittelwerten \pm SEM aus $N=2$ Versuchen. Die Signifikanz wurde mittels einer One-Way-ANOVA und Dunnett-Post-hoc-Tests analysiert. ns: nicht signifikant; *: $p < 0,05$ (466)

Alle aufgereinigten Fraktionen inhibierten die NPP1-Aktivität. Die jeweils niedrigere Dosis der Testsubstanzen zeigte mit 10 μM G6 8,26 % und 20 μM 14,32 % Hemmwirkung tendenziell eine niedrige intrinsische Aktivität als die höhere Dosis. Lediglich A3875-H6 hemmte mit 20 μM die ADO-Bildung um 57,39 %. Für die jeweils höheren Dosen wurden entsprechende höhere Werte ermittelt. A3875-G6 erzielte mit 25 μM eine Inhibition von 55,73 %. Die beiden kurzkettigeren Verbindungen H6 und I6 wirkten mit 66,97 % und 58,79 % etwas stärker auf die NPP1-Aktivität ein, sind allerdings mit 50 μM eingesetzter Substanz auch doppelt so hoch dosiert. Bei höheren Dosierungen von A3875-G6 und I6 sowie beiden Konzentrationen von A3875-H6 bestehen signifikante Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle.

Insgesamt unterbanden die Dalteparinfraktionen die Enzymaktivität weniger stark als die kommerziellen Heparine, was unter anderem anhand der höheren eingesetzten Konzentrationen der Fraktionen deutlich wird. Lediglich das Octasaccharid A3875-H6 wies in der geringeren Konzentration von 20 μM einen signifikanten Effekt auf. Sowohl bei A3875-G6 und A3875-I6 erzielte erst eine Konzentration von 50 μM nennenswerte Effekte, die bei dem LMWH Enoxaparin und Fonfaparinux bereits bei 10 μM erreicht wurden. Innerhalb der Fraktionen des

Dalteparins scheint es eine leichte Tendenz bezüglich der Größe zu geben. So wies das längere Dodecasaccharid A3875-G6 im Vergleich zu den beiden Kürzeren bereits mit niedrigeren Konzentrationen eine ähnlich starke Inhibition an NPP1 auf. Der Vergleich des Decasaccharids A3875-H6 mit dem Octasaccharid A3875-I6 lässt bezüglich der Korrelation zwischen Kettenlänge und Effekt keine eindeutige Aussage zu, da die Messwerte innerhalb der Schwankungsbreite der jeweiligen SEM liegen.

Tabelle 21: Tabellarische Zusammenfassung der Resultate der Untersuchungen der fraktionierten und aufgereinigten Dalteparinderivate mit verminderter antikoagulatorischer Potenz zur NPP1-Aktivität auf U87-Zellen. Angegeben sind die getesteten Konzentrationen und gemittelten Messwerte mitsamt des zugehörigen SEM.

| Verbindung | Konzentration [μM] | Inhibition \pm SEM [%] |
|------------|---------------------------------|--------------------------|
| A3875-G6 | 10 | 8,26 \pm 2,27 |
| | 25 | 55,73 \pm 13,56 |
| A3875-H6 | 20 | 57,39 \pm 12,75 |
| | 50 | 66,97 \pm 12,49 |
| A3875-I6 | 20 | 14,82 \pm 12,58 |
| | 50 | 58,79 \pm 16,09 |

5.4.4 Abgeleitete synthetische Sulfosaccharide

Zur weiteren Evaluation möglicher Strukturzusammenhänge der sulfatierten Oligosaccharide mit ihrer Kapazität zur NPP1-Inhibition wurden synthetische Trisaccharide analysiert. Hierfür wurden von Hien Nguyen (Wayne University Detroit, USA) drei synthetische Verbindungen bereitgestellt. Diese sind aus zwei Einheiten D-GlcN und der Uronsäure L-IdoA aufgebaut, die jeweils β -1,4-glykosidisch und α -1,4 glykosidisch an L-IdoA geknüpft sind. Daher weisen sie in Bezug auf die Substitution der Pyranosen mit Sulfatgruppen ähnliche Muster zur Glykosaminoglykanstruktur der Heparine auf bzw. wurden diesen nachempfunden. Im Unterschied zu diesen sind an der Uronsäure D-GlcA keine Sulfatgruppen vorzufinden.

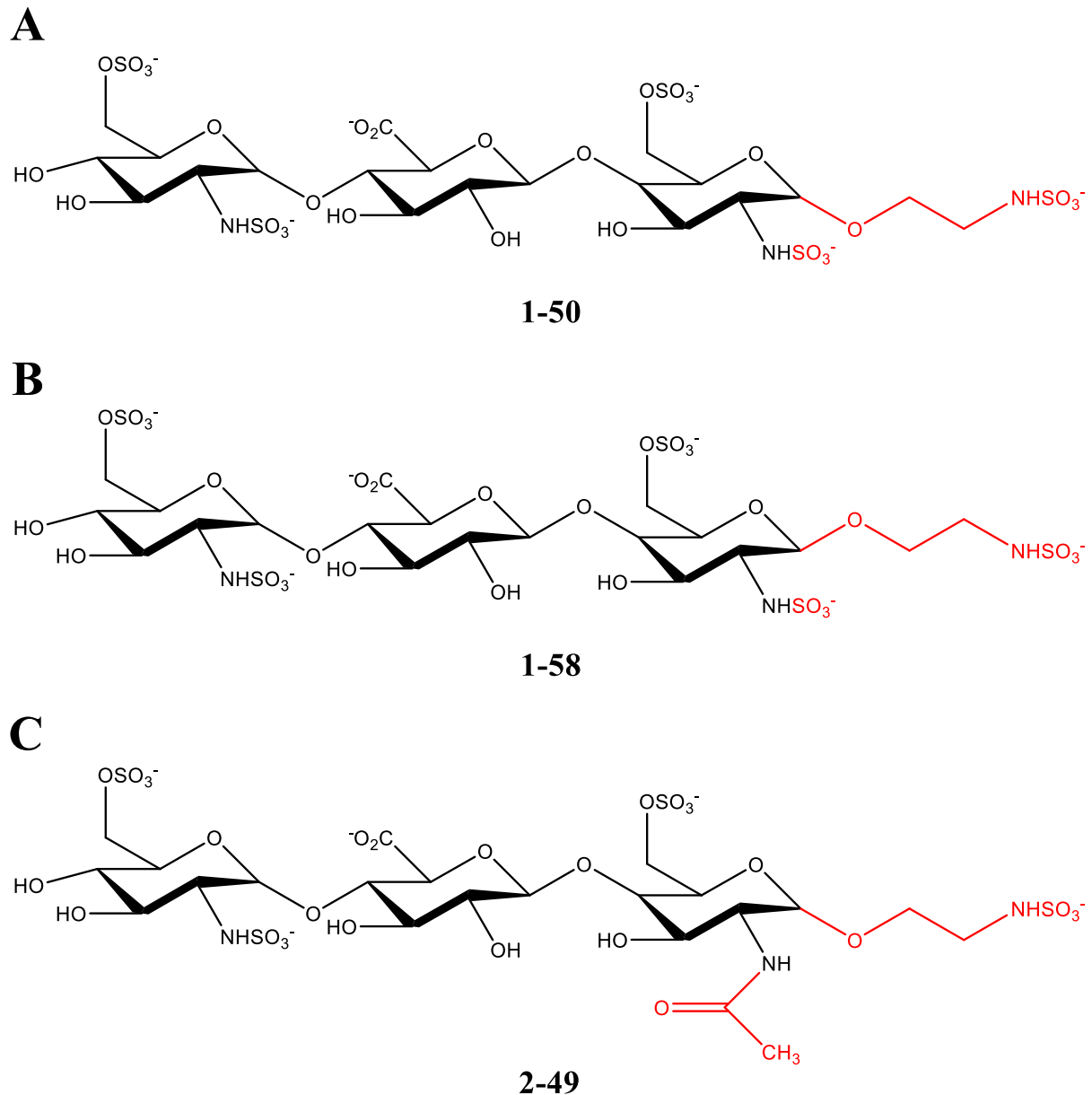


Abbildung 37: Graphische Darstellung der Strukturformeln der drei synthetischen Trisaccharide, die in Teilen der charakteristischen Pentasaccharidsequenz nachempfunden sind und das Pharmakophor der Heparine repräsentieren. Die Grundstruktur aller Verbindungen besteht dabei aus D-GlcN, das β -1,4-glykosidisch an D-GlcA geknüpft ist. Über eine α -1,4-glykosidische Bindung ist wiederum die dritte Pyranose in Form eines weiteren D-GlcN an D-GlcA gebunden. Den Abschluss bildet bei allen Verbindungen ein glykosidisch gebundener aliphatischer Rest, der aus einem Sulfonamid besteht. Die Verbindungen 1-50 (A) und 1-58 (B) stellen Stereoisomere in Bezug auf die räumliche Ausrichtung des aliphatischen Rests dar. Im Gegensatz zu Verbindungen 1-50 und 1-58 ist 2-49 (C) am Stickstoff der zweiten D-GlcN die Sulfatfunktion entfernt und durch einen Acetylrest substituiert worden.

Des Weiteren weisen alle Trisaccharide einen aliphatischen Substituenten in Form eines sulfatierten Aminoethanols auf, der an D-GlcN gebunden ist. Die aliphatischen Substituenten unterscheiden sich bei der Verbindung 1-58 im Vergleich zu 1-50 bezüglich der sterischen Ausrichtung. Somit handelt es sich bei den Testsubstanzen 1-50 und 1-58 um Stereoisomere. Des Weiteren unterscheidet sich 2-49 aufgrund der N-Acetylierung an C3 des D-GlcN von den

beiden anderen Verbindungen, da diese hier eine Sulfatierung aufweisen. Entsprechend liegt der Sulfatierungsgrad aller genannten Verbindungen mit 1,3 deutlich niedriger als bei den kommerziellen Heparinen und bei 2-49 aufgrund der N-Acetylierung mit 1,0 nochmals leicht darunter.

Tabelle 22: Tabellarische Zusammenfassung einiger chemischen Charakteristika der synthetischen Trisaccharide

| Verbindung | Molekulargewicht [g/mol] | Strukturmerkmal | Sulfatierungsgrad |
|------------|-----------------------------|--------------------------|-------------------|
| 1-50 | 1091,7 | Stereoisomer zu 1-58 | 1,3 |
| 1-58 | 1091,7 | Stereoisomer zu 1-50 | 1,3 |
| 2-49 | 1031,7 | N-Acetylierung an D-GlcN | 1,0 |

Mit der Untersuchung der drei Trisaccharide sollte insbesondere geklärt werden, ob eine mögliche Verkürzung des Pharmakophors der Heparine unter Beibehaltung des inhibitorischen Effektes auf NPP1 möglich ist.

Die verwendeten Mengen der Trisaccharide wurden ebenfalls als Stoffmengenkonzentration ausgewiesen. Zur Bestimmung einer potenziellen Korrelation zwischen Konzentration und Inhibition der Enzymaktivität wurden die synthetischen Verbindungen in drei Konzentrationen in einem Bereich von 10 – 50 μM betrachtet.

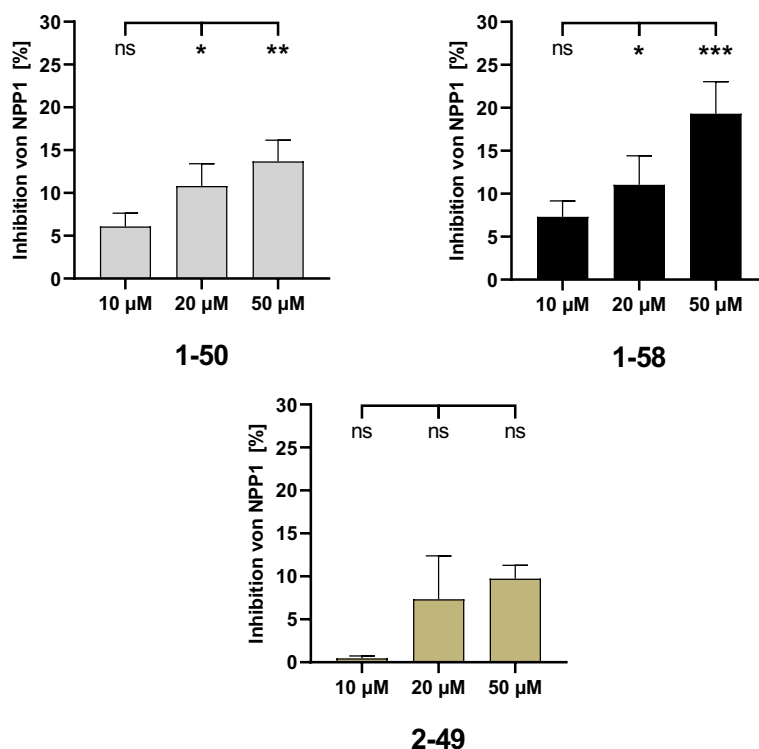


Abbildung 38: Graphische Darstellung der Resultate zur Untersuchung des synthetischen Disaccharids 1-58. Die Inhibition der NPP1-Enzymaktivität ist als relativer Prozentwert angegeben, dessen Berechnung analog der Formel 8 erfolgt. Die drei Verbindungen wurden in jeweils drei Konzentrationen getestet, um eine potenzielle Dosisabhängigkeit des Effektes zu ermitteln. Die dargestellten Daten entsprechen den Mittelwerten \pm SEM aus $N=3$ Versuchen. Die Signifikanz wurde mittels einer One-Way-ANOVA und Dunnett Post-hoc Tests analysiert. ns: nicht signifikant; *: $p<0,05$; **: $p<0,01$; ***: $p<0,001$

Die Resultate der Untersuchung der synthetischen Trisaccharide zur Inhibition von NPP1 auf U87-Zellen sind in Abbildung 38 graphisch aufgeführt. Insgesamt konnte bei der eingesetzten Menge eine maximale Inhibition von ungefähr 20 % erreicht werden. Für die jeweils geringste Konzentration von 10 μM wurden einstellige Inhibitionswerte von 6,08 % für 1-50 und 7,32 % für 1-58 ermittelt. Der entsprechende Wert des N-acetylierten 2-49 ist mit 0,47 % vernachlässigbar. Eine Verdopplung auf 20 μM der aufgewendeten Substanzmenge verstärkt die Aktivität der Trisaccharide, allerdings ist die prozentuale Inhibition in Bezug auf die unbehandelte Referenz mit 10,8 % (1-50), 11,04 % (1-58) und 7,35 % (2-49) vergleichsweise gering. Eine Steigerung der Derivate auf 50 μM hob die jeweiligen Werte für die NPP1-Inhibition dann auf 13,69 % für 1-50, 19,31 % für dessen Stereoisomer 1-58 und 9,73 % für 2-49 an. Hierbei ist der Unterschied zwischen dem N-sulfatierten Trisaccharid 1-58 und der N-acetylierten Variante 2-49 hervorzuheben, die sich in der Hemmwirkung bei 50 μM um den Faktor 2 unterscheiden. Auch gegenüber dessen Stereoisomer 1-50 konnte 1-58 einen größeren Effekt auf NPP1 verzeichnen. Insgesamt liegen die drei synthetischen Trisaccharide bezogen auf die inhibitorische Aktivität an NPP1 in etwa auf dem Niveau des natürlichen Copolymers

Chondroitinsulfat und damit deutlich unterhalb der kommerziellen Heparine und Fondaparinux sowie der chemisch modifizierten Heparinabkömmlinge.

Tabelle 23: Tabellarische Zusammenfassung der Resultate der Untersuchung des synthetischen Disaccharids 1-58 zur NPP1-Aktivität auf U87-Zellen. Angegeben sind die getesteten Konzentrationen und gemittelten Messwerte mitsamt des zugehörigen SEM.

| Bezeichnung | Konzentration [μM] | Inhibition \pm SEM [%] |
|-------------|---------------------------------|--------------------------|
| 1-50 | 10 | $6,08 \pm 1,56$ |
| | 20 | $10,80 \pm 2,61$ |
| | 50 | $13,69 \pm 2,46$ |
| 1-58 | 10 | $7,32 \pm 1,85$ |
| | 20 | $11,04 \pm 3,37$ |
| | 50 | $19,31 \pm 3,73$ |
| 2-49 | 10 | $0,47 \pm 0,25$ |
| | 20 | $7,34 \pm 5,03$ |
| | 50 | $9,73 \pm 1,55$ |

5.4.5 Zusammenfassung: CE-Analytik der Heparine und Analoga bezüglich NPP1-Inhibition

Im Rahmen dieser Testreihe wurden diverse natürliche, modifizierte sowie synthetische Verbindungen aus der Substanzklasse der Sulfopolysaccharide untersucht. Betrachtet man den strukturellen Aufbau der analysierten Verbindungen, lassen sich viele Gemeinsamkeiten bezüglich der Glykanstruktur feststellen. So bestehen bis auf die Seeargenextrakte fast alle Saccharide aus einer alternierenden Abfolge von D-Glucosamin und Uronsäuren. Allerdings ist die Substitution der Saccharidstruktur einiger Verbindungen stark variabel, wodurch sie sich hauptsächlich über elektrostatische Wechselwirkungen aufgrund eingebrachter negativer Ladungen unterscheiden. Ziel der Testreihe war es, potente NPP1-Inhibitoren zu finden.

Dies wurde erreicht, wenngleich die Potenz der Inhibitoren trotz struktureller Ähnlichkeiten der Verbindungen teils deutlich divergierte. Den stärksten Effekt zeigten einerseits der Fucoidanextrakt aus der Braunalge *Fucus vesiculosus* sowie das synthetische Pentasaccharid Fondaparinux, was sich aus dem Pharmakophor der Heparine gegen ATIII ableitet. So ließ sich innerhalb der Gruppe der kommerziellen Antikoagulantien eine Tendenz feststellen, dass kürzere Molekülketten eine verbesserte inhibitorische Kapazität aufwiesen als längere. Zusätzlich zeigten die chemisch modifizierten Heparinderivate, dass die NPP1-Inhibition nicht

von deren antikoagulatorischen Eigenschaften abhängt. Die Untersuchung der fraktionierten Dalteparinketten zeigte ebenso, dass der inhibitorische Effekt an NPP1 nicht ausschließlich von der Länge des Moleküls abhängt, da in diesem Versuchsmodell das Dodecasaccharid als größte Fraktion im Vergleich zu seinen kürzeren Vertretern die besseren Eigenschaften als Inhibitor zeigte. Die synthetischen Trisaccharide von Hien Nguyen weisen ebenfalls eine deutlich schwächere Inhibition der NPP1-Aktivität als die beiden LMWH, Fondaparinux und die nicht antikoagulatorischen Heparinderivate auf.

Ein weiterer Parameter, der als möglicher Erklärungsansatz dienen könnte, wäre die negative Ladungsdichte. Diese ist beim synthetischen, anorganischen NPP1-Inhibitor PSB-POM-141 mit räumlich kompakten acht negativen Ladungen und einer Molekülmasse von ~ 3 kDa die höchste unter allen eingesetzten Verbindungen. Bei den Sulfopolysacchariden schlägt sich der anionische Charakter in Form des Sulfatierungsgrad und der Uronsäuren durch Deprotonierungen bei einem physiologischem pH-Wert nieder. So weist das Pentasaccharid Fondaparinux im Vergleich zu UFH und den LMWH Tinzaparin und Enoxaparin neben der deutlich kürzeren Kettenlänge die höchste negative Ladungsdichte aufgrund der höheren Zahl an Sulfatgruppen auf. Bezogen auf die chemischen Modifikationen der antikoagulatorischen Derivate verhält sich die Tendenz bei G5945 und G6658 ähnlich, da diese durch 2-O-/6-O-Desulfatierung eine inhärent niedrigere anionische Ladungsdichte besitzen, dagegen das RO-Heparin mit den meisten Sulfatgruppen die stärkste Inhibition aufzeigt. Dem entgegen steht allerdings die hohe inhibitorische Potenz des Fucoidans aus der Braunalge *Fucus vesiculosus*, die sich nicht mit den Parametern Kettenlänge und anionischer Ladungsdichte im Rahmen des U87-Zellmodells erklären lässt.

Chondroitinsulfat als natürliches Struktur analogon des Heparins zeigt an NPP1 ebenfalls einen geringeren Effekt als die LMWH, was mit der geringeren anionische Ladungsdichte an D-GalNAc auch durch die N-Acetylierung zusammenhängen könnte. Die drei Trisaccharide 1-50, 1-58 und 2-49 hemmen NPP1 ebenfalls in weit geringerem Ausmaß als das größere Pentasaccharid Fondaparinux und weisen aufgrund ihres niedrigeren Sulfatierungsgrades ebenfalls eine geringere negative Ladungsdichte auf. Für eine genaue Evaluation der molekularen Interaktionen zwischen Inhibitor und enzymatischer Bindungsstelle müssten diese per Molekulardocking simuliert werden und anschließend ein Hochdurchsatzscreening zur Analyse der Struktur-Wirkungsbeziehung erfolgen. Danach können die gewonnenen Erkenntnisse auf ein geeignetes Zellmodell übertragen werden.

Vielmehr kann anhand der Testreihe ausgehend von den Untersuchungen von Hosoda et al. resümiert werden, dass der Substanzklasse der GAG eine variable Potenz zur Inhibition von

NPP1 innewohnt. Dies wird daran ersichtlich, dass neben den Heparinen und Fondaparinux beinahe alle betrachteten Verbindungen einen intrinsischen Effekt an NPP1 aufzeigen. Und das, obwohl sich die Verbindungen bezüglich verschiedener Parameter wie der Zusammensetzung der Saccharide und Sulfatierungsgrad und damit elektrostatischen Wechselwirkungen teils deutlich unterscheiden.

Somit eignet sich das etablierte U87-Zellmodell mit seinen Surrogatparametern ADO und ATP aus der inhibierten EN-Enzymkaskade und funktionellen Antipoden der purinergen Signaltransduktion zur Betrachtung einer potenziellen Immunmodulation in der TMU.

5.5 Analyse der EN-Induktion durch Zytostatikaresistenz

5.5.1 EN-Induktion durch eine Cisplatinresistenz in den Ovarialkarzinomzelllinien A2780/A2780cis und W1/W1CR

Im Zuge des Projektes sollte der Fragestellung nachgegangen werden, inwiefern ein möglicher oder sogar kausaler Zusammenhang zwischen einer Resistenzentwicklung der Tumorzellen gegen Zytostatika und der Expression der EN besteht. Hierfür wurde die Expression der EN NPP1-3, CD73 und NTPD1, 2, 3 und 8 in den beiden Ovarialkarzinomzelllinien A2780 und W1 sowie deren cisplatinresistenten Subtypen A2780cis und W1CR untersucht.

Zu diesem Zweck wurden die Zelllinien sowohl qualitativ als auch quantitativ in ihren Expressionsniveaus der vorhandenen EN sowohl im Normalzustand als auch in Folge eines zytotoxischen Stimulus betrachtet. Zur Evaluation dieses Sachverhalts wurde die $\Delta\Delta Cq$ -Methode angewendet. Sofern qualitativ die Expression eines betreffenden EN-Zielgens nachgewiesen wurde, folgte die Analyse der jeweiligen EN-Expressionslevel zwischen den Zellpärchen, um potenzielle quantitative Unterschiede ohne und mit Cisplatinexposition festzustellen.

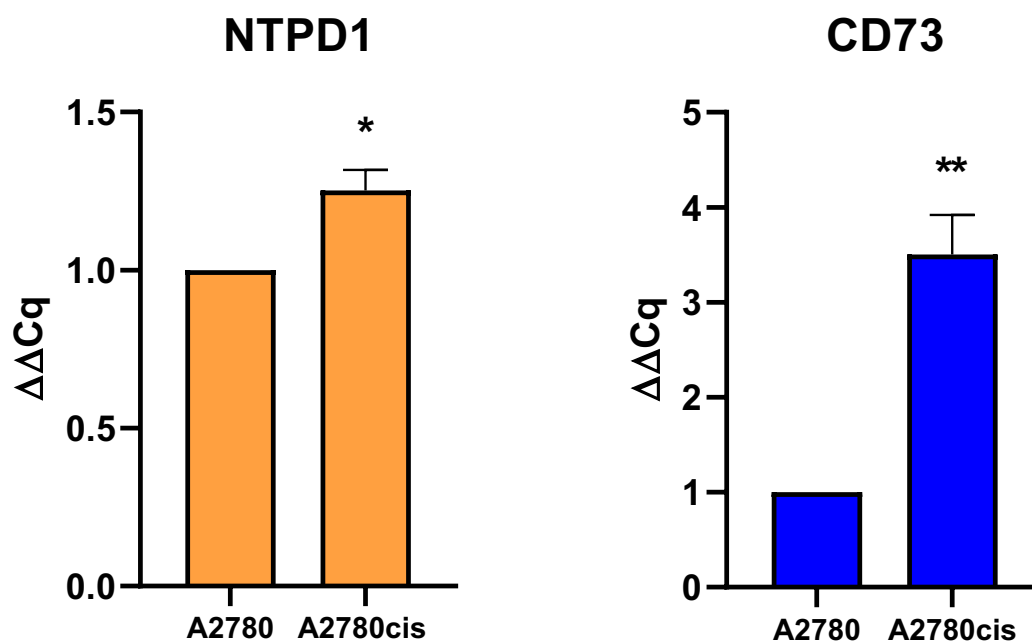


Abbildung 39: Graphische Zusammenfassung der Quantifizierung der mRNA-Menge des CD39-Subtyps NTPD1 und, CD73 in den Wildtyp A2780-Zellen sowie deren cisplatinresistenten Variante nach $\Delta\Delta Cq$. Die dargestellten Daten entsprechen den Mittelwerten \pm SD aus N=3 Versuchen. Die Signifikanz wurde mittels eines gepaarten t-Tests bestimmt. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$

Bezüglich der Enzymklasse der NPP ist festzuhalten, dass diese inklusive NPP1 weder durch den Wildtyp A2780 noch durch den resistenten Subtyp A2780cis exprimiert werden. Anders

verhält es sich mit dem CD39-Subtyp NTPD1 sowie CD73, die gemeinsam die EN-Hauptachse zum ATP-Abbau bilden. Von den betrachteten CD39-Varianten wurde lediglich der Subtyp NTPD1 exprimiert. Bezüglich der Expression von NTPD1 war eine geringe Steigerung der Expression zwischen dem Wildtyp und der resistenten Variante um den Faktor 1,25 feststellbar. Lediglich bei CD73 zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen beiden Varianten hinsichtlich der Quantität der Expression. Diese war beim resistenten Subtyp um den Faktor 3,5 erhöht und damit wesentlich stärker ausgeprägt. Eine Behandlung beider Subvarianten mit Cisplatin bewirkte jedoch keine messbaren Änderungen der Expressionsniveaus der EN NTPD1 und CD73.

Im Gegensatz zu den A2780/A2780cis-Zellen weisen sowohl die Wildtyp-W1 als auch die W1CR keine Expression einer CD39-Variante auf. Dahingegen wurden sowohl NPP1 als auch CD73 in geringem Maße auf beiden Zelltypen nachgewiesen. Jedoch ließ sich hier für CD73 nur eine geringfügige, nicht signifikante Steigerung der Expression um den Faktor 1,08 zwischen den Wildtyp-W1 und den W1CR ermitteln. Aus der Enzymklasse der NPP wurde lediglich NPP1 durch das Zellpärchen exprimiert. Ebenfalls konnte hier ein signifikanter Unterschied zwischen den Wildtyp-W1 und W1CR mit dem Faktor 1,73 bestimmt werden.

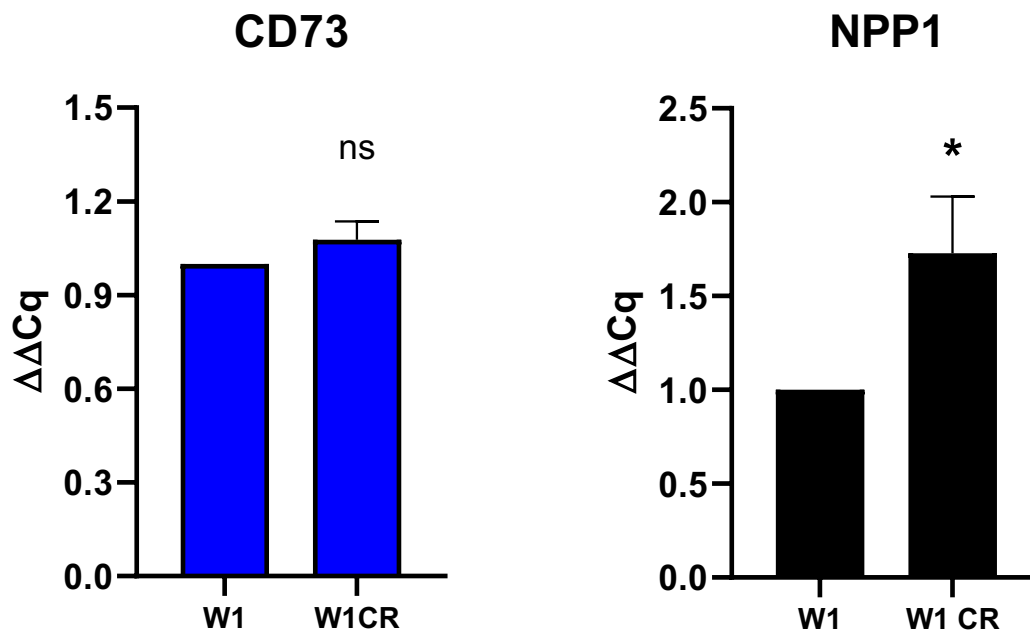


Abbildung 40: Graphische Zusammenfassung der Quantifizierung der mRNA-Menge der EN NPP1 und CD73 in den Wildtyp W1-Zellen sowie deren cisplatinresistenten Variante W1CR. Entsprechend der $\Delta\Delta Cq$ -Methode ist die Expressionsänderung der betrachteten EN aufgrund der Behandlung in Bezug auf die unbehandelte Probe angegeben. Die dargestellten Daten entsprechen den Mittelwerten \pm SD aus $N=3$ Versuchen. Die Signifikanz wurde mittels eines gepaarten t -Tests bestimmt. *: $p<0,05$; **: $p<0,01$

Die Exposition des Wildtyps sowie der resistenten Genvariante mit Cisplatin erzeugte keine Unterschiede der detektierten mRNA-Menge zur unbehandelten Referenzprobe.

5.5.2 EN-Induktion durch resistenzfördernde Faktoren an TNBC MDA-MB-231 Zellen

Neben den Ovarialkarzinomzelllinien wurde die aggressive TNBC Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 hinsichtlich einer potenziellen EN-Induktion aufgrund resistenzfördernder Mechanismen betrachtet. In Abschnitt 5.1.3 wurde bereits ausgeführt, dass MDA-MB-231 Zellen sowohl NPP1 als auch die CD39-Subvariante NTPD3 und CD73 exprimieren.

In der Literatur sind verschiedene Zusammenhänge zwischen der Expression von CD73 und resistenzsteigernder Stimuli beschrieben (376,467). Deshalb sollte ermittelt werden, inwieweit eine Exposition der Zellen mit dem Zytostatikum Doxorubicin sowie eine Kultivierung der Zellen auf Kollagen Typ I Einflüsse auf eine gesteigerte Expression der EN und einer purinergen Signaltransduktion entfaltet. Hierzu wurden die MDA-MB-231 Zellen, wie in Abschnitt 4.4.2 beschrieben, jeweils mit Doxorubicin oder Kollagen sowie einer Kombination aus beidem ausgesetzt und in der Folge die mRNA-Menge mittels qPCR bestimmt. Die Resultate wurden nach der $\Delta\Delta C_q$ -Methode evaluiert und sind in Abbildung 41 dargestellt. Zur übersichtlicheren Darstellung werden die untersuchten EN sowie deren Behandlungen in gesonderten Graphen betrachtet. Als Bezugspunkt diente jeweils die Referenzmenge des zu betrachtenden EN-Zielgens.

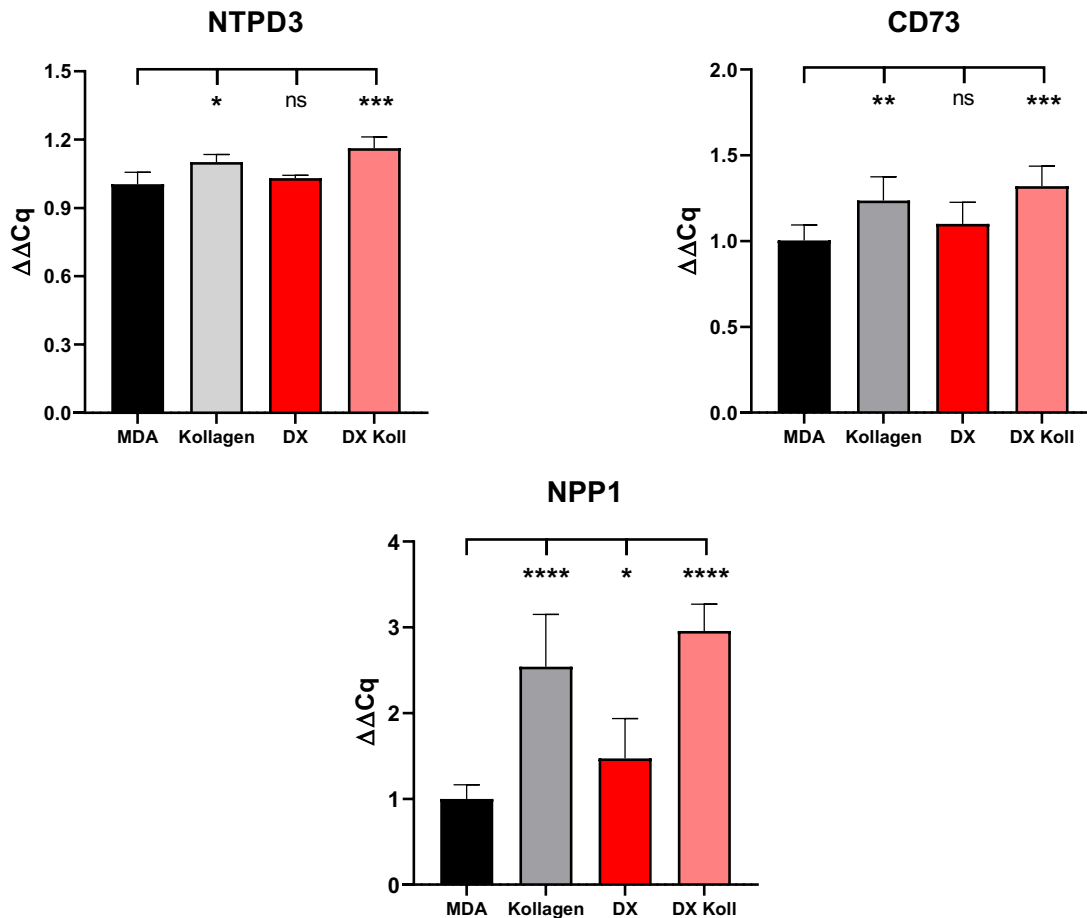


Abbildung 41: Graphische Zusammenfassung der Quantifizierung der mRNA-Menge des CD39-Subtyps NTP3, CD73 und NPP1 aus den TNBC MDA-MB-231-Zellen. Entsprechend der $\Delta\Delta Cq$ -Methode ist die Expressionsänderung der betrachteten EN aufgrund der Exposition mit Doxorubicin (DX), Kollagen (Koll) sowie der Kombination aus beidem (DX Koll) in Bezug auf die unbehandelte Probe (MDA) angegeben. Die dargestellten Daten entsprechen den Mittelwerten \pm SD aus $N=3$ Versuchen. Die Signifikanz wurde mittels einer One-Way ANOVA und Dunnett-Post-hoc-Test bestimmt. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$

Betreffend des CD39-Subtyps NTPD3 ließ sich feststellen, dass die Kultivierung auf Kollagen eine signifikante Expressionssteigerung um den Faktor 1,1 bewirkte. Bei einer Inkubation mit 3 μ M Doxorubicin wurden keine signifikante Veränderung ermittelt. Gegensätzlich verhielt es sich unter der Kombination aus Doxorubicin und Kollagen. Die Kokultivierung des Anthrazyklins sowie des Strukturproteins erzeugten durch einen potenziellen Synergismus eine Expressionssteigerung um den Faktor 1,16.

Hinsichtlich der Betrachtung von CD73 wurde beobachtet, dass die Behandlung mit 3 μ M Doxorubicin zwar eine Steigerung, jedoch ohne Signifikanz aufwies. Ähnliche Tendenzen wie bei NTPD3 konnte für den Kollagenstimulus sowie die Kombination aus Doxorubicin und Kollagen ermittelt werden. Hierbei betragen die jeweiligen signifikanten Expressionssteigerungen die Faktoren 1,24 und 1,32.

Eine deutliche Änderung wurde bei NPP1 durch die Exposition der Zellen mit Kollagen induziert. Die Veränderung der Expression schlug hier mit einem Faktor 2,54 zu Buche. Es bestätigte sich sowohl die Tendenz, dass Doxorubicin alleine im Vergleich zur Kollagenbehandlung die Expression nur leicht zu steigern vermag, als auch, dass die Kokultivierung aus dem Zytostatikum zusammen mit Kollagen eine verstärkte Induktion zur Folge hat. Durch die Behandlung mit der Kombination beider Faktoren wurde eine nahezu dreifach verstärkte Zielgenexpression erreicht als mit Doxorubicin alleine.

Tabelle 24: Zusammenfassung der Untersuchung zur EN-Enzyminduktion durch Doxorubicin und resistenzfördernde Faktoren wie Kollagen

| EN-Zielgen | Behandlung | Relative Veränderung der Expression des EN-Zielgens |
|------------|------------------------|---|
| NTPD3 | Referenz | 1,0 |
| | Kollagen | 1,10 |
| | Doxorubicin | 1,03 |
| | Doxorubicin + Kollagen | 1,16 |
| CD73 | Referenz | 1,0 |
| | Kollagen | 1,24 |
| | Doxorubicin | 1,10 |
| | Doxorubicin + Kollagen | 1,32 |
| NPP1 | Referenz | 1,0 |
| | Kollagen | 2,54 |
| | Doxorubicin | 1,47 |
| | Doxorubicin + Kollagen | 2,96 |

5.5.3 Einfluss der purinergeren Signaltransduktion auf die Anthrazyklinresistenz und Zellviabilität der MDA-MB-231

Neben der induzierten Expression der EN wurde ebenfalls ermittelt, welchen Einfluss die ATP-Degradation auf die Viabilität der MDA-MB-231-Zellen unter Exposition des Doxorubicins sowie des resistenzfördernden Kollagens hat. Zur Viabilitätsbestimmung wurde die Methodik des MTT-Assays angewandt. Zunächst galt es festzustellen, ob die relevanten EN-Inhibitoren PSB-POM-141 für NPP1 und PSB-19316 für CD73 in den eingesetzten Konzentrationen nach 72 h Inkubation eine Toxizität gegenüber der TNBC aufweisen. Im Folgeversuch wurde die Versuchsanordnung um Doxorubicin ergänzt und darauf geschaut, ob sich dessen Zytotoxizität

unter Zugabe der EN-Inhibitoren verändert. Die Resultate der Versuchsreihe sind in Abbildung 42 ausgewiesen.

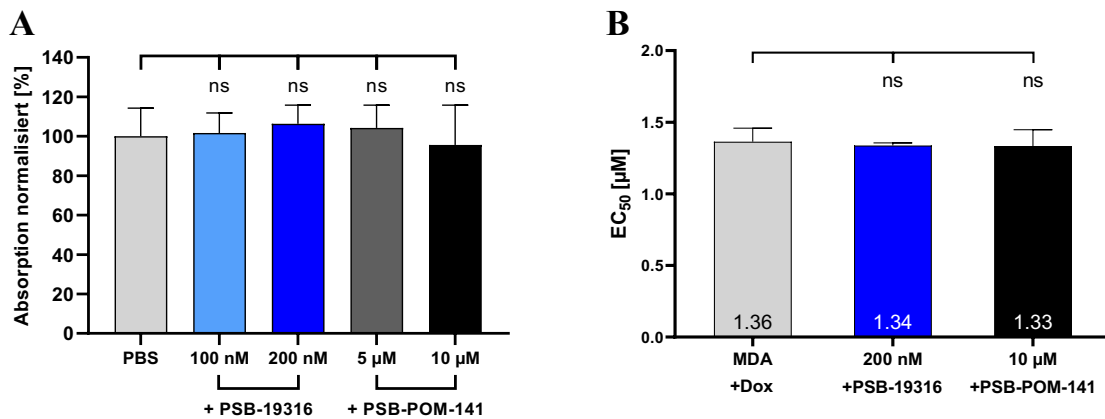


Abbildung 42: Graphische Zusammenstellung der Resultate zur Evaluation der Toxizität der EN-Inhibitoren PSB-POM-141 und PSB-19316 in MDA-MB-231-Zellen. In der linken Graphik A sind die normalisierten Absorptionenwerte der beiden Behandlungen mit den Inhibitoren mit jeweils zwei Konzentrationen in Relation zur Kontrolle mit PBS dargestellt. Die rechte Graphik B fasst die Ergebnisse des Folgeversuchs zur Zytotoxizität des Doxorubicins in Kombination mit den EN-Inhibitoren zusammen. Bei den jeweils höheren Konzentrationen beider Inhibitoren wurde kein Unterschied in den EC₅₀-Werten des Doxorubicins festgestellt. Diese wurden mit Hilfe einer nichtlinearen Regression anhand der Konzentrations-Effekt-Kurve bestimmt. Die dargestellten Daten entsprechen den Mittelwerten \pm SD aus N=3 Versuchen.

Nach Umsatz und Vermessung des MTT-Substrats in violette Formazan wurde ersichtlich, dass die ermittelten Absorptionenwerte der Behandlungen mit den EN-Inhibitoren keinen relevanten Unterschied zur Bezugsgruppe unter PBS aufwiesen (Abb. 42A). Hieraus ließ sich schließen, dass die verwendeten Konzentrationen der EN-Inhibitoren nicht toxisch wirken. Folglich wurde in der zweiten Versuchsanordnung auf zytotoxische Effekte, resultierend aus einem potenziellen Synergismus der beiden EN-Inhibitoren und Doxorubicin, getestet. Als Bezugsparameter wurde der EC₅₀-Wert der MDA-Zellen mit einer alleinigen Doxorubicinbehandlung definiert, der mit Hilfe einer nichtlinearen Regression aus der *dose response* Kurve abgeleitet wurde. Für die jeweiligen Ansätze wurden EC₅₀-Werte innerhalb eines engen Korridors von 1,33 – 1,36 µM ermittelt. Beide EN-Inhibitoren bewirkten daher keine Änderung der zytotoxischen Eigenschaften des Doxorubicins.

Nachdem die Toxizität der EN-Inhibitoren in den eingesetzten Konzentrationen auf die MDA-MB-231-Zellen experimentell ausgeschlossen wurde, konnte der Einfluss der purinerger Signaltransduktion auf die Zytotoxizität des Doxorubicins in diesem Zellmodell untersucht werden. Es wurde analysiert, inwieweit der Zusatz von ATP selbst die Resistenz zu steigern vermag, oder ob diese aus dem EN-Abbau zu ADO resultiert. Hierzu wurden 300 µM ATP zusätzlich in Präsenz der beiden EN-Inhibitoren und Doxorubicin untersucht. In einem weiteren Ansatz wurde das Versuchsmodell um den resistenzfördernden Faktor Kollagen ergänzt. Die

Ergebnisse und Diskussion

Kontrollgruppe wird in beiden Versuchsmodellen durch die kombinierte Behandlung aus Doxorubicin und ATP repräsentiert. Der Zusatz von 300 μM ATP modelliert den Metabolismus einer intakten Enzymkaskade sowie die Effekte der purinerger Signaltransduktion auf die Zytostatikaresistenz. Die graphischen Resultate sind der Abbildung 43 zu entnehmen.

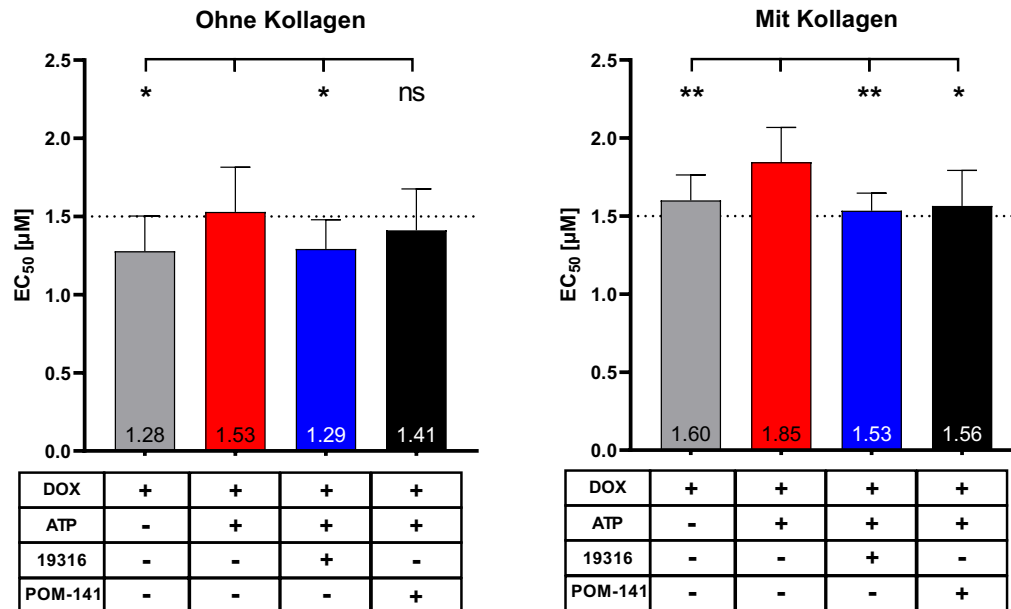


Abbildung 43: Graphische Darstellung der Resultate zur Untersuchung resistenzfördernder Einflussfaktoren der purinerger Signaltransduktion im TNBC-Zellmodell. Die Resultate sind als EC_{50} -Werte angegeben und werden jeweils in Relation zur Bezugsgruppe der simultanen Behandlung mit Dox und ATP oder EN-Inhibitor gesetzt. Die linke Graphik zeigt den Versuchsansatz ohne, die rechte den Ansatz mit auf Kollagen kultivierten Zellen. Die dargestellten Daten entsprechen den Mittelwerten \pm SD aus $N=3$ Versuchen. Die Signifikanz wurde mittels einer One-Way ANOVA und Dunnett-Post-hoc-Test bestimmt. ns: nicht signifikant *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$

Durch die Zugabe von 300 μM ATP steigt der EC_{50} -Wert von 1,28 μM um 0,25 μM auf 1,53 μM an. Der Anstieg des EC_{50} -Wertes ist auf eine Zunahme der Resistenz gegenüber dem Anthrazyklin zurückzuführen. Durch den additiven Einsatz des CD73-Inhibitors PSB-19316 konnte dieser jedoch wieder auf das Ursprungsniveau von 1,29 μM gesenkt werden. Eine alternative Ergänzung des NPP1-Inhibitors PSB-POM-141 bewirkte ebenfalls eine Absenkung des EC_{50} , die mit 1,41 μM jedoch nicht so stark ausfiel. Der zweite Versuchsansatz mit den kollagen-kultivierten MDA-Zellen weist in Bezug auf die Behandlungen ähnliche Tendenzen auf. Hierbei stieg der EC_{50} -Wert nach ATP-Zugabe von 1,60 μM ebenfalls um 0,25 μM auf 1,85 μM an, was auf eine induzierte Resistenz durch EN-Aktivität hindeuten könnte. Durch den Zusatz von 0,2 μM PSB-19316 wurde abermals eine Reduktion des EC_{50} -Wertes erreicht. Hierbei wurde der Effekt der purinerger Signalkaskade aufgehoben, da der Wert mit 1,53 μM auf dem Niveau der unbehandelten Referenzmessung liegt. Die korrespondierende Behandlung mit 10 μM PSB-POM-141 nivellierte die purinerg-induzierte Resistenz ebenfalls vollständig

und befindet sich mit einer EC_{50} mit $1,56 \mu\text{M}$ im Bereich der unbehandelten Bezugsgruppe. Insgesamt liegen alle beobachteten EC_{50} -Werte der Proben, die im Untersuchungszeitraum auf Kollagen wuchsen, oberhalb des Niveaus der kollagenfreien Messungen. Auffällig ist, dass der NPP1-Inhibitor im Modell ohne Kollagen die Zytotoxizität weniger stark beeinflusst als PSB-19316. Die Zelllinie MDA-MB-231 exprimiert nicht nur NPP1, sondern auch parallel den ATP-degradierenden CD39-Subtyp NTPD3. Deshalb liegt die Schlussfolgerung nahe, dass die Zytotoxizität des Doxorubicins unter der NPP1-Inhibition von PSB-POM-141 nicht in demselben Maße wiederhergestellt wurde wie unter Einfluss von PSB-19316. Somit wurde ein experimentelles Indiz geliefert, dass für die protumoralen Effekte in erster Linie das Nukleosid ADO und seine Signaltransduktion über die P1-Rezeptoren verantwortlich ist. Diese scheinen die antitumoralen Eigenschaften des ATP über die P2XR zu überwiegen. Zur Verifizierung dieser Tendenz wären weitere Untersuchungen mit einer Kombination aus CD39- und NPP1-Inhibition notwendig.

5.5.4 Durchflusszytometrische Untersuchung der purinergen Signaltransduktion und Resistenz durch potenzielle ABC-Transporteraktivität

Es wurde untersucht, inwieweit die verringerte Viabilität der Zellen bzw. erhöhte Zytotoxizität durch Blockade der EN-Enzymfunktion und purinergen Signaltransduktion auf einer veränderten ABC-Transporteraktivität basiert. Hierbei steht der zelluläre Efflux des Doxorubicins über ATP-induzierte Transporter im Fokus, die das Überleben der MDA-MB-231 Zellen begünstigen. Zur Aufklärung der vorangegangenen Versuchsansätze soll untersucht werden, ob ATP oder dessen EN-Abbauprodukt ADO den intrazellulären Doxorubicinspiegel entscheidend beeinflussen. Aufgrund der Eigenfluoreszenz des Anthrazyklins wurde die Durchflusszytometrie genutzt. Die unterschiedlich behandelten Zellen (Kap. 4.8.2) wurden in zwei verschiedenen Ansätzen mit und ohne Kollagen präpariert, um dessen Einfluss zusätzlich zu evaluieren. Die Resultate sind in Abbildung 44 dargestellt.

Ergebnisse und Diskussion

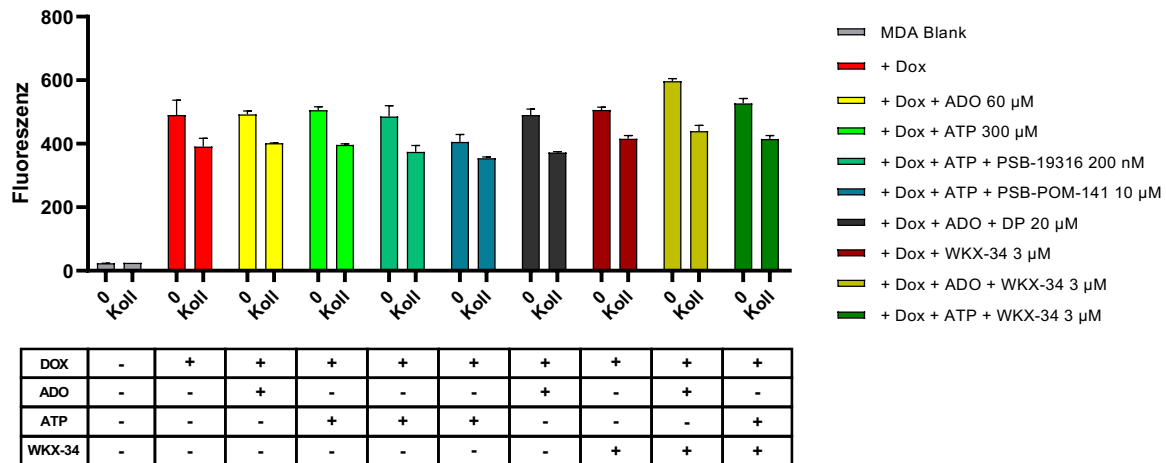


Abbildung 44: Graphische Zusammenfassung der Untersuchung der ABC-Transporteraktivität unter verschiedenen Einflüssen der EN-Aktivität und der konsekutiv modulierten purinerger Signaltransduktion. Betrachtet wurde der intrazelluläre Doxorubicinspiegel, der anhand seiner Eigenfluoreszenz abgebildet werden kann. Der bekannte ABC-Transporterinhibitor WKX-34 als 3 µM Zusatz simuliert eine blockierte Transporterkapazität. Die dargestellten Daten entsprechen den Mittelwerten \pm SEM aus N=2 Versuchen.

Die einzelnen Behandlungen der Zellen mit ADO und ATP sowie den Inhibitoren der EN-Kaskade zeigten sowohl bei den normalen Zellen als auch unter Kollagenbehandlung keinen signifikanten Einfluss auf die intrazellulären Doxorubicinspiegel. Eine signifikante Änderung konnte in beiden Szenarien erst nach der Zugabe des ABC-Transporterinhibitor WKX-34 erreicht werden. Der Einsatz der Purinderivate ADO und ATP in Kombination mit WKX-34 bewirkte sowohl ohne als auch mit Kollagen eine geringe Erhöhung des intrazellulären Doxorubicinspiegels, allerdings ohne statistische Signifikanz. Des Weiteren konnte verifiziert werden, dass Kollagen nicht nur die Viabilität der Tumorzellen erhöht, sondern ebenfalls die Transporterkapazität entscheidend erhöht, sodass in den auf Kollagen kultivierten Zellen unabhängig von den Behandlungen deutlich weniger Doxorubicin vorzufinden war. Insgesamt blieben die Tendenzen bei den Behandlungen ohne und mit Kollagen ähnlich. Zur ausführlicheren Betrachtung eines potenziellen Synergismus des Kollagens mit der purinerger Signaltransduktion zur Modulation der ABC-Transporterkapazität wurden die aufgenommenen Fluoreszenzwerte der verschiedenen Behandlungen auf die Einzelbehandlung mit Doxorubicin normalisiert, die somit die Referenz ohne weitere Einflüsse auf das Transportsystem darstellt. Die normalisierten Resultate sind in Abbildung 45 dargestellt.

Kollagen

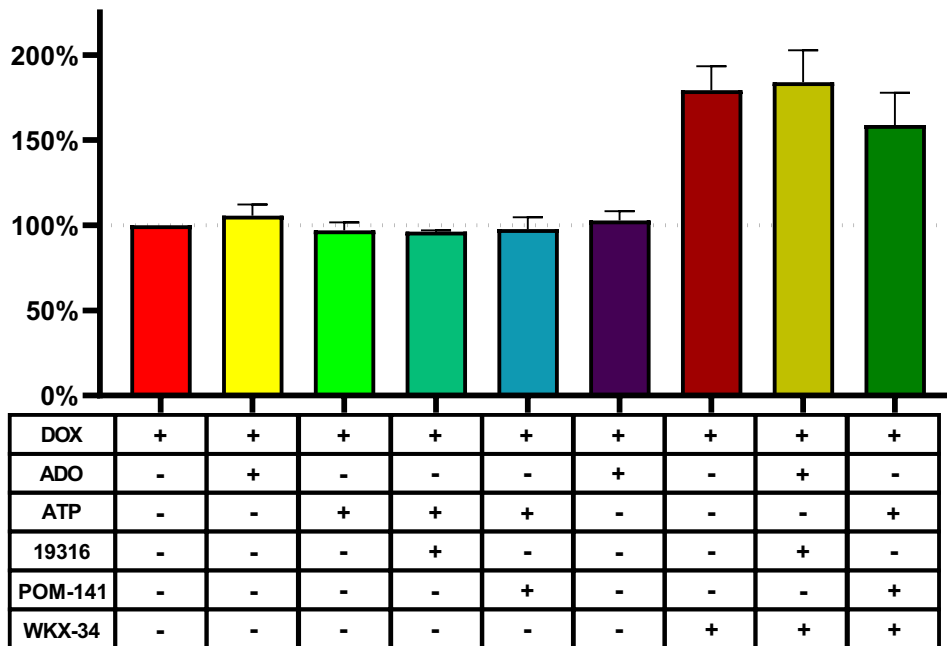


Abbildung 45: Darstellung der Analyse der ABC-Transporterkapazität hinsichtlich der intrazellulären Doxorubicinkonzentration unter Kollagenbehandlung, sowie mit verschiedenen Stimuli zur Beeinflussung der EN-Aktivität, der purinerger Signaltransduktion sowie der ABC-Transporteraktivität. Die einzelnen Behandlungen repräsentieren die Mittelwerte aus zwei Messungen (N=2) mit SEM und wurden auf die Bezugsintervention ausschließlich mit Doxorubicin normalisiert.

Sowohl die Interventionen mit jeweils ADO und ATP als auch der kombinierten Behandlung aus ATP sowie den EN-Inhibitoren PSB-19316 und PSB-POM-141 weisen in Relation zur Bezugsgruppe keine Veränderung der untersuchten ABC-Transporterkapazität auf. Eine deutliche Differenz der Transporterkapazität ließ sich erst durch eine Zugabe von 10 μM WKX-34 beobachten, was im Hintergrund der Eigenschaften der bekannten ABC-Transporterinhibition plausibel erscheint. Der Zugabe von ADO 60 μM oder ATP 300 μM additiv zum ABC-Inhibitor bewirkte einerseits im Falle des ADO eine leichte Steigerung und andererseits bei ATP eine leichte Minderung des Doxorubicinspiegels, die jedoch beide keine Signifikanz aufwiesen.

5.5.5 Zusammenfassung: EN-Induktion und Zytostatikaresistenz in Tumorzellen

Betreffs der EN-Expression beider Ovarialkarzinomzelllinien sowie deren cisplatinresistenten Subtypen wurde festgestellt, dass diese sowohl qualitativ als auch quantitativ unterschiedlich ausfiel. So exprimierte das Zellpärchen A2780/A2780cis mit dem CD39-Subtyp NTPD1 und CD73 die EN des klassischen Weges und das Zellpärchen W1/W1CR mit NPP1 und CD73 die EN-Kaskade des alternativen Weges. Die cisplatinresistente Variante wies bei beiden

Zellpärchen jeweils eine gesteigerte Expression der EN auf. Bei A2780cis fiel die deutlich stärkere Expression von CD73 um den Faktor 3,5 auf, wohingegen die Expression von NTPD1 bei A2780 und A2780cis nahezu gleich war. Bezüglich des Zellpärchens W1/W1CR verhielt es sich umgekehrt. Hier wies der resistente Subtyp eine Steigerung der NPP1-Expression um den Faktor 1,73 gegenüber dem Wildtyp auf. Die Hypothese, dass eine wiederholte Cisplatinexposition in einer EN-Enzyminduktion resultiert, wurde weder für das Zellpärchen A2780/A2780cis noch für W1/W1CR verifiziert, da sich bei keiner der untersuchten Zelllinien eine Änderung der EN-Expression in Folge der Exposition ergab. Somit konnte in diesem Versuchsansatz zwar kein unmittelbarer Zusammenhang zwischen der Induktion der EN und einer Cisplatinexposition, jedoch eine mögliche Verknüpfung zwischen der genetischen Resistenz und einer EN-Expression aufgrund der quantitativen Unterschiede hergestellt werden.

Zusätzlich zu den Ovarialkarzinomzelllinien wurde die Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 als Vertreter der aggressiven und schwer therapierbaren TNBC hinsichtlich eines möglichen Zusammenhangs zwischen EN-Expression und Zytostatikaresistenz untersucht. Neben der Exposition des indizierten Zytostatikums Doxorubicin sollte ebenfalls die Auswirkung des resistenzfördernden Faktors Kollagen auf die EN-Induktion betrachtet werden. Hierbei zeigte sich, dass vor allem Kollagen eine verstärkte Enzyminduktion der exprimierten EN hervorrief. Die Exposition mit Doxorubicin förderte die EN-Expression nur in geringem Maße, wenngleich sich dieser geringe Effekt mit dem des Kollagens bei einer simultanen Exposition synergistisch ergänzte. Unter diesen fiel besonders die signifikante NPP1-Induktion auf, da diese sich mehr als verdoppelte. Inwieweit die NPP1-Induktion als resistenzfördernder Faktor gewertet werden kann, bleibt jedoch unklar und bedarf ausführlicherer Untersuchungen. Weitere Untersuchungen an der Zelllinie sollten aufklären, inwieweit die exprimierte EN-Enzymkaskade die Sensitivität der MDA-MB-231-Zellen gegenüber Doxorubicin reguliert. Hierbei wurde festgestellt, dass neben Kollagen als bereits bekanntem Resistenzinduktor die purinerge Signaltransduktion über die EN-Aktivität ebenfalls regulative Auswirkungen besitzt. Es wurde ersichtlich, dass eine Blockade der EN insbesondere von CD73 als zentraler Regulator der ADO-Homöostase die TNBC sensitiver werden ließ. Der Einfluss von NPP1 ließ sich in dieser Versuchsanordnung in seiner Vollständigkeit nicht bemessen, da mit NTPD3 ein weiteres ATP-degradierendes Enzym exprimiert wurde.

Bei den MDA-MB-231-Zellen spielt die ABC-Transporteraktivität eine wichtige Rolle zur Steigerung der Resistenz gegenüber Doxorubicin, wodurch sich die Fragestellung ergab, ob die EN-Aktivität mit derjenigen der Transporter korreliert (445). Die ABC-Transporterkapazität

wurde in zwei Konzentrationen betrachtet, um mögliche Effekte der purinergen Signaltransduktion sowie der EN-Inhibitoren hervorzuheben. Jedoch wurden unter beiden eingesetzten Konzentrationsstufen von WKX-34 keine signifikanten Unterschiede festgestellt. In Folge der Untersuchungen zur EN-Induktion und Zytostatikaresistenz kann abschließend die Aussage getroffen werden, dass die erhöhte Resistenz der MDA-MB-231 Zellen gegenüber Doxorubicin durch die Zugabe von ATP nicht auf einer veränderten ABC-Transporteraktivität durch die purinerge Signaltransduktion beruht.

5.6 Immunmodulatorische Eigenschaften der Ektonukleotidasen in der TMU

5.6.1 Modulation der CD4⁺ T-Zelldifferenzierung in regulatorische T-Zellen anhand der Purinderivate ADO und ATP sowie deren nukleosidischen Analoga

Obwohl die EN-Aktivitäten in keinem eindeutigen Zusammenhang mit der Zytostatikaresistenz der Tumorzellen stehen, ist anzunehmen, dass die lokale Aktivität des Immunsystems in der TMU durch die EN-Aktivität beeinflusst wird. Um diesen Sachverhalt zu verifizieren, war es maßgebend, die Schnittstellen zwischen Immunzellen und Tumor zu identifizieren, an denen die EN und die purinerge Signaltransduktion entscheidend beteiligt sind und auf diese Weise die Immunevasion des Tumors begünstigen. Dementsprechend rückten auf der zellulären Ebene die Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen in immunsuppressive T_{reg} als repräsentativer Mechanismus der adaptiven Immunantwort und die Aktivität zytotoxischer NK-Zellen als antitumoraler Parameter der angeborenen Immunantwort in den Fokus.

Zur Voruntersuchung der Immunmodulation der CD4⁺ T-Zelldifferenzierung durch die purinerge Signaltransduktion an Tumorzellen wurde in einem ersten Schritt der direkte Effekt des P1-Agonisten ADO und des P2-Agonisten ATP beleuchtet. Die Aktivitäten von ADO und ATP wurden mit den jeweiligen synthetischen Analoga NECA für die P1-Rezeptoren A2AR und A2BR sowie BzATP für den P2X7R verglichen, um metabolische Effekte der Umwandlung von ADO oder ATP selektiv erfassen zu können. Dabei wurden die potentiell immunsuppressiven Aktivitäten von ADO und dessen Analogon NECA in den molaren Konzentrationen von jeweils 10 µM und 1 µM auf die CD4⁺ T-Zelldifferenzierung in Vollmedium getestet. Demgegenüber wurden die Effekte des regulatorischen Gegenspielers ATP und dessen Derivat BzATP in den jeweiligen molaren Konzentrationen 10 µM und 5 µM ebenfalls in Vollmedium untersucht. Hierfür wurden die isolierten, vorbehandelten naiven CD4⁺ T-Zellen zunächst über einen Zeitraum von 48 h mit den vier Testsubstanzen in den angegebenen Konzentrationen inkubiert, bevor nach abermaliger Zugabe diese für weitere 48 h inkubiert wurden. Anhand der durchflusszytometrischen Untersuchungen zur Bestimmung des Anteils der T_{reg} an der CD4⁺ T_{eff}-Population wurden die in Abbildung 46 dargestellten Ergebnisse erhalten.

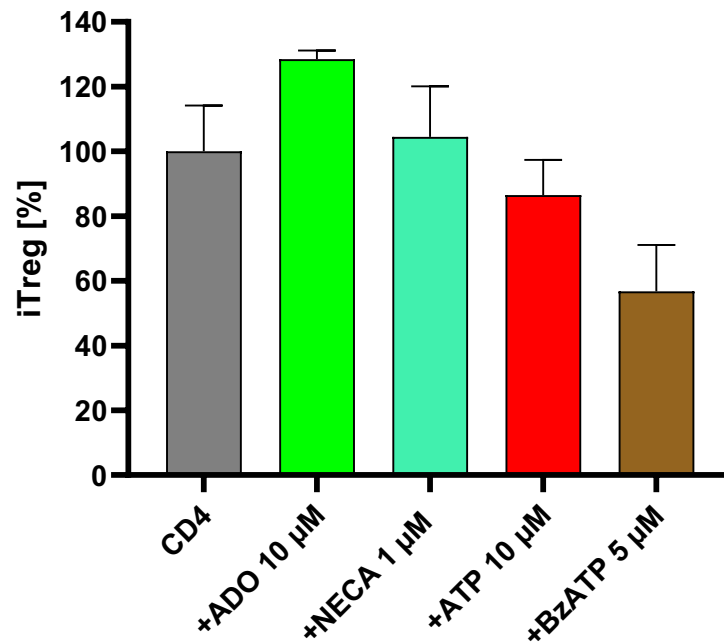


Abbildung 46: Graphische Darstellung der Ergebnisse aus der *in-vitro*-Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen in den immunsuppressiven Subtyp T_{reg} nach unterschiedlichen purinergen Stimuli. Die Behandlungen wurden jeweils mit der DP und EHNA behandelten Kontrollgruppe verglichen. Die Vorbehandlung mit stimulierendem Antikörper sowie DP und EHNA erfolgt sowohl zur Aktivierung der T-Zellen als auch um den Einfluss des Zellmetabolismus der CD4⁺ T-Zellen auf die Purinderivate ADO und ATP gering zu halten. Die dargestellten Daten entsprechen den Mittelwerten \pm SD aus N=3 Versuchen.

Die Resultate sind auf die Bezugsgruppe normalisiert, die im *in-vitro*-Modell die physiologische Menge T_{regs} nach Aktivierung der naiven CD4⁺ T-Zellen am Ende des Versuchsintervalls repräsentieren soll. Durch die Behandlung der naiven CD4⁺ T-Zellen mit ADO 10 µM wurde die Differenzierung in T_{reg} um 28,5 % verstärkt induziert. Der Anteil der iT_{reg} wurde ebenfalls unter Einfluss von NECA gesteigert. Hierbei fiel der Effekt mit 4,4 % allerdings deutlich geringer aus und liegt somit innerhalb der Schwankungsbreite der gemessenen Resultate.

Genau gegenteilig verhält es sich bei der Behandlung mit proinflammatorischem ATP und dessen Derivat BzATP. Bei aufgewendeten 10 µM ATP sank der Anteil der iT_{reg} an der Gesamtpopulation im Verhältnis zur Referenzgruppe um 15 %. Durch den Einsatz von 5 µM des P2X7R-Agonisten BzATP wurde der Anteil um 43 % reduziert. Dies könnte mit der Tatsache zusammenhängen, dass BzATP nicht metabolisiert wird und folglich durch eine längere Bindungszeit an dem Rezeptor eine höhere instrinsische Aktivität als das physiologische Analogon ATP besitzt.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 25: Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse aus der *in-vitro*-Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen in den immunsuppressiven Subtyp T_{reg} bei unterschiedlichen purinergen Stimuli.

| Behandlung | Konzentration [μ M] | Inhibition [%] | Veränderung [%] |
|------------|--------------------------|----------------|-----------------|
| Kontrolle | / | 100 | ± 0 |
| ADO | 10 | 128,5 | + 28,5 |
| NECA | 1 | 104,4 | + 4,4 |
| ATP | 10 | 84,47 | - 15,53 |
| BzATP | 5 | 56,73 | - 43,27 |

5.6.2 Modulation der CD4⁺ T-Zelldifferenzierung in regulatorische T-Zellen anhand heparinisierten Tumorzellüberstände

Im Anschluss an die Testung der Einzelsubstanzen erfolgte die eigentliche Analyse, inwieweit Zellüberstände von U87-Zellen sowie deren Vorbehandlung mit NPP1-Inhibitoren auch einen sichtbaren Einfluss auf die CD4⁺ T-Zelldifferenzierung entfalten. Dieser Ansatz wurde gewählt, um zu ermitteln, ob sich die festgestellten Effekte der purinergen Signaltransduktion auf ein aktives geeignetes Zellmodell übertragen lassen. Als Eingriffspunkt zur Beeinflussung der EN-Kaskade und der purinergen Signaltransduktion dienen die kommerziellen Heparine sowie das synthetische Pentasaccharid Fondaparinux auf Basis der Experimente in Kapitel 5.4.

Im Rahmen des Versuchansatzes wurden die isolierten CD4⁺ T-Zellen nach Kapitel 4.8.4 mit den heparinisierten Überständen der Zelllinie U87 (Kap. 4.8.3) behandelt. Dabei betragen die Konzentrationen von UFH und der LMWH jeweils 5 I.E./ml, und die des Fondaparinux 10 μ g/ml. Als Referenzpunkte der Messung diente ein unbehandelter U87-Überstand. Hier wurden lediglich analog zu den Behandlungen mit ATP sowie der Testverbindungen der ENT-Inhibitor DP und der ADA-Inhibitor EHNA zugesetzt. Hierbei wird die unbeeinflusste TMU der U87 Zellen *in vitro* modelliert [U87 (-)].

Die zweite Bezugsgruppe wurde in Folge der Behandlung der U87 Zellen mit 20 μ M ATP ebenfalls unter der Kokultivierung von DP und EHNA generiert [U87 (+)]. Sie simuliert in diesem Zellmodell den zusätzlichen Effekt des enthemmten aktiven immunsupprimierenden Purinmetabolismus der EN in der TMU auf die CD4⁺ T-Zelldifferenzierung

In Abbildung 47A sind repräsentative Dotplots der aktiven Referenzgruppe [U87 (+)] sowie der heparinisierten Überstände ausgewiesen. Die Achsen der Dotplots geben die gemessenen Fluoreszenzintensitäten des T_{reg}-spezifischen Transkriptionsfaktors FoxP3 sowie der α -Untereinheit CD25 des IL2R an. Folglich wurde der Anteil der induzierten CD25⁺FoxP3⁺ T_{reg}

mittels Populationsanalyse im oberen rechten Quadranten der Dotplots identifiziert. Hierbei wurden die FMO-Kontrollen (Abb. 18B) der Fluorophore entsprechend berücksichtigt.

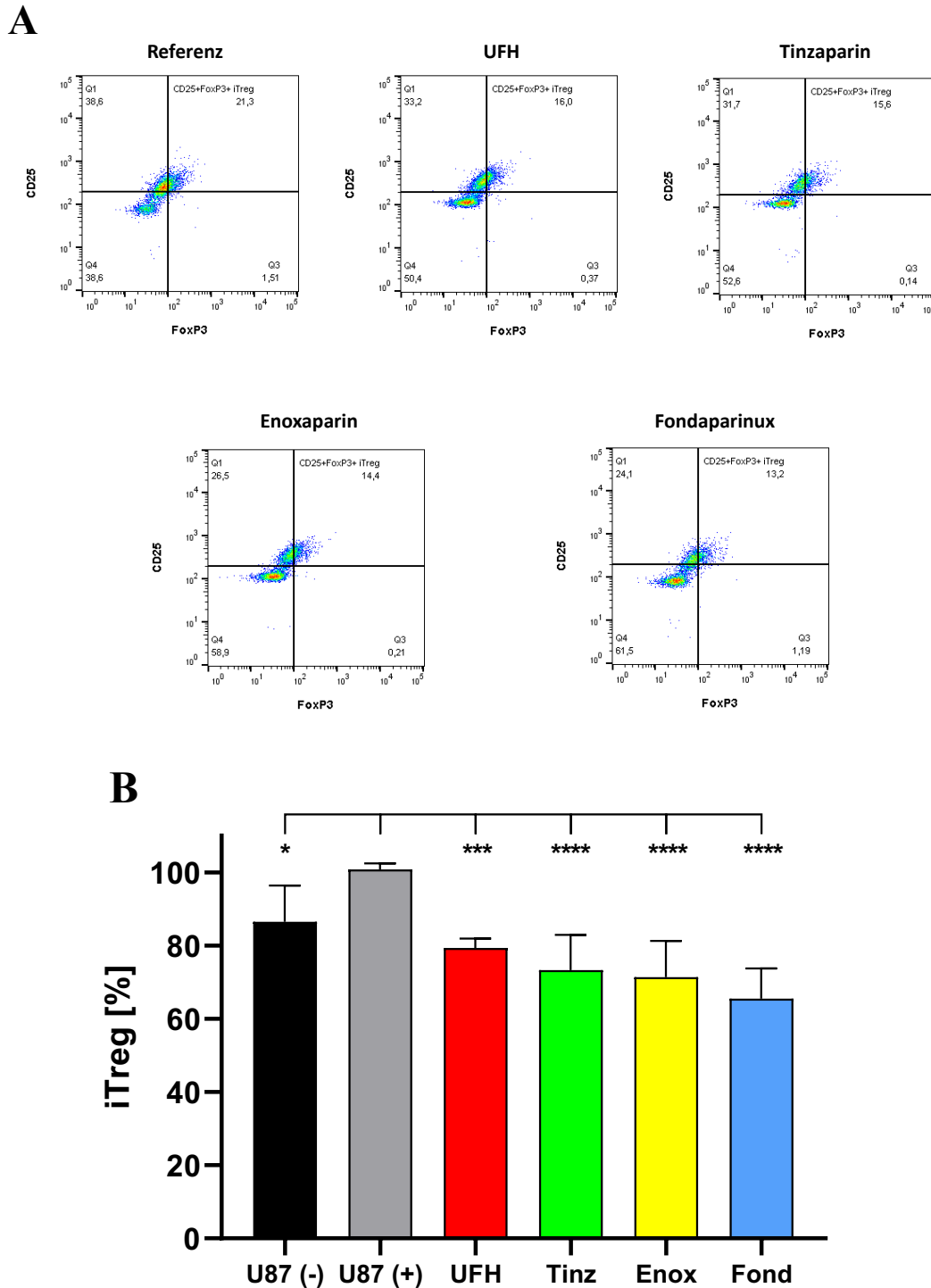


Abbildung 47: Graphische Darstellung der Analyse potenzieller immunmodulierender Eigenschaften der Heparine über die EN NPPI sowie der purinergen Signaltransduktion auf CD4⁺ T-Zelldifferenzierung. In der oberen Hälfte (A) sind repräsentative Dotplots von den jeweiligen Einzelmessungen der Bezugsgruppe mit ATP 20 μ M sowie der vier kommerziellen Heparine ausgewiesen. In der unteren Hälfte sind die Resultate der Messungen abgebildet. Angegeben ist jeweils der normalisierte prozentuale Anteil induzierter T_{reg}-Zellen an der Gesamtpopulation der ausdifferenzierten CD4⁺ T-Zellen. Die dargestellten Daten entsprechen den Mittelwerten \pm SD aus N=7 Versuchen. Die Signifikanz wurde mittels einer One-Way ANOVA und Dunnett Post-hoc Test bestimmt. ns: nicht signifikant *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$ (466)

Ergebnisse und Diskussion

Zur Vereinheitlichung der Messreihen wurden alle Gruppen auf den ATP behandelten U87-Überstand normalisiert, da unter dieser Behandlung gemäß den postulierten Hypothesen zu den immunsuppressiven Eigenschaften des ADO der höchste Anteil an iT_{reg} zu erwarten war. Folglich wurde die als [U87 (+)] bezeichnete Referenz als Wert mit 100 % für den maximalen iT_{reg} -Anteil festgesetzt.

Durch den Zusatz von 20 μ M ATP konnte der Anteil der iT_{reg} im Verhältnis zur unbehandelten Vergleichsprobe um 13,50 % gesteigert werden. Dieser Umstand könnte darauf hindeuten, dass der Großteil des zugesetzten ATP in ADO umgewandelt wurde und folglich die T_{reg} -Induktion in der modellierten TMU verstärkt. Die zusätzliche Behandlung der Zellen mit kommerziellen Heparinen drückte allerdings den Anteil der iT_{reg} unter das Niveau der purinfreien Referenzgruppe, womit der Effekt zur Induktion der T_{reg} in Nukleosid-haltigen Überständen vollständig nivelliert wurde. Bei UFH wurde der Anteil der iT_{reg} um 20,71 % auf 79,29 % in Bezug auf die [U87 (+)] Referenz abgesenkt. Unter Einsatz der beiden LMWH Tinzaparin und Enoxaparin wurde dieser um 26,76 % sowie 28,60 % im Verhältnis zur maximalen T_{reg} -Induktion vermindert. Fondaparinux vermag es, die Differenzierung in immunsuppressive T_{reg} noch weiter zu inhibieren. Unter Einfluss des Pentasaccharids betrug der Anteil iT_{reg} noch 65,49 % im Vergleich zur ATP-haltigen heparinfreien Referenzgruppe. Unterzieht man die ermittelten Resultate einem einarmigen ANOVA, so zeigt sich ein signifikanter Effekt als Absenkung der $CD4^+$ T-Zelldifferenzierung in T_{reg} bei allen heparinisierten Überständen inklusive Fondaparinux.

Tabelle 26: Tabellarische Zusammenfassung der Resultate der in-vitro-Differenzierung naiver $CD4^+$ T-Zellen in den immunsuppressiven Subtyp T_{reg} nach der Behandlung mit heparinisierten Tumorüberständen.

| Bezeichnung | Konzentration der Testverbindung | $iT_{reg} \pm SD[\%]$ | Veränderung zur Bezugsgruppe [%] |
|--------------|----------------------------------|-----------------------|----------------------------------|
| U87 (-) | / | 86,50 \pm 9,89 | - 13,50 |
| U87 (+) | / | 100,0 \pm 1,7 | / |
| UFH | 5 I.E./ml | 79,29 \pm 2,59 | - 20,71 |
| Tinzaparin | 5 I.E./ml | 73,24 \pm 9,64 | - 26,76 |
| Enoxaparin | 5 I.E./ml | 71,40 \pm 9,86 | - 28,60 |
| Fondaparinux | 10 μ g/ml | 65,49 \pm 8,26 | - 34,51 |

5.6.3 Modulation der Zytotoxizität der natürlichen Killerzellen anhand der purinergen Signaltransduktion

Neben der CD4⁺ T-Zell-Differenzierung als zentralem Mechanismus der adaptiven Immunantwort sollen die Auswirkungen der EN-Enzymkaskade und der purinergen Signaltransduktion auf antitumorale Prozesse des angeborenen Immunsystems untersucht werden. Dabei repräsentiert die zytolytische Aktivität der natürlichen Killerzellen den wichtigsten antitumoralen Akteur der angeborenen Immunantwort. In Kapitel 2.2.2 wurden die effektorischen Funktionen der NK-Zellen zur Beseitigung maligner Zellen bereits erläutert.

In der Folge wurde deren zytolytische Aktivität hinsichtlich der Leukämiezelllinie K562 untersucht, die als spezifische Targetzelllinie in diesem Assay durch die Abwesenheit von MHC-Komplexen fungiert und etabliert ist.

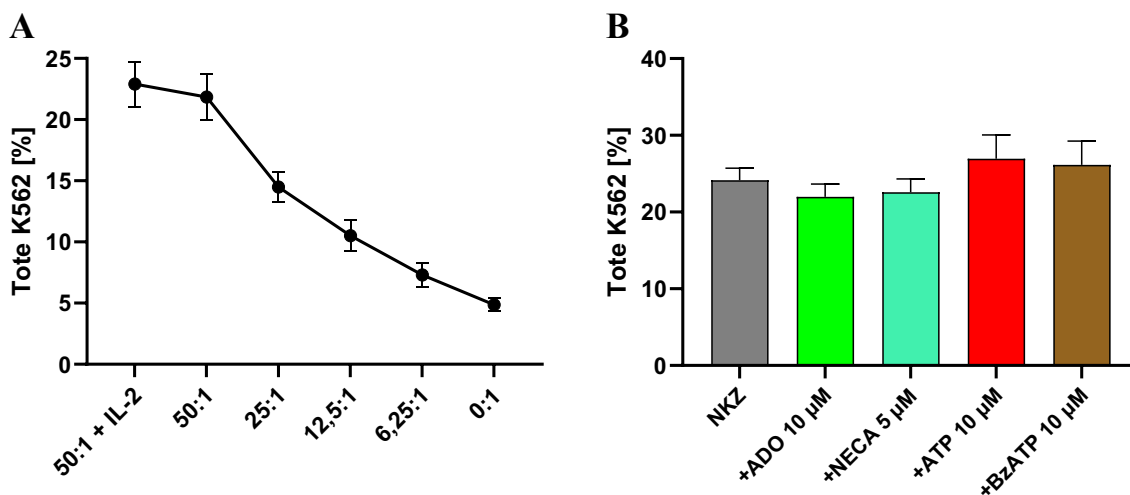


Abbildung 48: Graphische Darstellung der Zytotoxizität unterschiedlicher E:T-Verhältnisse auf die Zielzelllinie K562 (A) und der Resultate zur Beeinflussung der NKZ-Zytotoxizität durch die purinerge Signaltransduktion (B). Zur Evaluation eines geeigneten E:T-Verhältnisses für den Modellansatz wurden Mittelwerte und SD aus zwei Versuchsansätzen abgebildet (A). Die Auswirkung der beiden funktionellen Gegenspieler ADO und ATP sowie deren Rezeptoragonisten NECA und BzATP sind in B aufgeführt. Für alle Messungen wurde anhand der Erkenntnisse des Vorversuchs ein E:T-Verhältnis von 50:1 gewählt. Die dargestellten Daten entsprechen den Mittelwerten \pm SD aus $N=4$ Versuchen.

Mittels eines Vorversuchs wurde ein adäquates Verhältnis der Effektorzellen E (PBMC) zu den Targetzellen T (K562) evaluiert. Hierbei wurden die verschiedenen untersuchten Effektor-Target-Verhältnisse (E:T) hinsichtlich der zytolytischen Kapazität betrachtet, die in der Folge divergierende Zytolyseaktivitäten der NKZ aufwiesen. Die maximale Zytolysekapazität wurde durch den Zusatz von IL-2 bei einem fünfzigfachen Überschuss der PBMC (50:1 + IL-2) erreicht. Insgesamt nahm die zytolytische Kapazität der NKZ korrelierend mit der Höhe des E:T-Verhältnisses ab. Die K562 (0:1) wiesen eine durchschnittliche Autoapoptose von ungefähr 5 % auf. Durch die erhaltenen Resultate sind die Validität und Plausibilität des

Ergebnisse und Diskussion

Versuchsmodells gewährleistet, weshalb die Betrachtung des purinergen Einflusses auf die Funktionalität der NKZ erfolgen kann.

Zur Evaluation des immunmodulierenden Effektes durch die purinerge Signaltransduktion wurden die isolierten PBMC zunächst mit den funktionellen Gegenspielern der purinergen Signalkaskade ADO und ATP sowie deren Rezeptoragonisten NECA und BzATP inkubiert. Nach der Behandlung mit 10 μM ADO und 5 μM mit dessen nukleosidischem Struktur analogon NECA sank die Zytotoxizität der NKZ leicht auf 21,97 % und 22,58 % ab. In Bezug auf die unbehandelte Vergleichsprobe sind diese Änderungen der Aktivität jedoch nicht signifikant. Gegenätzlich verhielt es sich unter den jeweiligen Stimuli des Nukleotids ATP sowie dessen P2X7R-Agonisten BzATP, da die Zytotoxizität der NKZ leicht auf 26,93 % und 26,13 % angehoben wurde. In Hinblick auf die Zytotoxizität der Bezugsprobe [NKZ] konnte jedoch ebenfalls keine Signikanz in der Differenz nachgewiesen werden.

Tabelle 27: Übersicht der Analyse der zytolytischen Kapazität der NKZ nach verschiedenen Stimuli der purinergen Signaltransduktion. Angegeben sind die prozentualen Werte der abgetöteten Zielzelllinie K562 in Bezug auf deren Gesamtpopulation.

| Probe | Zytolytische Aktivität [%] | SD |
|----------------------|----------------------------|-------------|
| NKZ | 24,15 | $\pm 1,58$ |
| ADO 10 μM | 21,97 | $\pm 1,686$ |
| NECA 5 μM | 22,58 | $\pm 1,746$ |
| ATP 10 μM | 26,93 | $\pm 3,113$ |
| BzATP | 26,13 | $\pm 2,798$ |

5.6.4 Modulation der Zytotoxizität der natürlichen Killerzellen anhand der purinergen Signaltransduktion durch heparinisierte U87-Tumorzellüberstände

Im Anschluss an die Untersuchung der Auswirkungen der purinergen Signaltransduktion auf die Zytotoxizität der NKZ wurde die Thematik auf heparinisierte U87-Überstände übertragen. Hiermit wurde zusätzlich der Einfluss der EN-Kaskade auf die NKZ-Zytotoxizität analysiert.

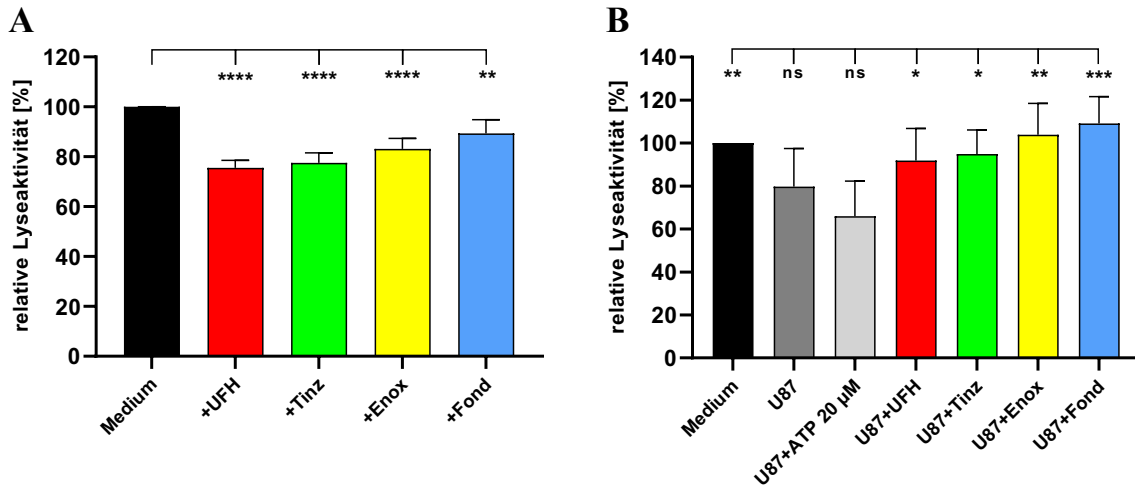


Abbildung 49: Zusammenfassung der Untersuchung der intrinsischen Effekte der Heparine auf die PBMC (A) sowie der Veränderung der NKZ-Zytotoxizität durch heparinisierte U87-Überstände (B). Zur Betrachtung einer möglichen intrinsischen Aktivität der Heparine und Fondaparinux wurden diese in den bereits anderweitig getesteten Konzentrationen von 5 I.E./ml bzw 10 µg/ml zugesetzt (A). Die Resultate aus den entsprechenden Testungen sind in Diagramm B abgebildet. Die dargestellten Daten entsprechen den Mittelwerten \pm SD aus N=5 Versuchen. Die Signifikanz wurde mittels einer One-Way ANOVA und Dunnett Post-hoc Test bestimmt. ns: nicht signifikant *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$ ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$

In einem ersten Schritt wurden mögliche intrinsische Effekte der Heparine auf die isolierten PBMC untersucht. In Vorbereitung zur Testung der U87-Überstände nach Kap. 4.8.3 wurde als Konzentration für UFH und die beiden LMWH 5 I.E./ml und für das Pentasaccharid 10 µg/ml gewählt. Diese liegt damit in etwa doppelt so hoch wie die finale Konzentration zur Behandlung der U87-Überstände. Zur Vereinheitlichung und Übersichtlichkeit der Daten wurden die absolute Zytolysekapazität der einzelnen Messläufe auf die unbehandelte Probe normalisiert, deren Aktivität auf den Wert von 100 % definiert wurde. Wie man Abbildung 49A entnehmen kann, besitzen UFH, die LMWH und Fondaparinux einen intrinsischen Effekt, bezogen auf die NKZ-Zytotoxizität. Es wurde eine sinkende zytolytische Aktivität der NKZ bei UFH, den LMWH und Fondaparinux im Vergleich zur unbehandelten Probe beobachtet. Die intrinsisch ermittelte Reduktion schwankte in einem Bereich von 10 – 25 %, wobei Fondaparinux mit 10 % eine niedrigere und UFH mit 25 % die stärkste Reduktion bewirkte.

Im eigentlichen Versuch wurde insbesondere durch die Zugabe des U87-Überstandes die Aktivität der NKZ herabgesetzt. In Folge der Behandlung der U87 mit 20 µM ATP wurde

dieser Befund sogar noch verstärkt, weshalb diese als Bezugsgruppe für die Zusatzbehandlungen mit den Heparinen und Fondaparinux definiert wurde. Diese beobachtete Reduktion der NKZ-Zytotoxizität durch die EN-Aktivität auf den U87 Zellen wurde unter Zusatz von UFH und Tinzaparin partiell und unter Enoxaparin und Fondaparinux vollständig nivelliert. Bei den zwei Letzteren wurde der immunsuppressive Synergismus aus U87 und ADO nicht nur aufgehoben, sondern es wurde die Zytotoxizität der NKZ in Relation zur unbehandelten Kontrollgruppe Medium womöglich leicht gesteigert. Hierbei wiesen sowohl UFH, beide LMWH Tinzaparin und Enoxaparin sowie das Pentasaccharid Fondaparinux signifikante Steigerungen der NKZ-Aktivität im Verhältnis zum ATP behandelten U87-Überstand auf.

Tabelle 28: Zusammenfassung der Resultate der Zytotoxizitätsanalyse der NKZ nach Behandlung mit U87-Tumorüberständen mit und ohne Heparin. Angegeben sind die normalisierten Mittelwerte, als deren Bezugsgruppe die unbehandelten NKZ fungieren.

| Behandlung der PBMC | Relative NKZ-Zytotoxizität [%] | SEM [%] | Differenz zur unbehandelten Referenz [%] |
|------------------------|--------------------------------------|---------|--|
| Medium | 100 | / | / |
| U87 | 79,79 | ± 8,81 | - 20,21 |
| U87 + ATP 20 µM | 65,93 | ± 9,46 | - 34,07 |
| UFH | 91,93 | ± 6,67 | - 8,07 |
| Tinzaparin | 94,95 | ± 5,00 | - 5,05 |
| Enoxaparin | 103,89 | ± 6,51 | + 3,89 |
| Fondaparinux | 109,16 | ± 5,59 | + 9,16 |

5.6.5 Zusammenfassung der immunmodulatorischen Eigenschaften der EN in der TMU

Insgesamt konnte der Einfluss der purinerger Signaltransduktion mit den funktionellen Antipoden ADO und ATP über die regulierte Aktivität der EN anhand zweier *in-vitro*-Modelle der adaptiven als auch der angeborenen Immunantwort aufgezeigt werden. In beiden Zellmodellen wurde nachgewiesen, dass der Zellüberstand der U87 die Aktivität der adaptiven und angeborenen Immunantwort durch Induktion der immunsuppressiven T_{reg} sowie Absenkung der NKZ-Zytotoxizität limitiert. Ein zusätzlicher synergistischer Einfluss der purinerger Signaltransduktion mit den Tumorzellen konnte anhand einer weiteren Zugabe und Koinkubation mit 20 µM ATP und der folgenden Immunsuppression dokumentiert werden.

Diese lässt sich im Verhältnis zu den im Rahmen der Vorversuche beobachteten Effekten der purinergen Signaltransduktion lediglich mit der EN-Aktivität der Tumorzellen erklären.

Erst die Heparinisierung der U87-Überstände und damit die partielle Inhibition von NPP1 konnte die T_{reg} -Induktion abschwächen. Hierbei war auffällig, dass die heparinisierten Überstände eine ähnliche Tendenz hinsichtlich der NPP1-Inhibition sowie der verminderten Differenzierung in T_{reg} aufwiesen. Somit unterdrücken die Heparine und insbesondere das Pentasaccharid Fondaparinux durch Inhibition des ATP-Abbaus auf Tumorzellen mit der $CD4^+$ T-Zelldifferenzierung in immunsuppressive T_{reg} einen zentralen Mechanismus, der die Immunevasion des Tumors ermöglicht. In diesem Fall kann durch eine stärkere Differenzierung der T-Zellen in andere Subtypen wie den T_H1 -Zellen das immunsupprimierende Milieu der TMU insgesamt in eine antitumorale Richtung gedrückt werden. Folgerichtig liefert dieses zellbiologische Versuchsmodell ein experimentelles Indiz zur Einordnung der EN-Enzymachse aus NPP1 und CD73 als mögliche Immuncheckpoints zur Immunregulation. Besonders in dem Fall der CD39-unabhängigen ATP-Degradation kommt NPP1 als Initiator der ATP-Degradation eine regulatorische Funktion der purinergen Signaltransduktion innerhalb der TMU zu. Somit können die Heparine, Fondaparinux und weitere Sulfopolysaccharide mit ähnlichem Anforderungsprofil auf Basis der *in-vitro*-Inhibition von NPP1 als Immuncheckpoint-Inhibitoren charakterisiert werden. Inwieweit der Befund der zellbiologischen Immunmodulation der Heparine deren Einsatz als ICI erlaubt, müsste zuvor durch weitergehende *in-vivo*-Modelle untersucht werden, bevor der Sachverhalt auf klinische Studien übertragen werden kann.

Selbige Tendenz konnte nicht nur betreffend der $CD4^+$ T-Zelldifferenzierung in T_{reg} , sondern auch hinsichtlich der NKZ-Zytotoxizität innerhalb der PBMC-Population ermittelt werden. Während UFH und Tinzaparin den immunsuppressiven Synergismus auf die Zytolyse stark reduzierten, nivellierte Enoxaparin diesen bzw. induzierte Fondaparinux die Zytolyse sogar leicht. Insgesamt konnten innerhalb des immunologischen NK-Zytotoxizitätsassays stärkere Effekte einerseits bezüglich der protumoralen Immunsuppression und andererseits hinsichtlich der antitumoralen Immunstimulation als bei der $CD4^+$ T-Zelldifferenzierung in T_{reg} beobachtet werden. Dieser Befund könnte mit der Komplexität des PBMC-Modells zusammenhängen, da die NK-Zellen hierin nur einen kleineren Anteil zwischen 5 – 15 % der Gesamtpopulation ausmachen. Neben diesen bestehen die PBMC aus weiteren Zelltypen wie den Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen und Neutrophilen Granulozyten (468). Diese interagieren über Zytokine wechselseitig untereinander sowie mit den NK-Zellen, sodass es durch gegenseitige Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen wie $IFN-\gamma$ insbesondere mit Makrophagen

und T-Zellen zu einer positiven Rückkopplungsschleife kommen kann. Das immunsuppressive Zytokinmilieu der TMU bewirkt über eine negative Rückkopplungsschleife einen antagonisierenden Effekt.

Es gilt jedoch zu berücksichtigen, dass die Heparine selbst die zytolytische Kapazität der NKZ in signifikantem Maße herabsetzen. Dieser beobachtete intrinsische Effekt korreliert auffälligerweise ebenfalls mit der Kettenlänge der vier kommerziellen Antikoagulantien, indem UFH die NKZ-Zytotoxizität am stärksten beeinträchtigt. Ein Erklärungsansatz für die Beobachtung könnte die hohe Bindungsaffinität der Heparine zu positiv geladenen Zytokinen und weiterer Oberflächenstrukturen der NK-Zellen sein. Die Bindungsfähigkeit von Heparinen an verschiedensten Zytokinen ist Inhalt verschiedener Untersuchungen der letzten zwei Jahrzehnte, aber aus struktureller Sicht sind hierfür nur ansatzweise klare Erkenntnisse für einzelne Komponenten publiziert. So wurde in einer Studie von Rajarathnam und Kollegen die Interaktion der Heparine mit den Chemokinen CXCR1 und CXCR2 adressiert und gezeigt, dass insbesondere die anionischen Sulfatgruppen des Heparins die basischen Aminosäuren Arginin (Arg) und Lysin (Lys) binden (469,470). Durch frühere Untersuchungen konnte eine spezifische Abfolge basischer Aminosäuren aus Arg und Lys sowie einer hydrophoben Aminosäure identifiziert werden, die nach ihren Entdeckern Cardin und Weintraub CW-Motiv benannt wurde. Das CW-Motiv ist für eine Vielzahl an elektrostatischen Interaktionen zwischen Heparinen und Proteinen verantwortlich (471).

Allerdings liefert das strukturell definierte CW-Motiv allein keine ausreichende Antwort auf die mannigfaltigen Heparin-Protein-Bindungen. In einer jüngeren Vergleichsstudie von Vallet et al. wurde das Interaktionspotenzial sämtlicher endogener Glykosaminoglykane (GAG) aufgezeigt und hinsichtlich der Anzahl der Bindungspartner und evaluiert. Hierbei wurde aufgezeigt, dass Heparin die höchste Anzahl an proteinischen Interaktionen aller endogenen GAG hat (472). Ebenfalls deckte sich der Befund mit früheren Untersuchungen, dass das CW-Motiv allein nicht ausreichend ist, eine solch hohe Zahl an Interaktionspartnern zu generieren. So sind neben dem CW-Motiv und den ionischen WW auch H-Brücken, van-der-Waals-Kräfte, polare Substituenten, Konformation und Kettenlänge des Moleküls für Interaktionen verantwortlich, auch wenn die elektrostatischen Interaktionen in der Intensität überwiegen (470,473,474). Indem vor allem das langkettige UFH einige sezernierte Chemokine und proinflammatorische Zytokine wie IFN- γ bindet, fehlt dieses zur autokrinen Stimulation der NK-Zellen. Ebenso wird die wechselseitige Kommunikation und Stimulation der PBMC untereinander durch Blockade der Rezeptoren herabgesetzt, was in diesem Ansatz zusätzlich die Zytolyse der NKZ beeinträchtigt.

Insgesamt untermauern die Befunde zur Stimulation der NK-Zytotoxizität unter NPP1-Inhibition auf Tumorzellen durch Heparine die Akzeptanz der EN NPP1 als möglichen Immuncheckpoint. Neben dem passiven antitumoralen Effekt über eine verminderte T_{reg} -Induktion zeigt dieses *in-vitro*-Versuchsmodell in Form der Zytolyse der K562 einen direkten antitumoralen Effekt. In weiteren Versuchen könnte intensiver analysiert werden, inwieweit die gesteigerte NK-Zytotoxizität auf den NK-Zellen allein oder auf einem möglichen wechselseitigen Synergismus mit anderen PBMC beruht.

5.7 Beeinflussung der IL-10-Sekretion durch den purinergen Metabolismus in der TMU

Zusätzlich zur CD4⁺ T-Zelldifferenzierung in immunsuppressive T_{reg} wurde mit Hilfe eines ELISA deren Aktivität unter verschiedenen Stimuli der TMU und der purinergen Signaltransduktion untersucht. Dies geschieht in Form der Quantifizierung der Freisetzung des Zytokins IL-10. Dieses fungiert als Suppressor anderer immunkompetenten CD4⁺ T-Zellen und insbesondere der antitumoralen T_H1-Zellen. Der Ansatz soll die Aktivität der induzierten T_{reg} nachweisen und somit die Befunde der Untersuchungen zur vorangegangenen T_{reg}-Induktion bekräftigen.

Analog zu den vorherigen immunologischen Untersuchungen wurde vor der Behandlung mit heparinisierten Tumorüberständen die Effekte der purinergen Signaltransduktion in Form von ADO und ATP auf die IL-10-Liberation der CD4⁺ T-Zellen in Medium untersucht. Das Resultat zur Evaluation der funktionellen Antipoden auf die T_{reg}-Aktivität ist in Abbildung 50 dargestellt.

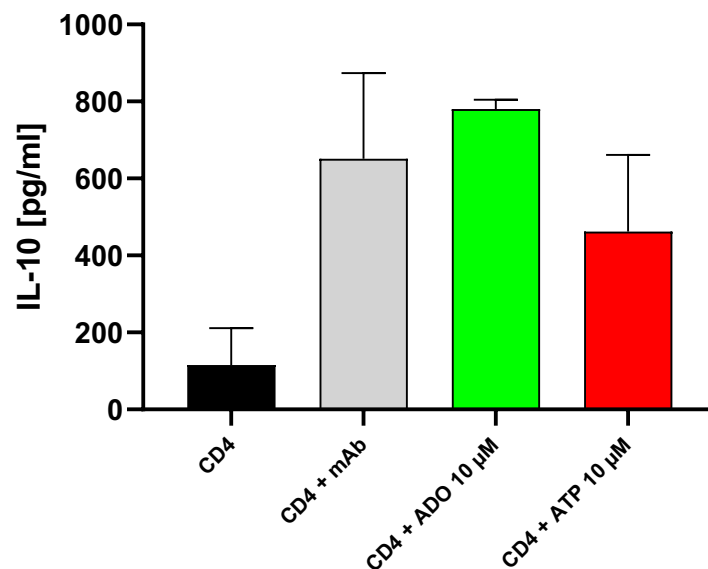


Abbildung 50: Zusammenfassung der ermittelten IL-10-Konzentration verschieden behandelter CD4⁺ T-Zellen. Nach der T-Zrellaktivierung durch einen Antikörpermix wurden diese zusätzlich mit ADO und ATP versetzt um die Auswirkung der purinergen Signaltransduktion zu bestimmen. Die Daten stellen die Mittelwerte mitsamt der SD für einen Ansatz N=3 dar.

Auffällig war, dass bereits die ruhenden T-Zellen einen geringen Ausstoß von IL-10 verzeichneten (115 pg/ml). Durch die Stimulation mit dem aktivierenden Antikörpermix wurde dieser entsprechend deutlich auf 651 pg/ml gesteigert. Die Zugabe von ADO bewirkte eine weitere Zunahme auf 780 pg/ml, die durch ATP jedoch auf 462 pg/ml abgesenkt wurde. Aufgrund der hohen Standardabweichungen wurden diese festgestellten Tendenzen allerdings nicht als statistisch signifikant gewertet.

Im Anschluss an den Vorversuch zur Analyse der purinergen Signaltransduktion auf die IL-10-Freisetzung der CD4⁺ T-Zellen wurde der Versuchsansatz durch Addition der Überstände um die Tumorkomponente ergänzt. Vor der Evaluation der nach 4.8.3 hergestellten U87-Überstände galt es, in einem Vorversuch eine potenzielle intrinsische Aktivität der Heparine und Fondaparinux auf die IL-10-Freisetzung zu evaluieren. Auch in diesem Versuchsmodell wurden die mit stimulierendem Antikörpermix (mAb) behandelten CD4⁺ als Bezugsgruppe definiert.

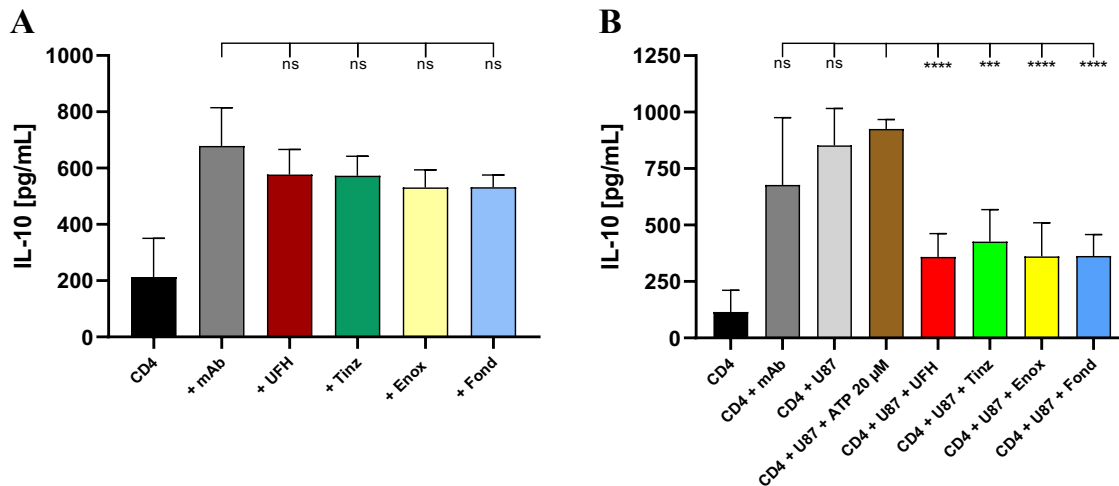


Abbildung 51: Graphische Darstellung der gemessenen IL-10-Konzentration der alleinig heparinisierten CD4⁺ Überstände (A) und der jeweils mit heparinisierten U87-Überstände behandelten CD4⁺ (B). Die Inkubation der CD4⁺ ausschließlich mit den Heparinen dient der Untersuchung potentieller intrinsischer Effekte auf die IL-10-Freisetzung. Die dargestellten Daten entsprechen den Mittelwerten ± SD aus N=4 Versuchen (A) und N=6 Versuchen (B). Die Signifikanz wurde mittels einer One-Way ANOVA und Dunnett-Post-hoc-Test bestimmt. ns: nicht signifikant; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$

Aus der Inkubation der CD4⁺ T-Zellen mit den drei Heparinen und Fondaparinux ergab sich eine leichte Reduktion der ermittelten IL-10-Konzentrationen in Relation zur Bezugsgruppe (Abbildung 51A). Diese Tendenz wurde bei allen vier getesteten kommerziellen Antikoagulantien festgestellt. Allerdings weist die veränderte IL-10-Freisetzung keine Signifikanz auf. Im Gegensatz zur CD4⁺ T-Zelldifferenzierung zeigten die Heparine in diesem Versuchsansatz ähnlich der Evaluation der NKZ-Zytotoxizität anhand eines PBMC-Modells eine leichte intrinsische Reduktion des betrachteten Surrogatparameters. Dies lässt sich möglicherweise auf die Affinität der Heparine zu positiv geladenen Proteinen und insbesondere Zytokine wie IL-10 zurückzuführen. Es ist jedoch hervorzuheben, dass die hierbei betrachtete intrinsische Reduktion der IL-10-Sekretion den gegenteiligen Effekt der verminderten NKZ-Zytotoxizität auf die Immunantwort zur Folge hat.

Diese Erkenntnis galt es für den Hauptversuch zu berücksichtigen. Die Behandlung mit U87-Überstand erzeugte eine verstärkte IL-10-Sekretion der CD4⁺ T-Zellen, die wiederum durch

eine Ergänzung mit 20 μM ATP leicht gesteigert wurde. Im Gegensatz hierzu fiel die IL-10-Sekretion der differenzierten CD4^+ T-Zellen bei den heparinisierten U87-Überständen deutlich von 925 pg/ml auf ~ 360 pg/ml ab. Auffällig ist, dass die jeweiligen gemessenen IL-10-Konzentrationen für UFH, Enoxaparin und Fondaparinux mit ~ 360 pg/ml im gleichen Bereich liegen. Einzig Tinzaparin verbleibt mit durchschnittlich 426 pg/ml auf einem leicht höheren Niveau, auch wenn der Unterschied zu den anderen Vertretern der kommerziellen Antikoagulantien nicht signifikant ausfällt.

Die deutliche Reduktion der IL-10-Produktion wurde in dem Ausmaß nicht erwartet, da diese stärker als die Tendenzen des vorgeschobenen Versuchsansatzes zur purinergen Signaltransduktion ausfiel. Die Reduktion des IL-10-Spiegels im Vorversuch kann partiell aus der Inkubation mit Heparinen als intrinsischer Effekt abgeleitet werden, da diese bekanntermaßen eine gewisse elektrostatisch begründete Affinität zu positiv geladenen Zytokinen besitzen. Aus diesem Grund lässt sich der deutliche Effekt des Hauptversuchs hauptsächlich auf die blockierte NPP1-Enzymaktivität zurückführen und kann in der Folge nicht allein aus der elektrostatischen Bindungsfähigkeit der Heparine resultieren. Die elektrostatische Absorption des IL-10 der Heparine bewirkt in diesem Falle einen zwar geringen, aber nicht zu vernachlässigenden Synergismus (472). Folglich steht während der richtungsweisenden Stimulation in der Differenzierung naiver CD4^+ T-Zellen weniger IL-10 zur Verfügung, sodass der Anteil der T_{reg} an der CD4^+ T_{eff} -Gesamtpopulation sinkt. In diesem Fall steht das gebundene/komplexierte IL-10 nicht mehr für die Bindung an den vorgesehenen Capture-Antikörper zur Verfügung. Intensivierte Untersuchungen explizit zur Aufklärung dieses Zusammenhangs stehen allerdings noch aus.

Ebenso bleibt es unklar, inwieweit die unterbundene NPP1-Enzymaktivität und purinerge Signaltransduktion alleinig die Reduktion des immunsupprimierenden IL-10 bewirkt, oder ob sich das Zytokinprofil der TMU in größerem Ausmaß von Immunsuppression in Richtung eines immunstimulatorischen, antitumoralen Milieus verschiebt.

5.8 Modulation des CD4⁺ Zytokinprofils durch Intervention des purinergen Metabolismus in der TMU

Die bisherigen Daten zur Untersuchung der tumoralen NPP1-Blockade durch die Heparine und Fondaparinux zeigten in Bezug auf die adaptive Immunantwort eine deutliche Reduktion der T_{reg} mitsamt deren immunsupprimierenden Zytokin IL-10 auf. Hinsichtlich der anderen Subtypen der effektorischen T_H-Zellen konnte bisher keine Aussage getroffen werden. Zur Evaluation, inwiefern die NPP1-Inhibition der Tumorzelllinie U87 neben der Reduktion der T_{reg}-Induktion und der IL-10-Sekretion zusätzlich zur Stimulation effektorischer T_H-Zellen und vor allem der antitumoralen T_H1-Zellen beiträgt, wurde eine Multiplex-Analyse durchgeführt. Entsprechend der Ausführungen in Kapitel 2.4 lassen sich die betrachteten Zytokine im Rahmen eines vereinfachten Modells der Aktivität einer Subpopulation der T_H-Zellen zuordnen, wobei IFN- γ die T_H1, IL-4 die T_H2, IL-17A die T_H17 und IL-10 die T_{reg} repräsentiert. Dabei können IFN- γ , IL-4, IL-17A vereinfacht als proinflammatorisch und IL-10 und TGF- β 1 als antiinflammatorisch sowie protumoral charakterisiert werden. Es gilt zu berücksichtigen, dass IFN- γ und IL-4 sowie IFN- γ und IL-10 in der CD4⁺ T-Zelldifferenzierung einen regulatorischen Antagonismus darstellen. Das Zytokin TGF- β 1 tritt als T_{reg}-Induktor ebenfalls antagonistisch gegenüber einer antitumoralen adaptiven T_H1-Immunantwort auf. Durch eine Kombination von TGF- β 1 in niedrigeren Konzentrationen und IL-6 wird jedoch eine Differenzierung in T_H17-Zellen angestoßen, was auf die Verwandtschaft zu den T_{reg} hindeutet. Somit stehen die CD4⁺ T_{eff}-Subpopulationen über verschiedene Stimuli in wechselseitiger Regulation, die von äußeren Einflüssen in der TMU gesteuert wird.

Ein hier nicht aufgeführter Vorversuch wurde durchgeführt, um mögliche intrinsische Effekte der Heparine sowie Purinderivate ADO und ATP auf die U87-Zellen zu betrachten. Es zeigte sich, dass die U87 Zellen das IFN- γ mit 0,1 ng/ml nur in sehr geringem Maße produzieren. IL-4 und IL-17A lagen mit 0,4 ng/ml nur leicht darüber. Auf diese drei Zytokine hatten auch die Behandlungen mit den Heparinen keine nennenswerten Auswirkungen. Unter Einfluss von ADO und ATP wurde IFN- γ tendenziell leicht reduziert, wohingegen die detektierte Konzentration von IL-17A unverändert blieb. Die Sekretion von IL-10 und TGF- β 1 fiel mit 0,5 ng/ml und respektive 0,65 ng/ml in etwa doppelt so hoch aus. Die Zugabe der Heparine zeigte wie zuvor keine Änderung der Parameter an. Erst durch die Behandlung mit ADO und ATP wurden die Zytokinspiegel bei IL-10 auf 0,68 ng/ml sowie 0,81 ng/ml bei TGF- β 1 erhöht. In einem weiteren Ansatz wurde untersucht, inwieweit die eingesetzten Heparine, Fondaparinux sowie ADO und ATP Effekte auf die Zytokinproduktion und -freisetzung der CD4⁺ T_{eff} besitzen. Zusätzlich wurde die Zytokinproduktion mit Zellmedium, den U87 und den

Ergebnisse und Diskussion

ruhenden CD4⁺ verglichen. Aufgrund der Tatsache, dass die verschiedenen Behandlungen keine nennenswerten Effekte auf die Expression und Sezernierung von IL-4 hatten, wurde auf dessen Darstellung in allen weiteren Graphiken verzichtet.

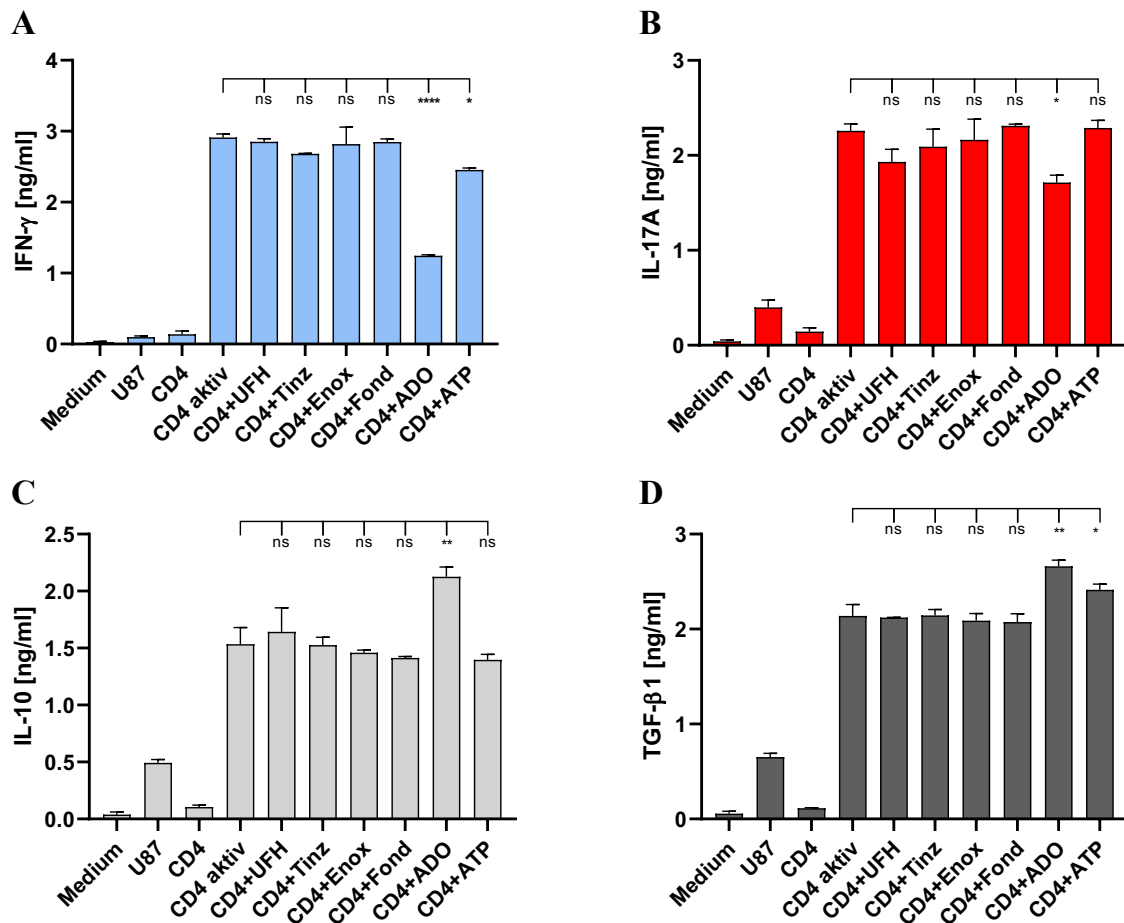


Abbildung 52: Graphische Darstellung der Konzentrationen der repräsentativen Zytokine der T_{eff}-Subpopulationen IFN-γ (A), IL-17A (B), IL-10 (C) sowie TGF-β1 (D) in Überständen aus verschiedenen behandelten CD4⁺ T-Zellkulturen zur Evaluation intrinsischer Effekte. Als Referenzbehandlung wurden die aktivierten CD4⁺ T-Zellen (CD4 aktiv) ausgewählt. Die dargestellten Daten entsprechen den Mittelwerten ± SD aus N=2 Versuchen. Die Signifikanz wurde mittels einer One-Way ANOVA und Dunnett Post-hoc Test bestimmt. ns: nicht signifikant; *: p<0,05; **: p<0,01; ****: p<0,0001

Hinsichtlich der Zytokinproduktion der CD4⁺ T-Zellen kann vermerkt werden, dass diese durch die Aktivierung und Differenzierung im Vergleich zu den naiven ruhenden CD4⁺ mindestens um den Faktor 10 (IL-10) und im Fall von IFN-γ und TGF-β1 bereits um den Faktor 20 steigt. Insgesamt liegt bei den aktivierten CD4⁺ IFN-γ mit 2,91 ng/ml über IL-17A mit 2,26 ng/ml und TGF-β1 mit 2,14 ng/ml. Dagegen fällt IL-10 mit einem gemessenen Gehalt von 1,54 ng/ml etwas ab. Werden die Behandlungen mit den Heparinen und Fondaparinux betrachtet, so sind kaum Unterschiede festzustellen. Stattdessen sind leichte Tendenzen zu beobachten, die bei IL-17A eine Reduktion des Zytokingehalts nach Kettenlänge der Heparine aufzeigen und

hinsichtlich IL-10 die umgekehrte Tendenz erkennen lassen. Bei IFN- γ und TGF- β 1 waren kaum bzw. keine Schwankungen der Zytokinkonzentrationen feststellbar.

Ein signifikanter Unterschied in der Zusammensetzung der Zytokinsekretion machte sich nach der Behandlung mit ADO 20 μ M bemerkbar. Der Gehalt der beiden proinflammatorischen Zytokine wurde im Falle des IFN- γ auf 1,24 ng/ml sehr stark und hinsichtlich IL-17A leicht auf 1,71 ng/ml reduziert. Umgekehrt verhielt es sich bei beiden antiinflammatorischen Zytokinen. Bezüglich IL-10 wurde eine gesteigerte Zytokinsekretion auf 2,13 ng/ml und hinsichtlich TGF- β 1 auf 2,66 ng/ml detektiert. Neben dem Nukleosid wurde ATP als dessen physiologischer Antagonist der purinergen Signaltransduktion untersucht. Unter der 20 μ M ATP-Inkubation reduzierte sich der IFN- γ -Gehalt leicht auf 2,46 ng/ml, wohingegen IL-17A unbeeinflusst blieb. Bezogen auf TGF- β 1 konnte abermals ein gegenteiliger Effekt zu IFN- γ beobachtet werden, dessen Konzentration signifikant auf einen Wert von 2,41 ng/ml anstieg. Im Gegensatz dazu ließ sich bei IL-10 keine signifikante Änderung feststellen.

Somit kann nach Abschluss der Voruntersuchungen vermerkt werden, dass die Heparine keine oder nur geringe intrinsische Aktivitäten hinsichtlich der Zytokinproduktion der CD4⁺ T_{eff} aufweisen. Diese lassen sich möglicherweise auf elektrostatische WW zurückführen, die bereits beim IL-10-ELISA auftraten. Es ist auffällig, dass der Effekt dort größer zu sein schien als im Multiplex. Dies kann möglicherweise damit erklärt werden, dass im ELISA Avidin anstatt Streptavidin zur Kopplung eines Biotin-Protein-Konjugats eingesetzt wurde. Avidin weist durch mehr Basenfunktionen bei neutralem pH-Wert im Verhältnis zu seinem Homologon Streptavidin deutlich mehr positive Ladungen auf. Dieser Umstand bewirkte möglicherweise eine Komplexierung der negativ geladenen Heparinketten durch das positive geladene, basische Avidin-MRP-Konjugat, was folglich zu einer erhöhten falsch-positiven Detektion führt (460). Im Vergleich zu diesem Befund war der Einfluss von ADO recht deutlich zu erkennen und bestätigte somit die gewonnenen Erkenntnisse des IL-10 ELISA. Ebenfalls wurde ein erstes Indiz darauf gegeben, dass in einer reinen CD4⁺ T_{eff}-Population vor allem zwischen IFN- γ auf der einen sowie IL-10 und TGF- β 1 auf der anderen Seite ein funktioneller Antagonismus besteht. Inwieweit die wechselseitige Regulation der genannten Zytokine auch unmittelbar IL-17A beeinflusst, bedarf weitergehender Untersuchungen. Das Nukleotid ATP bewirkte dahingehend kaum Effekte auf das Zytokinemilieu. Lediglich die leichte Reduktion von IFN- γ und die Steigerung von TGF- β 1 könnten ein Indiz auf eine schwache EN-Aktivität innerhalb der CD4⁺ T_{eff}-Population sein.

Nach diesen gewonnenen Erkenntnissen galt es, der eigentlichen Fragestellung der tumoralen NPP1-Aktivität und deren Auswirkungen auf die CD4⁺ T_{eff} nachzugehen. Hierzu wurden

Ergebnisse und Diskussion

Überstände der U87 mit den drei Heparinen und Fondaparinux in Kokultivierung mit ATP 20 μM generiert (Kap.4.8.3), bevor diese auf naive CD4^+ T-Zellen gegeben wurden. Als Referenzbehandlungen, um die möglichen Auswirkungen der Heparin-modulierten NPP1-Blockade auf die komplexe CD4^+ T_{eff} -Population zu porträtieren, wurden die Behandlung mit U87-Überstand allein und der Koinkubation mit ATP 20 μM festgelegt. Als Bezugspunkt der Statistik wurde allein die Behandlung [CD4+U87+ATP] festgesetzt. Der Vollständigkeit halber wurde eine weitere Koinkubation aus U87 und ADO 20 μM als zusätzliche Referenzbehandlung hinzugefügt. Zur verbesserten Übersicht und erleichterten Einordnung des Effektes der Heparine wurden die Zytokinmilieus der unbehandelten aktivierten CD4^+ T_{eff} ebenfalls aufgeführt. Die Ergebnisse dieses Versuchsdesigns sind in Abbildung 53 aufgeführt.

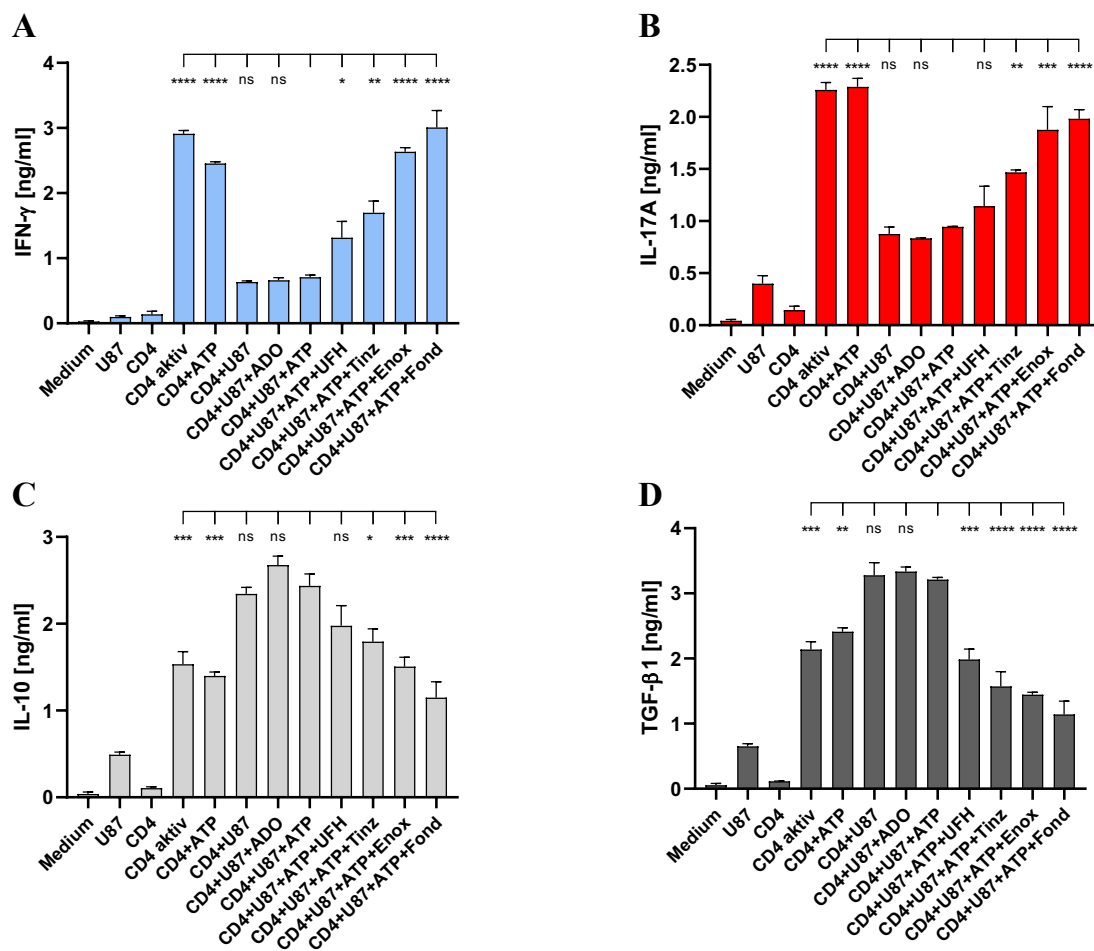


Abbildung 53: Graphische Darstellung der Konzentrationen der repräsentativen Zytokine der T_{eff} -Subpopulationen $\text{IFN-}\gamma$ (A), IL-17A (B), IL-10 (C) sowie $\text{TGF-}\beta 1$ (D) in Überständen aus verschiedenen behandelten CD4^+ T-Zellkulturen zur Evaluation immunonkologischer Effekte der Heparine durch die NPP1-Inhibition. Als Referenzbehandlung wurden die CD4^+ mit der Koinkubation aus U87 und ATP 20 μM ausgewählt. Die dargestellten Daten entsprechen den Mittelwerten \pm SD aus $N=2$ Versuchen. Die Signifikanz wurde mittels einer One-Way ANOVA und Dunnett-Post-hoc-Test bestimmt. ns: nicht signifikant; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$

Versetzte man die $CD4^+$ T_{eff} mit U87-Überstand, war eine starke Veränderung des Zytokinmilieus zu beobachten. Die Sekretion des proinflammatorischen, antitumoralen $IFN-\gamma$ wurde in einem deutlichen, signifikanten Maßstab von 2,91 ng/ml auf 0,64 ng/ml reduziert. Dies galt ebenfalls hinsichtlich IL-17A, das von 2,26 ng/ml auf einen Wert von 0,88 ng/ml abfällt. Im Gegenzug stiegen die gemessenen Konzentrationen der antiinflammatorischen, protumoralen Zytokine für IL-10 von 1,54 ng/ml auf 2,34 ng/ml und betreffend TGF- β 1 von 2,14 ng/ml auf 3,28 ng/ml an. Auch die weiteren Referenzbehandlungen mit den Zusätzen ADO und ATP gaben ein ähnliches Bild ab. Dabei liegen die Werte für $IFN-\gamma$ mit 0,7 ng/ml bei beiden Behandlungen auf demselben signifikant niedrigen Niveau, konnten dieses jedoch nicht unterschreiten. Die detektierten Gehalte von IL-17A divergierten zwischen den drei Behandlungen mit einer Schwankungsbreite von 0,1 ng/ml ebenfalls nur unwesentlich. Diese Tendenz wurde bezüglich IL-10 nicht bestätigt. Im Falle des antiinflammatorischen Zytokins führten die Zusätze ADO und ATP zur deutlichen Steigerung der Zytokinsekretion um 0,9 – 1,1 ng/ml im Verhältnis zu den 0,8 ng/ml resultierend aus der alleinigen U87-Behandlung (Abb. 53C). Gegensätzlich verhielt sich in diesem Fall TGF- β 1, das analog zu $IFN-\gamma$ und IL-17A unter den Zusätzen ADO und ATP nur minimale Änderungen aufwies.

Nimmt man nun den Einfluss der Heparine auf die NPP1-Inhibition als Aspekt auf das Zytokinmilieu hinzu, so werden starke Veränderungen deutlich. Die beiden proinflammatorischen Zytokine $IFN-\gamma$ und IL-17A erfahren unter der zusätzlichen Inkubation mit Heparin eine deutliche Steigerung ihrer Sekretion. Bezüglich $IFN-\gamma$ konnte für UFH und Tinzaparin eine Steigerung auf 1,31 ng/ml und 1,70 ng/ml verbucht werden. Dieser Effekt wurde unter Präsenz von Enoxaparin und Fondaparinux mit detektierten Werten von 2,63 ng/ml und 3,0 ng/ml deutlich verstärkt beobachtet (Abb. 53A). In letzterem Ansatz wurde damit sogar das Ausgangsniveau der unbehandelten aktivierten $CD4^+$ T_{eff} erreicht. Dieselbe Tendenz konnte auch hinsichtlich IL-17A beobachtet werden, auch wenn diese nicht in derselben Intensität ausgeprägt war. Hierbei wurde für UFH und Tinzaparin ein Anstieg auf 1,14 ng/ml und 1,47 ng/ml vermerkt. Bei Enoxaparin sowie Fondaparinux stieg die Sekretion ähnlich $IFN-\gamma$ auf höhere Niveaus von 1,88 ng/ml und 1,98 ng/ml an. Das detektierte Aufkommen der beiden antiinflammatorischen Zytokine und physiologischen Antagonisten IL-10 und TGF- β 1 verhielt sich unter der Kokultivierung der Heparine reziprok zu $IFN-\gamma$ und IL-17A. So fiel der Gehalt von IL-10 unter UFH und Tinzaparin auf 1,98 ng/ml und 1,79 ng/ml ab. Die beiden Werte wurden durch die Behandlung mit Enoxaparin und Fondaparinux mit 1,51 ng/ml und 1,15 ng/ml deutlich unterboten. Selbige Tendenz wurde ebenfalls bezüglich TGF- β 1 festgestellt. Bereits durch Inkubation mit UFH entstand mit 1,98 ng/ml im Aufkommen von

TGF- β 1 ein größeres Delta zur Referenzbehandlung als bei IL-10. Für die beiden Vertreter der LMWH wurden ebenfalls verringerte Konzentrationen von 1,57 ng/ml und 1,45 ng/ml im Überstand detektiert. Fondaparinux wies erneut die deutlichste Reduktion mit einem detektierten Wert von 1,14 ng/ml auf.

Insgesamt wirkte sich die Koinkubation der U87-Zellen mit ATP und Heparin sehr deutlich auf die Zusammensetzung des CD4⁺ T_{eff}-Zytokinmilieus aus. Ebenfalls auffällig war die wechselseitige Regulatorik der proinflammatorischen und antiinflammatorischen Zytokine, die die Aktivität ihrer jeweiligen CD4⁺ T_{eff}-Subpopulation innerhalb dieses Modells repräsentieren. Hierbei wurde der immunregulatorische Antagonismus der CD4⁺ T_{eff}-Subpopulationen und ihrer Zytokine besonders deutlich. Als wichtigster Aspekt stellt sich die Effektivität der NPP1-Inhibition der Heparine heraus, da sich anhand der Daten ein direkter Zusammenhang zwischen der NPP1-Aktivität und der CD4⁺ gesteuerten, antitumoralen Aktivität der adaptiven Immunantwort ableiten lässt. Dieser Befund sticht insbesondere dadurch hervor, dass die detektierten Gehalte von IFN- γ und IL-17A in demselben Maße ansteigen wie die Effektivität der NPP1-Blockade der vier Testverbindungen. Hiermit kommt der Effektivität der NPP1-Blockade und der daraus resultierenden ADO-Reduktion in Bezug auf die CD4⁺ T-Zelldifferenzierung und der antitumoralen Funktionalität der CD4⁺ T_{eff} eine übergeordnete Rolle zu.

Aus der CE-Analytik ergab sich abgestuft nach der Potenz zur Inhibition die Reihenfolge Fondaparinux, Enoxaparin, Tinzaparin und UFH, die sich umgekehrt in der gesteigerten Expression und Sekretion von IFN- γ ausdrückt. Somit ist anhand dieses *in-vitro*-Modells ein Nachweis erbracht, dass nicht nur die Anzahl der T_{reg} und deren Aktivität (IL-10) abnimmt, sondern im Zuge dessen auch die Aktivität der T_H1-Zellen (IFN- γ) zunimmt. Ebenfalls bemerkenswert ist der Umstand, dass neben IFN- γ auch hinsichtlich IL-17A dieselben Effekte zu verbuchen sind. Dies spielt insofern eine Rolle, da IL-17A und den T_H17 ohne deren ausführliche Analyse keine eindeutige Rolle in der TMU zugewiesen werden kann. Für diesen Subtyp wurden in der Literatur sowohl protumorale als auch antitumorale Effekte beschrieben (269,270). Dieser Umstand könnte unter anderem aus dem schwankenden TGF- β 1-Spiegel resultierend durch die Heparinbehandlungen resultieren. Denn einerseits differenzieren naive T-Zellen unter einem geringeren TGF- β 1-Spiegel in Kombination mit IL-6 bevorzugt in T_H17-Zellen, wohingegen unter hohen Konzentrationen T_{reg} entstehen. Des Weiteren könnte eine veränderte Zusammensetzung des CD4⁺ T-Zytokinmilieus ein Stimulus für das plastische Verhalten der T_H17 und T_{reg} darstellen. Untersuchungen zeigten, dass die beiden Subtypen nach einem ausreichend langen und persistenten Stimulus entgegen früheren Thesen ineinander

umwandelbar waren (475). Ob der Inkubationszeitraum von 96 h, wie für die naiven CD4⁺ T-Zellen und U87-Überstände veranschlagt, für eine solche Entwicklung lang genug ist, bleibt fraglich. Somit dürfte die Differenz hauptsächlich von der variablen Verfügbarkeit des TGF- β 1 während der CD4⁺ T-Zelldifferenzierung abhängen. Vor dem Hintergrund, dass sich die Aktivität der janusköpfigen TH17-Zellen unter dem entsprechenden Zytokinstimulus in Richtung einer antitumoralen TH1-Aktivität ändert, erscheint die Fragestellung im Kontext eines immunstimulatorischen Effektes als relevant. Hierzu könnte anhand einer Untersuchung der Koexpression der determinierenden Transkriptionsfaktoren ROR γ T und FoxP3 oder ROR γ T und T-bet der Immuntypus der TH17 und das plastizitätsbestimmende Zytokinmilieu näher bestimmt werden (475). Umgekehrt gilt dieser Effekt auch für das plastische Verhalten der immunsuppressiven T_{reg}, die sich unter dem entsprechenden Zytokinstimulus einer modifizierten TMU zu TH17 mit antitumoraler TH1-Aktivität reprogrammieren lassen (283,476,477).

Die elektrostatischen WW könnten bezüglich des Abfangens der Zytokine durch Heparine eine zusätzliche Rolle spielen. Da hierbei unterschiedliche Affinitäten zu den einzelnen Zytokinen vorliegen, könnte dieser Effekt Auswirkungen auf die Zusammensetzung des Zytokinmilieus haben. Zur Verifizierung dieser Thesen wären weitergehende Untersuchungen hinsichtlich verschiedener Affinitäten der Heparine zu einzelnen Zytokinen vonnöten.

Neben den Heparinvertretern wurden zwei weitere Verbindungen aus der Substanzklasse der vollsynthetischen Heparinmimetika als Vergleich herangezogen. Hinsichtlich der Heparinmimetika wurden bereits verschiedene immunonkologische Effekte auf Basis der Thrombozytenaktivierung beschrieben. So demonstrierten Gockel et al. eine stärkere Reduktion der T_{reg} innerhalb der CD4⁺ T_{eff}-Population durch das Zusammenspiel aus Heparinmimetika und Thrombozyten als durch Heparine. Dieser Befund wurde ebenfalls anhand der Reduktion des immunsuppressiven Zytokins IL-10 bestätigt (183).

Daher war es die Zielsetzung zu analysieren, inwiefern der immunregulatorische Effekt durch eine mögliche NPP1-Inhibition der Mimetika auch auf ein breiteres Zytokinmilieu des CD4⁺ T_{eff}-Zellsystem übertragbar war. Hierzu wurden die bekannten Überstände der U87 mit zwei ausgewählten Heparinmimetika versetzt, die Strukturanaloga darstellen, und zusätzlich in Präsenz von ATP koinkubiert. Vereinfachend wurden die beiden Verbindungen nach ihrer numerischen Listung in der Substanzbibliothek als Derivat 46 und 47 und entsprechend ihrem Molekulargewicht von 20 kDa als 46-20 und 47-20 bezeichnet. Dabei handelt es sich um synthetische Polymere, die aus alternierenden Monomeren der Itaconsäure (IA) und Natrium-4-Styrenesulfonat im Verhältnis 1:1 bei 46-20 und 2:1 bei 47-20 aufgebaut die Heparinstruktur

Ergebnisse und Diskussion

simulieren. Die eingesetzten Konzentrationen zur Generierung der Überstände betrug 20 μ M. Die Proben wurden wie bei den Heparinbehandlungen mit analog generierten Referenzen statistisch verglichen. Die Daten sind in Abbildung 54 aufgeführt.

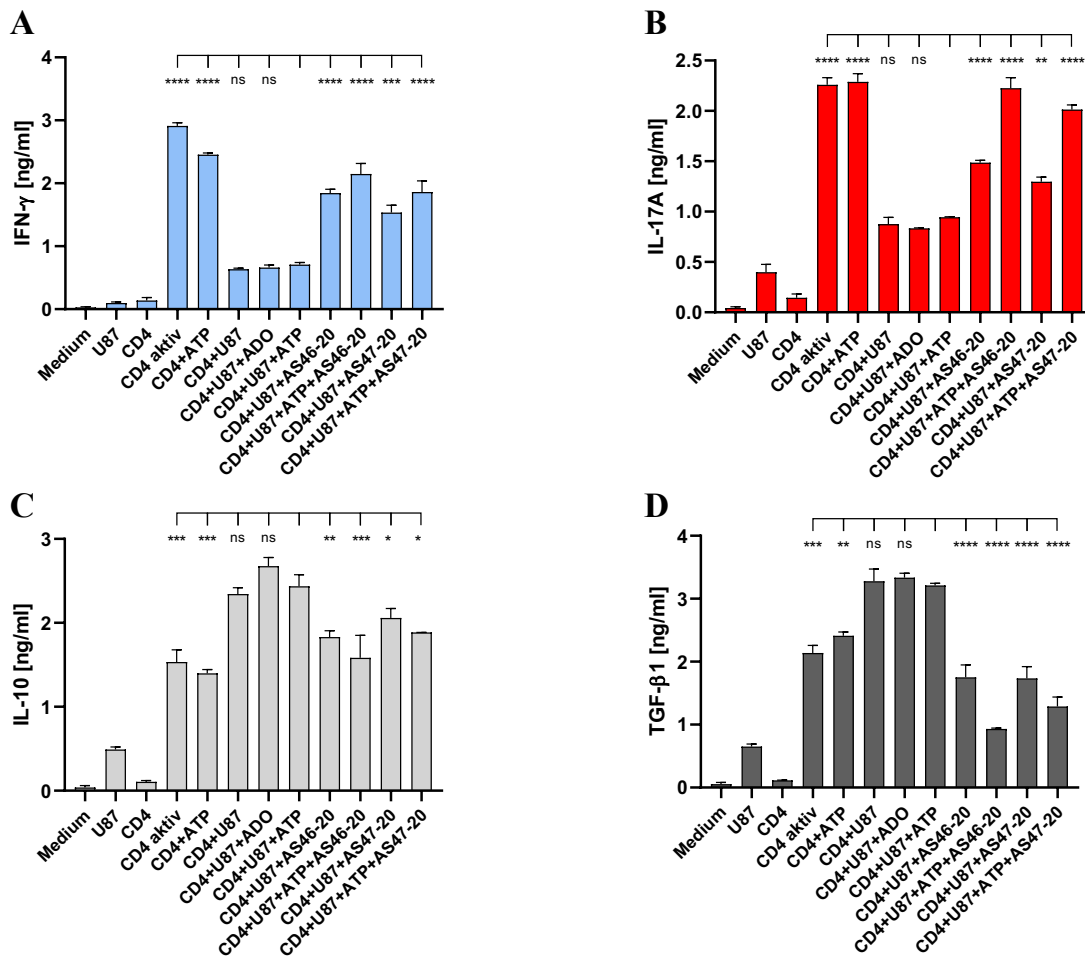


Abbildung 54: Graphische Darstellung der Konzentrationen der repräsentativen Zytokine der T_{eff}-Subpopulationen IFN- γ (A), IL-17A (B), IL-10 (C) sowie TGF- β 1 (D) in Überständen aus verschiedenen behandelten CD4⁺ T-Zellkulturen zur Evaluation immunologischer Effekte der Heparine durch die NPP1-Inhibition. Als Referenzbehandlung wurde daher die CD4⁺ mit der Kombination aus U87 und ATP 20 μ M ausgewählt. Die dargestellten Daten entsprechen den Mittelwerten \pm SD aus N=2 Versuchen. Die Signifikanz wurde mittels einer One-Way ANOVA und Dunnett-Post-hoc-Test bestimmt. ns: nicht signifikant; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$

Als erste Information kann die erneut gegenläufige Tendenz der proinflammatorischen Zytokine IFN- γ und IL-17A gegenüber den antiinflammatorischen Zytokinen IL-10 und TGF- β 1 extrahiert werden. Jedoch ist es offensichtlich, dass anders als bei den Heparinen bereits die Inkubation der CD4⁺ T-Zellen allein mit U87-Überstand und Mimetikum auf der inflammatorischen Seite eine signifikante Steigerung und auf der immunsuppressiven eine Reduktion bewirkte. So stiegen die detektierten Gehalte vor allem von IFN- γ deutlich an, wohingegen dieser Effekt bei IL-17A eher moderat ausfiel.

Bezüglich der Zytokinreduktion von IL-10 und TGF- β 1 ließen sich unterschiedlich ausgeprägte Intensitäten feststellen. So sank der Spiegel von TGF- β 1 im Vergleich zu IL-10 wesentlich stärker ab und wurde in etwa halbiert. Das Mimetikum 46-20 wies für alle betrachteten Zytokine etwas stärkere Effekte als 47-20 auf. Zieht man zu diesen Befunden die Koinkubation mit ATP hinzu, wird ersichtlich, dass der bisherige Effekt hinsichtlich des Zytokinmilieus unter Präsenz der Mimetika abermals verstärkt wird. In Bezug auf IFN- γ und IL-10 fällt die Differenz durch die zusätzliche ATP-Koinkubation deutlich geringer aus. Bezüglich IL-17A und TGF- β 1 kann erneut ein gegenläufiger Effekt vermerkt werden. So nahm der detektierte IL-17A-Gehalt durch die Koinkubation unter beiden Mimetika und ATP um das Doppelte zu. Betreffend TGF- β 1 wurde eine starke Reduktion vor allem durch die Koinkubation von 46-20 mit ATP erzielt. Abermals wurde durch die Koinkubation von 46-20 die deutlicheren Effekte im Vergleich zu 47-20 verbucht.

Da im Gegensatz zu den Heparinen keine Daten hinsichtlich der EN-Blockade vorliegen, können die resultierenden Effekte nicht unmittelbar auf die Inhibition von NPP1 zurückgeführt werden. Jedoch geben die stärkeren Effekte unter Koninkubation von ATP mögliche Indizien, dass NPP1 und die purinerge Signaltransduktion neben weiteren Aspekten eine relevante Rolle zukommt. Wahrscheinlicher ist, dass unterschiedlich starke elektrostatische WW mit den Zytokinen und die daraus resultierenden Konsequenzen jedoch ausschlaggebender sind. Des Weiteren ist es offensichtlich, dass im Verhältnis zu den Heparinen neben IFN- γ vor allem IL-17A stark induziert wird. Dies könnte damit begründet werden, dass unter den Mimetika die Aktivität der T_{reg} mit IL-10 weniger stark gesenkt und somit T_H1 mit IFN- γ etwas stärker antagonisiert wird. In der Folge werden durch den wesentlich niedrigeren TGF- β 1-Spiegel möglicherweise in Kombination mit IL-6 die naiven CD4⁺ T-Zellen verstärkt zur Differenzierung in T_H17 angeregt, worauf die verstärkte Sekretion von IL-17A hindeutet. Ähnlich zur vorgelagerten Fragestellung mit den Heparinen bedarf es hier einer tieferen Analyse bspw. der TMU, des Zytokinmilieus und der Transkriptionsfaktoren, um einen möglichen phänotypischen Funktionsshift der T_H17 und T_{reg} zu charakterisieren (475–477).

Insgesamt lässt sich abschließend an die Untersuchung der Multiplexanalyse anhand der *in-vitro*-Modellierung der TMU festhalten, dass eine möglichst erfolgreiche NPP1-Inhibition einen relevanten Einfluss auf das Zytokinmilieu der CD4⁺ T-Zellen hat. So wurden nicht nur die zuvor gewonnenen Eindrücke bestätigt, dass eine reduzierte Anzahl an T_{reg} (5.6) und IL-10 (5.7) auf der verringerten Enzymaktivität beruhen, sondern auch, dass den antitumoralen Komponenten der Immunantwort mehr Freiraum gegeben wurde. In demselben Maße wie die NPP1-Aktivität durch die Inhibitoren zurückging, reduzierte sich die Sekretion von IL-10 durch

die immunsuppressiven T_{reg} . In der Folge stieg die Expression und Sekretion von $IFN-\gamma$, dessen Hauptquelle die antitumoralen T_H1 darstellen. Somit wurde im Rahmen dieser *in-vitro*-Modellierung der TMU ein unmittelbarer Bezug zwischen der metabolischen Aktivität der EN-Achse auf Tumorzellen und der Effektivität der adaptiven Immunantwort hergestellt. Ein weiterer Aspekt ist die Reduktion von $TGF-\beta_1$, die sich sowohl in der Aktivität der T_{reg} als auch der T_H17 niederschlägt. Welche Rolle die T_H17 in der TMU spielen und inwiefern sie entweder die antitumoralen T_H1 oder die T_{reg} unterstützen, bleibt vorerst unklar und müsste zur Verifikation der These tiefergehend analysiert werden. Selbiges kann hinsichtlich der Plastizität der T_{reg} in Richtung der T_H17 in der TMU vermerkt werden. Des Weiteren ist es bemerkenswert, dass die Sekretion von IL-4 durch die Behandlungen kaum beeinflusst wird.

Neben den Heparinen sowie Fondaparinux erfuhr das Zytokinmilieu unter den beiden Heparinmimetika ebenfalls eine deutliche Veränderung, deren Ursache nur partiell auf den reduzierten ATP-Abbau zurückzuführen ist. Es liegt nahe, dass andere nicht untersuchte Parameter hier den Ausschlag gaben. Jedoch ermöglicht der Ansatz eine breitere Analyse des Zytokinmilieus und Evaluation der immunonkologischen Auswirkungen der NPP1-CD73-Achse auf das $CD4^+$ T-Zellsystem.

6 Zusammenfassung

Das Ziel der Arbeit war es, neue Beiträge über die potenzielle Verknüpfung des Purinmetabolismus in Abhängigkeit der EN-Aktivität zur Aufklärung der Immunevasion von Tumoren sowie deren Resistenzentwicklung gegenüber Zytostatika zu leisten. Hierzu wurde als verbindender Aspekt der beiden Fragestellungen der Purinmetabolismus in Form der Enzymklasse der Ektonukleotidasen sowie deren Substrat ATP und dessen Abbauprodukt ADO adressiert. Schwerpunktmäßig sollte mittels diverser Verbindungen aus der Substanzklasse der Sulfopolysaccharide das Potenzial zur NPP1-Blockade ermittelt werden. Ziel war es, die Purinhomöostase unabhängig vom bekannten CD39 in Richtung eines proinflammatorischen antitumoralen Milieus zu verschieben und so die Immunevasion zu unterbinden.

Als Grundlage diente ein Tumorzellmodell, das durch die konzertierte, stabile Expression der beiden EN NPP1 und CD73 die direkte Bildung des immunsuppressiven ADO aus ATP ermöglicht. Dabei galt es zu berücksichtigen, dass die parallele Expression von NPP1 und CD39 möglichst ausgeschlossen ist, um das Verhalten des Zellmodells hinsichtlich der Untersuchung von NPP1-Inhibitoren simpel zu halten. Mittels qPCR wurde eine adäquate Zelllinie anhand der U87 Glioblastomzellen identifiziert. Es erscheint auf den ersten Blick widersprüchlich, Glioblastomzellen als Therapieansatz für anionische Makromoleküle heranzuziehen, da diesen der Zugang in einem vollständigen Organismus durch die Blut-Hirn-Schranke verwehrt wird. Jedoch zeigten verschiedene Studien, dass Heparine insbesondere als LMWH und weitere kurzkettigere Derivate diese passieren können (478,479). Zusätzlich wurden die TNBC MDA-MB-231 aufgrund ihrer parallelen Expression von CD39, NPP1 und CD73 als geeignet für Untersuchungen einer Korrelation der EN-Expression und Zytostatikaresistenz befunden. Nachdem mit den U87 eine adäquate Zelllinie identifiziert wurde galt es, ein zweckmäßiges, robustes Assaysystem zu entwickeln. Dies gelang in Form der CE, die durch die funktionelle Modifikation mit der MEKC eine simultane Analytik der anionischen Moleküle und EN-Substrate ATP und AMP sowie des immunonkologisch relevanten Produkts und Neutralstoffs ADO ermöglichte. Mit Hilfe einer cDNA-Sequenzanalyse wurde sichergestellt, dass über den Verwendungszeitraum der Zelllinie einerseits eine stabile Expression von NPP1 gewährleistet war, andererseits etwaige Mutationen mit nachfolgender Funktionsbeeinträchtigung des Enzyms exkludiert wurden.

Betrachtet man die breitgefächerte Auswahl an getesteten möglichen NPP1-Inhibitoren am Zellmodell der U87, so wird deutlich, dass die Substanzklasse der Sulfopolysaccharide potente Eigenschaften hinsichtlich der NPP1-Hemmung besitzen. So weisen Verbindungen unterschiedlichster Substanzklassen und Heterogenität der Strukturen eine Varianz an

Zusammenfassung

inhibitorischer Effektivität auf. So stachen als besonders potent Algenextrakte, LMWH und das Pentasaccharid Fondaparinux hervor. Auch chemische Abwandlungen und Modifikationen der Heparine wie die Reduktion der Antikoagulation beeinträchtigten das inhibitorische Profil auf NPP1 kaum. Auch wenn mittels *in-vitro*-Zellmodell keine direkten Einblicke in die Struktur-Wirkungs-Beziehungen der NPP1-Inhibition gewonnen werden konnten, lässt sich resümieren, dass die vorangegangenen Annahmen von Hosoda et al. zu Heparin und seinen GAG-Abkömmlingen bestätigt wurden (402). Somit wurden auf der Basis der Potenz insbesondere die Heparine zu weitergehenden Untersuchungen hinsichtlich der immunonkologischen Auswirkungen herangezogen, die eine mögliche Einordnung von NPP1 als Immuncheckpoint erlauben.

Wird auf den Zusammenhang zwischen einer Resistenzentwicklung aufgrund einer EN-Enzyminduktion durch Zytostatikaexposition geschaut, lässt sich ein gemischtes Fazit ziehen. An den Ovarialkarzinomzellpärchen A2780/A2780cis und W1/W1CR ließ sich bei der jeweils inhärent cisplatinresistenten Variante in Relation zum jeweiligen Wildtyp eine leicht erhöhte Expression bezüglich von CD73 bzw. NPP1 feststellen. Allerdings wurde entweder keine vollständige Enzymkaskade zum ATP-Abbau exprimiert, oder es wurde bezüglich anderer EN keine Differenz zwischen Wildtyp und resistenitem Subtyp ermittelt. Auch die wiederholte Exposition mit Cisplatin bei beiden Zellpärchen hatte keine Induktion der EN-Expression zur Folge. Somit war eine vollständige Betrachtung der Purinhomöostase in Form von ATP und ADO in Bezug auf die Resistenz hier nicht möglich. Gegensätzlich hierzu verhielten sich die TNBC MDA-MB-231 unter ähnlichen Bedingungen. So wurde die EN-Expression unter Doxorubicin leicht und vor allem unter dem bekannten Resistenzfaktor Kollagen stark induziert. Durch die Kombination beider Faktoren wurde die Expression insbesondere von NPP1 zusätzlich induziert. Auf Basis dessen wurde über die Blockade der NPP1-Aktivität und die purinerge Signaltransduktion mit POM-141 eine Reduktion der Resistenz aufgezeigt und eine Korrelation mit dem ABC-Transportersystem ausgeschlossen.

Zur Fokussierung der Fragestellung, inwiefern es sich bei der alternativen NPP1-CD73-Achse und der purinergen Signaltransduktion um einen Immuncheckpoint handelt, wurden die CD4⁺ T-Zelldifferenzierung und NK-Zytotoxizität als zentrale, antitumorale Mechanismen der adaptiven und angeborenen Immunantwort analysiert. Betreffend der immunsuppressiven T_{eff}-Subpopulation T_{reg} wurde durch die Heparinintervention gegen NPP1 eine signifikante Reduktion der T_{reg}-Anzahl an der Gesamtpopulation ermittelt. Es wurde ebenfalls aufgedeckt, dass sich die Aktivität der T_{reg} in Form ihrer IL-10 Sekretion analog zu ihrer Anzahl absenkt. Bemerkenswerterweise korrelierte die Stärke des Effektes mit der Effektivität zur NPP1-

Hemmung. Hinsichtlich der NK-Zytotoxizität wurde ebenfalls eine signifikante Restimulation der NK-Zytotoxizität innerhalb einer PBMC-Population basierend auf der Heparinintervention gegen NPP1 detektiert. Auch hier kann resümierend geschlussfolgert werden, dass die Stärke der Immunstimulation mit der Effektivität der Substanzen zur NPP1-Inhibition korreliert. Somit werden zwei entscheidende antitumorale Mechanismen des Immunsystems durch gezielte Beeinflussung der NPP1-Funktion als Urheber der purinergen Degradation in der TMU wiederhergestellt.

Der Einfluss der NPP1-Hemmung auf den CD4⁺ Subtyp T_{reg} wurde bereits im Rahmen des zellulären Modells demonstriert. Um jedoch das Gesamtbild hinsichtlich der CD4⁺ T-Differenzierung und damit die Funktionalität der zellulären adaptiven Immunantwort vollständig zu illustrieren, war es notwendig, weitere Mediatorstoffe repräsentativ für ihren T_H-Subtyps in die Betrachtung einzuschließen. Die Multiplex-Analyse ermöglichte über die fünf repräsentativen Zytokine IFN- γ , IL-4, IL-17A, IL-10 und TGF- β 1 die Bewertung der Aktivität der CD4⁺ T_{eff}-Subtypen T_H1, T_H2, T_H17 sowie der T_{reg}. Die Behandlung der CD4⁺ T-Zellen mit U87-Überstand erzeugte eine deutliche Reduktion der proinflammatorischen Zytokine IFN- γ und IL-17A und in der Konsequenz einen Anstieg der protumoralen IL-10 und TGF- β 1. Dagegen wurde nach der Heparinintervention eine deutliche Steigerung der proinflammatorischen Zytokine IFN- γ und IL-17A sowie die entsprechende Reduktion der protumoralen IL-10 und TGF- β 1 ermittelt. Bemerkenswerterweise spiegelte sich die Effektivität zur NPP1-Hemmung der Heparine und Fondaparinux in demselbem Ausmaß auch in der Reaktivierung der antitumoralen T_H1-Zellen als IFN- γ wider. Somit zeigt sich anhand des *in-vitro*-Modells die immunonkologische Potenz der Heparine durch Blockade der NPP1-Inhibition, auch wenn weitere Aspekte hinsichtlich der T_H17 und T_{reg} vorerst unbeantwortet bleiben. Ebenso würde eine breitere Analyse des Zytokinmilieus ein vollständigeres Bild zur Charakterisierung eines pro- oder antitumoralen Shifts der Immunantwort durch die NPP1-Inhibition liefern. Der Vergleich mit den Heparinmimetika zeigt abermals auf, dass dieser immunonkologische Effekt nicht ultimativ auf eine definierte Struktur begrenzt ist, sondern weitere Substanzklassen ebenfalls in Betracht gezogen werden können. Allerdings gilt es zu evaluieren, inwieweit der Effekt durch die NPP1-Inhibition hervorgerufen wird oder andere Aspekte hierzu beitragen.

Abschließend konnte mittels dieser Arbeit aufgezeigt werden, dass die vorangegangenen Untersuchungen von Hosoda und Kollegen zur Affinität der GAG bezüglich NPP1 bestätigt wurden. So wiesen sämtliche betrachtete Vertreter zumindest eine partielle Aktivität an NPP1 auf. Zwar konnte hinsichtlich der Resistenz kein eindeutiges Resümee gezogen werden,

Zusammenfassung

allerdings bewirkte die Heparinintervention bezogen auf NPP1 und die purinerge Signaltransduktion einen immunstimulatorischen, antitumoralen Effekt in der TMU. Somit kann NPP1 als entscheidender Interferenzpunkt im Kontext der purinergen Signaltransduktion in der TMU als Immuncheckpoint charakterisiert werden. Jedoch ist festzuhalten, dass es sich hierbei ausschließlich um *in-vitro*-Erkenntnisse handelt, die keinen vollständigen Organismus erfassen und daher im Rahmen von *in-vivo*-Versuchen bestätigt werden müssen. Des Weiteren wäre es interessant, über Strukturoptimierungen einerseits die Inhibition von NPP1 zu verbessern und andererseits die pharmokologische Aktivität als Antikoagluans zu eliminieren, sofern dies aufgrund des Nebenwirkungsprofils erforderlich ist. Des Weiteren sollte geprüft werden, inwieweit die makromolekularen, anionischen Strukturen der Sulfopolysaccharide neben ihrer Eigenschaft als ICI von NPP1 über ihre Bindung elektrostatische WW inhärent die Sekretion der Zytokine und weiterer Mediatoren regulieren.

Quellenverzeichnis

1. Bray F, Laversanne M, Weiderpass E, Soerjomataram I. The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. *Cancer*. 15. August 2021;127(16):3029–30.
2. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. *Cancer Statistics, 2021*. *CA Cancer J Clin*. Januar 2021;71(1):7–33.
3. Wang Y, Ye F, Liang Y, Yang Q. Breast cancer brain metastasis: insight into molecular mechanisms and therapeutic strategies. *Br J Cancer*. 12. Oktober 2021;125(8):1056–67.
4. Pearce A, Haas M, Viney R, Pearson SA, Haywood P, Brown C, u. a. Incidence and severity of self-reported chemotherapy side effects in routine care: A prospective cohort study. *PLoS ONE*. 10. Oktober 2017;12(10):e0184360.
5. Oun R, Moussa YE, Wheate NJ. The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists. *Dalton Trans Camb Engl* 2003. 15. Mai 2018;47(19):6645–53.
6. Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O, u. a. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene*. 12. April 2012;31(15):1869–83.
7. Lovitt CJ, Shelper TB, Avery VM. Doxorubicin resistance in breast cancer cells is mediated by extracellular matrix proteins. *BMC Cancer*. 06 2018;18(1):41.
8. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *The Lancet*. 17. Februar 2001;357(9255):539–45.
9. Miao L, Zhang Y, Huang L. mRNA vaccine for cancer immunotherapy. *Mol Cancer*. 25. Februar 2021;20:41.
10. Lin H, Cheng J, Mu W, Zhou J, Zhu L. *Advances in Universal CAR-T Cell Therapy*. *Front Immunol*. 2021;12.
Verfügbar unter: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.744823>
11. Huang PW, Chang JWC. Immune checkpoint inhibitors win the 2018 Nobel Prize. *Biomed J*. Oktober 2019;42(5):299–306.
12. Granier C, De Guillebon E, Blanc C, Roussel H, Badoual C, Colin E, u. a. Mechanisms of action and rationale for the use of checkpoint inhibitors in cancer. *ESMO Open*. 3. Juli 2017;2(2):e000213.
13. Koustas E, Sarantis P, Papavassiliou AG, Karamouzis MV. The Resistance Mechanisms of Checkpoint Inhibitors in Solid Tumors. *Biomolecules*. 25. April 2020;10(5):666.
14. Stagg J, Smyth MJ. Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. *Oncogene*. 30. September 2010;29(39):5346–58.
15. Vitiello L, Gorini S, Rosano G, la Sala A. Immunoregulation through extracellular nucleotides. *Blood*. 19. Juli 2012;120(3):511–8.

Quellenverzeichnis

16. Dvorak HF. Tumors: Wounds That Do Not Heal. *N Engl J Med.* 25. Dezember 1986;315(26):1650–9.
17. Sharnoff JG. Results in the prophylaxis of postoperative thromboembolism. *Surg Gynecol Obstet.* August 1966;123(2):303–7.
18. Zacharski LR, Ornstein DL. Heparin and cancer. *Thromb Haemost.* Juli 1998;80(1):10–23.
19. Trousseau. Phlegmasia alba dolens. In: *Clinique Medicale de l'Hotel-Dieu de Paris* 2nd ed. Paris, France: JB Bailliere & Fils; 1865. S. 654–712.
20. Varki A. Trousseau's syndrome: multiple definitions and multiple mechanisms. *Blood.* 15. September 2007;110(6):1723–9.
21. Wong SY, Hynes RO. Lymphatic or Hematogenous Dissemination: How Does a Metastatic Tumor Cell Decide? *Cell Cycle Georget Tex.* April 2006;5(8):812–7.
22. Mulder FI, Horváth-Puhó E, van Es N, van Laarhoven HWM, Pedersen L, Moik F, u. a. Venous thromboembolism in cancer patients: a population-based cohort study. *Blood.* 8. April 2021;137(14):1959–69.
23. Hsu C, Hutt E, Bloomfield DM, Gailani D, Weitz JI. Factor XI Inhibition to Uncouple Thrombosis From Hemostasis: JACC Review Topic of the Week. *J Am Coll Cardiol.* 10. August 2021;78(6):625–31.
24. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer.* August 2002;2(8):563–72.
25. Heerboth S, Housman G, Leary M, Longacre M, Byler S, Lapinska K, u. a. EMT and tumor metastasis. *Clin Transl Med.* 26. Februar 2015;4:6.
26. Fidler IJ, Kripke ML. Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science.* 26. August 1977;197(4306):893–5.
27. Grover SP, Mackman N. Tissue Factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* April 2018;38(4):709–25.
28. Hisada Y, Mackman N. Tissue Factor and Cancer: Regulation, Tumor Growth and Metastasis. *Semin Thromb Hemost.* Juni 2019;45(4):385–95.
29. Zhou JN, Ljungdahl S, Shoshan MC, Swedenborg J, Linder S. Activation of tissue-factor gene expression in breast carcinoma cells by stimulation of the RAF-ERK signaling pathway. *Mol Carcinog.* 1998;21(4):234–43.
30. Rong Y, Belozarov VE, Tucker-Burden C, Chen G, Durden DL, Olson JJ, u. a. Epidermal Growth Factor Receptor and PTEN Modulate Tissue Factor Expression in Glioblastoma through JunD/Activator Protein-1 Transcriptional Activity. *Cancer Res.* 15. März 2009;69(6):2540–9.

31. Rao B, Gao Y, Huang J, Gao X, Fu X, Huang M, u. a. Mutations of p53 and K-ras correlate TF expression in human colorectal carcinomas: TF downregulation as a marker of poor prognosis. *Int J Colorectal Dis.* 1. Mai 2011;26(5):593–601.
32. Strilic B, Offermanns S. Intravascular Survival and Extravasation of Tumor Cells. *Cancer Cell.* 11. September 2017;32(3):282–93.
33. Palumbo JS, Talmage KE, Massari JV, La Jeunesse CM, Flick MJ, Kombrinck KW, u. a. Tumor cell-associated tissue factor and circulating hemostatic factors cooperate to increase metastatic potential through natural killer cell-dependent and-independent mechanisms. *Blood.* 1. Juli 2007;110(1):133–41.
34. Läubli H, Spanaus KS, Borsig L. Selectin-mediated activation of endothelial cells induces expression of CCL5 and promotes metastasis through recruitment of monocytes. *Blood.* 12. November 2009;114(20):4583–91.
35. Zarbock A, Polanowska-Grabowska RK, Ley K. Platelet-neutrophil-interactions: Linking hemostasis and inflammation. *Blood Rev.* 1. März 2007;21(2):99–111.
36. Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets.* August 2001;12(5):261–73.
37. Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res.* Februar 2009;19(2):156–72.
38. Grainger DJ, Mosedale DE, Metcalfe JC. TGF- β in blood: a complex problem. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1. April 2000;11(1):133–45.
39. Bayin NS, Ma L, Thomas C, Baitalmal R, Sure A, Fansiwala K, u. a. Patient-Specific Screening Using High-Grade Glioma Explants to Determine Potential Radiosensitization by a TGF- β Small Molecule Inhibitor. *Neoplasia N Y N.* 12. Dezember 2016;18(12):795–805.
40. Bochenek ML, Leidinger C, Rosinus NS, Gogiraju R, Guth S, Hobohm L, u. a. Activated Endothelial TGF β 1 Signaling Promotes Venous Thrombus Nonresolution in Mice Via Endothelin-1: Potential Role for Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. *Circ Res.* 17. Januar 2020;126(2):162–81.
41. Wojtowicz-Praga S. Reversal of tumor-induced immunosuppression by TGF-beta inhibitors. *Invest New Drugs.* Februar 2003;21(1):21–32.
42. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 19. Dezember 2002;420(6917):860–7.
43. Fidler IJ, Schroit AJ. Recognition and destruction of neoplastic cells by activated macrophages: discrimination of altered self. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer.* 15. November 1988;948(2):151–73.
44. Lavin Y, Mortha A, Rahman A, Merad M. Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues. *Nat Rev Immunol.* 25. November 2015;15(12):731–44.

Quellenverzeichnis

45. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* November 2002;23(11):549–55.
46. Hisada Y, Mackman N. Cancer-associated pathways and biomarkers of venous thrombosis. *Blood.* 28 2017;130(13):1499–506.
47. Blix K, Jensvoll H, Brækkan SK, Hansen JB. White Blood Cell Count Measured Prior to Cancer Development Is Associated with Future Risk of Venous Thromboembolism – The Tromsø Study. *PLOS ONE.* 4. September 2013;8(9):e73447.
48. Mozzini C, Garbin U, Fratta Pasini AM, Cominacini L. An exploratory look at NETosis in atherosclerosis. *Intern Emerg Med.* Februar 2017;12(1):13–22.
49. Gil-Bernabé AM, Ferjancic S, Tlalka M, Zhao L, Allen PD, Im JH, u. a. Recruitment of monocytes/macrophages by tissue factor-mediated coagulation is essential for metastatic cell survival and premetastatic niche establishment in mice. *Blood.* 29. März 2012;119(13):3164–75.
50. Bode M, Mackman N. Regulation of Tissue Factor Gene Expression in Monocytes and Endothelial Cells: Thromboxane A2 as a New Player. *Vascul Pharmacol.* August 2014;62(2):57–62.
51. Najem MY, Couturaud F, Lemarié CA. Cytokine and chemokine regulation of venous thromboembolism. *J Thromb Haemost.* 2020;18(5):1009–19.
52. Torri G, Naggi A. Heparin centenary – an ever-young life-saving drug. *Int J Cardiol.* 1. Juni 2016;212:S1–4.
53. McLean J. The thromboplastic action of cephalin. *Am J Physiol-Leg Content.* August 1916;41(2):250–7.
54. Howell WH, Holt E. Two new factors in blood coagulation—heparin and pro-antithrombin. *Am J Physiol-Leg Content.* Dezember 1918;47(3):328–41.
55. Van der Meer JY, Kellenbach E, Van den Bos LJ. From Farm to Pharma: An Overview of Industrial Heparin Manufacturing Methods. *Molecules.* Juni 2017;22(6):1025.
56. Baglin T, Barrowcliffe TW, Cohen A, Greaves M, Haematology the BC for S in. Guidelines on the use and monitoring of heparin. *Br J Haematol.* 2006;133(1):19–34.
57. Mulloy B, Gray E, Barrowcliffe TW. Characterization of unfractionated heparin: comparison of materials from the last 50 years. *Thromb Haemost.* Dezember 2000;84(6):1052–6.
58. Cosmi B, Hirsh J. Low molecular weight heparins. *Curr Opin Cardiol.* September 1994;9(5):612–8.
59. Jones CJ, Beni S, Limtiaco JFK, Langeslay DJ, Larive CK. Heparin characterization: challenges and solutions. *Annu Rev Anal Chem Palo Alto Calif.* 2011;4:439–65.

60. Shriver Z, Capila I, Venkataraman G, Sasisekharan R. Heparin and Heparan Sulfate: Analyzing Structure and Microheterogeneity. *Handb Exp Pharmacol.* 2012;(207):159–76.
61. Linhardt RJ. 2003 Claude S. Hudson Award address in carbohydrate chemistry. Heparin: structure and activity. *J Med Chem.* 19. Juni 2003;46(13):2551–64.
62. Mulloy B, Forster MJ, Jones C, Davies DB. N.m.r. and molecular-modelling studies of the solution conformation of heparin. *Biochem J.* 1. August 1993;293 (Pt 3)(Pt 3):849–58.
63. Gray E, Mulloy B, Barrowcliffe TW. Heparin and low-molecular-weight heparin. *Thromb Haemost.* Mai 2008;99(5):807–18.
64. Muñoz EM, Linhardt RJ. Heparin-Binding Domains in Vascular Biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* September 2004;24(9):1549–57.
65. Fachinfo-Service. Fachinformation, Heparin-Natrium-5000-ratiopharm® (Ampullen/Fertigspritzen). *Rote Liste* 2020. März 2020;1–7.
66. Guerrini M, Bisio A. Low-molecular-weight heparins: differential characterization/physical characterization. *Handb Exp Pharmacol.* 2012;(207):127–57.
67. Europäisches Direktorat für die Qualität von Arzneimitteln. 10.0/0828 Niedermolekulare Heparine - Heparina massae molecularis minoris. In: *Europäisches Arzneibuch 10.* Ausgabe Grundwerk 2020. 1. Aufl. Deutscher Apotheker Verlag; 2020. S. 4176–7.
68. Fachinfo-Service. Fachinformation, innohep® 8.000 I.E. - 18.000 I.E. Injektionslösung, Fertigspritze. *Rote Liste* 2019. 2019;1–4.
69. Linhardt RJ, Gunay NS. Production and chemical processing of low molecular weight heparins. *Semin Thromb Hemost.* 1999;25 Suppl 3:5–16.
70. Barnett WE. Anticoagulant substances. Riker Laboratories Inc.; US4351938A1, 1982.
71. Fachinfo-Service. Fachinformation, Fragmin®/ Fragmin® D. *Rote Liste.* 2022;Rote Liste 2022:1–8.
72. Hao C, Sun M, Wang H, Zhang L, Wang W. Chapter Two - Low molecular weight heparins and their clinical applications. In: Zhang L, Herausgeber. *Progress in Molecular Biology and Translational Science.* Academic Press; 2019. S. 21–39. (Glycans and Glycosaminoglycans as Clinical Biomarkers and Therapeutics - Part B; Bd. 163). Verfügbar unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877117319300249>
73. Fachinfo-Service. Fachinformation, Clexane® 2.000 I. E. – 15.000 I. E. / Clexane® multidose 50.000 I. E. – 100.000 I. E. *Rote Liste* 2022. 2022;1–15.
74. Uzan A. Sulfated polysaccharides obtained from heparin, preparation process, pharmaceutical composition and use thereof. Rhone Poulenc Rorer SA; US5849721A, 1998.

Quellenverzeichnis

75. Perlin AS. Glycol-cleavage oxidation. *Adv Carbohydr Chem Biochem.* 2006;60:183–250.
76. Jaseja M, Rej RN, Sauriol F, Perlin AS. Novel regio- and stereoselective modifications of heparin in alkaline solution. Nuclear magnetic resonance spectroscopic evidence. *Can J Chem.* September 1989;67(9):1449–56.
77. Matsuo M, Takano R, Kamei-Hayashi K, Hara S. A novel regioselective desulfation of polysaccharide sulfates: Specific 6-O-desulfation with N,O-bis(trimethylsilyl)acetamide. *Carbohydr Res.* 17. März 1993;241:209–15.
78. Casu B, Vlodaysky I, Sanderson RD. Non-Anticoagulant Heparins and Inhibition of Cancer. *Pathophysiol Haemost Thromb.* Januar 2009;36(3–4):195–203.
79. Reverter JC. Fondaparinux sodium. *Drugs Today Barc Spain* 1998. März 2002;38(3):185–94.
80. Choay J, Petitou M, Lormeau JC, Sinaÿ P, Casu B, Gatti G. Structure-activity relationship in heparin: a synthetic pentasaccharide with high affinity for antithrombin III and eliciting high anti-factor Xa activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 31. Oktober 1983;116(2):492–9.
81. Fachinfo-Service. Fachinformation, Arixtra® 2,5 mg/0,5 ml Injektionslösung, Fertigspritze. Rote Liste 2022. 2022;1–8.
82. Eichinger S. Reversing vitamin K antagonists: making the old new again. *Hematology.* 2. Dezember 2016;2016(1):605–11.
83. Rein CM, Desai UR, Church FC. Chapter Seven - Serpin–Glycosaminoglycan Interactions. In: Whisstock JC, Bird PI, Herausgeber. *Methods in Enzymology.* Academic Press; 2011. S. 105–37. (Serpin Structure and Evolution; Bd. 501). Verfügbar unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123859501000079>
84. Shifrin MM, Widmar SB. Platelet Inhibitors. *Nurs Clin North Am.* März 2016;51(1):29–43.
85. Hassouna HI. Thrombophilia and Hypercoagulability. *Med Princ Pract.* 2009;18(6):429–40.
86. Kruger PC, Eikelboom JW, Douketis JD, Hankey GJ. Deep vein thrombosis: update on diagnosis and management. *Med J Aust.* 2019;210(11):516–24.
87. Almony GT, Lefkovits J, Topol EJ. Antiplatelet and anticoagulant use after myocardial infarction. *Clin Cardiol.* 1996;19(5):357–65.
88. Kapil N, Datta YH, Alakbarova N, Bershady E, Selim M, Liebeskind DS, u. a. Antiplatelet and Anticoagulant Therapies for Prevention of Ischemic Stroke. *Clin Appl Thromb.* 1. Mai 2017;23(4):301–18.
89. Gladwell TD. Bivalirudin: A direct thrombin inhibitor. *Clin Ther.* 1. Januar 2002;24(1):38–58.

90. Fachinfo-Service. Fachinformation Pradaxa® 150mg Hartkapseln. Rote Liste 2018. 2018;1–16.
91. Fachinfo-Service. Eliquis® 2,5 mg Filmtabletten. Rote Liste. 2022;Rote Liste 2022:1–13.
92. Perzborn E, Roehrig S, Straub A, Kubitzka D, Misselwitz F. The discovery and development of rivaroxaban, an oral, direct factor Xa inhibitor. *Nat Rev Drug Discov.* Januar 2011;10(1):61–75.
93. Kasperkiewicz K, Ponczek MB, Owczarek J, Guga P, Budzisz E. Antagonists of Vitamin K—Popular Coumarin Drugs and New Synthetic and Natural Coumarin Derivatives. *Molecules.* 24. März 2020;25(6):1465.
94. Dickmann B, Ahlbrecht J, Ay C, Dunkler D, Thaler J, Scheithauer W, u. a. Regional lymph node metastases are a strong risk factor for venous thromboembolism: results from the Vienna Cancer and Thrombosis Study. *Haematologica.* August 2013;98(8):1309–14.
95. Wun T, White RH. Epidemiology of cancer-related venous thromboembolism. *Best Pract Res Clin Haematol.* März 2009;22(1):9–23.
96. Walker AJ, Card TR, West J, Crooks C, Grainge MJ. Incidence of venous thromboembolism in patients with cancer – A cohort study using linked United Kingdom databases. *Eur J Cancer.* 1. April 2013;49(6):1404–13.
97. Khorana AA. Cancer and thrombosis: implications of published guidelines for clinical practice. *Ann Oncol.* 1. Oktober 2009;20(10):1619–30.
98. Oppelt P, Betbadal A, Nayak L. Approach to Chemotherapy-associated Thrombosis. *Vasc Med Lond Engl.* April 2015;20(2):153–61.
99. Elyamany G, Alzahrani AM, Bukhary E. Cancer-Associated Thrombosis: An Overview. *Clin Med Insights Oncol.* 4. Dezember 2014;8:129–37.
100. Khorana AA. Venous thromboembolism and prognosis in cancer. *Thromb Res.* Juni 2010;125(6):490–3.
101. Sørensen HT, Mellekjaer L, Olsen JH, Baron JA. Prognosis of cancers associated with venous thromboembolism. *N Engl J Med.* 21. Dezember 2000;343(25):1846–50.
102. Sharnoff JG, Deblasio G. Prevention of fatal postoperative thromboembolism by heparin Prophylaxis. *The Lancet.* 14. November 1970;296(7681):1006–7.
103. Kakkar VV, Stringer MD. Prophylaxis of venous thromboembolism. *World J Surg.* 1990;14(5):670–8.
104. Taberner DA, Poller L, Burslem RW, Jones JB. Oral anticoagulants controlled by the British comparative thromboplastin versus low-dose heparin in prophylaxis of deep vein thrombosis. *Br Med J.* 4. Februar 1978;1(6108):272–4.

Quellenverzeichnis

105. Poller L, McKernan A, Thomson JM, Elstein M, Hirsch PJ, Jones JB. Fixed minidose warfarin: a new approach to prophylaxis against venous thrombosis after major surgery. *Br Med J Clin Res Ed.* 21. November 1987;295(6609):1309–12.
106. Sasahara AA, Sharma GVRK, Parisi AF. New developments in the detection and prevention of venous thromboembolism. *Am J Cardiol.* 1. Juni 1979;43(6):1214–24.
107. Carrier M, Lee AYY. Prophylactic and therapeutic anticoagulation for thrombosis: major issues in oncology. *Nat Clin Pract Oncol.* Februar 2009;6(2):74–84.
108. Borentain M, Montalescot G, Bouzamondo A, Choussat R, Hulot JS, Lechat P. Low-molecular-weight heparin vs. unfractionated heparin in percutaneous coronary intervention: A combined analysis. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2005;65(2):212–21.
109. Warkentin TE, Levine MN, Hirsh J, Horsewood P, Roberts RS, Gent M, u. a. Heparin-Induced Thrombocytopenia in Patients Treated with Low-Molecular-Weight Heparin or Unfractionated Heparin. *N Engl J Med.* 18. Mai 1995;332(20):1330–6.
110. Lee AYY, Levine MN, Baker RI, Bowden C, Kakkar AK, Prins M, u. a. Low-Molecular-Weight Heparin versus a Coumarin for the Prevention of Recurrent Venous Thromboembolism in Patients with Cancer. *N Engl J Med.* 10. Juli 2003;349(2):146–53.
111. Suryanarayan D, Lee AYY, Wu C. Direct Oral Anticoagulants in Cancer Patients. *Semin Thromb Hemost.* September 2019;45(6):638–47.
112. Moik F, Pabinger I, Ay C. How I treat cancer-associated thrombosis. *ESMO Open* 1. Januar 2019;4.
Verfügbar unter: [https://www.esmooopen.com/article/S2059-7029\(20\)30014-4/fulltext](https://www.esmooopen.com/article/S2059-7029(20)30014-4/fulltext)
113. Farge D, Frere C, Connors JM, Khorana AA, Kakkar A, Ay C, u. a. 2022 international clinical practice guidelines for the treatment and prophylaxis of venous thromboembolism in patients with cancer, including patients with COVID-19. *Lancet Oncol.* 1. Juli 2022;23(7):e334–47.
114. Kakkar AK, Levine MN, Kadziola Z, Lemoine NR, Low V, Patel HK, u. a. Low molecular weight heparin, therapy with dalteparin, and survival in advanced cancer: the fragmin advanced malignancy outcome study (FAMOUS). *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 15. Mai 2004;22(10):1944–8.
115. Macbeth F, Noble S, Evans J, Ahmed S, Cohen D, Hood K, u. a. Randomized Phase III Trial of Standard Therapy Plus Low Molecular Weight Heparin in Patients With Lung Cancer: FRAGMENTIC Trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 10. Februar 2016;34(5):488–94.
116. Ek L, Gezelius E, Bergman B, Bendahl PO, Anderson H, Sundberg J, u. a. Randomized phase III trial of low-molecular-weight heparin enoxaparin in addition to standard treatment in small-cell lung cancer: the RASTEN trial. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 1. Februar 2018;29(2):398–404.

117. Karamouzis MV, Athanasiadis I, Samelis G, Vallilas C, Bokas A, Nikolaidi A, u. a. The Impact of Thromboprophylaxis on the Survival of Patients with Advanced Pancreatic Cancer. The Pancreatic Cancer and Tinzaparin (PaCT) Study. *Cancers*. 9. Juni 2021;13(12):2884.
118. Bendas G, Borsig L. Cancer cell adhesion and metastasis: selectins, integrins, and the inhibitory potential of heparins. *Int J Cell Biol*. 2012;2012:676731.
119. Kansas GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood*. 1. November 1996;88(9):3259–87.
120. Egan K, Cooke N, Kenny D. Living in shear: platelets protect cancer cells from shear induced damage. *Clin Exp Metastasis*. August 2014;31(6):697–704.
121. Filippi MD. Neutrophil transendothelial migration: updates and new perspectives. *Blood*. 16. Mai 2019;133(20):2149–58.
122. Ludwig RJ, Boehme B, Podda M, Henschler R, Jager E, Tandi C, u. a. Endothelial P-selectin as a target of heparin action in experimental melanoma lung metastasis. *Cancer Res*. 2004;64(8):2743–50.
123. Liebsch AG, Schillers H. Quantification of heparin's antimetastatic effect by single-cell force spectroscopy. *J Mol Recognit*. 2021;34(1):e2854.
124. Simonis D, Christ K, Alban S, Bendas G. Affinity and kinetics of different heparins binding to P- and L-selectin. *Semin Thromb Hemost*. Juli 2007;33(5):534–9.
125. Borsig L, Wong R, Hynes RO, Varki NM, Varki A. Synergistic effects of L- and P-selectin in facilitating tumor metastasis can involve non-mucin ligands and implicate leukocytes as enhancers of metastasis. *Proc Natl Acad Sci*. 19. Februar 2002;99(4):2193–8.
126. Nelson RM, Cecconi O, Roberts WG, Aruffo A, Linhardt RJ, Bevilacqua MP. Heparin oligosaccharides bind L- and P-selectin and inhibit acute inflammation. *Blood*. 1. Dezember 1993;82(11):3253–8.
127. Liang S, Dong C. Integrin VLA-4 enhances sialyl-Lewisx/a-negative melanoma adhesion to and extravasation through the endothelium under low flow conditions. *Am J Physiol - Cell Physiol*. September 2008;295(3):C701–7.
128. Klemke M, Weschenfelder T, Konstandin MH, Samstag Y. High affinity interaction of integrin alpha4beta1 (VLA-4) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) enhances migration of human melanoma cells across activated endothelial cell layers. *J Cell Physiol*. August 2007;212(2):368–74.
129. Fritzsche J, Simonis D, Bendas G. Melanoma cell adhesion can be blocked by heparin in vitro: suggestion of VLA-4 as a novel target for antimetastatic approaches. *Thromb Haemost*. Dezember 2008;100(6):1166–75.
130. Schlesinger M, Simonis D, Schmitz P, Fritzsche J, Bendas G. Binding between heparin and the integrin VLA-4. *Thromb Haemost*. 2009;102(5):816–22.

131. Schlesinger M, Naggi A, Torri G, Zeisig R, Alexander M, Schmitz P, u. a. Blocking of integrin-mediated human MV3 melanoma cell binding by commercial and modified heparins. *Int J Clin Pharmacol Ther.* Juli 2010;48(7):448–50.
132. Hansen JB, Svensson B, Olsen R, Ezban M, Osterud B, Paulssen RH. Heparin induces synthesis and secretion of tissue factor pathway inhibitor from endothelial cells in vitro. *Thromb Haemost.* Juni 2000;83(6):937–43.
133. Wood JP, Ellery PER, Maroney SA, Mast AE. Biology of tissue factor pathway inhibitor. *Blood.* 8. Mai 2014;123(19):2934–43.
134. Amirkhosravi A, Meyer T, Amaya M, Davila M, Mousa SA, Robson T, u. a. The role of tissue factor pathway inhibitor in tumor growth and metastasis. *Semin Thromb Hemost.* Oktober 2007;33(7):643–52.
135. Sato T, Yamaguchi A, Goi T, Hirono Y, Takeuchi K, Katayama K, u. a. Heparanase expression in human colorectal cancer and its relationship to tumor angiogenesis, hematogenous metastasis, and prognosis. *J Surg Oncol.* 15. September 2004;87(4):174–81.
136. Sarrazin S, Lamanna WC, Esko JD. Heparan Sulfate Proteoglycans. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* Juli 2011;3(7):a004952.
137. Vlodaysky I, Ilan N, Sanderson RD. Forty Years of Basic and Translational Heparanase Research. *Heparanase.* 29. Februar 2020;1221:3–59.
138. Fuster MM, Wang L. Endothelial Heparan Sulfate in Angiogenesis. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2010;93:179–212.
139. Nadir Y, Brenner B. Heparanase multiple effects in cancer. *Thromb Res.* Mai 2014;133 Suppl 2:S90-94.
140. Nadir Y, Brenner B, Fux L, Shafat I, Attias J, Vlodaysky I. Heparanase enhances the generation of activated factor X in the presence of tissue factor and activated factor VII. *Haematologica.* November 2010;95(11):1927–34.
141. Batoool T, Fang J, Barash U, Moustakas A, Vlodaysky I, Li J. Overexpression of heparanase attenuated TGF- β -stimulated signaling in tumor cells. *FEBS Open Bio.* 11. Februar 2017;7(3):405–13.
142. Goodall KJ, Poon IKH, Phipps S, Hulett MD. Soluble Heparan Sulfate Fragments Generated by Heparanase Trigger the Release of Pro-Inflammatory Cytokines through TLR-4. *PLoS ONE.* 8. Oktober 2014;9(10):e109596.
143. Cousin R, Groult H, Manseur C, Ferru-Clément R, Gani M, Havret R, u. a. A Marine λ -Oligocarrageenan Inhibits Migratory and Invasive Ability of MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells through Actions on Heparanase Metabolism and MMP-14/MMP-2 Axis. *Mar Drugs.* 28. September 2021;19(10):546.

144. Lapiere F, Holme K, Lam L, Tressler RJ, Storm N, Wee J, u. a. Chemical modifications of heparin that diminish its anticoagulant but preserve its heparanase-inhibitory, angiostatic, anti-tumor and anti-metastatic properties. *Glycobiology*. April 1996;6(3):355–66.
145. Naggi A, Casu B, Perez M, Torri G, Cassinelli G, Penco S, u. a. Modulation of the heparanase-inhibiting activity of heparin through selective desulfation, graded N-acetylation, and glycol splitting. *J Biol Chem*. 2005;280(13):12103–13.
146. Guo F, Wang Y, Liu J, Mok SC, Xue F, Zhang W. CXCL12/CXCR4: a symbiotic bridge linking cancer cells and their stromal neighbors in oncogenic communication networks. *Oncogene*. Februar 2016;35(7):816–26.
147. Veldkamp CT, Peterson FC, Pelzek AJ, Volkman BF. The monomer–dimer equilibrium of stromal cell-derived factor-1 (CXCL 12) is altered by pH, phosphate, sulfate, and heparin. *Protein Sci Publ Protein Soc*. April 2005;14(4):1071–81.
148. Harvey JR, Mellor P, Eldaly H, Lennard TWJ, Kirby JA, Ali S. Inhibition of CXCR4-Mediated Breast Cancer Metastasis: A Potential Role for Heparinoids? *Clin Cancer Res*. 1. März 2007;13(5):1562–70.
149. Ma L, Qiao H, He C, Yang Q, Cheung CHA, Kanwar JR, u. a. Modulating the interaction of CXCR4 and CXCL12 by low-molecular-weight heparin inhibits hepatic metastasis of colon cancer. *Invest New Drugs*. April 2012;30(2):508–17.
150. Battinelli EM, Markens BA, Kulenthirarajan RA, Machlus KR, Flaumenhaft R, Italiano JE. Anticoagulation inhibits tumor cell-mediated release of platelet angiogenic proteins and diminishes platelet angiogenic response. *Blood*. 2. Januar 2014;123(1):101–12.
151. Ponert JM, Schwarz S, Haschemi R, Müller J, Pötzsch B, Bendas G, u. a. 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(1):e0191303.
152. Soker S, Goldstaub D, Svahn CM, Vlodaysky I, Levi BZ, Neufeld G. Variations in the size and sulfation of heparin modulate the effect of heparin on the binding of VEGF165 to its receptors. *Biochem Biophys Res Commun*. 15. September 1994;203(2):1339–47.
153. Li J, Guo ZY, Gao XH, Bian Q, Jia M, Li Lai X, u. a. Low Molecular Weight Heparin (LMWH) Improves Peritoneal Function and Inhibits Peritoneal Fibrosis Possibly through Suppression of HIF-1 α , VEGF and TGF- β 1. *PLoS ONE*. 27. Februar 2015;10(2):e0118481.
154. Labelle M, Begum S, Hynes RO. Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis. *Cancer Cell*. 15. November 2011;20(5):576–90.
155. Ponert JM, Gockel LM, Henze S, Schlesinger M. Unfractionated and Low Molecular Weight Heparin Reduce Platelet Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Pancreatic and Prostate Cancer Cells. *Molecules*. Oktober 2018;23(10):2690.

156. Li X, Ma X. The role of heparin in sepsis: much more than just an anticoagulant. *Br J Haematol.* 2017;179(3):389–98.
157. Yamakawa K, Umemura Y, Hayakawa M, Kudo D, Sanui M, Takahashi H, u. a. Benefit profile of anticoagulant therapy in sepsis: a nationwide multicentre registry in Japan. *Crit Care.* 2016;20:229.
158. Levi M, van der Poll T. The role of natural anticoagulants in the pathogenesis and management of systemic activation of coagulation and inflammation in critically ill patients. *Semin Thromb Hemost.* Juli 2008;34(5):459–68.
159. Wang C, Chi C, Guo L, Wang X, Guo L, Sun J, u. a. Heparin therapy reduces 28-day mortality in adult severe sepsis patients: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care.* 16. Oktober 2014;18(5):563.
160. Fan Y, Jiang M, Gong D, Zou C. Efficacy and safety of low-molecular-weight heparin in patients with sepsis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Sci Rep.* 16. Mai 2016;6(1):25984.
161. Chen D. Dual Targeting Autoimmunity and Cancer: From Biology to Medicine. *J Clin Pharmacol.* August 2018;58(8):990–6.
162. Beurskens DMH, Huckriede JP, Schrijver R, Hemker HC, Reutelingsperger CP, Nicolaes GAF. The Anticoagulant and Nonanticoagulant Properties of Heparin. *Thromb Haemost.* Oktober 2020;120(10):1371–83.
163. Conigliaro P, Triggianese P, Ballanti E, Perricone C, Perricone R, Chimenti MS. Complement, infection, and autoimmunity. *Curr Opin Rheumatol.* September 2019;31(5):532–41.
164. Linhardt RJ, Rice KG, Kim YS, Engelken JD, Weiler JM. Homogeneous, structurally defined heparin-oligosaccharides with low anticoagulant activity inhibit the generation of the amplification pathway C3 convertase in vitro. *J Biol Chem.* 15. September 1988;263(26):13090–6.
165. Subramaniam S, Jurk K, Hobohm L, Jäckel S, Saffarzadeh M, Schwierczek K, u. a. Distinct contributions of complement factors to platelet activation and fibrin formation in venous thrombus development. *Blood.* 20. April 2017;129(16):2291–302.
166. Guglietta S, Chiavelli A, Zagato E, Krieg C, Gandini S, Ravenda PS, u. a. Coagulation induced by C3aR-dependent NETosis drives protumorigenic neutrophils during small intestinal tumorigenesis. *Nat Commun.* 21. März 2016;7:11037.
167. Roumenina LT, Daugan MV, Petitprez F, Sautès-Fridman C, Fridman WH. Context-dependent roles of complement in cancer. *Nat Rev Cancer.* Dezember 2019;19(12):698–715.
168. Merle NS, Church SE, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement System Part I – Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Front Immunol.* 2. Juni 2015;6:262.

169. Reis ES, Mastellos DC, Hajishengallis G, Lambris JD. New Insights into the Immune Functions of Complement. *Nat Rev Immunol*. August 2019;19(8):503–16.
170. Bauer AT, Gorzelanny C, Gebhardt C, Pantel K, Schneider SW. Interplay between coagulation and inflammation in cancer: Limitations and therapeutic opportunities. *Cancer Treat Rev*. 1. Januar 2022;102. Verfügbar unter: [https://www.cancertreatmentreviews.com/article/S0305-7372\(21\)00170-5/fulltext](https://www.cancertreatmentreviews.com/article/S0305-7372(21)00170-5/fulltext)
171. Young E. The anti-inflammatory effects of heparin and related compounds. *Thromb Res*. 2008;122(6):743–52.
172. Diamond MS, Garcia-Aguilar J, Bickford JK, Corbi AL, Springer TA. The I domain is a major recognition site on the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) for four distinct adhesion ligands. *J Cell Biol*. Februar 1993;120(4):1031–43.
173. Kitamura N, Yamaguchi M, Shimabukuro K, Miyasaka M, Nakano H, Kumada K. Heparin-like glycosaminoglycans inhibit leukocyte adhesion to endotoxin-activated human vascular endothelial cells under nonstatic conditions. *Eur Surg Res Eur Chir Forsch Rech Chir Eur*. 1996;28(6):428–35.
174. Miller SJ, Hoggat AM, Faulk WP. Heparin regulates ICAM-1 expression in human endothelial cells: an example of non-cytokine-mediated endothelial activation. *Thromb Haemost*. September 1998;80(3):481–7.
175. Peter K, Schwarz M, Conradt C, Nordt T, Moser M, Kübler W, u. a. Heparin Inhibits Ligand Binding to the Leukocyte Integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *Circulation*. 5. Oktober 1999;100(14):1533–9.
176. Demidenko O, Tsvetkova S. Action of heparin on protein fractions of isolated nuclei and on their DNA content. *Histochemistry*. 15. September 1978;57(3):265–71.
177. Bal dit Sollier C, Dillinger JG, Drouet L. Anticoagulant activity and pleiotropic effects of heparin. *JMV-J Médecine Vasc*. 1. Mai 2020;45(3):147–57.
178. Wildhagen KCAA, García de Frutos P, Reutelingsperger CP, Schrijver R, Aresté C, Ortega-Gómez A, u. a. Nonanticoagulant heparin prevents histone-mediated cytotoxicity in vitro and improves survival in sepsis. *Blood*. 13. Februar 2014;123(7):1098–101.
179. Higai K, Imaizumi Y, Suzuki C, Azuma Y, Matsumoto K. NKG2D and CD94 bind to heparin and sulfate-containing polysaccharides. *Biochem Biophys Res Commun*. 4. September 2009;386(4):709–14.
180. Bloushtain N, Qimron U, Bar-Ilan A, Hershkovitz O, Gazit R, Fima E, u. a. Membrane-associated heparan sulfate proteoglycans are involved in the recognition of cellular targets by NKp30 and NKp46. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15. August 2004;173(4):2392–401.
181. Hershkovitz O, Jivov S, Bloushtain N, Zilka A, Landau G, Bar-Ilan A, u. a. Characterization of the recognition of tumor cells by the natural cytotoxicity receptor, NKp44. *Biochemistry*. 26. Juni 2007;46(25):7426–36.

182. Kopp HG, Placke T, Salih HR. Platelet-derived transforming growth factor-beta down-regulates NKG2D thereby inhibiting natural killer cell antitumor reactivity. *Cancer Res.* 1. Oktober 2009;69(19):7775–83.
183. Gockel LM, Nekipelov K, Ferro V, Bendas G, Schlesinger M. Tumour cell-activated platelets modulate the immunological activity of CD4+, CD8+, and NK cells, which is efficiently antagonized by heparin. *Cancer Immunol Immunother.* Oktober 2022;71(10):2523–33.
184. Sussman TA, Li H, Hobbs B, Funchain P, McCrae KR, Khorana AA. Incidence of thromboembolism in patients with melanoma on immune checkpoint inhibitor therapy and its adverse association with survival. *J Immunother Cancer.* 1. Januar 2021;9(1):e001719.
185. Yang Y, Stang A, Schweickert PG, Lanman NA, Paul EN, Monia BP, u. a. Thrombin Signaling Promotes Pancreatic Adenocarcinoma through PAR-1–Dependent Immune Evasion. *Cancer Res.* 1. Juli 2019;79(13):3417–30.
186. Graf C, Wilgenbus P, Pagel S, Pott J, Marini F, Reyda S, u. a. Myeloid cell-synthesized coagulation factor X dampens antitumor immunity. *Sci Immunol.* 20. September 2019;4(39).
187. Rolfes V, Idel C, Pries R, Plötze-Martin K, Habermann J, Gemoll T, u. a. PD-L1 is expressed on human platelets and is affected by immune checkpoint therapy. *Oncotarget.* 8. Juni 2018;9(44):27460–70.
188. Zamora C, Cantó E, Nieto JC, Bardina J, Diaz-Torné C, Moya P, u. a. Binding of Platelets to Lymphocytes: A Potential Anti-Inflammatory Therapy in Rheumatoid Arthritis. *J Immunol.* 15. April 2017;198(8):3099–108.
189. Kleijn S de, Langereis JD, Leentjens J, Kox M, Netea MG, Koenderman L, u. a. IFN- γ -Stimulated Neutrophils Suppress Lymphocyte Proliferation through Expression of PD-L1. *PLOS ONE.* 28. August 2013;8(8):e72249.
190. Steele CW, Karim SA, Leach JDG, Bailey P, Upstill-Goddard R, Rishi L, u. a. CXCR2 Inhibition Profoundly Suppresses Metastases and Augments Immunotherapy in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell.* 13. Juni 2016;29(6):832–45.
191. Templeton AJ, McNamara MG, Šeruga B, Vera-Badillo FE, Aneja P, Ocaña A, u. a. Prognostic Role of Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Solid Tumors: A Systematic Review and Meta-Analysis. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 1. Juni 2014;106(6):dju124.
192. Gebhardt C, Sevko A, Jiang H, Lichtenberger R, Reith M, Tarnanidis K, u. a. Myeloid Cells and Related Chronic Inflammatory Factors as Novel Predictive Markers in Melanoma Treatment with Ipilimumab. *Clin Cancer Res.* 14. Dezember 2015;21(24):5453–9.
193. Vollmar A, Zündorf I, Dingermann T. *Immunologie - Grundlagen und Wirkstoffe.* 2. Auflage. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; 2012. 451 S.

194. Kenneth Murphy et al. *Janeway's Immunology*. 8. Aufl. New York, NY: Garland Science; 2012. 862 S.
195. Noris M, Remuzzi G. Overview of Complement Activation and Regulation. *Semin Nephrol*. 1. November 2013;33(6):479–92.
196. Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of Phagocytosis in Macrophages. *Annu Rev Immunol*. 1999;17(1):593–623.
197. Ehrlich P. Beiträge zur Kenntniss der granulierten Bindegewebszellen und der eosinophilen Leukocythen. Vortrag Diss. 17. Januar 1879; *Arch. Anat. Physio.*(3):166–9.
198. Dvorak AM. Cell biology of the basophil. *Int Rev Cytol*. 1998;180:87–236.
199. Hamey FK, Lau WWY, Kucinski I, Wang X, Diamanti E, Wilson NK, u. a. Single-cell molecular profiling provides a high-resolution map of basophil and mast cell development. *Allergy*. Juni 2021;76(6):1731–42.
200. Rothenberg ME, Hogan SP. The eosinophil. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:147–74.
201. Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD, Zychlinsky A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:459–89.
202. Dalod M, Chelbi R, Malissen B, Lawrence T. Dendritic cell maturation: functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming. *EMBO J*. 16. Mai 2014;33(10):1104–16.
203. Quatrini L, Della Chiesa M, Sivori S, Mingari MC, Pende D, Moretta L. Human NK cells, their receptors and function. *Eur J Immunol*. 2021;51(7):1566–79.
204. Meza Guzman LG, Keating N, Nicholson SE. Natural Killer Cells: Tumor Surveillance and Signaling. *Cancers*. April 2020;12(4):952.
205. Ljunggren HG, Kärre K. In search of the „missing self“: MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today*. Juli 1990;11(7):237–44.
206. Ochoa MC, Minute L, Rodriguez I, Garasa S, Perez-Ruiz E, Inogés S, u. a. Antibody-dependent cell cytotoxicity: immunotherapy strategies enhancing effector NK cells. *Immunol Cell Biol*. 2017;95(4):347–55.
207. Voskoboinik I, Whisstock JC, Trapani JA. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nat Rev Immunol*. Juni 2015;15(6):388–400.
208. Prager I, Watzl C. Mechanisms of natural killer cell-mediated cellular cytotoxicity. *J Leukoc Biol*. Juni 2019;105(6):1319–29.
209. von Karstedt S, Montinaro A, Walczak H. Exploring the TRAILs less travelled: TRAIL in cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer*. 24. Mai 2017;17(6):352–66.
210. Poli A, Michel T, Thérésine M, Andrès E, Hentges F, Zimmer J. CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology*. April 2009;126(4):458–65.

Quellenverzeichnis

211. Reefman E, Kay JG, Wood SM, Offenhäuser C, Brown DL, Roy S, u. a. Cytokine secretion is distinct from secretion of cytotoxic granules in NK cells. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1. Mai 2010;184(9):4852–62.
212. Brezski RJ, Monroe JG. B-cell receptor. *Adv Exp Med Biol*. 2008;640:12–21.
213. Cancro MP, Tomayko MM. Memory B cells and plasma cells: The differentiative continuum of humoral immunity. *Immunol Rev*. September 2021;303(1):72–82.
214. Germain RN. The T Cell Receptor for Antigen: Signaling and Ligand Discrimination *. *J Biol Chem*. 21. September 2001;276(38):35223–6.
215. Rock KL, Reits E, Neefjes J. Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules. *Trends Immunol*. November 2016;37(11):724–37.
216. Manikwar P, Kiptoo P, Badawi AH, Büyüktimkin B, Siahaan TJ. Antigen-Specific Blocking of CD4-Specific Immunological Synapse Formation Using BPI and Current Therapies for Autoimmune Diseases. *Med Res Rev*. Juli 2012;32(4):727–64.
217. Létourneau S, Krieg C, Pantaleo G, Boyman O. IL-2- and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets. *J Allergy Clin Immunol*. April 2009;123(4):758–62.
218. Curtsinger JM, Mescher MF. Inflammatory Cytokines as a Third Signal for T Cell Activation. *Curr Opin Immunol*. Juni 2010;22(3):333–40.
219. Andersen MH, Schrama D, Straten P thor, Becker JC. Cytotoxic T Cells. *J Invest Dermatol*. 1. Januar 2006;126(1):32–41.
220. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. Bd. 2012, *Clinical and Developmental Immunology*. Hindawi; 2012. S. e925135 CD4+T Cells: Differentiation and Functions. Verfügbar unter: <https://www.hindawi.com/journals/jir/2012/925135/>
221. Saravia J, Chapman NM, Chi H. Helper T cell differentiation. *Cell Mol Immunol*. Juli 2019;16(7):634–43.
222. Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S. Human T helper type 1 dichotomy: origin, phenotype and biological activities. *Immunology*. 2015;144(3):343–51.
223. Walker JA, McKenzie ANJ. TH2 cell development and function. *Nat Rev Immunol*. Februar 2018;18(2):121–33.
224. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, u. a. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*. 22. September 2006;126(6):1121–33.
225. Stritesky GL, Yeh N, Kaplan MH. IL-23 Promotes Maintenance but Not Commitment to the Th17 Lineage1. *J Immunol*. 1. November 2008;181(9):5948–55.

226. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, u. a. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol.* November 2005;6(11):1133–41.
227. Dong C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat Rev Immunol.* Mai 2008;8(5):337–48.
228. Yasuda K, Takeuchi Y, Hirota K. The pathogenicity of Th17 cells in autoimmune diseases. *Semin Immunopathol.* Mai 2019;41(3):283–97.
229. Koch S, Sopel N, Finotto S. Th9 and other IL-9-producing cells in allergic asthma. *Semin Immunopathol.* Januar 2017;39(1):55–68.
230. Zhou L, Lopes JE, Chong MMW, Ivanov II, Min R, Victora GD, u. a. TGF- β -induced Foxp3 inhibits Th17 cell differentiation by antagonizing ROR γ t function. *Nature.* 8. Mai 2008;453(7192):236–40.
231. Gasteiger G, Kastenmuller W. Foxp3+ Regulatory T-cells and IL-2: The Moirai of T-cell Fates? *Front Immunol.* 2012;3.
Verfügbar unter: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2012.00179>
232. Lafaille MAC de, Lafaille JJ. Natural and Adaptive Foxp3+ Regulatory T Cells: More of the Same or a Division of Labor? *Immunity.* 22. Mai 2009;30(5):626–35.
233. Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol.* Juli 2008;8(7):523–32.
234. Van Coillie S, Wiernicki B, Xu J. Molecular and Cellular Functions of CTLA-4. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1248:7–32.
235. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol.* 2008;26:677–704.
236. Huang CT, Workman CJ, Flies D, Pan X, Marson AL, Zhou G, u. a. Role of LAG-3 in Regulatory T Cells. *Immunity.* 1. Oktober 2004;21(4):503–13.
237. Aggarwal BB, Vijayalekshmi RV, Sung B. Targeting Inflammatory Pathways for Prevention and Therapy of Cancer: Short-Term Friend, Long-Term Foe. *Clin Cancer Res.* 15. Januar 2009;15(2):425–30.
238. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature.* 24. Juli 2008;454(7203):436–44.
239. Grivnenkov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell.* 19. März 2010;140(6):883–99.
240. Hinshaw DC, Shevde LA. The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. *Cancer Res.* 15. September 2019;79(18):4557–66.
241. He X, Xu C. Immune checkpoint signaling and cancer immunotherapy. *Cell Res.* August 2020;30(8):660–9.

242. Boutilier AJ, ElSawa SF. Macrophage Polarization States in the Tumor Microenvironment. *Int J Mol Sci.* 29. Juni 2021;22(13):6995.
243. Allavena P, Sica A, Solinas G, Porta C, Mantovani A. The inflammatory microenvironment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. *Crit Rev Oncol Hematol.* April 2008;66(1):1–9.
244. Fridlender ZG, Kapoor V, Buchlis G, Cheng G, Sun J, Wang LCS, u. a. Monocyte Chemoattractant Protein–1 Blockade Inhibits Lung Cancer Tumor Growth by Altering Macrophage Phenotype and Activating CD8+ Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* Februar 2011;44(2):230–7.
245. Beauvillain C, Delneste Y, Scotet M, Peres A, Gascan H, Guernonprez P, u. a. Neutrophils efficiently cross-prime naive T cells in vivo. *Blood.* 15. Oktober 2007;110(8):2965–73.
246. Sun R, Luo J, Li D, Shu Y, Luo C, Wang SS, u. a. Neutrophils with protumor potential could efficiently suppress tumor growth after cytokine priming and in presence of normal NK cells. *Oncotarget.* 30. Dezember 2014;5(24):12621–34.
247. Zhou SL, Zhou ZJ, Hu ZQ, Huang XW, Wang Z, Chen EB, u. a. Tumor-Associated Neutrophils Recruit Macrophages and T-Regulatory Cells to Promote Progression of Hepatocellular Carcinoma and Resistance to Sorafenib. *Gastroenterology.* 1. Juni 2016;150(7):1646-1658.e17.
248. Ardi VC, Kupriyanova TA, Deryugina EI, Quigley JP. Human neutrophils uniquely release TIMP-free MMP-9 to provide a potent catalytic stimulator of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 18. Dezember 2007;104(51):20262–7.
249. Gerhard GM, Bill R, Messemaker M, Klein AM, Pittet MJ. Tumor-infiltrating dendritic cell states are conserved across solid human cancers. *J Exp Med.* 18. Dezember 2020;218(1):e20200264.
250. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, u. a. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science.* 29. September 2006;313(5795):1960–4.
251. Tosolini M, Kirilovsky A, Mlecnik B, Fredriksen T, Mauger S, Bindea G, u. a. Clinical Impact of Different Classes of Infiltrating T Cytotoxic and Helper Cells (Th1, Th2, Treg, Th17) in Patients with Colorectal Cancer. *Cancer Res.* 14. Februar 2011;71(4):1263–71.
252. Ubukata H, Motohashi G, Tabuchi T, Nagata H, Konishi S, Tabuchi T. Evaluations of interferon- γ /interleukin-4 ratio and neutrophil/lymphocyte ratio as prognostic indicators in gastric cancer patients. *J Surg Oncol.* 1. Dezember 2010;102(7):742–7.
253. Hoepner S, Loh JMS, Riccadonna C, Derouazi M, Maroun CY, Dietrich PY, u. a. Synergy between CD8 T Cells and Th1 or Th2 Polarised CD4 T Cells for Adoptive Immunotherapy of Brain Tumours. *PLOS ONE.* 23. Mai 2013;8(5):e63933.

254. De Monte L, Reni M, Tassi E, Clavenna D, Papa I, Recalde H, u. a. Intratumor T helper type 2 cell infiltrate correlates with cancer-associated fibroblast thymic stromal lymphopoietin production and reduced survival in pancreatic cancer. *J Exp Med.* 14. März 2011;208(3):469–78.
255. Yoon NK, Maresh EL, Shen D, Elshimali Y, Apple S, Horvath S, u. a. Higher Levels of GATA3 Predict Better Survival in Women with Breast Cancer. *Hum Pathol.* 1. Dezember 2010;41(12):1794–801.
256. Schreck S, Friebel D, Buettner M, Distel L, Grabenbauer G, Young LS, u. a. Prognostic impact of tumour-infiltrating Th2 and regulatory T cells in classical Hodgkin lymphoma. *Hematol Oncol.* März 2009;27(1):31–9.
257. Lorvik KB, Hammarström C, Fauskanger M, Haabeth OAW, Zangani M, Haraldsen G, u. a. Adoptive Transfer of Tumor-Specific Th2 Cells Eradicates Tumors by Triggering an In Situ Inflammatory Immune Response. *Cancer Res.* 30. November 2016;76(23):6864–76.
258. Hellstrom KE, Dai M, Hellstrom I. Curing tumor-bearing mice by shifting a Th2 to a Th1 anti-tumor response. *Hum Antibodies.* 2017;25(3–4):147–53.
259. Purwar R, Schlapbach C, Xiao S, Kang HS, Elyaman W, Jiang X, u. a. Robust tumor immunity to melanoma mediated by interleukin 9. *Nat Med.* August 2012;18(8):1248–53.
260. Lu Y, Wang Q, Xue G, Bi E, Ma X, Wang A, u. a. Th9 Cells Represent a Unique Subset of CD4+ T Cells Endowed with the Ability to Eradicate Advanced Tumors. *Cancer Cell.* 11. Juni 2018;33(6):1048-1060.e7.
261. Kumar S, Dhamija B, Marathe S, Ghosh S, Dwivedi A, Karulkar A, u. a. The Th9 Axis Reduces the Oxidative Stress and Promotes the Survival of Malignant T Cells in Cutaneous T-Cell Lymphoma Patients. *Mol Cancer Res.* 2. April 2020;18(4):657–68.
262. Salazar Y, Zheng X, Brunn D, Raifer H, Picard F, Zhang Y, u. a. Microenvironmental Th9 and Th17 lymphocytes induce metastatic spreading in lung cancer. *J Clin Invest.* 130(7):3560–75.
263. Asadzadeh Z, Mohammadi H, Safarzadeh E, Hemmatzadeh M, Mahdian-Shakib A, Jadidi-Niaragh F, u. a. The paradox of Th17 cell functions in tumor immunity. *Cell Immunol.* Dezember 2017;322:15–25.
264. Protosaltis NJ, Liang W, Nudleman E, Ferrara N. Interleukin-22 promotes tumor angiogenesis. *Angiogenesis.* Mai 2019;22(2):311–23.
265. Yang Z, Zhang B, Li D, Lv M, Huang C, Shen GX, u. a. Mast Cells Mobilize Myeloid-Derived Suppressor Cells and Treg Cells in Tumor Microenvironment via IL-17 Pathway in Murine Hepatocarcinoma Model. *PLoS ONE.* 27. Januar 2010;5(1):e8922.
266. Lakshmi Narendra B, Eshvendar Reddy K, Shantikumar S, Ramakrishna S. Immune system: a double-edged sword in cancer. *Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc Al.* September 2013;62(9):823–34.

Quellenverzeichnis

267. Muranski P, Boni A, Antony PA, Cassard L, Irvine KR, Kaiser A, u. a. Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood*. 15. Juli 2008;112(2):362–73.
268. Guéry L, Hugues S. Th17 Cell Plasticity and Functions in Cancer Immunity. *BioMed Res Int*. 2015;2015:314620.
269. Su X, Ye J, Hsueh EC, Zhang Y, Hoft DF, Peng G. Tumor Microenvironments Direct the Recruitment and Expansion of Human Th17 Cells. *J Immunol*. 21. Dezember 2009;184(3):1630–41.
270. Alizadeh D, Katsanis E, Larmonier N. The Multifaceted Role of Th17 Lymphocytes and Their Associated Cytokines in Cancer. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:957878.
271. Hicklin DJ, Marincola FM, Ferrone S. HLA class I antigen downregulation in human cancers: T-cell immunotherapy revives an old story. *Mol Med Today*. April 1999;5(4):178–86.
272. Driessens G, Kline J, Gajewski TF. Costimulatory and coinhibitory receptors in anti-tumor immunity. *Immunol Rev*. Mai 2009;229(1):126–44.
273. French LE, Tschopp J. Defective death receptor signaling as a cause of tumor immune escape. *Semin Cancer Biol*. Februar 2002;12(1):51–5.
274. Wu JD, Higgins LM, Steinle A, Cosman D, Haugk K, Plymate SR. Prevalent expression of the immunostimulatory MHC class I chain-related molecule is counteracted by shedding in prostate cancer. *J Clin Invest*. 16. August 2004;114(4):560–8.
275. Vitale M, Cantoni C, Pietra G, Mingari MC, Moretta L. Effect of tumor cells and tumor microenvironment on NK-cell function. *Eur J Immunol*. 2014;44(6):1582–92.
276. Molgora M, Supino D, Mavilio D, Santoni A, Moretta L, Mantovani A, u. a. The yin-yang of the interaction between myelomonocytic cells and NK cells. *Scand J Immunol*. September 2018;88(3):e12705.
277. Zaiatz-Bittencourt V, Finlay DK, Gardiner CM. Canonical TGF- β Signaling Pathway Represses Human NK Cell Metabolism. *J Immunol*. 15. Juni 2018;200(12):3934–41.
278. Parodi M, Raggi F, Cangelosi D, Manzini C, Balsamo M, Blengio F, u. a. Hypoxia Modifies the Transcriptome of Human NK Cells, Modulates Their Immunoregulatory Profile, and Influences NK Cell Subset Migration. *Front Immunol*. 2018;9. Verfügbar unter: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.02358>
279. Kastenmuller W, Gasteiger G, Subramanian N, Sparwasser T, Busch DH, Belkaid Y, u. a. Treg Selectively Control CD8+ T Cell Effector Pool Size via IL-2 Restriction. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15. September 2011;187(6):3186–97.
280. Solomon I, Amann M, Goubier A, Vargas FA, Zervas D, Qing C, u. a. CD25-Treg-depleting antibodies preserving IL-2 signaling on effector T cells enhance effector activation and antitumor immunity. *Nat Cancer*. Dezember 2020;1(12):1153–66.

281. Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, u. a. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*. 22. November 2007;450(7169):566–9.
282. Stewart CA, Metheny H, Iida N, Smith L, Hanson M, Steinhagen F, u. a. Interferon-dependent IL-10 production by Tregs limits tumor Th17 inflammation. *J Clin Invest*. 1. November 2013;123(11):4859–74.
283. Sawant DV, Yano H, Chikina M, Zhang Q, Liao M, Liu C, u. a. Adaptive plasticity of IL-10+ and IL-35+ Treg cells cooperatively promotes tumor T cell exhaustion. *Nat Immunol*. Juni 2019;20(6):724–35.
284. Lainé A, Labiad O, Hernandez-Vargas H, This S, Sanlaville A, Léon S, u. a. Regulatory T cells promote cancer immune-escape through integrin $\alpha\text{v}\beta\text{8}$ -mediated TGF- β activation. *Nat Commun*. 28. Oktober 2021;12:6228.
285. Zhou H, Chen L, You Y, Zou L, Zou P. Foxp3-transduced polyclonal regulatory T cells suppress NK cell functions in a TGF-beta dependent manner. *Autoimmunity*. Juni 2010;43(4):299–307.
286. Brouwer T, Ijsselsteijn M, Oosting J, Ruano D, van der Ploeg M, Dijk F, u. a. A Paradoxical Role for Regulatory T Cells in the Tumor Microenvironment of Pancreatic Cancer. *Cancers*. 10. August 2022;14(16):3862.
287. Grover P, Goel PN, Greene MI. Regulatory T Cells: Regulation of Identity and Function. *Front Immunol*. 5. Oktober 2021;12:750542.
288. Cao X, Cai SF, Fehniger TA, Song J, Collins LI, Piwnicka-Worms DR, u. a. Granzyme B and Perforin Are Important for Regulatory T Cell-Mediated Suppression of Tumor Clearance. *Immunity*. 26. Oktober 2007;27(4):635–46.
289. Maj T, Wang W, Crespo J, Zhang H, Wang W, Wei S, u. a. Oxidative stress controls regulatory T cell apoptosis and suppressor activity and PD-L1-blockade resistance in tumor. *Nat Immunol*. Dezember 2017;18(12):1332–41.
290. Zarek PE, Huang CT, Lutz ER, Kowalski J, Horton MR, Linden J, u. a. A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood*. 1. Januar 2008;111(1):251–9.
291. Tekguc M, Wing JB, Osaki M, Long J, Sakaguchi S. Treg-expressed CTLA-4 depletes CD80/CD86 by trogocytosis, releasing free PD-L1 on antigen-presenting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 27. Juli 2021;118(30):e2023739118.
292. Dolina JS, Van Braeckel-Budimir N, Thomas GD, Salek-Ardakani S. CD8+ T Cell Exhaustion in Cancer. *Front Immunol*. 2021;12.
Verfügbar unter: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.715234>
293. Maruhashi T, Sugiura D, Okazaki IM, Shimizu K, Maeda TK, Ikubo J, u. a. Binding of LAG-3 to stable peptide-MHC class II limits T cell function and suppresses autoimmunity and anti-cancer immunity. *Immunity*. 10. Mai 2022;55(5):912-924.e8.

Quellenverzeichnis

294. McNamara MA, Nair SK, Holl EK. RNA-Based Vaccines in Cancer Immunotherapy. *J Immunol Res.* 2015;2015:794528.
295. Sterner RC, Sterner RM. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. *Blood Cancer J.* 6. April 2021;11(4):69.
296. Korman AJ, Garrett-Thomson SC, Lonberg N. The foundations of immune checkpoint blockade and the ipilimumab approval decennial. *Nat Rev Drug Discov.* Juli 2022;21(7):509–28.
297. Keam SJ. Tremelimumab: First Approval. *Drugs.* Januar 2023;83(1):93–102.
298. Mahoney KM, Freeman GJ, McDermott DF. The Next Immune-Checkpoint Inhibitors: PD-1/PD-L1 Blockade in Melanoma. *Clin Ther.* 1. April 2015;37(4):764–82.
299. Markham A. Atezolizumab: First Global Approval. *Drugs.* August 2016;76(12):1227–32.
300. Kim ES. Avelumab: First Global Approval. *Drugs.* Mai 2017;77(8):929–37.
301. Boyerinas B, Jochems C, Fantini M, Heery CR, Gulley JL, Tsang KY, u. a. Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Activity of a Novel Anti-PD-L1 Antibody Avelumab (MSB0010718C) on Human Tumor Cells. *Cancer Immunol Res.* 4. Oktober 2015;3(10):1148–57.
302. Juliá EP, Amante A, Pampena MB, Mordoh J, Levy EM. Avelumab, an IgG1 anti-PD-L1 Immune Checkpoint Inhibitor, Triggers NK Cell-Mediated Cytotoxicity and Cytokine Production Against Triple Negative Breast Cancer Cells. *Front Immunol.* 2018;9. Verfügbar unter: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.02140>
303. Syn NL, Teng MWL, Mok TSK, Soo RA. De-novo and acquired resistance to immune checkpoint targeting. *Lancet Oncol.* Dezember 2017;18(12):e731–41.
304. Schöffski P, Tan DSW, Martín M, Ochoa-de-Olza M, Sarantopoulos J, Carvajal RD, u. a. Phase I/II study of the LAG-3 inhibitor ieramilimab (LAG525) ± anti-PD-1 spartalizumab (PDR001) in patients with advanced malignancies. *J Immunother Cancer.* 25. Februar 2022;10(2):e003776.
305. Chocarro L, Bocanegra A, Blanco E, Fernández-Rubio L, Arasanz H, Echaide M, u. a. Cutting-Edge: Preclinical and Clinical Development of the First Approved Lag-3 Inhibitor. *Cells.* 30. Juli 2022;11(15):2351.
306. Chiba S, Baghdadi M, Akiba H, Yoshiyama H, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, u. a. Tumor-infiltrating DCs suppress nucleic acid-mediated innate immune responses through interactions between the receptor TIM-3 and the alarmin HMGB1. *Nat Immunol.* September 2012;13(9):832–42.
307. Zhu C, Anderson AC, Schubart A, Xiong H, Imitola J, Khoury SJ, u. a. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat Immunol.* Dezember 2005;6(12):1245–52.

308. Huang YH, Zhu C, Kondo Y, Anderson AC, Gandhi A, Russell A, u. a. CEACAM1 regulates TIM-3-mediated tolerance and exhaustion. *Nature*. 15. Januar 2015;517(7534):386–90.
309. Chen Z, Chen L, Baker K, Olszak T, Zeissig S, Huang YH, u. a. CEACAM1 dampens antitumor immunity by down-regulating NKG2D ligand expression on tumor cells. *J Exp Med*. 19. Dezember 2011;208(13):2633–40.
310. Khan M, Arooj S, Wang H. NK Cell-Based Immune Checkpoint Inhibition. *Front Immunol*. 13. Februar 2020;11:167.
311. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 22. März 2012;12(4):252–64.
312. Feng M, Jiang W, Kim BY, Zhang C, Fu YX, Weissman IL. Phagocytosis checkpoints as new targets for cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. Oktober 2019;19(10):568–86.
313. Qin S, Xu L, Yi M, Yu S, Wu K, Luo S. Novel immune checkpoint targets: moving beyond PD-1 and CTLA-4. *Mol Cancer*. 2019;18.
Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6833286/>
314. Komiya T, Huang CH. Updates in the Clinical Development of Epacadostat and Other Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 Inhibitors (IDO1) for Human Cancers. *Front Oncol*. 4. Oktober 2018;8:423.
315. Nguyen NT, Kimura A, Nakahama T, Chinen I, Masuda K, Nohara K, u. a. Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates dendritic cell immunogenicity via a kynurenine-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 16. November 2010;107(46):19961–6.
316. Yu J, Sun J, Wang SE, Li H, Cao S, Cong Y, u. a. Upregulated Expression of Indoleamine 2, 3-Dioxygenase in Primary Breast Cancer Correlates with Increase of Infiltrated Regulatory T Cells In Situ and Lymph Node Metastasis. *Clin Dev Immunol*. 2011;2011.
Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3202140/>
317. Giannone G, Ghisoni E, Genta S, Scotto G, Tuninetti V, Turinetti M, u. a. Immuno-Metabolism and Microenvironment in Cancer: Key Players for Immunotherapy. *Int J Mol Sci*. 21. Juni 2020;21(12):4414.
318. Burnstock G. Purinergic Signalling: Therapeutic Developments. *Front Pharmacol*. 2017;8.
Verfügbar unter: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2017.00661>
319. Burnstock G. Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci CMLS*. Juni 2007;64(12):1471–83.
320. Antonioli L, Blandizzi C, Pacher P, Haskó G. Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. *Nat Rev Cancer*. 14. November 2013;13(12):842–57.

Quellenverzeichnis

321. Ciruela F, Albergaria C, Soriano A, Cuffi L, Carbonell L, Sánchez S, u. a. Adenosine receptors interacting proteins (ARIPs): Behind the biology of adenosine signaling. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr.* 1. Januar 2010;1798(1):9–20.
322. Sitkovsky M, Lukashev D. Regulation of immune cells by local-tissue oxygen tension: HIF1 alpha and adenosine receptors. *Nat Rev Immunol.* September 2005;5(9):712–21.
323. Young A, Ngiow SF, Barkauskas DS, Sult E, Hay C, Blake SJ, u. a. Co-inhibition of CD73 and A2AR Adenosine Signaling Improves Anti-tumor Immune Responses. *Cancer Cell.* 12. September 2016;30(3):391–403.
324. Ma SR, Deng WW, Liu JF, Mao L, Yu GT, Bu LL, u. a. Blockade of adenosine A2A receptor enhances CD8+ T cells response and decreases regulatory T cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Cancer.* 7. Juni 2017;16:99.
325. Young A, Ngiow SF, Gao Y, Patch AM, Barkauskas DS, Messaoudene M, u. a. A2AR Adenosine Signaling Suppresses Natural Killer Cell Maturation in the Tumor Microenvironment. *Cancer Res.* 14. Februar 2018;78(4):1003–16.
326. Raskovalova T, Huang X, Sitkovsky M, Zacharia LC, Jackson EK, Gorelik E. Gs Protein-Coupled Adenosine Receptor Signaling and Lytic Function of Activated NK Cells. *J Immunol.* 1. Oktober 2005;175(7):4383–91.
327. Raskovalova T, Lokshin A, Huang X, Jackson EK, Gorelik E. Adenosine-mediated inhibition of cytotoxic activity and cytokine production by IL-2/NKp46-activated NK cells: involvement of protein kinase A isozyme I (PKA I). *Immunol Res.* 2006;36(1–3):91–9.
328. Haskó G, Cronstein BN. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol.* Januar 2004;25(1):33–9.
329. Csóka B, Selmeczy Z, Koscsó B, Németh ZH, Pacher P, Murray PJ, u. a. Adenosine promotes alternative macrophage activation via A2A and A2B receptors. *FASEB J.* Januar 2012;26(1):376–86.
330. Novitskiy SV, Ryzhov S, Zaynagetdinov R, Goldstein AE, Huang Y, Tikhomirov OY, u. a. Adenosine receptors in regulation of dendritic cell differentiation and function. *Blood.* 1. September 2008;112(5):1822–31.
331. Cekic C, Sag D, Li Y, Theodorescu D, Strieter RM, Linden J. Adenosine A2B receptor blockade slows growth of bladder and breast tumors. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1. Januar 2012;188(1):10.4049/jimmunol.1101845.
332. Iannone R, Miele L, Maiolino P, Pinto A, Morello S. Blockade of A2b adenosine receptor reduces tumor growth and immune suppression mediated by myeloid-derived suppressor cells in a mouse model of melanoma. *Neoplasia N Y N.* Dezember 2013;15(12):1400–9.

333. Ohta A, Kini R, Ohta A, Subramanian M, Madasu M, Sitkovsky M. The development and immunosuppressive functions of CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ regulatory T cells are under influence of the adenosine-A2A adenosine receptor pathway. *Front Immunol.* 5. Juli 2012;3:190.
334. Lan J, Lu H, Samanta D, Salman S, Lu Y, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1-dependent expression of adenosine receptor 2B promotes breast cancer stem cell enrichment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 9. Oktober 2018;115(41):E9640–8.
335. Mittal D, Sinha D, Barkauskas D, Young A, Kalimutho M, Stannard K, u. a. Adenosine 2B Receptor Expression on Cancer Cells Promotes Metastasis. *Cancer Res.* 1. August 2016;76(15):4372–82.
336. Vecchio EA, Tan CYR, Gregory KJ, Christopoulos A, White PJ, May LT. Ligand-Independent Adenosine A2B Receptor Constitutive Activity as a Promoter of Prostate Cancer Cell Proliferation. *J Pharmacol Exp Ther.* April 2016;357(1):36–44.
337. Liu T zhu, Wang X, Bai Y feng, Liao H zhan, Qiu S cong, Yang Y qing, u. a. The HIF-2alpha dependent induction of PAP and adenosine synthesis regulates glioblastoma stem cell function through the A2B adenosine receptor. *Int J Biochem Cell Biol.* April 2014;49:8–16.
338. Beavis PA, Divisekera U, Paget C, Chow MT, John LB, Devaud C, u. a. Blockade of A2A receptors potently suppresses the metastasis of CD73⁺ tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 3. September 2013;110(36):14711–6.
339. Shi L, Wu Z, Miao J, Du S, Ai S, Xu E, u. a. Adenosine interaction with adenosine receptor A2a promotes gastric cancer metastasis by enhancing PI3K–AKT–mTOR signaling. *Mol Biol Cell.* 1. September 2019;30(19):2527–34.
340. Allard B, Cousineau I, Allard D, Buisseret L, Pommey S, Chrobak P, u. a. Adenosine A2a receptor promotes lymphangiogenesis and lymph node metastasis. *Oncoimmunology.* 26. April 2019;8(8):1601481.
341. Richard CL, Tan EY, Blay J. Adenosine upregulates CXCR4 and enhances the proliferative and migratory responses of human carcinoma cells to CXCL12/SDF-1alpha. *Int J Cancer.* 1. November 2006;119(9):2044–53.
342. Junger WG. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nat Rev Immunol.* März 2011;11(3):201–12.
343. Vénéreau E, Ceriotti C, Bianchi ME. DAMPs from Cell Death to New Life. *Front Immunol.* 18. August 2015;6:422.
344. Hatfield SM, Kjaergaard J, Lukashev D, Schreiber TH, Belikoff B, Abbott R, u. a. Immunological mechanisms of the antitumor effects of supplemental oxygenation. *Sci Transl Med.* 4. März 2015;7(277):277ra30.

Quellenverzeichnis

345. Elliott MR, Chekeni FB, Trampont PC, Lazarowski ER, Kadl A, Walk SF, u. a. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal for phagocytic clearance. *Nature*. 10. September 2009;461(7261):282–6.
346. Di Virgilio F, Sarti AC, Falzoni S, De Marchi E, Adinolfi E. Extracellular ATP and P2 purinergic signalling in the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer*. Oktober 2018;18(10):601–18.
347. Ghiringhelli F, Apetoh L, Tesniere A, Aymeric L, Ma Y, Ortiz C, u. a. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. *Nat Med*. Oktober 2009;15(10):1170–8.
348. Galluzzi L, Vacchelli E, Pedro JMBS, Buqué A, Senovilla L, Baracco EE, u. a. Classification of current anticancer immunotherapies. *Oncotarget*. 18. Dezember 2014;5(24):12472–508.
349. Garg AD, Martin S, Golab J, Agostinis P. Danger signalling during cancer cell death: origins, plasticity and regulation. *Cell Death Differ*. Januar 2014;21(1):26–38.
350. Di Virgilio F, Dal Ben D, Sarti AC, Giuliani AL, Falzoni S. The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. *Immunity*. 18. Juli 2017;47(1):15–31.
351. De Marchi E, Orioli E, Pegoraro A, Sangaletti S, Portararo P, Curti A, u. a. The P2X7 receptor modulates immune cells infiltration, ectonucleotidases expression and extracellular ATP levels in the tumor microenvironment. *Oncogene*. 2019;38(19):3636–50.
352. Longhi MS, Robson SC, Bernstein SH, Serra S, Deaglio S. Biological functions of ectoenzymes in regulating extracellular adenosine levels in neoplastic and inflammatory disease states. *J Mol Med Berl Ger*. Februar 2013;91(2):165–72.
353. Pellegatti P, Raffaghello L, Bianchi G, Piccardi F, Pistoia V, Virgilio FD. Increased Level of Extracellular ATP at Tumor Sites: In Vivo Imaging with Plasma Membrane Luciferase. *PLOS ONE*. 9. Juli 2008;3(7):e2599.
354. Giuliani AL, Sarti AC, Di Virgilio F. Extracellular nucleotides and nucleosides as signalling molecules. *Immunol Lett*. Januar 2019;205:16–24.
355. Horenstein AL, Chillemi A, Zaccarello G, Bruzzone S, Quarona V, Zito A, u. a. A CD38/CD203a/CD73 ectoenzymatic pathway independent of CD39 drives a novel adenosinergic loop in human T lymphocytes. *Oncoimmunology*. 1. September 2013;2(9). Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3850273/>
356. Young JD, Yao SYM, Baldwin JM, Cass CE, Baldwin SA. The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29. *Mol Aspects Med*. Juni 2013;34(2–3):529–47.
357. Monroy-Mora A, de Lourdes Mora-García M, Alheli Monroy Mora K, Hernández-Montes J, García-Rocha R, Don-López CA, u. a. Inhibition of adenosine deaminase activity reverses resistance to the cytotoxic effect of high adenosine levels in cervical cancer cells. *Cytokine*. Oktober 2022;158:155977.

358. Antonioli L, Colucci R, La Motta C, Tuccori M, Awwad O, Da Settimo F, u. a. Adenosine deaminase in the modulation of immune system and its potential as a novel target for treatment of inflammatory disorders. *Curr Drug Targets*. Juni 2012;13(6):842–62.
359. Allard B, Beavis PA, Darcy PK, Stagg J. Immunosuppressive activities of adenosine in cancer. *Curr Opin Pharmacol*. August 2016;29:7–16.
360. Haas CB, Lovász M, Braganhol E, Pacher P, Haskó G. Ectonucleotidases in Inflammation, Immunity, and Cancer. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1. Mai 2021;206(9):1983–90.
361. Kukulski F, Lévesque SA, Lavoie ÉG, Lecka J, Bigonnesse F, Knowles AF, u. a. Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8. *Purinergic Signal*. Juni 2005;1(2):193.
362. Bergamin LS, Braganhol E, Zanin RF, Edelweiss MIA, Battastini AMO. Ectonucleotidases in Tumor Cells and Tumor-Associated Immune Cells: An Overview. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:959848.
363. Allard B, Allard D, Buisseret L, Stagg J. The adenosine pathway in immuno-oncology. *Nat Rev Clin Oncol*. Oktober 2020;17(10):611–29.
364. Moesta AK, Li XY, Smyth MJ. Targeting CD39 in cancer. *Nat Rev Immunol*. Dezember 2020;20(12):739–55.
365. Li XY, Moesta AK, Xiao C, Nakamura K, Casey M, Zhang H, u. a. Targeting CD39 in cancer reveals an extracellular ATP and inflammasome driven tumor immunity. *Cancer Discov*. Dezember 2019;9(12):1754–73.
366. Bastid J, Regairaz A, Bonnefoy N, Déjou C, Giustiniani J, Laheurte C, u. a. Inhibition of CD39 enzymatic function at the surface of tumor cells alleviates their immunosuppressive activity. *Cancer Immunol Res*. März 2015;3(3):254–65.
367. Peres RS, Donate PB, Talbot J, Cecilio NT, Lobo PR, Machado CC, u. a. TGF- β signalling defect is linked to low CD39 expression on regulatory T cells and methotrexate resistance in rheumatoid arthritis. *J Autoimmun*. Juni 2018;90:49–58.
368. Gavin MA, Rasmussen JP, Fontenot JD, Vasta V, Manganiello VC, Beavo JA, u. a. Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature*. 15. Februar 2007;445(7129):771–5.
369. Hatfield SM, Kjaergaard J, Lukashev D, Belikoff B, Schreiber TH, Sethumadhavan S, u. a. Systemic oxygenation weakens the hypoxia and Hypoxia Inducible Factor 1 α -dependent and extracellular adenosine-mediated tumor protection. *J Mol Med Berl Ger*. Dezember 2014;92(12):1283–92.
370. Yegutkin GG. Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: Functional implications and measurement of activities. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 1. November 2014;49(6):473–97.

371. Maksimow M, Kyhälä L, Nieminen A, Kylänpää L, Aalto K, Elima K, u. a. Early prediction of persistent organ failure by soluble CD73 in patients with acute pancreatitis*. *Crit Care Med.* Dezember 2014;42(12):2556–64.
372. Liu H, Zhang Y, Wu H, D'Alessandro A, Yegutkin GG, Song A, u. a. Beneficial Role of Erythrocyte Adenosine A2B Receptor-Mediated AMPK Activation in High Altitude Hypoxia. *Circulation.* 2. August 2016;134(5):405–21.
373. Zukowska P, Kutryb-Zajac B, Toczek M, Smolenski RT, Slominska EM. The role of ecto-5'-nucleotidase in endothelial dysfunction and vascular pathologies. *Pharmacol Rep PR.* August 2015;67(4):675–81.
374. Allard D, Allard B, Gaudreau PO, Chrobak P, Stagg J. CD73-adenosine: a next-generation target in immuno-oncology. *Immunotherapy.* Februar 2016;8(2):145–63.
375. Nevedomskaya E, Perryman R, Solanki S, Syed N, Mayboroda OA, Keun HC. A Systems Oncology Approach Identifies NT5E as a Key Metabolic Regulator in Tumor Cells and Modulator of Platinum Sensitivity. *J Proteome Res.* 4. Januar 2016;15(1):280–90.
376. Loi S, Pommey S, Haibe-Kains B, Beavis PA, Darcy PK, Smyth MJ, u. a. CD73 promotes anthracycline resistance and poor prognosis in triple negative breast cancer. *Proc Natl Acad Sci.* 2. Juli 2013;110(27):11091–6.
377. Ryzhov SV, Pickup MW, Chytil A, Gorska AE, Zhang Q, Owens P, u. a. Role of TGF β signaling in generation of CD39+CD73+ myeloid cells in tumors. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15. September 2014;193(6):3155–64.
378. Regateiro FS, Howie D, Nolan KF, Agorogiannis EI, Greaves DR, Cobbold SP, u. a. Generation of anti-inflammatory adenosine by leukocytes is regulated by TGF- β . *Eur J Immunol.* 2011;41(10):2955–65.
379. Mandapathil M, Hilldorfer B, Szczepanski MJ, Czystowska M, Szajnik M, Ren J, u. a. Generation and Accumulation of Immunosuppressive Adenosine by Human CD4+CD25^{high}FOXP3+ Regulatory T Cells. *J Biol Chem.* 5. März 2010;285(10):7176–86.
380. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, u. a. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med.* 11. Juni 2007;204(6):1257–65.
381. Zimmermann H. History of ectonucleotidases and their role in purinergic signaling. *Biochem Pharmacol.* Mai 2021;187:114322.
382. Namasivayam V, Lee SY, Müller CE. The promiscuous ectonucleotidase NPP1: molecular insights into substrate binding and hydrolysis. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* März 2017;1861(3):603–14.
383. Li L, Yin Q, Kuss P, Maliga Z, Millán JL, Wu H, u. a. Hydrolysis of 2'3'-cGAMP by ENPP1 and design of non-hydrolyzable analogs. *Nat Chem Biol.* Dezember 2014;10(12):1043–8.

384. Kato K, Nishimasu H, Oikawa D, Hirano S, Hirano H, Kasuya G, u. a. Structural insights into cGAMP degradation by Ecto-nucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1. *Nat Commun.* 24. Oktober 2018;9(1):4424.
385. Goding JW, Grobбен B, Slegers H. Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis.* 20. Mai 2003;1638(1):1–19.
386. Goldfine ID, Maddux BA, Youngren JF, Reaven G, Accili D, Trischitta V, u. a. The Role of Membrane Glycoprotein Plasma Cell Antigen 1/Ectonucleotide Pyrophosphatase Phosphodiesterase 1 in the Pathogenesis of Insulin Resistance and Related Abnormalities. *Endocr Rev.* Februar 2008;29(1):62–75.
387. Grobбен B, De Deyn PP, Slegers H. Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. *Cell Tissue Res.* Dezember 2002;310(3):257–70.
388. Aerts I, Martin JJ, De Deyn PP, Van Ginniken C, Van Ostade X, Kockx M, u. a. The expression of ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 (E-NPP1) is correlated with astrocytic tumor grade. *Clin Neurol Neurosurg.* April 2011;113(3):224–9.
389. Bageritz J, Puccio L, Piro RM, Hovestadt V, Phillips E, Pankert T, u. a. Stem cell characteristics in glioblastoma are maintained by the ecto-nucleotidase E-NPP1. *Cell Death Differ.* Juni 2014;21(6):929–40.
390. Morandi F, Morandi B, Horenstein AL, Chillemi A, Quarona V, Zaccarello G, u. a. A non-canonical adenosinergic pathway led by CD38 in human melanoma cells induces suppression of T cell proliferation. *Oncotarget.* 25. Juli 2015;6(28):25602–18.
391. Deterre P, Gelman L, Gary-Gouy H, Arrieumerlou C, Berthelie V, Tixier JM, u. a. Coordinated regulation in human T cells of nucleotide-hydrolyzing ecto-enzymatic activities, including CD38 and PC-1. Possible role in the recycling of nicotinamide adenine dinucleotide metabolites. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15. August 1996;157(4):1381–8.
392. Morandi F, Horenstein AL, Chillemi A, Quarona V, Chiesa S, Imperatori A, u. a. CD56brightCD16- NK Cells Produce Adenosine through a CD38-Mediated Pathway and Act as Regulatory Cells Inhibiting Autologous CD4+ T Cell Proliferation. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1. August 2015;195(3):965–72.
393. Galperin MY, Bairoch A, Koonin EV. A superfamily of metalloenzymes unifies phosphopentomutase and cofactor-independent phosphoglycerate mutase with alkaline phosphatases and sulfatases. *Protein Sci Publ Protein Soc.* August 1998;7(8):1829–35.
394. Kato K, Nishimasu H, Okudaira S, Mihara E, Ishitani R, Takagi J, u. a. Crystal structure of Enpp1, an extracellular glycoprotein involved in bone mineralization and insulin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 16. Oktober 2012;109(42):16876–81.

395. Lee SY, Sarkar S, Bhattarai S, Namasivayam V, De Jonghe S, Stephan H, u. a. Substrate-Dependence of Competitive Nucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase1 (NPP1) Inhibitors. *Front Pharmacol.* 15. Februar 2017;8:54.
396. Schäkel L, Schmies CC, Idris RM, Luo X, Lee SY, Lopez V, u. a. Nucleotide Analog ARL67156 as a Lead Structure for the Development of CD39 and Dual CD39/CD73 Ectonucleotidase Inhibitors. *Front Pharmacol.* 8. September 2020;11:1294.
397. Bhattarai S, Freundlieb M, Pippel J, Meyer A, Abdelrahman A, Fiene A, u. a. α,β -Methylene-ADP (AOPCP) Derivatives and Analogues: Development of Potent and Selective ecto-5'-Nucleotidase (CD73) Inhibitors. *J Med Chem.* 13. August 2015;58(15):6248–63.
398. Lee SY, Müller CE. Nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 (NPP1) and its inhibitors †The authors declare no competing interests. *MedChemComm.* 9. Februar 2017;8(5):823–40.
399. Lee SY, Perotti A, De Jonghe S, Herdewijn P, Hanck T, Müller CE. Thiazolo[3,2-a]benzimidazol-3(2H)-one derivatives: Structure-activity relationships of selective nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase1 (NPP1) inhibitors. *Bioorg Med Chem.* 15. Juli 2016;24(14):3157–65.
400. Hasenknopf B. Polyoxometalates: introduction to a class of inorganic compounds and their biomedical applications. *Front Biosci J Virtual Libr.* 1. Januar 2005;10:275–87.
401. Lee SY, Fiene A, Li W, Hanck T, Brylev KA, Fedorov VE, u. a. Polyoxometalates—Potent and selective ecto-nucleotidase inhibitors. *Biochem Pharmacol.* 15. Januar 2015;93(2):171–81.
402. Hosoda N, Hoshino S ichi, Kanda Y, Katada T. Inhibition of phosphodiesterase/pyrophosphatase activity of PC-1 by its association with glycosaminoglycans. *Eur J Biochem.* 1. Oktober 1999;265(2):763–70.
403. Lopez V, Schäkel L, Schuh HJM, Schmidt MS, Mirza S, Renn C, u. a. Sulfated Polysaccharides from Macroalgae Are Potent Dual Inhibitors of Human ATP-Hydrolyzing Ectonucleotidases NPP1 and CD39. *Mar Drugs.* 22. Januar 2021;19(2):51.
404. Vollmayer P, Clair T, Goding JW, Sano K, Servos J, Zimmermann H. Hydrolysis of diadenosine polyphosphates by nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases. *Eur J Biochem.* 1. Juli 2003;270(14):2971–8.
405. Asensio AC, Rodríguez-Ferrer CR, Castañeyra-Perdomo A, Oaknin S, Rotllán P. Biochemical analysis of ecto-nucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase activity in brain membranes indicates involvement of NPP1 isoenzyme in extracellular hydrolysis of diadenosine polyphosphates in central nervous system. *Neurochem Int.* März 2007;50(4):581–90.
406. Manjunath M, Choudhary B. Triple-negative breast cancer: A run-through of features, classification and current therapies. *Oncol Lett.* Juli 2021;22(1):512.

407. Lozzio CB, Lozzio BB. Human Chronic Myelogenous Leukemia Cell-Line With Positive Philadelphia Chromosome. *Blood*. 1. März 1975;45(3):321–34.
408. Lozzio BB, Lozzio CB. Properties and usefulness of the original K-562 human myelogenous leukemia cell line. *Leuk Res*. 1979;3(6):363–70.
409. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, u. a. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1. August 2007;114(2):97–109.
410. Li H, Lei B, Xiang W, Wang H, Feng W, Liu Y, u. a. Differences in Protein Expression between the U251 and U87 Cell Lines. *Turk Neurosurg*. 2017;27(6):894–903.
411. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 16. Dezember 1983;65(1):55–63.
412. Präbst K, Engelhardt H, Ringgeler S, Hübner H. Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. In: Gilbert DF, Friedrich O, Herausgeber. *Cell Viability Assays: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer; 2017. S. 1–17. (Methods in Molecular Biology).
Verfügbar unter: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9_1
413. Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev*. 2005;11:127–52.
414. Lee Y, Rio DC. Mechanisms and Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing. *Annu Rev Biochem*. 2015;84:291–323.
415. Hyjek M, Figiel M, Nowotny M. RNases H: Structure and mechanism. *DNA Repair*. Dezember 2019;84:102672.
416. Berg JM, Tymoczko JL, Gatto GJ, Stryer L. *Stryer Biochemie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2018.
Verfügbar unter: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-54620-8>
417. Navarro E, Serrano-Heras G, Castaño MJ, Solera J. Real-time PCR detection chemistry. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 15. Januar 2015;439:231–50.
418. Taylor S, Wakem M, Dijkman G, Alsarraj M, Nguyen M. A practical approach to RT-qPCR—Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods*. April 2010;50(4):S1–5.
419. Tan SC, Yiap BC. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *BioMed Res Int*. 30. November 2009;2009:e574398.
420. Arnemann J. DNA-/RNA-Konzentrationsbestimmung. In: Gressner AM, Arndt T, Herausgeber. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2019. S. 719–719. (Springer Reference Medizin).
Verfügbar unter: https://doi.org/10.1007/978-3-662-48986-4_3464

Quellenverzeichnis

421. Green MR, Sambrook J. Removing DNA Contamination from RNA Samples by Treatment with RNase-Free DNase I. *Cold Spring Harb Protoc.* 1. Oktober 2019;2019(10).
422. Regier N, Frey B. Experimental comparison of relative RT-qPCR quantification approaches for gene expression studies in poplar. *BMC Mol Biol.* 11. August 2010;11:57.
423. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques.* Juli 2005;39(1):75–85.
424. Kozera B, Rapacz M. Reference genes in real-time PCR. *J Appl Genet.* 2013;54(4):391–406.
425. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods.* 1. Dezember 2001;25(4):402–8.
426. Evenhuis CJ, Hruska V, Guijt RM, Macka M, Gas B, Marriott PJ, u. a. Reliable electrophoretic mobilities free from Joule heating effects using CE. *Electrophoresis.* Oktober 2007;28(20):3759–66.
427. Palonen S, Jussila M, Porras SP, Hyötyläinen T, Riekkola ML. Extremely high electric field strengths in non-aqueous capillary electrophoresis. *J Chromatogr A.* 4. Mai 2001;916(1):89–99.
428. Gattu S, Carihfield CL, Lu G, Bwanali L, Veltri LM, Holland LA. Advances in enzyme substrate analysis with capillary electrophoresis. *Methods.* 15. August 2018;146:93–106.
429. Ermakov SV, Zhukov MYu null, Capelli L, Righetti PG. Quantitative studies of different injection systems in capillary electrophoresis. *Electrophoresis.* 1994;15(8–9):1158–66.
430. Unger KK, Kumar D, Grün M, Büchel G, Lüdtkke S, Adam T, u. a. Synthesis of spherical porous silicas in the micron and submicron size range: challenges and opportunities for miniaturized high-resolution chromatographic and electrokinetic separations. *J Chromatogr A.* 15. September 2000;892(1):47–55.
431. Wätzig H, Günter S. Capillary electrophoresis-a high performance analytical separation technique. *Clin Chem Lab Med.* Juni 2003;41(6):724–38.
432. Lin S, Xu L, Chi Wang A, Wang ZL. Quantifying electron-transfer in liquid-solid contact electrification and the formation of electric double-layer. *Nat Commun.* 21. Januar 2020;11(1):399.
433. Moring SE, Reel RT, van Soest REJ. Optical improvements of a Z-shaped cell for high-sensitivity UV absorbance detection in capillary electrophoresis. *Anal Chem.* 1. Dezember 1993;65(23):3454–9.

434. Pastor-Anglada M, Pérez-Torras S. Who Is Who in Adenosine Transport. *Front Pharmacol.* 14. Juni 2018;9.
Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6010718/>
435. Poppe D, Doerr J, Schneider M, Wilkens R, Steinbeck JA, Ladewig J, u. a. Genome Editing in Neuroepithelial Stem Cells to Generate Human Neurons with High Adenosine-Releasing Capacity. *STEM CELLS Transl Med.* 2018;7(6):477–86.
436. Ito A, Ito T. Absorption Spectra of Deoxyribose, Ribosephosphate, ATP and DNA by direct transmission measurements in the Vacuum-UV (150—190 nm) and Far-UV (190—260 nm) regions using synchrotron radiation as a light source. *Photochem Photobiol.* 1986;44(3):355–8.
437. Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, u. a. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol.* 11. Oktober 2011;7:539.
438. Lee GB, Hung CI, Ke BJ, Huang GR, Hwei BH, Lai HF. Hydrodynamic Focusing for a Micromachined Flow Cytometer. *J Fluids Eng.* 18. April 2001;123(3):672–9.
439. Salzman GC, Singham SB, Johnston RG, Bohren CF. Light Scattering Properties of Cells. In: Demers S, Herausgeber. *Particle Analysis in Oceanography.* Berlin, Heidelberg: Springer; 1991. S. 189–209. (NATO ASI Series).
Verfügbar unter: https://doi.org/10.1007/978-3-642-75121-9_8
440. Givan AL. Flow Cytometry: An Introduction. In: Hawley TS, Hawley RG, Herausgeber. *Flow Cytometry Protocols.* Totowa, NJ: Humana Press; 2011. S. 1–29. (Methods in Molecular Biology).
Verfügbar unter: https://doi.org/10.1007/978-1-61737-950-5_1
441. Waggoner A. Optical Filter Sets for Multiparameter Flow Cytometry. *Curr Protoc Cytom.* 1997;00(1):1.5.1-1.5.8.
442. Lawrence WG, Varadi G, Entine G, Podniesinski E, Wallace PK. Enhanced red and near infrared detection in flow cytometry using avalanche photodiodes. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol.* August 2008;73(8):767–76.
443. Böhmer RM, Bandala-Sanchez E, Harrison LC. Forward light scatter is a simple measure of T-cell activation and proliferation but is not universally suited for doublet discrimination. *Cytometry A.* 2011;79A(8):646–52.
444. Naivar MA, Galbraith DW. Digital Data Acquisition and Processing. *Curr Protoc Cytom.* 2015;71(1):10.19.1-10.19.13.
445. Baltes F, Pfeifer V, Silbermann K, Caspers J, Wantoch von Rekowski K, Schlesinger M, u. a. β 1-Integrin binding to collagen type 1 transmits breast cancer cells into chemoresistance by activating ABC efflux transporters. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* Mai 2020;1867(5):118663.

Quellenverzeichnis

446. Fuentes E, Fuentes M, Caballero J, Palomo I, Hinz S, El-Tayeb A, u. a. Adenosine A2A receptor agonists with potent antiplatelet activity. *Platelets*. 3. April 2018;29(3):292–300.
447. Donnelly-Roberts DL, Namovic MT, Han P, Jarvis MF. Mammalian P2X7 receptor pharmacology: comparison of recombinant mouse, rat and human P2X7 receptors. *Br J Pharmacol*. August 2009;157(7):1203–14.
448. Shevach EM, Thornton AM. tTregs, pTregs, and iTregs: similarities and differences. *Immunol Rev*. 2014;259(1):88–102.
449. Bauer DR, Leibold T, Chafin DR. Making a science out of preanalytics: An analytical method to determine optimal tissue fixation in real-time. *PLoS ONE*. 14. Oktober 2021;16(10):e0258495.
450. Law JP, Hirschhorn DF, Owen RE, Biswas HH, Norris PJ, Lanteri MC. The importance of Foxp3 antibody and fixation/permeabilization buffer combinations in identifying CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Cytometry A*. 2009;75A(12):1040–50.
451. Riederer BM, Porchet R, Marugg RA, Binder LI. Solubility of cytoskeletal proteins in immunohistochemistry and the influence of fixation. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc*. April 1993;41(4):609–16.
452. Niki H, Hosokawa S, Nagaike K, Tagawa T. A new immunofluorostaining method using red fluorescence of PerCP on formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *J Immunol Methods*. 1. Oktober 2004;293(1):143–51.
453. Produktinformation BB. BD PerCP-Cy5.5 and PerCP - Conjugated Reagents. :1–4.
454. Produktinformation Bio Legend. Tandem Dyes.
Verfügbar unter: <https://www.biologend.com/en-us/tandem-dyes>
455. Ren Q, Jiang C, Liu J. CFDA-SE Combined with MACSiBeads™ Particles to Evaluate the Inhibitory Effect of Treg Cells in vitro. *Ann Clin Lab Sci*. 11. Januar 2019;49(6):740–7.
456. Sengupta SK, Tinter SK, Lazarus H, Brown BL, Modest EJ. 7-substituted actinomycin D analogs. Chemical and growth-inhibitory studies. *J Med Chem*. Dezember 1975;18(12):1175–80.
457. Modest EJ, Sengupta SK. 7-Substituted actinomycin D (NSC-3053) analogs as fluorescent DNA-binding and experimental antitumor agents. *Cancer Chemother Rep*. 1974;58(1):35–48.
458. Kato K, Hamaguchi Y, Okawa S, Ishikawa E, Kobayashi K, Katunuma N. Use of Rabbit Antibody IgG Bound onto Plain and Aminoalkylsilyl Glass Surface for the Enzyme-Linked Sandwich Immunoassay. *J Biochem (Tokyo)*. 1977;82(1):261–6.
459. Bratthauer GL. The Avidin–Biotin Complex (ABC) Method and Other Avidin–Biotin Binding Methods. In: Oliver C, Jamur MC, Herausgeber. *Immunocytochemical Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; 2010. S. 257–70. (Methods in Molecular Biology). Verfügbar unter: https://doi.org/10.1007/978-1-59745-324-0_26

460. Nguyen TT, Sly KL, Conboy JC. Comparison of the Energetics of Avidin, Streptavidin, NeutrAvidin, and Anti-Biotin Antibody Binding to Biotinylated Lipid Bilayer Examined by Second-Harmonic Generation. *Anal Chem.* 3. Januar 2012;84(1):201–8.
461. Krieg R, Halbhuber KJ. Recent advances in catalytic peroxidase histochemistry. *Cell Mol Biol Noisy--Gd Fr.* Juni 2003;49(4):547–63.
462. Frey A, Meckelein B, Externest D, Schmidt MA. A stable and highly sensitive 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine-based substrate reagent for enzyme-linked immunosorbent assays. *J Immunol Methods.* 13. Januar 2000;233(1):47–56.
463. Filer JE, Channon RB, Henry CS, Geiss BJ. A Nuclease Protection ELISA Assay for Colorimetric and Electrochemical Detection of Nucleic Acids. *Anal Methods Adv Methods Appl.* 28. Februar 2019;11(8):1027–34.
464. Rolshoven GW. Design, synthesis and pharmacological evaluation of nucleotidic and non-nucleotidic inhibitors and probes for the ecto-5'-nucleotidase (CD73). [Bonn]; 2022.
465. Stella J, Buers I, van de Wetering K, Höhne W, Rutsch F, Nitschke Y. Effects of Different Variants in the ENPP1 Gene on the Functional Properties of Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase Family Member 1. *Hum Mutat.* 2016;37(11):1190–201.
466. Lopez V, Schuh HJM, Mirza S, Vaaßen VJ, Schmidt MS, Sylvester K, u. a. Heparins are potent inhibitors of ectonucleotide pyrophosphatase/phospho-diesterase-1 (NPP1) – a promising target for the immunotherapy of cancer. *Front Immunol.* 2023;14.
Verfügbar unter: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2023.1173634>
467. Allard B, Turcotte M, Stagg J. Targeting CD73 and downstream adenosine receptor signaling in triple-negative breast cancer. *Expert Opin Ther Targets.* August 2014;18(8):863–81.
468. Claus M, Greil J, Watzl C. Comprehensive analysis of NK cell function in whole blood samples. *J Immunol Methods.* 28. Februar 2009;341(1–2):154–64.
469. Rajarathnam K, Desai UR. Structural Insights Into How Proteoglycans Determine Chemokine-CXCR1/CXCR2 Interactions: Progress and Challenges. *Front Immunol.* 2020;11.
Verfügbar unter: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.00660>
470. Gandhi NS, Mancera RL. The Structure of Glycosaminoglycans and their Interactions with Proteins. *Chem Biol Drug Des.* 2008;72(6):455–82.
471. Cardin AD, Weintraub HJ. Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions. *Arterioscler Dallas Tex.* 1989;9(1):21–32.
472. Vallet SD, Clerc O, Ricard-Blum S. Glycosaminoglycan–Protein Interactions: The First Draft of the Glycosaminoglycan Interactome. *J Histochem Cytochem.* Februar 2021;69(2):93–104.

Quellenverzeichnis

473. Sarkar A, Desai UR. A Simple Method for Discovering Druggable, Specific Glycosaminoglycan-Protein Systems. Elucidation of Key Principles from Heparin/Heparan Sulfate-Binding Proteins. *PLoS ONE*. 21. Oktober 2015;10(10):e0141127.
474. Pomin VH, Mulloy B. Current structural biology of the heparin interactome. *Curr Opin Struct Biol*. Oktober 2015;34:17–25.
475. Carboni S, Gehrman U, Preite S, Mitra S. Cytokine-regulated Th17 plasticity in human health and diseases. *Immunology*. 2021;163(1):3–18.
476. Kang JH, Zappasodi R. Modulating Treg stability to improve cancer immunotherapy. *Trends Cancer*. 1. November 2023;9(11):911–27.
477. Whiteside TL. FOXP3+ Treg as a therapeutic target for promoting anti-tumor immunity. *Expert Opin Ther Targets*. April 2018;22(4):353–63.
478. Leveugle B, Ding W, Laurence F, Dehouck MP, Scanameo A, Cecchelli R, u. a. Heparin Oligosaccharides that Pass the Blood-Brain Barrier Inhibit β -Amyloid Precursor Protein Secretion and Heparin Binding to β -Amyloid Peptide. *J Neurochem*. 1998;70(2):736–44.
479. Ma Q, Dudas B, Hejna M, Cornelli U, Lee JM, Lorens S, u. a. The blood-brain barrier accessibility of a heparin-derived oligosaccharides C3. *Thromb Res*. 1. März 2002;105(5):447–53.

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|-----|
| 1. Übersicht der Aktivierungswege der Blutgerinnungskaskade | 4 |
| 2. Chemischer Aufbau von Heparansulfat und Heparin sowie dessen Pharmakophor | 8 |
| 3. Strukturformel des Pentasaccharids Fondaparinux | 10 |
| 4. Interventionspunkte der Heparine in die hämatogene Metastasierung | 19 |
| 5. Zytolytische Mechanismen der NK-Zellen | 23 |
| 6. Immunsuppressive Mechanismen der Treg in der TMU | 33 |
| 7. Immunonkologische Auswirkungen der purinerger Signaltransduktion in der TMU..... | 40 |
| 8. Purinerger Metabolismus der EN auf Tumorzellen | 42 |
| 9. Enzymatisch katalysierte Detektionsreaktion des MTT-Salzes | 76 |
| 10. Pipettierschema zur Zytotoxizitätsanalyse eines Tumorzellpärchens | 77 |
| 11. Übersicht der mechanischen Abläufe innerhalb eines PCR-Zyklus mitsamt Resultat | 82 |
| 12. Repräsentative Übersicht des Endresultats der qPCR mit Schmelzpunktbestimmung der Kontrollen | 87 |
| 13. Repräsentative Verifikation einer qPCR-Probe über die Schmelzpunktbestimmung..... | 88 |
| 14. Schematischer Aufbau und Funktionsweise der CE | 92 |
| 15. Migrationsreihenfolge der CE mit MEKC und elektrophoretischer Mobilität der Substanzen | 93 |
| 16. Verteilungsverhalten der Neutralstoffe in einer SDS-MEKC | 94 |
| 17. Funktionsweise der FACS-Kompensation mit Kontrollen bei Multistainingassays..... | 109 |
| 18. Gatingstrategie zur Identifikation regulatorischer T-Zellen per FMO-Kontrollen | 110 |
| 19. Gatingstrategie zur Identifikation toter Zielzellen zur Bestimmung der NK-Zytotoxizität... | 113 |
| 20. Schematischer Ablauf der Mechanismen eines Sandwich-ELISA für IL-10 | 116 |
| 21. Detektionsreaktion des Sandwich-ELISA mit TMB..... | 117 |
| 22. Bestimmung der Primereffizienz E mittels linearer Regression und R^2 für NPP und CD73. | 121 |
| 23. Bestimmung der Primereffizienz E mittels linearer Regression und R^2 für NTPD | 122 |
| 24. Identifikation der EN-Substrate per CE mit UV-DAD anhand externer Standards..... | 127 |

| | |
|---|-----|
| 25. Bestimmung der Aktivität der alternativen EN-Achse auf U87-Zellen..... | 128 |
| 26. Auswirkungen der selektiven NPP1-Inhibition mit PSB-POM-141 auf die EN-Aktivität der U87 | 129 |
| 27. Auswirkungen der selektiven CD73-Inhibition mit PSB-19316 auf die EN-Aktivität der U87 | 130 |
| 28. Identifikation und Blockade der ADA-Aktivität der U87 mit EHNA | 131 |
| 29. cDNA-Sequenzanalyse des NPP1-Gens zur Identifikation möglicher Mutationen..... | 132 |
| 30. Relative NPP1-Inhibition auf U87-Zellen durch Xylogalactan und Fucoidan aus Seealgen | 136 |
| 31. Vergleich der Strukturen von Heparin und dessen Analogon Chondroitinsulfat..... | 137 |
| 32. Relative NPP1-Inhibition auf U87-Zellen durch Chondroitinsulfat..... | 138 |
| 33. Relative NPP1-Inhibition von UFH, Tinzaparin, Enoxaparin und Fondaparinux | 141 |
| 34. Struktureller Aufbau chemisch modifizierter Heparine mit reduzierter antikoagulatorischer Aktivität sowie fraktionierter Derivate variabler Kettenlänge | 144 |
| 35. Relative NPP1-Inhibition chemisch modifizierter Heparine mit reduzierter antikoagulatorischer Aktivität | 146 |
| 36. Relative NPP1-Inhibition durch fraktionierte Heparine variabler Kettenlänge | 148 |
| 37. Strukturen synthetischer Trisaccharide basierend den Monosacchariden der Heparine.. | 150 |
| 38. Relative NPP1-Inhibition der synthetischen Trisaccharide | 152 |
| 39. Relative Expression der EN NTPD1 und CD73 durch die Zelllinien A2780 und A2780cis. | 156 |
| 40. Relative Expression der EN CD73 und NPP1 durch die Zelllinien W1 und W1CR..... | 157 |
| 41. Relative Expression der EN NTPD3, CD73 und NPP1 durch die Zelllinie MDA-MB-231 unter Doxorubicin, Kollagen und der Kombination aus beiden Faktoren..... | 159 |
| 42. Zytotoxizitätsanalyse der selektiven EN-Inhibitoren PSB-POM-141 und PSB-19316 auf die Zelllinie MDA-MB-231 in relevanten Konzentrationen per MTT..... | 161 |
| 43. Zytotoxizitätsanalyse zur Evaluation der purinerger Signaltransduktion durch selektive Blockade der EN NPP1 und CD73 auf der Zelllinie MDA-MB-231 per MTT | 162 |
| 44. Absolute ABC-Transporterkapazität der MDA-MB-231-Zellen unter selektiv blockierter EN-Aktivität ohne und mit Kollagen..... | 164 |
| 45. Relative ABC-Transporterkapazität der MDA-MB-231-Zellen unter selektiv blockierter EN-Aktivität mit Kollagen | 165 |
| 46. Relativer Effekt der purinerger Signaltransduktion auf die Treg-Induktion | 169 |

| | |
|---|-----|
| 47. Absoluter und relativer Effekt der Heparine als NPP1-Inhibitoren auf die Treg-Induktion in der modellierten TMU | 171 |
| 48. Validierung des NK-Zytotoxizitätsassays und Effekte der purinergen Signaltransduktion auf die NK-Zytotoxizität innerhalb der PBMC | 173 |
| 49. Intrinsische Effekte der Heparine sowie der heparinmodulierten NPP1-Inhibition auf die relative NK-Zytotoxizität | 175 |
| 50. IL-10-Sekretion der CD4 ⁺ T-Zellen durch purinenger Signaltransduktion | 180 |
| 51. Intrinsische Effekte der Heparine sowie der heparinmodulierten NPP1-Inhibition auf die IL-10-Sekretion der CD4 ⁺ T-Zellen | 181 |
| 52. Intrinsische Effekte der Heparine sowie der purinergen Signaltransduktion auf die Sekretion pro- und antiinflammatorischer Zytokine der CD4 ⁺ T-Zellen | 184 |
| 53. Effekt der heparinmodulierten NPP1-Inhibition auf die Sekretion pro- und antiinflammatorischer Zytokine der CD4 ⁺ T-Zellen..... | 186 |
| 54. Effekt der Heparinmimetika auf die Sekretion pro- und antiinflammatorischer Zytokine der CD4 ⁺ T-Zellen | 190 |

Formelverzeichnis

| | |
|--|----|
| 1. Berechnung der Kollagenkonzentration zur Plattenbeschichtung | 78 |
| 2. Berechnung des Resistenzfaktors RF | 80 |
| 3. Berechnung der Primereffizienz E | 85 |
| 4. Formelsammlung zur Berechnung der Genexpression nach $\Delta\Delta Cq$ | 89 |
| 5. Nernst' sches Verteilungsgesetz zur Charakterisierung des Verteilungsverhaltens | 94 |
| 6. Berechnung der relativen Konversionsrate des Substrats ATP durch die EN auf den U87..... | 98 |
| 7. Berechnung der normalisierten Konversionsrate der EN auf den U87 | 98 |
| 8. Berechnung der relativen Enzyminhibition durch die Testsubstanzen | 99 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|-----|
| 1. Übersicht der CD4 ⁺ TH-Subtypen sowie deren Rolle in Physiologie und Pathophysiologie. | 28 |
| 2. Temperaturmoderierte Arbeitsschritte eines PCR-Zyklus sowie deren Dauer mit abschließender Schmelzpunktbestimmung | 86 |
| 3. Zeitlicher Ablauf der Arbeitsschritte einer Einzelmessung der CE..... | 97 |
| 4. Probenschema zur Untersuchung Modulation der ABC-Transporteraktivität der MDA-MB- 231 durch die purinerge Signaltransduktion | 105 |
| 5. Verwendete Konzentrationen der kommerziellen Heparine und Fondaparinux mit Umrechnungen zur Generierung der U87-Überstände..... | 106 |
| 6. Pipettierschema zur Vermessung der NK-Zytotoxizität | 112 |
| 7. Basensequenzen der verwendeten Primer zur Expressionsanalyse der HKG und EN | 120 |
| 8. Expressionsanalyse der HKG und EN an U87-Zellen (N=3) | 123 |
| 9. Expressionsanalyse der HKG und EN an MDA-MB-231-Zellen (N=3) | 124 |
| 10. Charakterisierung der EN-Expression durch U87 und MDA-MB-Zellen | 126 |
| 11. Informationen der verwendeten Seealgenextrakte | 134 |
| 12. Glykosidische Zusammensetzung der verwendeten Seealgenextrakte | 135 |
| 13. Chemische Charakteristika der verwendeten Seealgenextrakte..... | 137 |
| 14. Relative NPP1-Inhibition der verwendeten Seealgenextrakte (N=3) | 139 |
| 15. Relative NPP1-Inhibition von Chondroitinsulfat (N=3) | 139 |
| 16. Chemische Charakteristika der verwendeten kommerziellen Heparine sowie Fondaparinux | 140 |
| 17. Verwendete Konzentrationen der kommerziellen Heparine sowie Fondaparinux..... | 141 |
| 18. Relative NPP1-Inhibition der kommerziellen Heparine sowie Fondaparinux (N=3)..... | 143 |
| 19. Chemische Charakteristika der chemisch modifizierten Heparine mit reduzierter antikoagulatorischer Aktivität sowie fraktionierte Derivate variabler Kettenlänge..... | 145 |
| 20. Relative NPP1-Inhibition chemisch modifizierter Heparine mit reduzierter antikoagulatorischer Aktivität (N=3) | 147 |
| 21. Relative NPP1-Inhibition durch fraktionierte Heparine variabler Kettenlänge (N=2) | 149 |
| 22. Chemische Charakteristika der synthetischen Trisaccharide | 151 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|-----|
| 23. Relative NPP1-Inhibition der synthetischen Trisaccharide (N=3)..... | 153 |
| 24. Expressionsanalyse der EN NTPD3, CD73 und NPP1 durch die Zelllinie MDA-MB-231 unter Doxorubicin, Kollagen und der Kombination aus beiden Faktoren (N=3)..... | 160 |
| 25. Effekte der purinergen Signaltransduktion auf die Treg-Induktion (N=3) | 170 |
| 26. Effekte der Heparine als NPP1-Inhibitoren auf die Treg-Induktion (N=7) | 172 |
| 27. Effekte der purinergen Signaltransduktion auf die relative NK-Zytotoxizität (N=4)..... | 174 |
| 28. Effekte der heparinmodulierten NPP1-Inhibition auf die relative NK-Zytotoxizität (N=5).. | 176 |

Publikationsliste

Lopez V*, Schuh HJM*, Mirza S, Vaaßen VJ, Schmidt MS, Sylvester K, Idris RM, Renn C, Schäkel L, Pelletier J, Sévigny J, Naggi A, Scheffler B, Lee S-Y, Bendas G, Müller CE
Heparins are potent inhibitors of ectonucleotidase pyrophosphatase/phosphodiesterase-1 – a promising target for the immunotherapy in cancer
Front. Immunol. **2023**;14 doi: 10.3389/fimmu.2023.1173634

Lopez V, Schäkel L, Schuh HJM, Schmidt MS, Mirza S, Renn C, Pelletier J, Lee S-Y, Sévigny J, Alban S, Bendas G, Müller CE
Sulfated Polysaccharides from Macroalgae Are Potent Dual Inhibitors of Human ATP-Hydrolyzing Ectonucleotidases NPP1 and CD39
Mar. Drugs. **2021**; 19(2):51 doi: 10.3390/md19020051

* geteilte Erstautorenschaft

Danksagung

Mein erster Dank richtet sich an meinen Doktorvater Prof. Dr. Gerd Bendas für die Bereitstellung des Promotionsthemas sowie der Möglichkeit diese bei ihm anfertigen zu können. Insbesondere das stets offene Ohr und seine Hilfsbereitschaft erbrachten zahlreiche konstruktive Fachdiskussionen. Ebenfalls hervorzuheben ist das harmonische Arbeitsumfeld, dass einem viele Freiheiten gewährte und Freude bei der Arbeit bereitet hat.

Frau Prof. Dr. Christa Müller danke ich für ihre intensive fachliche Kooperation, die ein zentraler Baustein zur Anfertigung dieser Arbeit war. Die produktive Zusammenarbeit und Kommunikation mit ehemaligen wie aktuellen Mitgliedern ihres Arbeitskreises war mir stets eine Freude. Zusätzlich richtet sich mein Dank an ihre Bereitschaft das Zweitgutachten der Dissertation zu übernehmen.

Prof. Dr. Ulrich Jaehde und Prof. Dr. Hanns Häberlein danke ich für ihre Tätigkeit in der Promotionskommission. Letzterem verdanke ich einige Kaffees, die ich im Rahmen der Gespräche mit seiner freundlichen Arbeitsgruppe regelmäßig genossen habe.

Prof. Dr. Annamaria Naggi und Prof. Dr. Hien Nguyen möchte ich für die Bereitstellung der Heparin-Derivate danken, die in verschiedene Versuche meiner Arbeit eingeflossen sind.

Bei Salahuddin Mirza und Dr. Laura Schäkel möchte ich mich für die Unterstützung in der Technik der Kapillarelektrophorese bedanken. Ebenso gilt mein Dank Victoria Vaaßen für die Unterstützung und Durchführung der cDNA-Sequenzanalyse.

Ebenfalls möchte ich mich bei den technischen Assistenten der Arbeitsgruppe bedanken. Hervorzuheben sind an dieser Stelle Svenja Henze und Angelika Fischer, die mich bei der Blutaufbereitung und der Durchführung des ELISA unterstützten.

Der Bonn International Graduate School of Drug Sciences (BIGS DrugS) danke ich für die finanzielle Unterstützung zur Teilnahme am Purine Club Meeting in Santiago de Compostela in Spanien 2019.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Dr. Anke Schiedel für die Zeit im Praktikum der Anorganischen Chemie im 1. Semester. Sie gestaltete die Betreuung der Studenten für uns Assistenten sehr angenehm.

Ein besonderer Dank richtet sich an meine beiden Masteranden Michael Schmidt und Mara Bingel, die mich fachlich unterstützt haben. Ihre Art bereicherte meinen Alltag auch neben der Arbeit auf unterschiedliche Art und Weise. An dieser Stelle möchte ich mich ebenfalls bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die unvergessliche gemeinsame Zeit bedanken. Insbesondere mit Reza Haschemi, Heiko Weber und meinen weiteren Bürokollegen sowie Philipp König werde ich zahlreiche Gespräche, Erinnerungen und Erlebnisse auch außerhalb der Uni

verbinden. Selbiges gilt ebenso für einige Mitarbeiter des AK Jaehde, die ich unter anderem durch die Organisation der Meraner Kongressfahrt sowie Konzertbesuchen und weiteren Unternehmungen zu meinen guten Freunden zählen kann.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Prof. Dr. Markus Joch und Dr. Rouven Kaiserling für das Korrekturlesen sowie für fachliche Ratschläge.

Ein ganz besonderer Dank richtet sich an meine Eltern Hermann Josef und Kira sowie meine Schwester Sarah ohne die mein jetztiger Werdegang kaum möglich gewesen wäre. Sie haben mich stets unterstützt und motiviert vor allem wenn es nicht besonders gut lief.

Verfassererklärung

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

Bonn, den 30.11.2023

Hermann Josef Maximilian Schuh