

**Epigenetische Modulation der Heparansulfat-
Sulfotransferasen-Expression in
Mammakarzinomzellen und Einflussnahme auf die
Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung**

Dissertation

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

Vorgelegt von

Nico Bückreiß

aus Bergisch Gladbach

Bonn, Juli 2024

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

Gutachter/Betreuer: Prof. Dr. Gerd Bendas

Gutachter: Prof. Dr. Finn K. Hansen

Tag der Promotion: 22.11.2024

Erscheinungsjahr: 2024

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
1 EINLEITUNG	1
2 THEORETISCHER HINTERGRUND	3
2.1 HÄMOSTASEOLOGIE	3
2.1.1 PRIMÄRE HÄMOSTASE	3
2.1.2 SEKUNDÄRE HÄMOSTASE	4
2.1.3 FIBRINOLYSE	6
2.1.4 ANTITHROMBIN	7
2.2 THROMBOZYTÄRE GRANULA	8
2.3 TUMORZELL-INDUZIERTER THROMBOZYTENAKTIVIERUNG.....	10
2.3.1 KONTAKT-MEDIERTER THROMBOZYTENAKTIVIERUNG	11
2.3.2 PARAKRINER THROMBOZYTENAKTIVIERUNG	13
2.3.3 THROMBOZYTENAKTIVIERUNG MITTELS AKTIVIERUNG DES BLUTGERINNUNGSSYSTEMS	14
2.4 HÄMATOGENE METASTASIERUNG.....	15
2.5 GLYKOKALYX.....	20
2.5.1 KOMPONENTEN UND FUNKTIONEN DER GLYKOKALYX	20
2.5.2 HEPARANSULFAT-PROTEOGLYKANE	21
2.6 EINFLUSS EINER VERÄNDERTEN HSPG-AUSSTATTUNG AUF DAS TUMORGESCHEHEN	26
2.6.1 HEPARANSULFAT 2-O-SULFOTRANSFERASEN	26
2.6.2 HEPARANSULFAT 3-O-SULFOTRANSFERASEN	27
2.6.3 HEPARANSULFAT 6-O-SULFOTRANSFERASEN	28
2.6.4 HEPARANASE	30
2.6.5 6-O-ENDOSULFATASEN	31
2.7 EPIGENETISCHE REGULATION DER HS-MODIFIZIERENDEN ENZYME	32
2.7.1 DNA-METHYLTRANSFERASEN	32
2.7.2 HISTON-DEACETYLASEN	34

2.8 EPIGENETISCHE WIRKSTOFFE ZUR REEXPRESSION HS-MODIFIZIERENDER ENZYME	35
2.8.1 AZACYTIDIN	36
2.8.2 5-FLUOR-2'-DESOXYCYTIDIN	37
2.8.3 VORINOSTAT	37
<u>3 ZIEL DER ARBEIT</u>	<u>38</u>
<u>4 MATERIAL</u>	<u>40</u>
4.1 GERÄTE	40
4.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN	43
4.3 CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN	46
4.3.1 CHEMIKALIEN	46
4.3.2 PUFFER UND LÖSUNGEN	50
4.3.3 PRIMÄRE ANTIKÖRPER	53
4.3.4 SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER	54
4.3.5 PRIMER	55
4.3.6 INHIBITOREN	56
4.4 SOFTWARE	56
<u>5 METHODEN.....</u>	<u>58</u>
5.1 ZELLKULTIVIERUNG	58
5.2 KRYOKONSERVIERUNG UND REVITALISIERUNG	58
5.3 SUBKULTIVIERUNG DER TUMORZELLEN.....	59
5.3.1 MCF-7 MAMMAKARZINOMZELLEN	60
5.3.2 MDA-MB-231 MAMMAKARZINOMZELLEN	60
5.4 ZELLZAHLBESTIMMUNG.....	61
5.5 MTT-ASSAY	62
5.6 QUANTITATIVE REAL-TIME POLYMERASE KETTENREAKTION.....	64
5.7 DURCHFLUSSZYTOMETRIE	67
5.7.1 QUANTIFIZIERUNG DER TF-EXPRESSION MITTELS DURCHFLUSSZYTOMETRIE	70
5.7.2 QUANTIFIZIERUNG DER AT-BINDUNG MITTELS DURCHFLUSSZYTOMETRIE	71

5.8 SDS-PAGE & WESTERN BLOT	72
5.8.1 LYSATGEWINNUNG	72
5.8.2 PROTEINBESTIMMUNG MITTELS BICINCHINONSÄURE-ASSAY	73
5.8.3 SDS-PAGE	74
5.8.4 WESTERN BLOT	75
5.9 KONFOKALE LASERRASTERMIKROSKOPIE	76
5.9.1 PROBENVORBEREITUNG CLSM	77
5.10 AUFBEREITUNG DER BLUTPROBEN	80
5.10.1 BLUTENTNAHME	81
5.10.2 ISOLATION PLÄTTCHENREICHEN PLASMAS AUS VOLLBLUT	81
5.10.3 ISOLATION PLÄTTCHENREICHEN PUFFERS AUS THROMBOZYTENKONZENTRATEN	82
5.11 LICHTTRANSMISSIONSAGGREGOMETRIE NACH BORN	83
5.12 THROMBINGENERIERUNGS-ASSAY	85
5.13 ATP-FREISETZUNGS-ASSAY	87
5.14 WUNDHEILUNG, MOTILITÄT UND PROLIFERATION	88
5.15 STATISTIK	89
 <u>6 ERGEBNISSE UND DISKUSSION</u>	 <u>90</u>
 6.1 EINFLÜSSE EINER DEREGULIERTEN HS3ST2-EXPRESSION AUF DIE HÄMATOGENE METASTASIERUNG 90	
6.1.1 QUANTIFIZIERUNG DER VERÄNDERTEN HS3ST2-EXPRESSION UND FLUORESCENZ-MIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNG DER 3-O-SULFATIERUNG IN MCF-7-ZELLEN	90
6.1.2 UNTERSUCHUNG DER FUNKTIONELLEN AUSWIRKUNG EINER HS3ST2-ÜBEREXPRESSION IN MCF-7- ZELLEN AUF DIE TCIPA	92
6.2 EINFLUSS EPIGENETISCH WIRKSAMER WIRKSTOFFE AUF DAS EXPRESSIONSPROFIL UND SULFATIERUNGSMUSTER VON MAMMAKARZINOMZELLEN	93
6.2.1 ZYTOTOXIZITÄTSBESTIMMUNG DER VERWENDETEN INHIBITOREN	93
6.2.2 UNTERSUCHUNG DES EINFLUSSES DER VERWENDETEN INHIBITOREN AUF DIE PROLIFERATIONSRATE	95
6.2.3 QUANTIFIZIERUNG DER VERÄNDERTEN EXPRESSION VON 3-O- UND 6-O-SULFOTRANSFERASEN IN MCF-7-ZELLEN NACH BEHANDLUNG MIT EPIGENETISCH WIRKSAMEN WIRKSTOFFEN	99
6.2.4 QUANTIFIZIERUNG DER VERÄNDERTEN EXPRESSION VON 3-O- UND 6-O-SULFOTRANSFERASEN IN MDA-MB-231-ZELLEN NACH BEHANDLUNG MIT EPIGENETISCH WIRKSAMEN WIRKSTOFFEN	101

6.2.5 FLUORESCENZMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNG DER 3-O-SULFATIERUNG BEHANDELT MAMMAKARZINOMZELLEN	104
6.2.6 QUANTIFIZIERUNG DER AT-BINDUNG AN DEN OBERFLÄCHEN BEHANDELT MAMMAKARZINOMZELLEN	105
6.2.7 ZWISCHENFAZIT ZU DEN UNTERSUCHUNGEN DER VERÄNDERTEN EXPRESSIONSPROFILE BEHANDELT MAMMAKARZINOMZELLEN	107
6.3 UNTERSUCHUNG DES FUNKTIONELLEN EINFLUSSES EINER VERÄNDERTEN EXPRESSION VON 3-O- UND 6-O-SULFOTRANSFERASEN INDUZIERT DURCH EPIGENETISCH WIRKSAME WIRKSTOFFE IN MAMMAKARZINOMZELLEN	108
6.3.1 FUNKTIONELLE BEEINFLUSSUNG DER TCIPA IN MCF-7-ZELLEN	109
6.3.2 FUNKTIONELLE BEEINFLUSSUNG DER TCIPA IN MDA-MB-231-ZELLEN	111
6.3.3 BEEINFLUSSUNG DES MIGRATIONSVERHALTENS VON MCF-7-ZELLEN	113
6.3.4 BEEINFLUSSUNG DES MIGRATIONSVERHALTENS VON MDA-MB-231-ZELLEN	115
6.3.5 ZWISCHENFAZIT ZU DEN FUNKTIONELLEN EINFLÜSSEN EINER VERÄNDERTEN 3-O- UND 6-O-SULFOTRANSFERASEN-EXPRESSION INDUZIERT DURCH EPIGENETISCH WIRKSAME WIRKSTOFFE IN MAMMAKARZINOMZELLEN	117
6.4 UNTERSUCHUNG DER TF-EXPRESSION IN MAMMAKARZINOMZELLEN NACH BEHANDLUNG MIT EPIGENETISCH WIRKSAMEN ARZNEISTOFFEN	118
6.4.1 QUANTIFIZIERUNG DER TF-EXPRESSION	118
6.4.2 POTENTIELLE URSACHE DER DEREGULIERTEN TF-EXPRESSION	119
6.4.3 ZWISCHENFAZIT ZU DER ATTENUIERTEN TF-EXPRESSION IN MAMMAKARZINOMZELLEN NACH BEHANDLUNG MIT EPIGENETISCH WIRKSAMEN ARZNEISTOFFEN	122
<u>7 ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>123</u>
<u>8 LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>126</u>
<u>9 ANHANG</u>	<u>171</u>
9.1 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	171
9.2 TABELLENVERZEICHNIS	177

Abkürzungsverzeichnis

In diesem Abkürzungsverzeichnis werden alle in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen aufgeführt und erläutert. Ausgeschlossen von diesem Verzeichnis sind Abkürzungen, welche Bestandteile von Produktbeschreibungen, Rechtsformen und Gesellschaften sind. Chemisch, mathematisch und physikalisch geläufige Einheiten und Symbole, griechische Zahlen und römische Ziffern sowie die im internationalen Einheitensystem festgelegten Dezimalpräfixe gelten ebenfalls als vorausgesetzt. Die Darstellung fremdsprachiger Begriffe erfolgt in kursiver Schriftweise.

% (m/V)	Massenkonzentration in Prozent
% (V/V)	Volumenprozent
ad	Auffüllen auf
ADP	Adenosindiphosphat
AF	AlexaFluor
AMC	7-Amino-4-Methylcumarin
AML	Akuter myeloische Leukämie
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
AT	Antithrombin, Antithrombin III, Serpin C1
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	<i>Area under the curve</i>
Aza	5-Azacytidin
B3GALT6	β -1,3-Galaktosyltransferase 6
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	<i>Cluster of differentiation</i>

cDNA	<i>complementary DNA</i>
CLEC-2	<i>C-type lectin-like receptor 2</i>
CLSM	Konfokale Laserrastermikroskopie
CMML	Chronische myelomonozytäre Leukämie
CP	<i>Cancer procoagulant</i>
CpG	Desoxycytidin-Phosphorsäure-Desoxyguanosin-Sequenz
CTI	Corn Trypsin Inhibitor
CXCL4	Plättchenfaktor 4
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagles medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
DNMTi	DNA-Methyltransferase-Inhibitor
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
dsDNA	<i>Double stranded DNA</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EMA	<i>European medicines agency</i>

EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
<i>et al.</i>	<i>Et alii</i>
ETP	Endogenes Thrombinbildungspotential
EXT	Exostosin
EXTL3	<i>Exostosin like glycosyltransferase 3</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
FDA	<i>Food and drug administration</i>
FdCyd	5-Fluor-2'-Desoxycytidin
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FGF2R	<i>Fibroblast growth factor receptor 2</i>
FIIa	Faktor IIa, Thrombin
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS/FBS	Fetales Kälberserum
FSC	<i>Forward scatter</i>
GAG	Glykosaminoglykan
Gal	Galaktose
GALT	Galaktosyltransferase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GlcA	Glucuronsäure
GLCAT1	Glucuronyltransferase 1
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamin

GlcNAc6S	6- <i>O</i> -sulfatiertes <i>N</i> -Acetylglucosamin
GlcNS3S6S	3,6- <i>O</i> -sulfatiertes <i>N</i> -Sulfoglucosamin
GlcNS6S	6- <i>O</i> -sulfatiertes <i>N</i> -Sulfoglucosamin
GP	Glykoprotein
HAT	Histon-Acetyltransferase
HB-EGF	Heparin-bindender EGF-ähnlicher Wachstumsfaktor
HDAC	Histondeacetylase
HDACi	Histondeacetylase-Inhibitor
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HMGB1	<i>High-mobility group box 1</i>
HPSE	Heparanase
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HS	Heparansulfat
HS2ST	Heparansulfat 2- <i>O</i> -Sulfotransferase
HS3ST	Heparansulfat 3- <i>O</i> -Sulfotransferase
HS6ST	Heparansulfat 6- <i>O</i> -Sulfotransferase
HSGLCE	Heparansulfat-D-Glucuronyl C5-Epimerase
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykan
HSV-1	Herpes-simplex-Virus-1
I.E.	Internationale Einheiten

ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
IdoA2S	2-O-sulfatierte Iduronsäure
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
JAK	Januskinase
KI	Künstliche Intelligenz
LAF	<i>Laminar-air-flow</i>
LTA	Lichttransmissionsaggregometrie
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MET	Mesenchymal-epitheliale Transition
MMP	Matrix-Metalloprotease
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
n	Stichprobenumfang
NAD ⁺	Nicotinamin-Adenosin-Dinukleotid
NDST	<i>N-Deacetylase/N-Sulfotransferase</i>
NFE2	<i>Nuclear factor nucleotid-derived 2</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
NKG2D	NK-Zellen aktivierender Rezeptor
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen

nTPM	<i>Normalized transcripts per million</i>
PAGE	<i>Polyacrylamid gel electrophoresis</i>
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1
PAR	Protease-aktivierter Rezeptor
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
PFA	Paraformaldehyd
PG	Proteoglykan
PIC	<i>Protease inhibitor cocktail</i>
PL	Phospholipide
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPP	Thrombozytenarmer Puffer
PRP	Thrombozytenreicher Puffer
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	Quantitative <i>real-time</i> Polymerase Kettenreaktion
RCL	<i>Reactive center loop</i>
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RPMI 1640	<i>Roswell park memorial institute 1640</i>
SAM	S-Adenosyl-L-Methionin
SDF-1	<i>Stromal cell-derived factor 1</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>

shRNA	<i>Short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SIRT	Sirtuin
sLe ^x	Sialyl Lewis X
SSC	<i>Sideward scatter</i>
STAT3	<i>Signal transducers and activators of transcription 3</i>
SULF	6-O-Endosulfatase
TAF	Tumorzell-assoziierte Fibroblasten
TCIPA	<i>Tumor cell-induced platelet aggregation</i>
TF	<i>Tissue factor</i> , Gewebsthrombokinas, Faktor III
TFPI	<i>Tissue factor pathway inhibitor</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor β</i>
TKZ	Thrombozytenkonzentrat
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TR	Texas Red
TRAP-6	Thrombinrezeptor-aktivierendes-Peptid-6
TXA ₂	Thromboxan A ₂
TXR	Thromboxan-Rezeptor
U	<i>Unit</i>
UKB	Universitätsklinikum Bonn
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>

VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VSV	Vesikuläres Stomatitis Virus
vWF	Von-Willebrand-Faktor
Wnt	<i>Wingless Int-1</i>
Xyl	Xylose
XYLT	Xylosyltransferase

1 Einleitung

Hochrechnungen der IARC (*International Agency for Research on Cancer*) zeigten, dass im Jahr 2022 weltweit schätzungsweise 20 Millionen Menschen an Krebs neu erkrankten, und ca. 9,7 Millionen an den Folgen einer malignen Neoplasie verstarben [1]. Schon lange gelten die kardiovaskulären Ereignisse als die weltweite Haupttodesursache, doch ein aktueller Trend zeigt, dass insbesondere in den hochentwickelten Nationen Menschen zunehmend an Neoplasien versterben. So konnte gezeigt werden, dass Krebserkrankungen im Jahr 2020 bereits in 57 Ländern die Haupttodesursache darstellten und somit die kardiovaskulären Ereignisse auf den zweiten Platz der nationalen Ranglisten vertrieben [2, 3].

Schätzungen zu Folge wird die Anzahl der Neuerkrankungen bis 2050 um ca. 77 % ansteigen [1], was die Notwendigkeit einer intensiveren Forschung für die Entwicklung neuer Behandlungsstrategien neoplastischer Erkrankungen unterstreicht. Bezogen auf beide Geschlechter ist Lungenkrebs die weltweit am häufigsten vorkommende und für die meisten Tode verantwortliche Tumorentität. Betrachtet man hingegen die Inzidenz neoplastischer Erkrankungen innerhalb des weiblichen Geschlechts, befindet sich Brustkrebs an erster Stelle der Statistik [1]. Laut WHO war Brustkrebs im Jahr 2022 in 157 von 185 Ländern die am häufigsten bei Frauen diagnostizierte Tumorentität [4]. Ähnliches gilt dabei für die Mortalität. Trotz der Fortschritte bei der Früherkennung und Therapie bleiben Mammakarzinome die Hauptursache für Krebs-assoziierte Todesfälle bei Frauen weltweit [1, 2]. Statistiken der WHO dokumentieren, dass Brustkrebs im Jahr 2022 über 670.000 Leben von Frauen einforderte [4].

Die Ausbildung von Metastasen nimmt dabei entscheidenden Einfluss auf die Progression der Erkrankungen und die Prognose der Patienten. So konnten Dillekås *et al.* zeigen, dass 66,7 % der Todesfälle von Patienten mit soliden Tumoren durch Metastasen verursacht wurden [5]. Andere Quellen schätzen die Beteiligung von Metastasen am Tod von Patienten sogar auf bis zu 90 % [6]. Essentieller Bestandteil der Entstehung von Metastasen ist dabei die hämatogene Metastasierung [6, 7]. Maligne Zellen lösen sich aus dem Primärtumor und gelangen über das Blutssystem in entfernte Gewebe, wo sie sich schließlich einnisten und Metastasen ausbilden können [6]. Um diese

Metastasierungskaskade erfolgreich absolvieren zu können, interagieren die entarteten Zellen mit einer Vielzahl zellulärer Strukturen und adaptieren so essentielle Überlebensvorteile [6]. Von besonderer Relevanz ist dabei die Interaktion mit Thrombozyten zu benennen. Tumorzellen aktivieren die Blutplättchen und induzieren so eine Aggregation und bilden Heteroaggregate aus. Neben der Gefahr von thromboembolischen Ereignissen, schützen sich die Tumorzellen so vor der körpereigenen Immunabwehr und dem mechanischen Scherstress des Blutstroms, können Gefäße und Gewebe besser invadieren und steigern ihren aggressiven Phänotyp [8]. Interaktionen werden dabei häufig über veränderte Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG) Strukturen auf der tumoralen Oberfläche vermittelt. Um diese strukturellen Veränderungen zu erreichen, kommt es in zahlreichen Tumorentitäten zu epigenetischen Deregulationen der HSPG-ausbildenden bzw. -modifizierenden Enzyme [9–11]. Die Umkehr solcher epigenetischen Regulationsmechanismen, die mit einem Überlebensvorteil der neoplastischen Zellen einhergehen, gilt es daher näher zu erforschen und zu forcieren, um somit das hämatogene Metastasierungsgeschehen zu verhindern oder zumindest zu erschweren. Es gibt bereits etliche Arzneistoffe, die sich auf epigenetische Zielstrukturen konzentrieren, von denen einige bereits eine Zulassung erhalten haben. Die unmittelbaren Auswirkungen auf die HSPG-Synthese oder die Tumorzell-Thrombozyten-Interaktion bleiben allerdings bislang weitestgehend unerforscht.

Angesichts des derzeitigen Schwerpunkts auf der Entwicklung neuer epigenetischer Krebstherapeutika, ist es daher wichtig zu verstehen, welche Auswirkungen diese neuen Therapeutika auf die Synthese von HSPG haben können, da Veränderungen in der HSPG-Zusammensetzung tiefgreifende und unerwartete Auswirkungen haben könnten.

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Hämostaseologie

Die Hämostase spielt eine essentielle Rolle für sämtliche Mechanismen im Organismus, die der Stillung von Blutungen dienen. Sie schafft ein überlebenswichtiges Gleichgewicht aus der gezielten Koagulation im Falle einer Verletzung und der Antikoagulation, um eine übermäßige Gerinnung zu verhindern und somit einen kontinuierlichen Blutstrom zu gewährleisten [12, 13]. Die Interaktion zwischen Thrombozyten, Plasmafaktoren und der Gefäßwand ist dabei von grundlegender Bedeutung für die Stillung von Blutungen [12, 14]. Wenn das Hämostasesystem gestört und die Gerinnung behindert ist, können bereits kleinste Verletzungen zu lebensgefährlichen Blutungen führen. Liegt hingegen eine Thrombophilie vor, können ernsthafte Komplikationen wie venöse Thromboembolien die Konsequenz sein [12, 15, 16]. Im Falle arterieller Thromboembolien können daraus ischämische Schlaganfälle oder akute Myokardinfarkte resultieren [17]. Die Hämostase wird unterteilt in die primäre und die sekundäre Hämostase [12, 13].

2.1.1 Primäre Hämostase

Die erste Reaktion auf eine Gefäßverletzung ist die primäre Hämostase. Treffen Thrombozyten auf eine Endothel-Denudation, interagieren sie mit den Glykoproteinen (GP) und Kollagenfasern der freiliegenden subendothelialen Matrix des beschädigten Gefäßendothels [18, 19]. Subendothelial gelagerter sowie freizirkulierender von-Willebrand-Faktor (vWF) bindet mit seiner A1-Domäne an GPIIb α des GPIIb-IX-V-Komplexes [18, 20–22] und vermittelt so die Bindung der Thrombozyten an Kollagen Typ I, III und VI [14, 16, 22, 23]. Aufgrund der Rezeptoreigenschaften des GPIIb-IX-V-Komplexes kommt es durch die Bindung des Kollagens zu einer Aktivierung der Thrombozyten und einer Ausschüttung verschiedener prokoagulativer Mediatorstoffe [14, 24, 25]. Die Thrombozyten-Kollagen-Bindung wird außerdem über GPVI und das Integrin $\alpha_2\beta_1$ vermittelt, was ebenfalls zu einem intrazellulären *signaling* und einer Thrombozytenaktivierung führt [14, 26]. Durch die Sezernierung vasokonstriktorischer

Mediatorstoffe wie Thromboxan A_2 (TXA_2), Serotonin oder Adrenalin wird eine Verlangsamung des Blutstroms erreicht und die Anlagerung weiterer Thrombozyten erleichtert. TXA_2 oder Adenosindiphosphat (ADP) aktivieren und immobilisieren dann wiederum vorbeiströmende Thrombozyten, die erneut über vWF gebunden werden können [13, 23]. Durch die Ausbildung von Pseudopodien vergrößern die aktivierten Plättchen ihre Oberfläche und bilden Vernetzungen untereinander aus. Es entsteht ein primärer und reversibler Thrombus und somit ein provisorischer erster Wundverschluss [13, 15]. Innerhalb des gebildeten Thrombus werden an GPIIa/IIIb Fibrinogen-Moleküle gebunden, welche die immobilisierten Thrombozyten quervernetzen und für die anschließende sekundäre Hämostase notwendig sind [14, 15, 23, 27, 28].

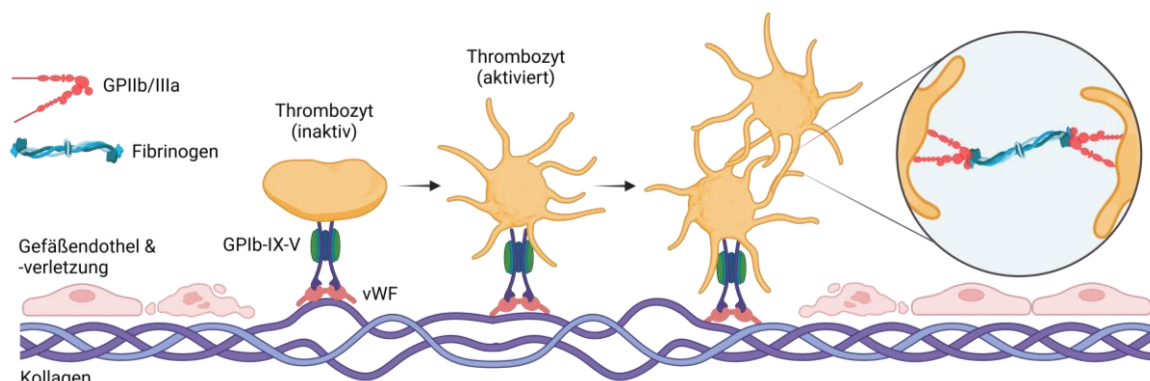


Abbildung 1: Schematische Darstellung der primären Hämostase nach einer Gefäßendothelverletzung. vWF bindet an freiliegende Kollagenfasern und vermittelt die Adhäsion vorbeiströmender Thrombozyten über die Bindung des GPIb-IX-V-Komplexes. Thrombozyten werden durch die Rezeptoreigenschaften des GP-Komplexes aktiviert und sezernieren Aktivatorstoffe. Weitere Thrombozyten werden angelockt, aktiviert und es entsteht über die Ausbildung von Pseudopodien ein Thrombus. Über Bindung an GPIIb/IIIa werden Fibrinogen-Moleküle im Thrombus angereichert [14, 23]. Die Grafik wurde mit BioRender erstellt.

2.1.2 Sekundäre Hämostase

Der im Zuge der primären Hämostase gebildete Thrombozytenpfropf ist für einen langfristigen Wundverschluss oftmals ungeeignet. Ziel der sekundären Hämostase ist daher einen dauerhaften und vor allem stabilen Wundverschluss herbeizuführen. Um dies zu erreichen, wird ein Fibrinnetzwerk polymerisiert, das den Thrombus stabilisiert. Dafür muss zunächst aus zuvor eingelagerten Fibrinogenmolekülen Fibrin abgespalten und anschließend polymerisiert werden. Die Abspaltung wird durch die Endopeptidase Thrombin vermittelt, welche wiederum durch den Prothrombinase-Komplex – bestehend

aus Faktor Xa, Faktor Va, Ca^{2+} -Ionen und Phospholipiden (PL) – aktiviert wird. Thrombin hydrolysiert Arginylglycin-Bindungen der α - und β -Ketten des Fibrinogens und spaltet so Fibrinmonomere ab. Zunächst polymerisieren die gebildeten Monomere und bilden wasserlösliche Fibrinstränge aus, die dann allerdings Thrombin-vermittelt durch den Gerinnungsfaktor XIIIa unter Ausbildung kovalenter Peptidbindungen stabilisiert werden, wodurch es zu einem wasserunlöslichen Fibrinnetz und einem dauerhaften Wundverschluss kommt [12].

Die Aktivierung der Gerinnungskaskade wird in der Theorie in zwei voneinander unabhängige Systeme unterteilt, deren Ziel in beiden Fällen die Bildung des Prothrombinase-Komplexes und die Aktivierung von Thrombin ist. Man unterscheidet hierbei zwischen dem intrinsischen und dem extrinsischen System, wobei davon auszugehen ist, dass im physiologischen Kontext keine klare Trennung der beiden Systeme vorgenommen werden kann [13, 26]. Die Gerinnungskaskade und die Unterteilung in die beiden Systeme werden schematisch in Abbildung 2 dargestellt.

Das extrinsische System wird durch die Präsentation der Gewebsthrombokinase (*tissue factor*, TF, Faktor III) aktiviert [12, 26, 29–31]. TF wird ausgeschüttet, wenn perivaskuläre Zellen zerstört werden. Parallel wird Faktor VII aktiviert, der sich dann mit Ca^{2+} -Ionen, PL und TF zum extrinsischen Tenase-Komplex zusammenlagert, der Faktor X in seine aktive Form Faktor Xa überführt. Anschließend wird Thrombin aktiviert und es kommt zur Fibrinpolymerisation [12, 13, 32–34].

Wenn Faktor XII (Hagemann-Faktor) auf negativ geladene endogene Strukturen (bspw. durch eine Gefäß-Denudation) oder auf künstliche Oberflächen trifft, wird dieser aktiviert und das intrinsische System der sekundären Hämostase initiiert [26, 35]. In einer Aktivierungskaskade werden die Gerinnungsfaktoren XI, IX und X nacheinander durch Reaktion mit Kofaktoren wie Ca^{2+} -Ionen oder PL in ihre jeweils aktivierte Form überführt. Faktor Xa vermittelt dann erneut die Aktivierung des Prothrombins hin zum Thrombin. Wie bei der extrinsischen Aktivierung resultiert aus der Aktivierung des Thrombins eine Fibrinpolymerisation und eine positive Rückkopplungsschleife [12–14, 26]. Aktiviertes Thrombin intensiviert und propagiert die Gerinnungsreaktion, indem Faktor V und Faktor VIII sowie weitere Thrombozyten via PAR aktiviert werden [36–38].

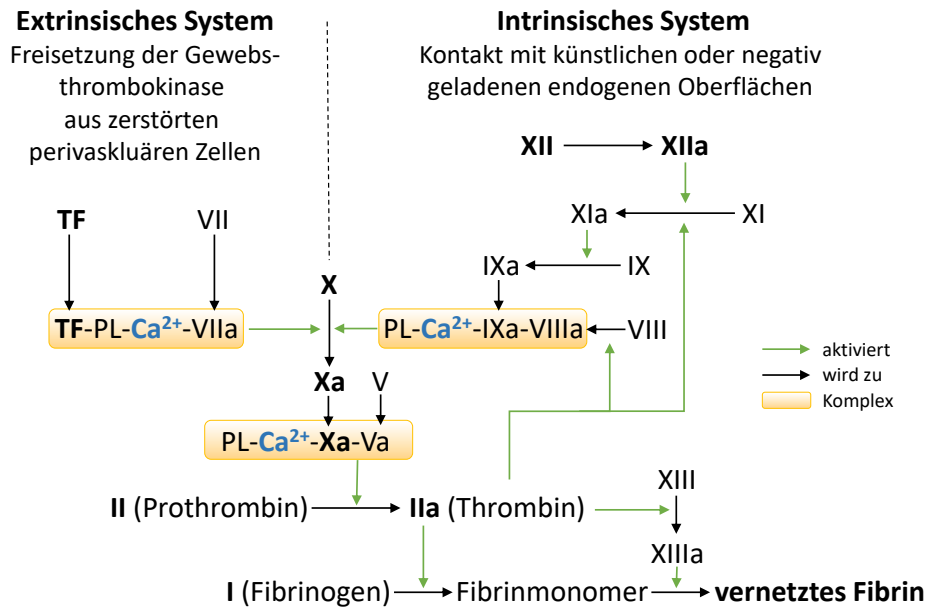


Abbildung 2: Schematische Darstellung der sekundären Hämostase mit Unterteilung des intrinsischen und des extrinsischen Hämostasesystems [12, 13, 26].

2.1.3 Fibrinolyse

Während eine schnelle und effiziente Blutgerinnung im Falle einer Verletzung überlebenswichtig ist, kann eine Hyperkoagulabilität zu schwerwiegenden Komplikationen führen. Es ist daher essentiell, dass Koagulation und Antikoagulation in einem Gleichgewicht zueinanderstehen. Die physiologische Gerinnungshemmung wird auch als Fibrinolyse bezeichnet, deren Ziel der Abbau überflüssiger Fibringerinnsel und die Verhinderung einer Hyperkoagulation ist. Dadurch wird die Entstehung von Thromben und Embolien verhindert, die andernfalls zu schwerwiegenden Schädigungen des Körpers führen könnten [12, 13, 15]. Die Auflösung bestehender Gerinnsel erfolgt über Plasmin, das je nach Lokalisation durch Kallikrein, Geweb plasminogenaktivator oder Urokinase aus seiner inaktiven Form, dem Plasminogen, gebildet wird. Bestehende Fibrinpolymere werden in lösliche Fibrinpeptide gespalten und abgebaut. Diese hemmen darüber hinaus die Thrombinbildung und Fibrinpolymerisation [13, 15].

Im Falle einer akuten Gefäßverletzung wird durch aktivierte Thrombozyten Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 freigesetzt, der die Abspaltung des Plasmins aus Plasminogen und so die Fibrinolyse vorübergehend antagonisiert [13].

Die Freisetzung verschiedener Thromboseschutzproteine stellt einen zusätzlichen präventiven antikoagulativen Mechanismus dar. Das Antithrombin (AT) ist dabei von besonderer Relevanz und dessen Rolle wird daher in Kapitel 2.1.4 detaillierter beschrieben. Weitere bedeutende Schutzproteine sind beispielsweise Prostacycline, *tissue factor pathway inhibitor* (TFPI), α_1 -Antitrypsin und Protein C [12, 13, 15].

2.1.4 Antithrombin

Antithrombin (AT, Antithrombin III, Serpin C1) spielt eine essentielle Rolle in der Gerinnungshemmung und Hämostase. Es handelt sich um ein Plasmaglykoprotein der Serpin-Superfamilie und Serinprotease-Inhibitor, das als Selbstmordsubstrat zahlreiche Gerinnungsfaktoren hemmt und so den intrinsischen und extrinsischen Weg der sekundären Hämostase antagonisiert [26, 39–43]. Die Synthese des Serpins erfolgt in der Leber und die physiologische Plasmakonzentration beträgt 0,125 mg/ml [26]. AT hemmt die Proteaseaktivität der Gerinnungsfaktoren FIIa, FIXa, FXa, FXIa und FXIIa, indem seine mobile *reactive center loop* (RCL) Domäne irreversible kovalente Bindungen mit den aktiven Zentren der Serinproteasen eingeht und diese so als inaktive Komplexe bindet (siehe Abbildung 3) [39]. Durch Bindung des basischen D-Helix des AT an Heparin oder Heparansulfat-Proteoglykanen kommt es zu einer erheblich gesteigerten antikoagulativen Aktivität [26, 40, 41, 44–47]. Die Bindung des D-Helix führt zu einer Konformationsänderung und somit zu einer Aktivierung der enzymatischen Aktivität des AT, indem eine vorherig versteckte Protease-interaktive *exosite*, die für die Interaktion mit den Koagulationsfaktoren essentiell ist, zugänglich gemacht wird [46, 48]. Aktiviertes AT inhibiert Faktor Xa und Faktor IIa über hundert-fach schneller als seine inaktivierte Form [49–51]. Die Pentasaccharid-Struktur GlcNAc6S-GlcA-GlcNS3S6S-IdoA2S-GlcNS6S des Heparins ist dabei für die Bindung und Aktivität des AT von besonders hohem Stellenwert [10, 52–55]. So konnte gezeigt werden, dass das Fehlen der 3-O-Sulfatierung des 3,6-O-sulfatierten N-Sulfoglucosamins zu einer 10^5 -fachen Reduktion der Bindungsaffinität führt [10]. Im Falle einer akuten Verletzung wird die antikoagulative Wirkung des AT durch anti-Plättchenfaktor 4 antagonisiert und ein effizienter Wundverschluss sichergestellt [13].

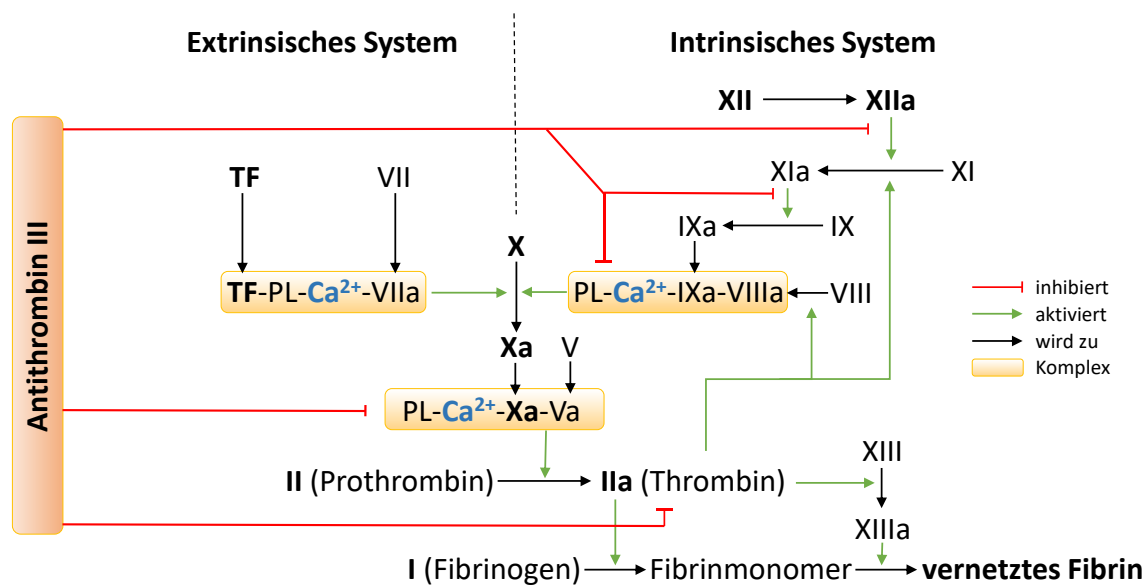


Abbildung 3: Einfluss von Antithrombin auf das intrinsische und extrinsische System der sekundären Hämostase [13, 26].

2.2 Thrombozytäre Granula

Thrombozyten enthalten eine Vielzahl von Mediatorstoffen, die in drei verschiedenen Granula gespeichert sind und nach einer Aktivierung freigesetzt werden können [56]. Man unterscheidet bei den Granula zwischen den Lysosomen, den dichten Granula und den α -Granula, die sich in Funktion und Aufbau unterscheiden [57]. In den Granula sind Stoffe enthalten, die für die Funktionalität der Thrombozyten während der Hämostase, Thrombose, Entzündung, Angiogenese und Tumorgenese verantwortlich sind [58–60].

Die Lysosomen speichern Enzyme, die für den Abbau von Kohlenhydraten, Lipiden und Proteinen verantwortlich sind. Ein Thrombozyt enthält bis zu drei Lysosomen, in denen bspw. Cathepsine, Carboxypeptidasen, Glucosidasen, Phosphatasen und saure Hydrolasen gespeichert sind [14, 57].

Die dichten Granula enthalten hauptsächlich kleine Moleküle, welche die bereits aktivierte Hämostase verstärken, zu Entzündungsprozessen und im pathophysiologischen Fall zur Bildung von Thrombosen beitragen. Ein Thrombozyt enthält zwischen drei bis sechs dichte Granula [57], in denen unter anderem Adenosintriphosphat (ATP), ADP, Serotonin, Ca^{2+} -Ionen und Polyphosphate enthalten sind [14, 61–63].

Jeder Thrombozyt enthält bis zu 80 Vesikel der α -Granula, in denen vor allem membranständige Adhäsionsproteine und lösliche funktionelle Proteine wie Zytokine und Mitogene gespeichert sind [57]. Im Falle einer Plättchenaktivierung kommt es zur Exozytose dieser Vesikel, was zu einer Präsentation der Adhäsionsproteine auf der thrombozytären Oberfläche und Sezernierung der Funktionsproteine führt [64]. Untersuchungen des Proteoms konnten zeigen, dass aus den α -Granula über 300 lösliche Proteine freigesetzt werden [65].

Die Funktionsproteine vermitteln dabei teils adversative Effekte, die auf eine eventuelle Kompartimentierung der α -Granula in Subpopulationen zurückzuführen sein könnten [57]. So sind zum Beispiel neben antikoagulativen Proteinen wie AT, *tissue factor pathway inhibitor 1* (TFPI) oder *plasminogen activator inhibitor 1* (PAI-1) auch prokoagulative Enzyme wie Faktor V, Faktor IX, Faktor XIII und Plasminogen in den Granula gespeichert. Durch das Sekretom können außerdem pro- als auch antiangiogenetische Effekte vermittelt werden. Neben *platelet-derived growth factor* (PDGF) und *vascular endothelium growth factor* (VEGF) enthalten die Vesikel außerdem Angiostatin, Endostatin und Plättchenfaktor 4 (CXCL4). Es konnte gezeigt werden, dass die α -Granula sich anhand ihrer Reaktion auf Agonisten [66–69], ihrer Morphologie [70] und ihrer Beladung [66, 67, 71] unterscheiden lässt. Vesikel-assoziierte Membran-Proteine könnten dabei einen entscheidenden Einfluss auf die gezielte Sezernierung eines spezifischen Sekretoms nehmen [57].

Die enthaltenen Adhäsionsproteine können über Wechselwirkungen mit Liganden oder Rezeptoren Bindungen eingehen, die das Adhären an andere Thrombozyten, Endothel- oder Tumorzellen ermöglichen. Zu ihnen zählen zum Beispiel vWF, Fibrinogen, Thrombospondin und P-Selektin. Auch die Präsentation des GPIb-IX-V-Komplexes und des GPIIb/IIIa auf der Thrombozytenoberfläche sind auf die Exozytose der α -Granula zurückzuführen [14, 56].

Neben der Freisetzung der Mediatorstoffe nimmt die Exozytose der α -Granula außerdem Einfluss auf die Größe der Plättchen. Nach erfolgter Aktivierung kommt es zu einem schnellen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Ionenkonzentration, was zu einer Kontraktion des Zytoskeletts und einem Transport der Granula zur Plasmamembran führt. *Soluble-N-ethylmaleimide-sensitive-factor-attachment-receptor* Proteine vermitteln dann die

Fusionierung der Plasmamembran mit den Granula [72]. So kann im Zusammenspiel mit dem *open canalicular system* eine zwei- bis dreifache Vergrößerung der thrombozytären Oberfläche erreicht und die charakteristischen Pseudopodien ausgebildet werden [14, 72].

2.3 Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung

Tumorzellen sind befähigt Thrombozyten mittels diverser Mechanismen zu aktivieren, was auch als Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung (TCIPA) bezeichnet wird [73]. Neben der erhöhten Gefahr einer hämatogenen Metastasierung durch die zahlreichen Überlebensvorteile, die sich die entarteten Zellen durch die Aktivierung der Blutplättchen sichern [8, 74], besteht für den Krebspatienten darüber hinaus ein signifikant erhöhtes Risiko thromboembolische Komplikationen zu erleiden [75–79]. Lebensgefährliche ischämische Schlaganfälle oder akute Myokardinfarkte können durch Thromboembolien verursacht werden [77]. Die Mechanismen mittels derer Tumorzellen die Thrombozyten aktivieren können, lassen sich in drei Klassen unterteilen [80]. Man unterscheidet zwischen der TCIPA durch direkten Oberflächenkontakt mit Tumorzellen, durch Ausschüttung parakriner Aktivatoren oder durch Aktivierung des Blutgerinnungssystems [80, 81]. Die relevantesten Aktivierungsmechanismen werden in Abbildung 4 schematisch dargestellt.

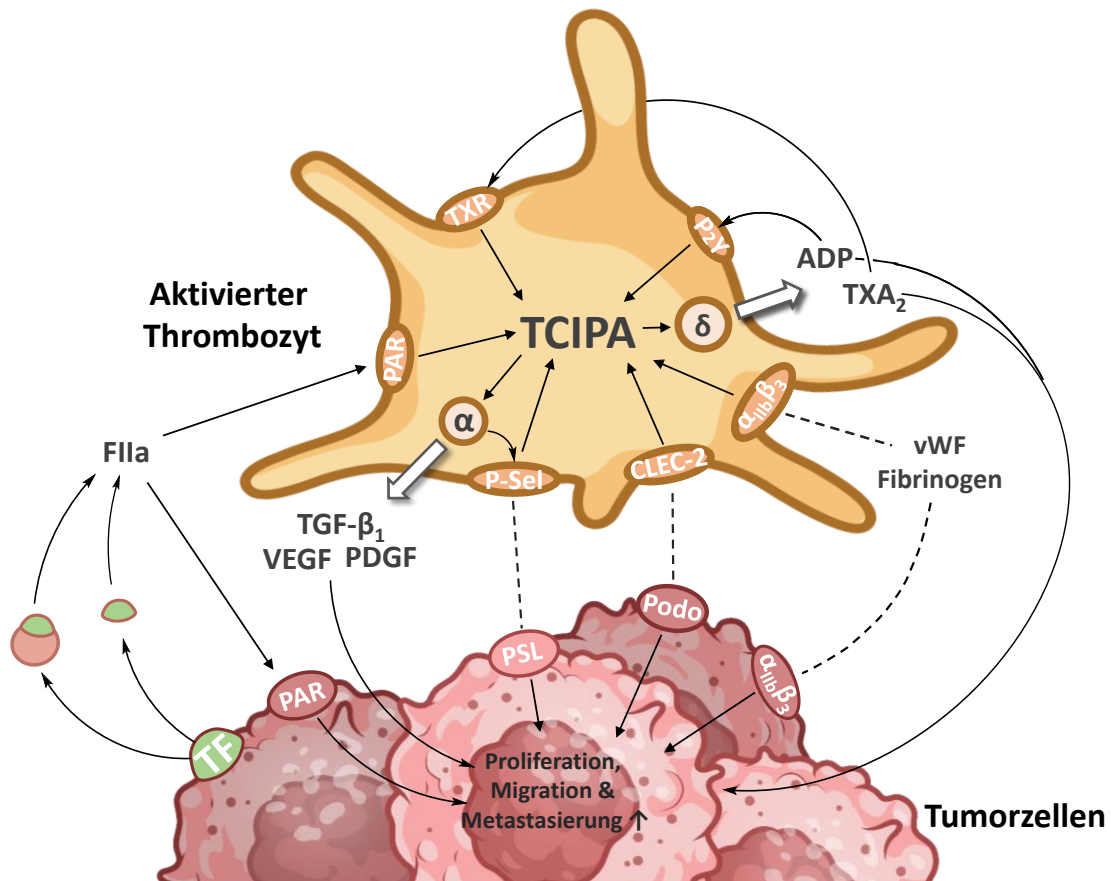


Abbildung 4: Schematische und vereinfachte Darstellung der unterschiedlichen Mechanismen einer TCIPA (Neu verwendete Abkürzungen: CLEC-2 = C-type lectin-like receptor; δ = dichte Granula; Podo = Podoplanin; PSL = P-Selektin-Ligand; TXR = Thromboxan-Rezeptor; $\alpha_{IIb}\beta_3$ = GPIIb/IIIa) [81, 82]. Die Grafik wurde mit BioRender erstellt.

2.3.1 Kontakt-mediierte Thrombozytenaktivierung

Ein direkter Zell-Zell-Kontakt kann eine TCIPA initiieren. Dabei kommt es zu einem Wechselwirken zwischen Adhäsionsmolekülen und den korrespondierenden Rezeptoren, was die Aktivierung der Thrombozyten zur Folge hat. Das Adhäsionsmolekül P-Selektin spielt eine wichtige Rolle während der hämatogenen Metastasierung und beeinflusst die TCIPA [83, 84]. Kommt es zu einer Thrombozytenaktivierung, wird das in den α -Granula der Thrombozyten gespeicherte Selektin an die Oberfläche transloziert. Dort kann es mit einer Vielzahl an Oligosacchariden in einer Ca^{2+} -Ionen-abhängigen Reaktion interagieren und als Adhäsionsrezeptor fungieren. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass P-Selektin neben seiner Rolle in der Adhäsion auch eine Funktion bei der Aktivierung von Thrombozyten spielt, indem es beispielsweise ein intrazelluläres *signaling* in den

Thrombozyten induziert [84, 85]. Es konnte ebenfalls demonstriert werden, dass P-Selektin alleinig eine TCIPA induzieren kann [86]. Einige Tumorzelllinien können P-Selektin-Liganden wie Sialyl Lewis X (sLe^x) oder P-Selektin Glykoprotein Ligand 1 (PSGL-1) exprimieren und so Heteroaggregate mit Thrombozyten ausbilden [87]. Tumorzellen können außerdem Muzine sezernieren, die an das P-Selektin der Thrombozyten und an L-Selektin von Neutrophilen binden und diese in räumliche Nähe zueinander bringen. Die in den Heteroaggregaten eingebundenen Neutrophilen schütten dann Cathepsin G aus, das die Thrombozyten über den Protease-aktivierten Rezeptor 4 (PAR-4) aktiviert [88, 89].

Thrombozyten tragen auf ihrer Oberfläche das Integrin $\alpha_6\beta_1$, welches von Tumorzellen durch das membranständige *disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 9* (ADAM9) stimuliert werden kann, was wiederum zu einer Aktivierung der Thrombozyten, der Ausbildung von Pseudopodien und einer verstärkten P-Selektin-Präsentation auf der thrombozytären Oberfläche führt [90]. Die Aktivierung des Integrins hängt dabei stark von der simultanen Stimulation des GPVI ab, da die durch Integrin $\alpha_6\beta_1$ vermittelte Thrombozytenaktivierung in Abwesenheit des Glykoproteins stark attenuiert ist [91]. GPVI ist ein auf Thrombozyten lokalisiertes Glykoprotein, das eine wichtige Rolle bei der Kollagen-vermittelten Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten einnimmt. GPVI kann außerdem durch einige Tumorentitäten durch die Präsentation von Galectin-3 aktiviert werden [92, 93].

Ein weiteres Adhäsions-assoziiertes Integrin, das im Kontext der TCIPA von Relevanz ist, ist das auf der Oberfläche von Thrombozyten befindliche GPIIb/IIIa. Der Plättchenrezeptor spielt im physiologischen Kontext eine wichtige Rolle bei der Thrombozytenaggregation. Tumorzellen können diesen Rezeptor ebenfalls auf ihrer Oberfläche exprimieren und so Heteroaggregate mit Thrombozyten über Bindung von Fibrinogen oder vWF ausbilden [81, 83, 94]. Durch eine Tumorzell-induzierte Aktivierung von Endothelzellen wird vWF aus den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen sezerniert und die Bindung an Thrombozyten erleichtert [95]. Es konnte gezeigt werden, dass die Ausschüttung von vWF die Progression und Metastasierung von Krebszellen fördert [96] und in der tumoralen Mikroumgebung zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität, Angiogenese und EMT führt [97]. Die Interaktion des GPIb-IX-V mit vWF resultiert dann in einer verstärkten Expression von

GP1Ib/IIIa [98, 99]. Die Inhibition von GPIb-IX-V oder vWF führt zu einer reduzierten Tumorzell-Thrombozyten-Interaktion [100].

C-type lectin-like receptor 2 (CLEC-2) ist ein thrombozytärer Adhäsionsrezeptor, dessen Agonist das transmembranäre Glykoprotein Podoplanin ist. Durch Bindung kommt es zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration und dadurch zur Exozytose der thrombozytären Granula [101]. Eine Podoplanin-Überexpression konnte in zahlreichen Tumorentitäten beobachtet werden und wird mit einer gesteigerten Malignität assoziiert [81, 102, 103]. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass eine hohe Podoplanin-Expression in primären Hirntumoren mit einem erhöhten Risiko für venöse Thromboembolien einhergeht [104].

2.3.2 Parakrine Thrombozytenaktivierung

Tumorzellen können mittels einer parakrinen Stimulation eine TCIPA induzieren. Dabei werden Botenstoffe mit prokoagulativer Wirkung ausgeschüttet, die zu einer Aktivierung der Thrombozyten führen. Ein solcher Initiator ist beispielsweise ADP, das im physiologischen Kontext vor allem in den dichten Granula der Thrombozyten gespeichert und im Falle einer Aktivierung in die Umgebung abgegeben wird [56]. Einige Tumorzelllinien können ebenfalls ADP freisetzen und dadurch Thrombozyten über die purinergen Rezeptoren P_2Y_1 und P_2Y_{12} aktivieren [82, 105–107]. Die Aktivierung der Plättchen durch ADP führt neben dem *shape change* zu einer Freisetzung verschiedener Wachstumsfaktoren und Thromboxan A_2 (TXA₂) [107–110]. Auch TXA₂ kann eine parakrin-medierte TCIPA induzieren, indem es den thrombozytären Thromboxan A_2 -Rezeptor (TXR) aktiviert [111]. Die Plättchen vollführen ebenfalls einen *shape change* und es kommt zur Degranulation [112]. TXA₂ wird in den Thrombozyten durch die TXA₂-Synthase aus Arachidonsäure synthetisiert und fungiert daher ähnlich wie ADP sowohl als para- als auch als endokriner Aktivator [113].

Ein weiterer Aktivator ist das *high-mobility group box 1* (HMGB1), das den *toll-like receptor 4* (TLR4) auf der Oberfläche von Thrombozyten aktiviert. Eine erhöhte Expression von HMGB1 wurde in einer Vielzahl verschiedener solider Tumor beobachtet und mit

einem gesteigerten Invasions- und Metastasierungspotential assoziiert. Eine erhöhte HMGB1-Expression konnte unter anderem in neoplastischen Geweben aus Prostata, Kolon, Pankreas und Brust beobachtet werden [114, 115].

2.3.3 Thrombozytenaktivierung mittels Aktivierung des Blutgerinnungssystems

Der wohl am häufigsten beschriebene und effizienteste Aktivierungsmechanismus ist die Stimulation der plasmatischen Gerinnungskaskade über die Präsentation oder Ausschüttung der Gewebsthrombokinase (*tissue factor*, TF). Zahlreiche Tumorentitäten präsentieren auf ihrer Oberfläche TF oder sezernieren TF-beladene Mikrovesikel [116–121]. TF aktiviert zusammen mit FVII das extrinsische System der sekundären Hämostase mittels Ausbildung des Prothrombinasekomplexes (siehe Abschnitt 2.1.2) [122, 123]. Das Level der TF-Expression korreliert mit der Aggressivität der jeweiligen Tumorzellentität, beeinflusst das Thromboserisiko und beeinflusst die Prognose des betroffenen Patienten [124–126]. Neben der intrinsischen TF-Expression sind einige Tumorzellen befähigt über die Ausschüttung von Tumornekrosefaktor α (TNF- α) Endothelzellen zu aktivieren, die dann ihrerseits TF ausschütten können [124, 127]. Sobald die sekundäre Hämostase aktiviert ist, kommt es zu einer positiven Rückkopplungsschleife und der verstärkten Thrombozytenaktivierung. Thrombin, das aus der enzymatischen Kaskade der sich gegenseitig aktivierenden Zymogene des Hämostasesystems gebildet wird, kann so beispielsweise weitere Thrombozyten über PAR-1 und PAR-4 aktivieren [128] – wobei PAR-1 der effizienteste Rezeptor für eine Thrombin-induzierte Aktivierung ist [129]. Eine Überexpression von PAR-1, PAR-3 und PAR-4 konnte ebenfalls in entarteten Zellen beobachtet werden, wobei insbesondere die PAR-1-Überexpression mit der Entwicklung und dem Fortschreiten einer Tumorerkrankung in Verbindung gebracht werden konnte [130, 131]. Einige Tumorzelllinien können außerdem eine TF-unabhängige Generierung von Thrombin induzieren. Die Freisetzung der Cysteinprotease *cancer procoagulant* (CP) führt zu einer direkten Aktivierung des Faktor X und ist somit unabhängig von Faktor FVII und TF [132, 133]. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass Lungenkarzinomzellen Thrombin direkt bilden und sezernieren können [134]. Die Aktivierung der Plättchen führt zudem zu einer verstärkten Präsentation des GPIIb/IIIa auf der Oberfläche von Thrombozyten, und begünstigt so auch andere TCIPA-initiiierende Mechanismen (siehe Abschnitt 2.3.1) [135].

2.4 Hämatogene Metastasierung

Im Jahr 1829 beschrieb Récamier erstmals die invasive Ausbreitung von Tumoren in entfernte Gewebe und prägte den Begriff „Metastasierung“ [136]. Es handelt sich dabei um einen komplexen und dynamischen Prozess, der bei der Progression von Krebserkrankungen eine entscheidende Rolle spielt. Dieser Prozess ist Hauptursache für die meisten Tumor-assoziierten Komplikationen und Todesfälle und führt häufig zum Versagen des durchgeführten Therapieregimes [6, 7, 137]. Metastasierung bezeichnet den Vorgang, bei dem sich entartete Zellen aus dem Primärtumor lösen, im Körper verbreiten und schließlich in entfernten Geweben oder Organen Sekundärtumore ausbilden [137]. Man unterscheidet dabei zwischen zwei verschiedenen Arten, die lymphatische und die hämatogene Metastasierung, in Abhängigkeit von dem zur Verbreitung genutzten Gefäßsystem [6]. Im Falle der hämatogenen Metastasierung erfolgt die Dissemination der entarteten Zellen über das Blutsystem. Die erfolgreiche Ausbildung eines sekundären Tumors setzt ein Durchlaufen einer komplexen, metastatischen Kaskade voraus, was nur wenigen disseminierten Zellen gelingt [6, 138, 139].

Im ersten Schritt der hämatogenen Metastasierung kommt es zu einer Neovaskularisierung des Primärtumors, was einerseits den stetig steigenden Nährstoff- sowie Sauerstoffbedarf des neoplastischen Gewebes kompensiert und andererseits die spätere Intravasation in das Blutsystem ermöglicht [140, 141]. Die verstärkte Vaskularisation wird durch die Freisetzung proangiogenetischer Substanzen wie TGF- β (*transforming growth factor*), VEGF und PDGF bewerkstelligt, die von den Tumorzellen selbst als auch aus der umgebenden Zellmatrix sezerniert werden können [141, 142]. Kommt es zum Beispiel zu einer Hypoxie, wird der Transkriptionsfaktor HIF-1 (Hypoxie-induzierter Faktor 1) aktiviert und vermehrt VEGF ausgeschüttet [143]. Die neu gebildeten Gefäße weisen zwar oftmals eine fehlerhafte Architektur und eine eingeschränkte Funktionalität auf, die die Tumorprogression und Metastasierung jedoch begünstigen können. Eine starke Fenestrierung der Gefäße erleichtert so beispielsweise die Intravasation von Tumorzellen in die Blutlaufbahn [144]. Durch die eingeschränkte Funktionalität der Gefäße kann es erneut zu Hypoxien innerhalb des Tumors kommen, was neben einer erneuten HIF-1-induzierten VEGF-Ausschüttung auch zu einer Selektion

und somit zu einer gesteigerten Invasionsfähigkeit und Aggressivität der Tumorzellen führen kann [140, 143, 145].

Um ein Blutgefäß infiltrieren zu können, muss sich die Tumorzelle zunächst aus dem Gewebeverbund des Tumors lösen und durch die extrazelluläre Matrix (EZM) hin zum nächstgelegenen Blutgefäß migrieren. Dafür durchlaufen die Tumorzellen eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT) und induzieren eine proteolytische Degradation der EZM [146, 147]. Die Inflammation des Gewebes rund um den Primärtumor sorgt für ein Einwandern von Makrophagen. Über die Ausschüttung diverser Zyto- und Chemokine induziert das tumorale Gewebe eine Differenzierung der Makrophagen hin zum M2-Subtyp. So wird verhindert, dass es zur Aktivierung einer T-Zellreaktion durch proinflammatorische M1-Typ Makrophagen kommt. Tumor-assoziierte M2-Makrophagen inhibieren die T-Zell-Aktivität und schützen den Tumor so vor Phagozytose. Außerdem werden Matrix Metalloproteasen (MMP) wie MMP-7 und MMP-9 ausgeschüttet, die Peptidbindungen der EZM katalytisch aufspalten [146, 147]. Des Weiteren kann durch Sezernierung von MMP-2, Interleukin-1 und VEGF die Angiogenese erneut angeregt werden [147, 148]. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Tumor-assoziierte Makrophagen häufig in Mammakarzinomen vorkommen [149]. Durch die Expression von Aromatase können die Makrophagen Androgene zu Östrogen oxidieren und so das Tumorstadium beeinflussen [150]. Neben Makrophagen begünstigen Tumorzell-assoziierte Fibroblasten (TAF) die Tumorigenese ebenfalls über die Sekretion verschiedener Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren und mittels Degradation der EZM [151–153]. Orimo et al. konnten zeigen, dass TAF über die Ausschüttung von *stromal cell-derived factor 1* (SDF-1) Wachstum, Invasivität und Neovaskularisation von Brustkrebszellen fördern können [154].

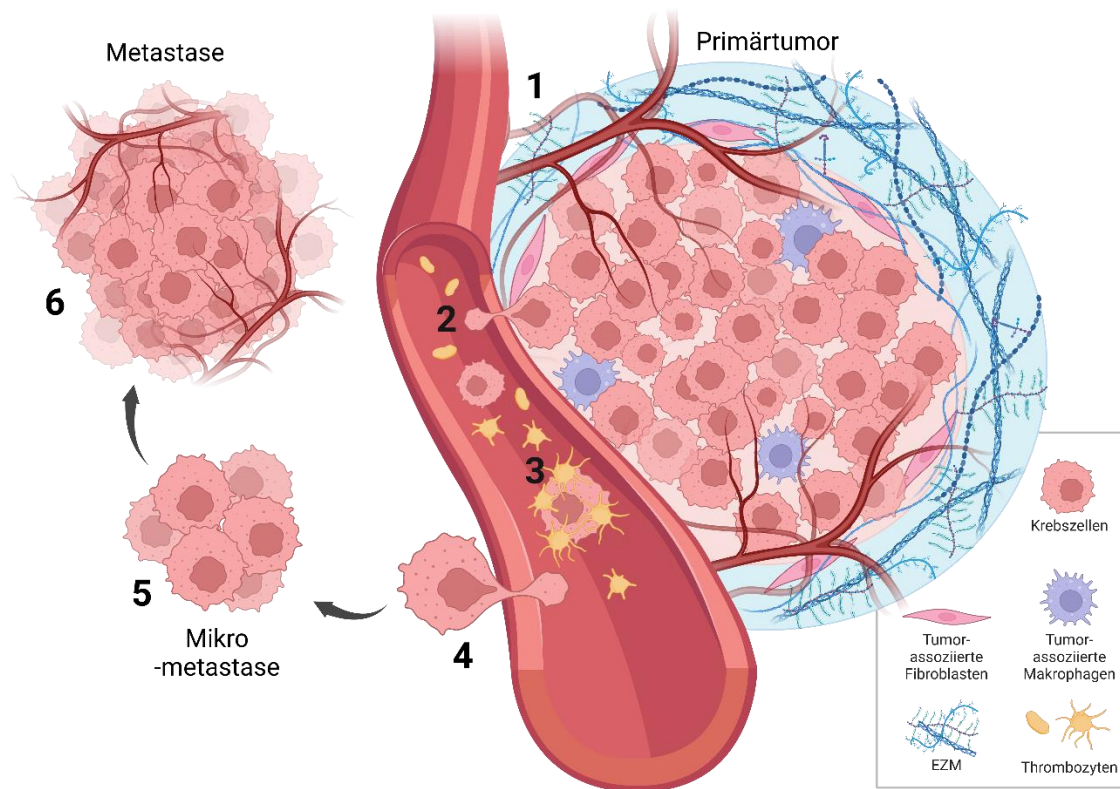


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Teilschritte der metastatischen Kaskade der hämatogenen Metastasierung: 1.) Neovaskularisation und enzymatische Degradation der Basalmembran sowie der EZM durch Tumorzellen des Primärtumors und Tumorzell-assoziierte Makrophagen und Fibroblasten gefolgt von einer aktiven Lokalinfiltration der entarteten Zellen in die EZM. 2.) Intravasation in Blutgefäß und Eintritt in das Blutsystem. 3.) Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung führt zur Ausbildung von Heteroaggregaten, durch die sich die disseminierten Zellen vor hämodynamischem Scherstress und Immunabwehr schützen. 4.) Extravasation aus dem Blutsystem. 5.) Bildung einer Mikrometastase unter Ausnutzung der prämetastatischen Nische. 6.) Metastatische Kolonisation und Ausbildung eines vaskularisierten Sekundärtumors [155]. Die Grafik wurde mit BioRender erstellt.

Durch die Interaktion mit der tumoralen Mikroumgebung können Tumorzellen eine gesteigerte Motilität erlangen und die zuvor degradierte EZM infiltrieren. Aktivierte Thrombozyten schütten beispielsweise das Zytokin TGF- β_1 aus und induzieren so eine EMT in den Tumorzellen [156, 157]. Die Zellen verlieren dabei ihren epithelialen Phänotypen und nehmen eine mesenchymale Gestalt an, die sich durch eine gesteigerte Zellmotilität auszeichnet [158, 159]. Dies geschieht durch den verstärkten Abbau des Adhäsionsproteins E-Cadherin. Dieser Prozess verhindert epitheliale Zell-Zell-Adhäsionen, die apikobasale Zellpolarität wird reduziert und das Herauslösen einzelner Zellen aus dem Zellverband erleichtert [160, 161]. Parallel kommt es zu einer gesteigerten N-Cadherin Expression, was auch als *cadherin-switch* bezeichnet wird und dessen Resultat ein verstärktes Migrations- und Invasionsverhalten der Zellen ist [158, 162, 163]. Neben der

gesteigerten Motilität nehmen Zellen mesenchymalen Phänotyps Stammzell-ähnliche Eigenschaften an und sind resistenter gegen Zytostatika sowie Apoptose [144, 164–166].

Treffen Tumorzellen während ihrer Migration durch die EZM auf ein Blutgefäß, kann es zur Intravasation und zur Infiltration in das Blutsystem kommen. Dort angekommen werden die Zellen erheblichen Belastungen ausgesetzt [8]. Durch Interaktion mit verschiedenen Blutkompartimenten sichern sich Tumorzellen essentielle Überlebensvorteile, die eine erfolgreiche Dissemination über das Blutsystem ermöglichen. So interagieren die entarteten Zellen beispielsweise mit Endothelzellen, Fibroblasten, Makrophagen, Lymphozyten, Mastzellen und Thrombozyten. Insbesondere die Interaktion mit Thrombozyten ist im Kontext der hämatogenen Metastasierung von besonderer Relevanz, wie Camerer et al. anhand eines *in vivo* Mausmodells zeigen konnten. Hierfür wurde das Metastasierungsverhalten in *nuclear factor nucleotid-derived 2* (NFE2) defizienten Mäuse untersucht. Durch den NFE2-*knockout* wurde die Reifung der Megakaryozyten der Mäuse und in Konsequenz die Bildung von Thrombozyten unterbunden. Verglichen mit der Kontrollgruppe, wurde die experimentelle Metastasierung in den NFE2-defizienten Mäusen fast vollständig inhibiert [167].

Wie in Abschnitt 2.3 beschrieben, können Tumorzellen über verschiedene Mechanismen Thrombozyten aktivieren [81]. Diese schütten dann eine Fülle von Mediatorstoffen aus ihren Granula aus, bilden Pseudopodien und vernetzen sich mit den Tumorzellen zu Heteroaggregaten. Durch diese Tumorzell-Thrombozyten-Kohäsion ummanteln sich die Tumorzellen förmlich mit einer Thrombozytenschicht und schützen sich so vor dem im Blutstrom herrschenden hämodynamischen Scherstress und tarnen sich vor der körpereigenen Immunabwehr [8, 81, 84]. Durch die Aktivierung der Thrombozyten werden mittels Exozytose der α -Granula Adhäsionsproteine wie P-Selektin oder GPIb-IX-V auf der Oberfläche der Thrombozyten präsentiert. Dies hat ein Abbremsen der Heteroaggregate im Blutstrom zur Folge, was die spätere Extravasation der Tumorzellen erleichtert [14]. Neutrophile Granulozyten können sich darüber hinaus über Wechselwirkungen mit L-Selektin, sLe^x und CD11 in die Heteroaggregate einlagern und so die leukozytäre Erkennung der zirkulierenden Tumorzellcluster und die Lyse durch NK-Zellen verhindern. Über die Präsentation von Integrinen und Selektinen tragen die

Granulozyten zu einer Arretierung der Tumorzellcluster im Kapillarbett bei, wodurch Extravasation und Transmigration durch das Endothel begünstigt werden [168]. Durch die Ausschüttung von TGF- β_1 aus den aktivierten Thrombozyten kommt es erneut zu einer EMT der Tumorzellen. Des Weiteren bewirkt TGF- β_1 eine Herunterregulierung von NKG2D (NK-Zellen aktivierender Rezeptor) und schützt die disseminierten Zellen so vor der Lyse durch NK-Zellen [169]. Neben der direkten Auswirkung des TGF- β_1 auf die zirkulierenden Tumorzellen, ist es auch an der Ausbildung prämetastatischer Nischen beteiligt [151, 156].

Neben den zirkulierenden Tumorzellclustern ist auch das Zielgewebe aktiv am Erfolg der Etablierung einer Metastase beteiligt. Der Primärtumor initiiert mittels eines mehrstufigen Prozesses die Ausbildung einer prämetastatischen Nische, um so das sekundäre Gewebe auf das Einnisten der Tumorzellen vorzubereiten. Die primären Tumorzellen setzen sekretorische Faktoren und extrazelluläre Vesikel frei, die bereits vor der Dissemination in der Mikroumgebung des Zielorgans zu einer Immunsuppression, einer Reorganisation der EZM und einer gesteigerten Permeabilität der Vaskularisierung des Gefäßes führen [170]. Der Primärtumor ist befähigt TF-beladene Mikrovesikel zu sezernieren, die in entfernten Geweben Thrombozyten oder Endothelzellen aktivieren können [116, 119, 121]. Die Aktivierung der Thrombozyten hat eine Ausschüttung der Chemokine CXCL5 und CXCL7 zur Folge, die mittels einer Rekrutierung neutrophiler Granulozyten zu einer Ausbildung metastatischer und prämetastatischer Nischen beiträgt [171]. Zusätzlich wird VEGF exprimiert, wodurch das Nährstoffangebot in der metastatischen Nische erhöht wird [172].

Kommt es zu einer Adhäsion des zirkulierenden Zellclusters an das Gefäßendothel, können diese durch transendotheliale Migration in die prämetastatische Nische gelangen. Dort angekommen, durchlaufen die Tumorzellen eine mesenchymal-epitheliale Transition (MET) und bilden wieder einen epithelialen Phänotyp aus. Es kommt zur Kolonialisierung des Zielorgans und der Ausbildung einer Mikrometastase, die durch Größenwachstum und Neovaskularisation zu einer sekundären Metastase heranreift [7, 144].

2.5 Glykokalyx

Die Glykokalyx beschreibt eine aus Glykanen bestehende multifunktionale und gelartige Schicht, welche die luminalen Oberflächen von Zellen umgibt. Sie setzt sich aus membranständigen Proteoglykanen (PG), Glykoproteinen (GP), Glykosaminoglykanketten (GAG) und adhärenen Plasmaproteinen zusammen [173–177]. Über sie wird die Interaktion der Zelle mit Plasmaproteinen, Enzymen, Enzyminhibitoren, Wachstumsfaktoren und Zytokinen vermittelt [177–180].

2.5.1 Komponenten und Funktionen der Glykokalyx

Ein Kompartiment der Glykokalyx sind Glykoproteine, an deren Kern kurze verzweigte Oligosaccharid-Ketten gebunden sind [181]. Sie fungieren vor allem als Adhäsionsrezeptoren und beeinflussen so die Leukozytenadhäsion und Entzündungsprozesse. So haben beispielsweise Integrine, E-Selektin, P-Selektin, *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1) oder *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1) Oligosaccharide an sich gebunden und werden daher als Glykoproteine klassifiziert [177, 181]. Neben den Zelladhäsionsmolekülen beherbergt die Glykokalyx auch Glykoproteine, die bei der Gerinnung, Fibrinolyse und Hämostase eine wichtige Rolle spielen. Ein Beispiel ist GPIb-IX-V, das auf Thrombozyten und Endothelzellen exprimiert wird und vWF binden kann [182].

Proteoglykane bestehen aus Kernproteinen, an die über eine kovalente Bindung GAG-Ketten und Sialoglykoproteine gebunden sind. Die Kernproteine können entweder über einen Glykophosphatidyl-Anker oder über eine transmembranäre Domäne, die mit dem Zytoskelett verbunden ist, auf der Zelloberfläche immobilisiert werden. An das Kernprotein werden dann lange, lineare GAG-Ketten gebunden, die aus einer hohen Anzahl von Disaccharid-Einheiten aufgebaut sind und auf Grund ihrer zahlreichen negativen Ladungen einen stark hydrophilen Charakter haben [176]. Die Klassifizierung der GAG erfolgt anhand der zu einer Kette verknüpften Disaccharid-Einheiten [180]. Heparansulfate (HS), Chondroitinsulfate, Dermatansulfate, Keratansulfate und Hyaluronsäuren sind dabei die auf Zelloberflächen dominierenden GAG. Diese an das

Kernprotein gebundenen Ketten reichen dann in den extrazellulären Raum der Zelle und werden so auf der zellulären Oberfläche präsentiert [175, 176, 183]. Lösliche Komponenten, wie z.B. diverse Proteine oder lösliche Proteoglykane, betten sich in das Netz aus Proteoglykanen und Glykoproteinen ein und beeinflussen im hohen Maße die Funktionalität der Glykokalyx [181].

In neoplastischen Geweben ist die Glykokalyx der Tumorzellen signifikant größer und deutlich robuster als die von gesunden Zellen [175, 184]. Durch eine veränderte Expression Glykokalyx-modifizierender Enzyme erlangt die entartete Zelle etliche Vorteile hinsichtlich der Tumorprogression. So beeinflusst die kanzeröse Glykokalyx Funktionen von transmembranären Rezeptoren, Integrin-vermittelte Signalwege, Zell-Zell- und Zell-EZM-Interaktionen und die Immunerkennung [174]. Es konnte gezeigt werden, dass eine vergrößerte, voluminösere Glykokalyx mit einer erhöhten Migrationsrate und einer potenteren Metastasierung einhergeht [185, 186].

Etwa 50 – 90 % der Gesamtmenge der in der Glykokalyx befindlichen Proteoglykane machen Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) aus [177, 187]. Daher soll im folgenden Abschnitt näher auf die Bedeutung der HSPG eingegangen werden.

2.5.2 Heparansulfat-Proteoglykane

Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) werden ubiquitär auf der Oberfläche und EZM von Säugetierzellen exprimiert [188–192]. Sie haben eine Schlüsselfunktion bei einer Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Prozesse, wie z.B. der Zellkommunikation, -differenzierung, -wachstum und -morphogenese. Es handelt sich dabei um Glykoproteine, die aus einer oder mehreren Heparansulfatketten (HS) bestehen [193]. HS sind lange, lineare, anionische Glykosaminglykanketten (GAG), die sich aus sich wiederholenden Disaccharideinheiten, bestehend aus *N*-Acetyl-Glucosamin (GlcNAc) und Glucuronsäure (GlcA) oder der C5-epimerisierten Variante Iduronsäure (IdoA), zusammensetzen und über α -1,4- oder β -1,4-glykosidische Bindungen verknüpft sind [10, 188, 194–197]. Diese Makromoleküle steuern etliche zelluläre Regulationsmechanismen, die mit Zellwachstum, Proliferation, Migration, Invasion,

Zelladhäsion, Membrantransport, Angiogenese und der Bildung extrazellulärer Gradienten assoziiert werden [191, 198]. Des Weiteren spielen sie in physiologischen und pathophysiologischen Prozessen eine essentielle Rolle, in dem sie die Embryonalentwicklung, den Gewebeumbau, den Aufbau und die Aufrechterhaltung der EZM, die Stoffwechselhomöostase, die Abwehr von Pathogenen und Entzündungsprozesse steuern [199–204]. HSPG agieren als Liganden oder Korezeptoren in verschiedenen Signalkaskaden wie dem VEGF-, FGF-, Wnt-, Notch-, IL-6/JAK-STAT3- oder NF- κ B-*signaling* [205]. Insbesondere die strukturellen Merkmale der HS, einschließlich Länge und Sulfatierungsmuster, sind dabei entscheidend für die biologischen Funktionen der HSPG, da diese Merkmale die Selektivität und Affinität der HS bestimmen. Diese strukturelle Vielfalt resultiert aus einem streng regulierten Biosyntheseweg, der je nach Organ, Entwicklungsstadium oder Pathologie verschiedentlich ausgeprägt ist [195, 206]. HS und andere sulfatierte GAG gehören zu den am stärksten negativ geladenen Biopolymeren und die Variation der Anzahl und Länge der Ketten sowie der Modifikationen führen zu einer enormen Polydispersität hinsichtlich ihrer Funktion und Erscheinung. Aufgrund der stark ausgeprägten negativen Ladung binden zahlreiche Proteine, darunter Vertreter der *fibroblast growth factor*-Familie und deren Rezeptortyrosinkinasen, *transforming growth factors*, Wnt-Proteine, Chemokine, Interleukine, Enzyme und Enzyminhibitoren, Lipasen sowie EZM- und Plasmaproteine, an die HS-Ketten [195, 207, 208]. Durch die Interaktion mit zahlreichen Liganden und Strukturproteinen sowie der Modulation verschiedener Signalwege, welche die Zelltransformation und -proliferation beeinflussen, übernehmen die HSPG außerdem eine essentielle Rolle im neoplastischen Kontext durch ihre Beteiligung an Tumorwachstum und Metastasierungsprozessen [189, 204, 209–211].

HSPG können abhängig vom Ort ihrer Präsentation drei Gruppen zugeordnet werden. Eine Gruppe bilden die membranständigen HSPG, zu denen die Syndecane und die Glykosylphosphatidylinositol-verankerten Proteoglykane (Glypicane) gehören. Des Weiteren gibt es die sezernierten, extrazellulären Matrix-HSPG, zu denen beispielsweise Agrin, Perlecan, Testican und Typ-XVIII-Kollagen zählen. Vertreter der dritten und letzten Gruppe ist das sekretorische Vesikelproteoglykan Serglycin [191, 201, 206].

Membranständige HSPG werden auf der Basalmembran präsentiert und interagieren mit anderen Komponenten der EZM, was bspw. die Migration der Zellen ermöglicht. Sie erleichtern so die Zellmotilität, Zell-Zell-Interaktion und EZM-Adhäsion mittels Interaktion mit Zelladhäsionsrezeptoren und Integrinen. In der Leber spielen die membranständigen HSPG eine wichtige Rolle, da sie die Elimination gebundener Rezeptorliganden regulieren und so entscheidend in den Lipoprotein-Metabolismus eingreifen [191, 212].

Serglycin ist ein HSPG, das hauptsächlich intrazellulär in endothelialen und hämatopoetischen Zellen vorkommt [195, 213–215]. Es wird vor allem in unterschiedlichen Speichergranula exprimiert, wodurch die Beladung der sekretorischen Vesikel reguliert wird. Die enzymatische Aktivität der in den Granula befindlichen Proteasen wird durch Wechselwirken mit Serglycin aufrechterhalten und so verschiedene biologische Aktivitäten reguliert (z.B. Gerinnung und Wundheilung). In Mastzellen wird ebenfalls Serglycin exprimiert, an das mittels kovalenter Bindung diverse Chondroitinsulfate und Heparin gebunden sind [193, 216].

Die Biosynthese der HS-Ketten, an der in Säugetieren bis zu 26 Enzyme beteiligt sind [195], findet an der Schnittstelle zwischen dem endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat statt [181, 194, 206]. Erster Schritt der Biosynthese ist der Aufbau eines GAG-Protein Linkers, der die spätere kovalente Bindung der HS-Kette an das Proteoglykan-Kernprotein vermittelt. Dafür wird zunächst ein Xylosemolekül (Xyl) durch XYLT1 und XYLT2 (Xylosyltransferase) auf einen Serinrest des Kernproteins übertragen. An die Xylose wird dann durch Galaktosyltransferase 1 (GALT1) ein Galaktosemolekül (Gal) β -1,4-glykosidisch angebunden. GALT2 bindet dann wiederum über eine β -1,3-glykosidische Bindung ein weiteres Gal-Molekül. Glucuronyltransferase 1 (GLCAT1) vermittelt dann eine β -1,3-glykosidische Anbindung eines Glucuronsäuremoleküls (GlcA), wodurch der Tetrasaccharid-Primer GlcA-Gal-Gal-Xyl fertiggestellt wird. *Exostosin like glycosyltransferase 3* (EXTL3) überträgt eine N-Acetyl Glucosamin-Einheit und bereitet die HS-Kette auf die anschließende Elongation durch Exostosine (EXT) vor [195]. EXT1 und EXT2 polymerisieren GlcA- und GlcNAc-Einheiten zu Ketten [195, 201]. Im letzten Schritt, der Reifung der fertigen HS-Kette, kommt es durch eine Reihe von HS-modifizierenden Enzymen zu Sulfatierungen, Deacetylierungen und Epimerisierungen, die entscheidenden Einfluss auf die Funktionalität der HSPG nehmen. Vermittelt werden diese Veränderungen

durch *N*-Deacetylase/*N*-Sulfotransferasen (NDST), HS-D-Glucuronyl C5-Epimerase (HSGLCE) und diverse *O*-Sulfotransferasen (HS2ST, HS3ST, HS6ST) [10, 193, 195, 197, 208, 217–220]. Durch diese Modifikationen und weitere postsynthetische Veränderungen der HS-Ketten durch 6-*O*-Endosulfatasen (SULF-1 und SULF-2) oder Heparanase erlangen die HSPG ihre Polydispersität [195, 197, 221].

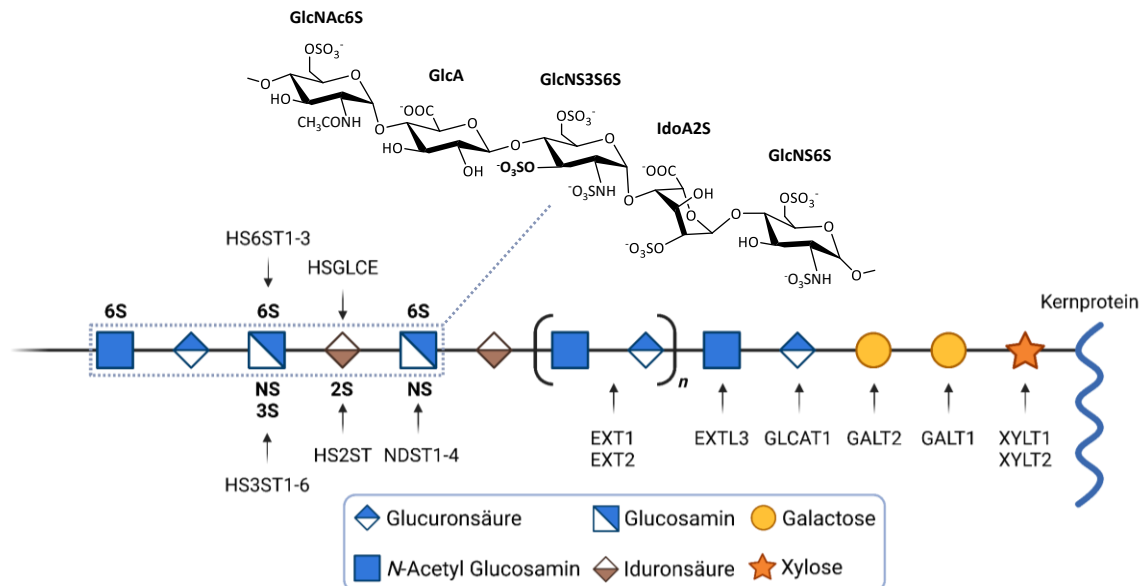


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Aufbaus von Heparansulfaten und der für die Ausbildung der AT-Bindungsstelle notwendigen Modifikationen der HS-Kette. Im Golgi-Apparat wird der Tetrasaccharid-Primer Xyl-Gal-Gal-GlcA durch XYLT1, XYLT2, GALT1, GALT2 und GLCAT1 ausgebildet. An diesen wird durch EXTL3 GlcNAc angebunden. EXT1 und EXT2 polymerisieren die HS-Kette, die im späteren Verlauf durch diverse Enzyme modifiziert wird. NDST vermitteln die N-Deacetylierung und anschließende N-Sulfatierung von GlcNAc. HS6ST kann dann eine 6-O-Sulfatierung Glc oder GlcNAc vermitteln. GlcA wird durch HSGLCE zu IdoA epimerisiert. Im Folgenden wird IdoA durch HS2ST 2-O-sulfatiert. HS3ST synthetisiert 3-O-Sulfatierungen an. Oberhalb der schematischen HS-Kette wird die Strukturformel des Antithrombin-bindenden Pentasaccharids abgebildet. (GlcNAc6S = 6-O-sulfatiertes N-Acetylglucosamin; GlcA = Glucuronsäure; GlcNS3S6S = 3,6-O-sulfatiertes N-Sulfoglucosamin; IdoA2S = 2-O-sulfatierte L-Iduronsäure; GlcNS6S = 6-O-sulfatiertes N-Sulfoglucosamin) [10, 54, 195, 222–224]. Die Grafik wurde mit BioRender erstellt.

Dies ermöglicht, dass HSPG als Rezeptoren für Proteasen oder Proteaseinhibitoren fungieren und so deren räumliche Verteilung und Aktivität regulieren können. Ein prominentes Beispiel für solch eine spezifische Regulation ist die Bindung von Antithrombin durch Heparin oder HSPG und die darauffolgende Aktivierung des Serinproteaseinhibitors [225]. Dass sulfatierte GAG-Ketten eine antikoagulative Wirkung aufweisen können und diese auf der Bindung von Antithrombin basiert, ist bereits länger bekannt. So wurde bereits 1916 das Heparin und dessen antikoagulative Wirkung entdeckt und beschrieben [226]. 1939 wurde dann nachgewiesen, dass die antikoagulative Wirkung des Heparins auf die Anwesenheit eines im Plasma befindlichen

Kofaktors angewiesen ist [227]. In den 1950er Jahren wurde dann herausgefunden, dass dieser Kofaktor Antithrombin ist und Heparine die antikoagulative Wirkung des Serinproteaseinhibitors verstärken [228, 229]. In den frühen 1980er Jahren konnte dann erstmalig die für die Bindung und Aktivierung von Antithrombin essentielle Pentasaccharid-Struktur identifiziert werden [230]. Die Interaktion mit der Pentasaccharidsequenz GlcNAc6S-GlcA-GlcNS3S6S-IdoA2S-GlcNS6S führt zu einer aktivierenden Konformationsänderung des Antithrombins und dadurch zu einer Inhibition der Faktoren Xa und IIa [10, 223, 231].

Heparin und HS sind beides sulfatierte GAG-Ketten, die sich strukturell stark ähneln. Anders als HS setzt sich Heparin allerdings aus Disaccharideinheiten, bestehend aus IdoA mit einer Sulfatierung an der C2-Position und *N*-sulfatiertem Glucosamin mit einer zusätzlichen Sulfatierung an der C6-Position, zusammen [194, 232, 233]. Die Differenzierung wird allerdings anhand des Ortes der Biosynthese vorgenommen. Als Heparine zählen diejenigen GAG-Ketten, die in Mastzellen synthetisiert werden. Alle übrigen strukturverwandten Polysaccharide werden hingegen als Heparansulfate bezeichnet [193]. HS-Ketten können ähnlich wie Heparine über die AT-bindende Pentasaccharidstruktur verfügen, weswegen beide GAG-Ketten antikoagulative Eigenschaften vermitteln [10, 232]. Die in Abbildung 6 dargestellte Struktur zeigt die AT-bindende Domäne der HS und des Heparins sowie die notwendigen Modifikationen. Neben den 6-*O*-Sulfatierungen an GlcNAc6S, GlcNS3S6S und GlcNS6S sowie der 2-*O*-Sulfatierung an IdoA2S, ist die 3-*O*-Sulfatierung GlcNS3S6S trotz ihres seltenen Vorkommens von besonders hohem Stellenwert für die AT-Bindung [222]. Chopra *et al.* konnten zeigen, dass das Fehlen der 3-*O*-Sulfatierung zu einer 10⁵-fachen Reduktion der Bindungsaffinität führt [10]. Ein Großteil dieser Modifikationen wird durch Heparansulfat Sulfotransferasen vermittelt, auf die im folgenden Abschnitt näher eingegangen werden soll.

2.6 Einfluss einer veränderten HSPG-Ausstattung auf das Tumorgeschehen

Neben ihren physiologischen Funktionen in der Entwicklung und Homöostase können HSPG eine wichtige Rolle in pathophysiologischen Prozessen einnehmen, indem die HS-Ketten bspw. mit krankheitsassoziierten Proteinen interagieren [195, 208, 211]. Die HSPG-Synthese ist in zahlreichen Tumorentitäten hochreguliert und kann als molekularer Biomarker zur Unterstützung der Diagnose und Prognose einer Krebserkrankung dienen [199, 234]. Die abweichende HSPG-Ausstattung der Tumorzellen ist Resultat einer dysregulierten Expression HS-modifizierender Enzyme. Konsequenz der abweichenden HS-Biosynthese sind stark veränderte HS-Strukturen, aus denen die entarteten Zellen durch eine veränderte HS-Protein-Interaktion etliche Überlebensvorteile ziehen. So konnte bereits nachgewiesen werden, dass sich die veränderte HS-Ausstattung auf die Tumorprogression, -proliferation, -migration, -apoptose und den Schutz vor der körpereigenen Immunabwehr auswirkt [9, 155, 195].

2.6.1 Heparansulfat 2-O-Sulfotransferasen

HS2ST1, die bislang einzige bekannte Isoform der Heparansulfat 2-O-Sulfotransferase, katalysiert den Transfer einer Sulfatgruppe an der C2-Position von GlcA und IdoA, wobei die Affinität an die epimerisierte IdoA fünffach höher ist als an GlcA [235]. IdoA2S ist für HSLCE als Substrat durch den Sulfatrest unzugänglich und kann dementsprechend nicht mehr zu GlcA epimerisiert werden [236]. Die Expression von HS2ST1 ist in zahlreichen Tumorentitäten dysreguliert. IdoA2S spielt eine entscheidende Rolle in der Tumorprogression, in dem es die Interaktion der HS-Ketten mit zahlreichen tumorigenen Liganden vermittelt [237]. Safaiyan *et al.* konnten zeigen, dass die Wechselwirkung der HS-Ketten mit Wachstumsfaktoren wie FGF-2, PDGF und Fibronectin maßgeblich von IdoA2S des GlcNS6S-IdoA2S-Disaccharids abhängt [238–242]. Die HS2ST-Expression in Prostatakarzinomen ist im Vergleich zu gesunden Geweben signifikant erhöht. Auch in *in vitro*-Untersuchungen des Prostatakarzinomzellmodells LNCaP-C4-2B konnte eine Korrelation zwischen HS2ST1-Level und Metastasierungspotential identifiziert werden. Aus einem HS2ST1-*knockdown* resultierte eine gesteigerte Zelladhäsion durch eine erhöhte E-Cadherin-Expression. Der *knockdown* bewirkte außerdem eine verminderte

Invasions- und Proliferationsrate der Zellen [243]. Teils konnten allerdings auch adversative Effekte einer veränderten HS2ST1-Expression beobachtet werden. Untersuchungen der Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 zeigten, dass eine Überexpression der Sulfotransferase zu einer reduzierten Invasivität, Migration und EZM-Adhäsion der Zellen führte. Außerdem beeinflusste eine Überexpression mehrere tumorassoziierte Signalwege wie EGFR, MAPK und Wnt und verschlechterte so die Viabilität der Zellen [244]. Eine veränderte Expression von HS2ST1 beeinflusst zudem die Stammzell-Eigenschaften von Brustkrebszellen [237].

2.6.2 Heparansulfat 3-*O*-Sulfotransferasen

Die 3-*O*-Sulfatierung der HS-Ketten ist einer der letzten Reifungsschritte der HS-Biosynthese und wird durch HS3ST vermittelt. Insgesamt sind sieben Isoformen der 3-*O*-Sulfotransferasen bekannt, deren Expression in vielen Tumorentitäten dereguliert ist [9, 245]. Während HS3ST1 und HS3ST5 im physiologischen Kontext an der Ausbildung der AT-Bindungsdomäne beteiligt sind, werden die Isoformen HS3ST2, HS3ST3A1, HS3ST3B1, HS3ST4 und HS3ST6 vorrangig mit der Synthese der Bindungsdomäne für das Glykoprotein gD des Herpes-simplex-Virus-1 (HSV-1) in Verbindung gebracht [246–256].

Studien haben gezeigt, dass die HS3ST-Genexpression durch epigenetische Mechanismen bei verschiedenen Tumorentitäten wie Brust-, Lungen-, Pankreas-, Hirn-, Haut- und Darmkrebs dereguliert wird, was eine wichtige Rolle im Kontext einer Pathogenese vermuten lässt [11, 257]. Bisherige Studien kommen allerdings zu einem heterogenen Ergebnis, was die Auswirkungen einer HS3ST-Dysregulation anbelangt. Während in einigen Forschungsarbeiten eine Funktion als Tumorsuppressor postuliert wurde, zeigten andere Studien klare onkogene Effekte der 3-*O*-Sulfotransferasen [11, 258–269].

Untersuchungen einer HS3ST2-Reexpression in Mammakarzinomzellen zeigten beispielsweise, dass je nach Brustkrebszelllinie Invasion und Proliferation der Zellen beeinflusst werden. Während die Reexpression in MDA-MB-231-Zellen zu einer gesteigerten Viabilität, Invasionsrate, Proliferation und Überlebensrate führte, konnten solche Effekte in MCF-7-Zellen nicht beobachtet werden [270, 271]. Ein ähnlicher

Zusammenhang zwischen der Hypermethylierung der HS3ST2-Promotorregion und einer erhöhten Tumorinvasivität wurde auch in Lungen- und Blasenkrebs hergestellt [262, 272].

Mao *et al.* konnten zeigen, dass die Expression von HS3ST3A1 in nahezu allen untersuchten Mammakarzinomzelllinien unterdrückt wird. Neben DNA-Methylierungen konnten auch Histonmodifikationen als epigenetische Regulationsmechanismen und Ursache der unterdrückten Expression ausgemacht werden. Transfektionen der Zellen mit cDNA und siRNA zeigten essentielle Auswirkungen einer geminderten HS3ST3A1-Expression auf das Zellverhalten. Ob die Reexpression von HS3ST3A1 pro- oder antitumorale Effekte vermittelt, hängt dabei von der untersuchten Zelllinie ab [267].

Bei H-HEMC-SS Chondrosarkomzellen wurde eine Hypermethylierung und eine damit einhergehende verringerte Expression der 3-O-Sulfotransferasen HS3ST1, HS3ST2 und HS3ST3A1 mit einem invasiveren Phänotyp in Verbindung gebracht. Mittels cDNA konnte in den H-HEMC-SS-Zellen eine Reexpression von HS3ST3A1 und HS3ST1 induziert werden, was eine Reduktion der proliferativen und invasiven Eigenschaften und eine verstärkte Adhäsion der Zellen zur Folge hatte [258]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ein HS3ST3A1-*knockdown* zu einer verbesserten Migration von A549-Zellen führte [273].

2.6.3 Heparansulfat 6-O-Sulfotransferasen

Die 6-O-Sulfatierung der HS-Ketten ist für die Bindung und Aktivierung vielerlei Signalmoleküle notwendig, die entscheidend an der Proliferation, Adhäsion und Migration von Zellen beteiligt sind. Dazu zählen beispielsweise VEGF, PDGF, HGF, FGF oder Fibronectin [241, 274–280]. Mehrere Studien weisen auf die Beteiligung einer Überexpression der insgesamt drei HS6ST-Isoformen am Tumorgeschehen hin [281]. So konnte beispielweise eine HS6ST1-Überexpression in Ovarialkarzinomen [282] und eine HS6ST2-Überexpression in Adenokarzinomen der Bauchspeicheldrüse, des Dickdarms, des Magens, der Gebärmutter und der Eierstöcke [282–286] beobachtet werden. Außerdem konnte eine Überexpression aller drei Isoformen in Chondrosarkomen festgestellt werden [287]. Irvani *et al.* untersuchten die Mammakarzinomzelllinien MDA-MB-231, MCF-7 und T47D, und stellten ebenfalls eine hochregulierte HS6ST3-Expression

fest. Ein HS6ST3-*silencing* mittels siRNA führte zu einer Reduktion des Wachstums, der Migration und der Invasion sowie zu einer gesteigerten Adhäsion und Apoptose der untersuchten Tumorzellen [281]. *In vivo* Untersuchungen zeigten zusätzlich, dass inaktive, therapierefraktäre Brustkrebszellen durch eine HS6ST1-Überexpression sowie einer hochregulierten Expression von FGF1, FGF2R und der Galaktosyltransferase B3GALT6 verbesserte Überlebenschancen adaptieren und das Risiko eines Tumorrezidivs steigt [288]. Gewebeproben von Patienten, die an einem Pankreaskarzinom litten, wurden mit nicht-kanzerösem Pankreasgewebe verglichen. Während die mRNA-Expression der Isoformen HS6ST1 und HS6ST3 in beiden Geweben unterhalb der Nachweisgrenze lag, konnte eine stark hochregulierte HS6ST2-Expression in dem Tumorgewebe festgestellt werden. Selbiges konnte bei *in vitro* Untersuchungen der Pankreaskarzinomzelllinie PANC-1 beobachtet werden. Ein shRNA-induziertes HS6ST2-*silencing* führte zu einer reduzierten Invasion, Migration und Angiogenese sowie zu einer verminderten Wachstumsrate und Tumorigenität der Tumorzellen. Ein HS6ST2-*knockdown* inhibierte außerdem die Tumorgenese in immunsupprimierten Mäusen [285]. In Ovarialkarzinomen modulierten HS6ST1 und HS6ST2 über eine HS-abhängige HB-EGF/EGFR-Achse die Expression proangiogener Zytokine. Die Herunterregulierung der beiden Sulfotransferasen in humanen Ovarialkarzinomzelllinien führt zu einer signifikanten Reduktion der 6-O-sulfatierten Glucosamin-Level, was das EGFR-*signaling* beeinträchtigt und die mRNA- und Proteinexpressionen von FGF2, IL-6 und IL-8 reduziert. Die Konsequenz ist eine verminderte Angiogenese des Tumorgewebes [289]. Mittels Microarray-Analyse konnte nachgewiesen werden, dass die HS6ST2-Expression im Gewebe von Magenkarzinomen, verglichen mit der Expression in gesundem Magengewebe, 12-fach erhöht ist. Es konnte außerdem auch ein Zusammenhang zwischen einem höheren HS6ST2-Level und der Tiefe der Tumordinvasion und dem allgemeinen Metastasierungspotential hergestellt werden. Die Kaplan-Meier-Überlebensanalyse zeigte, dass die Prognose der HS6ST2-positiven Gruppe signifikant schlechter war als die der HS6ST2-negativen Gruppe (5-Jahresüberlebensrate: HS6ST2⁺ = 28 %; HS6ST2⁻ = 64,7 %) [290].

2.6.4 Heparanase

Eine veränderte Expression der Enzyme, die an der postbiosynthetischen Modifikation der HS beteiligt sind, wird mit einer gesteigerten Tumorprogression assoziiert. Es konnte festgestellt werden, dass die Endo- β -Glucuronidase Heparanase (HPSE) von vielen Tumorentitäten verstärkt exprimiert wird. Die Überexpression korreliert dabei mit einer gesteigerten Malignität des Tumorgewebes, einer höheren Neovaskularisationsrate, einer reduzierten Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten [199, 291–294] und fördert die Infiltrations- und Metastasierungsrate von Tumorzellen durch einen verstärkten Abbau der EZM [196, 208, 295]. Wachstumsfaktoren und Zytokine, die an die HSPG der EZM gebunden sind, werden durch HPSE katalytisch abgespalten, in die Tumor-Mikroumgebung abgegeben und für eine Stimulation des Tumorgewebes zugänglich gemacht. Über die Freisetzung von proangiogenetischen Botenstoffen wie VEGF, FGF und PDGF wird so beispielsweise die Vaskularisation von Primärtumoren begünstigt [196, 208, 221, 292, 295, 296]. Neben der Spaltung der HS-Ketten der EZM kommt es auch zu einer HPSE-induzierten Degradation der Basalmembranen. Die Migration der Zellen durch den extrazellulären Raum und die Intravasation in den Blutkreislauf werden dadurch erleichtert. HPSE scheint darüber hinaus selbst Einfluss auf die Genexpression der Tumorzellen zu nehmen. Effektorproteine wie VEGF, MMP-9, TGF- β oder TF werden von HPSE-stimulierten Tumorzellen vermehrt exprimiert [196, 295, 297]. Durch Aktivierung von Thrombozyten, beispielsweise über eine verstärkte TF-Expression, können Tumorzellen ebenfalls eine Freisetzung von HPSE induzieren und erleichtern so ihre Extravasation aus dem Blutstrom [298]. Die Spaltung durch HPSE erfolgt bevorzugt an HS-Sequenzen mit einem niedrigen Sulfatierungsgrad [196]. Tumorzellen verfügen dadurch verglichen mit gesunden Geweben zwar über kürzere HS-Ketten, die dafür aber einen deutlich erhöhten 6-O-Sulfatierungsgrad und somit eine stärkere negative Ladung aufweisen [299]. Dies könnte die Bindungsaffinitäten von protumoralen Liganden und somit Krebs-assoziierte Signalwege beeinflussen [208].

2.6.5 6-O-Endosulfatasen

Die Expression von SULF-1 und SULF-2 ist in vielen Tumorentitäten dysreguliert. Während die Expression von SULF-1 je nach Tumorentität hoch- oder herunterreguliert wird [300], konnte für SULF-2 eine ubiquitäre Überexpression in allen untersuchten Tumorentitäten festgestellt werden [197, 300–303]. Bei den Endosulfatasen handelt es sich ebenfalls um Enzyme, die eine postsynthetische Modifikation der HS-Ketten vermitteln. Sie führen zu einer Desulfatierung der 6-O-Sulfatierungen der HS-Ketten, was Tumor-assoziierte Signalwege beeinflussen kann [197, 205, 304, 305]. Die 6-O-Desulfatierung findet dabei hauptsächlich an der Disaccharidstruktur IdoA2S-GlcNS6S statt [302, 306–308], die auch Bestandteil der AT-bindenden Domäne ist [10, 223, 231]. Während Tumorzellen SULF-2 überwiegend selbst exprimieren, wird SULF-1 vor allem von Tumorzell-assoziierten Fibroblasten ausgeschüttet [205]. In der Literatur werden den Sulfatasen teils adversative Effekte hinsichtlich einer pro- oder antitumoralen Wirkung zugesprochen [197]. So führt eine SULF-1-Überexpression zu einer tumorsupprimierenden Wirkung [309–311], während SULF-2 protumorigene Effekte vermitteln soll [302–304, 312–314]. Zahlreiche andere Studien konnten jedoch zeigen, dass eine erhöhte endogene SULF-1- oder SULF-2-Expression mit einer reduzierten Überlebenswahrscheinlichkeit des Patienten und einer gesteigerten Tumorprogression korrelieren. Dies konnte beispielsweise in Pankreas-, Mamma-, Magen-, hepatozellulären Karzinomen, Zervixkarzinomen sowie in Glioblastomen und multiplen Myelomen beobachtet werden [300, 301, 304, 311, 313, 315–317]. Die protumorale Wirkung der SULF-2 wird durch eine Studie von Zhu *et al.* unterstrichen, in der MCF-7-Zellen, die sich durch eine hohe intrinsische SULF-2-Expression auszeichnen, und MDA-MB-231-Zellen, die kein SULF-2 exprimieren, untersucht wurden. Hierfür wurden *knockout*- und überexprimierende Varianten der Zelllinien generiert, die hinsichtlich Proliferation, Invasion, Mobilität, Adhäsion und Apoptose untersucht wurden. Eine erhöhte SULF-2-Expression führte dabei zu einer gesteigerten Proliferations-, Invasions- und Metastasierungsrate und zu einer verringerten Apoptose der Brustkrebszellen [317].

2.7 Epigenetische Regulation der HS-modifizierenden Enzyme

Die Regulation der HSPG-Biosynthese in Tumorzellen spielt eine bedeutende Rolle bei der Tumorgenese und -progression. Zahlreiche Studien weisen darauf hin, dass die Expression der HS-modifizierenden Enzyme, die an der Biosynthese beteiligt sind, durch epigenetische Mechanismen reguliert werden [199]. Das Krebsepigenom ist durch globale Veränderungen in den DNA-Methylierungs- und Histonmodifikationsmustern sowie durch veränderte Expressionsprofile von Chromatin-modifizierenden Enzymen gekennzeichnet. Diese epigenetischen Veränderungen führen zu einer globalen Dysregulation von Genexpressionsprofilen, welche die Entwicklung und das Fortschreiten von Krankheiten begünstigen [199, 318, 319]. Eine entartete Regulation dieser Mechanismen hat dann zum Beispiel zur Folge, dass Tumorzellen mittels einer veränderten HSPG-Ausstattung zahlreiche biologische Prozesse beeinflussen können, die entscheidend an der Onkogenese beteiligt sind [199].

2.7.1 DNA-Methyltransferasen

Eine der wichtigsten epigenetischen Veränderungen, die mit der Tumorgenese in Verbindung gebracht wird, ist die in Tumorzellen aberrante DNA-Methylierung. Tumorzellen weisen erhebliche Abweichungen in ihrem DNA-Methylom auf, die sich in Form von gezielten Hypermethylierungen von Genpromotoren, globalen Hypomethylierungen und vermehrten Mutationen an methylierten CpG-Dinukleotiden äußern [320]. Die Methylierung wird durch DNA-Methyltransferasen (DNMT) vermittelt, welche die Übertragung einer Methylgruppe vom Kofaktor S-Adenoysl-L-Methionin (SAM) auf die C5-Position eines Cytosin-Rings katalysieren [321, 322]. Man unterscheidet dabei drei Isoformen der DNMT. DNMT1 wird auch als *maintenance*-Methyltransferase bezeichnet, da sie vorhandene Methylierungsmuster auf die neusynthetisierten DNA-Stränge kopiert. DNMT2 besitzt nur eine marginale enzymatische Aktivität und trägt kaum zur Ausbildung des DNA-Methyloms bei. DNMT3a und DNMT3b werden als *de novo*-Methyltransferasen bezeichnet, da sie die Cytosinmethylierung an nicht-methylierten CpG-Dinukleotiden vermitteln [321–323]. Insbesondere CpG-reiche Regionen, sogenannte CpG-Inseln, werden in Tumorzellen häufig hypermethyliert, was zu einem Verlust der entsprechenden Genexpression führt. Besonders häufig betroffen sind dabei

Tumorsuppressorgene, Zellzyklusregulatoren, DNA-Reparaturgene und Apoptose-assoziierte Gene [258]. Neben den zuvor genannten Genen wird auch die Transkription verschiedener HS3ST-kodierender Gene supprimiert. So konnte beispielsweise eine verminderte oder gänzlich unterdrückte HS3ST2-Expression, die auf eine Hypermethylierung zurückzuführen war, in Brust-, Kolon-, Lungen- und Pankreaskarzinomzellen festgestellt werden [11].

Das erste HS-modifizierende Enzym, bei dem eine epigenetische Deregulation im Zusammenhang mit einer Tumorerkrankung festgestellt werden konnte, ist EXT-1. Da es eine grundlegende Funktion in der Kettenelongation trägt, kann eine veränderte Expression viele anschließende HS-Funktionen beeinflussen und sich auf die Karzinogenese auswirken [199]. So konnte gezeigt werden, dass die EXT-1-kodierende Gensequenz bei promyelotischer Leukämie, akuter lymphatischer Leukämie und nicht-melanotischem Hautkrebs hypermethyliert ist. Resultat ist ein *silencing* der EXT-1-Expression und ein Stillstehen der HS-Biosynthese [245].

In Zellen der Chondrosarkomzelllinie H-HEMC-SS konnte eine Hypermethylierung in der NDST1 Promotorregion festgestellt werden. Zellen, die kein NDST1 oder NDST2 exprimieren, verfügen zwar über 6-*O*-Sulfatierungen; 2-*O*-, 3-*O*- sowie *N*-Sulfatierungen bleiben jedoch aus [324, 325]. Die Behandlung der H-HEMC-SS-Zellen mit dem DNMTi Decitabin führte zu einer Demethylierung der entsprechenden Promotorregion, zu einer erhöhten NDST1 mRNA-Expression und zu einer Reduktion der proliferativen und invasiven Eigenschaften der Zellen [258]. Die durchgeführte Analyse des Methylierungsstatus von Glykosyltransferase- und Sulfotransferase-Genen in H-HEMC-SS-Zellen zeigte außerdem eine Hypermethylierung der HS3ST-Gene. Eine Behandlung mit Decitabin führte auch hier zu einer Reexpression der Sulfotransferasen und gesteigerte HS3ST1-, HS3ST2- und HS3ST3A-mRNA-Level konnten nach der DNMTi-Inkubation gemessen werden [258]. Ein durch eine Hypermethylierung der HS3ST2-Promotorregion vermitteltes HS3ST2-*silencing* wurde auch in Lungen- und Blasenkrebs beobachtet. Die verminderte Expression korreliert dabei mit einer erhöhten Tumordinvasivität [262, 272]. Eine Hypermethylierung des HS3ST2-Gens wurde auch von Miyamoto *et al.* in einer Vielzahl von primären Mammakarzinomproben sowie in Kolon-, Lungen-, Pankreastumoren festgestellt. Durch eine Demethylierung wurde die Expression

wiederhergestellt [11]. Die Abwesenheit von HS3ST2 bewirkt in Mammakarzinomzellen außerdem eine erhöhte Proliferations- und Invasionsrate. Des Weiteren werden Stammzell-assoziierte Signalwege dadurch beeinflusst und die Tumorzellen schützen sich durch das *silencing* vor Apoptose und einem NK-Zellen-vermittelten Zelltod [237].

2.7.2 Histon-Deacetylasen

Histon-Deacetylasen (HDAC) spielen eine wichtige Rolle in der Transkriptionsregulation, indem sie über den Acetylierungszustand der Histone die Genexpression steuern. Histon-Acetyltransferasen (HAT) und HDAC stehen dabei in einem Gleichgewicht und bestimmen den Acetylierungsstatus von Lysinresten der N-terminalen Regionen der Histonproteine [326, 327]. HDAC katalysieren die Abspaltung von Acetylgruppen von ϵ -N-Acetyl-Lysin-Aminosäuren, wodurch es zur Präsentation einer positiven Ladung des Lysinrestes kommt [327]. Durch ladungsbasierte Wechselwirkungen mit der DNA kommt es zu dann einer Kondensation der Chromatinstruktur, was eine supprimierte Genexpression zur Folge hat [327, 328]. Die Acetylierung der Lysinreste führt hingegen zu einer Abschirmung der Ladung, wodurch eine Relaxation der Chromatinstruktur und eine gesteigerte Transkription erreicht wird [327–330]. HDAC regulieren neben der Histonmodifikation auch den postrationalen Acetylierungsstatus zahlreicher Nicht-Histonproteine, wie z.B. zytoplasmatischer Proteine oder Transkriptionsfaktoren, und beeinflussen so ebenfalls die Gentranskription und weitere zelluläre Prozesse [331, 332]. Insgesamt wurden 18 unterschiedliche HDAC-Isoformen im menschlichen Organismus identifiziert, die entsprechend ihrer Sequenz-Homologie zu *saccharomyces cerevisiae*-Proteinen, ihrer subzellulären Lage, ihrer Gewebsspezifität und ihrer enzymatischen Aktivität in vier Klassen unterteilt werden [327, 331, 333, 334]. Elf HDAC-Isoformen, die Zn^{2+} -Kationen als Kofaktor für ihre Deacetylaseaktivität benötigen, werden den Klassen I, II und IV zugeordnet. Klasse III bilden die Sirtuine (SIRT1-7), die in einer NAD^+ -abhängigen Reaktion die Deacetylierung katalysieren [327, 335–337].

Neben ihren physiologischen Funktionen sind HDAC auch im Kontext neoplastischer Erkrankungen von großer Bedeutung. In zahlreichen Tumorentitäten konnten veränderte Expressionen oder Aktivitäten der HDAC beobachtet werden [331, 337]. Sie regulieren

etliche Proteine, die sowohl an der Tumorgenese als auch an der Progression beteiligt sind. Insbesondere eine HDAC-Überexpression wird mit einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium und einer verschlechterten Prognose assoziiert [338–340].

Auch die Expression HS-modifizierender Enzyme unterliegt der epigenetischen Regulation durch HDAC. So konnte gezeigt werden, dass neben der Hypermethylierung von CpG-Inseln auch der Acetylierungsstatus der Histone die Expression beeinflusst. In Brustkrebszellen konnte beispielsweise eine deregulierte HSGLCE-Expression festgestellt werden, die durch eine veränderte Chromatinstruktur und nicht durch eine DNA-Hypermethylierung verursacht wurde. Während die Behandlung der Zellen mit einem HDAC-Inhibitor (HDACi) zu einer Reexpression der HSGLCE führte, nahm eine DNMT-Inhibition keinen Einfluss auf die Expression [341]. Zellen der Pankreaskarzinomzelllinie PANC-1 verfügen über keine HS3ST3B1-Expression. Die Reexpression kann neben einer DNMT-Inhibition mittels Decitabin auch durch die Behandlung der Zellen mit Trichostatin A – einem potenten Inhibitor der HDAC-Klassen I und II – induziert werden [342].

2.8 Epigenetische Wirkstoffe zur Reexpression HS-modifizierender Enzyme

Mittels geeigneter epigenetisch wirksamer Wirkstoffe soll im Zuge dieser Arbeit eine Reaktivierung der Sulfotransferasen-Expression in Mammakarzinomzellen induziert werden. Dafür werden die in Abbildung 7 abgebildeten Wirkstoffe verwendet, deren jeweiliger Wirkmechanismus im Folgenden erläutert wird.

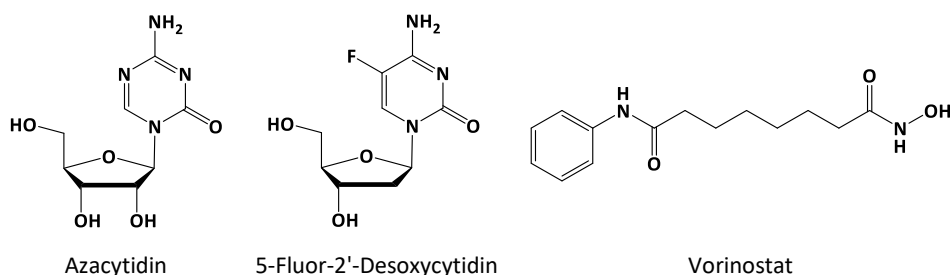


Abbildung 7: Strukturformeln der verwendeten epigenetisch-wirksamen Inhibitoren, deren Einfluss auf die Expression der Heparansulfat Sulfotransferasen untersucht werden soll.

2.8.1 Azacytidin

Azacytidin (5-Azacytidin, Aza) ist ein Pyrimidin-Nukleosid-Analogon und gehört zu der Klasse der DNMT-Inhibitoren (DNMTi) [343]. Es handelt es sich um ein *prodrug*, das intrazellulär zunächst durch die Uridin-Cytidinkinase und Pyrimidinmonophosphatkinase zu 5-Azacytidin-diphosphat phosphoryliert wird. Nach einem weiteren Phosphorylierungsschritt, vermittelt durch Pyrimidindiphosphatkinase, kann 5-Azacytidintriphosphat durch RNA-Polymerasen in RNA-Stränge integriert werden, was zu einer gestörten RNA- und Proteinbiosynthese führt [343–345].

Der hauptsächliche Wirkmechanismus der DNMTi ist jedoch die Inhibition der DNA-Methylierung. Dafür wird 5-Azacytidindiphosphat durch die Ribonucleotidreduktase zu 5-Aza-2'-Desoxycytidindiphosphat katalysiert und durch Nucleosiddiphosphatkinase erneut phosphoryliert. 5-Aza-2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat wird dann als Antimetabolit durch DNA-Polymerasen anstelle von Cytosin in den DNA-Strang integriert. Azacytosin-Guanin-Dinukleotide werden von DNA-Methyltransferasen als Substrat erkannt. Im Zuge der Methylierung kommt es durch einen nukleophilen Angriff zur Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen dem C6-Atom des Cytosinringes und dem Enzym [346–348]. Diese kovalente Bindung kann unter Normalkonditionen durch das C5-Atom des Cytosinringes durch eine β -Elimination gelöst werden [349]. Da der Kohlenstoff an dieser Stelle jedoch durch ein Stickstoffatom ausgetauscht wurde, ist das Enzym irreversibel an die DNA gebunden und verliert dadurch seine enzymatische Aktivität [349–352]. Darüber hinaus führt die Bindung zu einer Induktion eines *DNA damage signaling*, was eine Degradation der gebundenen DNMT zur Folge hat [352]. Durch eine verringerte Methylierungsrate kommt es zur Reaktivierung von Tumorsuppressorgenen. Azacytidin ist zugelassen zur Behandlung von myelodysplastischen Syndromen (MDS), chronischer myelomonozytärer Leukämie (CMML) und akuter myeloischer Leukämie (AML) [353, 354].

2.8.2 5-Fluor-2'-Desoxycytidin

5-Fluor-2'-Desoxycytidin (FdCyd) ist ebenfalls ein Nucleosid-Analogon und verfügt über denselben Wirkmechanismus wie Azacytidin (vergleiche Abschnitt 2.8.1) [355]. *In vivo* wird FdCyd durch das Enzym Cytidindesaminase zu 5-Fluor-2'-Desoxyuridin katalysiert und im weiteren Verlauf bilden sich die zytotoxischen Metaboliten 5-Fluoruracil und 5-Fluoruridin [356, 357]. FdCyd wird daher derzeit in Kombination mit dem Cytidindesaminase-Inhibitor 3,4,5,6-Tetrahydrouridin in einigen präklinischen und klinischen Studien untersucht [358].

2.8.3 Vorinostat

Vorinostat ist ein Hydroxamsäure-basierter Histondeacetylase-Inhibitor, der die HDAC-Isoformen HDAC1, 2, 3 und 6 bereits im nanomolaren Bereich antagonisiert [334, 359, 360]. Vorinostat war der erste HDACi, der für eine Chemotherapie zugelassen wurde, was im Jahr 2006 durch die FDA für die Behandlung von kutanen T-Zell Lymphomen geschah [360, 361].

3 Ziel der Arbeit

Tumorzellen ziehen aus ihrer Interaktion mit Thrombozyten zahlreiche Überlebensvorteile, die insbesondere für eine erfolgreiche hämatogene Metastasierung von besonderer Relevanz sind [8]. Eine hohe intrinsische TF-Expression korreliert dabei mit einem aggressiveren Phänotyp und einer verschlechterten Prognose für den Patienten [124]. TF aktiviert neben anderen (patho-)physiologischen Prozessen die sekundäre Hämostase, die in der Aktivierung von Thrombin endet. Thrombozyten werden dann durch Thrombin aktiviert und schützen die entarteten Zellen vor immunologischen Reaktionen und verhelfen zu einer erfolgreichen Dissemination. Eine Begleiterscheinung des hämatogenen Metastasierungsprozesses ist die Gefahr der Entwicklung thromboembolischer Komplikationen [77].

Neben einer hochregulierten TF-Expression konnte in zahlreichen Tumorzelllinien eine epigenetisch deregulierte Expression HS-modifizierender Enzyme festgestellt werden. Die resultierenden Veränderungen der tumoralen HS-Strukturen nehmen dabei auf eine Reihe zentraler zellulärer Prozesse Einfluss, die an der Entstehung und dem Fortschreiten neoplastischer Erkrankungen beteiligt sind [9, 199]. In vielen Tumorentitäten konnte eine veränderte Expression der Heparansulfat 3-O-Sulfotransferasen (HS3ST) beobachtet werden, die oftmals auf gestörte epigenetische Regulationsmechanismen zurückzuführen ist [9]. Die seltene 3-O-Sulfatierung der HSPG, welche die HS3ST vermitteln, ist für die Ausbildung der AT-Bindungsdomäne essentiell [10]. Eine veränderte HSPG-Biosynthese könnte zu einer veränderten Bindungsaffinität des AT führen und so die Koagulabilität der Tumorzellen beeinflussen.

Zielsetzung dieser Dissertationsarbeit ist die Untersuchung des potentiellen Einflusses einer Reaktivierung der HS-modifizierenden Enzyme auf das hämatogene Metastasierungsgeschehen. Humane Mammakarzinomzellen werden dafür mit epigenetisch wirksamen DNA-Methyltransferase- oder Histondeacetylase-Inhibitoren behandelt und die Expressionsprofile verschiedener 3-O- und 6-O-Sulfotransferasen auf mRNA- und Proteinebene sowie die Bindung von humanem Antithrombin an den Oberflächen der behandelten Zellen untersucht. Der Einfluss der reaktivierten 3-O- bzw. 6-O-Sulfatierung der HS-Ketten auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung wird mittels geeigneter *in vitro*-Testverfahren betrachtet. Eine durch gezielte

epigenetische Behandlungsstrategien reaktivierte Synthese antikoagulativer HS auf den Oberflächen entarteter Zellen könnte sowohl das Risiko thromboembolischer Ereignisse minimieren als auch einzelne disseminierte Zellen an einem erfolgreichen Durchlaufen der hämatogenen Metastasierungskaskade hindern.

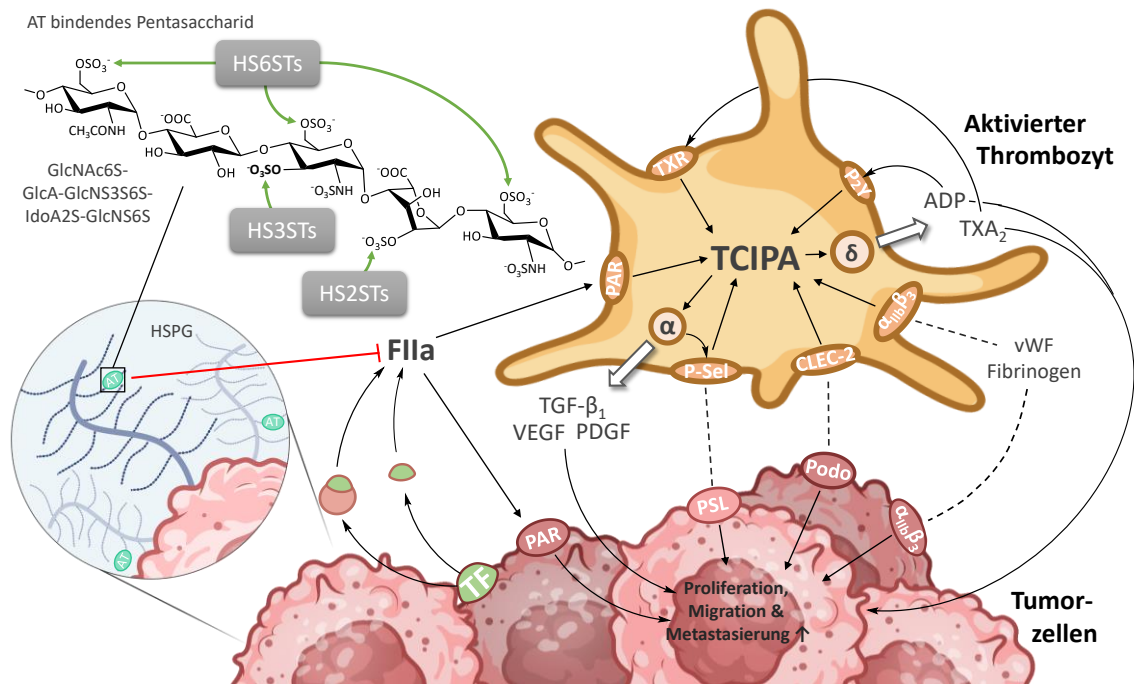


Abbildung 8: Potentieller Einfluss der 2-O-, 3-O- und 6-O-Sulfotransferasen HS2ST, HS3ST und HS6ST auf die Ausbildung des Antithrombin-bindenden Pentasaccharids mittels Modifikation der HSPG innerhalb der tumorale Glykokalyx. Die Inhibition des aktiven Thrombins (FIIa) könnte zu einer Beeinflussung der TCIPA mit Auswirkung auf die Tumorzell-Thrombozyten-Kommunikation und die hämatogene Metastasierung führen. Die Grafik wurde mit BioRender erstellt.

4 Material

4.1 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Absaugsystem BVC 21 NT	Vacuubrand GmbH & Co. KG, Wertheim
Accu-Jet®	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Accu-Jet®pro	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Analysenwaage Kern 770	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Analysenwaage Mettler Toledo Classic Plus AB135-S	Mettler-Toledo GmbH, Giessen
Analysenwaage Sartorius basic BA210S	Sartorius AG, Göttingen
Analysenwaage Sartorius R160P	Sartorius AG, Göttingen
APACT 4004	Haemochrom Diagnostica GmbH, Essen
ASSIST PLUS Basisgerät	INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal
Autoklav Systec V-95	Systec GmbH, Linden
CO ₂ -Brutschrank ICO105med	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
CO ₂ -Inkubator MCO-170 AIC (UV)	Panasonic Healthcare Co., Kadoma, Japan
CO ₂ -Inkubator NuAire™ DH AutoFlow	NuAire Inc., Plymouth, MN, USA
Colibri Microvolume Spectrometer	Berthold Technologies, Bad Wildbad
Einfrierbox Mr. Frosty™ Cryo 1 °C Freezing Container	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Fluoroskan Ascent®	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Guava®easyCyte HT	Merck KGaA, Darmstadt

Konfokales Laser-Scanning Mikroskop Nikon A1R	Nikon GmbH, Düsseldorf
Laborschüttler KS-15	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Laborschüttler New Brunswick™ Excella® E24R	Eppendorf AG, Hamburg
Laminar-Air-Flow-Werkbank Heraeus Herasafe HSP 12	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Laminar-Air-Flow-Werkbank Holten safe 2010	Heto-Holton A/S, Allerød, DK
Lichtmikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Lichtmikroskop Wilovert 30	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
Lichtmikroskop Wilovert Standard HF/K	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
Magnetrührer RCT basics	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen
Mehrfachdispenser HandyStep®electronic	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Mehrfachdispenser HandyStep®S	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Messkolben BLAUBRAND®, Klasse A (50 ml)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Messkolben BLAUBRAND®, Klasse A (10 ml)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Messkolben BLAUBRAND®, Klasse A (100 ml)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Messkolben BLAUBRAND®, Klasse A (1000 ml)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Messkolben BLAUBRAND®, Klasse A (250 ml)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Messkolben BLAUBRAND®, Klasse A (500 ml)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Minishaker MS 2	IKA Works Inc., Wilmington, NC, USA
Multipipette® M4	Eppendorf AG, Hamburg
Multiwell Reader FLUOstar™ OPTIMA	BMG Labtech GmbH, Ortenberg
pH-Meter S20 SevenEasy™ pH	Mettler-Toledo GmbH, Giessen
PHIO Cellwatcher M	PHIO scientific GmbH, München
Pipette (10 µl) Research®	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette (100 µl) Research®	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette (100 µl) Transferpette® S	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Pipette (1000 µl) Research®	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette (200 µl) Transferpette® S-12	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Purelab® Flex Wasseraufbereitungsanlage	ELGA LabWater, Celle
Realtime PCR CFX Opus 96	Bio-Rad Laboratories, München
SPARK® Multimode Microplate Reader	Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Bio-Rad Laboratories, München
Trockenschrank 60 °C	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Ultraschallbad Sonorex® Super RK 103 H	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin
Vakuumpumpe Vacuubrand	Vacuubrand GmbH & Co. KG, Wertheim

Vortex-Genie 2	Scientific Industries, NY, USA
VOYAGER Elektronische Pipette, 8-Kanal, 5 – 125 µl	INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal
Zellzähler CASY® 1 Model TT	Schärfe System GmbH, Reutlingen
Zentrifuge Allegra™ 25R	Beckmann-Coulter GmbH, Krefeld
Zentrifuge Avanti J-25	Beckmann-Coulter GmbH, Krefeld
Zentrifuge Micro 200 R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Zentrifuge Mini Spin	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Universal 32 R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Gerätschaften

4.2 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
µ-Slide 12 Well glass bottom	Ibidi GmbH, Gräfelfing
µ-Slide 4 Well glass bottom	Ibidi GmbH, Gräfelfing
µ-Slide 8 Well glass bottom	Ibidi GmbH, Gräfelfing
125 µl GRIPTIP, unsteril, 5 XYZ Racks für 384 Spitzenbox	INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal
APACT 4004 Küvetten	Haemochrom Diagnostica GmbH, Essen
CASY® cups	Schärfe System GmbH, Reutlingen
CELLSTAR® Röhrchen, 15 ml, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
CELLSTAR® Röhrchen, 50 ml, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

CytoOne® 24-Well-Platte, TC-behandelt, steril	Starlab GmbH, Ahrensburg
CytoOne® 6-Well-Platte, TC-behandelt, steril	Starlab GmbH, Ahrensburg
CytoOne® 96-Well-Platte, TC-behandelt, steril	Starlab GmbH, Ahrensburg
Disposable Reservoirs 10 ml, steril	INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal
Dual Reservoir Adapter	INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal
Einmalspritzen Braun Luer Solo (20 ml)	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Eppendorf Tubes® Safe-Lock Tubes 1,5 ml PCR clear	Eppendorf AG, Hamburg
Isopore™ Membranfilter (0,1 µm)	Millipore GmbH, Schwalbach
Kryogefäße Cryo S®	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Mikroplatte, 96-Well, PS, U-Boden	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Mikroplatte, 96-Well, PS, V-Boden, klar	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Mini-Protean® TGX Stainfree™, Elektrophorese Gel 10 %, 10/12 Wells	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Mini-Protean® TGX Stainfree™, Elektrophorese Gel 12 %, 10/12 Wells	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Mini-Protean® TGX Stainfree™, Elektrophorese Gel 7,5 %, 10/12 Wells	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Multifly®-Kanüle Set 21 G 200 mm Länge	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Nunc™ F96 MicroWell™ Polystyrolplatte, schwarz	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

Nunc™ F96 MicroWell™ Polystyrolplatte, weiß	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Parafilm® M	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Pasteurpipetten, Glas	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Pipettenspitzen (101-1000 µl), blau	Starlab GmbH, Ahrensburg
Pipettenspitzen (1-10 µl), natur	Starlab GmbH, Ahrensburg
Pipettenspitzen (1-200 µl), gelb	Starlab GmbH, Ahrensburg
Pipettenspitzen (5 ml) Plastibrand®, natur	BRAND GmbH & Co. KG; Wertheim
Pipettierreservoirs, PS, 50 ml für Mehrkanalpipetten	Ratiolab GmbH, Dreieich
PVDF-Membran	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Rack für 0,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen	INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal
Rack für 1,5 - 2 ml Mikrozentrifugenröhrchen	INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal
Reagiergefäße (0,6 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Reagiergefäße (1,5 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Reagiergefäße (2,0 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Serologische Pipetten (10 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Serologische Pipetten (25 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
S-Monovette® 8,2 ml 9N	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
TC-Platte 6 Well, Standard	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
TC-Platte 96-Well, Standard	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Vernichtungsbeutel	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
VWR Blotting Pad	VWR International GmbH, Darmstadt
Zellkulturflaschen, 250 ml, 75 cm ² , PS	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturflaschen, 50 ml, 25 cm ² , PS	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturflaschen, 550 ml, 175 cm ² , PS	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien

4.3 Chemikalien und Reagenzien

4.3.1 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Antithrombin III aus Humanplasma	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Bacillol® AF	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Bovines Serum-Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Calciumchlorid-Dihydrat	AppliChem GmbH, Darmstadt
CASY®ton	Schärfe Systems GmbH, Reutlingen
Cell Extraction Buffer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Clarity Western™ Luminol	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Clarity Western™ Peroxidlösung	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Direct-zol™ RNA Miniprep	Zymo Research Europe GmbH, Freiburg
Dithiothreitol (DTT)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
D-Luciferin	Cayman Chemical, MI, USA
DMEM Nährmedium	Gibco™ Life Technologies Ltd., Paisley, UK
DMEM Nährmedium	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
DNase/RNase-freies Wasser	Zymo Research, Irvine, CA, USA
DPBS ohne Calcium und Magnesium, steril	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
EDTA Lösung 50 mM	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
EDTA-Lösung, 0,02 % in PBS [m/V]	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ethanol absolut ≥99.	VWR International GmbH, Darmstadt
FACS clean	BD Biosciences, Heidelberg
FACS flow	BD Biosciences, Heidelberg
FACS rinse	BD Biosciences, Heidelberg
FBS Good (fetal bovine serum, 0,2 µm sterilfiltriert)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Gigasept® Instru AF	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt
Glucose	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt

Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (100x)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
HEPES	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Isopropanol 100 %	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kohlenstoffdioxid	AIR LIQUIDE Deutschland GmbH, Düsseldorf
Laemmli-Puffer (2x)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
L-Glutamin-Lösung [200 mM]	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Luciferase, firefly recombinant	Cayman Chemical, MI, USA
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
MycoplasmaOff	Minerva Biolabs GmbH, Berlin
Natriumazid	Janssen GmbH, Neuss
Natriumchlorid	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Grüssing GmbH, Filsum

Natriumpyruvat [100 mM]	Gibco™ Life Technologies Ltd., Paisley, UK
Natronlauge [1 M]	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Penicillin-Streptomycin-Lösung [10.000 I.E./ml, 10 mg/ml]	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Power SYBR® Green RNA-to-C _T ™ 1-Step Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Precision Plus Protein™ Unstained Standards	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Precision Protein™ StrepTactin-HRP Konjugat	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Reaktions Puffer ATP-Assay (20x)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
RPMI-1640® Nährmedium	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Salzsäure [1 M]	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Schwefelsäure 96 %	Merck KGaA, Darmstadt
Sterillium®	Bode Chemie GmbH, Hamburg
Stickstoff	Linde AG, Düsseldorf
Technothrombin® TGA CAL Set	Technoclone GmbH, Wien, Österreich
Technothrombin® TGA RC high	Technoclone GmbH, Wien, Österreich

Technothrombin® TGA Substrat	Technoclone GmbH, Wien, Österreich
TRAP-6	Tocris Bioscience, Bristol, GB
TRIS-Base	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tween®20	AppliChem GmbH, Darmstadt

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Chemikalien

4.3.2 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung	
Antithrombin-Stammlösung [150 mg/ml]	Antithrombin aus Humanplasma Aqua millipore	1,5 mg 10,0 ml
ATP-Assay-Lösung	Reaction Buffer (20x) Dithiothreitol [0,1 mM] D-Luciferin [10 mM] Luciferase, firefly [5 mg/ml] Aqua Millipore	0,5 ml 0,1 ml 0,5 ml 2,5 µl ad 10,0 ml
Blockierungspuffer (Durchflussszytometrie)	BSA DPBS	300,0 mg 10,0 ml
Blockierungspuffer (CLSM)	Milchpulver Glycin DPBS	1,0 g 30,0 mg 20,0 ml
Blockierungspuffer (Western Blot)	Milchpulver TBS-T	0,5 g 10,0 ml
BSA-Lösung 0,5 %	BSA DPBS	250,0 mg 50,0 ml
Calciumchloridlösung [0,5 M]	Calciumchlorid-Dihydrat Aqua millipore	1,47 g 10,0 ml

4 MATERIAL

Elektrophoresepuffer (10x)	Glycin	72,0 g
	TRIS-Base	15,0 g
	SDS	5,0 g
	Aqua Millipore	500,0 ml
Elektrophoresepuffer (1x)	Elektrodenpuffer (10x)	100,0 ml
	Aqua Millipore	ad 1000,0ml
Fixierungslösung (Durchflusszytometrie)	Saponin	100,0 mg
	Tween 20	50,0 µl
	Paraformaldehydlösung (3 % m/V)	ad 10,0 ml
Fixierungslösung (CLSM)	Paraformaldehyd	4,0 ml
	Aqua millipore	ad 100,0 ml
Kryomedium	FKS	45,0 ml
	DMSO	5,0 ml
Luminol-Peroxid-Lösung	Clarity Western™ Peroxidlösung	4,0 ml
	Clarity Western™ Luminollösung	4,0 ml
Lysepuffer	PMSF-Stammlösung [0,3 M]	3,4 µl
	Halt™ Protease Inhibitor Cocktail	10,0 µl
	Cell Extraction Buffer	ad 1,0 ml
MTT-Lösung [5 g/l]	MTT	50,0 mg
	DPBS	ad 10,0 ml
Nährmedium MCF-7	FBS Good	50,0 ml
	Penicillin / Streptomycinlösung [10.000 I.E./ml, 10 mg/ml]	5,0 ml
	L-Glutaminlösung [200 mmol/ml]	5,0 ml
	DMEM Nährmedium	500,0 ml
Nährmedium MDA-MB-231	FBS Good	50,0 ml
	Penicillin / Streptomycinlösung [10.000 I.E./ml, 10 mg/ml]	5,0 ml
	L-Glutaminlösung [200 mM]	5,0 ml
	Pyruvatlösung	5,0 ml
	DMEM Nährmedium	500,0 ml

4 MATERIAL

Plättchenarmer Puffer (PPP) 10x	HEPES	2,383 g
	Natriumchlorid	7,989 g
	Kaliumchlorid	0,194 g
	Magnesiumchlorid	0,095 g
	Natriumhydrogencarbonat	1,159 g
	Natriumhydrogenphosphat x H ₂ O	0,050 g
	D-Glucose	0,991 g
	Aqua millipore	100,0 ml
Plättchenarmer Puffer (PPP) 1x	PPP 10x	5,0 ml
	Aqua millipore	ad 50,0 ml
PMSF-Stammlösung [0,3 M]	PMSF	250,0 mg
	DMSO	4,783 ml
Proteinstandard-Stammlösung [0,2 g/l]	BSA	2,0 mg
	Aqua millipore	10,0 ml
TBS Puffer (10x)	Natriumchlorid	40,0 g
	TRIS-Base	6,06 g
	Aqua millipore	500,0 ml
	Salzsäure [1 M] pH=7,3	
TBS Puffer (1x)	TBS Puffer (10x)	100,0 ml
	Aqua millipore	ad 1,0 l
TBS-T Puffer	TBS Puffer (10x)	100,0 ml
	Tween 20	2,0 ml
	Aqua Millipore	ad 1,0 l
Transferpuffer (10x)	Glycin	72,0 g
	TRIS-Base	15,0 g
	Aqua millipore	500,0 ml
Transferpuffer (1x)	Transferpuffer (10x)	100,0 ml
	Aqua millipore	ad 1,0 l
TRAP-6-Stammlösung [3,3 mM]	TRAP-6	5,0 mg
	Aqua Millipore	2,0 ml

Waschpuffer	BSA	250,0 mg
(Druchflusszytometrie)	Natriumazid	50,0 mg
	DPBS	50,0 ml

Tabelle 4: Auflistung der hergestellten Puffer und Lösungen

4.3.3 Primäre Antikörper

Bezeichnung	Epitop	Eigenschaften	Hersteller
Anti-VSV GP (V5507)	VSV-Glykoprotein	Maus, monoklonal, IgG	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
ATIII (H-7) (sc-271987)	Antithrombin III (AT)	Maus, monoklonal, IgG, AF647	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
GAPDH (GT239)	GAPDH	Maus, monoklonal, IgG	Affinity Biosciences, OH, USA
HS3ST1 (AF5968)	HS3ST1	Schaf, polyklonal, IgG	R&D Systems Inc., MN, USA
HS3ST2 (PA5-26522)	HS3ST2	Kaninchen, polyklonal, IgG	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
HS3ST2 (G-6) (sc-514361)	HS3ST2	Maus, monoklonal, IgG	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
HS3ST3 (AF7276)	HS3ST3	Schaf, polyklonal, IgG	R&D Systems Inc., MN, USA

HS3ST4 (MAB60851)	HS3ST4	Maus, monoklonal, IgG	R&D Systems Inc., MN, USA
HS3ST5 (HPA021823)	HS3ST5	Kaninchen, polyklonal	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
HS4C3 (p5365)	3-O-Sulfatierungen von HSPG	Bakteriophagen	Dr. T. van Kuppevelt, Radboud Uni. Nijmegen
HS6ST1 (AF5057)	HS6ST1	Schaf, polyklonal, IgG	R&D Systems Inc., MN, USA
HS6ST2 (AF2710)	HS6ST2	Ziege, polyklonal, IgG	R&D Systems Inc., MN, USA
HTF-1 (16-1429-82)	Tissue Factor (TF)	Maus, monoklonal, IgG	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten primären Antikörper

4.3.4 Sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Konjugat	Eigenschaften	Hersteller
Donkey Anti-Mouse (sc-2785)	TR	Esel, polyklonal, IgG	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Donkey Anti-Rabbit (sc-2090)	FITC	Esel, polyklonal, IgG	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg

Donkey Anti-Sheep (sc-2473)	HRP	Esel, IgG	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Goat Anti-Mouse (BD554001)	FITC	Ziege, polyklonal, IgG/IgM	BD Biosciences, Heidelberg
Goat Anti-Rabbit (HAF008)	HRP	Ziege, polyklonal, IgG	R&D Systems Inc., MN, USA
mIgGk BP (sc-516102)	HRP	Leichtketten- bindendes Protein	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Mouse Anti-Goat (sc-2354)	HRP	Maus, monoklonal, IgG	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten sekundären Antikörper

4.3.5 Primer

Zielgen	Hersteller
GAPDH (VHPS-3541)	Biomol GmbH, Hamburg
HS3ST1 (VHPS-4288)	Biomol GmbH, Hamburg
HS3ST3A1 (VHPS-4290)	Biomol GmbH, Hamburg
HS3ST3B1 (VHPS-4291)	Biomol GmbH, Hamburg
HS3ST4 (VHPS-4292)	Biomol GmbH, Hamburg
HS3ST5 (HP218169)	OriGene Technologies Inc, Rockville, MD, USA
HS6ST1 (HP208069)	OriGene Technologies Inc, Rockville, MD, USA
HS6ST2 (VHPS-4293)	Biomol GmbH, Hamburg

SULF2 (HP213232)	OriGene Technologies Inc, Rockville, MD, USA
TF (VHPS-3105)	Biomol GmbH, Hamburg
β -Actin (VHPS-110)	Biomol GmbH, Hamburg

Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Primer

4.3.6 Inhibitoren

Bezeichnung	Target	Hersteller
5-Azacytidin	DNMT	MedChemExpress, NJ, USA
5-Fluor-2'-Desoxycytidin	DNMT	MedChemExpress, NJ, USA
Corn Trypsin Inhibitor (CTI)	Trypsin und Faktor XIIa	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Vorinostat	HDAC	MedChemExpress, NJ, USA

Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Inhibitoren

4.4 Software

Bezeichnung/Version	Urheber
APACT LPC-Software 1.21c	LABiTec GmbH, Ahrensburg
Bio-Rad CFX Maestro 2.3	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
BioRender® Premium Account	Biorender 2022, Toronto, Canada
ChemDraw Professional 18.1.2.18	PerkinElmer Informatics, MA, USA
Citavi 6.18	Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, Schweiz
FlowJo™ 10.5.3	BD Life Sciences, NJ, USA
GraphPad Prism 8.0.1	GraphPad Software

GuavaSoft InCyte™ 3.3	Merck KGaA, Darmstadt
Image Lab™ 6.0.1	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
ImageJ v1.54h	National Institutes of Health, MD, USA
LibreOffice 6.2.5.2	LibreOffice
Microsoft® Office 2016 für Windows	Microsoft Corporation, WA, USA
NIS-Elements Advanced Research	Nikon Instruments Inc., Kawasaki, Japan
NIS-Elements Viewer 5.21	Nikon Instruments Inc., Kawasaki, Japan
Optima 2.20R2	BMG Labtech GmbH, Offenburg
VIALAB	INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal

Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Software

5 Methoden

5.1 Zellkultivierung

Die verwendeten Tumorzelllinien sollen stets unter aseptischen Bedingungen behandelt und kultiviert werden. Sämtliche Arbeitsschritte finden daher an einer vorher desinfizierten *laminar air flow*-Werkbank (LAF) statt, um so Kontaminationen mit Pilzen oder Bakterien vorzubeugen. Die LAF wird in regelmäßigen Abständen mit Isopropanol 70 % (V/V) oder unter Zuhilfenahme einer UV-Lampe desinfiziert. Die benötigten Verbrauchsmaterialien werden vor Beginn der Versuche für 20 min bei 120 °C autoklaviert oder – sofern die Beschaffenheit der Materialien eine Autoklavierung nicht zulassen sollte – mit Isopropanol 70 % (V/V) eingesprüht und abgewischt. Um einer Mykoplasmen-Infektion vorzubeugen, wird die LAF außerdem vor und nach jeder Benutzung mit MycoplasmaOff® behandelt. Um Zellkulturkontaminationen auszuschließen wird in regelmäßigen Abständen mittels PCR-Tests auf etwaige Infektionen getestet.

Die Lagerung der Zellen findet in einem Inkubator bei einer Temperatur von 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5 % statt. Die für die jeweiligen Zelllinien individuell hergestellten Zellkulturmedien werden für eine verlängerte Haltbarkeit bei 2 – 8 °C aufbewahrt und erst unmittelbar vor Benutzung auf 37 °C temperiert. Anhand der Zellmedien und dem darin enthaltenen Farbindikator Phenolrot kann nachvollzogen werden, wann ein Wechsel des Mediums erforderlich ist. Wenn die sauren Stoffwechselprodukte der Zellen den pH-abhängigen Farbumschlag von rot nach gelb bewirken, wird das alte Medium abgesaugt, die Zellen mit DPBS gewaschen und neues Zellkulturmedium hinzugegeben.

5.2 Kryokonservierung und Revitalisierung

Für eine Langzeitaufbewahrung werden die Tumorzellen in einem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Tank bei -196 °C oder einem Gefrierschrank bei -150 °C kryokonserviert. Etwa 2×10^6 Tumorzellen werden dafür in einem Kryomedium – bestehend aus neun Teilen FKS und einem Teil DMSO – resuspendiert und zu je einem Milliliter in Kryogefäße aliquotiert. Das zugesetzte DMSO dient dabei als Kryoprotektivum, da andernfalls durch die Ausbildung scharfkantiger Eiskristalle die Zellmembranen perforiert werden könnten. Die

Kryokonservate werden in einem mit reinem Isopropanol gefüllten Mr. Frosty™ Gefrierbehälter bei -80 °C zwischengelagert, um so ein zu schnelles Absinken der Temperatur zu verhindern.

Für die Revitalisierung der Tumorzellen werden die Kryokonservate durch Zugabe eines Milliliters warmen Mediums aufgetaut. Die Suspension wird in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 450 g und 4 °C für 4 min zentrifugiert. Der DMSO-haltige Überstand wird verworfen, das Zellpellet in einem ml Medium resuspendiert und in eine T25- oder T75-Zellkulturflasche überführt. Die Dauer der jeweiligen Arbeitsschritte wird so gering wie möglich gehalten, um so etwaige zytotoxische Effekte des DMSO zu minimieren.

5.3 Subkultivierung der Tumorzellen

Die Kultivierung der Zellen findet in sterilen Zellkulturflaschen statt, in denen ein Adhären der Tumorzellen mittels einer physikalischen Oberflächenveränderung des Flaschenbodens gewährleistet ist. Spätestens wenn die Zellkulturen einen konfluenten *monolayer* ausgebildet haben, müssen die Zellen abgelöst und passagiert werden. Verbrauchtes Medium wird mittels einer Vakuumpumpe abgesaugt und der Zellrasen vorsichtig mit DPBS gewaschen, um so abgestorbene Zellen und Reste des Mediums sowie die darin enthaltenen Calcium-Ionen zu entfernen. Anschließend wird der Zellrasen mit einer sterilen EDTA-Lösung benetzt und bei 37 °C und 5 % CO₂ für etwa 10 min inkubiert. Durch eine lichtmikroskopische Kontrolle wird überprüft, ob sämtliche Zellen von der Oberfläche losgelöst sind. Sollte dies nicht der Fall sein, können die Zellen zusätzlich mechanisch mittels leichten Klopfens oder der Zuhilfenahme eines Zellschabers von der Oberfläche abgelöst werden. Der Flaschenboden wird dann unter der LAF mehrfach mit DPBS abgespült, die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 4 min bei 450 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in einem definierten Volumen DPBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird eine Zellzahlbestimmung entsprechend Abschnitt 5.4 durchgeführt. Abschließend wird ein adäquater Volumenanteil der Zellsuspension in eine neue Zellkulturflasche gegeben und im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt gelagert oder für etwaige anstehende Versuche weiterverwendet.

5.3.1 MCF-7 Mammakarzinomzellen

Die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 wurde 1973 durch die *Michigan Cancer Foundation* etabliert. Die Zellprobe wurde 1970 aus einer Metastase in der Pleurahöhle einer 69-jährigen Frau mit kaukasischer Herkunft, die an einem Adenokarzinom der Brust litt, isoliert und anschließend immortalisiert [362]. Die Tumorzellen sind Östrogenrezeptor und Progesteronrezeptor-positiv und gehören zum molekularen Subtyp Luminal A [363, 364]. Die Amplifikation des *human epidermal growth factor receptor 2* (HER2) fehlt. MCF-7 ist eine wenig aggressive und nicht-invasive Zelllinie, deren Metastasierungspotential eher gering ausfällt [364, 365]. Eine endokrine anti-östrogene Therapie bietet aufgrund der stark östrogenabhängigen Proliferation der MCF-7-Tumorzellen eine vielversprechende Therapiegrundlage [366]. Für die Kultivierung der adhärent wachsenden Zelllinie wird DMEM®-Nährmedium verwendet, das mit 10 % [V/V] FKS, 1 % [V/V] L-Glutamin und 1 % [V/V] Penicillin/Streptomycin supplementiert wird.

5.3.2 MDA-MB-231 Mammakarzinomzellen

Die Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 wurde 1973 durch das *M.D. Anderson Hospital and Cancer Institute* aus einer Brustgewebeprobe einer 51-jährigen, kaukasischen Patientin etabliert, die an einem metastatischen Mamma-Adenokarzinom litt [367, 368]. MDA-MB-231-Zellen weisen keine Expression des Östrogen- und des Progesteron- Rezeptors auf. Zudem fehlt die Amplifikation des HER2 [366]. Es handelt sich daher um eine triple-negative Mammakarzinomzelllinie, die hoch aggressiv, invasiv und schlecht differenziert ist [366, 369]. Die Zellen haben einen fibroblastoiden Phänotyp und bilden wenig Zell-Zell-Kontakte aus. Ein weiteres Charakteristikum der Zellen ist eine hohe intrinsische TF-Expression [370]. Für die Kultivierung der adhärent wachsenden Zelllinie wird DMEM®-Nährmedium verwendet, das mit 10 % [V/V] FKS, 1 % [V/V] L-Glutamin und 1 % [V/V] Penicillin/Streptomycin supplementiert wird.

5.4 Zellzahlbestimmung

Vor Versuchsreihen, in denen eine standardisierte und exakte Zellkonzentration von Nöten ist, wird eine Zellzahlbestimmung mittels eines CASY®1 Modell TT Cell Counters durchgeführt. Das Messprinzip des verwendeten Geräts basiert auf dem Grundsatz der *electrical current exclusion* und gibt Auskunft über Zellzahl und -viabilität [371].

Um die Zellanzahl zu ermitteln, werden die Tumorzellen entsprechend Abschnitt 5.3 vorbereitet und in einem definierten Volumen DPBS resuspendiert. 20 µl dieser Suspension werden in 10 ml einer sterilfiltrierten CASY®ton-Elektrolytlösung verdünnt und gründlich durch vorsichtiges Invertieren durchmischt. Die Lösung wird dann durch einen Unterdruck durch eine Kapillare mit einem Durchmesser von 150 µm geleitet. An zwei Platinelektroden am Ende der Kapillare wird ein Stromfluss angelegt und der resultierende Widerstand gemessen. Bei konstantem Fluss der reinen CASY®ton-Elektrolytlösung verhalten sich Stromfluss und Widerstand konstant. Durchströmt hingegen eine Tumorzelle die Kapillare, so verdrängt das Eigenvolumen der Zelle einen äquivalenten Teil der Elektrolytlösung. Eine intakte Zelle wirkt aufgrund ihrer Phospholipidmembran wie ein partieller Isolator, was bei Passieren der Elektroden zu einem kurzzeitigen Anstieg des Widerstandes und damit verbunden zu einer messbaren Spannungsschwankung führt. Das Ausmaß dieser Schwankungen wird durch Anzahl und Größe der vorbeiströmenden Zellen beeinflusst. Passiert eine abgestorbene Zelle mit defekter Zellmembran die Elektroden, so nimmt nur der Zellkern noch Einfluss auf den Widerstand. Somit können tote Zellen von lebenden differenziert werden und neben der Konzentration auch Aussagen über die Viabilität einer Zellkultur getroffen werden [371].

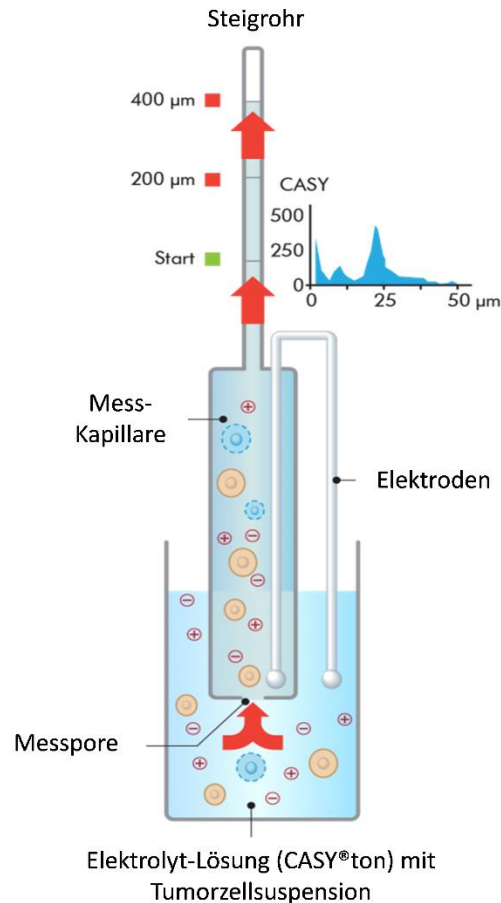


Abbildung 9: Aufbau des CASY®1 Modell TT Cell Counters [371]

5.5 MTT-Assay

Der MTT-Assay ist ein etabliertes kolorimetrisches Verfahren, das für Zytotoxizitätsbestimmungen von Substanzen und Inhibitoren genutzt wird [372]. Im Zuge dieser Arbeit sollen diejenigen Konzentrationen der verwendeten Inhibitoren ermittelt werden, die in einem subtoxischen Bereich liegen. Das Prinzip der Messung beruht auf der Umsetzung von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT), einem gelben Tetrazoliumsalz, das in stoffwechselaktiven Zellen durch mitochondriale Reduktasen in violettes wasserunlösliches Formazan reduziert wird (siehe Abbildung 10). Die entstehenden Formazankristalle werden abschließend in DMSO gelöst und können dann photometrisch vermessen werden. Die gemessene Absorption ist dabei direkt proportional zu der Viabilität der behandelten Zellen [372].

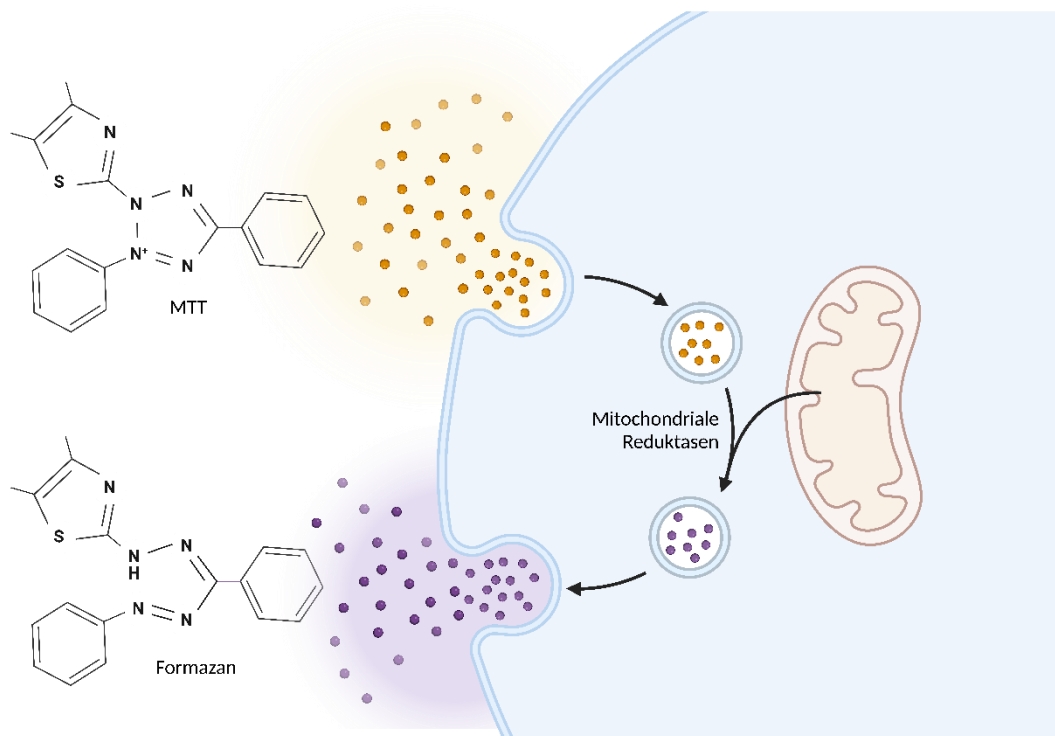


Abbildung 10: Schematische Darstellung der enzymatischen Reduktion von MTT hin zu violettem Formazan durch mitochondriale Reduktasen [372]. Die Grafik wurde mit BioRender erstellt.

Für die Durchführung des Versuches werden in durchsichtigen 96 Well Platten Tumorzellen ausgesät und für 24 h bei 37 °C und einer CO₂-Konzentration von 5 % kultiviert. Die ausgesäte Zellzahl hängt dabei von der jeweiligen Zelllinie ab (MDA-MB-231: 5.000 Zellen/Kavität; MCF-7: 2.000 Zellen/Kavität). Anschließend werden die Zellen für 72 h mit einer halblogarithmischen Verdünnungsreihe [10⁻⁹ - 10^{-4,5} mol/l] der Inhibitoren inkubiert, was die spätere Bestimmung des EC₅₀-Wertes der jeweiligen Substanzen ermöglicht. Zusätzlich werden Zellen mit DPBS als Negativ- und DMSO als zytotoxische Positivkontrolle beimpft. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Zellen für 90 min mit 20 µl einer MTT-Lösung [5 g/l] beimpft. Die Formazankristalle adhären am Boden der Wells und überschüssiges Lösungsmittel kann entfernt werden. Die Kristalle werden dann in reinem DMSO gelöst und die Absorption bei den Wellenlängen 570 nm und 690 nm in einem Multiwellreader Multiskan EX® gemessen. Während 570 nm den eigentlichen Messbereich des chromogenen Produkts darstellt, wird bei 690 nm das Hintergrundrauschen erfasst [372].

5.6 Quantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion

Die quantitative *real-time* Polymerase Kettenreaktion (qPCR) wird genutzt, um die Auswirkung verschiedener DNMT- und HDAC-Inhibitoren auf die mRNA-Expressionen von Zielgenen zu untersuchen, die durch eine veränderte Expression Einfluss auf den Sulfatierungsstatus der HSPGs entarteter Zellen nehmen. Die qPCR basiert auf der Vervielfältigung von Nukleinsäuren und kann für eine relative Quantifizierung der Expression von mRNA (*messenger* Ribonukleinsäure) genutzt werden [373].

Dafür muss die mRNA zunächst aus den behandelten Tumorzellproben extrahiert werden. Für die Isolation und Aufreinigung der mRNA aus Zellproben wird das Direct-zol™ RNA Miniprep-Kit der Firma Zymo Research Europe GmbH verwendet [374]. Die Zellen werden zunächst entsprechend Abschnitt 5.3. kultiviert und für einen definierten Zeitraum mit den jeweiligen Inhibitoren inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird der Zellrasen mittels EDTA gelöst und mit DPBS gewaschen. Nachdem der DPBS-Überstand mittels Zentrifugation abgetrennt wurde, wird die mRNA entsprechend der Herstelleranweisung aus den Zellpellets extrahiert [374].

Mit Hilfe eines Colibri Microvolumen Spektrophotometers werden dann die Konzentrationen der Proben bestimmt. Dafür werden Absorptionsmaxima der Proben bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm gemessen. Anhand des Quotienten der beiden Absorptionsmaxima können Rückschlüsse auf die Reinheit der mRNA-Proben geschlossen werden. $A_{260/280}$ sollte den Wert von 1,9 bis 2,1 nicht unter- bzw. überschreiten. Werte, die außerhalb dieser Spanne liegen, weisen auf eine Verunreinigung mit Proteinen hin.

Die qPCR-Messung erfolgt an einem CFX Opus 96 Real-Time PCR System der Firma Bio-Rad Laboratories. Im ersten Schritt der durchgeführten *one-step* qPCR werden je 25 ng der isolierten mRNA durch das Enzym Reverse Transkriptase in cDNA (*complementary* Desoxyribonukleinsäure) transkribiert. Diese doppelsträngige cDNA wird dann im weiteren Verlauf durch eine DNA-Polymerase vervielfältigt. SYBR Green – ein interkalierender Fluoreszenzfarbstoff – kann sich in den neugebildeten DNA-Strängen einlagern. Durch Interkalation des SYBR Greens wird die Fluoreszenzintensität des Fluorophors um den Faktor 1000 erhöht und kann bei einer Wellenlänge von 521 nm detektiert werden. Das daraus resultierende Fluoreszenzsignal und die Menge der

gebildeten cDNA sind direkt proportional zueinander, wodurch Rückschlüsse auf die Ausgangsmenge der mRNA geschlossen werden können [373].

Die Amplifikation der Stränge erfolgt zyklusweise und die Vermehrung der cDNA-Stränge geschieht exponentiell, woraus sich eine Amplifikationskurve mit einem sigmoidalen Kurvenverlauf ableitet. Anhand der Anzahl der Zyklen, die benötigt werden, um das Fluoreszenzsignal über einen vordefinierten Schwellenwert zu heben und ab denen das exponentielle Kurvenwachstum beginnt, wird der sogenannte *threshold cycle*-Wert (C_T -Wert, auch *quantification cycle*) ermittelt. Je weniger mRNA zu Beginn vorliegt, desto mehr Zyklen werden benötigt, um den Schwellenwert zu überschreiten. Hohe Expressionen zeichnen sich also folglich durch einen niedrigen C_T -Wert aus [373].

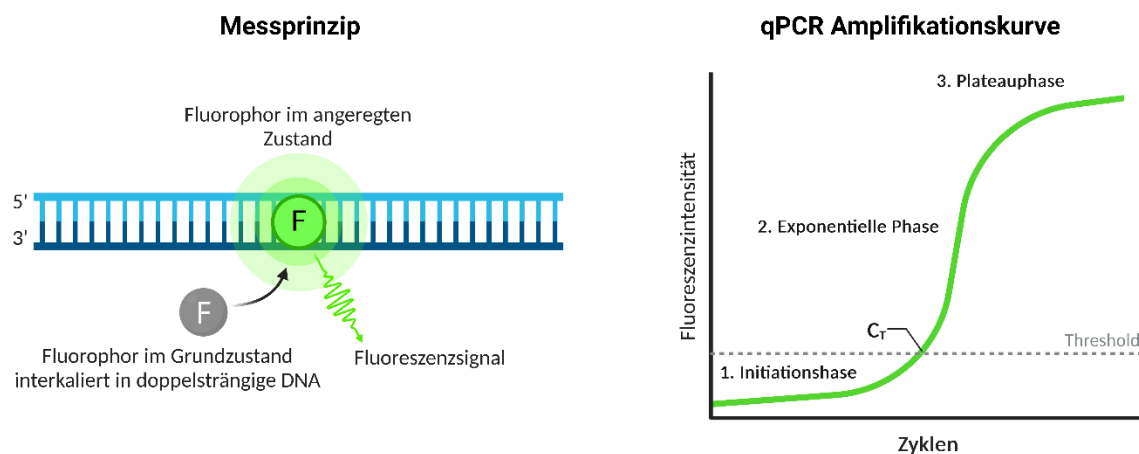


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Messprinzips (links) der qPCR und die daraus resultierende Amplifikationskurve (rechts). Die Grafik wurde mit BioRender erstellt.

Die Proben werden in insgesamt 50 Vermehrungszyklen untersucht, von denen jeder Zyklus in drei Phasen unterteilt werden kann (siehe Abbildung 12). In der ersten Phase wird sämtliche DNA bei 95 °C denaturiert. Der Doppelstrang wird dabei in zwei einzelsträngige DNA-Matrizen aufgebrochen und bereits gebundene SYBR Green Moleküle freigegeben. In der zweiten Phase, dem Primer-*annealing*, kommt es zu einer Primerhybridisierung und *forward* und *reverse primer* lagern sich an die jeweiligen Einzelstränge an. Ausgehend von den angelagerten Primern werden in der dritten und letzten Phase durch die DNA-Polymerase neue komplementäre DNA-Sequenzen synthetisiert, in denen SYBR Green dann erneut interkalieren kann. Dieser Schritt wird als

Elongation bezeichnet und erfolgt genau wie das Primer-*annealing* bei einer Temperatur von 60 °C. In einem Temperaturzyklus wird jeder DNA-Strang verdoppelt, was letztlich zu der bereits erwähnten exponentiellen Vermehrung der DNA-Stränge führt [373].

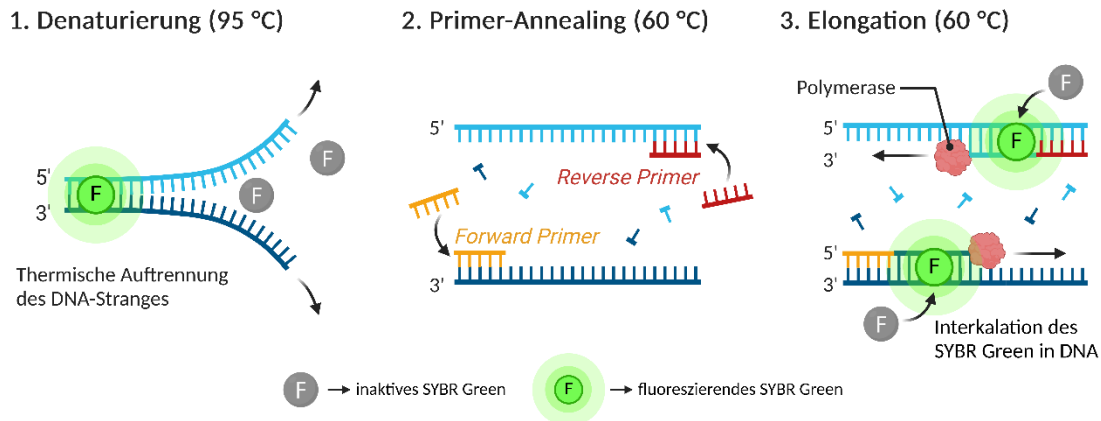


Abbildung 12: Schematische Darstellung der jeweiligen Teilschritte eines Vermehrungszyklus während der qPCR. Die Grafik wurde mit BioRender erstellt.

Die Reinheit des entstehenden Produktes wird simultan durch eine Schmelzpunktanalyse untersucht. Handelt es sich um ein reines Produkt, so erscheint in der Schmelzkurve lediglich ein klar abgegrenzter Peak bei einer definierten Temperatur. Sofern es zu Verunreinigungen oder der Bildung von Primer-Dimeren gekommen ist, zeichnen sich in der Schmelzkurve mehrere Peaks bei unterschiedlichen Temperaturen ab. Die Schmelztemperatur der gebildeten DNA-Sequenzen hängt dabei von dem Adenin-Thymin- und dem Guanin-Cytosin-Verhältnis ab. Des Weiteren werden Negativkontrollen vermessen, in denen abgesehen von den biologischen Proben alle Reagenzien enthalten sind. So soll sichergestellt werden, ob die Reagenzien eventuelle biologische Verunreinigungen enthalten. Das entsprechende Temperaturprogramm wird in Abbildung 13 dargestellt.

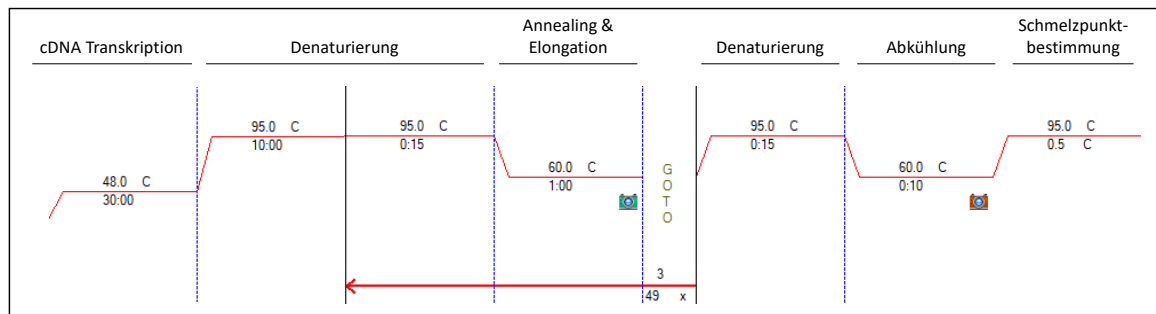


Abbildung 13: qPCR-Temperaturprogramm mit Unterteilung der drei Phasen Denaturierung, Annealing und Elongation der cDNA mit den entsprechenden Inkubationstemperaturen und -zeiten. Messpunkte sind mittels eines Kamerapiktogramms gekennzeichnet. Jede qPCR-Messung beginnt mit einer 30-minütigen Inkubationszeit bei einer Temperatur von 48 °C, bei der mRNA durch das Enzym Reverse Transkriptase in cDNA transkribiert wird, und endet mit einer Schmelzpunktbestimmung. Für diese wird ein Temperaturgradient (60 – 90 °C) mit 0,5 °C-Intervallen vermessen.

Neben den Zielgenen werden außerdem die beiden *housekeeping* Gene GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) und β -Actin vermessen, die in allen Zellen ubiquitär exprimiert werden und zur Normalisierung der gemessenen Expressionen herangezogen werden. Die relative Quantifizierung der Genexpressionen erfolgt mittels $\Delta\Delta C_T$ -Methode mit Hilfe der Software Bio-Rad CFX Maestro 2.3 [373].

5.7 Durchflusszytometrie

Die Quantifizierung der Proteinexpression einer Zellpopulation kann mittels der mikrokapillaren Durchflusszytometrie erfolgen. Es handelt sich um ein hochsensitives Verfahren, bei dem einzelne Zellen oder Partikel an mehreren Lasern vorbeiströmen und die daraus resultierende Lichtstreuung und diverse Fluoreszenzparameter gemessen werden [375].

Die Tumorzellen sollten möglichst als einzelne Zellen an den jeweiligen monochromatischen Lasern vorbeiströmen. Um eine solche Separation der Zellen zu bewerkstelligen, können verschiedene Verfahren genutzt werden. Bei der hydrodynamischen Fokussierung, die das gängigere Verfahren darstellt, wird die Probelösung mit einer Mantelflüssigkeit umspült und so einzelne Zellen mitgerissen (siehe Abbildung 14). Im CytoFLEX Durchflusszytometer der Firma Beckmann-Coulter GmbH, das für die Untersuchung der Antithrombin-Bindung an der Oberfläche vorbehandelter Tumorzellen genutzt wurde, wird ebendiese hydrodynamische Fokussierung für die Separation der Zellen genutzt [375, 376].

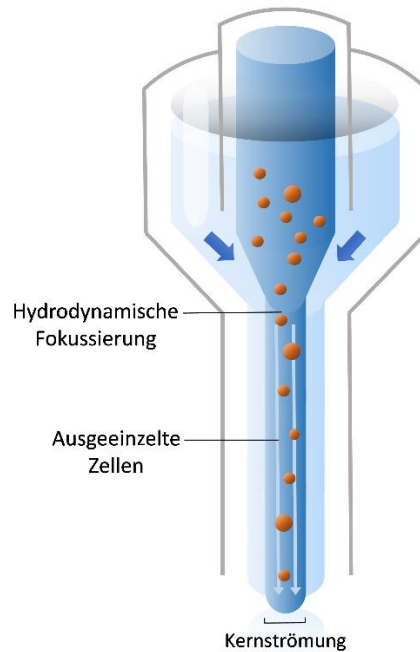


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Separation der Zellen durch Umspülung der Probelösung mit Mantelflüssigkeit [376].

Für die Quantifizierung von TF wird ein Guava® easyCyte HT Flow Zytometer verwendet. Hier werden die Zellen durch eine Mikrokapillare mit sehr hoher Geschwindigkeit angesaugt, was ebenfalls zu einer Separation der Zellen aus der Suspension führt [377].

Die zu untersuchenden Zellen werden dann mit einem Laser mit einer definierten Wellenlänge von 488 nm bzw. 633 nm bestrahlt. Am Interrogationspunkt entsteht so eine Lichtstreuung, die aus zwei Richtungen gemessen werden kann und Rückschlüsse auf Größe und Granularität der Zellen zulässt. Die Größe der Zellen nimmt dabei Einfluss auf die Lichttransmission des Lasers und kann in Form des Vorwärtsstreulichtes (*forward scatter*, FSC) erfasst werden. Der FSC-Detektor befindet sich in der Messanordnung auf einer Linie mit der Probe und dem Exzitationslaser. Die Größe einer Zelle und das gemessene Vorwärtsstreulicht stehen hierbei in einem reziproken Verhältnis zueinander, da die Lichttransmission mit zunehmender Zellgröße abnimmt. Ein weiterer Detektor erfasst im orthogonalen Winkel zum eingestrahlichten Licht das Seitwärtsstreulicht (*sideward scatter*, SSC), dessen Ausmaß von der internen Komplexität und der Granularität der Tumorzellen abhängig ist und somit Rückschlüsse auf die Morphologie erlaubt.

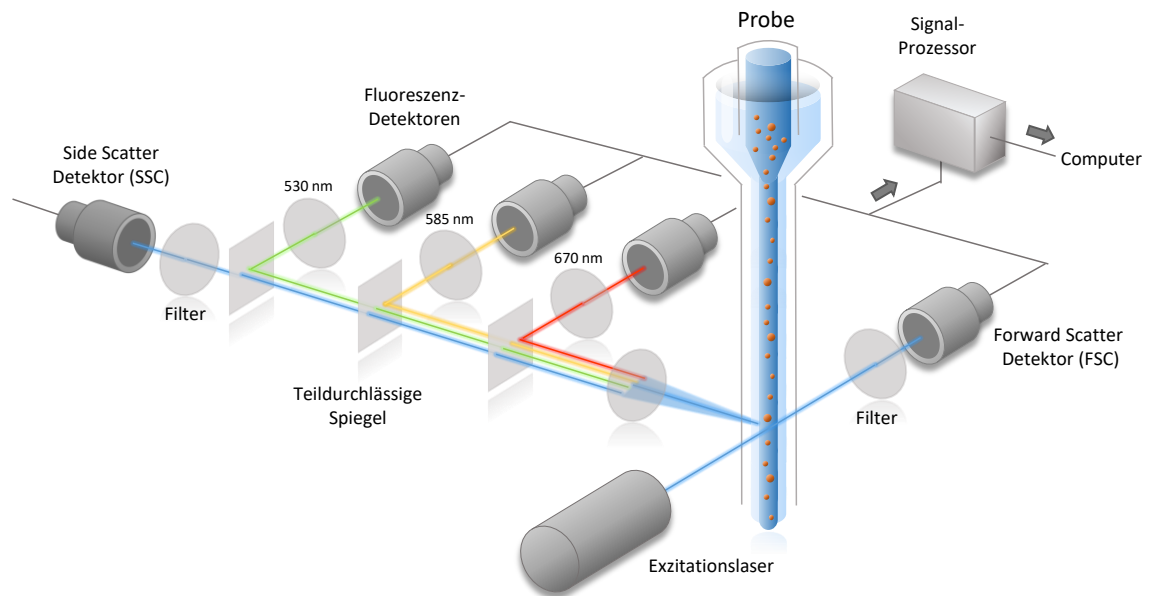


Abbildung 15: Schematische Darstellung des Aufbaus und des Strahlenganges des Durchflusszytometers [377].

Trägt man nun FSC und SSC gegeneinander auf, so bilden Zellen ähnlicher Größe und Granularität Populationen in Form von *dotplots* aus, anhand derer man unterschiedliche Zelllinien oder defekte und intakte Zellen voneinander differenzieren kann. Nachdem man die entsprechende Population mittels eines Gates selektiert hat, trägt man nun die Fläche des gemessenen FSC-Signals (FSC-A) gegen die Höhe desselben Signals (FSC-H) auf. Somit können Zellaggregate, sogenannte Doublets, von Singulets unterschieden werden.

Spezifische Fluorophor-konjugierte Antikörper binden an Zielstrukturen und können durch einen entsprechenden monochromatischen Laser angeregt werden. Die daraus resultierende Lichtemission kann für die Charakterisierung und Quantifizierung intra- und extrazellulärer Strukturen genutzt werden. Fluoreszenz-markierte Singulets können nun als Histogramm dargestellt und quantifiziert werden, indem die gemessene Fluoreszenzintensität gegen die Ereigniszahl aufgetragen wird.

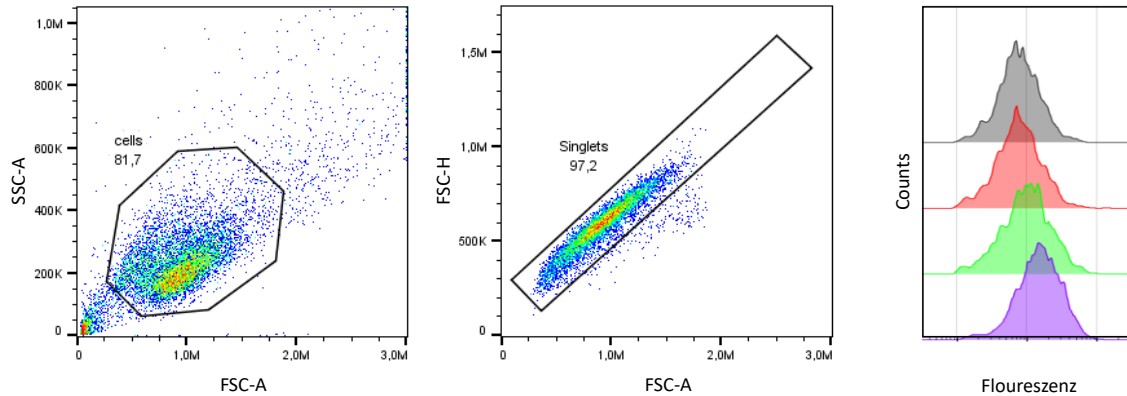


Abbildung 16: Gating-Strategie der Durchflusszytometrie

5.7.1 Quantifizierung der TF-Expression mittels Durchflusszytometrie

Für die Quantifizierung der TF-Expression mittels Durchflusszytometrie werden die Tumorzellen entsprechend Abschnitt 5.3 vorbereitet und zwei Mal mit DPBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen für 15 min bei Raumtemperatur in ca. 3 ml Zellsuspensionspuffer, bestehend aus 300 mg BSA gelöst in 10 ml DPBS, suspendiert und inkubiert. Durch die Blockierung mit BSA werden unspezifische Bindungen abgesättigt und vermieden. Die Konzentration der Zellproben wird mittels eines CASY®1 Modell TT Cell Counters ermittelt und die Proben nach Beendigung der Inkubationszeit für 4 min bei 4 °C und 600 g zentrifugiert. Die Pellets werden in Waschpuffer resuspendiert, sodass eine Stammlösung mit einer Konzentration von $1,5 \times 10^6$ TC/ml resultiert. Je 300 µl dieser Zellsuspensionen werden in Reagiergefäße aliquotiert. Ein gegen TF gerichteter, primärer monoklonaler Antikörper wird den Zellproben mit einer Konzentration von $2,5 \mu\text{g}/1 \times 10^6$ TC zugegeben und unter Ausschluss von Licht für 45 min bei 21 °C inkubiert. Die Tumorzellsuspension sollte dabei ca. alle 15 min vorsichtig invertiert werden, um ein Herabsinken der Zellen zu verhindern. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Reagiergefäße zentrifugiert (600 g, 4 °C, 4 min), die Zellen gewaschen und die Pellets anschließend in 200 µl Waschpuffer resuspendiert. Der primäre TF-Antikörper wird mittels eines Fluoresceinisothiocyanat-gekoppelten (FITC) Antikörpers markiert (45 min, lichtgeschützt, 21 °C). Nachdem die Inkubationszeit verstrichen und die Zellen zwei weitere Male gewaschen wurden, werden die Proben zu je 150 µl in die Kavitäten einer geeigneten Platte (96 Well, U-Form) überführt. Das Fluorophor wird in einem

Guava® easyCyte HT Flow Zytometer mittels eines blauen Lasers mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und das emittierte Licht durch einen grünen Bandpassfilter (530 nm) detektiert.

5.7.2 Quantifizierung der AT-Bindung mittels Durchflusszytometrie

Die Tumorzellen werden gemäß Abschnitt 5.3 vorbereitet und abschließend zwei Mal mit DPBS gewaschen, bevor eine relative Quantifizierung der AT-Bindung mit Hilfe der Durchflusszytometrie durchgeführt wird. Anschließend werden die Zellen für 15 min bei Raumtemperatur in ca. 3 ml Zellsuspensionspuffer suspendiert und inkubiert. Durch BSA werden unspezifische Bindungen abgesättigt. Die Konzentration der Zellproben wird mittels eines CASY®1 Modell TT Cell Counters ermittelt und die Proben nach Beendigung der Inkubationszeit für 4 min bei 4 °C und 600 g zentrifugiert. Die Pellets werden in Waschpuffer resuspendiert und je 2×10^5 Tumorzellen in ein Reagiergefäß überführt. Nach erneuter Zentrifugation (600 g, 4 °C, 4 min) werden die Zellpellets in 200 µl Waschpuffer aufgenommen und für eine Stunde bei Raumtemperatur und unter Ausschluss von Licht mit humanem Antithrombin mit einer Konzentration von 15 µg/ml inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Proben erneut gewaschen und in 200 µl Waschpuffer resuspendiert.

Die AT-Bindung an der Oberfläche behandelter Zellen wird durch einen Alexa Fluor 647-konjugierten monoklonalen Anti-AT Antikörper [$2,5 \mu\text{g}/1 \times 10^6 \text{ TC}$] markiert (60 min, lichtgeschützt, 21 °C). Die Bindung zwischen Zelle, Antithrombin und Antikörper wird mittels einer 30-minütigen Inkubation in Fixierungspuffer fixiert. Nach dreimaligem Waschen werden die Zellen in 200 µl Waschpuffer resuspendiert und in Durchflusszytometrie-geeignete Röhrchen überführt.

Das Fluorophor wird mittels eines roten Lasers bei 633 nm angeregt und durch einen roten Bandpassfilter (670 nm) in einem CytoFLEX Durchflusszytometer der Firma Beckmann-Coulter GmbH vermessen.

5.8 SDS-PAGE & Western Blot

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und die anschließende Western Blot Analyse werden genutzt, um Änderungen der Proteinexpressionen der jeweiligen Tumorentitäten nach einer Inkubation mit entsprechenden Wirkstoffen zu untersuchen. Hierfür wird ein isoliertes denaturiertes Proteingemisch zunächst mittels SDS-PAGE größenabhängig aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran übertragen. Unter Zuhilfenahme spezifischer HRP-konjugierter Antikörper werden dann die zu untersuchenden Proteine visualisiert [378–380].

5.8.1 Lysatgewinnung

Für die Herstellung von Proteinlysaten müssen die behandelten Tumorzellen zunächst mit EDTA (siehe Abschnitt 5.3) abgelöst und mit DPBS gewaschen werden. Für die Extraktion der Proteine wird das Zellepellet in einem frisch hergestellten Lysepuffer, bestehend aus *cell extraction buffer* (CE), Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und *protease inhibitor cocktail* (PIC), suspendiert [378, 379]. Während CE dafür sorgt, dass die Zellmembran lysiert wird und DNA sowie RNA präzipitieren, inhibieren PIC und PMSF endogene Proteasen und verhindern so den Abbau der Proteine. Um einer enzymunabhängigen Denaturierung der Proteine vorzubeugen, müssen die Proben und Reagiergefäße nach Zugabe des Lysepuffers gekühlt werden [378]. Die Proben werden für 30 min in einem Thermomix bei ca. 4°C und 650 U/min inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Proben zentrifugiert (10.000 g, 4 min, 4 °C), um lysierte Zellmembranfragmente sowie DNA- und RNA-Präzipitate abzutrennen. Übrig bleibt das Proteinlysate, das in ein neues Reagiergefäß überführt und bei -80 °C gelagert wird [378].

5.8.2 Proteinbestimmung mittels Bicinchoninsäure-Assay

Die Konzentration der isolierten Proteinlysate kann mittels einer Bicinchoninsäure-Reaktion (BCA) ermittelt werden [379, 381]. Diese beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} - zu Cu^{1+} -Ionen. Die Menge reduzierter Cu^{1+} -Ionen hängt dabei von der Anzahl spezifischer Peptidbindungen und der Tyrosin- und Tryptophanmenge der entsprechenden Probe ab [382]. Anschließend entsteht ein violetter Kupfer(I)-Bicinchoninsäure-Komplex, der kolorimetrisch quantifiziert werden kann. Die Absorptionsmessung erfolgt bei 570 nm. Die Menge des gebildeten Chelat-Komplexes und der Proteingehalt der Proben sind dabei direkt proportional zueinander [381].

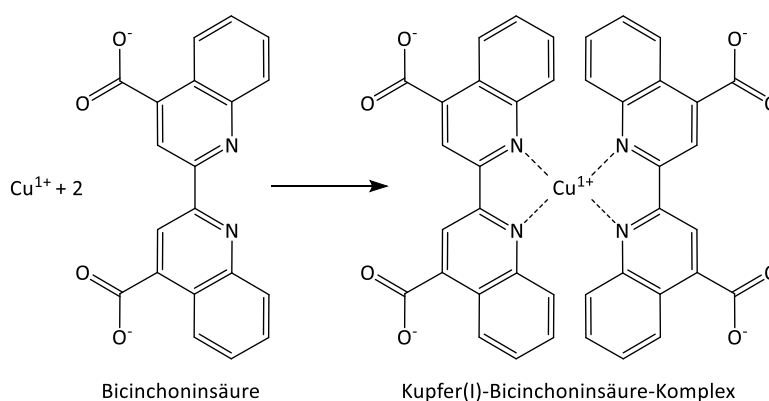


Abbildung 17: Entstehung des Kupfer(I)-Bicinchoninsäure-Komplexes aus einwertigen Kupfer-Ionen und BCA.

Für die Quantifizierung werden verschiedene Verdünnungen der Proben (1:10, 1:20, 1:50 und 1:100) in Milliporewasser hergestellt. Vermessen werden neben den Proben außerdem sechs Standardverdünnungen, aus denen im späteren Verlauf eine Kalibriergerade erstellt wird. Die Qualität der Kalibrierung wird des Weiteren mit drei Qualitätskontrollen, deren Konzentrationen im Bereich der Kalibrierung liegen (150, 250 und 350 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA), ermittelt. Die Proben, die Kalibrierstandards und die Qualitätskontrollen werden als technische Duplikate zu je 20 μl in die Kavitäten einer 96-Well-Platte pipettiert. Abschließend werden jedem Well 200 μl des frisch angesetzten BCA Protein Assay Kits der Firma ThermoFisher Scientific Inc., bestehend aus einer Kupfersulfat Lösung und BCA-Reagenz (1:50), zugegeben. Nach einer einstündigen Inkubation bei 60 °C und einer 10-minütigen Abkühlung der Platte bei Raumtemperatur wird die Absorption an einem Multiwell Reader FLUOstar™ OPTIMA gemessen.

5.8.3 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE-Methode wird verwendet, um das Proteingemisch der Lysate im Zuge einer Gelelektrophorese aufzutrennen [379]. Anhand der zuvor ermittelten Konzentrationen der Proben (siehe Abschnitt 5.8.2) kann das jeweilige Volumen errechnet werden, welches einer Gesamtproteinmenge von 25 µg entspricht. Ebendieses Volumen wird mit derselben Menge Laemmli-Puffer (2x) versetzt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert [378, 379].

Das im Laemmli-Puffer enthaltene Natriumdodecylsulfat (SDS) dient der Abschirmung von Eigenladungen der Zielproteine. Dadurch ist eine Auftrennung der Proteine rein nach Größe und nicht nach Ladung möglich [379]. Durch TRIS-Puffer wird ein pH-Bereich eingestellt, in dem die Peptidbindungen nicht aufgebrochen bzw. denaturiert werden. Bromphenolblau dient der visuellen Kontrolle, anhand derer man die Position der Lauffront erkennen kann. Disulfidbrücken werden durch die Zugabe von β-Mercaptoethanol aufgebrochen, da manche Proteine andernfalls nur als große Molekülkomplexe vorliegen könnten, deren Visualisierung dann wiederum nicht möglich wäre. Zusätzlich enthält der Laemmli-Puffer Glycerol, das aufgrund seiner hohen Dichte dafür sorgt, dass die Probengemische in den Taschen des Gels verbleiben [378].

Nach erfolgter Denaturierung werden die Proben in die Taschen eines Polyacrylamidgels pipettiert. Neben den Proben wird außerdem ein Größenstandard vermessen, der der späteren Identifikation der Proteinbanden dient. In dem ersten Segment des Gels, dem weitmaschigen Trenngel, werden die Proben aufkonzentriert. Chlorid-Ionen dienen dabei aufgrund ihrer Ladung und Größe als Leitonen. Der eingestellte pH-Wert entspricht dem isoelektrischen Punkt des Glycins, weswegen es als Zwitterionen vorliegt und daher bei einer angelegten Spannung nur langsam im Gel wandert. Es fungiert daher als Folge-Ion.

Darauffolgend gelangen die Proteine in ein engmaschigeres Trenngel, in dem eine größenbasierte Auftrennung der Proteine stattfindet [378]. Das Gel befindet sich in einer mit Elektrophorese-Puffer gefüllten Kammer und eine konstante Spannung von 200 V wird angelegt. Die Proteine wandern nun zur Anode. Je nach Größe des Zielproteins können unterschiedliche Polyacrylamid-Konzentrationen verwendet werden, was Einfluss auf die Laufgeschwindigkeit der SDS-Protein-Moleküle nimmt [378]. Je höher die

Polyacrylamid-Konzentration des Gels, desto feiner die Auftrennung der Proteine. Die Laufzeit der Gelelektrophorese muss ebenfalls individuell an das verwendete Gel und das zu untersuchende Protein angepasst werden. Nach erfolgter Gelelektrophorese wird an einem ChemiDoc™ XRS+ System der Firma BioRad eine *stainfree*-Detektion durchgeführt. Das Messprinzip basiert auf einer Fluoreszenzlöschung und dient im späteren Verlauf der Normalisierung und Auswertung des Western Blots.

5.8.4 Western Blot

Die zuvor aufgetrennten Proteine werden nun mittels Western Blot aus dem Polyacrylamid-Gel auf eine Polyvinyliden-Membran (PVDF-Membran) übertragen. Diese Membran muss zunächst aufgrund ihrer stark hydrophoben Eigenschaften equilibriert werden. Dafür wird die Membran zunächst für eine Minute mit Methanol benetzt und anschließend mit Transferpuffer gewaschen. Die Übertragung findet in einem Turbo™ Transfer System der Firma Bio-Rad Laboratories statt. Abhängig von der Größe des zu untersuchenden Proteins stehen verschiedene Transferprogramme zur Verfügung, die hinsichtlich Spannung und Laufzeit variieren können. Die Filterpapiere werden in Transferpuffer eingelegt und vollständig durchtränkt. Zwischen den einzelnen Schichten dürfen sich keine Luftblasen befinden, da eine Übertragung an diesen Stellen nicht funktionieren würde.

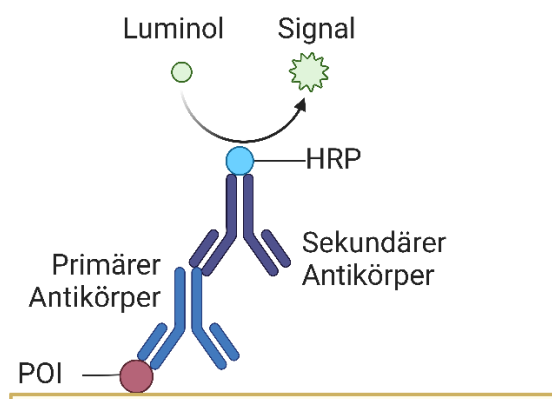


Abbildung 18: Schematische Darstellung der Visualisierung eines Zielproteins (POI = protein of interest) nach erfolgreicher SDS-PAGE und Übertragung auf eine PVDF-Membran. An das POI bindet ein spezifischer primärer Antikörper, der wiederum durch einen HRP-konjugierten sekundären Antikörper markiert wird. HRP katalysiert dann die Umsetzung von Luminol, woraus die Emission eines Lumineszenzsignals resultiert. Die Grafik wurde mit BioRender erstellt.

Nach vollendeter Übertragung werden die Filterpapiere und das Gel entsorgt. Die PVDF-Membran wird vorsichtig in eine Blot-Kammer überführt und für 1 h mit 50 ml Blockierlösung inkubiert, um so unspezifische Bindungen im späteren Verlauf der Antikörpermarkierung zu verhindern [378]. Daran anschließend wird die Membran drei Mal für je 10 min mit TBS-T gewaschen. Nun kann ein primärer Antikörper, der sich spezifisch gegen ein Zielprotein richtet, hinzugegeben werden. Die Membran wird für eine Stunde bei Raumtemperatur und dann für ca. zwölf Stunden bei 2-8 °C mit dem primären Antikörper inkubiert. Nach drei Waschschritten mit TBS-T wird die Membran für 90 Minuten mit einem sekundären Antikörper versetzt, der sich gegen die verwendeten primären Antikörper richtet und mit einer Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert ist. Nach erneutem Waschen wird der PVDF-Membran eine Luminol-Wasserstoffperoxid-Lösung zugegeben. HRP katalysiert dann die Oxidation von Luminol hin zu einem Phthalat, dessen Chemolumineszenz an einem ChemiDoc™ XRS+ gemessen werden kann. Die Proteinmenge ist dabei proportional zu der erfassten Lumineszenz. Jedes gemessene Signal wird als ein Pixel dargestellt, wodurch sich spezifische Banden der jeweiligen Proteine abbilden. Mit Hilfe der gemessenen Pixeldichten und der zuvor angefertigten stainfree Messung (siehe Abschnitt 5.8.3) kann das erfasste Proteinsignal relativ zur Gesamtproteinmenge quantifiziert und normalisiert werden [378].

5.9 Konfokale Laserrastermikroskopie

Die konfokale Laserrastermikroskopie (CLSM) wird genutzt, um veränderte Proteinexpressionen der Zellen sowie deren Auswirkung auf das Antithrombin-Bindungsvermögen und den Sulfatierungsstatus der HSPG zu visualisieren. Hierfür wird das CLSM-Modell A1 der Firma Nikon verwendet. Strukturen der Zelle, Zellkompartimente oder Zielproteine werden mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen oder mittels Fluoreszenz-konjugierter Antikörper angefärbt und können so visualisiert werden.

Das zu beobachtende Bild resultiert ausschließlich aus emittiertem Fluoreszenzlicht. Mittels unterschiedlicher monochromatischer Laser werden die gebundenen Fluorophore angeregt. Das emittierte Licht wird dann mittels beweglicher Spiegel durch einen dichroitischen Interferenzfilter geleitet. Dadurch wird rasterförmig eine große Anzahl von

Bildern eines Bildausschnittes aufgenommen, die dann zu einer hochauflösenden Einzelaufnahme zusammengesetzt werden. Die Verwendung von Lochblenden verhindert dabei das Messen von eventuellem Streulicht, was die Bildqualität des aufgenommenen Bildes erheblich verbessert [383]. Der schematische Aufbau und Strahlengang eines CLSM ist in Abbildung 19 illustriert.

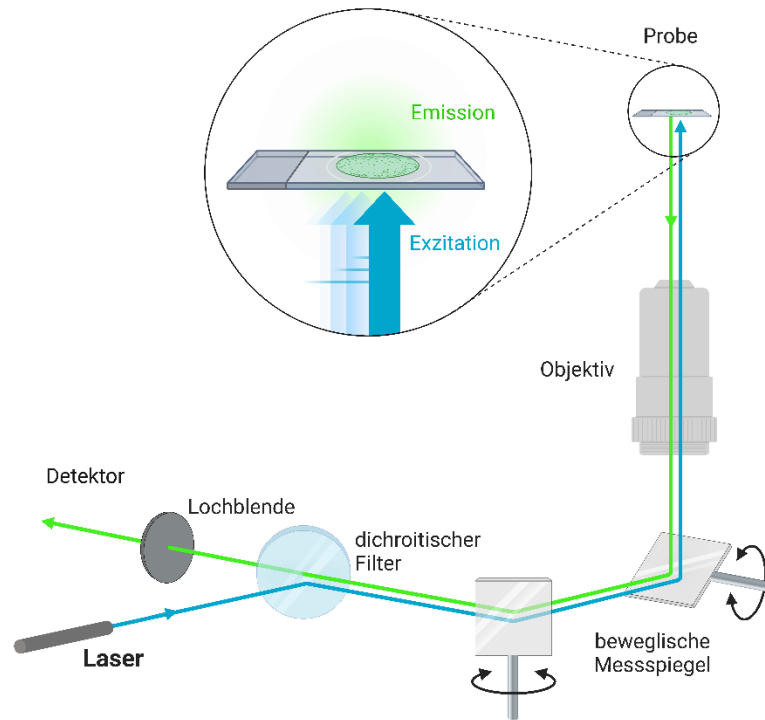


Abbildung 19: Schematische Darstellung des Strahlengangs eines konfokalen Laserrastermikroskops [383]. Die Grafik wurde mit BioRender erstellt.

5.9.1 Probenvorbereitung CLSM

Im Zuge dieser Arbeit sollen unterschiedliche Strukturen und Proteine Fluoreszenzmarkiert werden. Dafür werden Tumorzellen [15.000 Tumorzellen/ml] in Kammerobjektträgern der Firma Ibidi GmbH kultiviert. Die Konfluenz der Zellen sollte dabei nicht zu hoch sein, da andernfalls einzelne Zellen nur noch schwierig differenzierbar sind. Wenn die gewünschte Konfluenz erreicht ist, wird das Medium aus den Kammern des Objektträgers entfernt und der Zellrasen mit DPBS gewaschen. Die Zellen werden dann für 10 min mit einer 4%-igen Paraformaldehyd-Lösung (PFA) fixiert. PFA-Reste werden durch zweimaliges Waschen entfernt und den Zellen ein Milchpulverhaltiger Blockierungspuffer zugegeben. Die Zellen werden bei Raumtemperatur für 1 h

blockiert, bevor in drei Schritten mit DPBS, Waschpuffer und schließlich Wasser gewaschen wird. Nun werden die Nuclei der Zellen durch die zehnminütige Zugabe von 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) [1 µg/ml] markiert. DAPI ist ein in die DNA interkalierendes Fluorophor, das im ultravioletten Bereich angeregt wird. DAPI-Rückstände werden mittels Waschpuffer entfernt und mit dem Färben der zu untersuchenden Zielstruktur fortgefahren. Im Fall von Antikörpermarkierungen werden die Zellen immer mindestens für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

HS3ST2 wird visualisiert, indem den Zellen ein primärer HS3ST2-Antikörper zugegeben wird. In einem zweiten Schritt wird dieser dann mit einem sekundären Fluorophor-konjugierten Antikörper, der sich gegen die Spezies Kaninchen richtet, markiert. Aus einer HS3ST2-Überexpression resultiert eine verstärkte 3-O-Sulfatierung der HSPG. Diese kann visualisiert werden, in dem die Tumorzellen mit dem Antikörper HS4C3 – der freundlicherweise von Prof. Dr. Toin van Kuppevelt der Radboud Universität Nijmegen zur Verfügung gestellt wurde – behandelt werden [384]. Es handelt sich hierbei um einen Antikörper, der in der anti-VSV-Tag-Maushybridom-Zelllinie P5D4 (VSV = vesikuläres Stomatitis Virus) hergestellt wurde. Der Antikörper wird daher erst durch einen anti-VSV-Glykoprotein Antikörper und anschließend durch einen gegen die Spezies Maus gerichteten Fluorophor-konjugierten Antikörper markiert.

Die Fähigkeit behandelter Tumorzellen AT auf ihrer Oberfläche zu binden kann untersucht werden, indem den Zellen zunächst humanes AT [15 mg/ml] zugegeben und für 90 min inkubiert wird. Nachfolgend wird überschüssiges AT durch Waschen entfernt und das gebundene AT durch einen spezifischen AlexaFluor647-konjugierten anti-AT-Antikörper markiert.

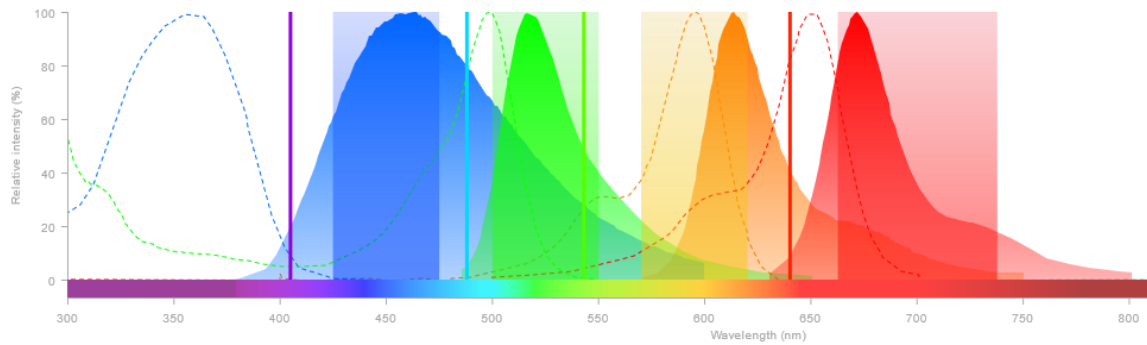


Abbildung 20: Schematische Darstellung der Wellenlängen der Emissions- und Exzitationsmaxima verschiedener Fluorophore (blau = DAPI; grün = FITC; orange = Texas Red, AlexaFluor594; rot = AlexaFluor647), der zur Verfügung stehenden Anregungslaser sowie der zugehörigen Filter. Die Grafik wurde mit Hilfe des Fluorescence SpectraViewer erstellt [385].

In Abbildung 20 werden die Wellenlängen der Emissions- und Exzitationsmaxima der verwendeten Fluorophore dargestellt. Des Weiteren ist der Abbildung zu entnehmen, welche Anregungslaser und welche Filter während der CLSM verwendet werden können. Da sich die Emissionen und Exzitationen der Fluorophore nur bedingt überschneiden, können multiple Färbungen der Zellen durchgeführt werden. Tabelle 10 sind die verwendeten Antikörper und die entsprechenden Verdünnungen zu entnehmen.

Antikörper	Hersteller	Target	Spezies	Fluorophor	Verdünnung
PA5-26522	Invitrogen	HS3ST2	Kaninchen		1:500
HS4C3	Uni Radboud	3-O-Sulfatierung	Maus		1:2
V5507	Sigma-Aldrich	VSV-Glykoprotein	Maus		1:25
sc-271987	Santa Cruz	Antithrombin	Maus	AF647	1:50
BD554001	BD Biosciences	Maus	Ziege	FITC	1:500
sc-2090	Santa Cruz	Kaninchen	Esel	FITC	1:200
sc-2785	Santa Cruz	Maus	Esel	TR	1:50

Tabelle 10: Liste der für die konfokale Laserrastermikroskopie verwendeten Antikörper.

5.10 Aufbereitung der Blutproben

Für die Untersuchungen der Tumorzell-induzierten Plättchenaktivierung müssen Thrombozyten aus Vollblut oder Thrombozytenkonzentraten isoliert und aufgereinigt werden. Für Untersuchungen des endogenen Thrombinbildungspotentials wird plättchenreiches Plasma genutzt, das aus Vollblut gewonnen wird. Im Falle von Lichttransmissions- oder ATP-Freisetzungs-Untersuchungen wird hingegen plättchenreicher Puffer verwendet, welcher aus bereits aufgereinigten Thrombozytenkonzentraten hergestellt wird.

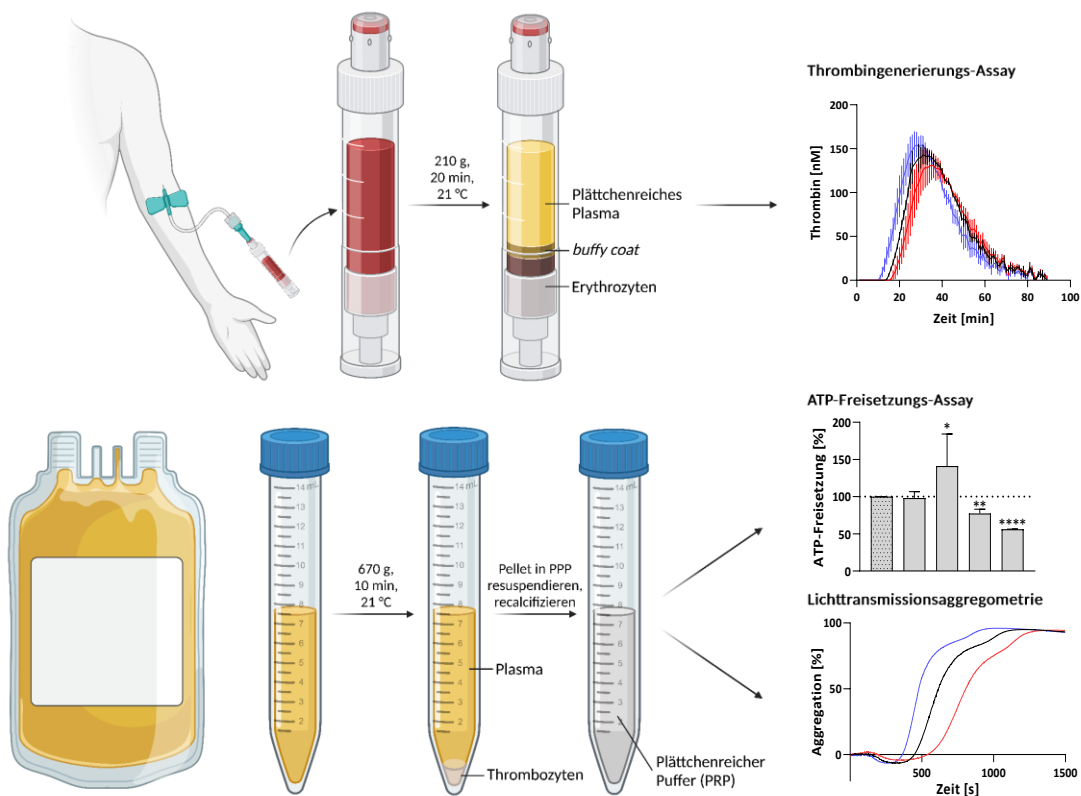


Abbildung 21: Schematische Darstellung der Thrombozytenisolierung aus Vollblut oder aus TKZ und die jeweils geeignete Anwendung. Die Grafik wurde mit BioRender erstellt.

5.10.1 Blutentnahme

Die Entnahme des Vollblutes erfolgt gemäß dem Verfahren von Harrison *et al.* [386]. Die Vollblutspender sind ausschließlich männliche weiße Personen mittleren Alters, die keine bekannten Vorerkrankungen haben und vor der jeweiligen Spende mindestens 14 Tage keine thrombozytenaggregationshemmenden Arzneistoffe eingenommen haben. Das Einhalten einer 30-minütigen Ruhepause vor der Spende soll den hämodynamischen Stress und somit eine Spontanaggregation der Blutprobe verhindern. Dem Spender wird eine Oberarmkompression angelegt und die zu punktierende Stelle gründlich desinfiziert. Anschließend wird die *Vena cephalica* oder die *Vena mediana cubiti* in der Ellenbeuge mittels einer Multifly-Kanüle mit einer Größe von 21 Gauge punktiert. Die Oberarmkompression wird gelöst, sobald die Kanüle sicher in einer der Venen liegt und sich ein gleichmäßiger Blutfluss eingestellt hat. Für die Entnahme des Vollblutes werden S-Monovetten verwendet, die vollständig gefüllt und anschließend vorsichtig invertiert werden. Das in den Monovetten enthaltene Natriumcitrat komplexiert Ca^{2+} -Ionen – also Gerinnungsfaktor IV – und verhindert so die spontane Aggregation der Probe.

Es muss außerdem beachtet werden, dass die Verwendung einer traumatischen Kanüle subendotheliales Gewebe freilegt, was wiederum zur Aktivierung des extrinsischen Systems führt. Daher muss die erste entnommene Monovette verworfen werden, da aktivierte Gerinnungsfaktoren sonst zur spontanen Aggregation der Blutprobe führen könnten. Die Blutentnahme erfolgt unter Einhaltung der ethischen Grundsätze der Deklaration von Helsinki [387].

5.10.2 Isolation plättchenreichen Plasmas aus Vollblut

Um Thrombozyten aus dem Vollblut zu isolieren, wird das gemäß Abschnitt 5.10.1 entnommene Blut für 20 min mit 210 g bei einer Temperatur von 21 °C zentrifugiert. Dadurch trennt sich das Vollblut in drei Phasen. Die untere, dunkelrote Schicht enthält Erythrozyten und Leukozyten. Die obere Phase ist das plättchenreiche Plasma. Es ist gelblich gefärbt und beinhaltet hauptsächlich Thrombozyten. Zwischen den beiden Phasen bildet sich eine schmale opaleszierende Grenzschicht, der sogenannte *buffy coat*, der sowohl Leukozyten als auch einige Thrombozyten enthält.

Das plättchenreiche Plasma wird vorsichtig mit einer Pipette aufgenommen und in ein neues Zentrifugationsgefäß überführt. Sofern die Thrombozyten im Rahmen einer Untersuchung des endogenen Thrombinbildungspotentials verwendet werden sollen, kann an dieser Stelle wie in Abschnitt 5.12 beschrieben weiter verfahren werden.

5.10.3 Isolation plättchenreichen Puffers aus Thrombozytenkonzentraten

Das Institut für experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Bonn hat für experimentelle Untersuchungen der TCIPA freundlicherweise verfallene Thrombozytenkonzentrate (TKZ) bereitgestellt. Die Thrombozyten werden mittels Thrombozytapherese aus dem Blut gesunder Spender separiert und in Plasma resuspendiert. Dem Plasma wird dabei eine Citrat-Dextrose-Lösung als Antikoagulans zugesetzt. Die zur Verfügung gestellten TKZ sind in der Regel bei Erhalt seit einem Tag verfallen und demnach nicht mehr für eine medizinische Verwendung geeignet, was jedoch keine Auswirkungen auf die Funktions- und Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten hat. Es konnte gezeigt werden, dass die Konzentrate sieben Tage nach Entnahme keine signifikanten Beeinträchtigungen hinsichtlich ihrer Funktionsfähigkeit aufweisen. Die Lagerung der TKZ erfolgt bei 21 °C und unter permanenter Bewegung auf einem Laborschüttler. Die durchschnittliche Konzentration der TKZ beträgt $1,2 \times 10^9$ Thrombozyten/ml und für die experimentellen Untersuchungen wird eine Zielkonzentration 4×10^8 Thrombozyten/ml benötigt. Dafür wird ein definiertes Volumen des TKZ entnommen und für 10 min bei 670 g und 21 °C zentrifugiert, wodurch die Thrombozyten vom Plasma und einem Großteil der darin enthaltenen plasmatischen Gerinnungsfaktoren abgetrennt werden. Das Thrombozytenpellet wird vorsichtig in plättchenarmen Puffer (PPP) resuspendiert und auf die Zielkonzentration von 4×10^8 Thrombozyten/ml eingestellt. Der resultierende plättchenreiche Puffer (PRP) muss vor Durchführung etwaiger Versuche recalcifiziert werden, um die Koagulabilität der Probe wiederherzustellen. Dafür wird mit einer Calciumchlorid-Stammlösung [0,5 M] eine Endkonzentration von 1 mM eingestellt. Die Haltbarkeit des PRP ist recht begrenzt, weswegen es möglichst unmittelbar vor den Versuchsansätzen frisch hergestellt werden sollte. Die Versuche sollten dann bestenfalls

binnen drei Stunden durchgeführt werden, da es sonst zu einer Spontanaggregation der Probe kommen könnte. Das hergestellte PRP ist geeignet für Untersuchungen der Lichttransmissionsaggregometrie (siehe Abschnitt 5.11) und der ATP-Freisetzung aus aktivierten Thrombozyten (siehe Abschnitt 5.13).

5.11 Lichttransmissionsaggregometrie nach Born

Die Lichttransmissionsaggregometrie (LTA) nach Born ist eine etablierte Technik zur funktionalen Untersuchung aktivierter Thrombozyten [80, 388]. Das Prinzip der Messung beruht auf der photo-optischen Erfassung der veränderten Lichtdurchlässigkeit nach einer Agonisten-induzierten Thrombozytenaggregation. Als potentielle Agonisten können beispielsweise Thrombin, TRAP-6, ADP, Kollagen, Epinephrin, TXA₂ oder Arachidonsäure dienen [14, 389, 390].

Tumorzellen können eine Thrombozytenaggregation auf verschiedene Weisen initiieren – sei es durch eine TF-induzierte Thrombingenerierung, durch Adhäsion von Tumorzellen an Thrombozyten oder durch eine Ausschüttung von Thrombozytenaktivatoren wie ADP oder TXA₂ (siehe Abschnitt 2.3) [80, 391]. Wenn die Plättchen inaktiv sind, haben sie einen diskoiden Phänotyp und liegen fein verteilt als Suspension vor [392]. Die inaktive Probelösung hat aufgrund dieser feinen Verteilung eine maximale optische Dichte wodurch die Transmission minimal ausfällt, da ein Großteil des eingestrahnten Lichtes von der großen Oberfläche der Suspension absorbiert wird. Dieser Zustand dient als Nullwert und wird mit 0 % Aggregation gleichgesetzt. Der theoretische Maximalwert der Aggregation wird durch Vermessen einer PPP-gefüllten Küvette festgelegt, was einer 100%-igen Aggregation entspricht [80, 393, 394].

In Thrombozyten, die bspw. durch Bindung eines Agonisten an dessen zugehörigen Rezeptor aktiviert werden, wird eine Signalkaskade losgetreten [393]. Ein substanzieller Schritt dieses Aktivierungsprozesses ist der schnelle Anstieg der intrazellulären Calcium-Ionen-Konzentration, was die Freisetzung prokoagulativer Mediatorstoffe aus den Granula der aktivierten Thrombozyten erleichtert [393, 394]. Dies zieht weitere Thrombozyten an und begünstigt die Thrombenbildung. Pseudopodien, die durch Membranausstülpungen ausgebildet werden, erhöhen die Oberfläche der Blutplättchen

erheblich und führen zum sogenannten *shape change*. Durch die vergrößerte Oberfläche der Thrombozyten kommt es kurzzeitig zu einer verringerten Lichttransmission, die dann allerdings durch die Präzipitation von Homo- oder Heteroagglomeraten stark zunimmt. Die Lichttransmission wird von einem Photometer erfasst und in Echtzeit in Form eines sigmoidalen Kurvenverlaufes abgebildet [80, 394].

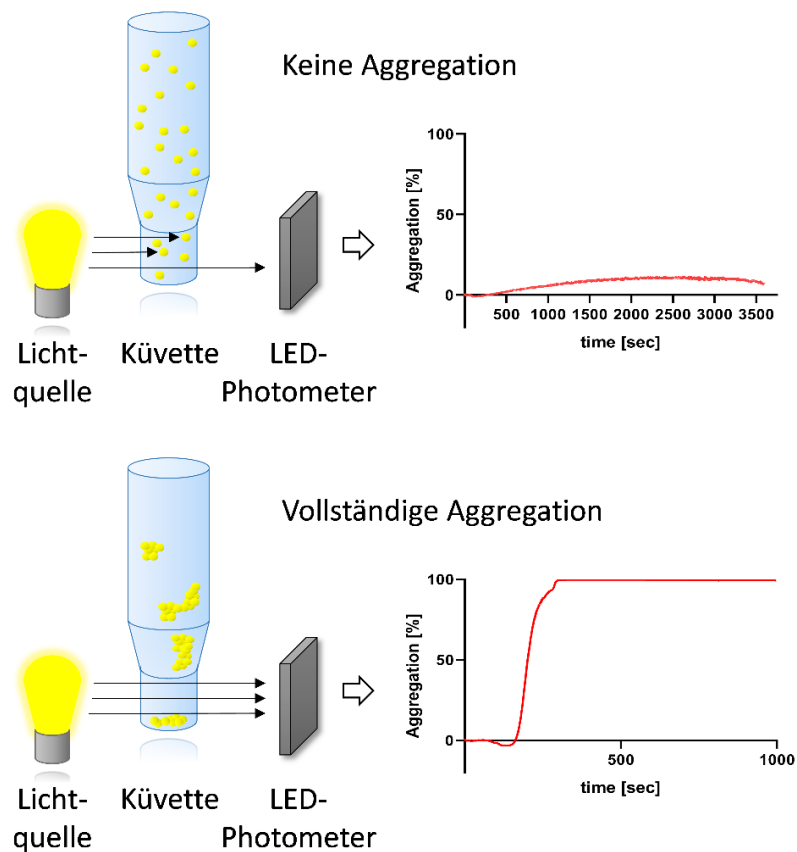


Abbildung 22: Funktionsweise der Lichttransmissionsaggregometrie nach Born [388, 394]

5.12 Thrombingenerierungs-Assay

Der Thrombingenerierungs-Assay (TGA) ist ein Messverfahren zur Bewertung der Fähigkeit einer plättchenreichen Plasmaprobe nach *in vitro*-Aktivierung der Gerinnung durch TF oder einen anderen geeigneten Stimulus Thrombin zu generieren [395, 396]. Die Menge gebildeten Thrombins fungiert als Surrogatparameter zur Beurteilung des Ausmaßes einer thrombozytären Aggregation. Dies ermöglicht es zu analysieren, ob und in welchem Maße beispielsweise eine Tumorzelllinie befähigt ist, TF und somit in Konsequenz Thrombin freizusetzen.

Die Quantifizierung des generierten Thrombins basiert dabei auf einer Fluoreszenzmessung, die durch die Thrombin-spezifische Abspaltung eines Fluorophors aus dem fluorogenen Substrat Z-Gly-Gly-Arg-AMC zustande kommt [396]. Die Serinprotease spaltet das fluoreszierende 7-Amino-4-Methylcumarin (AMC) katalytisch vom Substrat ab [397]. Durch eine vorherige Erstellung einer Kalibriergeraden kann anhand der gemessenen Fluoreszenzintensitäten das endogene Thrombinbildungspotential (ETP) der jeweiligen Proben ermittelt werden. Das ETP entspricht dabei der *area under the curve* (AUC) der aufgezeichneten Funktion. Zusätzlich können Aussagen über die Koagulabilität der einzelnen Proben anhand der gemessenen *lag time* getroffen werden.

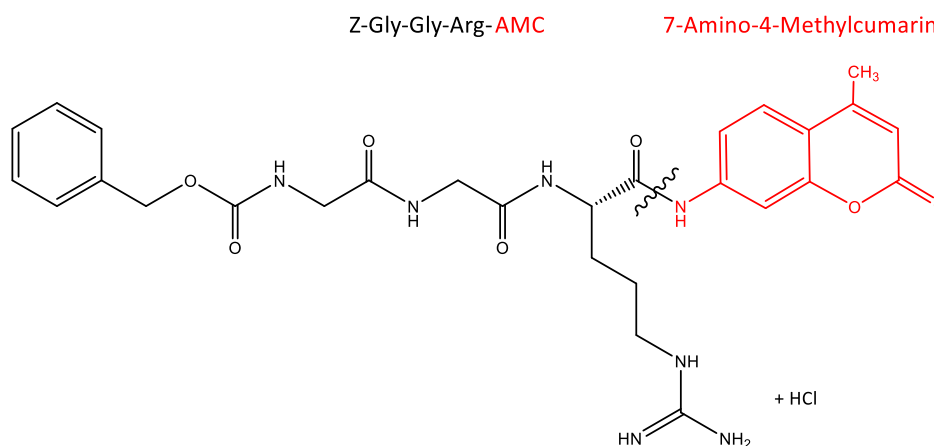


Abbildung 23: Strukturformel von Z-Gly-Gly-Arg-AMC (schwarz und rot) und das nach der Abspaltung durch Thrombin entstehende Fluorophor 7-Amino-4-Methylcumarin (rot) [397].

Bevor die Thrombozyten isoliert und aufbereitet werden, werden die Tumorzellen gemäß Abschnitt 5.3 abgelöst, gezählt und die für den jeweiligen Versuchsansatz benötigte Konzentration eingestellt. Falls erforderlich, werden die Tumorzellen mit Inhibitoren präinkubiert.

Unmittelbar nachdem die Tumorzell-Suspensionen vorbereitet wurden, wird frisches plättchenreiches Plasma wie in Abschnitt 5.10.2 beschrieben hergestellt. Die Entnahme des Plasmas geschieht mit besonderer Vorsicht, damit keine Erythrozyten in die Probe gelangen, da die Lyse dieser Zellen zur Freisetzung thrombozytenaktivierender Artefakte führen könnte. Des Weiteren soll so ein zu großer Scherstress vermieden werden. Da sowohl das intrinsische (FXII) als auch das extrinsische Gerinnungssystem (FVII) die Thrombinbildung initiieren können, ist die Zugabe des FXIIa-Inhibitors *corn trypsin inhibitor* (CTI) in einer Konzentration von 50 µg/ml zwingend erforderlich. Das Plasma wird nach Zugabe des CTI vorsichtig invertiert und unmittelbar danach zu je 40 µl in die Kavitäten einer schwarzen Nunc™ F96 MicroWell™-Platte pipettiert. Dem vorgelegten plättchenreichen Plasma werden dann 10 µl der jeweiligen Induktoren zugegeben. DPBS dient dabei als Negativ- und rekombinanter TF als Positivkontrolle (siehe Tabelle 11).

Reagenzien	Probe [µl]	Positivkontrolle [µl]	Negativkontrolle [µl]
Plättchenreiches Plasma	40		
Tumorzellsuspension	10	---	---
Rekombinanter TF	---	10	
DPBS	---	---	10
TGA-Substrat	50		

Tabelle 11: Pipettierschema Thrombingenerierung.

Unmittelbar vor der Messung werden je 50 µl der fluorogenen Substrat-Lösung (Z-Gly-Gly-Arg-AMC) zügig in jede Kavität pipettiert. Die Kinetikmessung erfolgt in einminütigen Messintervallen an einem auf 37 °C temperierten Tecan Spark® Multimode Microplate Reader über einen Zeitraum von 90 min. Gemessen wird bei einer Extinktion von 360 nm und einer Emission von 460 nm.

5.13 ATP-Freisetzungs-Assay

Die Freisetzung von ATP aus den dichten Granula aktivierter Thrombozyten kann mittels einer Luciferase-induzierten Lumiaggregometrie quantifiziert werden. Die Menge des freigesetzten ATP korreliert dabei mit dem Ausmaß der thrombozytären Aktivierung und Aggregation [80].

Recalcifizierter PRP wird für eine definierte Zeitspanne mit Tumorzellen inkubiert, welche entsprechend Abschnitt 5.3 vorbereitet werden. Neben der Behandlung mit den Tumorzellen werden zwei Proben außerdem mit DPBS bzw. mit TRAP-6 beimpft. Die mit DPBS versetzte Probe dient als Negativkontrolle und bildet das ATP-Basallevel in inaktiviertem PRP sowie die Autolumineszenz ab. TRAP-6 hingegen induziert eine schnelle und vor allem starke Aktivierung der Thrombozyten und wird daher als Positivkontrolle herangezogen. Die Proben werden anschließend zu je 50 µl in technischen Triplikaten in die Kavitäten einer weißen Nunc™ F96 MicroWell™ Platte pipettiert.

Parallel dazu wird unter Ausschluss von Licht das D-Luciferin/Luciferase-Reagenz hergestellt. Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeiten werden 40 µl des Reagenzes in jede Kavität gegeben.

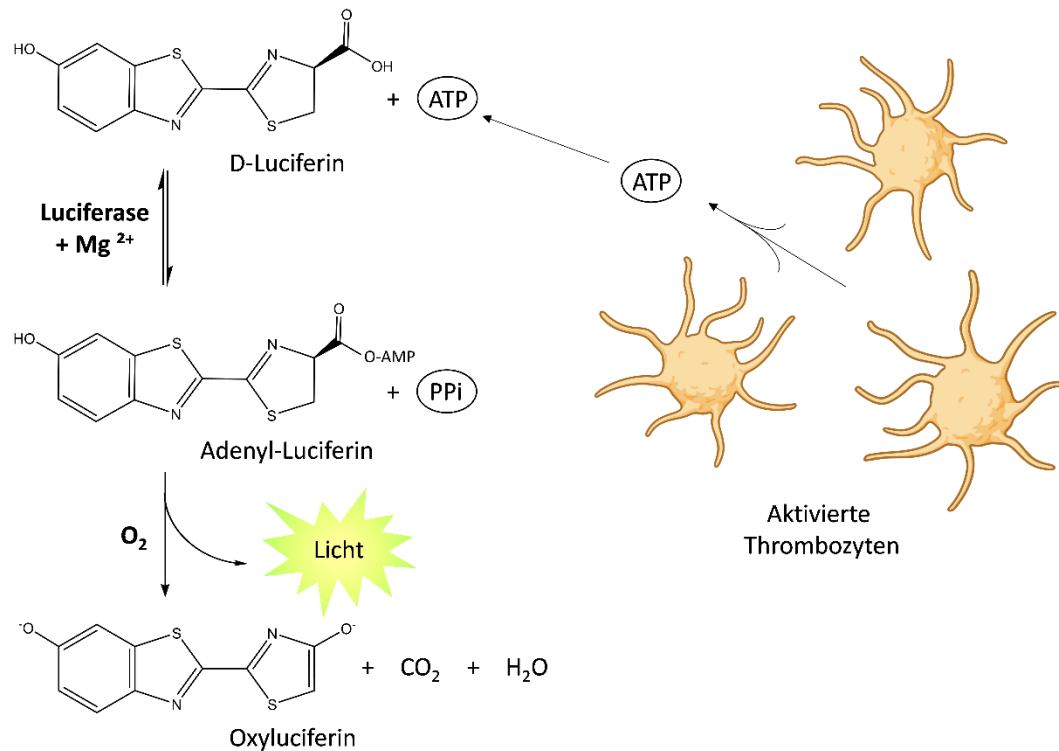


Abbildung 24: Schematische Darstellung des Messprinzips des ATP-Freisetzungs-Assays. Die Sezernierung des ATP erfolgt aus den dichten Granula aktivierter Thrombozyten und kann anhand einer durch Luciferin/Luciferase-Reaktion-induzierten Lumineszenz quantifiziert werden [14, 80]. Die Grafik wurde mit BioRender erstellt.

D-Luciferin wird in einer ATP-abhängigen enzymatischen Reaktion durch *firefly luciferase* in das energetisch angeregte Intermediat Adenyl-Luciferin überführt. In Anwesenheit von Sauerstoff zerfällt das Adenyl-Luciferin in Oxyluciferin, Kohlenstoffdioxid und Wasser und emittiert dabei Licht. Die Intensität der resultierenden Biolumineszenz, die bei einer Wellenlänge von 560 nm an einem Multiwell Reader FLUOstar™ OPTIMA gemessen wird, ist dabei proportional zur freigesetzten Menge ATP [14, 80, 390].

5.14 Wundheilung, Motilität und Proliferation

Der Einfluss einer DNA-Methyltransferase- und einer Histondeacetylase-Inhibition auf Wundheilung, Motilität und Proliferation von Mammakarzinomzellen wurde durch die Verwendung eines PHIO Cellwatcher M der Firma PHIO scientific GmbH untersucht. Es handelt sich um ein linsenloses Bildgebungsverfahren, in dem sechs voneinander unabhängige Kameras in regelmäßigen Abständen mikroskopische Bilder von Zellen aufnehmen. Diese werden dann in Echtzeit durch ein durch künstliche Intelligenz (KI)

gestütztes System analysiert und multiparametrische Daten generiert. Die KI erkennt einzelne Zellen und erfasst über einen Zeitverlauf Proliferation, Motilität oder Wundheilung einer Verletzung des Zellrasens.

Für Motilitäts- und Proliferationsmessungen werden 2 ml einer Tumorzellsuspension [5×10^4 Tumorzellen/ml] in die Kavitäten einer 6 Well Platte gegeben. Das verwendete Vollmedium wird vorher mit den entsprechenden Inhibitoren beimpft. Die Platte wird in den PHIO Cellwatcher M gestellt und nach einer einstündigen Adhäsionsphase wird die Messung gestartet.

Für Wundheilungsuntersuchungen werden Zweikammer-Kultureinsätze der Firma Ibidi GmbH genutzt. In jede Kammer werden 70 µl einer Tumorzellsuspension [$3,5 \times 10^5$ Tumorzellen/ml] pipettiert, die zuvor mit den entsprechenden Inhibitoren beimpft wurde. Nach einer 24-stündigen Inkubationszeit ist ein nahezu konfluenter Zellrasen entstanden und durch vorsichtiges Herausziehen des Kultureinsatzes wird ein Wundspalt im Zellrasen erzeugt. Jede Kavität wird vorsichtig mit DPBS gewaschen und mit neuem Inhibitor-haltigem Medium versetzt. Die Messung wird nun gestartet und die Zellen über einen Zeitverlauf von 72 - 96 h untersucht.

5.15 Statistik

Ergebnisse, die im Zuge dieser Arbeit erarbeitet und abgebildet werden, stammen von mindestens drei voneinander unabhängigen biologischen Replikaten und werden als Mittelwert $\pm$ SD angegeben. Falls nicht anders gekennzeichnet, wurden One way ANOVA-Tests für die statistische Analyse der erhaltenen Daten verwendet. Als Post-hoc Test dient der Dunnett-Test. Der Grad der statistischen Signifikanz wird mit Sternchen gekennzeichnet (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$).

6 Ergebnisse und Diskussion

6.1 Einflüsse einer deregulierten HS3ST2-Expression auf die hämatogene Metastasierung

Zunächst soll untersucht werden, ob ein erhöhter 3-*O*-Sulfatierungsgrad der tumoralen Glykokalyx auch mit einer verminderten thrombogenen Aktivität der Zellen einhergeht. Dafür werden MCF-7-Zellen genutzt, deren intrinsische HS3ST2-Expression aufgrund eines durch Hypermethylierung induzierten *silencing* schwindend gering ist [11]. Stabil transfizierte MCF-7-Zellen, in denen mittels eines Plasmides eine HS3ST2-Überexpression (MCF-7_{HS3ST2-OV}) induziert wurde, wurden freundlicherweise durch Prof. Martin Götte (Universitätsklinikum Münster; Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe) zur Verfügung gestellt. MCF-7-Zellen, die mit einem pcDNA3.1-Kontrollplasmid transfiziert wurden, dienen außerdem als Negativkontrolle, um etwaige, zufällige Integrationseffekte auszuschließen (MCF-7_{vector}) [270].

6.1.1 Quantifizierung der veränderten HS3ST2-Expression und fluoreszenz-mikroskopische Untersuchung der 3-*O*-Sulfatierung in MCF-7-Zellen

Zu Beginn der Versuchsreihe wird die Effizienz der HS3ST2-Transfektion überprüft. Dafür wird die HS3ST2-Expression der Zellen mittels qPCR und Western Blot untersucht (Abbildung 25 A). Das mRNA-Level der MCF-7_{HS3ST2-OV} ist verglichen mit dem der MCF-7_{vector} signifikant erhöht. Im Falle der Proteinexpression zeichnet sich ein ähnliches Bild ab: Während bei den Vektorzellen keinerlei HS3ST2 nachgewiesen werden kann, ist bei der überexprimierenden Zellvariante eine stark ausgeprägte Proteinbande auf Höhe des Zielproteins zu erkennen (Abbildung 25 A).

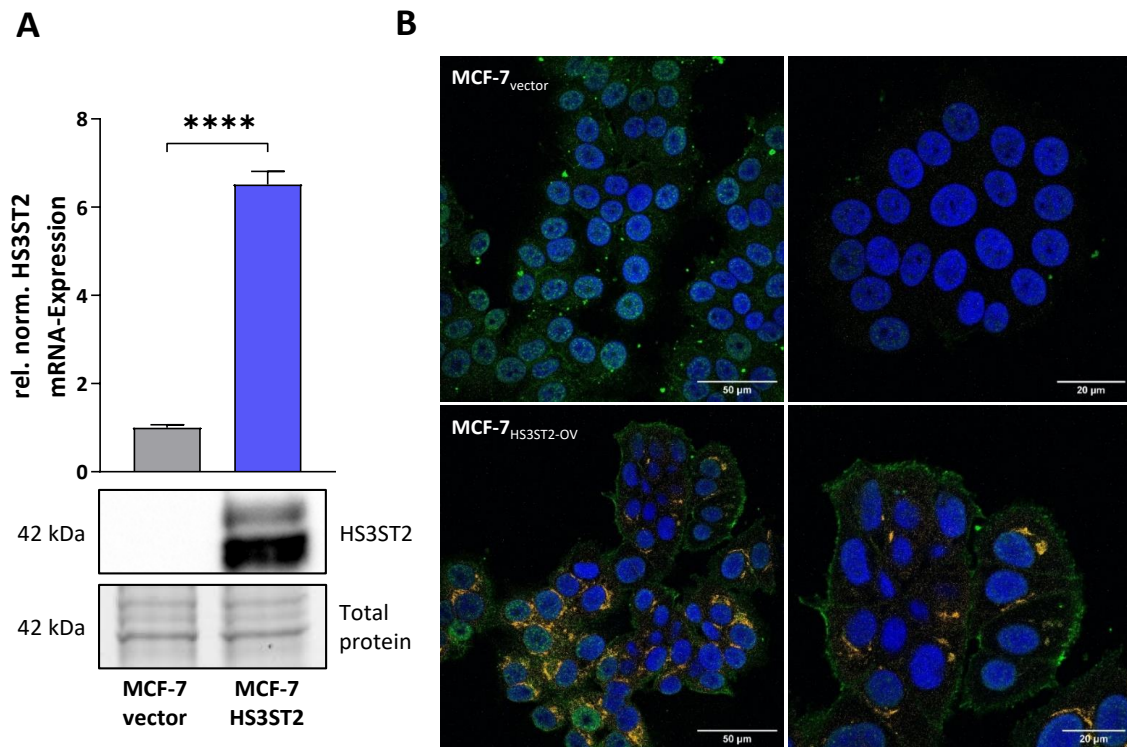


Abbildung 25: Untersuchung HS3ST2-überexprimierender MCF-7-Zellen und Einfluss auf den 3-O-Sulfatierungsstatus der Zellen. **A** Analyse der HS3ST2-Expression stabil transfizierter MCF-7-Zellen auf mRNA- und Proteinebene mittels qPCR (oben) und Western Blot (unten). **B** Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Zellen mittels CLSM. Die Immunfluoreszenzfärbung der zellulären Strukturen erfolgt mit DAPI (Zellkern; blau), FITC (3-O-sulfatierte Epitope; grün) und AlexaFluor594 (HS3ST2; gelb).

Im weiteren Verlauf soll nun untersucht werden, ob eine erhöhte HS3ST2-Expression auch zu einer verstärkten 3-O-Sulfatierung der tumoralen Oberfläche führt. Hierfür werden fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen angestellt, in denen HS3ST2 und 3-O-Sulfatierungen der HSPG mittels geeigneter spezifischer Antikörper angefärbt und visualisiert werden (Abbildung 25 B). Die Zellkerne der zu untersuchenden Zellen werden dafür mit DAPI – einem DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff – angefärbt, der in blau abgebildet wird. Intrazelluläres HS3ST2 wird in gelb und 3-O-Sulfatierungen in grün dargestellt. Anhand der mikroskopischen Aufnahmen lässt sich klar erkennen, dass die Kontrollzellen über keine detektierbare HS3ST2-Expression und nur eine schwach ausgeprägte 3-O-Sulfatierung verfügen. MCF-7_{HS3ST2-OV} zeichnet sich hingegen durch eine starke HS3ST2-Expression und 3-O-Sulfatierung aus.

6.1.2 Untersuchung der funktionellen Auswirkung einer HS3ST2-Überexpression in MCF-7-Zellen auf die TCIPA

Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine Reexpression von HS3ST2 zu einer verstärkten 3-O-Sulfatierung der MCF-7-Zellen führt, soll nun untersucht werden, ob der veränderte Sulfatierungsgrad Einfluss auf die prothrombotischen Eigenschaften der Mammakarzinomzellen nimmt. Wie in Abschnitt 2.1.4 beschrieben, ist die 3-O-Sulfatierung der tumoralen HSPG essentiell für die Bindung und Aktivität von Antithrombin [10]. Da die TCIPA in erster Linie durch Thrombin initiiert wird, dessen Aktivierung aus der Präsentation von TF resultiert, ist ein potentiell antithrombotischer Effekt durch eine verstärkte 3-O-Sulfatierung anzunehmen. Um dies zu untersuchen, werden Lichttransmissionsaggregometrie-Messungen von Thrombozyten nach Kontakt mit beiden Zellvarianten vorgenommen und miteinander verglichen (Abbildung 26 A). Anhand der Aggregogramme lässt sich klar erkennen, dass die Zellvariante MCF-7_{HS3ST2-OV} eine deutlich verzögerte Aktivierung der Thrombozyten induziert. Während sich im Falle der Vektor-Kontrollzellen bereits nach ca. 20 min eine 100%-ige Aggregation einstellt, bedarf es bei der überexprimierenden Zellvariante fast 40 min, bis dieser Zustand eingetreten ist.

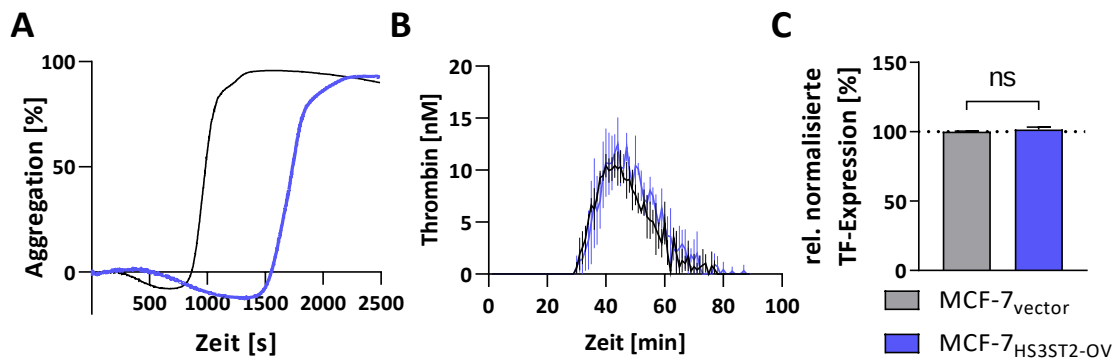


Abbildung 26: Untersuchung des funktionellen Einflusses einer HS3ST2-Überexpression auf die TCIPA induziert durch stabil transfizierte MCF-7-Zellen. **A** Untersuchung der Lichttransmissionsaggregometrie HS3ST2-überexprimierender Zellen. **B** Untersuchung des ETP induziert durch HS3ST2-überexprimierende Zellen. **C** Quantifizierung der relativen normalisierten TF-Expression. (MCF-7_{vector} = schwarz; MCF-7_{HS3ST2-OV} = blau).

Um zu überprüfen, ob der beobachtete Effekt auf eine Inhibition des durch TF-Präsentation gebildeten Thrombins zurückzuführen ist, wird das endogene Thrombinbildungspotential (ETP) der jeweiligen Zellvariante mittels Thrombingenerierungs-Assays erfasst (Abbildung 26 B). Obwohl die Überexpression der MCF-7^{HS3ST2-OV}-Zellen die Gesamtmenge des gebildeten Thrombins nicht beeinflusst, kann trotzdem eine gering verzögerte *lag time* beobachtet werden.

Abschließend wird die TF-Expression der Zellen mittels Durchflusszytometrie untersucht, um so eventuelle Effekte durch eine veränderte Ausstattung mit dem Gerinnungsfaktor auszuschließen. Da die Hochregulierung der Sulfotransferase keinen Einfluss auf die TF-Expression hat, kann die beobachtete antithrombogene Wirkung aus der verstärkten 3-*O*-Sulfatierung der Zellen resultieren (Abbildung 26 C).

6.2 Einfluss epigenetisch wirksamer Wirkstoffe auf das Expressionsprofil und Sulfatierungsmuster von Mammakarzinomzellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Überexpression von HS3ST2 in MCF-7-Mammakarzinomzellen zu einer attenuierten Koagulabilität führte, soll im weiteren Verlauf dieser Dissertationsarbeit der Einfluss der DNMTi Azacytidin und FdCyd sowie des HDACi Vorinostat auf den prothrombotischen Phänotyp der Mammakarzinomzellen mittels geeigneter *in vitro*-Assays untersucht werden. Neben MCF-7-Zellen werden außerdem Untersuchungen an der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 vorgenommen, die sich neben einer erhöhten Aggressivität außerdem durch eine deutlich höhere intrinsische TF-Expression auszeichnet. Abgesehen von HS3ST2 wird außerdem die Expression der übrigen bekannten 3-*O*- und 6-*O*-Sulfotransferasen untersucht.

6.2.1 Zytotoxizitätsbestimmung der verwendeten Inhibitoren

Zu Beginn der Versuchsreihe werden die Zytotoxizitäten der jeweiligen Inhibitoren mit Hilfe von MTT-Messungen untersucht. Ziel ist die Ermittlung einer subtoxischen Konzentration der Inhibitoren, mit der die Tumorzellen im weiteren Verlauf behandelt werden sollen. Die MTT-Kurven sowie die ermittelten EC₅₀-Werte werden in Abbildung 27

dargestellt. Die gemessenen EC_{50} -Werte der Inhibitoren Azacytidin und Vorinostat liegen allesamt im einstelligen mikromolaren Konzentrationsbereich.

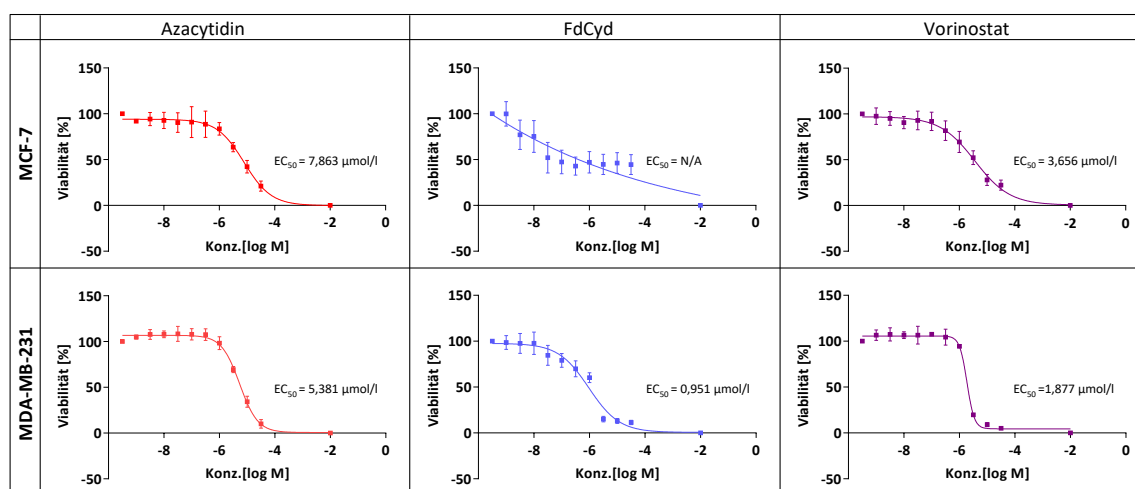


Abbildung 27: Zytotoxizitätsuntersuchungen der verwendeten Inhibitoren mittels MTT-Assay. Die Mammakarzinomzellen werden für 72 h mit einer halblogarithmischen Verdünnungsreihe der entsprechenden Inhibitoren inkubiert. Als Positivkontrolle dient DMSO (gekennzeichnet als 10^{-2}) und als Negativkontrolle wird den Zellen DPBS (gekennzeichnet als $10^{-9,5}$) hinzugegeben. Anhand des sigmoidalen Kurvenverlaufs wird der EC_{50} -Wert [$\mu\text{mol/l}$] ermittelt.

Betrachtet man die MTT-Messungen der FdCyd-behandelten MCF-7-Zellen fällt auf, dass sich kein sigmoidaler Kurvenverlauf einstellt. Stattdessen fällt die Viabilität der Zellen bereits ab einer Konzentration im dreistelligen nanomolaren Bereich auf ca. 50 % ab, sinkt aber im weiteren Verlauf – selbst bei einer Konzentration von ca. $31,6 \mu\text{M}$ (halblogarithmischer Verdünnungsschritt $10^{-4,5}$) – nicht weiter ab. Dieser atypische Kurvenverlauf lässt darauf schließen, dass FdCyd die mitochondriale Stoffwechselaktivität und somit die Umsetzung des MTT beeinflusst. Im Falle der MDA-MB-231-Zellen ergibt sich zwar ein sigmoidaler Kurvenverlauf, wobei auch hier zu beobachten ist, dass die Viabilität der Zellen ebenfalls bereits in nanomolaren Konzentrationsbereichen absinkt. Auch hier ist davon auszugehen, dass die errechnete Zytotoxizität ($EC_{50} = 0,951 \mu\text{M}$) nicht den tatsächlichen toxischen Konzentrationsbereich des Inhibitors abbildet. Visuelle, lichtmikroskopische Kontrollen und Viabilitätsmessungen mit Hilfe eines CASY®1 Modell TT Cell Counters konnten zeigen, dass die Inkubation der Zelllinien mit FdCyd mit einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ über 48 h zu keiner nennenswerten Beeinträchtigung der Viabilität führte. Auf Grundlage der Zytotoxizitätsuntersuchungen wird daher für die folgenden Versuchsreihen stets eine Inhibitorkonzentration von $1 \mu\text{M}$ genutzt.

6.2.2 Untersuchung des Einflusses der verwendeten Inhibitoren auf die Proliferationsrate

Neben Zytotoxizitätsuntersuchungen soll außerdem der Einfluss der verwendeten Inhibitoren auf die Proliferationsrate der Zellen untersucht werden. Dafür wird die Konfluenz des Zellrasens unter Verwendung eines PHIO Cellwatcher M über einen Zeitraum hinweg beobachtet, der bis zum Erreichen einer vollständigen Konfluenz benötigt wird. Anschließend werden die mikroskopischen Aufnahmen mit Hilfe eines implementierten, KI-basierten Programmes analysiert. Die Proliferationsrate der Zellen leitet sich dabei aus der Konfluenzzunahme in % pro Zeit ab. Die verwendete Konzentration der Inhibitoren beträgt entsprechend der vorherigen Zytotoxizitätsuntersuchungen 1 μ M. Aufgrund der zeitlich limitierten Verfügbarkeit des Gerätes handelt es sich bei den in diesem Kapitel abgebildeten Ergebnissen um Einzelmessungen (n = 1).

Die Konfluenzen der Zelllinie MCF-7 werden in Form mikroskopischer Aufnahmen in Abbildung 28 A zu ausgewählten Zeitpunkten dargestellt. Lebende Zellen werden durch den PHIO Cellwatcher M erkannt und gelb gefärbt abgebildet. Tote Zellen oder unbewachsene Areale werden hingegen in violett dargestellt. Bereits nach 48 h lässt sich erkennen, dass FdCyd die Proliferationsrate der Zellen mindert. Bei den übrigen Behandlungen ist zu diesem Zeitpunkt keine visuelle Einschränkung des Wachstums zu beobachten. Verglichen mit der DMSO-Kontrolle lässt sich nach 120 h festhalten, dass FdCyd und Vorinostat die Proliferation stark hemmen. Azacytidin hingegen scheint die Proliferation der Zellen zu begünstigen. Betrachtet man die Proliferationskurven (Abbildung 28 C), lässt sich erkennen, dass die Inhibitoren das Wachstum der Zellen in den ersten 50 h nicht oder nur marginal beeinflussen. Um die Proliferationsrate in der Inkubationszeit der nachfolgenden Experimente besser evaluieren zu können, wird die Wachstumsrate nach 48 h bestimmt (Abbildung 28 B). Während die Konfluenz der Zellrasen während der Inkubation mit DMSO, Azacytidin und Vorinostat mit einer Geschwindigkeit von ca. 2 %/h zunehmen, verringert sich die Proliferationsrate unter Einfluss von FdCyd auf ca. 1 %/h. Anhand der KI-gestützten Erkennung lebendiger Zellen kann allerdings bestätigt werden, dass die Zellen unter Einfluss von FdCyd trotz eingeschränkter Proliferationsrate noch über eine ausreichende Viabilität verfügen.

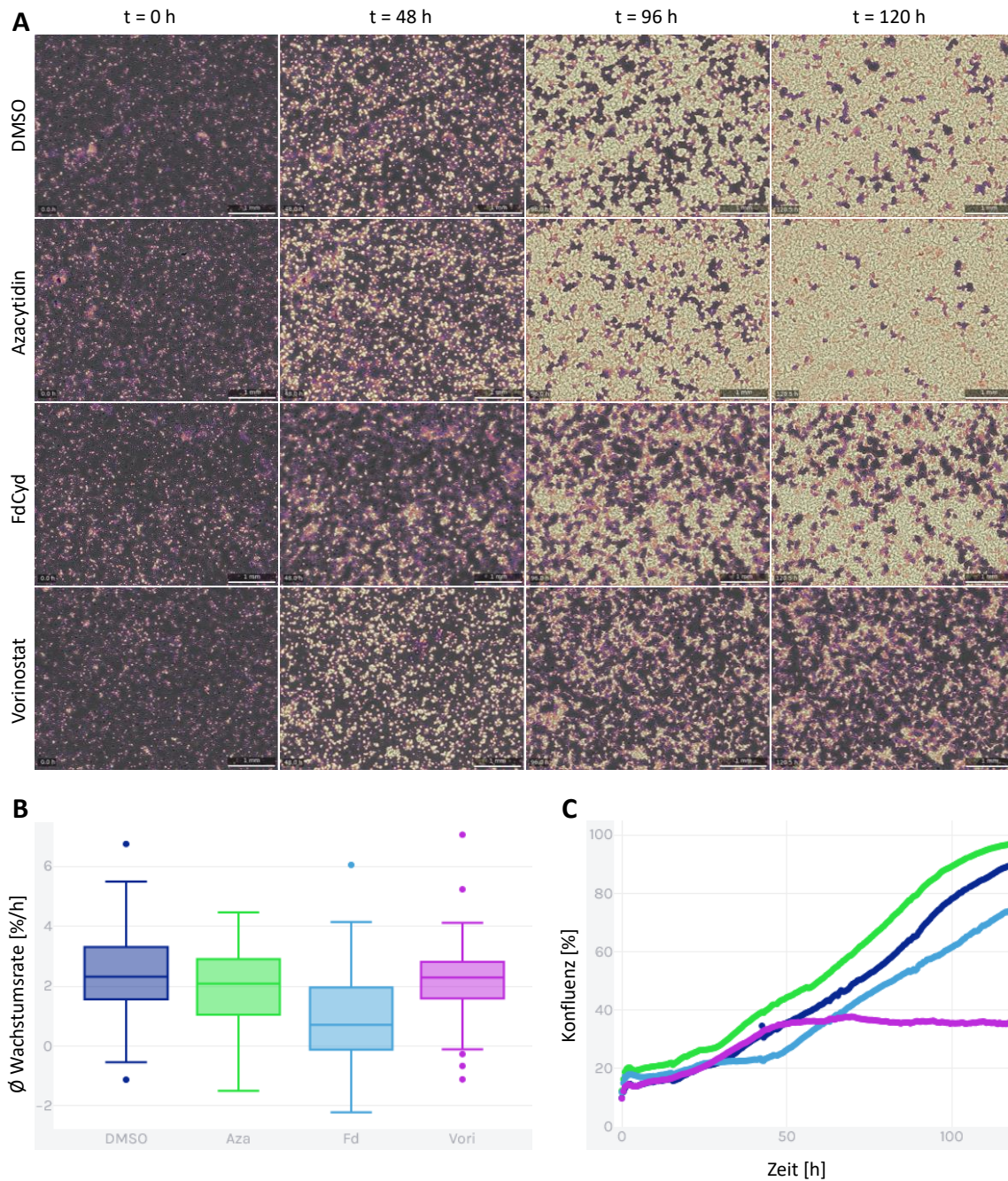


Abbildung 28: Untersuchung der Proliferationsrate von MCF-7-Zellen unter Einfluss einer DNMT- bzw. HDAC-Inhibition mittels eines PHIO Cellwatcher M und anschließender KI-gestützter Analyse der Konfluenz und Viabilität des Zellrasens. **A** Abbildung mikroskopischer Aufnahmen der Zellrasen zu ausgewählten repräsentativen Zeitpunkten. Lebende Zellen werden in gelb und tote Zellen oder unbewachsende Areale in violett dargestellt. **B** Analyse der Proliferationsrate nach 48-stündiger Inkubation mit den entsprechenden Inhibitoren. **C** Darstellung der Wachstumskurven über einen Zeitverlauf von 120 h (DMSO = dunkelblau; Azacytidin = grün; FdCyd = hellblau; Vorinostat = violett). Bei der hier abgebildeten Versuchsreihe handelt es sich lediglich um eine biologische Stichprobe ($n = 1$), weswegen keine statistische Analyse durchgeführt wurde.

Analog hierzu werden auch Untersuchungen an der Zelllinie MDA-MB-231 vorgenommen. Die Wachstumsrate der aggressiveren triple-negativen Zelllinie fällt höher aus als die der MCF-7-Zellen, weswegen bereits nach 72 h eine vollständige Konfluenz des Zellrasens erreicht wird (Abbildung 29 A). Nach 24 h lässt sich kein visueller Unterschied hinsichtlich der Konfluenz unter Einfluss der verwendeten Inhibitoren erkennen. Auch die Viabilität scheint durch die Inkubation zu diesem Zeitpunkt unbeeinflusst. Nach 72 h wird die Proliferation der Zellen durch die Inhibitoren Azacytidin und Vorinostat nur marginal attenuiert. FdCyd führt hingegen nach ca. 50 h zu einer Abnahme der Proliferation. Betrachtet man die Proliferationsrate über einen Zeitraum von 48 h (Abbildung 29 B) – also der Inkubationszeit, die für die nachfolgenden Experimente festgelegt wurde – lässt sich keine Beeinträchtigung der Wachstumsgeschwindigkeit feststellen. Die Proliferationsrate beträgt unter allen Behandlungen ca. 3 %/h.

Die Behandlungen der Zellen mit den Inhibitoren mit einer Konzentration von 1 μ M führen zu keiner Beeinträchtigung der Viabilitäten oder der Proliferationsraten. Lediglich die Behandlung der MCF-7-Zellen mit FdCyd führt zu einer verminderten Proliferationsrate. Die Viabilität der Zellen wird dadurch allerdings in keinem erheblichen Maße negativ beeinflusst.

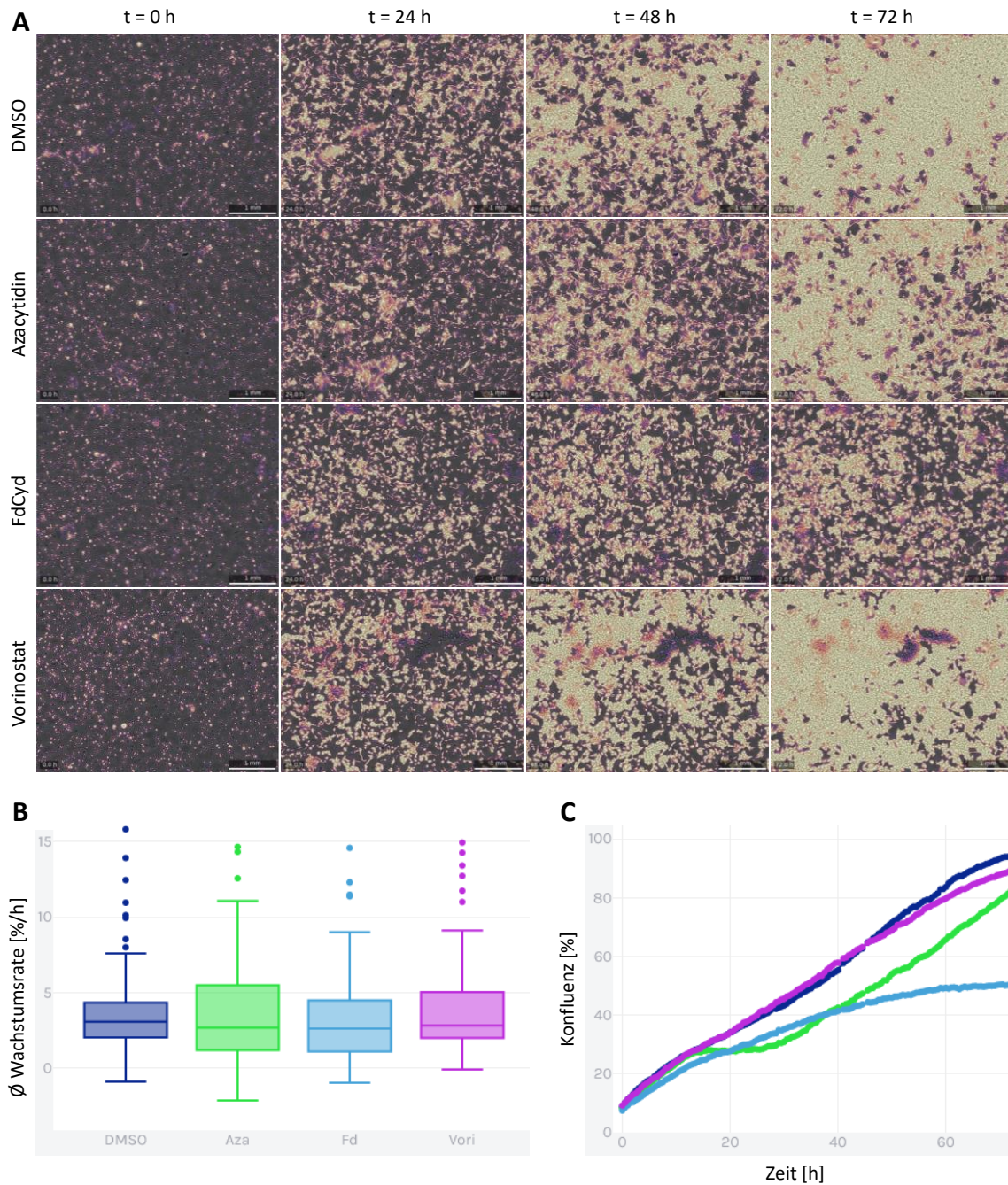


Abbildung 29: Untersuchung der Proliferationsrate von MDA-MB-231-Zellen unter Einfluss einer DNMT- bzw. HDAC-Inhibition mittels eines PHIO Cellwatcher M und anschließender KI-gestützter Analyse der Konfluenz und Viabilität des Zellrasens. **A** Abbildung mikroskopischer Aufnahmen der Zellrasen zu ausgewählten repräsentativen Zeitpunkten. Lebende Zellen werden in gelb und tote Zellen oder unbewachsende Areale in violett dargestellt. **B** Analyse der Proliferationsrate nach 48-stündiger Inkubation mit den entsprechenden Inhibitoren. **C** Darstellung der Wachstumskurven über einen Zeitverlauf von 72 h (DMSO = dunkelblau; Azacytidin = grün; FdCyd = hellblau; Vorinostat = violett). Bei der hier abgebildeten Versuchsreihe handelt es sich lediglich um eine biologische Stichprobe ($n = 1$), weswegen keine statistische Analyse durchgeführt wurde.

6.2.3 Quantifizierung der veränderten Expression von 3-O- und 6-O-Sulfotransferasen in MCF-7-Zellen nach Behandlung mit epigenetisch wirksamen Wirkstoffen

Bevor der Einfluss einer Wirkstoffinkubation näher untersucht wird, wurden zunächst die intrinsischen Expressionsprofile der entsprechenden Heparansulfat-Sulfotransferasen der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 betrachtet. Dafür wurden die öffentlich zur Verfügung gestellten RNA-Sequenzierungs-Daten des *human protein atlas* [398] herangezogen (Abbildung 30 A). Die Analyse zeigt, dass nur marginale Mengen der HS3ST-Familie exprimiert werden. Lediglich die Isoformen HS3ST3A1, -3B1 und -5 werden von der Zelllinie exprimiert, wohingegen die Expression der Isoformen -1, -2 und -4 unterhalb der Nachweisgrenze zu liegen scheint. Die Expressionsniveaus der HS6ST-Familie liegen deutlich höher, wobei der Subtyp HS6ST1 am stärksten vertreten ist.

Die Tumorzellen werden nun mit den zuvor ermittelten, subtoxischen Konzentrationen der Inhibitoren (siehe Abschnitt 6.2.1) behandelt und für 48 h inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden aus den Zellen qPCR-Proben gewonnen und die relativen mRNA-Level der jeweiligen Sulfotransferasen ermittelt. Eine DMSO-behandelte Population dient dabei als Referenzwert. Die qPCR-Messungen (Abbildung 30 B) zeigen, dass die Azacytidin-Behandlung zu einem leichten, nicht-signifikanten Anstieg von HS3ST1, -2 und -4 sowie HS6ST1 und -2 führt. Die Expression von HS3ST3A1 und -3B1 – hier aufgrund der identischen Primersequenz zusammengefasst als HS3ST3 – nimmt unter dem Einfluss von Azacytidin ab. Trotz des ähnlichen Wirkmechanismus der beiden DNMTi, induziert die FdCyd-Behandlung eine von Azacytidin abweichende Veränderung der Expressionen. Die mRNA-Level der Subtypen HS3ST1, -2 und -3 werden verringert und die Expression von HS3ST4 bleibt unverändert. Die 6-O-Sulfotransferasen werden hingegen verstärkt exprimiert, wobei die Expression von HS6ST2 hoch signifikant erhöht wird. Vorinostat führt zu einem signifikanten Anstieg von HS3ST4 und einer nicht-signifikanten Erhöhung von HS3ST1. Die Expression der übrigen Sulfotransferasen bleibt durch den HDACi unbeeinflusst oder wird nur schwach vermindert (Abbildung 30 B).

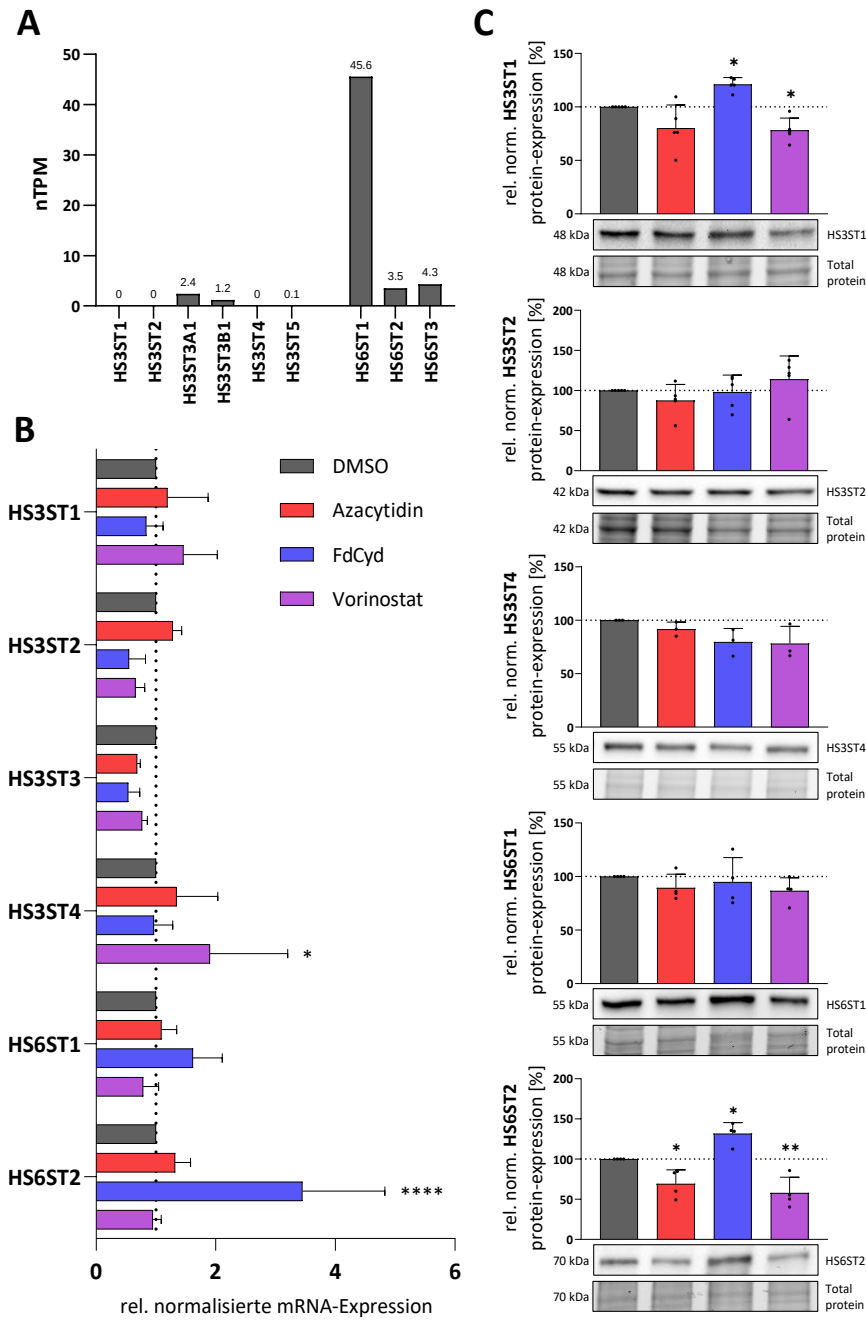


Abbildung 30: Untersuchung der Auswirkungen einer DNMT- bzw. HDAC-Inhibition auf das Sulfotransferasen-Expressionsprofil von MCF-7-Zellen. **A** Untersuchung der intrinsischen mRNA-Level diverser Heparansulfat-Sulfotransferasen unter Zuhilfenahme des human protein atlas [398]. **B** Analyse der mRNA-Level ausgewählter 3-O- und 6-O-Sulfotransferasen in MCF-7-Zellen nach Behandlung mit den jeweiligen Inhibitoren mittels qPCR. **C** Analyse der Protein-Expression ausgewählter 3-O- und 6-O-Sulfotransferasen in MCF-7-Zellen nach Behandlung mit den jeweiligen Inhibitoren mittels Western Blot-Analyse.

Um zu verifizieren, ob die veränderten mRNA-Level auch zu einer attenuierten oder gesteigerten Proteinexpression führen, werden Western Blot-Untersuchungen angestellt (Abbildung 30 C). Die Behandlung der Zellen mit Azacytidin führt erstaunlicherweise bei allen untersuchten Sulfotransferasen zu einer Herunterregulierung. Auch die Proteinexpression nach Behandlung mit FdCyd und Vorinostat stimmen nur teilweise mit den zuvor gezeigten qPCR-Daten überein. Auffallend ist hier FdCyd, das als einziger Inhibitor in der Lage zu sein scheint, eine signifikant veränderte Reexpression von HS3ST1 und HS6ST2 zu induzieren.

6.2.4 Quantifizierung der veränderten Expression von 3-O- und 6-O-Sulfotransferasen in MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit epigenetisch wirksamen Wirkstoffen

Analoge Untersuchungen sollen nun an der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 vorgenommen werden. Erneut wird zuerst das intrinsische Expressionsprofil der Zellen unter Zuhilfenahme des *human protein atlas* [398] untersucht (Abbildung 31 A). Es lässt sich feststellen, dass die Expression der 6-O-Sulfotransferasen in den MDA-MB-231-Zellen deutlich geringer ausfällt, als in MCF-7-Zellen. Die Isoformen HS6ST2 und -3 sind nicht nachweisbar oder nur knapp oberhalb der Nachweisgrenze. Die *normalized transcripts per million* (nTPM) der Isoform HS6ST1 fallen außerdem geringer aus, als in den zuvor untersuchten MCF-7-Zellen. Die gemessenen Expressionen der HS3ST-Isoformen zeigen, dass neben den Subtypen HS3ST3A1 und -3B1 eine ausgeprägte intrinsische HS3ST1-Expression in den Zellen identifiziert werden konnte.

Erneut werden die Auswirkungen einer Inhibitorbehandlung auf die jeweiligen mRNA-Expressionsprofile mittels qPCR untersucht. Lediglich Vorinostat führt hier zu einer signifikant gesteigerten Expression der Isoformen HS3ST2 und HS6ST2. Die übrigen Inhibitorbehandlungen führen nur zu nicht-signifikanten, marginalen Veränderungen der jeweiligen Expressionen, verglichen mit der DMSO-Kontrollpopulation (Abbildung 31 B).

Die Proteinanalytik stimmt erneut nur bedingt mit den qPCR-Daten überein, was nahelegt, dass für die tatsächliche Expression der Enzyme weitere regulatorische Mechanismen nachgeschaltet sind. Azacytidin nimmt keinerlei Einfluss auf die Expression der untersuchten Isoformen. Die Behandlung mit FdCyd führt zu einer signifikant erhöhten HS3ST1-Expression, wohingegen die Expression der übrigen Enzyme unverändert bleibt. Unter Einfluss von Vorinostat kann in den Zellen eine erhöhte Expression von HS3ST1 und -2 beobachtet werden. Die Expression von HS3ST4 und HS6ST1 werden verringert. Bei Western Blot-Untersuchungen der Isoform HS6ST2 konnte bei der Größe des Zielproteins keine Bande detektiert werden, was darauf schließen lässt, dass die Expression unterhalb der Nachweisgrenze zu liegen scheint.

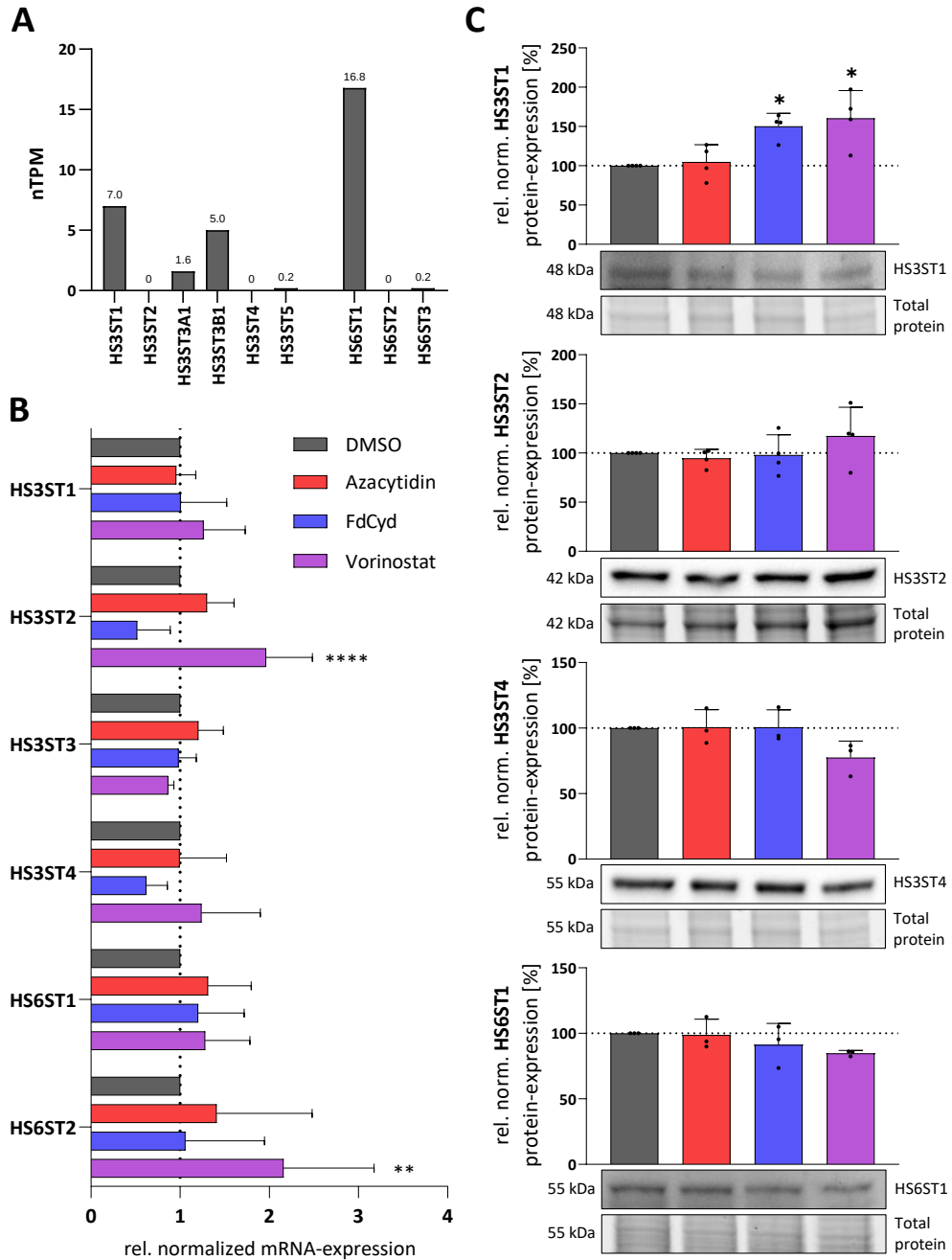
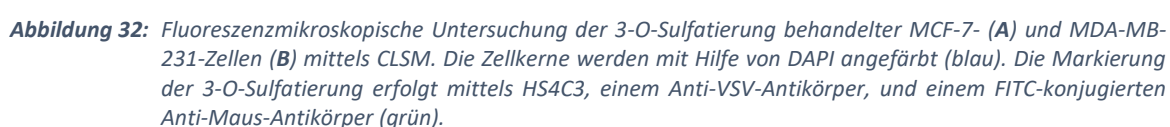


Abbildung 31: Untersuchung der Auswirkungen einer DNMT- bzw. HDAC-Inhibition auf das Sulfotransferasen-Expressionsprofil von MDA-MB-231-Zellen. **A** Untersuchung der intrinsischen mRNA-Level diverser Heparansulfat-Sulfotransferasen unter Zuhilfenahme des human protein atlas [398]. **B** Analyse der mRNA-Level ausgewählter 3-O- und 6-O-Sulfotransferasen in MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit den jeweiligen Inhibitoren mittels qPCR. **C** Analyse der Protein-Expression ausgewählter 3-O- und 6-O-Sulfotransferasen in MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit den jeweiligen Inhibitoren mittels Western Blot-Analyse.



Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der MCF-7-Zellen zeigt, dass die DMSO-behandelte Kontrollgruppe nur über einen schwachen 3-*O*-Sulfatierungsgrad verfügt. Unter Einfluss der Inhibitoren nimmt dieser zu. Im Einklang mit den Western Blot Daten, die eine signifikante Hochregulierung von HS3ST1 zeigten, führt die Behandlung der Zellen mit FdCyd zu der stärksten 3-*O*-Sulfatierung der Zelloberfläche. Auch die Behandlung mit Azacytidin und Vorinostat induziert eine verstärkte 3-*O*-Sulfatierung der Zellen, was mit Blick auf die Expressionsniveaus der 3-*O*-Sulfotransferasen unter Einfluss von Azacytidin etwas verwunderlich erscheint. Denkbar wäre, dass andere Enzyme, die an der Synthese oder Modifikation der HSPG beteiligt sind, durch die Inhibitoren verändert exprimiert werden, und so trotz geringerer Expressionslevel dennoch eine gesteigerte 3-*O*-Sulfatierung auftritt. Auch sei an dieser Stelle zu erwähnen, dass die Expression und die Aktivität eines Enzyms nicht zwangsläufig voneinander abhängen. Es könnte also auch sein, dass die Aktivität einer oder mehrerer HS3ST durch die Inhibitorbehandlung gesteigert wird.

Die Untersuchungen der MDA-MB-231-Zellen zeigen ein ähnliches Bild. Auch hier führt die Azacytidin-Behandlung zu einer schwach gesteigerten 3-*O*-Sulfatierung der Oberfläche trotz unveränderter HS3ST-Ausstattung. Die Inhibitoren FdCyd und Vorinostat, die beide eine signifikant erhöhte HS3ST1-Expression induzierten, führen auch beide zu einer verstärkten 3-*O*-Sulfatierung – wobei der durch FdCyd vermittelte Effekt deutlich stärker ausfällt.

6.2.6 Quantifizierung der AT-Bindung an den Oberflächen behandelter Mammakarzinomzellen

In der Literatur ist vielfach beschrieben, dass die 3-*O*-Sulfatierung der HSPG eine essentielle Bedeutung für die Bindung von AT hat [10]. Demnach sollte eine gesteigerte 3-*O*-Sulfatierungsrate auch mit einer verbesserten Bindungsaffinität von AT einhergehen. Da der 3-*O*-Sulfatierungsgrad unter Einfluss von FdCyd in beiden Tumorzelllinien am stärksten erhöht wurde, müsste unter dieser Behandlung auch die AT-Bindung am höchsten ausfallen. Um dies zu untersuchen, werden erneut fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen vorgenommen. Aus den präinkubierten Zellen werden CLSM-Proben

entsprechend Abschnitt 5.9.1 hergestellt, die nach erfolgter Fixierung und Blockierung mit humanem Antithrombin beimpft werden. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Zellen dann mit einem AlexaFluor647-konjugierten anti-AT-Antikörper angefärbt und zusammen mit DAPI im CLSM visualisiert. Analog zu den CLSM-Untersuchungen wird die AT-Bindung außerdem durchflusszytometrisch untersucht.

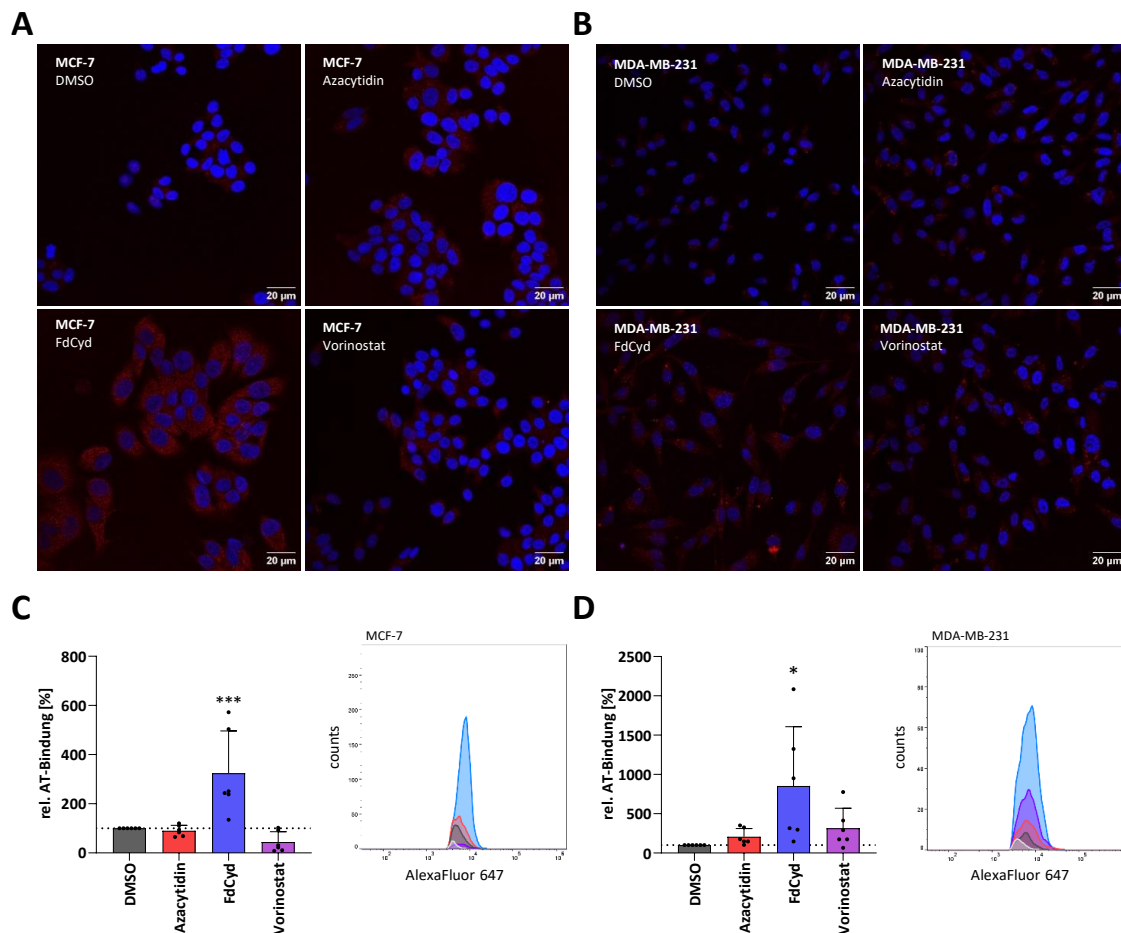


Abbildung 33: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der AT-Bindung an der Oberfläche behandelter (A) MCF-7- und (B) MDA-MB-231-Zellen. Die Zellen werden mit humanem Antithrombin versetzt, das anschließend mit einem AlexaFluor647-konjugierten Anti-AT-Antikörper markiert und in rot dargestellt wird. Die Zellkerne werden mittels DAPI angefärbt und in blauer Farbe abgebildet. Eine relative Quantifizierung der AT-Bindung, verglichen mit einer DMSO-Kontrollpopulation, wird außerdem mittels Durchflusszytometrie vorgenommen. Die durchflusszytometrischen Untersuchungen der MCF-7-Zellen werden in C und die der MDA-MB-231-Zellen in D abgebildet.

Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der MCF-7-Zellen (Abbildung 33 A) zeigt, dass die DMSO-Kontrollgruppe minimale Mengen an AT gebunden hat. Betrachtet man die Azacytidin- und Vorinostat-behandelten Zellen, kann man eine leicht gesteigerte Bindung des AT erfassen. Die Inkubation mit FdCyd führt hingegen zu einer deutlich verstärkten Bindung. Diese Daten werden teilweise von den durchflusszytometrischen

Untersuchungen gestützt (Abbildung 33 C). Während die Behandlung mit Azacytidin und Vorinostat keine verstärkte AT-Bindung induziert, führt die Behandlung mit FdCyd zu einem hoch signifikant gesteigerten AT-Bindungsvermögen der Zellen.

Betrachtet man nun die MDA-MB-231-Zellen, zeichnet sich ein ähnliches Bild ab. Erneut führen die Behandlungen mit Azacytidin und Vorinostat nur zu einer geringen und FdCyd zu einer deutlich gesteigerten Bindungsaffinität des AT (Abbildung 33 B). Die durchflusszytometrische Analyse bestätigt diese Beobachtung. Verglichen mit der DMSO-Kontrolle erhöht sich die AT-Bindung unter Einfluss FdCyd signifikant um das zehnfache – bei MCF-7-Zellen führt die Behandlung nur zu einer Erhöhung um den Faktor drei. Auch die gemessenen Effekte der übrigen Inhibitoren stimmen mit den Beobachtungen aus den CLSM-Untersuchungen überein. Sowohl Azacytidin als auch Vorinostat begünstigen die AT-Bindung (Abbildung 33 D).

6.2.7 Zwischenfazit zu den Untersuchungen der veränderten Expressionsprofile behandelter Mammakarzinomzellen

Zunächst konnte bestätigt werden, dass eine HS3ST2-Reexpression einen antikoagulativen Einfluss auf den sonst prothrombotischen Phänotyp der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 ausübt. Mittels geeigneter epigenetisch wirksamer Inhibitoren sollte daher eine Reexpression der HS3ST forciert und dessen Einfluss auf den 3-O-Sulfatierungsgrad der Zellen und das AT-Bindungspotential untersucht werden. Darüberhinaus wird die Expression der 6-O-Sulfotransferasen ebenfalls untersucht, da deren Stellenwert in der Ausbildung der AT-Bindungsdomäne nicht ignoriert werden sollte – auch wenn hinreichend belegt ist, dass in erster Linie die 3-O-Sulfatierung die Bindungsaffinität beeinflusst.

Die fluoreszenzmikroskopischen und durchflusszytometrischen Untersuchungen konnten belegen, dass insbesondere FdCyd in beiden Zelllinien zu einer gesteigerten 3-O-Sulfatierung und in Konsequenz zu einer signifikant gesteigerten AT-Bindung führte. Azacytidin und Vorinostat induzierten ebenfalls in beiden Zelllinien eine verstärkte 3-O-Sulfatierung, die in der Bildgebung der CLSM-Untersuchungen ebenfalls zu einer

verbesserten AT-Bindung führten. Die durchflusszytometrischen Untersuchungen bestätigten diese Ergebnisse nur bedingt. Dass vor allem unter Einfluss von Azacytidin keine signifikant erhöhte Expression von HS3ST, aber dafür eine verbesserte 3-O-Sulfatierung und AT-Bindung festgestellt werden konnte, erscheint widersprüchlich. Es muss jedoch bedacht werden, dass die Enzymaktivität nicht alleinig von dessen Expression abhängt. Es wäre also denkbar, dass etwaige andere Effekte die Enzymaktivität der HS3ST steigern, ohne dass die Expressionsniveaus zwangsläufig erhöht sein müssen.

Auf Grundlage der bisher erhobenen Daten ist davon auszugehen, dass sämtliche untersuchten Inhibitoren eine antithrombotische Wirkung in den untersuchten Zelllinien induzieren sollten. FdCyd, das die 3-O-Sulfatierung und die AT-Bindung am stärksten begünstigte, sollte dabei auch den stärksten antikoagulativen Effekt vermitteln.

6.3 Untersuchung des funktionellen Einflusses einer veränderten Expression von 3-O- und 6-O-Sulfotransferasen induziert durch epigenetisch wirksame Wirkstoffe in Mammakarzinomzellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Inkubation der beiden untersuchten Zelllinien mit DNMTi oder HDACi zu einer veränderten AT-Bindung führt, soll nun überprüft werden, ob sich dies auch auf den prothrombotischen Phänotyp der Tumorzellen auswirkt. Dafür wird die Lichttransmissionsaggregometrie (LTA), die ATP-Freisetzung aus Thrombozyten nach Tumorzellkontakt und das endogene Thrombinbildungspotential (ETP) der Zellen untersucht und jeweils mit einer DMSO-behandelten Kontrollgruppe verglichen.

Des Weiteren soll untersucht werden, ob die Inhibitorbehandlung einen Einfluss auf das Migrationsverhalten der Zellen nimmt. Es ist hinreichend belegt, dass die Aktivierung der Thrombozyten eine EMT der Tumorzellen induzieren kann. Dafür verantwortlich ist vor allem TGF- β_1 , das in den α -Granula der Thrombozyten gespeichert und im Falle einer Aktivierung sezerniert wird [14, 156]. Verschiedenartige *transforming growth factors* werden durch HSPG auf der tumoralen Oberfläche immobilisiert und können dann diverse zelluläre Prozesse oder Signalkaskaden initiieren [195, 207, 208]. Es soll daher untersucht werden, ob eine Behandlung mit den verwendeten Inhibitoren einen Einfluss auf das Migrationsverhalten von Tumorzellen hat. Dafür werden Wundheilungsassays

durchgeführt und eine mit Plättchenüberstand behandelte und eine Kontrollpopulation hinsichtlich der durchschnittlichen Geschwindigkeiten des jeweiligen Wundverschlusses verglichen. Da der PHIO Cellwatcher M leider nur für einen zeitlich limitierten Rahmen zur Verfügung stand, konnten nur die DNMTi untersucht werden. Es konnten außerdem keine Wiederholungen der Wundheilungsassays durchgeführt werden, weswegen die dargestellten Ergebnisse lediglich eine Einzelmessung darstellen ($n = 1$) und keine biologischen Triplikate.

6.3.1 Funktionelle Beeinflussung der TCIPA in MCF-7-Zellen

Die LTA-Untersuchungen präinkubierter MCF-7-Zellen zeigen, dass sowohl Azacytidin als auch Vorinostat die TCIPA verzögern. FdCyd-behandelte Zellen induzieren unerwarteter Weise eine schnellere TCIPA, was auf eine gesteigerte Koagulabilität der Zellen unter Einfluss des DNMTi hinweist (Abbildung 34 A). Dieser unerwartete Befund spiegelt sich auch in der ATP-Freisetzung der Thrombozyten wider. Hier erhöht FdCyd die ATP-Freisetzung aus den dichten Granula der Thrombozyten, was auf eine verstärkte Aktivierung der Plättchen hindeutet, während Vorinostat die ATP-Freisetzung signifikant vermindert. Im Falle von Azacytidin lässt sich kein Einfluss auf die ATP-Freisetzung feststellen (Abbildung 34 B). Die Untersuchungen der Tumorzell-induzierten Thrombingenerierung ergeben ein mit den LTA-Versuchen weitestgehend übereinstimmendes Ergebnis. Azacytidin und Vorinostat verlängern ähnlich wie bei der LTA die *lag time*, wodurch es zu einem späteren Einsetzen der thrombozytären Aktivierung bzw. Generierung von Thrombin kommt. Die *lag time* der MCF-7-Zellen wird dabei durch beide Inhibitoren signifikant verlängert, was einer antithrombotischen Veränderung des tumoralen Phänotyps entspricht (Abbildung 34 D). Die Menge des gebildeten Thrombins wird durch die Inhibitoren aber nur unwesentlich beeinflusst. FdCyd bewirkt dabei erneut einen gegenteiligen Effekt (Abbildung 34 C, D).

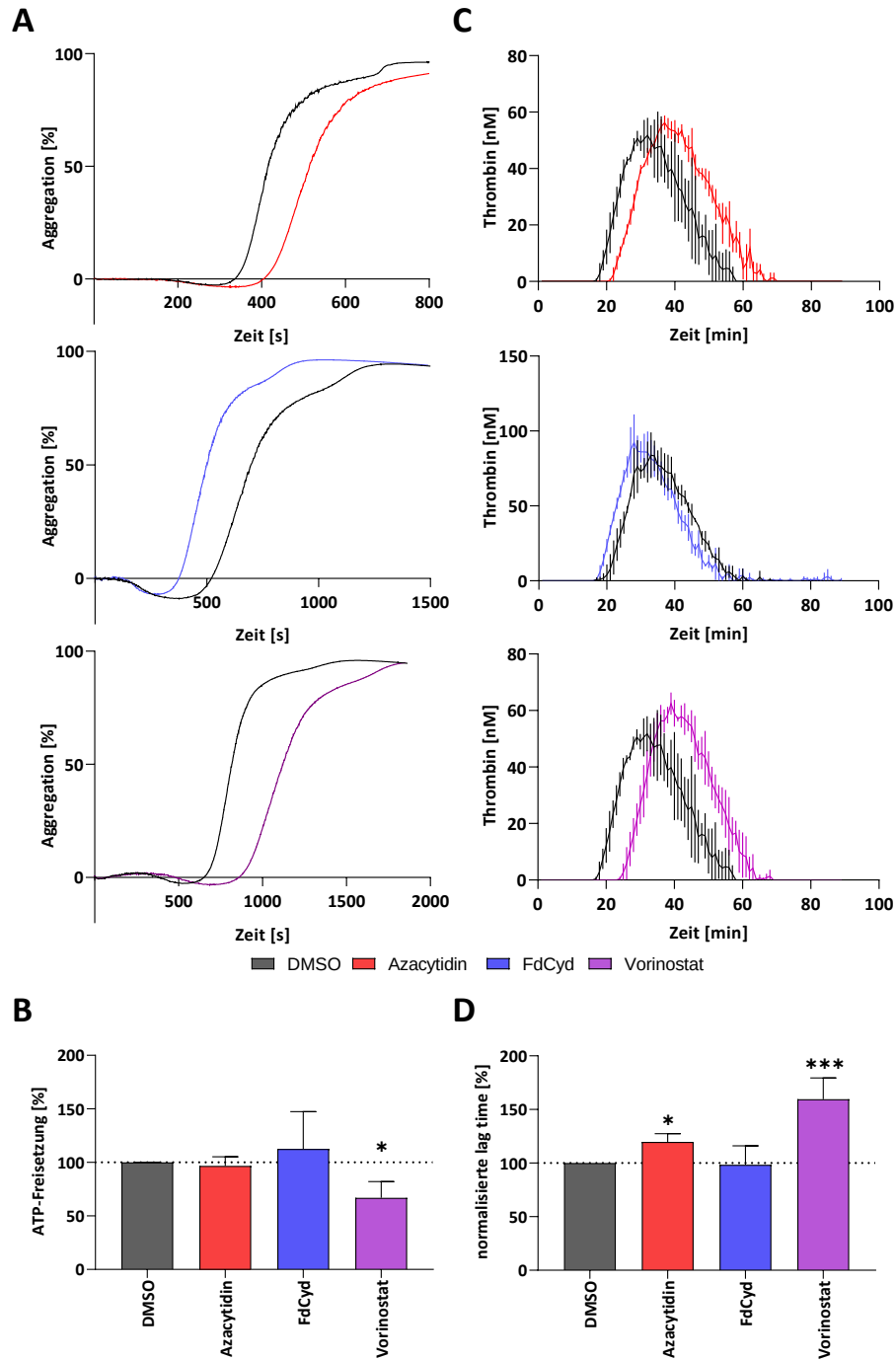


Abbildung 34: Untersuchung der funktionellen Auswirkung einer DNMT- oder HDAC-Inhibition auf die TCIPA durch MCF-7-Zellen. **A** LTA-Untersuchung nach Behandlung mit Azacytidin (rot), FdCyd (blau) oder Vorinostat (lila) verglichen mit einer DMSO-behandelten Zellpopulation (schwarz). **B** Untersuchung der ATP-Freisetzung aus den dichten Granula von Thrombozyten nach Kontakt mit präinkubierten MCF-7-Zellen. Analyse des ETP (**C**) und der lag time (**D**) unter Einfluss einer Inhibition mit den epigenetisch wirksamen Wirkstoffen.

6.3.2 Funktionelle Beeinflussung der TCIPA in MDA-MB-231-Zellen

Analoge Untersuchungen an der Zelllinie MDA-MB-231 führen zu vergleichbaren Ergebnissen. Erneut führt Azacytidin zu einer weniger stark ausgeprägten TCIPA und bewirkt, dass die Thrombozytenaktivierung erst verspätet einsetzt. Die Koagulabilität der Zellen unter Einfluss des DNMTi FdCyd nimmt ebenfalls zu. Lediglich die beobachteten Effekte während der LTA unter Einfluss des HDACi Vorinostat weichen von den zuvor erhobenen Daten ab. Anders als bei den MCF-7-Zellen verstärkt Vorinostat den prothrombotischen Phänotyp der MDA-MB-231-Zellen (Abbildung 35 A). Während die ATP-Freisetzung durch Azacytidin und Vorinostat nicht beeinflusst wird, führt FdCyd ebenfalls zu einer Erhöhung und somit zu einer verstärkten Aktivierung der Plättchen (Abbildung 35 B). Untersuchungen des ETP zeigen, dass Azacytidin nur eine leicht retardierende Wirkung auf die *lag time* ausübt. FdCyd und Vorinostat führen hingegen sowohl zu einem erhöhten ETP als auch zu einer stark verkürzten *lag time* (Abbildung 35 C, D). Die Zellen adaptieren also durch die Behandlung mit den Inhibitoren Vorinostat und FdCyd prokoagulative Eigenschaften, wohingegen Azacytidin die TCIPA vermindert.

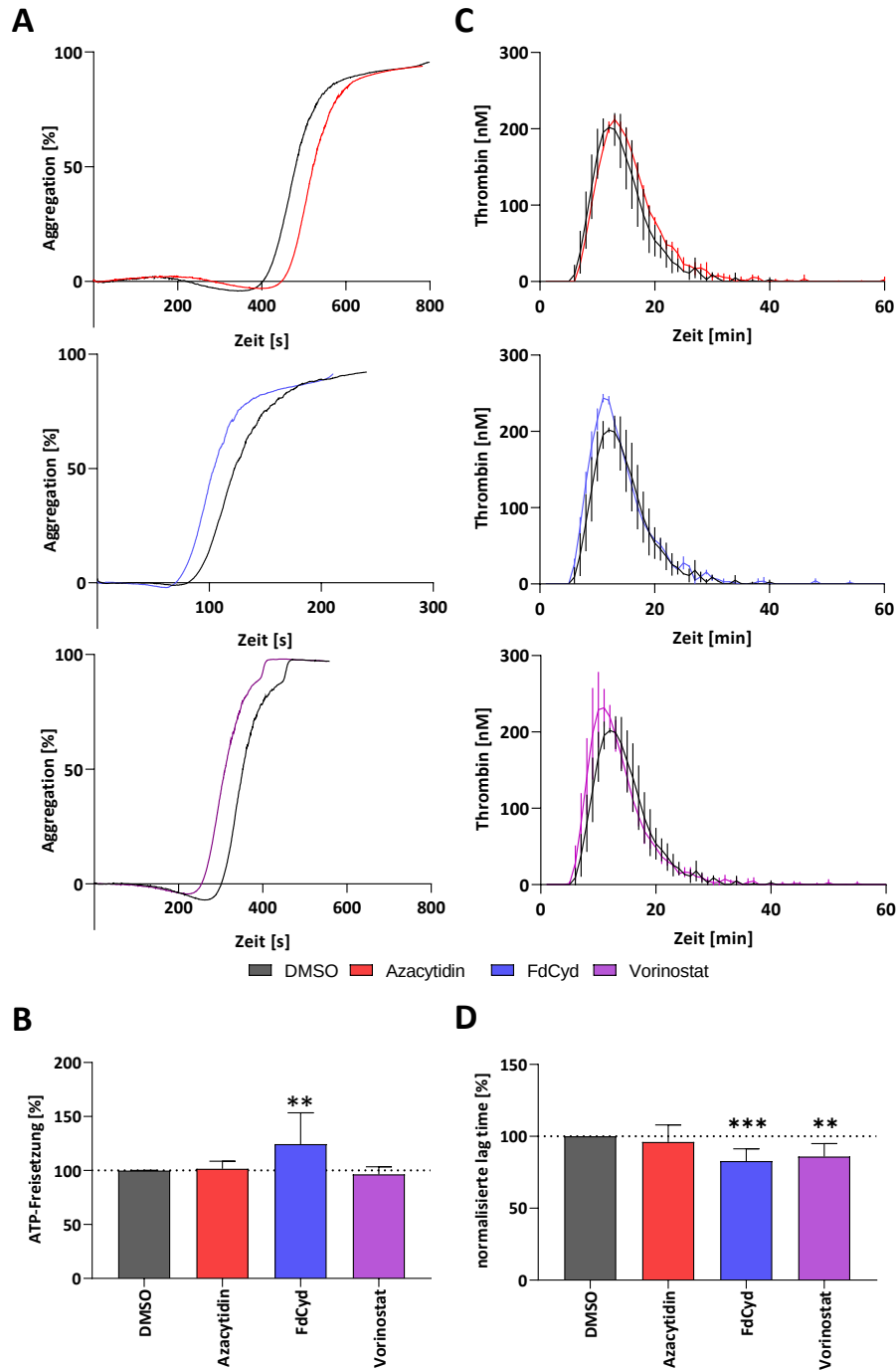


Abbildung 35: Untersuchung der funktionellen Auswirkung einer DNMT- oder HDAC-Inhibition auf die TCIPA durch MDA-MB-231-Zellen. **A** LTA-Untersuchung nach Behandlung mit Azacytidin (rot), FdCyd (blau) oder Vorinostat (lila) verglichen mit einer DMSO-behandelten Zellpopulation (schwarz). **B** Untersuchung der ATP-Freisetzung aus den dichten Granula von Thrombozyten nach Kontakt mit präinkubierten MDA-MB-231-Zellen. Analyse des ETP (**C**) und der lag time (**D**) unter Einfluss einer Inhibition mit den epigenetisch wirksamen Wirkstoffen.

6.3.3 Beeinflussung des Migrationsverhaltens von MCF-7-Zellen

Das Migrationsverhalten der Mammarkarzinomzellen soll mittels Wundheilungsassays unter Verwendung eines PHIO Cellwatcher M untersucht werden. Die Zellen werden dafür mit den jeweiligen Inhibitoren und mit Überständen von aktivierten PRP-Proben beimpft. Mit Hilfe eines selbstklebenden Zweikammersystems wird ein durch eine Wunde unterbrochener Zellrasen generiert. Die so entstehende Wunde wird dann in halbstündigen Intervallen durch ein Kamerasystem des Cellwatcher M fotografiert und anschließend KI-basiert hinsichtlich der Migrationsgeschwindigkeit untersucht.

Die ersten Untersuchungen werden an der Zelllinie MCF-7 vorgenommen. Selbst nach einer Zeitspanne von 70 h sind die Zellen nicht in der Lage den Zellspalt vollständig zu verschließen (Abbildung 36 A, C). Tumorzellen, die den Plättchenüberständen ausgesetzt waren, weisen eine höhere Wundheilungsgeschwindigkeit auf. Vergleicht man die DMSO-Kontrollgruppe mit den mit Azacytidin behandelten Zellen, lässt sich kein Unterschied hinsichtlich des Migrationverhaltens feststellen. Die Behandlung mit FdCyd führt hingegen zu einer Zunahme der durchschnittlichen Wundschließungsgeschwindigkeit, die durch die Zugabe der Plättchenüberstände sogar noch weiter erhöht wird (Abbildung 36 A, B). FdCyd alleine scheint also schon zu einer Induktion einer EMT beizutragen, was erneut für einen gesteigerten prometastatischen Phänotyp der Zellen spricht.

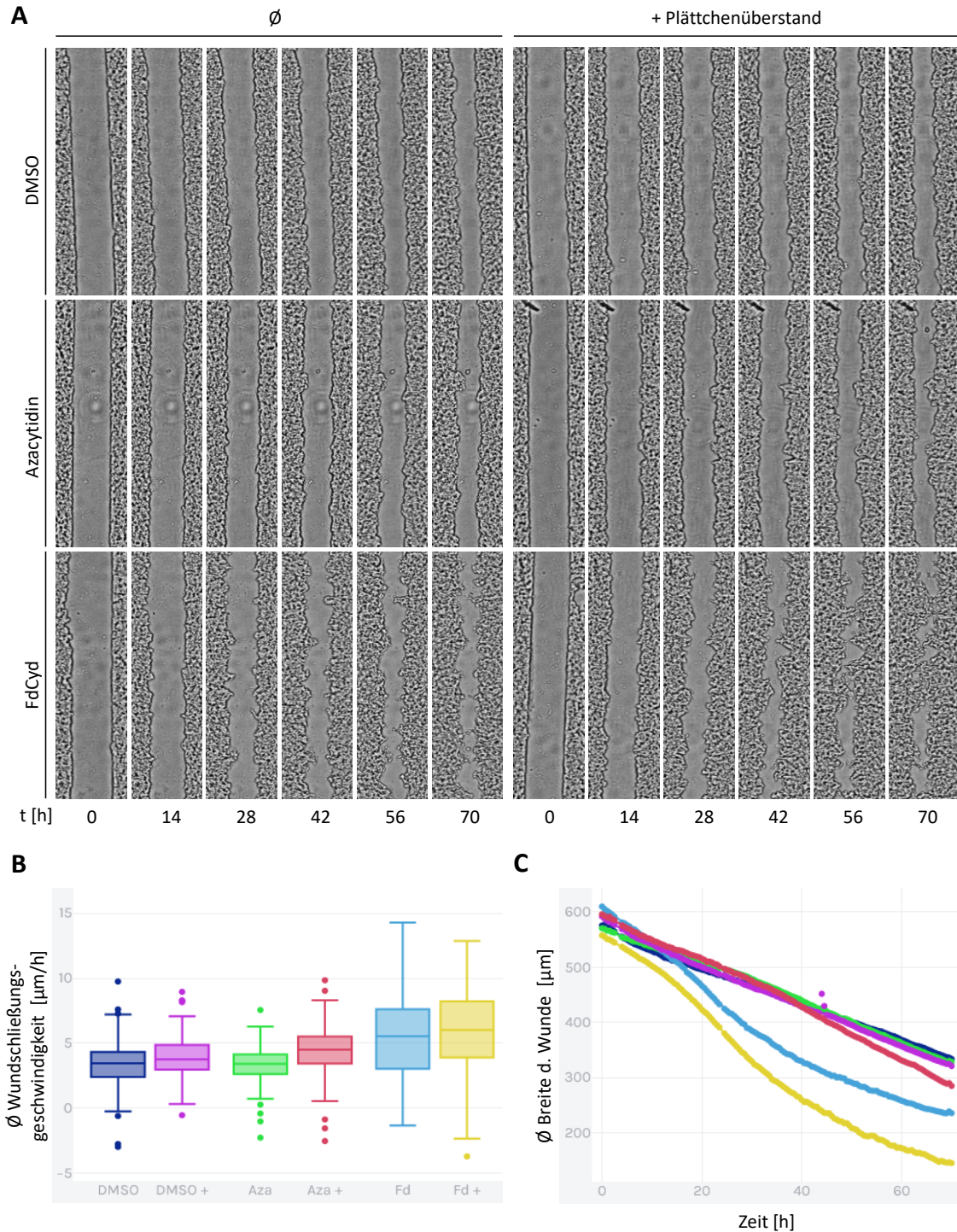


Abbildung 36: Untersuchung des Einflusses der verwendeten Inhibitoren auf das Migrationsverhalten von MCF-7-Zellen. **A** Abbildung mikroskopischer Aufnahmen der jeweiligen Wundspalten zu ausgewählten Zeitpunkten. Das Migrationsverhalten von Zellen, die nur mit dem entsprechenden Inhibitor behandelt wurden (links), werden mit dem von Zellen verglichen, die mit einer Koinkubation, bestehend aus Inhibitor und einem Plättchenüberstand, behandelt wurden (rechts). **B** Darstellung der durchschnittlichen Geschwindigkeit der Wundheilung bezogen auf einen Zeitraum von 70 h. Die Koinkubation mit einem Plättchenüberstand wird gekennzeichnet mit einem „+“. **C** Darstellung der durchschnittlichen Spaltbreite der Wunde in μm (DMSO = dunkelblau; DMSO + = violett; Azacytidin = grün; Azacytidin + = rot; FdCyd = hellblau; FdCyd + = gelb). Bei der hier abgebildeten Versuchsreihe handelt es sich lediglich um eine biologische Stichprobe ($n = 1$), weswegen keine statistische Analyse durchgeführt wurde.

6.3.4 Beeinflussung des Migrationsverhaltens von MDA-MB-231-Zellen

Analog zu den zuvor an MCF-7-Zellen durchgeführten Versuchen soll nun das Migrationsverhalten von MDA-MB-231-Zellen untersucht werden. Die triple-negative Zelllinie zeichnet sich unter anderem auch durch eine hohe Invasivität und ein potentes Migrationsverhalten aus [366]. Gleiches lässt sich auch in der hier durchgeführten Versuchsreihe erkennen. Während es bei den MCF-7-Zellen nach 70 h noch immer zu keinem Wundverschluss kam, ist der Wundspalt im Falle der DMSO- und Plättchenüberstand-behandelten MDA-MB-231-Zellen bereits nach ca. 40 h geschlossen (Abbildung 37 A, C). Zellen, die hingegen nur mit DMSO behandelt wurden, benötigen fast 60 h um einen Wundverschluss zu bewerkstelligen, was den Stellenwert der Thrombozyten auf die EMT-Induktion eindeutig unterstreicht (Abbildung 37 C). Auch die Zellen, die mit Azacytidin behandelt werden, sind in der Lage einen Wundverschluss zu erreichen. Hier ist allerdings auffällig, dass dieser Wundverschluss erst nach einer deutlichen zeitlichen Verzögerung eintritt. Die FdCyd-Behandlung führt nahezu zu einem Erliegen der Wundheilung. Nach 70 h erscheint der Wundspalt fast unverändert. Betrachtet man nun die durchschnittlichen Wundschließungsgeschwindigkeiten, zeichnet sich ein ähnliches Bild ab. Die Geschwindigkeit, die hier ermittelt wurde, bezieht sich auf den Zeitraum, bis es zum ersten vollständigen Wundverschluss kommt ($t = 40$ h). Die jeweilige Behandlung mit den Plättchenüberständen induziert unabhängig von der Inhibitor-Behandlung immer einen leichten Anstieg der Migrationsgeschwindigkeit. Auffällig ist hier aber, dass die Behandlung mit Azacytidin und Plättchenüberstand zu einer geringeren durchschnittlichen Migrationsgeschwindigkeit führt, als die alleinige DMSO-Behandlung. Azacytidin führt also nicht nur zu einer Reduktion der Migrationsgeschwindigkeit, sondern nivelliert scheinbar auch die EMT-Induktion durch Plättchenüberstände. Der durch FdCyd vermittelte Effekt fällt sogar noch stärker aus. Die Migrationsgeschwindigkeit ist um ein Vielfaches niedriger als bei der DMSO-Kontrollgruppe. Der prometastatische Phänotyp der MDA-MB-231-Zellen wird – trotz Behandlung mit Plättchenüberständen – durch Azacytidin und FdCyd stark gehemmt (Abbildung 37 C).

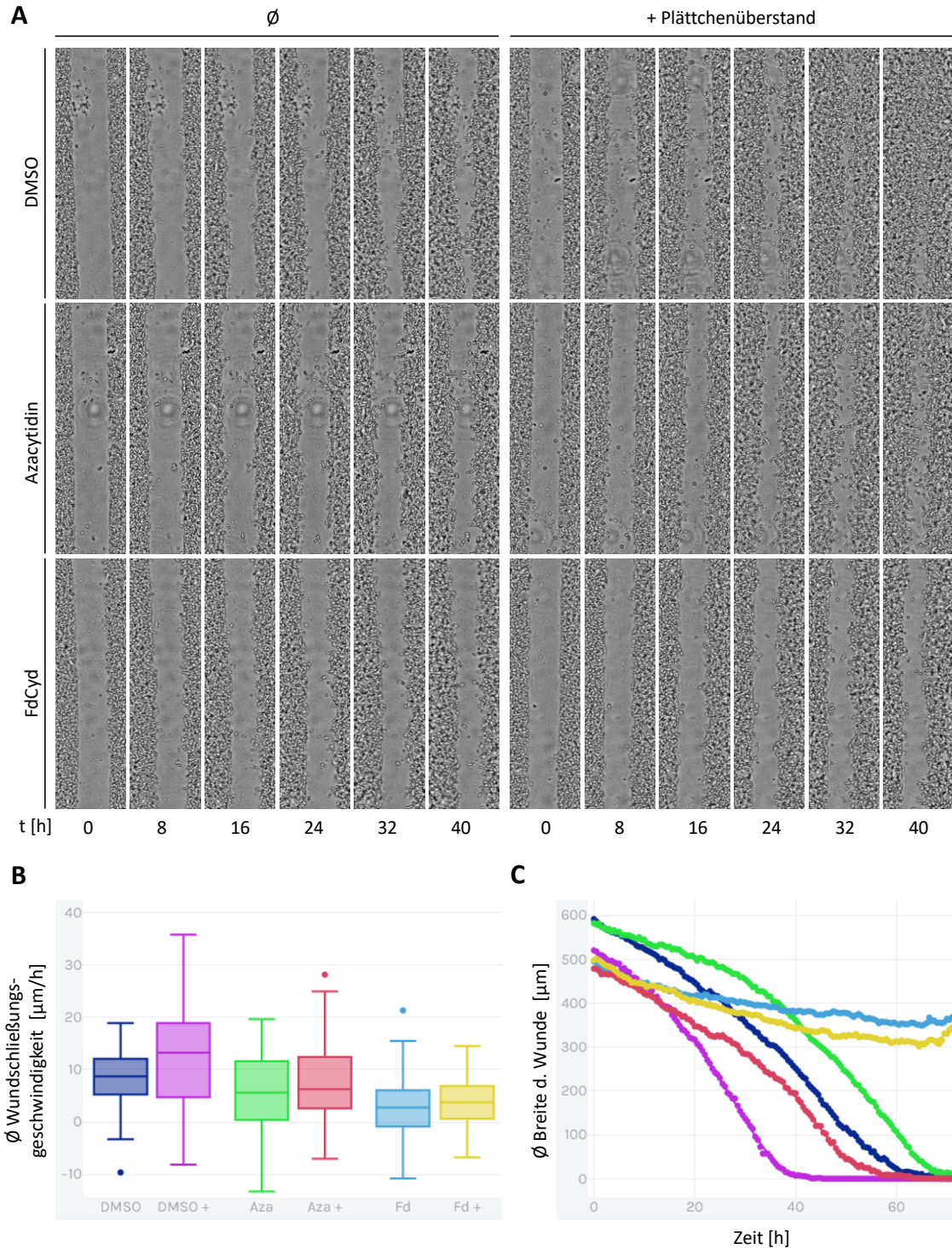


Abbildung 37: Untersuchung des Einflusses der verwendeten Inhibitoren auf das Migrationsverhalten von MDA-MB-231-Zellen. **A** Abbildung mikroskopischer Aufnahmen der jeweiligen Wundspalten zu ausgewählten Zeitpunkten. Das Migrationsverhalten von Zellen, die nur mit dem entsprechenden Inhibitor behandelt wurden (links), werden mit dem von Zellen verglichen, die mit einer Koinkubation, bestehend aus Inhibitor und einem Plättchenüberstand, behandelt wurden (rechts). **B** Darstellung der durchschnittlichen Geschwindigkeit der Wundheilung bezogen auf einen Zeitraum, bis die erste Wunde vollständig verheilt ist ($t = 40$ h). Die Koinkubation mit einem Plättchenüberstand wird gekennzeichnet mit einem „+“. **C** Darstellung der durchschnittlichen Spaltbreite der Wunde in μm (DMSO = dunkelblau; DMSO + = violett; Azacytidin = grün; Azacytidin + = rot; FdCyd = hellblau; FdCyd + = gelb). Bei der hier abgebildeten Versuchsreihe handelt es sich lediglich um eine biologische Stichprobe ($n = 1$), weswegen keine statistische Analyse durchgeführt wurde.

6.3.5 Zwischenfazit zu den funktionellen Einflüssen einer veränderten 3-O- und 6-O-Sulfotransferasen-Expression induziert durch epigenetisch wirksame Wirkstoffe in Mammakarzinomzellen

Basierend auf den zuvor erhobenen Daten hinsichtlich der Expression der jeweiligen Heparansulfat-Sulfotransferasen und der damit einhergehenden 3-O-Sulfatierung und dem AT-Bindungsvermögen der Zellen, wäre zu erwarten gewesen, dass insbesondere FdCyd zu einer stark verminderten TCIPA hätte führen sollen. Stattdessen konnte festgestellt werden, dass gerade FdCyd die Koagulabilität der MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen steigert, während der zuvor weniger vielversprechende DNMTi Azacytidin ebendiese verringerte. Die Behandlung mit Vorinostat führte zu heterogenen Ergebnissen und lässt einen zelllinienabhängigen Effekt vermuten. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass der Effekt eines epigenetisch wirksamen Inhibitors abhängig von der Tumorentität oder der Zelllinie unterschiedlich ausfallen kann. So konnten Suhovskih *et al.* beispielsweise zeigen, dass die Behandlung der androgenabhängigen, nicht-metastasierenden Prostatakarzinomzelllinie LNCaP mit Decitabin zu einer Reexpression von NDST1 führte, während dieser Effekt in androgenabhängigen, metastatischen PC-3-Prostatakarzinomzellen trotz der DNMTi-Behandlung ausblieb [399]. Gleiches wäre hier auch denkbar.

Um jedoch einen möglichen Erklärungsansatz für diese Beobachtungen postulieren zu können, bedarf es weiterer struktureller Untersuchungen der behandelten Zellen. So ist es wahrscheinlich, dass die verwendeten epigenetisch wirksamen Arzneistoffe einen weitreichenderen Einfluss auf das Proteom der Zellen haben. Neben den an der HSPG-Synthese beteiligten Enzymen könnten so zum Beispiel auch die Expression anderer Proteine oder Enzyme, die einen Einfluss auf die TCIPA nehmen können, dereguliert werden.

6.4 Untersuchung der TF-Expression in Mammakarzinomzellen nach Behandlung mit epigenetisch wirksamen Arzneistoffen

Da die Ergebnisse der funktionellen Untersuchungen der epigenetisch behandelten Zellen teilweise im Widerspruch zu den untersuchten Expressionsprofilen stehen, soll im Folgenden aufgeklärt werden, ob andere deregulierte zelluläre Mechanismen für die abweichenden Ergebnisse verantwortlich sein könnten. Da im Kontext der TCIPA vor allem TF eine Schlüsselrolle spielt, soll zuerst die Expression des TF nach Behandlung mit den epigenetisch wirksamen Arzneistoffen mittels qPCR und Durchflusszytometrie quantifiziert werden.

6.4.1 Quantifizierung der TF-Expression

Vorweg sei zu erwähnen, dass die intrinsische TF-Expression von MCF-7-Zellen verglichen mit MDA-MB-231-Zellen sehr gering ausfällt [400], was einerseits die Analytik erschwert, und auf der anderen Seite zur Konsequenz hat, dass bereits kleinste Schwankungen zu starken Veränderungen der TCIPA führen können.

In MCF-7-Zellen kann beobachtet werden, dass die mRNA-Level von TF unter Einfluss der Inhibitoren weitestgehend unverändert bleiben. Auf Proteinebene stellt sich dennoch eine signifikant erhöhte TF-Expression unter Einfluss von FdCyd ein. Azacytidin und Vorinostat verändern die TF-Expression der MCF-7-Zellen hingegen nicht (Abbildung 38 A). Grund für die Diskrepanz zwischen mRNA- und Proteinlevel könnte die sehr niedrige intrinsische TF-Expression der MCF-7-Zellen sein. Die Standardabweichung der qPCR-Messungen fallen hoch aus und eine eventuelle Hochregulation kann ggf. mit der Sensitivität des Messverfahrens nicht erfasst werden.

Bei der Zelllinie MDA-MB-231 induzieren die Inhibitoren FdCyd und Vorinostat eine hoch signifikant gesteigerte mRNA- und Proteinexpression des TF. Azacytidin verändert die tumorale TF-Ausstattung hingegen nicht (Abbildung 38 B).

Die deregulierte TF-Expression stimmt mit den Beobachtungen aus den funktionellen Untersuchungen der Mammakarzinomzellen überein. MCF-7-Zellen, die mit FdCyd behandelt wurden, exprimieren vermehrt TF und weisen dadurch eine deutlich erhöhte

Koagulabilität auf. Im Fall der MDA-MB-231-Zellen induzieren FdCyd und Vorinostat eine gesteigerte Koagulabilität, die ebenfalls auf die erhöhte TF-Expression zurückzuführen ist.

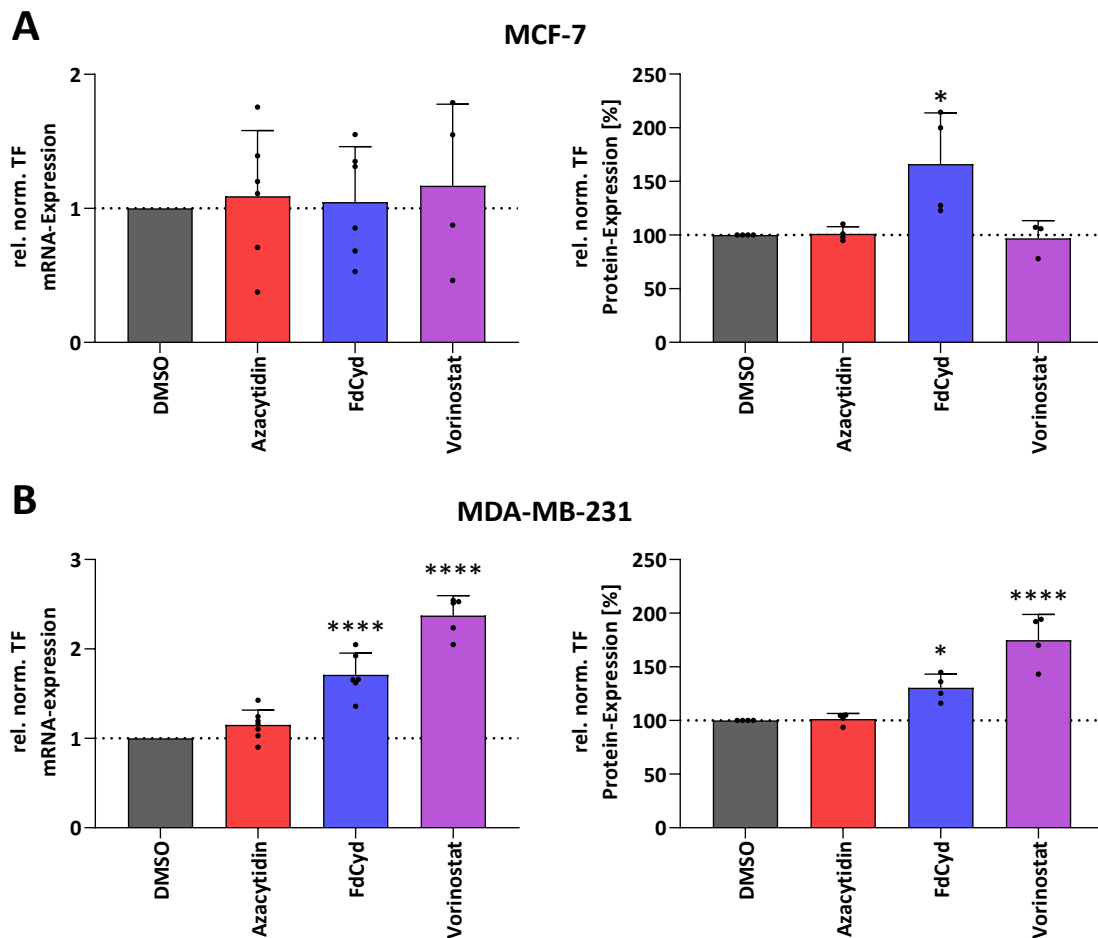


Abbildung 38: Untersuchung der TF-Expression nach Behandlung der Zellen mit epigenetisch wirksamen Arzneistoffen. Relative Quantifizierung der mRNA-Level mittels qPCR (links) und Proteinanalytik von TF mittels Durchflusszytometrie (rechts) in (A) MCF-7- und (B) MDA-MB-231-Zellen.

6.4.2 Potentielle Ursache der deregulierten TF-Expression

Ein möglicher und naheliegender Erklärungsansatz, wie die deregulierte TF-Expression zustande kommt, wäre eine direkte, durch die Inhibitoren induzierte Beeinflussung der Transkription des TF-kodierenden Gens. Die Dysregulation könnte allerdings auch Resultat einer veränderten HSPG-Ausstattung der Zellen sein. So konnte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Martin Götte gezeigt werden, dass das transmembranäre HSPG Syndecan-1 (Sdc-1) Komponenten des TF-Signalweges beeinflusst [400]. Mammakarzinomzellen weisen eine hochregulierte Sdc-1-Expression auf, was mit einer

schlechten Prognose und einem aggressiven zellulären Phänotyp assoziiert wird [401, 402]. Um nun zu untersuchen, ob eine veränderte Sdc-1-Ausstattung auch zu einer direkten Beeinflussung der TF-Expression von Brustkrebszellen führt, werden Untersuchungen an stabil transfizierten Zellvarianten der Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 vorgenommen, die entweder die humane Wildtypvariante von Sdc-1 (Sdc-1 OV) oder eine murine, konstitutiv freigesetzte Sdc-1-Variante überexprimieren (392 Sdc-1 OV). Die Zellen wurden durch Nikolova *et al.* stabil transfiziert und freundlicherweise durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Martin Götte bereitgestellt [402].

Zunächst wird die TF-Expression der Zellvarianten mittels Durchflusszytometrie quantifiziert und mit einer entsprechenden Vektorkontrolle verglichen (Abbildung 39 A). In beiden Zelllinien führt die Sdc-1-Überexpression zu einer hoch signifikant gesteigerten TF-Expression. Die beiden Zellpopulationen, welche die humane Wildtypvariante des Sdc-1 überexprimieren (Sdc-1 OV), weisen dabei eine höhere TF-Expression auf als die 392 Sdc-1-OV-Varianten. Nachdem nun gezeigt werden konnte, dass eine hochregulierte Sdc-1-Expression auch die Expression des TF erhöht, soll nun die Auswirkung auf die LTA untersucht werden. Im Fall der MCF-7-Zellen führen beide Sdc-1-überexprimierenden Zellvarianten zu einer schnelleren Aggregation der Thrombozyten, was auf einen gesteigerten prokoagulativen Phänotyp zurückzuführen ist (Abbildung 39 B oben). Bei den MDA-MB-231-Zellen führt die Überexpression der beiden Sdc-1-Varianten nur zu einer marginal veränderten LTA. Auffällig ist hier allerdings, dass die Vektorzellen bereits nach kürzester Zeit eine vollständige Aggregation des PRP induzieren (Abbildung 39 B unten). Es wäre denkbar, dass das hier verwendete Testsystem eine noch schnellere Aktivierung des PRP schlichtweg nicht abbilden kann, da ein schnelleres Aktivieren der Zymogene der Gerinnungskaskade nicht möglich ist. Daher soll neben der LTA auch die Tumorzell-induzierte Thrombingenerierung untersucht werden. Betrachtet man die repräsentativen TGA-Kurven, die in Abbildung 39 C dargestellt werden, fällt auf, dass die Sdc-1-OV- (rot) und die 392-Sdc-1-OV-Transfektionen in beiden Zelllinien zu einer schnelleren und stärkeren Thrombingenerierung führen. Auch hier induzieren die MDA-MB-231-Zellen eine schnellere und potentere Thrombingenerierung.

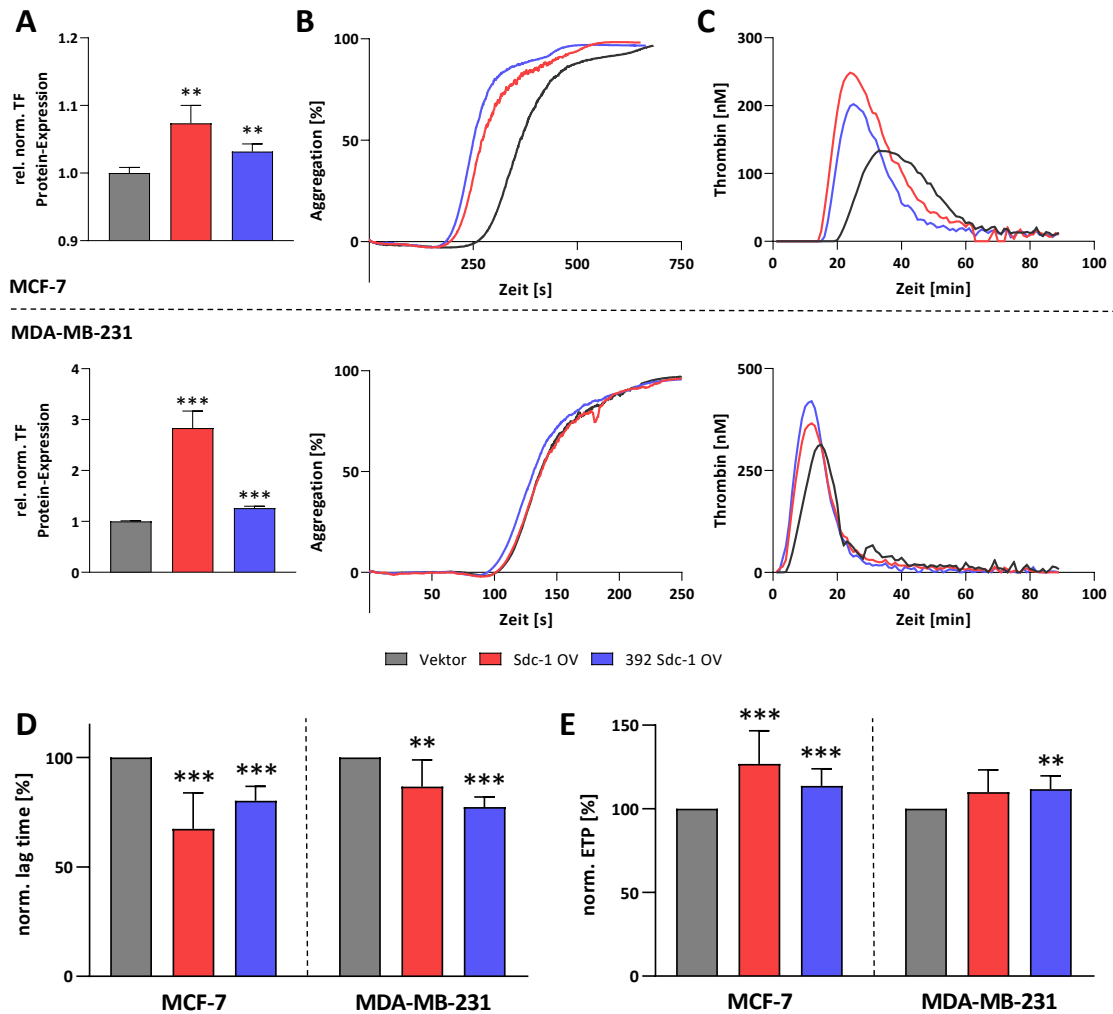


Abbildung 39: Untersuchung der TF-Expression stabil transfizierter und Sdc-1 überexprimierender MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen. **A** Relative Quantifizierung der TF-Expression mittels Durchflusszytometrie. **B** Untersuchung der LTA induziert durch stabil transfizierte Mammakarzinomzellen. **C** Untersuchung der Tumorzell-induzierten Thrombingenerierung. **D** Darstellung der normalisierten lag time, die benötigt wird, bis die Thrombingenerierung durch die Tumorzellen induziert wird. **E** Darstellung des normalisierten endogenen Thrombinbildungspotentials induziert durch stabil transfizierte Mammakarzinomzellen. (Vektorkontrolle = grau; Sdc-1 OV = rot; 392 Sdc-1 OV = blau). Modifiziert nach Hassan et al. [400].

Die relative normalisierte *lag time*, die benötigt wird, bis eine messbare Thrombinbildung einsetzt, bestätigt die vorherigen Ergebnisse. Beide überexprimierenden Varianten der jeweiligen Zelllinie führen zu einer deutlichen und signifikanten Verzögerung der *lag time* (Abbildung 39 D). Im Einklang mit diesen Ergebnissen wird auch das ETP der Zellen durch die Sdc-1-Überexpression erhöht (Abbildung 39 E).

6.4.3 Zwischenfazit zu der attenuierten TF-Expression in Mammakarzinomzellen nach Behandlung mit epigenetisch wirksamen Arzneistoffen

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine Sdc-1-Überexpression in beiden untersuchten Mammakarzinomzelllinien zu einer erhöhten TF-Expression führte und die Zellen dadurch einen gesteigert prothrombotischen Phänotyp adaptierten. Ob diese Beobachtung auch Ursache der erhöhten TF-Expression und der gesteigerten Koagulabilität nach Behandlung mit FdCyd ist, gilt es genauer zu untersuchen. Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit wurde das Transkriptom Inhibitor-behandelter MCF-7-Zellen mit Hilfe einer RNA-Sequenzierung untersucht. Betrachtet man die Sdc-1-mRNA-Level der jeweilig behandelten Zellpopulation, fällt eine hoch signifikant erhöhte Sdc-1-Expression unter Einfluss von FdCyd auf, wohingegen Azacytidin und Vorinostat zu keiner signifikanten Veränderung der Sdc-1-Level führen (Abbildung 40). Die TF-Expression wird in MCF-7-Zellen ebenfalls nur durch FdCyd dereguliert, was die Hypothese, dass die FdCyd-induzierte Hyperkoagulabilität durch eine veränderte Sdc-1/TF-Achse vermittelt wird, zulässt. Um diese Hypothese abschließend zu überprüfen, sollten weitere Untersuchungen der Sdc-1-Proteinexpression und die Sdc-1-Level der behandelten MDA-MB-231-Zellen untersucht werden, was im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit nicht mehr möglich war.

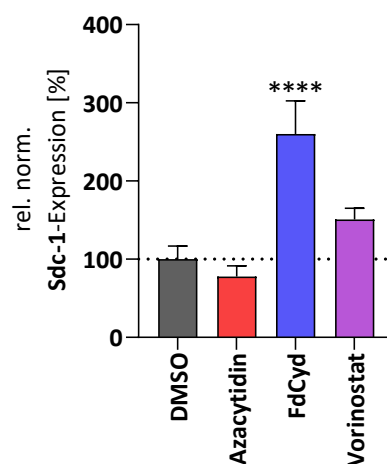


Abbildung 40: Untersuchung der relativen Sdc-1-Expression behandelter MCF-7-Zellen mittels einer RNA-Sequenzierung nach Behandlung mit epigenetisch wirksamen Inhibitoren.

7 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Dissertationsarbeit war es, das Verständnis der Interaktion von Mammakarzinomzellen und Thrombozyten im Kontext der hämatogenen Metastasierung zu erweitern. Tumorzellen profitieren erheblich von der Interaktion mit Thrombozyten. Durch die Bildung von Konglomeraten mit aktivierten Thrombozyten schützen sich disseminierte Tumorzellen vor dem Immunsystem und mechanischen Belastungen innerhalb des Blutstroms. Die Aktivierung der Thrombozyten trägt außerdem wesentlich zur Bildung prämetastatischer Nischen und zum Erfolg der hämatogenen Metastasierung bei. Daher ist es wichtig, die Kommunikation zwischen Tumorzellen und Thrombozyten genauer zu untersuchen, um neue therapeutische Ansätze in der Krebsbehandlung zu finden.

Eine deregulierte HSPG-Synthese ist zentraler Bestandteil vieler neoplastischer Prozesse in diversen Tumorentitäten und trägt wesentlich zur Malignität der entarteten Zellen bei. Besonderer Fokus lag bei dieser Arbeit daher auf der Untersuchung des Einflusses einer deregulierten Expression verschiedener Heparansulfat-Sulfotransferasen sowie der Auswirkung einer Reexpression dieser auf die TCIPA. Insbesondere die Enzymklasse der Heparansulfat-3-*O*-Sulfotransferasen war dabei von Interesse, da die 3-*O*-Sulfatierung eine sehr seltene Modifikation des Sulfatierungsmusters darstellt, dabei aber einen essentiellen Einfluss auf die Ausbildung einer suffizienten Antithrombin-bindenden Domäne entfaltet. Die Expression der Enzyme, die an der Synthese und Modifikation von HSPG beteiligt sind, wird in Tumorzellen häufig durch epigenetische Mechanismen dereguliert. Beispiele für solche epigenetischen Regulationsmechanismen, die in einer Vielzahl der Fälle zu einem *silencing* der entsprechenden Enzyme führt, sind DNA-Hypermethylierungen oder Histon-Hyperacetylierungen. Durch die Behandlung der Tumorzellen mit DNMTi bzw. HDACi soll die HS-Sulfatierung in den Tumorzellen reaktiviert und ein antithrombotischer Phänotyp erreicht werden.

Stabil transfizierte MCF-7-Zellen, die eine Überexpression an HS3ST2 aufweisen, zeigten ein stark gemindert Potential Thrombozyten zu aktivieren. Die Behandlung von MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen mit Azacytidin, FdCyd oder Vorinostat führte teilweise zu einer signifikant gesteigerten Reexpression verschiedener HS3ST und HS6ST. Alle Inhibitorbehandlungen führten dann zu einer verbesserten 3-*O*-Sulfatierung und einer

gesteigerten AT-Bindung, verglichen mit DMSO-behandelten Tumorzellen. Die daraus resultierenden funktionellen Auswirkungen entsprachen allerdings nur bedingt der Hypothese, dass eine verbesserte AT-Bindung zwingend zu einer geminderten Koagulabilität führe. Im Falle von Azacytidin konnte zwar eindrücklich gezeigt werden, dass die DNMT-Inhibition in beiden Mammakarzinomzelllinien eine antithrombotische Wirkung vermittelte – die Behandlung mit den Inhibitoren FdCyd und Vorinostat führte jedoch zu heterogenen Ergebnissen. Während Vorinostat die durch MCF-7-Zellen induzierte Plättchenaktivierung stark einschränkte, wurde die durch MDA-MB-231-Zellen vermittelte TCIPA sogar verstärkt. FdCyd führte in beiden untersuchten Zelllinien zu einem starken Anstieg der Koagulabilität.

Ein unveränderter TF-Status der Zellen wäre entscheidend, um die Auswirkung der veränderten HS3ST- und HS6ST-Ausstattung auf die TCIPA bestmöglich untersuchen zu können. Mittels durchflusszytometrischer Untersuchungen und qPCR konnte jedoch gezeigt werden, dass eine attenuierte TF-Expression – die abhängig von Inhibitor und Entität unterschiedlich ausfiel – für die heterogenen Effekte der funktionellen Untersuchungen verantwortlich war. FdCyd erhöhte dabei in beiden Zelllinien und Vorinostat nur im Fall der MDA-MB-231-Zellen die TF-Expression, was sich auch in einer gesteigerten TCIPA widerspiegelte. Lediglich Azacytidin hatte in beiden Zelllinien keinerlei Einfluss auf die TF-Level und führte dennoch zu einer Inhibition der TCIPA, was auf ein verändertes Sulfatierungsmuster und einer damit einhergehenden erhöhten AT-Bindung zurückzuführen war.

Zusammenfassend konnte im Zuge dieser Dissertationsarbeit gezeigt werden, dass eine DNMT- bzw. HDAC-Inhibition mittels epigenetisch wirksamer Wirkstoffe wie Azacytidin, FdCyd oder Vorinostat einen bedeutenden Einfluss auf den Sulfatierungsstatus und die AT-Bindungsaffinität der Mammakarzinomzellen hat, und so zu einer Veränderung der thrombogenen Eigenschaften der Zellen führen kann. Die Auswirkungen der untersuchten Inhibitoren auf die Koagulabilität der Zellen variieren dabei stark, was auf komplexe, zelllinienabhängige Mechanismen hindeutet, deren Aufklärung weiterer Erforschung bedarf. Besonders die Rolle der Sdc-1/TF-Achse in der FdCyd-induzierten Hyperkoagulabilität stellt einen wichtigen Fokus für zukünftige Studien dar. Darüber hinaus wurde der Auswirkung einer DNMT- oder HDAC-Inhibition auf die

Sulfatierungsmuster der Zellen bislang keine Beachtung geschenkt. Angesichts der hier aufgeführten Ergebnisse könnten eventuelle Veränderungen der Sulfotransferasen-Expression durchaus für den Therapieerfolg von Bedeutung sein. Im Falle von Azacytidin wäre zum Beispiel denkbar, dass eine verbesserte AT-Bindung nicht nur das Risiko von thromboembolischen Komplikationen reduzieren, sondern auch einen entscheidenden Einfluss auf die Effizienz der hämatogenen Metastasierung haben könnte. Am Beispiel von FdCyd konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung in subtoxischen Konzentrationsbereichen nicht nur zu einem Versagen der antineoplastischen Therapie, sondern auch zu einer Verschlechterung der Prognose führen könnte. Anhand des letzten untersuchten Inhibitors Vorinostat konnte verdeutlicht werden, dass zelllinienabhängige Effekte auftreten können und berücksichtigt werden sollten. Untersuchungen weiterer Zelllinien oder *in vivo*-Untersuchungen erscheinen daher sinnig, um so einen Grundstein für eine nebenwirkungsarme und patientenindividuelle Therapie zu setzen.

Aufbauend auf den Ergebnissen dieser Dissertationsarbeit sind bereits weitere Versuchsreihen geplant, die Bestandteil zukünftiger Forschungs- und Promotionsprojekte werden sollen. Derzeit wird in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jin-ping Li (Department of Medical Biochemistry and Microbiology, Uppsala University) eine exakte Analytik des Sulfatierungsmusters der HSPG unter Einfluss der verwendeten Inhibitoren entsprechend Wang *et al.* durchgeführt [403]. Da die Fertigstellung der Versuchsreihe weiterer Zeit bedarf, konnten die Ergebnisse leider keinen Einzug in diese Dissertation finden. Die exakte Analyse des Sulfatierungsmusters könnte entscheidende Hinweise auf den Einfluss einer epigenetischen Modulation auf die Ausstattung und Funktionalität der HSPG auf den Oberflächen von Tumorzellen liefern. Darüberhinaus soll die Expression der übrigen an der HSPG-Synthese beteiligten Enzyme näher betrachtet werden. So soll im Zuge einer weiteren Dissertationsarbeit der Stellenwert der Heparanase hinsichtlich der AT-Bindung und der hämatogenen Metastasierung näher betrachtet werden.

8 Literaturverzeichnis

1. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2024; 74(3):229–63. doi: 10.3322/caac.21834.
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2021; 71(3):209–49. doi: 10.3322/caac.21660.
3. Bray F, Laversanne M, Weiderpass E, Soerjomataram I. The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. *Cancer* 2021; 127(16):3029–30. doi: 10.1002/cncr.33587.
4. Breast cancer; 2024 [Stand: 23.06.2024]. Verfügbar unter: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>.
5. Dillekås H, Rogers MS, Straume O. Are 90% of deaths from cancer caused by metastases? *Cancer Med* 2019; 8(12):5574–6. doi: 10.1002/cam4.2474.
6. Labelle M, Hynes RO. The Initial Hours of Metastasis: The Importance of Cooperative Host-Tumor Cell Interactions during Hematogenous Dissemination. *Cancer Discovery* 2012; 2(12):1091–9. doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0329.
7. Fares J, Fares MY, Khachfe HH, Salhab HA, Fares Y. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2020; 5(1):28. doi: 10.1038/s41392-020-0134-x.
8. Schlesinger M. Role of platelets and platelet receptors in cancer metastasis. *Journal of Hematology & Oncology* 2018; 11. doi: 10.1186/s13045-018-0669-2.
9. Denys A, Allain F. The Emerging Roles of Heparan Sulfate 3-O-Sulfotransferases in Cancer. *Frontiers in Oncology* 2019; 9:507. doi: 10.3389/fonc.2019.00507.

10. Chopra P, Joshi A, Wu J, Lu W, Yadavalli T, Wolfert MA et al. The 3-O-sulfation of heparan sulfate modulates protein binding and lyase degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2021; 118(3). doi: 10.1073/pnas.2012935118.
11. Miyamoto K, Asada K, Fukutomi T, Okochi E, Yagi Y, Hasegawa T et al. Methylation-associated silencing of heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase-2 (3-OST-2) in human breast, colon, lung and pancreatic cancers. *Oncogene* 2003; 22(2):274–80. doi: 10.1038/sj.onc.1206146.
12. Lüllmann H, Mohr K. Taschenatlas Pharmakologie. 7. Aufl. Stuttgart New York: Thieme; 2014; ISBN: 978-3-13-707707-7.
13. Silbernagl S, Despopoulos A, Draguhn A, Hrsg. Taschenatlas Physiologie. 9. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2018; ISBN: 978-3-13-241030-5 978-3-13-241033-6 [Stand: 05.06.2020]. Verfügbar unter: <https://eref.thieme.de/10.1055/b-006-149287>.
14. Michelson AD, Hrsg. Platelets. 3rd ed. London, Waltham, MA: Academic Press; 2013; ISBN: 978-0-12-387837-3.
15. Geisslinger G, Menzel S, Gudermann T, Hinz B, Ruth P, Mutschler E. Mutschler Arzneimittelwirkungen: Pharmakologie - Klinische Pharmakologie - Toxikologie. 11., völlig neu bearbeitete Aufl. 2020: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart; 2019; ISBN: 978-3-8047-3663-4.
16. Bergmeier W, Hynes RO. Extracellular matrix proteins in hemostasis and thrombosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012; 4(2). doi: 10.1101/cshperspect.a005132.
17. Grilz E, Königsbrügge O, Posch F, Schmidinger M, Pirker R, Lang IM et al. Frequency, risk factors, and impact on mortality of arterial thromboembolism in patients with cancer. *Haematologica* 2018; 103(9):1549–56. doi: 10.3324/haematol.2018.192419.
18. Herr AB, Farndale RW. Structural insights into the interactions between platelet receptors and fibrillar collagen. *Journal of Biological Chemistry* 2009; 284(30):19781–5. doi: 10.1074/jbc.R109.013219.

19. Ruggeri ZM, Mendolicchio GL. Adhesion mechanisms in platelet function. *Circ Res* 2007; 100(12):1673–85. doi: 10.1161/01.RES.0000267878.97021.ab.
20. Lenting PJ, Christophe OD, Denis CV. von Willebrand factor biosynthesis, secretion, and clearance: connecting the far ends. *Blood* 2015; 125(13):2019–28. doi: 10.1182/blood-2014-06-528406.
21. Mendolicchio GL, Ruggeri ZM. New perspectives on von Willebrand factor functions in hemostasis and thrombosis. *Semin Hematol* 2005; 42(1):5–14. doi: 10.1053/j.seminhematol.2004.09.006.
22. Andrews RK, Gardiner EE, Shen Y, Whisstock JC, Berndt MC. Glycoprotein Ib-IX-V. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35(8):1170–4. doi: 10.1016/s1357-2725(02)00280-7.
23. Zou C-Y, Li Q-J, Hu J-J, Song Y-T, Zhang Q-Y, Nie R et al. Design of biopolymer-based hemostatic material: Starting from molecular structures and forms. *Mater Today Bio* 2022; 17:100468. doi: 10.1016/j.mtbio.2022.100468.
24. Mazzucato M, Pradella P, Cozzi MR, Marco L de, Ruggeri ZM. Sequential cytoplasmic calcium signals in a 2-stage platelet activation process induced by the glycoprotein Ibalph mechanoreceptor. *Blood* 2002; 100(8):2793–800. doi: 10.1182/blood-2002-02-0514.
25. Nesbitt WS, Kulkarni S, Giuliano S, Goncalves I, Dopheide SM, Yap CL et al. Distinct glycoprotein Ib/V/IX and integrin alpha IIbbeta 3-dependent calcium signals cooperatively regulate platelet adhesion under flow. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277(4):2965–72. doi: 10.1074/jbc.M110070200.
26. Horn F, Moc I, Hrsg. *Biochemie des Menschen: das Lehrbuch für das Medizinstudium*. 5., korrigierte Aufl. Stuttgart: Thieme; 2012; ISBN: 978-3-13-130885-6 978-3-13-151345-8.
27. Hein L, Fischer JW. *Taschenatlas Pharmakologie: 178 Farbtafeln*. 8., überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 2020. (Pharmakologie in Text und Bild); ISBN: 9783132426139.

28. Lefkovits J, Plow EF, Topol EJ. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine. *N Engl J Med* 1995; 332(23):1553–9. doi: 10.1056/NEJM199506083322306.
29. Persson E, Olsen OH. Current status on tissue factor activation of factor VIIa. *Thrombosis Research* 2010; 125 Suppl 1:S11-2. doi: 10.1016/j.thromres.2010.01.023.
30. Wilcox JN, Smith KM, Schwartz SM, Gordon D. Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1989; 86(8):2839–43. doi: 10.1073/pnas.86.8.2839.
31. Weiss HJ, Turitto VT, Baumgartner HR, Nemerson Y, Hoffmann T. Evidence for the presence of tissue factor activity on subendothelium. *Blood* 1989; 73(4):968–75.
32. Lawson JH, Mann KG. Cooperative activation of human factor IX by the human extrinsic pathway of blood coagulation. *Journal of Biological Chemistry* 1991; 266(17):11317–27.
33. Bom VJ, Bertina RM. The contributions of Ca²⁺, phospholipids and tissue-factor apoprotein to the activation of human blood-coagulation factor X by activated factor VII. *Biochem J* 1990; 265(2):327–36. doi: 10.1042/bj2650327.
34. Komiyama Y, Pedersen AH, Kisiel W. Proteolytic activation of human factors IX and X by recombinant human factor VIIa: effects of calcium, phospholipids, and tissue factor. *Biochemistry* 1990; 29(40):9418–25. doi: 10.1021/bi00492a016.
35. Müller F, Gailani D, Renné T. Factor XI and XII as antithrombotic targets. *Current Opinion in Hematology* 2011; 18(5):349–55. doi: 10.1097/MOH.0b013e3283497e61.
36. Butenas S, van 't Veer C, Mann KG. Evaluation of the initiation phase of blood coagulation using ultrasensitive assays for serine proteases. *Journal of Biological Chemistry* 1997; 272(34):21527–33. doi: 10.1074/jbc.272.34.21527.
37. Rand MD, Lock JB, van't Veer C, Gaffney DP, Mann KG. Blood clotting in minimally altered whole blood. *Blood* 1996; 88(9):3432–45.

38. Lawson JH, Kalafatis M, Stram S, Mann KG. A model for the tissue factor pathway to thrombin. I. An empirical study. *Journal of Biological Chemistry* 1994; 269(37):23357–66.
39. Rezaie AR, Giri H. Anticoagulant and signaling functions of antithrombin. *J Thromb Haemost* 2020; 18(12):3142–53. doi: 10.1111/jth.15052.
40. Olson ST, Richard B, Izaguirre G, Schedin-Weiss S, Gettins PGW. Molecular mechanisms of antithrombin-heparin regulation of blood clotting proteinases. A paradigm for understanding proteinase regulation by serpin family protein proteinase inhibitors. *Biochimie* 2010; 92(11):1587–96. doi: 10.1016/j.biochi.2010.05.011.
41. Gettins PGW. Serpin structure, mechanism, and function. *Chem Rev* 2002; 102(12):4751–804. doi: 10.1021/cr010170.
42. Damus PS, Hicks M, Rosenberg RD. Anticoagulant action of heparin. *Nature* 1973; 246(5432):355–7. doi: 10.1038/246355a0.
43. Léon M, Aiach M, Coezy E, Guennec JY, Fiessinger JN. Antithrombin III synthesis in rat liver parenchymal cells. *Thrombosis Research* 1983; 30(4):369–75. doi: 10.1016/0049-3848(83)90228-1.
44. Belzar KJ, Zhou A, Carrell RW, Gettins PGW, Huntington JA. Helix D elongation and allosteric activation of antithrombin. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277(10):8551–8. doi: 10.1074/jbc.M110807200.
45. Danielsson A, Raub E, Lindahl U, Björk I. Role of ternary complexes, in which heparin binds both antithrombin and proteinase, in the acceleration of the reactions between antithrombin and thrombin or factor Xa. *Journal of Biological Chemistry* 1986; 261(33):15467–73.
46. Jin L, Abrahams JP, Skinner R, Petitou M, Pike RN, Carrell RW. The anticoagulant activation of antithrombin by heparin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1997; 94(26):14683–8. doi: 10.1073/pnas.94.26.14683.
47. Agostini AI de, Watkins SC, Slayter HS, Youssoufian H, Rosenberg RD. Localization of anticoagulant active heparan sulfate proteoglycans in vascular endothelium:

- antithrombin binding on cultured endothelial cells and perfused rat aorta. *The Journal of Cell Biology* 1990; 111(3):1293–304. doi: 10.1083/jcb.111.3.1293.
48. Huntington JA, McCoy A, Belzar KJ, Pei XY, Gettins PG, Carrell RW. The conformational activation of antithrombin. A 2.85-Å structure of a fluorescein derivative reveals an electrostatic link between the hinge and heparin binding regions. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275(20):15377–83. doi: 10.1074/jbc.275.20.15377.
49. Olson ST, Swanson R, Raub-Segall E, Bedsted T, Sadri M, Petitou M et al. Accelerating ability of synthetic oligosaccharides on antithrombin inhibition of proteinases of the clotting and fibrinolytic systems. Comparison with heparin and low-molecular-weight heparin. *Thrombosis and Haemostasis* 2004; 92(5):929–39. doi: 10.1160/TH04-06-0384.
50. Wiebe EM, Stafford AR, Fredenburgh JC, Weitz JI. Mechanism of catalysis of inhibition of factor IXa by antithrombin in the presence of heparin or pentasaccharide. *Journal of Biological Chemistry* 2003; 278(37):35767–74. doi: 10.1074/jbc.M304803200.
51. Yang L, Manithody C, Rezaie AR. Localization of the heparin binding exosite of factor IXa. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277(52):50756–60. doi: 10.1074/jbc.M208485200.
52. 6 O Sulfotransferase 1 Represents a Critical Enzyme in the Anticoagulant Heparan Sulfate Biosynthetic Pathway.
53. Kuberan B, Beeler DL, Lech M, Wu ZL, Rosenberg RD. Chemoenzymatic synthesis of classical and non-classical anticoagulant heparan sulfate polysaccharides. *J Biol Chem* 2003; 278(52):52613–21. doi: 10.1074/jbc.M305029200.
54. Shworak NW, Kobayashi T, Agostini A de, Smits NC. Anticoagulant Heparan Sulfate. In: *Glycosaminoglycans in Development, Health and Disease*: Elsevier; 2010. S. 153–78 [Progress in Molecular Biology and Translational Science].

55. Thacker BE, Xu D, Lawrence R, Esko JD. Heparan sulfate 3-O-sulfation: a rare modification in search of a function. *Matrix Biol* 2014; 35:60–72. doi: 10.1016/j.matbio.2013.12.001.
56. Bambace NM, Holmes CE. The platelet contribution to cancer progression. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2011; 9(2):237–49. doi: 10.1111/j.1538-7836.2010.04131.x.
57. Peters CG, Michelson AD, Flaumenhaft R. Granule exocytosis is required for platelet spreading: differential sorting of α -granules expressing VAMP-7. *Blood* 2012; 120(1):199–206. doi: 10.1182/blood-2011-10-389247.
58. Graham GJ, Ren Q, Dilks JR, Blair P, Whiteheart SW, Flaumenhaft R. Endobrevin/VAMP-8-dependent dense granule release mediates thrombus formation in vivo. *Blood* 2009; 114(5):1083–90. doi: 10.1182/blood-2009-03-210211.
59. Ho-Tin-Noé B, Goerge T, Cifuni SM, Duerschmied D, Wagner DD. Platelet granule secretion continuously prevents intratumor hemorrhage. *Cancer Research* 2008; 68(16):6851–8. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0718.
60. Blair P, Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev* 2009; 23(4):177–89. doi: 10.1016/j.blre.2009.04.001.
61. Gerrard JM, Rao GHR, White JG. The Influence of Reserpine and Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA) on Serotonin Storage Organelles of Blood Platelets 1977; 87(3):14.
62. Holmsen H, Weiss HJ. Secretable storage pools in platelets. *Annu Rev Med* 1979; 30:119–34. doi: 10.1146/annurev.me.30.020179.001003.
63. Aikawa M, Schoenbechler MJ, Barbaro JF, Sadun EH. Interaction of rabbit platelets and leukocytes in the release of histamine. Electron microscopic observations. *Am J Pathol* 1971; 63(1):85–98.
64. Berger G, Massé JM, Cramer EM. Alpha-granule membrane mirrors the platelet plasma membrane and contains the glycoproteins Ib, IX, and V. *Blood* 1996; 87(4):1385–95.

65. Coppinger JA, Cagney G, Toomey S, Kislinger T, Belton O, McRedmond JP et al. Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions. *Blood* 2004; 103(6):2096–104. doi: 10.1182/blood-2003-08-2804.
66. Italiano JE, Richardson JL, Patel-Hett S, Battinelli E, Zaslavsky A, Short S et al. Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet alpha granules and differentially released. *Blood* 2008; 111(3):1227–33. doi: 10.1182/blood-2007-09-113837.
67. Chatterjee M, Huang Z, Zhang W, Jiang L, Hultenby K, Zhu L et al. Distinct platelet packaging, release, and surface expression of proangiogenic and antiangiogenic factors on different platelet stimuli. *Blood* 2011; 117(14):3907–11. doi: 10.1182/blood-2010-12-327007.
68. Ma L, Perini R, McKnight W, Dicay M, Klein A, Hollenberg MD et al. Proteinase-activated receptors 1 and 4 counter-regulate endostatin and VEGF release from human platelets. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2005; 102(1):216–20. doi: 10.1073/pnas.0406682102.
69. Battinelli EM, Markens BA, Italiano JE. Release of angiogenesis regulatory proteins from platelet alpha granules: modulation of physiologic and pathologic angiogenesis. *Blood* 2011; 118(5):1359–69. doi: 10.1182/blood-2011-02-334524.
70. van Nispen tot Pannerden H, Haas F de, Geerts W, Posthuma G, van Dijk S, Heijnen HFG. The platelet interior revisited: electron tomography reveals tubular alpha-granule subtypes. *Blood* 2010; 116(7):1147–56. doi: 10.1182/blood-2010-02-268680.
71. Sehgal S, Storrie B. Evidence that differential packaging of the major platelet granule proteins von Willebrand factor and fibrinogen can support their differential release. *J Thromb Haemost* 2007; 5(10):2009–16. doi: 10.1111/j.1538-7836.2007.02698.x.
72. Feng D, Crane K, Rozenvayn N, Dvorak AM, Flaumenhaft R. Subcellular distribution of 3 functional platelet SNARE proteins: human cellubrevin, SNAP-23, and syntaxin 2. *Blood* 2002; 99(11):4006–14. doi: 10.1182/blood.v99.11.4006.

73. Jurasz P, Alonso-Escolano D, Radomski MW. Platelet--cancer interactions: mechanisms and pharmacology of tumour cell-induced platelet aggregation. *British Journal of Pharmacology* 2004; 143(7):819–26. doi: 10.1038/sj.bjp.0706013.
74. Meikle CKS, Kelly CA, Garg P, Wuescher LM, Ali RA, Worth RG. Cancer and Thrombosis: The Platelet Perspective. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2016; 4:147. doi: 10.3389/fcell.2016.00147.
75. Hyslop SR, Josefsson EC. Undercover Agents: Targeting Tumours with Modified Platelets. *Trends in Cancer* 2017; 3(3):235–46. doi: 10.1016/j.trecan.2017.01.006.
76. Goad KE, Gralnick HR. Coagulation disorders in cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 1996; 10(2):457–84. doi: 10.1016/s0889-8588(05)70347-6.
77. Varki A. Trousseau's syndrome: multiple definitions and multiple mechanisms. *Blood* 2007; 110(6):1723–9. doi: 10.1182/blood-2006-10-053736.
78. Rickles FR, Falanga A. Molecular basis for the relationship between thrombosis and cancer. *Thrombosis Research* 2001; 102(6):V215-24. doi: 10.1016/s0049-3848(01)00285-7.
79. Silverstein MD, Heit JA, Mohr DN, Petterson TM, O'Fallon WM, Melton LJ. Trends in the incidence of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a 25-year population-based study. *Archives of Internal Medicine* 1998; 158(6):585–93. doi: 10.1001/archinte.158.6.585.
80. Schwarz S, Schlesinger M, Bendas G. Detection of Tumor Cell-Induced Platelet Aggregation and Granule Secretion. *Methods Mol Biol* 2021; 2294:181–95. doi: 10.1007/978-1-0716-1350-4_13.
81. Strassenburg W, Jóźwicki J, Durślewicz J, Kuffel B, Kulczyk MP, Kowalewski A et al. Tumor Cell-Induced Platelet Aggregation as an Emerging Therapeutic Target for Cancer Therapy. *Frontiers in Oncology* 2022; 12:909767. doi: 10.3389/fonc.2022.909767.
82. Goubran H, Stakiw J, Radosevic M, Burnouf T. Platelet–Cancer Interactions. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 2014; 40(03):296–305. doi: 10.1055/s-0034-1370767.

83. Pang JH, Coupland LA, Freeman C, Chong BH, Parish CR. Activation of tumour cell ECM degradation by thrombin-activated platelet membranes: potentially a P-selectin and GPIIb/IIIa-dependent process. *Clin Exp Metastasis* 2015; 32(5):495–505. doi: 10.1007/s10585-015-9722-5.
84. Schwarz S, Gockel LM, Naggi A, Barash U, Gobec M, Bendas G et al. Glycosaminoglycans as Tools to Decipher the Platelet Tumor Cell Interaction: A Focus on P-Selectin. *Molecules* 2020; 25(5):1039. doi: 10.3390/molecules25051039.
85. Théorêt J-F, Yacoub D, Hachem A, Gillis M-A, Merhi Y. P-selectin ligation induces platelet activation and enhances microaggregate and thrombus formation. *Thrombosis Research* 2011; 128(3):243–50. doi: 10.1016/j.thromres.2011.04.018.
86. Kim YJ, Borsig L, Varki NM, Varki A. P-selectin deficiency attenuates tumor growth and metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1998; 95(16):9325–30. doi: 10.1073/pnas.95.16.9325.
87. Qi C-L, Wei B, Ye J, Yang Y, Li B, Zhang Q-Q et al. P-Selectin-Mediated Platelet Adhesion Promotes the Metastasis of Murine Melanoma Cells. *PLOS ONE* 2014; 9(3). doi: 10.1371/journal.pone.0091320.
88. Shao B, Wahrenbrock MG, Yao L, David T, Coughlin SR, Xia L et al. Carcinoma mucins trigger reciprocal activation of platelets and neutrophils in a murine model of Trousseau syndrome. *Blood* 2011; 118(15):4015–23. doi: 10.1182/blood-2011-07-368514.
89. Faraday N, Schunke K, Saleem S, Fu J, Wang B, Zhang J et al. Cathepsin G-dependent modulation of platelet thrombus formation in vivo by blood neutrophils. *PLOS ONE* 2013; 8(8):e71447. doi: 10.1371/journal.pone.0071447.
90. Mammadova-Bach E, Zigrino P, Brucker C, Bourdon C, Freund M, Arcangelis A de et al. Platelet integrin $\alpha 6 \beta 1$ controls lung metastasis through direct binding to cancer cell-derived ADAM9. *JCI insight* 2016; 1(14):e88245. doi: 10.1172/jci.insight.88245.

91. Inoue O, Suzuki-Inoue K, McCarty OJT, Moroi M, Ruggeri ZM, Kunicki TJ et al. Laminin stimulates spreading of platelets through integrin $\alpha 6 \beta 1$ –dependent activation of GPVI. *Blood* 2006; 107(4):1405–12. doi: 10.1182/blood-2005-06-2406.
92. Mammadova-Bach E, Gil-Pulido J, Sarukhanyan E, Burkard P, Shityakov S, Schonhart C et al. Platelet glycoprotein VI promotes metastasis through interaction with cancer cell-derived Galectin-3. *Blood* 2020:blood.2019002649. doi: 10.1182/blood.2019002649.
93. Dovizio M, Maier TJ, Alberti S, Di Francesco L, Marcantoni E, Münch G et al. Pharmacological inhibition of platelet-tumor cell cross-talk prevents platelet-induced overexpression of cyclooxygenase-2 in HT29 human colon carcinoma cells. *Molecular Pharmacology* 2013; 84(1):25–40. doi: 10.1124/mol.113.084988.
94. Bastida E, Almirall L, Ordinas A. Tumor-cell-induced platelet aggregation is a glycoprotein-dependent and lipoxygenase-associated process. *Int J Cancer* 1987; 39(6):760–3. doi: 10.1002/ijc.2910390617.
95. Da Lopes Silva M, Cutler DF. von Willebrand factor multimerization and the polarity of secretory pathways in endothelial cells. *Blood* 2016; 128(2):277–85. doi: 10.1182/blood-2015-10-677054.
96. Gil-Bazo I, Catalán Goni V, Alonso Gutiérrez A, Rodríguez Rodríguez J, Páramo Fernández JA, La Cámara Gómez J de et al. Impact of surgery and chemotherapy on von Willebrand factor and vascular endothelial growth factor levels in colorectal cancer. *Clin Transl Oncol* 2005; 7(4):150–5. doi: 10.1007/BF02708752.
97. Ling J, Sun Y, Pan J, Wang H, Ma Z, Yin J et al. Feedback modulation of endothelial cells promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis of osteosarcoma cells by Von Willebrand Factor release. *J Cell Biochem* 2019; 120(9):15971–9. doi: 10.1002/jcb.28875.
98. Nesbitt WS, Giuliano S, Kulkarni S, Dopheide SM, Harper IS, Jackson SP. Intercellular calcium communication regulates platelet aggregation and thrombus growth. *The Journal of Cell Biology* 2003; 160(7):1151–61. doi: 10.1083/jcb.200207119.

99. Sakariassen KS, Nievelstein PF, Collier BS, Sixma JJ. The role of platelet membrane glycoproteins Ib and IIb-IIIa in platelet adherence to human artery subendothelium. *British Journal of Haematology* 1986; 63(4):681–91. doi: 10.1111/j.1365-2141.1986.tb07552.x.
100. Oleksowicz L, Mrowiec Z, Schwartz E, Khorshidi M, Dutcher JP, Puszkin E. Characterization of tumor-induced platelet aggregation: the role of immunorelated GPIb and GPIIb/IIIa expression by MCF-7 breast cancer cells. *Thrombosis Research* 1995; 79(3):261–74. doi: 10.1016/0049-3848(95)00113-6.
101. Suzuki-Inoue K, Inoue O, Ozaki Y. Novel platelet activation receptor CLEC-2: from discovery to prospects. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2011; 9 Suppl 1:44–55. doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04335.x.
102. Lowe KL, Navarro-Nunez L, Watson SP. Platelet CLEC-2 and podoplanin in cancer metastasis. *Thrombosis Research* 2012; 129 Suppl 1:S30-7. doi: 10.1016/S0049-3848(12)70013-0.
103. Takemoto A, Miyata K, Fujita N. Platelet-activating factor podoplanin: from discovery to drug development. *Cancer Metastasis Rev* 2017; 36(2):225–34. doi: 10.1007/s10555-017-9672-2.
104. Riedl J, Preusser M, Nazari PMS, Posch F, Panzer S, Marosi C et al. Podoplanin expression in primary brain tumors induces platelet aggregation and increases risk of venous thromboembolism. *Blood* 2017; 129(13):1831–9. doi: 10.1182/blood-2016-06-720714.
105. Nieswandt B, Hafner M, Echtenacher B, Männel DN. Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets. *Cancer Research* 1999; 59(6):1295–300.
106. Wang Y, Sun Y, Li D, Zhang L, Wang K, Zuo Y et al. Platelet P2Y12 Is Involved in Murine Pulmonary Metastasis. *PLOS ONE* 2013; 8(11). doi: 10.1371/journal.pone.0080780.
107. Fabre JE, Nguyen M, Latour A, Keifer JA, Audoly LP, Coffman TM et al. Decreased platelet aggregation, increased bleeding time and resistance to thromboembolism in P2Y1-deficient mice. *Nat Med* 1999; 5(10):1199–202. doi: 10.1038/13522.

108. Hechler B, Léon C, Vial C, Vigne P, Frelin C, Cazenave JP et al. The P2Y1 receptor is necessary for adenosine 5'-diphosphate-induced platelet aggregation. *Blood* 1998; 92(1):152–9.
109. Communi D, Janssens R, Suarez-Huerta N, Robaye B, Boeynaems JM. Advances in signalling by extracellular nucleotides. the role and transduction mechanisms of P2Y receptors. *Cell Signal* 2000; 12(6):351–60. doi: 10.1016/s0898-6568(00)00083-8.
110. Jin J, Kunapuli SP. Coactivation of two different G protein-coupled receptors is essential for ADP-induced platelet aggregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1998; 95(14):8070–4. doi: 10.1073/pnas.95.14.8070.
111. Matsui Y, Amano H, Ito Y, Eshima K, Suzuki T, Ogawa F et al. Thromboxane A₂ receptor signaling facilitates tumor colonization through P-selectin-mediated interaction of tumor cells with platelets and endothelial cells. *Cancer Science* 2012; 103(4):700–7. doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02200.x.
112. Aitokallio-Tallberg A, Kärkkäinen J, Pantzar P, Wahlström T, Ylikorkala O. Prostacyclin and thromboxane in breast cancer: Relationship between steroid receptor status and medroxyprogesterone acetate. *British Journal of Cancer* 1985; 51(5):671–4. doi: 10.1038/bjc.1985.101.
113. Lian L, Li W, Li Z-Y, Mao Y-X, Zhang Y-T, Zhao Y-M et al. Inhibition of MCF-7 breast cancer cell-induced platelet aggregation using a combination of antiplatelet drugs. *Oncol Lett* 2013; 5(2):675–80. doi: 10.3892/ol.2012.1074.
114. Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, Herbst R, Coyle AJ. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annual Review of Immunology* 2010; 28:367–88. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132603.
115. Yu L-X, Yan L, Yang W, Wu F-Q, Ling Y, Chen S-Z et al. Platelets promote tumour metastasis via interaction between TLR4 and tumour cell-released high-mobility group box1 protein. *Nature Communications* 2014; 5:5256. doi: 10.1038/ncomms6256.

116. Milsom C, Rak J. Tissue factor and cancer. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis* 2008; 36(3-4):160–76. doi: 10.1159/000175154.
117. Contrino J, Hair G, Kreutzer DL, Rickles FR. In situ detection of tissue factor in vascular endothelial cells: correlation with the malignant phenotype of human breast disease. *Nat Med* 1996; 2(2):209–15. doi: 10.1038/nm0296-209.
118. Eisenreich A, Zakrzewicz A, Huber K, Thierbach H, Pepke W, Goldin-Lang P et al. Regulation of pro-angiogenic tissue factor expression in hypoxia-induced human lung cancer cells. *Oncol Rep* 2013; 30(1):462–70. doi: 10.3892/or.2013.2413.
119. Geddings JE, Hisada Y, Boulaftali Y, Getz TM, Whelihan M, Fuentes R et al. Tissue factor-positive tumor microvesicles activate platelets and enhance thrombosis in mice. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2016; 14(1):153–66. doi: 10.1111/jth.13181.
120. Lwaleed BA, Lam L, Lasebai M, Cooper AJ. Expression of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in microparticles and subcellular fractions of normal and malignant prostate cell lines. *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis* 2013; 24(3):339–43. doi: 10.1097/MBC.0b013e32835e98a6.
121. Sasano T, Cho MS, Rodriguez-Aguayo C, Bayraktar E, Taki M, Afshar-Kharghan V et al. Role of tissue-factor bearing extracellular vesicles released from ovarian cancer cells in platelet aggregation in vitro and venous thrombosis in mice. *Thrombosis Update* 2021; 2:100020. doi: 10.1016/j.tru.2020.100020.
122. Auwerda JJA, Yuana Y, Osanto S, Maat MPM de, Sonneveld P, Bertina RM et al. Microparticle-associated tissue factor activity and venous thrombosis in multiple myeloma. *Thrombosis and Haemostasis* 2011; 105(1):14–20. doi: 10.1160/TH10-03-0187.
123. Mezouar S, Frère C, Darbousset R, Mege D, Crescence L, Dignat-George F et al. Role of platelets in cancer and cancer-associated thrombosis: Experimental and clinical evidences. *Thrombosis Research* 2016; 139:65–76. doi: 10.1016/j.thromres.2016.01.006.

124. Ueno T, Toi M, Koike M, Nakamura S, Tominaga T. Tissue factor expression in breast cancer tissues: its correlation with prognosis and plasma concentration. *British Journal of Cancer* 2000; 83(2):164–70. doi: 10.1054/bjoc.2000.1272.
125. Koomägi R, Volm M. Tissue-factor expression in human non-small-cell lung carcinoma measured by immunohistochemistry: Correlation between tissue factor and angiogenesis. *International Journal of Cancer* 1998; 79(1):19–22. doi: 10.1002/(sici)1097-0215(19980220)79:1<19::aid-ijc4>3.0.co;2-z.
126. Förster Y, Meye A, Albrecht S, Kotzsch M, Füssel S, Wirth MP et al. Tissue specific expression and serum levels of human tissue factor in patients with urological cancer. *Cancer Letters* 2003; 193(1):65–73. doi: 10.1016/s0304-3835(02)00687-0.
127. Kirchhofer D, Tschopp TB, Hadváry P, Baumgartner HR. Endothelial cells stimulated with tumor necrosis factor-alpha express varying amounts of tissue factor resulting in inhomogenous fibrin deposition in a native blood flow system. Effects of thrombin inhibitors. *Journal of Clinical Investigation* 1994; 93(5):2073–83.
128. Davie E, Kulman J. An Overview of the Structure and Function of Thrombin. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 2006; 32(S 1):3–15. doi: 10.1055/s-2006-939550.
129. Tantry US, Liu F, Chen G, Gurbel PA. Vorapaxar in the secondary prevention of atherothrombosis. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2015; 13(12):1293–305. doi: 10.1586/14779072.2015.1109447.
130. Cisowski J, O'Callaghan K, Kuliopulos A, Yang J, Nguyen N, Deng Q et al. Targeting protease-activated receptor-1 with cell-penetrating pepducins in lung cancer. *Am J Pathol* 2011; 179(1):513–23. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.03.025.
131. Zhang H, Jiang P, Zhang C, Lee S, Wang W, Zou H. PAR4 overexpression promotes colorectal cancer cell proliferation and migration. *Oncol Lett* 2018; 16(5):5745–52. doi: 10.3892/ol.2018.9407.
132. Falanga A, Consonni R, Marchetti M, Locatelli G, Garattini E, Passerini CG et al. Cancer procoagulant and tissue factor are differently modulated by all-trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia cells. *Blood* 1998; 92(1):143–51.

133. Falanga A, Schieppati F, Russo D. Cancer Tissue Procoagulant Mechanisms and the Hypercoagulable State of Patients with Cancer. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 2015; 41(07):756–64. doi: 10.1055/s-0035-1564040.
134. Heinmöller E, Weinel RJ, Heidtmann HH, Salge U, Seitz R, Schmitz I et al. Studies on tumor-cell-induced platelet aggregation in human lung cancer cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol* 1996; 122(12):735–44. doi: 10.1007/BF01209121.
135. Wojtukiewicz MZ, Tang DG, Nelson KK, Walz DA, Diglio CA, Honn KV. Thrombin enhances tumor cell adhesive and metastatic properties via increased alpha IIb beta 3 expression on the cell surface. *Thrombosis Research* 1992; 68(3):233–45. doi: 10.1016/0049-3848(92)90081-k.
136. Ganten D, Hahn S, Schmiegel W, Ruckpaul K. *Molekularmedizinische Grundlagen von nicht-hereditären Tumorerkrankungen*: Springer-Verlag; 2019; ISBN: 978-3-642-56297-6.
137. Stracke ML, Liotta LA. Multi-step cascade of tumor cell metastasis. *In Vivo* (Athens, Greece) 1992; 6(4):309–16.
138. Weiss L. Metastatic inefficiency. *Adv Cancer Res* 1990; 54:159–211. doi: 10.1016/s0065-230x(08)60811-8.
139. Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, Kerkvliet N, Morris VL, Chambers AF et al. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol* 1998; 153(3):865–73. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65628-3.
140. Viallard C, Larrivée B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis* 2017; 20(4):409–26. doi: 10.1007/s10456-017-9562-9.
141. Gay LJ, Felding-Habermann B. Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nature Reviews Cancer* 2011; 11(2):123–34. doi: 10.1038/nrc3004.
142. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 2011; 473(7347):298–307. doi: 10.1038/nature10144.

143. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Molecular and Cellular Biology* 1996; 16(9):4604–13. doi: 10.1128/MCB.16.9.4604.
144. Ponert J, Gockel L, Henze S, Schlesinger M. Unfractionated and Low Molecular Weight Heparin Reduce Platelet Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Pancreatic and Prostate Cancer Cells. *Molecules* 2018; 23(10):2690. doi: 10.3390/molecules23102690.
145. Carnero A, Lleona M. The hypoxic microenvironment: A determinant of cancer stem cell evolution: Hypoxic niche and cancer stem cells. *BioEssays* 2016; 38:S65 - S74. doi: 10.1002/bies.201670911.
146. Chen Y, Zhang S, Wang Q, Zhang X. Tumor-recruited M2 macrophages promote gastric and breast cancer metastasis via M2 macrophage-secreted CHI3L1 protein. *Journal of Hematology & Oncology* 2017; 10. doi: 10.1186/s13045-017-0408-0.
147. Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nature Reviews Cancer* 2004; 4(1):71–8. doi: 10.1038/nrc1256.
148. Fantin A, Vieira JM, Gestri G, Denti L, Schwarz Q, Prykhodzhiy S et al. Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. *Blood* 2010; 116(5):829–40. doi: 10.1182/blood-2009-12-257832.
149. Leek RD, Harris AL. Tumor-associated macrophages in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2002; 7(2):177–89. doi: 10.1023/a:1020304003704.
150. Mor G, Yue W, Santen RJ, Gutierrez L, Eliza M, Bernstein LM et al. Macrophages, estrogen and the microenvironment of breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1998; 67(5-6):403–11. doi: 10.1016/s0960-0760(98)00143-5.
151. Erdogan B, Webb DJ. Cancer-associated fibroblasts modulate growth factor signaling and extracellular matrix remodeling to regulate tumor metastasis. *Biochem Soc Trans* 2017; 45(1):229–36. doi: 10.1042/BST20160387.

152. Liao Z, Tan ZW, Zhu P, Tan NS. Cancer-associated fibroblasts in tumor microenvironment - Accomplices in tumor malignancy. *Cell Immunol* 2019; 343:103729. doi: 10.1016/j.cellimm.2017.12.003.
153. Shiga K, Hara M, Nagasaki T, Sato T, Takahashi H, Takeyama H. Cancer-Associated Fibroblasts: Their Characteristics and Their Roles in Tumor Growth. *Cancers* 2015; 7(4):2443–58. doi: 10.3390/cancers7040902.
154. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 2005; 121(3):335–48. doi: 10.1016/j.cell.2005.02.034.
155. Fuster MM, Esko JD. The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. *Nature Reviews Cancer* 2005; 5(7):526–42. doi: 10.1038/nrc1649.
156. Labelle M, Begum S, Hynes RO. Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis. *Cancer cell* 2011; 20(5):576–90. doi: 10.1016/j.ccr.2011.09.009.
157. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell* 2009; 139(5):871–90. doi: 10.1016/j.cell.2009.11.007.
158. Wheelock MJ, Shintani Y, Maeda M, Fukumoto Y, Johnson KR. Cadherin switching. *J Cell Sci* 2008; 121(Pt 6):727–35. doi: 10.1242/jcs.000455.
159. Mrozik KM, Blaschuk OW, Cheong CM, Zannettino ACW, Vandyke K. N-cadherin in cancer metastasis, its emerging role in haematological malignancies and potential as a therapeutic target in cancer. *BMC Cancer* 2018; 18(1):939. doi: 10.1186/s12885-018-4845-0.
160. Kourtidis A, Lu R, Pence LJ, Anastasiadis PZ. A central role for cadherin signaling in cancer. *Exp Cell Res* 2017; 358(1):78–85. doi: 10.1016/j.yexcr.2017.04.006.
161. Perl AK, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H, Christofori G. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature* 1998; 392(6672):190–3. doi: 10.1038/32433.

162. Gheldof A, Berx G. Cadherins and epithelial-to-mesenchymal transition. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2013; 116:317–36. doi: 10.1016/B978-0-12-394311-8.00014-5.
163. Araki K, Shimura T, Suzuki H, Tsutsumi S, Wada W, Yajima T et al. E/N-cadherin switch mediates cancer progression via TGF- β -induced epithelial-to-mesenchymal transition in extrahepatic cholangiocarcinoma. *British Journal of Cancer* 2011; 105(12):1885–93. doi: 10.1038/bjc.2011.452.
164. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation* 2009; 119(6):1420–8. doi: 10.1172/JCI39104.
165. Mladinich M, Ruan D, Chan C-H. Tackling Cancer Stem Cells via Inhibition of EMT Transcription Factors. *Stem Cells Int* 2016; 2016:5285892. doi: 10.1155/2016/5285892.
166. Fischer KR, Durrans A, Lee S, Sheng J, Li F, Wong STC et al. Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature* 2015; 527(7579):472–6. doi: 10.1038/nature15748.
167. Camerer E, Qazi AA, Duong DN, Cornelissen I, Advincula R, Coughlin SR. Platelets, protease-activated receptors, and fibrinogen in hematogenous metastasis. *Blood* 2004; 104(2):397–401. doi: 10.1182/blood-2004-02-0434.
168. Leach J, Morton JP, Sansom OJ. Neutrophils: Homing in on the myeloid mechanisms of metastasis. *Molecular Immunology* 2019; 110:69–76. doi: 10.1016/j.molimm.2017.12.013.
169. Kopp H-G, Placke T, Salih HR. Platelet-derived transforming growth factor-beta down-regulates NKG2D thereby inhibiting natural killer cell antitumor reactivity. *Cancer Research* 2009; 69(19):7775–83. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2123.
170. Peinado H, Zhang H, Matei IR, Costa-Silva B, Hoshino A, Rodrigues G et al. Pre-metastatic niches: organ-specific homes for metastases. *Nature Reviews Cancer* 2017; 17(5):302–17. doi: 10.1038/nrc.2017.6.
171. Labelle M, Begum S, Hynes RO. Platelets guide the formation of early metastatic niches. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2014; 111(30):E3053 - E3061. doi: 10.1073/pnas.1411082111.

172. Claesson-Welsh L. Vascular permeability--the essentials. *Ups J Med Sci* 2015; 120(3):135–43. doi: 10.3109/03009734.2015.1064501.
173. Weinbaum S, Tarbell JM, Damiano ER. The structure and function of the endothelial glycocalyx layer. *Annu Rev Biomed Eng* 2007; 9:121–67. doi: 10.1146/annurev.bioeng.9.060906.151959.
174. Uchimido R, Schmidt EP, Shapiro NI. The glycocalyx: a novel diagnostic and therapeutic target in sepsis. *Crit Care* 2019; 23(1):16. doi: 10.1186/s13054-018-2292-6.
175. Tarbell JM, Cancel LM. The glycocalyx and its significance in human medicine. *J Intern Med* 2016; 280(1):97–113. doi: 10.1111/joim.12465.
176. Tarbell JM, Pahakis MY. Mechanotransduction and the glycocalyx. *J Intern Med* 2006; 259(4):339–50. doi: 10.1111/j.1365-2796.2006.01620.x.
177. Pries AR, Secomb TW, Gaehtgens P. The endothelial surface layer. *Pflugers Arch* 2000; 440(5):653–66. doi: 10.1007/s004240000307.
178. Adamson RH, Clough G. Plasma proteins modify the endothelial cell glycocalyx of frog mesenteric microvessels. *J Physiol* 1992; 445:473–86. doi: 10.1113/jphysiol.1992.sp018934.
179. Bernfield M, Götte M, Park PW, Reizes O, Fitzgerald ML, Lincecum J et al. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem* 1999; 68:729–77. doi: 10.1146/annurev.biochem.68.1.729.
180. Jackson RL, Busch SJ, Cardin AD. Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes. *Physiol Rev* 1991; 71(2):481–539. doi: 10.1152/physrev.1991.71.2.481.
181. Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort MAMJ, oude Egbrink MGA. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflugers Arch* 2007; 454(3):345–59. doi: 10.1007/s00424-007-0212-8.
182. Ruggeri ZM. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *J Thromb Haemost* 2003; 1(7):1335–42. doi: 10.1046/j.1538-7836.2003.00260.x.

183. Tarbell JM, Simon SI, Curry F-RE. Mechanosensing at the vascular interface. *Annu Rev Biomed Eng* 2014; 16:505–32. doi: 10.1146/annurev-bioeng-071813-104908.
184. Pavelka M, Roth J, Hrsg. *Functional Ultrastructure: Atlas of Tissue Biology and Pathology*. Second, Revised and Enlarged Edition. Vienna: Springer-Verlag Vienna; 2010; ISBN: 978-3-211-99390-3.
185. Woods EC, Kai F, Barnes JM, Pedram K, Pickup MW, Hollander MJ et al. A bulky glycocalyx fosters metastasis formation by promoting G1 cell cycle progression. *Elife* 2017; 6. doi: 10.7554/eLife.25752.
186. Barnes JM, Kaushik S, Bainer RO, Sa JK, Woods EC, Kai F et al. A tension-mediated glycocalyx-integrin feedback loop promotes mesenchymal-like glioblastoma. *Nature Cell Biology* 2018; 20(10):1203–14. doi: 10.1038/s41556-018-0183-3.
187. Ihrcke NS, Wrenshall LE, Lindman BJ, Platt JL. Role of heparan sulfate in immune system-blood vessel interactions. *Immunol Today* 1993; 14(10):500–5. doi: 10.1016/0167-5699(93)90265-M.
188. Lindahl U, Couchman J, Kimata K, Esko JD. *Essentials of Glycobiology: Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans*. 3rd. Cold Spring Harbor (NY); 2015.
189. Couchman JR, Multhaupt H, Sanderson RD. Recent Insights into Cell Surface Heparan Sulphate Proteoglycans and Cancer. *F1000Res* 2016; 5. doi: 10.12688/f1000research.8543.1.
190. Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, Karamanos NK. Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev* 2016; 97:4–27. doi: 10.1016/j.addr.2015.11.001.
191. Sarrazin S, Lamanna WC, Esko JD. Heparan sulfate proteoglycans. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011; 3(7). doi: 10.1101/cshperspect.a004952.
192. Alexander Köwitsch, Guoying Zhou, Thomas Groth. Medical application of glycosaminoglycans: a review.
193. Li J-P. Heparin, heparan sulfate and heparanase in cancer: remedy for metastasis? *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 2008; 8(1):64–76. doi: 10.2174/187152008783330824.

194. Köwitsch A, Zhou G, Groth T. Medical application of glycosaminoglycans: a review. *J Tissue Eng Regen Med* 2018; 12(1):e23-e41. doi: 10.1002/term.2398.
195. Bishop JR, Schuksz M, Esko JD. Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature* 2007; 446(7139):1030–7. doi: 10.1038/nature05817.
196. Vlodavsky I, Beckhove P, Lerner I, Pisano C, Meirovitz A, Ilan N et al. Significance of heparanase in cancer and inflammation. *Cancer Microenviron* 2012; 5(2):115–32. doi: 10.1007/s12307-011-0082-7.
197. Vivès RR, Seffouh A, Lortat-Jacob H. Post-Synthetic Regulation of HS Structure: The Yin and Yang of the Sulfs in Cancer. *Frontiers in Oncology* 2014; 3:331. doi: 10.3389/fonc.2013.00331.
198. Karamanos NK, Piperigkou Z, Theocharis AD, Watanabe H, Franchi M, Baud S et al. Proteoglycan Chemical Diversity Drives Multifunctional Cell Regulation and Therapeutics. *Chem Rev* 2018; 118(18):9152–232. doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00354.
199. Hull EE, Montgomery MR, Leyva KJ. Epigenetic Regulation of the Biosynthesis & Enzymatic Modification of Heparan Sulfate Proteoglycans: Implications for Tumorigenesis and Cancer Biomarkers. *Int J Mol Sci* 2017; 18(7). doi: 10.3390/ijms18071361.
200. Matsuo I, Kimura-Yoshida C. Extracellular distribution of diffusible growth factors controlled by heparan sulfate proteoglycans during mammalian embryogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2014; 369(1657). doi: 10.1098/rstb.2013.0545.
201. Annaïval T, Wild R, Crétinon Y, Sadir R, Vivès RR, Lortat-Jacob H. Heparan Sulfate Proteoglycans Biosynthesis and Post Synthesis Mechanisms Combine Few Enzymes and Few Core Proteins to Generate Extensive Structural and Functional Diversity. *Molecules* 2020; 25(18). doi: 10.3390/molecules25184215.
202. Pessentheiner AR, Ducasa GM, Gordts PLSM. Proteoglycans in Obesity-Associated Metabolic Dysfunction and Meta-Inflammation. *Frontiers in Immunology* 2020; 11:769. doi: 10.3389/fimmu.2020.00769.

203. Pasquale V de, Quiccione MS, Tafuri S, Avallone L, Pavone LM. Heparan Sulfate Proteoglycans in Viral Infection and Treatment: A Special Focus on SARS-CoV-2. *Int J Mol Sci* 2021; 22(12). doi: 10.3390/ijms22126574.
204. Faria-Ramos I, Poças J, Marques C, Santos-Antunes J, Macedo G, Reis CA et al. Heparan Sulfate Glycosaminoglycans: (Un)Expected Allies in Cancer Clinical Management. *Biomolecules* 2021; 11(2). doi: 10.3390/biom11020136.
205. Mukherjee P, Zhou X, Benicky J, Panigrahi A, Aljuhani R, Liu J et al. Heparan-6-O-Endosulfatase 2 Promotes Invasiveness of Head and Neck Squamous Carcinoma Cell Lines in Co-Cultures with Cancer-Associated Fibroblasts. *Cancers* 2023; 15(21). doi: 10.3390/cancers15215168.
206. Marques C, Reis CA, Vivès RR, Magalhães A. Heparan Sulfate Biosynthesis and Sulfation Profiles as Modulators of Cancer Signalling and Progression. *Frontiers in Oncology* 2021; 11:778752. doi: 10.3389/fonc.2021.778752.
207. Blackhall FH, Merry CL, Davies EJ, Jayson GC. Heparan sulfate proteoglycans and cancer. *British Journal of Cancer* 2001; 85(8):1094–8. doi: 10.1054/bjoc.2001.2054.
208. Li J-P, Kusche-Gullberg M. Heparan Sulfate: Biosynthesis, Structure, and Function. *Int Rev Cell Mol Biol* 2016; 325:215–73. doi: 10.1016/bs.ircmb.2016.02.009.
209. Hassan N, Greve B, Espinoza-Sánchez NA, Götte M. Cell-surface heparan sulfate proteoglycans as multifunctional integrators of signaling in cancer. *Cell Signal* 2021; 77:109822. doi: 10.1016/j.cellsig.2020.109822.
210. Pasquale V de, Pavone LM. Heparan Sulfate Proteoglycan Signaling in Tumor Microenvironment. *Int J Mol Sci* 2020; 21(18). doi: 10.3390/ijms21186588.
211. Wieboldt R, Läubli H. Glycosaminoglycans in cancer therapy. *Am J Physiol Cell Physiol* 2022; 322(6):C1187–C1200. doi: 10.1152/ajpcell.00063.2022.
212. Kolset SO, Salmivirta M. Cell surface heparan sulfate proteoglycans and lipoprotein metabolism. *Cell. Mol. Life Sci.* 1999; 56(9-10):857–70. doi: 10.1007/s000180050031.
213. Kolset SO, Prydz K, Pejler G. Intracellular proteoglycans. *Biochem J* 2004; 379(Pt 2):217–27. doi: 10.1042/BJ20031230.

214. Kolset SO, Tveit H. Serglycin – Structure and biology. *Cell. Mol. Life Sci.* 2008; 65(7-8):1073–85. doi: 10.1007/s00018-007-7455-6.
215. Rönnerberg E, Pejler G. Serglycin: The Master of the Mast Cell. In: Redini F, Hrsg. *Proteoglycans: Methods and protocols*. New York, Heidelberg: Humana Press; 2012. S. 201–17 [Springer protocols; vol. 836].
216. Kolset SO, Gallagher JT. Proteoglycans in haemopoietic cells. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1032(2-3):191–211. doi: 10.1016/0304-419X(90)90004-K.
217. Varki A, Cummings RD, Esko JD, Hrsg. *Essentials of glycobiology*. Fourth edition. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022; ISBN: 9781621824213.
218. Kuberan B, Beeler DL, Lech M, Wu ZL, Rosenberg RD. Chemoenzymatic synthesis of classical and non-classical anticoagulant heparan sulfate polysaccharides. *J Biol Chem* 2003; 278(52):52613–21. doi: 10.1074/jbc.M305029200.
219. Esko JD, Selleck SB. Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate. *Annu Rev Biochem* 2002; 71:435–71. doi: 10.1146/annurev.biochem.71.110601.135458.
220. Veraldi N, Zouggar N, Agostini A de. The Challenge of Modulating Heparan Sulfate Turnover by Multitarget Heparin Derivatives. *Molecules* 2020; 25(2). doi: 10.3390/molecules25020390.
221. Vlodavsky I, Ilan N, Sanderson RD. Forty Years of Basic and Translational Heparanase Research. *Adv Exp Med Biol* 2020; 1221:3–59. doi: 10.1007/978-3-030-34521-1_1.
222. Thacker BE, Xu D, Lawrence R, Esko JD. Heparan sulfate 3-O-sulfation: a rare modification in search of a function; 2014. (Bd. 35).
223. Muñoz EM, Linhardt RJ. Heparin-binding domains in vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24(9):1549–57. doi: 10.1161/01.ATV.0000137189.22999.3f.
224. Weiss RJ, Esko JD, Tor Y. Targeting heparin and heparan sulfate protein interactions. *Org Biomol Chem* 2017; 15(27):5656–68. doi: 10.1039/c7ob01058c.

225. Huntington JA. Mechanisms of glycosaminoglycan activation of the serpins in hemostasis. *J Thromb Haemost* 2003; 1(7):1535–49. doi: 10.1046/j.1538-7836.2003.00305.x.
226. McLean J. THE THROMBOPLASTIC ACTION OF CEPHALIN. *American Journal of Physiology-Legacy Content* 1916; 41(2):250–7. doi: 10.1152/ajplegacy.1916.41.2.250.
227. Brinkhous KM, Smith HP, Warner ED, Seegers WH. THE INHIBITION OF BLOOD CLOTTING: AN UNIDENTIFIED SUBSTANCE WHICH ACTS IN CONJUNCTION WITH HEPARIN TO PREVENT THE CONVERSION OF PROTHROMBIN INTO THROMBIN. *American Journal of Physiology-Legacy Content* 1939; 125(4):683–7. doi: 10.1152/ajplegacy.1939.125.4.683.
228. MONKHOUSE FC, FRANCE ES, Seegers WH. Studies on the antithrombin and heparin cofactor activities of a fraction adsorbed from plasma by aluminum hydroxide. *Circ Res* 1955; 3(4):397–402. doi: 10.1161/01.res.3.4.397.
229. WAUGH DF, FITZGERALD MA. Quantitative aspects of antithrombin and heparin in plasma. *American Journal of Physiology-Legacy Content* 1956; 184(3):627–39. doi: 10.1152/ajplegacy.1956.184.3.627.
230. Petitou M, van Boeckel CAA. A synthetic antithrombin III binding pentasaccharide is now a drug! What comes next? *Angew Chem Int Ed Engl* 2004; 43(24):3118–33. doi: 10.1002/anie.200300640.
231. Petitou M. 1976–1983, a critical period in the history of heparin: the discovery of the antithrombin binding site. *Biochimie* 2003; 85(1-2):83–9. doi: 10.1016/S0300-9084(03)00078-6.
232. Hileman RE, Fromm JR, Weiler JM, Linhardt RJ. Glycosaminoglycan-protein interactions: definition of consensus sites in glycosaminoglycan binding proteins. *Bioessays* 1998; 20(2):156–67. doi: 10.1002/(SICI)1521-1878(199802)20:2<156::AID-BIES8>3.0.CO;2-R.
233. Lindahl U, Kjellén L. Heparin or Heparan Sulfate - What is the Difference? *Thrombosis and Haemostasis* 1991; 66(01):44–8. doi: 10.1055/s-0038-1646372.

234. Bratulic S, Limeta A, Dabestani S, Birgisson H, Enblad G, Ståhlberg K et al. Noninvasive detection of any-stage cancer using free glycosaminoglycans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2022; 119(50):e2115328119. doi: 10.1073/pnas.2115328119.
235. Rong J, Habuchi H, Kimata K, Lindahl U, Kusche-Gullberg M. Substrate specificity of the heparan sulfate hexuronic acid 2-O-sulfotransferase. *Biochemistry* 2001; 40(18):5548–55. doi: 10.1021/bi002926p.
236. Jacobsson I, Lindahl U, Jensen JW, Rodén L, Prihar H, Feingold DS. Biosynthesis of heparin. Substrate specificity of heparosan N-sulfate D-glucuronosyl 5-epimerase. *Journal of Biological Chemistry* 1984; 259(2):1056–63.
237. Teixeira, Felipe C. O. B., Vijaya Kumar A, Kumar Katakam S, Cocola C, Pelucchi P, Graf M et al. The Heparan Sulfate Sulfotransferases HS2ST1 and HS3ST2 Are Novel Regulators of Breast Cancer Stem-Cell Properties. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2020; 8:559554. doi: 10.3389/fcell.2020.559554.
238. Maccarana M, Casu B, Lindahl U. Minimal sequence in heparin/heparan sulfate required for binding of basic fibroblast growth factor. *Journal of Biological Chemistry* 1993; 268(32):23898–905.
239. Walker A, Gallagher JT. Structural domains of heparan sulphate for specific recognition of the C-terminal heparin-binding domain of human plasma fibronectin (HEPII). *Biochem J* 1996; 317 (Pt 3)(Pt 3):871–7. doi: 10.1042/bj3170871.
240. Turnbull JE, Fernig DG, Ke Y, Wilkinson MC, Gallagher JT. Identification of the basic fibroblast growth factor binding sequence in fibroblast heparan sulfate. *Journal of Biological Chemistry* 1992; 267(15):10337–41.
241. Feyzi E, Lustig F, Fager G, Spillmann D, Lindahl U, Salmivirta M. Characterization of heparin and heparan sulfate domains binding to the long splice variant of platelet-derived growth factor A chain. *Journal of Biological Chemistry* 1997; 272(9):5518–24. doi: 10.1074/jbc.272.9.5518.
242. Habuchi H, Suzuki S, Saito T, Tamura T, Harada T, Yoshida K et al. Structure of a heparan sulphate oligosaccharide that binds to basic fibroblast growth factor. *Biochem J* 1992; 285 (Pt 3)(Pt 3):805–13. doi: 10.1042/bj2850805.

243. Ferguson BW, Datta S. Role of heparan sulfate 2-O-sulfotransferase in prostate cancer cell proliferation, invasion, and growth factor signaling. *Prostate Cancer* 2011; 2011:893208. doi: 10.1155/2011/893208.
244. Vijaya Kumar A, Brézillon S, Untereiner V, Sockalingum GD, Kumar Katakam S, Mohamed HT et al. HS2ST1-dependent signaling pathways determine breast cancer cell viability, matrix interactions, and invasive behavior. *Cancer Science* 2020; 111(8):2907–22. doi: 10.1111/cas.14539.
245. Ropero S, Setien F, Espada J, Fraga MF, Herranz M, Asp J et al. Epigenetic loss of the familial tumor-suppressor gene exostosin-1 (EXT1) disrupts heparan sulfate synthesis in cancer cells. *Human Molecular Genetics* 2004; 13(22):2753–65. doi: 10.1093/hmg/ddh298.
246. Liu J, Shworak NW, Fritze LM, Edelberg JM, Rosenberg RD. Purification of heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase. *Journal of Biological Chemistry* 1996; 271(43):27072–82. doi: 10.1074/jbc.271.43.27072.
247. Mochizuki H, Yoshida K, Gotoh M, Sugioka S, Kikuchi N, Kwon Y-D et al. Characterization of a heparan sulfate 3-O-sulfotransferase-5, an enzyme synthesizing a tetrasulfated disaccharide. *Journal of Biological Chemistry* 2003; 278(29):26780–7. doi: 10.1074/jbc.M301861200.
248. Mochizuki H, Yoshida K, Shibata Y, Kimata K. Tetrasulfated disaccharide unit in heparan sulfate: enzymatic formation and tissue distribution. *Journal of Biological Chemistry* 2008; 283(45):31237–45. doi: 10.1074/jbc.M801586200.
249. O'Donnell CD, Tiwari V, Oh M-J, Shukla D. A role for heparan sulfate 3-O-sulfotransferase isoform 2 in herpes simplex virus type 1 entry and spread. *Virology* 2006; 346(2):452–9. doi: 10.1016/j.virol.2005.11.003.
250. Shukla D, Liu J, Blaiklock P, Shworak NW, Bai X, Esko JD et al. A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. *Cell* 1999; 99(1):13–22. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80058-6.
251. Shworak NW, Liu J, Petros LM, Zhang L, Kobayashi M, Copeland NG et al. Multiple isoforms of heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase. Isolation,

- characterization, and expression of human cdnas and identification of distinct genomic loci. *Journal of Biological Chemistry* 1999; 274(8):5170–84. doi: 10.1074/jbc.274.8.5170.
252. Tiwari V, O'Donnell CD, Oh M-J, Valyi-Nagy T, Shukla D. A role for 3-O-sulfotransferase isoform-4 in assisting HSV-1 entry and spread. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005; 338(2):930–7. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.10.056.
253. Wang Z, Hsieh P-H, Xu Y, Thieker D, Chai EJE, Xie S et al. Synthesis of 3-O-Sulfated Oligosaccharides to Understand the Relationship between Structures and Functions of Heparan Sulfate. *J Am Chem Soc* 2017; 139(14):5249–56. doi: 10.1021/jacs.7b01923.
254. Xia G, Chen J, Tiwari V, Ju W, Li J-P, Malmstrom A et al. Heparan sulfate 3-O-sulfotransferase isoform 5 generates both an antithrombin-binding site and an entry receptor for herpes simplex virus, type 1. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277(40):37912–9. doi: 10.1074/jbc.M204209200.
255. Xu D, Tiwari V, Xia G, Clement C, Shukla D, Liu J. Characterization of heparan sulphate 3-O-sulphotransferase isoform 6 and its role in assisting the entry of herpes simplex virus type 1. *Biochem J* 2005; 385(Pt 2):451–9. doi: 10.1042/BJ20040908.
256. Zhang L, Lawrence R, Schwartz JJ, Bai X, Wei G, Esko JD et al. The effect of precursor structures on the action of glucosaminyl 3-O-sulfotransferase-1 and the biosynthesis of anticoagulant heparan sulfate. *Journal of Biological Chemistry* 2001; 276(31):28806–13. doi: 10.1074/jbc.M100204200.
257. Raman K, Kuberan B. Chemical Tumor Biology of Heparan Sulfate Proteoglycans. *Curr Chem Biol* 2010; 4(1):20–31. doi: 10.2174/187231310790226206.
258. Bui C, Ouzzine M, Talhaoui I, Sharp S, Prydz K, Coughtrie MWH et al. Epigenetics: methylation-associated repression of heparan sulfate 3-O-sulfotransferase gene expression contributes to the invasive phenotype of H-EMC-SS chondrosarcoma cells. *FASEB J* 2010; 24(2):436–50. doi: 10.1096/fj.09-136291.

259. Bernal C, Aguayo F, Villarroel C, Vargas M, Díaz I, Ossandon FJ et al. Reprimo as a potential biomarker for early detection in gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14(19):6264–9. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4522.
260. Dietrich D, Lesche R, Tetzner R, Krispin M, Dietrich J, Haedicke W et al. Analysis of DNA methylation of multiple genes in microdissected cells from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *J Histochem Cytochem* 2009; 57(5):477–89. doi: 10.1369/jhc.2009.953026.
261. Gonzalo V, Lozano JJ, Muñoz J, Balaguer F, Pellisé M, Rodríguez de Miguel C et al. Aberrant gene promoter methylation associated with sporadic multiple colorectal cancer. *PLOS ONE* 2010; 5(1):e8777. doi: 10.1371/journal.pone.0008777.
262. Hwang J-A, Kim Y, Hong S-H, Lee J, Cho YG, Han J-Y et al. Epigenetic inactivation of heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 2 in lung cancer and its role in tumorigenesis. *PLOS ONE* 2013; 8(11):e79634. doi: 10.1371/journal.pone.0079634.
263. Lim EH, Ng SL, Li JL, Chang AR, Ng J, Ilancheran A et al. Cervical dysplasia: assessing methylation status (Methylight) of CCNA1, DAPK1, HS3ST2, PAX1 and TFPI2 to improve diagnostic accuracy. *Gynecol Oncol* 2010; 119(2):225–31. doi: 10.1016/j.ygyno.2010.07.028.
264. Mahapatra S, Klee EW, Young CYF, Sun Z, Jimenez RE, Klee GG et al. Global methylation profiling for risk prediction of prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2012; 18(10):2882–95. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2090.
265. Martin-Subero JI, Ammerpohl O, Bibikova M, Wickham-Garcia E, Agirre X, Alvarez S et al. A comprehensive microarray-based DNA methylation study of 367 hematological neoplasms. *PLOS ONE* 2009; 4(9):e6986. doi: 10.1371/journal.pone.0006986.
266. Shivapurkar N, Sherman ME, Stastny V, Echebiri C, Rader JS, Nayar R et al. Evaluation of candidate methylation markers to detect cervical neoplasia. *Gynecol Oncol* 2007; 107(3):549–53. doi: 10.1016/j.ygyno.2007.08.057.
267. Mao X, Gauche C, Coughtrie MWH, Bui C, Gulberti S, Merhi-Soussi F et al. The heparan sulfate sulfotransferase 3-OST3A (HS3ST3A) is a novel tumor regulator and

- a prognostic marker in breast cancer. *Oncogene* 2016; 35(38):5043–55. doi: 10.1038/onc.2016.44.
268. Zhang Z, Jiang H, Wang Y, Shi M. Heparan sulfate D-glucosamine 3-O-sulfotransferase 3B1 is a novel regulator of transforming growth factor-beta-mediated epithelial-to-mesenchymal transition and regulated by miR-218 in nonsmall cell lung cancer. *J Cancer Res Ther* 2018; 14(1):24–9. doi: 10.4103/jcrt.JCRT_659_17.
269. Biroccio A, Cherfils-Vicini J, Augereau A, Pinte S, Bauwens S, Ye J et al. TRF2 inhibits a cell-extrinsic pathway through which natural killer cells eliminate cancer cells. *Nature Cell Biology* 2013; 15(7):818–28. doi: 10.1038/ncb2774.
270. Vijaya Kumar A, Salem Gassar E, Spillmann D, Stock C, Sen Y-P, Zhang T et al. HS3ST2 modulates breast cancer cell invasiveness via MAP kinase- and Tcf4 (Tcf7l2)-dependent regulation of protease and cadherin expression. *International Journal of Cancer* 2014; 135(11):2579–92. doi: 10.1002/ijc.28921.
271. Hellec C, Delos M, Carpentier M, Denys A, Allain F. The heparan sulfate 3-O-sulfotransferases (HS3ST) 2, 3B and 4 enhance proliferation and survival in breast cancer MDA-MB-231 cells. *PLOS ONE* 2018; 13(3):e0194676. doi: 10.1371/journal.pone.0194676.
272. Roperch J-P, Grandchamp B, Desgrandchamps F, Mongiat-Artus P, Ravery V, Ouzaid I et al. Promoter hypermethylation of HS3ST2, SEPTIN9 and SLIT2 combined with FGFR3 mutations as a sensitive/specific urinary assay for diagnosis and surveillance in patients with low or high-risk non-muscle-invasive bladder cancer. *BMC Cancer* 2016; 16(1):704. doi: 10.1186/s12885-016-2748-5.
273. Zhao S, Wang Z. Changes in heparan sulfate sulfotransferases and cell-surface heparan sulfate during SKM-1 cells granulocytic differentiation and A549 cells epithelial-mesenchymal transition. *Glycoconjugate Journal* 2020; 37(2):151–64. doi: 10.1007/s10719-019-09903-0.
274. Ashikari-Hada S, Habuchi H, Kariya Y, Itoh N, Reddi AH, Kimata K. Characterization of growth factor-binding structures in heparin/heparan sulfate using an

- octasaccharide library. *Journal of Biological Chemistry* 2004; 279(13):12346–54. doi: 10.1074/jbc.M313523200.
275. Kreuger J, Jemth P, Sanders-Lindberg E, Eliahu L, Ron D, Basilico C et al. Fibroblast growth factors share binding sites in heparan sulphate. *Biochem J* 2005; 389(Pt 1):145–50. doi: 10.1042/BJ20042129.
276. Kreuger J, Salmivirta M, Sturiale L, Giménez-Gallego G, Lindahl U. Sequence analysis of heparan sulfate epitopes with graded affinities for fibroblast growth factors 1 and 2. *Journal of Biological Chemistry* 2001; 276(33):30744–52. doi: 10.1074/jbc.M102628200.
277. Mahalingam Y, Gallagher JT, Couchman JR. Cellular adhesion responses to the heparin-binding (HepII) domain of fibronectin require heparan sulfate with specific properties. *Journal of Biological Chemistry* 2007; 282(5):3221–30. doi: 10.1074/jbc.M604938200.
278. Ono K, Hattori H, Takeshita S, Kurita A, Ishihara M. Structural features in heparin that interact with VEGF165 and modulate its biological activity. *Glycobiology* 1999; 9(7):705–11. doi: 10.1093/glycob/9.7.705.
279. Pye DA, Vivès RR, Hyde P, Gallagher JT. Regulation of FGF-1 mitogenic activity by heparan sulfate oligosaccharides is dependent on specific structural features: differential requirements for the modulation of FGF-1 and FGF-2. *Glycobiology* 2000; 10(11):1183–92. doi: 10.1093/glycob/10.11.1183.
280. Safaiyan F, Lindahl U, Salmivirta M. Selective reduction of 6-O-sulfation in heparan sulfate from transformed mammary epithelial cells. *European Journal of Biochemistry* 1998; 252(3):576–82. doi: 10.1046/j.1432-1327.1998.2520576.x.
281. Iravani O, Bay B-H, Yip GW-C. Silencing HS6ST3 inhibits growth and progression of breast cancer cells through suppressing IGF1R and inducing XAF1. *Exp Cell Res* 2017; 350(2):380–9. doi: 10.1016/j.yexcr.2016.12.019.
282. Backen AC, Cole CL, Lau SC, Clamp AR, McVey R, Gallagher JT et al. Heparan sulphate synthetic and editing enzymes in ovarian cancer. *British Journal of Cancer* 2007; 96(10):1544–8. doi: 10.1038/sj.bjc.6603747.

283. Kanoh A, Seko A, Ideo H, Yoshida M, Nomoto M, Yonezawa S et al. Ectopic expression of N-acetylglucosamine 6-O-sulfotransferase 2 in chemotherapy-resistant ovarian adenocarcinomas. *Glycoconjugate Journal* 2006; 23(5-6):453–60. doi: 10.1007/s10719-006-6979-6.
284. Seko A, Nagata K, Yonezawa S, Yamashita K. Ectopic expression of a GlcNAc 6-O-sulfotransferase, GlcNAc6ST-2, in colonic mucinous adenocarcinoma. *Glycobiology* 2002; 12(6):379–88. doi: 10.1093/glycob/12.6.379.
285. Song K, Li Q, Peng Y-B, Li J, Ding K, Chen L-J et al. Silencing of hHS6ST2 inhibits progression of pancreatic cancer through inhibition of Notch signalling. *Biochem J* 2011; 436(2):271–82. doi: 10.1042/BJ20110297.
286. Seko A, Kataoka F, Aoki D, Sakamoto M, Nakamura T, Hatae M et al. N-Acetylglucosamine 6-O-sulfotransferase-2 as a tumor marker for uterine cervical and corpus cancer. *Glycoconjugate Journal* 2009; 26(8):1065–73. doi: 10.1007/s10719-008-9227-4.
287. Waaijer CJF, Andrea CE de, Hamilton A, van Oosterwijk JG, Stringer SE, Bovée JVMG. Cartilage tumour progression is characterized by an increased expression of heparan sulphate 6O-sulphation-modifying enzymes. *Virchows Arch* 2012; 461(4):475–81. doi: 10.1007/s00428-012-1300-5.
288. Sreekumar A, Lu M, Choudhury B, Pan T-C, Pant DK, Lawrence-Paul MR et al. B3GALT6 promotes dormant breast cancer cell survival and recurrence by enabling heparan sulfate-mediated FGF signaling. *Cancer cell* 2024; 42(1):52-69.e7. doi: 10.1016/j.ccell.2023.11.008.
289. Cole CL, Rushton G, Jayson GC, Avizienyte E. Ovarian cancer cell heparan sulfate 6-O-sulfotransferases regulate an angiogenic program induced by heparin-binding epidermal growth factor (EGF)-like growth factor/EGF receptor signaling. *J Biol Chem* 2014; 289(15):10488–501. doi: 10.1074/jbc.M113.534263.
290. Jin Y, He J, Du J, Zhang R-X, Yao H-B, Shao Q-S. Overexpression of HS6ST2 is associated with poor prognosis in patients with gastric cancer. *Oncol Lett* 2017; 14(5):6191–7. doi: 10.3892/ol.2017.6944.

291. Ramani VC, Purushothaman A, Stewart MD, Thompson CA, Vlodavsky I, Au JL-S et al. The heparanase/syndecan-1 axis in cancer: mechanisms and therapies. *FEBS J* 2013; 280(10):2294–306. doi: 10.1111/febs.12168.
292. Ilan N, Elkin M, Vlodavsky I. Regulation, function and clinical significance of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38(12):2018–39. doi: 10.1016/j.biocel.2006.06.004.
293. Vreys V, David G. Mammalian heparanase: what is the message? *J Cell Mol Med* 2007; 11(3):427–52. doi: 10.1111/j.1582-4934.2007.00039.x.
294. Sanderson RD, Yang Y, Kelly T, MacLeod V, Dai Y, Theus A. Enzymatic remodeling of heparan sulfate proteoglycans within the tumor microenvironment: growth regulation and the prospect of new cancer therapies. *J Cell Biochem* 2005; 96(5):897–905. doi: 10.1002/jcb.20602.
295. Nardella C, Lahm A, Pallaoro M, Brunetti M, Vannini A, Steinkühler C. Mechanism of activation of human heparanase investigated by protein engineering. *Biochemistry* 2004; 43(7):1862–73. doi: 10.1021/bi030203a.
296. Elkin M, Ilan N, Ishai-Michaeli R, Friedmann Y, Papo O, Pecker I et al. Heparanase as mediator of angiogenesis: mode of action. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2001; 15(9):1661–3. doi: 10.1096/fj.00-0895fje.
297. Cohen-Kaplan V, Naroditsky I, Zetser A, Ilan N, Vlodavsky I, Doweck I. Heparanase induces VEGF C and facilitates tumor lymphangiogenesis. *International Journal of Cancer* 2008; 123(11):2566–73. doi: 10.1002/ijc.23898.
298. Vlodavsky I, Eldor A, Haimovitz-Friedman A, Matzner Y, Ishai-Michaeli R, Lider O et al. Expression of heparanase by platelets and circulating cells of the immune system: possible involvement in diapedesis and extravasation. *Invasion Metastasis* 1992; 12(2):112–27.
299. Escobar Galvis ML, Jia J, Zhang X, Jastrebova N, Spillmann D, Gottfridsson E et al. Transgenic or tumor-induced expression of heparanase upregulates sulfation of

- heparan sulfate. *Nature Chemical Biology* 2007; 3(12):773–8. doi: 10.1038/nchembio.2007.41.
300. Rosen SD, Lemjabbar-Alaoui H. Sulf-2: an extracellular modulator of cell signaling and a cancer target candidate. *Expert Opin Ther Targets* 2010; 14(9):935–49. doi: 10.1517/14728222.2010.504718.
301. Hur K, Han T-S, Jung E-J, Yu J, Lee H-J, Kim WH et al. Up-regulated expression of sulfatases (SULF1 and SULF2) as prognostic and metastasis predictive markers in human gastric cancer. *J Pathol* 2012; 228(1):88–98. doi: 10.1002/path.4055.
302. Morimoto-Tomita M, Uchimura K, Werb Z, Hemmerich S, Rosen SD. Cloning and characterization of two extracellular heparin-degrading endosulfatases in mice and humans. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277(51):49175–85. doi: 10.1074/jbc.M205131200.
303. Nawroth R, van Zante A, Cervantes S, McManus M, Hebrok M, Rosen SD. Extracellular sulfatases, elements of the Wnt signaling pathway, positively regulate growth and tumorigenicity of human pancreatic cancer cells. *PLOS ONE* 2007; 2(4):e392. doi: 10.1371/journal.pone.0000392.
304. Bret C, Moreaux J, Schved J-F, Hose D, Klein B. SULFs in human neoplasia: implication as progression and prognosis factors. *J Transl Med* 2011; 9:72. doi: 10.1186/1479-5876-9-72.
305. El Masri R, Crétinon Y, Gout E, Vivès RR. HS and Inflammation: A Potential Playground for the Sulfs? *Frontiers in Immunology* 2020; 11:570. doi: 10.3389/fimmu.2020.00570.
306. Ai X, Do A-T, Lozynska O, Kusche-Gullberg M, Lindahl U, Emerson CP. QSulf1 remodels the 6-O sulfation states of cell surface heparan sulfate proteoglycans to promote Wnt signaling. *The Journal of Cell Biology* 2003; 162(2):341–51. doi: 10.1083/jcb.200212083.
307. Viviano BL, Paine-Saunders S, Gasiunas N, Gallagher J, Saunders S. Domain-specific modification of heparan sulfate by QSulf1 modulates the binding of the bone

- morphogenetic protein antagonist Noggin. *Journal of Biological Chemistry* 2004; 279(7):5604–11. doi: 10.1074/jbc.M310691200.
308. Saad OM, Ebel H, Uchimura K, Rosen SD, Bertozzi CR, Leary JA. Compositional profiling of heparin/heparan sulfate using mass spectrometry: assay for specificity of a novel extracellular human endosulfatase. *Glycobiology* 2005; 15(8):818–26. doi: 10.1093/glycob/cwi064.
309. Dai Y, Yang Y, MacLeod V, Yue X, Rapraeger AC, Shriver Z et al. HSulf-1 and HSulf-2 are potent inhibitors of myeloma tumor growth in vivo. *Journal of Biological Chemistry* 2005; 280(48):40066–73. doi: 10.1074/jbc.M508136200.
310. Lai J-P, Chien JR, Moser DR, Staub JK, Aderca I, Montoya DP et al. hSulf1 Sulfatase promotes apoptosis of hepatocellular cancer cells by decreasing heparin-binding growth factor signaling. *Gastroenterology* 2004; 126(1):231–48. doi: 10.1053/j.gastro.2003.09.043.
311. Li J, Kleeff J, Abiatari I, Kaye H, Giese NA, Felix K et al. Enhanced levels of HSulf-1 interfere with heparin-binding growth factor signaling in pancreatic cancer. *Molecular Cancer* 2005; 4(1):14. doi: 10.1186/1476-4598-4-14.
312. Yang JD, Sun Z, Hu C, Lai J, Dove R, Nakamura I et al. Sulfatase 1 and sulfatase 2 in hepatocellular carcinoma: associated signaling pathways, tumor phenotypes, and survival. *Genes Chromosomes Cancer* 2011; 50(2):122–35. doi: 10.1002/gcc.20838.
313. Lai J-P, Sandhu DS, Yu C, Han T, Moser CD, Jackson KK et al. Sulfatase 2 up-regulates glypican 3, promotes fibroblast growth factor signaling, and decreases survival in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008; 47(4):1211–22. doi: 10.1002/hep.22202.
314. Lemjabbar-Alaoui H, van Zante A, Singer MS, Xue Q, Wang Y-Q, Tsay D et al. Sulf-2, a heparan sulfate endosulfatase, promotes human lung carcinogenesis. *Oncogene* 2010; 29(5):635–46. doi: 10.1038/onc.2009.365.
315. Jiang T, Chen Z-H, Chen Z, Tan D. SULF2 promotes tumorigenesis and inhibits apoptosis of cervical cancer cells through the ERK/AKT signaling pathway. *Braz J Med Biol Res* 2020; 53(2):e8901. doi: 10.1590/1414-431X20198901.

316. Phillips JJ, Huillard E, Robinson AE, Ward A, Lum DH, Polley M-Y et al. Heparan sulfate sulfatase SULF2 regulates PDGFR α signaling and growth in human and mouse malignant glioma. *J Clin Invest* 2012; 122(3):911–22. doi: 10.1172/JCI58215.
317. ZHU C, He L, Zhou X, Nie X, Gu Y. Sulfatase 2 promotes breast cancer progression through regulating some tumor-related factors. *Oncol Rep* 2016; 35(3):1318–28. doi: 10.3892/or.2015.4525.
318. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 2004; 429(6990):457–63. doi: 10.1038/nature02625.
319. Yu X, Zhao H, Wang R, Chen Y, Ouyang X, Li W et al. Cancer epigenetics: from laboratory studies and clinical trials to precision medicine. *Cell Death Discov* 2024; 10(1):28. doi: 10.1038/s41420-024-01803-z.
320. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 2010; 31(1):27–36. doi: 10.1093/carcin/bgp220.
321. Klose RJ, Bird AP. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci* 2006; 31(2):89–97. doi: 10.1016/j.tibs.2005.12.008.
322. Sippl W. Epigenetic targets in drug discovery. Weinheim: WILEY-VCH; 2009. (Methods and Principles in Medicinal Chemistryvol. 42); ISBN: 978-3-527-32355-5.
323. Kulis M, Esteller M. DNA methylation and cancer. *Adv Genet* 2010; 70:27–56. doi: 10.1016/B978-0-12-380866-0.60002-2.
324. Holmborn K, Ledin J, Smeds E, Eriksson I, Kusche-Gullberg M, Kjellén L. Heparan sulfate synthesized by mouse embryonic stem cells deficient in NDST1 and NDST2 is 6-O-sulfated but contains no N-sulfate groups. *Journal of Biological Chemistry* 2004; 279(41):42355–8. doi: 10.1074/jbc.C400373200.
325. Pikas DS, Eriksson I, Kjellén L. Overexpression of different isoforms of glucosaminyl N-deacetylase/N-sulfotransferase results in distinct heparan sulfate N-sulfation patterns. *Biochemistry* 2000; 39(15):4552–8. doi: 10.1021/bi992524l.
326. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res* 2011; 21(3):381–95. doi: 10.1038/cr.2011.22.

327. Hull EE, Montgomery MR, Leyva KJ. HDAC Inhibitors as Epigenetic Regulators of the Immune System: Impacts on Cancer Therapy and Inflammatory Diseases. *BioMed Research International*:15.
328. Haberland M, Montgomery RL, Olson EN. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat Rev Genet* 2009; 10(1):32–42. doi: 10.1038/nrg2485.
329. Ropero S, Esteller M. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. *Molecular Oncology* 2007; 1(1):19–25. doi: 10.1016/j.molonc.2007.01.001.
330. Grunstein M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 1997; 389(6649):349–52. doi: 10.1038/38664.
331. Chun P. Histone deacetylase inhibitors in hematological malignancies and solid tumors. *Archives of Pharmacal Research* 2015; 38(6):933–49. doi: 10.1007/s12272-015-0571-1.
332. Peng L, Seto E. Deacetylation of nonhistone proteins by HDACs and the implications in cancer. *Handb Exp Pharmacol* 2011; 206:39–56. doi: 10.1007/978-3-642-21631-2_3.
333. Seto E, Yoshida M. Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014; 6(4):a018713. doi: 10.1101/cshperspect.a018713.
334. McClure JJ, Li X, Chou CJ. Advances and Challenges of HDAC Inhibitors in Cancer Therapeutics. *Adv Cancer Res* 2018; 138:183–211. doi: 10.1016/bs.acr.2018.02.006.
335. Gregoret IV, Lee Y-M, Goodson HV. Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *J Mol Biol* 2004; 338(1):17–31. doi: 10.1016/j.jmb.2004.02.006.
336. Ruijter AJM de, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, van Kuilenburg ABP. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* 2003; 370(Pt 3):737–49. doi: 10.1042/BJ20021321.
337. Barneda-Zahonero B, Parra M. Histone deacetylases and cancer. *Molecular Oncology* 2012; 6(6):579–89. doi: 10.1016/j.molonc.2012.07.003.

338. Weichert W, Röske A, Gekeler V, Beckers T, Ebert MPA, Pross M et al. Association of patterns of class I histone deacetylase expression with patient prognosis in gastric cancer: a retrospective analysis. *Lancet Oncol* 2008; 9(2):139–48. doi: 10.1016/S1470-2045(08)70004-4.
339. Weichert W, Denkert C, Noske A, Darb-Esfahani S, Dietel M, Kalloger SE et al. Expression of class I histone deacetylases indicates poor prognosis in endometrioid subtypes of ovarian and endometrial carcinomas. *Neoplasia* 2008; 10(9):1021–7. doi: 10.1593/neo.08474.
340. Sudo T, Mimori K, Nishida N, Kogo R, Iwaya T, Tanaka F et al. Histone deacetylase 1 expression in gastric cancer. *Oncol Rep* 2011; 26(4):777–82. doi: 10.3892/or.2011.1361.
341. Mostovich LA, Prudnikova TY, Kondratov AG, Gubanova NV, Kharchenko OA, Kutsenko OS et al. The TCF4/ β -catenin pathway and chromatin structure cooperate to regulate D-glucuronyl C5-epimerase expression in breast cancer. *Epigenetics* 2012; 7(8):930–9. doi: 10.4161/epi.21199.
342. Song K, Li Q, Jiang Z-Z, Guo C-W, Li P. Heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase-3B1, a novel epithelial-mesenchymal transition inducer in pancreatic cancer. *Cancer Biol Ther* 2011; 12(5):388–98. doi: 10.4161/cbt.12.5.15957.
343. Müller A, Florek M. 5-Azacytidine/Azacitidine. *Recent Results Cancer Res* 2010; 184:159–70. doi: 10.1007/978-3-642-01222-8_11.
344. Li LH, Olin EJ, Fraser TJ, Bhuyan BK. Phase specificity of 5-azacytidine against mammalian cells in tissue culture. *Cancer Research* 1970; 30(11):2770–5.
345. Glover AB, Leyland-Jones B. Biochemistry of azacitidine: a review. *Cancer Treat Rep* 1987; 71(10):959–64.
346. Chen L, MacMillan AM, Chang W, Ezaz-Nikpay K, Lane WS, Verdine GL. Direct identification of the active-site nucleophile in a DNA (cytosine-5)-methyltransferase. *Biochemistry* 1991; 30(46):11018–25. doi: 10.1021/bi00110a002.

347. Santi DV, Norment A, Garrett CE. Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1984; 81(22):6993–7. doi: 10.1073/pnas.81.22.6993.
348. Gnyszka A, Jastrzebski Z, Flis S. DNA methyltransferase inhibitors and their emerging role in epigenetic therapy of cancer. *Anticancer Research* 2013; 33(8):2989–96.
349. Schermelleh L, Spada F, Easwaran HP, Zolghadr K, Margot JB, Cardoso MC et al. Trapped in action: direct visualization of DNA methyltransferase activity in living cells. *Nat Methods* 2005; 2(10):751–6. doi: 10.1038/nmeth794.
350. Friedman S. The inhibition of DNA(cytosine-5)methylases by 5-azacytidine. The effect of azacytosine-containing DNA. *Molecular Pharmacology* 1981; 19(2):314–20.
351. Jones PA, Taylor SM, Wilson VL. Inhibition of DNA methylation by 5-azacytidine. *Recent Results Cancer Res* 1983; 84:202–11. doi: 10.1007/978-3-642-81947-6_15.
352. Stresemann C, Lyko F. Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *International Journal of Cancer* 2008; 123(1):8–13. doi: 10.1002/ijc.23607.
353. Kaminskas E, Farrell AT, Wang Y-C, Sridhara R, Pazdur R. FDA drug approval summary: azacitidine (5-azacytidine, Vidaza) for injectable suspension. *Oncologist* 2005; 10(3):176–82. doi: 10.1634/theoncologist.10-3-176.
354. Azacitidine Accord | European Medicines Agency; 2024 [Stand: 28.03.2024]. Verfügbar unter:
<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/azacitidine-accord>.
355. Hu C, Liu X, Zeng Y, Liu J, Wu F. DNA methyltransferase inhibitors combination therapy for the treatment of solid tumor: mechanism and clinical application. *Clinical Epigenetics* 2021; 13(1):166. doi: 10.1186/s13148-021-01154-x.
356. Stoller RG, Myers CE, Chabner BA. Analysis of cytidine deaminase and tetrahydrouridine interaction by use of ligand techniques. *Biochemical Pharmacology* 1978; 27(1):53–9. doi: 10.1016/0006-2952(78)90256-3.

357. Boothman DA, Briggles TV, Greer S. Tumor-selective metabolism of 5-fluoro-2'-deoxycytidine coadministered with tetrahydrouridine compared to 5-fluorouracil in mice bearing Lewis lung carcinoma. *Cancer Research* 1987; 47(9):2354–62.
358. Beumer JH, Parise RA, Newman EM, Doroshow JH, Synold TW, Lenz H-J et al. Concentrations of the DNA methyltransferase inhibitor 5-fluoro-2'-deoxycytidine (FdCyd) and its cytotoxic metabolites in plasma of patients treated with FdCyd and tetrahydrouridine (THU). *Cancer Chemother Pharmacol* 2008; 62(2):363–8. doi: 10.1007/s00280-007-0603-8.
359. Bradner JE, West N, Grachan ML, Greenberg EF, Haggarty SJ, Warnow T et al. Chemical phylogenetics of histone deacetylases. *Nature Chemical Biology* 2010; 6(3):238–43. doi: 10.1038/nchembio.313.
360. Li Y, Seto E. HDACs and HDAC Inhibitors in Cancer Development and Therapy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2016; 6(10).
361. Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5(9):769–84. doi: 10.1038/nrd2133.
362. Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1973; 51(5):1409–16. doi: 10.1093/jnci/51.5.1409.
363. Done SJ, Hrsg. *Breast Cancer: Recent Advances in Biology, Imaging and Therapeutics*. Erscheinungsort nicht ermittelbar: IntechOpen; 2011; ISBN: 978-953-307-730-7. Verfügbar unter: <https://directory.doabooks.org/handle/20.500.12854/65358>.
364. H. F, Zarghi A, Kobarfard F, Zendehdel R, Nakhjavani M, Arfaiee S et al. Remarks in Successful Cellular Investigations for Fighting Breast Cancer Using Novel Synthetic Compounds. In: Gunduz M, Gunduz E, Hrsg. *Breast cancer: Focusing tumor microenvironment, stem cells and metastasis*. s.l.: s.n; 2011.
365. Gest C, Joimel U, Huang L, Pritchard L-L, Petit A, Dulong C et al. Rac3 induces a molecular pathway triggering breast cancer cell aggressiveness: differences in

- MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines. BMC Cancer 2013; 13:63. doi: 10.1186/1471-2407-13-63.
366. Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. Breast Cancer Research : BCR 2011; 13(4):215. doi: 10.1186/bcr2889.
367. Cailleau R, Olivé M, Cruciger QVJ. Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: Preliminary characterization. In Vitro 1978; 14(11):911–5. doi: 10.1007/BF02616120.
368. Cailleau R, Young R, Olivé M, Reeves WJ. Breast tumor cell lines from pleural effusions. J Natl Cancer Inst 1974; 53(3):661–74. doi: 10.1093/jnci/53.3.661.
369. Chavez KJ, Garimella SV, Lipkowitz S, Eng-Wong J, Zujewski JA. Triple negative breast cancer cell lines: One tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. Breast Disease 2011; 32(1-2):35–48. doi: 10.3233/BD-2010-0307.
370. Korff M, Imberg L, Will JM, Bückreiß N, Kalinina SA, Wenzel BM et al. Acylated 1 H - 1,2,4-Triazol-5-amines Targeting Human Coagulation Factor XIIa and Thrombin: Conventional and Microscale Synthesis, Anticoagulant Properties, and Mechanism of Action. Journal of Medicinal Chemistry 2020:acs.jmedchem.0c01635. doi: 10.1021/acs.jmedchem.0c01635.
371. casy_brochure.pdf [Stand: 21.02.2024]. Verfügbar unter: https://www.ols-bio.de/wp-content/uploads/2020/02/casy_brochure.pdf.
372. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. Cold Spring Harb Protoc 2018; 2018(6). doi: 10.1101/pdb.prot095505.
373. Holzapfel B, Wickert L. Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. Biol. Unserer Zeit 2007; 37(2):120–6. doi: 10.1002/biuz.200610332.
374. Zymo Research Europe. Direct-zol RNA Miniprep Kits; 2023 [Stand: 11.07.2023]. Verfügbar unter: <https://www.zymoresearch.de/products/direct-zol-rna-miniprep-kits>.

375. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Current Protocols in Immunology* 2018; 120:5.1.1-5.1.11. doi: 10.1002/cpim.40.
376. How a Flow Cytometer Works - DE. Verfügbar unter:
<https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/flow-cytometry-basics/flow-cytometry-fundamentals/how-flow-cytometer-works.html> [Stand: 07.05.2020].
377. Guava® easyCyte™. Luminex Corporation. Verfügbar unter:
<https://www.luminexcorp.com/guava-easycyte-flow-cytometers/> [Stand: 06.05.2020].
378. Mahmood T, Yang P-C. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences* 2012; 4(9):429–34. doi: 10.4103/1947-2714.100998.
379. Hnasko TS, Hnasko RM. The Western Blot. *Methods Mol Biol* 2015; 1318:87–96. doi: 10.1007/978-1-4939-2742-5_9.
380. Kim B. Western Blot Techniques. *Methods Mol Biol* 2017; 1606:133–9. doi: 10.1007/978-1-4939-6990-6_9.
381. Kielkopf CL, Bauer W, Urbatsch IL. Methods for Measuring the Concentrations of Proteins. *Cold Spring Harb Protoc* 2020; 2020(4):102277. doi: 10.1101/pdb.top102277.
382. LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 1951; 193(1):265–75.
383. Bayguinov PO, Oakley DM, Shih C-C, Geanon DJ, Joens MS, Fitzpatrick JAJ. Modern Laser Scanning Confocal Microscopy. *Curr Protoc Cytom* 2018; 85(1):e39. doi: 10.1002/cpcy.39.
384. Dam GB ten, Kurup S, van de Westerloo EMA, Versteeg EMM, Lindahl U, Spillmann D et al. 3-O-sulfated oligosaccharide structures are recognized by anti-heparan sulfate antibody HS4C3. *J Biol Chem* 2006; 281(8):4654–62. doi: 10.1074/jbc.M506357200.

385. Fluorescence SpectraViewer; 2024 [Stand: 18.04.2024]. Verfügbar unter:
<https://www.thermofisher.com/order/fluorescence-spectraviewer/>.
386. Harrison P, Mackie I, Mumford A, Briggs C, Liesner R, Winter M et al. Guidelines for the laboratory investigation of heritable disorders of platelet function: Guideline. British Journal of Haematology 2011; 155(1):30–44. doi: 10.1111/j.1365-2141.2011.08793.x.
387. WMA - The World Medical Association-WMA Declaration of Helsinki – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects; 2024 [Stand: 18.04.2024]. Verfügbar unter: <https://www.wma.net/policies-post/wma-declaration-of-helsinki-ethical-principles-for-medical-research-involving-human-subjects/>.
388. Born GVR. Aggregation of Blood Platelets by Adenosine Diphosphate and its Reversal. Nature 1962; 194(4832):927–9. doi: 10.1038/194927b0.
389. Gremmel T, Calatzis A, Steiner S, Kaider A, Seidinger D, Koppensteiner R et al. Is TRAP-6 suitable as a positive control for platelet reactivity when assessing response to clopidogrel? Platelets 2010; 21(7):515–21. doi: 10.3109/09537104.2010.493587.
390. Rajendran M, Dane E, Conley J, Tantama M. Imaging Adenosine Triphosphate (ATP). The Biological Bulletin 2016; 231(1):73–84. doi: 10.1086/689592.
391. Gockel L, Ponert J, Schwarz S, Schlesinger M, Bendas G. The Low Molecular Weight Heparin Tinzaparin Attenuates Platelet Activation in Terms of Metastatic Niche Formation by Coagulation-Dependent and Independent Pathways. Molecules 2018; 23(11):2753. doi: 10.3390/molecules23112753.
392. Cattaneo M, Cerletti C, Harrison P, Hayward CPM, Kenny D, Nugent D et al. Recommendations for the standardization of light transmission aggregometry: a consensus of the working party from the platelet physiology subcommittee of SSC/ISTH. Journal of Thrombosis and Haemostasis 2013; 11(6):1183–9. doi: 10.1111/jth.12231.
393. Hvas A-M, Favaloro EJ. Platelet Function Analyzed by Light Transmission Aggregometry. In: Favaloro EJ, Lippi G, Hrsg. Hemostasis and Thrombosis. New

- York, NY: Springer New York; 2017. S. 321–31 [Stand: 05.05.2020]. Verfügbar unter: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7196-1_25.
394. Paniccia R, Priora R, Alessandrello Liotta A, Abbate R. Platelet function tests: a comparative review. *Vascular Health and Risk Management* 2015; 11:133–48. doi: 10.2147/VHRM.S44469.
395. Castoldi E, Rosing J. Thrombin generation tests. *Thrombosis Research* 2011; 127:S21 - S25. doi: 10.1016/S0049-3848(11)70007-X.
396. Tripodi A. Thrombin Generation Assay and Its Application in the Clinical Laboratory. *Clinical Chemistry* 2016; 62(5):699–707. doi: 10.1373/clinchem.2015.248625.
397. Technothrombin® TGA - Diapharma. Verfügbar unter: <https://diapharma.com/product/hemostasis/technothrombin-thrombin-generation-assay-tga/> [Stand: 11.05.2020].
398. The Human Protein Atlas; 2024 [Stand: 25.06.2024]. Verfügbar unter: <https://www.proteinatlas.org/>.
399. Suhovskih AV, Tsidulko AY, Kutsenko OS, Kovner AV, Aidagulova SV, Ernberg I et al. Transcriptional Activity of Heparan Sulfate Biosynthetic Machinery is Specifically Impaired in Benign Prostate Hyperplasia and Prostate Cancer. *Frontiers in Oncology* 2014; 4:79. doi: 10.3389/fonc.2014.00079.
400. Hassan N, Bückreiß N, Efinger J, Schulz-Fincke M, König P, Greve B et al. The Heparan Sulfate Proteoglycan Syndecan-1 Triggers Breast Cancer Cell-Induced Coagulability by Induced Expression of Tissue Factor. *Cells* 2023; 12(6). doi: 10.3390/cells12060910.
401. Ibrahim SA, Gadalla R, El-Ghonaimy EA, Samir O, Mohamed HT, Hassan H et al. Syndecan-1 is a novel molecular marker for triple negative inflammatory breast cancer and modulates the cancer stem cell phenotype via the IL-6/STAT3, Notch and EGFR signaling pathways. *Molecular Cancer* 2017; 16(1):57. doi: 10.1186/s12943-017-0621-z.

402. Nikolova V, Koo C-Y, Ibrahim SA, Wang Z, Spillmann D, Dreier R et al. Differential roles for membrane-bound and soluble syndecan-1 (CD138) in breast cancer progression. *Carcinogenesis* 2009; 30(3):397–407. doi: 10.1093/carcin/bgp001.
403. Wang Z, Arnold K, Dhurandhare VM, Xu Y, Pagadala V, Labra E et al. Analysis of 3-O-Sulfated Heparan Sulfate Using Isotopically Labeled Oligosaccharide Calibrants. *Anal Chem* 2022; 94(6):2950–7. doi: 10.1021/acs.analchem.1c04965.

9 Anhang

9.1 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Schematische Darstellung der primären Hämostase nach einer Gefäßendotheldenudation. vWF bindet an freiliegende Kollagenfasern und vermittelt die Adhäsion vorbeiströmender Thrombozyten über die Bindung des GPIb-IX-V-Komplexes. Thrombozyten werden durch die Rezeptoreigenschaften des GP-Komplexes aktiviert und sezernieren Aktivatorstoffe. Weitere Thrombozyten werden angelockt, aktiviert und es entsteht über die Ausbildung von Pseudopodien ein Thrombus. Über Bindung an GPIIb/IIIa werden Fibrinogen-Moleküle im Thrombus angereichert [14, 23]. Die Grafik wurde mit BioRender erstellt..... 4
- Abbildung 2:** Schematische Darstellung der sekundären Hämostase mit Unterteilung des intrinsischen und des extrinsischen Hämostasesystems [12, 13, 26]. 6
- Abbildung 3:** Einfluss von Antithrombin auf das intrinsische und extrinsische System der sekundären Hämostase [13, 26]. 8
- Abbildung 4:** Schematische und vereinfachte Darstellung der unterschiedlichen Mechanismen einer TCIPA (Neu verwendete Abkürzungen: CLEC-2 = C-type lectin-like receptor; δ = dichte Granula; Podo = Podoplanin; PSL = P-Selektin-Ligand; TXR = Thromboxan-Rezeptor; $\alpha_{IIb}\beta_3$ = GPIIb/IIIa) [81, 82]. Die Grafik wurde mit BioRender erstellt. 11
- Abbildung 5:** Schematische Darstellung der Teilschritte der metastatischen Kaskade der hämatogenen Metastasierung: 1.) Neovaskularisation und enzymatische Degradation der Basalmembran sowie der EZM durch Tumorzellen des Primärtumors und Tumorzell-assoziierte Makrophagen und Fibroblasten gefolgt von einer aktiven Lokalinfiltration der entarteten Zellen in die EZM. 2.) Intravasation in Blutgefäß und Eintritt in das Blutssystem. 3.) Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung führt zur Ausbildung von Heteroaggregaten, durch die sich die disseminierten Zellen vor hämodynamischem Scherstress und Immunabwehr schützen. 4.) Extravasation aus dem Blutssystem. 5.) Bildung einer Mikrometastase unter Ausnutzung der prämetastatischen Nische. 6.) Metastatische Kolonisation und Ausbildung eines vaskularisierten Sekundärtumors [155]. Die Grafik wurde mit BioRender erstellt. 17

- Abbildung 6:** Schematische Darstellung des Aufbaus von Heparansulfaten und der für die Ausbildung der AT-Bindungsstelle notwendigen Modifikationen der HS-Kette. Im Golgi-Apparat wird der Tetrasaccharid-Primer Xyl-Gal-Gal-GlcA durch XYLT1, XYLT2, GALT1, GALT2 und GLCAT1 ausgebildet. An diesen wird durch EXT1, EXT2 polymerisiert, die HS-Kette, die im späteren Verlauf durch diverse Enzyme modifiziert wird. NDST vermitteln die N-Deacetylierung und anschließende N-Sulfatierung von GlcNAc. HS6ST kann dann eine 6-O-Sulfatierung Glc oder GlcNAc vermitteln. GlcA wird durch HSGLCSE zu IdoA epimerisiert. Im Folgenden wird IdoA durch HS2ST 2-O-sulfatiert. HS3ST synthetisiert 3-O-Sulfatierungen an. Oberhalb der schematischen HS-Kette wird die Strukturformel des Antithrombin-bindenden Pentasaccharids abgebildet. (GlcNAc6S = 6-O-sulfatiertes N-Acetylglucosamin; GlcA = Glucuronsäure; GlcNS3S6S = 3,6-O-sulfatiertes N-Sulfoglucosamin; IdoA2S = 2-O-sulfatierte L-Iduronsäure; GlcNS6S = 6-O-sulfatiertes N-Sulfoglucosamin) [10, 54, 195, 222–224]. Die Grafik wurde mit BioRender erstellt..... 24
- Abbildung 7:** Strukturformeln der verwendeten epigenetisch-wirksamen Inhibitoren, deren Einfluss auf die Expression der Heparansulfat Sulfotransferasen untersucht werden soll..... 35
- Abbildung 8:** Potentieller Einfluss der 2-O-, 3-O- und 6-O-Sulfotransferasen HS2ST, HS3ST und HS6ST auf die Ausbildung des Antithrombin-bindenden Pentasaccharids mittels Modifikation der HSPG innerhalb der tumoralen Glykokalyx. Die Inhibition des aktiven Thrombins (FIIa) könnte zu einer Beeinflussung der TCIPA mit Auswirkung auf die Tumorzell-Thrombozyten-Kommunikation und die hämatogene Metastasierung führen. Die Grafik wurde mit BioRender erstellt..... 39
- Abbildung 9:** Aufbau des CASY® 1 Modell TT Cell Counters [371] 62
- Abbildung 10:** Schematische Darstellung der enzymatischen Reduktion von MTT hin zu violettem Formazan durch mitochondriale Reduktasen [372]. Die Grafik wurde mit BioRender erstellt. 63
- Abbildung 11:** Schematische Darstellung des Messprinzips (links) der qPCR und die daraus resultierende Amplifikationskurve (rechts). Die Grafik wurde mit BioRender erstellt. 65
- Abbildung 12:** Schematische Darstellung der jeweiligen Teilschritte eines Vermehrungszyklus während der qPCR. Die Grafik wurde mit BioRender erstellt..... 66
- Abbildung 13:** qPCR-Temperaturprogramm mit Unterteilung der drei Phasen Denaturierung, Annealing und Elongation der cDNA mit den entsprechenden Inkubationstemperaturen und -zeiten. Messpunkte sind mittels eines Kamerapiktogramms gekennzeichnet. Jede qPCR-Messung beginnt mit einer 30-minütigen Inkubationszeit bei einer Temperatur von 48 °C, bei der mRNA durch das Enzym Reverse Transkriptase in cDNA transkribiert wird, und endet mit einer Schmelzpunktbestimmung. Für diese wird ein Temperaturgradient (60 – 90 °C) mit 0,5 °C-Intervallen vermessen. 67

Abbildung 14: Schematische Darstellung der Separation der Zellen durch Umspülung der Probelösung mit Mantelflüssigkeit [376].	68
Abbildung 15: Schematische Darstellung des Aufbaus und des Strahlenganges des Durchflussszytometers [377].	69
Abbildung 16: Gating-Strategie der Durchflussszytometrie	70
Abbildung 17: Entstehung des Kupfer(I)-Bicinchoninsäure-Komplexes aus einwertigen Kupfer-Ionen und BCA.	73
Abbildung 18: Schematische Darstellung der Visualisierung eines Zielproteins (POI = protein of interest) nach erfolgter SDS-PAGE und Übertragung auf eine PVDF-Membran. An das POI bindet ein spezifischer primärer Antikörper, der wiederum durch einen HRP-konjugierten sekundären Antikörper markiert wird. HRP katalysiert dann die Umsetzung von Luminol, woraus die Emission eines Lumineszenzsignals resultiert. Die Grafik wurde mit BioRender erstellt.	75
Abbildung 19: Schematische Darstellung des Strahlengangs eines konfokalen Laserrastermikroskops [383]. Die Grafik wurde mit BioRender erstellt.	77
Abbildung 20: Schematische Darstellung der Wellenlängen der Emissions- und Exzitationsmaxima verschiedener Fluorophore (blau = DAPI; grün = FITC; orange = Texas Red, AlexaFluor594; rot = AlexaFluor647), der zur Verfügung stehenden Anregungslaser sowie der zugehörigen Filter. Die Grafik wurde mit Hilfe des Fluorescence SpectraViewer erstellt [385].	79
Abbildung 21: Schematische Darstellung der Thrombozytenisolation aus Vollblut oder aus TKZ und die jeweils geeignete Anwendung. Die Grafik wurde mit BioRender erstellt.	80
Abbildung 22: Funktionsweise der Lichttransmissionsaggregometrie nach Born [388, 394]	84
Abbildung 23: Strukturformel von Z-Gly-Gly-Arg-AMC (schwarz und rot) und das nach der Abspaltung durch Thrombin entstehende Fluorophor 7-Amino-4-Methylcumarin (rot) [397].	85
Abbildung 24: Schematische Darstellung des Messprinzips des ATP-Freisetzungs-Assays. Die Sezernierung des ATP erfolgt aus den dichten Granula aktivierter Thrombozyten und kann anhand einer durch Luciferin/Luciferase-Reaktion-induzierten Lumineszenz quantifiziert werden [14, 80]. Die Grafik wurde mit BioRender erstellt.	88
Abbildung 25: Untersuchung HS3ST2-überexprimierender MCF-7-Zellen und Einfluss auf den 3-O-Sulfatierungsstatus der Zellen. A Analyse der HS3ST2-Expression stabil transfizierter MCF-7-Zellen auf mRNA- und Proteinebene mittels qPCR (oben) und Western Blot (unten). B Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Zellen mittels CLSM. Die Immunfluoreszenzfärbung der zellulären Strukturen erfolgt mit DAPI (Zellkern; blau), FITC (3-O-sulfatierte Epitope; grün) und AlexaFluor594 (HS3ST2; gelb).	91

- Abbildung 26:** Untersuchung des funktionellen Einflusses einer HS3ST2-Überexpression auf die TCIPA induziert durch stabil transfizierte MCF-7-Zellen. **A** Untersuchung der Lichttransmissionsaggregometrie HS3ST2-überexprimierender Zellen. **B** Untersuchung des ETP induziert durch HS3ST2-überexprimierende Zellen. **C** Quantifizierung der relativen normalisierten TF-Expression. (MCF-7_{vector} = schwarz; MCF-7_{HS3ST2-OV} = blau). 92
- Abbildung 27:** Zytotoxizitätsuntersuchungen der verwendeten Inhibitoren mittels MTT-Assay. Die Mammakarzinomzellen werden für 72 h mit einer halblogarithmischen Verdünnungsreihe der entsprechenden Inhibitoren inkubiert. Als Positivkontrolle dient DMSO (gekennzeichnet als 10^{-2}) und als Negativkontrolle wird den Zellen DPBS (gekennzeichnet als $10^{-9,5}$) hinzugegeben. Anhand des sigmoidalen Kurvenverlaufs wird der EC₅₀-Wert [$\mu\text{mol/l}$] ermittelt..... 94
- Abbildung 28:** Untersuchung der Proliferationsrate von MCF-7-Zellen unter Einfluss einer DNMT- bzw. HDAC-Inhibition mittels eines PHIO Cellwatcher M und anschließender KI-gestützter Analyse der Konfluenz und Viabilität des Zellrasens. **A** Abbildung mikroskopischer Aufnahmen der Zellrasen zu ausgewählten repräsentativen Zeitpunkten. Lebende Zellen werden in gelb und tote Zellen oder unbewachsende Areale in violett dargestellt. **B** Analyse der Proliferationsrate nach 48-stündiger Inkubation mit den entsprechenden Inhibitoren. **C** Darstellung der Wachstumskurven über einen Zeitverlauf von 120 h (DMSO = dunkelblau; Azacytidin = grün; FdCyd = hellblau; Vorinostat = violett). Bei der hier abgebildeten Versuchsreihe handelt es sich lediglich um eine biologische Stichprobe ($n = 1$), weswegen keine statistische Analyse durchgeführt wurde..... 96
- Abbildung 29:** Untersuchung der Proliferationsrate von MDA-MB-231-Zellen unter Einfluss einer DNMT- bzw. HDAC-Inhibition mittels eines PHIO Cellwatcher M und anschließender KI-gestützter Analyse der Konfluenz und Viabilität des Zellrasens. **A** Abbildung mikroskopischer Aufnahmen der Zellrasen zu ausgewählten repräsentativen Zeitpunkten. Lebende Zellen werden in gelb und tote Zellen oder unbewachsende Areale in violett dargestellt. **B** Analyse der Proliferationsrate nach 48-stündiger Inkubation mit den entsprechenden Inhibitoren. **C** Darstellung der Wachstumskurven über einen Zeitverlauf von 72 h (DMSO = dunkelblau; Azacytidin = grün; FdCyd = hellblau; Vorinostat = violett). Bei der hier abgebildeten Versuchsreihe handelt es sich lediglich um eine biologische Stichprobe ($n = 1$), weswegen keine statistische Analyse durchgeführt wurde. 98

- Abbildung 30:** Untersuchung der Auswirkungen einer DNMT- bzw. HDAC-Inhibition auf das Sulfotransferasen-Expressionsprofil von MCF-7-Zellen. **A** Untersuchung der intrinsischen mRNA-Level diverser Heparansulfat-Sulfotransferasen unter Zuhilfenahme des human protein atlas [398]. **B** Analyse der mRNA-Level ausgewählter 3-O- und 6-O-Sulfotransferasen in MCF-7-Zellen nach Behandlung mit den jeweiligen Inhibitoren mittels qPCR. **C** Analyse der Protein-Expression ausgewählter 3-O- und 6-O-Sulfotransferasen in MCF-7-Zellen nach Behandlung mit den jeweiligen Inhibitoren mittels Western Blot-Analyse. 100
- Abbildung 31:** Untersuchung der Auswirkungen einer DNMT- bzw. HDAC-Inhibition auf das Sulfotransferasen-Expressionsprofil von MDA-MB-231-Zellen. **A** Untersuchung der intrinsischen mRNA-Level diverser Heparansulfat-Sulfotransferasen unter Zuhilfenahme des human protein atlas [398]. **B** Analyse der mRNA-Level ausgewählter 3-O- und 6-O-Sulfotransferasen in MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit den jeweiligen Inhibitoren mittels qPCR. **C** Analyse der Protein-Expression ausgewählter 3-O- und 6-O-Sulfotransferasen in MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit den jeweiligen Inhibitoren mittels Western Blot-Analyse..... 103
- Abbildung 32:** Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der 3-O-Sulfatierung behandelte MCF-7- (**A**) und MDA-MB-231-Zellen (**B**) mittels CLSM. Die Zellkerne werden mit Hilfe von DAPI angefärbt (blau). Die Markierung der 3-O-Sulfatierung erfolgt mittels HS4C3, einem Anti-VSV-Antikörper, und einem FITC-konjugierten Anti-Maus-Antikörper (grün). 104
- Abbildung 33:** Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der AT-Bindung an der Oberfläche behandelte (**A**) MCF-7- und (**B**) MDA-MB-231-Zellen. Die Zellen werden mit humanem Antithrombin versetzt, das anschließend mit einem AlexaFluor647-konjugierten Anti-AT-Antikörper markiert und in rot dargestellt wird. Die Zellkerne werden mittels DAPI angefärbt und in blauer Farbe abgebildet. Eine relative Quantifizierung der AT-Bindung, verglichen mit einer DMSO-Kontrollpopulation, wird außerdem mittels Durchflusszytometrie vorgenommen. Die durchflusszytometrischen Untersuchungen der MCF-7-Zellen werden in **C** und die der MDA-MB-231-Zellen in **D** abgebildet..... 106
- Abbildung 34:** Untersuchung der funktionellen Auswirkung einer DNMT- oder HDAC-Inhibition auf die TCIPA durch MCF-7-Zellen. **A** LTA-Untersuchung nach Behandlung mit Azacytidin (rot), FdCyd (blau) oder Vorinostat (lila) verglichen mit einer DMSO-behandelten Zellpopulation (schwarz). **B** Untersuchung der ATP-Freisetzung aus den dichten Granula von Thrombozyten nach Kontakt mit präinkubierten MCF-7-Zellen. Analyse des ETP (**C**) und der lag time (**D**) unter Einfluss einer Inhibition mit den epigenetisch wirksamen Wirkstoffen..... 110

- Abbildung 35:** Untersuchung der funktionellen Auswirkung einer DNMT- oder HDAC-Inhibition auf die TCIPA durch MDA-MB-231-Zellen. **A** LTA-Untersuchung nach Behandlung mit Azacytidin (rot), FdCyd (blau) oder Vorinostat (lila) verglichen mit einer DMSO-behandelten Zellpopulation (schwarz). **B** Untersuchung der ATP-Freisetzung aus den dichten Granula von Thrombozyten nach Kontakt mit präinkubierten MDA-MB-231-Zellen. Analyse des ETP (**C**) und der lag time (**D**) unter Einfluss einer Inhibition mit den epigenetisch wirksamen Wirkstoffen. 112
- Abbildung 36:** Untersuchung des Einflusses der verwendeten Inhibitoren auf das Migrationsverhalten von MCF-7-Zellen. **A** Abbildung mikroskopischer Aufnahmen der jeweiligen Wundspalten zu ausgewählten Zeitpunkten. Das Migrationsverhalten von Zellen, die nur mit dem entsprechenden Inhibitor behandelt wurden (links), werden mit dem von Zellen verglichen, die mit einer Koinkubation, bestehend aus Inhibitor und einem Plättchenüberstand, behandelt wurden (rechts). **B** Darstellung der durchschnittlichen Geschwindigkeit der Wundheilung bezogen auf einen Zeitraum von 70 h. Die Koinkubation mit einem Plättchenüberstand wird gekennzeichnet mit einem „+“. **C** Darstellung der durchschnittlichen Spaltbreite der Wunde in μm (DMSO = dunkelblau; DMSO + = violett; Azacytidin = grün; Azacytidin + = rot; FdCyd = hellblau; FdCyd + = gelb). Bei der hier abgebildeten Versuchsreihe handelt es sich lediglich um eine biologische Stichprobe ($n = 1$), weswegen keine statistische Analyse durchgeführt wurde. 114
- Abbildung 37:** Untersuchung des Einflusses der verwendeten Inhibitoren auf das Migrationsverhalten von MDA-MB-231-Zellen. **A** Abbildung mikroskopischer Aufnahmen der jeweiligen Wundspalten zu ausgewählten Zeitpunkten. Das Migrationsverhalten von Zellen, die nur mit dem entsprechenden Inhibitor behandelt wurden (links), werden mit dem von Zellen verglichen, die mit einer Koinkubation, bestehend aus Inhibitor und einem Plättchenüberstand, behandelt wurden (rechts). **B** Darstellung der durchschnittlichen Geschwindigkeit der Wundheilung bezogen auf einen Zeitraum, bis die erste Wunde vollständig verheilt ist ($t = 40 \text{ h}$). Die Koinkubation mit einem Plättchenüberstand wird gekennzeichnet mit einem „+“. **C** Darstellung der durchschnittlichen Spaltbreite der Wunde in μm (DMSO = dunkelblau; DMSO + = violett; Azacytidin = grün; Azacytidin + = rot; FdCyd = hellblau; FdCyd + = gelb). Bei der hier abgebildeten Versuchsreihe handelt es sich lediglich um eine biologische Stichprobe ($n = 1$), weswegen keine statistische Analyse durchgeführt wurde. 116
- Abbildung 38:** Untersuchung der TF-Expression nach Behandlung der Zellen mit epigenetisch wirksamen Arzneistoffen. Relative Quantifizierung der mRNA-Level mittels qPCR (links) und Proteinanalytik von TF mittels Durchflusszytometrie (rechts) in (**A**) MCF-7- und (**B**) MDA-MB-231-Zellen. 119

- Abbildung 39:** Untersuchung der TF-Expression stabil transfizierter und Sdc-1 überexprimierender MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen. **A** Relative Quantifizierung der TF-Expression mittels Durchflusszytometrie. **B** Untersuchung der LTA induziert durch stabil transfizierte Mammakarzinomzellen. **C** Untersuchung der Tumorzell-induzierten Thrombingenerierung. **D** Darstellung der normalisierten lag time, die benötigt wird, bis die Thrombingenerierung durch die Tumorzellen induziert wird. **E** Darstellung des normalisierten endogenen Thrombinbildungspotentials induziert durch stabil transfizierte Mammakarzinomzellen. (Vektorkontrolle = grau; Sdc-1 OV = rot; 392 Sdc-1 OV = blau). Modifiziert nach Hassan et al. [400]...... 121
- Abbildung 40:** Untersuchung der relativen Sdc-1-Expression behandelter MCF-7-Zellen mittels einer RNA-Sequenzierung nach Behandlung mit epigenetisch wirksamen Inhibitoren..... 122

9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Auflistung der verwendeten Gerätschaften	43
Tabelle 2:	Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien	46
Tabelle 3:	Auflistung der verwendeten Chemikalien.....	50
Tabelle 4:	Auflistung der hergestellten Puffer und Lösungen	53
Tabelle 5:	Auflistung der verwendeten primären Antikörper	54
Tabelle 6:	Auflistung der verwendeten sekundären Antikörper	55
Tabelle 7:	Auflistung der verwendeten Primer.....	56
Tabelle 8:	Auflistung der verwendeten Inhibitoren	56
Tabelle 9:	Auflistung der verwendeten Software	57
Tabelle 10:	Liste der für die konfokale Laserrastermikroskopie verwendeten Antikörper.	79
Tabelle 11:	Pipettierschema Thrombingenerierung.....	86