

**Molekulare Mechanismen der
prometastatischen Tumorzell-Thrombozyten-
Interaktionen während der hämatogenen
Metastasierung und ihre Inhibition durch
Antikoagulantien**

Dissertation

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

vorgelegt von

Jan-Moritz Ponert

aus Lohmar

Bonn, September 2019

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

1. Gutachter: Prof. Dr. Gerd Bendas

2. Gutachter: PD Dr. Ganna Staal geb. Kalayda

Tag der Promotion: 10.12.2019

Erscheinungsjahr: 2020

Für meine leider viel zu früh verstorbenen Eltern Ingrid und Jochen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Einleitung	1
2. Theorie.....	4
2.1 Hämatogene Metastasierung und die zelluläre Mikroumgebung	4
2.2 Thrombozytenaktivierung induziert durch Tumorzellen	9
2.2.1 Induktion einer Thrombozytenaktivierung via Stimulation der Blutgerinnung	9
2.2.2 Induktion einer Thrombozytenaktivierung via direkten Tumorzell-Kontakt	12
2.2.3 Induktion einer Thrombozytenaktivierung via Freisetzung von Thrombozytenaktivatoren.....	18
2.3 Zusammensetzung und Sekretion der thrombozytären Granula.....	21
2.4 Einfluss einer Thrombozytenaktivierung auf die hämatogene Metastasierung.....	24
2.4.1 Induktion einer Epithelial-mesenchymalen Transition in metastasierenden Tumorzellen	24
2.4.2 Beitrag zur Bildung der prämetastatischen und metastatischen Nischen.....	29
2.4.3 Unterstützung der Extravasation	32
2.5 Antikoagulantien	34
2.5.1 Antikoagulantien in der Onkologie.....	34
2.5.2 Heparine	37
2.5.3 Direkte orale Antikoagulantien	39
2.5.4 Antimetastatische Effekte von Heparinen	39
2.5.5 Evaluation antimetastatischer Effekte von Heparinen in klinischen Studien	43
3. Ziele dieser Arbeit.....	45
4. Material und Methoden.....	48
4.1 Chemikalien und Reagenzien	48
4.1.1 Chemikalien	48

4.1.2 Antikörper	53
4.1.3 Primer.....	54
4.1.4 Antikoagulantien	55
4.1.5 Hergestellte Reagenzien	56
4.2 Verbrauchsmaterialien.....	64
4.3 <i>Enzyme-linked immunosorbent assay-Kits</i>	67
4.4 Geräte.....	68
4.5 Software	71
4.6 Zelllinien	72
4.6.1 AsPC-1 Pankreaskarzinomzellen	72
4.6.2 MDA-MB-231 Mammakarzinomzellen	72
4.6.3 MV3 Melanomzellen	72
4.6.4 PC-3 Prostatakarzinomzellen	72
4.6.5 EA.hy926 immortalisierte Endothelzellen	73
4.7 Zellkultur	73
4.7.1 Inkulturnahme.....	73
4.7.2 Kultivierung	74
4.7.3 Langzeitlagerung der Zellen	74
4.7.4 Bestimmung der Zellzahl.....	75
4.7.5 Prüfung auf Mykoplasmen.....	75
4.8 Experimentelle Standardkonzentrationen der Antikoagulantien	76
4.9 Thrombozytenisolation und -präparation aus Thrombozytenkonzentraten	77
4.10 Calceinbasierter Adhäsionsassay	78
4.11 Quantifizierung der <i>tumor cell-induced platelet aggregation</i> mittels Lichttransmissionsaggregometrie	80
4.12 Quantifizierung der thrombozytären Granulasekretion.....	83
4.12.1 Thrombozytenaktivierung.....	83

4.12.2 Quantifizierung der ATP-Freisetzung aus den dichten-Granula.....	84
4.12.3 Quantifizierung der α -Granulafreisetzung mittels <i>enzyme-linked immunosorbent assays</i>	85
4.13 Tube Formation Assay	87
4.14 Induktion der Epithelial-mesenchymalen Transition durch Thrombozyten	89
4.15 Quantifizierung der Epithelial-mesenchymalen Transition auf mRNA-Ebene mittels quantitativer Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion	90
4.15.1 Grundlagen der Messung	90
4.15.2 Praktische Durchführung.....	91
4.15.3 Validierung der Messung durch die Bestimmung der Effizienz	93
4.15.4 Die housekeeping-Gen-Auswahl	94
4.15.5 Auswertung und Ergebnisberechnung	95
4.16 Quantifizierung der Epithelial-mesenchymalen Transition auf Protein-Ebene mittels Western Blot.....	97
4.16.1 Zelllyse und Proteinbestimmung.....	98
4.16.2 SDS-PAGE und Western Blot	99
4.16.3 Visualisierung und Auswertung.....	100
4.17 Quantifizierung der Epithelial-mesenchymalen Transition auf funktioneller-Ebene mittels Wundheilungsassays	101
4.18 Quantifizierung der α -Granulafreisetzung in fibrinfreiem Plasma.....	102
4.18.1 Blutentnahme und Plasmaisolation aus Vollblut	102
4.18.2 Thrombozytenzählung mit der Neubauer improved® Zählkammer	103
4.18.3 Herstellung von fibrinfreiem Plasma mit Batroxobin.....	105
4.18.4 Thrombozytenaktivierung in fibrinfreiem Plasma	106
4.18.5 <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> -Durchführung unter Verwendung von fibrinfreiem Plasma	106
4.19 Untersuchung der Thrombingenerierung induziert durch Tumorzellen.....	106

4.19.1 Blutentnahme, Thrombozytenisolation aus Vollblut und Thrombozytenzählung	107
4.19.2 Quantifizierung der <i>tissue factor</i> -Expression mittels Durchflusszytometrie.....	107
4.19.3 Thrombingenerierung.....	108
4.20 Statistik.....	110
5. Ergebnisse und Diskussion	112
5.1. Einfluss von Antikoagulantien auf die Adhäsion zwischen Thrombozyten und Tumorzellen der Linien AsPC-1, MDA-MB-231, MV3 und PC-3.....	113
5.2 Quantifizierung der <i>tumor cell-induced platelet aggregation</i> durch Tumorzellen der Linien AsPC-1, MDA-MB-231, MV3 und PC-3	117
5.2.1 Einfluss von Antikoagulantien auf die <i>tumor cell-induced platelet aggregation</i> .	117
5.2.2 Quantifizierung der Konzentrationsabhängigkeit der Inhibition der <i>tumor cell-</i> <i>induced platelet aggregation</i> durch Antikoagulantien anhand von AsPC-1 Zellen.....	124
5.3 Quantifizierung der Thrombingenerierung in recalcifiziertem, thrombozytenreichem Puffer.....	126
5.4 Quantifizierung der Granulasekretion von Thrombozyten nach einem Kontakt mit Tumorzellen der Linien AsPC-1, MDA-MB-231, MV3 und PC-3.....	128
5.4.1 Quantifizierung der ATP-Freisetzung aus der dichten-Granula.....	128
5.4.2 Quantifizierung EGF-, HGF-, PDGF-B-, TGF- β 1- und VEGF-Freisetzung aus der α -Granula	133
5.4.3 Zusammenfassung der Quantifizierungen der Granulasekretion	148
5.5 Quantifizierung des angiogenetischen Potentials der Granulasekretion.....	151
5.6 Einfluss von UFH und Enoxaparin auf die Induktion einer Epithelial-mesenchymalen Transition durch Thrombozyten in Tumorzellen der Linien AsPC-1 und PC-3	156
5.6.1 Quantifizierung der Induktion und Inhibition einer Epithelial-mesenchymalen Transition auf mRNA-Ebene.....	157
5.6.2 Quantifizierung der Induktion und Inhibition einer Epithelial-mesenchymalen Transition auf Protein-Ebene	159

5.6.3 Quantifizierung der Induktion und Inhibition einer Epithelial-mesenchymalen Transition auf funktioneller-Ebene.....	161
5.6.4 Zusammenfassung des Einflusses von UFH und Enoxaparin auf die Induktion einer Epithelial-mesenchymalen Transition durch Thrombozyten in den Tumorzellen der Linien AsPC-1 und PC-3.....	162
5.7 Zwischenfazit Projekt 1.....	164
5.8 Einfluss von UFH und Fondaparinux auf die Sekretion von VEGF, CXCL5 und CXCL7 nach einer Thrombozytenaktivierung mit MV3 Zellen in fibrinfreiem Plasma.....	168
5.9 Zwischenfazit Projekt 2.....	173
5.10 Einfluss von Antikoagulantien auf eine Thrombingenerierung induziert durch Tumorzellen der Linien AsPC-1, MDA-MB-231, MV3 und PC-3	175
5.11 Zwischenfazit Projekt 3.....	181
6. Zusammenfassung	184
7. Literaturverzeichnis	191
8. Anhang	222
8.1 Abbildungsverzeichnis	222
8.2 Tabellenverzeichnis	231
8.3 Publikationsliste.....	232
8.4 Danksagung	233

Abkürzungsverzeichnis

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

% (m/v)	Massenkonzentration in Prozent
% (v/v)	Volumenprozent
°C	Grad Celsius
ABTS	2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
ad	Auffüllen auf
ADP	Adenosindiphosphat
AKT	Proteinkinase B
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
B2M	<i>Human beta-2-Mikroglobulin</i>
BCA	Bicinchoninsäure
bFGF	<i>Basic fibroblast growthfactor</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
Btk	<i>Bruton's tyrosine kinase</i>
bzw.	Beziehungsweise
Calcein-AM	Calcein-Acetoxymethylester
CaLDAG-GEFI	<i>Ca₂⁺- and DAG-regulated guanine nucleotide exchange factor I</i>
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat

Abkürzungsverzeichnis

cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i>
CLEC-2	<i>C-type-lectin-receptor-2</i>
COX-1	Cyclooxygenase-1
CP	<i>Cancer procoagulant</i>
CTI	Corn Trypsin Inhibitor
C _T -Wert	<i>Threshold cycle</i>
Cyr61	<i>Cysteine-rich protein 61</i>
DAG	1,2-Diacylglycerin
DAMP	<i>Damage associated molecular pattern molecules</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagles medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DOAK	Direktes orales Antikoagulans
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphat Buffer Salin without Calcium and Magnesium</i>
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
E	Effizienz
E-Cadherin	Epitheliales-Cadherin
ECE®	<i>Electrical current exclusion®</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Expressionsänderung

EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ENA-78/CXCL5	<i>Epithelial-derived neutrophil-activating protein 78 / CXC-Motiv-Chemokin 5</i>
et al.	Et alii
EZM	Extrazellulär Matrix
Fab-Fragment	<i>Fragment antigen binding</i>
FAK	Fokale Adhäsionskinase
Faktor IIa	Thrombin
Fc-Fragment	<i>Fragment crystallisable</i>
FcR γ	<i>Fc-Rezeptor-γ</i>
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GAG	Glykosaminglykan
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GlcA	Glukuronsäure
GlcN	Glukosamin
GOI	<i>Gene of interest</i>
GOI _{re}	<i>Relative expression gene of interest</i>
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GPVI	Glykoprotein VI
HER2	<i>Human epidermal growth factor receptor-2</i>

Abkürzungsverzeichnis

HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HIF-1 α	<i>Hypoxia-inducible factor 1-α</i>
HKG	<i>Housekeeping gene</i>
HMGB1	<i>High-mobility group box 1 protein</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase / Meerrettichperoxidase</i>
IdoA	Iduronsäure
i. d. R.	In der Regel
I.E.	Internationale Einheit
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule-1</i>
IgG	Immunglobulin G
INR	<i>International normalized ratio</i>
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
L	Liter
LAP	<i>Latency-associated peptide</i>
LAT	<i>Linker for activated T-cells</i>
LEC	<i>Lymphatic endothelial cell</i>
LLC	<i>Lewis Lung Carcinoma</i>
LIMK1	<i>LIM Domain Kinase 1</i>
LMWH	<i>Low molecular weight heparin</i>
LPA	Lysophosphatidylsäure
m	Meter
m ²	Quadratmeter

MAP-Kinasen	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
max.	Maximal
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein 1</i>
MET	Mesenchymal-Epitheliale Transition
min	Minute
min.	Mindestens
MMP	Matrix-Metalloprotease
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
MYD88	<i>Myeloid differentiation primary response 88</i>
n	Stichprobenanzahl
NAP-2/CXCL7	<i>Neutrophil-activating peptide-2 / CXC-Motiv-Chemokin 7</i>
N-Cadherin	<i>Neural-Cadherin</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NF	Normalisierungsfaktor
NMH	Niedermolekulares Heparin
PAR	Protease-aktivierter Rezeptor
Par	<i>Partitioning-defective protein</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF-B	<i>Platelet-derived growth factor-B</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PLC β	Phospholipase C- β

Abkürzungsverzeichnis

PLC γ 2	Phospholipase C- γ 2
PSGL-1	P-Selektin-Glykoproteinligand-1
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
Rac1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
Rap-1b	<i>RAS-related protein 1b</i>
RO-Heparin	Reduziertes Oxyheparin
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPL13	<i>Human ribosomal protein L13</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
s.c.	Subkutan
SD	Standardabweichung
SDF-1/CXCL12	<i>stromal cell-derived factor 1 / CXC-Motiv-Chemokin 12</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SDS	Natriumdodecylsulfat
SFK	<i>Src family kinase</i>
sGC	<i>Soluble guanylyl cyclase</i>
sLe ^x	Sialyl Lewis x
sGC	<i>Soluble guanylyl cyclase</i>
SLP76	<i>SH2 domain-containing leukocyte phosphoprotein of 76 kDa</i>

Slug	<i>Human Snail homolog 2</i>
Snail1	<i>Human Snail homolog 1</i>
SNAP	<i>Synaptosomal-associated proteins</i>
SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment receptor</i>
STX	<i>Syntaxin</i>
Syk	<i>Spleen tyrosin kinase</i>
TAP	Thrombozytenarmes Plasma
TBS	<i>TRIS buffered saline</i>
TBS-T	<i>TRIS buffered saline with Tween 20</i>
TCIPA	<i>Tumor cell-induced platelet aggregation</i>
Tec	<i>Tec protein tyrosine kinase</i>
TF	<i>Tissue factor</i>
TFPI	<i>Tissue factor pathway inhibitor</i>
TGF- β 1	<i>Transforming growth factor-β1</i>
TKZ	Thrombozytenkonzentrat
TLR4	<i>Toll-like receptor-4</i>
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktors- α
TXA ₂ -Rezeptor	Thromboxan A ₂ -Rezeptor
TRAP-6	Thrombinrezeptor-aktivierendes-Peptid-6
TRP	Thrombozytenreiches Plasma
TRPu	Thrombozytenreicher Puffer

Abkürzungsverzeichnis

tSNARE	<i>target SNARE</i>
Twist1	<i>Human Twist homolog 1</i>
TXA ₂	Thromboxan A ₂
u. a.	Unter anderem
UFH	Unfraktioniertes Heparin
VAMP8	<i>Vesicle-associated membrane protein 8</i>
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR1	VEGF-Rezeptor-1
Vim	<i>Human Vimentin</i>
VKA	Vitamin K Antagonist
VLA-4	<i>Very late antigen-4</i>
vSNARE	<i>vesicle SNARE</i>
vWF	Von-Willebrand-Faktor
z. B.	Zum Beispiel
Zeb2	<i>Human zinc finger E-box binding homebox 2</i>
α-D-GlcA	α-D-Glukuronsäure
α-D-GlcN	α-D-Glukosamin
α-L-IdoA	α-L-Iduronsäure
β-Act	<i>Human beta-Aktin</i>
β-D-GlcA	β-D-Glukuronsäure

1. Einleitung

Vor 48 Jahren wurde von dem damaligen US Präsidenten Richard Nixon der *War on Cancer* erklärt. Das ambitionierte Ziel war es, mit größten Anstrengungen innerhalb von 25 Jahren ein Heilmittel für die Krebserkrankung zu finden (1). Seitdem wurden immense Fortschritte in der Therapie erzielt, so hat der Therapeut heute z. B. die Möglichkeit modernste Checkpoint-Inhibitoren einzusetzen, um gezielt das körpereigene Immunsystem zu aktivieren und gegen die Tumorzellen zu mobilisieren (2). Weiterhin haben sich interdisziplinäre Zusammenschlüsse in der Onkologie entwickelt. In diesen sogenannten *tumor boards* werden alle benötigten Therapeuten und Experten zusammengebracht und entwickeln, basierend auf den individuellen pathologischen Befunden des Tumorgewebes und des Patientenzustandes, Therapien, die in hohem Maße personalisiert und evidenzbasiert sind (3).

Doch obgleich immer wieder Fortschritte und Siege im *War on Cancer* zu verzeichnen sind, bleiben Krebserkrankungen hinter Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache. Im Jahr 2018 sind global 18.078.957 Menschen neu an Krebs erkrankt und 9.555.027 an seinen Folgen verstorben. Die Situation ist also dramatisch. In Bezug auf die jeweiligen Geschlechter ist bei Männern, hinsichtlich der Mortalität und Inzidenz, Lungenkrebs und bei Frauen Brustkrebs vorherrschend (4). Das Auftreten von Tumoren ist multifaktoriell bedingt und kann nur eingeschränkt durch die Verhaltensweisen der Menschen aktiv gesteuert oder erklärt werden. Trotzdem muss man festhalten, dass auch durch Forschung und Medizin nicht die menschliche Unvernunft kompensiert werden kann. So ist z. B. das Tabakrauchen noch immer global sehr verbreitet, obwohl es bekanntermaßen einer der größten Risikofaktoren für die Entwicklung von Lungenkrebs ist (4,5). Ebenso werden Menschen durch bessere Lebensumstände zunehmend älter, wodurch grundsätzlich die Entstehung von Krebs begünstigt wird (6).

Eine besonders gefährliche Komplikation bei Krebserkrankungen ist die Metastasierung bzw. die Verteilung der Tumorzellen im Organismus. Sie wird als eine der häufigsten Todesursachen der Erkrankung eingestuft (7). Die Verteilung der Tumorzellen kann unter Ausnutzung der Blutgefäße erfolgen und wird in diesem Fall als hämatogene Metastasierung bezeichnet (8). Im Verlauf dieser hämatogenen Metastasierung treten diverse Unregelmäßigkeiten der Blutgerinnung auf, die ihre Ursache in Interaktionen der

Tumorzellen mit dem Blut und den Blutzellen haben. Diese Koinzidenz von hämostaseologischen Unregelmäßigkeiten und malignen Erkrankungen wurde erstmals 1865 von dem französischen Arzt Armand Trousseau (1801-1867) wissenschaftlich erfasst. Von 1865 bis heute hat sich durch intensive Forschung herauskristallisiert, dass onkologische Patienten ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung thromboembolischer Ereignisse wie z. B. tiefer Beinvenenthrombosen und Lungenembolien haben. Die hämostaseologischen Störungen werden zusätzlich durch Veränderungen der Gefäßwand, der Hämodynamik und die Entwicklung einer Hyperkoagulabilität gefördert. Diese Veränderungen entwickeln sich u. a. aus der Therapie mit toxischen Chemotherapeutika, Operationen, zentralvenösen Kathetern und der Immobilisation der Patienten. Sie werden zur Virchow Trias gezählt (9). Daraus resultierte die Notwendigkeit, Tumorpatienten begleitend zur Chemotherapie mit Blutgerinnungshemmern, sogenannten Antikoagulantien zu behandeln (10).

Im Laufe der Zeit entwickelte sich ein stark verfeinertes Verständnis der Krebserkrankung, das vor allem die Kommunikation und Interaktion der Tumorzellen mit ihrer zellulären Mikroumgebung in den Fokus rückte. Diese Interaktionen sind für das Wachstum, Fortbestehen sowie die Ausbreitung des Tumors von großer Bedeutung (11).

Zu dieser zellulären Mikroumgebung gehören auch Blutzellen und hierbei insbesondere die Thrombozyten. Obwohl Thrombozyten kleine kernlose Zellen sind, besitzen sie ein umfangreiches Repertoire an Rezeptoren und Adhäsionsmolekülen sowie verschiedene hochkomplexe Granula, die mit Chemokinen, Wachstumsfaktoren und vielen weiteren biologisch aktiven Molekülen beladen sind (12,13).

Ihr Kontakt zu Tumorzellen im Zuge einer hämatogenen Metastasierung beeinflusst den Krankheitsverlauf negativ. So konnte z. B. gezeigt werden, dass sie in den metastasierenden Tumorzellen eine Epithelial-mesenchymale Transition induzieren, wodurch die Malignität der Tumorzellen gesteigert wird (14). Darüber hinaus können Thrombozyten Tumorzellen vor natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und vor dem Scherstress im Blut schützen (15,16). Thrombozyten werden von den metastasierenden Tumorzellen ausgenutzt, um eine hämatogene Metastasierung erfolgreich zu absolvieren.

Da sie auf vielen Ebenen in die hämatogene Metastasierung involviert sind und den Prozess maßgeblich beeinflussen können, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Beitrag zum Verständnis der Tumorzell-Thrombozyten-Kommunikation erbracht. Hierzu wurden vier verschiedene Tumorentitäten verwendet. Weiterhin wurden die inhibitorischen Kapazitäten

1. Einleitung

mehrerer Antikoagulantien bezüglich der Tumorzell-Thrombozyten-Kommunikation quantifiziert. Zusätzlich wurde untersucht, welche Mechanismen die notwendige, anfängliche Aktivierung der Thrombozyten durch Tumorzellen vermitteln.

2. Theorie

2.1 Hämatogene Metastasierung und die zelluläre Mikroumgebung

Der Begriff Metastasierung beschreibt die Ausbreitung entarteter Zellen eines Primärtumors in entfernte Organe und die daraus resultierende Bildung eines Sekundärtumors. Erfolgt diese Ausbreitung über Gefäße des lymphatischen Systems, wird sie als lymphatische Metastasierung bezeichnet, erfolgt sie über Gefäße des Blutkreislaufes als hämatogene Metastasierung (8). Im Fokus dieser Arbeit steht die Beteiligung von Thrombozyten an der hämatogenen Metastasierung, somit wird im Folgenden dieser Prozess betrachtet.

Grundsätzlich verläuft eine hämatogene Metastasierung entsprechend einzelner Teilprozesse, welche in der metastatischen Kaskade definiert sind. Am Beginn dieser stehen die Vaskularisierung des Primärtumors und die Ablösung der Tumorzellen aus dem Gewebeverbund sowie eine Migration durch die extrazelluläre Matrix (EZM). Wird ein Blutgefäß von den migrierenden Tumorzellen erreicht, überwinden sie das Endothel, dringen in die Blutbahn ein und werden mit dem Blutstrom im Organismus verteilt. Daraufhin erfolgen am Ort der prämetastatischen Nische eine Endothel-Adhäsion der zirkulierenden Tumorzellen sowie eine Extravasation. Schließlich kann durch die Proliferation der Zellen ein Sekundärtumor gebildet werden (17–19).

Der Umfang der metastatischen Kaskade und die Notwendigkeit, dass sie zur Bildung einer Metastase in ihrer Gänze absolviert werden muss, lässt vermuten, dass nur hochspezialisierte Tumorzellen dazu in der Lage sind. Anhand einer Studie von M. Gullino et al. an Brustkrebszellen wurde offengelegt, dass im Durchschnitt pro Gramm Tumormasse $4,1 \times 10^6$ Tumorzellen pro Tag in den Blutkreislauf freigesetzt werden. Hieraus wird ersichtlich, dass es sich um einen hoch ineffizienten Prozess handelt (20). Der Erfolg einer Metastasierung hängt u. a. von der metastasierenden Tumorzelle bzw. ihrem Genotyp sowie dem resultierenden Phänotyp und von ihrer Kommunikation und Interaktion mit der zellulären Mikroumgebung ab.

Die entartete Zelle muss bestimmte Eigenschaften aufweisen, um erfolgreich zu metastasieren. Kripke et al. konnten zeigen, dass in einem Primärtumor verschiedene Zellpopulationen hinsichtlich des metastatischen Potentials vorkommen können und in unterschiedlicher Quantität Metastasen bilden (21). Diese entscheidenden Eigenschaften bzw. ein bestimmter Geno- und Phänotyp können z. B. durch die Absolvierung einer

Epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) seitens der Tumorzelle erlangt werden (22,23). Die EMT beschreibt, dass eine epitheliale Tumorzelle aufgrund verschiedener Stimuli ihren Phänotyp hin zu einer mesenchymalen Tumorzelle verändert. Infolgedessen kann sie verschiedene prometastatische Fähigkeiten erlangen, wie z. B. eine Resistenz gegenüber der Anoikis, stammzellartige Eigenschaften sowie eine gesteigerte Motilität und Invasivität (24–26). Die Induktion einer EMT kann z. B. durch eine *transforming growth factor*- β -vermittelte (TGF- β) Signaltransduktion in den Tumorzellen erfolgen (27). Die EMT-Induktion via TGF- β verdeutlicht, dass eine Differenzierung zwischen intrinsischen und extrinsischen prometastatischen Faktoren kompliziert ist, da TGF- β sowohl von Tumorzellen selbst, als auch von Zellen der tumoralen Mikroumgebung freigesetzt werden kann (28,29). Die gängige Theorie besagt, dass die Tumorzelle vor der Metastasierung eine EMT absolviert und in ihrer mesenchymalen Form erfolgreich metastasiert. In der prämetastatischen Nische wiederum durchläuft die Tumorzelle eine Mesenchymal-epitheliale Transition (MET), verliert dadurch ihre mesenchymalen Eigenschaften und verankert sich als epitheliale Zelle wieder im Gewebe und proliferiert (30).

Zusätzlich zu den intrinsischen Eigenschaften der Tumorzelle ist der Erfolg einer Metastasierung abhängig von der Kommunikation und Interaktion der metastasierenden Zellen mit ihrer zellulären Mikroumgebung. Abbildung 1 illustriert einige dieser prometastatischen Interaktionen.

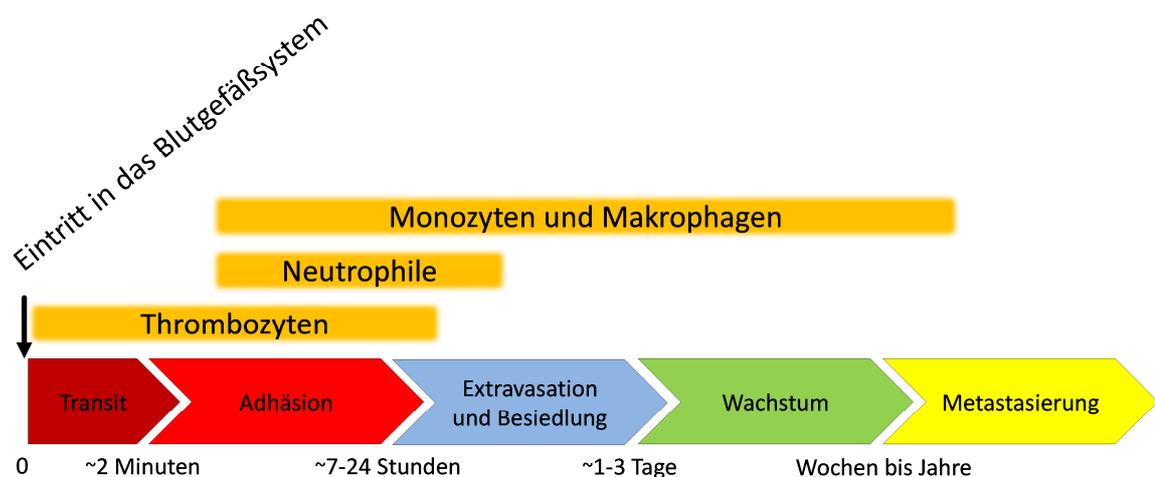


Abbildung 1: Schematische Übersicht der prometastatischen Interaktionen zwischen Tumorzellen und Zellen der Mikroumgebung im chronologischen Verlauf der hämatogenen Metastasierung. Modifiziert nach Labelle et al. (31).

Bereits vor dem Eintritt der Tumorzellen in die Blutgefäße wird das metastatische Geschehen von tumorassoziierten Makrophagen und Fibroblasten der Tumor-Mikroumgebung beeinflusst (32). Makrophagen akkumulieren aufgrund der inflammatorischen Prozesse, die das Wachstum eines Tumors begleiten, früh am Ort der Gewebeläsion (33). Obwohl Makrophagen das Wachstum und die Dissemination des Tumors aufgrund ihrer Fähigkeiten zur Präsentation tumorassoziiertes Antigens gegenüber T-Zellen sowie der Freisetzung von für T-Zellen und natürliche Killerzellen (NK) stimulatorischen Zytokinen eigentlich behindern müssten, agieren sie eher wachstumsfördernd und prometastatisch (32,34). Einen Erklärungsansatz für dieses Verhalten der Makrophagen geben Mantovani et al. mit der Hypothese, dass in einem Tumor verschiedene Makrophagenpopulationen vorliegen können. Innerhalb solcher Populationen könnte der prometastatische M2-Typ der Makrophagen gegenüber dem wachstumshemmenden M1-Typ überwiegen. M2-Makrophagen können die T-Zell-Aktivität unterdrücken, wohingegen M1-Makrophagen Tumorzellen lysieren können. Weiterhin wird vermutet, dass die Bildung dieser Populationen durch Signale der Tumorzellen unter Beteiligung von TGF- β und IL-10 gesteuert wird (35,36). Makrophagen können die Invasivität von Tumorzellen z. B. durch die Sezernierung der Matrix-Metalloproteasen-7 und -9 (MMPs) steigern. Diese Enzyme degradieren die EZM (37,38).

Auch tumorassoziierte Fibroblasten interferieren mit der Metastasierung. So konnte demonstriert werden, dass sie durch eine Freisetzung von *hepatocyte growth factor* (HGF) und *tenascin-C* die Invasivität von Kolonkarzinom Zellen steigern können (39). Außerdem begünstigen sie metastatische Prozesse durch die Freisetzung der MMP-1, welche eine EMT in Tumorzellen fördern kann (40,41).

Erneut wird ersichtlich, ähnlich wie bei der EMT Induktion, dass eine isolierte Betrachtung von metastasierenden Tumorzellen ohne die Zellen der Tumor-Mikroumgebung nicht ausreichend ist. Weiterhin zeigt sich am Beispiel der Makrophagen, dass Tumorzellen dazu befähigt sind ihre Mikroumgebung zu ihrem Vorteil zu beeinflussen und zu verändern. Diese Ausnutzung gesunder bzw. physiologisch-kompetenter Systeme manifestiert sich deutlich nach dem Eintritt der metastasierenden Zellen in die Blutgefäße.

Diese Phase der metastatischen Kaskade ist geprägt von Interaktionen der Tumorzellen mit Thrombozyten und Leukozyten (42–44). Auf den Eintritt der Tumorzellen in ein Blutgefäß und den ersten Kontakt mit Blut und Blutzellen folgt eine Aktivierung von Thrombozyten

sowie der Blutgerinnung. Daraus resultiert die Bildung von Aggregaten, die aus Tumorzellen, Thrombozyten und Leukozyten zusammengesetzt sind. Diese Aggregation wird als *tumor cell-induced platelet aggregation* (TCIPA) bezeichnet (45–48). Die aus der TCIPA resultierenden Aggregate stellen einen Zustand dar, in welchem Tumorzellen mit dem Blutfluss im Körper verteilt werden, in dem sie im Blut überleben und in welchem sie an das Endothel der prämetastatischen Nische adhären und extravadiieren. Dementsprechend sind Thrombozyten maßgeblich an mehreren Teilprozessen der metastatischen Kaskade beteiligt (49). Die TCIPA und ihre Konsequenzen sind ein weiteres Beispiel für die Ausnutzung intakter physiologischer Kompartimente durch entartete Zellen, um prometastatische Effekte zu generieren.

Tumorzellen können eine Aktivierung der Thrombozyten, aus der die TCIPA resultiert, über mehrere Mechanismen induzieren. So können sie über eine Präsentation des *tissue factors* (TF) die Blutgerinnung aktivieren, wodurch Thrombin gebildet wird, das eine Thrombozytenaktivierung auslöst (50–52). Ebenso ist die Induktion der Thrombozytenaktivierung durch einen direkten Kontakt mit Tumorzellen denkbar, der zu einer Aktivierung über Adhäsionsrezeptoren wie z. B. dem *C-type lectin-like receptor 2* (CLEC-2) oder P-Selektin führt (53–55). Außerdem ist eine parakrine Stimulation der Thrombozyten via tumoraler Freisetzung von, auf Thrombozyten aktivierend wirkenden Mediatoren wie z. B. Adenosindiphosphat (ADP) möglich (56,57).

Die prometastatischen Effekte, die aus der Interaktion von Thrombozyten und Tumorzellen hervorgehen sind zahlreich. So werden die Tumorzellen durch einen Mantel aus aktivierten und aggregierten Thrombozyten vor dem Scherstress im Blut geschützt sowie die Permeabilität des Endothels durch thrombozytäre Mediatoren wie z. B. den *vascular endothelial growth factor* (VEGF) herabgesetzt. Zudem kann durch eine TGF- β 1-Freisetzung seitens der aktivierten Thrombozyten eine Immunsuppression von NK-Zellen und eine Förderung bzw. Unterhaltung der EMT in Tumorzellen erfolgen (14–16,58).

Zum besseren Verständnis soll erwähnt werden, dass es insgesamt drei verschiedene TGF- β -Isoformen gibt, bisher konnten TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3 identifiziert werden. In Thrombozyten wird nahezu nur TGF- β 1 gespeichert (TGF- β 1 = 45 ng/mL, TGF- β 2 = 0,1 ng/mL, TGF- β 3 = 1,3 ng/mL) (59). Dementsprechend sind alle Effekte, welche aus thrombozytärem TGF- β resultieren, maßgeblich TGF- β 1-vermittelt.

Zusätzlich wird eine Beteiligung der aktivierten Thrombozyten an der Formation einer prämetastatischen Nische, einer Art von prometastatischer Mikroumgebung an der Lokalisation der zukünftigen Metastase, postuliert. Durch selektinabhängige Wechselwirkungen zwischen Thrombozyten und Endothelzellen erfolgt eine Endothelzellaktivierung. Das aktivierte Endothel setzt seinerseits CCL5 frei, welches eine starke Chemotaxis auf Monozyten ausübt (60). Monozyten wiederum sind die Vorstufe von Makrophagen und somit auch von den in der Tumor-Mikroumgebung lokalisierten tumorassoziierten Makrophagen. Sie nehmen, außer den bereits erwähnten Effekten auf die Metastasierung auch Einfluss auf die tumorassoziierte Inflammation und das Tumorwachstum (32,33).

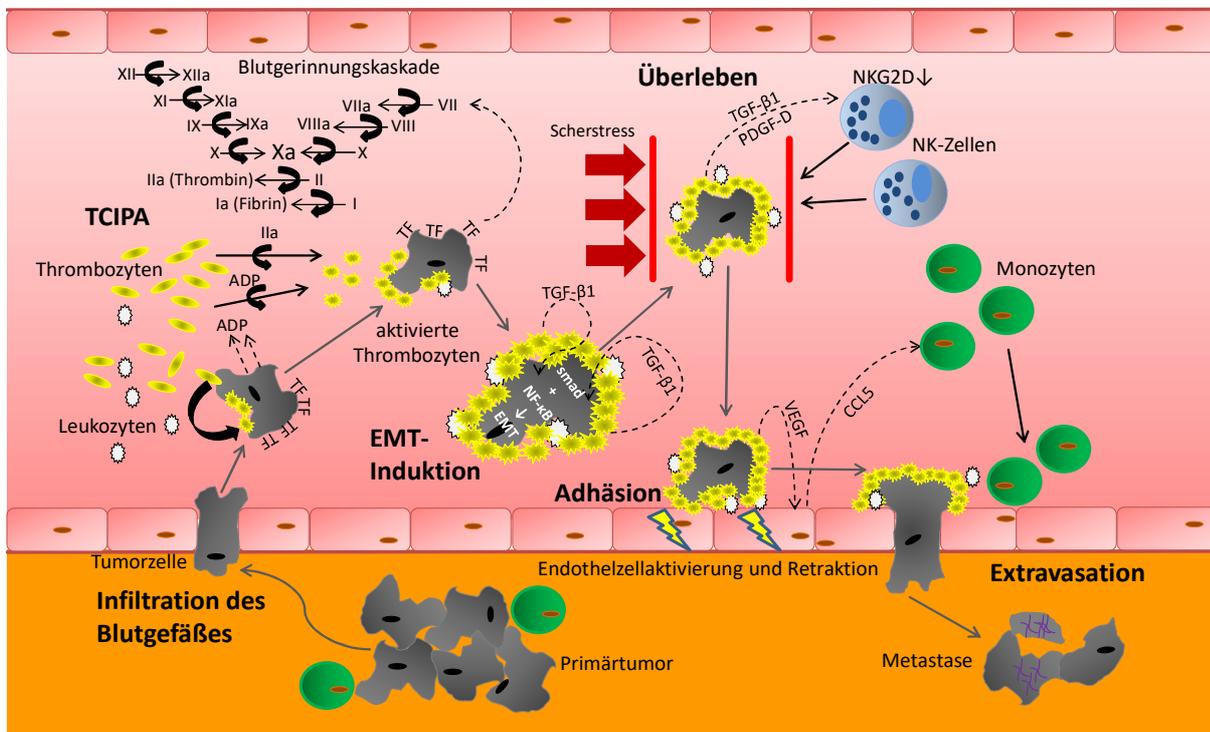


Abbildung 2: Simplifizierte Darstellung der hämatogenen Metastasierung und der Tumorzell-Thrombozyten-Kommunikation sowie aus dieser Interaktion resultierender prometastatischer Effekte. Die Abbildung zeigt die Infiltration des Blutgefäßes durch die Tumorzelle, welche gefolgt ist von einer TCIPA. Die Aktivierung der Thrombozyten erfolgt durch Kontakt mit Tumorzellen über Adhäsionsrezeptoren, durch die tumorale Freisetzung von Aktivator (ADP) und durch die Gerinnungskaskade (tumorale TF-Präsentation). Aus der Interaktion resultieren eine EMT, der Schutz vor NK-Zellen (Herunterregulierung NKG2D) und dem Scherstress, eine Steigerung der Permeabilität des Endothels und die Rekrutierung von Monozyten zur metastatischen Nische. Abgeschlossen wird die Metastasierung durch die Extravasation und die Proliferation der Tumorzellen (14,16,45,57,60–64).

Da Thrombozyten einen nicht unerheblichen Anteil am Erfolg der metastatischen Kaskade haben, eröffnet eine Inhibition der Tumorzell-Thrombozyten-Kommunikation eine Option zur therapeutischen Einflussnahme auf die Metastasierung.

2.2 Thrombozytenaktivierung induziert durch Tumorzellen

Im folgenden Abschnitt werden die drei bereits erwähnten Mechanismen beleuchtet, die für eine Thrombozytenaktivierung durch Tumorzellen während einer hämatogenen Metastasierung verantwortlich sein können. Es handelt sich um die Stimulation der Blutgerinnung mit folgender Thrombinbildung, die Adhäsion zwischen Tumorzellen und Thrombozyten und die parakrine Thrombozytenaktivierung durch tumorale Freisetzung von Thrombozytenaktivatoren. Nach dem Eintritt in ein Blutgefäß wird die Thrombozytenaktivierung mit dem ersten Kontakt der Tumorzellen mit den Gerinnungsfaktoren und den Thrombozyten initialisiert. Die drei Mechanismen, die zu einer Aktivierung führen, können parallel ablaufen und sind abhängig von den individuellen Eigenschaften des Tumors bzw. der metastasierenden Zelle.

Da diese Aktivierung der Ausgangspunkt jedweder folgenden Interaktion mit Thrombozyten im Verlauf einer Metastasierung ist, könnte ihre Inhibition eine Möglichkeit bieten, die Progression der Erkrankung günstig zu beeinflussen.

2.2.1 Induktion einer Thrombozytenaktivierung via Stimulation der Blutgerinnung

Das hämostaseologische System, und in dessen Mittelpunkt Thrombin kann entscheidend eine Thrombozytenaktivierung durch Tumorzellen induzieren. Unter physiologischen Konditionen befindet sich das hämostaseologische System in einem Gleichgewicht zwischen Koagulation und Antikoagulation. Verschiedene Noxen, so auch maligne Tumorerkrankungen, aber auch das metabolische Syndrom, führen zu einer Störung dieses Gleichgewichtes (65). Beteiligt an den Systemen sind zelluläre und enzymatische Komponenten. Der enzymatische Teil des prokoagulativen Blutgerinnungssystems wird zu einem großen Teil von der sekundären Hämostase bzw. der Blutgerinnungskaskade abgebildet. Es handelt sich um ein System aus inaktiven Enzymen, sogenannten Zymogenen, die sich in festgelegter Reihenfolge nach bestimmten Stimuli gegenseitig kaskadenartig aktivieren. Sowohl Zymogen als auch aktives Enzym werden als Gerinnungsfaktoren bzw. aktivierte Gerinnungsfaktoren

bezeichnet und entweder nach römischen Ziffern oder expliziten Namen benannt. So wird z. B. ein aktives Enzym Faktor IIa oder Thrombin genannt und sein inaktives Zymogen Faktor II oder Prothrombin. Das Ziel der Gerinnungskaskade ist die bedarfsgerechte und schnelle Thrombinbildung (61). Thrombin wiederum katalysiert mehrere Reaktionen im Kontext der Blutgerinnung, wie z. B. die Bildung von Fibrin aus Fibrinogen, die Umwandlung von Faktor XIII zu Faktor XIIIa sowie die Aktivierung von Thrombozyten über die Protease-aktivierten Rezeptoren-1 und -4 (PAR-1,-4) (52). Thrombin ist ein Bindeglied zwischen der enzymatischen sekundären Hämostase und der primären Hämostase, welche durch die endotheliale Adhäsion, Aktivierung sowie Aggregation von Thrombozyten repräsentiert wird (61).

Verschiedene Faktoren spielen bei der Aktivierung der Gerinnungskaskade durch Tumorzellen eine Rolle, man kann sie in direkte und indirekte Faktoren unterteilen. Zu den direkten Faktoren gehört die konstitutive *TF*-Expression von metastasierenden Tumorzellen, da sie direkt via Faktor VII-Aktivierung zur Entstehung eines Prothrombinasekomplexes und somit zu einer Thrombinbildung führt. Khorana et al. konnten durch die Analyse verschiedener Pankreas-karzinom-Entitäten, wie z. B. intraepithelialer Tumore oder Tumore der Papillarschleimhaut, eine *TF*-Expression in einem großen Anteil der Proben feststellen. Außerdem zeigten sie, dass diese Expression mit dem Auftreten venöser Thromboembolien korreliert war. Eine hohe *TF*-Expression resultierte in einer Thromboserate von 26,3 %, wohingegen eine geringere Expression in einer Rate von 4,5 % resultierte. Bezüglich der Überlebensrate wurde lediglich eine nicht signifikante Tendenz hin zu einer Verschlechterung bei hoher *TF*-Expression festgestellt (51,61). Demgegenüber erkannten Ueno et al. bei der Untersuchung der *TF*-Expression von Brustkrebsgewebe entsprechender Patienten, dass eine geringe *TF*-Expression der Tumorzellen das Gesamtüberleben signifikant erhöhte (66).

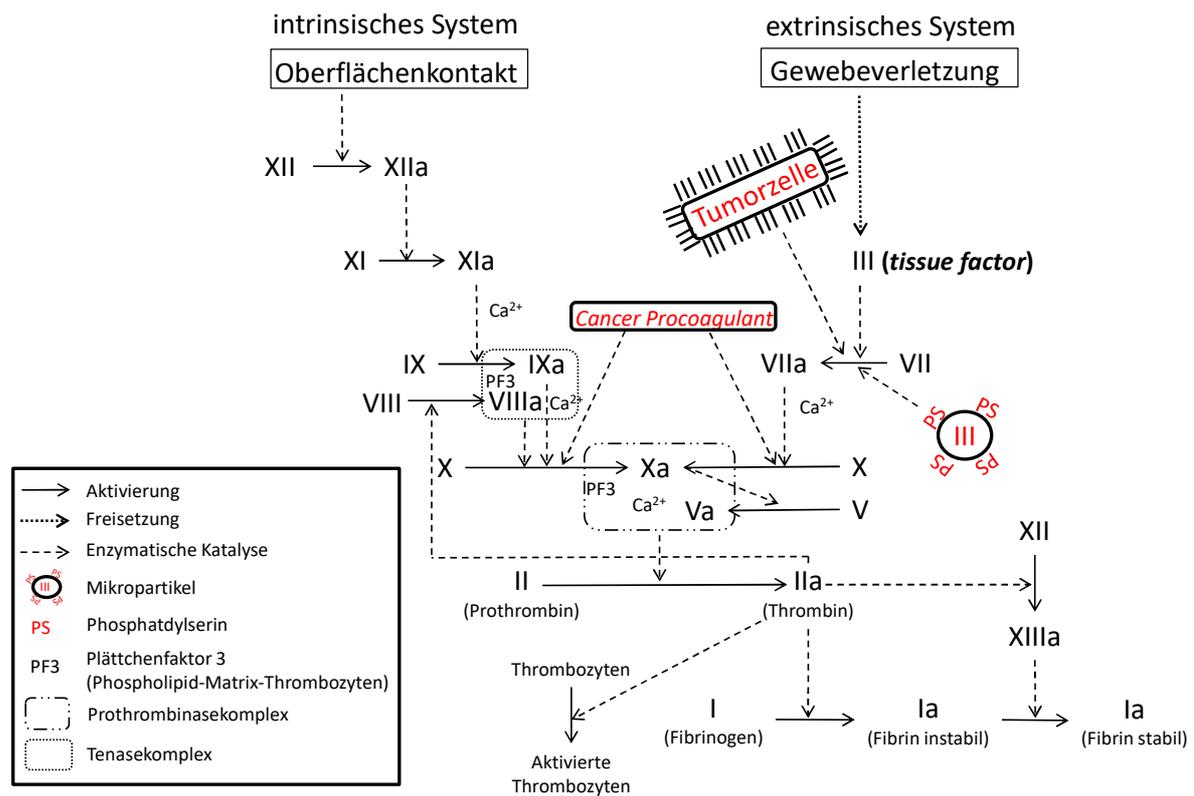


Abbildung 3: Übersicht der Möglichkeiten durch die eine metastasierende Tumorzelle die Blutgerinnungskaskade aktivieren kann, um eine Thrombingenerierung zu induzieren. Eine Aktivierung ist durch die Präsentation von TF möglich sowie die Freisetzung von *Cancer Procoagulant* oder tumoraler Mikropartikel (61,62,67).

Die direkte Aktivierung durch eine TF-Expression kann auch begleitet werden von einer tumoralen Freisetzung von Mikropartikeln-, welche ebenfalls mit TF beladen sind. Zusätzlich können diese Partikel anionische Phospholipide wie Phosphatidylserin tragen, welche eine Assoziation des Prothrombinasekomplexes unterstützen (68,69).

Von Falanga et al. konnte schließlich ein weiterer direkter Mechanismus der durch eine Aktivierung der Gerinnung zu einer Thrombinbildung führt, beschrieben werden. Sie isolierten aus Melanomzellen eine Cysteinprotease, die direkt sowie unabhängig von Faktor VII und TF den Faktor X aktivieren kann und somit eine Thrombingenerierung auslöst. Die Cysteinprotease wird als *cancer procoagulant* (CP) bezeichnet (70). Diese konnte ein Jahr nach ihrer Entdeckung auch in humanen Tumor-Gewebeproben von Melanompatienten nachgewiesen und quantifiziert werden (71). Darüber hinaus fanden Mielicki et al. schlüssige Hinweise auf das Vorkommen von CP in Magenkrebs- und Kolonkarzinomzellen (72).

Die zu Beginn erwähnten indirekten Faktoren beziehen sich auf das inflammatorische Geschehen, welches eine Tumorerkrankung begleitet (33). So können Tumorzellen z. B. durch die Freisetzung des Tumor-Nekrose-Faktors- α (TNF- α) prokoagulative Eigenschaften

vaskulärer Zellen induzieren. Eine Aktivierung der Endothelzellen durch TNF- α kann sich in einer gesteigerten TF-Expression manifestieren und so indirekt, ohne Kontakt zwischen Tumorzellen und Gerinnungsfaktoren, eine Aktivierung der Gerinnungskaskade auslösen sowie fördern (66,73).

Abschließend soll noch erwähnt werden, dass Thrombin, außer der Vermittlung einer Thrombozytenaktivierung via PAR-1 und -4, weiter auf das onkologische Geschehen Einfluss nehmen kann. So konnte z. B. von Adams et al. gezeigt werden, dass Thrombin die Proliferation von humanen und murinen Kolonkarzinomzellen durch die Aktivierung tumoraler PAR-1-Rezeptoren stimulieren kann (74). Zudem induziert Thrombin durch eine Aktivierung von PAR-1-Rezeptoren auf tumorassoziierten Makrophagen und Fibroblasten eine Freisetzung von *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1), welches eine Migration von Monozyten hin zur Tumormikroumgebung fördert (75). Somit kann Thrombin auch an der Formation und Konsolidierung der zellulären Mikroumgebung eines Tumors beteiligt sein.

Auf Thrombozyten aktiviert Thrombin durch die Spaltung einer extrazellulären Domäne die beiden, zu den G-protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) zählenden Rezeptoren, PAR-1 und -4. Durch die Spaltung wird ein neuer N-Terminus der extrazellulären Domäne exponiert, welcher als rezeptorinterner Ligand bzw. Agonist die Aktivierung auslöst. Aus der Aktivierung der beiden PAR-Rezeptoren resultiert eine RhoA-vermittelte Änderung der Thrombozytenmorphologie, der sogenannte *shape change* sowie eine Aktivierung der Phospholipase C- β (PLC β) mit folgender 1,2-Diacylglycerin-(DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat-(IP $_3$) Bildung. Infolgedessen aktiviert DAG die Proteinkinase C (PKC) und IP $_3$ erzeugt einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration, welcher zu einer Sekretion der thrombozytären Granula führt (76,77).

2.2.2 Induktion einer Thrombozytenaktivierung via direkten Tumorzell-Kontakt

Der zweite Mechanismus einer Thrombozytenaktivierung ist die Aktivierung durch einen direkten Kontakt zwischen Tumorzellen und Thrombozyten, welche von verschiedenen Adhäsionsrezeptoren vermittelt wird. Zu diesen Rezeptoren gehören die zur Immunglobulin Superfamilie zählenden Glykoprotein VI-(GPVI) und Fc γ RIIIa-Rezeptoren, die Integrine $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa) und $\alpha_v\beta_3$ sowie ein Adhäsionsrezeptor der *leucin-rich repeat* Klasse der Glykoprotein Ib-IX-V-Komplex (GPIb-IX-V-Komplex). Außerdem gehören die beiden zu den

C-type lectin-like receptors zählenden Adhäsionsmoleküle P-Selektin und *C-type-lectin-like-receptor-2* (CLEC-2) dazu (78–81). Im Folgenden wird für jeden Rezeptor die mögliche Art der Aktivierung durch Tumorzellen betrachtet.

Prometastatische Effekte einer GPVI-Aktivierung zeigten Jain et al., indem das Auftreten von Metastasen in der Lunge in GPVI-defizienten und -kompetenten Mäusen nach der Injektion von Melanomzellen und *Lewis Lung Carcinoma* (LLC) Zellen verglichen wurde. Die GPVI-defizienten Mäuse entwickelten weniger Metastasen in der Lunge (82). Der Mechanismus wurde von Dovizio et al. unter Verwendung humaner Kolonkarzinomzellen identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass die GPVI-Aktivierung durch das von den Kolonkarzinomzellen exprimierte Galectin 3 erfolgte (83). GPVI zählt zur Immunglobulin-Superfamilie und ist als solches mit einer im Zytoplasma lokalisiertem Fc γ -Kette verbunden. Diese Kette enthält das *immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM), welches nach einer GPVI-Aktivierung bzw. der Rezeptor-Gruppierung, dem sogenannten Clustering freigelegt wird. Daraufhin erfolgt eine Phosphorylierung an Tyrosinresten des ITAMs, welche dann die *spleen tyrosin kinase* (Syk) bindet und durch Autophosphorylierung aktiviert wird. Syk induziert die weitere Signaltransduktion, welche zur Aktivierung der Phospholipase C- γ 2 (PLC γ 2) führt. PLC γ 2 katalysiert die Bildung von DAG und IP $_3$. DAG aktiviert die PKC und IP $_3$ verursacht einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration (84). Das Resultat einer GPVI-Aktivierung ist die Freisetzung thrombozytärer Mikropartikel und der α -Granula (83,85,86).

Das Integrin $\alpha_6\beta_1$ wurde hinsichtlich seiner Bedeutung für die Metastasierung an Mäusen unter Verwendung von Mammakarzinomzellen untersucht. Mammadova-Bach et al. zeigten, dass es am metastatischen Geschehen beteiligt ist und prometastatische Effekte vermitteln kann. Das Integrin kann das Enzym ADAM9 aus der Klasse der Disintegrine und Metalloproteasen, welches in der Tumorzellmembran lokalisiert ist, binden. Aus der Bindung resultieren der *shape change* und eine gesteigerte P-Selektin-Präsentation, welche Merkmale einer Thrombozytenaktivierung sind (87,88). Die Signaltransduktion erfolgt via Phosphorylierung und Aktivierung der Tyrosinkinase Syk und der PLC γ 2. Die Intensität einer Thrombozytenaktivierung durch die alleinige $\alpha_6\beta_1$ -Aktivierung ist vermutlich als gering einzustufen, da eine parallele Aktivierung von GPVI für eine robuste Aktivierung erforderlich ist (89). Das Integrin $\alpha_2\beta_1$ soll in dieser Stelle kurz erwähnt werden. Seine Hauptaufgabe besteht darin Kollagen zu binden und so die Signaltransduktion von GPVI zu fördern (90).

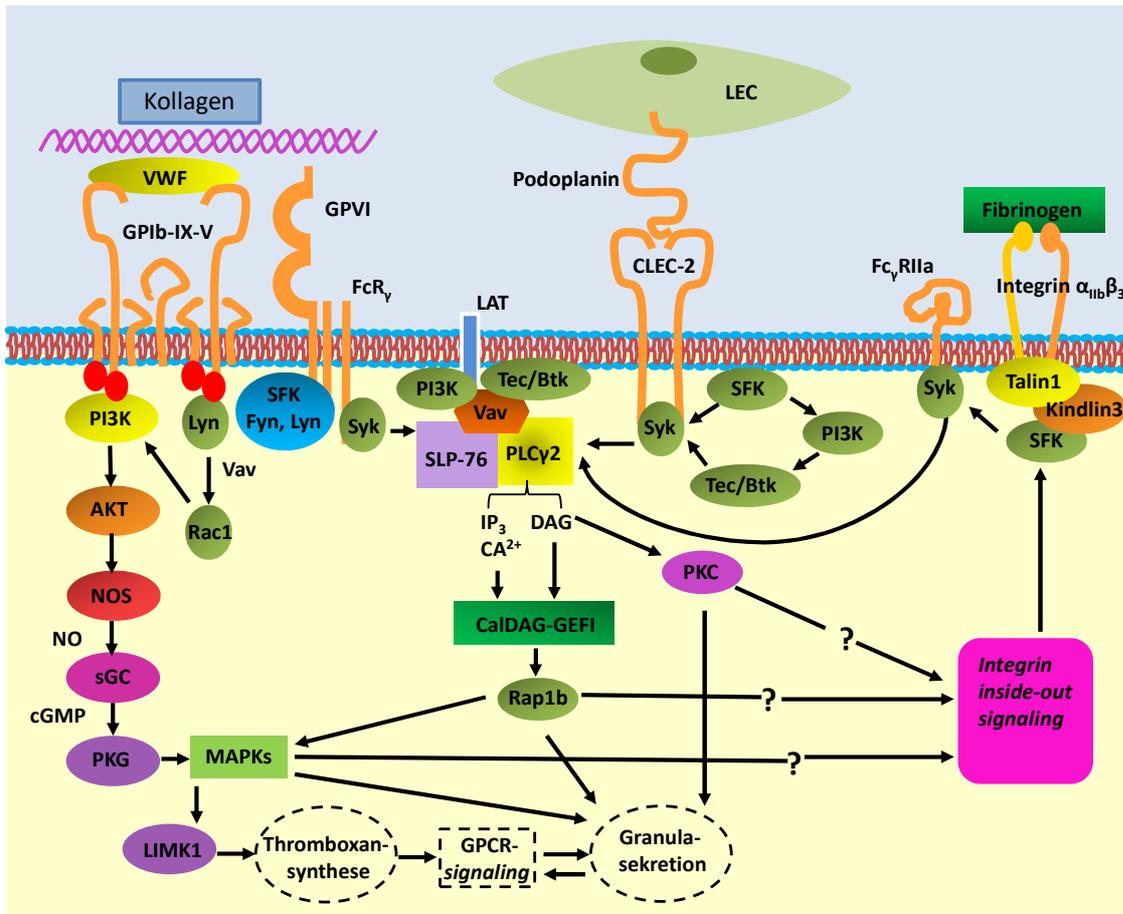


Abbildung 4: Schematische stark vereinfachte Darstellung der Signaltransduktion in Thrombozyten nach einer Aktivierung des GPIb-IX-V-Komplexes, des GPVI-Rezeptors, von CLEC2, dem Fc γ RIIa Rezeptor und dem Integrin α _{IIb} β ₃ (GPIIb/IIIa).
Modifiziert nach Estevez et al. (91).

Ein weiterer ITAM assoziierter Adhäsionsrezeptor ist der Fc γ RIIa-Rezeptor. Seine Beteiligung an einer Thrombozytenaktivierung durch Tumorzellen wurde von Mitrugno et al. postuliert. Sie konnten zeigen, dass die Aggregation und Granulasekretion von Thrombozyten, induziert durch den Kontakt mit Prostatakarzinomzellen, deutlich reduziert wurde, wenn eine Präinkubation der Thrombozyten mit einem Fc γ RIIa-Rezeptor blockierendem Antikörper erfolgte (92). Die Signaltransduktion des Fc γ RIIa-Rezeptors verläuft über eine Syk- und PLC γ 2-Aktivierung. (93). Sie führt somit auch zu einer Bildung von IP₃ und DAG mit PKC-Aktivierung (94).

Der nächste Rezeptor ist das Integrin α _{IIb} β ₃ (GPIIb/IIIa). Seine physiologische Funktionen sind die Aggregation bzw. Quervernetzung von Thrombozyten via Fibrinogen-Bindung während der Blutgerinnung und die Bindung an subendotheliale Strukturen über den von-Willebrand-Faktor (vWF) (95,96). In nicht-aktivierten Thrombozyten liegt es in einem inaktiven Zustand vor. Zur Umwandlung in eine der beiden möglichen, sich in ihrer Affinität für Fibrinogen unterscheidenden, aktiven Konformationen ist ein sogenanntes *inside-out signaling*

notwendig. Dieses kann z. B. induziert werden durch eine Aktivierung des GPIb-IX-V-Komplexes, der PAR-1 und -4 Rezeptoren sowie der ADP-Rezeptoren (97). Im aktiven Zustand kann das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ durch Bindung seiner Liganden mittels eines komplexen *outside-in signalings* die Thrombozytenfunktion steuern. An diesem *signaling* sind zahlreiche Proteine beteiligt, so erfolgt u. a. über die Syk-Aktivierung eine PLC γ 2-Aktivierung mit folgender IP $_3$ -und DAG-Bildung. IP $_3$ verursacht einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration und DAG eine PKC-Aktivierung. Ebenso erfolgt eine Aktivierung der fokalen Adhäsionskinase (FAK) und die Aktivität von Rho-GTPasen, welche Änderungen des Thrombozytenzytoskelettes steuern, wird reguliert. Außerdem ist eine Beteiligung des Fc γ R11a-Rezeptors am *outside-in signalings* beschrieben (98).

Bisher konnten verschiedene Mechanismen einer Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ Beteiligung an Thrombozyt-Tumorzell-Interaktionen erfasst werden. Bei Messungen der Aggregation von Thrombozyten und Melanomzellen konnte eine Beteiligung des Integrins an der Aggregatbildung durch Verwendung blockierender Antikörper festgestellt werden (99). Zusätzlich zu der Funktion als Aggregatbildner konnte gezeigt werden, dass die Freisetzung proangiogener Mediatoren aus der thrombozytären Granula vom Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ abhängen kann. Engebraaten et al. demonstrierten eine Inhibition der Granulasekretion am Beispiel von *basic fibroblast growth factor* (bFGF) und Mammakarzinomzellen, Amirkhosravi et al. zeigten die Inhibition am *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und Melanomzellen. In beiden Studien wurde das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ blockiert und eine Reduktion der Sekretion festgestellt (100,101).

Ein weiteres am metastatischen Geschehen beteiligtes Integrin ist das $\alpha_v\beta_3$. Trotz seiner Lokalisation auf Thrombozyten und seiner Funktion als Vitronectin-Rezeptor erlangt es eine noch größere Bedeutung durch seine Lokalisation auf Tumorzellen und die damit einhergehenden prometastatischen Effekte (102). In einem Modell mit Melanomzellen konnte gezeigt werden, dass zwischen tumorzellständigem Integrin $\alpha_v\beta_3$ und auf Thrombozyten lokalisiertem $\alpha_{IIb}\beta_3$ eine sowohl fibrinogenabhängige als auch unabhängige Bindung etabliert werden kann. Eine Inhibition dieser Bindung durch Antikörper reduzierte das Auftreten von Lungenmetastasen im Mausmodell (103).

Der GPIb-IX-V-Komplex besteht aus den vier verschiedenen Untereinheiten: GPI α , GPI β , GPIX und GPV (104). Seine physiologische Funktion besteht im Aufbau einer ersten Bindung mit subendothelialen Strukturen über den vWF bei starkem Blutfluss, weitere Liganden sind z. B. Thrombin und P-Selektin (105,106). Die Signaltransduktion nach einer Ligandbindung

verläuft via Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) und führt zu einer Aktivierung der Proteinkinase G (PKG) sowie der *mitogen-activated protein kinases* (MAP-Kinasen) (107–109). Aus deren Aktivierung können eine Induktion der Thromboxan A₂ Synthese, eine Aktivierung des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$, eine Granulasekretion sowie Veränderungen am Zytoskelett resultieren (107,109–111). Eine Assoziation der Signaltransduktion mit dem Fc γ RIIa-Rezeptor und der Fc γ -Kette, welche wiederum Syk-abhängig sind, wurde beschrieben, jedoch konnte gezeigt werden, dass Syk vermutlich nur eine untergeordnete Bedeutung in der Signaltransduktion hat (111,112). Die Bedeutung des GPIb-IX-V Komplexes für die Metastasierung ist kontrovers. So konnte einerseits durch eine Inhibition des Glykoproteinkomplexes eine Reduktion der durch Mammakarzinomzellen induzierten TCIPA gezeigt werden, andererseits konnte von Erpenbeck et al. demonstriert werden, dass eine Inhibition der GPI α -Einheit und somit des Komplexes in einer gesteigerten Anzahl von Lungenmetastasen resultierte (113).

Der vorletzte thrombozytäre Adhäsionsrezeptor mit einem Einfluss auf die Thrombozytenaktivität ist P-Selektin. Ob es an einer initialen Aktivierung beteiligt ist, bleibt fraglich, da es in Thrombozyten in der α -Granula gespeichert wird. Durch eine Thrombozytenaktivierung transloziert das gespeicherte P-Selektin zur Thrombozytenmembran und wird extrazellulär präsentiert. Es handelt sich um einen *C-type lectin-like* Rezeptor, dessen Funktion die calciumabhängige Bindung von sialylierten und fucosylierten Oligosacchariden wie z. B. Sialyl Lewis x (sLe^x) ist. Die entsprechenden Oligosaccharide bzw. Liganden müssen zur Bindung in größerer Anzahl gruppiert auf der Membran vorliegen. Die physiologische Funktion des P-Selektins bzw. der Selektine ist die Vermittlung von Zell-Zell-Adhäsionen im Kontext von z. B. Entzündungen und Gewebeverletzungen. An von Selektinen getragenen Prozessen können zusätzlich zu Thrombozyten, L-Selektin exprimierende Leukozyten sowie E- und P-Selektin exprimierende Endothelzellen beteiligt sein (114,115). Vervollständigt wird das Bild durch eine Betrachtung der Expression der Liganden, wie z. B. der des P-Selektin-Glykoproteinliganden-1 (PSGL-1). Dieser wird konstitutiv auf lymphatischen, dendritischen und myeloischen Zellen exprimiert. Somit kann über Selektine eine schnelle bedarfsgerechte Adhäsion dieser Zellen während einer Entzündung erfolgen (116).

Dementsprechend konnte gezeigt werden, dass die Einbindung von Leukozyten in einen Thrombus von P-Selektin abhängig sein kann (117). Ebenso zeigten Kim et al. anhand von

Kolonkarzinomzellen, dass die Bildung von Tumorzell-Thrombozyt-Aggregaten von P-Selektin vermittelt werden kann (118). In Bezug auf P-Selektin konnte zusätzlich belegt werden, dass die assoziierten prometastatischen Effekte über eine Adhäsion hinausgehen. Bei dem Kontakt von Melanomzellen mit Thrombozyten stellten Becker et al. fest, dass via Bindung des thrombozytären P-Selektins eine Aktivierung der MAP-Kinasen mit resultierender Freisetzung der sauren Sphingomyelinase erfolgte. Die saure Sphingomyelinase erhöhte wiederum die Tumorzellanzahl in der Lunge (119).

Abschließend wird der Adhäsionsrezeptor CLEC-2 betrachtet. Es handelt sich um ein transmembranäres Glykoprotein, welches intrazellulär mit einem kurzkettigem ITAM verknüpft ist, dem sogenannten hemITAM. CLEC-2 kann durch den Liganden Podoplanin aktiviert werden. Zur Signaltransduktion erfolgt eine Phosphorylierung von Tyrosin im hemITAM, welches anschließend Syk bindet und via Autophosphorylierung aktiviert. Syk aktiviert wiederum durch Phosphorylierung die PLC γ 2. Daraus resultieren wieder via IP $_3$ und DAG Bildung ein Anstieg der Calciumkonzentration und eine Aktivierung der PKC (120,121). Unter physiologischen Bedingungen hat die Adhäsion zwischen Thrombozyten via CLEC-2 und Podoplanin exprimierenden Zellen z. B. eine Bedeutung in der embryonalen Entwicklung oder zur Abgrenzung von Lymph- und Blutgefäßen (122).

Bei der Untersuchung der Podoplanin-Expression von Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen wurde eine Beteiligung des Podoplanins im Kontext maligner Erkrankungen evident. Es stellte sich heraus, dass die Podoplanin-Expression mit einer schlechteren Prognose und einem gesteigerten Auftreten von Lymphmetastasen korreliert war (123). Von Nakazawa et al. konnte als möglicher zugrundeliegender Mechanismus eine Förderung der Thrombozytenaktivierung durch die tumorale Podoplanin-Expression identifiziert werden. Durch eine antikörpervermittelte Inhibition von Podoplanin wurde das Auftreten von Lungenmetastasen in Mäusen reduziert. Leicht einschränkend muss aber bemerkt werden, dass anstelle von Tumorzellen mit Podoplaningenen transfizierte *chinese hamster ovary cells* (CHO) verwendet wurden (124). Ähnliche Experimente wurden von Takagi et al. durchgeführt. Es wurde auch das Auftreten von Lungenmetastasen in Mäusen nach der Injektion von murinen podoplanindefizienten und -kompetenten Blasenkrebszellen untereinander verglichen (53). Nach der Injektion der podoplanindefizienten Zellen konnte eine deutliche Reduktion der Lungenmetastasen festgestellt werden.

Abbildung 4 illustriert, mit Ausnahme der Adhäsionsrezeptoren P-Selektin und Integrin $\alpha_6\beta_1$, die verschiedenen Signaltransduktionen. Es lässt sich somit resümieren, dass Adhäsionsrezeptoren auch an der Formierung und Erhaltung der Tumorzell-Thrombozyten-Aggregate und an der Extravasation bzw. der Adhäsion am Endothel beteiligt sein können.

2.2.3 Induktion einer Thrombozytenaktivierung via Freisetzung von Thrombozytenaktivatoren

Der dritte Thrombozyten-Aktivierungs-Mechanismus basiert einerseits auf der Freisetzung von Aktivatoren durch Tumorzellen, die parakrin aktivierend auf Thrombozyten wirken und andererseits, auf einer Freisetzung von sekundären Aktivatoren durch Thrombozyten, welche autokrin die Thrombozytenaktivierung fördern. Zu den wichtigsten parakrinen Mediatoren gehören ADP, Thromboxan A_2 und das *high-mobility group box 1 protein* (HMGB1).

Thrombozyten besitzen zwei GPCRs für ADP, einen $G\alpha_q$ gekoppelten P2Y₁-Rezeptor und einen $G\alpha_i$ gekoppelten P2Y₁₂-Rezeptor (125). Damit Thrombozyten die durch ADP maximal mögliche Aktivierung erfahren, ist eine Aktivierung beider Rezeptoren notwendig (126). Weiterhin ist anzunehmen, dass die ADP-vermittelte Aktivierung ein positives Feedback darstellt und z. B. eine initiale Thrombinstimulation unterstützt und aufrecht erhält (127). Die Agonist-Bindung des P2Y₁-Rezeptors führt über IP₃ und DAG zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration. Die Aktivierung des P2Y₁₂-Rezeptors induziert einerseits eine Inhibition der Adenylatcyclase und reduziert somit die Konzentration von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) und andererseits via PI3K eine Aktivierung der MAP-Kinasen und der PKG. Die Konsequenz der dualen Rezeptoraktivierung ist eine Förderung des *shape change*, der Granulasekretion, die Aktivierung des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ und der Thromboxansynthese (128,129). Im Kontext der Metastasierung haben die P2Y-Rezeptoren Bedeutung als sekundäre Aktivatoren von Thrombozyten erlangt, da ADP und ATP in der thrombozytären Granula gespeichert sind und erst nach initialer Freisetzung die Aktivierung fördern (130). Es sollte auch erwähnt werden, dass verschiedene Tumorarten zu einer ADP-Freisetzung befähigt sein können. Haemmerle et al. demonstrierten eine direkte ADP-Freisetzung von Ovarialkarzinomzellen (56). So konnte eine unmittelbare Aktivierung der P2Y-Rezeptoren erfolgen. Unter Verwendung von Melanomzellen und LLC konnte beim

Vergleich von P2Y₁₂-defizienten mit –kompetenten Mäusen eine Reduktion des Auftretens von Lungenmetastasen in den P2Y₁₂-defizienten Tieren festgestellt werden (57).

Der zweite parakrin sowie autokrin wirkende Aktivator ist Thromboxan A₂ (TXA₂). Dessen Bildung aus Arachidonsäure in Thrombozyten wird durch die Enzyme Cyclooxygenase-1 (COX-1) und Thromboxan A₂-Synthase katalysiert. Der entsprechende Rezeptor auf Thrombozyten ist ein GPCR und wird als Thromboxan A₂-Rezeptor (TXA₂-Rezeptor) bezeichnet. Er ist mit Gα_q und Gα_{12/13} gekoppelt. Die Signaltransduktion erfolgt dementsprechend über DAG und IP₃ mit folgender PKC-Aktivierung und Steigerung der intrazellulären Calcium-konzentrationen sowie RhoA-Aktivierung. Das Resultat der Signaltransduktion ist eine Förderung der Granulasekretion und des *shape change* (131,132). Die Bedeutung von TXA₂ im Kontext von malignen Erkrankungen wird daran ersichtlich, dass die *U.S. Preventive Services Task Force* unter bestimmten Voraussetzungen die Einnahme von Acetylsalicylsäure (ASS) zur Prävention von Kolorektalkarzinomen empfiehlt (133). ASS inhibiert in niedriger Dosierung irreversibel die COX-1 und verhindert somit die TXA₂-Synthese. Der Bezug von TXA₂ auf Tumorzell-Thrombozyten-Interaktion wurde durch Guillem-Llobat et al. und ihrer Arbeit mit Kolorektalkarzinomzellen erbracht. Es konnte gezeigt werden, dass durch die ASS-vermittelte COX-1 Inhibition zelluläre Veränderungen, induziert durch Thrombozyten-Koinkubation, hin zu einem mesenchymalen Phänotyp reduziert wurden. Außerdem wurde das Auftreten von Lungenmetastasen durch eine Behandlung der Mäuse mit ASS reduziert. Die Behandlung wurde vier Tage vor der Tumorzellinjektion begonnen. Die Effekte wurden jedoch teilweise einer Inhibition der Synthese des, auch durch COX-1 gebildeten, Prostaglandins-E₂ zugeschrieben (134). TXA₂ hat ähnlich wie ADP die Funktion eines sekundären Aktivators und verstärkt primäre Signale wie z. B. eine PAR-Aktivierung. Menta et al. zeigten, dass die Aggregation von Thrombozyten, induziert durch Osteosarkomzellen, reduziert wurde durch eine TXA₂-Rezeptor Blockade, aber nicht durch die Inhibition der TXA₂-Synthese (135). Vermutlich muss die Synthese über einen längeren Zeitraum inhibiert werden. Abschließend soll angemerkt werden, dass auch Tumorzellen, wie z. B. Kolorektalkarzinomzellen, TXA₂ synthetisieren und es zur Förderung ihrer Proliferation verwenden. Dementsprechend ist es nicht auszuschließen, dass eine intrinsische tumorale TXA₂-Freisetzung eine Thrombozytenaktivierung parakrin fördern kann (136).

Der dritte parakrin und autokrin aktivierende Mediator ist das Protein HMGB1. Es besitzt verschiedene Funktionen im Organismus. Einerseits reguliert und vermittelt es im Nucleus die Bindung zwischen der DNA und regulatorischen Proteinen und andererseits fungiert es als Zytokin, welches an der inflammatorischen Signaltransduktion im Organismus beteiligt ist (137–139). Es wird außerdem zu den *damage associated molecular pattern molecules* (DAMPs) gezählt, welche durch ihre Freisetzung einen Gewebeschaden signalisieren (140). Auf Thrombozyten ist überwiegend der *toll-like receptor-4* (TLR4) für die Bindung von HMGB1 und die Weiterleitung von Effekten verantwortlich (141–143). Wird dieser aktiviert, erfolgt unter Beteiligung des Proteins *myeloid differentiation primary response 88* (MYD88) die Aktivierung der PKG, was in einer Förderung der Thrombozytenaggregation und Granulasekretion resultiert (144). Wie bei den beiden vorangegangenen Mediatoren ist auch HMGB1 in der thrombozytären Granula gespeichert und wird im Zuge einer PAR-Aktivierung freigesetzt. Dementsprechend vermittelt es auch eine Förderung der initialen Aktivierung und kann als sekundärer Thrombozyten-Agonist betrachtet werden (145). Um die Bedeutung von HMGB1 zu unterstreichen, werden Studien von Vogel et al. angeführt, welche zeigten, dass Mäuse mit HMGB1-defizienten Thrombozyten massive Störungen der Blutgerinnung aufweisen (143). Im Kontext der Tumorzell-Thrombozyten-Interaktionen während der Metastasierung konnte eine tragende Rolle der TLR4-HMGB1-vermittelten Signaltransduktion von Yu et al. unter Verwendung von LLC und Melanomzellen demonstriert werden. Es wurde gezeigt, dass das Auftreten von Lungenmetastasen von der TLR4-HMGB1-Signalkaskade abhängig sein kann. Sowohl Rezeptordefizienz als auch Inhibition des Liganden führten zu einer Reduktion der Lungenmetastasen. Außerdem wurde eine Mikrovesikel basierte Freisetzung von HMGB1 durch beide Tumorzelllinien festgestellt. Somit ist auch HMGB1 kein reiner autokriner sekundärer Thrombozyten-Agonist, sondern ist auch zu einer parakrinen Thrombozytenaktivierung befähigt (146).

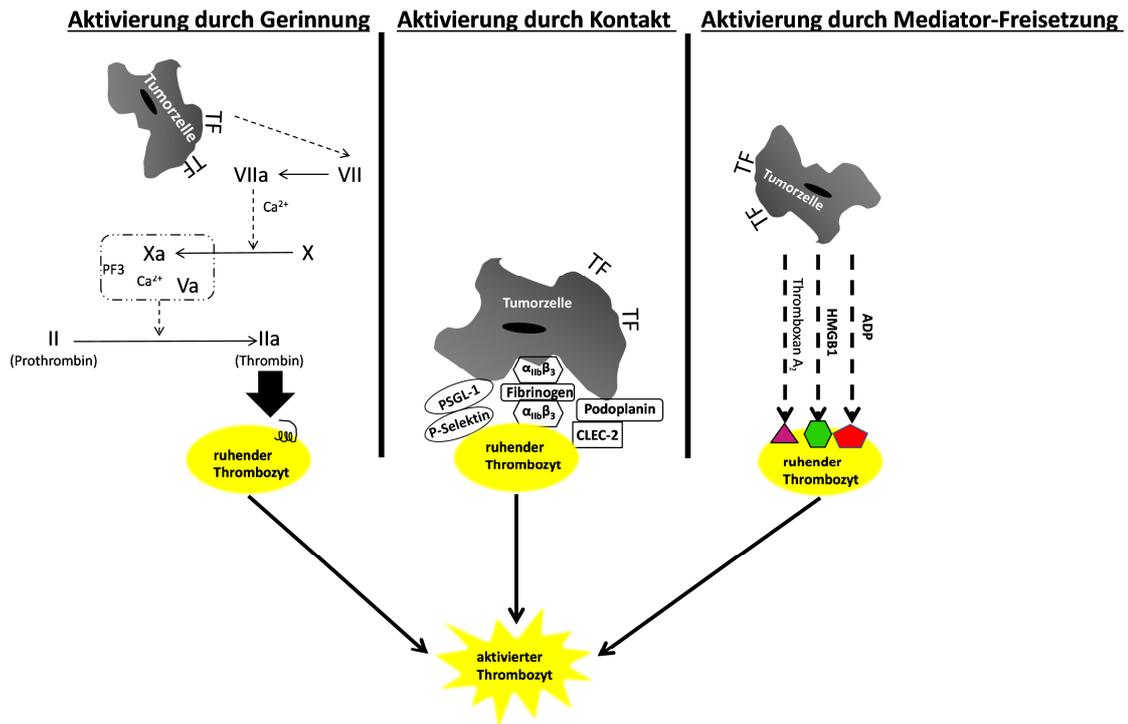


Abbildung 5: Simplifizierte Übersicht der drei Mechanismen durch die Tumorzellen eine Thrombozytenaktivierung während der hämatogenen Metastasierung herbeiführen können (53,56,61,62,67,99,118,119,135,146).

2.3 Zusammensetzung und Sekretion der thrombozytären Granula

Die durch Tumorzellen induzierte unphysiologische Thrombozytenaktivierung ist der Beginn des fatalen prometastatischen Wechselspiels zwischen den beiden Zellarten. Jedoch haben viele der prometastatischen Effekte ihren Ursprung in den thrombozytären Granula bzw. den dort gespeicherten Molekülen und ihrer Freisetzung. Einige der Effekte wurden in Abschnitt 2.1 bereits angedeutet; hervorzuheben sind z. B. die Suppression von NK-Zellen sowie die EMT-Induktion in metastasierenden Tumorzellen, welche beide von TGF- β 1 vermittelt werden. Durch eine VEGF-Freisetzung kann die Extravasation von Tumorzellen unterstützt werden und durch Chemokinfreisetzung die Bildung einer prämetastatischen Nische (14,16,58,60,147,148). Außerdem wird die Thrombozytenaktivierung durch in den Granula gespeichertes ADP, TXA₂ und HMGB1 verstärkt, was sich wiederum z. B. in einer Steigerung der Aggregation mit Tumorzellen manifestieren kann (128,129,131,132,144). Anhand der in den vorangegangenen Abschnitten angeführten Beispiele welche in der Regel eine Reduktion der Lungenmetastasen-Inzidenz durch eine Inhibition der Thrombozytenaktivierung und somit der Granulasekretion zeigten, wird die Bedeutung der Sekretion im metastatischen Kontext unterstrichen.

Thrombozyten enthalten drei verschiedene Granula. Erstens die dichten(δ)-Granula, welche kleinere Verbindungen wie z. B. divalente Kationen, ADP, ATP und Serotonin beinhalten. Zweitens die α -Granula, die eine komplexe Komposition verschiedener Verbindungen enthalten, so findet man in ihnen Adhäsionsproteine wie z. B. den vWF und Fibrinogen, Wachstumsfaktoren wie TGF- β 1 und VEGF, Gerinnungsfaktoren wie z. B. Faktor V sowie Chemokine wie CXCL5 und 7. Die dritte Art der Granula wird durch Lysosomen repräsentiert, welche degradierende Enzyme enthalten (12,148,149). Somit lassen sich auch die physiologischen Funktionen der Thrombozyten anhand der Zusammensetzung der Granula ablesen, die u. a. die Potenzierung von Gerinnungsprozessen bei der Wundheilung sowie die Regulation inflammatorischer Prozesse umfassen (150,151).

Die Sekretion der Granula ist die Konsequenz einer Thrombozytenaktivierung und als solche in ihrer Intensität abhängig von den aktivierten Rezeptoren. Die Intensität wird z. B. von der Anzahl der aktivierten Rezeptoren, also der Rezeptordichte auf der Oberfläche, determiniert (152,153). Im Vorhinein muss erwähnt werden, dass die Signaltransduktion, die zur Sekretion der thrombozytären Granula führt und diese reguliert, weder komplett verstanden ist, noch in ihrer Gänze wissenschaftlich beschrieben wurde. Wie in Abschnitt 2.2 erläutert wurde, sind viele Signaltransduktionskaskaden an einer Thrombozytenaktivierung und somit der Granulasekretion beteiligt. Die Sekretion wird initialisiert durch eine Aktivierung der PKC und der PKG sowie durch eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration, die MAP-Kinasen Signaltransduktion und die Aktivierung von RhoA (154–158). Die Sekretion der Granula wird gesteuert bzw. vermittelt durch Proteine der Klasse der *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment receptors* (SNAREs). Thrombozyten besitzen an der Innenseite ihrer Phospholipiddoppelschicht *target SNAREs* (tSNAREs), die aus *synaptosomal-associated proteins* (SNAPs) und *Syntaxins* (STXs) bestehen. Die tSNAREs sind assoziiert mit Chaperonen, welche Änderungen der Konformation vermitteln. Die tSNAREs binden bei einem entsprechenden Signal die auf den Granulavesikeln lokalisierten *vesicle SNAREs* (vSNAREs) (159–161). In Thrombozyten sind vSNAREs überwiegend mit dem *vesicle-associated membrane protein 8* (VAMP8) assoziiert (162,163). Bei korrekter Bindung der SNAREs fusioniert das Vesikel mit der Thrombozytenmembran, es wird eine Pore in der Phospholipiddoppelschicht gebildet und der Vesikelinhalt wird freigesetzt (164).

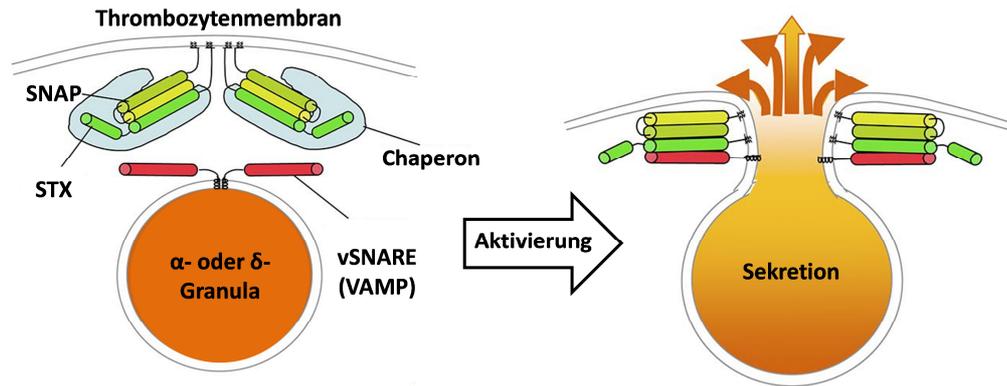


Abbildung 6: Stark vereinfachte Darstellung der Granulasekretion sowie der Lokalisation und Interaktion der SNAREs.
Modifiziert nach Marks et al. (159).

Da der Mechanismus der Membran-Vesikel Fusion vergleichsweise komplex ist, wird er im Rahmen dieser Arbeit in einer simplifizierten Form dargestellt. Im Folgenden wird der Fokus auf Mechanismen gelegt, die eine Steuerung und Regulation der Freisetzung des thrombozytären Granulainhaltes ermöglichen. Kann der Thrombozyt bzw. die metastasierende Tumorzelle steuern, welche Mediatoren aus welchen Granula freigesetzt werden, oder wird im Zuge einer Aktivierung stets alles freigesetzt?

Zur Erklärung der regulatorischen Mechanismen wurden verschiedene Experimente durchgeführt und Theorien postuliert. So konnten Ma et al. zeigen, dass eine selektive Aktivierung des PAR-1 in einer Steigerung der VEGF-Sekretion resultierte, wohingegen sich eine selektive Aktivierung des PAR-4 in einer Steigerung der Endostatin-Freisetzung manifestierte (165). Also könnte möglicherweise die initiale Rezeptoraktivierung und die folgende Signaltransduktion einen Einfluss auf das Sekretionsmuster haben. Als Hypothese zur Erklärung dieser Beobachtungen wurde eine unterschiedliche Beladung und Lagerung bzw. Lokalisation der α-Granula-Vesikel vermutet. Erste Beweise dieser differentiellen Lagerung wurden anhand des Musters der Lokalisation von vWF und Fibrinogen enthaltenden Vesikeln erbracht (166). Außerdem muss berücksichtigt werden, dass eine Tumorzelle zur Ausführung einer selektiven Aktivierung des PAR-1 durch die Freisetzung der MMP-1 befähigt sein kann und so die gezielte Freisetzung proangiogener Mediatoren fördern könnte (167).

Zu einer weiteren interessanten Erkenntnis bezüglich der Regulation gelangten Jonnalagadda et al. bei der Analytik der Freisetzungskinetik von 30 Verbindungen aus den Granula. Es wurde festgestellt, dass die gespeicherten Verbindungen mit verschiedenen Geschwindigkeiten freigesetzt werden und das Potential zur Induktion einer Thrombozytenaktivierung der Agonisten die gesamte Geschwindigkeit der Freisetzung

beeinflusste. So induzierte Thrombin die schnellste und umfangreichste Freisetzung. Da jedoch funktionell antagonistische Mediatoren aus den Granula in diesen Versuchen ein ähnliches Freisetzungsprofil hatten, bietet die isolierte Betrachtung der Freisetzungskinetik keine hinreichende Erklärung (168).

Ebenso könnte der komplexe Sekretionsapparat aus SNAREs mitverantwortlich sein für die Regulation der bedarfsgerechten Granulasekretion. Bisher konnte von Ye et al. gezeigt werden, dass ein Fehlen von STX-11 eine durch Thrombin induzierte Freisetzung der α - und der dichten-Granula reduzierte (169). Außerdem konnte von Golebiewaska et al. eine entscheidende Beteiligung von STX-8 an der Freisetzung der dichten-Granula gezeigt werden (170). Scheinbar sind verschiedene SNAREs in die Regulation unterschiedlich involviert. Weitere Forschung ist notwendig zum besseren Verständnis der Steuerung der thrombozytären Granulasekretion.

2.4 Einfluss einer Thrombozytenaktivierung auf die hämatogene

Metastasierung

Nach der Betrachtung der grundlegenden Mechanismen einer Thrombozytenaktivierung durch Tumorzellen und der damit verbundenen Sekretion der Granula werden im folgenden Abschnitt die resultierenden prometastatischen Effekte betrachtet. Der Fokus wird dabei auf drei Prozesse gelegt, die von Thrombozyten beeinflusst werden. Die Induktion bzw. Aufrechterhaltung einer EMT in den metastasierenden Tumorzellen, die Ausbildung einer prämetastatischen Nische und die Förderung einer Extravasation der Tumorzellen.

2.4.1 Induktion einer Epithelial-mesenchymalen Transition in metastasierenden

Tumorzellen

Da der Phänotyp von epithelialen und mesenchymalen Zellen einer gewissen Plastizität unterliegt, kann er als transient betrachtet werden. Eine Veränderung des Phänotyps ist in Abhängigkeit von den die Zelle stimulierenden Noxen möglich. Metastasierende Tumorzellen profitieren in hohem Maße von einer Veränderung ihres Phänotyps bzw. von einer EMT und MET. Eine EMT verleiht einer entarteten Zelle prometastatische Charakteristika wie z. B. stammzellartige Eigenschaften sowie eine gesteigerte Motilität und Invasivität (24–26). Es ist sowohl die Umwandlung einer epithelialen Zelle zu einer mesenchymalen Zelle möglich,

welche als EMT bezeichnet wird, als auch die Umwandlung einer mesenchymalen Zelle zu einer epithelialen Zelle, welche MET genannt wird. Die Umwandlungen können vollständig oder partiell erfolgen. Unter physiologischen Bedingungen ist der Prozess der EMT z. B. an der Morphogenese und Wundheilung beteiligt (171). Vor dem Hintergrund eines pathologischen Geschehens erlangte die EMT Bedeutung in Verbindung mit malignen Erkrankungen und Fibrosen (172).

Im Kontext einer malignen Erkrankung wird Tumorzellen durch eine EMT ermöglicht, sich aus dem soliden Gewebeverbund zu lösen, den Primärtumor zu verlassen und zu metastasieren (173). Die Zunahme der Bewegungsfreiheit resultiert aus den mit der EMT einhergehenden morphologischen Änderungen der Zelle. Möglich sind ein Verlust der Zellpolarität und ein Verlust von Zell-Zell-Verbindungen wie z. B. von E-Cadherin (epithelial). Insbesondere der E-Cadherin-Verlust, welcher aus einer reduzierten Expression und einem gesteigerten Abbau resultieren sowie die Erhöhung der N-Cadherin-Expression (neural), werden als hochspezifische EMT-Charakteristika eingestuft und als *cadherine switch* bezeichnet (174–176). Weiterhin kann eine EMT zu einer Reorganisation des Zytoskelettes führen, z. B. durch eine gesteigerte Expression des Typ III Intermediär Filamentes Vimentin. Die Änderungen des Zytoskeletts können sich in einer Steigerung der Zellmotilität und in einer Änderung der Zellform manifestieren (177–179). Zudem ist eine Zunahme der Resistenz gegenüber Zytostatika möglich sowie die Entwicklung Stammzell-artiger Eigenschaften (180,181). Die vormals stationäre epitheliale Tumorzelle wandelt sich durch eine EMT zu einer invasiven, beweglichen und resistenten mesenchymalen Tumorzelle.

Verantwortlich für die EMT-Induktion am Ort des Primärtumors sind Signaltransduktionskaskaden, die aus Inflammationen, Hypoxien oder oxidativem Stress resultieren können. Diese werden u. a. vermittelt von TGF- β , dem *hypoxia-inducible factor-1 α* (HIF-1 α) und den *reactive oxygen species* (ROS) (182–184). Infolge der EMT-Stimulation, z. B. via TGF- β werden Signaltransduktionskaskaden initialisiert, welche die Genexpression durch Aktivierung der EMT-induzierenden Transkriptionsfaktoren Snail1, Slug (Snail2), Twist1 sowie Zeb1 und 2 modulieren. Die zu Beginn beschriebenen Änderungen des Zell-Phänotyps sind die Konsequenz dieser geänderten Genexpression (185).

Interessanterweise kann TGF- β auch gegensätzliche Effekte auf Tumorzellen ausüben. Es wurde festgestellt, dass der Wachstumsfaktor in frühen Tumorstadien positive Effekte wie die Induktion einer Apoptose vermitteln kann und somit als Tumorsuppressor agiert.

Paradoxerweise entfaltet TGF- β in späteren Stadien immunsuppressive Wirkungen und agiert dann als Tumorpromoter. Möglicherweise basiert diese kontroverse Wirkung auf der TGF- β -vermittelten EMT-Induktion (186–188). Zudem muss in Bezug auf TGF- β berücksichtigt werden, dass der Faktor nach seiner Freisetzung in der Regel erst durch die Abspaltung von gebundenen Proteinen wie dem *latency-associated peptide* (LAP) aktiviert werden muss. Verschiedene Mechanismen vermitteln diese Aktivierung, einerseits erfolgt eine enzymatische Spaltung durch Serinproteasen wie Plasmin und Metalloproteasen wie MMP-9 und andererseits, kann die Aktivierung unter der Beteiligung verschiedener LAP-bindender Integrine, wie z. B. dem $\alpha_v\beta_3$ verlaufen. Außerdem ist eine Abhängigkeit der TGF- β -Aktivierung vom pH-Wert und der Temperatur beschrieben (189).

Bei der Betrachtung des Verlaufes der hämatogenen Metastasierung wurde angenommen, dass die EMT, welche die Tumorzelle mit prometastatischen und invasiven Eigenschaften ausstattet, zu Beginn der metastatischen Kaskade im Primärtumor stattfindet und im Verlauf der Metastasierung der mesenchymale Phänotyp stabil ist. Labelle und Hynes erwogen die Möglichkeit, dass die metastasierenden Tumorzellen auch während der Metastasierung EMT-induzierenden Stimuli ausgesetzt sind und diese einen entscheidenden Anteil am Erfolg der Metastasierung haben (190). Grundlage ihrer Hypothese ist die evidente sowie intensive Interaktion von metastasierenden Tumorzellen mit Thrombozyten und die Tatsache, dass im Kontext dieser Interaktionen größere gespeicherte Mengen TGF- β 1 sowie *hepatocyte growth factor* (HGF), *platelet-derived growth factor-B* (PDGF-B), *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und *epidermal growth factor* (EGF) freigesetzt werden können (191–195). Diese können alle über ihre entsprechenden Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) zur EMT-Induktion befähigt bzw. an ihr beteiligt sein (196–200). So erzeugten Yang et al. in Pankreaskarzinomzellen durch eine Inkubation mit VEGF zelluläre Veränderungen wie eine Steigerung der Snail-, Slug-, N-Cadherin- und Vimentin-Expression sowie eine Reduktion der E-Cadherin-Expression (198). Ebenso konnte gezeigt werden, dass EGF via SMAD2/3 zelluläre Veränderung hin zu einer EMT anstößt. Diese manifestierten sich in einer Reduktion der E-Cadherin-Expression sowie einer Steigerung der Motilität und Invasivität von Mammakarzinomzellen (200).

Labelle und Hynes konnten eine signifikante Steigerung des Auftretens von metastatischen Herden in den Lungen von Mäusen feststellen, die letztendlich aus einer durch Thrombozyten induzierten EMT resultierten. Die Analyse der Lungen erfolgte 14 Tage nach

der Injektion von Mamma- oder Kolonkarzinomzellen, die einer 40-stündigen Inkubation mit Thrombozyten unterzogen wurden. Bereits 48 Stunden nach der Injektion konnten signifikant erhöhte Tumorzellanzahlen in der Lunge festgestellt werden. Der Ablauf einer EMT konnte durch eine Analytik der mRNA-Expression für Snail, Slug, Zeb1 und 2 sowie Vimentin und Fibronektin bewiesen werden.

Interessanterweise konnte beim Vergleich der EMT-Induktion ausgelöst durch entweder unbehandelte Thrombozyten, gewaschene und mit Thrombin aktivierte Thrombozyten oder durch den Überstand von mit Thrombin aktivierten Thrombozyten festgestellt werden, dass die EMT-Induktion aus zwei synergistischen Mechanismen resultierte. Einerseits erfolgte sie über sezerniertes, aktives TGF- β 1 bzw. den Granulainhalt der Thrombozyten via TGF- β 1/SMAD Signaltransduktion und andererseits durch den Kontakt zu aktivierten gewaschenen Thrombozyten. Welcher Rezeptor an der über den Kontakt vermittelten EMT-Induktion beteiligt war und ob es sich um Adhäsionsrezeptoren oder um an der Membran gebundene Faktoren handelt wurde nicht aufgeklärt. Jedoch konnten Labelle und Hynes präzisieren, dass aus dem Kontakt zwischen Thrombozyten und Tumorzellen eine Aktivierung des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors *nuclear factor kappa B* (NF- κ B) resultierte. Außerdem postulierten sie aufgrund der Tatsache, dass TGF- β 1 allein geringere mesenchymale Änderungen in ihrem Modell erzeugte, eine Abhängigkeit bzw. Verstärkung der TGF- β 1 induzierten EMT, durch die aus dem Kontakt mit aktivierten Thrombozyten induzierte NF- κ B-Signaltransduktion (190).

Eine ähnliche Verknüpfung zwischen den Signaltransduktion von TGF- β 1 und NF- κ B wurde bereits von Neil und Schiemann in anderem Kontext beschrieben, sie stellten fest, dass NF- κ B in Mechanismen involviert sein kann, die determinieren, ob TGF- β 1 als Tumorsuppressor oder als Tumorpromoter agiert (203).

Eine weitere, von Takemoto et al. durchgeführte Arbeit beschreibt eine EMT-Induktion in Blasenkarzinomzellen durch eine thrombozytäre Sekretion von TGF- β 1, welche aus der Aktivierung des thrombozytären Adhäsionsrezeptors CLEC-2 über Podoplanin resultierte. Ein wesentlicher Unterschied besteht darin, dass keine Beteiligung des Transkriptionsfaktors NF- κ B festgestellt werden konnte, obwohl der Kontakt entscheidend war (204). Zusätzlich soll erwähnt werden, dass eine Tumorzelle durch eine Podoplanin-Expression auch unabhängig von einer EMT eine Steigerung ihrer Invasivität erfahren kann (205). Hierzu erfolgt eine Reorganisation des Zytoskeletts, welche von Podoplanin durch eine

Phosphorylierung des Proteins Ezrin und einer Beeinflussung der RhoA-Aktivität vermittelt wird. Durch Podoplanin phosphoryliertes Ezrin kann prometastatische Effekte entfalten (206).

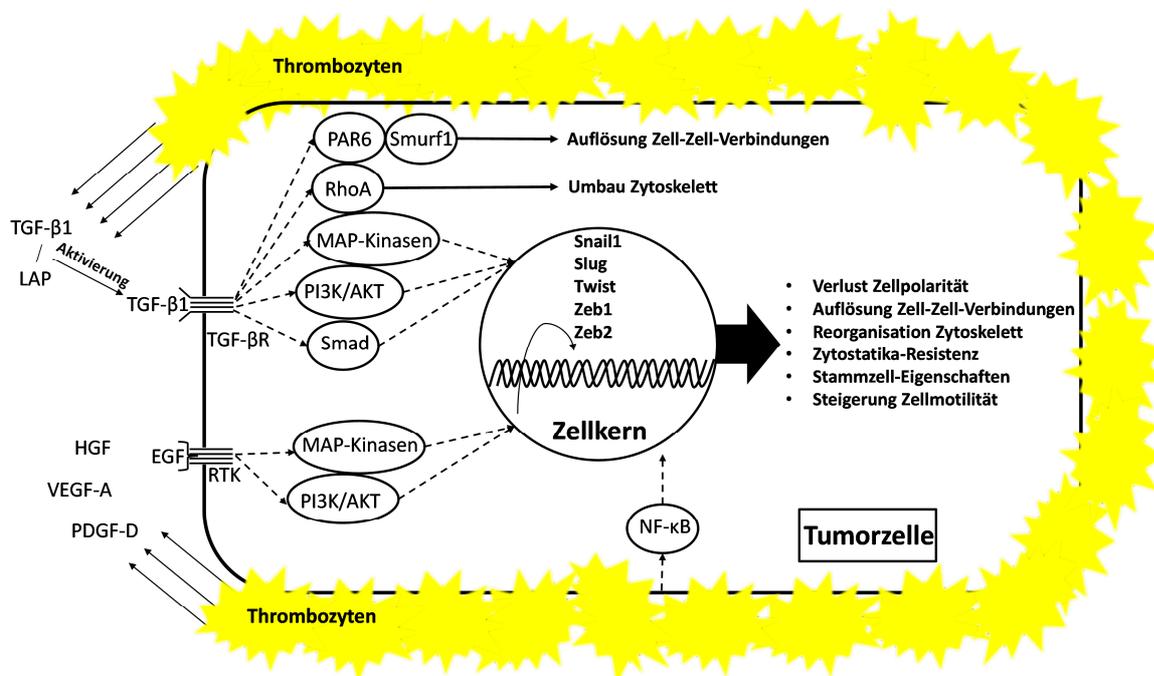


Abbildung 7: Simplifizierte Übersicht der EMT-Induktion durch aktivierte Thrombozyten via Granulasekretion und den direkten Kontakt zu Tumorzellen. Die Abbildung zeigt die Induktoren, die Signaltransduktion sowie morphologische Konsequenzen für die Tumorzellen (190,201,202).

Weitere Studien konnten die Verknüpfung der thrombozytären TGF-β1-Freisetzung mit einer EMT-Induktion in Tumorzellen demonstrieren. So konnte von Yu et al. anhand der Analyse zirkulierender Mammakarzinomzellen ein Anstieg der Aktivität von Signaltransduktionskaskaden festgestellt werden, die mit einer TGF-β1 vermittelten EMT-Induktion assoziiert sind. Es handelte sich überwiegend um Mammakarzinomzellen mit mesenchymalem Phänotyp (207). Außerdem zeigten Jia et al., im Gegensatz zu Hynes und Labelle, anhand von Kolonkarzinomzellen, dass eine EMT-Induktion auch durch die alleinige Koinkubation mit Überständen von via PAR-1 aktivierten Thrombozyten möglich sein kann (208).

Aufgrund der Variabilität der Resultate der beschriebenen Studien wird deutlich, dass die EMT-Induktion durch Thrombozyten ein komplexer Prozess ist. Dieser hängt in seinem Ablauf in hohem Maße davon ab, wie die Tumorzelle Thrombozyten aktivieren kann, und welche Noxen in der Tumorzelle eine EMT induzieren können bzw. welche Sensitivitäten sie besitzt.

2.4.2 Beitrag zur Bildung der prämetastatischen und metastatischen Nischen

Thrombozyten sind nicht nur an der Ausbildung eines prometastatischen Phänotyps der Tumorzellen durch die EMT-Induktion beteiligt, sondern auch an der Auswahl und Prägung einer geeigneten Lokalisation für die Bildung einer Metastase. Die bisherigen Ausführungen belegen, dass viele Abläufe der Metastasierung mitnichten zufällig sind, sondern reguliert werden. Auch die Lokalisation einer Metastase kann zum Beginn einer Metastasierung vom Primärtumor determiniert werden. Eine erste Hypothese zu dieser prämetastatischen Auswahl einer geeigneten Lokalisation bzw. eines Organs und der Vorbereitung auf das Wachstum einer Metastase wurde von Stephen Paget 1889 postuliert. Die sogenannte *seed and soil* Theorie besagt, dass der *seed* die disseminierende Tumorzelle auf ein geeignetes Gewebe den *soil* treffen muss um eine Metastase bilden zu können (209).

Seit 1889 wurde die Hypothese intensiv erforscht sowie kontrovers diskutiert und mehr als ein Jahrhundert später hat sich das Modell einer prämetastatischen und metastatischen Nische etabliert. Grundsätzlich beschreibt dieses, dass ein Primärtumor dazu befähigt ist, den Ort der Metastasierung auszuwählen und durch verschiedene Mechanismen für die Ansiedlung der metastasierenden Tumorzellen vorzubereiten. Diese Vorbereitung bzw. Entwicklung des *soil* manifestiert sich erst in der Ausbildung einer prämetastatischen Nische, die durch die Besiedlung mit disseminierenden Tumorzellen zu einer metastatischen Nische transformiert wird (19,210).

Die prämetastatische Nische beschreibt einen Gewebeabschnitt, der eine komplexe Komposition aus zellulären Bestandteilen, einer abweichenden EZM-Zusammensetzung und verschiedener bioaktiver Mediatoren enthält. So kann in prämetastatischen Nischen z. B. eine Akkumulation von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, Fibroblasten, mesenchymaler Stammzellen sowie verschiedener dem Knochenmark entstammender Progenitorzellen stattfinden (211,212). Die Veränderungen der extrazellulären Matrix resultieren teilweise aus der Anwesenheit bzw. der hohen Aktivität dieser Zellen. Es werden entweder neue Komponenten der EZM gebildet oder bestehende umgebaut. So kann eine Aktivierung von Fibroblasten eine stark gesteigerte Fibronektinbildung zur Folge haben. Ebenso kann durch eine Expression von MMP-9 ein enzymatischer Umbau der EZM verursacht werden (63). Weiterhin treten in prämetastatischen Nischen erhöhte Konzentrationen an Chemokinen wie z. B. CXCL12 (SDF-1), Interleukinen, Proteasen und Wachstumsfaktoren wie VEGF auf (211).

Als initialisierender Mechanismus für die Bildung einer prämetastatischen Nische wird die gerichtete Induktion einer Fibronectinbildung in der Nähe der zukünftigen prämetastatischen Nische erachtet. Diese Induktion resultiert aus der sekretorischen Aktivität des Primärtumors. Fibronectin ist ein Ligand des Integrins $\alpha_4\beta_1$ (*very late antigen 4*), somit resultiert aus der Fibronectinbildung eine Akkumulation von Integrin $\alpha_4\beta_1$ exprimierenden Zellen. Zu diesen zählen VEGF-Rezeptor-1 (VEGFR1) exprimierende und dem Knochenmark entstammende Progenitorzellen. Weiterhin konnten Lyden et al. zeigen, dass Kulturmedien von verschiedenen Tumorzelllinien an unterschiedlichen Lokalisationen in Mäusen Akkumulationen von Fibronectin und den VEGFR1 exprimierenden Progenitorzellen hervorriefen. So akkumulierten diese in mit LLC-Medium behandelten Mäusen in der Lunge, und bei Mäusen, die mit Melanomzell-Medium behandelt wurden, in den Nieren, der Milz und dem Darm. Eine antikörpervermittelte Inhibition des VEGFR1 oder des Integrins $\alpha_4\beta_1$ reduzierte das Auftreten von prämetastatischen Nischen (63). Die Prozesse und Interaktionen zwischen den in der prämetastatischen Nische präsenten Zellen sind komplex und weiterhin Gegenstand der Forschung. Im Kontext der Betrachtung der Tumorzell-Thrombozyt-Interaktion soll evaluiert werden, welchen Anteil Thrombozyten an der Entstehung der prämetastatischen Nische haben.

Ein Primärtumor kann die Ausbildung der prämetastatischen Nische u. a. durch die Freisetzung von prokoagulativen Mikropartikeln, die TF enthalten, beeinflussen und so die Blutgerinnungskaskade in den Nischen anstoßen. Das gebildete Thrombin aktiviert die angrenzenden Endothelzellen und Thrombozyten (213). Somit können bereits vor der Besiedlung der prämetastatischen Nische aktivierte Thrombozyten in der Nische auftreten. Zusätzlich konnte von Gil-Bernabe et al. am Beispiel von Melanomzellen gezeigt werden, dass die Migration von Makrophagen hin zu einer prämetastatischen Nische abhängig von einer funktionsfähigen Koagulation ist (214).

Weiterhin können aktivierte Thrombozyten durch die Sekretion ihrer Granula bzw. von VEGF weitere die Nischenbildung begünstigende Effekte hervorrufen (191). So ist eine Stimulation der initialen VEGFR1 exprimierenden, dem Knochenmark entstammenden Progenitorzellen in der Nische denkbar, welche sich in einer Steigerung einer MMP-9-Expression manifestieren kann (215). Zudem könnte thrombozytäres VEGF in dieser Art und Weise auch in die Angiogenese am Ort der prämetastatischen Nische involviert sein und diese z. B. fördern. Eine allgemeine Beteiligung der Thrombozyten an der mit dem Tumor assoziierten

Angiogenese wurde bereits von Folkman et al. postuliert und von Battinelli et al. evaluiert (191,216,217). Zusätzlich kann VEGF die Permeabilität des Endothels erhöhen. So würde eine Freisetzung von VEGF in der Nische möglicherweise die Extravasation verschiedener Zellen aus dem Blut erleichtern und Faktoren aus den thrombozytären Granula wie z. B. Chemokinen den Austritt ermöglichen (64).

Eine weitere Beteiligung von Thrombozyten bzw. ihrer Granulasekretion wurde von Hynes et al. beschrieben. Sie demonstrierten die Formierung einer frühen prämetastatischen Nische durch die Freisetzung der Chemokine CXCL5 und 7 aus den Granula der mit Tumorzellen aggregierten Thrombozyten. Die Chemokinfreisetzung war in ihrem Modell mit LLC und Kolonkarzinomzellen notwendig für die Ausübung einer Chemotaxis auf neutrophile Granulozyten, welche wiederum eine Voraussetzung für eine erfolgreiche Metastasierung in die Lunge waren. Somit sind aktivierte Thrombozyten auch in der Lage, neutrophile Granulozyten zur prämetastatischen und metastatischen Nische zu rekrutieren (218).

Darüber hinaus können die Aggregate aus Thrombozyten und Tumorzellen Endothelzellen aktivieren, welche ihrerseits CCL5 freisetzen und so eine Chemotaxis für Monozyten, der Vorstufe von Makrophagen, aufbauen und diese zur metastatischen Nische rekrutieren. Läubli et al. stellten fest, dass in ihrem Modell die mit Kolonkarzinomzellen aggregierten Thrombozyten essentiell für die Endothelzellaktivierung waren (60). Außerdem können Thrombozyten nach einer Aktivierung ebenfalls CCL5 freisetzen (219).

Abschließend wird der Einfluss von Thrombozyten auf die Bildung von Knochenmetastasen durch Prostatakarzinome betrachtet. Von Kerr et al. wurde gezeigt, dass im Vorfeld einer Knochenmetastasierung von einem Prostatakarzinom ein Knochenumbau stattfindet. Wurden in diesem Modell 90 % der Thrombozyten unter Verwendung von Antikörpern entfernt, war der beschriebene Knochenumbau nicht mehr festzustellen. Betrachtet man den Knochenumbau als eine prämetastatische Nische, kann man postulieren, dass Thrombozyten direkt an ihrer Ausbildung beteiligt sind. Weiterhin stellten Kerr et al. fest, dass Thrombozyten in Mäusen mit Implantaten aus humanen Tumorzellen, auch humane dem Tumor entstammende Mediatoren enthielten. Somit fungierten die Thrombozyten als Signalvermittler bzw. Transporter für tumorale, die Bildung einer prämetastatischen Nische fördernde, Signale (220).

Thrombozyten sind also in verschiedenen Ebenen an der Entstehung der prämetastatischen und metastatischen Nische beteiligt.

2.4.3 Unterstützung der Extravasation

Nach dem Eintritt der Tumorzelle in ein Blutgefäß und dem ersten Kontakt mit Blut bilden sich im Zuge der TCIPA Aggregate aus Tumorzellen, Thrombozyten sowie Leukozyten und diese werden im Organismus verteilt (43–47,221). Im Anschluss an die Dissemination der entarteten Zelle muss sie am Ort der prämetastatischen Nische das Blutgefäßsystem wieder verlassen. Dieser Prozess wird Extravasation genannt und ist teilweise aufgeklärt. Er beginnt mit einer instabilen selektinvermittelten Endothelbindung, gefolgt von einer stabilen von Integrinen getragenen Adhäsion der Tumorzellen an das Endothel. Daraufhin erfolgen eine endotheliale Retraktion sowie eine transendotheliale Migration mit Überwindung der Basalmembran. Der exakte Ablauf der Extravasation ist in hohem Maße abhängig von der Morphologie der Tumorzelle und vom Ort der Extravasation, Abweichungen des beschriebenen Ablaufes sind möglich (222).

Thrombozyten können diesen Prozess unterstützen. In Bezug auf das auf Thrombozyten lokalisierte Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ konnte festgestellt werden, dass es die direkte Adhäsion an Endothelzellen vermitteln kann (223). Ein weiterer thrombozytärer Rezeptor, der an einer direkten Adhäsion beteiligt sein kann, ist das P-Selektin. Es wird in Folge der TCIPA aus den α -Granula an die thrombozytäre Oberfläche verlagert und dort präsentiert. Die Funktion von P-Selektin während einer endothelialen Adhäsion ist die Aufnahme einer ersten Bindung, es vermittelt das sogenannte *tethering* und *rolling* der Aggregate auf Endothelzellen (224,225). Die Bedeutung der beiden thrombozytären Adhäsionsrezeptoren P-Selektin und Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ für die endotheliale Adhäsion wurde von Dardik et al. präzisiert. Sie reduzierten die Adhäsion von Melanomzellen entweder durch eine Entfernung von Thrombozyten oder durch eine Blockade der beiden Rezeptoren (226).

Die notwendige räumliche Nähe von Thrombozyten und Tumorzellen wird durch die Bildung der Aggregate erzeugt (48). Die Bindung von Tumorzellen und Thrombozyten wird u. a. vermittelt von dem auf Thrombozyten lokalisierten Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ und dem auf Tumorzellen lokalisierten Integrin $\alpha_v\beta_3$. Zwischen beiden erfolgt eine Verknüpfung über Fibrinogen (103). Das Integrin $\alpha_v\beta_3$ wurde bereits im Abschnitt zur Induktion einer Thrombozytenaktivierung durch Kontakt beschrieben. Es ist in geringer Dichte auf Thrombozyten lokalisiert und kann in hoher Dichte auf Tumorzellen vorkommen. Fielding et al. konnten in Experimenten an Mammakarzinomzellen zur transendothelialen Migration zeigen, dass die Migration der Tumorzellen signifikant gesteigert wurde, wenn sie aktiviertes hochaffines Integrin $\alpha_v\beta_3$

exprimierten. Außerdem konnte demonstriert werden, dass die Anwesenheit von Thrombozyten mit funktionierenden α -Granula unabdingbar für eine erfolgreiche transendotheliale Migration war. Wurden Thrombozyten mit leeren α -Granula eingesetzt, konnte keine transendotheliale Migration mehr detektiert werden. Erfolgte im Experiment eine zusätzliche Aktivierung der Thrombozyten mit gefüllter α -Granula via PAR-1, so konnte die Anzahl der migrierten Zellen gesteigert werden (227).

Thrombozyten und insbesondere die in den α -Granula gespeicherten Mediatoren beeinflussen weitere Aspekte der Extravasation. Eine VEGF-Sekretion steigert die Permeabilität des Endothels und kann so z. B. die transendotheliale Migration von Mammakarzinomzellen im *in vitro* Modell erleichtern (64). Ebenso kann eine Freisetzung der Lysophosphatidylsäure (LPA) die Permeabilität regulieren. Indes muss erwähnt werden, dass in Abhängigkeit der Endothelzellen bezüglich LPA steigernde (HUVEC-Zellen) und reduzierende (EA.hy926-Zellen) Effekte ermittelt wurden (228–230). Ursachen dieser Unterschiede können in der Verschiedenheit der Endothelzellen begründet sein. Weiterhin konnte eine die Permeabilität steigernde Wirkung von durch Thrombozyten freigesetztes ATP von Schumacher et al. bewiesen werden. Anhand einer Betrachtung der transendothelialen Migration von Melanomzellen wurde gezeigt, dass Melanomzellen eine thrombozytäre ATP-Freisetzung induzieren. ATP aktivierte auf den Endothelzellen lokalisierte P2Y₂-Rezeptoren, wodurch eine Erhöhung der Permeabilität herbeigeführt werden konnte (231).

Zusätzlich zur Erhöhung der Permeabilität überschneidet sich eine weitere Facette der Extravasation gewissermaßen mit Aspekten der Bildung prämetastatischer Nischen. Es handelt sich um die Rekrutierung von Zellen bzw. Monozyten. Von Läubli et. al. konnte gezeigt werden, dass eine Endothelzellaktivierung, einhergehend mit einer endothelialen CCL5-Freisetzung und E-Selektin-Expression, von der Anwesenheit von Thrombozyten und P-Selektin abhängen kann. Die durch CCL5 verursachte Chemotaxis für Monozyten rekrutierte diese zum Ort der Extravasation (60). Dort können sie, wie am Beispiel von Mammakarzinomzellen gezeigt wurde, die Adhäsion der Tumorzellen zusätzlich verstärken (232). Eine Antagonisierung des CCL5-Rezeptors konnte die Metastasierung von Kolonkarzinomzellen reduzieren (60).

Abschließend sollen noch Effekte von, aus der aktiven Blutgerinnungskaskade resultierendem, Thrombin auf das Endothel betrachtet werden. Thrombin kann

Endothelzellen über die Spaltung der PAR-1 und -4 Rezeptoren stimulieren (233). Infolgedessen können Endothelzellen vermehrt Adhäsionsrezeptoren wie z. B. das *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) und das *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) exprimieren, welche eine Bindung zu Monozyten vermitteln (234). Darüber hinaus steigert Thrombin die Permeabilität des Endothels (235).

Abschließend ist zu erwähnen, dass das Ausmaß der Beteiligung von Thrombozyten an der Extravasation in Abhängigkeit der Charakteristika der metastasierenden Tumorzelle differiert.

2.5 Antikoagulantien

Nachdem die Aktivierung der Thrombozyten durch Tumorzellen und die Konsequenzen dieser für die Metastasierung beleuchtet wurden, wird sich dieser Abschnitt mit Antikoagulantien befassen, welche zur Prävention thromboembolischer Komplikationen, als Standardtherapie bei onkologischen Patienten eingesetzt werden. Im Zuge der häufigen Verwendung und langen Präsenz im Markt wurden Antikoagulantien intensiv erforscht, und es stellte sich insbesondere bezüglich der Klasse der Heparine heraus, dass sie zusätzliche pharmakologische Effekte entfalten können. Diese Effekte besitzen das Potential, die Inzidenz der hämatologischen Metastasierung zu reduzieren.

2.5.1 Antikoagulantien in der Onkologie

Die Notwendigkeit einer präventiven Antikoagulation in der Onkologie zeigte eine Studie von Khorana et al., welche 4466 Patienten einschloss. In dieser wurde gezeigt, dass Thromboembolien zusammen mit Infektionen die zweithäufigsten Todesursachen während einer malignen Erkrankung sind (236). Zusätzlich wird der Bedarf einer konsequenten antikoagulativen Therapie von onkologischen Patienten aus den bisherigen Ausführungen ersichtlich. Denn die Interaktionen zwischen Thrombozyten, der Blutgerinnungskaskade und Tumorzellen können sich nicht nur in einer Förderung der Metastasierung manifestieren, sondern auch in einer Steigerung der Inzidenz thromboembolischer Ereignisse wie z. B. venöser Thromboembolien sowie Lungenembolien. Ursachen der starken Gerinnungsaktivierung können z. B. die tumorale Freisetzung von CP oder Mikropartikeln sein (68,70,213). Prokoagulative Effekte können ebenso aus dem Eintritt TF-exprimierender

Tumorzellen in Blutgefäße und aus der folgenden TCIPA resultieren (45,66). Zusätzlich ist die Immobilisation von schwerkranken Patienten als ein Faktor zu verstehen, der das Risiko für thromboembolische Komplikationen erhöht.

Das Risiko kann dabei bis zu 4,1-fach durch die maligne Erkrankung erhöht werden und bis zu 6,5-fach durch die Chemotherapie (237). Unter Miteinbeziehung der Prävalenz der verschiedenen Tumorentitäten sind Tumore der Lunge mit 25,6 %, des Pankreas mit 17,4 %, des Magens mit 16,8 % und des Kolons mit 15,2 % die Entitäten, welche die höchsten Raten für das Auftreten thromboembolischer Ereignisse aufweisen (238,239).

Zur Prävention von thromboembolischen Komplikationen werden verschiedene Klassen von Antikoagulantien evidenzbasiert eingesetzt. Es können Heparine, direkte orale Antikoagulantien (DOAKs) und Vitamin-K Antagonisten verwendet werden (240). Tabelle 1 bietet einen Überblick der verwendeten Wirkstoffe.

Tabelle 1: Übersicht der antikoagulativen Wirkstoffe (240–242).

Heparin			Vitamin-K Antagonisten	DOAKs
unfraktioniert	niedermolekular	Pentasaccharid		
•Heparin	•Tinzaparin •Dalteparin •Nadroparin •Ardeparin •Reviparin •Enoxaparin	•Fondaparinux	•Phenprocoumon •Warfarin	•Apixaban •Rivaroxaban •Edoxaban •Dabigatran

Die Therapie und Prävention thromboembolischer Ereignisse im Kontext einer malignen Erkrankung unterscheidet sich von anderen Erkrankungen. Zur Steigerung der Evidenz und Ermittlung der besten Therapeutika in Bezug auf Sicherheit, Wirksamkeit und Unbedenklichkeit wurden mehrere klinische Studien durchgeführt. So konnten die idealen Therapeutika ermittelt werden. Es konnte eine Überlegenheit der niedermolekularen Heparine (LMWH) in der CLOT-(Dalteparin) und CATCH-Studie (Tinzaparin) für den Endpunkt das Auftreten venöser und tiefer Beinvenenthrombosen bewiesen werden. Vitamin-K Antagonisten (VKA) besitzen eine geringere Wirksamkeit in der Indikation (243–245). Begleitet wird die geringere Wirksamkeit von der Notwendigkeit eines Monitorings der *international normalized ratio-values* (INR-Werte) um einen Patienten optimal

einzustellen (246). Somit fanden die niedermolekularen Heparine ihren Platz in zahlreichen Leitlinien als *first line* Therapeutika (247–249).

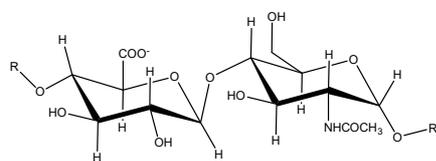
Da der Stellenwert der DOAKs in der Therapie der Thromboembolie dem der Heparine inzwischen gleichwertig ist, bzw. möglicherweise eine Überlegenheit aufgrund der Anwenderfreundlichkeit vorliegt, wurden diese auch in der betrachteten Indikation getestet. Die Studie, welche erste belastbare Ergebnisse zur Wirksamkeit der DOAKs generierte, war die Hokusai *VTE Cancer study*, welche 1046 Probanden umfasste. Es wurden Dalteparin und Edoxaban verglichen, in Bezug auf den Endpunkt des erneuten Auftretens einer venösen Thromboembolie und einer schweren Blutung. Beide Antikoagulantien wurden hinsichtlich der Prävention einer venösen Thromboembolie als gleichwertig evaluiert. Ein Unterschied bestand darin, dass unter der Therapie mit Edoxaban etwas häufiger schwere Blutungen auftraten (250). Die Verwendung der DOAKs in der Prävention thromboembolischer Ereignisse in Krebspatienten nimmt zu und sie werden vermehrt in Leitlinien aufgenommen (251). Unter den LMWH werden Dalteparin, Enoxaparin und Tinzaparin häufiger eingesetzt (252).

Selbstverständlich muss bei der Auswahl eines geeigneten Blutgerinnungshemmers auch der individuelle Patient und sein Zustand berücksichtigt werden. Offensichtlich muss zum Beispiel auf die mit einer Chemotherapie verbundene Nausea und Emesis Rücksicht genommen werden. Was die Entscheidung des Therapeuten eher hin zu einer subcutanen LMWH Verwendung beeinflussen würde. Zusätzlich müssen weitere Parameter wie Tumorlokalisation, Nierenfunktion und potentielle Arzneimittel-Interaktionen berücksichtigt werden (253).

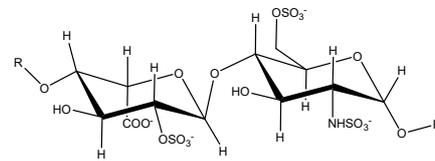
Abschließend soll noch der klinische Alltag betrachtet werden. Khorana et al. analysierten basierend auf Versicherungsdaten die tatsächliche Anwendung von verschiedenen Antikoagulantien zur Therapie bei neuerkrankten Krebspatienten. Es zeigte sich unter 2941 Patienten eine prozentuale Verteilung der Anwendung der Therapeutika von 25 % LMWH, 47,7 % Warfarin und 24,1 % Rivaroxaban (254).

2.5.2 Heparine

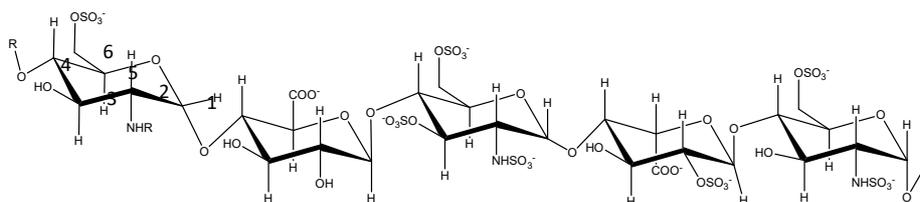
Heparine sind polysulfatierte Glykosaminoglykane, die aus Schweinedarm isoliert, gereinigt und gegebenenfalls gespalten und fraktioniert werden. Abhängig von ihrer mittleren Molekülmasse werden unfraktionierte (höhermolekulare) Heparine (UFH) und fraktionierte niedermolekulare Heparine (LMWH) unterschieden. Heparine bestehen aus linearen Ketten, welche wiederum aus sich wiederholenden Disaccharideinheiten bestehen. Die Einheiten sind aufgebaut aus Glukosamin (GlcN) und Glukuronsäure (GlcA) oder Iduronsäure (IdoA), dem Epimer der Glukuronsäure. Die Disaccharide sind über eine α -1-4-Bindung miteinander verknüpft. Als Modifikationen der Disaccharide sind eine Deacetylierung und eine Sulfonierung am Stickstoffatom des Glukosamins, eine Sulfonierung am Sauerstoffatom des Kohlenstoffatoms 2 der Uronsäuren oder eine Sulfonierung am Sauerstoffatom am Kohlenstoffatom 3 oder 6 des Glukosamins möglich. Im Vergleich zu Heparansulfaten dominiert in Heparinen die Iduronsäure und der Grad der Sulfatierung ist höher. Darüber hinaus besitzen Heparine eine vergleichsweise große negative Ladung und haben eine hoch flexible Konformation (256,257). Im Folgenden werden einige Heparine vorgestellt.



Überwiegende Einheit in Heparansulfat
 $[-4]-\beta$ -D-GlcA-(1 \rightarrow 4)- α -D-GlcNAC-(1-]



Überwiegende Einheit in Heparin (70% in Heparin vorhanden)
 $[-4]-\alpha$ -L-IdoA(2 SO₃⁻)-(1 \rightarrow 4)- α -D-GlcNSO₃⁻(6 SO₃⁻)-(1-]



Pentasaccharid aus Heparin, kleinste pharmakologisch wirksame Einheit mit hoher Affinität für Antithrombin III [R=COCH₃/SO₃⁻]
 $[-4]-\alpha$ -D-GlcNAC(6 SO₃⁻)-(1 \rightarrow 4)- α -D-GlcA-(1 \rightarrow 4)- α -D-GlcNSO₃⁻(3,6 di SO₃⁻)-(1 \rightarrow 4)- α -L-IdoA(2 SO₃⁻)-(1 \rightarrow 4)- α -D-GlcNSO₃⁻(6 SO₃⁻)-(1-]

Abbildung 8: Darstellung von Einheiten der Heparinstruktur. Im oberen Teil sind zwei Disaccharide aus Heparansulfat (links) und Heparin (rechts) gezeigt und im unteren Abschnitt das pharmakologisch wirksame Pentasaccharid aus Heparin.

Modifiziert nach Grey et al. (255).

Unfraktioniertes Heparin (UFH) zeichnet sich durch eine hohe Molekülmasse von 15.000 Da aus. Das Molekül ist stark negativ geladen und kann deshalb verschiedene Proteine binden und deren Aktivität modulieren. Heparin steigert durch die Bindung von Antithrombin III dessen Aktivität um das 700-fache. Da die physiologische Funktion von Antithrombin III die

Gerinnungshemmung durch die Inhibition der Serinproteasen bzw. Gerinnungsfaktoren XIIa, XIa, Xa, VIIa und IIa (Thrombin) ist, fungiert UFH als Antikoagulans (256,258).

Durch die chemische oder enzymatische Modifikation von UFH können niedermolekulare Heparine gewonnen werden. Diese werden u. a. repräsentiert durch Enoxaparin und Tinzaparin. Das mittlere Molekulargewicht von Enoxaparin beträgt 4.500 Dalton. Die Herstellung erfolgt durch eine alkalische Depolymerisation von Heparin-Benzylestern. Die Struktur wird definiert durch eine 2-O-Sulfo-4-enpyranosuronsäure-Gruppe am nichtreduzierenden Ende und einen 2-N,6-O-Disulfo-D-glukosamin-Rest am reduzierenden Ende der Kette, im Mittel enthalten 20 % der Struktur ein 1,6-Anhydro-Derivat am reduzierenden Ende der Polysaccharidkette. Enoxaparin vermittelt die antikoagulativen Effekte auch via Bindung von Antithrombin III und einer Steigerung von dessen Aktivität. Die Gerinnungshemmung erfolgt somit indirekt über Antithrombin III, durch Inhibition der Gerinnungsfaktoren Xa, IIa und VIIa, mit einer vergleichsweise hohen Affinität für Faktor Xa. Das Verhältnis der Faktor Xa-Inhibition zur Faktor IIa-Inhibition beträgt im Mittel 4,3 zu Gunsten von Faktor Xa. (259).

Tinzaparin ist größer als Enoxaparin, sein mittleres Molekulargewicht liegt bei 6.500 Dalton. Es wird durch enzymatische Depolymerisation aus unfraktioniertem Heparin hergestellt. Es inhibiert Antithrombin III abhängig die Gerinnungsfaktoren Xa und IIa, mit einer höheren Affinität für Faktor Xa. Das Verhältnis der Faktor Xa-Inhibition zur Faktor IIa-Inhibition liegt zwischen 1,5 und 2,5 ebenfalls zu Gunsten von Faktor Xa (260,261).

Heparine können chemisch so modifiziert werden, dass ihre antikoagulativen Eigenschaften abgeschwächt werden, bei einem Erhalt der Heparinstruktur und den daraus resultierenden potentiellen Interaktionen mit Proteinstrukturen. Durch eine Oxidation mit Periodat und einer anschließenden Reduktion durch Borhydrid kann reduziertes Oxyheparin erzeugt werden. (262,263).

Abschließend soll noch Fondaparinux erwähnt werden. Es handelt sich um einen synthetisch hergestellten indirekten selektiven Faktor Xa-Inhibitor. Die Struktur entspricht der kleinsten noch pharmakologisch wirksamen Zuckereinheit im Heparin. Sie besteht aus einem polysulfatierten Pentasaccharid, welches sich aus drei D-Glukosaminen, einer D-Glukuronsäure und einer L-Iduronsäure zusammensetzt. Die Wirkung wird indirekt über Antithrombin III vermittelt (264–266).

2.5.3 Direkte orale Antikoagulantien

Es gibt die drei Wirkstoffe Edoxaban, Rivaroxaban und Apixaban, welche eine direkte orale Faktor Xa-Inhibition verursachen und einen direkten oralen Thrombin-Inhibitor, den Wirkstoff Dabigatran. Sie wirken alle Antithrombin III-unabhängig durch Blockade des aktiven Zentrums des entsprechenden Enzyms. Da sowohl Faktor Xa als auch Thrombin Serinproteasen sind, werden die verschiedenen Inhibitoren auch als Serinproteaseinhibitoren bzw. Serpine bezeichnet (267–270).

Diese Klasse der Antikoagulantien wird u. a. repräsentiert durch Rivaroxaban, das zur Gruppe der Oxazolidinone gehört. Es handelt sich um ein kleines Molekül, welches nach enteraler Resorption den Gerinnungsfaktor Xa inhibiert. Die Inhibition verläuft selektiv und Antithrombin III-unabhängig (271,272).

2.5.4 Antimetastatische Effekte von Heparinen

Bisher wurden Heparine als Antikoagulantien zur Therapie und Prävention thromboembolischer Ereignisse im Kontext von Krebserkrankungen vorgestellt. Jedoch konnten in verschiedenen Tiermodellen zusätzlich zur antikoagulativen Wirkung der Heparine auch antimetastatische Effekte festgestellt werden. Die antimetastatische Wirksamkeit wurde überwiegend anhand der Bildung von Lungenmetastasen quantifiziert (273–275). Im orthotopen Tumormodell konnte festgestellt werden, dass nur die Metastasierung und nicht das Wachstum des Primärtumors abgeschwächt bzw. inhibiert wird (276).

Zur Bestimmung eines antimetastatischen Wirkmechanismus wurde von Szende et al. ein wichtiger Beitrag erbracht. Ihnen gelang die Demonstration einer Abhängigkeit der antimetastatischen Wirksamkeit vom Injektionszeitpunkt eines LMWH, relativ zum Zeitpunkt der Tumorzellinjektion. Die Injektionen von Heparin und Tumorzellen erfolgten beide intravenös mit einem Abstand von einer Stunde. Wurde der Abstand vergrößert auf z. B. sechs Stunden entfiel die Signifikanz der antimetastatischen Effekte. Somit könnte der Ursprung der antimetastatischen Wirksamkeit im Beginn der metastatischen Kaskade lokalisiert werden (277). Die Effekte blieben erhalten, wenn die Dosis so adaptiert wurde, dass sie einer humanen therapeutischen Dosis entsprach (278). Bisher wurden verschiedene antimetastatische Wirkmechanismen von Heparinen beschrieben diese werden im Folgenden erläutert.

Heparine setzen bei Kontakt mit Endothelzellen aus diesen *tissue-factor-pathway-inhibitor* (TFPI) frei, welcher die antikoagulativen Effekte via Inhibition der aktivierten Gerinnungsfaktoren Xa und VIIa verstärkt (279,280). Da eine TF-Expression bei vielen Tumorentitäten bewiesen wurde, kann durch den TFPI eine effizientere Hemmung der Tumorzell-induzierten Thrombinbildung erreicht werden (66,68,281,282). Somit wirkt der TFPI theoretisch hemmend auf eine Thrombinbildung und somit auf prometastatische Effekte, die aus einer Thrombinbildung resultieren, wie z. B. eine Thrombozytenaktivierung via PAR-1 und -4.

Zudem kann TF auch koagulationsunabhängig in prometastatische Prozesse involviert sein. Eine Beteiligung an der Induktion der Angiogenese durch eine Aktivierung von Endothelzellen via PAR-2, mit einer Beteiligung von Faktor VIIa, ist beschrieben worden (283). Auch hier kann der TFPI inhibierend einwirken. Schließlich wurde, durch eine Arbeit von Amirkhosravi et al., eine Einordnung der Bedeutung des TFPI möglich. Sie verglichen Enoxaparin mit einem nicht antikoagulativ wirksamen LMWH, welches TFPI freisetzen konnte, hinsichtlich des Auftretens von Lungenmetastasen. Das modifizierte LMWH und Enoxaparin unterschieden sich kaum in ihrer Wirksamkeit bzw. in der Reduktion der Lungenmetastasenanzahl (284).

Ein weiterer antimetastatischer Mechanismus ist die Inhibition der Endoglykosidase Heparanase, welche die Spaltung von Heparansulfaten bzw. Heparansulfat-Proteoglykanen katalysiert. Diese sind Bestandteile der EZM und insbesondere der Basalmembran sowie der externen Zellmembran. Heparansulfate vermitteln Interaktionen der Zellen mit der EZM und mit anderen Zellen (285). Außerdem können sie eine große Anzahl verschiedener Proteine wie z. B. Enzyme, Zytokine, Wachstumsfaktoren und Lipoproteine binden. Die Proteinbindung wird überwiegend über ionische Wechselwirkungen zwischen den anionischen Gruppen der Heparansulfate und positiv geladenen Aminosäuren vermittelt (286). Heparansulfate können so die Funktion eines Depots bzw. Speichers haben. Erfolgt dann eine Spaltung durch Heparanase, werden direkt große Mengen des gebundenen Moleküls freigesetzt und z. B. eine Angiogenese induziert (287). Tumorzellen können, je nach Entität, Heparanase synthetisieren und freisetzen, was mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist (285,288). Sie können so einerseits die von den Heparansulfaten gebundenen Moleküle freisetzen und andererseits den Abbau der EZM bzw. der Basalmembran vorantreiben, wodurch die Invasivität eines Tumors gesteigert wird (289). Heparine können

aufgrund ihrer zu den Heparansulfaten ähnlichen polyanionischen Struktur die Heparanase inhibieren (290,291).

Abschließend kann zur Einordnung der Bedeutung der Heparanase für die Metastasierung eine Arbeit von Edovitsky et al. herangezogen werden. In dieser konnte durch den *Knockdown* der Heparanase in Mammakarzinom- und Melanomzellen die Angiogenese und Metastasierung reduziert werden (292).

Weiterhin beeinflussen Heparine auch die Funktionalität von L- und P-Selektinen, P-Selektin wurden bereits im Abschnitt 2.2.2 vorgestellt. Beide Selektine sind Adhäsionsrezeptoren, welche im Kontext einer hämatogenen Metastasierung die Adhäsion zwischen Thrombozyten (P-Selektin), Leukozyten (L-Selektin), Endothelzellen (P- und E-Selektin) und Tumorzellen vermitteln können (293,294). Tumorzellen können dazu befähigt sein, Selektinliganden in Form von Mucinen bzw. Proteoglykanen zu exprimieren und zu sezernieren. Diese enthalten je nach Zusammensetzung sialylierte, fucosylierte oder sulfatierte Glykane, welche als Liganden für P-, L- und E-Selektin fungieren können (295). Darüber hinaus können Tumorzellen eine abgewandelte Glykosylierung bzw. ein abgewandeltes *glycome* aufweisen, in dem z. B. durch die gesteigerte Aktivität von Fucosyltransferasen und Sialyltransferasen hohe Dichten von Selektinliganden vorkommen (293).

P-Selektine vermitteln in den Heteroaggregaten aus Thrombozyten, Tumorzellen und Leukozyten adhäsive und kohäsive Wechselwirkungen. Sie sind somit an der Bildung und Stabilisierung dieser Aggregate beteiligt (43,118,296). Wahrenbrock et al. konnten demonstrieren, dass die alleinige Injektion von, aus Kolonkarzinomzellen isolierten Mucinen in Mäusen eine ausgiebige selektinabhängige Thrombozytenaggregation auslöste (297). Zudem konnte am Beispiel von Prostatakarzinom-Patienten gezeigt werden, dass eine tumorale Expression von Selektinliganden mit einer schlechteren Prognose assoziiert war (298). Dementsprechend wiesen Kim et al. nach, dass ein *Knockdown* von P-Selektin zu einer Reduktion der Metastasenbildung und der Adhäsion zwischen Thrombozyten und Kolonkarzinomzellen führte (118).

In Bezug auf L-Selektin demonstrierten Borsig et al., dass eine weitere Reduktion der Metastasenbildung erreicht werden konnte, wenn zusätzlich zu P-Selektin auch L-Selektin in Mäusen genetisch depletiert wurde (299). Stevenson et al. zeigten anhand von Melanomzellen, dass UFH und Tinzaparin effektiv eine Reduktion der

Lungenmetastasenanzahl durch eine Selektininhibition herbeiführten (278). Eine Inhibition der Aggregatbildung bzw. der Interaktion von Thrombozyten und Tumorzellen durch eine Hemmung von Selektinen, hat vermutlich Auswirkungen auf Effekte die aus dieser Interaktion erwachsen. Denkbar ist eine bessere Immunabwehr gegenüber Tumorzellen durch NK-Zellen, durch das Wegfallen der via Selektinen gebundenen schützenden Thrombozyten (16,300). Die inhibitorischen Effekte von Heparinen auf P- und L-Selektin konnten mehrfach eindrucksvoll demonstriert werden (278,301,302).

Schlesinger et al. erbrachten am Beispiel von Melanomzellen den Beweis, dass das LMWH Tinzaparin Einfluss auf die Metastasierung über die Inhibition des *very late antigen-4* (VLA-4) nehmen kann (303). VLA-4 wird unter physiologischen Bedingungen von verschiedenen Leukozyten exprimiert (304). Es kann aber auch auf Tumorzellen vorkommen und im Zuge einer hämatogenen Metastasierung eine endotheliale Adhäsion durch Bindung von endotheliale VCAM-1 vermitteln (305). Tinzaparin hemmte die VLA-4 vermittelte Adhäsion durch die Inhibition des *cysteine-rich protein 61* (Cyr61), welches an der Aktivierung von VLA-4 beteiligt ist (306). Zudem konnte anhand von Prostatakarzinomzellen gezeigt werden, dass eine Cyr61-Expression mit einer starken zellulären Migration assoziiert ist (307). In der gleichen Prostatakarzinomzelllinie offenbarte sich eine Beteiligung von Cyr61 an der Zellproliferation, ein Knockdown resultierte somit in einer Inhibition der Proliferation (308).

Ein weiterer antimetastatischer Effekt des LMWHs Tinzaparins beschreibt einen Einfluss auf die Genaktivität. Von Pfankuchen et al. wurde anhand zweier nahezu identischer Ovarialkarzinomzelllinien, die sich nur in ihrer Cisplatinresistenz unterschieden, demonstriert, dass Tinzaparin via Interaktionen mit Heparansulfat-Proteoglykanen die Genaktivität modulieren kann. Das Resultat dieser Modulationen war eine Reduktion der Cisplatinresistenz (309).

Außerdem besitzen Heparine in Abhängigkeit ihrer Größe das Potential, aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu Heparansulfaten, Wachstumsfaktoren wie z. B. bFGF und Chemokine wie SDF-1 α zu binden und diese so zu inaktivieren (310,311).

Abschließend soll noch ein Effekt von Heparinen beleuchtet werden, der von Sento et al. beschrieben wurde. Orale Plattenepithelkarzinomzellen fördern autokrin durch Sekretion und Resorption verschiedener Exosomen ihre Proliferation. Heparine beeinträchtigten die Aufnahme dieser Exosomen und somit die Proliferation (312).

2.5.5 Evaluation antimetastatischer Effekte von Heparinen in klinischen Studien

Zur besseren Einordnung und Bewertung der Relevanz der bekannten antimetastatischen Mechanismen der Heparine werden abschließend Ergebnisse klinischer Studien betrachtet, deren Ziel die Quantifizierung dieser Effekte war.

In einer Metaanalyse der Cochrane Gesellschaft aus dem Jahr 2017, die 18 randomisierte klinische Studien umfasste und somit 9.575 Patienten einschloss, wurde der Effekt von UFH und LMWH auf die Mortalität der Patienten in einem Zeitraum von 12 und 24 Monaten evaluiert. Überwiegend wurden Patienten mit kleinzelligem Lungenkarzinom, nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom und Pankreaskarzinom betrachtet. Es konnte keine signifikante Reduktion der Mortalität festgestellt werden bezüglich der betrachteten Zeiträume. Entweder sind die Effekte also äußerst gering und nicht signifikant, oder ein anderes Studiendesign ist notwendig (313). Im Folgenden werden drei Beispiele angeführt, die Effekte von Heparinen auf die Mortalität offenbaren und Grund zu der Annahme geben, dass Heparine möglicherweise nur in einem frühen Stadium der Krebserkrankung wirken.

In einer Studie von Klerk et al. wurden 302 Patienten mit metastasierter oder lokal fortgeschrittener Tumorerkrankung eingeschlossen und die Gabe von Nadroparin mit Placebo verglichen. Der Unterschied der mittleren Überlebenszeit zwischen Verumgruppe (8,0 Monate) und Placebogruppe (6,6 Monate) lag bei 1,4 Monaten ($p=0,021$). Die Differenz war in einer Subgruppe mit günstiger klinischer Prognose größer, sie betrug sechs Monate (Verumgruppe 15,4 versus Placebogruppe 9,4 Monate; $p=0,01$) (314).

Eine Studie von van Doormaal et al. schloss 503 Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom, lokal fortgeschrittenem Pankreaskarzinom oder hormonrefraktärem Prostatakarzinom ein. Insgesamt wurden 244 Patienten zusätzlich zur Chemotherapie mit Nadroparin behandelt, 259 Patienten bekamen nur die entsprechende Chemotherapie. In der Nadroparingruppe lag die mittlere Überlebenszeit bei 13,1 Monaten und in der Kontrollgruppe bei 11,9 Monaten. Die Differenz ist gering und nicht signifikant (315).

Abschließend wird eine Studie von Kakkar et al. angeführt. In dieser erfolgte, anhand von 385 Patienten mit einer fortgeschrittenen Tumorerkrankung, ein Vergleich von Dalteparin mit Placebo. In der Verumgruppe betrug das mittlere Gesamtüberleben 10,8 Monate versus 9,1 Monate in der Placebogruppe ($p=0,19$). Der Unterschied war nicht signifikant. Es wurde jedoch abschließend noch eine a priori nicht definierte Subgruppenanalyse von Patienten mit einer guten klinischen Prognose bzw. einer Gesamtüberlebenszeit von mindestens

17 Monaten, durchgeführt. In dieser Subgruppe zeigte sich ein großer Unterschied in der Mortalität der Patienten. Die mittlere Überlebenszeit lag in der Verumgruppe bei 43,5 Monaten und in der Placebogruppe bei 24,3 Monaten (316).

Möglicherweise kann Heparin durch seine antimetastatische Wirksamkeit den klinischen Verlauf der Erkrankung nur günstig beeinflussen, wenn es in einem frühen Stadium mit einer günstigen Prognose gegeben wird.

3. Ziele dieser Arbeit

Das Ziel dieser Forschungsarbeit ist es, einen Beitrag zum Verständnis der Interaktionen zwischen Thrombozyten und Tumorzellen während der hämatogenen Metastasierung zu leisten.

Im Fokus steht dabei die Aktivierung der Thrombozyten durch Tumorzellen. Es sollen Möglichkeiten der Kommunikation zwischen Tumorzellen und Thrombozyten evaluiert werden. Außerdem erfolgt der Versuch dominante Mechanismen dieser Kommunikation zu identifizieren. Dazu wird der Effekt von Tumorzellen auf die Aktivierung der Thrombozyten in calciumfreiem und recalcifiziertem Plasma, also mit und ohne Thrombinbildung betrachtet. Zur weiteren Diskriminierung von kontaktbasierenden bzw. parakrinen und adhäsiven sowie gerinnungsvermittelten Mechanismen werden Experimente zur Aktivierung in unterschiedlichen Medien, in An- und Abwesenheit von Gerinnungsfaktoren, durchgeführt. Weiterhin sollen Konsequenzen und Effekte dieses prometastatischen Wechselspiels ermittelt, demonstriert und bewertet werden. Hierbei wird die Sekretion der thrombozytären Granula in den Mittelpunkt gerückt und die Induktion ihrer Freisetzung durch Tumorzellen betrachtet. Hierzu wird die Freisetzung von ATP aus den dichten-Granula sowie von CXCL5, CXCL7, EGF, HGF, PDGF-B, TGF- β 1 und VEGF aus den α -Granula quantifiziert. Zusätzlich werden funktionelle prometastatische Konsequenzen der Granulasekretion, wie die Induktion einer EMT und einer Angiogenese untersucht. Außerdem wird die Thrombinbildung induziert durch Tumorzellen beleuchtet. Zur Simulation werden Zellen von vier verschiedenen Tumorentitäten eingesetzt, um eine gute Verallgemeinerbarkeit der Ergebnisse zu erreichen.

Da die Metastasierung bekanntermaßen eine schwerwiegende Komplikation der Krebserkrankung ist, sollen therapeutische Optionen zur Inhibition oder Abschwächung dieser geprüft werden. Hierzu werden inhibitorische Effekte verschiedener Antikoagulantien quantifiziert. Es wird unfraktioniertes Heparin, Enoxaparin, Tinzaparin, Fondaparinux, Rivaroxaban und reduziertes Oxyheparin eingesetzt. Durch die Verwendung von einem DOAK, UFH, LMWHs und einem nicht antikoagulativen Heparinderivat sollen Erkenntnisse zu inhibitorischen Wirkmechanismen gewonnen werden.

Die Auswirkungen der zu testenden Antikoagulantien auf die Tumorzell-Thrombozyt-Kommunikation werden im Rahmen dieser Arbeit in drei verschiedenen Projekten geprüft. Grundsätzlich werden in jedem Projekt die Aktivierung von Thrombozyten induziert durch

Tumorzellen abgebildet und der inhibitorische Einfluss von verschiedenen Antikoagulantien quantifiziert. Im ersten und zweiten Projekt wurden zusätzlich funktionelle Konsequenzen der Thrombozytenaktivierung beleuchtet. Die Projekte unterscheiden sich maßgeblich im Medium in dem die Thrombozyten suspendiert sind und somit in der Beteiligung der Blutgerinnungsenzyme an der Tumorzell-Thrombozyt-Kommunikation. Abbildung 9 bietet einen Überblick zu den einzelnen Projekten und den eingesetzten Techniken bzw. durchgeführten Experimenten.

In dem ersten Projekt werden die Kommunikation und deren Inhibition durch Antikoagulantien selektiv in einem koagulationsdefizienten Modell in Abwesenheit der gelösten plasmatischen Gerinnungsfaktoren getestet. Der Fokus liegt auf kontaktbasierenden bzw. adhesiven und parakrinen Interaktionen zwischen Tumorzellen und Thrombozyten. Störungen durch polymerisierendes Fibrin werden ausgeschlossen. Weiterhin wird der Einfluss des Plasmas vernachlässigt. Hierzu wird thrombozytenreicher Puffer (TRPu) verwendet, welcher Thrombozyten aus Thrombozytenkonzentraten sowie Thrombozytenpuffer enthält und recalcifiziert wurde.

Im zweiten Projekt wird ein Vergleich zwischen kontaktvermittelten Effekten und einer Kombination aus kontaktvermittelten Effekten und Gerinnungseffekten angestrebt. Verglichen wird die Tumorzell-Thrombozyt-Kommunikation in nicht recalcifiziertem Plasma mit einer in recalcifiziertem defibrinisiertem Plasma. Es handelt sich also einerseits um ein koagulationsdefizientes System und andererseits um ein koagulationskompetentes. Zusätzlich werden Einflüsse des Plasmas miteinbezogen. Für das koagulationsdefiziente System wird thrombozytenreiches Plasma (TRP) aus frischen humanen Blutproben verwendet. Für das koagulationskompetente System werden Thrombozyten aus Thrombozytenkonzentraten isoliert und in defibrinisiertes Plasma überführt. Zur Gewährleistung der Gerinnungsfaktor-Funktionalität wird das defibrinisierte Plasma recalcifiziert. Die Fibrinentfernung ist notwendig, weil der Vergleich anhand der thrombozytären Granulafreisetzung via *enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISAs) durchgeführt wird, welche durch eine Fibrinbildung gestört werden.

Das dritte Projekt befasst sich mit einem plasmatischen Modell, welches den Fokus auf die Thrombinbildung als Surrogatparameter einer Thrombozytenaktivierung, induziert durch Tumorzellen, legt. Es wird eine Kombination aus kontaktbasierenden und koagulationsvermittelten Interaktionen im Plasma abbildet. Dieses System ermöglicht eine

3. Ziele dieser Arbeit

Annäherung an die *in vivo* Situation. Als Proben wird aus frischen Blutproben isoliertes TRP verwendet. Die einzigen Modifikationen des Plasmas sind die Zugabe des Faktor XIIIa-Inhibitors Corn Trypsin Inhibitor (CTI) und die von Calcium.

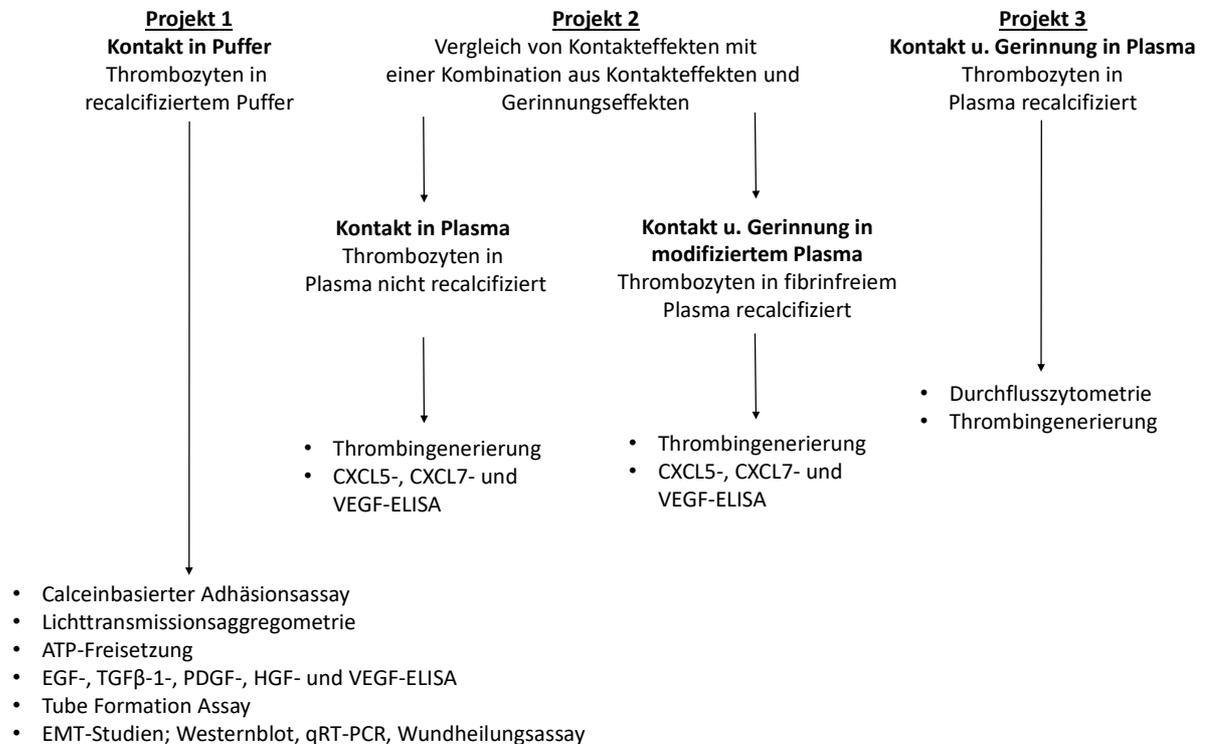


Abbildung 9: Übersicht der drei Projekte, aus denen sich diese Arbeit zusammensetzt. Im Wesentlichen unterscheiden sie sich im Medium, in dem die Thrombozyten untersucht wurden und damit den möglichen Interaktionen (calciumfreies Plasma, recalcifiziertes Plasma, fibrinfreies recalcifiziertes Plasma und recalcifizierter Puffer).

4. Material und Methoden

4.1 Chemikalien und Reagenzien

4.1.1 Chemikalien

Tabelle 2: Informationen zu den verwendeten Chemikalien.

Bezeichnung	Hersteller
1-Step® Ultra TMB-ELISA Substrat Lösung	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
4',6-Diamidin-2-phenylindol- dihydrochlorid, DAPI	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Adenosindiphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Adenosin 5'-triphosphate	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Bacillof® AF	Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
Batroxobin Reagenz	Siemens AG, München, Deutschland
Bovines Serum-Albumin, BSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Calcein-AM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Calciumchlorid-Dihydrat	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
CASY®ton	Schärfe Systems GmbH, Reutlingen, Deutschland
Cell Extraction Buffer	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Clarity™ Western ECL Blotting Substrate	BioRad, Hercules, CA, USA

4. Material und Methoden

Corn Trypsin Inhibitor	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA
Diethylpyrocarbonat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid, DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
DNase I, RNase Free	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
DNase/RNase-Free Water	Zymo Research, Irvine, CA, USA
Direct-zol™ RNA PreWash	Zymo Research, Irvine, CA, USA
Dithiothreitol	ThermoFisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA
D-Luciferin	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Dulbecco`s modified eagles medium high glucose	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Dulbecco`s modified eagles medium low glucose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Dulbecco`s Phosphat Buffer Salin ohne Calcium und Magnesium pH 7,4, steril	PAN Biotech GmbH, Aldenbach, Deutschland
EDTA-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
EDTA Lösung 50 mM	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Ethanol absolut ≥99.8 %	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Faktor VII-Mangelplasma, lyophilisiert	CoaChrom Diagnostica GmbH, Maria Enzersdorf, Österreich

Fluoromount™ wässriges mounting-Medium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Fötale Kälberserum F7524	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Geltrex™ LDEV-Free Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Gigasept® Instru AF	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland
Glucose	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (100×)	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
HEPES	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
iScript Advanced Reaction Mix (5x)	BioRad, Hercules, CA, USA
iScript Advanced Reverse Transkriptase	BioRad, Hercules, CA, USA
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Laemmli Probenpuffer Konzentrat (2×)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
L-Glutamin-Lösung (200mM)	PAN Biotech GmbH, Aldenbach, Deutschland
Luciferase, firefly recombinant	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Isopropanol 100 %	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

4. Material und Methoden

Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumazid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcitrat-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Th. Geyer GmbH & Co. KG
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumpyruvat (100 mM)	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Penicillin-Streptomycin-Lösung (10.000 I.E./mL, 10 mg/mL)	PAN Biotech GmbH, Aldenbach, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Precision Plus Protein™ Dual Color Standard	BioRad, Hercules, CA, USA
Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standard	BioRad, Hercules, CA, USA
Precision Protein™ StrepTactin-HRP Conjugate	BioRad, Hercules, CA, USA
Reaktions Puffer ATP-Assay (20x)	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Reaktions Puffer mit MgCl ₂ (10x)	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

RNA PreWash Buffer	Zymo Research, Irvine, CA, USA
RNA Wash Buffer	Zymo Research, Irvine, CA, USA
RPMI-1640® Nährmedium	PAN Biotech GmbH, Aldenbach, Deutschland
Salzsäure (1 mol/L)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Schwefelsäure 96 % (v/v)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Sera Plus, Special processed FBS, Virus and mycoplasma tested	PAN Biotech GmbH, Aldenbach, Deutschland
Sterillium®	Bode Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland
SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix	BioRad, Hercules, CA, USA
Stickstoff	Linde AG, Düsseldorf, Deutschland
Sucrose	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Technothrombin® TGA CAL Set	Technoclone GmbH, Wien, Österreich
Technothrombin® TGA RC high	Technoclone GmbH, Wien, Österreich
Technothrombin® TGA SUB	Technoclone GmbH, Wien, Österreich
TRAP-6	Tocris Bioscience, Bristol, United Kingdom
Tris-Base	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Triton® X 100	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
TRI Reagent®	Zymo Research, Irvine, CA, USA
Trypsin 0.05 %/EDTA 0.02 % in PBS ohne Calcium und Magnesium mit Phenolrot	PAN Biotech GmbH, Aldenbach, Deutschland
Tween™ 20	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

4. Material und Methoden

4.1.2 Antikörper

Tabelle 3: Informationen zu den verwendeten Antikörpern.

Bezeichnung	Epitop	Eigenschaften	Hersteller
E-Cadherin (G-10) (sc-8426)	Aminosäuren 600-707 der extrazellulären humanem E-Cadherin Domäne	Maus, monoklonal, IgG1, primär	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA
GAPDH (GT239)	Aminosäuren in zentraler Region von humanem GAPDH (Firmengeheimnis)	Maus, monoklonal, IgG2b, primär	GeneTex, Irvine, CA, USA
Human Coagulation Factor III/ Tissue Factor Antibody (AF233)	Gewebsthrombo-kinase (Tissue Factor) Aminosäuren Gly34-Glu251	Ziege, polyklonal, IgG, primär	R&D systems, Minneapolis, MN, USA
m-IgGκ BP-HRP (sc-516102)	Maus-IgGκ leichte Kette	Maus, HRP-konjugiert	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA
rabbit anti-goat IgG-FITC (SC-2777)	Ziegen-IgG	Hase, IgG, sekundär, FITC-konjugiert	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA
Vimentin (V9) (sc-6260)	gerichtet gegen Vimentin aus Schweine Augenlinsen (Firmengeheimnis)	Maus, monoklonal, IgG1, primär	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA

4.1.3 Primer

Tabelle 4: Informationen zu den verwendeten Primern.

Bezeichnung	Hersteller
human beta-Aktin (β -Act)	BioRad, Hercules, CA, USA
human beta-2-Mikroglobulin (B2M)	Biomol, Hamburg, Deutschland
human Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH)	BioRad, Hercules, CA, USA
human Ribosomales Protein L13 (RPL13)	Biomol, Hamburg, Deutschland
human Snail homolog 1 (Snail1)	BioRad, Hercules, CA, USA
human Snail homolog 2 (Slug)	BioRad, Hercules, CA, USA
human Twist homolog 1 (Twist1)	Biomol, Hamburg, Deutschland
human Vimentin (Vim)	Biomol, Hamburg, Deutschland
human zinc finger E-box binding homeobox 2 (Zeb2)	Biomol, Hamburg, Deutschland

4. Material und Methoden

4.1.4 Antikoagulantien

Tabelle 5: Informationen zu den verwendeten Antikoagulantien.

Fertigarzneimittel	Wirkstoff	Hersteller
Heparin-Natrium-5000-ratiopharm®	unfraktioniertes Heparin	ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
Innohep® 20000 Anit-Xa I.E./mL Fertigspritzen Injektionslösung	Tinzaparin	Leo Pharma A/S, Ballerup, Dänemark
Clexane® 4.000 I.E. (40 mg)/0,4 ml, Injektionslösung in einer Fertigspritze	Enoxaparin	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Arixtra® 2,5 mg/0,5 mL Injektionslösung, Fertigspritze	Fondaparinux	Aspen Pharma Trading Limited, Dublin, Irland
-	Rivaroxaban	Sellekchem, München, Deutschland
RO-Heparin	Reduziertes Oxyheparin	Ronconi Institute, Mailand, Italien

4.1.5 Hergestellte Reagenzien

4.1.5.1 Hergestellte Puffer, Lösungen und Nährmedien

Tabelle 6: Informationen zu den verwendeten hergestellten Puffern, Lösungen und Nährmedien.

Bezeichnung	Zusammensetzung	
ADP-Arbeitslösung (1 mmol/L)	ADP Aqua dem.	4,272 mg ad 10 mL
ATP-Assay-Lösung	Reaction Buffer (20x) Dithiothreitol (0,1 mol/L) D-Luciferin (10 mmol/l) Luciferase, firefly (5 mg/mL) Aqua dem.	0,5 mL 0,1 mL 0,5 mL 2,5 µL 8,9 mL
BCA-Lösung	BCA-Reagenz B BCA-Reagenz A (Beide Reagenzien im Pierce™ BCA Protein Assay Kit enthalten)	196,1 µL ad 10,0 mL
Blockierungslösung ELISA	BSA DPBS	1,2 g 40,0 mL
Blockierungslösung FACS	BSA DPBS	300 mg 10,0 mL
Blockierungslösung Western Blot	Magermilchpulver TBS-T	5,0 g 100,0 mL
Calciumchloridlösung (0,5 M)	Calciumchlorid-Dihydrat Aqua millipore	1,47 g 10,0 mL
Calcein-AM-Arbeitslösung (1 mM)	Calcein-AM DMSO	50,0 µg 50,0 µL
DAPI-Arbeitslösung (300 nmol/L)	DAPI-Stammlösung (3 mmol/L) DPBS	0,5 µL ad 5,0 mL
Direct-zol™ RNA PreWash-Arbeitslösung	Direct-zol™ RNA PreWash Ethanol absolut ≥99.8 %	40,0 mL 10,0 mL

4. Material und Methoden

DNase I-, RNasefreie Lösung	Reaktions Puffer MgCl ₂ (10x)	2,0 µL
	DNase I, RNase Free	2,0 µL
	DNase/RNase-Free Water	14,0 µL
	(nach der Inkubation (37°C, 30 min) mit der Probe Zugabe von 2 µL EDTA-Lösung (50 mmol/L))	
ELISA-Diluent	BSA	50,0 mg
	TWEEN 20	25,0 µL
	DPBS	ad 50,0 mL
Elektrodenpuffer (1x)	Elektrodenpuffer (10x)	100,0 mL
	Aqua millipore	ad 1000,0 mL
Elektrodenpuffer (10x)	Glycin	72,0 g
	TRIS-Base	15,0 g
	SDS	5,0 g
	Aqua millipore	500,0 mL
iScript Advanced Reverse Transkriptase Mixtur	iScript Advanced Reaction Mix (5x)	4,0 µL
	iScript Advanced rev. Transkriptase	1,0 µL
	Nukleasefreies Wasser	4,0 µL
iScript Advanced Reverse Transkriptase Mixtur (Enzym freie Kontrolle)	iScript Advanced Reaction Mix (5x)	4,0 µL
	Nukleasefreies Wasser	5,0 µL
Kryomedium	FKS	45,0 mL
	DMSO	5,0 mL
Luminol-Peroxidlösung	Clarity Western Peroxid-Reagenz	4,0 mL
	Clarity Western Luminol-Reagenz	4,0 mL
	(Enthalten im Clarity Western ECL Blotting Substrate)	
Lysepuffer	Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (100x)	25,0 µL
	Phenylmethylsulfonylfluorid (0,3 mol/L)	17,0 µL
	Cell Extraction Buffer	ad 5,0 mL

4. Material und Methoden

Nährmedium AsPC-1	Fötales Kälberserum F7524	50,0 mL
	Penicillin/Streptomycinlösung (10.000 I.E./mL, 10 mg/mL)	5,0 mL
	RPMI-1640® Nährmedium	500,0 mL
Nährmedium Ea.hy926	Sera Plus, Special processed FBS, Virus and mycoplasma tested	100,0 mL
	Penicillin/Streptomycinlösung (10.000 I.E./mL, 10 mg/mL)	10,0 mL
	Natriumhydrogencarbonat	3,7 g
	Dulbecco`s modified eagles medium low glucose	ad 1000,0 mL
Nährmedium MDA-MB-231	Sera Plus, Special processed FBS, Virus and mycoplasma tested	50,0 mL
	Penicillin/Streptomycinlösung (10.000 I.E./mL, 10 mg/mL)	5,0 mL
	L-Glutaminlösung (200 mmol/L)	5,0 mL
	Dulbecco`s modified eagles medium high glucose	500,0 mL
Nährmedium MV3	Sera Plus, Special processed FBS, Virus and mycoplasma tested	50,0 mL
	Penicillin/Streptomycinlösung (10.000 I.E./mL, 10 mg/mL)	5,0 mL
	RPMI-1640® Nährmedium	500,0 mL
Nährmedium PC-3	Fötales Kälberserum F7524	50,0 mL
	Penicillin/Streptomycinlösung (10.000 I.E./mL, 10 mg/mL)	5,0 mL
	L-Glutaminlösung (200 mmol/L)	5,0 mL
	Natriumpyruvat (100 mmol/L)	5,0 mL
	RPMI-1640® Nährmedium	500,0 mL
nukleasefreies Wasser	Diethylpyrocarbonat	250,0 mg
	Auqa dem. (12 h unter rühren inkubieren anschließend autoklavieren)	250,0 mL
Phenylmethylsulfonylfluorid- Stammlösung (0,3 mol/L)	PMSF	261,3 mg
	DMSO	5,0 mL

4. Material und Methoden

RNA Wash Buffer-Arbeitslösung	RNA Wash Buffer	48,0 mL
	Ethanol absolut $\geq 99.8\%$	12,0 mL
Stopplösung für 1-Step® Ultra TMB-ELISA-Substratlösung	Schwefelsäure 96 % (v/v)	11,1 mL
	Aqua dem.	ad 100 mL
TBS-Puffer (1×)	TBS-Puffer (10×)	100,0 mL
	Aqua millipore	ad 1000,0 mL
TBS-Puffer (10×)	Natriumchlorid	40,0 g
	Tris-Base	6,06 g
	Aqua millipore	500,0 mL
	pH-Wert Einstellung auf 7,3 erfolgte mit Salzsäure (1 mol/L)	
TBS-T-Puffer	Aqua millipore	720,0 mL
	TBS-Puffer (10×)	80,0 mL
	Tween® 20	1,6 mL
Transferpuffer (1×)	Transferpuffer (10×)	100,0 mL
	Aqua millipore	ad 1000,0 mL
Transferpuffer (10×)	Glycin	72,0 g
	Tris-Base	15,0 g
	Aqua millipore	500,0 mL
TRAP-6-Arbeitslösung (3,3 mmol/L)	TRAP-6	5,0 mg
	Aqua millipore	2,0 mL
Triton® X 100-Arbeitslösung (1 %) (m/v)	Triton® X 100	1,0 g
	Aqua millipore	ad 100,0 mL
Thrombozytenpuffer	HEPES	10 mmol/L
	NaCl	136,7 mmol/L
	KCl	2,6 mmol/L
	MgCl ₂	1 mmol/L
	NaHCO ₃	13,8 mmol/L
	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	0,36 mmol/L
	D-Glucose	5,5 mmol/L
	Aqua millipore	q.s.

4. Material und Methoden

Thrombozyten-Waschpuffer	NaCl	140 mmol/L
	KCl	5 mmol/L
	Natriumcitrat	12 mmol/L
	Glucose	10 mmol/L
	Sucrose	12,5 mmol/L
	Aqua millipore	q.s.
Waschpuffer (ELISA)	TWEEN 20	250,0 µL
	DPBS	ad 500,0 mL
Waschpuffer (FACS)	BSA	250,0 mg
	Natriumazid	50,0 mg
	DPBS	50,0 mL

4.1.5.2 Hergestellte Primerlösungen

Tabelle 7: Informationen zu den verwendeten hergestellten Primerlösungen.

Bezeichnung	Zusammensetzung	
beta-Aktin (β -Act)-Arbeitslösung für 17 Wells (1,17x)	beta-Aktin Stammlösung (20x)	12,75 µL
	SsoAdvanced™ Universal SYBR®	127,5 µL
	Green Supermix	
	Nukleasefrei Wasser	80,75 µL
beta-2-Mikroglobulin (B2M)-Stammlösung (2 µmol/L)	beta-2-Mikroglobulin Lösung (50 µmol/L)	2,0 µL
	Nukleasefrei Wasser	ad 50,0 µL
beta-2-Mikroglobulin (B2M)-Arbeitslösung für 17 Wells (0,115 µmol/L)	beta-2-Mikroglobulin Stammlösung (2 µmol/L)	12,75 µL
	SsoAdvanced™ Universal SYBR®	127,5 µL
	Green Supermix	
	Nukleasefrei Wasser	80,75 µL
Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH)-Arbeitslösung für 17 Wells (1,17x)	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase Stammlösung (20x)	12,75 µL
	SsoAdvanced™ Universal SYBR®	127,5 µL
	Green Supermix	
	Nukleasefrei Wasser	80,75 µL

4. Material und Methoden

Ribosomales Protein L 13 (RPL13)- Stammlösung (2 µmol/L)	Ribosomales Protein L 13 Lösung (50 mmol/L) Nukleasefrei Wasser	2,0 µL ad 50,0 µL
Ribosomales Protein L 13 (RPL13)- Arbeitslösung für 17 Wells (0,115 µmol/L)	Ribosomales Protein L 13 Stammlösung (2 µmol/L) SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix Nukleasefrei Wasser	12,75 µL 127,5 µL 80,75 µL
human Snail homolog 1 (Snail1)- Arbeitslösung für 17 Wells (1,17x)	human Snail homolog 1 Stammlösung (20x) SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix Nukleasefrei Wasser	12,75 µL 127,5 µL 80,75 µL
human Snail homolog 2 (Slug)- Arbeitslösung für 17 Wells (1,17x)	human Snail homolog 2 Stammlösung (20x) SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix Nukleasefrei Wasser	12,75 µL 127,5 µL 80,75 µL
human Twist homolog 1 (Twist1)- Stammlösung (2 µmol/L)	human Twist homolog 1 Lösung (50 µmol/L) Nukleasefrei Wasser	2,0 µL ad 50,0 µL
human Twist homolog 1 (Twist1)- Arbeitslösung für 17 Wells (0,115 µmol/L)	human Twist homolog 1 Stammlösung (2 µmol/L) SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix Nukleasefrei Wasser	12,75 µL 127,5 µL 80,75 µL
human Vimentin (Vim)-Stammlösung (2 µmol/L)	human Vimentin Lösung (50 µmol/L) Nukleasefrei Wasser	2,0 µL ad 50,0 µL
human Vimentin (Vim)-Arbeitslösung für 17 Wells (0,115 µmol/L)	human Vimentin Stammlösung (2 µmol/L) SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix Nukleasefrei Wasser	12,75 µL 127,5 µL 80,75 µL
human zinc finger E-box binding homeobox 2 (Zeb2)-Stammlösung (2 µmol/L)	human zinc finger E-box binding homeobox 2 Lösung (50 µmol/L) Nukleasefrei Wasser	2,0 µL ad 50,0 µL

4. Material und Methoden

human zinc finger E-box binding homeobox 2 (Zeb2)-Arbeitslösung für 17 Wells (0,115 µmol/L)	human zinc finger E-box binding homeobox 2 Stammlösung (2 µmol/L) SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix Nukleasefrei Wasser	12,75 µL 127,5 µL 80,75 µL
---	--	--------------------------------------

4.1.5.3 Hergestellte Antikoagulantienlösungen

Tabelle 8: Informationen zu den hergestellten und verwendeten Antikoagulantienlösungen.

Bezeichnung	Zusammensetzung	
UFH-Arbeitslösung (500 I.E./mL)	Heparin-Natrium-5000- ratiopharm Aqua millipore	5 µL ad 250 µL
Tinzaparin-Arbeitslösung (500 I.E./mL)	Innohep® 20.000 Anit-Xa I.E./mL Fertigspritzen Injektionslösung Aqua millipore	5 µL ad 200 µL
Enoxaparin-Arbeitslösung (500 I.E./mL)	Clexane 4.000 I. E. (40 mg)/0,4 ml, Injektionslösung, Fertigspritze Aqua millipore	10 µL ad 200 µL
Fondaparinux-Arbeitslösung (125 µg/mL)	Arixtra® 2,5 mg/0,5 mL Injektionslösung, Fertigspritze Aqua millipore	25 µL ad 1000 µL
Rivaroxaban-Stammlösung (1 mg/mL)	Rivaroxaban DMSO	2,8 mg ad 2,80 mL
Rivaroxaban-Arbeitslösung (20 µg/mL)	Rivaroxaban DMSO	20 µL ad 1000 µL
Reduziertes Oxyheparin-Stammlösung (10 mg/mL)	Reduziertes Oxyheparin Aqua millipore	10 mg ad 1000 mL

4. Material und Methoden

4.1.5.4 Hergestellte Antikörperlösungen

Tabelle 9: Informationen zu den verwendeten hergestellten Antikörperlösungen.

Bezeichnung/Verdünnung	Zusammensetzung	
E-Cadherin (G-10)-Arbeitslösung (1:200)	BSA Natriumazid E-Cadherin (G-10) Antikörper TBS-T	500,0 mg 10,0 mg 50,0 µL ad 10,0 mL
GAPDH-Arbeitslösung (1:20.000)	BSA Natriumazid GAPDH Antikörper TBS-T	500,0 mg 10,0 mg 0,5 µL ad 10,0 mL
m-IgGκ BP-HRP-Arbeitslösung (1:10.000)	Magermilchpulver Precision Protein™ StrepTactin- HRP Conjugate Sekundärer m-IgGκ Antikörper TBS-T	500,0 mg 10,0 mg 1,0 µL ad 10,0 mL
Vimentin (V9)-Arbeitslösung (1:200)	BSA Natriumazid Vimentin (V9) Antikörper TBS-T	500,0 mg 10,0 mg 50,0 µL ad 10,0 mL
Durchflusszytometrie Antikörper	Verwendung	
Human Coagulation Factor III/ Tissue Factor Antibody (0,2 mg/mL)	2,5 µg /10 ⁶ Zellen	
rabbit anti-goat IgG-FITC (0,4 mg/mL)	0,75 µg /10 ⁶ Zellen	

4.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 10: Informationen zu den verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Hersteller
96F Non-Treated Black Microwell SH	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
APACT 4004 Küvetten	Haemochrom Diagnostica GmbH, Essen, Deutschland
CASY® cups	Schärfe System GmbH; Reutlingen, Deutschland
CELLSTAR® Röhrchen, 15 mL, Polypropylen, steri	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
CELLSTAR® Röhrchen, 50 mL, Polypropylen, steri	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Collection Tubes	Zymo Research, Irvine, CA, USA
CytoOne® 6-Well-Platte, TC-behandelt, steril	Starlab GmbH; Ahrensburg, Deutschland
Cyto One 96-Well-Platten, F-Form, natur, steril	Starlab GmbH; Ahrensburg, Deutschland
Deckgläser Stärke No. 1, rund	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Einmalspritzen Braun Luer Solo (20 mL)	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Eppendorf Tubes® Safe-Lock Tubes 1,5 mL PCR clea	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Gel-Pipettenspitzen MultiFlex Round	Sorenson BioScience Inc., Salt Lake City, USA
Hard-Shell® 96-Well PCR Plates, low profile, thin wall, skirted, white/white	BioRad, Hercules, CA, USA

4. Material und Methoden

Kryogefäße Cryo.S®	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Microplatte, 96-Well, PS, U-Boden	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Microseal® 'B' PCR Plate Sealing Film, adhesive, optical	BioRad, Hercules, CA, USA
Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels (7,5-12 %)	BioRad, Hercules, CA, USA
Mini Trans-Blot® Filter Paper	BioRad, Hercules, CA, USA
Multifly®-Kanüle Set 21 G 200 mm Länge	Sarstedt AG & Co.KG, Nümbrecht, Deutschland
Nunc™ F96-MicroWell™ Polystyrolplatte, schwarz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Nunc™ F96-MicroWell™ Polystyrolplatte, weiß	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Nunc-Immuno® MicroWell® 96-well solid plates	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Objektträger Stärke ca. 1 mm	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Pasteurpipetten, Glas	Brand GmbH & Co. KG; Wertheim, Deutschland
Pipettierreservoirs, PS, 50 mL für Mehrkanalpipetten	ratiolab GmbH, Dreieich, Deutschland
Pipettierwanne 50 mL Costar	Corning Inc., NY, USA
Pipettenspitzen TipOne® (10 µL), natur	Starlab GmbH; Ahrensburg, Deutschland
Pipettenspitzen TipOne® (200 µL), gelb	Starlab GmbH; Ahrensburg, Deutschland

Pipettenspitzen TipOne® (1000 µL), blau	Starlab GmbH; Ahrensburg, Deutschland
Pipettenspitzen TipOne® Filter Tip (10 µL), natur	Starlab GmbH; Ahrensburg, Deutschland
Pipettenspitzen TipOne® Filter Tip (200 µL), gelb	Starlab GmbH; Ahrensburg, Deutschland
Pipettenspitzen TipOne® Filter Tip (1000 µL), blau	Starlab GmbH; Ahrensburg, Deutschland
Pipettenspitzen (5 mL) Plastibrand®, natur	Brand GmbH & Co. KG; Wertheim, Deutschland
Reagiergefäße (0,6 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Reagiergefäße (1,5 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Reagiergefäße (2,0 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Reagiergefäße (5,0 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Reagiergefäße (1,5 mL), SafeSeal, braun	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
S-Monovette® 8,2 mL 9NC	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten (10 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten (25 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Spritzenvorsatzfilter für die Probenvorbereitung	Berrytec GmbH, Harthausen, Deutschland
Spritzenvorsatzfilter steril	Berrytec GmbH, Harthausen, Deutschland
TC-Platte 96-Well, Standard, F	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflaschen CELLSTAR® TC, 50 mL, 25 cm ² , PS, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

 4. Material und Methoden

Zellkulturflaschen CELLSTAR® TC, 250 mL, 75 cm ² , PS, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturflaschen CELLSTAR® TC, 550 mL, 175 cm ² , PS, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zymo-Spin™ IIC Columns	Zymo Research, Irvine, CA, USA

4.3 Enzyme-linked immunosorbent assay-Kits

Tabelle 11: Informationen zu den verwendeten ELISA-Kits.

Bezeichnung	Hersteller
Human CXCL5/ENA-78 Quantikine ELISA Kit	R&D Systems, Abington, UK
Human CXCL7/NAP-2 DuoSet ELISA	R&D Systems, Abington, UK
Human EGF Mini ABTS ELISA Development Kit	Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA
Human FGF-basic Mini ABTS ELISA Development Kit	Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA
Human HGF ELISA Kit	Ray Biotech, Norcross, GA, USA
Human PDGF-BB Mini ABTS ELISA Development Kit	Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA
Human/Mouse TGF beta 1 Uncoated ELISA	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Human VEGF ELISA Development Kit	Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA

4.4 Geräte

Tabelle 12: Informationen zu den verwendeten Geräten.

Bezeichnung	Hersteller
APACT 4004	Haemochrom Diagnostica GmbH, Essen, Deutschland
Absaugsystem BVC 21 NT	Vacuubrand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Accu-Jet® pro	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Analysenwaage Sartorius Research	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Analysenwaage Sartorius basic BA210S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Axiovert 200	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
ChemiDoc™ XRS+ System	BioRad, Hercules, CA, USA
CO ₂ -Inkubator NuAire™ DH AutoFlow	NuAire Inc., Plymouth, MN, USA
Colibri Microvolume Spectrometer	Titertek Berthold, Bad Wildbad, Deutschland
DNA Engine Opticon™ System	BioRad, Hercules, CA, USA
Durchflusszytometer Guava® easyCyt ^e HT Flow Cytometer	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
Fluoroskan Ascent®	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Laborschüttler KS-15	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Laminar-Air-Flow-Werkbank Holten safe 2010	Heto-Holton A/S, Allerød, DK
Konfokales Laser-Scanning	Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland

4. Material und Methoden

Mikroskop Nikon A1R Lichtmikroskop Wilovert 30	Helmut Hund GmbH, Wetzlar, Deutschland
Lichtmikroskop Wilovert Standard HF/K	Helmut Hund GmbH, Wetzlar, Deutschland
Magnetrührer IKA RCT Basic	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Mini-PROTEAN® Tetra Cell, Mini Trans-Blot® Module and PowerPac™ Basic Power Supply	BioRad, Hercules, CA, USA
Minishaker MS 2	IKA Works Inc., Wilmington, NC, USA
Multiskan® EX	Thermo Scientific GmbH, Langenselbold, Deutschland
Multiwell Reader FLUOstar™ OPTIMA	BMG Labtech GmbH, Ortenberg
Neubauer improved® Zählkammer	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
PARAFILM® M	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Peltier-Kühlbrutschrank IPP110	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
pH-Meter S20 SevenEasy™ pH	Mettler-Toledo GmbH, Giessen, Deutschland
Pipette (1-5 mL) Finnpipette®	Thermo Fisher Scientific GmbH, Langenselbold, Deutschland
Pipette (10 µL) Research®	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette (100 µL) Research®	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette (1000 µL) Research®	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette (200 µL) Transferpipette® S-12	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette (10 µL)	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim,

Transferpette® S	Deutschland
Pipette (100 µL) Transferpette® S	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Pipette (200 µL) Transferpette® S-12	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Purelab® Plus Wasseraufbereitungsanlage	ELGA LabWater, Celle, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Trockenschrank 60°C	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Trockenschrank 250°C	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Zellzähler CASY® 1 Model TT	OMNI Life Science GmbH & Co. KG, Bremen
Zentrifuge Micro 200 R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Minispin	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Universal 32 R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland

4.5 Software

Tabelle 13: Informationen zu den verwendeten Geräten.

Bezeichnung	Urheberrechte
APACT LPC-Software	© LABiTec GmbH, Ahrensburg, Deutschland
Ascent Software™ v2.6	© Thermo LabSystems Oy 1996–2002
ChemDraw® Prime Version 16.0.1.4	© PerkinElmer Informatics, Inc. 1998–2017
GraphPad Prism 6	©GraphPad Software, La Jolla, CA, USA
guavaSoft™ 3.1.1	© Merck Millipore, Burlington, MA, USA
ImageJ	National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA
Image Lab (Version 5.2.1)	© Bio-Rad Laboratories 2010
Microsoft® Office 2016 für Windows	©Microsoft Corporation; Redmond, WA, USA
Opticon™ monitor analysis software (Version 1.08)	©BioRad, Hercules, CA, USA
THERMO Fluoroskan Ascent TGA Evaluation Software (+AUC)	©Technoclone GmbH, Wien, Österreich
ZEN Mikroskop Software	©Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland

4.6 Zelllinien

4.6.1 AsPC-1 Pankreaskarzinomzellen

Die Zelllinie wurde aus dem Aszites einer 62-jährigen kaukasischen Patientin entnommen, die an einem Adenokarzinom der Bauchspeicheldrüse erkrankt war. Die Zelllinie wurde durch eine Transplantation in Nacktmäuse etabliert und schließlich aus dem Tumorgewebe der Nacktmäuse isoliert (317,318). Bezogen wurden die Zellen über Prof. Massing von der Universität Freiburg.

4.6.2 MDA-MB-231 Mammakarzinomzellen

Diese Zelllinie wurde aus einer, an Brustkrebs erkrankten, 51-jährigen kaukasischen Patientin durch das M.D. Anderson Hospital and Cancer Institute entnommen und etabliert (319). Charakteristisch ist eine Abwesenheit von Progesteron- und Estrogen-Rezeptoren sowie des humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors 2 (HER2), somit erfolgte eine Einstufung als triple-negativer Brustkrebs (320,321). Zusätzlich zeichnen sich die Zellen durch eine reduzierte Claudin-3-, -4- und -7-Expression aus (320). Die Zellen wurden über Dr. Zeisig von der EPO GmbH Berlin bezogen.

4.6.3 MV3 Melanomzellen

Die Zelllinie wurde aus einer Lymphknotenmetastase eines, an einem bösartigen Melanom erkrankten, 76-jährigen Patienten durch van Muijen et al isoliert. Sie wurde etabliert durch eine subkutane Transplantation in Nacktmäuse. Die fertige Zelllinie resultierte aus der dritten Passage (322). Die Zelllinie wurde über die Experimental Pharmacology and Oncology Berlin Buch GmbH bezogen.

4.6.4 PC-3 Prostatakarzinomzellen

Die Zelllinie wurde aus einer Knochenmetastase eines, an einem Adenokarzinom der Prostata Grad IV erkrankten, 62-jährigen Patienten isoliert (323). Charakteristisch ist die Abwesenheit androgener Rezeptoren und des prostataspezifischen Antigens (324,325). Die Zellen wurden bezogen über Prof. Massing von der Universität Freiburg.

4.6.5 EA.hy926 immortalisierte Endothelzellen

Etabliert wurde diese Zelllinie durch die Hybridisierung von humanen Nabelschnurvenen-Endothelzellen mit der humanen Lungenkrebszelllinie A549 durch Edge et al (326). Charakteristisch für diese immortalisierte Endothelzelllinie ist ihre erhöhte Lebensdauer im Vergleich zu HUVEC-Zellen und die Bildung von *Weibel-Palade-Bodies*, E-Selectin sowie VCAM-1 (327,328). Bezogen wurden die Zellen über das Institute of Cellular Biology and Pathology in Bukarest.

4.7 Zellkultur

Alle zellulären Arbeiten wurden unter aseptischen Bedingungen durchgeführt, um Kontaminationen der Zellkultur mit Bakterien und Pilzen zu vermeiden. Zur Gewährleistung der aseptischen Bedingungen wurde eine Laminar-Air-Flow Werkbank, steriles Arbeitsmaterial und 70 %iger Isopropanol zur Desinfektion verwendet. Alle zellulären Arbeitsschritte wurden unter der Werkbank durchgeführt.

4.7.1 Inkulturnahme

Die Langzeitlagerung der Tumorzellen erfolgte in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff bei einer Temperatur von -196°C . Zur Inkulturnahme der Zellen wurden die Kryoröhrchen im Inkubator bei 37°C aufgetaut. Sobald eine Verflüssigung der Zellsuspension erkennbar wurde, erfolgte zügig die Überführung in eine mit 4 mL des entsprechenden Mediums befüllte T25-Zellkulturflasche. Die Zellkulturflasche wurde anschließend im Inkubator bei 37°C und 5 % CO_2 gelagert. Als die Zellen am Flaschenboden adhäriert waren, wurde unverzüglich das Medium gewechselt. Im weiteren Verlauf der Kultivierung erfolgte der Wechsel des Mediums ca. alle 2-3 Tage, somit war eine adäquate Nährstoffversorgung gewährleistet. Ebenso ermöglichte der im Medium enthaltene Indikator Phenolrot, welcher bei zunehmender Ansäuerung durch zelluläre Stoffwechselprodukte, die Farbe von Rot zu Gelb veränderte, einen Nahrungsmangel der Zellen zu erkennen und zu reagieren. Zusätzlich wurde das Wachstum der Zellen visuell mittels eines Lichtmikroskops überwacht.

4.7.2 Kultivierung

Durch die lichtmikroskopische Kontrolle des Wachstums der Zellen war es möglich, den Grad der bewachsenen Fläche des Flaschenbodens, die sogenannte Konfluenz, zu ermitteln. Erreichte die Konfluenz einen Wert von 80-90 % oder wurden akut Zellen für Experimente benötigt, erfolgte eine Extraktion der Zellen aus der Zellkulturflasche. Anschließend wurden sie weiter kultiviert, d.h. in reduzierter Anzahl in neue Flaschen überführt oder experimentell verwendet.

Zur Extraktion wurde das Nährmedium abgesaugt und die Zellkultur wurde mit 10 mL Dulbecco's Phosphat Buffer Salin ohne Calcium und Magnesium pH 7,4, steril (DPBS) dreimal gewaschen, um tote Zellen sowie zelluläre Stoffwechselprodukte zu entfernen. Dann wurde die Kultur in Abhängigkeit der Zelllinie entweder mit EDTA- oder Trypsin/EDTA-Lösung versetzt und für fünf Minuten im Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nur für MV3 Zellen wurde EDTA-Lösung eingesetzt. Während dieser Inkubation lösten sich die Zellen vom Flaschenboden. Das verwendete Volumen orientierte sich an der Größe der Zellkulturflasche (T25 = 1 mL, T75 = 3 mL, T175 = 5 mL). Nach dem Ablösen der Zellen wurde die Zellkulturflasche mit 10 mL des entsprechenden Mediums gefüllt. Dieses wurde dann durch Auf- und Abpipettieren zehnmal über den Flaschenboden gespült. Die entstandene Zellsuspension wurde in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt und bei 450 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Zellpellet wurde in 1 mL Nährmedium resuspendiert und je nach Bedarf wurde ein adäquater Teil dieser Suspension in eine neue mit Nährmedium befüllte Zellkulturflasche überführt. Diese wurden dann wieder bei 37°C und 5 % CO₂ im Inkubator gelagert.

4.7.3 Langzeitlagerung der Zellen

Zur Langzeitlagerung wurden die Zellen entsprechend dem vorangegangenen Abschnitt abgelöst sowie in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/mL in Kryomedium suspendiert und zu je 1 mL in Kryoröhrchen überführt. Diese wurden anschließend bei -80°C in einem Tiefkühlschrank für eine Woche gelagert. Zur Langzeitlagerung wurden die Kryoröhrchen in einen mit flüssigem Stickstoff gefüllten Tank überführt.

4.7.4 Bestimmung der Zellzahl

Zur Standardisierung und Validierung der Experimente ist es erforderlich, stets gleiche Zellzahlen zu verwenden. Die Bestimmung der Zellzahl wurde durchgeführt unter Verwendung eines Zellzählers CASY® 1 Model TT. Die Funktionsweise des Gerätes beruht auf dem Prinzip der sogenannten *electrical current exclusion*® (ECE®). Die zu vermessenden Zellen liegen suspendiert in einer Elektrolytlösung, dem CASY® ton, vor. Zur Messung werden sie mittels Unterdruck in einer konstanten Geschwindigkeit durch eine Kapillare gesaugt an deren Ende Platinelektroden lokalisiert sind. Zwischen diesen beiden Elektroden wird ein Stromfluss erzeugt und der Widerstand gemessen. Stromfluss und Widerstand sind konstant, sofern nur die Elektrolytlösung durch die Kapillare fließt. Da eine intakte Zellmembran als Isolator fungiert, ändern Zellen bei der Passage der Kapillare, proportional zu ihrer Größe und ihrer Viabilität, den gemessenen Widerstand bzw. den Stromfluss. Tote Zellen werden anhand ihrer Größe erkannt, denn ohne intakte Zellmembran wird nur noch der Zellkern detektiert. Im Rahmen einer Messung wird ein definiertes Volumen analysiert, mehrere Zellen werden nacheinander durch die Kapillare gesaugt und quantifiziert. Anschließend wird das Messergebnis als Größenverteilung illustriert und die Zellkonzentration in Zellen/mL angegeben. Zusätzlich ist es möglich aufgrund der Messung der Zellgröße Aussagen zur Zellviabilität zu treffen (329).

Die Vorbereitung einer Messung der Zellzahl erfolgte analog den Ausführungen in Abschnitt 4.7.2. Jedoch wurde das Zellpellet, welches aus der Zentrifugation erhalten wurde, nicht in 1 mL sondern in 10 mL Nährmedium resuspendiert. Von diesen 10 mL wurden 20 µL entnommen und mit 10 mL steril filtrierten CASY® ton gemischt. Diese stark verdünnte Zellsuspension wurde dann am CASY® 1 Model TT Zellzähler vermessen.

4.7.5 Prüfung auf Mykoplasmen

Zur Prüfung auf Kontaminationen der Zellkultur mit Mykoplasmen wurde halbjährlich und vor dem Einfrieren der Zellen zur Langzeitlagerung ein Mykoplasmen-Test, der auf dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) basiert, durchgeführt. Zur Vorbereitung auf diesen Test wurden die Zellen für eine Woche in antibiotikafreiem Medium wachsen gelassen. Anschließend wurden sie, entsprechend den Ausführungen in Abschnitt 4.7.2, abgelöst und nach der Zentrifugation zu je 1×10^6 Zellen/mL resuspendiert. Diese Suspension wurde zur weiteren Kultivierung auf die Wells einer CytoOne® 6-Well-Platte zu je

1 mL/Well aufgeteilt. In jedem Well wurde vorher ein Deckgläschen am Boden platziert. Den Zellen wurde ermöglicht über Nacht zu adhären. Am zweiten Versuchstag wurden die Wells zweimal mit DPBS gewaschen, anschließend mit 300 µL der DAPI Arbeitslösung versetzt und für 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Es folgte erneut ein zweimaliges Waschen mit DPBS, um den nicht gebundenen Farbstoff zu entfernen. Dann wurden die die Zellen tragenden Deckgläschen vorsichtig entnommen und zur Trocknung mit der unbewachsenen Seite nach unten für 30 min auf einem Papiertuch platziert. Parallel dazu wurden Objektträger mit mounting-Medium präpariert. Auf diesen wurden dann die getrockneten Deckgläschen, mit der bewachsenen Seite orientiert in Richtung mounting-Medium, gelegt und am nächsten Tag mit durchsichtigem Nagellack fixiert. Die Quantifizierung der DAPI-Bindung bzw. der Mykoplasmen erfolgte mittels eines Laser-Scanning-Mikroskops. Hierzu wurde eine Anregungswellenlänge von 405 nm verwendet und die Emission bei 450 nm detektiert bei einer Bandbreite von 50 nm. Die Auswertung erfolgt visuell. DAPI bindet doppelsträngige DNA und macht sie sichtbar (330). Somit ist es möglich, zwischen gefärbten Zellen und gefärbten Mykoplasmen aufgrund ihrer Größe zu differenzieren. Der Test wurde als negativ bewertet, wenn neben den gefärbten Zellen, keine deutlich kleineren gefärbten Punkte oder Agglomerate visuell detektierbar waren.

4.8 Experimentelle Standardkonzentrationen der Antikoagulantien

Tabelle 14 zeigt die Konzentrationen, die standardmäßig bei allen Versuchen verwendet wurden. Bis auf die Konzentrationen des reduzierten Oxyheparins orientierten sich alle an Referenzkonzentrationen, welche den therapeutischen Konzentrationen entsprachen. Die Ermittlung einer geeigneten experimentellen Konzentration des Oxyheparins soll im Folgenden kurz erläutert werden.

Wie bereits beschrieben, werden reduzierte Oxyheparine hergestellt, indem Heparine mit Periodat oxidiert werden. Daraus resultiert aus einer Oxidation der Kohlenstoffatome 2 und 3 in den unsulfatierten Uronsäuren, lokalisiert in der Antithrombin III-Bindungsstelle, ein Verlust der Fähigkeit Antithrombin III zu binden (331–334). Was theoretisch in einem Verlust der antikoagulativen Wirksamkeit resultieren müsste. Jedoch konnte, anhand von Messungen der partiellen Thromboplastinzeit, in einigen Studien gezeigt werden, dass RO-Heparin eine gewisse gerinnungshemmende Restaktivität besitzen kann. Diese ist in hohem Maße von der Konzentration abhängig. Eine Auswertung der spezifischen Literatur

4. Material und Methoden

führte zu der Erkenntnis, dass die antikoagulative Aktivität des Oxyheparins in den Konzentrationen 5 und 10 µg/mL als vernachlässigbar eingestuft werden kann (335).

Sofern ein Versuch mit anderen Konzentrationen durchgeführt wurde, sind diese aufgeführt. Für alle Experimente, außer für die EMT-Studien (UFH und Enoxaparin) und die Quantifizierung der α -Granulafreisetzung in fibrinfreiem Plasma (UFH, Fondaparinux), wurden stets alle Antikoagulantien verwendet.

Tabelle 14: Informationen zu den verwendeten Konzentrationen der Antikoagulantien(256,259,260,264,272).

Bezeichnung	Zugabe zu 1 mL Thrombozytenlösung	Endkonzentration	Referenzkonzentration
UFH-Arbeitslösung (500 I.E./mL)	2 µL	1 I.E./mL	0,8 I.E./mL
Tinzaparin-Arbeitslösung (500 I.E./mL)	2 µL	1 I.E./mL	1 I.E./mL
Enoxaparin-Arbeitslösung (500 I.E./mL)	2 µL	1 I.E./mL	1,1 I.E./mL
Fondaparinux-Arbeitslösung (125 µg/mL)	6,2 µL	775 ng/mL	500 ng/mL
Rivaroxaban-Arbeitslösung (20 µg/mL)	10 µL	200 ng/mL	7-273 ng/mL
Reduziertes Oxyheparin-Stammlösung (10 mg/mL)	0,5 µL	5 µg/mL	-
	1,0 µL	10 µg/ml	-

4.9 Thrombozytenisolation und -präparation aus Thrombozytenkonzentraten

Um nur den Kontakt von Thrombozyten und Tumorzellen vor einem koagulationsdefizienten Hintergrund abzubilden, war es erforderlich, Thrombozyten von plasmatischen Gerinnungsfaktoren zu trennen. Aufgrund technischer Limitationen bezüglich hämatologischer Arbeiten wurde im Rahmen einer Kooperation mit dem Universitätsklinikum Bonn eine stetige Versorgung mit Thrombozytenkonzentraten (TKZ) aufgebaut. Es wurden Konzentrate verwendet, welche ihr Haltbarkeitsdatum um einen Tag überschritten hatten. Die Funktionsfähigkeit der Thrombozyten wurde mittels Lichttransmissionsaggregometrie und Quantifizierungen der thrombozytären Granulasekretion geprüft. Die Lagerung erfolgte unter stetiger Bewegung bei 22°C auf einem

temperierbaren Laborschüttler. Die Konzentration der Thrombozyten im Konzentrat wurde routinemäßig von der Hämatologie der Uniklinik übermittelt. In der Regel lag sie im Bereich von $850-1500 \times 10^3$ Thrombozyten/ μL . Zur Extraktion wurde das benötigte Volumen bei 670 g für 10 min bei 25°C zentrifugiert und das Thrombozytenpellet stets so in Thrombozytenpuffer resuspendiert, dass eine Konzentration von 400×10^6 Thrombozyten/mL resultierte. Diese Thrombozytenkonzentration entspricht dem physiologisch möglichen Maximum (336). Der so hergestellte TRPu wurde mit einer CaCl_2 -Lösung (0,5 mol/L) so recalcifiziert, dass eine Endkonzentration von 1 mmol/L erreicht wurde (337).

4.10 Calceinbasierter Adhäsionsassay

Der calceinbasierte Adhäsionsassay wurde unter Verwendung von TRPu durchgeführt und es wurden die Zelllinien AsPC-1, MDA-MB-231, MV3 und PC-3 eingesetzt. Aufgrund der Abwesenheit der Blutgerinnungsfaktoren steht eine kontaktvermittelte Thrombozytenaktivierung im Vordergrund. Der Assay wird eingesetzt, um das Ausmaß der möglichen adhäsiven Wechselwirkungen zwischen Tumorzellen und Thrombozyten zu evaluieren, sowie den Einfluss von verschiedenen Antikoagulantien zu quantifizieren.

Der Versuch wurde an zwei Tagen durchgeführt. Am ersten Tag wurden die Tumorzellen entsprechend Abschnitt 4.7.2 abgelöst und am CASY® 1 Model TT Zellzähler gezählt. Das Tumorzellpellet wurde so im entsprechenden Medium resuspendiert, dass eine Konzentration von 1×10^6 Tumorzellen/mL resultierte. Anschließend wurden von dieser Tumorzellsuspension 100 μL je Well einer 96-Well Platte eingesetzt. Somit befanden sich in jedem Well 100.000 Tumorzellen. Über Nacht wurde eine Adhäsion in der Form eines Monolayers im Inkubator ermöglicht. Die Komposition der Proben einer Messung ist in Abbildung 10 illustriert.

Zu Beginn des zweiten Versuchstages wurde aus dem TKZ eine adäquate Menge entnommen, welche so gewählt wurde, dass nach der Resuspension im finalen Volumen Thrombozytenpuffer eine Konzentration von 400×10^6 Thrombozyten/mL vorlagen. Als nächstes wurde das TKZ so mit der Calcein-Acetoxy-methylester(Calcein-AM)-Arbeitslösung (1 mmol/L) versetzt, dass eine finale Konzentration von 2 $\mu\text{mol/L}$ Calcein-AM im TKZ resultierte. Es folgte eine Inkubation auf einem Laborschüttler unter Lichtausschluss für 30 min.

4. Material und Methoden

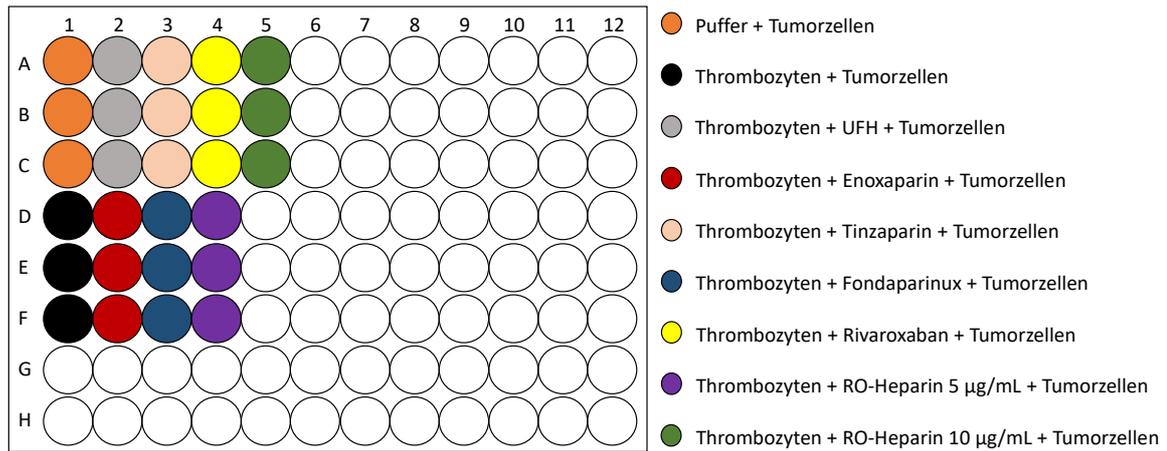


Abbildung 10: Darstellung des Pipettierschemas zur Durchführung eines Adhäsionsassays unter Verwendung von Calcein-AM. Der Boden der Wells war mit einem konfluenten Zellrasen bedeckt. Für jedes Antikoagulans wurde die experimentelle Standardkonzentration entsprechend Abschnitt 4.8 verwendet.

In Calcein-AM sind die Calcium-chelatisierenden Molekülanteile durch Acetoxymethylester abgeschirmt und ein Lacton verhindert die Entstehung eines durchkonjugierten π -Elektronen-Systems. Es ist lipophil, überwindet Zellmembranen und fluoresziert nicht. Nach intrazellulärer Aufnahme spalten Esterasen die Acetoxymethylester und das Lacton wird geöffnet. Das Resultat dieser enzymatischen Umwandlung, die nur durch lebendige Zellen vollführt werden kann, ist die Bildung eines fluoreszierenden konjugierten π -Elektronen-Systems und eine Calcium-Chelatisierung. Durch eine Zunahme der Hydrophilie und die Bildung des Chelatkomplexes kann das Molekül die Zellmembran nicht mehr überwinden, es verbleibt selektiv in lebendigen Zellen und markiert diese (338,339).

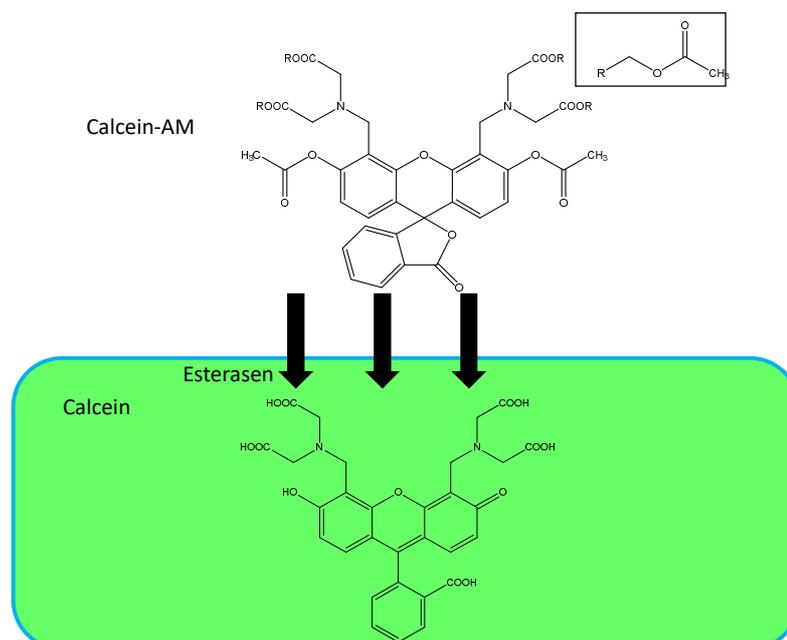


Abbildung 11: Prinzip der Fluoreszenz-Markierung einer Zelle durch Calcein-AM (340).

Die mit Calcein markierten Thrombozyten wurden stets unter Lichtausschluss gehandhabt, um eine max. Calcein-Fluoreszenz zu gewährleisten. Nachdem die Thrombozyten mit Calcein markiert wurden, erfolgte ihre Isolation aus dem TKZ via Zentrifugation bei 670 g für 10 min bei 25°C. In der Regel wurde so viel TKZ eingesetzt, dass es ausreichte um 5 mL TRPu mit einer Konzentration von 400×10^6 Thrombozyten/mL herzustellen. Nach der Resuspension wurde der TRPu recalcifiziert, hierzu wurde eine CaCl_2 -Lösung (0,5 mol/L) so eingesetzt, dass eine Endkonzentration von 1 mmol/L resultierte. Der TRPu wurde dann auf acht verschiedene Ansätze je 500 μL aufgeteilt, von diesen wurden sieben mit Antikoagulantien in ihren experimentellen Standardkonzentrationen versetzt und für 30 min inkubiert. Parallel wurden die mit Tumorzellen bewachsenen 96-Well-Platten dreimal mit DPBS gewaschen und die Zellviabilität lichtmikroskopisch geprüft. Nach der 30-minütigen Inkubationszeit wurden 100 μL je Well von den mit Antikoagulantien präinkubierten TRPUs auf die Tumorzell-Monolayer entsprechend Abbildung 10 aufgeteilt. Zusätzlich wurde nicht mit Antikoagulantien behandelte TRPu und Puffer als Negativkontrolle eingesetzt. Den Tumorzellen wurde im Rahmen einer Inkubationszeit von 15 min ermöglicht die Thrombozyten zu aktivieren, welche infolgedessen adhären konnten. Erneut wurden die Wells dreimal mit DPBS gewaschen, um ungebundene Thrombozyten zu entfernen. Das Adhäsionsverhalten der Thrombozyten wurde fluoreszenzmikroskopisch geprüft.

Bevor eine quantitative Messung der Fluoreszenzintensität erfolgen konnte, wurden die Zellen mit der 1 %igen Triton® X 100-Arbeitslösung lysiert. Je Well wurden 150 μL Triton® X 100-Arbeitslösung eingesetzt und es erfolgte eine 15-minütige Inkubation. Anschließend wurden pro Well 100 μL auf eine schwarze Nunc™ F96 MicroWell™ Platte überführt und an einem FLUOstar™ OPTIMA Multiwell Reader wurde die Fluoreszenzintensität (Exzitation 485 nm, Emission 520 nm) quantifiziert.

4.11 Quantifizierung der *tumor cell-induced platelet aggregation* mittels

Lichttransmissionsaggregometrie

Die Quantifizierung der TCIPA bzw. der Aggregatbildung zwischen Tumorzellen und Thrombozyten kann als Weiterentwicklung des Adhäsionsassays bzw. *in vivo* Annäherung an die hämatologische Metastasierung verstanden werden. Es wurden wieder die vier Tumorzelllinien AsPC-1, MDA-MB-231, MV3 und PC-3 geprüft. Es werden Interaktionen zwischen Thrombozyten und Tumorzellen in Lösung analysiert, welche zur Induktion einer

4. Material und Methoden

Thrombozytenaktivierung sowie Aggregatbildung führen. Zur Messung wird ein APACT 4004 Aggregometer der Firma Haemochrom verwendet, an dem ein modifizierter Thrombozytenaggregationstest nach Born durchgeführt wird. Die Modifikation besteht darin, dass die Thrombozyten resuspendiert in Thrombozytenpuffer und nicht in Plasma eingesetzt werden (341). Dementsprechend werden Effekte der Blutgerinnungsfaktoren vernachlässigt.

Es handelt sich um eine turbidimetrische Messung. Das Gerät detektiert durch Messung der Lichttransmission die Klarheit bzw. Trübung einer Suspension. Hierzu wird ein Lichtstrahl durch eine Küvette geleitet in der sich eine kontinuierlich gerührte Thrombozytensuspension befindet. Hinter der Küvette wird die durchgetretene Lichtintensität mittels eines LED-Photometers detektiert. Es wird also eine Änderung der Transmission in Abhängigkeit der Thrombozytenaggregation gemessen. Diese Korrelation ermöglicht die Erfassung einer Kinetik der Thrombozytenaggregation. Das Gerät besitzt vier Messkanäle also vier Küvettenstellplätze (341,342).

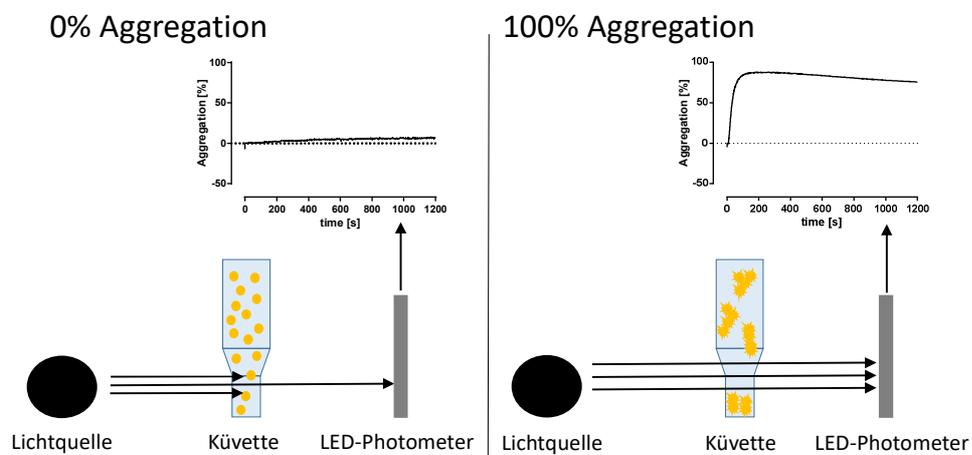


Abbildung 12: Strahlengang und Funktionsweise der Lichttransmissionsaggregometrie (341,342).

Zur Durchführung des Versuches wurden parallel Thrombozyten- und Tumorzellsuspensionen hergestellt und in den Küvetten des Aggregometers unmittelbar vor der Messung kombiniert. Der recalcifizierte TRPu wurde, wie in Abschnitt 4.9 beschrieben, aus TKZ hergestellt. Pro Ansatz bzw. Antikoagulans wurde ein TRPu Volumen von 1 mL gewählt, welches mit den Testsubstanzen in ihren experimentellen Standardkonzentrationen für 30 min präinkubiert wurde. Zur Aufdeckung konzentrationsabhängiger Effekte wurden von jedem Antikoagulans entsprechend Tabelle 15 mehrere Konzentrationen vermessen.

Tabelle 15: Informationen zu den eingesetzten Konzentrationen der Antikoagulantien.

Bezeichnung	Konzentration		
	1	2	3
UFH-Arbeitslösung (500 I.E./mL)	0,5 I.E./mL	1 I.E./mL	2 I.E./mL
Tinzaparin-Arbeitslösung (500 I.E./mL)	0,5 I.E./mL	1 I.E./mL	2 I.E./mL
Enoxaparin-Arbeitslösung (500 I.E./mL)	0,5 I.E./mL	1 I.E./mL	2 I.E./mL
Fondaparinux-Arbeitslösung (125 ng/mL)	387,5 ng/mL	775 ng/mL	1550 ng/mL
Rivaroxaban-Arbeitslösung (20 µg/mL)	100 ng/mL	200 ng/mL	400 ng/mL
Reduziertes Oxyheparin- Stammlösung (10 mg/mL)	5 µg/mL	10 µg/mL	100 µg/mL

Parallel dazu wurden Tumorzellen abgelöst, gezählt und in DPBS so resuspendiert, dass eine Tumorzellkonzentration von 1×10^5 Zellen/mL resultierte. Die eigentliche Messung am Aggregometer wurde mit einer Kalibrierung des Gerätes begonnen. Hierzu wurde erst durch die Messung von Thrombozytenpuffer ein Messwert für die 100%ige Transmission festgelegt, dieser Wert entsprach einer maximalen Aggregation und war für alle Messungen im entsprechenden Lösungsmittel am Versuchstag gültig. Direkt vor jeder Messung wurde spezifisch für die jeweilige Probe bzw. Küvette eine Messung der trüben, inaktivierten Suspensionen durchgeführt, welcher als Basislinie verwendet wurde und einer 0%igen Aggregation entsprach. Die Ausführung einer Messung umfasste die Vorlage von 200 µL TRPu in einer Küvette und die Zugabe von 20 µL Tumorzellsuspension, somit wurden pro 200 µL TRPu 2.000 Tumorzellen, also 10.000 Tumorzellen pro 1 mL TRPu eingesetzt. Direkt im Anschluss an das Vermischen beider Zellarten wurde die Messung gestartet. Zusätzlich wurde als Positivkontrolle eine Aktivierung der Thrombozyten mit dem synthetischen Thrombinrezeptor-Agonisten Thrombinrezeptor-aktivierendes-Peptid-6 (TRAP-6) durchgeführt. TRAP-6 wurde in einer Konzentration von 41,25 µmol/L verwendet. Die AFACT LPC-Software illustriert die Transmission der Thrombozytensuspension in Abhängigkeit der Messzeit in Form eines Diagramms, dass im Verlauf der Messung von 0 % auf maximal 100 % anstieg.

4.12 Quantifizierung der thrombozytären Granulasekretion

Als weiterer Parameter zur Quantifizierung einer Inhibition der Tumorzell-Thrombozyten-Kommunikation durch Antikoagulantien wurde die Freisetzung der thrombozytären Granula induziert durch Tumorzellen und der Einfluss von Antikoagulantien auf diese untersucht. Zu den thrombozytären Granula zählen die dichten-, die α - und die lysosomalen-Granula (343). Zur Analyse der ATP-Freisetzung aus den dichten-Granula wurde ein Luciferaseassays verwendet. Zur Quantifizierung der α -Granulafreisetzung wurde die Sekretion verschiedener Wachstumsfaktoren mittels ELISA-Technik untersucht (344,345). Wieder wurden die Zelllinien AsPC-1, MDA-MB-231, MV3 und PC-3 verwendet.

4.12.1 Thrombozytenaktivierung

Zur Quantifizierung der thrombozytären Granulasekretion wurden Thrombozyten durch den Kontakt mit Tumorzellen aktiviert, anschließend wurde der Überstand gesammelt und analysiert. Dafür wurde recalcifizierter TRPu verwendet und für 30 min mit den zu testenden Antikoagulantien in ihren Standardkonzentrationen entsprechend Abschnitt 4.8 inkubiert. Während der Inkubationszeit wurden die Tumorzellen abgelöst, gezählt und anschließend in DPBS in einer Konzentration von 1×10^6 Tumorzellen/mL resuspendiert. Zur Resuspension wurde DPBS verwendet, da in der Regel alle Zellkulturmedien fötales Kälberserum enthalten, das folgende Quantifizierungen gestört hätte. Nach der Inkubation mit den Antikoagulantien erfolgte die Aktivierung. Die mit Antikoagulantien präparierten TRPUs wurden mit der Tumorzellsuspension in einer Konzentration von 1×10^4 Tumorzellen pro mL TRPu versetzt. Zusätzlich wurde als Positivkontrolle eine Aktivierung der Thrombozyten mit TRAP-6 durchgeführt. TRAP-6 wurde in einer Konzentration von 41,25 $\mu\text{mol/L}$ verwendet.

Sofern eine Quantifizierung der α -Granulafreisetzung via ELISA durchgeführt werden sollte, wurden die Tumorzell-Thrombozyten-Suspensionen für 15 min bei 37°C inkubiert und anschließend zur Isolation des Thrombozytensekretoms bei 17880 g für 10 min zentrifugiert. Dann wurde der Überstand abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C gelagert.

Sollte aber die ATP-Freisetzung aus den dichten-Granula via Luciferaseassay quantifiziert werden, mussten die Tumorzell-Thrombozyten-Suspensionen direkt nach der Vereinigung entnommen und für den Luciferaseassay verwendet werden. Abbildung 13 illustriert die

Zusammensetzung der Proben für die Quantifizierungen der Freisetzung der dichten-Granula und der α -Granula.

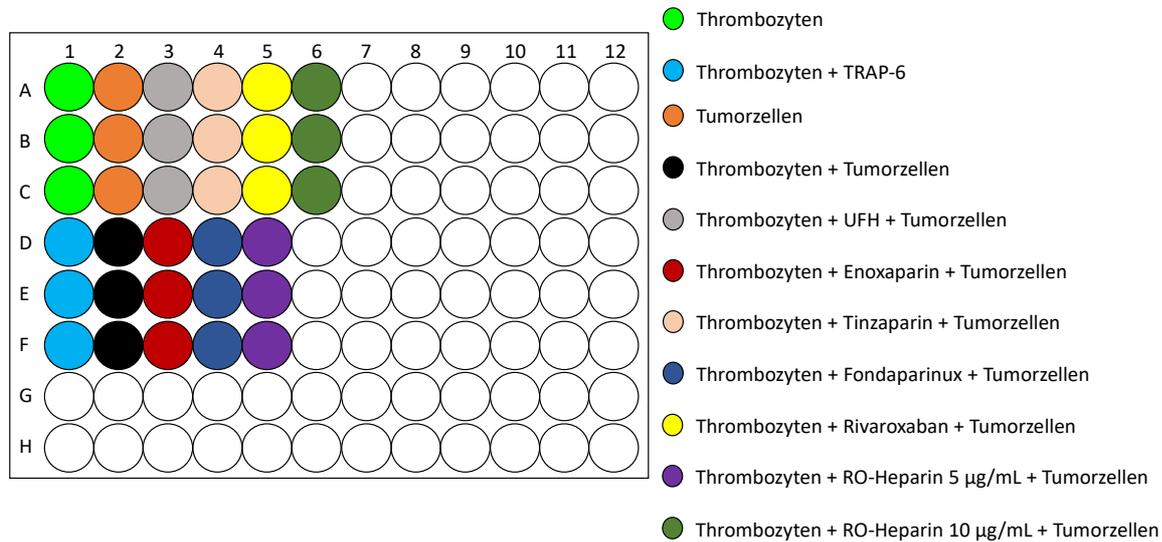


Abbildung 13: Darstellung des Pipettierschemas zur Durchführung der Quantifizierung der Freisetzung der dichten- und der α -Granula. Es wurden die experimentellen Standardkonzentration der Antikoagulantien entsprechend Abschnitt 4.8 verwendet.

4.12.2 Quantifizierung der ATP-Freisetzung aus den dichten-Granula

ATP wird in Thrombozyten in den dichten-Granula gespeichert. Das Prinzip der Messung basiert auf einer ATP-abhängigen Umwandlung von D-Luciferin zu Oxiluciferin. Diese wird katalysiert durch das Enzym Firefly Luciferase und generiert ein Biolumineszenzsignal. Zusammengefasst läuft folgende Reaktion ab, unter ATP-Verbrauch wird ein angeregtes Luciferinadenylat gebildet, welches unter CO_2 Verbrauch und Lichtemission in Oxiluciferin zerfällt. Die Lichtintensität ist proportional zur Oxiluciferin Menge und diese wiederum zur ATP Menge (346).

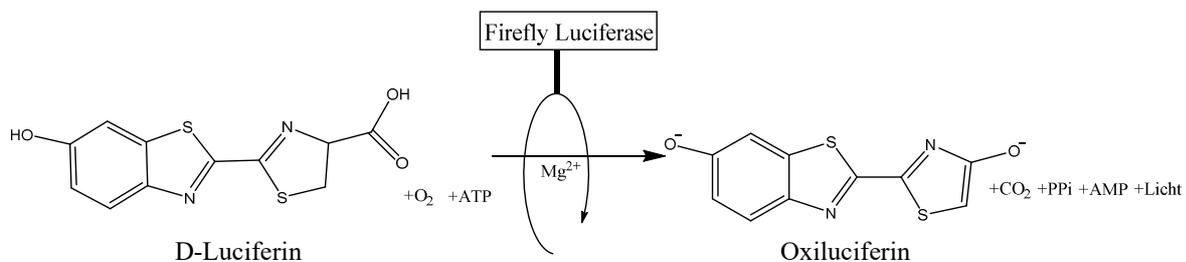


Abbildung 14: Umwandlung von D-Luciferin zu Oxiluciferin durch *Firefly Luciferase* (347).

Die Quantifizierung wurde unter Verwendung eines *ATP-Determination-Kits* der Firma ThermoFisher durchgeführt. Jegliche Arbeitsschritte in die D-Luciferin und die Firefly Luciferase involviert waren, wurden unter Lichtausschluss durchgeführt. Die Zusammensetzung der ATP-Assay Lösung entsprach den Anweisungen des Herstellers und ist in Abschnitt 4.1.5 zu finden. Die Proben und Tumorzellsuspensionen wurden entsprechend Abschnitt 4.12.1 präpariert. Direkt nach der Vereinigung von Thrombozyten und Tumorzellen, wurden 50 µL dieser Lösung in eine weiße Nunc™ F96 MicroWell™ Platte überführt und mit 50 µL der ATP-Assay Lösung versetzt. Die Messung der Biolumineszenz erfolgte zügig an einem FLUOstar Optima Plattenleser bei einer Wellenlänge von 560 nm. Zur Aufnahme einer Freisetzungskinetik erfolgte die Messung über 15 min mit einer Geschwindigkeit von einer Fluoreszenzmessung pro Minute.

Die Ergebnisse wurden auf die ATP-Freisetzung induziert durch TRAP-6 Stimulation normalisiert. Sie wurde als maximal mögliche Freisetzung angenommen und als 100 %ige Freisetzung eingesetzt. Die anderen Werte werden als prozentuale Anteile dieser dargestellt.

4.12.3 Quantifizierung der α -Granulafreisetzung mittels *enzyme-linked*

immunosorbent assays

Zur Quantifizierung der Freisetzung wurden verschiedene in den α -Granula gespeicherte Wachstumsfaktoren ausgewählt (191–195,348). Es wurden verschiedene ELISA-Kits verwendet, die alle gemäß den Anweisungen der Hersteller durchgeführt wurden. Die einzige Abweichung von den Herstelleranweisungen war die Verwendung von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) zur Detektion. Für VEGF, EGF, PDGF-B, CXCL5 und CXCL7 wurden Kits mit unvorbereiteten Platten verwendet. Für TGF- β 1 und für HGF wurden Kits verwendet, die bereits mit Antikörper beschichtete Platten enthielten. Da es zwischen den einzelnen ELISA-Kits zahlreiche Konzentrationsunterschiede der einzelnen Komponenten gibt, wird an dieser Stelle auf die Herstelleranweisung verwiesen und nur die allgemeine Durchführung erläutert.

Es handelte sich um *sandwich* ELISAs, welche alle unter Verwendung von TMB ausgewertet wurden (349). Entweder war TMB in den Kits enthalten oder es wurde eine 1-Step® Ultra TMB-ELISA Substrat Lösung verwendet. Diese wurde entgegen den Herstelleranweisungen, welche die Verwendung von 2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS)

vorgaben, eingesetzt. Grund für diesen Austausch war eine größere Sensitivität des TMB (350).

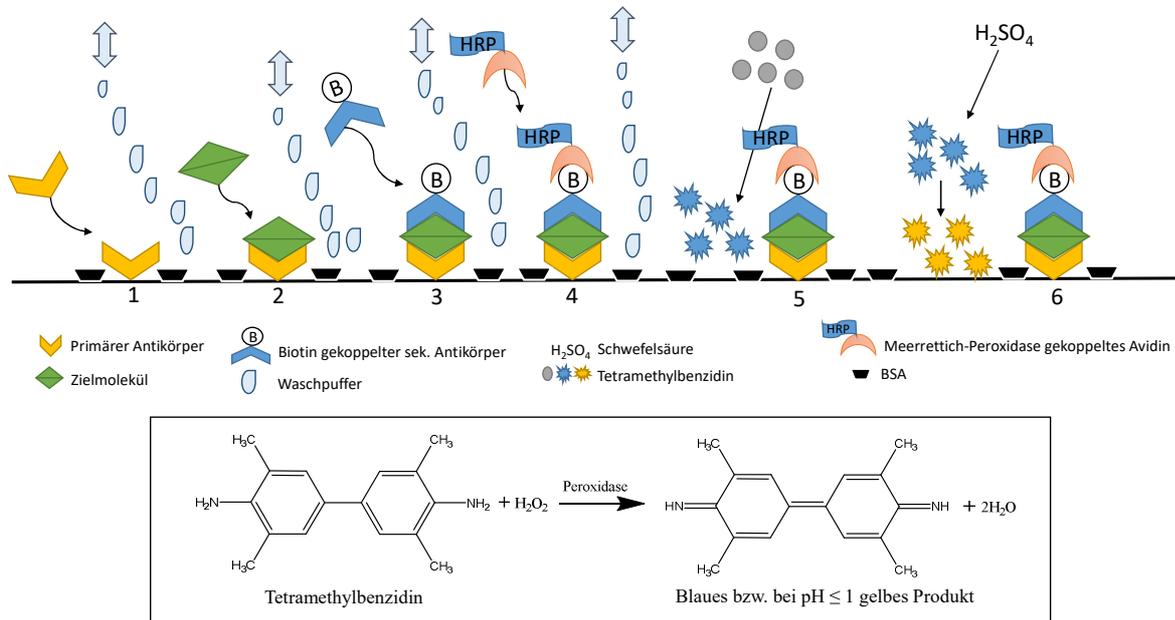


Abbildung 15: Funktionsweise eines Sandwich-ELISAs sowie die Umwandlung von Tetramethylbenzidin (349,351).

Die Durchführung eines ELISAs umfasste entweder drei Tage, wenn die 96-Well-Platte beschichtet werden musste, oder zwei Tage bei der Verwendung von ELISA-Kits mit bereits beschichteten Platten. Am ersten Versuchstag wurde eine Nunc-Immuno® MicroWell® 96-Well-Platte mit einem primären Antikörper beschichtet und über Nacht bei RT inkubiert. Der primäre Antikörper wurde in ELISA-Diluent gelöst.

Am zweiten Versuchstag wurden die Wells dreimal mit ELISA-Waschpuffer gewaschen und mit der ELISA-Blockierungslösung versetzt. Es folgte eine Inkubation von einer Stunde mit der Blockierungslösung und erneut ein dreimaliges Waschen der Wells. Die Blockierungslösung enthielt bovines Serumalbumin (BSA), welches unspezifische Bindungsstellen in den Wells blockierte. Während der Inkubation mit der Blockierungslösung wurde eine adäquate Kalibrierung erstellt. Diese setzte sich zusammen aus acht Lösungen, welche linear absteigende Konzentrationen des zu quantifizierenden Moleküls enthielten. Der geringste Wert der Kalibrierung wurde stets durch zusatzfreien ELISA-Diluent repräsentiert. Die Konzentrationen orientierten sich an den zu erwartenden Quantitäten in Thrombozyten. Zusätzlich wurden die Proben entsprechend den zu erwartenden Quantitäten adäquat mit ELISA-Diluent verdünnt. Für folgende Messungen mussten die Proben verdünnt werden: TGF- β 1 (1:280), PDGF-B (1:10), VEGF (1:4), CXCL5 (1:8) und

CXCL7 (1:4000). Durch die Verdünnung wurde gewährleistet, dass die späteren Messungen im linearen Bereich des Lambert-Beer'schen Gesetzes lagen und somit quantitative Aussagen getroffen werden konnten. Nach der Blockierung und dem Waschen wurden Kalibrierung und Proben zu je 100 μL pro Well auf die Platte aufgebracht. Anschließend erfolgte eine Inkubation über Nacht im Kühlschrank. Während dieser wurde das Zielmolekül vom immobilisierten primären Antikörper via Fab-Fragment (*fragment antigen binding*) gebunden.

Am dritten Tag erfolgten erneut ein dreimaliges Waschen der Wells und die Zugabe des sekundären Antikörpers. Dieser band das Zielmolekül ebenfalls über sein Fab-Fragment und war am Fc-Fragment (*fragment crystallisable*) biotinyliert. Nach einer zweistündigen Inkubation erfolgten erneut ein dreimaliges Waschen und die Zugabe einer Meerrettichperoxidase, die je nach Kit an Avidin oder Streptavidin gekoppelt war. Dann wurde wieder für 30 min inkubiert und Avidin bzw. Streptavidin banden das am sekundären Antikörper lokalisierte Biotin. Erneut wurde dreimal gewaschen. Schließlich wurde zur Farbentwicklung eine TMB-Lösung hinzugefügt und für 15 Minuten inkubiert. Die Farbreaktion wurde mit Schwefelsäure (2 mol/L) gestoppt und die Platte wurde unverzüglich photometrisch bei einem Absorptionsmaximum von 450 nm an einem Multiskan® EX Plattenleser ausgewertet. Die gemessene Absorption war proportional zur umgesetzten TMB-Menge, welche wiederum von der Quantität des Zielmoleküls abhing. Weiterhin wurde zur Korrektur der Absorption eine Messung bei 570 nm durchgeführt, um Absorptionen, die nicht auf Enzym-Substrat-Reaktionen basieren, zu detektieren.

Zur Auswertung wurde für jeden Messwert die Differenz aus Messwert-Absorption und Lösungsmittel-Absorption gebildet. Erst dann wurden die Konzentrationen des Zielmoleküls mit Hilfe der Kalibrierung errechnet. Da eine Aktivierung mit TRAP-6 einer vollständigen Thrombozytenaktivierung entspricht, wurden die Ergebnisse der Proben normalisiert auf die Freisetzung induziert durch TRAP-6. Die Messwerte der TRAP-6-Stimulation wurden als 100 % Sekretion betrachtet und die anderen als prozentualer Anteil dieser berechnet.

4.13 Tube Formation Assay

Da ein Teil der durch Tumorzellen thrombozytär-freigesetzten Mediatoren pro-angiogenetisch wirkt und Tumorzellen von einer ausgeprägten Angiogenese profitieren, wurde zur Quantifizierung der Angiogenese ein Tube Formation Assay durchgeführt. Er soll

die inhibitorischen Effekte der Antikoagulantien hinsichtlich der Freisetzung der Granula auf funktioneller Ebene bestätigen. Im Rahmen dieses Versuches wird das pro-angiogenetische Potential, der nach Abschnitt 12.1 erzeugten und quantifizierten, Thrombozytensekretome geprüft. Die Zusammensetzung der Proben entspricht Abbildung 13, zusätzlich wurde ein VEGF-ELISA-Standard als Positivkontrolle eingesetzt.

Als zelluläres Messsystem wurden immortalisierte EA.hy926 Endothelzellen verwendet. Diese werden in Kontakt mit Angiogenese-induktoren gebracht und bilden infolgedessen kapillarähnliche Strukturen aus. Zu Beginn des Versuches wurden die Wells einer Cyto One 96-Well-Platte mit Geltrex[®], einer der Basalmembran ähnlichen Substanz, beschichtet. Geltrex ist frei von Wachstumsfaktoren, enthält aber alle wichtigen Bestandteile der Basalmembran wie z. B. Laminin, Kollagen IV und Heparansulfat-Proteoglykane. Es gewährleistete eine gute Migrationsfähigkeit der Endothelzellen.

Zur Beschichtung wurde das Geltrex[®], welches bei -80°C gelagert wurde, über Nacht im Kühlschrank aufgetaut. Anschließend erfolgte die Beschichtung der Wells unter aseptischen Bedingungen in einer Laminar-Air-Flow Werkbank. Pro Well wurden entsprechend der Grundfläche von 29 cm^2 29 μL Geltrex[®] verwendet. Es wurde darauf geachtet, eine homogene Matrix frei von Luftblasen zu erzeugen. Die Geltrex[®]-Matrix wurde für 30 min bei 37°C verfestigt. Während der 30 min wurden die EA.hy926 Zellen mit EDTA/Trypsin abgelöst. Es folgte ein dreimaliges Waschen der Zellen mit DPBS, um im Medium bzw. im fetalen Kälberserum (FKS) enthaltene Wachstumsfaktoren zu entfernen. Anschließend wurde eine Zellzählung mit dem CASY[®] 1 Model TT Zellzähler durchgeführt. Die Zellsuspension wurde in einer Konzentration von 35×10^3 Zellen/58 μL mit FKS-freiem Ea.hy926 Nährmedium hergestellt. Je Geltrex[®]-Well wurden 58 μL Zellsuspension hinzugefügt und homogen verteilt. Nach einer mikroskopischen Kontrolle wurden 45 μL , der auf RT erwärmten Proben in die Wells pipettiert. Es wurde stets darauf geachtet, dass beim Pipettieren nicht die Geltrex[®]-Matrix berührt wurde. Als Positivkontrolle wurde die Zugabe der Probe ersetzt durch die Zugabe von 12 μL VEGF-ELISA-Standard, wodurch eine finale Konzentration von 210 ng/mL VEGF erreicht wurde. Schließlich wurden die so präparierten EA.hy926 Zellkulturen für 24 Stunden inkubiert, um eine Formation der Kapillarstrukturen zu ermöglichen.

Die Auswertung erfolgte, indem lichtmikroskopisch Verzweigungen mit mindestens drei Abzweigungen, sogenannte *branchpoints*, gezählt wurden. Zusätzlich wurden

lichtmikroskopische Bilder der Wells angefertigt. Die Ergebnisse wurden wieder so normalisiert, dass die Tube Formation assoziiert mit einer TRAP-6 Stimulation der Thrombozyten als 100 % Formation eingestuft wurde. Die anderen Proben bzw. Messwerte werden als prozentualer Anteil dieser berechnet (352,353).

4.14 Induktion der Epithelial-mesenchymalen Transition durch Thrombozyten

Zur Induktion einer EMT wurden Tumorzellen in Kontakt mit Thrombozyten gebracht und 72 Stunden inkubiert. UFH und Enoxaparin wurden bezüglich ihrer inhibitorischen Eigenschaften hinsichtlich einer EMT-Induktion durch Thrombozyten getestet. Beide wurden in den experimentellen Standardkonzentrationen verwendet. Im Gegensatz zu den vorangegangenen Versuchen, in welchen stets alle unter Abschnitt 4.6 genannten Tumorzellen analysiert wurden, erfolgte die Durchführung der EMT-Studien nur an AsPC-1 Pankreaskarzinom Zellen und PC-3 Prostatakarzinom Zellen.

Der Versuch wurde begonnen, wenn vier Tumorzellkulturen einer Zellart in T75 Zellkulturflaschen eine Konfluenz von ca. 90 % erreicht hatten. Dann wurden 20 mL recalcifizierter TRPu hergestellt und zu je 5 mL auf drei Ansätze aufgeteilt. Von diesen Ansätzen wurde einer nicht behandelt, einer mit UFH und einer mit Enoxaparin in den entsprechenden Standardkonzentrationen versetzt. Es folgte eine Koinkubation von Antikoagulantien und Thrombozyten für 30 Minuten.

Anschließend wurden die Zellkulturen mit DPBS dreimal gewaschen um tote Zellen zu entfernen. Daraufhin wurden je Zellkulturflasche entweder 5 mL Thrombozytenpuffer, 5 mL TRPu oder 5 mL TRPu präinkubiert mit Antikoagulans hinzugefügt. Zu jedem Ansatz wurden 5 mL des entsprechenden Nährmediums gegeben, um optimale Wachstumsbedingungen für die Zellen zu gewährleisten. Somit wurde eine Kultur mit Puffer, eine mit Thrombozyten und zwei mit Thrombozyten und Antikoagulans inkubiert. Zur Induktion der EMT wurden die so präparierten Zellkulturen 72 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Es erfolgte eine lichtmikroskopische Kontrolle der Zellviabilität. Nach drei Tagen wurden die Zellkulturen mit DPBS sechsmal gewaschen, vorsichtig mit einem Zellschaber abgelöst und in Zentrifugenröhrchen überführt. Es erfolgte eine Pelletierung via Zentrifugation bei 670 g und 4°C für 4 min. Das Pellet wurde einmal zwecks Aufreinigung in 10 mL DPBS resuspendiert und erneut bei den genannten Bedingungen zentrifugiert. Die Zellpellets wurden dann entweder für eine mRNA-Extraktion oder für eine Zellyse zur Proteinanalytik verwendet.

4.15 Quantifizierung der Epithelial-mesenchymalen Transition auf mRNA-Ebene mittels quantitativer Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

Die Erläuterung der Durchführung der quantitativen Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) wird gegliedert in fünf Unterabschnitte; der Erste behandelt die Grundlagen der Messung, der Zweite die praktische Durchführung, der Dritte die Validierung der Messung, der Vierte die housekeeping-Gen-Auswahl und der Fünfte beleuchtet die Auswertung und Ergebnisberechnung. Alle Arbeiten wurden entweder auf mit 70 %igem Isopropanol gesäuberten Oberflächen oder unter der Laminar-Air-Flow Werkbank durchgeführt. Es wurde stets ein Mundschutz getragen und alle Materialien, die in direkten Kontakt mit DNA oder RNA kamen waren entsprechend gesäubert bzw. vom Hersteller für diese Arbeiten vorgesehen. Außerdem wurde nur nukleasefreies Wasser verwendet.

4.15.1 Grundlagen der Messung

Es handelt sich um eine Technik, die es ermöglicht eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in Echtzeit zu verfolgen bzw. zu quantifizieren. Hierzu wird RNA isoliert, aufgereinigt, mit einer Reversen-Transkriptase in DNA umgewandelt und als Matrize bzw. Vorlage für die Vervielfältigung verwendet. Während der PCR wird die Matrize mit einer hitzebeständigen Polymerase in Gegenwart spezifischer Startermoleküle sogenannter Primer und allgemeiner Nukleotide umgesetzt. Die Primer sind kurze Oligonukleotide und binden die Matrizen-DNA an spezifischen Positionen. Sie stellen die Bindungsstelle der Polymerase dar und sind somit Ausgangspunkt der DNA-Synthese. Die Reaktion wird in drei temperaturabhängige Phasen eingeteilt. Die Denaturierung, in welcher der Matrizen-Doppelstrang durch Erhitzen auf 95°C in Einzelstränge geteilt wird. Darauf folgt das sogenannte Annealing, bei dem die Primer bei 50°C - 65°C an die DNA-Matrize binden. Schließlich erfolgt die Elongation, in welcher bei ca. 70°C die Polymerase aktiviert wird und den zur Matrize komplementären DNA-Strang synthetisiert.

Diese drei Phasen werden als ein Zyklus zusammengefasst. Da die Erstellung einer DNA-Kopie via PCR, die sogenannte Amplifikation, exponentiell verläuft, sind stets mehrere Zyklen notwendig, um ausreichend DNA für eine Quantifizierung zu generieren.

Bei der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten qRT-PCR wurde der in die DNA interkalierende fluoreszierende Farbstoff SYBR Green zugesetzt. Sobald eine Interkalation in die DNA-Helix erfolgt, verstärkt sich die Fluoreszenz von SYBR Green ca. um den Faktor 1.000. Die Fluoreszenz wird kontinuierlich in Echtzeit während der PCR gemessen.

Der eigentliche Messwert der qRT-PCR ist der sogenannte *threshold cycle* (C_T -Wert). Dieser beschreibt den Zyklus an dem erstmalig genug DNA vorliegt und dementsprechend genug SYBR Green interkalieren konnte, um eine so starke Fluoreszenzintensität zu erzeugen, dass ein festgelegter Schwellenwert der sogenannte *threshold* überschritten werden konnte. Somit wird parallel zur PCR eine DNA-Quantifizierung ermöglicht (354,355).

4.15.2 Praktische Durchführung

Die Proben bzw. Zellen wurden, entsprechend Abschnitt 4.14, erzeugt und unter Verwendung des RNA-Isolations Kits der Firma Zymo Research isoliert. Hierzu wurden die Zellpellets in 500 μ L TRI Reagent[®] gelöst, gemischt und für 5 min inkubiert. Das TRI Reagent[®] inhibiert RNasen und lysiert Zellen. Es folgte eine Separation der zellulären Bestandteile durch eine Zentrifugation bei 12.000 g für 1 min. Der klare Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 μ L Ethanol (96 %) versetzt. Dieser Mix wurde in eine Zymo-Spin[™] IIC Säule gegeben, die auf einem Sammelröhrchen aufgesteckt war und bei 12.000 g für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Zymo-Spin[™] IIC Säule wurde auf ein neues Sammelröhrchen gesteckt. Die mRNA wurde in der Säule immobilisiert. Es folgte eine Beladung der Säule mit 400 μ L Direct-zol RNA PreWash-Puffer und eine erneute Zentrifugation bei 12.000 g für 1 min. Dieser Arbeitsschritt wurde einmal wiederholt. Erneut wurde das Sammelröhrchen gewechselt. Dann wurde die Säule mit 700 μ L RNA Waschpuffer beladen und bei 12.000 g für 2 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde wieder verworfen und das Sammelröhrchen erneuert. Schließlich wurde die immobilisierte mRNA mit 50 μ L nukleasefreien Wasser aus der Säule eluiert. Sie konnte dann bei -80°C gelagert oder weiter prozessiert werden.

Unter Verwendung eines Colibri Microvolume Spectrometer wurde eine photometrische Konzentrationsbestimmung der mRNA in den jeweiligen Proben durchgeführt. Es wurde darauf geachtet, dass der Proteinkoeffizient (A_{260}/A_{280}) zwischen 1,90-2,10 und die Konzentration an mRNA zwischen 500-1500 ng/ μ L lag.

Nach der Konzentrationsbestimmung erfolgte eine Aufreinigung zur Entfernung störender DNA. Hierzu wurde aus jeder Probe ein Ansatz hergestellt, der 2 µg RNA enthielt. Diese wurden mit 2 µL zehnfachen MgCl₂ Reaktions-Puffer und 2 µL DNase I (RNase frei) versetzt und auf 20 µL mit nukleasefreiem Wasser aufgefüllt. Es folgten zwei Inkubation im Thermomixer comfort, die erste bei 37°C für 30 min und die zweite nach der Zugabe von 2 µL Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Lösung (50 mM) bei 65°C für 10 min. DNase I katalysiert den Abbau von DNA. Da zur Inaktivierung der DNase I Temperaturen über 60°C erforderlich sind, musste EDTA hinzugefügt werden, um eine temperaturbedingte Hydrolyse der mRNA, in Gegenwart von ungebundenem Magnesium zu vermeiden.

Nach dieser Aufreinigung erfolgte die reverse Transkription, wodurch die mRNA in DNA umgewandelt wurde. Hierzu wurden aus jeder Probe zwei Ansätze hergestellt, die je 1 µg RNA enthielten. Dementsprechend wurde der 22 µL umfassende Ansatz geteilt und je mit 4 µL fünffachem iScript Advanced Reaction Mix versetzt. Zu einem der 1 µg-Ansätze wurde 1 µL iScript Advanced reverse Transkriptase hinzugefügt und zum anderen 1 µL nukleasefreies Wasser. Schließlich wurden beide Ansätze mit nukleasefreiem Wasser auf 20 µL aufgefüllt. Die reverse Transkription wurde am Thermomixer comfort mit folgendem Programm durchgeführt, 46°C für 20 min und 95°C für 1 min. Die Verteilung der Probe auf zwei Ansätze und die Tatsache, dass nur ein Ansatz eine reverse Transkriptase enthält, dient der Kontrolle. Der Ansatz ohne reverse Transkriptase wird mit vermessen und darf keine nachweisbare DNA enthalten. Außerdem wird das verwendete nukleasefreie Wasser vermessen und darf ebenfalls keine DNA enthalten. Die neugebildete DNA wurde schließlich so mit nukleasefreiem Wasser verdünnt, dass 5 ng DNA in 2 µL vorlagen. Diese Proben konnten bei -80°C gelagert werden.

Bevor die eigentliche Messung durchgeführt wurde, mussten die primerspezifischen Mastermixturen (Primer-Arbeitslösungen) hergestellt werden. Zur Quantifizierung der EMT wurden folgende Primer eingesetzt human Snail homolog 1 (Snail1), human Snail homolog 2 (Slug), human Vimentin (Vim), human Twist homolog 1 (Twist1) und human zinc finger E-box binding homeobox 2 (Zeb2). Die Herstellung und Konzentration sind in Abschnitt 4.1.5 erläutert. Hierzu wurde errechnet, wie viele Wells benötigt werden und der sich ergebende Faktor mit den benötigten Mengen für ein Well multipliziert. Für ein Well wurden 7,5 µL SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix, 0,75 µL *forward/reverse* Primer Mix und 4,75 µL nukleasefreies Wasser benötigt. Die fertigen primerspezifischen Mastermixturen

4. Material und Methoden

wurden in die Wells einer Hard-Shell® 96-Well PCR Platte überführt, pro Well wurden 13 µL eingesetzt. Anschließend wurden 2 µL Probe hinzugefügt und die PCR Platte mit einem Microseal® 'B' PCR Plate Sealing Film verschlossen.

Die Platte wurde in einem DNA Engine Opticon™ System mit folgendem Programm prozessiert; 95°C für 3 min und anschließend 50 Zyklen mit 95°C für 20 s, 60°C für 20 s und 68°C für 40 s. Um die Anzahl erstandener PCR-Produkte zu quantifizieren, wurde nach der Prozessierung der DNA und der Messung der Fluoreszenz, eine Bestimmung der Schmelzpunkte der PCR-Produkte vorgenommen. Dafür wurden die PCR-Produkte von 30°C auf 95°C erhitzt und es wurde alle 0,5°C die Fluoreszenzintensität gemessen. Zwischen den Messungen wurde die Temperatur jeweils für 0,5 s gehalten.

4.15.3 Validierung der Messung durch die Bestimmung der Effizienz

Die Effizienz sollte in der exponentiellen Phase der PCR-Reaktion 100 % betragen. Dies bedeutet, dass sich der C_T -Wert bei einer Verdopplung der DNA-Ausgangsmenge um Eins verringert. Die Effizienz einer PCR-Reaktion wird bestimmt, indem eine DNA-Verdünnungsreihe erstellt und vermessen wird. Anschließend werden die gemessenen C_T -Werte und die entsprechenden logarithmierten DNA-Quantitäten als Graph dargestellt. Anhand der Steigung der Geraden kann die Effizienz (E) errechnet werden. Eine Effizienz im Bereich von 90 % - 110 % wurde akzeptiert (354–356). Es wurden repräsentative Effizienz-Bestimmungen für die vier verschiedenen Proben je Zelllinie durchgeführt. Abbildung 16 zeigt ein Beispiel und Formeln zur Berechnung der Effizienz. Alle Effizienzen lagen im akzeptablen Bereich.

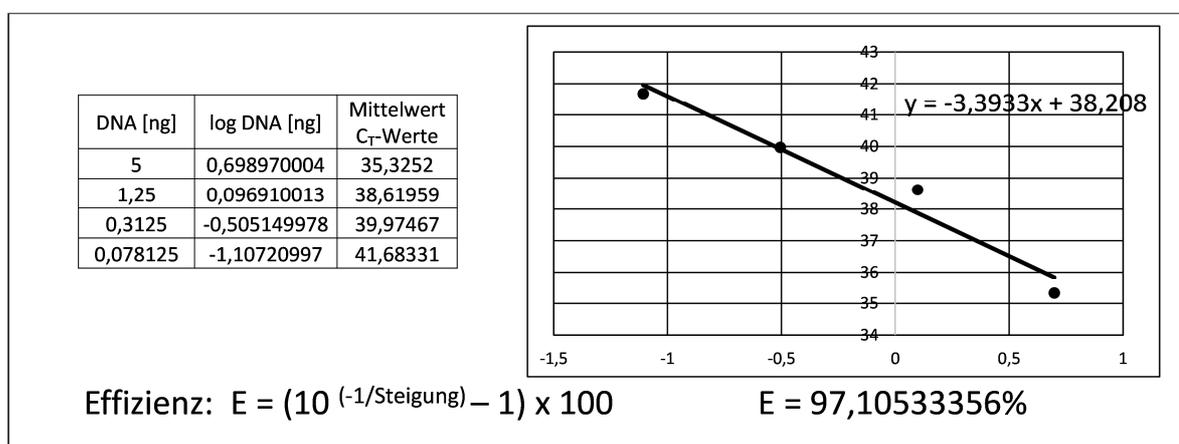


Abbildung 16: Beispiel zur Effizienz Ermittlung und Berechnung

4.15.4 Die housekeeping-Gen-Auswahl

Als housekeeping-Gene (HKG) werden die Gene bezeichnet, die zur Normalisierung der Proben verwendet werden. Ein HKG wird von allen Zellen in einer Messung idealerweise in ähnlicher Quantität und Stabilität exprimiert. Es ermöglicht, Unterschiede in der eingesetzten Ausgangsmenge der DNA zu erkennen. Ein Unterschied der C_T -Werte zwischen zwei Proben ist nur relevant, wenn die C_T -Werte der HKGs nahezu identisch sind. Das zu quantifizierende Gen wird als *gene of interest* (GOI) bzw. Kandidatengen bezeichnet. Um eine aussagekräftige qRT-PCR durchzuführen, sollten in jeder Messung mehrere HKGs vermessen werden, standardmäßig wurden drei pro Messung und Probe verwendet.

Da die Expression zwischen verschiedenen Zellarten und in Abhängigkeit der Behandlung der Zellen variieren kann, muss eine sinnvolle Auswahl vor der eigentlichen Messung getroffen werden. Ein ideales HKG wird in seiner Expression durch die Behandlung nicht tangiert und stabil exprimiert. Unter Verwendung des in Microsoft Excel eingebetteten Programms geNorm, entwickelt von Vandesompele et al., können zur HKG-Validierung Expressionsverhältnisse verschiedener HKGs verglichen werden. Das Programm ermittelt einen Gen-Stabilitätswert M. Je kleiner M, desto stabiler ist die Expression. Schließlich werden die drei Gene als HKG ausgewählt, die die kleinsten M-Werte aufweisen (354,355). Die Eingabe der C_T -Werte in geNorm erfolgt als sogenannte Quantities. Die Berechnung und ein Beispiel sind in Abbildung 17 dargestellt.

C_T Mittelwert = $\frac{C_{T1} + C_{T2}}{2}$		β -Aktin	GAPDH	β -2 Makroglobulin	RPL13 Set 1	RPL13 Set 2	
	Mittelwert C_T	Puffer	20,4455585	19,86637	45,029425	30,097585	22,677895
		Thrombozyten	19,621815	18,65517	42,65625	30,1763	21,900435
$\Delta C_T = C_{Tmin} - C_{Tmax}$							
	ΔC_T	Puffer	0,8237435	1,211195	2,373175	0,078715	0,77746
		Thrombozyten	0	0	0	0	0
Quantity (Q) = $2^{\Delta C_T}$							
	Quantities	Puffer	1,76999281	2,315293	5,180800392	1,05607698	1,71411036
		Thrombozyten	1	1	1	1	1
geNorm Eingabe							
	M-Werte	0,482281296	0,550774	1,167006645	0,86102864	0,49046314	
geNorm Eingabe							
	M-Werte	0,277837221	0,460484		0,60722877	0,27783722	

Abbildung 17: Beispiel zur housekeeping-Gen-Auswahl; Berechnung und Eingabe in geNorm .

Für diese Arbeit wurde eine Vorauswahl, basierend auf Studien zur HKG-Expression in humanen Geweben, durchgeführt (357). Somit wurden zusätzlich zu den klassischen HKGs β -Aktin (β -Act) und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), β -2-Mikroglobulin (B2M) sowie zwei Primer Sets des ribosomalen Proteins L 13 (RPL13) ausgewählt.

Die C_T -Werte wurden gemessen, die Quantities errechnet und via geNorm die drei, in ihrer Expression stabilsten HKGs ausgewählt und für die Messung verwendet.

4.15.5 Auswertung und Ergebnisberechnung

Der benötigte bzw. detektierte Messwert der qRT-PCR ist der C_T -Wert. Die Opticon™ monitor analysis software illustriert die Ergebnisse als Fluoreszenzkurve, an der dieser Wert abzulesen ist. Es wird die nach jedem Zyklus gemessene Fluoreszenzintensität gegen die Zyklenanzahl aufgetragen. Die Software führt eine Basislinien-Korrektur durch, so dass die mittlere Fluoreszenzintensität gemessen zwischen den Zyklen 3-10 von den folgenden Messungen subtrahiert wird. Eine gestrichelte Linie im Graphen indiziert die Fluoreszenzintensität, die der sogenannte *threshold* hat. Es handelt sich um einen festgelegten Schwellenwert. Der Zyklus, in dem dieser erreicht wird, ist der C_T -Wert einer Messung bzw. Probe. Idealerweise liegt der *threshold* im log-linearen Bereich der Kurve, somit wird gewährleistet, dass er im exponentiellen Bereich der PCR liegt. Abbildung 18 zeigt ein Beispiel der Fluoreszenzintensitätskurven, im linken Teil ist die Fluoreszenzintensität linear und im rechten halblogarithmisch aufgetragen. Große DNA-Ausgangsmengen resultieren in niedrigen C_T -Werten und geringe Mengen in hohen.

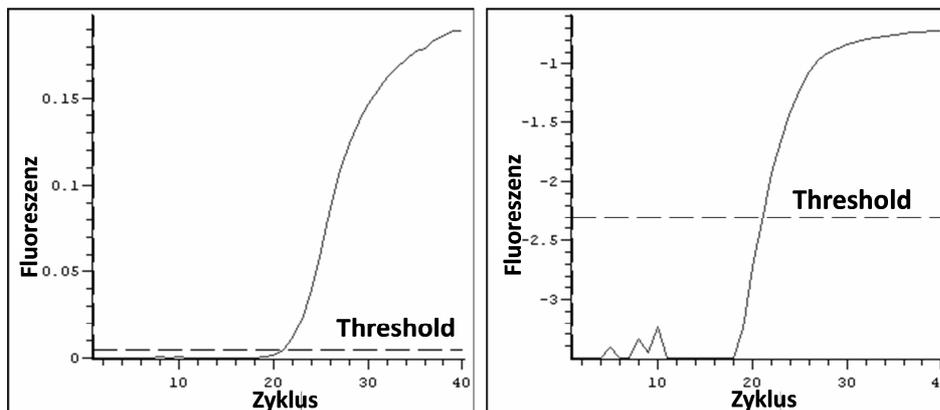


Abbildung 18: Fluoreszenz-Zyklus-Kurve der PCR-Reaktion. Der threshold ist bei 0,005 Fluoreszenzeinheiten mit linearer (links) und logarithmischer (rechts) Skalierung der Fluoreszenzachse dargestellt (354).

Bevor die gemessenen C_T -Werte zur Berechnung des Ergebnisses verwendet werden können, muss eine Schmelzpunktanalyse der PCR-Produkte durchgeführt werden. Diese ist notwendig, da SYBR Green unspezifisch an jede DNA-Doppelhelix bindet.

Die Produkte werden durch langsames Erwärmen denaturiert und parallel wird die Fluoreszenzintensität gemessen. Wird die Schmelztemperatur eines PCR-Produktes erreicht,

wird es denaturiert, SYBR Green verliert seine Bindung und ein massiver Abfall der Fluoreszenz resultiert. Da verschiedene PCR-Produkte verschiedene Schmelzpunkte haben, kann man so ermitteln, ob tatsächlich aus einem Primer ein spezifisches Produkt amplifiziert wurde. Durch die Darstellung der ersten Ableitung der Fluoreszenzintensitäts-Temperatur-Kurve wird es möglich, den Schmelzpunkt exakt zu bestimmen.

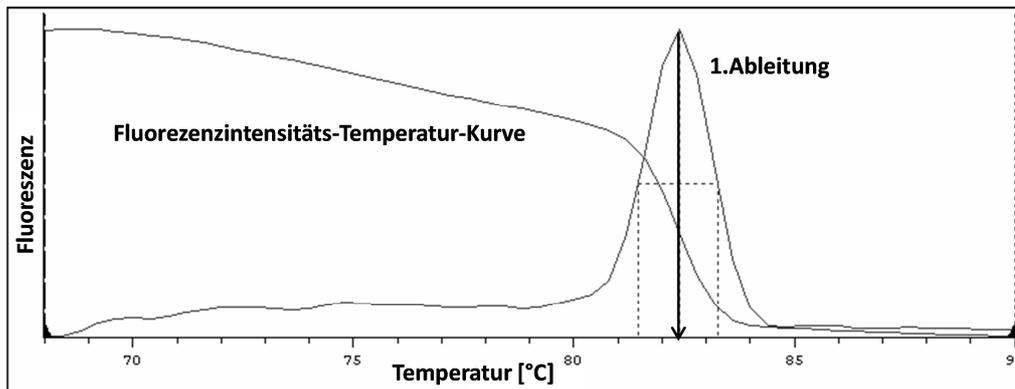


Abbildung 19: Schmelzpunktkurve eines PCR-Produktes, welche im Maximum der ersten Ableitung den Schmelzpunkt des PCR-Produktes zeigt (354).

Sobald zwei deutliche Peaks in der ersten Ableitung erkennbar waren, was i. d. R. bedeutete, dass mehr als ein PCR-Produkt vorlag, wurden diese C_T -Werte für die Berechnung der Ergebnisse nicht mehr herangezogen und als fehlerhaft betrachtet.

Berechnung Housekeeping-Gene							
Probe	C_{T1}	C_{T2}	Mittelwert C_T	SD C_T	Quantities (Q)	SD Quantities	
RPL 13 Set 2	Puffer	23,69035	23,88153	23,78594	0,09559	0,860054507	0,056985439
	Thrombozyten	23,56844	23,56844	23,56844	0	1	0
BETA ACT	Puffer	22,01503	21,70319	21,85911	0,15592	0,622488893	0,067275803
	Thrombozyten	21,19561	21,15485	21,17523	0,02038	1	0,01412634
GAPDH	Puffer	21,01526	21,02949	21,022375	0,007115	0,822934779	0,004058502
	Thrombozyten	20,71328	20,76917	20,741225	0,027945	1	0,019369998

Berechnung Normalisierungsfaktor (NF)	
Puffer	0,760923505
Thrombozyten	1

Berechnung Snail 1										
GOI Messung	C_{T1}	C_{T2}	Mittelwert C_T	SD C_T	Quantities (Q)	SD Q	Normalisierungsfaktor (NF)	SD NF	relative Expression (GOI_{re})	SD GOI_{re}
Puffer	33,65339	33,10376	33,378575	0,274815	0,62827801	0,119678946	0,760923505	0,057263	0,82567828	0,16911035
Thrombozyten	32,91318	32,50292	32,70805	0,20513	1	0,142185281	1	0,017315	1	0,14323566

Expressionsänderung (EF) = 1,2112

Abbildung 20: Änderung der Snail1-Expression zwischen zwei Proben, Beispiel zur Ergebnisberechnung mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode unter Berücksichtigung der spezifischen Normalisierungsfaktoren.

4. Material und Methoden

Die Berechnung der relativen Gen-Expression erfolgte anhand der C_T -Werte unter Verwendung der $\Delta\Delta C_T$ -Methode. Da es sich um eine komplexere Berechnung handelt, werden in Abbildung 20 ein Beispiel und in Abbildung 21 die verwendeten Formeln dargestellt. Das Endergebnis, die Expressionssteigerung, sagt aus, dass das betreffende Gen um diesen Faktor stärker exprimiert wird bzw. um diesen Faktor mehr mRNA in der Zelle vorlag. Zur relativen Quantifizierung wird eine Normalisierungsfaktor aus drei HKGs für jeden direkten Vergleich errechnet (354,355).

$$\begin{array}{ll}
 1. C_T \text{ Mittelwert} = \frac{C_{T1} + C_{T2}}{2} & 6. SD \text{ NF} = NF \sqrt{\left[\frac{SD Q_{HKG1}}{3 \times Q_{HKG1}} \right]^2 + \left[\frac{SD Q_{HKG2}}{3 \times Q_{HKG2}} \right]^2 + \left[\frac{SD Q_{HKG3}}{3 \times Q_{HKG3}} \right]^2} \\
 2. \Delta C_T = C_{T\min} - C_{T\max} & 7. GOI_{re} = \frac{Q_{Puffer}}{NF} \\
 3. Q = 2^{\Delta C_T} & 8. SD GOI_{re} = GOI_{re} \sqrt{\left[\frac{SD NF_{Puffer}}{NF_{Puffer}} \right]^2 + \left[\frac{SD Q_{Puffer}}{Q_{Puffer}} \right]^2} \\
 4. SD Q = Q \times \ln 2 \times SD C_T & 9. EF = \frac{GOI_{Thrombozyten}}{GOI_{Puffer}} \\
 5. NF = \sqrt[3]{Q_{HKG1} \times Q_{HKG2} \times Q_{HKG3}} & 10. SD EF = \sqrt{\left[\frac{SD GOI_{Puffer}}{GOI_{Puffer}} \right]^2 + \left[\frac{SD GOI_{Thrombozyten}}{GOI_{Thrombozyten}} \right]^2} \times EF
 \end{array}$$

Abbildung 21: Formeln zur Ergebnisberechnung: threshold cycle (C_T), Quantity (Q), Normalisierungsfaktor (NF), relative Expression *gene of interest* (GOI_{re}), Expressionsänderung (EF), Standardabweichung (SD).

Die Expressionssteigerung wurde immer im direkten Vergleich zum Nullwert bzw. den unbehandelten Tumorzellen errechnet.

4.16 Quantifizierung der Epithelial-mesenchymalen Transition auf Protein-Ebene mittels Western Blot

Die Proben bzw. Zellen wurden, entsprechend Abschnitt 4.14 hergestellt und eine Quantifizierung der Proteinexpression wurde mittels Western Blot Technik durchgeführt. Der Western Blot ermöglicht den Transfer von Proteinen auf eine Trägermembran und ihren Nachweis durch den Einsatz spezifischer Antikörper. Hierzu wurden die Zellen lysiert, der

Proteingehalt bestimmt, die Proteine via Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-gelelektrophorese (SDS-PAGE) separiert und schließlich ein Western Blot durchgeführt.

4.16.1 Zellyse und Proteinbestimmung

Zur Proteinextraktion wurden die Zellpellets mit Lysepuffer versetzt. Die Menge des eingesetzten Lysepuffers orientierte sich an der Quantität der Zellen bzw. der Größe der Zellpellets, i. d. R. wurden 0,5 - 1,2 mL eingesetzt. Das Pellet wurde sorgfältig mit dem Lysepuffer gemischt und in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt. Es erfolgte anschließend eine 30-minütige Inkubation der Proben auf Eis. Im Abstand von zehn Minuten wurden die Proben auf einem Laborschüttler gemischt. Zur Entfernung zellulärer Bestandteile von gelösten Proteinen, wurden die Proben nach der Inkubation bei 30230 g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt und bei -80°C gelagert.

Die Proteinbestimmung wurde unter Verwendung eines Pierce™ BCA Protein Assay Kits durchgeführt. Das Kit ermöglicht eine Visualisierung und Quantifizierung der gelösten Proteine durch eine Biuret-Reaktion. Diese Reaktion beschreibt die Ausbildung farbiger Komplexe aus zweiwertigen Kupfer-Ionen und Proteinen in einem alkalischen Milieu. Die in den Proteinen enthaltenen Aminosäuren Cystin, Cystein, Tryptophan und Tyrosin reduzieren die zweiwertigen Kupfer-Ionen zu einwertigen. Diese werden dann ihrerseits durch die im Kit enthaltene Bicinchoninsäure (BCA) unter Ausbildung einer violetten Färbung komplexiert (358,359). Die Intensität dieser Färbung korreliert mit der Proteinkonzentration, so kann durch die Messung der Absorption bei 570 nm unter Verwendung einer Kalibrierung eine Proteinbestimmung durchgeführt werden. Zur Messung der Absorption wurde ein Multiskan® EX Plattenleser verwendet.

Die zu quantifizierenden Proben wurden mit DPBS zehnfach, fünfzigfach und hundertfach je zu einem Gesamtvolumen von 50 µL verdünnt. Die Verdünnungen wurden zu je 20 µL pro Well auf eine durchsichtige 96-Well Platte in Duplikaten aufgetragen. Zusätzlich wurde eine Kalibrierung im Bereich von 0 - 400 µg/mL und Qualitätskontrollen (150, 250, 350 µg/mL) in Duplikaten aufgetragen. Es erfolgte anschließend die Zugabe von 200 µL BCA-Lösung pro Well und eine 60-minütige Inkubation bei 60°C. Nachdem die Platte auf Raumtemperatur abgekühlt war, erfolgte die Messung der Absorption.

4.16.2 SDS-PAGE und Western Blot

Anhand der Proteinbestimmung wurde das Volumen berechnet, das exakt 25 µg Protein enthielt. Dieses wurde im Vorfeld der Elektrophorese mit dem äquivalenten Volumen Laemmli Probenpuffer 2 x Konzentrat gemischt und 30 min inkubiert. Das Volumen des Gemisches durfte maximal 50 µL betragen, was dem maximalen Füllungsvolumen der Geltaschen entsprach. Der Puffer enthält reduzierendes β-Mercaptoethanol und das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS). Durch die Reaktion der Proteine mit β-Mercaptoethanol verlieren diese ihre Sekundär- und Tertiärstruktur und liegen in ihrer Primärstruktur vor. Weiterhin überdeckt das anionische SDS die Proteineigenladung durch eine Bindung der Proteine. Da die gebundene Menge SDS von der Proteingröße abhängt, wird gewährleistet, dass die Wanderung der Proteine im elektrischen Feld von ihrer Größe abhängt (360,361).

Parallel zur Inkubation wurde die Elektrophoresekammer vorbereitet, hierzu wurde das Polyacrylamidgel in die Halterung der Kammer eingesetzt, diese wurde mit Elektrodenpuffer (1x) befüllt und die Taschen des Gels wurden mehrfach mit diesem Puffer gespült. Nach Abschluss der Inkubationszeit wurde pro Geltasche ein Volumen des Gemisches aus Laemmli Probenpuffer und Proben das 25 µg Protein enthielt hinzugefügt. Zwei Geltaschen wurden mit 2 µL Precision Plus Protein™ Standard befüllt. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Spannung von 20 V für 45 min durchgeführt.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 5 min in Transferpuffer äquilibriert. Währenddessen wurde eine saubere Blot-Kammer mit Transferpuffer (1x) bis zur Hälfte befüllt und die Blot-Halterung eingesetzt. Die aufgetrennten Proteine aus dem Gel wurden auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) übertragen. Hierzu wurde die Membran zwecks Aktivierung 20 Sekunden in Methanol geschüttelt und in das sogenannte Blot-Sandwich eingesetzt. Das Blot-Sandwich war zusammengesetzt aus dem Gel auf dem die PVDF-Membran lag und wurde beidseitig umgeben von Mini Trans-Blot® Filter Papier, welches dann wiederum beidseitig von *fiber-pads* umschlossen war. Es wurde in die Halterung der Blot-Kammer eingesetzt, ein Rührfisch und Kühlakku wurden hinzugefügt und die Kammer wurde mit Transferpuffer (1x) bis zur Markierung aufgefüllt. Die Übertragung der Proteine erfolgte bei 100 V und 350 mA für 60 min.

4.16.3 Visualisierung und Auswertung

Zur Visualisierung mussten die Proteine mit spezifischen Antikörpern markiert werden. Die PVDF-Membran wurde nach dem Blot aus der Kammer entfernt und in TBS-Puffer (1x) bis zur Blockierungsreaktion gelagert. Die Blockierung ist notwendig, um freie Bindungsstellen zu besetzen und unspezifische Antikörperbindung zu vermeiden. Hierzu wurde die PVDF-Membran eine Stunde in 50 mL Western Blot Blockierungslösung schüttelnd inkubiert. Dann wurde sie dreimal mit TBS-T-Puffer (1x) gewaschen. Ein Waschschrift beschreibt ein zehninütiges Schütteln der Membran in Puffer. Es folgte die Reaktion mit dem primären Antikörper. Zur Prüfung einer EMT-Induktion wurden Antikörper für die Proteine Vimentin und E-Cadherin eingesetzt. Die Antikörperlösungen wurden entsprechend Abschnitt 4.1.5 hergestellt und 10 mL wurden mit der Membran zusammen für eine Stunde bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Daraufhin erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 8°C im Kühlschrank.

Im Anschluss wurde die Antikörperlösung entfernt und es wurde erneut dreimal mit TBS-T-Puffer (1x) gewaschen. Dann wurde die Membran mit der sekundären Antikörperlösung umgesetzt. Diese wurde entsprechend Abschnitt 4.1.5 hergestellt. Nach dem dritten Waschschrift wurde die Membran für 90 min mit 10 mL sekundärer Antikörper-Lösung schüttelnd inkubiert. Der sekundäre Antikörper bindet spezifisch den primären und ist mit einer Meerrettich-Peroxidase gekoppelt, um eine Visualisierung zu ermöglichen. Nach 90 Minuten wurde die sekundäre Antikörper-Lösung entfernt und erneut wurden zwei Waschschriffe mit TBS-T-Puffer (1x) durchgeführt. Schließlich wurden 4 mL Luminol-Peroxidlösung hinzugefügt und für 120 Sekunden unter Lichtausschluss mit der Membran inkubiert. Zur Detektion der Lumineszenz bzw. zur Protein Visualisierung wurde ein ChemiDoc™ XRS+ System verwendet. Abbildung 22 illustriert die Reaktion zwischen Luminol und Meerrettich-Peroxidase, aus welcher die Lumineszenz resultiert. Die Peroxidase katalysiert die Oxidation des Luminols mit Wasserstoffperoxid über ein Epoxid-Zwischenprodukt zu 3-Aminophthalat. Aus dieser Reaktion resultiert die Lumineszenz. Diese kann bei 430 nm detektiert werden. Eine Messung am ChemiDoc™ XRS+ System wurde über eine Belichtungszeit von 20 min durchgeführt.

Ausgewertet wurden die Bilder der Blots mit der Image Lab Software. Sie ermöglicht die Bestimmung der Banden-Pixeldichte und die Anfertigung repräsentativer Bilder der Blots bzw. Banden. Zur Auswertung wurde stets ein housekeeping-Protein verwendet, hier

GAPDH. Anhand des housekeeping-Proteins können Unterschiede in den eingesetzten Proteinmengen demaskiert werden. Somit war ein Vergleich der Proteinquantitäten zwischen den Proben möglich, wenn vorher eine Normalisierung mit dem housekeeping-Protein durchgeführt wurde. Histogramme wurden erstellt, indem die Proteinquantität prozentual auf unbehandelte Tumorzellen bezogen wurde (362–364).

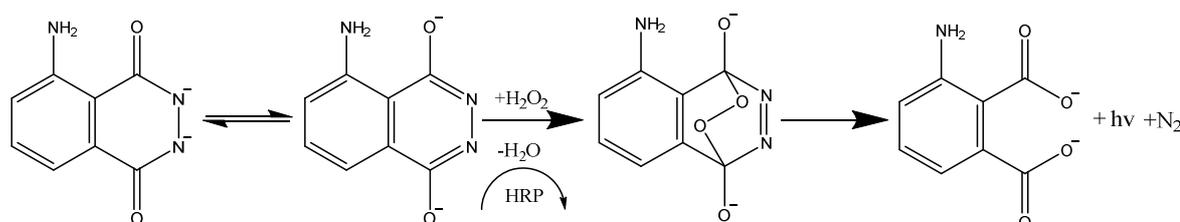


Abbildung 22: Luminol-Oxidation mit Wasserstoffperoxid über ein Epoxid-Zwischenprodukt zu 3-Aminophthalat. Modifiziert nach White et al. (365).

4.17 Quantifizierung der Epithelial-mesenchymalen Transition auf funktioneller-Ebene mittels Wundheilungsassays

Eine Veränderung der Migrationsgeschwindigkeit der Tumorzellen durch eine EMT wurde unter Verwendung eines Wundheilungsassays evaluiert. Grundsätzlich wurde die EMT entsprechend Abschnitt 4.14 induziert, allerdings wurde nicht in T75-Zellkulturflaschen sondern in unbeschichteten CytoOne® 6 Well-Platten gearbeitet. In vier Wells einer Platte wurden konfluente Tumorzellkulturen generiert. In diesen wurde eine EMT mit Thrombozyten in An- und Abwesenheit von UFH oder Enoxaparin, wie in Abschnitt 4.14 erläutert, induziert. Die Dauer der EMT-Induktion betrug ebenfalls drei Tage. Alle eingesetzten Volumina wurden unter Beibehaltung aller Konzentrationen, entsprechend der reduzierten Wachstumsfläche der CytoOne® 6 Well-Platten, im Vergleich zu T75-Zellkulturflaschen angepasst.

Nach der EMT-Induktion wurden die Zellkulturen fünfmal mit DPBS gewaschen, um alle Rückstände von Thrombozyten und Antikoagulantien zu entfernen. Es folgte eine Inkubation mit dem entsprechenden FKS-freien Nährmedium für 16 Stunden. Anschließend wurde mit einer 10 µL Pipettenspitze TipOne® vorsichtig ein gleichmäßiger Kratzer im konfluenten Zellrasen erzeugt und das FKS-freie Medium erneuert. Initial wurden Fotos mit einem Carl Zeiss Axiovert 200 Mikroskop gemacht. Die Zellen wurden dann im Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂ gelagert.

In regelmäßigen Abständen wurde der Verschluss des Kratzers durch die Migration der Tumorzellen dokumentiert. Der Verschluss des Kratzers in der PC-3 Zellkultur wurde nach null, acht und 24 Stunden dokumentiert und der in der AsPC-1 Zellkultur nach null, 24 und 72 Stunden. Die Größe des Kratzers wurde mit dem Programm ImageJ auf den mikroskopischen Bildern ermittelt. Hierzu musste so umgerechnet werden, dass 0,335 μm einem Pixel auf dem mikroskopischen Bild entsprachen. Zur Quantifizierung wurde die Distanz des Risses an drei Punkten vermessen und der Mittelwert dieser drei Messungen wurde als tatsächliche Distanz verwendet.

4.18 Quantifizierung der α -Granulafreisetzung in fibrinfreiem Plasma

Im zweiten Projekt soll die Freisetzung der thrombozytären Granula, induziert durch Tumorzellen, vor dem Hintergrund einer aktiven Gerinnung und der Möglichkeit für kontaktbasierende Interaktionen zwischen den Zellen quantifiziert werden. Es erfolgt ein Vergleich der Granulafreisetzung von Thrombozyten in recalcifiziertem fibrinfreiem Plasma mit der von Thrombozyten in calciumfreien Plasma.

4.18.1 Blutentnahme und Plasmaisolation aus Vollblut

Als Blutspender wurden männliche weiße Personen mittleren Alters ausgewählt. Sie durften keine chronische Erkrankung sowie die Thrombozyten und Gerinnungsfunktion betreffende Erkrankungen aufweisen. Weiterhin wurde sichergestellt, dass die Probanden über einen Zeitraum von drei Wochen vor der Blutentnahme keine Arznei- oder Nahrungsmittel eingenommen hatten, welche die Thrombozyten und Gerinnungsfunktion beeinflussen können. Die Blutentnahme wurde entsprechend der *Guideline Laboratory Investigation of Heritable Disorders of Platelet Function* durchgeführt. Da es erforderlich war, Blutproben mit inaktivierten Thrombozyten und einer inaktivierten Gerinnungskaskade zu gewinnen, wurde die Blutentnahme möglichst schonend durchgeführt (366). Eine Lagerung der so extrahierten Thrombozyten ist problematisch, deshalb wurde die Blutentnahme stets direkt vor den Versuchen am gleichen Tag durchgeführt. Die Thrombozyten wurden maximal drei Stunden lang verwendet.

Im Vorfeld der Blutentnahme hielt der Proband sitzend eine Ruhezeit von 45 Minuten ein, um hämodynamischen Stress zu vermeiden. In der Regel wurde zur Entnahme die Vena

mediana cubiti oder die Vena cephalica in der Ellenbeuge gewählt. Die Punktion der Vene wurde, bei geringer Oberarmkompression, mit einem Multifly Kanülen Set der Größe 21 Gauge durchgeführt. Dieses wurde in Kombination mit S-Monovetten, welche mit Citrat gefüllt waren, verwendet. Die Punktion ist grundsätzlich eine Verletzung, auf die der Organismus mit der Aktivierung der Blutgerinnung reagiert, deshalb wurde die erste Monovette stets verworfen. Die folgenden wurden, nachdem sie gefüllt waren, mehrfach invertiert um eine vollständige Vermischung von Blut und Citrat zu gewährleisten.

Durch eine Zentrifugation des Vollblutes bei 200 g für 20 min bei 25°C konnte das Blut in drei Phasen geteilt werden. Diese können anhand der in ihnen enthaltenen Zellen klassifiziert werden. Die untere dunkelrote Phase besteht aus Erythrozyten und Leukozyten. Die obere hellgelbe Phase enthält überwiegend Thrombozyten. Diese Phase wird auch als *platelet-rich plasma* bezeichnet, im Folgenden wird sie als thrombozytenreiches Plasma (TRP) bezeichnet. Die mittlere dunkelgelbe Phase wird als *buffy coat* bezeichnet und setzt sich aus Leukozyten und Thrombozyten zusammen (367). Für die Versuche wurde das TRP also die obere gelbe Phase verwendet. Es wurde vorsichtig, ohne den *buffy coat* zu tangieren, mittels einer Pipette abgenommen. Zur Entfernung der Thrombozyten wurde dieses bei 5000 g für 25 min bei 25°C zentrifugiert. Im Anschluss wurde die Abwesenheit der Thrombozyten lichtmikroskopisch mit der Neubauer improved® Zählkammer verifiziert. Eine geringe Anzahl wurde toleriert, für dieses sogenannte *platelet-poor plasma* wird im Folgenden die Bezeichnung thrombozytenarmes Plasma (TAP) verwendet.

4.18.2 Thrombozytenzählung mit der Neubauer improved® Zählkammer

Obwohl theoretisch jeder Mensch eine ähnliche Thrombozytenkonzentration im Blut aufweist, wurde sie im Anschluss an die Isolation stets bestimmt. Die Zählung der Thrombozyten wurde mit einer Neubauer improved® Zählkammer durchgeführt. Zum besseren Verständnis der Funktionsweise wird zuerst detailliert der Aufbau beschrieben. Grundsätzlich handelt es sich um einen Objektträger mit Deckglas, welche zusammengesetzt unter einem Lichtmikroskop betrachtet bzw. ausgewertet werden. In den Objektträger ist eine präzise Struktur aus kleiner werdenden Quadraten eingeschliffen. Außerdem ist dieser so präpariert, dass das Deckglas immer in der exakt gleichen Höhe aufliegt. Zusammgebaut bilden beide Teile eine kleine Kammer mit einer Höhe von 0,1 mm. So wird gewährleistet, dass bei einer Zählung immer das gleiche Volumen betrachtet wird.

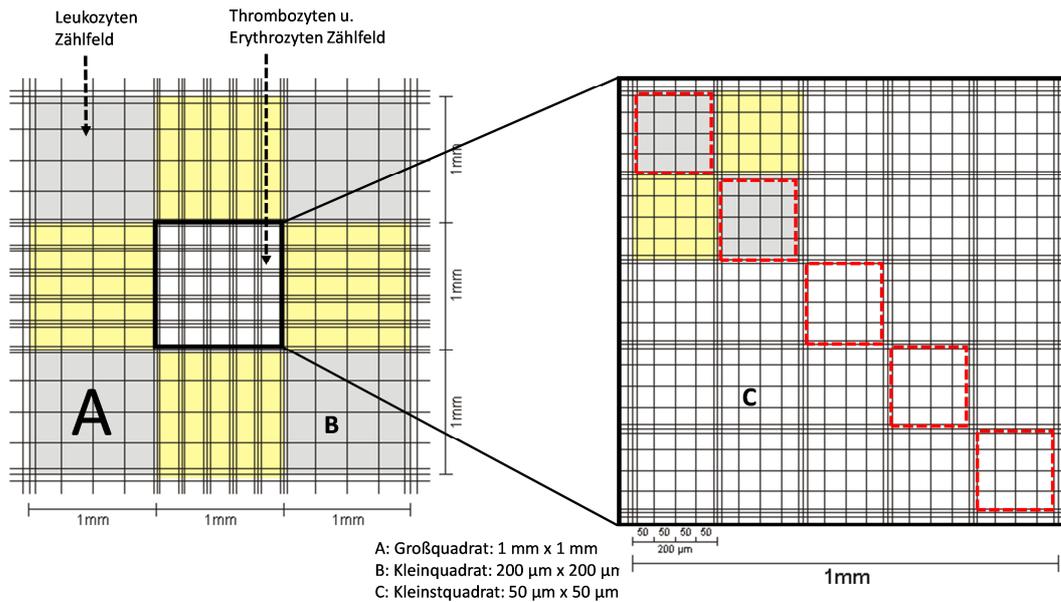


Abbildung 23: Zählgitter der Neubauer Improved Zählkammer mit entsprechenden Zählfeldern für Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten (368).

Abbildung 24 zeigt eine Aufsicht der eingeschliffenen quadratischen Struktur. Diese Struktur ist das Zählgitter der Kammer. Leukozyten werden unter Verwendung der Großquadrate, lokalisiert in den Ecken, ausgezählt und Erythrozyten sowie Thrombozyten im zentralen Großquadrat.

Zur Auszählung der Thrombozyten wird der Objektträger mit einer Probe beladen, mit dem Deckglas verschlossen und fünf diagonal liegende Kleinquadrate werden ausgezählt. Bei der Zählung muss einerseits beachtet werden, dass im Kleinquadrat nacheinander die Kleinstquadrate ausgezählt werden und andererseits, dass von den dreifachen Begrenzungslinien die mittlere Linie die Zählgrenze darstellt. Aus der Zählung der fünf Kleinquadrate wird der Mittelwert gebildet und mit der Fläche eines Kleinquadrates sowie der Höhe der Kammer multipliziert. Daraus resultiert die Thrombozytenkonzentration für ein Kleinquadrat. Zur Berechnung der Thrombozytenkonzentration in 1 µL muss die Konzentration in einem Großquadrat errechnet werden. Da dieses aus 25 Kleinquadraten besteht wird mit dem Faktor 25 multipliziert.

$$\text{Thrombozyten}/\mu\text{L} = \text{Mittelwert} \times (0,2 \text{ mm} \times 0,2 \text{ mm} \times 0,1 \text{ mm}) \times 25 \times 10$$

Der so erhaltene Wert für ein Großquadrat muss dann mit 10 multipliziert werden, da das Volumen von zehn Großquadraten 1 mm³ entspricht, was wiederum 1 µL entspricht (368,369).

4.18.3 Herstellung von fibrinfreiem Plasma mit Batroxobin

Das Problem einer Quantifizierung der Granulasekretion vor dem Hintergrund einer aktiven Gerinnung besteht darin, dass bei einer Aktivierung der Blutgerinnung in recalcifiziertem Plasma Fibrin gebildet wird. Fibrin polymerisiert und erzeugt in der Probe einen Anstieg der Viskosität, wodurch eine Quantifizierung der Granulasekretion via ELISA nahezu unmöglich wird. Zur Umgehung dieser Problematik wird fibrinfreies Plasma unter Verwendung des Enzyms Batroxobin erzeugt. Das Enzym katalysiert unabhängig von Calcium die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin. Es ist somit möglich im Vorfeld der eigentlichen Experimente das Plasma bei inaktiver Blutgerinnungskaskade, da kein Calcium in der Probe enthalten ist, zu defibrinisieren. Das Enzym Batroxobin ist als eine thrombinartige Serinprotease einzustufen. Es wird aus dem Gift von Schlangen der Gattung der amerikanischen Lanzenottern, wie z. B. der gewöhnlichen Lanzenotter (*Bothrops atrox*) isoliert. Experimentell betrachtet besteht neben der Unabhängigkeit von Calcium ein weiterer Vorteil darin, dass Batroxobin bei der Umwandlung von Fibrin nur die Abspaltung des Fibrinopeptides A aus der α -Kette des Fibrinogens katalysiert und nicht die des Fibrinopeptides B aus der β -Kette. Dadurch wird die Ausbildung von Fibrinfasern sowie eine Quervernetzung verhindert und das unfertige Fibrin kann gut via Zentrifugation entfernt werden (370).

Zur Fibrinogen-Entfernung wurde TAP verwendet. Es wurde stets ein Zehntel des TAP-Volumens an Batroxobinreagenz von Siemens hinzugefügt, bei 10 mL TAP wurde 1 mL Batroxobinlösung verwendet. Daraufhin erfolgte eine Inkubation für 20 min bei 37°C. Das gebildete nicht quervernetzte Fibrin konnte anschließend bei 2700 g für 12 min bei 25°C abzentrifugiert werden. Der Überstand wurde vom Fibrinpellet getrennt und erneut für 10 min bei 37°C inkubiert, um die Polymerisation verbliebender Fibrinogen-Reste zu ermöglichen. Dann wurde erneut bei identischen Bedingungen zentrifugiert und der Überstand isoliert. Das Batroxobinplasma wurde bis zur Verwendung bei -10°C gelagert. Vor den Versuchen wurde es auf RT erwärmt und zur Resuspension von Thrombozyten verwendet. Die Thrombozyten wurden entsprechend Abschnitt 4.9 aus TKZs isoliert und in einer Konzentration von 400×10^6 Thrombozyten/mL in fibrinfreiem Plasma resuspendiert. Diese Suspensionen wurden vor den Experimenten recalcifiziert.

4.18.4 Thrombozytenaktivierung in fibrinfreiem Plasma

Die Aktivierung der Thrombozyten wurde entsprechend den Ausführungen in Abschnitt 4.12.1 durchgeführt. Die Unterschiede bestanden darin, dass die Thrombozyten entweder in calciumfreiem Plasma oder in recalcifiziertem, fibrinfreiem Plasma vorlagen und darin, dass nur MV3 Zellen sowie UFH und Fondaparinux getestet wurden. Zusätzlich zu TRAP-6 wurde ADP zur Aktivierung der Thrombozyten verwendet in einer Konzentration von 35 $\mu\text{mol/L}$.

4.18.5 Enzyme-linked immunosorbent assay-Durchführung unter Verwendung von fibrinfreiem Plasma

Es wurden Sandwich-ELISAs zur Quantifizierung der VEGF-, CXCL5- und CXCL7-Freisetzung, entsprechend den Ausführungen in Abschnitt 4.12.3 durchgeführt. Es wurden die Proben verwendet, die gemäß dem vorangegangenen Abschnitt hergestellt wurden. Abbildung 23 illustriert die Probenzusammenstellung.

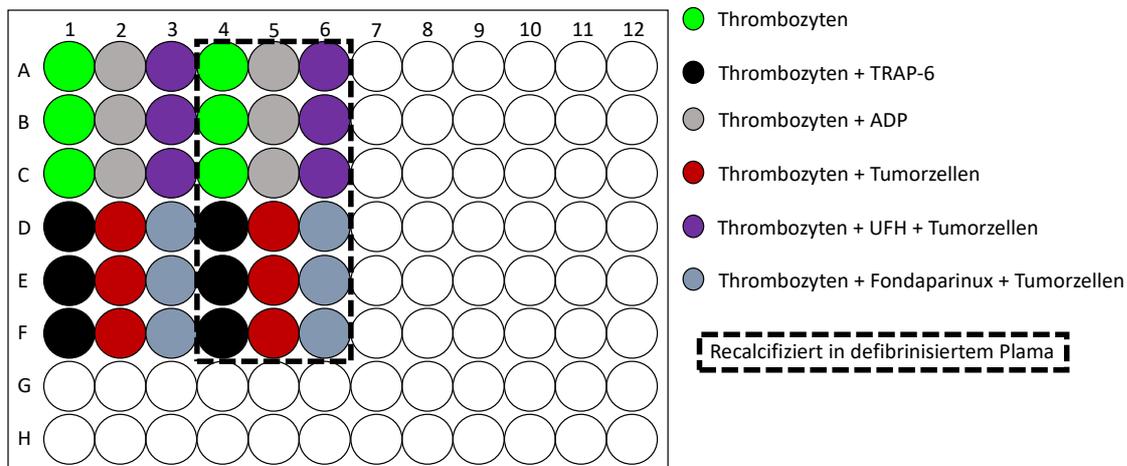


Abbildung 24: Darstellung des Pipettierschemas zur Durchführung der Quantifizierung der Freisetzung der α -Granula. Es wurden die experimentellen Standardkonzentration der Antikoagulantien entsprechend Abschnitt 4.8 verwendet.

4.19 Untersuchung der Thrombingenerierung induziert durch Tumorzellen

Thrombin erzeugt über die Aktivierung von PAR-1 und -4 eine vollständige Thrombozytenaktivierung (191). Also eignet sich die Thrombinkonzentration und Bildungsgeschwindigkeit als Surrogatparameter für eine Thrombozytenaktivierung. Für den folgenden Versuch bzw. das dritte Projekt dieser Arbeit, wird frisches, humanes TRP verwendet. Es wurde aus einer frischen Probe Vollblut isoliert. Es handelt sich um ein

System, das Effekte der Gerinnungsenzyme und kontaktbasierte Effekte abbilden kann. In ihm werden die Induktion einer Thrombinbildung durch die Tumorzelllinien AsPC-1, MDA-MB-231, MV3 und PC-3 und etwaige inhibitorische Effekte der Antikoagulantien getestet.

4.19.1 Blutentnahme, Thrombozytenisolation aus Vollblut und Thrombozytenzählung

Das TRP für die Untersuchung der Thrombingenerierung wurde entsprechend Abschnitt 4.18.1 erzeugt und nach einer Prüfung der Thrombozytenanzahl entsprechend Abschnitt 4.18.2 für die Versuche zur Thrombingenerierung verwendet.

4.19.2 Quantifizierung der *tissue factor*-Expression mittels Durchflusszytometrie

Eine Thrombinbildung wird hauptsächlich durch die Enzyme der Gerinnung katalysiert. Diese können durch Tumorzellen via oberflächlicher Expression der Gewebsthrombokinase bzw. des TFs aktiviert werden (50). Bevor eine Quantifizierung der Thrombingenerierung durchgeführt wurde, sollte überprüft werden, ob die eingesetzten Tumorzellen TF oberflächlich exprimieren.

Durchgeführt wurde die TF-Quantifizierung unter Verwendung der Durchflusszytometrie an einem Durchflusszytometer der Marke Guava® easyCyte HT Flow Cytometer.

In diesem Experiment wurde die TF-Expression von AsPC-1, PC-3, MV3 und MDA-MB-231 Tumorzellen quantifiziert. Hierzu wurden die Tumorzellen abgelöst und via Zentrifugation pelletiert. Alle wurden mit EDTA abgelöst, da Trypsin die Zelloberfläche zerstört hätte. Daraufhin wurde das Zellpellet zweimal mit FACS-Waschpuffer gewaschen und die Konzentrationen der Zellen am Zellzähler CASY® 1 Model TT bestimmt. Dann wurden die Zellpellets so in FACS-Blockierungslösung resuspendiert, dass eine Konzentration von 10×10^4 Zellen/100 μL resultierte. Vier Versuchsansätze wurden erstellt und in braunen 1,5 mL Reaktionsgefäßen für 15 Minuten inkubiert bzw. blockiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden. Die vier Ansätze unterteilten sich in einen Ansatz ohne Zusatz, einen mit primären Antikörpern, einen mit sekundären Antikörpern und einen mit einer Kombination aus beiden Antikörpern. Die ersten drei enthielten 20×10^4 und der letzte 30×10^4 Zellen. Auf die Blockierung folgte die Zugabe des primären TF-bindenden Antikörpers in einer Konzentration von $2,5 \mu\text{g}/10^6$ Zellen und eine Inkubation von 45 min.

Anschließend erfolgten zwei Waschschrte bestehend aus je einer Zentrifugation bei 4°C und 500 g für 5 min und einer Resuspension in 1 mL FACS-Waschpuffer.

Daraufhin wurde der sekundäre mit Fluoresceinisothiocyanat markierte Antikörper in einer Konzentration von 0,75 µg/10⁶ Zellen hinzugefügt und es wurde für 35 min inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurde der primäre Antikörper von dem Sekundären gebunden. Es wurde erneut zweimal gewaschen und die Zellen wurden zu einer Konzentration von 10 x 10⁴ Zellen/100 µL verdünnt. Schließlich wurden 100 µL je Probe in die Wells einer 96-Well Platte überführt und am Durchflusszytometer, unter Verwendung eines blauen Lasers zur Anregung und eines grünen Filters zur Detektion vermessen. Die Auswertung erfolgte mit der guavaSoft™ Software des Guava® easyCyte HT Flow Cytometer.

4.19.3 Thrombingenerierung

Durch die TF-Quantifizierung konnte festgestellt werden, dass einige Tumorzelllinien TF präsentieren. Somit waren die Voraussetzungen für einen Thrombingenerierungsassay gegeben. Die Thrombinbildung wurde quantifiziert, indem die Fluoreszenz gemessen wird, die aus einer durch Thrombin katalysierten Substratspaltung resultiert. Das Substrat Z-G-G-R-AMC wird durch Thrombin zu fluoreszierendem 7-Amino-4-Methylcumarin gespalten (371,372).

Eine Thrombinbildung kann sowohl über das intrinsische (Faktor XII), als auch über das extrinsische (Faktor VII) System der Blutgerinnungskaskade induziert werden. Das intrinsische System wurde durch die Zugabe des Faktor XIIa-Inhibitors CTI blockiert (373). Dieser wurde in einer finalen Konzentration von 50 µg/mL eingesetzt und für 10 min mit dem TRP inkubiert. Zur Prüfung der TF-Abhängigkeit der Thrombinbildung wurde Faktor VII-Mangelplasma verwendet, welches zur Aktivierung mit Tumorzellen und TF versetzt wurde. Bei einer Abwesenheit von Faktor VII kann keine Thrombinbildung durch TF induziert werden. Das mit CTI präparierte TRP wurde auf die in Abbildung 25 illustrierten Ansätze aufgeteilt und für 30 min mit den Antikoagulantien in ihren experimentellen Standardkonzentrationen inkubiert.

Während der Inkubation wurden die Tumorzellen mit EDTA abgelöst sowie durch Zentrifugation und Resuspension mit DPBS zweimal gewaschen und am Zellzähler CASY® 1 Model TT gezählt. Dann wurde eine Tumorzellsuspension in DPBS mit einer Konzentration

4. Material und Methoden

von 333.333 Tumorzellen/mL hergestellt. Die finale Tumorzellkonzentration zur Induktion einer Thrombingenerierung betrug 10×10^3 Tumorzellen/mL.

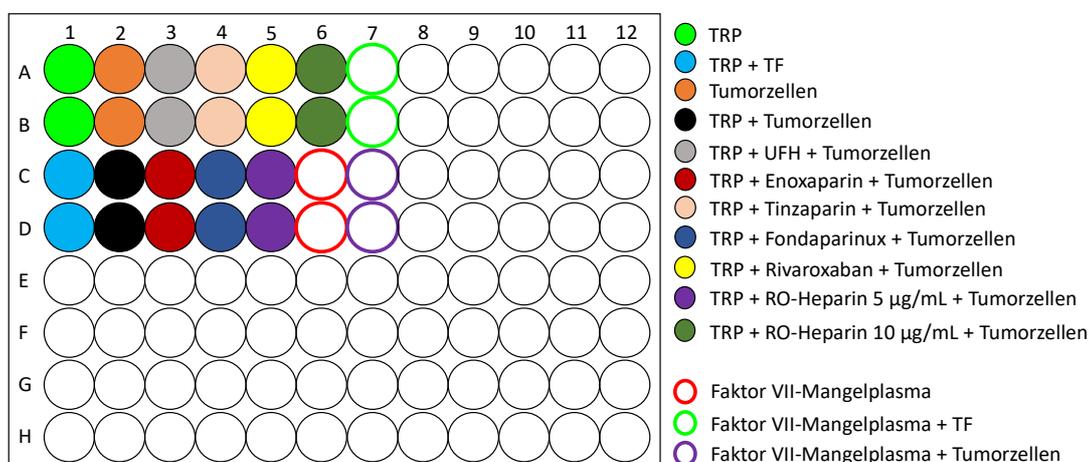


Abbildung 25: Darstellung des Pipettierschemas zur Durchführung der Quantifizierung der Thrombingenerierung. Es wurden die experimentellen Standardkonzentration der Antikoagulantien entsprechend Abschnitt 4.8 verwendet. Zusätzlich zu frisch isoliertem TRP wurden Thrombozyten in Faktor VII-Mangelplasma vermessen.

Nachdem die Tumorzellen und das TRP vorbereitet waren, wurden die Proben entsprechend Abbildung 25 auf einer schwarzen 96F Non-Treated Black Microwell Platte, gemäß dem in Tabelle 16 dargestellten Pipettierschema in den Wells zusammengefügt. Es wurden bis auf das calciumhaltige fluorogene Substrat alle Komponenten einer Probe vereinigt und alle Luftblasen entfernt. Unmittelbar vor der Messung wurden 50 µL Substratlösung hinzugefügt und die Platte wurde direkt danach in einem Thermo Fluorscan Ascent® vermessen. Die Fluoreszenzintensität wurde über insgesamt 90 Minuten minütlich quantifiziert.

Tabelle 16: Informationen zur Zusammensetzung der Proben und Kontrollen der Thrombingenerierung

	TRP [µL]	FVII-Mangelplasma [µL]	DPBS [µL]	Tumorzell-Suspension [µL]	TF-Reagenz [µL]	Fluorogenes Substrat (Z-G-G-R-AMC) [µL]
Nullwert	17	-	33	-	-	50
Positivkontrolle	34	-	6	-	10	50
Probe	17	-	30	3	-	50
Nullwert FVII-Mangelplasma	-	17	33	-	-	50
Positivkontrolle FVII-Mangelplasma	-	34	6	-	10	50
Probe FVII-Mangelplasma	-	17	30	3	-	50

In der Positivkontrolle wird das TRP mit TF aktiviert um allgemein die Aktivierbarkeit des TRPs zu prüfen und zu gewährleisten. Zur Verknüpfung der gemessenen Fluoreszenzintensitäten mit realen Enzymaktivitäten wurde zusätzlich eine Kalibrierung mit Standards, deren Thrombinaktivität bekannt ist, durchgeführt. Hierzu wird das Kalibrator-Set Technothrombin® TGA CAL der Firma Technoclone GmbH eingesetzt. Die Stammlösung des Kalibrators wurde entsprechend den Anweisungen des Herstellers, dargestellt in Tabelle 17, verdünnt. Als Nullwert der Kalibrierung wurde DPBS verwendet. Pro Well wurden 40 µL der Kalibratorlösung eingesetzt und nach der Entfernung der Luftblasen und dem Versetzen mit 50 µL Substratlösung am Thermo Fluoroscan Ascent® vermessen. Über einen Zeitraum von 10 Minuten wurde alle 30 Sekunden eine Messung durchgeführt.

Mit Hilfe der Kalibrierung konnte unter Verwendung der von Technoclone zur Verfügung gestellten Software aus den Messwerten eine Thrombinbildungskinetik berechnet werden.

Tabelle 17: Informationen zur Zusammensetzung der Kalibrierung.

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

4.20 Statistik

Alle Versuche dieser Arbeit wurden, mit Ausnahme des HGF-ELISAs, mindestens mit einer Stichprobenanzahl (n) von drei durchgeführt. Hierzu wurden an drei unterschiedlichen Tagen unter der Verwendung von drei unterschiedlichen Proben identische Messungen durchgeführt. Die Proben wurden in Triplikaten (Adhäsionsassay, Granulasekretion, Tube Formation Assay, Wundheilungsassay,) oder in Duplikaten (Lichttransmissionaggregometrie, qRT-PCR, Western Blot, Durchflusszytometrie, Thrombingenerierung) vermessen. Der HGF-ELISA wurde in einer Stichprobenanzahl von zwei in Duplikaten durchgeführt. Die Signifikanzen wurden stets mit einem ungepaarten T-Test geprüft mit Ausnahme der qRT-PCR, bei der die Signifikanzprüfung mit einer zweifaktoriellen Varianzanalyse erfolgte. Die errechneten Signifikanzen sind mit Sternchen (*) in den Resultaten dargestellt, wobei * \triangleq p=0,05; ** \triangleq p=0,01 und *** \triangleq p=0,001 entsprechen.

4. Material und Methoden

Zur Darstellung der Ergebnisse der Lichttransmissionsaggregometrie, der Durchflusszytometrie und der Thrombingenerierung wurden aus den jeweiligen Messungen repräsentative Darstellungen gewählt. Die weiteren Ergebnisse wurden in Form von Histogrammen dargestellt und repräsentieren Mittelwerte der gesamten Stichprobenanzahl sowie die Standardabweichung. Wenn eine Normalisierung erfolgte, wurde diese stets in der versuchsbezogenen Stichprobe durchgeführt.

5. Ergebnisse und Diskussion

Das Ziel dieser Forschungsarbeit war es, das Verständnis der Interaktionen zwischen Thrombozyten und Tumorzellen im Verlauf der hämatogenen Metastasierung zu erweitern. Dazu wurden die Interaktionen experimentell simuliert und der Einfluss von Antikoagulantien auf diese quantifiziert. Zudem sollten die unterschiedlichen Antikoagulantien in ihrer Wirksamkeit evaluiert werden.

Die mechanistischen Aspekte der Interaktionen wurden durch Studien zur Quantifizierung der Tumorzell-Thrombozyten-Adhäsion, der TCIPA und der thrombozytären Granulasekretion beleuchtet. Zur Untersuchung funktioneller Aspekte wurden Quantifizierungen der Angiogenese, EMT und Thrombingenerierung durchgeführt. Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente aus den drei Projekten dieser Arbeit werden nacheinander präsentiert und diskutiert. Zur Identifizierung von entscheidenden Struktur-Wirkungsbeziehungen wurden die Testsubstanzen so ausgewählt, dass sie sich in ihrem Wirkmechanismus und ihrer Struktur unterschieden (Tabelle 18). Eine Abgrenzung von parakrinen und adhäsiven bzw. kontaktbasierenden Interaktionen zwischen Tumorzellen und Thrombozyten von der Blutgerinnung wurde durch die Verwendung von verschiedenen Lösungsmitteln für Thrombozyten erreicht. Parakrine und adhäsive Interaktionen wurden durch die Verwendung von recalcifiziertem TRPu untersucht. Interaktionen die aus der Blutgerinnung resultieren wurden durch die Verwendung von recalcifiziertem TRP quantifiziert.

Tabelle 18: Überblick der Wirkmechanismen der eingesetzten Testsubstanzen (256,259–261,264,271,272,374,375).

Testsubstanz	Inhibition	Antithrombin III-abhängig	Struktur
UFH	Faktor XIIa, XIa, Xa, VIIa, Va, IIa	Ja	Glykosaminoglykan (15.000 Da)
Tinzaparin	Faktor Xa, IIa	Ja	Glykosaminoglykan (5.500-7.500 Da)
Enoxaparin	Faktor Xa, VIIa, IIa,	Ja	Glykosaminoglykan (4500 Da)
Fondaparinux	Faktor Xa	Ja	Pentasaccharid
Rivaroxaban	Faktor Xa	Nein	Oxazolidinon
Reduziertes Oxyheparin	keine Zielstruktur	Nein	Glykosaminoglykan (10.000-13.000 Da)

5.1. Einfluss von Antikoagulantien auf die Adhäsion zwischen Thrombozyten und Tumorzellen der Linien AsPC-1, MDA-MB-231, MV3 und PC-3

Die Betrachtung der Tumorzell-Thrombozyten-Interaktionen wurde mit einer Quantifizierung der Adhäsion zwischen einer konfluenten Tumorzellschicht und Thrombozyten begonnen. Hierzu wurden Zellen der vier Tumorentitäten Melanom (MV3), Pankreas- (AsPC-1), Mamma- (MDA-MB-231) und Prostatakarzinom (PC-3) sowie die Antikoagulantien UFH, Tinzaparin, Enoxaparin, Fondaparinux, Rivaroxaban und reduziertes Oxyheparin (RO-Heparin) eingesetzt. Zur isolierten Betrachtung von parakrinen und adhäsiven bzw. kontaktbasierenden Tumorzell-Thrombozyten-Interaktionen wurde in recalcifiziertem TRPu gearbeitet. Die Ergebnisse wurden als Histogramme dargestellt. In diesen ist die Adhäsion zwischen Tumorzellen und Thrombozyten ohne antikoagulativen Zusatz durch einen schwarzen Balken hervorgehoben. Alle ermittelten Signifikanzen beziehen sich stets auf diese Messung.

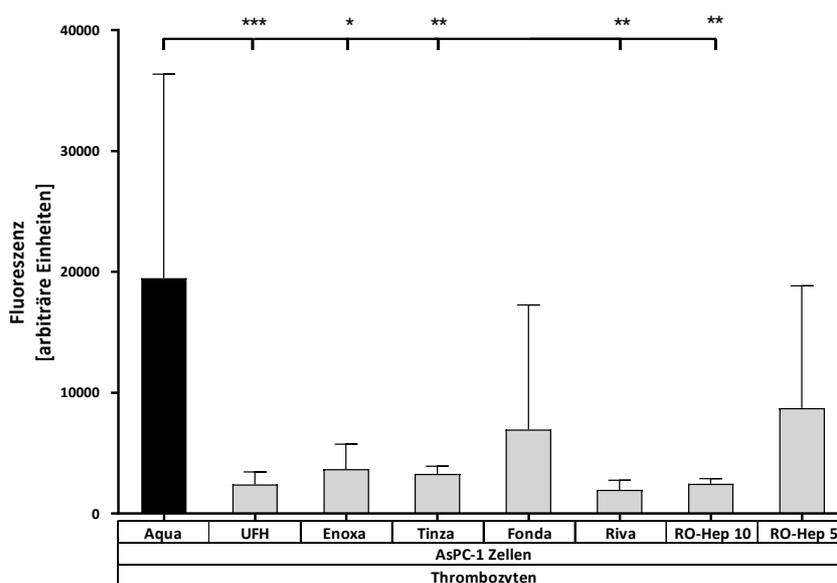


Abbildung 26: Quantifizierung der Adhäsion von Thrombozyten (400 Mio/mL) an eine konfluente Schicht aus AsPC-1 Zellen sowie der Inhibition durch Antikoagulantien. Dargestellt ist die Adhäsion von unbehandelten Thrombozyten (Aqua) und von Thrombozyten nach einer Präinkubation mit unfraktioniertem Heparin (UFH), Enoxaparin (Enoxa), Tinzaparin (Tinza), Fondaparinux (Fonda), Rivaroxaban (Riva), und reduziertem Oxyheparin in den Konzentrationen 10 µg/mL und 5 µg/mL (RO-Hep 10, RO-Hep 5) nach 15 min (n=3).

Die Koinkubation der adhären AsPC-1 Zellen mit unbehandelten Thrombozyten resultierte in einem starken Anstieg des Fluoreszenzsignals, welcher eine umfassende Adhäsion der mit Calcein-AM markierten Thrombozyten an die AsPC-1 Zellen indizierte (Abbildung 26).

Durch eine Präinkubation der Thrombozyten mit UFH wurde die Thrombozytenadhäsion höchst signifikant reduziert. Die Präinkubation mit Enoxaparin erwirkte eine signifikante und die mit Tinzaparin eine hoch signifikante Reduktion der Adhäsion. Der selektive Faktor Xa-Inhibitor Fondaparinux und das reduzierte Oxyheparin, in der Konzentration von 5 µg/mL, vermochten die Adhäsion zu reduzieren, erreichten aber nicht das Niveau von UFH und den beiden LMWHs (264). Jedoch vermittelte das RO-Heparin in einer höheren Konzentration von 10 µg/mL eine hoch signifikante Reduktion der Adhäsion, was auf eine Konzentrationsabhängigkeit des RO-Heparin-Effektes hinweist. Da das nicht antikoagulative RO-Heparin in diesem koagulationsfreien Modellsystem seine Wirksamkeit entfaltet, wird die Bedeutung der GAG-Struktur der Heparine für die Unterdrückung der Thrombozytenbindung an die Tumorzellen eindrucksvoll verdeutlicht.

Die Präinkubation mit Rivaroxaban, dem zweiten Faktor Xa-Inhibitor, resultierte in einer hoch signifikanten Reduktion der Thrombozytenadhäsion (272). Diese hoch signifikante Reduktion von Rivaroxaban und der hemmende Effekt von Fondaparinux waren bemerkenswert, da beide Faktor Xa-Inhibitoren sind und die Versuche mit Thrombozyten in recalcifiziertem TRPu durchgeführt wurden, welcher keine Gerinnungsfaktoren mehr enthalten sollte (264,272).

Das Experiment wurde mit MDA-MB-231 Zellen wiederholt und es zeigte sich, dass auch diese Zelllinie die Fähigkeit besitzt, mit Thrombozyten zu interagieren und eine stabile Adhäsion aufzubauen (Abbildung 27). Die Adhäsion, welche durch eine Koinkubation der MDA-MB-231 Zellen mit Thrombozyten erreicht wurde, war der Adhäsion durch eine Koinkubation AsPC-1 Zellen ähnlich.

Die Inhibition der Adhäsion durch UFH, die beiden LMWHs, Rivaroxaban und RO-Heparin (10 µg/mL) waren weniger potent als im Versuch mit AsPC-1 Zellen. Hervorzuheben ist, dass die Hemmung durch UFH nicht signifikant war wie im vorangegangenen Versuch und die Inhibitionen durch die anderen vier Antikoagulantien reduzierte Signifikanzen aufwiesen. Die Ursache der Verringerung der inhibitorischen Effekte könnte in einem größeren Potential der MDA-MB-231 Zellen zur Etablierung einer gegenüber Heparin unempfindlichen Adhäsion begründet sein. Den geringsten inhibitorischen Effekt auf die Adhäsion hatten Fondaparinux und das RO-Heparin (5 µg/mL).

5. Ergebnisse und Diskussion

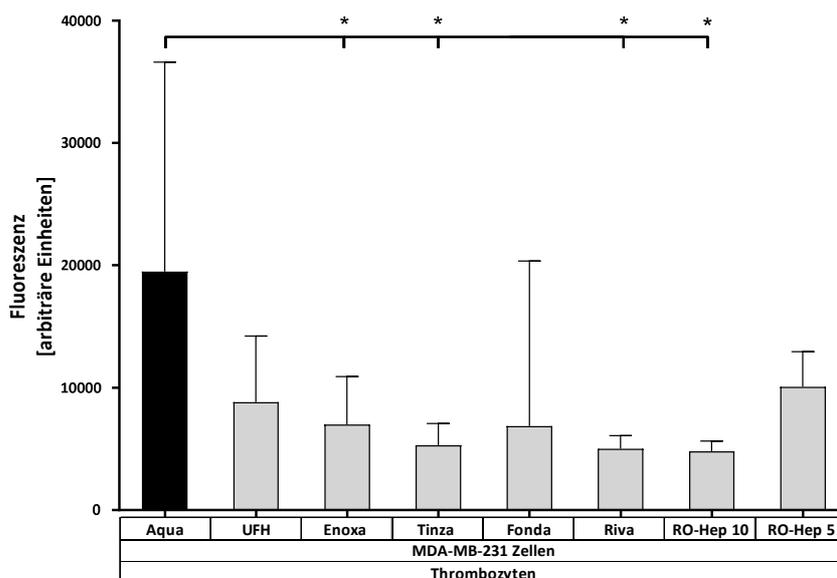


Abbildung 27: Quantifizierung der Adhäsion von Thrombozyten (400 Mio/mL) an eine konfluente Schicht aus MDA-MB-231 Zellen sowie der Inhibition durch Antikoagulantien. Dargestellt ist die Adhäsion von unbehandelten Thrombozyten und von Thrombozyten nach einer Präinkubation mit den Antikoagulantien nach 15 min (Abkürzungen analog Abbildung 26) (n=3).

Als nächstes erfolgte die Betrachtung der Thrombozytenadhäsion an MV3 Zellen. Wie bei den beiden vorangegangenen Zelllinien konnte erneut eine starke Adhäsion festgestellt werden, welche in ihrer Intensität die Adhäsionen durch die beiden anderen Zelllinien überstieg (Abbildung 28). Die Adhäsion an MV3 Zellen wurde höchst signifikant durch die beiden LMWHs und UFH reduziert. Zusätzlich zeigte sich erneut eine Tendenz zur Abschwächung des inhibitorischen Effektes von Tinzaparin über Enoxaparin hin zu UFH.

Die Präinkubation mit Rivaroxaban führte zu einer höchst signifikanten Hemmung und erstmalig inhibierte der zweite Faktor Xa-Inhibitor, das Fondaparinux, die Adhäsion auf ein signifikantes Niveau (264). Warum Fondaparinux einen signifikanten Effekt auf die Thrombozytenadhäsion exklusiv bei der Verwendung von MV3 Zellen zeigte, blieb unklar. Eine Ursache könnte die vergleichsweise moderate Standardabweichung der Messwerte der antikoagulantienfreien Probe gewesen sein. Das RO-Heparin reduzierte die Adhäsion an MV3 Zellen nur in der höheren Konzentration von 10 µg/mL signifikant.

Aufgrund der inhibitorischen Effekte des UFHs, der LMWHs und des RO-Heparins in beiden Konzentrationen verfestigte sich die Annahme, dass die GAG-Struktur für die Effekte verantwortlich sein könnte. Wobei möglicherweise nicht einfach die Größe der GAG-Struktur entscheidend war, da eine Abnahme der Effekte von Tinzaparin über Enoxaparin hin zu UFH erkennbar war (Abbildung 27, 28).

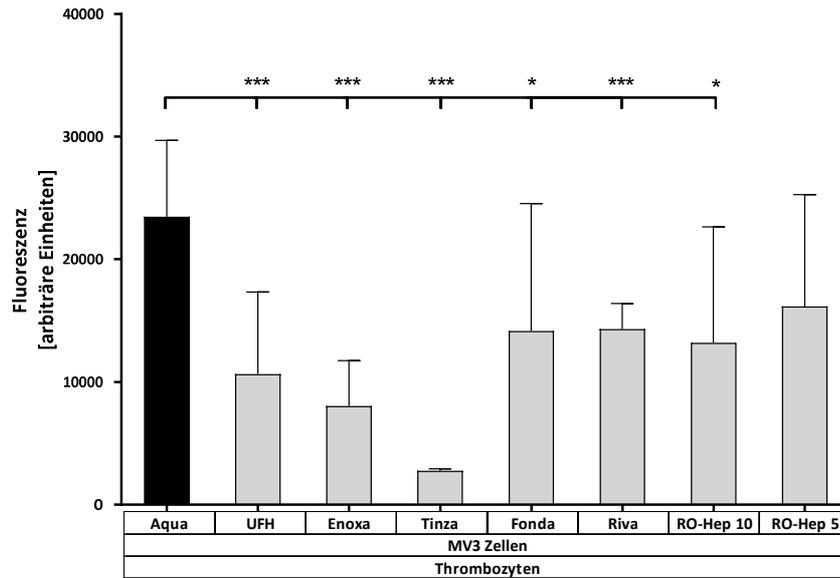


Abbildung 28: Quantifizierung der Adhäsion von Thrombozyten (400 Mio/mL) an eine konfluente Schicht aus MV3 Zellen sowie der Inhibition durch Antikoagulantien. Dargestellt ist die Adhäsion von unbehandelten Thrombozyten und von Thrombozyten nach einer Präinkubation mit den Antikoagulantien nach 15 min (Abkürzungen analog Abbildung 26) (n=3).

Schließlich wurde eine Quantifizierung der Thrombozytenadhäsion an PC-3 Zellen durchgeführt. Im Vergleich zu den anderen Zelllinien zeigte sich, dass PC-3 Zellen nur zu einer schwachen Adhäsion von Thrombozyten befähigt waren.

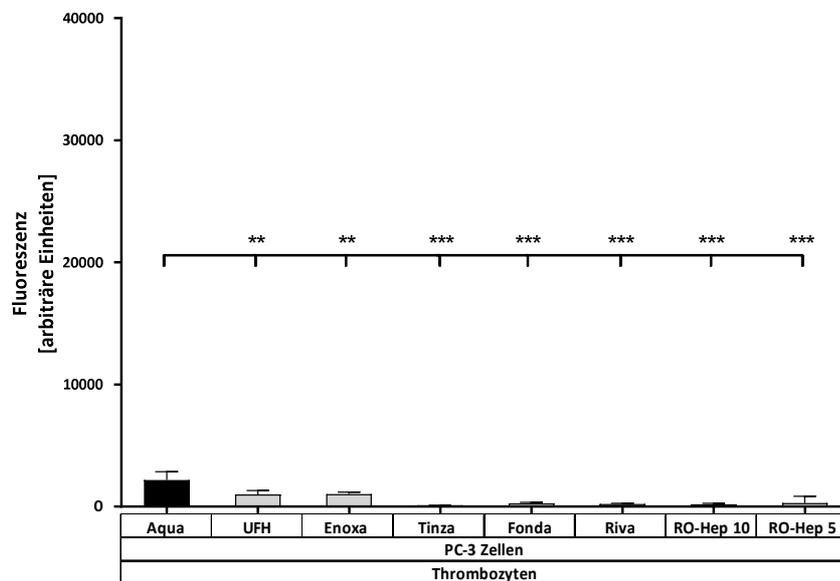


Abbildung 29: Quantifizierung der Adhäsion von Thrombozyten (400 Mio/mL) an eine konfluente Schicht aus PC-3 Zellen sowie der Inhibition durch Antikoagulantien. Dargestellt ist die Adhäsion von unbehandelten Thrombozyten und von Thrombozyten nach einer Präinkubation mit den Antikoagulantien nach 15 min (Abkürzungen analog Abbildung 26) (n=3).

Möglicherweise war diese schwache Adhäsion darin begründet, dass die PC-3 Zellen die notwendigen Adhäsionsrezeptoren oder Liganden in einer verminderten Anzahl

exprimierten. Trotz der schwachen Thrombozytenadhäsion offenbarten alle Testsubstanzen inhibitorische Effekte bzw. hoch sowie höchst signifikante Reduktionen der Adhäsion. Die hemmenden Effekte von Tinzaparin sind erneut stärker als die von Enoxaparin und UFH. Auch Fondaparinux und RO-Heparin (5 µg/mL) vermochten die Adhäsion zwischen PC-3 Zellen und Thrombozyten signifikant zu reduzieren (Abbildung 29).

Abschließend sollen alle wichtigen Erkenntnisse aus den vier Quantifizierungen zusammengefasst werden. Das Potential zur Ausbildung einer Adhäsion mit Thrombozyten variierte zwischen den eingesetzten Tumorzellen. Das größte Potential offenbarten Tumorzellen der Linien MV3, dann folgten in abfallender Reihenfolge MDA-MB-231, AsPC-1 und PC-3. Diese Differenzen könnten aus dem Expressionsprofil von Adhäsionsrezeptoren oder Liganden für diese resultieren. Ebenso könnte man postulieren, dass eine Aktivierung der Thrombozyten vor der Adhäsion stattfand und diese in Abhängigkeit der Tumorzelllinie von unterschiedlicher Intensität war, wodurch die folgende Adhäsion tangiert wurde.

Bezüglich der LMWHs und UFH ist hervorzuheben, dass die Beschaffenheit ihrer GAG-Struktur einen hemmenden Einfluss auf die Adhäsion gehabt haben könnte. Dass die GAG-Struktur einen Einfluss auf die Adhäsion zwischen TCs und Thrombozyten hatte, wird durch die inhibitorischen Effekte des RO-Heparins unterstrichen. Tinzaparin offenbarte das größte inhibitorische Potential in diesen Versuchen. Die inhibitorische Wirksamkeit von Rivaroxaban und Fondaparinux konnte an dieser Stelle nicht abschließend bewertet werden.

5.2 Quantifizierung der *tumor cell-induced platelet aggregation* durch Tumorzellen der Linien AsPC-1, MDA-MB-231, MV3 und PC-3

5.2.1 Einfluss von Antikoagulantien auf die *tumor cell-induced platelet aggregation*

Aus der Untersuchung der Adhäsion resultierten erste Erkenntnisse zu den Tumorzell-Thrombozyten-Interaktionen in einem statischen zweidimensionalen Modell sowie zur Inhibition dieser durch Antikoagulantien. Zur Annäherung an die *in vivo* Situation wurde die TCIPA in einem dynamischen System untersucht. Hierzu wurde die Lichttransmissionsaggregometrie modifiziert nach Born eingesetzt. Durch die Verwendung von recalcifiziertem TRPu wurden erneut parakrine und adhäsive Effekte isoliert betrachtet.

Die Darstellung der Messergebnisse erfolgte in Form von Graphen, welche die Aggregation in Prozent auf der Y-Achse gegen die Zeit auf der X-Achse darstellen. Die Aggregation wurde

insgesamt über eine Zeitspanne von 1200 s gemessen. Zusätzlich zur Induktion der Aggregation mit Tumorzellen wurde stets eine Aggregation durch Zugabe des PAR-1-Agonisten TRAP-6 hervorgerufen. Die mit TRAP-6 aktivierten Proben wurden als Positivkontrolle verwendet, da TRAP-6 immer und direkt eine umfassende Thrombozytenaktivierung mit folgender Aggregation induziert. Außerdem konnte so stets die Funktionalität der Thrombozyten geprüft werden.

AsPC-1 Zellen erzeugten nach Zugabe zum recalcifiziertem TRPu, nach ca. 200 s, eine vollständige Aggregation (Abbildung 30, schwarze Kurve). Der Verlauf der Messung zeigte zudem nur minimale Anzeichen eines *shape change* der Thrombozyten. Dieser ist durch das anfängliche Abfallen der Kurve in den negativen Bereich, kurz vor dem Anstieg gekennzeichnet. Die Transmission fällt kurzzeitig ab, da die Thrombozyten Pseudopodien im Zuge des *shape change* ausbilden (376,377).

Interessanterweise erreichte die Aggregation induziert durch AsPC-1 Zellen einen größeren Wert als die durch TRAP-6 induzierte Aggregation (Abbildung 30, orange Kurve), die eigentlich als Positivkontrolle diente. Zudem blieb die durch AsPC-1 Zellen induzierte Aggregation der Thrombozyten konstant auf einem hohen Niveau und flachte nicht wie die Positivkontrolle langsam ab. Diese Differenzen in den Aggregationen könnten erklärbar sein durch die Anwesenheit der Tumorzellen, welche eine stabile Heteroaggregatbildung ermöglichen.

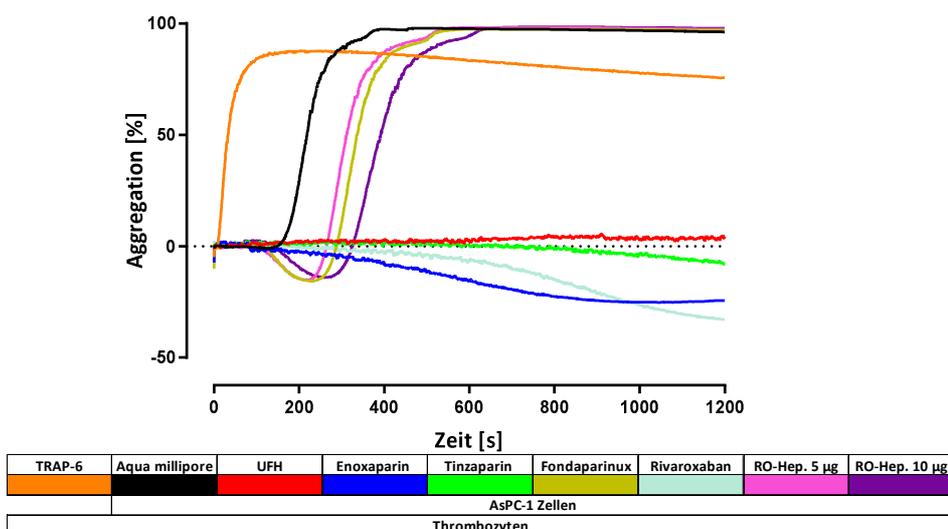


Abbildung 30: Darstellung des Verlaufes der Thrombozytenaggregation von recalcifiziertem TRPu (400 Mio/mL) über 1200 s induziert durch AsPC-1 Zellen (10.000 Zellen/mL) sowie der Inhibition durch Antikoagulantien. Es handelt sich um einen repräsentativen Graphen einer Messung (n=3). Unfraktioniertes Heparin (UFH), Reduziertes Oxyheparin 5µg/mL u. 10µg/mL (RO-Hep. 5µg, RO-Hep. 10µg)

Die Antikoagulantien konnten basierend auf ihren Effekten grob in zwei Gruppen unterteilt werden. Die eine Gruppe zeigte eine Verzögerung der Aggregation, zu dieser zählten Fondaparinux und das RO-Heparin. Die andere Gruppe zeigte eine Inhibition der Aggregation, zu dieser zählten UFH, die LMWHs und Rivaroxaban (Abbildung 30).

Bezüglich der ersten Gruppe war es, basierend auf den Ergebnissen der Adhäsionsversuche, nicht überraschend, dass Fondaparinux nur eine schwache Inhibition zeigte. Jedoch wurde erwartet, dass das höher konzentrierte RO-Heparin (10 µg/mL) stärker mit der Aggregation interferieren würde, da es die Adhäsion in jedem Versuch signifikant reduzierte (Abbildung 26-29). Ein Vergleich der Messungen der beiden RO-Heparin-Konzentrationen deutete an, dass die Inhibition der TCIPA durch RO-Heparin in hohem Maße konzentrationsabhängig sein könnte. Die Quantifizierungen von Fondaparinux und RO-Heparin wiesen außerdem deutliche Zeichen eines *shape change* auf (Abbildung 30).

Ogleich alle vier Testsubstanzen der zweiten Gruppe die Aggregation über 1200 s hemmten, offenbarten sich Unterschiede in den Effekten. Der Verlauf der Graphen von Enoxaparin, Rivaroxaban und Tinzaparin könnte einen extrem langsamen Anstieg der Aggregation indizieren. Die Graphen traten in den negativen Bereich der Aggregation ein, wie es bei einem *shape change* üblich wäre, verließen diesen dann aber über die 1200 s nicht mehr (Abbildung 30 blaue, grüne und türkise Kurve). Um die inhibitorischen Potentiale der drei Antikoagulantien zu präzisieren, wurden die Versuche mit geringeren Konzentrationen wiederholt (Abbildung 34). Zudem soll angemerkt werden, dass bereits eine Verzögerung der TCIPA um 1200 s die metastasierenden Tumorzellen dem Scherstress im Blutfluss und dem Immunsystem aussetzen würde und so antimetastatisch wirken könnte (15,16).

Wie im vorangegangenen Versuch blieb die unterschiedliche Wirksamkeit der beiden Faktor Xa-Inhibitoren Fondaparinux und Rivaroxaban erhalten (264,272). UFH war der einzige und somit stärkste Inhibitor, der kein Anzeichen einer Aggregation erkennen ließ und dessen Graph konstant an der Basislinie verlief (Abbildung 30, rote Kurve).

Im Wesentlichen waren die Resultate der TCIPA-Quantifizierung von MDA-MB-231 Zellen identisch zu denen von AsPC-1 Zellen. Die Aggregationen und Inhibitionen verliefen ähnlich und wiesen die gleichen Besonderheiten bezüglich des *shape change* auf. Dementsprechend konnte die gleiche Einteilung der Antikoagulantien in die zwei erwähnten Gruppen vorgenommen werden (Abbildung 31).

5. Ergebnisse und Diskussion

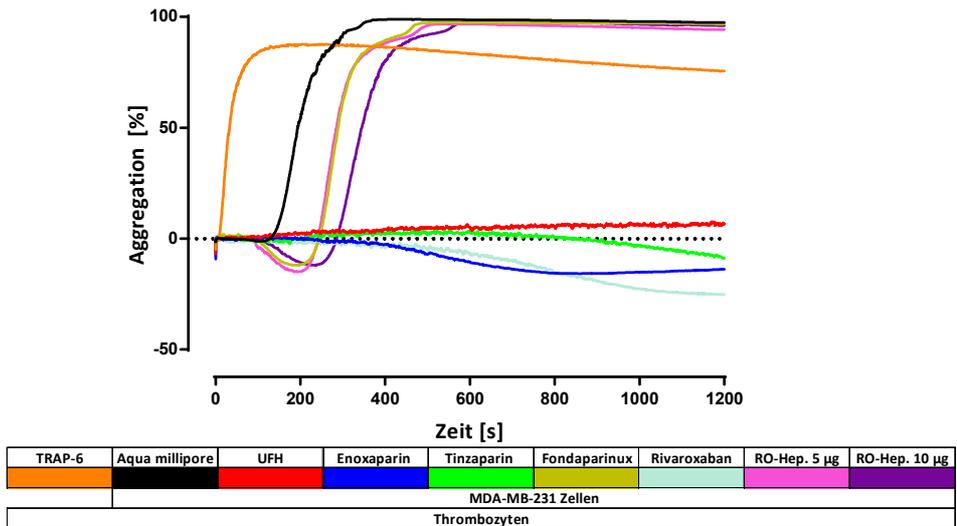


Abbildung 31: Darstellung des Verlaufes der Thrombozytenaggregation von recalcifiziertem TRPu (400 Mio/mL) über 1200 s induziert durch MDA-MB-231 Zellen (10.000 Zellen/mL) sowie der Inhibition durch Antikoagulantien. Es handelt sich um einen repräsentativen Graphen einer Messung (n=3). Unfraktioniertes Heparin (UFH), Reduziertes Oxyheparin 5µg/mL u. 10µg/mL (RO-Hep. 5µg, RO-Hep. 10µg)

Wieder gab es eine Gruppe der inhibitorisch wirksamen Antikoagulantien aus UFH, den beiden LMWHs und Rivaroxaban und eine aus verzögernd wirkenden Antikoagulantien aus Fondaparinux und RO-Heparin. UFH offenbarte in diesem Versuch erneut das höchste antiaggregatorische Potential (Abbildung 31, rote Kurve).

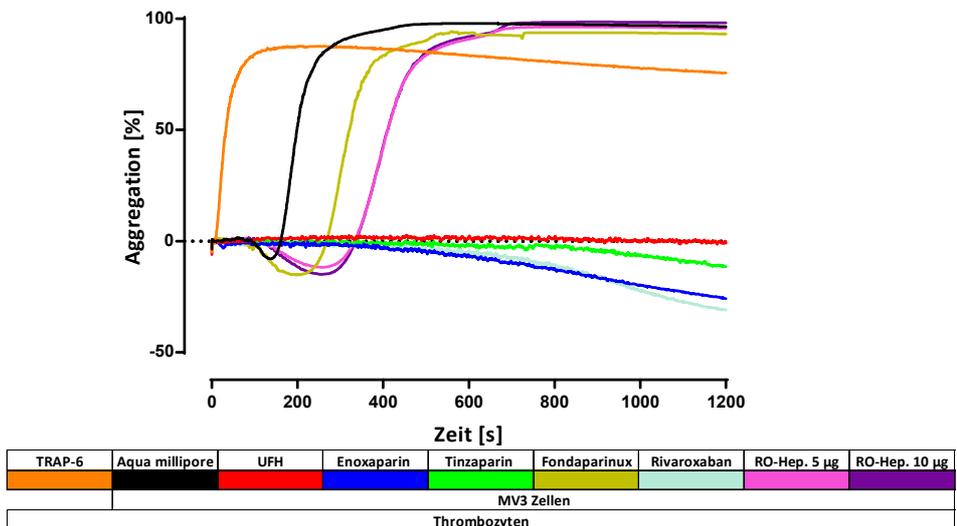


Abbildung 32: Darstellung des Verlaufes der Thrombozytenaggregation von recalcifiziertem TRPu (400 Mio/mL) über 1200 s induziert durch MV3 Zellen (10.000 Zellen/mL) sowie der Inhibition durch Antikoagulantien. Es handelt sich um einen repräsentativen Graphen einer Messung (n=3). Unfraktioniertes Heparin (UFH), Reduziertes Oxyheparin 5µg/mL u. 10µg/mL (RO-Hep. 5µg, RO-Hep. 10µg)

Die Ergebnisse der TCIPA-Quantifizierung nach einer Zugabe von MV3 Zellen waren ebenfalls ähnlich zu den beiden vorangegangenen Versuchen. Erneut konnten die Antikoagulantien

entsprechend ihren Effekten in die beiden Gruppen unterteilt werden. Wieder bestand eine Gruppe aus den schwach wirksamen Antikoagulantien Fondaparinux und RO-Heparin und die andere Gruppe setzte sich zusammen aus den wirksamen Substanzen UFH, den LMWHs und Rivaroxaban (Abbildung 32). Lediglich die beiden folgende Unterschiede traten auf; der Verlauf der Aggregation nach einer Zugabe von MV3 Zellen zeigte erstmalig einen ausgeprägten *shape change* (Abbildung 32, schwarze Kurve) und beide RO-Heparin Konzentrationen besaßen den gleichen inhibitorischen Effekt. Auch in dieser Quantifizierung offenbarte sich UFH als wirksamster Inhibitor der TCIPA (Abbildung 32, rote Kurve).

Schließlich wurde noch die TCIPA durch PC-3 Zellen untersucht. Durch Zugabe zu recalcifiziertem TRPu konnte keine Aggregation induziert und detektiert werden (Abbildung 33, schwarze Kurve). Folglich wurden keine Effekte der Antikoagulantien erfasst. Die Funktionalität der Thrombozyten wurde bestätigt, indem sie mit TRAP-6 aktiviert und aggregiert wurden (Abbildung 33, orange Kurve). Der Versuch demonstriert, dass PC-3 Zellen nicht zur Induktion einer Thrombozytenaggregation befähigt waren.

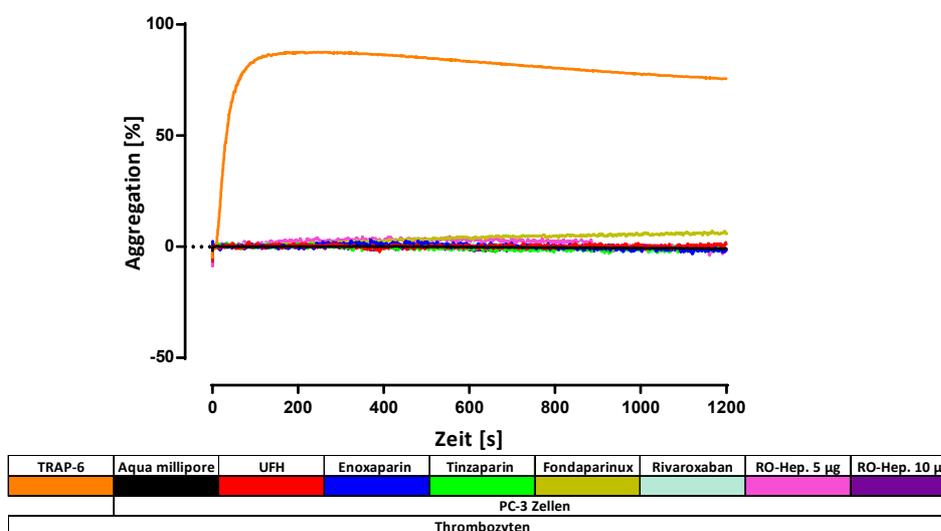


Abbildung 33: Darstellung des Verlaufes der Thrombozytenaggregation von recalcifiziertem TRPu (400 Mio/mL) über 1200 s induziert durch PC-3 Zellen (10.000 Zellen/mL) sowie der Inhibition durch Antikoagulantien. Es handelt sich um einen repräsentativen Graphen einer Messung (n=3). Unfraktioniertes Heparin (UFH), Reduziertes Oxyheparin 5µg/mL u. 10µg/mL (RO-Hep. 5µg, RO-Hep. 10µg)

Anhand der TCIPA-Quantifizierungen konnte demonstriert werden, dass Tumorzellen der Linien AsPC-1, MDA-MB-231 und MV3, aber nicht PC-3 eine Aggregation in recalcifiziertem TRPu induzierten. Somit ergab sich die Frage, was Melanom-, Pankreaskarzinom- und Mammakarzinomzellen von den Prostatakarzinomzellen hinsichtlich der Induktion einer Thrombozytenaggregation unterschied. Da in den Graphen der

Aggregation immer, wenn auch erst nach Zugabe von RO-Heparin oder Fondaparinux, ein *shape change* der Thrombozyten feststellbar war, wurde angenommen, dass vor der Aggregation eine Thrombozytenaktivierung stattfand. Diese wurde durch die Tumorzellen induziert.

Die offensichtlichste Gemeinsamkeit der drei aktivierenden Zelllinien ist ihre TF-Präsentation (378–381). Diese ermöglicht eine Aktivierung der Blutgerinnungskaskade via Faktor VII, woraus eine Bildung von Thrombin resultiert, das Thrombozyten über PAR-Rezeptoren aktivieren kann (61,62,76). Im Vergleich dazu exprimieren PC-3 Zellen sehr wenig TF (382). Somit könnte man annehmen, dass die Thrombozytenaktivierung und die Aggregation von einer TF-Präsentation seitens der Tumorzellen und der Blutgerinnungskaskade bzw. Thrombin abhängig waren.

Dieser Mechanismus zur Thrombozytenaktivierung wurde eigentlich ausgeschlossen, da Thrombozyten von der Blutgerinnungskaskade getrennt wurden und resuspendiert in recalcifiziertem TRPu verwendet wurden. Dementsprechend hätte die Thrombozytenaktivierung unabhängig von der Gerinnung ablaufen müssen und sollte aus adhäsiven und parakrinen Wechselwirkungen mit Tumorzellen resultieren. Wenngleich praktisch keine Gerinnungs-faktoren enthalten waren, so war doch durch die Recalcifizierung Calcium im TRPu vorhanden, welches für die Funktionalität der Gerinnungskaskade unabdingbar ist (61,76). Somit konnte eine Thrombingenerierung nicht absolut ausgeschlossen werden.

Die Theorie der Aktivierung via Thrombin bot darüber hinaus einen Erklärungsansatz für die differente Wirksamkeit der beiden Faktor Xa-Inhibitoren. Hierzu müsste man voraussetzen, dass eine Faktor Xa-Inhibition durch Heparin-Antithrombin III- und Fondaparinux-Antithrombin III-Komplexe umfassend beeinträchtigt wird, sobald dieser Faktor in den Prothrombinasekomplex eingebaut wurde. Eine solche Abschirmung wurde von Bruffato et al. und Rezaie et al. beschrieben. Bruffato et al. zeigten, dass die Faktor Xa-Inhibition in Gegenwart von Phospholipidvesikeln, Prothrombin, Calciumionen und Faktor Va durch Antithrombin III im Verbund mit UFH, Enoxaparin oder Fondaparinux stark reduziert war (383,384). Jedoch ist der Mechanismus nicht abschließend geklärt, diskutiert wird die Konkurrenz von Prothrombin und Antithrombin III um eine externe vom aktiven Zentrum unabhängige Bindungsstelle, welche im Prothrombinasekomplex effizient mit Prothrombin besetzt wird (383,385). Zudem ist die klinische Relevanz unklar, da Fondaparinux in seiner

Wirksamkeit stark beeinträchtigt wäre, sobald sich der Prothrombinasekomplex gebildet hätte. Rivaroxaban hingegen kann im Prothrombinasekomplex gebundenen Faktor Xa inhibieren (386,387).

Eine Abschirmung von Faktor Xa würde sich darüber hinaus weniger auf die Wirkung von UFH, Tinzaparin und Enoxaparin in diesem Kontext auswirken, da sie, zusätzlich zur Faktor Xa-Inhibition, zu einer Hemmung von Thrombin via Antithrombin III befähigt sind. Anhand der Befunde von Bruffato et al. sind die hier gezeigten Effekte des Fondaparinux im Vergleich zu Rivaroxaban und UFH bzw. den LMWHs zumindest partiell erklärbar.

Gegen eine Thrombinbeteiligung spricht, dass zur Etablierung einer Aggregation zwischen Tumorzellen und Thrombozyten adhäsive Verbindungen aufgebaut werden müssen. Welchen Beitrag diese zu einer möglichen Aktivierung via Adhäsionsrezeptoren besitzen, ist an dieser Stelle unklar. So konnte z. B. für MDA-MB-231 Zellen nachgewiesen werden, dass diese Podoplanin, den Liganden von CLEC-2, exprimieren, wodurch eine Thrombozytenaktivierung induziert werden kann (388). Weiterhin wurde von Mitrugno et al. an gewaschenen Thrombozyten gezeigt, dass MDA-MB-231-Zellen, aber nicht PC-3 Zellen eine TCIPA auslösen können. Mitrugno et al. demonstrierten zudem, dass eine TCIPA, induziert durch eine stark metastatische Prostatakarzinomzelllinie (PC-3M-luc), in keiner Weise signifikant durch einen PAR-1-Inhibitor reduziert wurde (92). Somit stuften sie eine Beteiligung von Thrombin als vernachlässigbar ein.

Zusätzlich widerspricht die Wirksamkeit des nicht antikoagulativen RO-Heparins der Theorie einer Thrombingenerierung im recalcifizierten TRPu, da es in den Adhäsionsexperimenten gute Effekte zeigte. Somit ist es wahrscheinlich, dass RO-Heparin diese inhibitorischen Effekte über seine GAG-Struktur vermittelte. Diese kann mit thrombozytären Adhäsionsrezeptoren, wie z. B. Selektinen und Integrinen, interferieren und so Inhibitionen einer adhäsiven Thrombozyten-aktivierung herbeiführen (389). Außerdem soll erwähnt werden, in Bezugnahme auf Abschnitt 2.2 Thrombozytenaktivierung induziert durch Tumorzellen, dass zahlreiche weitere Möglichkeiten für adhäsive aktivierende Interaktionen sowie die Freisetzung von Thrombozytenaktivatoren durch Tumorzellen bestehen.

Aufgrund der heterogenen Literatur und Ergebnisse kann an dieser Stelle nicht abschließend bewertet werden, ob eine Beteiligung von Thrombin vorlag und, ob die TF-Expression der Tumorzellen entscheidend für die Induktion einer TCIPA war.

5.2.2 Quantifizierung der Konzentrationsabhängigkeit der Inhibition der *tumor cell-induced platelet aggregation* durch Antikoagulantien anhand von AsPC-1 Zellen

Zur abschließenden Evaluation der TCIPA-Inhibition durch Antikoagulantien wurden von jeder Testsubstanz zwei weitere Konzentrationen eingesetzt und die TCIPA durch AsPC-1 Zellen quantifiziert (Abbildung 34). Da die Tumorzelllinien MV3, AsPC-1 und MDA-MB-231 die Thrombozytenaggregation in ähnlicher Intensität und Geschwindigkeit induzierten, wurde stellvertretend eine Zelllinie ausgewählt für die Quantifizierung. So konnte ermittelt werden, ob Effekte verschwinden, stärker werden, erst bei höheren Konzentrationen in Erscheinung treten oder auch bei geringen Konzentrationen erhalten bleiben.

Die reduzierenden Effekte von UFH und den beiden LMWHs, Enoxaparin und Tinzaparin, blieben auch bei einer Halbierung der Standardkonzentration erhalten (Abbildung 34, rote, blaue und grüne Kurven). Demgemäß wurde ausgeschlossen, dass die Aggregation in Gegenwart einer der drei Substanzen nach 1200 s bedeutend ansteigen würde. Alle drei Substanzen erwiesen sich somit als potente Inhibitoren der TCIPA in diesem Modell, wobei UFH den stärksten Inhibitor repräsentierte.

Überraschenderweise wurde die Wirksamkeit von Fondaparinux durch die Änderungen der Konzentrationen nur marginal tangiert. Die Verzögerung der Aggregation wurde bei einer Erhöhung der Konzentration größer und bei einer Reduktion kleiner. Die Intensität der Aggregation bzw. der maximale Wert wurden nicht beeinflusst (Abbildung 34, gelbe Kurven). Die Resultate zur Quantifizierung der Konzentrationsabhängigkeit der TCIPA-Inhibition von Rivaroxaban und RO-Heparin fügten der Betrachtung interessante Aspekte hinzu. Der Faktor Xa-Inhibitor offenbarte eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit seiner Effekte (272). Bei einer Halbierung der in dieser Arbeit verwendeten Standardkonzentration verlor Rivaroxaban seinen hemmenden Effekt auf die TCIPA. Dieser wandelte sich in eine Verzögerung, vergleichbar mit den Fondaparinux-Effekten. Zusätzlich konnten Effekte des Rivaroxaban-Lösungsmittels DMSO ausgeschlossen werden (Abbildung 34, türkise Kurven).

RO-Heparin offenbarte ebenfalls eine massive Konzentrationsabhängigkeit seiner Effekte. Jedoch wurde diese erst ab der fünffachen Konzentration (50 µg/mL) sichtbar und erreichte erst in der zehnfachen Konzentration (100 µg/mL) eine vollständige Unterdrückung der Aggregation (Abbildung 34, violette Kurven). Es kann daher angenommen werden, dass durch die höhere Menge des RO-Heparins eine effektivere Inhibition der Tumorzellkontakte

5. Ergebnisse und Diskussion

mit den Thrombozyten erfolgen konnte, was die antiadhäsiven Eigenschaften der GAG-Strukturen unterstreicht.

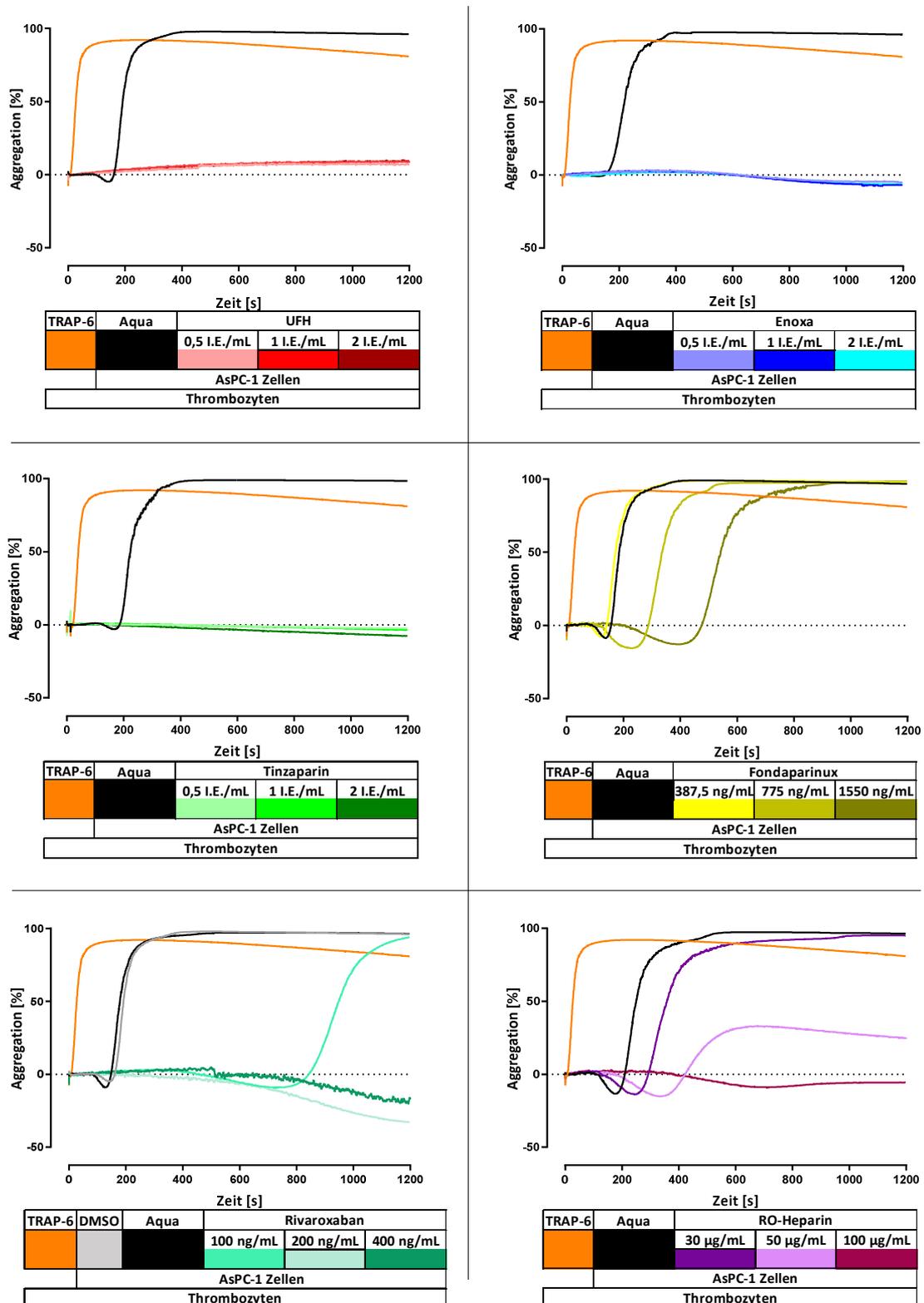


Abbildung 34: Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der TCIPA-Inhibition der eingesetzten Antikoagulantien (Messung über 1200s). Induktion der Aggregation erfolgte durch die Zugabe von AsPC-1 Zellen (10.000 Zellen/mL) zu recalcifiziertem TRPu (400 Mio/mL), das mit den entsprechenden Antikoagulantien, in unterschiedlichen Konzentrationen, einer Präinkubation unterzogen wurde. Es handelt sich um repräsentative Graphen einer Messung (n=3).

5.3 Quantifizierung der Thrombingenerierung in recalcifiziertem, thrombozytenreichem Puffer

Aus den Versuchen zur TCIPA resultierte die Hypothese, dass die der Aggregation vorangehende Thrombozytenaktivierung durch Thrombin aus der Gerinnungskaskade induziert wurde und abhängig davon war, ob Tumorzellen TF präsentierten. Zur Prüfung dieser Annahme wurde eine Quantifizierung der Thrombingenerierung in dem verwendeten Modell (recalcifizierter TRPu) vorgenommen. Hierzu wurde die Thrombingenerierung durch eine Zugabe von MDA-MB-231 Zellen zu entweder recalcifiziertem TRP oder zu recalcifiziertem TRPu induziert. Diese Versuche wurden freundlicherweise von Lukas Gockel im Rahmen seiner Masterarbeit durchgeführt und ausgewertet.

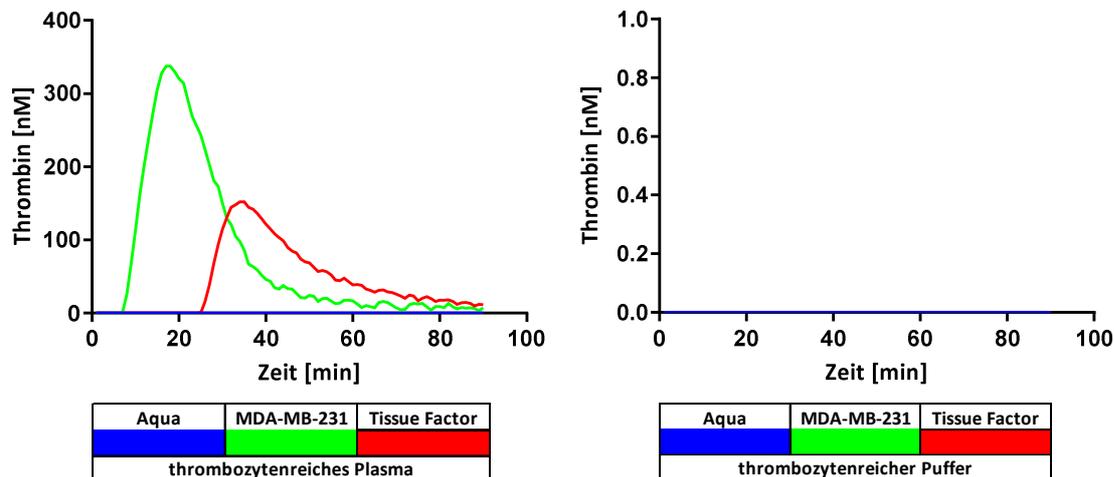


Abbildung 35: Direkter Vergleich der Thrombingenerierung induziert durch die Zugabe von MDA-MB-231 Zellen oder TF zu recalcifiziertem thrombozytenreichem Plasma (320 Mio/mL) (links) sowie zu recalcifiziertem thrombozytenreichem Puffer (400 Mio/mL) (rechts) (n=3).

Die Ergebnisse zeigen, dass keine Thrombingenerierung in recalcifiziertem TRPu (Abbildung 35, rechts) festgestellt werden konnte. Weder die Zugabe von MDA-MB-231 Zellen noch die Zugabe von TF resultierten in einer messbaren Thrombingenerierung. Demgegenüber ist die Blutgerinnungskaskade in recalcifiziertem TRP vorhanden und funktionsfähig, insofern wurde durch beide Zugaben eine Thrombingenerierung eingeleitet (Abbildung 35, links) (62). Grundsätzlich erlauben diese Ergebnisse zwei Schlussfolgerungen. Erstens, die Annahme einer Beteiligung von Thrombin an der Thrombozytenaktivierung im verwendeten recalcifiziertem TRPu wurde widerlegt und Thrombin kann als Aktivator aus dieser

Betrachtung ausgeschlossen werden. Zweitens, die gebildete Thrombinmenge ist so gering, dass die Sensitivität des Testsystems nicht zur Detektion ausreichte.

Aus Gründen der Vollständigkeit soll auf Arbeiten von Heinmöller et al. hingewiesen werden, in diesen wurde auch die TCIPA durch Tumorzellen via Aggregometrie quantifiziert. Sie postulierten, dass eine TCIPA, welche aus einer Zugabe von Pankreas- oder Lungenkarzinomzellen zu thrombozytenreichem Tyrodespuffer resultierte, erst möglich wurde, wenn ein geringer Prozentsatz des Gesamtvolumens an Plasma hinzugefügt wurde. Zur Präzisierung des Mechanismus wiederholten Sie das Experiment mit dem Unterschied, dass die Plasma-Zugabe durch eine Gabe von Prothrombin und Faktor V ersetzt wurde. Erneut war eine Aggregation feststellbar (390). Für die Faktor Xa-unabhängige Thrombinaktivierung postulierten die Autoren eine intrinsische Faktor Xa-Aktivität der Tumorzellen (390,391).

Sofern eine gewisse Übertragbarkeit der Ergebnisse von Heinmöller et al. auf diese Arbeit besteht muss angemerkt werden, dass evtl. vorhandene Plasmareste keine detektierbare Thrombinbildung ausgelöst haben.

Abschließend soll noch einmal auf die Arbeiten von Mitrugno et al. verwiesen werden, in welcher eine Thrombinbeteiligung an einer TCIPA durch die Verwendung von PAR-1-Inhibitoren ausgeschlossen wurde. Sie postulierten eine Thrombozytenaktivierung basierend auf einem direkten Kontakt zu Tumorzellen unter Beteiligung des FcγRIIa-Rezeptors (92).

Der aktivierende Mechanismus bleibt an dieser Stelle weiterhin fraglich. Basierend auf Literaturbefunden und den Ergebnissen müssen weiterhin beide Aktivierungsmechanismen in Erwägung gezogen werden. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurde in folgenden Versuchen die Granulasekretion fokussiert und analysiert.

5.4 Quantifizierung der Granulasekretion von Thrombozyten nach einem Kontakt mit Tumorzellen der Linien AsPC-1, MDA-MB-231, MV3 und PC-3

Da die thrombozytäre Granulasekretion die Ursache vieler prometastatischer Konsequenzen der Tumorzell-Thrombozyten-Kommunikation darstellt, wie z. B. einer Angiogenese oder einer EMT-Induktion in metastasierenden Tumorzellen, wurde sie im Folgenden umfassend analysiert.

Basierend auf den Ergebnissen zur Quantifizierung der Thrombingenerierung in recalcifiziertem TRPu wurde das etablierte Modell beibehalten und eine Betrachtung der thrombozytären Granulasekretion nach Tumorzell-Zugabe zu recalcifiziertem TRPu durchgeführt. Hierzu wurden wieder alle vier Tumorzelllinien sowie alle bisher verwendeten Antikoagulantien eingesetzt.

Die Granulasekretion, welche aus einer antikoagulantienfreien Koinkubation von Tumorzellen und Thrombozyten resultierte, ist in jedem Histogramm durch einen schwarzen Balken gekennzeichnet. Alle ermittelten Signifikanzen beziehen sich auf diese Messungen. Die Ergebnisse wurden stets auf die Freisetzung, die durch den PAR-1-Agonisten TRAP-6 ausgelöst wurde, normalisiert. Die TRAP-6-vermittelte Freisetzung wurde dabei als 100 %-Wert definiert. Zusätzlich konnte durch die Verwendung von TRAP-6 stets die Funktionsfähigkeit der Thrombozyten geprüft und bestätigt werden.

5.4.1 Quantifizierung der ATP-Freisetzung aus der dichten-Granula

Die Präsentation der Ergebnisse beginnt mit der ATP-Freisetzung, die aus einer Koinkubation der Thrombozyten mit AsPC-1 Zellen resultierte. Die Tumorzellen induzierten eine ATP-Freisetzung von 113,5 %, die somit die durch TRAP-6 ausgelöste Freisetzung um 13,5 % übertraf. Diese wurde höchst signifikant durch eine Präinkubation mit UFH, den beiden LMWHs, Rivaroxaban und RO-Heparin (10 µg/mL) reduziert sowie hoch signifikant durch das RO-Heparin (5 µg/mL) (Abbildung 36). UFH und die beiden LMWHs erreichten eine Reduktion der ATP-Freisetzung auf Werte von ca. 5%. Das RO-Heparin reduzierte die Sekretion in der 10 µg/mL Konzentration auf 18,8 % und in der 5 µg/mL Konzentration auf 56,3 %. Somit zeigte sich erneut eine Konzentrationsabhängigkeit der Inhibition durch RO-Heparin. Fondaparinux zeigte keinerlei Hemmwirkung auf die Freisetzung. Demgegenüber

5. Ergebnisse und Diskussion

trat Rivaroxaban erneut als hochpotenter Inhibitor in Erscheinung und reduzierte die ATP-Freisetzung auf 5,8 %.

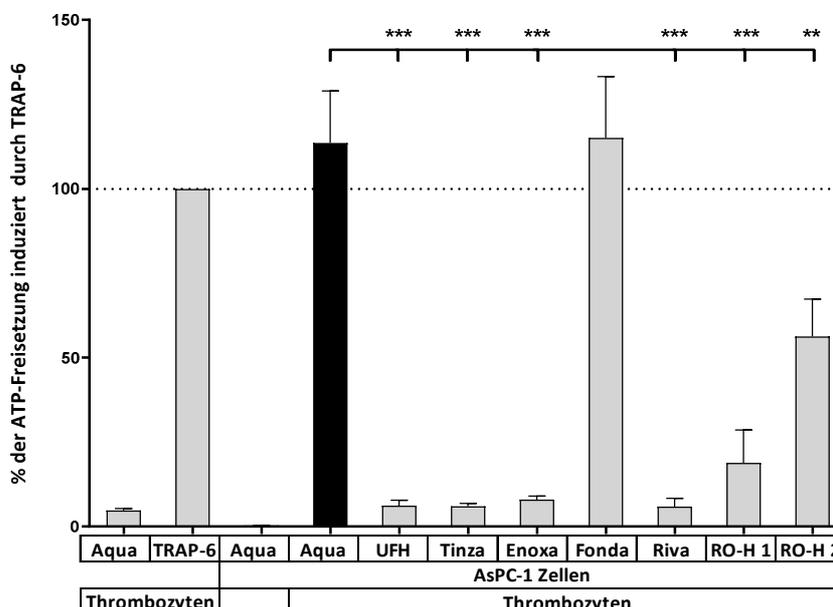


Abbildung 36: Relative Quantifizierung der ATP-Freisetzung von unbehandelten Thrombozyten (400 Mio/mL) (Aqua), von mit TRAP-6 aktivierten Thrombozyten (TRAP-6), von AsPC-1 Zellen (Aqua), von Thrombozyten aktiviert mit AsPC-1 Zellen (Aqua) und von Thrombozyten aktiviert mit AsPC-1 Zellen nach einer Präinkubation mit unfractioniertem Heparin (UFH), Tinzaparin (Tinza), Enoxaparin (Enoxa), Fondaparinux (Fonda), Rivaroxaban (Riva), und reduziertem Oxyheparin in den Konzentrationen 10 µg/mL und 5 µg/mL (RO-H 1, RO-H 2) (n=3).

Die Quantifizierung wurde mit den Mammakarzinomzellen MDA-MB-231 wiederholt. Die Ergebnisse waren ähnlich zu denen aus dem vorangegangenen Versuch. MDA-MB-231 Zellen induzierten eine ATP-Freisetzung von 113,1 %. Fondaparinux blieb wirkungslos und zeigte keine inhibitorischen Effekte. Die Antikoagulantien UFH, Tinzaparin, Enoxaparin, Rivaroxaban und RO-Heparin (10 µg/mL) hemmten die ATP-Freisetzung wieder höchst signifikant. Die niedrigere RO-Heparin Konzentration von 5 µg/mL zeigte erneut einen hoch signifikanten Effekt (Abbildung 37). Erwähnenswert ist, dass der Effekt des RO-Heparins bzw. der beiden Konzentrationen stärker war als im Experiment mit den AsPC-1 Zellen.

Da der Mechanismus des Rivaroxaban-Effektes noch immer unklar war, wurde das Rivaroxaban-Lösungsmittel DMSO hinsichtlich inhibitorischer Kapazitäten an den MDA-MB-231 Zellen geprüft. Es konnten keine Effekte festgestellt werden (Abbildung 37).

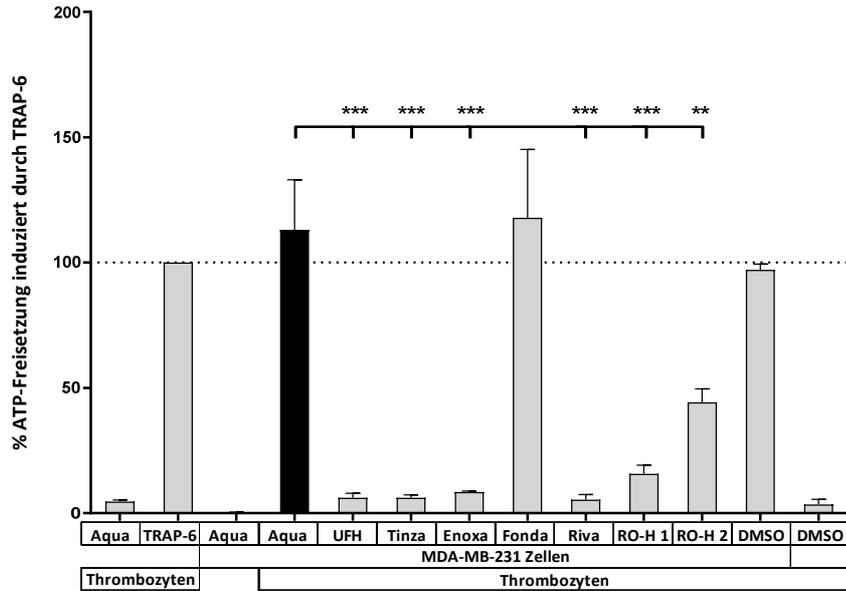


Abbildung 37: Relative Quantifizierung der ATP-Freisetzung von unbehandelten Thrombozyten (400 Mio/mL), von mit TRAP-6 aktivierten Thrombozyten, von MDA-MB-231 Zellen, von Thrombozyten aktiviert mit MDA-MB-231 Zellen und von Thrombozyten aktiviert mit MDA-MB-231 Zellen nach einer Präinkubation mit den Testsubstanzen (Abkürzungen analog Abbildung 36). Zusätzliche Darstellung von DMSO-Effekten (n=3).

In gleicher Weise wurde auch die durch MV3 Zellen induzierte thrombozytäre ATP-Freisetzung quantifiziert, die Messungen waren ähnlich zu den beiden vorherigen Quantifizierungen.

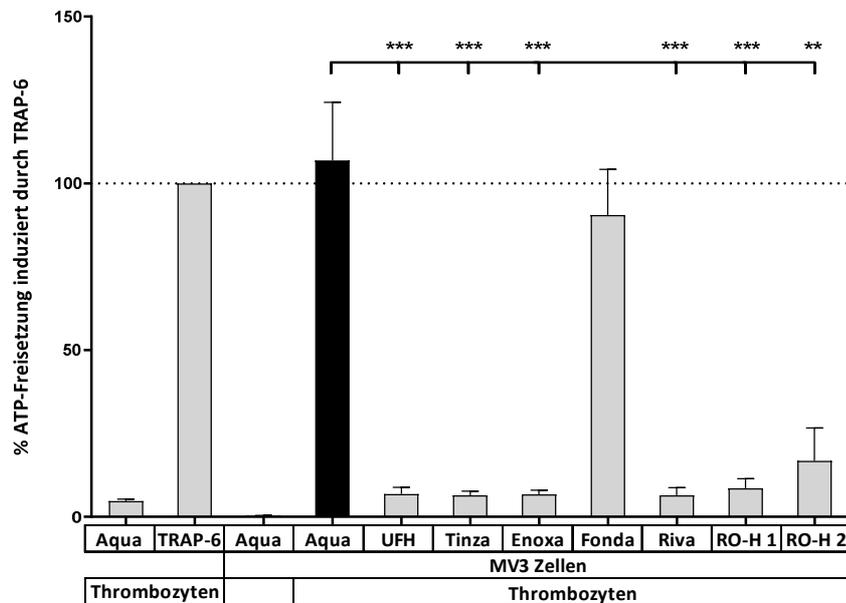


Abbildung 38: Relative Quantifizierung der ATP-Freisetzung von unbehandelten Thrombozyten (400 Mio/mL), von mit TRAP-6 aktivierten Thrombozyten, von MV3 Zellen, von Thrombozyten aktiviert mit MV3 Zellen und von Thrombozyten aktiviert mit MV3 Zellen nach einer Präinkubation mit den Testsubstanzen (Abkürzungen analog Abbildung 36) (n=3).

5. Ergebnisse und Diskussion

Das Muster der inhibitorischen Effekte der Antikoagulantien sowie die Signifikanzen der Effekte änderten sich kaum (Abbildung 38). Hervorzuheben ist, dass die Effekte der RO-Heparine noch einmal zunahmen. Beide erreichten fast eine Reduktion auf dem Niveau von UFH und den beiden LMWHs, wobei RO-Heparin (10 µg/mL) stärkere Effekte auf die ATP-Sekretion zeigte als RO-Heparin (5 µg/mL).

Bevor eine abschließende Interpretation der Quantifizierung der dichten-Granulasekretion erfolgte, wurde noch die ATP-Sekretion aus Thrombozyten nach einer Koinkubation mit PC-3 Zellen untersucht. In den vorangegangenen Versuchen offenbarten die Prostatakarzinomzellen ein geringes Potential zur Induktion einer Adhäsion und einer TCIPA. Dieses geringe Potential konnte auch in Bezug auf die Induktion einer thrombozytären ATP-Freisetzung festgestellt werden (Abbildung 39). Alle Proben, mit Ausnahme der mit TRAP-6 versetzten, wiesen Werte auf dem Niveau der unbehandelten Thrombozyten auf. Somit konnte keine Sekretion und dementsprechend keine Inhibition detektiert werden. Die Funktionsfähigkeit der Thrombozyten wurde durch die Verwendung von TRAP-6 geprüft und bestätigt.

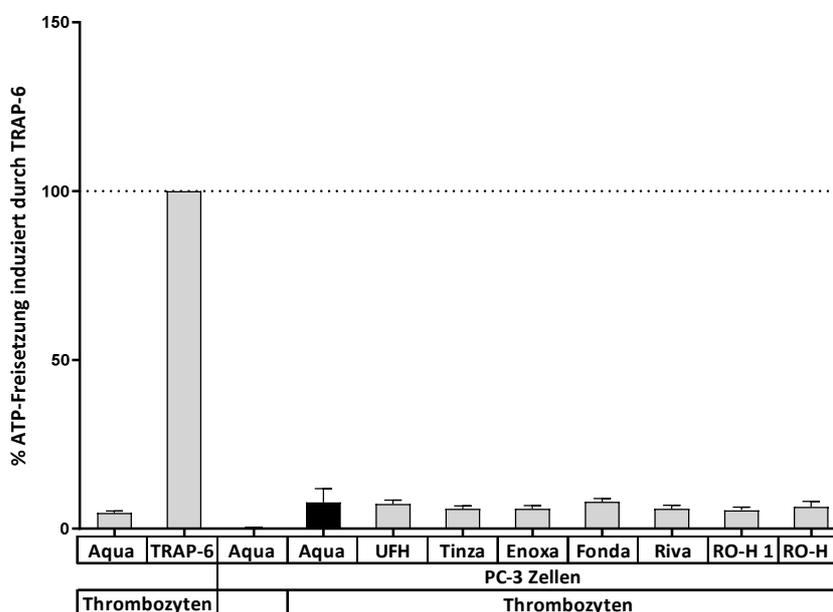


Abbildung 39: Relative Quantifizierung der ATP-Freisetzung von unbehandelten Thrombozyten (400 Mio/mL), von mit TRAP-6 aktivierten Thrombozyten, von PC-3 Zellen, von Thrombozyten aktiviert mit PC-3 Zellen und von Thrombozyten aktiviert mit PC-3 Zellen nach einer Präinkubation mit den Testsubstanzen (Abkürzungen analog Abbildung 36) (n=3).

Die Quantifizierung der ATP-Sekretion aus der dichten-Granula, induziert durch die vier Tumorzelllinien, wies Korrelationen mit den beiden bisher betrachteten Prozessen auf. Hinsichtlich der Tumorzelllinien konnte festgestellt werden, dass ihr Potential eine Adhäsion

und eine TCIPA zu induzieren, auf die Induktion einer Sekretion der dichten-Granula übertragen werden konnte. Zellen der Linien AsPC-1, MDA-MB-231 und MV3 erwiesen sich wieder als starke Induktoren, während PC-3 Zellen nur eine schwache Sekretion auslösten.

Ebenso konnte ein Unterschied der inhibitorischen Wirksamkeit der beiden Faktor Xa-Inhibitoren Rivaroxaban und Fondaparinux für die Sekretion der dichten-Granula bestätigt werden (264,272). Rivaroxaban vermittelte eine starke Hemmung der ATP-Sekretion und Fondaparinux war wirkungslos. Erneut wiesen die beiden LMWHs und UFH starke inhibitorische Kapazitäten auf.

Interessanterweise offenbarte das RO-Heparin in beiden Konzentrationen eine signifikante Hemmung der ATP-Sekretion, welche, unter Berücksichtigung der Resultate der TCIPA-Quantifizierung, so nicht erwartet wurde. Denn sowohl Fondaparinux als auch RO-Heparin hemmten die TCIPA nur marginal und es wurde angenommen, dass eine TCIPA-Hemmung mit einer Inhibition der Thrombozytenaktivierung sowie der ATP-Freisetzung assoziiert sei. Diese Annahme basierte auf der Tatsache, dass die Aggregation von Thrombozyten ADP-abhängig ist, und die ADP-Freisetzung mit der von ATP korreliert ist. Die ADP-Abhängigkeit der Thrombozytenaggregation bzw. die Bedeutung einer P2Y₁₂-Rezeptor-Aktivierung wird ersichtlich aus der therapeutischen Anwendung von P2Y₁₂-Inhibitoren wie Clopidogrel als Thrombozytenaggregationshemmer (392). Die Korrelation der ADP/ATP-Freisetzung wurde durch von Papen et al. bestätigt. Sie stellten fest, dass durch eine TRAP-6-Stimulation von Thrombozyten 41,2 % des gesamten ATPs und parallel dazu 86,2 % des gesamten ADPs freigesetzt werden (393). Basierend auf den Daten des RO-Heparins könnte man postulieren, dass eine Sekretion von ATP und ADP keine Notwendigkeit zur Induktion einer TCIPA darstellt.

Jin und Kunapuli et al. bestätigten diese Hypothese. Sie zeigten, dass die ADP-vermittelte Induktion einer Thrombozytenaggregation abhängig ist von der Koaktivierung des P2Y₁₂-Rezeptors, welcher G_i-Protein-gekoppelt ist und des P2Y₁-Rezeptors, welcher G_q-Protein-gekoppelt ist. Sie konnten die ADP-vermittelte Aggregation durch die gleichzeitige Anwendung von Epinephrin und Serotonin zur Induktion einer Thrombozytenaggregation reproduzieren (126). Somit besteht die Möglichkeit, dass Tumorzellen zur TCIPA nicht auf eine ADP-Freisetzung der Thrombozyten angewiesen sind, sofern sie intrinsische Mechanismen zur Aktivierung von je einem G_i-Protein-gekoppelten

und einem G_q-Protein-gekoppelten GPCR aufweisen. So könnte erklärt werden, warum das RO-Heparin die ATP-Sekretion hemmt, ohne die TCIPA zu tangieren.

Bisher wurde die Korrelation der Freisetzung von ADP und ATP diskutiert und die Bedeutung von ADP für die TCIPA vordergründig beleuchtet. Es soll jedoch darauf hingewiesen werden, dass auch ATP durch die Aktivierung des thrombozytären P2X₁-Rezeptors direkt Einfluss auf die Thrombozytenaktivität nimmt. Die Aktivierung des P2X₁-Rezeptors induziert einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration, welche einen *shape change* vermittelt und die Signaltransduktion des ADP-abhängigen P2Y₁-Rezeptors synergistisch verstärkt. Eine alleinige Aktivierung des P2X₁-Rezeptors induziert jedoch keine Thrombozytenaggregation (394,395).

Abschließend wird noch ein Mechanismus von ATP erläutert der direkt Einfluss auf die hämatogene Metastasierung hat. Durch Thrombozyten freigesetztes ATP kann auf den Endothelzellen lokalisierte P2Y₂-Rezeptoren aktivieren und so eine Erhöhung der Permeabilität des Endothels herbeiführen. Es konnte gezeigt werden, dass Melanomzellen die thrombozytäre ATP-Sekretion induzieren und so ihre eigene transendotheliale Migration fördern (231). Durch die Inhibition der ATP-Freisetzung könnte bei einer Übertragbarkeit der Erkenntnisse auf die *in vivo* Situation, also auch direkt die hämatogene Metastasierung via Behinderung der Extravasation beeinflusst werden.

5.4.2 Quantifizierung EGF-, HGF-, PDGF-B-, TGF-β1- und VEGF-Freisetzung aus der α-Granula

Jayson et al. beschrieben Interaktionen zwischen Heparin und dem *basic fibroblast growth factor* sowie weiterer Wachstumsfaktoren, welche in ihrer Wirkung von einer Heparansulfat-Bindung abhängen. Zu diesen weiteren Wachstumsfaktoren gehören VEGF und HGF (311). Ob diese Interaktionen die Quantifizierung via ELISA tangieren wurde in einem Vorversuch anhand von UFH in einem VEGF-ELISA untersucht.

Es wurde eine absolute Quantifizierung der VEGF-Sekretion durchgeführt. Hierzu wurden die Thrombozyten in An- und Abwesenheit von UFH mit ADP (35 µmol/L) und TRAP-6 (41,25 µmol/L) aktiviert. Die Ergebnisse zeigten, dass UFH VEGF einer Quantifizierung via ELISA nicht entziehen konnte (Abbildung 40).

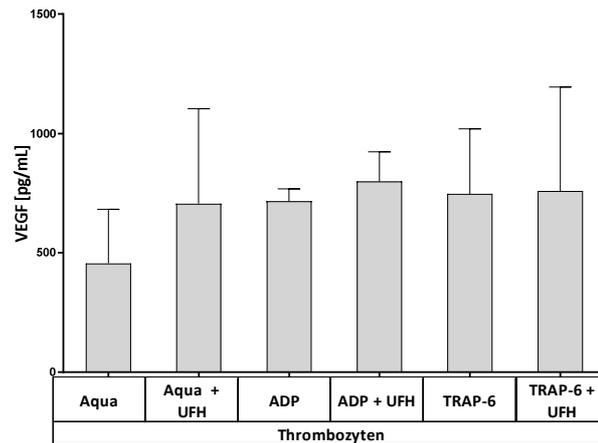


Abbildung 40: Vorversuch zur Prüfung einer Beeinträchtigung der VEGF-Quantifizierung via ELISA-Technik durch UFH.

Die Betrachtung der α -Granulafreisetzung beginnt mit der relativen Quantifizierung der EGF-Freisetzung. Die drei Tumorzelllinien AsPC-1, MDA-MB-231 und MV3 wiesen erwartungsgemäß ein großes Potential zur Thrombozytenaktivierung auf, welches sich in diesem Modell in einer Induktion einer EGF-Sekretion manifestierte. PC-3 Zellen waren nicht dazu befähigt eine thrombozytäre EGF-Freisetzung zu induzieren. Keine der Tumorzelllinien wies eine intrinsische EGF-Sekretion auf (Abbildung 41, 42).

Die inhibitorischen Effekte der Antikoagulantien auf die EGF-Freisetzung waren heterogen. Signifikante Effekte wurden nur in den Quantifizierungen mit Tumorzellen der Linien AsPC-1 und MDA-MB-231 festgestellt. UFH erreichte signifikante inhibitorische Effekte in beiden Versuchen. Die LMWHs inhibierten die EGF-Freisetzung hoch signifikant, wobei Tinzaparin sogar die durch AsPC-1 Zellen induzierte höchst signifikant hemmte. Rivaroxaban reduzierte die Sekretion in beiden Quantifizierungen hoch signifikant, wobei wiederum hemmende Effekte seines Lösungsmittels im Versuch mit MDA-MB-231 Zellen ausgeschlossen wurden (Abbildung 41, unten). Die beschriebenen Effekte traten als nicht signifikante Tendenzen alle auch in den Experimenten mit MV3 Zellen auf (Abbildung 42, oben). In keiner der vier Quantifizierungen konnte ein inhibitorischer Effekt von Fondaparinux auf die EGF-Sekretion festgestellt werden.

Die Inhibition der EGF-Freisetzung durch RO-Heparin war relativ heterogen. Die Konzentration von 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ wies in den Quantifizierungen mit MV3 Zellen eine deutlich reduzierende Tendenz der EGF-Sekretion auf (Abbildung 42, oben). Wohingegen in den Versuchen mit MDA-MB-231 Zellen nur eine marginale Beeinflussung festgestellt wurde (Abbildung 41, unten). Eine erwartete Konzentrationsabhängigkeit der Effekte konnte nicht bestätigt werden.

5. Ergebnisse und Diskussion

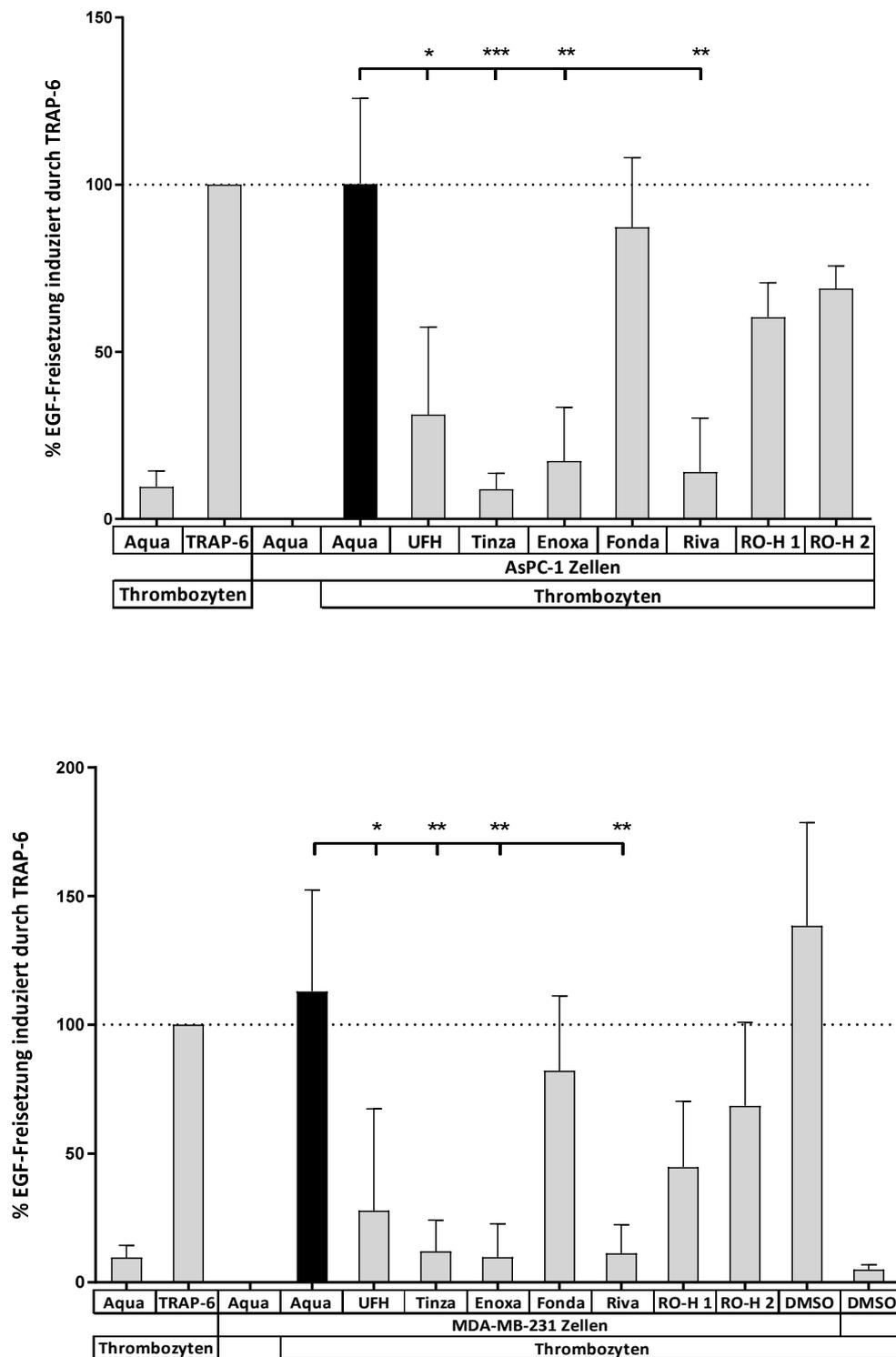


Abbildung 41: Relative Quantifizierung der EGF-Freisetzung von unbehandelten Thrombozyten (400 Mio/mL) (Aqua), von mit TRAP-6 aktivierten Thrombozyten (TRAP-6), von Tumorzellen (10.000/mL) (Aqua), von Thrombozyten aktiviert mit Tumorzellen (Aqua) und von Thrombozyten aktiviert mit Tumorzellen nach einer Präinkubation mit unfraktioniertem Heparin (UFH), Tinzaparin (Tinza), Enoxaparin (Enoxa), Fondaparinux (Fonda), Rivaroxaban (Riva), und reduziertem Oxyheparin in den Konzentrationen 10 µg/mL und 5 µg/mL (RO-H 1, RO-H 2). Ergebnisse zu den Versuchen mit AsPC-1 Zellen sind oben und zu den Versuchen mit MDA-MB-231 Zellen, inklusive DMSO Effekten, unten dargestellt (n=3).

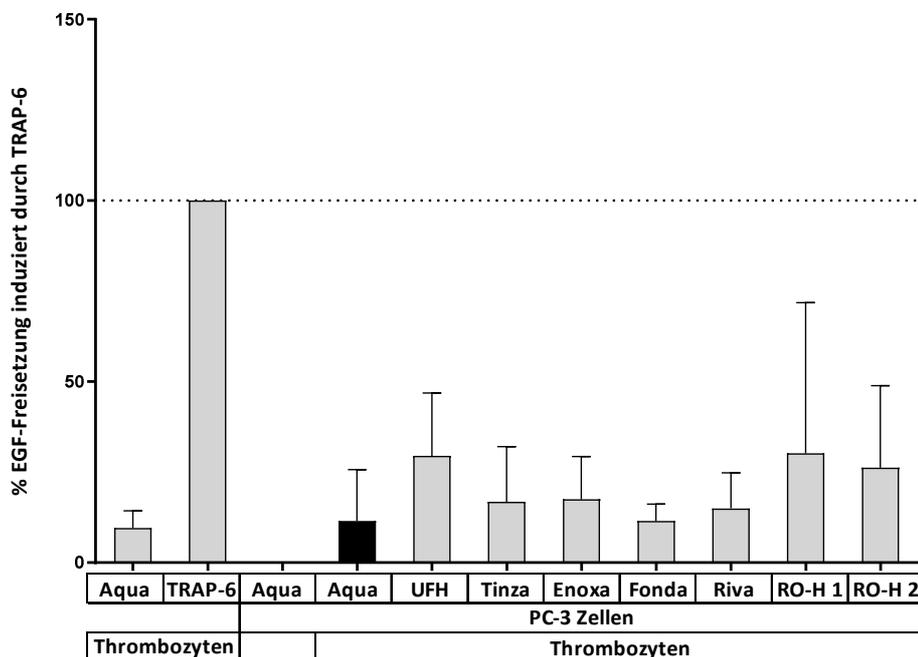
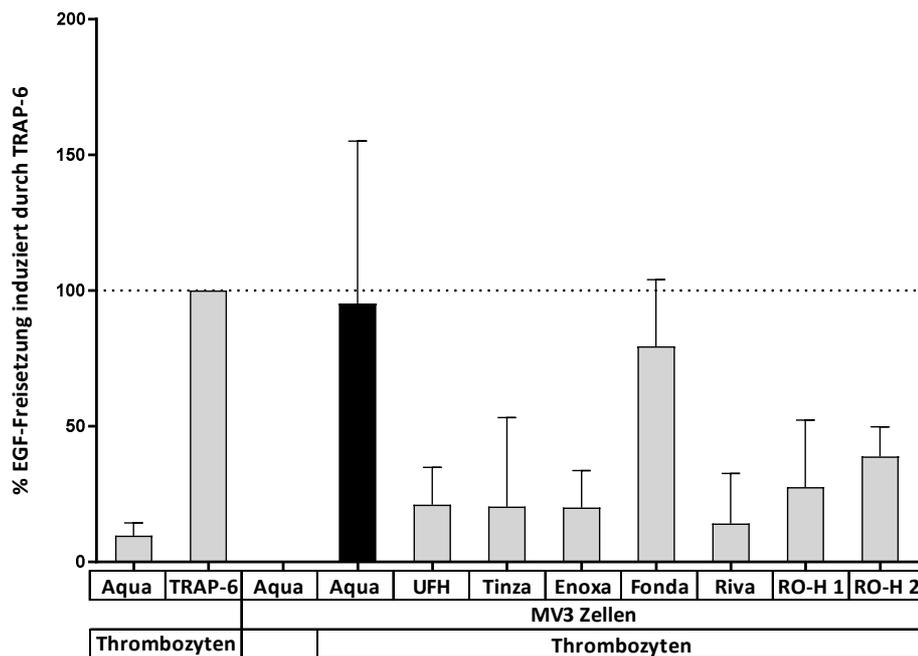


Abbildung 42: Relative Quantifizierung der EGF-Freisetzung von unbehandelten Thrombozyten (400 Mio/mL) (Aqua), von mit TRAP-6 aktivierten Thrombozyten (TRAP-6), von Tumorzellen (10.000/mL) (Aqua) und von Thrombozyten aktiviert mit Tumorzellen nach einer Präinkubation mit unfraktioniertem Heparin (UFH), Tinzaparin (Tinza), Enoxaparin (Enox), Fondaparinux (Fonda), Rivaroxaban (Riva), und reduziertem Oxyheparin in den Konzentrationen 10 µg/mL und 5 µg/mL (RO-H 1, RO-H 2). Ergebnisse zu den Versuchen mit MV3 Zellen sind oben und zu den Versuchen mit PC-3 Zellen unten dargestellt (n=3).

5. Ergebnisse und Diskussion

Die Betrachtung wird fortgesetzt mit der Quantifizierung der HGF-Freisetzung aus der α -Granula. Alle vier Quantifizierungen wiesen vergleichsweise große Standardabweichungen auf, wodurch eine Beurteilung erschwert war (Abbildung 43, 44).

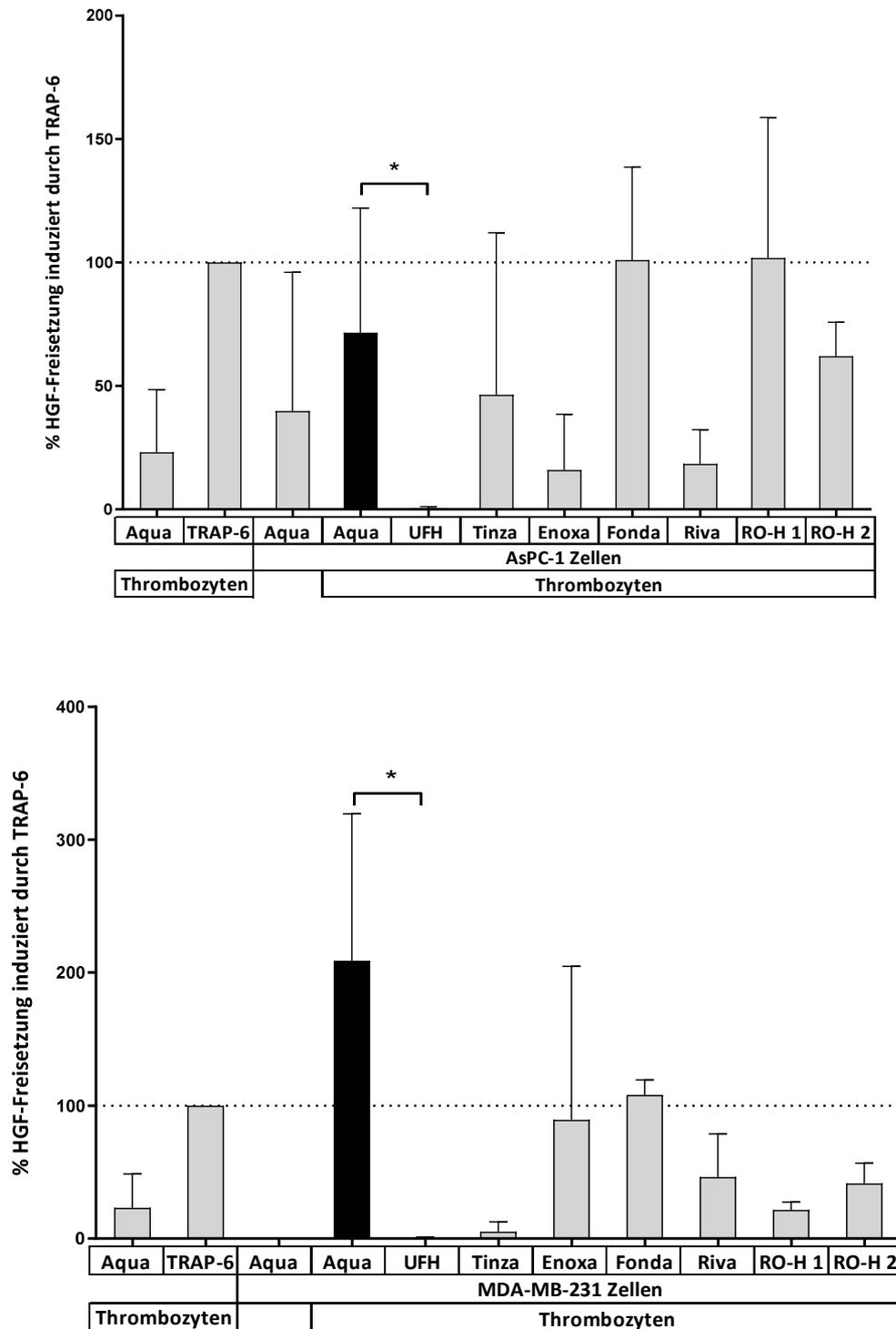


Abbildung 43: Relative Quantifizierung der HGF-Freisetzung von unbehandelten Thrombozyten (400 Mio/mL) (Aqua), von mit TRAP-6 aktivierten Thrombozyten (TRAP-6), von Tumorzellen (10.000/mL) (Aqua), von Thrombozyten aktiviert mit Tumorzellen (Aqua) und von Thrombozyten aktiviert mit Tumorzellen nach einer Präinkubation mit unfraktioniertem Heparin (UFH), Tinzaparin (Tinza), Enoxaparin (Enoxa), Fondaparinux (Fonda), Rivaroxaban (Riva), und reduziertem Oxyheparin in den Konzentrationen 10 μ g/mL und 5 μ g/mL (RO-H 1, RO-H 2). Ergebnisse zu den Versuchen mit AsPC-1 Zellen sind oben und zu den Versuchen mit MDA-MB-231 Zellen unten dargestellt (n=2).

5. Ergebnisse und Diskussion

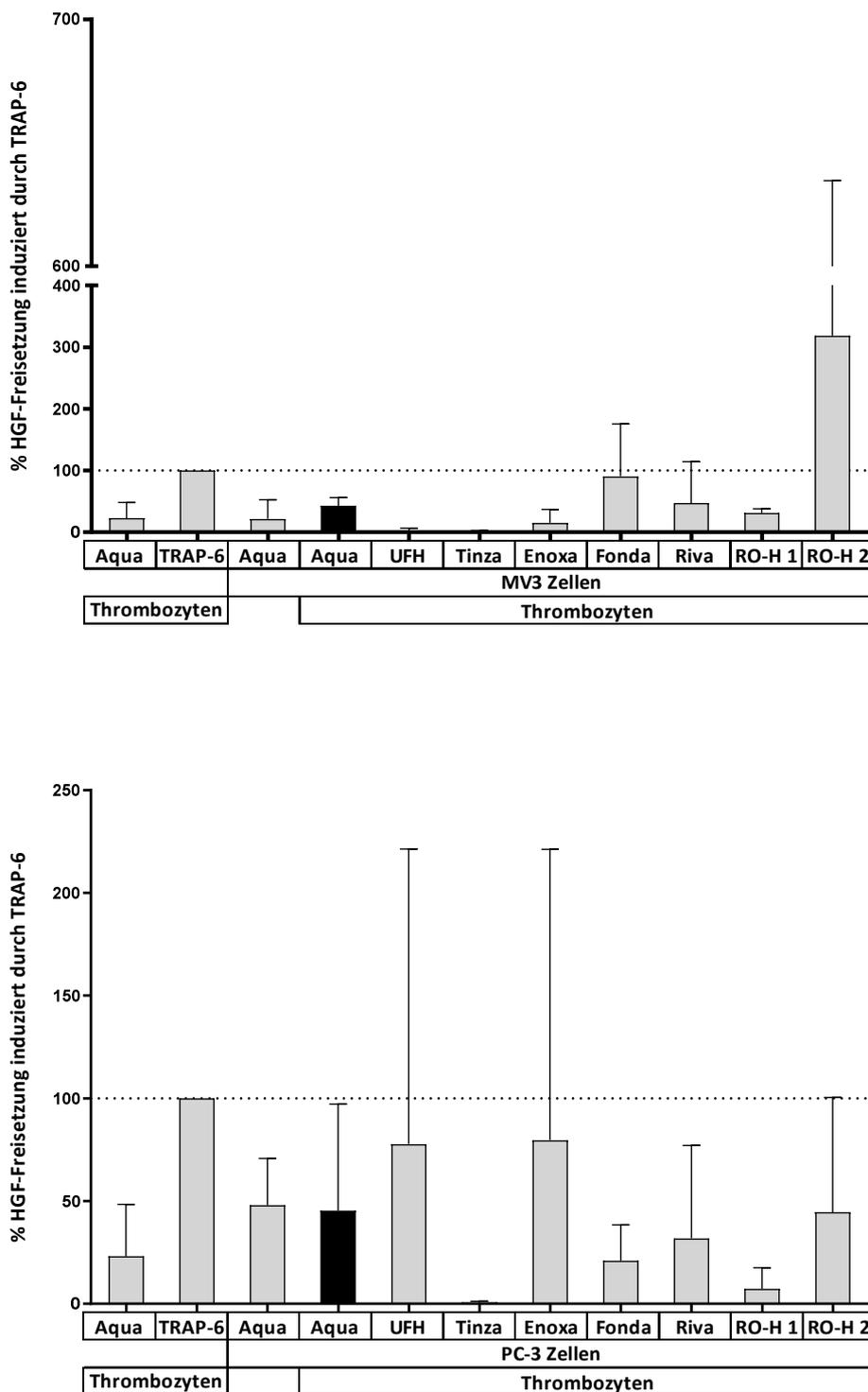


Abbildung 44: Relative Quantifizierung der HGF-Freisetzung von unbehandelten Thrombozyten (400 Mio/mL) (Aqua), von mit TRAP-6 aktivierten Thrombozyten (TRAP-6), von Tumorzellen (10.000/mL) (Aqua), von Thrombozyten aktiviert mit Tumorzellen (Aqua) und von Thrombozyten aktiviert mit Tumorzellen nach einer Präinkubation mit unfraktioniertem Heparin (UFH), Tinzaparin (Tinza), Enoxaparin (Enoxa), Fondaparinux (Fonda), Rivaroxaban (Riva), und reduziertem Oxyheparin in den Konzentrationen 10 µg/mL und 5 µg/mL (RO-H 1, RO-H 2). Ergebnisse zu den Versuchen mit MV3 Zellen sind oben und zu den Versuchen mit PC-3 Zellen unten dargestellt (n=2).

Dementsprechend konnten lediglich inhibitorische Tendenzen der Antikoagulantien ausgemacht werden, die deckungsgleich zu den Erkenntnissen aus den Quantifizierungen der EGF-Freisetzung waren. Darüber hinaus wurden zwei signifikante Effekte festgestellt, UFH reduzierte die HGF-Freisetzung induziert durch die Zelllinien AsPC-1 und MDA-MB-231 signifikant (Abbildung 43). PC-3 Zellen wiesen eine intrinsische HGF-Sekretion auf (Abbildung 44, unten).

Zur weiteren Charakterisierung der α -Granulasekretion wurde die PDGF-B-Freisetzung quantifiziert. Eine thrombozytäre Sekretion konnte durch eine Koinkubation mit Zellen der Linien MV3, AsPC-1 und MDA-MB-231, jedoch nicht PC-3, induziert werden (Abbildung 45, 46).

Die Intensität der Sekretion war bemerkenswert. So überstiegen die PDGF-B-Werte die aus einer antikoagulantienfreien Koinkubation der Thrombozyten mit Tumorzellen resultierten, die Werte der durch TRAP-6 induzierten Sekretion stets um ca. 50 %. Zwei mögliche Ursachen für dieses Phänomen konnten ausgemacht werden. Erstens, eine intrinsische PDGF-B-Freisetzung der Tumorzellen, welche für AsPC-1 (2,5 %) und MV3 Zellen (8,5 %) demonstriert werden konnte (Abbildung 45, 46 jeweils oben). Da die Werte jedoch gering waren, müsste aus dem Thrombozytenkontakt eine große Steigerung dieser intrinsischen Sekretion resultieren, um die Werte von ca. 150 % zu erreichen. Zweitens besteht die Möglichkeit, dass die Tumorzellen eine stärkere Aktivierung der Thrombozyten auslösen, als es TRAP-6 via PAR-1 vermag.

Bezüglich der Inhibitionen konnte festgestellt werden, dass die beiden LMWHs, UFH und Rivaroxaban die PDGF-B-Freisetzung reduzierten. Bemerkenswert war die Konformität des Effektes, alle vier Testsubstanzen verursachten eine höchst signifikante Inhibition, unabhängig davon, ob Zellen der Linien AsPC-1, MDA-MB-231 oder MV3 zur Thrombozytenaktivierung eingesetzt wurden (Abbildung 45, 46 oben). Bei einem direkten Vergleich der Effekte der vier Antikoagulantien erwies sich Rivaroxaban in dieser Quantifizierung als potentester Inhibitor. Effekte seines Lösungsmittels wurden wieder, unter Verwendung von MDA-MB-231 Zellen, ausgeschlossen (Abbildung 45 unten). Fondaparinux blieb unwirksam und vermittelte keine hemmenden Effekte auf die PDGF-B-Sekretion.

5. Ergebnisse und Diskussion

Im Vergleich zur Quantifizierung der EGF-Freisetzung, in der das RO-Heparin gute inhibitorische Tendenzen offenbarte, sind diese hinsichtlich der PDGF-B-Sekretion nicht erkennbar.

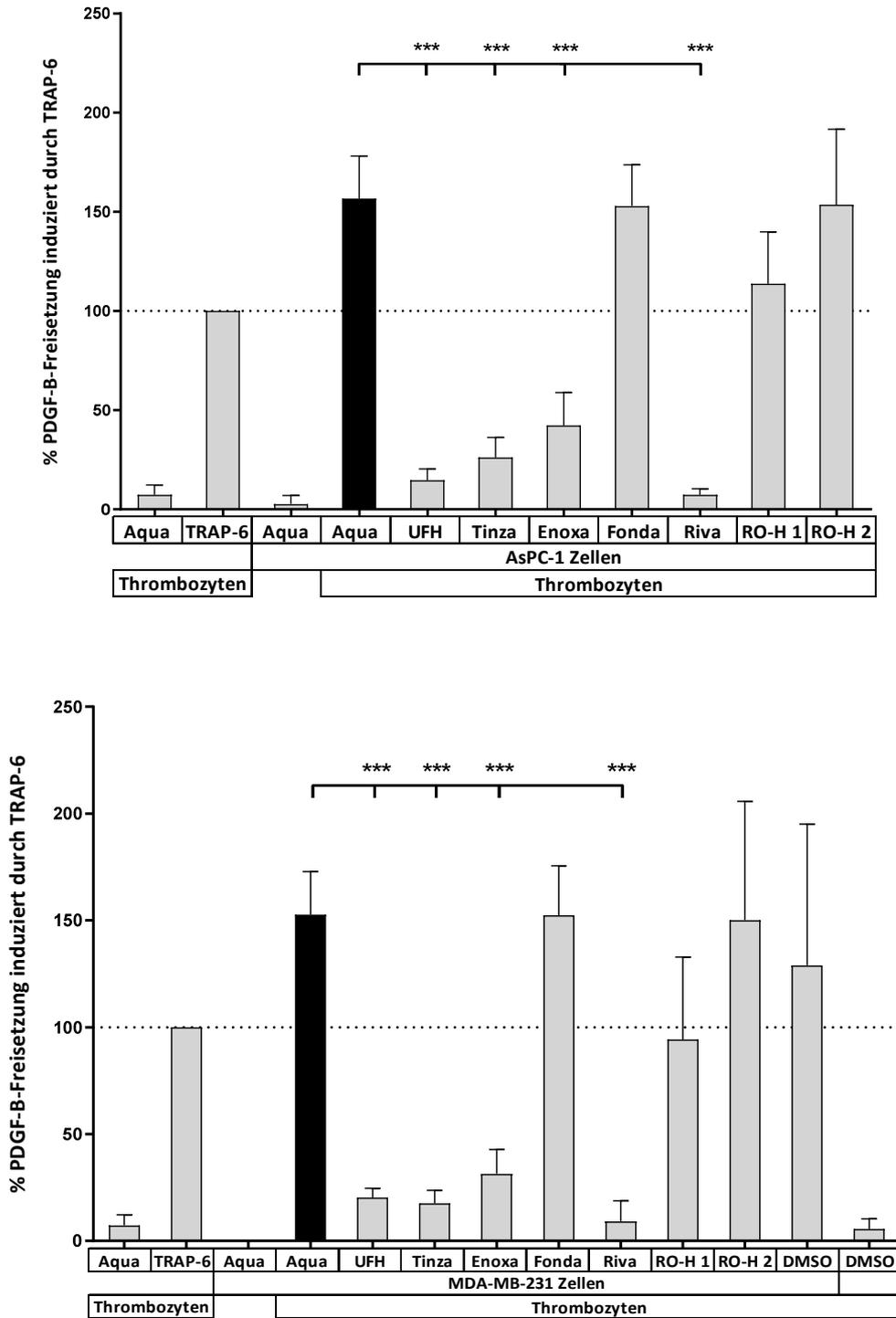


Abbildung 45: Relative Quantifizierung der PDGF-B-Freisetzung von unbehandelten Thrombozyten (400 Mio/mL) (Aqua), von mit TRAP-6 aktivierten Thrombozyten (TRAP-6), von Tumorzellen (10.000/mL) (Aqua), von Thrombozyten aktiviert mit Tumorzellen (Aqua) und von Thrombozyten aktiviert mit Tumorzellen nach einer Präinkubation mit unfraktioniertem Heparin (UFH), Tinzaparin (Tinza), Enoxaparin (Enoxa), Fondaparinux (Fonda), Rivaroxaban (Riva), und reduziertem Oxyheparin in den Konzentrationen 10 µg/mL und 5 µg/mL (RO-H 1, RO-H 2). Ergebnisse zu den Versuchen mit AsPC-1 Zellen sind oben und zu den Versuchen mit MDA-MB-231 Zellen, inklusive DMSO Effekten, unten dargestellt (n=3).

5. Ergebnisse und Diskussion

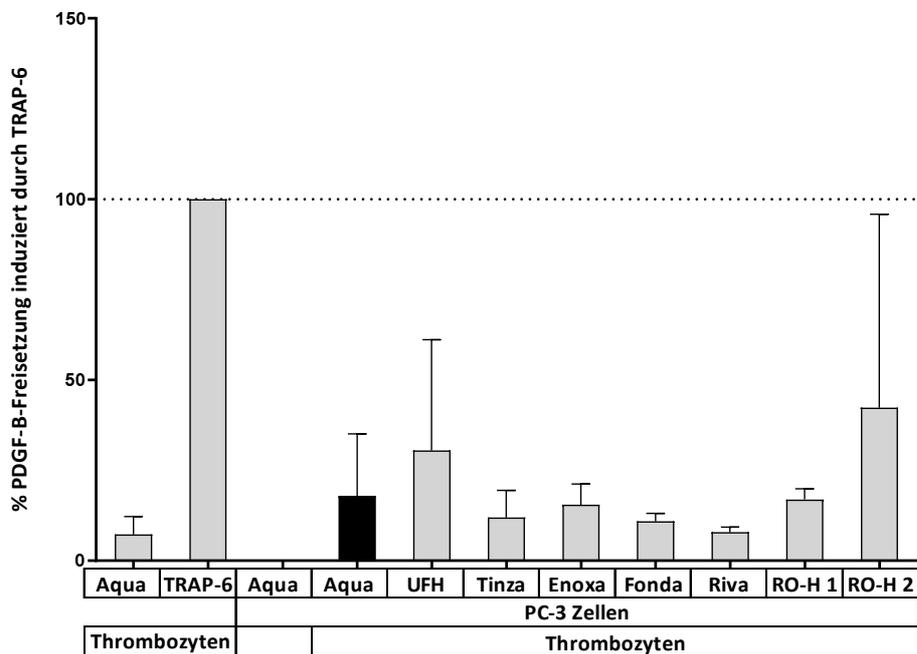
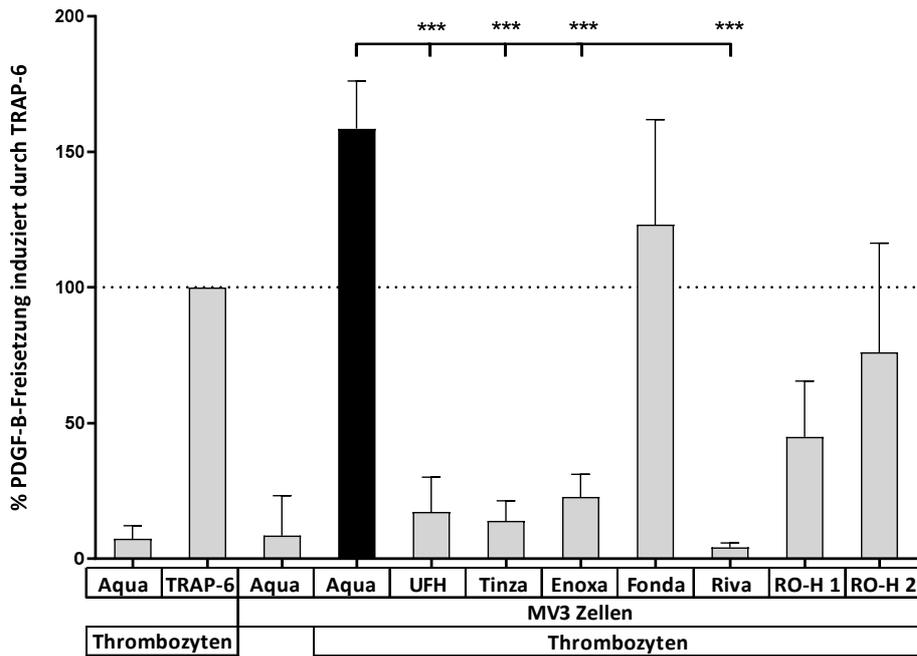


Abbildung 46: Relative Quantifizierung der PDGF-B-Freisetzung von unbehandelten Thrombozyten (400 Mio/mL) (Aqua), von mit TRAP-6 aktivierten Thrombozyten (TRAP-6), von Tumorzellen (10.000/mL) (Aqua), von Thrombozyten aktiviert mit Tumorzellen (Aqua) und von Thrombozyten aktiviert mit Tumorzellen nach einer Präinkubation mit unfraktioniertem Heparin (UFH), Tinzaparin (Tinza), Enoxaparin (Enoxa), Fondaparinux (Fonda), Rivaroxaban (Riva), und reduziertem Oxyheparin in den Konzentrationen 10 µg/mL und 5 µg/mL (RO-H 1, RO-H 2). Ergebnisse zu den Versuchen mit MV3 Zellen sind oben und zu den Versuchen mit PC-3 Zellen unten dargestellt (n=3).

Die Quantifizierung der α -Granulasekretion wird mit der Quantifizierung der TGF- β 1-Freisetzung fortgesetzt.

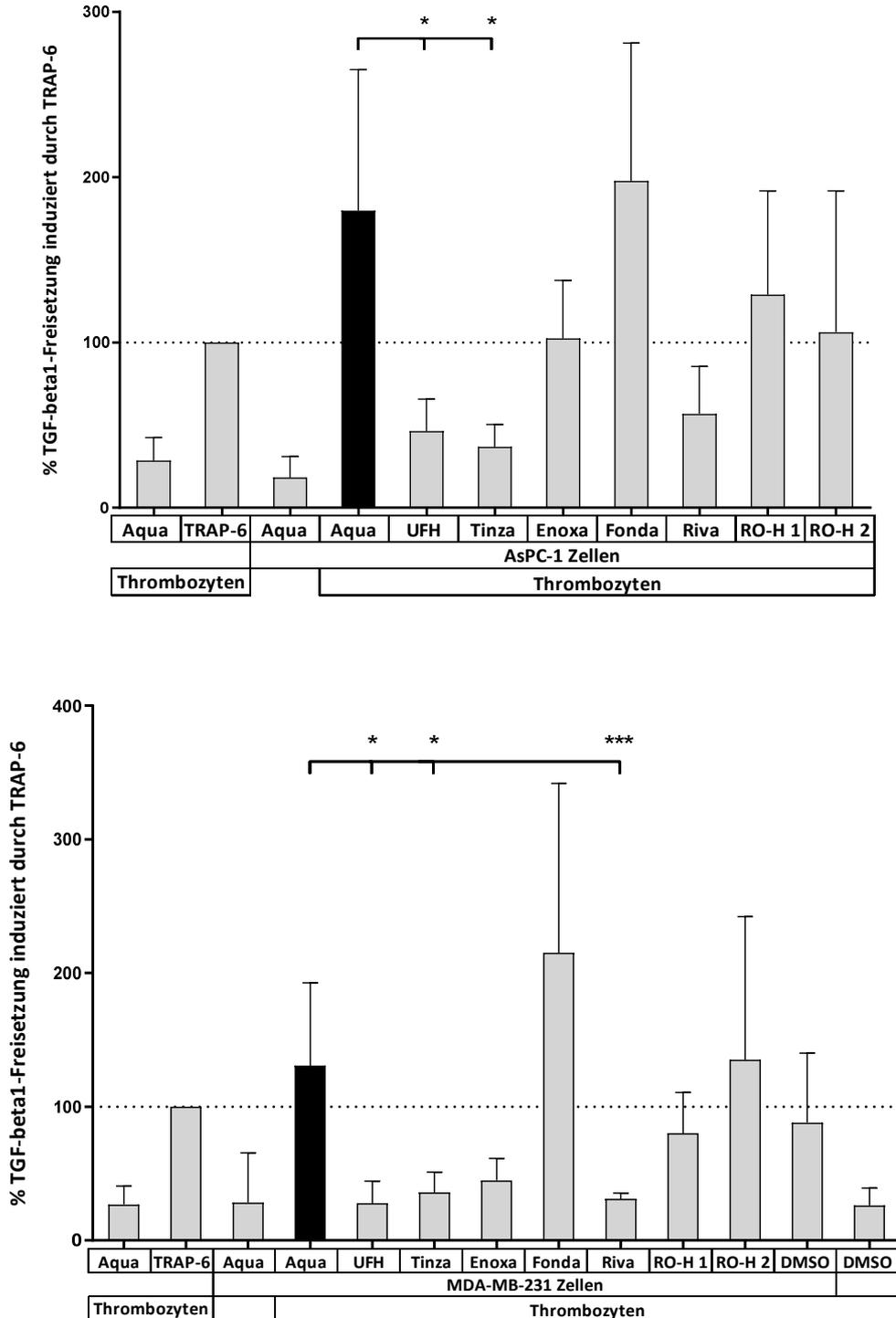


Abbildung 47: Relative Quantifizierung der TGF- β 1-Freisetzung von unbehandelten Thrombozyten (400 Mio/mL) (Aqua), von mit TRAP-6 aktivierten Thrombozyten (TRAP-6), von Tumorzellen (10.000/mL) (Aqua), von Thrombozyten aktiviert mit Tumorzellen (Aqua) und von Thrombozyten aktiviert mit Tumorzellen nach einer Präinkubation mit unfraktioniertem Heparin (UFH), Tinzaparin (Tinza), Enoxaparin (Enoxa), Fondaparinux (Fonda), Rivaroxaban (Riva), und reduziertem Oxyheparin in den Konzentrationen 10 μ g/mL und 5 μ g/mL (RO-H 1, RO-H 2). Ergebnisse zu den Versuchen mit AsPC-1 Zellen sind oben und zu den Versuchen mit MDA-MB-231 Zellen, inklusive DMSO Effekten, unten dargestellt (n=3).

5. Ergebnisse und Diskussion

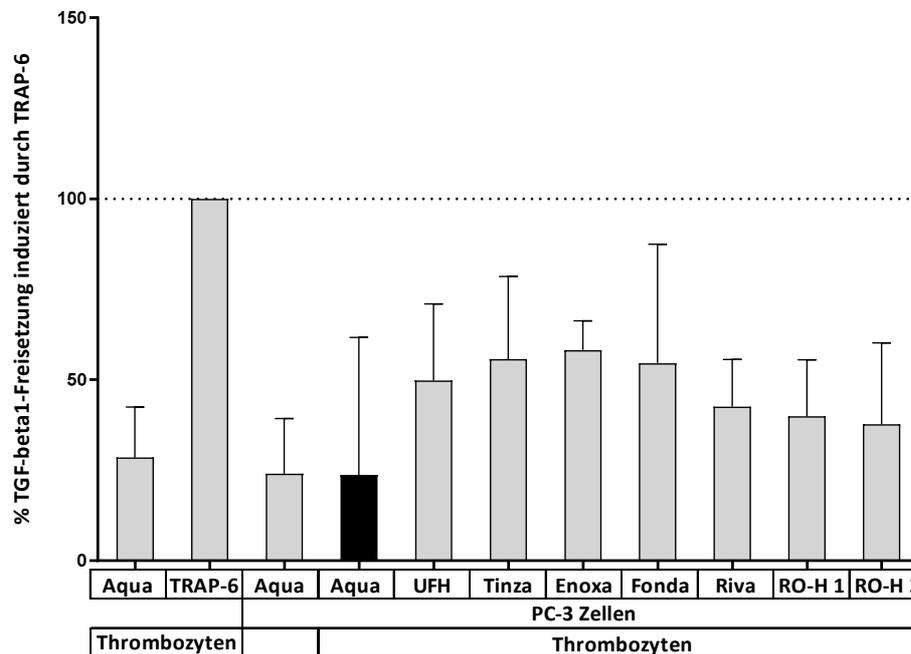
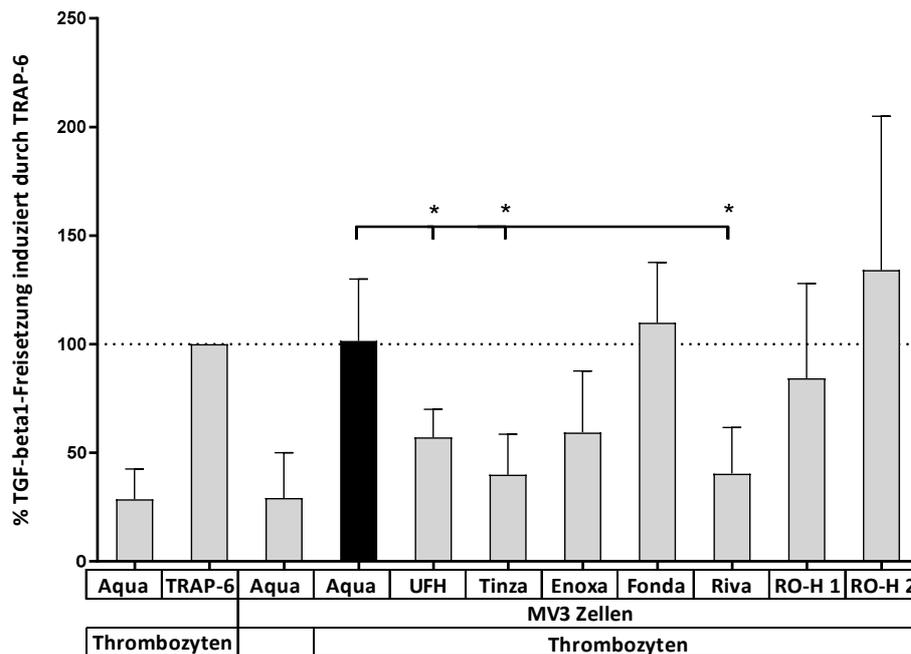


Abbildung 48: Relative Quantifizierung der TGF- β 1-Freisetzung von unbehandelten Thrombozyten (400 Mio/mL) (Aqua), von mit TRAP-6 aktivierten Thrombozyten (TRAP-6), von Tumorzellen (10.000/mL) (Aqua), von Thrombozyten aktiviert mit Tumorzellen (Aqua) und von Thrombozyten aktiviert mit Tumorzellen nach einer Präinkubation mit unfraktioniertem Heparin (UFH), Tinzaparin (Tinza), Enoxaparin (Enoxa), Fondaparinux (Fonda), Rivaroxaban (Riva), und reduziertem Oxyheparin in den Konzentrationen 10 μ g/mL und 5 μ g/mL (RO-H 1, RO-H 2). Ergebnisse zu den Versuchen mit MV3 Zellen sind oben und zu den Versuchen mit PC-3 Zellen unten dargestellt (n=3).

Die Ergebnisse der Quantifizierungen der TGF- β 1-Freisetzung sind grundsätzlich ähnlich zu den bisherigen Beobachtungen der Sekretion der α -Granula, jedoch wiesen die vier Tumorzelllinien eine starke intrinsische TGF- β 1-Freisetzung auf.

Die Potentiale der Tumorzelllinien zur Induktion einer TGF- β 1-Sekretion konnten analog den bisherigen Erkenntnissen zur Sekretion der α -Granula bewertet werden. Zusätzlich zur Induktion der TGF- β 1-Freisetzung aus Thrombozyten zeigte sich, dass die Tumorzellen intrinsisch TGF- β 1 in unterschiedlicher Menge freisetzen (AsPC-1 \cong 18 %, MDA-MB-231 \cong 28 %, MV3 \cong 29 %, PC-3 \cong 25 %) (Abbildung 47, 48). Da PC-3 Zellen keine thrombozytäre Sekretion induzierten, konnte man anhand der Quantifizierung erkennen, dass die intrinsische Sekretion durch die Antikoagulantien nicht gehemmt wurde. Sie wurde tendenziell eher gesteigert. Allgemein war die intrinsische Sekretion experimentell betrachtet problematisch, da sie inhibitorische Effekte der Testsubstanzen abschwächte und ihre Detektion erschwerte (Abbildung 47, 48).

Trotzdem wurden einige signifikante Effekte ermittelt. UFH und Tinzaparin reduzierten signifikant die Freisetzung nach einer Koinkubation mit den drei aktivierenden Tumorzelllinien AsPC-1, MDA-MB-231 und MV3 (Abbildung 47, 48 oben). Für Rivaroxaban konnte bezüglich einer Thrombozytenaktivierung mit MDA-MB-231 Zellen eine höchst signifikante (Abbildung 47 unten) und für die mit MV3 Zellen eine signifikante Reduktion festgestellt werden (Abbildung 48 oben). Effekte des Lösungsmittels von Rivaroxaban wurden wieder, anhand einer Sekretion induziert durch MDA-MB-231-Zellen, geprüft und ausgeschlossen (Abbildung 47 unten). Überraschenderweise verlor Enoxaparin seine signifikanten inhibitorischen Effekte und zeigte nur im Versuch mit MDA-MB-231 Zellen eine Tendenz zur Inhibition (Abbildung 47 unten).

Fondaparinux offenbarte keine inhibitorischen Effekte. Auch das RO-Heparin tangierte die TGF- β 1-Freisetzung in keiner erwähnenswerten Weise.

Die Betrachtung der Sekretion der α -Granula wird mit der Quantifizierung der VEGF-Freisetzung fortgesetzt und abgeschlossen.

5. Ergebnisse und Diskussion

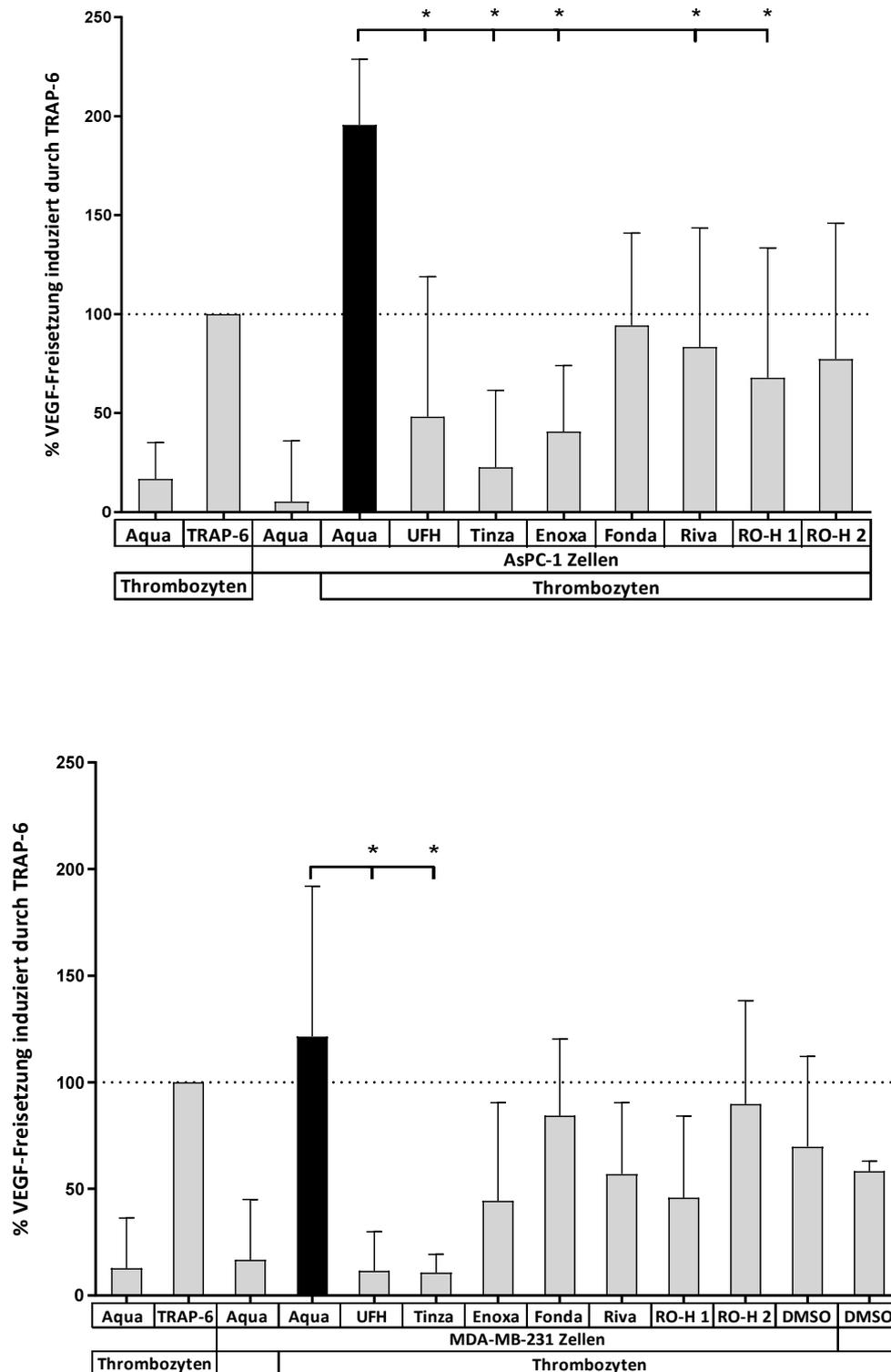


Abbildung 49: Relative Quantifizierung der VEGF-Freisetzung von unbehandelten Thrombozyten (400 Mio/mL) (Aqua), von mit TRAP-6 aktivierten Thrombozyten (TRAP-6), von Tumorzellen (10.000/mL) (Aqua), von Thrombozyten aktiviert mit Tumorzellen (Aqua) und von Thrombozyten aktiviert mit Tumorzellen nach einer Präinkubation mit unfractioniertem Heparin (UFH), Tinzaparin (Tinza), Enoxaparin (Enoxa), Fondaparinux (Fonda), Rivaroxaban (Riva), und reduziertem Oxyheparin in den Konzentrationen 10 µg/mL und 5 µg/mL (RO-H 1, RO-H 2). Ergebnisse zu den Versuchen mit AsPC-1 Zellen sind oben und zu den Versuchen mit MDA-MB-231 Zellen, inklusive DMSO Effekten, unten dargestellt (n=3).

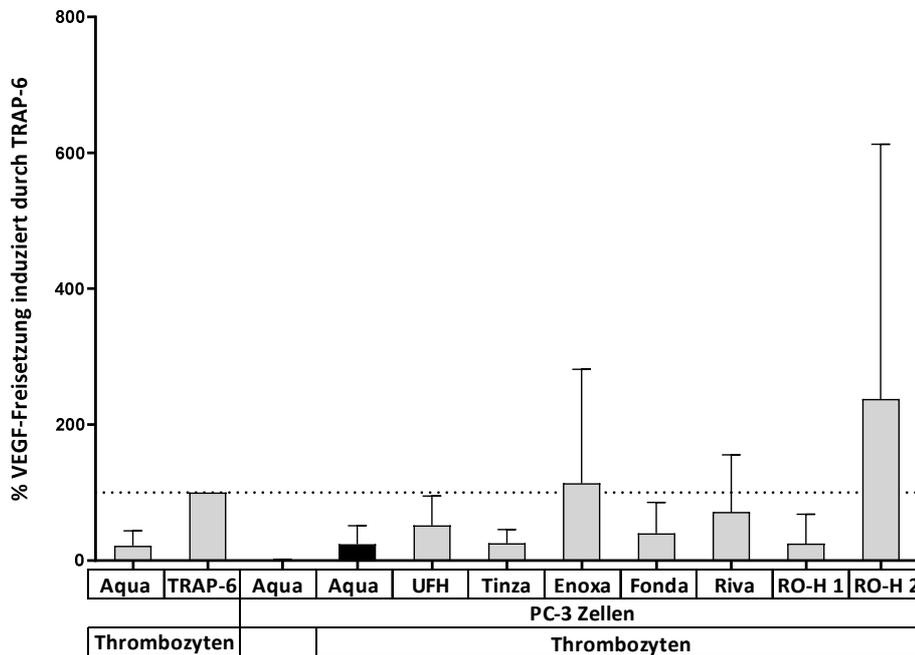
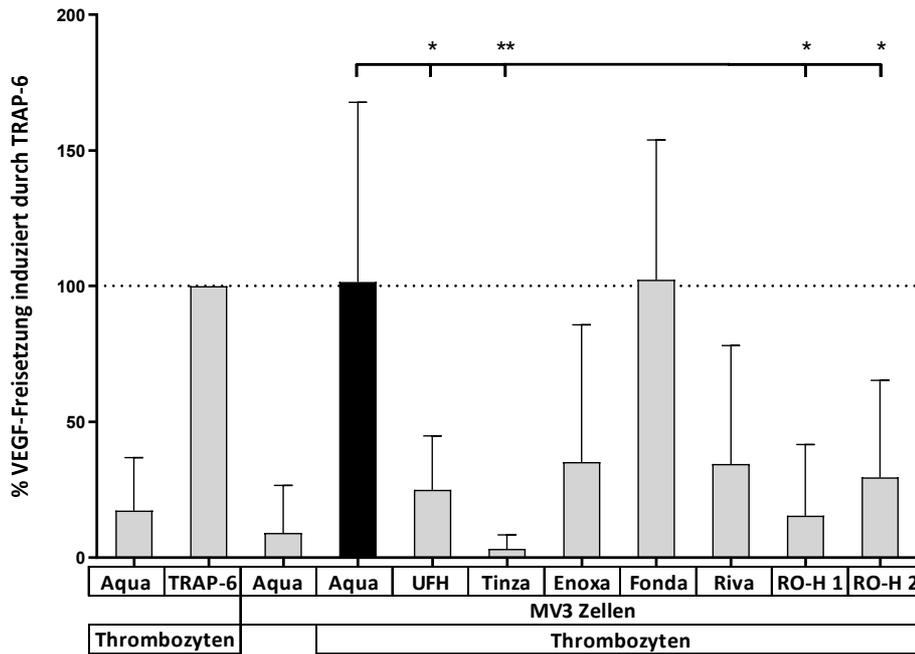


Abbildung 50: Relative Quantifizierung der VEGF-Freisetzung von unbehandelten Thrombozyten (400 Mio/mL) (Aqua), von mit TRAP-6 aktivierten Thrombozyten (TRAP-6), von Tumorzellen (10.000/mL) (Aqua) und von Thrombozyten aktiviert mit Tumorzellen nach einer Präinkubation mit unfraktioniertem Heparin (UFH), Tinzaparin (Tinza), Enoxaparin (Enox), Fondaparinux (Fonda), Rivaroxaban (Riva), und reduziertem Oxyheparin in den Konzentrationen 10 µg/mL und 5 µg/mL (RO-H 1, RO-H 2). Ergebnisse zu den Versuchen mit MV3 Zellen sind oben und zu den Versuchen mit PC-3 Zellen unten dargestellt (n=3).

Die Quantifizierung der Induktion und Inhibition einer VEGF-Freisetzung brachte erneut ähnliche Ergebnisse zu den bisherigen Quantifizierungen der α -Granulafreisetzung hervor. Wieder zeigten die Zelllinien AsPC-1, MDA-MB-231 und MV3 das stärkste Potential zur Induktion einer VEGF-Sekretion. Demgegenüber waren PC-3 Zellen wieder nicht dazu in der Lage eine Freisetzung zu induzieren.

Ogleich die Werte größere Standardabweichungen aufwiesen, konnte wieder, ähnlich zu PDGF-B und TGF- β 1, eine intrinsische VEGF-Freisetzung bei den Tumorzelllinien AsPC-1, MDA-MB-231 und MV3 detektiert werden (Abbildung 49, 50 oben). Diese war wahrscheinlich dafür verantwortlich, dass die VEGF-Werte aus einer antikoagulantienfreien Thrombozytenaktivierung mit Tumorzellen zum Teil größer waren, als die aus einer PAR-1-Aktivierung. Hervorzuheben war die VEGF-Freisetzung aus der antikoagulantienfreien Thrombozytenaktivierung mit AsPC-1 Zellen, diese war mit 195,6 % fast doppelt so stark wie die Freisetzung induziert durch TRAP-6 (Abbildung 49 oben).

Hinsichtlich der Testsubstanzen bzw. ihrer Inhibition der VEGF-Freisetzung offenbarten UFH und Tinzaparin gute inhibitorische Kapazitäten. Beide reduzierten die Freisetzung induziert durch die Zelllinien AsPC-1, MDA-MB-231 und MV3 signifikant (Abbildung 49, 50 oben). Rivaroxaban hemmte nur die Sekretion induziert durch die Zelllinie AsPC-1 signifikant (Abbildung 49 oben). Effekte des Lösungsmittels von Rivaroxaban wurden wieder, anhand von MDA-MB-231 Zellen, geprüft und ausgeschlossen (Abbildung 49 unten). Enoxaparin zeigte bis auf eine signifikante Reduktion in der Quantifizierung unter Verwendung von AsPC-1 Zellen (Abbildung 49 oben) nur leichte Tendenzen einer Hemmung. Fondaparinux blieb auch in den VEGF-Quantifizierungen wirkungslos.

Das RO-Heparin zeigte in der Konzentration von 10 μ g/mL in den Freisetzungen, welche unter Verwendung von Zellen der Linien AsPC-1 und MV3 durchgeführt wurden, signifikante Reduktionen (Abbildung 49, 50 jeweils oben) und unter Verwendung von MDA-MB-231 Zellen eine deutliche reduzierende Tendenz (Abbildung 49 unten). Eine Konzentration von 5 μ g/mL des RO-Heparins reichte sogar aus, um die durch MV3 Zellen induzierte Freisetzung signifikant zu hemmen (Abbildung 50 oben). Die Effekte des RO-Heparins sind überraschend, da sie bisher nur bei der Quantifizierung der Sekretion der dichten-Granula auftraten und somit angenommen wurde, dass RO-Heparin exklusiv nur diese Sekretion inhibierte.

5.4.3 Zusammenfassung der Quantifizierungen der Granulasekretion

Eindeutig konnte bezüglich aller Mediatoren festgestellt werden, dass die Tumorzelllinien AsPC-1, MDA-MB-231 und MV3 eine starke Freisetzung der α -Granula induzierten und PC-3 Zellen dazu nicht befähigt waren. Weiterhin wurde hinsichtlich TGF- β 1, PDGF-B und VEGF eine intrinsische Sekretion der Tumorzelllinien in unterschiedlicher Intensität festgestellt. Außerdem zeigte die Quantifizierung der PDGF-B- und VEGF-Sekretion Anzeichen dafür, dass die Tumorzellen aktivierende Mechanismen besaßen, die stärker waren als eine reine PAR-1-Aktivierung oder mehrere synergistische Mechanismen bzw. Signalwege zur Thrombozytenaktivierung verwendeten.

Zudem wurde gezeigt, dass in dem verwendeten Modell eine Sekretion von Mediatoren aus der dichten- und der α -Granula in ähnlicher Intensität durch eine Koinkubation mit Tumorzellen der Linien AsPC-1, MDA-MB-231 und MV3 induziert wurde. Es konnte in den Quantifizierungen der Granulasekretion, hinsichtlich der betrachteten Mediatoren, keine bemerkenswerte Regulation dieser durch die verwendeten Tumorzelllinien festgestellt werden. Jedoch wurde nicht jeder Mediator aus der thrombozytären Granula untersucht. Bisher konnte z. B. eine Regulation der Endostatin- und VEGF-Freisetzung durch eine selektive PAR-1- und PAR-4-Rezeptor-Aktivierung von Ma et al. demonstriert werden (165).

Von den getesteten Antikoagulantien offenbarten sich UFH, Tinzaparin, Enoxaparin und Rivaroxaban als potente Inhibitoren der Sekretion der dichten- und der α -Granula. Die Präinkubation der Thrombozyten mit ihnen resultierte in einer umfassenden Inhibition der Freisetzung von nahezu allen betrachteten Mediatoren unabhängig von der eingesetzten Tumorzelllinie (Tabelle 19).

Das RO-Heparin reduzierte in beiden Konzentrationen höchst signifikant nur die Freisetzung der dichten-Granula und tangierte die Sekretion der α -Granula-Mediatoren kaum, lediglich die VEGF-Sekretion wurde signifikant reduziert.

Fondaparinux blieb in jeder Quantifizierung wirkungslos. Somit konnte die unterschiedliche inhibitorische Wirksamkeit der beiden Faktor Xa-Inhibitoren, Rivaroxaban und Fondaparinux, welche bezüglich der Adhäsion und TCIPA festgestellt wurde, auch hinsichtlich der Granulasekretion bestätigt werden (264,272). Rivaroxaban zählte, unter Beachtung der Signifikanzen und dem Auftreten der Inhibitionen, zu den drei besten getesteten Inhibitoren der Granulasekretion (Tabelle 19).

5. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 19: Übersicht der Signifikanzen der Inhibitionen der Granulafreisetzung; unfraktioniertes Heparin (UFH), Tinzaparin (Tinza), Enoxaparin (Enoxa), Fondaparinux (Fonda), Rivaroxaban (Riva), und reduziertes Oxyheparin in den Konzentrationen 10 µg/mL und 5 µg/mL (RO-Hep 10 µg/mL, RO-Hep 5 µg/mL)

Molekül	Tumorzelllinie	Antikoagulantien						
		UFH	Tinza	Enoxa	Fonda	Riva	RO-Hep 10 µg/mL	RO-Hep 5 µg/mL
ATP	AsPC-1	***	***	***	-	***	***	**
	MDA-MB-231	***	***	***	-	***	***	**
	MV3	***	***	***	-	***	***	**
	PC-3	-	-	-	-	-	-	-
EGF	AsPC-1	*	***	**	-	**	-	-
	MDA-MB-231	*	**	**	-	**	-	-
	MV3	-	-	-	-	-	-	-
	PC-3	-	-	-	-	-	-	-
HGF	AsPC-1	*	-	-	-	-	-	-
	MDA-MB-231	*	-	-	-	-	-	-
	MV3	-	-	-	-	-	-	-
	PC-3	-	-	-	-	-	-	-
PDGF-B	AsPC-1	***	***	***	-	***	-	-
	MDA-MB-231	***	***	***	-	***	-	-
	MV3	***	***	***	-	***	-	-
	PC-3	-	-	-	-	-	-	-
TGF-β1	AsPC-1	*	*	-	-	-	-	-
	MDA-MB-231	*	*	-	-	***	-	-
	MV3	*	*	-	-	*	-	-
	PC-3	-	-	-	-	-	-	-
VEGF	AsPC-1	*	*	*	-	*	*	-
	MDA-MB-231	*	*	-	-	-	-	-
	MV3	*	**	-	-	-	*	*
	PC-3	-	-	-	-	-	-	-

Tinzaparin und UFH repräsentierten die anderen beiden potentesten Inhibitoren. Sie waren in ihrer inhibitorischen Kapazität Enoxaparin überlegen. Dafür könnte ein Größenunterschied der GAG-Struktur verantwortlich gewesen sein. Enoxaparin ist mit einer Größe von ca. 4.500 Da im Vergleich zu Tinzaparin (5.500-7.500 Da) und UFH (ca. 15.000 Da) das kleinste GAG (259,374,396). Möglicherweise determinierte die Größe der GAG-Struktur das Potential für Interaktionen mit thrombozytären Adhäsionsrezeptoren und somit für eine Inhibition der Thrombozytenaktivierung und Granulasekretion. Da jedoch das RO-Heparin, welches ebenfalls eine GAG-Struktur besitzt, nur die Sekretion der dichten-Granula und die VEGF-Sekretion hemmte blieb unklar, welchen Stellenwert die GAG-Struktur hinsichtlich der Inhibition hatte. Zusätzlich soll angemerkt werden, dass RO-Heparin (10.000-13.000 Da) in

der Größe seiner GAG-Struktur mit der von UFH vergleichbar ist (375). Als eine Zielstruktur des RO-Heparins bzw. der GAG-Struktur konnte bisher P-Selektin identifiziert werden (291,397). Der Stellenwert dieses Selektins im metastatischen Kontext ist als bedeutend einzustufen (398). Eine Studie von Becker et al. demonstrierte, dass Melanomzellen in Thrombozyten via P-Selektin-Bindung eine Aktivierung von MAP-Kinasen induzieren können, die in einer Freisetzung der sauren Sphingomyelinase resultierte, welche mit einer Steigerung der Tumorzellanzahl in der Lunge assoziiert war (119).

Sofern eine Inhibition der dichten-Granulafreisetzung durch RO-Heparin via P-Selektin erfolgte, könnte dieses für die α -Granulasekretion vernachlässigbar sein. Ebenso kann das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa) als Zielstruktur in Betracht gezogen werden. In Studien von Zhang et al. wurde gezeigt, dass RO-Heparin durch eine Interferenz mit diesem Integrin die Adhäsion zwischen Thrombozyten und Melanomzellen inhibierte (399). Möglicherweise wird durch die Hemmung einer Adhäsion die Grundlage für weitere Wechselwirkungen entzogen. Unklar ist bisher die Bedeutung des thrombozytären Adhäsionsrezeptors GPVI als Zielstruktur, da für ihn bisher noch keine Bindung durch Heparin beschrieben wurde. Da durch RO-Heparin nur die Sekretion der dichten-Granula gehemmt wurde, könnte man postulieren, dass ein mechanistischer Unterschied in der Freisetzung und Inhibition der beiden Granula besteht. Von Tolmachova et al. konnte bereits demonstriert werden, dass die Sekretion der dichten-Granula von den zwei GTPasen Rab27a und Rab27b gesteuert wird und dass durch die Inhibition dieser Beiden die Sekretion der dichten-Granula gehemmt wird ohne die Sekretion der α -Granula zu beeinflussen (400).

Da prometastatische Prozesse der Tumorzell-Thrombozyten-Interaktionen u. a. aus der Granulasekretion resultieren, werden in den folgenden Versuchen Einflüsse der Antikoagulantien auf zwei solcher Prozesse untersucht. Hierzu werden die Angiogenese und die EMT-Induktion in Tumorzellen durch Thrombozyten, beleuchtet.

5.5 Quantifizierung des angiogenetischen Potentials der Granulasekretion

Die α -Granula-Mediatoren, deren Freisetzung im vorangegangenen Abschnitt quantifiziert wurde, können alle an einer Angiogenese fördernd beteiligt sein. VEGF wird als einer der stärksten Induktoren der Angiogenese eingestuft, aber auch für EGF, HGF, PDGF-B und TGF- β 1 konnten in verschiedenen Modellen grundsätzliche Beteiligungen an der Angiogenese nachgewiesen werden (401–405). So zeigte Xin et al. anhand eines *rat corneal angiogenesis assays*, welcher die Angiogenese in der Rattenhornhaut quantifiziert, einen synergistischen pro-angiogenetischen Effekt von VEGF und HGF (402).

Um zu prüfen, ob die Inhibition der Granulasekretion auch funktionelle Konsequenzen hat, wurde ein Tube Formation Assay durchgeführt. Dieser ermöglichte eine Bestimmung des angiogenetischen Potentials flüssiger Proben. Hierzu wurde das Wachstum von Endothelzellen nach verschiedenen Stimulationen analysiert. Zur Quantifizierung erfolgte eine Erfassung der Verzweigungspunkte mit minimal drei Verzweigungen. Die Ergebnisse wurden erneut auf die Messwerte der TRAP-6 Proben normalisiert. Zudem wurden die gleichen Proben untersucht, die unter Abschnitt 5.4.2 hinsichtlich der Granulasekretion analysiert wurden. Es sollte somit ermöglicht werden die Granulafreisetzung und ihre Inhibition in Bezug zur Angiogenese zu setzen, um etwaige Korrelationen zu erkennen.

Die Betrachtung beginnt mit den Ergebnissen der Quantifizierung von Thrombozytensekretomen aus einer Thrombozytenaktivierung mit AsPC-1 Zellen.

Es war deutlich erkennbar, dass sowohl unbehandelte Thrombozyten, als auch unbehandelte Tumorzellen Tendenzen zur Induktion einer Bildung endothelialer Verzweigungen zeigten (Abbildung 51 links). Dafür könnte ein hohes intrinsisches Potential der EA.hy926 Zellen zur Ausbildung der Verzweigungen verantwortlich gewesen sein. Somit war die Steigerung der Verzweigungsanzahl, welche durch eine PAR-1-Aktivierung via TRAP-6 erreicht wurde, als geringer einzustufen. Sie erhöhte sich nur um ca. 25 %. Folglich waren Reduktionen der Verzweigungsanzahl durch Antikoagulantien schwächer, als sie basierend auf den Ergebnissen zur Granulasekretion aus Abschnitt 5.4.2 erwartet wurden. Trotzdem waren inhibitorische Tendenzen erkennbar. Die Kombination aus AsPC-1 Zellen und Thrombozyten vermochte eine Steigerung der Verzweigungsanzahl auf 128,2 % herbeizuführen, welche die reinen VEGF-Werte (102 %) um ca. 26 % übertraf (Abbildung 51 links). Unter den Inhibitoren offenbarten UFH und die beiden LMWHs deutliche Tendenzen hin zu einer Inhibition. Das RO-Heparin (10 μ g/mL) und Rivaroxaban zeigten leichte inhibitorische Tendenzen.

Fondaparinux und das geringer konzentrierte RO-Heparin (5 µg/mL) blieben wirkungslos (Abbildung 51 links).

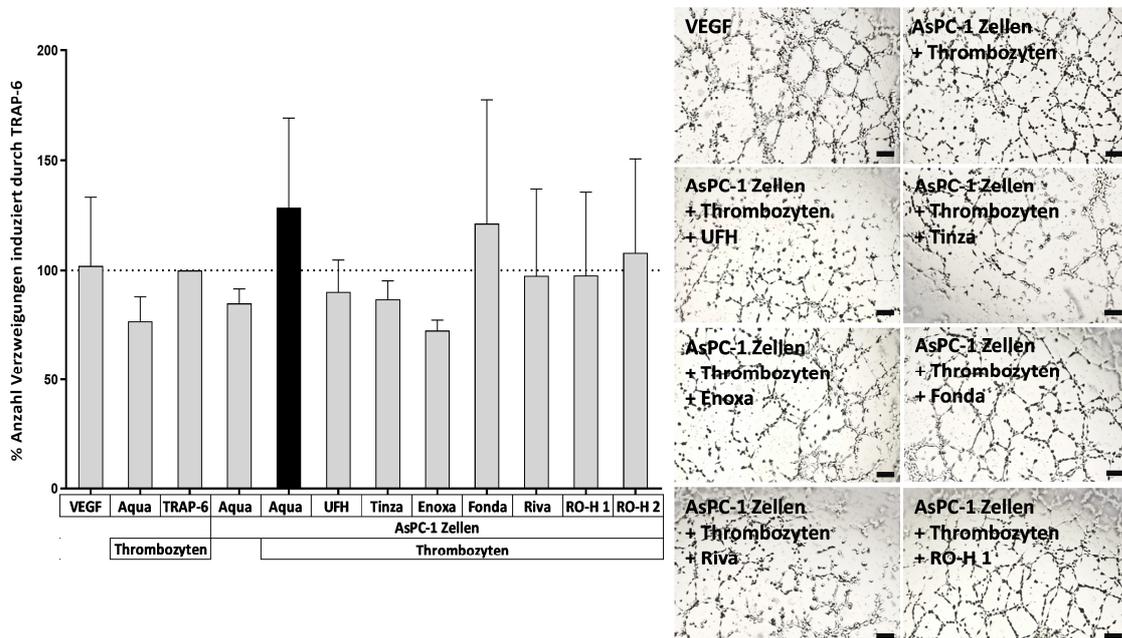


Abbildung 51: Quantifizierung des angiogenetischen Potentials der freigesetzten Granulainhalte aus einer

Thrombozytenaktivierung mit AsPC-1 Zellen. Dargestellt ist die Auszählung der Verzweigungen von EA.hy926 Zellen (35.000/Well), nach einer Inkubation von 24 h mit 210 ng VEGF (VEGF) oder 45 µL des freigesetzten Granulainhaltes aus folgenden Reaktionen: unbehandelte Thrombozyten (400 Mio/mL) (Aqua), Thrombozyten aktiviert mit TRAP-6 (TRAP-6), Tumorzellen (10.000/mL) (Aqua), Thrombozyten aktiviert mit Tumorzellen (Aqua) und Thrombozyten aktiviert mit Tumorzellen nach einer Präinkubation mit unfraktioniertem Heparin (UFH), Tinzaparin (Tinza), Enoxaparin (Enoxa), Fondaparinux (Fonda), Rivaroxaban (Riva), und reduziertem Oxyheparin in den Konzentrationen 10 µg/mL und 5 µg/mL (RO-H 1, RO-H 2) (n=3) (links). Auswahl repräsentativer Bilder der Wells (Maßstabsleiste entspricht 200 µm) (rechts).

Als nächstes wird die Tube Formation von Granulainhalten aus einer Thrombozytenaktivierung, induziert durch MDA-MB-231 Zellen, diskutiert. Die allgemein erhöhten Grundwerte und hohen Werte für unbehandelte Thrombozyten und Tumorzellen fanden sich auch in diesem Experiment wieder. Trotzdem induzierte die Kombination aus Thrombozyten und MDA-MB-231 Zellen einen deutlichen Anstieg der Verzweigungsanzahl (Abbildung 52 links). Eine Hemmung dieses Anstieges wurde auf einem signifikanten Niveau von Tinzaparin und Enoxaparin erreicht. Eine hoch signifikante Inhibition wurde von UFH und Rivaroxaban vermittelt (Abbildung 52 links). Das RO-Heparin präsentierte in beiden Konzentrationen lediglich eine reduzierende Tendenz und Fondaparinux blieb wirkungslos. Erstaunlicherweise steigerte DMSO die Verzweigungsanzahl. Da es sich allerdings um eine Steigerung handelte, wurde der Effekt von Rivaroxaban nicht entwertet (Abbildung 52 links). Die Resultate bestätigen gewissermaßen die Ergebnisse, welche durch die Quantifizierung der Granulafreisetzung erhalten wurden.

5. Ergebnisse und Diskussion

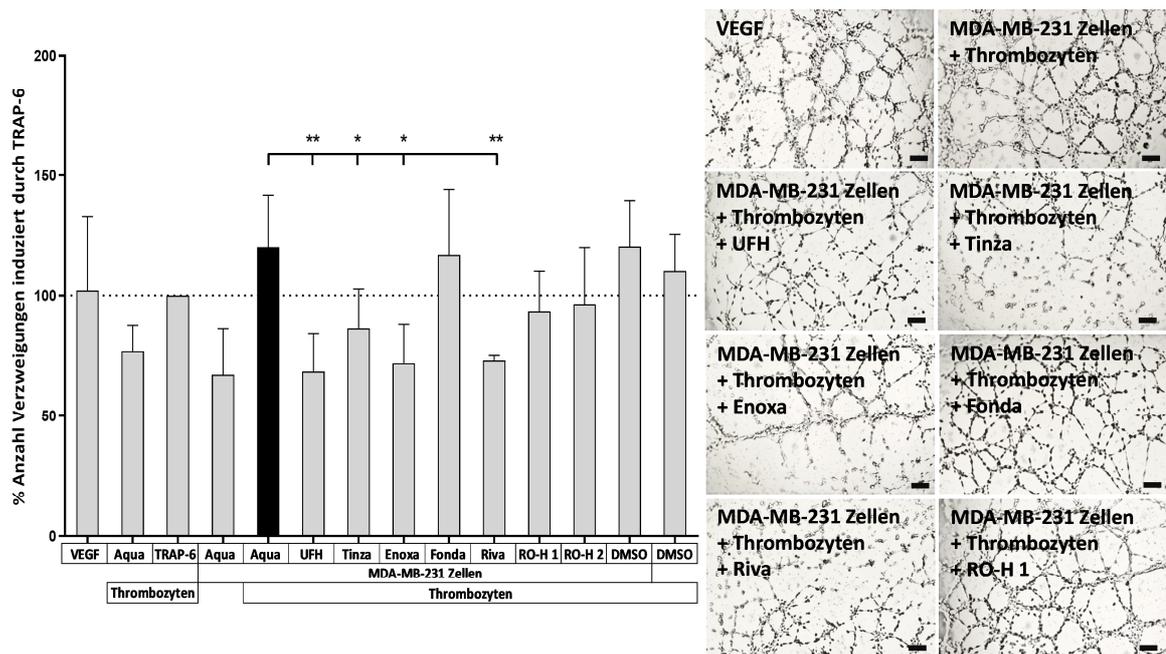


Abbildung 52: Quantifizierung des angiogenetischen Potentials der freigesetzten Granulainhalte aus einer Thrombozytenaktivierung mit MDA-MB-231 Zellen. Dargestellt ist die Auszählung der Verzweigungen von EA.hy926 Zellen (35.000/Well) nach einer Inkubation von 24 h mit 210 ng VEGF (VEGF) oder mit 45 µL des freigesetzten Granulainhaltes aus Reaktionen analog Abbildung 51, mit dem Unterschied, dass MDA-MB-231 Zellen verwendet wurden (Abkürzungen analog Abbildung 51) (n=3) (links). Auswahl repräsentativer Bilder der Wells (Maßstabsleiste entspricht 200 µm) (rechts).

Die Ergebnisbetrachtung wird fortgesetzt mit den Proben, welche aus einer Thrombozytenaktivierung induziert durch MV3 Zellen resultierten.

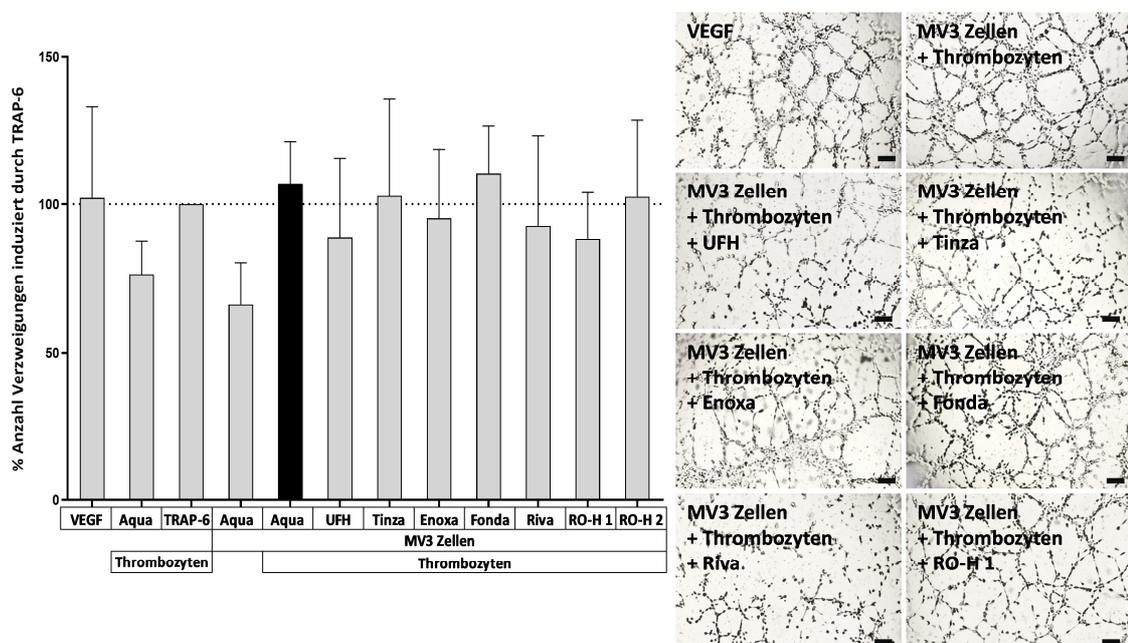


Abbildung 53: Quantifizierung des angiogenetischen Potentials der freigesetzten Granulainhalte aus einer Thrombozytenaktivierung mit MV3 Zellen. Dargestellt ist die Auszählung der Verzweigungen von EA.hy926 Zellen (35.000/Well) nach einer Inkubation von 24 h mit 210 ng VEGF (VEGF) oder mit 45 µL des freigesetzten Granulainhaltes aus Reaktionen analog Abbildung 51, mit dem Unterschied, dass MV3 Zellen verwendet wurden (Abkürzungen analog Abbildung 51) (n=3) (links). Auswahl repräsentativer Bilder der Wells (Maßstabsleiste entspricht 200 µm) (rechts).

Die allgemein gesteigerten Basiswerte traten erneut auf. Es konnte nur eine schwache Steigerung der Verzweigungen durch die Kombination aus Tumorzellen und Thrombozyten festgestellt werden. Zudem sind nur geringfügige Tendenzen einer Inhibition der Tube Formation durch die Antikoagulantien erkennbar (Abbildung 53 links). Die Ergebnisse widersprechen den Erwartungen aus der VEGF-Quantifizierung deutlich. Denn obwohl die VEGF-Sekretion durch alle Testsubstanzen außer Fondaparinux signifikant reduziert wurde, konnten in diesem Versuch keine deutlichen inhibitorischen Effekte festgestellt werden.

Abschließend wird das angiogenetische Potential der Granulainhalte aus den Thrombozytenaktivierungen mit PC-3 Zellen diskutiert. Die Ergebnisse wiesen wieder die hohen Grundwerte der Verzweigungsanzahl für Thrombozyten (76,6 %) und Tumorzellen (71,9 %) auf. Durch die Kombination der beiden Zellarten (87,4 %) wurde kaum eine Steigerung erreicht (Abbildung 54 links). Somit konnte bezüglich der Tube Formation gezeigt werden, dass PC-3 Zellen nicht zur Induktion von für die Angiogenese relevanten Molekülen befähigt waren. Alle Testsubstanzen zeigten Tendenzen einer Inhibition, die aber aufgrund des Fehlens einer deutlichen Steigerung der Verzweigungsanzahl durch PC-3 Zellen eine geringe Aussagekraft hatten.

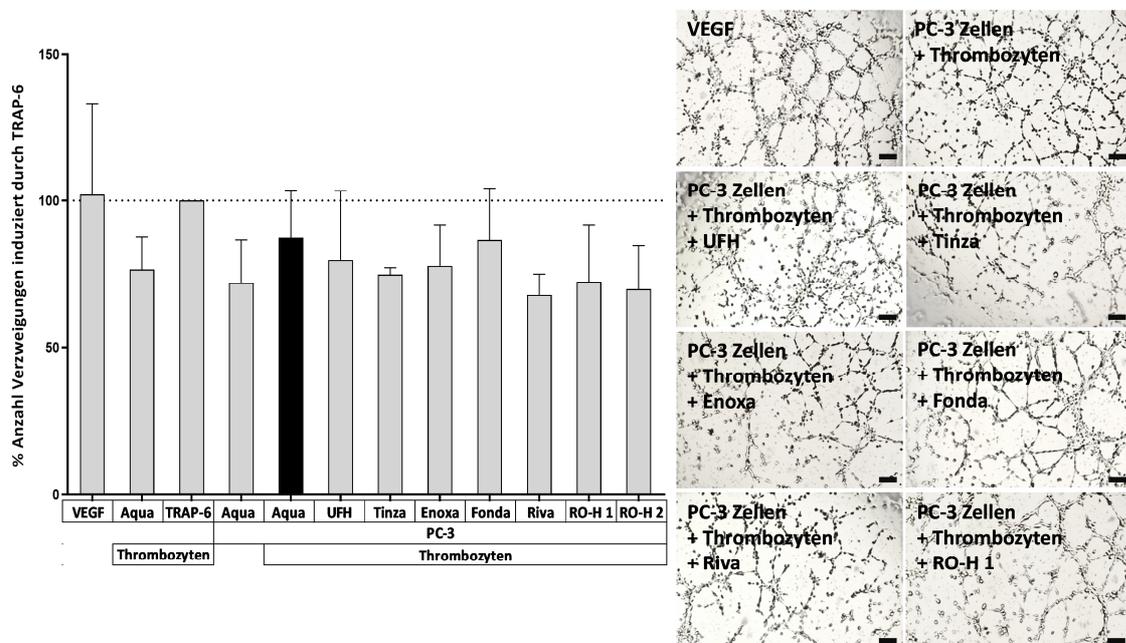


Abbildung 54: Quantifizierung des angiogenetischen Potentials der freigesetzten Granulainhalte aus einer Thrombozytenaktivierung mit PC-3 Zellen. Dargestellt ist die Auszählung der Verzweigungen von EA.hy926 Zellen (35.000/Well) nach einer Inkubation von 24 h mit 210 ng VEGF (VEGF) oder mit 45 µL des freigesetzten Granulainhaltes aus Reaktionen analog Abbildung 51 mit dem Unterschied, dass PC-3 Zellen verwendet wurden (Abkürzungen analog Abbildung 51) (links) (n=3). Auswahl repräsentativer Bilder der Wells (rechts) (Maßstabsleiste entspricht 200 µm).

In diesem Versuch sollte demonstriert werden, dass die Hemmung der Granulasekretion funktionelle Konsequenzen für die Angiogenese besitzt. Zur Quantifizierung der Granulafreisetzung und des angiogenetischen Potentials wurden die gleichen Proben verwendet. Ein Vergleich der vier Quantifizierungen der Tube Formation belegte, dass PC-3 Zellen im Vergleich zu den Zellen der Linien AsPC-1, MDA-MB-231 und MV3 das schwächste Potential zur Induktion einer Angiogenese aufwiesen. Da PC-3 Zellen, wie aus Abschnitt 5.4.2 hervorgeht, die schwächsten Induktoren einer thrombozytären Granulasekretion waren, wurde angenommen, dass ein Zusammenhang zwischen der Sekretion der Granula und der Angiogenese bestand.

Weiterhin sollte demonstriert werden, dass die Hemmung der thrombozytären Sekretion proangiogenetischer Mediatoren direkt die Angiogenese inhibierte. Aufgrund einer hohen intrinsischen Neigung der Ea.hy926 Zellen zur Bildung von Verzweigungen wurde die Sensitivität des Experimentes reduziert und die Detektion inhibitorischer Effekte erschwert. Jedoch war es möglich, im Experiment mit MDA-MB-231 Zellen signifikante Inhibitionen für UFH, beide LMWHs und Rivaroxaban zu zeigen, die auch im Versuch mit AsPC-1 Zellen deutliche Tendenzen einer Inhibition aufwiesen (Abbildung 51, 52). Diese vier Antikoagulantien offenbarten auch in den Ergebnissen zur Inhibition der Granulafreisetzung in Abschnitt 5.4.2 durchweg die signifikantesten Effekte (Tabelle 19). Somit konnte anhand von MDA-MB-231 Zellen eine Korrelation zwischen der Inhibition einer thrombozytären Granulasekretion und einer Inhibition der Angiogenese gezeigt werden. Vermutlich konnten aufgrund der hohen intrinsischen Neigung der Ea.hy926 Zellen zur Bildung von Verzweigungen keine Effekte des RO-Heparins festgestellt werden, die basierend auf der Inhibition der VEGF-Freisetzung (Abbildung 49, 50) erwartet wurden.

Sofern diese Ergebnisse übertragbar auf die *in vivo* Situation sind, könnte man postulieren, dass die Hemmung der Thrombozytenaktivierung und Granulasekretion durch z. B. UFH, einen reduzierenden Einfluss auf eine Angiogenese in metastatischen Nischen entwickeln kann (191,216,217). Zudem könnte angenommen werden, dass weitere Effekte, die aus einer Thrombozytenaktivierung und Granulasekretion resultieren, durch UFH, Tinzaparin, Enoxaparin und Rivaroxaban gehemmt werden können. Diese Annahme wurde im nächsten Experiment anhand der EMT-Induktion in Tumorzellen durch Thrombozyten geprüft, da an dieser zu einem erheblichen Teil TGF- β -1 beteiligt ist (190). Über die Inhibition der Aktivierung und Sekretion könnten UFH, Tinzaparin, Enoxaparin und Rivaroxaban

maßgeblich mit der Tumorzell-Thrombozyten-Kommunikation interferieren und die Metastasierung beeinträchtigen.

5.6 Einfluss von UFH und Enoxaparin auf die Induktion einer Epithelial-mesenchymalen Transition durch Thrombozyten in Tumorzellen der Linien AsPC-1 und PC-3

Labelle und Hynes demonstrierten, dass Thrombozyten eine EMT in Tumorzellen induzieren können, welche letztendlich im Tierversuch zu einer Steigerung der Anzahl von Lungenmetastasen führte. Weiterhin identifizierten sie als induzierende Mechanismen einen direkten Kontakt der Tumorzellen zu aktivierten Thrombozyten sowie die Freisetzung der thrombozytären Granula (190). Hinsichtlich des freigesetzten Granulainhaltes nimmt TGF- β 1 eine Sonderposition als stärkster EMT-Induktor ein, aber auch HGF, PDGF-B, VEGF und EGF können an einer EMT-Induktion beteiligt sein (196–200).

Aufgrund des größeren experimentellen Umfangs wurde die Probengröße verkleinert. In den folgenden Versuchen wurden nur die Tumorzelllinien AsPC-1 und PC-3 getestet. AsPC-1 Zellen wurden ausgewählt, da sie die geringste intrinsische TGF- β 1-Freisetzung zeigten und die stärkste thrombozytäre Sekretion auslösten. Zudem induzierten sie eine starke Thrombozytenadhäsion und TCIPA. PC-3 Zellen wurden ausgesucht, da sie nur eine intrinsische TGF- β 1-Freisetzung aufwiesen, die durch Antikoagulantien nicht beeinflusst wurde. Außerdem induzierten PC-3 Zellen weder eine Thrombozytenadhäsion noch waren sie zur TCIPA befähigt.

Somit wurde erwartet, dass PC-3 Zellen eine schwächere EMT aufweisen würden, die aus der intrinsischen TGF- β 1-Freisetzung resultiert und nicht durch Antikoagulantien inhibiert werden kann. Demgegenüber sollte eine EMT der AsPC-1 Zellen durch Antikoagulantien hemmbar sein, da sie theoretisch in hohem Maße von der Thrombozytenaktivierung bzw. der resultierenden Granulasekretion, welche durch Antikoagulantien inhibiert werden kann, abhängig sein müsste.

Da sich die Antikoagulantien UFH und Enoxaparin als potente Inhibitoren der Tumorzell-Thrombozyten-Adhäsion, der TCIPA und der Granulafreisetzung offenbart hatten, sollte ihr Effekt auf eine EMT-Induktion in Tumorzellen durch Thrombozyten auf mRNA-, Protein- und funktioneller-Ebene quantifiziert werden. Zudem wurde diese Auswahl

aufgrund der unterschiedlichen Größe der GAG-Strukturen vorgenommen (259,374) und weil UFH die durch AsPC-1 Zellen induzierte TGF- β 1-Freisetzung signifikant reduzierte, während Enoxaparin diese nur auf dem Niveau von TRAP-6 (100 % TGF- β 1-Freisetzung) stabilisierte (Abbildung 47 oben). Beide Antikoagulantien wurden in den experimentellen Standardkonzentrationen, welche sich an therapeutischen Konzentrationen orientierten, von 1 I. E./mL eingesetzt. Die Thrombozyten wurden wie bisher in recalcifiziertem TRPu eingesetzt, um eine isolierte Betrachtung von adhäsiven und parakrinen Interaktionen zwischen Tumorzellen und Thrombozyten zu ermöglichen.

5.6.1 Quantifizierung der Induktion und Inhibition einer Epithelial-mesenchymalen Transition auf mRNA-Ebene

Durch eine 72-stündige Koinkubation von Tumorzellen und Thrombozyten wurde eine EMT induziert. Anschließend erfolgte eine Quantifizierung der mRNA-Expression der EMT-induzierenden Transkriptionsfaktoren Snail1, Slug, Zeb2 und Twist1 (201). Zudem wurde die mRNA für das EMT-spezifische Typ III Intermediär Filament Vimentin untersucht. Vimentin ist ein Bestandteil des Zytoskeletts und wird im Zuge einer EMT verstärkt gebildet. Es ist dementsprechend ein Marker zur Identifikation mesenchymaler Zellen (178,179).

Die Koinkubation der AsCP-1 Zellen mit Thrombozyten resultierte in einer hoch signifikanten Steigerung der Snail1-Expression sowie in deutlichen Tendenzen zur Steigerung der Slug- und Vimentin-Expression. Die Twist1-Expression wurde nur leicht tangiert und die von Zeb2 reduziert (Abbildung 55). Diese Änderungen in der mRNA-Expression zeigten eine EMT-Induktion in den AsPC-1 Zellen an.

Die Steigerung der Snail1-Expression wurde höchst signifikant durch eine Präinkubation der Thrombozyten mit UFH und Enoxaparin reduziert bzw. inhibiert. Die Steigerungen der Slug- und Vimentin-Expression wurden ebenfalls durch beide Antikoagulantien auf das Niveau un behandelter Tumorzellen reduziert. Die Zeb2- und Twist1-Expression wurden kaum durch UFH und Enoxaparin beeinflusst (Abbildung 55). Dementsprechend interferierten beide Antikoagulantien mit der EMT-Induktion in AsPC-1 Zellen auf der Ebene der mRNA-Expression.

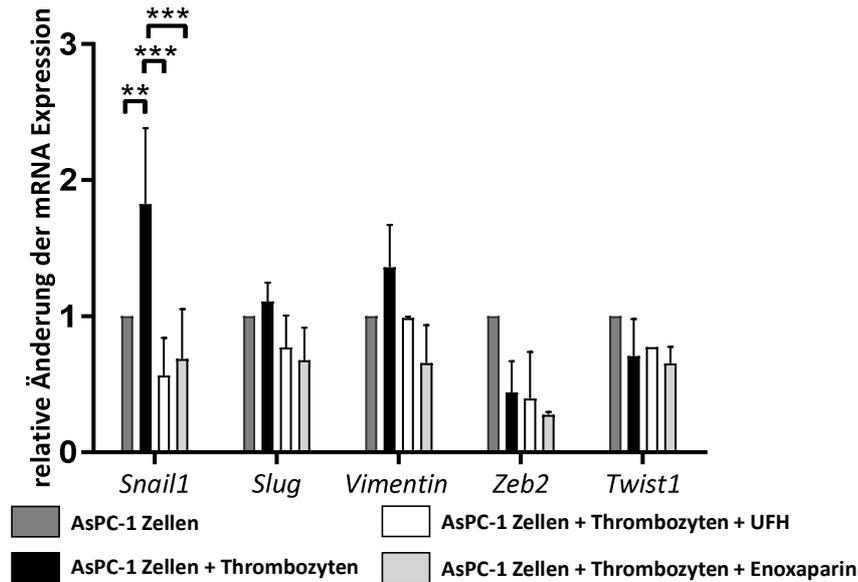


Abbildung 55: Quantifizierung der relativen Expressionsänderung der m-RNA von Vimentin und den EMT-induzierenden Transkriptionsfaktoren Snail1, Slug, Zeb2 und Twist1 von unbehandelten AsPC-1 Zellen und nach einer EMT-Induktion (72 h) mit Thrombozyten (200 Mio/mL) in An- und Abwesenheit von UFH oder Enoxaparin. Die Angabe der mRNA-Expressionsänderung erfolgte als Faktor und wurde auf unbehandelte AsPC-1 Zellen normalisiert (n=3).

Das Experiment wurde mit PC-3 Zellen wiederholt. Sie zeigten bisher keine bemerkenswerten Kapazitäten zur Aktivierung von Thrombozyten, es konnte allenfalls eine geringe Induktion der thrombozytären Granulafreisetzung und eine geringe Adhäsion von Thrombozyten demonstriert werden. Jedoch offenbarten PC-3 Zellen eine intrinsische Sekretion von TGF- β 1, die durch Antikoagulantien nicht reduziert werden konnte.

Die Koinkubation der PC-3 Zellen mit Thrombozyten verursachte eine Steigerung der Snail1-, Slug- und Zeb2-mRNA-Level. Die mRNA-Expression von Vimentin und Twist1 wurde nicht erhöht. Somit konnten Tendenzen EMT-spezifischer Expressionsänderungen festgestellt werden (Abbildung 56). UFH reduzierte die Snail1- und die Twist1-Expression. Die Präinkubation mit Enoxaparin verringerte den mRNA-Gehalt von Snail1, Slug, Vimentin und Zeb2. Es konnten keine signifikanten Effekte detektiert werden (Abbildung 56).

Da die Antikoagulantien einen Einfluss auf die Expression der EMT-induzierenden Transkriptionsfaktoren hatten, kann nicht allein die intrinsische TGF- β 1-Sekretion verantwortlich für die Expressionsänderungen sein. Möglicherweise ist also das geringe Potential der PC-3 Zellen zur Aktivierung von Thrombozyten bereits ausreichend um eine EMT einzuleiten.

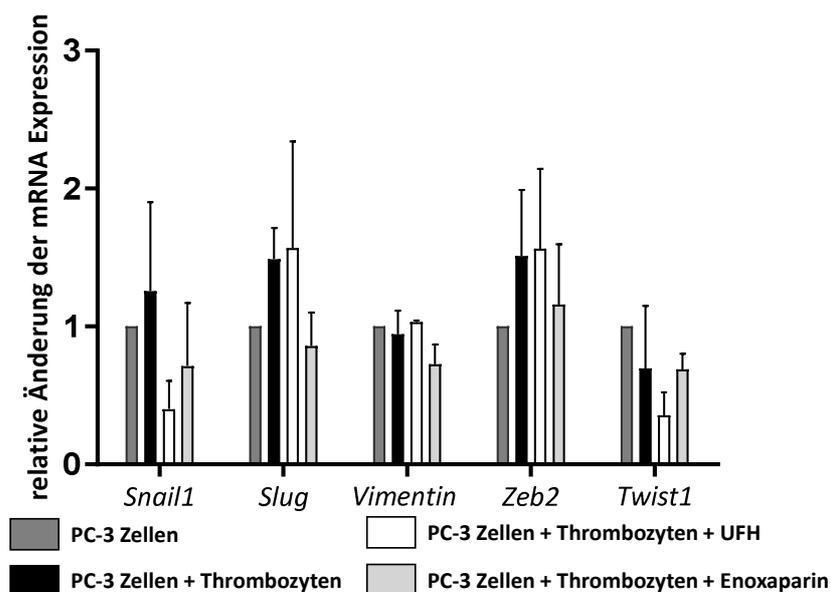


Abbildung 56: Quantifizierung der relativen Expressionsänderung der m-RNA von Vimentin und den EMT-induzierenden Transkriptionsfaktoren Snail1, Slug, Zeb2 und Twist1 von unbehandelten PC-3 Zellen und nach einer EMT-Induktion (72 h) mit Thrombozyten (200 Mio/mL) in An- und Abwesenheit von UFH oder Enoxaparin. Die Angabe der mRNA-Expressionsänderung erfolgte als Faktor und wurde auf unbehandelte PC-3 Zellen normalisiert (n=3).

5.6.2 Quantifizierung der Induktion und Inhibition einer Epithelial-mesenchymalen Transition auf Protein-Ebene

Zur Bestätigung der Ergebnisse aus der Quantifizierung der mRNA-Expression wurde eine Untersuchung der Proteinexpression von Vimentin und E-Cadherin durchgeführt. Das Typ III Intermediär Filament Vimentin ist wie bereits erwähnt ein Marker für mesenchymale Zellen (178,179). E-Cadherin vermittelt die interzelluläre Bindung von Epithelzellen und ist somit ein Marker für diese (176). Eine klassisch verlaufende EMT weist dementsprechend eine Steigerung der Vimentin-Expression und eine Reduktion der E-Cadherin-Expression auf. Die Betrachtung beginnt mit der Quantifizierung der Expression der beiden Marker in AsPC-1 Zellen nach einer EMT-Induktion mit Thrombozyten. Die Vimentin-Expression wurde durch die Behandlung mit Thrombozyten siebenfach gesteigert. Die E-Cadherin-Expression wurde halbiert (Abbildung 57 rechts). Die Steigerung des mesenchymalen Markers und die Reduktion des epithelialen Markers sind charakteristisch für eine EMT-Induktion und bestätigen die Erkenntnisse aus den qRT-PCR-Experimenten.

Eine Präinkubation der Thrombozyten mit UFH verhinderte die Induktion einer EMT. Die Expression von Vimentin stieg in Gegenwart der mit UFH behandelten Thrombozyten lediglich um 4,6 %. Die E-Cadherin-Expression wurde nicht reduziert, sondern um 11,8 % gesteigert. Die Vimentin-Expression ist durch die UFH Präinkubation der Thrombozyten

höchst signifikant reduziert worden. Enoxaparin stabilisierte den Anstieg der Vimentin-Expression bei 341,5 % und den Abfall der von E-Cadherin bei 96,8 %. Somit offenbarte das LMWH ebenfalls reduzierende Effekte und hemmte die EMT-Induktion (Abbildung 57 rechts).

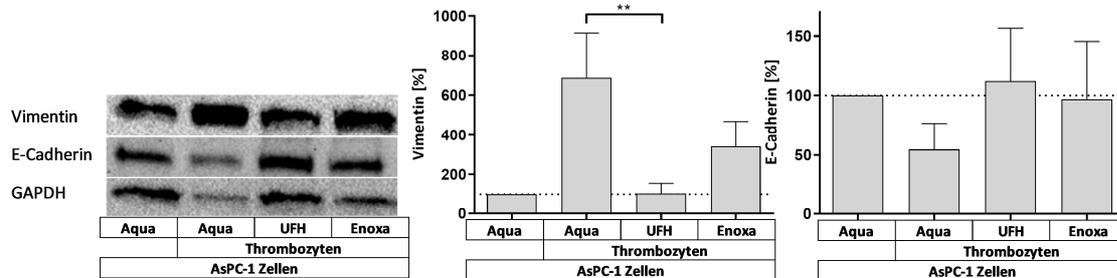


Abbildung 57: Quantifizierung der Proteinexpression von Vimentin und E-Cadherin, in unbehandelten AsPC-1 Zellen, in AsPC-1 Zellen nach einer EMT-Induktion (72 h) mit Thrombozyten (200 Mio/mL) und in AsPC-1 Zellen nach einer EMT-Induktion mit Thrombozyten in Anwesenheit von UFH oder Enoxaparin. Ergebnisse wurden via Messung der Pixeldichte quantifiziert und auf unbehandelte AsPC-1 Zellen normalisiert. Die Darstellung erfolgte als prozentualer Anteil (rechts) (n=3) und als repräsentative Western Blot-Banden (links).

Die PC-3 Zellen offenbarten, trotz der eine EMT andeutenden Genexpression, keine eindeutigen Veränderungen der Vimentin- und E-Cadherin-Expression. Es konnte eine Zunahme der Vimentin-Expression um 164,8 % festgestellt werden, die durch UFH und Enoxaparin in unterschiedlichem Ausmaß reduziert wurde. Durch eine Präinkubation der Thrombozyten mit UFH stieg die Vimentin-Expression nur um 94,2 % und durch eine mit Enoxaparin um 72,1 % (Abbildung 58 rechts). Die Effekte waren nicht signifikant. Es konnte keine Abnahme der Expression des epithelialen Markers E-Cadherin festgestellt werden, was der Annahme einer EMT-Induktion in PC-3 eher widersprach oder eine unvollständige bzw. partielle EMT andeutete.

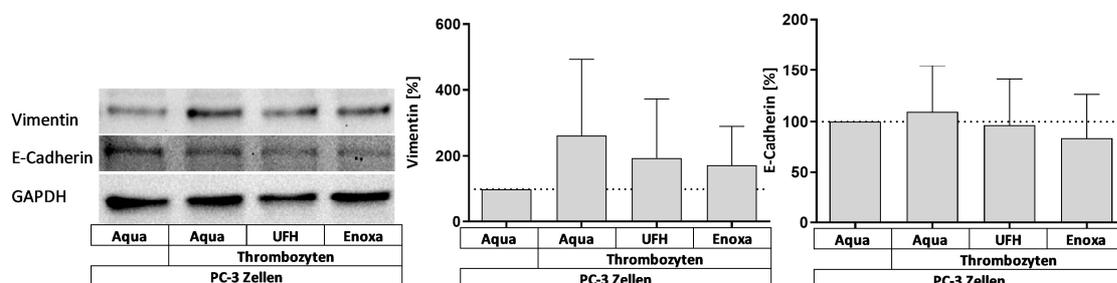


Abbildung 58: Quantifizierung der Proteinexpression von Vimentin und E-Cadherin, in unbehandelten PC-3 Zellen, in PC-3 Zellen nach einer EMT-Induktion (72 h) mit Thrombozyten (200 Mio/mL) und in PC-3 Zellen nach einer EMT-Induktion mit Thrombozyten in Anwesenheit von UFH oder Enoxaparin. Ergebnisse wurden via Messung der Pixeldichte quantifiziert und auf unbehandelte PC-3 Zellen normalisiert. Die Darstellung erfolgte als prozentualer Anteil (rechts) (n=3) und als repräsentative Western Blot-Banden (links).

5.6.3 Quantifizierung der Induktion und Inhibition einer Epithelial-mesenchymalen Transition auf funktioneller-Ebene

Zur Untersuchung funktioneller Konsequenzen der EMT-Induktion und –Inhibition wurden Wundheilungsassays durchgeführt. Eine EMT ist charakteristischerweise mit einer Zunahme der Migrationsgeschwindigkeit und Invasivität assoziiert. Der Wundheilungsassay ermöglichte die Bestimmung der Migrationsgeschwindigkeit der Zellen, indem der Verschluss eines Spaltes bzw. einer Wunde in einer konfluenten Zellschicht durch die Migration der Zellen über einen bestimmten Zeitraum untersucht wurde. Nach der EMT-Induktion mit Thrombozyten wurde ein Spalt in der Tumorzellschicht erzeugt und der Verschluss dieses Spaltes dokumentiert.

Die Bewegung der AsPC-1 Zellen wurde über 72 Stunden dokumentiert. Die repräsentativen Aufnahmen zeigten einen langsamen und stetigen Verschluss des Spaltes (Abbildung 59 links).

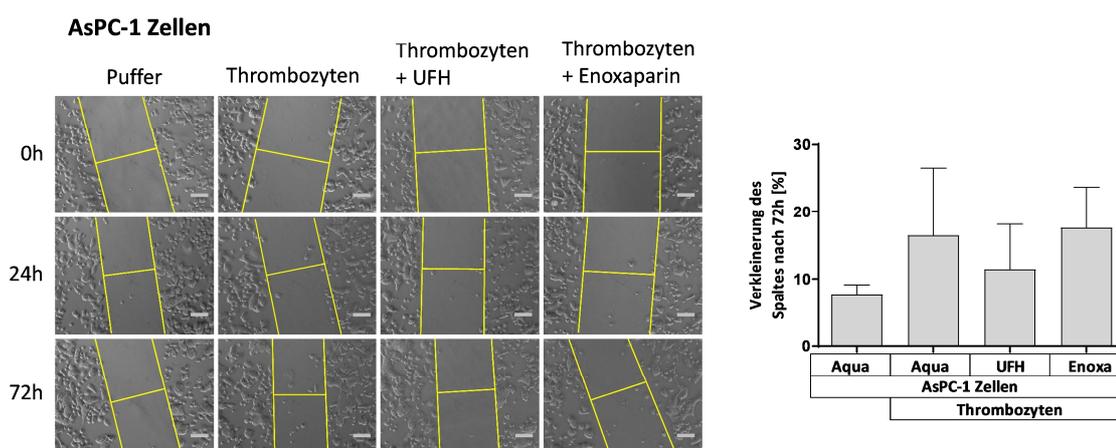


Abbildung 59: Zur Quantifizierung funktioneller Konsequenzen der EMT, wurde in einer konfluenten Zellschicht, nach FKS-Entzug (min. 16 h), ein Spalt erzeugt. Über 72 h wurde der Verschluss dieses Spaltes dokumentiert. Es wurden unbehandelten AsPC-1 Zellen, AsPC-1 Zellen nach einer EMT-Induktion (72 h) mit Thrombozyten (200 Mio/mL) und AsPC-1 Zellen nach einer EMT-Induktion mit Thrombozyten in Anwesenheit von UFH oder Enoxaparin untersucht. Die Quantifizierung erfolgte durch die mikroskopische Dokumentation des Verschlusses (links; repräsentative Bilder) und die Messung der Spaltgröße mit der Software ImageJ (rechts). Die Verkleinerung des Spaltes wurde als prozentualer Anteil der Größe zum Zeitpunkt 0 h dargestellt (Maßstabsleiste entspricht 50 µm) (n=3).

Dieser wurde nach 72 Stunden von unbehandelten AsPC-1 Zellen um 7,6 %, von mit Thrombozyten behandelten um 16,4 % und von mit Thrombozyten und UFH behandelten um 11,4 % verkleinert. Enoxaparin hatte keinen Einfluss (Abbildung 59 rechts). Es konnte somit eine Tendenz zur Zunahme der Migrationsgeschwindigkeit durch eine EMT festgestellt werden, welche durch UFH reduziert wurde.

Unbehandelte PC-3 Zellen offenbarten bereits eine relativ hohe Migrationsgeschwindigkeit, welche durch die Behandlung mit Thrombozyten nochmals gesteigert werden konnte (Abbildung 60 links). Deshalb wurde der Wundheilungsassay über einen Zeitraum von 24 Stunden dokumentiert. Die Verkleinerung des Spaltes betrug in dieser Zeit für die unbehandelten PC-3 Zellen 35,5 % und wurde durch die Behandlung mit Thrombozyten auf 52,3 % gesteigert. Eine Präinkubation der Thrombozyten mit UFH resultierte in einer Verkleinerung des Spaltes um 32,5 %. Somit reduzierte UFH die Migrationsgeschwindigkeit der PC-3 Zellen. Die Präinkubation mit Enoxaparin resultierte in einer Reduktion der Spaltverkleinerung auf 44,1 % (Abbildung 60 rechts). Das Ergebnis dieses Versuches deutet erneut und im Widerspruch zu den Ergebnissen der Quantifizierung auf Protein-Ebene den Ablauf einer EMT in PC-3-Zellen an.

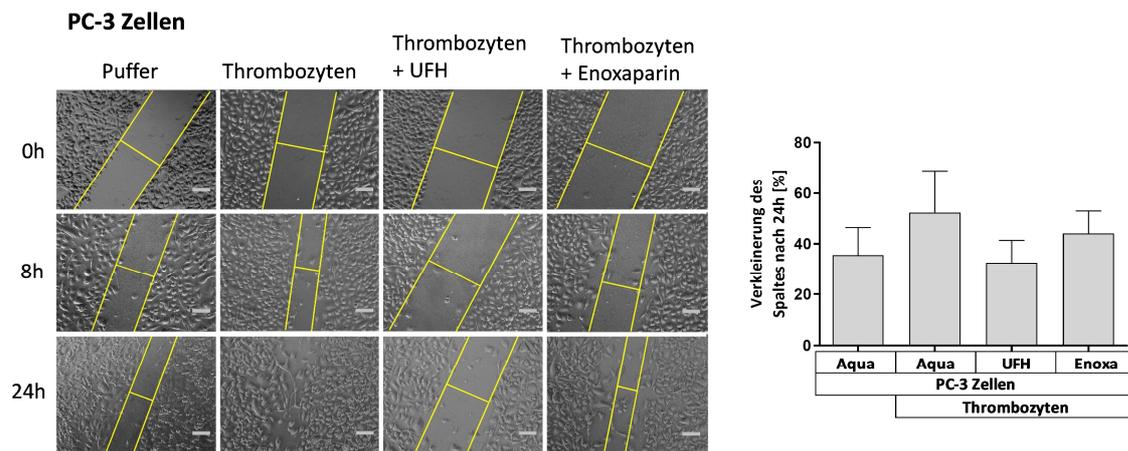


Abbildung 60: Zur Quantifizierung funktioneller Konsequenzen der EMT, wurde in einer konfluenten Zellschicht, nach FKS-Entzug (min. 16 h), ein Spalt erzeugt. Über 72 h wurde der Verschluss dieses Spaltes dokumentiert. Es wurden unbehandelten PC-3 Zellen, PC-3 Zellen nach einer EMT-Induktion (72 h) mit Thrombozyten (200 Mio/mL) und PC-3 Zellen nach einer EMT-Induktion mit Thrombozyten in Anwesenheit von UFH oder Enoxaparin untersucht. Die Quantifizierung erfolgte durch die mikroskopische Dokumentation des Verschlusses (links; repräsentative Bilder) und die Messung der Spaltgröße mit der Software ImageJ (rechts). Die Verkleinerung des Spaltes wurde als prozentualer Anteil der Größe zum Zeitpunkt 0 h dargestellt (Maßstabsleiste entspricht 50 µm) (n=3).

5.6.4 Zusammenfassung des Einflusses von UFH und Enoxaparin auf die Induktion einer Epithelial-mesenchymalen Transition durch Thrombozyten in den Tumorzellen der Linien AsPC-1 und PC-3

Die Ergebnisse der Quantifizierungen der EMT-Induktion und –Inhibition belegen, dass UFH und Enoxaparin die EMT-Induktion in den Pankreaskarzinomzellen der Linie AsPC-1 beeinflussen konnten und abschwächten. UFH offenbarte sich als der stärkere Inhibitor. Eine Inkubation der Thrombozyten mit UFH vor der EMT-Induktion resultierte in einer höchst

signifikanten Reduktion der Snail1 m-RNA-Expression sowie in einer hoch signifikanten Reduktion der Vimentin-Proteinmenge (Abbildung 55, 57). Zusätzlich offenbarte sich anhand der hohen Vimentin-Protein-Expression und der geringeren Vimentin-mRNA-Expression, dass das Maximum der Vimentin-mRNA-Expression in weniger als 72 Stunden erreicht wird. Bezüglich der PC-3 Zellen konnte festgestellt werden, dass sie nach einer Inkubation mit Thrombozyten gewisse Anzeichen einer EMT-Induktion aufweisen. Jedoch waren die Ergebnisse der Quantifizierungen heterogener als die Ergebnisse der EMT-Quantifizierungen der AsPC-1 Zellen. Es konnte z. B. keine Abnahme der E-Cadherin-Proteinmenge festgestellt werden (Abbildung 58). Möglicherweise war die EMT-Induktion in den PC-3 Zellen schwächer und unvollständiger. Auch diese schwache EMT-Induktion konnte durch UFH und Enoxaparin gehemmt werden.

Labelle und Hynes identifizierten in ihren Arbeiten die Freisetzung der thrombozytären Granula und insbesondere die von TGF- β 1 sowie den direkten Kontakt zu Tumorzellen, als die EMT-induzierenden Mechanismen in diesem Kontext (190). In dieser Arbeit konnte bisher gezeigt werden dass UFH und Enoxaparin die TCIPA, die Adhäsion von Thrombozyten und die Granulasekretion hemmten. Somit könnte man postulieren, dass die Inhibition der EMT-Induktion durch UFH und Enoxaparin eine Konsequenz der Hemmung dieser Prozesse war.

Ob in diesen Studien für die Hemmung der EMT-Induktion die Inhibition der Freisetzung von EMT-Induktoren aus der thrombozytären Granula, die Inhibition des Kontaktes oder eine kombinierte Hemmung beider Prozesse verantwortlich war, blieb unklar.

Weiterhin konnte aufgedeckt werden, dass bereits geringe Interaktionen zwischen PC-3 Zellen und Thrombozyten ausreichten, um morphologische Veränderungen hin zu einem mesenchymalen Phänotyp zu erzeugen. PC-3 Zellen gehen nur schwache Wechselwirkungen mit Thrombozyten ein. Vermutlich sind diese schwachen Wechselwirkungen verantwortlich für die schwächere EMT-Induktion.

UFH war in der Lage, die Stimuli der Thrombozyten zur Induktion und Aufrechterhaltung einer EMT in metastasierenden Tumorzellen zu blockieren, indem die Tumorzell-Thrombozyten-Kommunikation gestört wurde. Dementsprechend ist davon auszugehen, dass, sofern die Ergebnisse auf die *in vivo* Situation übertragen werden können, eine Therapie mit UFH durch diesen Mechanismus möglicherweise die hämatogene Metastasierung abschwächen könnte (190). Metastasierenden Tumorzellen im Blut würde

so der, die EMT-aufrechterhaltende Stimulus der Thrombozyten entzogen werden, und sie würden ihren mesenchymalen Phänotyp verlieren. Die Inhibition der EMT-Induktion ist, zusätzlich zur Hemmung der Angiogenese, der zweite prometastatische Prozess, der aus den Interaktionen der Tumorzellen mit Thrombozyten hervorgeht und durch die Hemmung der Thrombozytenaktivierung durch Antikoagulantien inhibiert werden konnte. Somit stellt sich die Frage, ob weitere prometastatische Mechanismen, die aus diesen Wechselwirkungen resultieren wie z. B. die Beeinflussung der Endothelpermeabilität bei einer Extravasation, durch Antikoagulantien inhibiert werden können (64).

5.7 Zwischenfazit Projekt 1

Um sich der Thematik experimentell zu nähern, wurde zu Beginn eine Quantifizierung der Tumorzell-Thrombozyten-Adhäsion durchgeführt, auf diese folgten eine Bestimmung der TCIPA und eine Untersuchung der thrombozytären Granulasekretion nach einem Tumorzellkontakt. Anschließend wurden die EMT- und Angiogenese-Induktion als funktionelle Konsequenzen der Tumorzell-Thrombozyten-Interaktion quantifiziert.

Zur Simulation der Kommunikation zwischen Tumorzellen und Thrombozyten wurde ein Modell verwendet, in dem Thrombozyten in recalcifiziertem TRPu suspendiert vorlagen. So sollten adhäsive und parakrine bzw. kontaktbasierende Wechselwirkungen zwischen Tumorzellen und Thrombozyten isoliert untersucht werden und aktivierende Effekte, welche aus der Blutgerinnungskaskade resultierten, ausgeschlossen werden. Weiterhin wurden in jedem der Experimente, außer in den EMT-Studien, alle vier Tumorentitäten und alle sechs Antikoagulantien verwendet. Die EMT-Studien wurden unter Verwendung von Prostata- und Pankreaskarzinomzellen sowie von UFH und Enoxaparin durchgeführt.

Die Ergebnisse der Versuche belegten, dass Melanom, Pankreas- und Mammakarzinomzellen, aber nicht Prostatakarzinomzellen, eine Aktivierung der Thrombozyten induzierten. Diese Aktivierung umfasste die Etablierung einer Adhäsion von Thrombozyten, die Bildung von Aggregaten aus Tumorzellen und Thrombozyten sowie die Induktion einer Sekretion der thrombozytären dichten- und α -Granula. Die durch Tumorzellen induzierte Thrombozyten-aktivierung offenbarte funktionelle prometastatische Konsequenzen, wie die Förderung einer Angiogenese und die Induktion einer EMT in den Tumorzellen.

Weiterhin wurde festgestellt, dass die verwendeten Tumorzellen auch zu einer intrinsischen PDGF-B-, TGF- β 1- und VEGF-Sekretion befähigt waren. Zudem gelang die Detektion einer PDGF-B-Freisetzung aus den unbehandelten Tumorzell-Thrombozyten-Inkubationen, welche in ihrer Intensität die Freisetzung aus einer PAR-1-Aktivierung weit übertraf. Sie kann als Hinweis dafür gewertet werden, dass eine Aktivierung der Thrombozyten durch Tumorzellen, hinsichtlich der PDGF-B Freisetzung, stärker sein könnte als eine via PAR-1.

Es wurde versucht morphologische Gemeinsamkeiten der drei die Thrombozyten aktivierenden Tumorzelllinien zu identifizieren, welche verantwortlich für die Aktivierung sein konnten. Basierend auf einer Literaturrecherche konnte als Gemeinsamkeit eine TF-Expression festgestellt werden (378–382). Ob diese verantwortlich für die Aktivierung war, wurde durch eine vergleichende Thrombingenerierung zwischen recalcifiziertem TRP und recalcifiziertem TRPu untersucht. In dem recalcifizierten TRPu konnte keine Thrombingenerierung nach einer Zugabe von TF- oder Tumorzellen detektiert werden.

Jedoch zeigte Rivaroxaban in allen Versuchen ausgeprägte Effekte, welche auf eine Präsenz der Gerinnungskaskade hindeuteten. Somit blieb die Beteiligung der Blutgerinnungskaskade bzw. von Thrombin an dem verwendeten Modell unklar. Demgegenüber wäre auch eine Aktivierung über thrombozytäre Adhäsionsrezeptoren denkbar, welche nicht unbedingt in gleicher Art und Weise für jede Tumorzelllinie ablaufen müsste. So konnte z. B. anhand einer Studie von Barnes et al. belegt werden, dass MDA-MB-231 Zellen Podoplanin exprimieren können, wodurch Thrombozyten via CLEC-2 aktiviert werden können (388).

Die inhibitorischen Kapazitäten der Testsubstanzen bezüglich der simulierten Prozesse sind vergleichsweise heterogen und werden im Folgenden nacheinander diskutiert.

UFH hat exzellente inhibitorische Wirksamkeiten in allen Experimenten gezeigt, es reduzierte nahezu alle Interaktionen und die daraus folgenden funktionellen Konsequenzen. Seine Überlegenheit demonstrierte es bei der Inhibition der TCIPA, der Hemmung der Granulasekretion und der EMT-Induktion. Diese exzellente Wirksamkeit könnte zum Teil in seiner großen GAG-Struktur begründet sein (374). Diese besitzt ein Potential zur Interferenz mit thrombozytären Adhäsionsrezeptoren wie z. B. P-Selektin (301,302,397,406).

Die niedermolekularen Heparine, Tinzaparin und Enoxaparin wirkten ähnlich wie UFH. Wobei Tinzaparin nur etwas schlechter wirkte als UFH, was deutlich wurde bei den Quantifizierungen der TCIPA und der Angiogenese. Die Unterschiede waren allerdings gering und Tinzaparin wurde nicht hinsichtlich der Inhibition einer EMT-Induktion untersucht.

Enoxaparin schnitt deutlich schlechter im direkten Vergleich mit UFH ab, was sich bei der Untersuchung der Adhäsion, der TCIPA, der Granulasekretion und EMT-Induktion zeigte. Die GAG-Struktur beider LMWHs ist kleiner als die von UFH (15.000 Da), Enoxaparin ist mit 4.500 Da kleiner als Tinzaparin mit 5.500-7.500 Da (259,374,396). Möglicherweise ist die differente Wirksamkeit in diesen Größenunterschieden begründet und der Effekt verbessert sich mit einer Zunahme der Größe der GAG-Struktur oder besitzt bei einer bestimmten Größe ein Optimum.

Fondaparinux, der Antithrombin III abhängige Faktor Xa-Inhibitor besteht aus einem Pentasaccharid (264). Es zeigte in allen Experimenten sehr schwache inhibitorische Kapazitäten.

Demgegenüber offenbarte der zweite Faktor Xa-Inhibitor ein bemerkenswertes Potential zur Hemmung der Thrombozytenaktivierung (272). Rivaroxaban wirkte in Bezug auf die Inhibition der Adhäsion, Granulasekretion und Angiogenese ähnlich gut wie Tinzaparin und UFH. Es war jedoch in der Inhibition der TCIPA unterlegen. Warum Rivaroxaban so gute Effekte in einem Modell zeigte, das auf recalcifiziertem TRPu basierte und somit keine Gerinnungsfaktoren enthalten sollte, und warum es besser als der andere Faktor Xa-Inhibitor wirkte, blieb fraglich.

Ein möglicher Erklärungsansatz wurde in Abschnitt 5.2.1 präsentiert. Dieser setzte voraus, dass die Thrombozytenaktivierung im verwendeten Modell abhängig von Faktor Xa war und befasste sich mit der Annahme, dass Fondaparinux keinen im Prothrombinasekomplex gebundenen Faktor Xa hemmen konnte, wozu Rivaroxaban aber befähigt war (383,384,386,387). Die Annahme einer Thrombingenerierung im recalcifizierten TRPu bot einen Erklärungsansatz und lag gemäß Heinmöller et al. im Bereich des Möglichen. Die Generierung könnte nach Heinmöller et al. aus extrem kleinen Plasmarückständen im TRPu resultieren (390,391). Jedoch konnte wie bereits erwähnt kein aktives Thrombin im recalcifiziertem TRPu nach einer TF-Zugabe detektiert werden.

Der Vollständigkeit halber soll darauf hingewiesen werden, dass eine Thrombingenerierung auch die Abstufung der Wirksamkeit von UFH und den beiden LMWHs erklären kann, da diese sich in ihrer Anti-Faktor IIa-Aktivität entsprechend unterscheiden. Das Verhältnis der Anti-Faktor Xa-Aktivität zur Anti-Faktor IIa-Aktivität nimmt von UFH mit 1 über Tinzaparin mit 1,5-2,5 hin zu Enoxaparin mit 4,3 zu. (259,261,374) UFH ist somit der stärkste Thrombin-Inhibitor.

Die Effekte des RO-Heparins waren sehr heterogen. Es inhibierte in der höheren Konzentration die Thrombozytenadhäsion. Weiterhin zeigten beide Konzentrationen ein starkes Potential zur Inhibition der dichten-Granulasekretion. Zudem konnten Reduktionen der VEGF-Freisetzung aus der α -Granula durch die höhere Konzentration detektiert werden. Die Inhibition der TCIPA durch RO-Heparin war in hohem Maße konzentrationsabhängig. Die beiden standardmäßig verwendeten Konzentrationen von 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ und 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ verzögerten die TCIPA. Die Angiogenese wurde nur marginal reduziert.

Da die antikoagulative Aktivität des RO-Heparins in den beiden verwendeten Konzentrationen vernachlässigbar war, wurden die inhibitorischen Effekte ausschließlich der GAG-Struktur bzw. Interferenzen dieser mit zellulären Oberflächenstrukturen zugeschrieben (335). Interaktionen von RO-Heparin mit thrombozytärem P-Selektin wurden bereits wissenschaftlich erfasst (291). Somit muss man die Hemmung der ATP-Freisetzung bzw. der dichten-Granulafreisetzung und der VEGF-Sekretion als Effekt der GAG-Struktur interpretieren.

Zudem war es bemerkenswert, dass das RO-Heparin in beiden verwendeten Konzentrationen die TCIPA ähnlich wie Fondaparinux nur leicht verzögerte, aber trotzdem die ATP-Freisetzung stark reduzierte, wozu Fondaparinux nicht befähigt war. Es wurde eine gewisse Korrelation der TCIPA und der Sekretion der dichten-Granula erwartet, da die Thrombozytenaktivierung, sekundär nach dem aktivierenden Stimulus, via ATP- und ADP-Freisetzung autokrin gefördert und verstärkt wird (395,407). Aufgrund der Effekte des RO-Heparins auf beide Prozesse kann man postulieren, dass die TCIPA von den betrachteten Tumorzelllinien unabhängig von der Freisetzung dieser beiden Nucleotide und vermutlich von der Freisetzung der dichten-Granula ablief (393).

Abschließend soll noch einmal betont werden, dass UFH sich als potentester Inhibitor offenbart hatte. Es interferierte sowohl mit der Thrombozytenaktivierung, als auch mit den funktionellen prometastatischen Konsequenzen dieser Aktivierung.

Die Präsentation der Ergebnisse wird fortgesetzt mit Versuchen, die eine bessere Differenzierung der die Thrombozyten aktivierenden Mechanismen ermöglichen sollen, da die Beteiligung der Blutgerinnungskaskade im recalcifiziertem TRPu-Modell fraglich blieb. So wurde in den folgenden beiden Projekten der Stellenwert einer Thrombozytenaktivierung durch den Tumorzellkontakt in der Abwesenheit von Calcium und durch die Aktivierung der Blutgerinnungskaskade bzw. einer Thrombingenerierung evaluiert.

5.8 Einfluss von UFH und Fondaparinux auf die Sekretion von VEGF, CXCL5 und CXCL7 nach einer Thrombozytenaktivierung mit MV3 Zellen in fibrinfreiem Plasma

Obwohl im Modell des ersten Projektes eine Beteiligung der Gerinnungskaskade bzw. von Thrombin an der Tumorzell-Thrombozyten-Kommunikation durch eine Quantifizierung der Thrombingenerierung ausgeschlossen wurde, bestand weiterhin eine gewisse Unklarheit resultierend aus den starken inhibitorischen Effekten von Rivaroxaban. Es wurde eigentlich erwartet, dass sowohl Fondaparinux, als auch Rivaroxaban in dem recalcifizierten TRPu-Modell keine Effekte besitzen würden.

Dementsprechend wurde im zweiten Projekt eine Quantifizierung durchgeführt, die den Anteil der Gerinnungskaskade an einer Thrombozytenaktivierung und den von einem Kontakt zu Tumorzellen durch die Messung der Granulasekretion bestimmen sollte.

Hierzu wurde die thrombozytäre Sekretion von VEGF und der beiden Chemokine CXCL5 und -7 untersucht. Die beiden Chemokine sind in der α -Granula gespeichert und an der Etablierung von frühen prämetastatischen Nischen beteiligt (31).

Um in diesen Versuchen die adhäsiven und parakrinen Wechselwirkungen, welche aus dem Kontakt resultieren, klar von Effekten der Blutgerinnung zu trennen wurden verschiedene Plasmen eingesetzt. Zur isolierten Quantifizierung der adhäsiven und parakrinen Wechselwirkungen, wurde Citratplasma eingesetzt, das nicht recalcifiziert wurde. Die Anwesenheit von Calcium ist eine notwendige Voraussetzung für die Aktivität der Gerinnungskaskade (62). Die Messung des Einflusses der Gerinnungskaskade wurde unter Verwendung von fibrinfreiem recalcifiziertem Plasma durchgeführt. Dieses wurde analog den Ausführungen in Abschnitt 4.18 hergestellt.

Die Thrombozyten wurden mit MV3 Zellen aktiviert, diese Tumorzelllinie weist eine TF-Präsentation auf und kann somit die Gerinnungskaskade bzw. eine Thrombingenerierung induzieren (378). In den folgenden Versuchen wurden die inhibitorischen Kapazitäten von UFH und Fondaparinux evaluiert. Beide wurden in den experimentellen Standardkonzentrationen eingesetzt.

Die Prüfung der korrekten Funktionalität der verschiedenen Plasmen erfolgte durch einen Thrombingenerierungsassay. Es konnte bestätigt werden, dass eine Thrombingenerierung im recalcifiziertem fibrinfreiem Plasma induzierbar war und im calciumfreien Plasma nicht. Weiterhin wurde demonstriert, dass eine Zugabe von MV3 Zellen keine

5. Ergebnisse und Diskussion

Thrombingenerierung im calciumfreien Plasma auslöste (Abbildung 61). Somit konnte eine Beteiligung von Thrombin an der Einleitung einer Granulasekretion durch MV3 Zellen im calciumfreien Plasma in den folgenden Quantifizierungen ausgeschlossen werden.

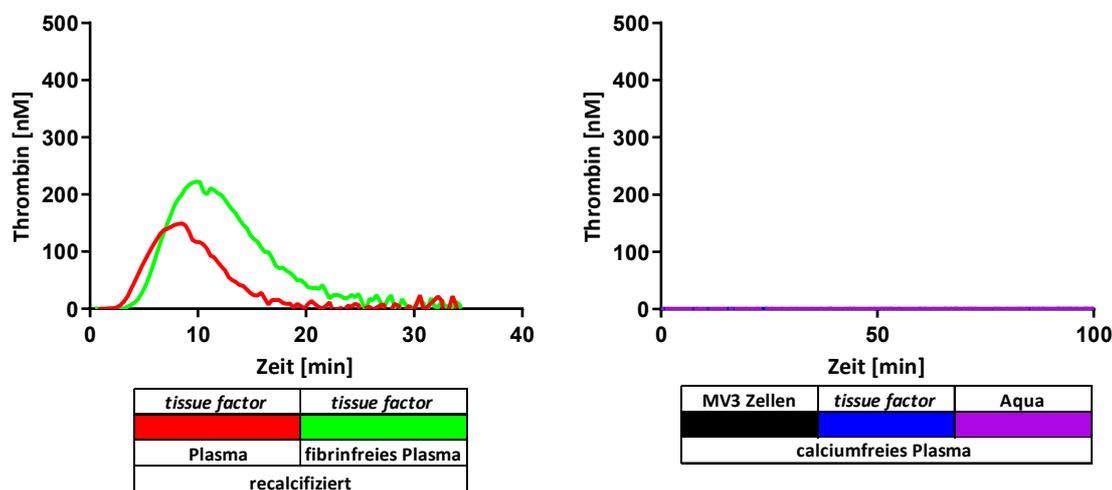


Abbildung 61: Vergleich der Thrombingenerierung in recalcifiziertem Plasma, in calciumfreiem Plasma und in recalcifiziertem fibrinfreiem Plasma nach einer TF-Zugabe. Zusätzliche Prüfung der Thrombinbildung induziert durch MV3 Zellen in calciumfreiem Plasma. Es handelt sich um repräsentative Graphen einer Messung (n=3).

Dementsprechend erfolgte die Prüfung der VEGF-Freisetzung in calciumfreiem Plasma. Diese Quantifizierung sollte beweisen, dass nur durch den Kontakt von MV3 Zellen zu Thrombozyten also adhäsive und parakrine Wechselwirkungen eine Thrombozytenaktivierung bzw. eine VEGF-Sekretion induziert werden konnte. Hierzu wurde zuerst der VEGF-Gehalt der unbehandelten Tumorzellen, der unbehandelten Thrombozyten und des calciumfreien Plasmas verglichen. Die unbehandelten Tumorzellen erreichten VEGF-Werte von 268,2 ng/mL, die unbehandelten Thrombozyten Werte von 248,5 ng/mL und das calciumfreie Plasma Werte von 199,1 ng/mL (Abbildung 62). Die Messung zeigte, dass das calciumfreie Plasma in dem die Versuche durchgeführt wurden bereits einen VEGF-Grundwert von 199,1 ng/mL aufwies. Dementsprechend war die intrinsische VEGF-Freisetzung von MV3 Zellen und Thrombozyten als geringer zu bewerten.

Aus der Kombination von Tumorzellen und Thrombozyten resultierte eine VEGF-Sekretion von 847,5 ng/mL und unterschied sich somit hoch signifikant von der durch Thrombozyten in calciumfreiem Plasma (Abbildung 62).

Da einerseits eine Thrombinbildung experimentell ausgeschlossen wurde und andererseits kein Calcium vorhanden war, wurde postuliert, dass MV3 Zellen nur durch einen Kontakt zu den Thrombozyten, also via adhäsive und parakrine Wechselwirkungen, eine VEGF-Sekretion

induzierten. Es soll angemerkt werden, dass MV3 Zellen möglicherweise Calcium freisetzen könnten, dieses würde aber direkt durch im Überschuss enthaltenes Citrat komplexiert werden.

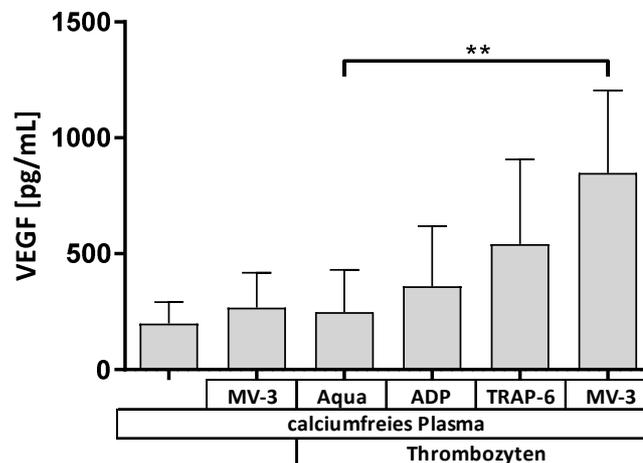


Abbildung 62: Absolute Quantifizierung der VEGF-Freisetzung in calciumfreiem Plasma von MV3 Zellen (MV3), von unbehandelten Thrombozyten (400 Mio/mL) (Aqua), von mit ADP aktivierten Thrombozyten (ADP), von mit TRAP-6 aktivierten Thrombozyten (TRAP-6) und von Thrombozyten mit MV3 Zellen aktiviert (MV3) (n=3).

Das Experiment wurde wiederholt mit einer Quantifizierung der Freisetzung der beiden Chemokine CXCL5 und CXCL7. Die Ergebnisse deuteten ebenfalls eine Freisetzung der beiden Chemokine in calciumfreiem Plasma an, die aus einem Kontakt zwischen Thrombozyten und Tumorzellen resultierte. Sowohl für CXCL5, als auch CXCL7 konnten durch eine Inkubation der Thrombozyten mit MV3 Zellen höchst signifikante Steigerungen der Freisetzungen festgestellt werden (Abbildung 63). Da jedoch keine Quantifizierung der intrinsischen Chemokinfreisetzung der MV3 Zellen durchgeführt wurde, war die Beweiskraft der Ergebnisse reduziert.

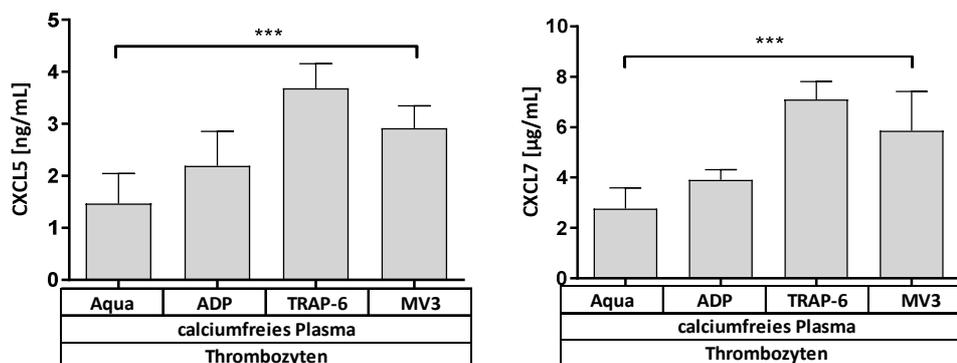


Abbildung 63: Absolute Quantifizierung der CXCL5- und CXCL7-Freisetzung in calciumfreiem Plasma von unbehandelten Thrombozyten (400 Mio/mL) (Aqua), von mit ADP aktivierten Thrombozyten (ADP), von mit TRAP-6 aktivierten Thrombozyten (TRAP-6) und von Thrombozyten mit MV3 Zellen aktiviert (MV3) (n=3).

Als nächstes wurde die Inhibition der thrombozytären Freisetzung der drei α -Granula-Mediatoren durch UFH und Fondaparinux in calciumfreien Plasma und recalcifiziertem fibrinfreien Plasma vergleichend betrachtet. Im calciumfreien Plasma konnte selektiv die Granulafreisetzung der Thrombozyten via Kontakt zu Tumorzellen unabhängig von der Gerinnung betrachtet werden. Demgegenüber wurde im fibrinfreien recalcifiziertem Plasma die Freisetzung resultierend aus einer Kombination von Kontakt- und Gerinnungseffekten quantifiziert. Demgemäß war es möglich, den Einfluss der zwei Antikoagulantien auf die beiden Mechanismen zu untersuchen.

Die Quantifizierung wurde mit der VEGF-Freisetzung begonnen. Erwartungsgemäß konnte im calciumfreien Plasma eine deutliche gerinnungsunabhängige VEGF-Sekretion detektiert werden, die hoch signifikant durch UFH reduziert wurde. Fondaparinux hatte keinen Einfluss auf diese Sekretion (Abbildung 64).

Interessanterweise tangierte eine Thrombingenerierung bzw. die aktive Gerinnungskaskade im recalcifizierten fibrinfreien Plasma die Induktion und Inhibition der VEGF-Freisetzung nur marginal. Die VEGF-Freisetzung wurde nicht gesteigert sondern blieb auf einem ähnlichen Niveau wie die nach einem Tumorzell-Kontakt. Die Effekte der Antikoagulantien änderten sich ebenfalls nicht. Die Präinkubation mit UFH resultierte auch im recalcifizierten fibrinfreien Plasma in einer signifikanten Reduktion. Fondaparinux beeinflusste die Sekretion nicht (Abbildung 64).

Die Ergebnisse deuteten an, dass eine thrombozytäre VEGF-Freisetzung, die durch einen Kontakt zu MV3 Melanomzellen induziert wird, durch Thrombin nicht weiter gesteigert werden kann. Zudem offenbarte UFH in einem calciumfreien und somit gerinnungsunabhängigen Kontext starke inhibitorische Kapazitäten hinsichtlich der durch Tumorzell-Kontakt vermittelten Thrombozytenaktivierung bzw. der thrombozytären Granulasekretion. Die inhibitorischen Effekte von UFH könnten aus der GAG-Struktur sowie der Größe dieser resultieren. Es soll angemerkt werden, dass eine Bindung von VEGF durch UFH, welche die Quantifizierung stören könnte bereits experimentell in Abschnitt 5.4.2 ausgeschlossen wurde.

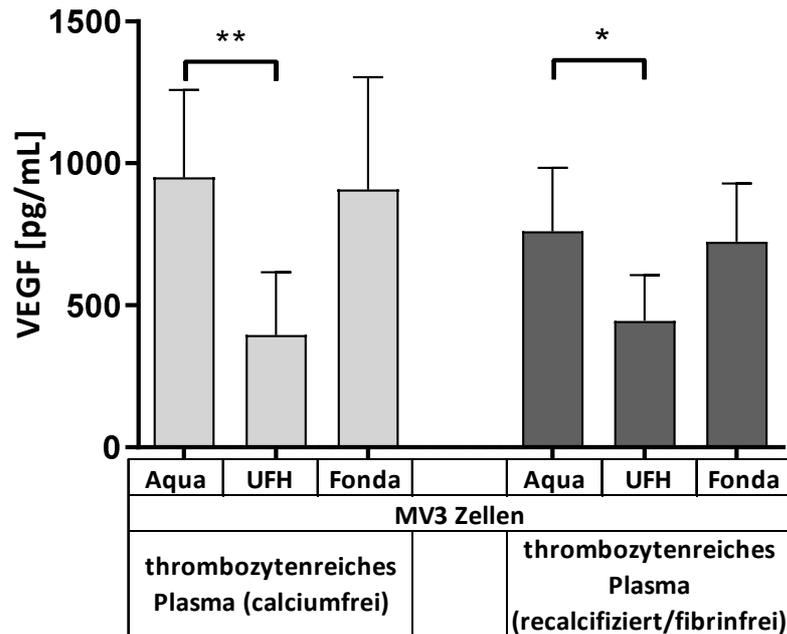


Abbildung 64: Vergleich der Inhibition der VEGF-Freisetzung in calciumfreien Plasma und recalcifiziertem fibrinfreiem Plasma von Thrombozyten (400 Mio/mL) (Aqua) aktiviert mit MV3 Zellen und von Thrombozyten aktiviert mit MV3 Zellen nach einer Präinkubation mit UFH (UFH) oder Fondaparinux (Fonda) (n=3).

Der Versuch wurde wiederholt mit einer Quantifizierung der Induktion und Inhibition der Chemokinsekretion in den beiden unterschiedlichen Plasmen. Im Vergleich zur VEGF-Freisetzung wurde durch aktives Thrombin die Freisetzung von beiden Chemokinen weiter gesteigert. Die CXCL5-Sekretion wurde im recalcifiziertem fibrinfreiem Plasma von 2,9 ng/mL auf 4,6 ng/mL gesteigert und die von CXCL7 von 5,8 µg/mL auf 7,3 µg/mL erhöht (Abbildung 65). Die durch den Tumorzell-Kontakt induzierte Freisetzung im calciumfreien Plasma wurde durch beide Antikoagulantien nicht reduziert. Jedoch wurde die CXCL5-Sekretion im recalcifiziertem fibrinfreiem Plasma, an der die Blutgerinnung beteiligt war, durch UFH höchst signifikant reduziert und die von CXCL7 hoch signifikant (Abbildung 65). UFH reduzierte die Freisetzung von CXCL5 auf 3,2 ng/mL und die CXCL7-Sekretion auf 5,6 µg/mL. Anhand der gemessenen Konzentrationen konnte man postulieren, dass UFH die Chemokinsekretion durch eine Inhibition von Thrombin vermittelte und die Chemokin-konzentrationen um den Anteil der von Thrombin bzw. einer PAR-Rezeptor-Aktivierung abhängig war reduzierte. Fondaparinux war weder zur Reduktion der Chemokinsekretion im calciumfreien Plasma, noch im recalcifiziertem fibrinfreiem Plasma befähigt (Abbildung 65).

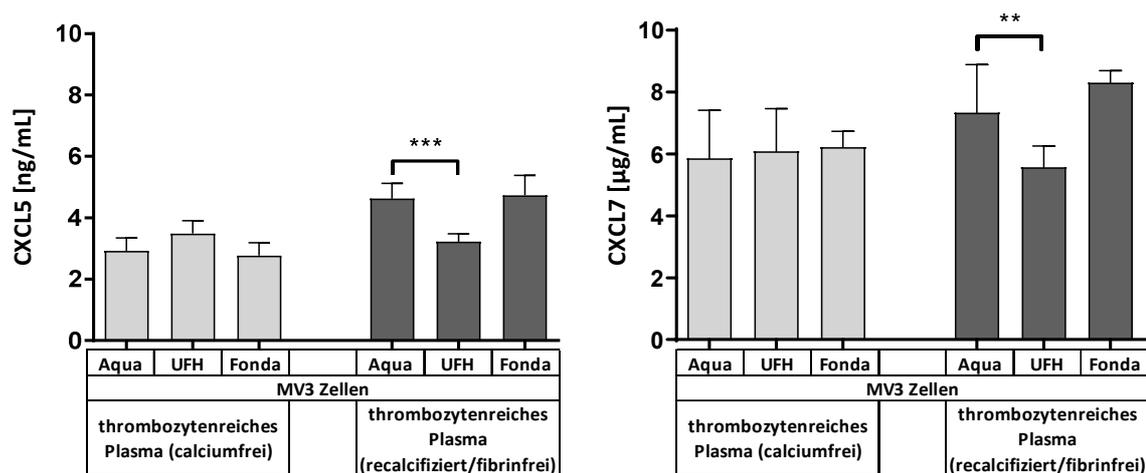


Abbildung 65: Vergleich der Inhibition der CXCL5- und CXCL7-Freisetzung in calciumfreien Plasma und recalcifiziertem fibrinfreiem Plasma von Thrombozyten (400 Mio/mL) (Aqua) aktiviert mit MV3 Zellen und von Thrombozyten aktiviert mit MV3 Zellen nach einer Präinkubation mit UFH (UFH) oder Fondaparinux (Fonda) (n=3).

5.9 Zwischenfazit Projekt 2

Es konnte demonstriert werden, dass MV3 Zellen in der Abwesenheit von Calcium gerinnungsunabhängig durch adhäsive und parakrine Wechselwirkungen die Sekretion von VEGF, CXCL5 und CXCL7 aus Thrombozyten induzieren können (Abbildung 62, 63). Weiterhin zeigte der Vergleich der Sekretionen induziert durch MV3 Zellen in calciumfreiem und in recalcifiziertem fibrinfreiem Plasma, eine unterschiedliche Regulation der Freisetzung von VEGF, CXCL5 und CXCL7 (Abbildung 64, 65). Die VEGF-Freisetzung wurde durch die Anwesenheit einer aktiven Blutgerinnungskaskade kaum beeinflusst (Abbildung 64). Demgegenüber wurde die Freisetzung der beiden Chemokine durch die Gegenwart der aktiven Gerinnungskaskade deutlich gesteigert (Abbildung 65).

Da die Aktivierung der Kaskade in einer Thrombingenerierung resultiert und Thrombin Thrombozyten via PAR-Rezeptoren aktiviert, kann postuliert werden, dass die VEGF-Freisetzung von Thrombin weniger beeinflusst wurde, wohingegen Thrombin die Sekretion der Chemokine verstärkte (61,76).

In beiden Plasmen bzw. Modellen wurde das inhibitorische Potential von UFH und Fondaparinux getestet. UFH offenbarte bezüglich VEGF in beiden Plasmen ausgeprägte Effekte und reduzierte signifikant die Freisetzung (Abbildung 64). Da die VEGF-Freisetzung durch die Gegenwart einer aktiven Gerinnungskaskade nicht tangiert wurde, kann angenommen werden, dass die Inhibition der VEGF-Freisetzung durch UFH aus Interferenzen mit parakrinen und adhäsiven Interaktionen zwischen MV3 Zellen und Thrombozyten resultierte.

Die Sekretion der beiden Chemokine offenbarte eine Sensitivität gegenüber der Anwesenheit der Gerinnungskaskade bzw. Thrombin. Sie wurde im recalcifiziertem fibrinfreien Plasma weiter gesteigert. UFH hemmte nur die Chemokinsekretion im recalcifiziertem fibrinfreien Plasma und hatte keinen Einfluss auf die Sekretion im calciumfreien Plasma. Somit kann bezüglich der Inhibition der Chemokinsekretion postuliert werden, dass UFH nur die von Thrombin abhängige Freisetzung inhibiert (Abbildung 65).

Somit entfaltete UFH im Kontext einer Tumorzell-Thrombozyten-Kommunikation unterschiedliche Wirkmechanismen, es hemmte die Thrombozytenaktivierung via Inhibition der Gerinnungskaskade und durch eine Interferenz mit adhäsiven und parakrinen Wechselwirkungen, die aus einem Kontakt mit Tumorzellen resultierten. Zudem wurde deutlich, dass die Hemmung der Sekretion durch UFH abhängig war vom Mechanismus, der diese regulierte. Denn UFH verfehlte die Inhibition der Chemokin-Freisetzung, die aus adhäsiven und parakrinen Wechselwirkungen resultierte.

Fondaparinux zeigte keine hemmenden Effekte in den Experimenten des zweiten Projektes. Vermutlich verfehlte es die Inhibition der kontaktbasierenden Aktivierung aufgrund seiner Pentasaccharid-Struktur, welche ein geringeres Potential für Interferenzen mit Proteinstrukturen als eine große GAG-Struktur aufwies. Das Ausbleiben der Inhibition der Gerinnungskaskade ist wahrscheinlich begründet in der bereits in Abschnitt 5.2.1 erläuterten Problematik, Faktor Xa im Prothrombinasekomplex adäquat zu binden und zu inhibieren (383,384).

Da in diesen Versuchen Thrombin eine zentrale Funktion in der Regulation der Chemokinfreisetzung hatte und im TRPu Modell geringste Thrombinmengen beteiligt sein könnten, wird in den nächsten Versuchen die Thrombinbildung, induziert durch Tumorzellen, betrachtet.

5.10 Einfluss von Antikoagulantien auf eine Thrombingenerierung induziert durch Tumorzellen der Linien AsPC-1, MDA-MB-231, MV3 und PC-3

Da eine Beteiligung von Thrombin am recalcifizierten TRPu-Modell erwogen wurde (Projekt 1) und es in dem vorangegangenen Versuch an der Chemokinfreisetzung (Projekt 2) maßgeblich beteiligt war, wurde in den folgenden Studien die Thrombingenerierung untersucht. Hierzu wurde das Potential zur Induktion einer Thrombingenerierung von den vier beschriebenen Tumorzelllinien quantifiziert. Zudem wurde die Inhibition dieser Generierung durch alle Testsubstanzen geprüft. So sollte die Betrachtung der Tumorzell-Thrombozyten-Kommunikation um die Ebene der Gerinnungskaskade bzw. der Thrombingenerierung erweitert werden.

Die Versuche wurden in frisch hergestelltem recalcifiziertem TRP durchgeführt. Zur Vermeidung einer Aktivierung der intrinsischen Gerinnung wurde der Faktor XIIa-Inhibitor CTI hinzugefügt. Da erwartet wurde, dass die Tumorzellen die Thrombingenerierung durch Stimulation der extrinsischen Gerinnung via TF-Präsentation einleiten, wurde diese unter Verwendung der Durchflusszytometrie quantifiziert (61). Die Fluoreszenz als der eigentliche Messwert, der von einer TF-Expression abhängt, ist durch eine rote Linie im Graph illustriert. Je weiter diese nach rechts verschoben ist, desto stärker war die Fluoreszenz und somit die TF-Präsentation. Die grüne Linie dient als Kontrolle und zeigt die Fluoreszenz einer unspezifischen Bindung des fluoreszierenden sekundären Antikörpers.

Die Graphen der Zelllinien MDA-MB-231 und AsPC-1 zeigen durch eine ausgeprägte Rechtsverschiebung der roten Linie eine deutliche TF-Präsentation an (Abbildung 66 oben), wobei MDA-MB-231 Zellen mehr TF präsentierten. Der Graph der MV3 Zellen (Abbildung 66 unten) indiziert ebenfalls eine TF-Präsentation, diese war jedoch geringer als die der Zelllinien MDA-MB-231 und AsPC-1. PC-3 Zellen erzeugten keine Rechtsverschiebung somit war anzunehmen, dass sie keinen bzw. kaum TF aufwiesen (Abbildung 66 unten). Die Ergebnisse entsprachen somit den Angaben der Literatur und ermöglichten Aussagen zum Ausmaß der TF-Präsentation der verwendeten Tumorzelllinien (378–382).

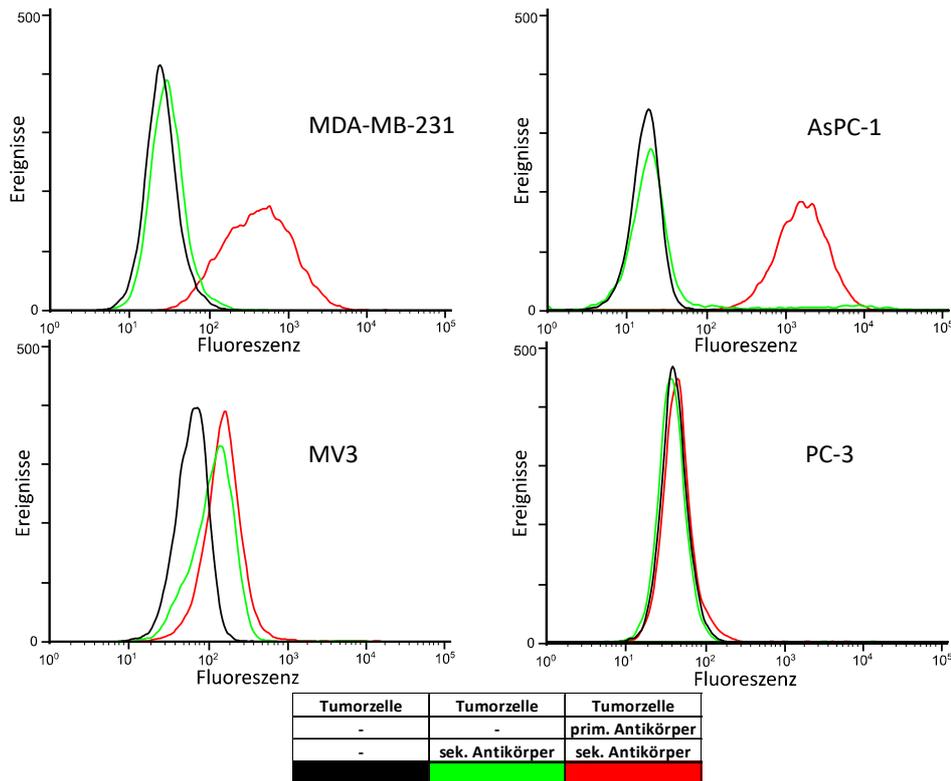


Abbildung 66: Quantifizierung der TF-Präsentation der vier verwendeten Tumorzelllinien. Es handelt sich um repräsentative Graphen einer Messung (n=3).

Im Folgenden wurde das Potential zur Induktion einer Thrombingenerierung der Tumorzellen und die Inhibition dieser durch die verwendeten Antikoagulantien untersucht. Vor den eigentlichen Messungen wurden zur Etablierung und Anwendung der Thrombingenerierung auf die verwendeten Tumorzelllinien Kontrollexperimente durchgeführt. Zuerst wurde geprüft, ob eine Thrombingenerierung in der Abwesenheit von Faktor VII möglich war. Da in Faktor VII-Mangelplasma durch keine der Tumorzelllinien eine Bildung von Thrombin eingeleitet wurde, konnte bewiesen werden, dass diese exklusiv nur durch TF bzw. die Aktivierung des extrinsischen Gerinnungssystems induziert werden konnte (Abbildung 67).

5. Ergebnisse und Diskussion

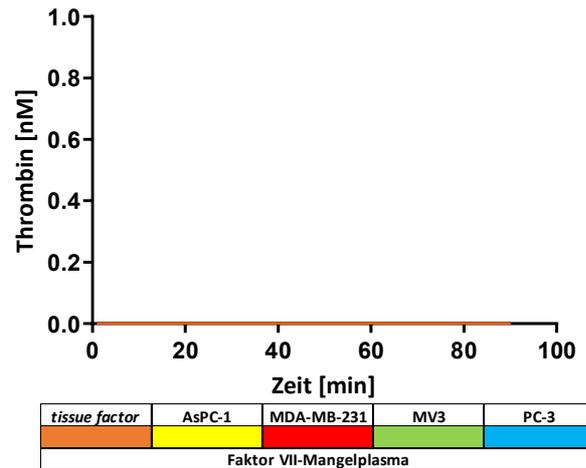


Abbildung 67: Quantifizierung der Thrombingenerierung induziert durch Tumorzellen (10.000/mL) in recalcifiziertem Faktor VII-Mangelplasma. Es handelt sich um repräsentative Graphen einer Messung (n=3).

Im nächsten Vorversuch wurde die Aktivierbarkeit der Gerinnungskaskade durch TF im recalcifizierten und mit CTI versetzten TRP geprüft und bestätigt (Abbildung 68 links).

Der dritte Versuch belegte, dass DMSO, das Lösungsmittel von Rivaroxaban, einen geringen Einfluss auf die Bildung von Thrombin hatte (Abbildung 68 rechts). Die Präinkubation des TRP mit DMSO resultierte in einer geringen Verzögerung der Thrombinbildung und einer leichten Reduktion der gebildeten Menge. Der Effekt des DMSOs auf die gebildete Gesamtmenge wurde bei der Interpretation der Rivaroxaban-Effekte berücksichtigt.

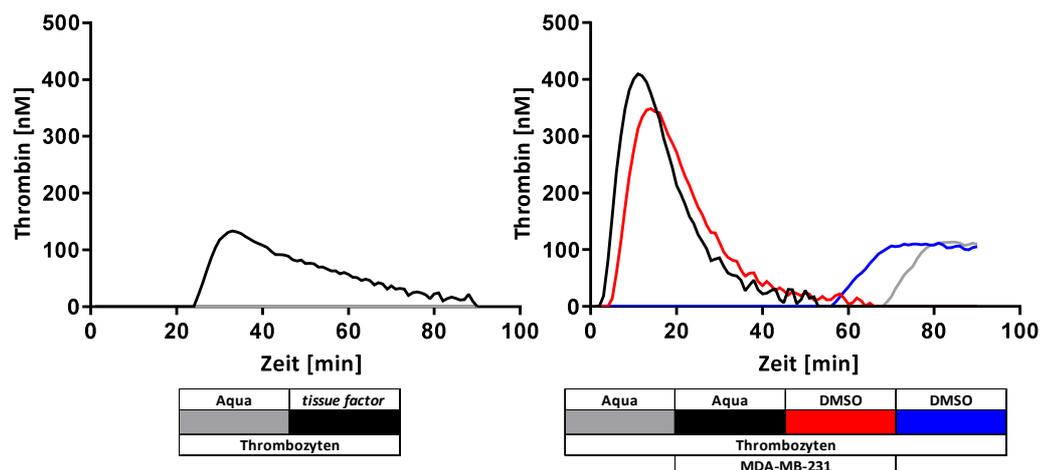


Abbildung 68: Prüfung der Aktivierbarkeit des recalcifizierten mit CTI versetzten TRPs durch eine TF-Zugabe (links). Quantifizierung der Effekte des Lösungsmittels von Rivaroxaban DMSO anhand von MDA-MB-231 Zellen (10.000/mL) (rechts). Es handelt sich um repräsentative Graphen einer Messung (n=3).

Zur Prüfung der korrekten Funktionalität der eingesetzten Antikoagulantien wurde die Thrombinbildung durch TF induziert und in An- und Abwesenheit der Antikoagulantien quantifiziert. Bis auf RO-Heparin, welches eine geringe antikoagulative Aktivität offenbarte, verhinderten alle Antikoagulantien eine Thrombingenerierung (Abbildung 69).

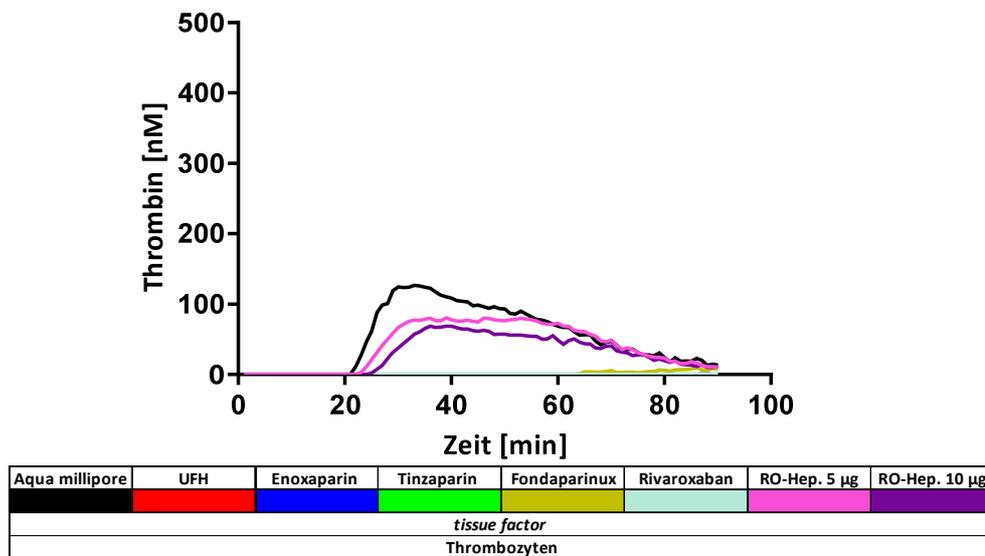


Abbildung 69: Prüfung der korrekten Funktionsweise der eingesetzten Antikoagulantien anhand einer Thrombingenerierung induziert durch eine TF-Zugabe. Es handelt sich um repräsentative Graphen einer Messung (n=3).

Unfraktioniertes Heparin (UFH), Reduziertes Oxyheparin 5µg/mL u. 10µg/mL (RO-Hep. 5µg, RO-Hep. 10µg)

Die Untersuchung der Thrombingenerierung wurde mit AsPC-1 Zellen begonnen. Die Pankreaskarzinomzellen induzierten eine deutliche Thrombingenerierung, welche die TF-Kontrollmessungen weit überstieg. Die Antikoagulantien konnten grundsätzlich, gemäß ihrer Inhibition der Thrombinbildung, in drei Gruppen unterteilt werden (Abbildung 70). Die erste Gruppe zeichnete sich durch eine geringe Hemmung aus, in ihr sind RO-Heparin und Fondaparinux zusammengefasst. Die zweite Gruppe wird durch Enoxaparin und Rivaroxaban repräsentiert. Sie reduzierten die gebildete Trombinmenge deutlich um ca. 50 %. Jedoch resultierte der Effekt von Rivaroxaban anteilig aus seinem Lösungsmittel DMSO (Abbildung 68 rechts). Weiterhin ist anzumerken, dass Rivaroxaban die Thrombinbildung verzögerte. Die dritte Gruppe fasste UFH und Tinzaparin zusammen, welche die Thrombingenerierung fast vollständig hemmten und sich somit als die beiden effizientesten Inhibitoren offenbarten. Ihre Anwendung resultierte in einer starken Reduktion der gebildeten Thrombinmenge und verzögerte die Bildung (Abbildung 70).

5. Ergebnisse und Diskussion

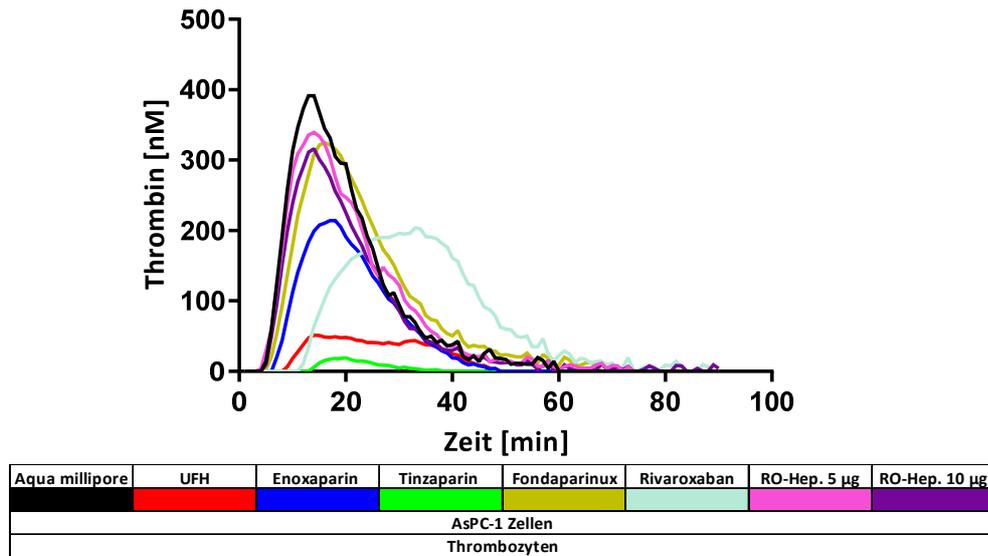


Abbildung 70: Quantifizierung der Induktion einer Thrombingenerierung in recalcifiziertem TRP durch AsPC-1 Zellen (10.000/mL) und der Inhibition dieser durch Antikoagulantien. Es handelt sich um repräsentative Graphen einer Messung (n=3). Unfraktioniertes Heparin (UFH), Reduziertes Oxyheparin 5µg/mL u. 10µg/mL (RO-Hep. 5µg, RO-Hep. 10µg)

Als nächstes werden die Ergebnisse einer Thrombinbildung induziert durch eine Zugabe von MDA-MB-231 Zellen präsentiert. Diese waren relativ ähnlich zur Thrombingenerierung induziert durch AsPC-1 Zellen. Die Einteilung der Inhibitoren konnte analog dem vorherigen Experiment in die drei entsprechenden Gruppen vorgenommen werden (Abbildung 71).

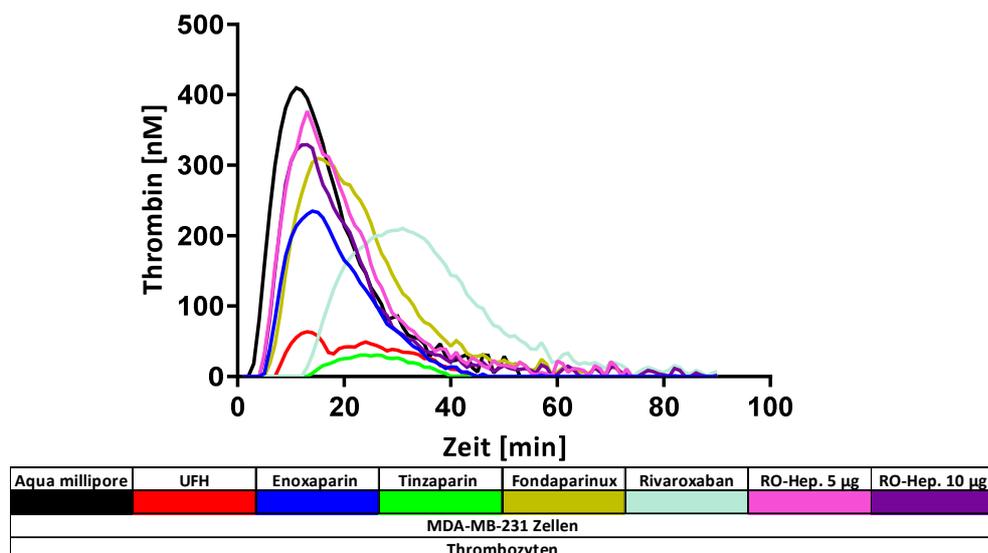


Abbildung 71: Quantifizierung der Induktion einer Thrombingenerierung in recalcifiziertem TRP durch MDA-MB-231 Zellen (10.000/mL) und der Inhibition dieser durch Antikoagulantien. Es handelt sich um repräsentative Graphen einer Messung (n=3). Unfraktioniertes Heparin (UFH), Reduziertes Oxyheparin 5µg/mL u. 10µg/mL (RO-Hep. 5µg, RO-Hep. 10µg)

Wieder resultierte die Präinkubation des TRPs mit Fondaparinux und RO-Heparin in einer geringfügigen Inhibition der Generierung. Rivaroxaban und Enoxaparin reduzierten wieder die gebildete Gesamtmenge von Thrombin um ca. 50 % und Rivaroxaban verzögerte die Bildung. Erneut waren UFH und Tinzaparin die beiden potentesten Inhibitoren.

Die Thrombingenerierung induziert durch MV3 Zellen war hinsichtlich der Thrombinmenge und Geschwindigkeit ähnlich zu der, die durch AsPC-1 und MDA-MB-231 Zellen induziert wurde, was bemerkenswert war, da MV3 Zellen eine geringere TF-Präsentation als die Zellen der Linien AsPC-1 und MDA-MB-231 aufwiesen (Abbildung 66). Die Effekte der Antikoagulantien waren ebenfalls ähnlich zu den in den beiden vorangegangenen Versuchen beobachteten und die Einteilung in die drei Gruppen konnte wieder vorgenommen werden (Abbildung 72). UFH und Tinzaparin zeigten wieder die stärksten inhibitorischen Effekte.

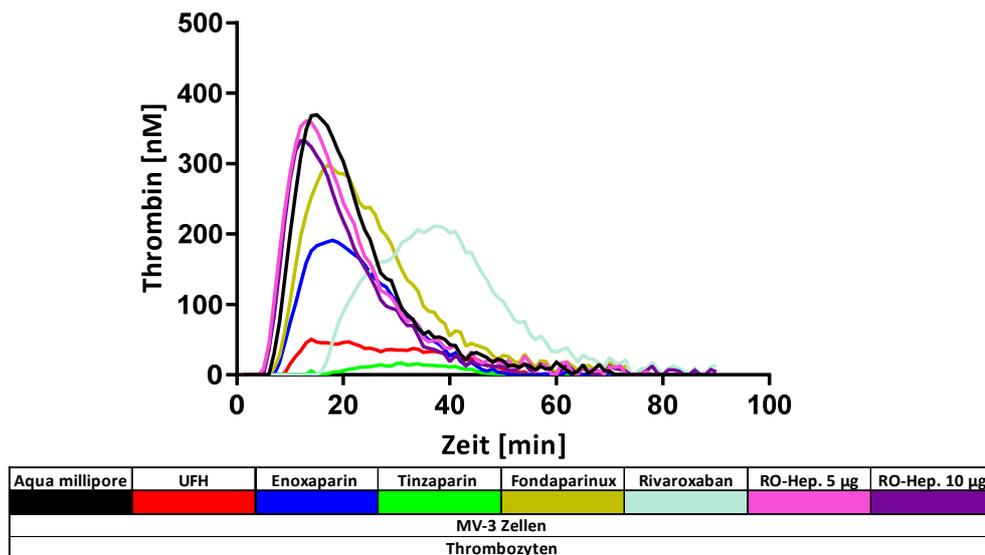


Abbildung 72: Quantifizierung der Induktion einer Thrombingenerierung in recalcifiziertem TRP durch MV3 Zellen (10.000/mL) und der Inhibition dieser durch Antikoagulantien. Es handelt sich um repräsentative Graphen einer Messung (n=3). Unfraktioniertes Heparin (UFH), Reduziertes Oxyheparin 5µg/mL u. 10µg/mL (RO-Hep. 5µg, RO-Hep. 10µg)

Abschließend erfolgte die Untersuchung der Thrombingenerierung die aus einer Zugabe von PC-3 Zellen zum recalcifiziertem TRP resultierte. Entsprechend der bewiesenermaßen sehr geringen TF-Präsentation wurde keine Thrombinbildung erwartet. Jedoch stellte sich heraus, dass diese geringe Expression ausreichte, um Thrombinwerte auf dem Niveau der TF-Kontrollen zu erreichen (Abbildung 73). Diese Thrombingenerierung wurde durch alle Antikoagulantien, außer RO-Heparin, effizient inhibiert.

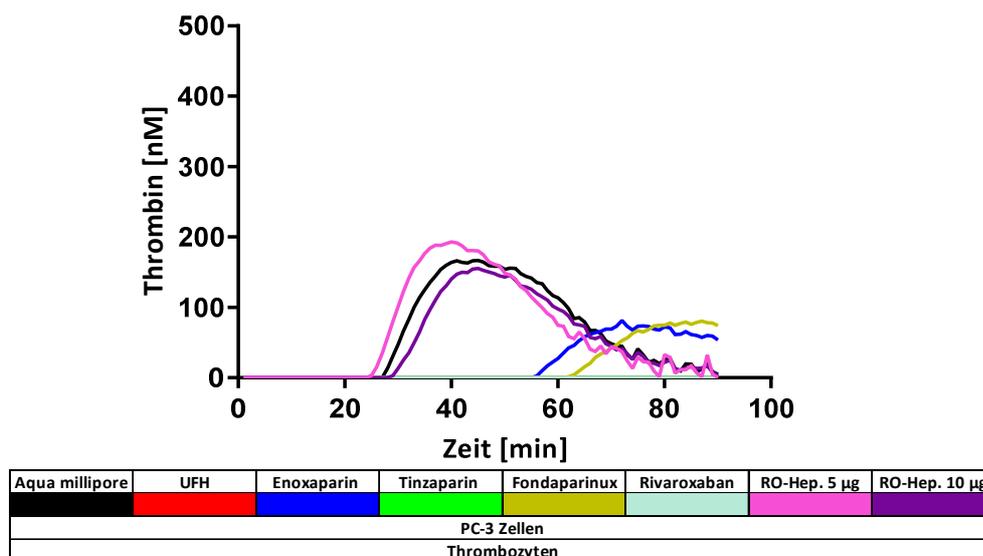


Abbildung 73: Quantifizierung der Induktion einer Thrombingenerierung in recalcifiziertem TRP durch PC-3 Zellen (10.000/mL) und der Inhibition dieser durch Antikoagulantien. Es handelt sich um repräsentative Graphen einer Messung (n=3). Unfraktioniertes Heparin (UFH), Reduziertes Oxyheparin 5µg/mL u. 10µg/mL (RO-Hep. 5µg, RO-Hep. 10µg)

5.11 Zwischenfazit Projekt 3

Durch die Untersuchung der Thrombingenerierung wurde die Betrachtung der Tumorzell-Thrombozyten-Kommunikation um die Ebene der Thrombingenerierung erweitert. Es wurde bestätigt, dass die drei Tumorzelllinien AsPC-1, MDA-MB-231 und MV3, welche bisher in jedem Modell eine Thrombozytenaktivierung induzierten, TF präsentierten (Abbildung 66). Obgleich sie alle TF in einer unterschiedlichen Quantität präsentierten, waren die Differenzen der Thrombingenerierungen gering, die Geschwindigkeiten der Thrombinbildung sowie die gebildeten Gesamtmengen waren sehr ähnlich. Zudem erzeugten alle drei Zelllinien Thrombinmengen, die die der TF-Kontrolle circa um das Dreifache übertrafen (Abbildung 69, 70, 71, 72). Dementsprechend präsentierten die Tumorzellen wahrscheinlich relativ betrachtet sehr viel TF oder verwendeten möglicherweise zusätzliche Mechanismen wie z. B. die Freisetzung von mit TF beladene Mikropartikel (381).

Darüber hinaus wurde eine geringe TF-Präsentation der PC-3 Zellen belegt (382). Diese reichte jedoch trotzdem aus, um eine Thrombingenerierung auf dem Niveau der TF-Kontrolle zu erzeugen (Abbildung 73). Da in Faktor VII-Mangelplasma kein Thrombin detektiert wurde, konnte eine intrinsische Thrombinsekretion seitens der Tumorzellen oder eine Aktivierung von Faktor X über andere Mechanismen wie z. B. das *cancer procoagulant* ausgeschlossen werden (71).

Ein Vergleich der Inhibitionen der Thrombingenerierungen induziert durch Tumorzellen mit der induziert durch TF zeigte eindrucksvoll, dass sich durch eine Tumorzellbeteiligung die inhibitorischen Wirksamkeiten der Antikoagulantien deutlich änderten. Im TF-Kontrollversuch (Abbildung 69) verhinderten alle Antikoagulantien außer RO-Heparin vollständig eine Thrombinbildung. Dieser Effekt änderte sich deutlich durch eine Zugabe von AsPC-1, MDA-MB-231 sowie MV3 Zellen (Abbildung 70, 71, 72,) und führte zu einer Abschwächung der inhibitorischen Wirksamkeiten der Antikoagulantien. Das Ausmaß der Effekt-Einbußen variierte zwischen den Substanzen. Fondaparinux verlor fast vollständig sein inhibitorisches Potential. Demgegenüber wurden die Effekte von Enoxaparin und Rivaroxaban um ca. 50 % reduziert. Zudem resultierte die Inhibition der Thrombingenerierung durch Rivaroxaban anteilig aus seinem Lösungsmittel DMSO (Abbildung 68 rechts). Nur UFH und Tinzaparin vermittelten weiterhin auch in Tumorzellgegenwart adäquate Inhibitionen der Thrombingenerierung. Eine ähnliche Beeinflussung der Thrombinbildung durch Tumorzellen wurde von Rousseau et al. beobachtet (408)

Der Verlust der Inhibitionen könnte aus einer intensiven, effizienten und schnellen Faktor X-Aktivierung mit Prothrombinasekomplexbildung durch Tumorzellen resultieren. Ebenso wäre eine Faktor VII-Aktivierung über alternative und synergistische Mechanismen durch die Tumorzellen denkbar. Durch eine schnelle Entstehung des Prothrombinasekomplexes könnte Fondaparinux seine Wirksamkeit verloren haben, da es nicht in der Lage ist Faktor Xa im Prothrominasekomplex zu binden und zu inhibieren (383,384). Die Problematik der Faktor Xa-Abschirmung könnte auch Enoxaparin betroffen haben (383). Da es aber zusätzlich zur Faktor Xa Hemmung auch Faktor IIa inhibierte, waren die Einbußen des Effektes geringer. Das Verhältnis der Anti-Faktor Xa-Aktivität zur Anti-Faktor IIa-Aktivität beträgt 4,3 für Enoxaparin, somit hemmt es Faktor Xa mit einer stärkeren Affinität (259).

Als kompetitiver Faktor Xa-Inhibitor ist Rivaroxaban in seiner Wirksamkeit gegenüber hohen Agonist Konzentrationen empfindlich (409). Möglicherweise entstand aus der Tumorzellzugabe eine so hohe Faktor VIIa-Konzentration, dass Rivaroxaban nicht mehr zu einer vollständigen kompetitiven Inhibition von Faktor Xa befähigt war. Zusätzlich soll erwähnt werden, dass, im Gegensatz zu Fondaparinux, die Wirksamkeit von Rivaroxaban nicht durch die Anwesenheit des Prothrombinasekomplexes tangiert wird (272,386,387).

Faktor Xa offenbarte sich also im Kontext einer Thrombingenerierung induziert durch Tumorzellen als eher ungünstige Zielstruktur, eine Inhibition hatte geringeren Einfluss auf die Thrombingenerierung.

Gegenüber Rivaroxaban zeichneten sich UFH und Tinzaparin durch eine starke Hemmung der Thrombingenerierung in Tumorzellgegenwart aus. Da eine selektive Faktor Xa Inhibition geringeren Einfluss hatte und das RO-Heparin mit seiner GAG-Struktur keinen Effekt zeigte, könnte die Inhibition der Thrombingenerierung aus der Thrombinhemmung, die beide Substanzen vermitteln, resultieren. Das Verhältnis der Anti-Faktor Xa-Aktivität zur Anti-Faktor IIa-Aktivität von Tinzaparin liegt bei 1,5-2,5 und das von UFH beträgt 1 (261,374). Somit inhibieren beide Substanzen effizient via Antithrombin III Thrombin. Darüber hinaus besitzen beide Substanzen eine stärkere Anti-Faktor IIa-Aktivität als Enoxaparin, was ihre Überlegenheit in der Thrombingenerierung erklären würde. Sie waren dazu befähigt via Antithrombin III direkt die Thrombinaktivität zu reduzieren, woraus eine Inhibition der enzymatischen Umsetzung des artifiziellen Thrombinsubstrates resultierte. Möglicherweise reduzierten UFH und Tinzaparin also nicht die tatsächliche gebildete Thrombinmenge. Darüber hinaus war es bemerkenswert, dass Tinzaparin scheinbar UFH überlegen war in der Hemmung der Thrombingenerierung, obwohl UFH die größere Anti-Faktor IIa-Aktivität besitzt (Abbildung 70, 71, 72 jeweils grüne vs. rote Kurve). Eine Ursache für diesen Unterschied konnte aus den Versuchen nicht abgeleitet werden.

Zur effektiven Inhibition der, durch Tumorzellen induzierten Thrombingenerierung, war also die alleinige Hemmung des zentralen Faktors Xa nicht ausreichend, eine unmittelbare Inhibition von Thrombin war erforderlich.

6. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Forschungsarbeit war die Erweiterung des Verständnisses der Interaktionen zwischen Thrombozyten und Tumorzellen während einer hämatogenen Metastasierung sowie die Evaluation der Inhibition dieser durch Antikoagulantien. Der Beginn dieser Interaktionen wird durch die Thrombozytenaktivierung repräsentiert. Diese kann durch Thrombin aus der Blutgerinnungskaskade und durch den Kontakt zu Tumorzellen bzw. adhäsive und parakrine Wechselwirkungen erfolgen. Dementsprechend wurde versucht diese Mechanismen experimentell voneinander abzugrenzen, um so eine bessere Charakterisierung der Inhibition durch Antikoagulantien zu erreichen.

Das erste Projekt basierte auf einem Modell aus recalcifiziertem TRPu, es sollte die Tumorzell-Thrombozyten-Kommunikation vor einem gerinnungsdefizienten Hintergrund abbilden. Jedoch war es aufgrund eines Unterschiedes in den Wirksamkeiten der beiden Faktor Xa-Inhibitoren fraglich, ob durch die Entfernung des Plasmas tatsächlich ein gerinnungsfaktorfreies Modell erzeugt wurde. Dieser Unterschied manifestierte sich darin, dass Fondaparinux in allen Versuchen viel schwächere inhibitorische Kapazitäten zeigte als Rivaroxaban. Daraus resultierte die Frage, warum ein Faktor Xa-Inhibitor im recalcifiziertem TRPu-Modell gute inhibitorische Effekte zeigte und ein anderer nicht (264,272). Entweder war also trotz der Entfernung des Plasmas Faktor Xa an der Thrombozytenaktivierung im Modell beteiligt und konnte nur durch Fondaparinux nicht inhibiert werden, oder Rivaroxaban besaß eine bisher unbekannte Wirkung.

Eine Erklärung der unterschiedlichen Wirksamkeiten bot die Annahme, dass trotz der Entfernung des Plasmas Faktor Xa an der Thrombozytenaktivierung beteiligt war und dieser nur durch Rivaroxaban gehemmt werden konnte.

Von Bruffato et al. und Rezaie et al. wurde eine Abschirmung von Faktor Xa durch den Prothrombinasekomplex gegenüber Fondaparinux beschrieben. Bruffato et al. zeigten, dass die Faktor Xa-Hemmung in Gegenwart von Phospholipidvesikeln, Prothrombin, Calciumionen und Faktor Va durch Antithrombin III im Komplex mit UFH, Enoxaparin oder Fondaparinux stark reduziert ist (383,384). Zudem war Calcium im TRPu vorhanden, das für die Funktionalität der Gerinnungsfaktoren unabdingbar ist und Rivaroxaban wird in seiner Wirksamkeit nicht beeinträchtigt durch den Prothrombinasekomplex (61,76,386,387).

Da bisher kein neuer Wirkmechanismus von Rivaroxaban bekannt ist und im Rahmen dieser Arbeit kein schlüssiger Beweis für einen solchen erbracht werden konnte, wurde

angenommen, dass im recalcifiziertem TRPu-Modell, obgleich umfassender Plasmaentfernung und dem Ausbleiben einer Detektion von Thrombin (Abbildung 35), eine aktive Gerinnungskaskade vorlag. Weiterhin wurde angenommen, dass Rivaroxaban seine Effekte via Faktor Xa-Inhibition vermittelte und Fondaparinux wirkungslos blieb, da es den mit dem Prothrombinasekomplex assoziierten Faktor Xa nicht inhibieren konnte (383).

Dementsprechend bildete das recalcifizierte TRPu-Modell sowohl die Blutgerinnung, als auch die Kombination von adhäsiven und parakrinen Mechanismen zur Thrombozytenaktivierung ab. Durch die Anwesenheit von Thrombin im Modell, wenngleich es sich um eine geringere Quantität handelte, spiegelte das recalcifizierte TRPu-Modell eher die *in vivo* Situation wider als erwartet. Tumorzellen konnten Thrombozyten somit via Thrombin aus der Gerinnungskaskade sowie unter Ausnutzung parakriner und adhäsiver Mechanismen aktivieren. In diesem Modell erzeugten die Tumorzellen der Linien AsPC-1, MDA-MB-231 und MV3 eine starke Thrombozytenaktivierung, woraus eine TCIPA sowie die Sekretion der thrombozytären dichten- und α -Granula resultierten. Das prometastatische Potential dieser Aktivierung wurde durch die Quantifizierung der Induktion einer Angiogenese und einer EMT bestätigt.

UFH und die beiden LMWHs sowie Rivaroxaban offenbarten umfassende inhibitorische Effekte. Sie beeinträchtigten signifikant die Interaktionen zwischen Tumorzellen und Thrombozyten bzw. die Thrombozytenaktivierung, was sich in einer Reduktion der TCIPA und der Granulasekretion manifestierte. Hervorzuheben ist, dass sich UFH und die LMWHs als hochpotente Inhibitoren der TCIPA erwiesen und auch nach einer Halbierung ihrer Konzentration eine exzellente Hemmung zeigten. Wohingegen sich der Effekt von Rivaroxaban auf die TCIPA durch eine Halbierung seiner Konzentration deutlich verschlechterte (Abbildung 34).

Weiterhin erfolgte ein Vergleich von UFH und Enoxaparin hinsichtlich der Inhibition einer EMT-Induktion durch Thrombozyten in Tumorzellen. Es konnte auf mRNA-, Protein- und funktioneller Ebene demonstriert werden, dass durch eine Behandlung der Thrombozyten mit UFH eine EMT-Induktion in AsPC-1 Zellen inhibiert bzw. abgeschwächt werden konnte (Abbildung 55, 57, 59). Als Mechanismus der Inhibition wurde eine Reduktion der thrombozytären Granulasekretion, insbesondere der TGF- β 1-Sekretion (Abbildung 47 oben), und eine Beeinträchtigung der Aggregatbildung (Abbildung 30) ausgemacht (190). Somit wäre, UFH dazu befähigt, sofern eine Übertragbarkeit auf die *in vivo* Situation möglich ist,

einer metastasierenden Tumorzelle EMT-induzierende Signale im Blut zu entziehen und indirekt Einfluss auf die Malignität der disseminierenden Tumorzellen zu nehmen.

Anhand der EMT-Induktion und der Quantifizierung der Angiogenese wurde gezeigt, dass sich eine Inhibition der Thrombozytenaktivierung und der folgenden Granulasekretion in einer Abschwächung funktioneller Konsequenzen widerspiegeln kann. Somit sind wahrscheinlich auch resultierende Prozesse wie die Änderung der Endothelpermeabilität im Zuge einer Extravasation durch ATP und VEGF betroffen sowie die Immunsuppression von NK-Zellen durch eine TGF- β 1-Freisetzung (16,64,231). Die inhibitorischen Effekte der Antikoagulantien wurden in diesem Modell bzw. im ersten Projekt wahrscheinlich durch eine Hemmung der Thrombinbildung sowie adhäsiver und parakriner Mechanismen vermittelt.

Vor dem Hintergrund der Beteiligung von Thrombin in diesem Modell sind die Effekte des RO-Heparins, welches kaum antikoagulativ wirkte, in Bezug auf die Freisetzung der dichten-Granula bemerkenswert. Es hemmte in beiden Konzentrationen hoch bzw. höchst signifikant die ATP-Freisetzung aus der dichten Granula (Abbildung 36, 37, 38). Dieses Ergebnis gab Grund zu der Annahme, dass diese Sekretion in hohem Maße sensitiv gegenüber einer Inhibition durch eine Interferenz der GAG-Struktur mit Oberflächenstrukturen wie z. B. P-Selektin ist. Weiterhin offenbarte sich eine selektive und signifikante Reduktion der VEGF-Sekretion durch RO-Heparin (Abbildung 49, 50 oben). Da die TCIPA nicht inhibiert wurde durch RO-Heparin (Abbildung 30, 31, 32) bei gleichzeitiger Hemmung der Sekretion der dichten-Granula, wurde gezeigt, dass thrombozytäre Aggregation und Sekretion als zwei getrennte Prozesse betrachtet werden können.

Im ersten Projekt erfolgte eine Betrachtung der Thrombozytenaktivierung durch Tumorzellen via adhäsive und parakrine Mechanismen sowie Thrombin aus der aktiven Gerinnungskaskade. Zur weiteren Differenzierung der Mechanismen über die Tumorzellen Thrombozyten aktivieren und der Inhibition dieser durch Antikoagulantien wurden zwei weitere Projekte durchgeführt.

Anhand des RO-Heparins und der Inhibition der ATP- und VEGF-Freisetzung zeigte sich ein gerinnungsunabhängiger Einfluss auf die Sekretion durch die GAG-Struktur. Deshalb wurde im zweiten Projekt durch die Verwendung von calciumfreiem TRP ein adäquates Modell zur Betrachtung von adhäsiven und parakrinen Effekten generiert. In diesem Modell konnte bei vollständiger Inaktivität der Gerinnungskaskade eine thrombozytäre VEGF-Sekretion durch die Zugabe von MV3 Zellen erzeugt werden (Abbildung 62). Weiterhin erbrachte ein

Vergleich der VEGF-Sekretion in calciumfreien TRP (inaktive Gerinnungskaskade) mit der in recalcifiziertem fibrinfreiem TRP (aktive Gerinnungskaskade) den Nachweis, dass die VEGF-Sekretion gegenüber Thrombin wenig bis keine Sensitivität besitzt (Abbildung 64). Durch aktives Thrombin wurde keine Steigerung der VEGF-Freisetzung erreicht. Die thrombozytäre Sekretion der Chemokine CXCL5 und -7 konnte ebenfalls durch eine Zugabe von MV3 Zellen zu calciumfreien TRP eingeleitet werden (Abbildung 63). Jedoch verhielt sich ihre Freisetzung grundlegend anders als die von VEGF, denn sie war gegenüber Thrombin sensitiv und wurde durch das aktive Enzym gesteigert (Abbildung 65).

UFH war dazu befähigt die VEGF-Sekretion, welche aus der Zugabe von MV3 Zellen und den folgenden adhäsiven und parakrinen Effekten im calciumfreien TRP resultierte, signifikant zu inhibieren. Die Inhibition blieb auch in Gegenwart von Thrombin erhalten (Abbildung 64). Wohingegen sich die Inhibition der Chemokinfreisetzung anders darstellte. UFH verfehlte die Hemmung der Sekretion induziert durch adhäsive und parakrine Effekte im calciumfreien Plasma. Es inhibierte allerdings die thrombinabhängige Chemokinfreisetzung und reduzierte die Chemokinwerte um den von Thrombin abhängigen Anteil (Abbildung 65). Diese Ergebnisse demonstrierten die Existenz von unterschiedlichen α -Granula in Thrombozyten, die unterschiedlich beladen sind und in ihrer Freisetzung unterschiedlich reguliert werden.

Eine mögliche Zielstruktur von UFH bzw. der GAG-Struktur zur Hemmung der parakrinen und adhäsiven Wechselwirkungen zwischen Thrombozyten und Tumorzellen, aus denen die VEGF-Sekretion resultierte, ist der thrombozytäre Adhäsionsrezeptor P-Selektin. Die GAG-Struktur der Heparine kann die Struktur von Selektinliganden imitieren und Selektine binden. Stevenson et al. zeigten in Tierversuchen, dass Tinzaparin und UFH aber nicht Fondaparinux die Metastasierung von Melanomzellen in Mäusen reduzierten (301). Sie konnten den inhibitorischen Effekt von UFH und Tinzaparin in P- und L-Selektin defizienten Mäusen reproduzieren und demonstrierten zudem, dass Heparine in diesen selektindefizienten Mäusen ihren inhibitorischen Effekt auf die Metastasierung verloren (278).

In der VEGF-Quantifizierung im zweiten Projekt konnte ähnlich wie bei Stevenson et al. eine starke Inhibition durch UFH und eine Wirkungslosigkeit von Fondaparinux demonstriert werden. Diese hat laut Stevenson et al. ihre Ursache in der Größe der Moleküle. Sie postulierten, dass die großen Glykosaminoglykane des Heparins effizient beide Bindungsstellen des P-Selektins blockieren und aufgrund ihrer Größe viele benachbarte

P-Selektine zusammen inhibieren können. Demgegenüber kann das kleine Pentasaccharid Fondaparinux lediglich eine Bindungsstelle des P-Selektins blockieren. Durch die Inhibition von P-Selektin wird die Kontaktaufnahme zwischen Thrombozyten und Tumorzellen gestört (278). Ob die Hemmung von P-Selektin für die Inhibition der VEGF-Sekretion durch UFH verantwortlich war, blieb fraglich, jedoch bot diese Annahme eine gute Erklärung für die beobachteten Effekte von UFH und Fondaparinux im zweiten Projekt.

Abschließend soll zum zweiten Projekt erwähnt werden, dass sich die geringere Sensitivität der VEGF-Sekretion gegenüber Thrombin ansatzweise auch bei der Quantifizierung der α -Granulasekretion im ersten Projekt offenbarte. VEGF war der einzige Mediator aus der α -Granula, dessen Freisetzung durch RO-Heparin signifikant gehemmt werden konnte und auf dessen Freisetzung Rivaroxaban deutlich weniger Einfluss hatte (Abbildung 49, 50 oben). Man kann somit postulieren, dass zur vollständigen Hemmung der Thrombozytenaktivierung durch Tumorzellen eine alleinige Inhibition der Blutgerinnungskaskade nicht ausreicht. Bei einer Inhibition der Gerinnungskaskade könnte durch den Kontakt zu Tumorzellen z. B. weiterhin VEGF freigesetzt werden.

Das dritte Projekt beleuchtete selektiv die durch Tumorzellen induzierte Thrombingenerierung in frischem recalcifiziertem TRP. Das Modell bildete bezüglich der Thrombingenerierung durch den physiologischen Plasma Anteil die *in vivo* Situation weitaus besser ab, als das erste Projekt. Die Tumorzelllinien AsPC-1, MDA-MB-231 und MV3 induzierten aufgrund einer TF-Präsentation via Faktor VII eine starke Thrombingenerierung, welche die durch die TF Kontrollen induzierte weit überstieg.

Zudem änderten sich die inhibitorischen Kapazitäten der Antikoagulantien durch die Anwesenheit der Tumorzellen. Eine Faktor Xa-Inhibition war in der Gegenwart von Tumorzellen nicht mehr ausreichend, um die Entstehung von Thrombin effizient zu blockieren (Abbildung 69, 70). Die Inhibition der Thrombingenerierung durch Rivaroxaban manifestierte sich in einer Reduktion der gebildeten Thrombinmenge um ca. 50 %, wobei dieser Effekt zu einem geringen Anteil vom Lösungsmittel DMSO vermittelt wurde. Enoxaparin zeigte ähnliche inhibitorische Effekte wie Rivaroxaban. Die Präinkubation der Thrombozyten mit Fondaparinux und RO-Heparin resultierte nur in einer geringfügigen Hemmung der durch Tumorzellen induzierten Thrombingenerierung.

Nur UFH und Tinzaparin, die beide via Antithrombin III direkt Thrombin hemmten, vermochten eine deutliche Inhibition der Thrombingenerierung induziert durch Tumorzellen

herbeizuführen. Sie inhibierten wahrscheinlich eher aktives Thrombin, als seine Entstehung aus Prothrombin durch eine Faktor Xa-Hemmung zu blockieren. Durch die hocheffiziente Thrombinhemmung ist anzunehmen, dass UFH und Tinzaparin prometastatische Effekte die von Thrombin abhängen, wie z. B. eine Thrombozytenaktivierung, konsequent abschwächen und hemmen können.

Die Ergebnisse der drei Projekte belegen, dass Thrombininhibitoren mit einer großen GAG-Struktur wie UFH wahrscheinlich das günstigste Wirkprofil hinsichtlich einer Interferenz mit der Tumorzell-Thrombozyten-Kommunikation während einer hämatogenen Metastasierung besitzen. Zur vollständigen Inhibition dieser Kommunikation muss die Thrombozytenaktivierung durch Thrombin aus der Gerinnungskaskade und die durch adhäsive sowie parakrine Mechanismen der Tumorzellen gehemmt werden. Es konnte gezeigt werden, dass UFH zu einer umfassenden Inhibition dieser Mechanismen befähigt ist (Projekt 2, 3). Weiterhin konnte anhand der Inhibition der EMT-Induktion demonstriert werden, dass UFH auch tatsächlich komplexe prometastatische Prozesse, die aus der Thrombozytenaktivierung resultieren, inhibieren kann (Projekt 1).

Tinzaparin offenbarte sich ebenfalls als exzellenter Inhibitor der Thrombingenerierung im dritten Projekt sowie der Granulasekretion und TCIPA im ersten Projekt. Es besitzt also ähnliche inhibitorische Kapazitäten wie UFH.

Sofern diese Erkenntnisse auf die *in vivo* Situation übertragen werden können, ist anzunehmen, dass onkologische Patienten von einer antikoagulativen Therapie mit UFH und Tinzaparin profitieren können. Beide Substanzen würden mit der hämatogenen Metastasierung interferieren und die Ausbreitung der Tumorzellen im Organismus beeinträchtigen. Je nach Progression der malignen Erkrankung könnten die beiden Substanzen durch eine Hemmung der Metastasierung den Krankheitsverlauf günstig beeinflussen. In frühen Stadien der Erkrankung vor einer Metastasenbildung wäre der Effekt vermutlich größer, als in späteren.

Zusätzlich wurde deutlich, dass Faktor Xa-Inhibitoren eher ungeeignet sein könnten, um mit der Tumorzell-Thrombozyten-Kommunikation zu interferieren. Am Beispiel von Rivaroxaban und Fondaparinux wurde demonstriert, dass sie nicht die notwendige Wirksamkeit für eine effektive Thrombinhemmung sowie das Potential zur Interferenz mit adhäsiven und parakrinen Mechanismen besitzen, durch die Thrombozyten von Tumorzellen aktiviert werden können.

Ein positiver Effekt von Heparinen auf die Mortalität von Tumorpatienten konnte bisher nicht eindeutig in einer klinischen Studie bewiesen werden. Eine Metaanalyse der Cochrane Gesellschaft aus dem Jahr 2017 kam zu dem Ergebnis, dass Heparine keinen Einfluss auf die Sterblichkeit von Tumorpatienten haben (313). Jedoch zeigten drei andere Studien, dass Heparine möglicherweise nur die Mortalität von Patienten mit einer guten Prognose reduzieren können oder wenn sie in einem frühen Krankheitsstadium gegeben werden (314–316).

Eindrucksvoll demonstrierte eine Studie von Kakkar et al. die Effekte einer solchen Anwendung von Heparinen. In dieser Studie konnte durch eine a priori nicht definierte Subgruppenanalyse von Patienten mit einer guten klinischen Prognose bzw. einer Gesamtüberlebenszeit von mindestens 17 Monaten, eine deutliche Reduktion der Mortalität durch das niedermolekulare Heparin Dalteparin gezeigt werden. In dieser Subgruppe lag die mittlere Überlebenszeit der Verumgruppe (n=55) bei 43,5 Monaten und in der Placebogruppe (n=47) bei 24,3 Monaten (316).

7. Literaturverzeichnis

1. Sporn MB. The war on cancer. *Lancet Lond Engl.* 18. Mai 1996;347(9012):1377–81.
2. Hargadon KM, Johnson CE, Williams CJ. Immune checkpoint blockade therapy for cancer: An overview of FDA-approved immune checkpoint inhibitors. *Int Immunopharmacol.* September 2018;62:29–39.
3. Nakamura S, Fukui T, (Ito) Sasahara Y, Suzuki S, Takeda H, Miwa M, u. a. The Role of Cancer Boards in the Treatment Decisions Regarding Chemotherapy. *Intern Med.* 2016;55(21):3119–23.
4. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* November 2018;68(6):394–424.
5. Furrukh M. Tobacco Smoking and Lung Cancer. :14. *Sultan Qaboos Univ Med J.* 2013 Aug; 13(3): 345–358.
6. Aunan JR, Cho WC, Søreide K. The Biology of Aging and Cancer: A Brief Overview of Shared and Divergent Molecular Hallmarks. *Aging Dis.* 2017;8(5):628.
7. Seyfried TN, Huysentruyt LC. On the Origin of Cancer Metastasis. *Crit Rev Oncog.* 2013;18(1–2):43–73.
8. Wong SY, Hynes RO. Lymphatic or Hematogenous Dissemination: How Does a Metastatic Tumor Cell Decide? *Cell Cycle.* 15. April 2006;5(8):812–7.
9. Langer F. Hämostaseologische Aspekte in der Onkologie. *Onkol Welt.* 2015;06(04):158–71.
10. Wang T-F, Li A, Garcia D. Managing thrombosis in cancer patients. *Res Pract Thromb Haemost.* Juli 2018;2(3):429–38.
11. Calorini L. Environmental control of invasiveness and metastatic dissemination of tumor cells: the role of tumor cell-host cell interactions. 2010;10.
12. Gay LJ, Felding-Habermann B. Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nat Rev Cancer.* Februar 2011;11(2):123–34.
13. Ghoshal K, Bhattacharyya M. Overview of Platelet Physiology: Its Hemostatic and Nonhemostatic Role in Disease Pathogenesis. *Sci World J.* 2014;2014:1–16.
14. Labelle M, Begum S, Hynes RO. Direct Signaling between Platelets and Cancer Cells Induces an Epithelial-Mesenchymal-Like Transition and Promotes Metastasis. *Cancer Cell.* November 2011;20(5):576–90.
15. Felding-Habermann B, Habermann R, Saldívar E, Ruggeri ZM. Role of α 3 Integrins in Melanoma Cell Adhesion to Activated Platelets under Flow. *J Biol Chem.* 8. März 1996;271(10):5892–900.

16. Kopp H-G, Placke T, Salih HR. Platelet-Derived Transforming Growth Factor- Down-Regulates NKG2D Thereby Inhibiting Natural Killer Cell Antitumor Reactivity. *Cancer Res.* 1. Oktober 2009;69(19):7775–83.
17. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the „seed and soil“ hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer.* Juni 2003;3(6):453–8.
18. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites: Metastasis. *Nat Rev Cancer.* August 2002;2(8):563–72.
19. Cox TR, Gartland A, Erler JT. The pre-metastatic niche: is metastasis random? *BoneKEy Rep [Internet].* 2. Mai 2012 [zitiert 6. Februar 2019];1(5). Verfügbar unter: <http://www.portico.org/Portico/article?article=pgk2tjwcfsq>
20. Butler P, Gullino M. Quantitation of Cell Shedding into Efferent Blood of Mammary. 1975;35:6.
21. Fidler IJ, Kripke ML. Metastasis Results from Preexisting Variant Cells Within a Malignant Tumor. *Sci New Ser.* 1977;197(4306):893–5.
22. Heerboth S, Housman G, Leary M, Longacre M, Byler S, Lapinska K, u. a. EMT and tumor metastasis. *Clin Transl Med [Internet].* Dezember 2015 [zitiert 5. Januar 2019];4(1). Verfügbar unter: <http://www.clintransmed.com/content/4/1/6>
23. Son H-J, Moon A. Epithelial-mesenchymal Transition and Cell Invasion. *Toxicol Res.* 1. Dezember 2010;26(4):245–52.
24. Aiello NM, Maddipati R, Norgard RJ, Balli D, Li J, Yuan S, u. a. EMT Subtype Influences Epithelial Plasticity and Mode of Cell Migration. *Dev Cell.* Juni 2018;45(6):681-695.e4.
25. Mani SA, Guo W, Liao M-J, Eaton Eng, Ayyanan A, Zhou AY, u. a. The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. *Cell.* Mai 2008;133(4):704–15.
26. Kim Y-N, Koo KH, Sung JY, Yun U-J, Kim H. Anoikis Resistance: An Essential Prerequisite for Tumor Metastasis. *Int J Cell Biol.* 2012;2012:1–11.
27. Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res.* Februar 2009;19(2):156–72.
28. Derynck R, Goeddel DV, Ullrich A, Gutterman JU, Williams RD, Bringman TS, u. a. Synthesis of Messenger RNAs for Transforming Growth Factors α and β and the Epidermal Growth Factor Receptor by Human Tumors. :*CANCER RESEARCH* 47, 707-712, February 1, 1987
29. Bonde A-K, Tischler V, Kumar S, Soltermann A, Schwendener RA. Intratumoral macrophages contribute to epithelial-mesenchymal transition in solid tumors. *BMC Cancer [Internet].* Dezember 2012 [zitiert 6. Januar 2019];12(1). Verfügbar unter: <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-12-35>

30. Chaffer CL, Brennan JP, Slavin JL, Blick T, Thompson EW, Williams ED. Mesenchymal-to-Epithelial Transition Facilitates Bladder Cancer Metastasis: Role of Fibroblast Growth Factor Receptor-2. *Cancer Res.* 17. November 2006;66(23):11271–8.
31. Labelle M, Hynes RO. The Initial Hours of Metastasis: The Importance of Cooperative Host-Tumor Cell Interactions during Hematogenous Dissemination. *Cancer Discov.* 1. Dezember 2012;2(12):1091–9.
32. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med.* November 2013;19(11):1423–37.
33. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 19. Dezember 2002;420(6917):860–7.
34. Fidler IJ, Schroit AJ. Recognition and destruction of neoplastic cells by activated macrophages: discrimination of altered self. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer.* November 1988;948(2):151–73.
35. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 1. November 2002;23(11):549–55.
36. Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunol Rev.* April 2008;222(1):155–61.
37. Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer.* Januar 2004;4(1):71–8.
38. Deryugina EI, Quigley JP. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* März 2006;25(1):9–34.
39. De Wever O, Nguyen Q-D, Van Hoorde L, Bracke M, Bruyneel E, Gespach C, u. a. Tenascin-C and SF/HGF produced by myofibroblasts in vitro provide convergent pro-invasive signals to human colon cancer cells through RhoA and Rac. *FASEB J.* Juni 2004;18(9):1016–8.
40. Rong G, Kang H, Wang Y, Hai T, Sun H. Candidate Markers That Associate with Chemotherapy Resistance in Breast Cancer through the Study on Taxotere-Induced Damage to Tumor Microenvironment and Gene Expression Profiling of Carcinoma-Associated Fibroblasts (CAFs). St-Pierre Y, Herausgeber. *PLoS ONE.* 8. August 2013;8(8):e70960.
41. Lochter A, Galosy S, Muschler J, Freedman N, Werb Z, Bissell MJ. Matrix Metalloproteinase Stromelysin-1 Triggers a Cascade of Molecular Alterations That Leads to Stable Epithelial-to-Mesenchymal Conversion and a Premalignant Phenotype in Mammary Epithelial Cells. *J Cell Biol.* 29. Dezember 1997;139(7):1861–72.

42. Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer*. April 2009;9(4):239–52.
43. Gil-Bernabe AM, Ferjancic S, Tlalka M, Zhao L, Allen PD, Im JH, u. a. Recruitment of monocytes/macrophages by tissue factor-mediated coagulation is essential for metastatic cell survival and premetastatic niche establishment in mice. *Blood*. 29. März 2012;119(13):3164–75.
44. Qian B-Z, Li J, Zhang H, Kitamura T, Zhang J, Campion LR, u. a. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature*. 8. Juni 2011;475(7355):222–5.
45. Heinmöller E, Schropp T, Kisker O, Simon B, Seitz R, Weinel RJ. Tumor Cell-Induced Platelet Aggregation in Vitro by Human Pancreatic Cancer Cell Lines. *Scand J Gastroenterol*. Januar 1995;30(10):1008–16.
46. Chang M-C, Chan C-P, Ho Y-S, Lee J-J, Lin P-S, Lin B-R, u. a. Signaling pathways for induction of platelet aggregation by SAS tongue cancer cells - a mechanism of hematogenous metastasis: Platelets-oral cancer cells interaction. *J Oral Pathol Med*. 22. September 2008;38(5):434–40.
47. Zarà M, Canobbio I, Visconte C, Canino J, Torti M, Guidetti GF. Molecular mechanisms of platelet activation and aggregation induced by breast cancer cells. *Cell Signal*. August 2018;48:45–53.
48. Medina C. Platelet Aggregation-Induced by Caco-2 Cells: Regulation by Matrix Metalloproteinase-2 and Adenosine Diphosphate. *J Pharmacol Exp Ther*. 2. Februar 2006;317(2):739–45.
49. Lou X-L, Sun J, Gong S-Q, Yu X-F, Gong R, Deng H. Interaction between circulating cancer cells and platelets: clinical implication. *Chin J Cancer Res*. 2015;27(5):11.
50. Loof TG, Deicke C, Medina E. The role of coagulation/fibrinolysis during *Streptococcus pyogenes* infection. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 11. September 2014 [zitiert 3. Januar 2019];4. Verfügbar unter: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2014.00128/abstract>
51. Khorana AA, Ahrendt SA, Ryan CK, Francis CW, Hruban RH, Hu YC, u. a. Tissue Factor Expression, Angiogenesis, and Thrombosis in Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res*. 15. Mai 2007;13(10):2870–5.
52. Coughlin S. Protease-Activated Receptors and Platelet Function. *Thromb Haemost*. 1999;82(08):353–6.
53. Takagi S, Oh-hara T, Sato S, Gong B, Takami M, Fujita N. Expression of Aggrus/podoplanin in bladder cancer and its role in pulmonary metastasis: Aggrus/Podoplanin in Bladder Cancer. *Int J Cancer*. 1. Juni 2014;134(11):2605–14.

54. Qi C-L, Wei B, Ye J, Yang Y, Li B, Zhang Q-Q, u. a. P-Selectin-Mediated Platelet Adhesion Promotes the Metastasis of Murine Melanoma Cells. Slominski AT, Herausgeber. PLoS ONE. 14. März 2014;9(3):e91320.
55. Wahrenbrock M, Borsig L, Le D, Varki N, Varki A. Selectin-mucin interactions as a probable molecular explanation for the association of Trousseau syndrome with mucinous adenocarcinomas. J Clin Invest. 15. September 2003;112(6):853–62.
56. Haemmerle M, Bottsford-Miller J, Pradeep S, Taylor ML, Choi H-J, Hansen JM, u. a. FAK regulates platelet extravasation and tumor growth after antiangiogenic therapy withdrawal. J Clin Invest. 11. April 2016;126(5):1885–96.
57. Wang Y, Sun Y, Li D, Zhang L, Wang K, Zuo Y, u. a. Platelet P2Y12 Is Involved in Murine Pulmonary Metastasis. Kalinichenko VV, Herausgeber. PLoS ONE. 13. November 2013;8(11):e80780.
58. Bates DO. Vascular endothelial growth factors and vascular permeability. Cardiovasc Res. 15. Juli 2010;87(2):262–71.
59. Grainger DJ, Mosedale DE, Metcalfe JC. TGF- β in blood: a complex problem. Cytokine & Growth Factor Reviews Volume 11, Issues 1–2, April 2000, Pages 133-145
60. Laubli H, Spanaus K-S, Borsig L. Selectin-mediated activation of endothelial cells induces expression of CCL5 and promotes metastasis through recruitment of monocytes. Blood. 12. November 2009;114(20):4583–91.
61. Mutschler E, Schaible H-G, Vaupel P, Thews G. Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen: 140 Tabellen. 6., völlig überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges; 2007. 981 S.
62. Brummel-Ziedins KE, Orfeo T, Gissel M, Mann KG, Rosendaal FR. Factor Xa Generation by Computational Modeling: An Additional Discriminator to Thrombin Generation Evaluation. Reitsma PH, Herausgeber. PLoS ONE. 11. Januar 2012;7(1):e29178.
63. Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, u. a. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. Nature. Dezember 2005;438(7069):820–7.
64. Bates DO. Vascular endothelial growth factors and vascular permeability. Cardiovasc Res. 15. Juli 2010;87(2):262–71.
65. Previtali E, Paolo B, Al E. Risk factors for venous and arterial thrombosis. Blood Transfus. 2011;120–138.
66. Ueno T, Toi M, Koike M, Nakamura S, Tominaga T. Tissue factor expression in breast cancer tissues: its correlation with prognosis and plasma concentration. Br J Cancer. Juli 2000;83(2):164–70.
67. Fay PJ. Activation of factor VIII and mechanisms of cofactor action. Blood Rev. März 2004;18(1):1–15.

68. Geddings JE, Mackman N. Tumor-derived tissue factor–positive microparticles and venous thrombosis in cancer patients. *Blood*. 12. September 2013;122(11):1873–80.
69. Hugel B, Martínez MC, Kunzelmann C, Freyssinet J-M. Membrane Microparticles: Two Sides of the Coin. *Physiology*. Februar 2005;20(1):22–7.
70. Falanga A, Gordon SG. Isolation and characterization of cancer procoagulant: a cysteine proteinase from malignant tissue. *Biochemistry*. September 1985;24(20):5558–67.
71. Donati MB, Gambacorti-Passerini C, Casali B, Falanga A, Vannotti P, Fossati G, u. a. Cancer Procoagulant in Human Tumor Cells: Evidence from Melanoma Patients. :5. *CANCER RESEARCH* 46, 6471-6474, December 1986
72. Mielicki W, Serwa J, Kurzawinski T, Wierzbicki R. Procoagulant Activity of Human Stomach and Colon Cancers. *Oncology*. 1990;47(4):299–302.
73. Kirchhofer D, Tschopp TB, Hadvery P, Baumgartner HR. Endothelial Cells Stimulated with Tumor Necrosis Factor- α Express Varying Amounts of Tissue Factor Resulting in Inhomogenous Fibrin Deposition in a Native Blood Flow System. : *J Clin Invest*. 1994 May;93(5):2073-83.
74. Adams GN, Rosenfeldt L, Frederick M, Miller W, Waltz D, Kombrinck K, u. a. Colon Cancer Growth and Dissemination Relies upon Thrombin, Stromal PAR-1, and Fibrinogen. *Cancer Res*. 1. Oktober 2015;75(19):4235–43.
75. Queiroz KCS, Shi K, Duitman J, Aberson HL, Wilmink JW, van Noesel CJM, u. a. Protease-activated receptor-1 drives pancreatic cancer progression and chemoresistance: PAR-1 drives pancreatic cancer progression. *Int J Cancer*. 15. November 2014;135(10):2294–304.
76. Stalker TJ, Newman DK, Ma P, Wannemacher KM, Brass LF. Platelet Signaling. In: Gresele P, Born GVR, Patrono C, Page CP, Herausgeber. *Antiplatelet Agents* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2012 [zitiert 16. Januar 2019]. S. 59–85. Verfügbar unter: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-29423-5_3
77. Soh UJ, Dores MR, Chen B, Trejo J. Signal transduction by protease-activated receptors: PAR signalling paradigms. *Br J Pharmacol*. Mai 2010;160(2):191–203.
78. Ni H, Freedman J. Platelets in hemostasis and thrombosis: role of integrins and their ligands. *Transfus Apher Sci*. Juni 2003;28(3):257–64.
79. Clemetson KJ, Clemetson JM. Platelet Receptors. In: *Platelets* [Internet]. Elsevier; 2013 [zitiert 11. Januar 2019]. S. 169–94. Verfügbar unter: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123878373000092>
80. Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B. Cell Adhesion Mechanisms in Platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. März 2008;28(3):403–12.

81. Zelensky AN, Gready JE. The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS J.* Dezember 2005;272(24):6179–217.
82. Jain S, Russell S, Ware J. Platelet glycoprotein VI facilitates experimental lung metastasis in syngenic mouse models. *J Thromb Haemost.* Oktober 2009;7(10):1713–7.
83. Dovizio M, Maier TJ, Alberti S, Di Francesco L, Marcantoni E, Munch G, u. a. Pharmacological Inhibition of Platelet-Tumor Cell Cross-Talk Prevents Platelet-Induced Overexpression of Cyclooxygenase-2 in HT29 Human Colon Carcinoma Cells. *Mol Pharmacol.* 1. Juli 2013;84(1):25–40.
84. Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B. Cell Adhesion Mechanisms in Platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* März 2008;28(3):403–12.
85. Watson SP, Herbert JM, Pollitt AY. GPVI and CLEC-2 in hemostasis and vascular integrity: ITAM and hemITAM receptors in platelets. *J Thromb Haemost.* 25. März 2010;8(7):1456–67.
86. Buitrago L, Bhavanasi D, Dangelmaier C, Manne BK, Badolia R, Borgognone A, u. a. Tyrosine Phosphorylation on Spleen Tyrosine Kinase (Syk) Is Differentially Regulated in Human and Murine Platelets by Protein Kinase C Isoforms. *J Biol Chem.* 4. Oktober 2013;288(40):29160–9.
87. Mammadova-Bach E, Zigrino P, Brucker C, Bourdon C, Freund M, De Arcangelis A, u. a. Platelet integrin $\alpha 6\beta 1$ controls lung metastasis through direct binding to cancer cell-derived ADAM9. *JCI Insight* [Internet]. 8. September 2016 [zitiert 11. Januar 2019];1(14). Verfügbar unter: <https://insight.jci.org/articles/view/88245>
88. Murphy G. The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer.* Dezember 2008;8(12):932–41.
89. Inoue O. Laminin stimulates spreading of platelets through integrin $\alpha 6\beta 1$ -dependent activation of GPVI. *Blood.* 15. Februar 2006;107(4):1405–12.
90. Nieswandt B, Brakebusch C, Bergmeier W, Schulte V, Bouvard D, Lindhout T, u. a. Glycoprotein VI but not $\alpha 2\beta 1$ integrin is essential for platelet interaction with collagen. :11.
91. Estevez B, Du X. New Concepts and Mechanisms of Platelet Activation Signaling. *Physiology.* März 2017;32(2):162–77.
92. Mitrugno A, Williams D, Kerrigan SW, Moran N. A novel and essential role for Fc γ R1a in cancer cell-induced platelet activation. 2014;123(2):13.
93. Qiao J, Al-Tamimi M, Baker RI, Andrews RK, Gardiner EE. The platelet Fc receptor, Fc γ R1a. *Immunol Rev.* November 2015;268(1):241–52.
94. Boylan B, Gao C, Rathore V, Gill JC, Newman DK, Newman PJ. Identification of Fc R1a as the ITAM-bearing receptor mediating $\text{IIb} 3$ outside-in integrin signaling in human platelets. *Blood.* 1. Oktober 2008;112(7):2780–6.

95. Shattil SJ, Kashiwagi H, Pampori N. Integrin Signaling: The Platelet Paradigm. :14.
96. Schmutz M, Rand ML, Freedman J. Platelets and von Willebrand factor. *Transfus Apher Sci.* Juni 2003;28(3):269–77.
97. Bennett JS. Regulation of integrins in platelets: Integrins in Platelets. *Biopolymers.* Juli 2015;104(4):323–33.
98. PubMed Central Link [Internet]. [zitiert 14. Januar 2019]. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5672329/>
99. Boukerche H, Berthier-Vergnes O, Tabone E, Doré JF, Leung LL, McGregor JL. Platelet-melanoma cell interaction is mediated by the glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood.* 1. August 1989;74(2):658–63.
100. Engebraaten O, Trikha M, Juell S, Garman-Vik S, Fodstad Ø. Inhibition of In Vivo Tumour Growth by the Blocking of Host $\alpha v \beta 3$ and $\alpha IIb \beta 3$ Integrins. *ANTICANCER Res.* 2009;7.
101. Amirkhosravi, Mildred Amaya, Farooq A. Blockade of GPIIb/IIIa inhibits the release of vascular endothelial growth factor (VEGF) from tumor cell-activated platelets and experimental metastasis. *Platelets.* Januar 1999;10(5):285–92.
102. Charo IE, Nannizzi L, Smith JW, Cheresch DA. The Vitronectin Receptor $\alpha v \beta 3$ Binds Fibronectin and Acts in Concert with $\alpha 5 \beta 1$ in Promoting Cellular Attachment and Spreading on Fibronectin. *J Cell Biol.* 1990;111:6.
103. Lonsdorf AS, Krämer BF, Fahrleitner M, Schönberger T, Gnerlich S, Ring S, u. a. Engagement of $\alpha IIb \beta 3$ (GPIIb/IIIa) with $\alpha v \beta 3$ Integrin Mediates Interaction of Melanoma Cells with Platelets: A CONNECTION TO HEMATOGENOUS METASTASIS. *J Biol Chem.* 13. Januar 2012;287(3):2168–78.
104. ModdermanS PW, Admiraal LG, Sonnenberg A. Glycoproteins V and Ib-IX Form a Noncovalent Complex in the Platelet Membrane. :6. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, Vol. 267, No. 1, Issue of January 5, pp. 364-369,1992
105. Hagen I, Brosstad F, Gogstad GO, Korsmo R, Solum NO. Further studies on the interaction between thrombin and GP Ib using crossed immunoelectrophoresis. Effect of thrombin inhibitors. *Thromb Res.* September 1982;27(5):549–54.
106. Romo GM, Dong J-F, Schade AJ, Gardiner EE, Kansas GS, Li CQ, u. a. The Glycoprotein Ib-IX-V Complex Is a Platelet Counterreceptor for P-Selectin. *J Exp Med.* 20. September 1999;190(6):803–14.
107. Yin H, Stojanovic A, Hay N, Du X. The role of Akt in the signaling pathway of the glycoprotein Ib-IX induced platelet activation. *Blood.* 15. Januar 2008;111(2):658–65.
108. Garcia A. Src family kinase-mediated and Erk-mediated thromboxane A2 generation are r VWF/GPIb-induced fibrinogen receptor activation in human platelets. *Blood.* 15. November 2005;106(10):3410–4.

109. Li Z, Xi X, Du X. A Mitogen-activated Protein Kinase-dependent Signaling Pathway in the Activation of Platelet Integrin $\alpha_{IIb} \beta_3$. *J Biol Chem.* 9. November 2001;276(45):42226–32.
110. Estevez B, Stojanovic-Terpo A, Delaney MK, O'Brien KA, Berndt MC, Ruan C, u. a. LIM kinase-1 selectively promotes glycoprotein Ib-IX-mediated TXA2 synthesis, platelet activation, and thrombosis. *Blood.* 30. Mai 2013;121(22):4586–94.
111. Canobbio I, Balduini C, Torti M. Signalling through the platelet glycoprotein Ib-V-IX complex. *Cell Signal.* Dezember 2004;16(12):1329–44.
112. Badolia R, Kostyak J, Dangelmaier C, Kunapuli S. Syk Activity Is Dispensable for Platelet GP1b-IX-V Signaling. *Int J Mol Sci.* 9. Juni 2017;18(6):1238.
113. Lian L, Li W, Li Z-Y, Mao Y-X, Zhang Y-T, Zhao Y-M, u. a. Inhibition of MCF-7 breast cancer cell-induced platelet aggregation using a combination of antiplatelet drugs. *Oncol Lett.* Februar 2013;5(2):675–80.
114. McEver RP. Selectin-carbohydrate interactions during inflammation and metastasis. *Glycoconj J.* 1997 Aug;14(5):585-91.
115. Kappelmayer J, Nagy B. The Interaction of Selectins and PSGL-1 as a Key Component in Thrombus Formation and Cancer Progression. *BioMed Res Int.* 2017;2017:1–18.
116. Laszik Z, Jansen PJ, Cummings RD, Tedder TF, McEver RP, Moore KL. P-Selectin Glycoprotein Ligand-I Is Broadly Expressed in Cells of Myeloid, Lymphoid, and Dendritic Lineage and in Some Nonhematopoietic Cells. : *Blood.* 1996 Oct 15;88(8):3010-21.
117. Palabrica T, Lobb R, Furie BC, Aronovitz M, Benjamin C, Hsu YM, u. a. Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets. *Nature.* 29. Oktober 1992;359(6398):848–51.
118. Kim YJ, Borsig L, Varki NM, Varki A. P-selectin deficiency attenuates tumor growth and metastasis. *Proc Natl Acad Sci.* 4. August 1998;95(16):9325–30.
119. Becker KA, Beckmann N, Adams C, Hessler G, Kramer M, Gulbins E, u. a. Melanoma cell metastasis via P-selectin-mediated activation of acid sphingomyelinase in platelets. *Clin Exp Metastasis.* Januar 2017;34(1):25–35.
120. Suzuki-Inoue K, Inoue O, Ozaki Y. Novel platelet activation receptor CLEC-2: from discovery to prospects: Novel platelet activation receptor CLEC-2. *J Thromb Haemost.* Juli 2011;9:44–55.
121. Séverin S, Pollitt AY, Navarro-Nuñez L, Nash CA, Mourão-Sá D, Eble JA, u. a. Syk-dependent Phosphorylation of CLEC-2: A NOVEL MECHANISM OF HEM-IMMUNORECEPTOR TYROSINE-BASED ACTIVATION MOTIF SIGNALING. *J Biol Chem.* 11. Februar 2011;286(6):4107–16.

122. Uhrin P, Zaujec J, Breuss JM, Olcaydu D, Chrenek P, Stockinger H, u. a. Novel function for blood platelets and podoplanin in developmental separation of blood and lymphatic circulation. *Blood*. 13. Mai 2010;115(19):3997–4005.
123. Yuan P, Temam S, El-Naggar A, Zhou X, Liu DD, Lee JJ, u. a. Overexpression of podoplanin in oral cancer and its association with poor clinical outcome. *Cancer*. 1. August 2006;107(3):563–9.
124. Nakazawa Y, Takagi S, Sato S, Oh-hara T, Koike S, Takami M, u. a. Prevention of hematogenous metastasis by neutralizing mice and its chimeric anti-Aggrus/podoplanin antibodies. *Cancer Sci*. November 2011;102(11):2051–7.
125. Gachet C. REGULATION OF PLATELET FUNCTIONS BY P2 RECEPTORS. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. Februar 2006;46(1):277–300.
126. Jin J, Kunapuli SP. Coactivation of two different G protein-coupled receptors is essential for ADP-induced platelet aggregation. *Proc Natl Acad Sci*. 7. Juli 1998;95(14):8070–4.
127. Weiss HJ, Lages B. Platelet Prothrombinase Activity and Intracellular Calcium Responses in Patients With Storage Pool Deficiency, Glycoprotein IIb-IIIa Deficiency, or Impaired Platelet Coagulant Activity — A Comparison With Scott Syndrome. : *Blood*. 1997 Mar 1;89(5):1599-611
128. Kunapuli S. Platelet purinergic receptors. *Curr Opin Pharmacol*. April 2003;3(2): 175–80.
129. Nguyen TA, Diodati JG, Pharand C. Resistance to clopidogrel: A review of the evidence. *J Am Coll Cardiol*. April 2005;45(8):1157–64.
130. McNicol A, Israels SJ, Bennett JS. Platelet Dense Granules: Structure, Function and Implications for Haemostasis. *Thromb Res*. 1999 Jul 1;95(1):1-18.
131. Nakahata N. Thromboxane A2: Physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. *Pharmacol Ther*. April 2008;118(1):18–35.
132. Moers A, Wettschureck N, Grüner S, Nieswandt B, Offermanns S. Unresponsiveness of platelets lacking both, Gαq and Gα13: Implications for collagen-induced platelet activation. : *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* Vol. 279, No. 44, Issue of October 29, pp. 45354–45359, 2004
133. Bibbins-Domingo K, on behalf of the U.S. Preventive Services Task Force. Aspirin Use for the Primary Prevention of Cardiovascular Disease and Colorectal Cancer: U.S. Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *Ann Intern Med*. 21. Juni 2016;164(12):836.
134. Guillem-Llobat P, Dovizio M, Bruno A, Ricciotti E, Cufino V, Sacco A, u. a. Aspirin prevents colorectal cancer metastasis in mice by splitting the crosstalk between platelets and tumor cells. *Oncotarget* [Internet]. 31. Mai 2016 [zitiert 18. Januar 2019];7(22). Verfügbar unter: <http://www.oncotarget.com/fulltext/8655>

135. Menta I, LaÂ D. Effects of Thromboxane A₂ Inhibition on Osteogenic Sarcoma Cell-induced Platelet Aggregation. : *Cancer Res.* 1986 Oct;46(10):5061-3.
136. Sakai H, Suzuki T, Takahashi Y, Ukai M, Tauchi K, Fujii T, u. a. Upregulation of thromboxane synthase in human colorectal carcinoma and the cancer cell proliferation by thromboxane A₂. *FEBS Lett.* 12. Juni 2006;580(14):3368–74.
137. Štros M. HMGB proteins: Interactions with DNA and chromatin. *Biochim Biophys Acta BBA - Gene Regul Mech.* Januar 2010;1799(1–2):101–13.
138. Pasqualini JR, Sterner R, Mercat P, Allfrey VG. Estradiol enhanced acetylation of nuclear high mobility group proteins of the uterus of newborn guinea pigs. *Biochem Biophys Res Commun.* Juni 1989;161(3):1260–6.
139. Andersson U, Erlandsson-Harris H. HMGB1 is a potent trigger of arthritis. *J Intern Med.* März 2004;255(3):344–50.
140. Laursen TL, Støy S, Deleuran B, Vilstrup H, Grønbaek H, Sandahl TD. The damage-associated molecular pattern HMGB1 is elevated in human alcoholic hepatitis, but does not seem to be a primary driver of inflammation. *APMIS.* September 2016;124(9):741–7.
141. Andonegui G. Platelets express functional Toll-like receptor-4. *Blood.* 1. Oktober 2005;106(7):2417–23.
142. Kim S, Kim SY, Pribis JP, Lotze M, Mollen KP, Shapiro R, u. a. Signaling of High Mobility Group Box 1 (HMGB1) through Toll-like Receptor 4 in Macrophages Requires CD14. *Mol Med.* 12. März 2013;19(1):88–98.
143. Vogel S, Bodenstein R, Chen Q, Feil S, Feil R, Rheinlaender J, u. a. Platelet-derived HMGB1 is a critical mediator of thrombosis. *J Clin Invest.* 9. November 2015;125(12):4638–54.
144. Zhang G, Han J, Welch EJ, Ye RD, Voyno-Yasenetskaya TA, Malik AB, u. a. Lipopolysaccharide Stimulates Platelet Secretion and Potentiates Platelet Aggregation via TLR4/MyD88 and the cGMP-Dependent Protein Kinase Pathway. *J Immunol.* 15. Juni 2009;182(12):7997–8004.
145. Maugeri N, Franchini S, Campana L, Baldini M, Ramirez GA, Sabbadini MG, u. a. Circulating platelets as a source of the damage-associated molecular pattern HMGB1 in patients with systemic sclerosis. *Autoimmunity.* Dezember 2012;45(8):584–7.
146. Yu L-X, Yan L, Yang W, Wu F-Q, Ling Y, Chen S-Z, u. a. Platelets promote tumour metastasis via interaction between TLR4 and tumour cell-released high-mobility group box1 protein. *Nat Commun [Internet].* Dezember 2014 [zitiert 18. Januar 2019];5(1). Verfügbar unter: <http://www.nature.com/articles/ncomms6256>
147. Labelle M, Begum S, Hynes RO. Platelets guide the formation of early metastatic niches. *Proc Natl Acad Sci.* 29. Juli 2014;111(30):E3053–61.

148. Hundelshausen P, Petersen F, Brandt E. Platelet-derived chemokines in vascular biology. *Thromb Haemost.* 2007;97(05):704–13.
149. Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets.* Januar 2001;12(5):261–73.
150. Ghasemzadeh M, Kaplan ZS, Alwis I, Schoenwaelder SM, Ashworth KJ, Westein E, u. a. The CXCR1/2 ligand NAP-2 promotes directed intravascular leukocyte migration through platelet thrombi. *Blood.* 30. Mai 2013;121(22):4555–66.
151. Golebiewska EM, Poole AW. Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Rev.* Mai 2015;29(3):153–62.
152. Ajayi AAL, Halushka PV. Castration reduces platelet thromboxane A2 receptor density and aggregability. *QJM Int J Med.* 1. Mai 2005;98(5):349–56.
153. Gazi L, Bobirnac I, Danzeisen M, Tricklebank M, Schoe P. Receptor density as a factor governing the efficacy of the dopamine D4 receptor ligands, L-745,870 and U-101958 at human recombinant D4.4 receptors expressed in CHO cells. :8.
154. Lopez E, Bermejo N, Berna-Erro A, Alonso N, Salido GM, Redondo PC, u. a. Relationship between calcium mobilization and platelet α - and δ -granule secretion. A role for TRPC6 in thrombin-evoked δ -granule exocytosis. *Arch Biochem Biophys.* November 2015;585:75–81.
155. Konopatskaya O, Matthews SA, Harper MT, Gilio K, Cosemans JMEM, Williams CM, u. a. Protein kinase C mediates platelet secretion and thrombus formation through protein kinase D2. *Blood.* 14. Juli 2011;118(2):416–24.
156. Li Z, Zhang G, Marjanovic JA, Ruan C, Du X. A Platelet Secretion Pathway Mediated by cGMP-dependent Protein Kinase. *J Biol Chem.* 8. Oktober 2004;279(41):42469–75.
157. Kato H, Adachi S, Doi T, Matsushima-Nishiwaki R, Minamitani C, Akamatsu S, u. a. Mechanism of collagen-induced release of 5-HT, PDGF-AB and sCD40L from human platelets: Role of HSP27 phosphorylation via p44/p42 MAPK. *Thromb Res.* Juli 2010;126(1):39–43.
158. Jin J, Mao Y, Thomas D, Kim S, Daniel JL, Kunapuli SP. RhoA downstream of Gq and G12/13 pathways regulates protease-activated receptor-mediated dense granule release in platelets. *Biochem Pharmacol.* März 2009;77(5):835–44.
159. Marks MS. SNARing platelet granule secretion. *Blood.* 20. September 2012;120(12):2355–7.
160. Huang Y, Whiteheart SW. Platelet secretion paves the way. *Blood.* 23. Juli 2015;126(4):433–4.
161. Baker RW, Hughson FM. Chaperoning SNARE assembly and disassembly. *Nat Rev Mol Cell Biol.* August 2016;17(8):465–79.

162. 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*. 30. Juli 2009;114(5):1083–90.
163. Ren Q, Barber HK, Crawford GL, Karim ZA, Zhao C, Choi W, u. a. Endobrevin/VAMP-8 Is the Primary v-SNARE for the Platelet Release Reaction. *Mol Biol Cell*. 2007;18:10.
164. Hua Y, Scheller RH. Three SNARE complexes cooperate to mediate membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci*. 3. Juli 2001;98(14):8065–70.
165. Ma L, Perini R, McKnight W, Dicay M, Klein A, Hollenberg MD, u. a. Proteinase-activated receptors 1 and 4 counter-regulate endostatin and VEGF release from human platelets. *Proc Natl Acad Sci*. 4. Januar 2005;102(1):216–20.
166. 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*. Oktober 2007;5(10):2009–16.
167. Zheng J, Fan H, Chen Y, Ni B, Wang S, Sun M, u. a. Expression of MMP-1/PAR-1 and patterns of invasion in oral squamous cell carcinoma as potential prognostic markers. *OncoTargets Ther*. Juli 2015;1619.
168. Jonnalagadda D, Izu LT, Whiteheart SW. Platelet secretion is kinetically heterogeneous in an agonist-responsive manner. *Blood*. 20. Dezember 2012;120(26):5209–16.
169. Ye S, Karim ZA, Al Hawas R, Pessin JE, Filipovich AH, Whiteheart SW. Syntaxin-11, but not syntaxin-2 or syntaxin-4, is required for platelet secretion. *Blood*. 20. September 2012;120(12):2484–92.
170. Golebiewska EM, Harper MT, Williams CM, Savage JS, Goggs R, Fischer von Mollard G, u. a. Syntaxin 8 Regulates Platelet Dense Granule Secretion, Aggregation, and Thrombus Stability. *J Biol Chem*. 16. Januar 2015;290(3):1536–45.
171. Nieto MA. The Ins and Outs of the Epithelial to Mesenchymal Transition in Health and Disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 10. November 2011;27(1):347–76.
172. López-Novoa JM, Nieto MA. Inflammation and EMT: an alliance towards organ fibrosis and cancer progression: Inflammation and EMT: organ fibrosis and cancer. *EMBO Mol Med*. September 2009;1(6–7):303–14.
173. Klymkowsky MW, Savagner P. Epithelial-Mesenchymal Transition. *Am J Pathol*. Mai 2009;174(5):1588–93.
174. Moreno-Bueno G, Portillo F, Cano A. Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer. *Oncogene*. November 2008;27(55):6958–69.
175. Knights AJ, Funnell APW, Crossley M, Pearson RCM. Holding Tight: Cell Junctions and Cancer Spread. 2013;11.

176. Araki K, Shimura T, Suzuki H, Tsutsumi S, Wada W, Yajima T, u. a. E/N-cadherin switch mediates cancer progression via TGF- β -induced epithelial-to-mesenchymal transition in extrahepatic cholangiocarcinoma. *Br J Cancer*. Dezember 2011;105(12):1885–93.
177. VIM vimentin [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [zitiert 31. Januar 2019]. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7431>
178. Liu C-Y, Lin H-H, Tang M-J, Wang Y-K. Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation. *Oncotarget* [Internet]. 30. Juni 2015 [zitiert 31. Januar 2019];6(18). Verfügbar unter: <http://www.oncotarget.com/fulltext/3862>
179. Mendez MG, Kojima S-I, Goldman RD. Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *FASEB J*. Juni 2010;24(6):1838–51.
180. Mladinich M, Ruan D, Chan C-H. Tackling Cancer Stem Cells via Inhibition of EMT Transcription Factors. *Stem Cells Int*. 2016;2016:1–10.
181. Fischer KR, Durrans A, Lee S, Sheng J, Li F, Wong STC, u. a. Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature*. November 2015;527(7579):472–6.
182. Daroqui MC, Vazquez P, De Kier Joffé EB, Bakin AV, Puricelli LI. TGF- β autocrine pathway and MAPK signaling promote cell invasiveness and in vivo mammary adenocarcinoma tumor progression. *Oncol Rep*. August 2012;28(2):567–75.
183. Yang M-H, Wu M-Z, Chiou S-H, Chen P-M, Chang S-Y, Liu C-J, u. a. Direct regulation of TWIST by HIF-1 α promotes metastasis. *Nat Cell Biol*. März 2008;10(3):295–305.
184. Kang KA, Ryu YS, Piao MJ, Shilnikova K, Kang HK, Yi JM, u. a. DUOX2-mediated production of reactive oxygen species induces epithelial mesenchymal transition in 5-fluorouracil resistant human colon cancer cells. *Redox Biol*. Juli 2018;17:224–35.
185. Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer*. Juni 2007;7(6):415–28.
186. Cui W, Fowles DJ, Bryson S, Duffie E, Ireland H, Balmain A, u. a. TGF- β 1 Inhibits the Formation of Benign Skin Tumors, but Enhances Progression to Invasive Spindle Carcinomas in Transgenic Mice. *Cell*. 1996 Aug 23;86(4):531-42.
187. Langenskiöld M, Holmdahl L, Falk P, Angenete E, Ivarsson M-L. Increased TGF-Beta1 protein expression in patients with advanced colorectal cancer. *J Surg Oncol*. 1. April 2008;97(5):409–15.
188. Inman GJ. Switching TGF β from a tumor suppressor to a tumor promoter. *Curr Opin Genet Dev*. Februar 2011;21(1):93–9.
189. Travis MA, Sheppard D. TGF- β Activation and Function in Immunity. *Annu Rev Immunol*. 21. März 2014;32(1):51–82.

190. Labelle M, Begum S, Hynes RO. Direct Signaling between Platelets and Cancer Cells Induces an Epithelial-Mesenchymal-Like Transition and Promotes Metastasis. *Cancer Cell*. November 2011;20(5):576–90.
191. Battinelli EM, Markens BA, Kulenthirarajan RA, Machlus KR, Flaumenhaft R, Italiano JE. Anticoagulation inhibits tumor cell-mediated release of platelet angiogenic proteins and diminishes platelet angiogenic response. *Blood*. 2. Januar 2014;123(1):101–12.
192. Pietrapiana D, Sala M, Prat M, Sinigaglia F. Met identification on human platelets: Role of hepatocyte growth factor in the modulation of platelet activation. *FEBS Lett*. 15. August 2005;579(20):4550–4.
193. Labelle M, Begum S, Hynes RO. Direct Signaling between Platelets and Cancer Cells Induces an Epithelial-Mesenchymal-Like Transition and Promotes Metastasis. *Cancer Cell*. November 2011;20(5):576–90.
194. Schultz GS, Grant MB. Neovascular growth factors. *Eye*. März 1991;5(2):170–80.
195. Ben-Ezra J, Sheibani K. Megakaryocyte Synthesis Is the Source of Epidermal Growth Factor in Human Platelets. 1990;13(4):5.
196. Liu F, Song S, Yi Z, Zhang M, Li J, Yang F, u. a. HGF induces EMT in non-small-cell lung cancer through the hBVR pathway. *Eur J Pharmacol*. September 2017;811:180–90.
197. Kurimoto R, Iwasawa S, Ebata T, Ishiwata T, Sekine I, Tada Y, u. a. Drug resistance originating from a TGF- β /FGF-2-driven epithelial-to-mesenchymal transition and its reversion in human lung adenocarcinoma cell lines harboring an EGFR mutation. *Int J Oncol*. Mai 2016;48(5):1825–36.
198. Yang AD, Camp ER, Fan F, Shen L, Gray MJ, Liu W, u. a. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Activation Mediates Epithelial to Mesenchymal Transition in Human Pancreatic Carcinoma Cells. *Cancer Res*. 1. Januar 2006;66(1):46–51.
199. Yang L, Lin C, Liu Z-R. P68 RNA Helicase Mediates PDGF-Induced Epithelial Mesenchymal Transition by Displacing Axin from β -Catenin. *Cell*. Oktober 2006;127(1):139–55.
200. Kim J, Kong J, Chang H, Kim H, Kim A. EGF induces epithelial-mesenchymal transition through phospho-Smad2/3-Snail signaling pathway in breast cancer cells. *Oncotarget* [Internet]. 20. Dezember 2016 [zitiert 29. März 2019];7(51). Verfügbar unter: <http://www.oncotarget.com/fulltext/13116>
201. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*. März 2014;15(3):178–96.
202. Suarez-Carmona M, Lesage J, Cataldo D, Gilles C. EMT and inflammation: inseparable actors of cancer progression. *Mol Oncol*. Juli 2017;11(7):805–23.

203. Neil JR, Schiemann WP. Altered TAB1:IKK Kinase Interaction Promotes Transforming Growth Factor- β -Mediated Nuclear Factor- κ B Activation during Breast Cancer Progression. *Cancer Res.* 1. März 2008;68(5):1462–70.
204. Takemoto A, Okitaka M, Takagi S, Takami M, Sato S, Nishio M, u. a. A critical role of platelet TGF- β release in podoplanin-mediated tumour invasion and metastasis. *Sci Rep [Internet]*. Dezember 2017 [zitiert 1. Februar 2019];7(1). Verfügbar unter: <http://www.nature.com/articles/srep42186>
205. Wicki A, Lehembre F, Wick N, Hantusch B, Kerjaschki D, Christofori G. Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: Podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton. *Cancer Cell.* April 2006;9(4):261–72.
206. Wicki A, Christofori G. The potential role of podoplanin in tumour invasion. *Br J Cancer.* Januar 2007;96(1):1–5.
207. Yu M, Bardia A, Wittner BS, Stott SL, Smas ME, Ting DT, u. a. Circulating Breast Tumor Cells Exhibit Dynamic Changes in Epithelial and Mesenchymal Composition. *Science.* 1. Februar 2013;339(6119):580–4.
208. Jia Y, Zhang S, Miao L, Wang J, Jin Z, Gu B, u. a. Activation of platelet protease-activated receptor-1 induces epithelial-mesenchymal transition and chemotaxis of colon cancer cell line SW620. *Oncol Rep.* Juni 2015;33(6):2681–8.
209. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *The Lancet.* 1889;
210. Celià-Terrassa T, Kang Y. Metastatic niche functions and therapeutic opportunities. *Nat Cell Biol.* August 2018;20(8):868–77.
211. Aguado BA, Bushnell GG, Rao SS, Jeruss JS, Shea LD. Engineering the pre-metastatic niche. *Nat Biomed Eng.* 13. Juni 2017;1(6):0077.
212. Gomes AM, Stelling MP, Pavão MSG. Heparan Sulfate and Heparanase as Modulators of Breast Cancer Progression. *BioMed Res Int.* 2013;2013:1–11.
213. Che SPY, Park JY, Stokol T. Tissue Factor-Expressing Tumor-Derived Extracellular Vesicles Activate Quiescent Endothelial Cells via Protease-Activated Receptor-1. *Front Oncol [Internet]*. 2. November 2017 [zitiert 6. Februar 2019];7. Verfügbar unter: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2017.00261/full>
214. Gil-Bernabe AM, Ferjancic S, Tlalka M, Zhao L, Allen PD, Im JH, u. a. Recruitment of monocytes/macrophages by tissue factor-mediated coagulation is essential for metastatic cell survival and premetastatic niche establishment in mice. *Blood.* 29. März 2012;119(13):3164–75.
215. Hiratsuka S, Nakamura K, Iwai S, Murakami M, Itoh T, Kijima H, u. a. MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell.* Oktober 2002;2(4):289–300.

216. Pinedo H, Verheul H, D'Amato R, Folkman J. Involvement of platelets in tumour angiogenesis? *The Lancet*. November 1998;352(9142):1775–7.
217. Wojtukiewicz MZ, Sierko E, Hempel D, Tucker SC, Honn KV. Platelets and cancer angiogenesis nexus. *Cancer Metastasis Rev*. Juni 2017;36(2):249–62.
218. Labelle M, Begum S, Hynes RO. Platelets guide the formation of early metastatic niches. *Proc Natl Acad Sci*. 29. Juli 2014;111(30):E3053–61.
219. Johnson KE, Ceglowski JR, Roweth HG, Forward JA, Tippy MD, El-Husayni S, u. a. Aspirin inhibits platelets from reprogramming breast tumor cells and promoting metastasis. *Blood Adv*. 22. Januar 2019;3(2):198–211.
220. Kerr BA, McCabe NP, Feng W, Byzova TV. Platelets govern pre-metastatic tumor communication to bone. *Oncogene*. September 2013;32(36):4319–24.
221. Borsig L, Wong R, Hynes RO, Varki NM, Varki A. Synergistic effects of L- and P-selectin in facilitating tumor metastasis can involve non-mucin ligands and implicate leukocytes as enhancers of metastasis. *Proc Natl Acad Sci*. 19. Februar 2002;99(4):2193–8.
222. Miles FL, Pruitt FL, van Golen KL, Cooper CR. Stepping out of the flow: capillary extravasation in cancer metastasis. *Clin Exp Metastasis*. Juni 2008;25(4):305–24.
223. Bombeli T, Schwartz BR, Harlan JM. Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), α v β 3 integrin, and GPIIb/IIIa. *J Exp Med*. 1998 Feb 2;187(3):329–39.
224. Gong L, Mi H-J, Zhu H, Zhou X, Yang H. P-selectin-mediated platelet activation promotes adhesion of non-small cell lung carcinoma cells on vascular endothelial cells under flow. *Mol Med Rep*. April 2012;5(4):935–42.
225. McCarty OJT, Mousa SA, Bray PF, Konstantopoulos K. Immobilized platelets support human colon carcinoma cell tethering, rolling, and firm adhesion under dynamic flow conditions. 2000;96(5):10.
226. Dardik' R, Savion N, Kaufmann Y, Varon' D. Thrombin promotes platelet-mediated melanoma cell adhesion to endothelial cells under flow conditions: role of platelet glycoproteins P-selectin and GPIIb-IIIa. *British Journal of Cancer*(1998)77(12),2069-2075
227. Weber MR, Zuka M, Lorger M, Tschan M, Torbett BE, Zijlstra A, u. a. Activated tumor cell integrin α v β 3 cooperates with platelets to promote extravasation and metastasis from the blood stream. *Thromb Res*. April 2016;140:S27–36.
228. Boucharaba A, Serre C-M, Grès S, Saulnier-Blache JS, Bordet J-C, Guglielmi J, u. a. Platelet-derived lysophosphatidic acid supports the progression of osteolytic bone metastases in breast cancer. *J Clin Invest*. 15. Dezember 2004;114(12):1714–25.

229. Amerongen GP van N, Vermeer MA, van Hinsbergh VWM. Role of RhoA and Rho Kinase in Lysophosphatidic Acid–Induced Endothelial Barrier Dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. Dezember 2000 [zitiert 8. Februar 2019];20(12). Verfügbar unter: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.ATV.20.12.e127>
230. Li X. Role of protein kinase C in thrombin-induced endothelial permeability changes: inhibition by angiopoietin-1. *Blood*. 15. September 2004;104(6):1716–24.
231. Schumacher D, Strilic B, Sivaraj KK, Wettschureck N, Offermanns S. Platelet-Derived Nucleotides Promote Tumor-Cell Transendothelial Migration and Metastasis via P2Y2 Receptor. *Cancer Cell*. Juli 2013;24(1):130–7.
232. Evani SJ, Prabhu RG, Gnanaruban V, Finol EA, Ramasubramanian AK. Monocytes mediate metastatic breast tumor cell adhesion to endothelium under flow. *FASEB J*. August 2013;27(8):3017–29.
233. Kataoka H. Protease-activated receptors 1 and 4 mediate thrombin signaling in endothelial cells. *Blood*. 1. November 2003;102(9):3224–31.
234. Kaplanski G, Bongrand P, Kaplanski S, Farnarier C. Thrombin-Activated Human Endothelial Cells Support Monocyte Adhesion In Vitro Following Expression of Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1; CD54) and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1; CD106). :10.
235. Konstantoulaki M, Kouklis P, Malik AB. Protein kinase C modifications of VE-cadherin, p120, and β -catenin contribute to endothelial barrier dysregulation induced by thrombin. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol*. August 2003;285(2):L434–42.
236. Khorana AA, Francis CW, Culakova E, Kuderer NM, Lyman GH. Thromboembolism is a leading cause of death in cancer patients receiving outpatient chemotherapy. *J Thromb Haemost*. März 2007;5(3):632–4.
237. Lee AYY. Venous Thromboembolism and Cancer: Risks and Outcomes. *Circulation*. 17. Juni 2003;107(90231):171–21.
238. Rickles FR, Edwards RL. Activation of blood coagulation in cancer: Trousseau’s syndrome revisited. *Blood*. Juli 1983;62(1):14–31.
239. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. November 2018;68(6):394–424.
240. Sylvia Haas, Albrecht Encke, Ina KoppS3-Leitlinie Prophylaxe der venösen Thromboembolie (VTE), 2. komplett überarbeitete Auflage. :238. *Dtsch med Wochenschr* 2016; 141(07): 453-456
241. Minor C, Tellor KB, Armbruster AL. Edoxaban, a Novel Oral Factor Xa Inhibitor. *Ann Pharmacother*. Juli 2015;49(7):843–50.
242. Weitz JI. Low-Molecular-Weight Heparins. *N Engl J Med*. 1997 September;11.

243. Lee AY, Bauersachs R, Janas MS, Jarner MF, Kamphuisen PW, Meyer G, u. a. CATCH: a randomised clinical trial comparing long-term tinzaparin versus warfarin for treatment of acute venous thromboembolism in cancer patients. *BMC Cancer* [Internet]. Dezember 2013 [zitiert 18. Februar 2019];13(1). Verfügbar unter: <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-13-284>
244. Review of CLOT and CATCH Trials: Treatment of VTE in Patients With Cancer [Internet]. American College of Cardiology. [zitiert 18. Februar 2019]. Verfügbar unter: <http://www.acc.org/latest-in-cardiology/articles/2018/05/11/08/39/2/preview-of-clot-and-catch-trials>
245. Lee AYY, Levine MN, Baker RI, Bowden C, Kakkar AK, Prins M, u. a. Low-Molecular-Weight Heparin versus a Coumarin for the Prevention of Recurrent Venous Thromboembolism in Patients with Cancer. *N Engl J Med*. 10. Juli 2003;349(2):146–53.
246. Ansell J. Point-of-care patient self-monitoring of oral vitamin K antagonist therapy. *J Thromb Thrombolysis*. April 2013;35(3):339–41.
247. Streiff MB, Holmstrom B, Ashrani A, Bockenstedt PL, Chesney C, Eby C, u. a. Cancer-Associated Venous Thromboembolic Disease, Version 1.2015. *J Natl Compr Canc Netw*. September 2015;13(9):1079–95.
248. Lyman GH, Bohlke K, Khorana AA, Kuderer NM, Lee AY, Arcelus JI, u. a. Venous Thromboembolism Prophylaxis and Treatment in Patients With Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update 2014. *J Clin Oncol*. 20. Februar 2015;33(6):654–6.
249. Kearon C, Akl EA, Ornelas J, Blaivas A, Jimenez D, Bounameaux H, u. a. Antithrombotic Therapy for VTE Disease. *Chest*. Februar 2016;149(2):315–52.
250. Raskob GE, van Es N, Verhamme P, Carrier M, Di Nisio M, Garcia D, u. a. Edoxaban for the Treatment of Cancer-Associated Venous Thromboembolism. *N Engl J Med*. 15. Februar 2018;378(7):615–24.
251. Farge D, Bounameaux H, Brenner B, Cajfinger F, Debourdeau P, Khorana AA, u. a. International clinical practice guidelines including guidance for direct oral anticoagulants in the treatment and prophylaxis of venous thromboembolism in patients with cancer. *Lancet Oncol*. Oktober 2016;17(10):e452–66.
252. Khalil J, Bensaid B, Elkacemi H, Afif M, Bensaid Y, Kebdani T, u. a. Venous thromboembolism in cancer patients: an underestimated major health problem. *World J Surg Oncol* [Internet]. Dezember 2015 [zitiert 18. Februar 2019];13(1). Verfügbar unter: <http://www.wjso.com/content/13/1/204>
253. Patel HK, Khorana AA. Anticoagulation in Cancer Patients: a Summary of Pitfalls to Avoid. *Curr Oncol Rep* [Internet]. Februar 2019 [zitiert 19. Februar 2019];21(2). Verfügbar unter: <http://link.springer.com/10.1007/s11912-019-0767-5>

254. Khorana AA, McCrae KR, Milentijevic D, Fortier J, Nelson WW, Laliberté F, u. a. Current practice patterns and patient persistence with anticoagulant treatments for cancer-associated thrombosis. *Res Pract Thromb Haemost.* Juli 2017;1(1):14–22.
255. Gray E, Mulloy B, Barrowcliffe T. Heparin and low-molecular-weight heparin. *Thromb Haemost.* 2008;99(11):807–18.
256. Ratiopharm GmbH. Fachinformation Heparin-Natrium-5000-ratiopharm® (Ampullen/Fertigspritzen). Fachinfo Service;
257. Shriver Z, Capila I, Venkataraman G, Sasisekharan R. Heparin and Heparan Sulfate: Analyzing Structure and Microheterogeneity. In: Lever R, Mulloy B, Page CP, Herausgeber. *Heparin - A Century of Progress* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2012 [zitiert 1. März 2019]. S. 159–76. Verfügbar unter: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-23056-1_8
258. Falanga A, Marchetti M. Heparin in Tumor Progression and Metastatic Dissemination. *Semin Thromb Hemost.* Oktober 2007;33(7):688–94.
259. Sanofi-Aventis Deutschland GmbH. Fachinformation Clexane® 20 mg, - Duo, - Klinik, - Praxis Clexane® 40 mg, - Duo, - Klinik, - Praxis.
260. LEO Pharma A/S. Fachinfo innohep® 20.000 Anti-Xa I.E./ml Fertigspritzen Injektionslösung.
261. LEO Pharma A/S. ATTACHMENT Innohep Rx only (tinzaparin sodium injection) - FDA.
262. Casu B, Vlodaysky I, Sanderson RD. Non-Anticoagulant Heparins and Inhibition of Cancer. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2007;36(3–4):195–203.
263. Lapierre F, Holme K, Lam L, Tressler RJ, Storm N, Wee J, u. a. Chemical modifications of heparin that diminish its anticoagulant but preserve its heparanase-inhibitory, angiostatic, anti-tumor and anti-metastatic properties. *Glycobiology.* 1996;6(3):355–66.
264. Aspen Pharma Trading Limited. Fachinformation Arixtra 7,5 mg/0,6 ml Injektionslösung, Fertigspritze.
265. Turpie AG. Fondaparinux: a Factor Xa inhibitor for antithrombotic therapy. *Expert Opin Pharmacother.* Juni 2004;5(6):1373–84.
266. Walenga JM, Jeske WP, Frapaise FX, Bick RL, Fareed J, Samama MM. Fondaparinux: a synthetic heparin pentasaccharide as a new antithrombotic agent. *Expert Opin Investig Drugs.* März 2002;11(3):397–407.
267. Daiichi Sankyo Europe GmbH. Fachinformation Lixiana® 60 mg Filmtabletten.
268. Bristol-Myers Squibb/Pfizer EEIG. Fachinformation Eliquis® 5 mg Filmtabletten.
269. Boehringer Ingelheim International GmbH. Fachinformation Pradaxa® 110 mg Hartkapseln.

-
270. Mitsubishi Tanabe Pharma Europe Ltd. Fachinformation Argatra Multidose 100 mg/ml Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung.
271. Perzborn E, Roehrig S, Straub A, Kubitzka D, Misselwitz F. The discovery and development of rivaroxaban, an oral, direct factor Xa inhibitor. *Nat Rev Drug Discov.* Januar 2011;10(1):61–75.
272. Bayer AG. Fachinfo Xarelto® 20 mg Filmtabletten.
273. Stevenson JL, Varki A, Borsig L. Heparin attenuates metastasis mainly due to inhibition of P- and L-selectin, but non-anticoagulant heparins can have additional effects. *Thromb Res.* Januar 2007;120:S107–11.
274. Yoshitomi Y. Inhibition of experimental lung metastases of Lewis lung carcinoma cells by chemically modified heparin with reduced anticoagulant activity. *Cancer Lett.* April 2004;207(2):165–74.
275. Lee DY, Park K, Kim SK, Park R-W, Kwon IC, Kim SY, u. a. Antimetastatic Effect of an Orally Active Heparin Derivative on Experimentally Induced Metastasis. *Clin Cancer Res.* 1. Mai 2008;14(9):2841–9.
276. Kragh M, Binderup L, Hjarnaa P-JV, Bramm E, Johansen KB, Petersen CF. Non-anti-coagulant heparin inhibits metastasis but not primary tumor growth. *Oncol Rep.* 2005 Jul;14(1):99-104..
277. Szende B, Paku N. Effect of Fraxiparine and Heparin on Experimental Tumor Metastasis in Mice. *Anticancer Res.* 2005 Jul-Aug;25(4):2869-72.
278. Stevenson JL. Differential Metastasis Inhibition by Clinically Relevant Levels of Heparins--Correlation with Selectin Inhibition, Not Antithrombotic Activity. *Clin Cancer Res.* 1. Oktober 2005;11(19):7003–11.
279. Hansen J-B, Svensson B, Olsen R, Ezban M, Østerud B, Paulssen R. Heparin Induces Synthesis and Secretion of Tissue Factor Pathway Inhibitor from Endothelial Cells In Vitro. *Thromb Haemost.* 2000;83(06):937–43.
280. Wood JP, Ellery PER, Maroney SA, Mast AE. Biology of tissue factor pathway inhibitor. *Blood.* 8. Mai 2014;123(19):2934–43.
281. Ueda C, Hirohata Y, Kihara Y, Nakamura H, Abe S, Akahane K, u. a. Pancreatic cancer complicated by disseminated intravascular coagulation associated with production of tissue factor. *J Gastroenterol.* 1. Dezember 2001;36(12):848–50.
282. Nakasaki T, Wada H, Shigemori C, Miki C, Gabazza EC, Nobori T, u. a. Expression of tissue factor and vascular endothelial growth factor is associated with angiogenesis in colorectal cancer. *Am J Hematol.* April 2002;69(4):247–54.
283. Camerer E, Huang W, Coughlin SR. Tissue factor- and factor X-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor VIIa. *Proc Natl Acad Sci.* 9. Mai 2000;97(10):5255–60.

284. Amirkhosravi A, Meyer T, Amaya M, Davila M, Mousa S, Robson T, u. a. The Role of Tissue Factor Pathway Inhibitor in Tumor Growth and Metastasis. *Semin Thromb Hemost.* Oktober 2007;33(7):643–52.
285. Takaoka M, Naomoto Y, Ohkawa T, Uetsuka H, Shirakawa Y, Uno F, u. a. Heparanase Expression Correlates with Invasion and Poor Prognosis in Gastric Cancers. *Lab Invest.* Mai 2003;83(5):613–22.
286. Li J-P, Kusche-Gullberg M. Heparan Sulfate: Biosynthesis, Structure, and Function. In: *International Review of Cell and Molecular Biology* [Internet]. Elsevier; 2016 [zitiert 22. Februar 2019]. S. 215–73. Verfügbar unter: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S193764481630020X>
287. Fuster MM, Wang L. Endothelial Heparan Sulfate in Angiogenesis. In: *Progress in Molecular Biology and Translational Science* [Internet]. Elsevier; 2010 [zitiert 25. Februar 2019]. S. 179–212. Verfügbar unter: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877117310930093>
288. Sato T, Yamaguchi A, Goi T, Hirono Y, Takeuchi K, Katayama K, u. a. Heparanase expression in human colorectal cancer and its relationship to tumor angiogenesis, hematogenous metastasis, and prognosis. *J Surg Oncol.* 15. September 2004;87(4):174–81.
289. Xie Z-J, Liu Y, Jia L-M, He Y-C. Heparanase expression, degradation of basement membrane and low degree of infiltration by immunocytes correlate with invasion and progression of human gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2008;14(24):3812.
290. Naggi A, Casu B, Perez M, Torri G, Cassinelli G, Penco S, u. a. Modulation of the Heparanase-inhibiting Activity of Heparin through Selective Desulfation, Graded *N*-Acetylation, and Glycol Splitting. *J Biol Chem.* 1. April 2005;280(13):12103–13.
291. Hostettler N, Naggi A, Torri G, Ishai-Michaeli R, Casu B, Vlodaysky I, u. a. P-selectin- and heparanase-dependent antimetastatic activity of non-anticoagulant heparins. *FASEB J.* November 2007;21(13):3562–72.
292. Edovitsky E, Elkin M, Zcharia E, Peretz T, Vlodaysky I. Heparanase Gene Silencing, Tumor Invasiveness, Angiogenesis, and Metastasis. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 18. August 2004;96(16):1219–30.
293. Glavey SV, Huynh D, Reagan MR, Manier S, Moschetta M, Kawano Y, u. a. The cancer glycome: Carbohydrates as mediators of metastasis. *Blood Rev.* Juli 2015;29(4):269–79.
294. Golias C, Batistatou A, Bablekos G, Charalabopoulos A, Peschos D, Mitsopoulos P, u. a. Physiology and Pathophysiology of Selectins, Integrins, and IgSf Cell Adhesion Molecules Focusing on Inflammation. A Paradigm Model on Infectious Endocarditis. *Cell Commun Adhes.* Juni 2011;18(3):19–32.

295. Wahrenbrock M, Borsig L, Le D, Varki N, Varki A. Selectin-mucin interactions as a probable molecular explanation for the association of Trousseau syndrome with mucinous adenocarcinomas. *J Clin Invest.* 15. September 2003;112(6):853–62.
296. Zarbock A, Müller H, Kuwano Y, Ley K. PSGL-1-dependent myeloid leukocyte activation. *J Leukoc Biol.* November 2009;86(5):1119–24.
297. Wahrenbrock M, Borsig L, Le D, Varki N, Varki A. Selectin-mucin interactions as a probable molecular explanation for the association of Trousseau syndrome with mucinous adenocarcinomas. *J Clin Invest.* 15. September 2003;112(6):853–62.
298. Jørgensen T, Berner A, Kaalhus O, Tveter KJ, Danielsen HE, Bryne M. Up-regulation of the oligosaccharide sialyl LewisX: a new prognostic parameter in metastatic prostate cancer. *Cancer Res.* 1. Mai 1995;55(9):1817–9.
299. Borsig L, Wong R, Hynes RO, Varki NM, Varki A. Synergistic effects of L- and P-selectin in facilitating tumor metastasis can involve non-mucin ligands and implicate leukocytes as enhancers of metastasis. *Proc Natl Acad Sci.* 19. Februar 2002;99(4):2193–8.
300. Nieswandt B, Hafner M, Echtenacher B, Mannel DN. Lysis of Tumor Cells by Natural Killer Cells in Mice Is Impeded by Platelets. *Cancer Res.* 1999 Mar 15;59(6):1295-300.
301. Stevenson JL, Varki A, Borsig L. Heparin attenuates metastasis mainly due to inhibition of P- and L-selectin, but non-anticoagulant heparins can have additional effects. *Thromb Res.* Januar 2007;120:S107–11.
302. Borsig L, Wong R, Feramisco J, Nadeau DR, Varki NM, Varki A. Heparin and cancer revisited: Mechanistic connections involving platelets, P-selectin, carcinoma mucins, and tumor metastasis. *Proc Natl Acad Sci.* 13. März 2001;98(6):3352–7.
303. Schlesinger M, Roblek M, Ortmann K, Naggi A, Torri G, Borsig L, u. a. The role of VLA-4 binding for experimental melanoma metastasis and its inhibition by heparin. *Thromb Res.* Mai 2014;133(5):855–62.
304. Liu S-Y, Tsai M-Y, Chuang K-P, Huang Y-F, Shieh C-C. Ligand binding of leukocyte integrin very late antigen-4 involves exposure of sulfhydryl groups and is subject to redox modulation. *Eur J Immunol.* Februar 2008;38(2):410–23.
305. Martín-Padura I, Mortarini R, Lauri D, Bernasconi S, Sanchez-Madrid F, Parmiani G, u. a. Heterogeneity in human melanoma cell adhesion to cytokine activated endothelial cells correlates with VLA-4 expression. *Cancer Res.* 15. April 1991;51(8):2239–41.
306. Schmitz P, Gerber U, Schütze N, Jüngel E, Blaheta R, Naggi A, u. a. Cyr61 is a target for heparin in reducing MV3 melanoma cell adhesion and migration via the integrin VLA-4. *Thromb Haemost.* 2013;110(11):1046–54.

307. Schmitz P, Gerber U, Jünger E, Schütze N, Blaheta R, Bendas G. Cyr61/CCN1 affects the integrin-mediated migration of prostate cancer cells (PC-3) in vitro. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 1. Januar 2013;51(01):47–50.
308. Franzen CA, Chen C-C, Todorovic V, Juric V, Monzon RI, Lau LF. Matrix Protein CCN1 Is Critical for Prostate Carcinoma Cell Proliferation and TRAIL-Induced Apoptosis. *Mol Cancer Res.* 1. Juli 2009;7(7):1045–55.
309. Pfankuchen DB, Stölting DP, Schlesinger M, Royer H-D, Bendas G. Low molecular weight heparin tinzaparin antagonizes cisplatin resistance of ovarian cancer cells. *Biochem Pharmacol.* September 2015;97(2):147–57.
310. Zhou H, Roy S, Cochran E, Zouaoui R, Chu CL, Duffner J, u. a. M402, a Novel Heparan Sulfate Mimetic, Targets Multiple Pathways Implicated in Tumor Progression and Metastasis. Minna JD, Herausgeber. *PLoS ONE.* 16. Juni 2011;6(6):e21106.
311. Jayson G, Gallagher J. Heparin oligosaccharides: inhibitors of the biological activity of bFGF on Caco-2 cells. *Br J Cancer.* Januar 1997;75(1):9–16.
312. Sento S, Sasabe E, Yamamoto T. Application of a Persistent Heparin Treatment Inhibits the Malignant Potential of Oral Squamous Carcinoma Cells Induced by Tumor Cell-Derived Exosomes. Tang C-H, Herausgeber. *PLOS ONE.* 5. Februar 2016;11(2):e0148454.
313. Akl EA, Kahale LA, Hakoum MB, Matar CF, Sperati F, Barba M, u. a. Parenteral anticoagulation in ambulatory patients with cancer. Cochrane Gynaecological, Neuro-oncology and Orphan Cancer Group, Herausgeber. *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. 11. September 2017 [zitiert 1. März 2019]; Verfügbar unter: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD006652.pub5>
314. Klerk CPW, Smorenburg SM, Otten H-M, Lensing AWA, Prins MH, Piovella F, u. a. The Effect of Low Molecular Weight Heparin on Survival in Patients With Advanced Malignancy. *J Clin Oncol.* April 2005;23(10):2130–5.
315. van Doormaal FF, Di Nisio M, Otten H-M, Richel DJ, Prins M, Buller HR. Randomized Trial of the Effect of the Low Molecular Weight Heparin Nadroparin on Survival in Patients With Cancer. *J Clin Oncol.* 20. Mai 2011;29(15):2071–6.
316. Kakkar AK, Levine MN, Kadziola Z, Lemoine NR, Low V, Patel HK, u. a. Low Molecular Weight Heparin, Therapy With Dalteparin, and Survival in Advanced Cancer: The Fragmin Advanced Malignancy Outcome Study (FAMOUS). *J Clin Oncol.* 15. Mai 2004;22(10):1944–8.
317. AsPC-1 ATCC® CRL-1682™ *Homo sapiens* pancreas; derived from [Internet]. [zitiert 18. Dezember 2018]. Verfügbar unter: <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1682.aspx>
318. Deer EL, González-Hernández J, Coursen JD, Shea JE, Ngatia J, Scaife CL, u. a. Phenotype and Genotype of Pancreatic Cancer Cell Lines: Pancreas. *Mai* 2010;39(4):425–35.

319. Cailleau R, Olivé M, Cruciger QVJ. Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: Preliminary characterization. *In Vitro*. November 1978;14(11):911-5.
320. Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res* [Internet]. August 2011 [zitiert 19. Dezember 2018];13(4). Verfügbar unter: <http://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr2889>
321. Chavez KJ, Garimella SV, Lipkowitz S. Triple negative breast cancer cell lines: One tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. Eng-Wong J, Zujewski JA, Herausgeber. *Breast Dis*. 15. März 2011;32(1–2):35–48.
322. van Muijen GNP, Jansen KFJ, Cornelissen IMHA, Smeets DFCM, Beck JLM, Ruiter DJ. Establishment and characterization of a human melanoma cell line (MV3) which is highly metastatic in nude mice. *Int J Cancer*. 5. Juli 2007;48(1):85–91.
323. PC-3 ATCC® CRL-1435™ Homo sapiens prostate; derived from me [Internet]. [zitiert 18. Dezember 2018]. Verfügbar unter: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-1435.aspx?geo_country=gb
324. Tai S, Sun Y, Squires JM, Zhang H, Oh WK, Liang C-Z, u. a. PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma. *The Prostate*. November 2011;71(15):1668–79.
325. van Bokhoven A, Varella-Garcia M, Korch C, Johannes WU, Smith EE, Miller HL, u. a. Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines. *The Prostate*. 1. November 2003;57(3):205–25.
326. Edgell CJ, McDonald CC, Graham JB. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc Natl Acad Sci*. 1. Juni 1983;80(12):3734–7.
327. Endothelium in vitro: A review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research. : *Angiogenesis* 4: 91-102, 2001.
328. Edgell C-JS, Haizlip JE, Bagnell CR, Packenham JP, Harrison P, Wilbourn B, u. a. Endothelium specific Weibel-Palade bodies in a continuous human cell line, EA.hy926. *In Vitro Cell Dev Biol*. Dezember 1990;26(12):1167–72.
329. OMNI Life Science GmbH & Co. KG. CASY Cell Counter and Analyzer-Label-free cell status monitoring, instantly [Internet]. [zitiert 19. Dezember 2018]. Verfügbar unter: https://www.ols-bio.de/media/pdf/CASY_2018.pdf
330. Kubista M, Akerman B, Nord B. Characterization of Interaction between DNA and 4',6-Diamidino-2-phenylindole by Optical Spectroscopy. : *Biochemistry* 1987 26 (14), 4545-4553
331. Cassinelli G, Naggi A. Old and new applications of non-anticoagulant heparin. *Int J Cardiol*. Juni 2016;212:S14–21.

332. Islam T, Butler M, Sikkander SA, Toida T, Linhardt RJ. Further evidence that periodate cleavage of heparin occurs primarily through the antithrombin binding site. *Carbohydr Res*. November 2002;337(21–23):2239–43.
333. Casu B, Diamantini G, Fedeli G, Mantovani M, Oreste P, Pescador R, u. a. Retention of antilipemic activity by periodate-oxidized non-anticoagulant heparins. *Arzneimittelforschung*. April 1986;36(4):637–42.
334. Perlin AS. Glycol-Cleavage Oxidation. In: *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* [Internet]. Elsevier; 2006 [zitiert 5. April 2019]. S. 183–250. Verfügbar unter: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S006523180660005X>
335. Wei M, Tai G, Gao Y, Li N, Huang B, Zhou Y, u. a. Modified Heparin Inhibits P-selectin-mediated Cell Adhesion of Human Colon Carcinoma Cells to Immobilized Platelets under Dynamic Flow Conditions. *J Biol Chem*. 9. Juli 2004;279(28):29202–10.
336. Daly ME. Determinants of platelet count in humans. *Haematologica*. 1. Januar 2011;96(1):10–3.
337. Evenepoel P, Bammens B, Claes K, Kuypers D, Meijers BKI, Vanrenterghem Y. Measuring Total Blood Calcium Displays a Low Sensitivity for the Diagnosis of Hypercalcemia in Incident Renal Transplant Recipients. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN*. November 2010;5(11):2085–92.
338. Calcein AM Dye [Internet]. G-Biosciences. [zitiert 21. Dezember 2018]. Verfügbar unter: https://www.gbiosciences.com/Calcein_AM_Dye
339. Tenopoulou M, Kurz T, Doulias P-T, Galaris D, Brunk UT. Does the calcein-AM method assay the total cellular 'labile iron pool' or only a fraction of it? *Biochem J*. 15. April 2007;403(2):261–6.
340. Calcein AM Cell Viability Assay [Internet]. [zitiert 1. April 2019]. Verfügbar unter: https://www.gbiosciences.com/Calcein_AM_Cell_Viability_Assay
341. Paniccia R, Priora R, Alessandrello Liotta A, Abbate R. Platelet function tests: a comparative review. *Vasc Health Risk Manag*. Februar 2015;133.
342. Datenblatt_APACT_4004_DE_11-2017.pdf [Internet]. [zitiert 2. Januar 2019]. Verfügbar unter: https://www.labitec.de/wp-content/uploads/2017/11/Datenblatt_APACT_4004_DE_11-2017.pdf
343. Knight AE, Gomez K, Cutler DF. Super-resolution microscopy in the diagnosis of platelet granule disorders. *Expert Rev Hematol*. 4. Mai 2017;10(5):375–81.
344. Maynard DM, Heijnen HFG, Horne MK, White JG, Gahl WA. Proteomic analysis of platelet α -granules using mass spectrometry: Platelet α -granule proteomics. *J Thromb Haemost*. 10. Juli 2007;5(9):1945–55.
345. McNicol A, Israels SJ, Bennett JS. Platelet Dense Granules: Structure, Function and Implications for Haemostasis. *Thromb Res*. 1999 Jul 1;95(1):1-18.

346. Fraga H, Fernandes D, Novotny J, Fontes R, Esteves da Silva JCG. Firefly Luciferase Produces Hydrogen Peroxide as a Coproduct in Dehydroluciferyl Adenylate Formation. *ChemBioChem*. 2. Juni 2006;7(6):929–35.
347. one-glo-luciferase-assay-system-protocol.pdf [Internet]. [zitiert 5. März 2019]. Verfügbar unter: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/one-glo-luciferase-assay-system-protocol.pdf>
348. Brunner G, Nguyen H, Gabrilove J, Wilson L. Basic Fibroblast Growth Factor Expression in Human Bone Marrow and Peripheral Blood Cells. : *Blood*. 1993 Feb 1;81(3):631-8.
349. Smith BW, Strakova J, King JL, Erdman JW, O'Brien WD. Validated Sandwich ELISA for the Quantification of von Willebrand Factor in Rabbit Plasma. *Biomark Insights*. Januar 2010;5:BMI.S6051.
350. Porstmann T, Kiessig ST. Enzyme immunoassay techniques an overview. *J Immunol Methods*. Juni 1992;150(1–2):5–21.
351. Frey A, Meckelein B, Externest D, Schmidt MA. A stable and highly sensitive 3,3X,5,5X-tetramethylbenzidine-based substrate reagent for enzyme-linked immunosorbent assays. 2000;10.
352. Endothelial Cell Tube Formation Assay - DE [Internet]. [zitiert 3. Januar 2019]. Verfügbar unter: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/cell-proliferation-assay-protocols/angiogenesis-protocols/endothelial-cell-tube-formation-assay.html>
353. DeCicco-Skinner KL, Henry GH, Cataisson C, Tabib T, Gwilliam JC, Watson NJ, u. a. Endothelial Cell Tube Formation Assay for the In Vitro Study of Angiogenesis. *J Vis Exp* [Internet]. 1. September 2014 [zitiert 3. Januar 2019];(91). Verfügbar unter: <http://www.jove.com/video/51312/endothelial-cell-tube-formation-assay-for-vitro-study>
354. Gosepath EM. Cisplatin-Resistenz von Tumorzellen: Identifizierung neuer Kandidatengene und Evaluierung der Rolle von DKK1. 2007: urn:nbn:de:hbz:5N-12062
355. Weykam S. Differentielle Genexpression in Cisplatin-resistenten und -sensitiven Ovarialkarzinom-Zelllinien und Untersuchung der Funktion von EMP1. : 2008, ulb Bonn
356. Understanding qPCR Efficiency and Why It Exceeds 100% [Internet]. *Biosistemika*. 2017 [zitiert 3. Januar 2019]. Verfügbar unter: <https://biosistemika.com/blog/qpcr-efficiency-over-100/>

357. Radonić A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun.* Januar 2004;313(4):856–62.
358. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, u. a. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* Oktober 1985;150(1):76–85.
359. Noble JE, Bailey MJA. Chapter 8 Quantitation of Protein. In: *Methods in Enzymology* [Internet]. Elsevier; 2009 [zitiert 3. Januar 2019]. S. 73–95. Verfügbar unter: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687909630081>
360. Sample Buffer, Laemmli 2× Concentrate S3401 [Internet]. Sigma-Aldrich. [zitiert 3. Januar 2019]. Verfügbar unter: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/s3401>
361. Smith BJ. SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. : *Methods Mol Biol.* 1984;1:41-55.
362. Kurien BT, Scofield RH. Protein blotting: a review. *J Immunol Methods.* März 2003;274(1–2):1–15.
363. Leong MM, Milstein C, Pannell R. Luminescent detection method for immunodot, Western, and Southern blots. *J Histochem Cytochem.* Dezember 1986;34(12):1645–50.
364. D085075.pdf [Internet]. [zitiert 3. Januar 2019]. Verfügbar unter: <http://www.biorad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/D085075.pdf>
365. White EH, Zafiriou Oliver, Kagi HH, Hill JHM. Chemilunimescence of Luminol: The Chemical Reaction. *J Am Chem Soc.* März 1964;86(5):940–1.
366. Harrison P, Mackie I, Mumford A, Briggs C, Liesner R, Winter M, u. a. Guidelines for the laboratory investigation of heritable disorders of platelet function: Guideline. *Br J Haematol.* Oktober 2011;155(1):30–44.
367. Dhurat R, Sukesh M. Principles and methods of preparation of platelet-rich plasma: A review and author’s perspective. *J Cutan Aesthetic Surg.* 2014;7(4):189.
368. Fritzsche J. In vitro-Simulation der Funktion von Adhäsionsmolekülen im Prozess der hämatogenen Metastasierung von Tumorzellen und deren Inhibition durch Heparin. :200.
369. Brand GmbH und Co. KG.; *Clinical Lab Zaehlkammern.pdf.*
370. Vu TT, Stafford AR, Leslie BA, Kim PY, Fredenburgh JC, Weitz JI. Batroxobin Binds Fibrin with Higher Affinity and Promotes Clot Expansion to a Greater Extent than Thrombin. *J Biol Chem.* 7. Juni 2013;288(23):16862–71.
371. Castoldi E, Rosing J. Thrombin generation tests. *Thromb Res.* Februar 2011;127:S21-5.

372. Technothrombin® TGA [Internet]. Diapharma. [zitiert 3. Januar 2019]. Verfügbar unter: <https://diapharma.com/product/hemostasis/technothrombin-thrombin-generation-assay-tga/>
373. Naudin C, Burillo E, Blankenberg S, Butler L, Renné T. Factor XII Contact Activation. *Semin Thromb Hemost.* November 2017;43(08):814–26.
374. Bounameaux H. Unfractionated versus low-molecular-weight heparin in the treatment of venous thromboembolism. *Vasc Med.* 1998;3(1):41-6.
375. Alekseeva A, Casu B, Torri G, Pierro S, Naggi A. Profiling glycol-split heparins by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry analysis of their heparinase-generated oligosaccharides. *Anal Biochem.* März 2013;434(1):112–22.
376. Platelet Function Testing: Light Transmission Aggregometry [Internet]. [zitiert 3. April 2019]. Verfügbar unter: http://www.practical-haemostasis.com/Platelets/platelet_function_testing_lta.html
377. H. Schulze, J. Italiano. *Molecular and cellular biology of platelet formation.* New York, NY: Springer Berlin Heidelberg; 2016.
378. Geaquinto DLA, Fernandes RS, Lima LG, Barja-Fidalgo C, Monteiro RQ. Procoagulant properties of human MV3 melanoma cells. *Braz J Med Biol Res.* 11. Januar 2008;41(2):99–105.
379. Berny-Lang MA, Aslan JE, Tormoen GW, Patel IA, Bock PE, Gruber A, u. a. Promotion of experimental thrombus formation by the procoagulant activity of breast cancer cells. *Phys Biol.* 1. Februar 2011;8(1):015014.
380. Haas SL, Jesnowski R, Steiner M, Hummel F, Ringel J, Burstein C, u. a. Expression of tissue factor in pancreatic adenocarcinoma is associated with activation of coagulation. *World J Gastroenterol.* 2006 Aug 14;12(30):4843-9.
381. Ettelaie C, Collier ME, Featherby S, Benelhaj NE, Greenman J, Maraveyas A. Analysis of the potential of cancer cell lines to release tissue factor-containing microvesicles: correlation with tissue factor and PAR2 expression. *Thromb J* [Internet]. Dezember 2016 [zitiert 4. April 2019];14(1). Verfügbar unter: <http://www.thrombosisjournal.com/content/14/1/2>
382. Caldwell JA, Dickhout JG, Al-Hashimi AA, Austin RC. Development of a continuous assay for the measurement of tissue factor procoagulant activity on intact cells. *Lab Invest.* Juni 2010;90(6):953–62.
383. Brufatto N, Ward A, Nesheim ME. Factor Xa is highly protected from antithrombin-fondaparinux and antithrombin-enoxaparin when incorporated into the prothrombinase complex: *Prothrombinase inhibition by fondaparinux and enoxaparin.* *J Thromb Haemost.* Juni 2003;1(6):1258–63.
384. Rezaie AR. Prothrombin protects factor Xa in the prothrombinase complex from inhibition by the heparin-antithrombin complex. *Blood.* 15. April 2001;97(8):2308–13.

385. Boskovic DS, Krishnaswamy S. Exosite Binding Tethers the Macromolecular Substrate to the Prothrombinase Complex and Directs Cleavage at Two Spatially Distinct Sites. *J Biol Chem.* 8. Dezember 2000;275(49):38561–70.
386. Kubitzka D, Becka M, Wensing G, Voith B, Zuehlsdorf M. Safety, pharmacodynamics, and pharmacokinetics of BAY 59-7939—an oral, direct Factor Xa inhibitor—after multiple dosing in healthy male subjects. *Eur J Clin Pharmacol.* Dezember 2005;61(12):873–80.
387. Perzborn E, Strassburger J, Wilmen A, Pohlmann J, Roehrig S, Schlemmer K-H, u. a. In vitro and in vivo studies of the novel antithrombotic agent BAY 59-7939-an oral, direct Factor Xa inhibitor. *J Thromb Haemost.* März 2005;3(3):514–21.
388. Barnes NLP, Warnberg F, Farnie G, White D, Jiang W, Anderson E, u. a. Cyclooxygenase-2 inhibition: effects on tumour growth, cell cycling and lymphangiogenesis in a xenograft model of breast cancer. *Br J Cancer.* Februar 2007;96(4):575–82.
389. Esko JD, H. Prestegard J, Linhardt RJ. Proteins That Bind Sulfated Glycosaminoglycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, u. a., Herausgeber. *Essentials of Glycobiology* [Internet]. 3rd Aufl. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015 [zitiert 5. April 2019]. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK453026/>
390. Heinmöller E, Schropp T, Kisker O, Simon B, Seitz R, Weinel RJ. Tumor Cell-Induced Platelet Aggregation in Vitro by Human Pancreatic Cancer Cell Lines. *Scand J Gastroenterol.* Januar 1995;30(10):1008–16.
391. Heinmöller E, Weinel RJ, Heidtmann HH, Salge U, Seitz R, Schmitz I, u. a. Studies on tumor-cell-induced platelet aggregation in human lung cancer cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol.* Dezember 1996;122(12):735–44.
392. Plavix® 75 mg Filmtabletten Plavix® 300 mg Filmtabletten. 2018;9.
393. von Papen M, Gambaryan S, Schütz C, Geiger J. Determination of ATP and ADP Secretion from Human and Mouse Platelets by an HPLC Assay. *Transfus Med Hemotherapy.* 2013;40(2):109–16.
394. Mahaut-Smith MP, Jones S, Evans RJ. The P2X1 receptor and platelet function. *Purinergic Signal.* September 2011;7(3):341–56.
395. Jones S, Evans RJ, Mahaut-Smith MP. Ca²⁺ Influx through P2X1 Receptors Amplifies P2Y1 Receptor-Evoked Ca²⁺ Signaling and ADP-Evoked Platelet Aggregation. *Mol Pharmacol.* 24. Juli 2014;86(3):243–51.
396. Neely JL, Carlson SS, Lenhart SE. Tinzaparin sodium: A low-molecular-weight heparin. *Am J Health Syst Pharm.* 1. August 2002;59(15):1426–36.
397. Ludwig RJ. Endothelial P-Selectin as a Target of Heparin Action in Experimental Melanoma Lung Metastasis. *Cancer Res.* 15. April 2004;64(8):2743–50.

398. Läubli H, Borsig L. Selectins promote tumor metastasis. *Semin Cancer Biol.* Juni 2010;20(3):169–77.
399. Zhang C, Liu Y, Gao Y, Shen J, Zheng S, Wei M, u. a. Modified heparins inhibit integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ mediated adhesion of melanoma cells to platelets *in vitro* and *in vivo*. *Int J Cancer.* November 2009;125(9):2058–65.
400. Tolmachova T, Abrink M, Futter CE, Authi KS, Seabra MC. Rab27b regulates number and secretion of platelet dense granules. *Proc Natl Acad Sci.* 3. April 2007;104(14):5872–7.
401. van Cruijssen H, Giaccone G, Hoekman K. Epidermal growth factor receptor and angiogenesis: Opportunities for combined anticancer strategies. *Int J Cancer.* 20. Dezember 2005;117(6):883–8.
402. Xin X, Yang S, Ingle G, Zlot C, Rangell L, Kowalski J, u. a. Hepatocyte Growth Factor Enhances Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Angiogenesis *in Vitro* and *in Vivo*. *Am J Pathol.* März 2001;158(3):1111–20.
403. Guo P, Hu B, Gu W, Xu L, Wang D, Huang H-JS, u. a. Platelet-Derived Growth Factor-B Enhances Glioma Angiogenesis by Stimulating Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Tumor Endothelia and by Promoting Pericyte Recruitment. *Am J Pathol.* April 2003;162(4):1083–93.
404. Ferrari G, Cook BD, Terushkin V, Pintucci G, Mignatti P. Transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) induces angiogenesis through vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated apoptosis. *J Cell Physiol.* Mai 2009;219(2):449–58.
405. Shibuya M. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes Cancer.* 1. Dezember 2011;2(12):1097–105.
406. Wodicka J, Chambers A, Sangha G, Goergen C, Panitch A. Development of a Glycosaminoglycan Derived, Selectin Targeting Anti-Adhesive Coating to Treat Endothelial Cell Dysfunction. *Pharmaceuticals.* 29. März 2017;10(4):36.
407. Murugappan S. The role of ADP receptors in platelet function. *Front Biosci.* 2006;11(1):1977.
408. Rousseau A, Van Dreden P, Mbemba E, Elalamy I, Larsen A, Gerotziafas GT. Cancer cells BXP3 and MCF7 differentially reverse the inhibition of thrombin generation by apixaban, fondaparinux and enoxaparin. *Thromb Res.* Dezember 2015;136(6):1273–9.
409. Perzborn E, Roehrig S, Straub A, Kubitzka D, Mueck W, Laux V. Rivaroxaban: A New Oral Factor Xa Inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* März 2010;30(3):376–81.

8. Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Schematische Übersicht der prometastatischen Interaktionen zwischen Tumorzellen und Zellen der Mikroumgebung im chronologischen Verlauf der hämatogenen Metastasierung. Modifiziert nach Labelle et al. (31)..... 5
- Abbildung 2: Simplifizierte Darstellung der hämatogenen Metastasierung und der Tumorzell-Thrombozyten-Kommunikation sowie aus dieser Interaktion resultierender prometastatischer Effekte. Die Abbildung zeigt die Infiltration des Blutgefäßes durch die Tumorzelle, welche gefolgt ist von einer TCIPA. Die Aktivierung der Thrombozyten erfolgt durch Kontakt mit Tumorzellen über Adhäsionsrezeptoren, durch die tumorale Freisetzung von Aktivatoren (ADP) und durch die Gerinnungskaskade (tumorale TF-Präsentation). Aus der Interaktion resultieren eine EMT, der Schutz vor NK-Zellen (Herunterregulierung NKG2D) und dem Scherstress, eine Steigerung der Permeabilität des Endothels und die Rekrutierung von Monozyten zur metastatischen Nische. Abgeschlossen wird die Metastasierung durch die Extravasation und die Proliferation der Tumorzellen (14,16,45,57,60–64). 8
- Abbildung 3: Übersicht der Möglichkeiten durch die eine metastasierende Tumorzelle die Blutgerinnungskaskade aktivieren kann, um eine Thrombingenerierung zu induzieren. Eine Aktivierung ist durch die Präsentation von TF möglich sowie die Freisetzung von *Cancer Procoagulant* oder tumoraler Mikropartikel (61,62,67)..... 11
- Abbildung 4: Schematische stark vereinfachte Darstellung der Signaltransduktion in Thrombozyten nach einer Aktivierung des GPIb-IX-V-Komplexes, des GPVI-Rezeptors, von CLEC2, dem FcγRIIa Rezeptor und dem Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa). Modifiziert nach Estevez et al. (91). 14
- Abbildung 5: Simplifizierte Übersicht der drei Mechanismen durch die Tumorzellen eine Thrombozytenaktivierung während der hämatogenen Metastasierung herbeiführen können (53,56,61,62,67,99,118,119,135,146)..... 21
- Abbildung 6: Stark vereinfachte Darstellung der Granulasekretion sowie der Lokalisation und Interaktion der SNAREs..... 23
- Abbildung 7: Simplifizierte Übersicht der EMT-Induktion durch aktivierte Thrombozyten via Granulasekretion und den direkten Kontakt zu Tumorzellen. Die Abbildung zeigt die Induktoren, die Signaltransduktion sowie morphologische Konsequenzen für die Tumorzellen (190,201,202). 28
- Abbildung 8: Darstellung von Einheiten der Heparinstruktur. Im oberen Teil sind zwei Disaccharide aus Heparansulfat (links) und Heparin (rechts) gezeigt und im unteren Abschnitt das pharmakologisch wirksame Pentasaccharid aus Heparin. Modifiziert nach Grey et al. (255). 37
- Abbildung 9: Übersicht der drei Projekte, aus denen sich diese Arbeit zusammensetzt. Im Wesentlichen unterscheiden sie sich im Medium, in dem die Thrombozyten untersucht

wurden und damit den möglichen Interaktionen (calciumfreies Plasma, recalcifiziertes Plasma, fibrinfreies recalcifiziertes Plasma und recalcifizierter Puffer).....	47
Abbildung 10: Darstellung des Pipettierschemas zur Durchführung eines Adhäsionsassays unter Verwendung von Calcein-AM. Der Boden der Wells war mit einem konfluenten Zellrasen bedeckt. Für jedes Antikoagulans wurde die experimentelle Standardkonzentration entsprechend Abschnitt 4.8 verwendet.....	79
Abbildung 11: Prinzip der Fluoreszenz-Markierung einer Zelle durch Calcein-AM (340).....	79
Abbildung 12: Strahlengang und Funktionsweise der Lichttransmissionsaggregometrie (341,342).....	81
Abbildung 13: Darstellung des Pipettierschemas zur Durchführung der Quantifizierung der Freisetzung der dichten- und der α -Granula. Es wurden die experimentellen Standardkonzentration der Antikoagulantien entsprechend Abschnitt 4.8 verwendet.	84
Abbildung 14: Umwandlung von D-Luciferin zu Oxiluciferin durch <i>Firefly Luciferase</i> (347)....	84
Abbildung 15: Funktionsweise eines Sandwich ELISAs sowie die Umwandlung von Tetramethylbenzidin (349,351).....	86
Abbildung 16: Beispiel zur Effizienz Ermittlung und Berechnung.....	93
Abbildung 17: Beispiel zur housekeeping-Gen-Auswahl; Berechnung und Eingabe in geNorm	94
Abbildung 18: Fluoreszenz-Zyklus-Kurve der PCR-Reaktion. Der threshold ist bei 0,005 Fluoreszenzeinheiten mit linearer (links) und logarithmischer (rechts) Skalierung der Fluoreszenzachse dargestellt (354).	95
Abbildung 19: Schmelzpunktkurve eines PCR-Produktes, welche im Maximum der ersten Ableitung den Schmelzpunkt des PCR-Produktes zeigt (354).	96
Abbildung 20: Änderung der Snail1-Expression zwischen zwei Proben, Beispiel zur Ergebnisberechnung mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode unter Berücksichtigung der spezifischen Normalisierungsfaktoren.....	96
Abbildung 21: Formeln zur Ergebnisberechnung: threshold cycle (C_T), Quantity (Q), Normalisierungsfaktor (NF), relative Expression <i>gene of interest</i> (GOI_{re}), Expressionsänderung (EF), Standardabweichung (SD).	97
Abbildung 22: Luminol-Oxidation mit Wasserstoffperoxid über ein Epoxid-Zwischenprodukt zu 3-Aminophthalat. Modifiziert nach White et al. (365).	101
Abbildung 23: Zählgitter der Neubauer Improved Zählkammer mit entsprechenden Zählfeldern für Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten (368).	104
Abbildung 24: Darstellung des Pipettierschemas zur Durchführung der Quantifizierung der Freisetzung der α -Granula. Es wurden die experimentellen Standardkonzentration der Antikoagulantien entsprechend Abschnitt 4.8 verwendet.	106

- Abbildung 25: Darstellung des Pipettierschemas zur Durchführung der Quantifizierung der Thrombingenerierung. Es wurden die experimentellen Standardkonzentration der Antikoagulantien entsprechend Abschnitt 4.8 verwendet. Zusätzlich zu frisch isoliertem TRP wurden Thrombozyten in Faktor VII-Mangelplasma vermessen. 109
- Abbildung 26: Quantifizierung der Adhäsion von Thrombozyten (400 Mio/mL) an eine konfluente Schicht aus AsPC-1 Zellen sowie der Inhibition durch Antikoagulantien. Dargestellt ist die Adhäsion von unbehandelten Thrombozyten (Aqua) und von Thrombozyten nach einer Präinkubation mit unfraktioniertem Heparin (UFH), Enoxaparin (Enoxa), Tinzaparin (Tinza), Fondaparinux (Fonda), Rivaroxaban (Riva), und reduziertem Oxyheparin in den Konzentrationen 10 µg/mL und 5 µg/mL (RO-Hep 10, RO-Hep 5) nach 15 min (n=3). 113
- Abbildung 27: Quantifizierung der Adhäsion von Thrombozyten (400 Mio/mL) an eine konfluente Schicht aus MDA-MB-231 Zellen sowie der Inhibition durch Antikoagulantien. Dargestellt ist die Adhäsion von unbehandelten Thrombozyten und von Thrombozyten nach einer Präinkubation mit den Antikoagulantien nach 15 min (Abkürzungen analog Abbildung 26) (n=3). 115
- Abbildung 28: Quantifizierung der Adhäsion von Thrombozyten (400 Mio/mL) an eine konfluente Schicht aus MV3 Zellen sowie der Inhibition durch Antikoagulantien. Dargestellt ist die Adhäsion von unbehandelten Thrombozyten und von Thrombozyten nach einer Präinkubation mit den Antikoagulantien nach 15 min (Abkürzungen analog Abbildung 26) (n=3). 116
- Abbildung 29: Quantifizierung der Adhäsion von Thrombozyten (400 Mio/mL) an eine konfluente Schicht aus PC-3 Zellen sowie der Inhibition durch Antikoagulantien. Dargestellt ist die Adhäsion von unbehandelten Thrombozyten und von Thrombozyten nach einer Präinkubation mit den Antikoagulantien nach 15 min (Abkürzungen analog Abbildung 26) (n=3). 116
- Abbildung 30: Darstellung des Verlaufes der Thrombozytenaggregation von recalcifiziertem TRPu (400 Mio/mL) über 1200 s induziert durch AsPC-1 Zellen (10.000 Zellen/mL) sowie der Inhibition durch Antikoagulantien. Es handelt sich um einen repräsentativen Graphen einer Messung (n=3). Unfraktioniertes Heparin (UFH), Reduziertes Oxyheparin 5µg/mL u. 10µg/mL (RO-Hep. 5µg, RO-Hep. 10µg) 118
- Abbildung 31: Darstellung des Verlaufes der Thrombozytenaggregation von recalcifiziertem TRPu (400 Mio/mL) über 1200 s induziert durch MDA-MB-231 Zellen (10.000 Zellen/mL) sowie der Inhibition durch Antikoagulantien. Es handelt sich um einen repräsentativen Graphen einer Messung (n=3). Unfraktioniertes Heparin (UFH), Reduziertes Oxyheparin 5µg/mL u. 10µg/mL (RO-Hep. 5µg, RO-Hep. 10µg) 120
- Abbildung 32: Darstellung des Verlaufes der Thrombozytenaggregation von recalcifiziertem TRPu (400 Mio/mL) über 1200 s induziert durch MV3 Zellen (10.000 Zellen/mL) sowie der Inhibition durch Antikoagulantien. Es handelt sich um einen repräsentativen Graphen einer Messung (n=3). Unfraktioniertes Heparin (UFH), Reduziertes Oxyheparin 5µg/mL u. 10µg/mL (RO-Hep. 5µg, RO-Hep. 10µg) 120

- Abbildung 33: Darstellung des Verlaufes der Thrombozytenaggregation von recalcifiziertem TRPu (400 Mio/mL) über 1200 s induziert durch PC-3 Zellen (10.000 Zellen/mL) sowie der Inhibition durch Antikoagulantien. Es handelt sich um einen repräsentativen Graphen einer Messung (n=3). Unfraktioniertes Heparin (UFH), Reduziertes Oxyheparin 5µg/mL u. 10µg/mL (RO-Hep. 5µg, RO-Hep. 10µg) 121
- Abbildung 34: Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der TCIPA-Inhibition der eingesetzten Antikoagulantien (Messung über 1200s). Induktion der Aggregation erfolgte durch die Zugabe von AsPC-1 Zellen (10.000 Zellen/mL) zu recalcifiziertem TRPu (400 Mio/mL), das mit den entsprechenden Antikoagulantien, in unterschiedlichen Konzentrationen, einer Präinkubation unterzogen wurde. Es handelt sich um repräsentative Graphen einer Messung (n=3)..... 125
- Abbildung 35: Direkter Vergleich der Thrombingenerierung induziert durch die Zugabe von MDA-MB-231 Zellen oder TF zu recalcifiziertem thrombozytenreichen Plasma (320 Mio/mL) (links) sowie zu recalcifiziertem thrombozytenreichen Puffer (400 Mio/mL) (rechts) (n=3).126
- Abbildung 36: Relative Quantifizierung der ATP-Freisetzung von unbehandelten Thrombozyten (400 Mio/mL) (Aqua), von mit TRAP-6 aktivierten Thrombozyten (TRAP-6), von AsPC-1 Zellen (Aqua), von Thrombozyten aktiviert mit AsPC-1 Zellen (Aqua) und von Thrombozyten aktiviert mit AsPC-1 Zellen nach einer Präinkubation mit unfraktioniertem Heparin (UFH), Tinzaparin (Tinza), Enoxaparin (Enoxa), Fondaparinux (Fonda), Rivaroxaban (Riva), und reduziertem Oxyheparin in den Konzentrationen 10 µg/mL und 5 µg/mL (RO-H 1, RO-H 2) (n=3). 129
- Abbildung 37: Relative Quantifizierung der ATP-Freisetzung von unbehandelten Thrombozyten (400 Mio/mL), von mit TRAP-6 aktivierten Thrombozyten, von MDA-MB-231 Zellen, von Thrombozyten aktiviert mit MDA-MB-231 Zellen und von Thrombozyten aktiviert mit MDA-MB-231 Zellen nach einer Präinkubation mit den Testsubstanzen (Abkürzungen analog Abbildung 36). Zusätzliche Darstellung von DMSO-Effekten (n=3)..... 130
- Abbildung 38: Relative Quantifizierung der ATP-Freisetzung von unbehandelten Thrombozyten (400 Mio/mL), von mit TRAP-6 aktivierten Thrombozyten, von MV3 Zellen, von Thrombozyten aktiviert mit MV3 Zellen und von Thrombozyten aktiviert mit MV3 Zellen nach einer Präinkubation mit den Testsubstanzen (Abkürzungen analog Abbildung 36) (n=3). 130
- Abbildung 39: Relative Quantifizierung der ATP-Freisetzung von unbehandelten Thrombozyten (400 Mio/mL), von mit TRAP-6 aktivierten Thrombozyten, von PC-3 Zellen, von Thrombozyten aktiviert mit PC-3 Zellen und von Thrombozyten aktiviert mit PC-3 Zellen nach einer Präinkubation mit den Testsubstanzen (Abkürzungen analog Abbildung 36) (n=3). 131
- Abbildung 40: Vorversuch zur Prüfung einer Beeinträchtigung der VEGF-Quantifizierung via ELISA-Technik durch UFH. 134
- Abbildung 41: Relative Quantifizierung der EGF-Freisetzung von unbehandelten Thrombozyten (400 Mio/mL) (Aqua), von mit TRAP-6 aktivierten Thrombozyten (TRAP-6), von Tumorzellen (10.000/mL) (Aqua), von Thrombozyten aktiviert mit Tumorzellen (Aqua) und von Thrombozyten aktiviert mit Tumorzellen nach einer Präinkubation mit

unfraktioniertem Heparin (UFH), Tinzaparin (Tinza), Enoxaparin (Enoxa), Fondaparinux (Fonda), Rivaroxaban (Riva), und reduziertem Oxyheparin in den Konzentrationen 10 µg/mL und 5 µg/mL (RO-H 1, RO-H 2). Ergebnisse zu den Versuchen mit AsPC-1 Zellen sind oben und zu den Versuchen mit MDA-MB-231 Zellen, inklusive DMSO Effekten, unten dargestellt (n=3). 135

Abbildung 42: Relative Quantifizierung der EGF-Freisetzung von unbehandelten Thrombozyten (400 Mio/mL) (Aqua), von mit TRAP-6 aktivierten Thrombozyten (TRAP-6), von Tumorzellen (10.000/mL) (Aqua), von Thrombozyten aktiviert mit Tumorzellen (Aqua) und von Thrombozyten aktiviert mit Tumorzellen nach einer Präinkubation mit unfraktioniertem Heparin (UFH), Tinzaparin (Tinza), Enoxaparin (Enoxa), Fondaparinux (Fonda), Rivaroxaban (Riva), und reduziertem Oxyheparin in den Konzentrationen 10 µg/mL und 5 µg/mL (RO-H 1, RO-H 2). Ergebnisse zu den Versuchen mit MV3 Zellen sind oben und zu den Versuchen mit PC-3 Zellen unten dargestellt (n=3). 136

Abbildung 43: Relative Quantifizierung der HGF-Freisetzung von unbehandelten Thrombozyten (400 Mio/mL) (Aqua), von mit TRAP-6 aktivierten Thrombozyten (TRAP-6), von Tumorzellen (10.000/mL) (Aqua), von Thrombozyten aktiviert mit Tumorzellen (Aqua) und von Thrombozyten aktiviert mit Tumorzellen nach einer Präinkubation mit unfraktioniertem Heparin (UFH), Tinzaparin (Tinza), Enoxaparin (Enoxa), Fondaparinux (Fonda), Rivaroxaban (Riva), und reduziertem Oxyheparin in den Konzentrationen 10 µg/mL und 5 µg/mL (RO-H 1, RO-H 2). Ergebnisse zu den Versuchen mit AsPC-1 Zellen sind oben und zu den Versuchen mit MDA-MB-231 Zellen unten dargestellt (n=2). 137

Abbildung 44: Relative Quantifizierung der HGF-Freisetzung von unbehandelten Thrombozyten (400 Mio/mL) (Aqua), von mit TRAP-6 aktivierten Thrombozyten (TRAP-6), von Tumorzellen (10.000/mL) (Aqua), von Thrombozyten aktiviert mit Tumorzellen (Aqua) und von Thrombozyten aktiviert mit Tumorzellen nach einer Präinkubation mit unfraktioniertem Heparin (UFH), Tinzaparin (Tinza), Enoxaparin (Enoxa), Fondaparinux (Fonda), Rivaroxaban (Riva), und reduziertem Oxyheparin in den Konzentrationen 10 µg/mL und 5 µg/mL (RO-H 1, RO-H 2). Ergebnisse zu den Versuchen mit MV3 Zellen sind oben und zu den Versuchen mit PC-3 Zellen unten dargestellt (n=2). 138

Abbildung 45: Relative Quantifizierung der PDGF-B-Freisetzung von unbehandelten Thrombozyten (400 Mio/mL) (Aqua), von mit TRAP-6 aktivierten Thrombozyten (TRAP-6), von Tumorzellen (10.000/mL) (Aqua), von Thrombozyten aktiviert mit Tumorzellen (Aqua) und von Thrombozyten aktiviert mit Tumorzellen nach einer Präinkubation mit unfraktioniertem Heparin (UFH), Tinzaparin (Tinza), Enoxaparin (Enoxa), Fondaparinux (Fonda), Rivaroxaban (Riva), und reduziertem Oxyheparin in den Konzentrationen 10 µg/mL und 5 µg/mL (RO-H 1, RO-H 2). Ergebnisse zu den Versuchen mit AsPC-1 Zellen sind oben und zu den Versuchen mit MDA-MB-231 Zellen, inklusive DMSO Effekten, unten dargestellt (n=3). 140

Abbildung 46: Relative Quantifizierung der PDGF-B-Freisetzung von unbehandelten Thrombozyten (400 Mio/mL) (Aqua), von mit TRAP-6 aktivierten Thrombozyten (TRAP-6), von Tumorzellen (10.000/mL) (Aqua), von Thrombozyten aktiviert mit Tumorzellen (Aqua) und von Thrombozyten aktiviert mit Tumorzellen nach einer Präinkubation mit unfraktioniertem Heparin (UFH), Tinzaparin (Tinza), Enoxaparin (Enoxa), Fondaparinux (Fonda), Rivaroxaban (Riva), und reduziertem Oxyheparin in den Konzentrationen 10 µg/mL

und 5 µg/mL (RO-H 1, RO-H 2). Ergebnisse zu den Versuchen mit MV3 Zellen sind oben und zu den Versuchen mit PC-3 Zellen unten dargestellt (n=3)..... 141

Abbildung 47: Relative Quantifizierung der TGF-β1-Freisetzung von unbehandelten Thrombozyten (400 Mio/mL) (Aqua), von mit TRAP-6 aktivierten Thrombozyten (TRAP-6), von Tumorzellen (10.000/mL) (Aqua), von Thrombozyten aktiviert mit Tumorzellen (Aqua) und von Thrombozyten aktiviert mit Tumorzellen nach einer Präinkubation mit unfraktioniertem Heparin (UFH), Tinzaparin (Tinza), Enoxaparin (Enoxa), Fondaparinux (Fonda), Rivaroxaban (Riva), und reduziertem Oxyheparin in den Konzentrationen 10 µg/mL und 5 µg/mL (RO-H 1, RO-H 2). Ergebnisse zu den Versuchen mit AsPC-1 Zellen sind oben und zu den Versuchen mit MDA-MB-231 Zellen, inklusive DMSO Effekten, unten dargestellt (n=3)..... 142

Abbildung 48: Relative Quantifizierung der TGF-β1-Freisetzung von unbehandelten Thrombozyten (400 Mio/mL) (Aqua), von mit TRAP-6 aktivierten Thrombozyten (TRAP-6), von Tumorzellen (10.000/mL) (Aqua), von Thrombozyten aktiviert mit Tumorzellen (Aqua) und von Thrombozyten aktiviert mit Tumorzellen nach einer Präinkubation mit unfraktioniertem Heparin (UFH), Tinzaparin (Tinza), Enoxaparin (Enoxa), Fondaparinux (Fonda), Rivaroxaban (Riva), und reduziertem Oxyheparin in den Konzentrationen 10 µg/mL und 5 µg/mL (RO-H 1, RO-H 2). Ergebnisse zu den Versuchen mit MV3 Zellen sind oben und zu den Versuchen mit PC-3 Zellen unten dargestellt (n=3)..... 143

Abbildung 49: Relative Quantifizierung der VEGF-Freisetzung von unbehandelten Thrombozyten (400 Mio/mL) (Aqua), von mit TRAP-6 aktivierten Thrombozyten (TRAP-6), von Tumorzellen (10.000/mL) (Aqua), von Thrombozyten aktiviert mit Tumorzellen (Aqua) und von Thrombozyten aktiviert mit Tumorzellen nach einer Präinkubation mit unfraktioniertem Heparin (UFH), Tinzaparin (Tinza), Enoxaparin (Enoxa), Fondaparinux (Fonda), Rivaroxaban (Riva), und reduziertem Oxyheparin in den Konzentrationen 10 µg/mL und 5 µg/mL (RO-H 1, RO-H 2). Ergebnisse zu den Versuchen mit AsPC-1 Zellen sind oben und zu den Versuchen mit MDA-MB-231 Zellen, inklusive DMSO Effekten, unten dargestellt (n=3)..... 145

Abbildung 50: Relative Quantifizierung der VEGF-Freisetzung von unbehandelten Thrombozyten (400 Mio/mL) (Aqua), von mit TRAP-6 aktivierten Thrombozyten (TRAP-6), von Tumorzellen (10.000/mL) (Aqua), von Thrombozyten aktiviert mit Tumorzellen (Aqua) und von Thrombozyten aktiviert mit Tumorzellen nach einer Präinkubation mit unfraktioniertem Heparin (UFH), Tinzaparin (Tinza), Enoxaparin (Enoxa), Fondaparinux (Fonda), Rivaroxaban (Riva), und reduziertem Oxyheparin in den Konzentrationen 10 µg/mL und 5 µg/mL (RO-H 1, RO-H 2). Ergebnisse zu den Versuchen mit MV3 Zellen sind oben und zu den Versuchen mit PC-3 Zellen unten dargestellt (n=3)..... 146

Abbildung 51: Quantifizierung des angiogenetischen Potentials der freigesetzten Granulainhalte aus einer Thrombozytenaktivierung mit AsPC-1 Zellen. Dargestellt ist die Auszählung der Verzweigungen von EA.hy926 Zellen (35.000/Well), nach einer Inkubation von 24 h mit 210 ng VEGF (VEGF) oder 45 µL des freigesetzten Granulainhaltes aus folgenden Reaktionen: unbehandelte Thrombozyten (400 Mio/mL) (Aqua), Thrombozyten aktiviert mit TRAP-6 (TRAP-6), Tumorzellen (10.000/mL) (Aqua), Thrombozyten aktiviert mit Tumorzellen (Aqua) und Thrombozyten aktiviert mit Tumorzellen nach einer Präinkubation mit unfraktioniertem Heparin (UFH), Tinzaparin (Tinza), Enoxaparin (Enoxa), Fondaparinux

(Fonda), Rivaroxaban (Riva), und reduziertem Oxyheparin in den Konzentrationen 10 µg/mL und 5 µg/mL (RO-H 1, RO-H 2) (n=3) (links). Auswahl repräsentativer Bilder der Wells (Maßstabsleiste entspricht 200 µm) (rechts). 152

Abbildung 52: Quantifizierung des angiogenetischen Potentials der freigesetzten Granulainhalte aus einer Thrombozytenaktivierung mit MDA-MB-231 Zellen. Dargestellt ist die Auszählung der Verzweigungen von EA.hy926 Zellen (35.000/Well) nach einer Inkubation von 24 h mit 210 ng VEGF (VEGF) oder mit 45 µL des freigesetzten Granulainhaltes aus Reaktionen analog Abbildung 51, mit dem Unterschied, dass MDA-MB-231 Zellen verwendet wurden (Abkürzungen analog Abbildung 51) (n=3) (links). Auswahl repräsentativer Bilder der Wells (Maßstabsleiste entspricht 200 µm) (rechts)..... 153

Abbildung 53: Quantifizierung des angiogenetischen Potentials der freigesetzten Granulainhalte aus einer Thrombozytenaktivierung mit MV3 Zellen. Dargestellt ist die Auszählung der Verzweigungen von EA.hy926 Zellen (35.000/Well) nach einer Inkubation von 24 h mit 210 ng VEGF (VEGF) oder mit 45 µL des freigesetzten Granulainhaltes aus Reaktionen analog Abbildung 51, mit dem Unterschied, dass MV3 Zellen verwendet wurden (Abkürzungen analog Abbildung 51) (n=3) (links). Auswahl repräsentativer Bilder der Wells (Maßstabsleiste entspricht 200 µm) (rechts). 153

Abbildung 54: Quantifizierung des angiogenetischen Potentials der freigesetzten Granulainhalte aus einer Thrombozytenaktivierung mit PC-3 Zellen. Dargestellt ist die Auszählung der Verzweigungen von EA.hy926 Zellen(35.000/Well) nach einer Inkubation von 24 h mit 210 ng VEGF (VEGF) oder mit 45 µL des freigesetzten Granulainhaltes aus Reaktionen analog Abbildung 51 mit dem Unterschied, dass PC-3 Zellen verwendet wurden (Abkürzungen analog Abbildung 51) (links) (n=3). Auswahl repräsentativer Bilder der Wells (rechts) (Maßstabsleiste entspricht 200 µm). 154

Abbildung 55: Quantifizierung der relativen Expressionsänderung der m-RNA von Vimentin und den EMT-induzierenden Transkriptionsfaktoren Snail1, Slug, Zeb2 und Twist1 von unbehandelten AsPC-1 Zellen und nach einer EMT-Induktion (72 h) mit Thrombozyten (200 Mio/mL) in An- und Abwesenheit von UFH oder Enoxaparin. Die Angabe der mRNA-Expressionsänderung erfolgte als Faktor und wurde auf unbehandelte AsPC-1 Zellen normalisiert (n=3). 158

Abbildung 56: Quantifizierung der relativen Expressionsänderung der m-RNA von Vimentin und den EMT-induzierenden Transkriptionsfaktoren Snail1, Slug, Zeb2 und Twist1 von unbehandelten PC-3 Zellen und nach einer EMT-Induktion (72 h) mit Thrombozyten (200 Mio/mL) in An- und Abwesenheit von UFH oder Enoxaparin. Die Angabe der mRNA-Expressionsänderung erfolgte als Faktor und wurde auf unbehandelte PC-3 Zellen normalisiert (n=3). 159

Abbildung 57: Quantifizierung der Proteinexpression von Vimentin und E-Cadherin, in unbehandelten AsPC-1 Zellen, in AsPC-1 Zellen nach einer EMT-Induktion (72 h) mit Thrombozyten (200 Mio/mL) und in AsPC-1 Zellen nach einer EMT-Induktion mit Thrombozyten in Anwesenheit von UFH oder Enoxaparin. Ergebnisse wurden via Messung der Pixeldichte quantifiziert und auf unbehandelte AsPC-1 Zellen normalisiert. Die Darstellung erfolgte als prozentualer Anteil (rechts) (n=3) und als repräsentative Western Blot-Banden (links). 160

- Abbildung 58: Quantifizierung der Proteinexpression von Vimentin und E-Cadherin, in unbehandelten PC-3 Zellen, in PC-3 Zellen nach einer EMT-Induktion (72 h) mit Thrombozyten (200 Mio/mL) und in PC-3 Zellen nach einer EMT-Induktion mit Thrombozyten in Anwesenheit von UFH oder Enoxaparin. Ergebnisse wurden via Messung der Pixeldichte quantifiziert und auf unbehandelte PC-3 Zellen normalisiert. Die Darstellung erfolgte als prozentualer Anteil (rechts) (n=3) und als repräsentative Western Blot Banden (links). 160
- Abbildung 59: Zur Quantifizierung funktioneller Konsequenzen der EMT, wurde in einer konfluenten Zellschicht, nach FKS-Entzug (min. 16 h), ein Spalt erzeugt. Über 72 h wurde der Verschluss dieses Spaltes dokumentiert. Es wurden unbehandelten AsPC-1 Zellen, AsPC-1 Zellen nach einer EMT-Induktion (72 h) mit Thrombozyten (200 Mio/mL) und AsPC-1 Zellen nach einer EMT-Induktion mit Thrombozyten in Anwesenheit von UFH oder Enoxaparin untersucht. Die Quantifizierung erfolgte durch die mikroskopische Dokumentation des Verschlusses (links; repräsentative Bilder) und die Messung der Spaltgröße mit der Software ImageJ (rechts). Die Verkleinerung des Spaltes wurde als prozentualer Anteil der Größe zum Zeitpunkt 0 h dargestellt (Maßstabsleiste entspricht 50 µm) (n=3). 161
- Abbildung 60: Zur Quantifizierung funktioneller Konsequenzen der EMT, wurde in einer konfluenten Zellschicht, nach FKS-Entzug (min. 16 h), ein Spalt erzeugt. Über 72 h wurde der Verschluss dieses Spaltes dokumentiert. Es wurden unbehandelten PC-3 Zellen, PC-3 Zellen nach einer EMT-Induktion (72 h) mit Thrombozyten (200 Mio/mL) und PC-3 Zellen nach einer EMT-Induktion mit Thrombozyten in Anwesenheit von UFH oder Enoxaparin untersucht. Die Quantifizierung erfolgte durch die mikroskopische Dokumentation des Verschlusses (links; repräsentative Bilder) und die Messung der Spaltgröße mit der Software ImageJ (rechts). Die Verkleinerung des Spaltes wurde als prozentualer Anteil der Größe zum Zeitpunkt 0 h dargestellt (Maßstabsleiste entspricht 50 µm) (n=3). 162
- Abbildung 61: Vergleich der Thrombingenerierung in recalcifiziertem Plasma, in calciumfreien Plasma und in recalcifiziertem fibrinfreien Plasma nach einer TF-Zugabe. Zusätzliche Prüfung der Thrombinbildung induziert durch MV3 Zellen in calciumfreien Plasma. Es handelt sich um repräsentative Graphen einer Messung (n=3). 169
- Abbildung 62: Absolute Quantifizierung der VEGF-Freisetzung in calciumfreien Plasma von MV3 Zellen (MV3), von unbehandelten Thrombozyten (400 Mio/mL) (Aqua), von mit ADP aktivierten Thrombozyten (ADP), von mit TRAP-6 aktivierten Thrombozyten (TRAP-6) und von Thrombozyten mit MV3 Zellen aktiviert (MV3) (n=3). 170
- Abbildung 63: Absolute Quantifizierung der CXCL5- und CXCL7-Freisetzung in calciumfreien Plasma von unbehandelten Thrombozyten (400 Mio/mL) (Aqua), von mit ADP aktivierten Thrombozyten (ADP), von mit TRAP-6 aktivierten Thrombozyten (TRAP-6) und von Thrombozyten mit MV3 Zellen aktiviert (MV3) (n=3). 170
- Abbildung 64: Vergleich der Inhibition der VEGF-Freisetzung in calciumfreien Plasma und recalcifiziertem fibrinfreien Plasma von Thrombozyten (400 Mio/mL) (Aqua) aktiviert mit MV3 Zellen und von Thrombozyten aktiviert mit MV3 Zellen nach einer Präinkubation mit UFH (UFH) oder Fondaparinux (Fonda) (n=3). 172
- Abbildung 65: Vergleich der Inhibition der CXCL5- und CXCL7-Freisetzung in calciumfreien Plasma und recalcifiziertem fibrinfreien Plasma von Thrombozyten (400 Mio/mL) (Aqua)

- aktiviert mit MV3 Zellen und von Thrombozyten aktiviert mit MV3 Zellen nach einer Präinkubation mit UFH (UFH) oder Fondaparinux (Fonda) (n=3)..... 173
- Abbildung 66: Quantifizierung der TF-Präsentation der vier verwendeten Tumorzelllinien. Es handelt sich um repräsentative Graphen einer Messung (n=3)..... 176
- Abbildung 67: Quantifizierung der Thrombingenerierung induziert durch Tumorzellen (10.000/mL) in recalcifiziertem Faktor VII-Mangelplasma. Es handelt sich um repräsentative Graphen einer Messung (n=3). 177
- Abbildung 68: Prüfung der Aktivierbarkeit des recalcifizierten mit CTI versetzten TRPs durch eine TF-Zugabe (links). Quantifizierung der Effekte des Lösungsmittels von Rivaroxaban DMSO anhand von MDA-MB-231 Zellen (10.000/mL) (rechts). Es handelt sich um repräsentative Graphen einer Messung (n=3)..... 177
- Abbildung 69: Prüfung der korrekten Funktionsweise der eingesetzten Antikoagulantien anhand einer Thrombingenerierung induziert durch eine TF-Zugabe. Es handelt sich um repräsentative Graphen einer Messung (n=3)..... 178
- Abbildung 70: Quantifizierung der Induktion einer Thrombingenerierung in recalcifiziertem TRP durch AsPC-1 Zellen (10.000/mL) und der Inhibition dieser durch Antikoagulantien. Es handelt sich um repräsentative Graphen einer Messung (n=3). Unfraktioniertes Heparin (UFH), Reduziertes Oxyheparin 5µg/mL u. 10µg/mL (RO-Hep. 5µg, RO-Hep. 10µg) 179
- Abbildung 71: Quantifizierung der Induktion einer Thrombingenerierung in recalcifiziertem TRP durch MDA-MB-231 Zellen (10.000/mL) und der Inhibition dieser durch Antikoagulantien. Es handelt sich um repräsentative Graphen einer Messung (n=3). Unfraktioniertes Heparin (UFH), Reduziertes Oxyheparin 5µg/mL u. 10µg/mL (RO-Hep. 5µg, RO-Hep. 10µg)..... 179
- Abbildung 72: Quantifizierung der Induktion einer Thrombingenerierung in recalcifiziertem TRP durch MV3 Zellen (10.000/mL) und der Inhibition dieser durch Antikoagulantien. Es handelt sich um repräsentative Graphen einer Messung (n=3). Unfraktioniertes Heparin (UFH), Reduziertes Oxyheparin 5µg/mL u. 10µg/mL (RO-Hep. 5µg, RO-Hep. 10µg) 180
- Abbildung 73: Quantifizierung der Induktion einer Thrombingenerierung in recalcifiziertem TRP durch PC-3 Zellen (10.000/mL) und der Inhibition dieser durch Antikoagulantien. Es handelt sich um repräsentative Graphen einer Messung (n=3). Unfraktioniertes Heparin (UFH), Reduziertes Oxyheparin 5µg/mL u. 10µg/mL (RO-Hep. 5µg, RO-Hep. 10µg) 181

8.2 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Übersicht der antikoagulativen Wirkstoffe (240–242).</i>	35
<i>Tabelle 2: Informationen zu den verwendeten Chemikalien.</i>	48
<i>Tabelle 3: Informationen zu den verwendeten Antikörpern.</i>	53
<i>Tabelle 4: Informationen zu den verwendeten Primern.</i>	54
<i>Tabelle 5: Informationen zu den verwendeten Antikoagulantien.</i>	55
<i>Tabelle 6: Informationen zu den verwendeten hergestellten Puffern, Lösungen und Nährmedien.</i>	56
<i>Tabelle 7: Informationen zu den verwendeten hergestellten Primerlösungen.</i>	60
<i>Tabelle 8: Informationen zu den hergestellten und verwendeten Antikoagulantienlösungen.</i>	62
<i>Tabelle 9: Informationen zu den verwendeten hergestellten Antikörperlösungen.</i>	63
<i>Tabelle 10: Informationen zu den verwendeten Verbrauchsmaterialien.</i>	64
<i>Tabelle 11: Informationen zu den verwendeten ELISA-Kits.</i>	67
<i>Tabelle 12: Informationen zu den verwendeten Geräten.</i>	68
<i>Tabelle 13: Informationen zu den verwendeten Geräten.</i>	71
<i>Tabelle 14: Informationen zu den verwendeten Konzentrationen der Antikoagulantien(256,259,260,264,272).</i>	77
<i>Tabelle 15: Informationen zu den eingesetzten Konzentrationen der Antikoagulantien.</i>	82
<i>Tabelle 16: Informationen zur Zusammensetzung der Proben und Kontrollen der Thrombingenerierung</i>	109
<i>Tabelle 17: Informationen zur Zusammensetzung der Kalibrierung.</i>	110
<i>Tabelle 18: Überblick der Wirkmechanismen der eingesetzten Testsubstanzen (256,259–261,264,271,272,374,375).</i>	112
<i>Tabelle 19: Übersicht der Signifikanzen der Inhibitionen der Granulafreisetzung; unfraktioniertes Heparin (UFH), Tinzaparin (Tinza), Enoxaparin (Enoxa), Fondaparinux (Fonda), Rivaroxaban (Riva), und reduziertes Oxyheparin in den Konzentrationen 10 µg/mL und 5 µg/mL (RO-Hep 10 µg/mL, RO-Hep 5 µg/mL)</i>	149

8.3 Publikationsliste

Gockel L.M., Ponert J.M., 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 Nov; 23(11): 2753. (Oktober 2018)

Ponert J.M., Gockel L.M., Henze S., Schlesinger M.

Unfractionated and Low Molecular Weight Heparin Reduce Platelet Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Pancreatic and Prostate Cancer Cells.

Molecules. 2018 Oct; 23(10): 2690 (Oktober 2018)

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

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

PLoS One. 2018; 13(1): e0191303 (Januar 2018)

8.4 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Gerd Bendas für die Überlassung des hochinteressanten Themas. Zudem verdanke ich ihm jede erdenkliche Unterstützung und viele inspirierende Diskussionen im Laufe der Promotion. Jede Phase dieser Arbeit wurde intensiv und professionell von ihm begleitet.

Auch Dr. Martin Schlesinger gilt mein herzlicher Dank, da er mich stets bei der Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente, der vorliegenden Arbeit, mit seinem großen Erfahrungsschatz und Fachwissen unterstützte. Außerdem lehrte er mich die Grundlagen des wissenschaftlichen und hämatologischen Arbeitens, wofür ich sehr dankbar bin.

Außerdem bedanke ich mich bei meinen beiden ehemaligen Masterstudenten*innen Lukas und Svenja für die gute Zusammenarbeit und gemeinsame Zeit.

Bei Eva Hanfland bedanke ich mich für die stete und exzellente Versorgung mit Thrombozytenkonzentraten.

Iris Jusen, Dieter Baumert und Svenja Henze danke ich für die Unterstützung bei allen technischen Fragen und der Durchführung von Bestellungen.

Ebenso bedanke ich mich bei allen Kollegen, die mir jederzeit hilfsbereit zur Seite standen und in der Regel aus einem normalen Arbeitstag, durch ihren Sinn für Humor und ihre Unternehmenslust meistens einen schönen Tag machten.

Dem Bundesministerium für Bildung und Forschung und der Bonn International Graduate School of Drug Sciences (BIGS DrugS) danke ich für die Stipendien zur Finanzierung dieser Arbeit.

Meiner Mutter gilt mein herzlicher Dank, da Sie mich stets unterstützt hat und maßgeblich zur Ermöglichung meines beruflichen Werdegangs sowie letztendlich zur Anfertigung dieser Arbeit beigetragen hat.

Außerdem möchte ich noch meiner Ehefrau Stefanie für Ihre Unterstützung danken.

Schließlich möchte ich noch meinem Bruder danken der mich immer bei allem unterstützt hat sowie meiner Schwägerin Maria und meinem Patenkind Lina.