

**Einblicke in die molekularen Mechanismen einer
Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung und
Identifikation von P-Selektin als essentiellen Rezeptor für die
Aktivierung von Thrombozyten durch
Mammakarzinomzelllinien**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Svenja Schwarz

aus Köln

Bonn, September 2021

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

1. Gutachter: Prof. Dr. Gerd Bendas

2. Gutachter: PD Dr. Martin Schlesinger

Tag der mündlichen Prüfung: 12.11.2021

Erscheinungsjahr: 2022

Für Finn

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
1 EINLEITUNG	1
2 THEORETISCHER HINTERGRUND DER ARBEIT	3
2.1 Überblick über die hämatogene Metastasierung	3
2.2 Rolle der Thrombozyten während der hämatogenen Metastasierung	9
2.2.1 Einfluss Tumorzell-assoziiertes Thrombozyten auf die Immunantwort	10
2.2.2 Einfluss Tumorzell-assoziiertes Thrombozyten auf die Extravasation im Zielgewebe	12
2.2.3 Einfluss Tumorzell-assoziiertes Thrombozyten auf die Angiogenese	12
2.2.4 Rolle der Thrombozyten in der Krebsdiagnostik	13
2.3 Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung	14
2.3.1 Thrombozytenaktivierung infolge einer Tumorzell-vermittelten Aktivierung des Blutgerinnungssystems	14
2.3.1.1 Thrombin	16
2.3.2 Die Induktion einer Thrombozytenaktivierung via Tumorzell-assoziiertes lösliches Mediatorstoffe	21
2.3.3 Thrombozytenaktivierung infolge des direkten Kontakts mit Tumorzellen.....	25
2.3.3.1 Integrine.....	25
2.3.3.1.1 Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$	26
2.3.3.1.2 Integrin $\alpha_6\beta_1$	27
2.3.3.2 GPIIb-IX-V	28
2.3.3.3 CLEC-2.....	29
2.3.3.4 Fc γ RIIa	30
2.3.3.5 GPVI	30
2.3.3.6 P-Selektin	31
2.3.3.6.1 Liganden des P-Selektin	32
2.3.3.6.2 Rolle des P-Selektins im metastatischen Geschehen.....	34
2.3.3.6.3 Heparine und ihre Rolle in der Blockade der Selektine.....	35
3 ZIEL DER ARBEIT	39
4 MATERIAL	43
4.1 Chemikalien und Reagenzien	43
4.1.1 Allgemeine Chemikalien und Ausgangsstoffe	43
4.1.2 Antikörper und rekombinante Proteine.....	45
4.1.3 Thrombozyten-Agonisten	46
4.1.4 Thrombozyten-Inhibitoren	47
4.1.4.1 <i>small molecule</i> Inhibitoren.....	47
4.1.4.2 Heparin-Derivate	47
4.1.5 <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> Kits.....	48

4.1.6 <i>Proteome Profiler Array Kits</i>	48
4.1.7 Hergestellte Reagenzien	48
4.1.7.1 Zellkultur	48
4.1.7.2 Aufarbeitung der Thrombozyten	49
4.1.7.3 ATP-Freisetzungs-Assay	50
4.1.7.4 <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>	50
4.1.7.5 Adhäsionsassay	51
4.1.7.6 Durchflusszytometrie	51
4.1.7.7 Untersuchung thrombozytärer Signalprozesse	51
4.2 Verbrauchsmaterialien	53
4.3 Geräte	55
4.4 Software	57
5 METHODEN	59
5.1 Zellkultur	59
5.1.1 Kryokonservierung und Inkulturnahme	59
5.1.2 Zelllinien und ihre entsprechende Kultivierung	59
5.1.2.1 MDA-MB-231 Zellen	59
5.1.2.2 MCF-7 Zellen	60
5.1.2.3 A375 Zellen	60
5.1.3 Zellzahlbestimmung	61
5.2 Thrombozytenisolation und -präparation aus Thrombozytenkonzentrat	61
5.2.1 Herstellung von Thrombozyten-reichem Puffer (TRP)	62
5.2.2 Herstellung von gewaschenen Thrombozyten in Puffer (wTRP)	62
5.3 Einsatz verschiedener Inhibitoren zur Evaluation der Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung	63
5.3.1 Inkubation der Thrombozyten mit Inhibitoren	63
5.3.2 Inkubation der Tumorzellen mit Inhibitoren	65
5.3.2.1 Behandlung der Tumorzellen mit einem Fucosyltransferase-Inhibitor	66
5.4 Aktivierung der Thrombozyten zur Untersuchung der thrombozytären Granulafreisetzung	66
5.5 Quantifizierung der ATP-Freisetzung aus der thrombozytären dichten Granula	68
5.6 Quantifizierung der Freisetzung verschiedener Proteine aus der thrombozytären α-Granula	69
5.6.1 Durchführung des <i>enzyme-linked immunosorbent assays</i> (ELISA)	70
5.6.2 Durchführung des <i>Proteome Profiler Arrays</i>	71
5.7 Lichttransmissionsaggregometrie	73
5.8 Thrombin-Generierungs-Assay	75
5.9 Adhäsionsassay	77

5.10 Untersuchung von zellulären Oberflächenstrukturen mittels Durchflusszytometrie	78
5.10.1 Detektion von P-Selektin auf der Oberfläche von Thrombozyten	78
5.10.2 Detektion von Liganden des P-Selektins und TF auf Tumorzellen	79
5.11 Untersuchungen zu thrombozytären Signalprozessen	81
5.11.1 Thrombozytenlyse und Bestimmung der Gesamtproteinmenge	81
5.11.2 SDS-Page und Western Blot	82
5.11.3 <i>Phospho-Kinase Array</i>	84
5.12 Statistik	84
6 ERGEBNISSE UND DISKUSSION	87
6.1 Etablierung eines <i>in vitro</i>-Testsystems zur Evaluation der Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung	87
6.1.1 Evaluation verschiedener Methoden der Aufbereitung von Thrombozyten aus Thrombozytenkonzentrat	88
6.1.2 Evaluation verschiedener Tumorzellkonzentrationen zur Induktion einer Thrombozytenaktivierung	93
6.1.3 Beitrag des Tumorzell-sezernierten ATP zur Gesamtkonzentration	95
6.2 Die Rolle der Gerinnung für die Thrombozytenaktivierung im etablierten <i>in vitro</i>-Testsystem	96
6.2.1 Quantifizierung der Tumorzell-induzierten Thrombin-Generierung im entwickelten Testsystem	96
6.2.2 Durchflusszytometrischer Nachweis der TF-Expression auf Mammakarzinomzellen	97
6.2.3 Beitrag von Thrombin zur Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung	99
6.2.4 Beitrag verschiedener thrombozytärer Zielstrukturen des Thrombins zur Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung	101
6.2.5 Einfluss der Inhibition verschiedener thrombozytärer Zielstrukturen des Thrombins auf die Freisetzung von Proteinen aus der α -Granula	103
6.2.6 Einfluss der Inhibition verschiedener thrombozytärer Zielstrukturen des Thrombins auf die Freisetzung von pro- und antiangiogenetischen Wachstumsfaktoren	107
6.3 Beitrag verschiedener Aktivierungsmechanismen zur Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung	112
6.3.1 Beteiligung des TXA ₂ -Rezeptors an der Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung	113
6.3.2 Beteiligung des P2Y ₁₂ -Rezeptors an der Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung	115
6.3.3 Beteiligung des GPVI an der Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung	117
6.3.4 Beteiligung des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ an der Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung	119
6.3.5 Untersuchung des Einflusses weiterer Inhibitoren auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung	122
6.3.6 Untersuchung des Einflusses von UFH auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung	123
6.4 Einfluss von P-Selektin auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung	124
6.4.1 Einfluss verschiedener Heparin-Derivate auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung	125
6.4.2 Einfluss einer Inhibition von P-Selektin auf die PAR-1 vermittelte Thrombozytenaktivierung	133

6.4.3 Nachweis von P-Selektin auf der Oberfläche von ruhenden Thrombozyten, sowie nach einer Tumorzell-induzierten Aktivierung	135
6.4.4 Einfluss des P-Selektins auf die späte Phase der TCIPA	136
6.4.5 Einfluss der Inhibition von P-Selektin auf die Tumorzell-induzierte Freisetzung verschiedener Proteine aus der thrombozytären α -Granula	138
6.5 Beitrag von Tumorzell-ständigen Liganden des P-Selektins zur TCIPA	139
6.5.1 Nachweis der Bindung von P-Selektin an Tumorzellen	140
6.5.2 Einfluss der P-Selektin Liganden auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung	140
6.5.2.1 Einfluss von CD24 auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung	145
6.6 Beteiligung von P-Selektin am thrombozytären <i>signaling</i> infolge einer Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung	149
7 ZUSAMMENFASSUNG	153
8 LITERATURVERZEICHNIS	159
9 ANHANG	189
9.1 Abbildungsverzeichnis	189
9.2 Tabellenverzeichnis	192
9.3 Publikationsliste	194

Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
ACD-A	Acid-Citrat-Dextrose-A Lösung
ADAM	<i>a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein</i>
ADP	Adenosindiphosphat
Ak	Antikörper
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CHO	<i>chinese hamster ovary</i>
CLEC-2	<i>C-type lectin-like receptor 2</i>
COX-1	Cyclooxygenase-1
CTI	<i>corn trypsin inhibitor</i>
CXCL	CXC Motiv Chemokin Ligand
CXCR	CXC Motiv Chemokin Rezeptor
DAMP	<i>damage associated molecular pattern molecules</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate- Buffered Saline</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EGFRvIII	<i>epidermal growth factor receptor variant III</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMT	Epithelial-Mesenchymale Transition
EZM	extrazelluläre Matrix
Fab	<i>fragment antigen binding</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FITC	Fluorescein Isothiocyanat

FKS	fötales Kälberserum
FucT	α 1,3-Fucosyltransferasen
GADS	<i>Grb2-related adaptor downstream of Shc</i>
GalT	β 1,4-Galactosyltransferasen
GITRL	<i>glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-ligand</i>
GlcA	Glucuronsäure
GlcN	Glucosamin
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GoH3	Antikörper gegen Integrin α 6 (Klon GoH3)
GP	Glykoprotein
GPI- Anker	Glykosyl-Phosphatidylinositol-Anker
GPIb	Glykoprotein Ib
GPIb-IX-V	Glykoprotein Ib-IX-V Komplex
Grb2	<i>growth factor receptor-bound protein 2</i>
HAS	<i>heat-stable antigen (CD24)</i>
hemITAM	<i>hem-Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif</i>
HER2	humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
HIP1	Antikörper gegen GPIb α (Klon HIP1)
HMGB1	<i>high-mobility group box 1</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule-1</i>
IdoA	Iduronsäure
IgG	Immunglobulin G
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
IV.3	Antikörper gegen Fc γ RIIa (Klon IV.3)
Konz.	Konzentration
LAT	<i>linker for activation of T cells</i>
LM	Lösungsmittel
LMWH	<i>low molecular weight heparin</i>
LPA	Lysophosphatidsäuren
LRR-Motiv	<i>leucin-rich repeat motive</i>

MAPK	<i>mitogen-activated protein kinases</i>
MHC-I	<i>major histocompatibility complex class I</i>
MMP	Matrix-Metalloprotease
MUC	Mucin
MV	Mikrovesikel
NIH	<i>national institute of Health (Thrombin Unit)</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PAI-2	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-2
PAR	Protease-aktivierbare Rezeptoren
PCA3	<i>prostate cancer antigen 3</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PF4	<i>platelet factor 4</i>
PGE ₂	Prostaglandin E2
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIC	Protease-Inhibitor-Cocktail
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSGL-1	<i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RLU	<i>relative luminescence units</i>
RO-Heparin	<i>reduced oxyheparin</i>
SCRs	<i>short consensus repeats</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SFK	<i>Src family kinase</i>
sLe ^a	sialyl-Lewis ^a
sLe ^x	sialyl-Lewis ^x
SLP-76	<i>SH2 domain-containing leukocyte-specific protein of 76 kDa</i>
Stammlsg.	Stammlösung
Syk	<i>spleen tyrosine kinase</i>
TAPI	Thrombozyten-armes Plasma
TBS-T	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
TCIPA	<i>tumor cell-induced platelet aggregation</i>

TEP	<i>tumor-educated platelets</i>
TF	<i>tissue factor</i>
TGA	Thrombin-Generierungs-Assay
TGF α	<i>transforming growth factor α</i>
TIMP-1	<i>tissue inhibitor of metalloproteinases 1</i>
TKZ	Thrombozytenkonzentrat
TLR4	<i>Toll-like receptor 4</i>
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
TRAP-6	<i>thrombin receptor activator peptide-6</i>
TRP	Thrombozyten-reicher Puffer
TXA ₂	Thromboxan A ₂
UFH	unfraktioniertes Heparin
uPA	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VTE	Venöse Thromboembolie
vWF	von-Willebrand-Faktor
wTRP	gewaschene Thrombozyten in Puffer
YAP1	<i>Yes-associated protein 1</i>

1 Einleitung

Im Jahr 2021 jährt sich am 1. Oktober der internationale Tag des Brustkrebses zum dreißigsten Mal. Institutionen, Vereine, öffentliche Einrichtungen und auch die Medien nutzen diesen Tag, um verstärkt auf die Möglichkeiten der Prävention, Früherkennung und Therapie dieser Krebserkrankung aufmerksam zu machen. Laut dem aktuellen Bericht „Krebs in Deutschland“ des RKI ist Brustkrebs mit rund 69.000 Neuerkrankungen pro Jahr die mit Abstand häufigste Krebserkrankung bei Frauen. Etwa eine von acht Frauen erkrankt im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs (1).

Trotz modernster Möglichkeiten der Früherkennung, wie Mammographie-Screenings, und innovativer Behandlungsmöglichkeiten sterben jährlich rund 18.000 Frauen in Deutschland infolge einer Brustkrebserkrankung. Die relative Überlebensrate nach fünf Jahren bei Patientinnen, bei denen ein lokal begrenztes Mammakarzinom (UICC-Stadium-I) diagnostiziert wurde, lag 2017 bei 101 %. Im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung war diese Rate also sogar leicht erhöht, wohl auch aufgrund einer intensiven medizinischen Betreuung. Gänzlich anders verhält sich die Überlebensrate nach fünf Jahren für Patientinnen, die unter metastasierendem Brustkrebs (UICC-Stadium-IV) litten. Sie betrug 2017 lediglich 29 %. Diese massive Reduktion der Überlebensrate unterstreicht die Bedeutung der Bildung von Metastasen, die oft einen Wendepunkt im Krankheitsverlauf von Krebspatienten darstellt.

Metastasen entstehen, nachdem sich Krebszellen aus dem Gewebeverbund des Primärtumors herauslösen. Im Falle der hämatogenen Metastasierung migrieren sie durch das umliegende Gewebe in Blutgefäße und gelangen durch diese zu entfernten Organen. Dort wandern sie in das umliegende Gewebe ein und etablieren schließlich unter speziellen, prometastatischen Bedingungen eine Metastase. Zum aktuellen Zeitpunkt gibt es keine Arzneistoffe, die gezielt in diese metastatische Kaskade eingreifen und so die Ausbildung von sekundären Tumoren verhindern könnten.

Die metastatische Kaskade ist von einer engen Interaktion der Krebszellen mit ihrer zellulären Mikroumgebung abhängig. Thrombozyten gehören zu den ersten Zellen, mit denen Tumorzellen direkt nach ihrem Eintritt in die Blutbahn in Kontakt kommen (2). Die essentielle Rolle der Thrombozyten in der hämatogenen Metastasierung wurde im Mausmodell durch die reduzierte Anzahl von Metastasen in der Lunge in Folge einer Thrombozytopenie gezeigt (3). Die Interaktion von Tumorzellen mit Thrombozyten induziert eine Aktivierung der Thrombozyten und die Bildung von Aggregaten aus Tumorzellen, Thrombozyten und Leukozyten. Innerhalb dieser Aggregaten werden Tumorzellen, geschützt vor dem Scherstress in den Blutgefäßen, hin zu entfernten Organen transportiert.

Der prometastatische Einfluss von Thrombozyten geht jedoch über einen mechanischen Schutz der Tumorzellen hinaus. Die Thrombozyten fördern eine EMT und unterdrücken die Immunantwort des Körpers (4–6). Zusätzlich fördern sie über die Ausschüttung löslicher Mediatorstoffe die Aktivierung des Endothels und die Extravasation der Tumorzellen sowie die Bildung einer metastatischen Nische und eines proangiogenetischen Milieus (7–10).

Neben diesen prometastatischen Effekten führt die Interaktion zirkulierender Tumorzellen mit Thrombozyten zu hämostaseologischen Unregelmäßigkeiten, die der französische Arzt Armand Trousseau bereits 1865 beschrieb.

Das Risiko einer venösen Thromboembolie ist für Krebspatienten um das Vier- bis Sechsfache erhöht. Eine entsprechende Diagnose ist für die Patienten mit einem signifikant schlechteren Gesamtüberleben assoziiert (11,12). Typischerweise zeigen Thrombosen bei Tumorpatienten einen aggressiveren Verlauf als bei Patienten ohne maligne Grunderkrankung. Hierzu tragen sowohl ein gesteigertes thromboembolisches Rezidivrisiko als ein deutlich erhöhtes Blutungsrisiko während einer antikoagulatorischen Therapie bei (13). Klinische Studien zeigten, dass die Gabe von Antikoagulantien, wie beispielsweise Aspirin, die Wahrscheinlichkeit der Neubildung von Tumoren reduziert und dem Fortschreiten einer bestehenden Tumorerkrankung sowie besonders der Bildung von Metastasen entgegenwirkt. Antikoagulantien erhöhen jedoch besonders für multimorbide Patienten das Risiko für Blutungen, unter anderem infolge einer operativen Tumortherapie (14–16).

Vor dem beschriebenen Hintergrund stellt ein Eingriff in die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung ohne eine Beeinträchtigung des Hämostasesystem einen vielversprechenden Ansatz für die Unterbrechung der tödlichen Symbiose aus metastasierenden Tumorzellen und aktivierten Thrombozyten dar. Ein solcher Eingriff erfordert eine detaillierte Aufklärung der Interaktionen zwischen Tumorzellen und Thrombozyten. In der wissenschaftlichen Literatur sind zahlreiche Aktivierungsmechanismen für unterschiedliche Tumorentitäten beschrieben, systematische Untersuchungen der relevanten Aktivierungsmechanismen für einzelne Tumorentitäten sind hingegen nicht verfügbar.

Die vorliegende Arbeit umfasst die systematische Untersuchung der molekularen Grundlagen der Interaktionen zwischen Thrombozyten und Mammakarzinomzellen. Hierzu wird zunächst ein universell einsetzbares *in vitro* Testsystem entwickelt. In diesem können die zu untersuchenden Interaktionen unter kontrollierten Bedingungen stattfinden. Mehrere im Anschluss etablierte Methoden dienen der Durchführung eines Screenings der potentiell an der Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung beteiligten Oberflächenrezeptoren.

Weitere, sich an das Screening anschließende Untersuchungen vertiefen das Verständnis der Rolle von zuvor identifizierten Mechanismen der Mammakarzinomzell-induzierten Thrombozytenaktivierung. Sie zeigen so Möglichkeiten für eine gezielte antimetastatische Therapie für Patienten mit einer Brustkrebserkrankung auf.

2 Theoretischer Hintergrund der Arbeit

2.1 Überblick über die hämatogene Metastasierung

Unter dem Begriff Metastasierung werden die Ausbreitung von Zellen aus einem primären Tumor in entfernte Organe und die dortige Bildung eines Sekundärtumors zusammengefasst. Es wird zwischen der lymphatischen und der hämatogenen Metastasierung unterschieden. Die lymphatische Metastasierung beschreibt eine Ausbreitung der Tumorzellen über das lymphatische System des Körpers. Erfolgt die Ausbreitung über den Blutkreislauf, spricht man von einer hämatogenen Metastasierung (17). Letztere soll im Folgenden als Grundlage dieser Arbeit näher betrachtet werden.

Der hämatogenen Metastasierung liegt eine Reihe komplex regulierter Prozesse zu Grunde, die auch als metastatische Kaskade bezeichnet wird. Die metastatische Kaskade wird durch das Herauslösen von Tumorzellen aus dem Gewebeverbund des Primärtumors sowie die Migration durch die extrazelluläre Matrix (EZM) eingeleitet. Bei Erreichen eines Blutgefäßes passieren die Tumorzellen das Endothel und treten in den Blutkreislauf ein. Über den Blutstrom werden die metastasierenden Tumorzellen zu entfernten Geweben transportiert, wo sie am Endothel adhären und anschließend extravadiieren. Nach der Ankunft in dem entsprechenden Gewebe müssen die Tumorzellen am Zielort überleben und proliferieren, um einen sekundären Tumor auszubilden (18–20). Eine Tumorzelle muss jeden einzelnen Schritt dieser Kaskade erfolgreich durchlaufen, um schlussendlich eine Metastase zu bilden. Zwar sind sogar kleine Primärtumore in der Lage eine große Zahl Zellen in den Blutkreislauf freizusetzen (21), jedoch ist nur ein extrem geringer Anteil dieser Zellen in der Lage Metastasen auszubilden (22–24). Der Erfolg der Metastasierung hängt besonders von den geno- und resultierenden phänotypischen Eigenschaften der Tumorzellen und von deren Interaktionen mit der zellulären Mikroumgebung ab. Fidler und Kollegen konnten zeigen, dass innerhalb eines Primärtumors verschiedene Zellpopulationen vorkommen, die sich hinsichtlich ihres metastatischen Potentials stark voneinander unterscheiden (25).

Das Größenwachstum eines soliden Tumors ist durch die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen limitiert. Ab einer Größe von etwa 2 mm³ ist der Tumor auf das Einsprießen neuer Kapillaren aus dem Gefäßsystem angewiesen, um einer Unterversorgung entgegenzuwirken. Die Neoangiogenese wird durch ein Ungleichgewicht zwischen pro- und antiangiogenetischen Faktoren begünstigt. Dieses entsteht unter anderem durch die Sekretion von Wachstumsfaktoren (z.B. *vascular endothelial growth factor* (VEGF)) aus den Tumorzellen selbst oder aus umliegenden Zellen. Die gebildeten Gefäße sind meist unvollständig ausgebildet und weisen eine abnormale Mikroarchitektur auf. Durch eine erhöhte Permeabilität stellen sie ein Einfallstor für Tumorzellen in den Blutkreislauf dar (26).

Um in den Blutkreislauf übertreten zu können, müssen die Tumorzellen zunächst vom primären Tumor disaggregieren. Im Vergleich zu Epithelzellen weisen Tumorzellen eine verminderte Zell-Zell-Adhäsion auf (27,28). Ursache für dieses Phänomen ist die geringere Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle. Beispielsweise wird die Tumor-assoziierte Verarmung an E-Cadherin mit der Ausbildung eines metastatischen anstelle eines epithelialen Phänotyps der Tumorzelle in Verbindung gebracht (29). Um den Primärtumor zu verlassen und sich während der Metastasierung fortbewegen zu können, sind die Tumorzellen auf eine erhöhte Zellmotilität angewiesen. Sie bedienen sich dabei unterschiedlicher Mechanismen, z.B. einer amöboiden Fortbewegungsweise oder der Annahme einer elongierten, mesenchymalen Morphologie (30). Die Umwandlung von epithelialen zu motilen, mesenchymalen Phänotypen wird als Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet. Motile Tumorzellen reagieren auf Chemokin-Gradienten und bedienen sich neben der Heparanase als Proteoglycan-abbauendes Enzym auch verschiedener Proteasen, um umliegendes Gewebe zu degradieren. Zu diesen Proteasen zählen beispielsweise Matrix-Metalloproteasen (MMP) und der Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA) (31). Die Aktivität der Proteasen ist physiologisch strikt reguliert. Im Zuge der Metastasierung kommt es jedoch zu einem Verlust diverser Kontrollmechanismen und zur Degeneration der EZM mittels Proteasen, die von der Tumorzelle selbst oder von umliegenden Zellen freigesetzt werden (32). Infolge der Proteolyse der EZM durch MMP's werden verschiedene Wachstumsfaktoren, z.B. VEGF und FGF (*fibroblast growth factor*), freigesetzt, die wiederum eine Angiogenese stimulieren können. Zudem fördern diese Faktoren die Synthese und Freisetzung von Kollagenasen sowie die Freisetzung von uPA aus Endothelzellen in Tumornähe. So werden durch die Aktivierung der MMP's sowohl die proteolytische Kaskade als auch die Vaskularisation des Tumors begünstigt (33).

Infolge der erfolgreichen Disaggregation aus dem Zellverband und dem Überwinden der EZM kommen migrierende Tumorzellen unter Umständen in Kontakt mit der Tumolvaskulatur. Anschließend können Integrin-vermittelte Interaktionen mit der gefäßumgebende Basalmembran und ein Abbau dieser durch proteolytische Enzyme folgen. Zudem erleichtern die fehlerhafte Mikroarchitektur und die Fenestration der neugebildeten, Tumor-assoziierten Gefäße den migrierenden Tumorzellen den Eintritt in das Blutgefäß (26).

Tumorzellen sind aufgrund ihres zumeist epithelialen Ursprungs physiologisch an ein Überleben im engen Netzwerk mit anderen Zellen und Interaktionen mit diesen über Membranproteine, vor allem Integrine, angepasst. Verlieren Tumorzellen die enge Interaktion mit umliegenden Zellen, kann dies zu Apoptose führen. Dieses Phänomen wird Anoikis genannt (34). Für ein Überleben der Zellen im Blutstrom ist dementsprechend eine Suppression der Anoikis essentiell (35). Dazu wird entweder die Interaktion mit, die Tumorzelle umgebenden, Blutzellen genutzt oder eine Aktivierung von Integrin-Signalwegen unabhängig von Zell-Zell-Kontakten induziert (36).

Nach Eintritt in den systemischen Blutkreislauf werden Tumorzellen mit den Scherkräften und Turbulenzen in den Gefäßen und Attacken durch das Immunsystem, besonders durch Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), konfrontiert (24,37). Einzelne Tumorzellen sind dabei eher gefährdet als Zellen im Zentrum eines Zellverbundes, der ihnen physikalischen Schutz bietet (38). Die metastasierenden Tumorzellen treten einzeln oder als Zellcluster verschiedener Größe, sogenannten zirkulierenden Tumormikroemboli, in den Blutstrom ein (39,40). Diese Zellcluster zeigen ein erhöhtes metastatisches Potential gegenüber vereinzelt metastasierenden Zellen. Dies konnte sowohl für metastasierende Lungen- als auch für Brustkrebszellen gezeigt werden (40,41). Neben dem Transit von Tumormikroemboli kann auch die Ausbildung von Heteroaggregaten mit Thrombozyten, Leukozyten und Endothelzellen für Tumorzellen im hämodynamischen Stress von Vorteil sein (42–44). Abbildung 2.1 illustriert den zeitlichen Zusammenhang einiger Interaktionen von metastasierenden Tumorzellen mit ihrer zellulären Mikroumgebung.

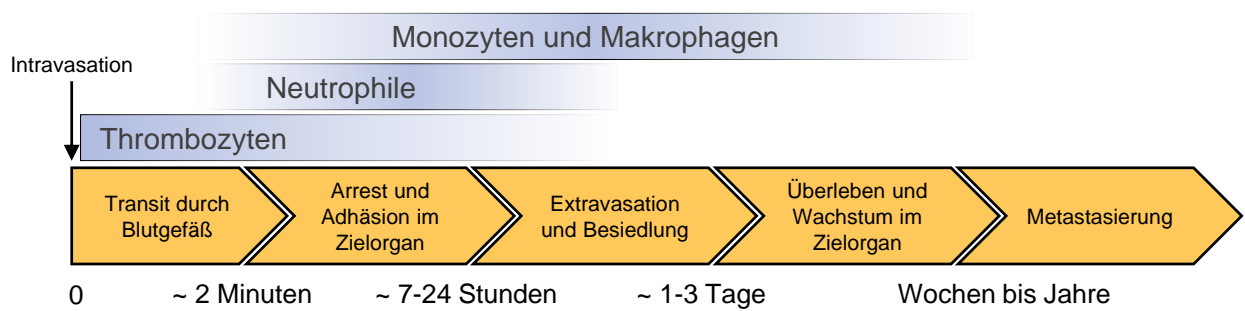


Abbildung 2.1 - Schematische Übersicht über den zeitlichen Ablauf der Interaktionen von metastasierenden Tumorzellen mit ihrer zellulären Mikroumgebung im Zuge der hämatogenen Metastasierung. Modifiziert nach Labelle et al. (2)

Tumorzellen, die durch ihre intrinsischen Eigenschaften der Immunüberwachung des Körpers entgehen können oder dafür in intensive Wechselwirkungen mit anderen zellulären Blutbestandteilen treten, weisen eine erhöhte Wahrscheinlichkeit auf, den Transit durch das Gefäßsystem zu überstehen. Diese Anpassung an die erschwerten Bedingungen während der Metastasierung können sowohl phänotypischer, genetischer als auch epigenetischer Natur sein (45). Diese prometastatischen Eigenschaften können Tumorzellen schon im Primärtumor erlangt haben. Dies geschieht entweder autonom oder als Folge von inflammatorischen Prozessen in der Mikroumgebung des Tumors, Interaktionen mit Stromazellen oder als Reaktion auf äußere Bedingungen im Tumor (z.B. Hypoxie oder mechanisch wirkende Kräfte auf die Tumorzellen) (42).

Zusätzlich zu den intrinsischen Eigenschaften, die einen direkten Überlebensvorteil während der metastatischen Kaskade mit sich bringen, ist der Erfolg der Metastasierung von der Interaktion der metastasierenden Tumorzelle mit ihrer zellulären Mikroumgebung abhängig. Thrombozyten nehmen dabei eine herausragende Rolle ein, die direkt nach Eintritt der Tumorzelle in das Gefäßsystem zum Tragen kommt. Die Relevanz der Thrombozyten im Tumorgeschehen und besonders während der Metastasierung ist seit Jahrzehnten Thema der Forschung. So konnte schon 1973 von Gasic und Kollegen anhand von *in vivo* Studien gezeigt werden, dass die Anzahl von Metastasen in der Lunge

von Mäusen sowohl in Folge einer Thrombozytopenie, als auch durch den therapeutischen Einsatz von Aspirin zurückgeht (46).

Infolge einer Tumorzell-induzierten Aktivierung der Blutgerinnung sowie der Thrombozyten bilden sich Aggregate, die aus Tumorzellen, Thrombozyten und Leukozyten zusammengesetzt sind. Diese Aggregation wird als *tumor cell-induced platelet aggregation* (TCIPA) bezeichnet (47–49). Die vielfältigen Vorteile, die Tumorzellen aus den Interaktionen mit Thrombozyten und der TCIPA ziehen, sollen in Abschnitt 2.2 dieser Arbeit näher beleuchtet werden.

Die infolge der TCIPA gebildeten Aggregate stellen den Zustand dar, in welchem die Tumorzellen die Blutgefäße passieren, am Endothel im Kapillarbett des Zielorgans adhären und extravasieren. Der Transit der Tumorzellen durch den Blutstrom erfolgt meist in einem engen Zeitfenster. Ein Grund dafür sind physikalische Restriktionen, da Karzinomzellen meist zu groß sind, um Kapillarbetten zu passieren. Daher adhären die Zellen meist innerhalb von Minuten im ersten Kapillarbett, das sie erreichen (50). So konnte gezeigt werden, dass Zellen eines primären Tumors im Kolon vermehrt Metastasen in der Leber bilden, Brustkrebszellen hingegen in der Lunge (2). Die häufig zirkulierenden Aggregate infolge einer TCIPA vergrößern die Wahrscheinlichkeit einer passiven Adhäsion in Kapillaren geringen Durchmessers noch zusätzlich.

Neben den beschriebenen passiven Vorgängen adhären Tumorzellen während der Metastasierung in Leber und Lunge aber auch am Endothel größerer Gefäße (51). Diese aktive Adhäsion findet via spezifischer Adhäsionsrezeptoren, z.B. Selektine und Integrine, statt (52–56). Die zum initialen Arrest erforderlichen Adhäsionsrezeptoren befinden sich auf den Tumorzellen selber oder werden von Tumorzell-assoziierten Thrombozyten, Leukozyten oder Fibroblasten exprimiert. Die direkt oder indirekt zur aktiven Adhäsion befähigten Tumorzellen sind jene, die dauerhaft am Endothel adhären und somit die Möglichkeit der Extravasation erlangen (57).

Die Extravasation und eine anschließende Proliferation der metastasierenden Zellen findet häufig in Gewebereichen statt, die ein aktiviertes Endothel aufweisen. Diese Aktivierung der Endothelzellen spiegelt sich z.B. in einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen (z.B. P-Selektin, E-Selektin, *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) und *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1)) wider. Die Ligand-vermittelte Bindung dieser Adhäsionsmoleküle an Tumorzellen forcieren ein Zellrollen und die Adhäsion der Tumorzellen an das Endothel (57–60).

Neben der Aktivierung des Endothels kann auch die Ausbildung einer sogenannten prämetastatischen Nische die Einwanderung von Tumorzellen aus dem Blutstrom fördern. Das metastatische-Nische-Modell postuliert, dass disseminierende Krebszellen ein vor ihrem Eintreffen gebildetes, der Umgebung des Primärtumors ähnliches Mikromilieu in entfernten Organen induzieren. So können sie dann die sogenannte prämetastatische Nische, nutzen, um in das Gewebe einzuwandern und sich dort zu etablieren (61–64). Das dort herrschende supportive Mikromilieu ist entscheidend durch den primären Tumor geprägt. Der Primärtumor kann befähigt

sein, verschiedene Zytokine, Wachstumsfaktoren, Mikrovesikel und Enzyme freizusetzen, die zu Veränderungen in entfernten Geweben führen können. Zu diesen Veränderungen zählen beispielsweise die Remodellierung der EZM, die Rekrutierung von Stromazellen, sowie eine erhöhte Fibronectinfreisetzung im Stroma und die Veränderungen der lokalen Blut- und Lymphvaskulatur (65). Als Reaktion auf die Gewebsveränderungen wandern vermehrt Tumor-assoziierte Zellen, wie beispielsweise Progenitorzellen aus dem Knochenmark und Makrophagen, in das Zielgewebe ein (62,66,67). Durch die Schaffung Tumor-assoziiertes Nischen bzw. durch die Modulation von endogenen Nischen, beispielsweise Stammzell-Nischen, werden die betroffenen Gewebe optimal für die Extravasation, Migration und Proliferation einer metastasierenden Tumorzelle vorbereitet (66). Die prämetastatische Nische wandelt sich durch die Besiedlung mit Tumorzellen in die metastatische Nische um (65). Die metastatische Nische zeichnet sich durch ein Mikromilieu aus, das reich an Wachstumsfaktoren (z.B. platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor α (TGF α) und VEGF), inflammatorischen Zytokinen und anderen Botenstoffen ist. Diese führen zur Aktivierung verschiedener Signalwege, z.B. des TGF β -Signalwegs (68,69). Auch die durch Chemotaxis in die Umgebung eingewanderten Leukozyten erhöhen das inflammatorische Potenzial der metastatischen Nische weiter (57).

Im Zuge der Etablierung eines sekundären Tumors nach Einwanderung der metastasierenden Tumorzelle kann die Relevanz Tumorzell-assoziiertes Thrombozyten erneut hervorgehoben werden. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten-aktivierte Tumorzellen eine prometastatische Signatur ihrer Genexpression aufweisen, die eine erhöhte Expression von verschiedenen Proteasen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren beinhaltet (70).

Abbildung 2.2 liefert einen groben Überblick über die Prozesse der hämatogenen Metastasierung und greift die Beteiligung der Thrombozyten in diesen auf, welche in Abschnitt 2.2 näher erläutert werden.

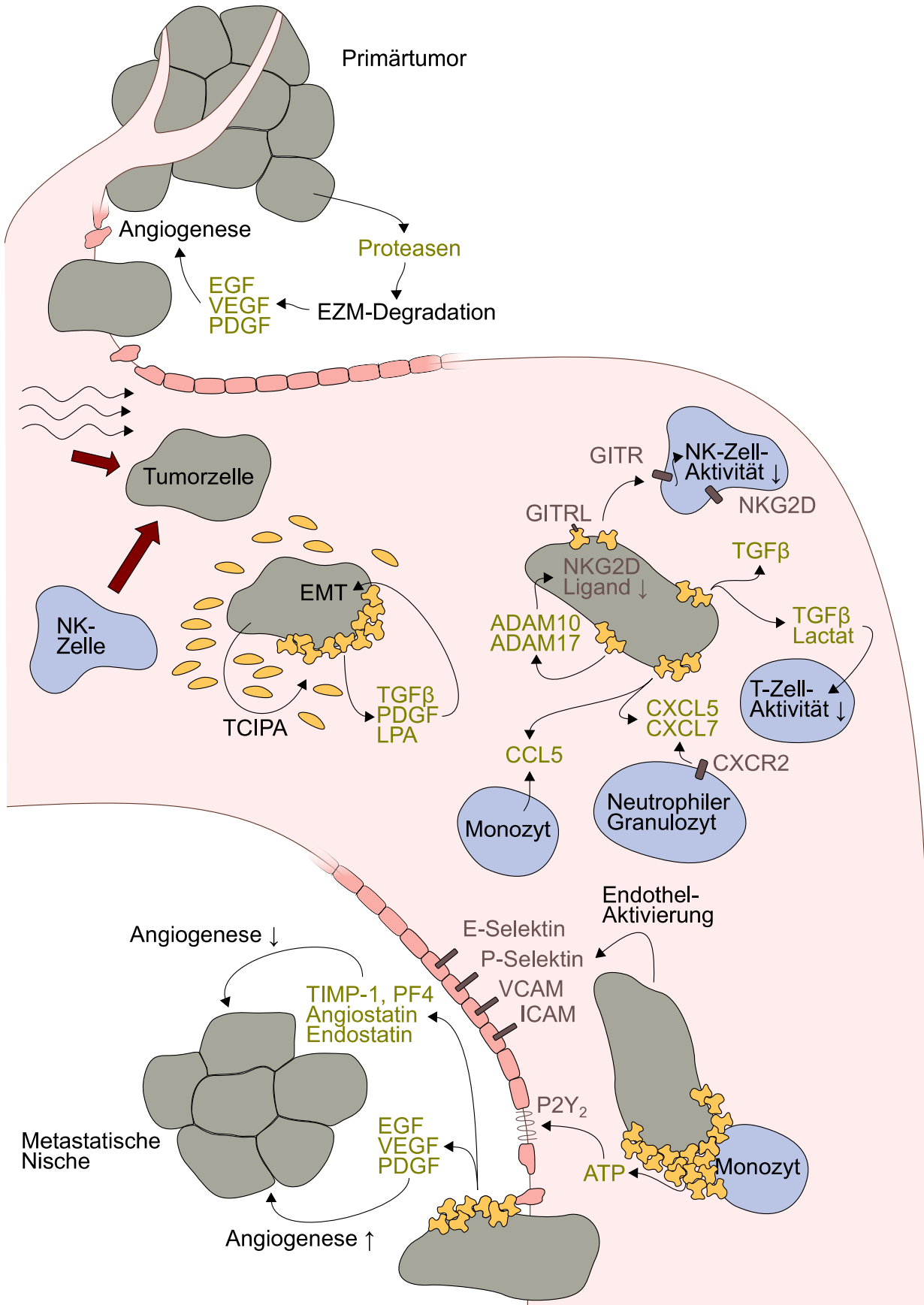


Abbildung 2.2 - Überblick über die hämatogene Metastasierung und die Beteiligung von Thrombozyten an dieser. Genaue Erläuterungen in den Abschnitten 2.1 sowie 2.2.

2.2 Rolle der Thrombozyten während der hämatogenen Metastasierung

Wie im vorherigen Abschnitt erläutert, ist die enge Interaktion zwischen Tumorzellen und körpereigenen Zellen nicht nur für die Tumorprogression, sondern auch für eine erfolgreiche Metastasierung von essentieller Relevanz. Im Folgenden soll der Fokus auf die Bedeutung des Zusammenspiels zwischen disseminierenden Tumorzellen und Thrombozyten während dieser Prozesse gelegt und ein Überblick über die Vorteile, die Tumorzellen aus diesen Interaktionen ziehen, gegeben werden.

Nachdem die Tumorzelle erfolgreich aus dem primären Tumor disaggregiert, durch die umliegende Matrix migriert und in das Gefäßsystem des Körpers invadiert ist, kommt sie unmittelbar in Kontakt mit den zellulären Bestandteilen des Blutes. Bereits in dieser initialen Phase des Zelltransits kommt den Thrombozyten eine tragende Rolle zu. So führt eine in Mäusen induzierte Thrombozytopenie zu einer signifikant abnehmenden Anzahl neugebildeter Metastasen (3,46).

Während der Interaktion von Thrombozyten mit zirkulierenden Tumorzellen wirken verschiedene Mechanismen: i) Tumorzellen können eine Aktivierung der Thrombozyten induzieren; ii) Thrombozyten unterstützen den Prozess der hämatogenen Metastasierung, z.B. indem sie die Adhäsion von Tumorzellen am Endothel unterstützen, und somit deren Arrest im Gefäßsystem der Zielorgane erleichtern; iii) Thrombozyten helfen Tumorzellen, die Immunantwort des Organismus zu umgehen; iv) Thrombozyten unterstützen die Extravasation der Tumorzelle; v) Thrombozyten können die Tumorangiogenese vorantreiben. Einen Überblick über die Beteiligung der Thrombozyten an den verschiedenen Prozessen der metastatischen Kaskade liefert Abbildung 2.3, die im Folgenden näher erläutert werden soll.

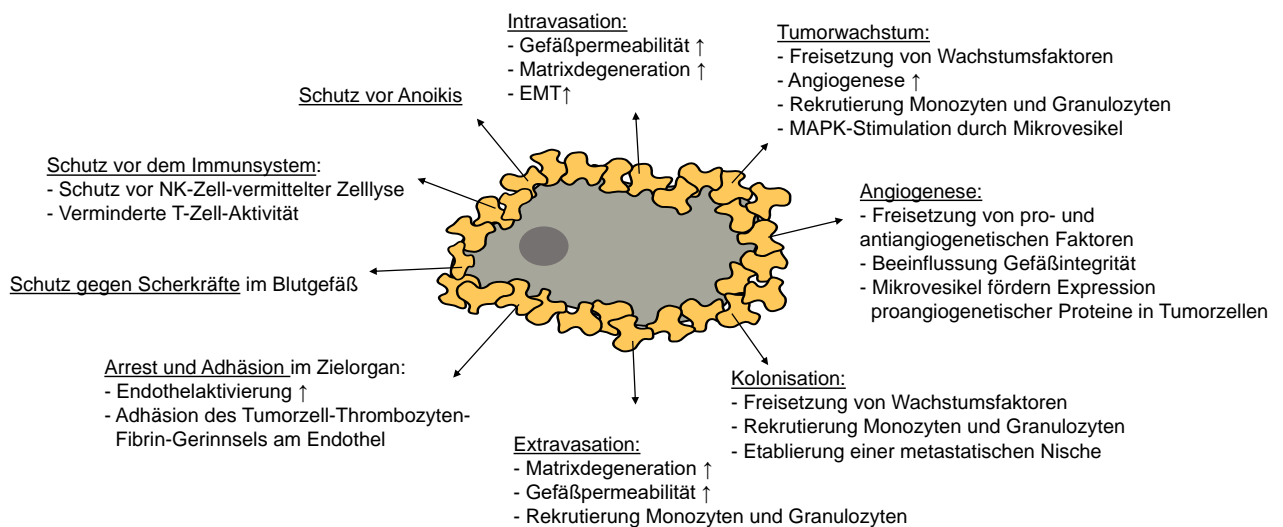


Abbildung 2.3 - Beitrag der Thrombozyten zur hämatogenen Metastasierung. Modifiziert nach (71).

Thrombozyten spielen nicht erst im Zuge der hämatogenen Metastasierung eine tragende Rolle. Vielmehr zeigen sie schon im Primärtumor einen direkten Einfluss auf die Proliferation von

Tumorzellen im Zellverbund. Es wurde gezeigt, dass von Thrombozyten sezernierter TGF β die Proliferation von Ovarialkarzinomzellen steigert (72). Auch thrombozytäre Mikrovesikel werden mit einer gesteigerten Proliferation von Lungenkarzinomzellen über die Stimulation von mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs) assoziiert (73).

Im Zuge der hämatogenen Metastasierung umgeben sich metastasierende Tumorzellen nach Eintritt in das Blutgefäßsystem des Körpers innerhalb von Minuten mit aktivierten Thrombozyten und Leukozyten und bilden so Heteroaggregate (47,49,74). Die infolge der TCIPA gebildeten Aggregate stellen den Zustand dar, in dem die Tumorzellen befähigt sind, die Widrigkeiten des Blutstroms zu überleben und sich über das Gefäßsystem des Körpers zu verteilen. Die mechanistischen Hintergründe der TCIPA werden in Abschnitt 2.3 näher erläutert. Die, eine Tumorzelle umgebenden, Thrombozyten schützen diese mechanisch vor einer Beschädigung der Zellmembran durch die hohen Scherkräfte in den Gefäßen (75). Darüber hinaus unterstützen sie das Überleben der metastasierenden Tumorzelle aber auf vielfältige Weise, die über das mechanische Abschirmen hinausgehen.

Die in Abschnitt 2.1 erläuterte Anoikis kann von metastasierenden Tumorzellen durch Interaktionen mit verschiedenen zellulären Blutbestandteilen supprimiert werden. Haemmerle und Kollegen zeigten, dass Thrombozyten eine Anoikis verschiedener humaner Ovarialkarzinomzelllinien über die Aktivierung des *yes-associated protein 1* (YAP1) - Signalweges unterdrücken (76).

Wie bereits erwähnt weisen metastasierende Tumorzellen infolge einer EMT häufig einen mesenchymalen anstelle eines epithelialen Phänotypen auf (77). Tumorzell-assoziierte Thrombozyten scheinen an der EMT auf unterschiedliche Weise beteiligt zu sein. Dabei spielen Mediatorstoffe aus Tumor-assoziierten Thrombozyten wie beispielsweise TGF β , Prostaglandin E₂ (PGE₂), PDGF und Lysophosphatidsäuren (LPA) eine essentielle Rolle (4,78,79). Infolge von Interaktionen mit Thrombozyten zeigen Tumorzellen eine Verarmung an E-Cadherin (80) und gleichzeitig eine vermehrte Expression von Proteinen, die mit der Ausbildung eines mesenchymalen Phänotyps assoziiert sind. Dazu zählen beispielsweise Snail, Vimentin, Fibronectin und MMP-9 (70). Neben der gesteigerten Motilität wird eine EMT mit weiteren prometastatischen Eigenschaften in Verbindung gebracht. Dazu gehören beispielsweise eine verminderte Neigung zur Apoptose sowie stammzellähnliche Eigenschaften (81,82).

2.2.1 Einfluss Tumorzell-assoziiierter Thrombozyten auf die Immunantwort

Einen entscheidenden Beitrag zum Überleben der Tumorzellen in der Blutzirkulation vermitteln Thrombozyten durch ihren inhibitorischen Einfluss auf NK-Zellen (5,83). Thrombozyten sind in der Lage, eine parakrine Suppression NK-Zell-vermittelter zytolytischer Aktivitäten auszulösen. TGF β , welches aus der α -Granula aktivierter Thrombozyten sezerniert wird, führt zu einer Herunterregulierung der Expression des aktivierenden Immunorezeptors NKG2D auf NK-Zellen und

wirkt so der Granula-Mobilisation, der Zytotoxizität und der Interferon- γ -Sekretion von NK-Zellen entgegen (84). Neue Untersuchungen zeigten zudem, dass die von aktivierten Thrombozyten exprimierte *a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein* (ADAM)10 und ADAM17 zum Abbau von NKG2D-Liganden auf Tumorzellen beitragen. Über die Expression von ADAM10/ADAM17 tragen Thrombozyten entsprechend dazu bei, dass die Tumorzellen der Erkennung durch NKG2D und damit der NK-Zell-vermittelten Immunantwort entgehen können (6).

Placke und Kollegen konnten zeigen, dass im Zuge der direkten Interaktion zwischen Tumorzellen und Thrombozyten ein Transfer des von Thrombozyten exprimierte *major histocompatibility complex class I* (MHC-I) auf die Oberfläche von Tumorzellen stattfindet. MHC-I schützt letztere vor der Erkennung durch den direkten Kontakt mit NK-Zellen (85). Nach der Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung wird der *glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-ligand* (GITRL) zusammen mit P-Selektin auf der Thrombozytenoberfläche coexprimiert. GITR wird auf der Oberfläche von NK-Zellen von GITRL gebunden und induziert eine inhibitorische Signalkaskade, die eine verminderte Sekretion von Interferon- γ und eine reduzierte NK-Zelltoxizität zur Folge hat (86).

Neben der Funktion von NK-Zellen beeinflussen Tumorzell-assoziierte Thrombozyten auch die Aktivität von T-Zellen. Rachidi und Kollegen zeigten, dass von Thrombozyten sezerniertes TGF β und Lactat die Funktion von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen modulieren. Sie postulierten daher den therapeutischen Ansatz, dass die adoptive Immuntherapie von Krebspatienten durch die Gabe eines Inhibitors der Thrombozytenaktivierung optimiert werden kann (87).

Auch die Beteiligung anderer Immunzellen am metastatischen Geschehen kann durch Tumorzell-assoziierte Thrombozyten beeinflusst werden. Dabei spielen neben immunmodulatorischen Chemokinen, welche aus der α -Granula freigesetzt werden, auch thrombozytäre Oberflächenrezeptoren, wie beispielsweise P-Selektin und das Glykoprotein Iba ($\text{GPIb}\alpha$) eine Rolle (88,89). So wurde gezeigt, dass Tumorzell-assoziierte Thrombozyten die Wanderung von Neutrophilen Granulozyten zu Zielgeweben der Metastasierung und ihre dortige Extravasation fördern (90). An diesem Phänomen ist unter anderem die Bindung von Thrombozyten-ständigem $\text{GPIb}\alpha$ an $\alpha_{\text{M}}\beta_2$ auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten beteiligt. Die so gebildeten Heteroaggregate aus Tumorzellen, Thrombozyten und Neutrophilen Granulozyten verstärken den Schutz der Tumorzelle vor dem Immunsystem (89,91). Labelle und Kollegen zeigten zudem, dass CD11⁺ MMP9⁺ Ly6G⁺ Granulozyten in Agglomerate aus aktivierten Thrombozyten und MC38 Kolonkarzinomzellen einwandern (92). Die CXC-Motiv Chemokine CXCL5 und CXCL7 werden aus der thrombozytären α -Granula freigesetzt. Die Sekretion der Chemokine erfolgt nach einer Aktivierung der Thrombozyten aufgrund des direkten Kontakts mit Tumorzellen oder infolge des aktivierten Gerinnungssystems (93). Sowohl CXCL5 als auch CXCL7 induzieren eine Chemotaxis von Granulozyten über die Aktivierung des Granulozyten-ständigen Rezeptors CXCR2 (92). Die Einwanderung von Leukozyten in Tumorzell-Thrombozyten-Mikrothromben fördert die Extravasation

der Tumorzellen sowie die Tumorzell-Proliferation. Zudem scheinen sie an der lokalen Immunsuppression beteiligt zu sein (43,44,94).

2.2.2 Einfluss Tumorzell-assoziiertes Thrombozyten auf die Extravasation im Zielgewebe

Erreichen die Tumorzellen nach ihrem Transit durch das Gefäßsystem den Ort der Extravasation, unterstützen Thrombozyten die Bindung am Endothel über adhäsive Interaktionen zwischen Thrombozyten, Tumorzellen und Leukozyten (57,95). Tumorzellen und aktivierte Thrombozyten induzieren über die Ausschüttung löslicher Mediatorstoffe, extrazellulärer Vesikel oder Proteasen eine Aktivierung des Endothels (7,96). ATP, freigesetzt aus der dichten Granula aktivierter Thrombozyten, bindet und aktiviert endothelständige P2Y₂-Rezeptoren. Die dadurch forcierte Permeabilität des Endothels ermöglicht Tumorzellen die Extravasation (8). Das aktivierte Endothel rekrutiert seinerseits Tumorzellen bzw. Tumorzell-Thrombozyten-Aggregate mithilfe verschiedener Adhäsionsrezeptoren. Zu diesen zählen beispielsweise P-Selektin, E-Selektin, $\alpha\text{v}\beta_3$, von-Willebrand-Faktor (vWF), VCAM-1 und ICAM-1 (57,97). CCL5, welches aus der α -Granula aktivierter Thrombozyten freigesetzt wird, führt zu einer Chemotaxis von Monozyten hin zum Zielgewebe. Die rekrutierten Monozyten treiben wiederum die Aktivierung des Endothels voran und forcieren so die Tumorzellextravasation (9,98).

2.2.3 Einfluss Tumorzell-assoziiertes Thrombozyten auf die Angiogenese

Damit sich aus einer ins Gewebe eingewanderten Tumorzelle erfolgreich ein Sekundärtumor entwickeln kann, spielt neben diversen anderen Mechanismen die Neoangiogenese eine essentielle Rolle. In der thrombozytären α -Granula sind neben einer Vielzahl anderer physiologisch aktiver Mediatorstoffe auch pro- sowie antiangiogenetische Proteine gespeichert. Zu den proangiogenetischen Wachstumsfaktoren zählen beispielsweise VEGF, PDGF, *basic fibroblast growth factor* (bFGF) und *epidermal growth factor* (EGF) (10,71,99–103). Diese induzieren einerseits die Neubildung und Remodellierung von Tumor-infiltrierenden Blutgefäßen. Andererseits werden sie auch mit der Proliferation und Differenzierung von Perizyten und Fibroblasten in der Tumormikroumgebung, sowie der Rekrutierung von Progenitorzellen aus dem Knochenmark assoziiert. Zu den antiangiogenetischen Wachstumsfaktoren, die in der α -Granula gespeichert sind, zählen beispielsweise Angiostatin, Endostatin, Thrombospondin-1, *tissue inhibitor of metalloproteinases* (TIMP)-1 und *platelet factor 4* (PF4) (71,104–106). Die Mechanismen, die dazu führen, dass Thrombozyten ein proangiogenetisches Tumormikromilieu fördern, sind bis dato nicht vollständig aufgeklärt und Gegenstand aktueller Untersuchungen. Es wird diskutiert, dass verschiedene Untergruppen von Proteinen in verschiedenen α -Granula gespeichert sind, deren Freisetzungen unterschiedlich reguliert werden (99,107,108). Einer anderen Hypothese folgend könnten die verschiedenen Proteine aber auch in unterschiedlichen Bereichen der gleichen Granula

gespeichert sein, welche in Folge verschiedener Stimuli differenziert sezerniert werden (109,110). Ein weiterer Mechanismus, mit dem Tumor-assoziierte Thrombozyten die Bildung neuer Blutgefäße im Tumorgewebe unterstützen, ist die Freisetzung thrombozytärer Mikrovesikel. (73) Janowska-Wieczorek und Kollegen untersuchten den Einfluss thrombozytärer Mikrovesikel auf Tumorzellen. Erstere stimulierten die mRNA-Expression von VEGF, MMP9 und *hepatocyte growth factor* (HGF) in Lungenkarzinomzellen und förderten so die Neoangiogenese im Tumor (73).

Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass Tumor-assoziierte Thrombozyten einen proangiogenetischen Phänotyp aufweisen. In klinischen Studien wurden in Thrombozyten, die von Tumorpatienten isoliert wurden, erhöhte Konzentrationen VEGF, PDGF aber auch PF4 nachgewiesen (111,112). Die mechanistischen Hintergründe eines proangiogenetischen Phänotypen sind nicht vollständig geklärt, können aber mit der Beeinflussung des thrombozytären Transkriptoms durch Tumorzellen (113,114) zusammenhängen. Klement und Kollegen konnten zudem zeigen, dass Thrombozyten aktiv proangiogene Faktoren binden und aufnehmen können, die von Tumorzellen sezerniert werden. Sie zeigten weiter, dass die Konzentration Angiogenese-regulierender Proteine in Thrombozyten erhöht war, welche aus tumorimplantierten Mäusen isoliert worden waren. Die Plasmakonzentrationen der untersuchten Proteine änderte sich im Vergleich zum Plasma der Kontrollgruppe dabei jedoch nicht (115). Neben der Beteiligung an Angiogenese-regulierenden Prozessen sind Thrombozyten zudem in der Lage, via Sekretion von Angiopoetin-1 und Serotonin die Vaskulatur im Tumor zu stabilisieren und intratumorale Blutungen zu verhindern (116).

2.2.4 Rolle der Thrombozyten in der Krebsdiagnostik

Neben den vielfältigen Beiträgen der Thrombozyten zur hämatogenen Metastasierung stellen diese auch interessante Ansatzpunkte der modernen Diagnostik in der Onkologie dar. Infolge der Aktivierung der Thrombozyten und dem hohen Scherstress, welchem sie in den Gefäßen ausgesetzt sind, setzen Thrombozyten extrazelluläre Vesikel, beispielsweise Exosomen und Mikropartikel, frei (117). Es konnte nachgewiesen werden, dass die Konzentrationen an thrombozytären Mikropartikeln im Blut bei Patienten mit aggressiven Tumorformen stark erhöht ist (118,119). Thrombozyten sind befähigt, mRNA von zirkulierenden Tumorzellen aufzunehmen. So entstehen Modifikationen im Transkriptom der Thrombozyten welche dem Tumorprofil ähneln (114). Dieses therapeutisch interessante Phänomen wird als *tumor-educated platelets* (TEP) bezeichnet. Der zugrundeliegende Mechanismus der TEP ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Tumorzellen sind befähigt, RNA in ihre direkte Umgebung abzugeben, beispielsweise über die Freisetzung von Exosomen (120,121), welche dann von den Thrombozyten aufgenommen wird (114,122,123). Wie diese Aufnahme vonstattengeht, ist nicht abschließend geklärt. Mögliche Szenarien beinhalten die Fusion von Plasmamembranen, Clathrin-vermittelte Endozytose oder Phagozytose seitens der Thrombozyten (124). Das Konzept der TEP stellt eine interessante Möglichkeit in der Diagnostik von

Tumorpatienten dar. So konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten von Krebspatienten Tumor-assoziierte Biomarker enthalten. Beispielsweise konnten *epidermal growth factor receptor variant III* (EGFRvIII) und *prostate cancer antigen 3* (PCA3) als Biomarker für Glioma bzw. Prostatakrebs nachgewiesen werden (122).

2.3 Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung

Nach Eintritt der metastasierenden Tumorzelle in das Blutgefäß wird die Entstehung eines stabilen Thrombus durch die Tumorzell-vermittelte Aktivierung der Thrombozyten unterstützt. Diese Aktivierung findet mittels verschiedener Mechanismen statt, die sich grob in drei Kategorien einteilen lassen. Tumorzellen exprimieren häufig *tissue factor* (TF) auf ihrer Oberfläche. Dieser induziert die Aktivierung der plasmatischen Gerinnungskaskade und führt über die Generierung aktiven Thrombins zu einer Thrombozytenaktivierung. Zudem sezernieren Tumorzellen lösliche Mediatorstoffe wie beispielsweise ADP, Thromboxan A₂ (TXA₂) oder das *high-mobility group box 1* (HMGB1) Protein. Diese Mediatorstoffe sind ihrerseits in der Lage, Thrombozyten über entsprechende Rezeptoren auf deren Membranen zu aktivieren und auf diesem Wege zur Formation eines stabilen Thrombus beizutragen. Der dritte Mechanismus resultiert aus dem direkten Kontakt von Tumorzellen und Thrombozyten, bei dem Adhäsionsrezeptoren und deren Liganden die Aktivierung der Thrombozyten vermitteln.

2.3.1 Thrombozytenaktivierung infolge einer Tumorzell-vermittelten Aktivierung des Blutgerinnungssystems

Das hämostaseologische System, besonders dessen zentrale Serinprotease Thrombin, tragen entscheidend zu einer Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung bei. Durchschnittlich ist das Risiko einer venöse Thromboembolie (VTE) bei Krebspatienten um das vier- bis sechsfache erhöht. Die Diagnose einer thromboembolischen Komplikation ist zudem mit einem signifikant schlechteren Gesamtüberleben assoziiert (11,12). Der klinische Zusammenhang zwischen malignen Erkrankungen und Thrombosen wurde erstmals von dem französischen Arzt Armand Trousseau beschrieben, dementsprechend werden paraneoplastische Gerinnungsstörungen als Trousseau-Syndrom bezeichnet (125). Eine durch eine maligne Erkrankung induzierte Aktivierung der Hämostase trägt über die Bildung lokaler Thromben oder systemischer Gerinnungsstörungen erheblich zur Morbidität und Mortalität von Tumorpatienten bei. Zudem spielen zahlreiche Komponenten des aktivierten Hämostasesystems eine bedeutende Rolle für das primäre Wachstum von Tumoren sowie für die hämatogene Metastasierung.

Da die hämostaseologischen Grundlagen in der einschlägigen Fachliteratur ausführlich beschrieben sind, soll an dieser Stelle Abbildung 2.4 einen Überblick liefern, jedoch nicht näher erläutert werden.

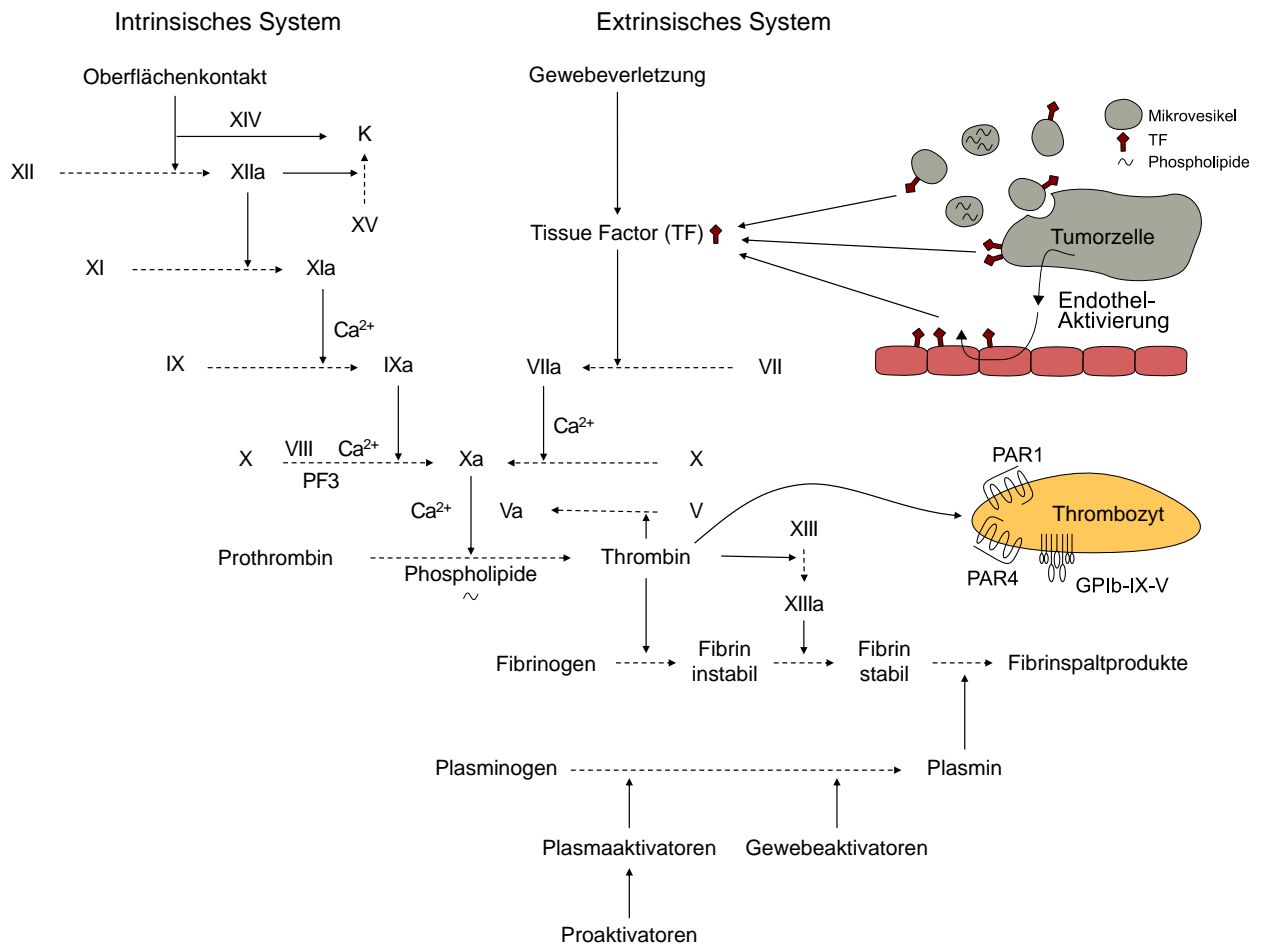


Abbildung 2.4 - Übersicht über das Blutgerinnungssystem und den Einfluss von Tumorzellen auf dieses. Möglichkeit der Tumorzell-vermittelten Aktivierung des Gerinnungssystems über Tumorzell-ständigen TF, TF-präsentierende Mikropartikel sowie indirekt über die Aktivierung des Endothels und eine TF-Präsentation infolge dessen.

Wie in Abbildung 2.4 dargestellt sind Tumorzellen befähigt, die physiologische Blutgerinnungskaskade auf verschiedene Weise zu beeinflussen. Eine zentrale Rolle in der Tumorzell-induzierten Aktivierung der Blutgerinnung nimmt das Gewebethromboplastin (*tissue factor* (TF)) ein. TF wird in gesunden Geweben von subendothelialen Zellen, wie Fibroblasten oder Perizyten, exprimiert (126). Im Gegensatz dazu konnte in diversen malignen Geweben eine Expression von TF nachgewiesen werden. Tumore epithelialen Ursprungs exprimierten dabei häufig mehr TF als Tumore nicht-epithelialen Ursprungs (127). Neben der konstitutiven Expression von TF kann es durch inflammatorische oder sonstige Tumor-spezifische Prozesse zu einer Hochregulation der TF-Genexpression, sowohl in den Tumorzellen selbst, als auch in Tumor-assoziierten Zellen (z.B. Stromazellen), kommen (128–130). Die Expression von TF konnte bei verschiedenen Krebserkrankungen mit einer schlechteren Prognose für die Patienten assoziiert werden. So konnte ein erhöhtes Risiko einer VTE bei Patienten beobachtet werden, die beispielsweise unter Pankreas-

oder Ovarialkrebs litten, sobald eine erhöhte Expression von TF seitens der Tumorzellen nachweisbar war (131,132).

Neben der Expression von oberflächenständigem TF auf den Tumorzellen stellen TF-präsentierende Mikrovesikel einen weiteren möglichen Mechanismus der Aktivierung des Gerinnungssystems dar. Bei Mikrovesikeln handelt es sich um kleine Vesikel membranären Ursprungs mit einem Durchmesser von 0,1-1 μM , die von apoptotischen Zellen oder infolge einer Aktivierung der Zellen freigesetzt werden. Neben der Präsentation von TF auf ihrer Oberfläche können diese Mikrovesikel anionische Phospholipide, beispielsweise Phosphatidylserin, enthalten. Diese Phospholipide unterstützen als negativ geladene Oberfläche die Assoziation des Prothrombinasekomplexes und tragen auf diese Weise zusätzlich zur Thrombozytenaktivierung bei (133).

Neben dieser direkten Beeinflussung des physiologischen Gerinnungssystems können weitere Tumor-assoziierte, indirekte Faktoren die Entstehung thromboembolischer Ereignisse fördern. Häufig hängen diese indirekten Faktoren mit dem inflammatorischen Geschehen, welches eine Tumorerkrankung begleitet, zusammen (134). Ein Beispiel dafür ist die Freisetzung des Tumor-Nekrose-Faktors- α (TNF α) aus den Tumorzellen. Dieser kann an einer Aktivierung des Endothels beteiligt sein, welche sich in einer gesteigerten TF-Expression seitens der Endothelzellen manifestiert (135). Von Tumorzellen sezernierte Proteine können so indirekt eine Aktivierung der Gerinnungskaskade auslösen, ohne direkt mit den Gerinnungsfaktoren zu interagieren.

2.3.1.1 Thrombin

Als Folge einer Tumorzell-induzierten Aktivierung des Gerinnungssystems kommt es unter anderem zu der Generierung aktiven Thrombins aus dem Zymogen Prothrombin.

Thrombin gehört zu den Serinproteasen. Sein spezieller Aufbau erlaubt die spezifische Erkennung zahlreicher unterschiedlicher Substrate. Thrombin weist ein katalytisches Zentrum sowie die *Exosite I* und *Exosite II* auf, die direkt oder indirekt (über die Bindung von Cofaktoren) an der Bildung eines Thrombin-Substrat-Komplexes beteiligt sein können (136). An der Bindung und Spaltung von Fibrinogen sind beispielsweise sowohl das aktive Zentrum des Thrombins, als auch die *Exosite I* beteiligt (137). Für die Bindung von GPIIb als Cofaktor des aktiven Zentrums für die proteolytische Spaltung von Protease-aktivierbaren Rezeptoren (PAR) sowie Faktor XI scheint hingegen besonders die *Exosite II* ausschlaggebend zu sein (136). Ebenfalls an der *Exosite II* ist die Heparin-Bindungsstelle des Thrombins lokalisiert (138). Heparin dient so als Cofaktor für die Bindung des Thrombins an dessen physiologischen Inhibitor Antithrombin (139). Im Gegensatz dazu bindet der synthetisch hergestellte Thrombininhibitor Argatroban direkt im aktiven Zentrum des Thrombins und hemmt so reversibel seine proteolytische Wirkung (140).

Thrombin ist befähigt, Zellen über einen einzigartigen proteolytischen Mechanismus zu aktivieren. Die Rezeptoren, die durch Thrombin adressiert werden, zeichnen sich durch einen langen,

extrazellulären N-Terminus aus. Thrombin ist befähigt einen Teil dieses N-terminalen Bereiches proteolytisch zu entfernen, wodurch eine Peptidsequenz freigelegt wird, die als hochaffiner Ligand an den Rezeptor bindet und diesen aktiviert. Die auf diese Weise von Thrombin aktivierbaren Rezeptoren zählen zu der Familie der GPCRs und werden unter der Bezeichnung Protease-aktivierbare Rezeptoren (PAR) zusammengefasst (141). Für diese Arbeit von besonderer Relevanz sind PAR-1 sowie PAR-4, da diese von humanen Thrombozyten exprimiert werden und ihre Thrombin-vermittelte Aktivierung in einer starken Thrombozytenaktivierung mündet. PAR-1 enthält eine *hirudin-like domain*, welche eine hohe Affinität zu Thrombin aufweist und so eine Colokalisation von Thrombin und PAR-1 vermittelt und damit letztlich eine Aktivierung von PAR-1 fördert. Dies hat zur Folge, dass schon Thrombinkonzentrationen im picomolaren Bereich ausreichen, um eine Aktivierung herbeizuführen. Bei zunehmender Thrombin-Konzentration wird die PAR-1 vermittelte Aktivierung zunehmend von einer PAR-4 vermittelten Aktivierung verdrängt. Obwohl PAR-4 keine *hirudin-like domain* aufweist, dominiert bei hohen Thrombin-Konzentrationen (> 10 nM) eine Aktivierung der Thrombozyten durch PAR-4 anstelle der PAR-1 vermittelten Aktivierung (142–145). PAR-1 wird im direkten Vergleich mit PAR-4 nach einer Aktivierung wesentlich schneller internalisiert, sodass der PAR-4 vermittelte Effekt auf Thrombozyten von längerer Dauer ist (145).

Neben der PAR-vermittelten Aktivierung scheint Thrombin befähigt, über eine Interaktion mit GPIIb eine Thrombozytenaktivierung zu induzieren. Adam und Kollegen arbeiteten mit einer Mutante des Thrombins, welche durch eine Inaktivierung des aktiven Zentrums nicht fähig ist, PAR zu spalten. Dieses Thrombin rief eine Adhäsion und Spreitung der Thrombozyten sowie die Sekretion der dichten Granula und eine Inside-out-Aktivierung des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ hervor. Dieses Ergebnis wurde durch die Verwendung von Thrombozyten, die von einem Patienten isoliert wurden, der unter dem Bernard Soulier Syndrom litt und dementsprechend einen Mangel an GPIIb aufwies, unterstrichen. Diese Thrombozyten waren nicht durch inaktiviertes Thrombin aktivierbar (146).

Neben seiner entscheidenden Rolle in der Hämostase, sowie als Bindeglied zwischen TF-exprimierenden Tumorzellen und Thrombozyten, beeinflusst Thrombin das onkologische Geschehen auf vielerlei weiteren Ebenen. Ein prothrombotischer Zustand wird als charakteristisch für eine fortgeschrittene und metastasierende Krebserkrankung angesehen (147,148). Guo und Kollegen zeigten, dass Hirudin, ein spezifischer Thrombin-Inhibitor, die spontane Metastasenbildung unterdrückt und die Überlebenszeit im Mausmodell signifikant verlängert (149). Einen Überblick über den Einfluss des Thrombins auf das Tumorgeschehen bietet Abbildung 2.5.

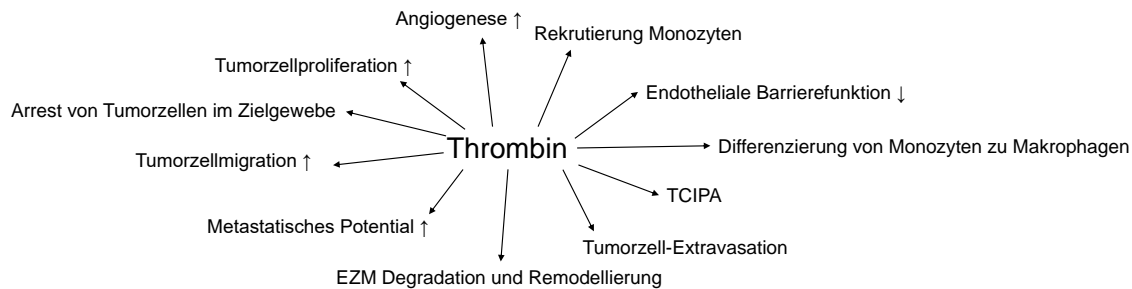


Abbildung 2.5 - Effekte des Thrombins auf das Tumorgeschehen sowie im Zuge der hämatogenen Metastasierung. Modifiziert nach (147).

Die pleiotropen Effekte des Thrombins erstrecken sich über die gesamten Schritte der metastatischen Kaskade und reichen von der Beeinflussung des Herauslösens der Tumorzellen aus dem Primärtumor, deren Migration ins umliegende Gewebe, dem Eintritt in das Gefäßsystem und dem Überleben dort bis hin zur Extravasation und Ausbildung einer Metastase im Zielgewebe (147). Dabei beeinflusst Thrombin die beteiligten Zellen direkt über PAR oder indirekt über die Bildung von Fibrin-Matrices (141,150).

Im Folgenden soll auf einzelne Beispiele des Einflusses von Thrombin auf das Krebsgeschehen näher eingegangen werden.

Adams und Kollegen zeigten eine Stimulation der Proliferation von Kolonkarzinomzellen infolge einer Thrombin-vermittelten Aktivierung von PAR-1 exprimierenden, Tumor-assoziierten, Stromazellen. Neben der Aktivierung von PAR-1 trägt auch die Thrombin-vermittelte Bildung einer Fibrin-Matrix signifikant zum Tumorwachstum bei (151). Fibrin interagiert mit einer Vielzahl Tumor-assoziierten Zellen, wie beispielsweise Endothelzellen, Thrombozyten, Leukozyten, Fibroblasten sowie den Tumorzellen selber (147,151). Zudem dienen Fibrin-Matrices als Reservoir für Thrombin, Wachstumsfaktoren oder andere Proteine (z.B. VEGF, Plasminogen, Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-2 (PAI-2) oder TGF β 1), die als Folge einer Fibrindegeneration durch Plasmin wieder in die Mikroumgebung des Tumors freigesetzt werden und proliferative Stimuli vermitteln (151–153). So konnte eine verstärkte Nekroseneigung der Tumorzellen sowie eine verminderte Vaskularisation solcher Tumore beobachtet werden, die aus Fibrinogen-defizienten Mäusen isoliert wurden (151).

Als weiteres Beispiel für die Effekte einer Thrombin-induzierten Aktivierung von PAR-1 auf Tumorzellen kann die PAR-1 abhängige Hochregulierung diverser Gene, die mit aggressiven, stark

metastasierenden Tumorentitäten assoziiert sind, genannt werden. Dazu gehören beispielsweise Osteopontin, CXCL1, Twist, Cathepsin S, sowie MMP-1 und MMP-2 (154–157). Bei Patienten, die unter metastasierendem Brustkrebs litten, konnte die Korrelation zwischen erhöhten Plasmakonzentrationen an Osteopontin und einer schlechten Prognose gezeigt werden (156). Die Aktivität von Osteopontin wird durch Thrombin auch auf Proteinebene weiter gesteigert. Osteopontin wird durch Thrombin proteolytisch gespalten, wobei sich die Spaltprodukte durch eine erhöhte biologische Aktivität auszeichnen und über Bindung an ihre jeweiligen Rezeptoren die Migration der Tumorzellen sowie eine Haptotaxis fördern (158,159).

Auch die Migration von Monozyten aus dem Blut in die Tumormikroumgebung sowie ihre Differenzierung zu Makrophagen scheinen partiell von der Thrombin-induzierten PAR-1-Aktivierung abhängig zu sein (160). Die rekrutierten Monozyten können wiederum zum Überleben und zur Proliferation der Tumorzellen beitragen.

Neben der Beteiligung an Prozessen im soliden Tumor unterstützt Thrombin diverse weitere Prozesse im Zuge der hämatogenen Metastasierung. Von Thrombin gebildetes lösliches Fibrin fungiert beispielsweise als Brücke zwischen zirkulierenden Tumorzellen und endothelialen Rezeptoren und unterstützt so den Arrest der Tumorzellen im Kapillarbett des Zielgewebes (161). Es konnte zudem gezeigt werden, dass sowohl Fibrinogen als auch Fibrin an der Neutrophilen-vermittelten Adhäsion von Melanomzellen via ICAM-1 beteiligt sind (162). Auch die Beteiligung an der Extravasation zirkulierender Tumorzellen konnte für Thrombin gezeigt werden. Thrombin induziert eine Herabsetzung der endothelialen Barrierefunktion und ermöglicht den Tumorzellen einen parazellulären Transit (163,164).

Des Weiteren beeinflusst Thrombin die Angiogenese im Primärtumor und in gebildeten Metastasen. Dabei stimuliert Thrombin die Tumor-assoziierte Angiogenese sowohl in Abhängigkeit von PAR-1 als auch PAR-unabhängig über die Interaktion mit Tumor- sowie Stromazellen (150,165,166). Wie bereits in Abschnitt 2.2.3 beschrieben, trägt die Tumorzell-vermittelte Aktivierung von Thrombozyten (besonders mittels Thrombin) und die damit assoziierte Freisetzung von Wachstumsfaktoren erheblich zur Tumor-assoziierten Angiogenese bei. Daneben vermittelt Thrombin über eine Aktivierung von PAR starke mitogene Effekte auf Endothelzellen, glatte Muskelzellen sowie vaskuläre Vorläuferzellen (150,154,166). Zusätzlich übt Thrombin chemotaktische Effekte auf Endothelzellen aus und führt zu einer verminderten Apoptoseneigung dieser Zellen (150,165,167). Zudem erhöht die Stimulation mit Thrombin die Expression von $\alpha_v\beta_3$, einem phänotypischem Angiogenesemarker auf Endothelzellen, der die Interaktionen zwischen Endothelzellen und der EZM fördert (168). Die Thrombin-vermittelten, PAR-unabhängigen Effekte auf die Angiogenese sind erneut besonders von Fibrin abhängig. Das Fibrinnetzwerk innerhalb der Tumormikroumgebung dient als Matrix für die Adhäsion von Endothelzellen und die Ausbildung kapillarähnlicher Strukturen (169). Zudem können, wie bereits erwähnt, Wachstumsfaktoren etc., die Einfluss auf

angiogenetische Prozesse nehmen können, innerhalb des Fibrinnetzwerks gespeichert und vor dem Abbau in der EZM geschützt werden (150,170).

Die dargestellten, breit gefächerten Effekte des Thrombins unterstreichen die Relevanz des Gerinnungssystems im Krebsgeschehen. Die Aufklärung der mechanistischen Interaktionen zwischen dem Tumorgeschehen und einzelnen Komponenten des Gerinnungssystems bietet dementsprechend die Möglichkeit, therapeutische Strategien zu entwickeln, um die Wahrscheinlichkeit einer Tumor-assoziierte VTE zu reduzieren. Zusätzlich trägt ein tieferes Verständnis dieser Interaktionen dazu bei, neue therapeutische Angriffspunkte zu erschließen, die den Teufelskreis aus einer Tumorzell-induzierten Aktivierung des Gerinnungssystems einerseits und den Tumor- sowie metastasierungsfördernden Effekten einer aktivierten Gerinnung andererseits zu durchbrechen.

2.3.2 Die Induktion einer Thrombozytenaktivierung via Tumorzell-assoziiertes löslicher Mediatorstoffe

Die Aktivierung via löslicher Mediatorstoffe stellt neben einer Aktivierung in Folge eines aktivierten Gerinnungssystems einen weiteren möglichen Mechanismus der Thrombozytenaktivierung dar. Einerseits können aktivierte Thrombozyten Mediatorstoffe freisetzen, welche autokrin die Aktivierung verstärken. Andererseits werden Aktivatoren durch die Tumorzellen selbst freigesetzt, die parakrin auf Thrombozyten wirken. Zu den wichtigsten parakrinen Mediatoren gehören ADP, Thromboxan A₂ und das high-mobility group box 1 protein (HMGB1). Einen Überblick über die Möglichkeiten der Thrombozytenaktivierung via Tumorzell-assoziiertes löslicher Mediatorstoffe liefert Abbildung 2.6.

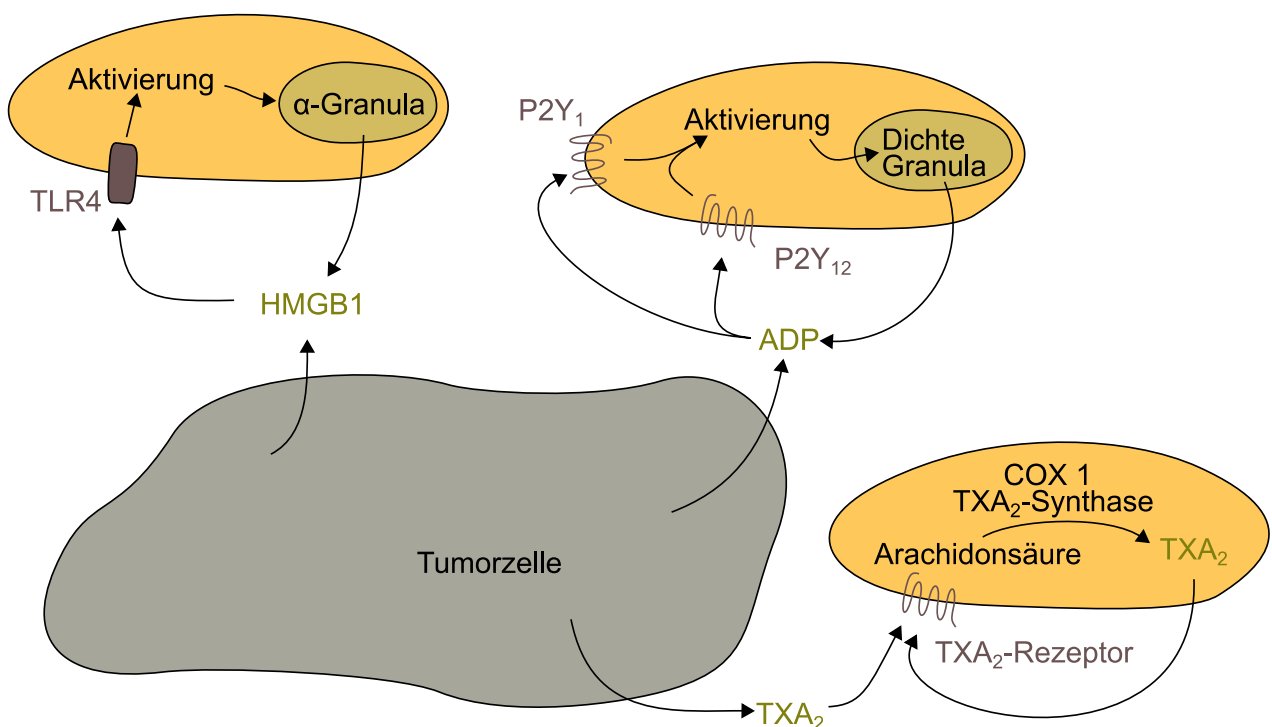


Abbildung 2.6 - Schematische Darstellung der Thrombozytenaktivierung infolge der Tumor-assoziierten löslichen Mediatorstoffe ADP, TXA₂ sowie HMGB1.

ADP kann direkt von Tumorzellen, wie beispielsweise Ovarialkarzinomzellen, freigesetzt werden (171). Zudem kommt ADP eine entscheidende Rolle als sekundärer Thrombozytenaktivator zu, da in der dichten Granula der Thrombozyten gespeichertes ADP infolge eines initialen Stimulus freigesetzt wird und über entsprechende purinerge Rezeptoren eine Autoaktivierung weiterer Thrombozyten hervorruft (172). Auf Thrombozyten finden sich zwei GPCRs, welche von ADP aktiviert werden können. Zum einen der Gα_q-gekoppelten P2Y₁-Rezeptor und zum anderen der Gα_i-gekoppelten P2Y₁₂-Rezeptor (173). Eine vollständige Aggregation der Thrombozyten infolge einer Stimulation mit ADP wird zunächst durch eine Aktivierung des P2Y₁-Rezeptors eingeleitet, welcher sich die Aktivierung des P2Y₁₂-Rezeptors anschließt (174). Eine Bindung von ADP am P2Y₁-Rezeptor führt über Inositoltriphosphat (IP₃) und 1,2-Diacylglycerin (DAG) zu einem Anstieg der

intrazellulären Calciumkonzentration. Eine Aktivierung der P2Y₁₂-Rezeptoren führt zur Inhibition der Adenylatcyclase und reduziert somit die Konzentration von intrazellulärem zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP). Zudem erfolgt via Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) eine Aktivierung der MAP-Kinasen und der Proteinkinase G (PKG). Die Konsequenz dieser dualen Rezeptoraktivierung mittels ADP sind die Förderung des *shape changes*, der Granulasekretion, eine inside-out Aktivierung des $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrins sowie eine Initiierung der Thromboxansynthese (174–176). ADP kommt dementsprechend eine entscheidende Rolle in der Stabilisation eines entstehenden Thrombus zu.

Die Relevanz des thrombozytenständigen P2Y₁₂-Rezeptors für die hämatogene Metastasierung konnten Wang und Kollegen belegen. Sie zeigten, dass die Bildung von Lungenmetastasen in P2Y₁₂-defizienten Mäusen signifikant reduziert ist. Zudem schien auch die Freisetzung von TGF β aus den Thrombozyten sowie die resultierende EMT der zirkulierenden Tumorzellen durch ein vorliegendes Defizit an thrombozytären P2Y₁₂-Rezeptoren stark beeinträchtigt (177). Diese Beobachtungen wurden von Guillem-Llobat und Kollegen untermauert, die ähnliche Ergebnisse für HT29-Kolonkarzinomzellen unter Verwendung des reversiblen P2Y₁₂-Antagonisten Ticagrelor erzielen konnten. Die Zugabe von Ticagrelor zu Tumorzellen, welche mit Thrombozyten coinkubiert wurden, hatte sowohl einen Einfluss auf die Expression von E-Cadherin (einem epithelialen Zellmarker) als auch auf die prometastatische Migration der Tumorzellen (4).

P2Y₁₂-Antagonisten sind nach Acetylsalicylsäure (ASS) die am häufigsten eingesetzte Wirkstoffgruppe im Rahmen von Herz-Kreislaufkrankungen (174). Sie lassen sich grob in zwei Gruppen unterteilen. Die erste Gruppe umfasst Thienopiperidine Ticlopidin, Clopidogrel sowie Prasugrel. Diese werden über eine Esterhydrolyse und Cytochrom P450-Proteine in aktive Metabolite überführt, welche irreversibel P2Y₁₂-Rezeptoren blockieren. Zum anderen wurden die reversiblen P2Y₁₂-Inhibitoren Cangrelor, Elinogrel sowie Ticagrelor entwickelt. Diese binden direkt an den Rezeptor und benötigen keine Bioaktivierung (178). Die Entwicklung von Elinogrel wurde jedoch im Jahre 2012 eingestellt (179).

Ein weiterer therapeutischer Ansatzpunkt für Ticagrelor neben der Hemmung der Thrombozytenaktivierung wurde Anfang letzten Jahres von Elaskalani und Kollegen vorgestellt. Sie unterstrichen die multifaktorielle Beteiligung des ADP-P2Y₁₂-Signalweges im Tumorgeschehen, welche über die Aktivierung von Thrombozyten hinausgeht. Sie zeigten die Expression des P2Y₁₂-Rezeptors für verschiedene Pankreaszelllinien und wiesen einen additiven Effekt für die gleichzeitige Gabe verschiedener Chemotherapeutika und Ticagrelor nach. Ein Grund dafür scheint die Beteiligung des P2Y₁₂-Rezeptors an der Aktivierung des *epidermal growth factor receptor* (EGFR) zu sein. Eine Inhibition von P2Y₁₂-Rezeptoren führte zu einer Reduktion der EGF-abhängigen AKT-Aktivierung, verminderte die Tumorzellproliferation und erhöhte den Effekt eines gegen EGFR-gerichteten therapeutischen Regimes (180).

Der *Toll-like receptor 4* (TLR4) ist ein weiterer Rezeptor, der unter anderem auf Thrombozyten exprimiert wird und durch lösliche Mediatorstoffe (in diesem Fall HMGB1) aktiviert werden kann. TLR4 spielt eine wichtige Rolle im Entzündungsgeschehen. Seine Aktivierung kann sowohl über bakterielles Endotoxin, als auch über endogene Liganden erfolgen (181). Im Tumorgeschehen nimmt TLR4 eine dichotome Rolle ein. Je nach Zusammensetzung der tumoralen Mikroumgebung und des Stadiums der Erkrankung kann eine Stimulation des TLR-4 Signalweges die Entwicklung des Tumors vorantreiben oder inhibieren (182,183). Ein endogener Ligand des TLR4 ist das HMGB1. Neben seiner Rolle als Zytokin, als welches es an der inflammatorischen Signaltransduktion im Organismus beteiligt ist, reguliert HMGB1 im Nucleus die Bindung zwischen der DNA und regulatorischen Proteinen (184,185). Zudem wird es zu den *damage associated molecular pattern molecules* (DAMPs) gezählt, welche durch ihre Freisetzung dem Organismus einen Gewebeschaden signalisieren (186). HMGB1 kann von nekrotischen Zellen, beispielsweise Tumorzellen, aktivierten Makrophagen oder aktivierten Thrombozyten sezerniert werden (187). Auch Thrombozyten exprimieren den HMGB1-aktivierbaren TLR4 und können somit auf bakterielle Endotoxine im Blut reagieren (188). Dementsprechend kann HMGB1 zu den sekundären Mediatorstoffen gezählt werden, der über eine Aktivierung des TLR4 die Autoaktivierung der Thrombozyten vorantreibt, die Aggregation fördert sowie eine Granulasekretion bedingt (189). Yu und Kollegen wiesen die Freisetzung von HMGB1 in Tumor-assoziierten Mikrovesikeln nach, sodass neben der autokrinen Aktivierung ebenso ein parakriner Aktivierungsmechanismus für HMGB1 relevant ist. Sie zeigten zudem, dass das Auftreten von Lungenmetastasen sowohl in TLR4 defizienten Mäusen, als auch nach der Gabe eines gegen HMGB1 gerichteten Antikörpers signifikant reduziert war und unterstrichen so eine mögliche prometastatische Rolle der TLR4-HMGB1-Signalkaskade für die hämatogene Metastasierung (190).

Abschließend soll der Thrombozyten aktivierende Mediatorstoff Thromboxan A₂ (TXA₂) näher beleuchtet werden. Die TXA₂-Synthese wird eng mit Thrombozyten assoziiert. Es konnte aber zudem gezeigt werden, dass auch Tumorzellen, beispielsweise Kolonrektalkarzinomzellen in der Lage sein können TXA₂ zu synthetisieren und damit die Tumorzellproliferation zu fördern (191). In Thrombozyten wird die TXA₂-Synthese durch die beiden Enzyme Cyclooxygenase-1 (COX-1) und Thromboxan A₂-Synthase katalysiert. Ausgangsstoff für die Synthese ist dabei die Arachidonsäure. Kommt es zu einer Aktivierung der Thrombozyten, führt die Ausschüttung des gebildeten und gespeicherten TXA₂ zu einem *positive feedback loop*. Der daran beteiligte Thrombozyten-ständige Rezeptor ist der Thromboxan A₂-Rezeptor (TXA₂-Rezeptor). Es handelt sich bei dem TXA₂-Rezeptor um einen G_q- und G_{12/13}-gekoppelten GPCR. Die Folge der Aktivierung des TXA₂-Rezeptors ist eine Förderung der Granula-Sekretion, sowie des *shape change* (192). Bezüglich der Rolle von TXA₂ im Tumorgeschehen wurde besonders der Effekt von ASS auf die Tumorprogression sowie die hämatogene Metastasierung untersucht. ASS inhibiert in niedriger Dosierung irreversibel die COX-1 und unterdrückt so die TXA₂-Synthese in Thrombozyten. Guillem-Llobat und Kollegen zeigten

beispielsweise, dass der Einsatz von ASS das Auftreten einer Thrombozyten-induzierten EMT von Kolonkarzinomzellen reduziert. Auch die Anzahl der Lungenmetastasen im Mausmodell war nach der Gabe von ASS vermindert. Inwiefern die präventiven Effekte des ASS auf die Thromboxan-Synthese zurückzuführen waren, konnte jedoch nicht eindeutig belegt werden, da auch die Prostaglandin-E₂ Synthese durch die Hemmung der COX1 beeinflusst wird und einen Einfluss auf die Metastasenbildung zu haben schien (4). Zu dem Ergebnis, dass zwar die Blockade des TXA₂-Rezeptors, nicht aber der Thromboxan-Synthese einen Effekt auf die TCIPA hat, kamen Menta und Kollegen in einer *in vitro* Studie mit Osteosarkomzellen (193). Dies könnte zum einen darin begründet sein, dass die Inhibition der Synthese über einen längeren Zeitraum erfolgen muss, um einen entsprechenden Effekt zu erzielen. Andererseits könnte es aber auch ein Hinweis auf eine parakrine Aktivierung der Thrombozyten sein, die durch TXA₂ ausgelöst wird, welches von den Tumorzellen und nicht von den Thrombozyten sezerniert wird.

2.3.3 Thrombozytenaktivierung infolge des direkten Kontakts mit Tumorzellen

Thrombozyten präsentieren auf ihrer Oberfläche eine Vielzahl verschiedener Adhäsionsrezeptoren. Dazu gehören beispielsweise GPIb-IX-V, die beiden zu den *C-type lectin-like receptors* zählenden Adhäsionsmoleküle CLEC-2 und P-Selektin, sechs verschiedene Integrine, sowie die Rezeptoren GPVI und FcγRIIa aus der Immunglobulin Superfamilie. Abbildung 2.7 bietet einen Überblick über jene thrombozytären Adhäsionsrezeptoren, die für die direkte Interaktion mit Tumorzellen als relevant gelten.

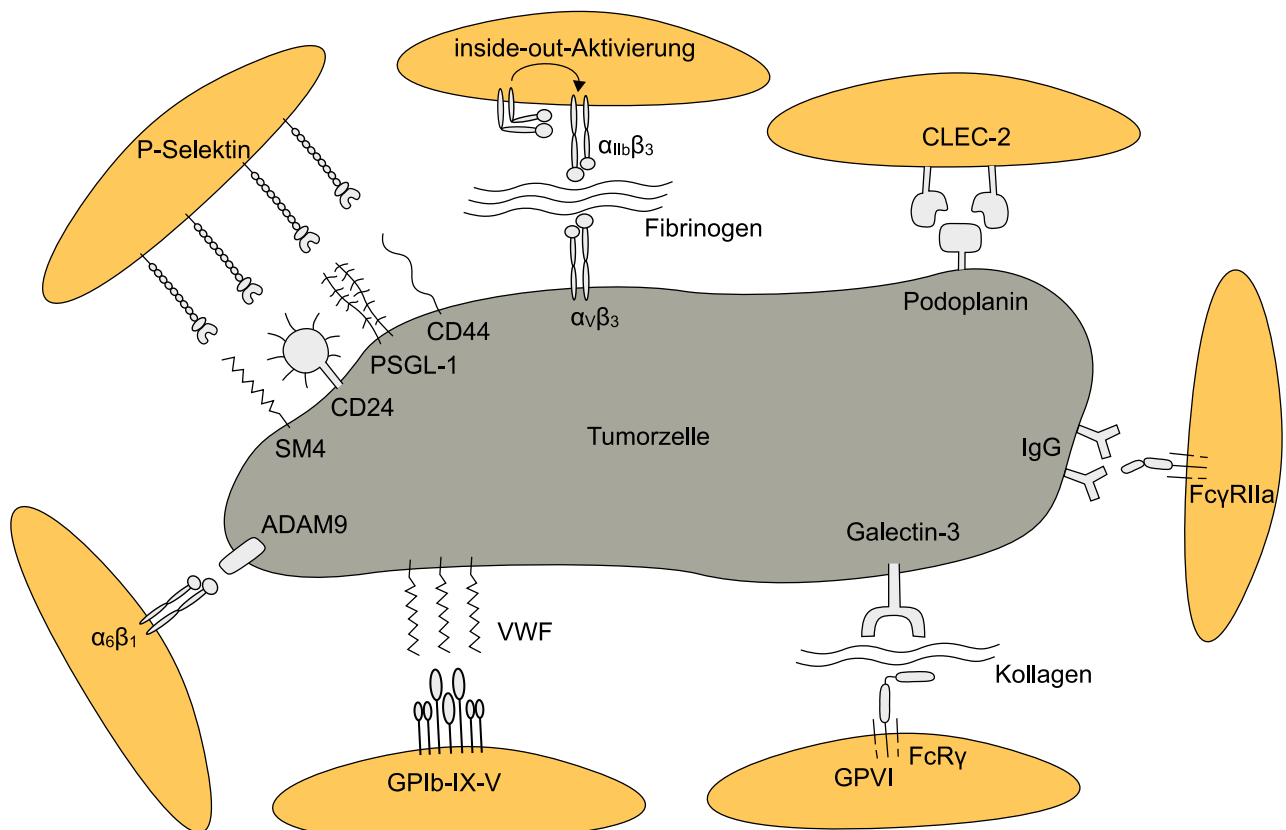


Abbildung 2.7 - Überblick über Adhäsionsrezeptoren, die eine Relevanz für die direkten Interaktionen von Thrombozyten mit Tumorzellen besitzen.

Im Folgenden sollen die für die vorliegende Arbeit relevanten Adhäsionsrezeptoren näher betrachtet werden.

2.3.3.1 Integrine

Integrine bilden eine Familie transmembranärer Rezeptoren, die über die Bindung an Komponenten der EZM oder Liganden auf der Zelloberfläche für die Kontaktausbildung der Zellen mit ihrer Umgebung verantwortlich sind. Die heterodimeren Glykoproteine sind aus nicht-kovalent verbundenen α - und β -Untereinheiten aufgebaut. Bis heute sind 18 α - und acht β -Untereinheiten bekannt (194). Auf der Oberfläche von Thrombozyten sind die Integrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_L\beta_2$ und $\alpha_V\beta_3$ beschrieben. Im Folgenden sollen einige Vertreter dieser Integrine näher erläutert werden, denen

eine Rolle in der hämatogenen Metastasierung zugeschrieben wird, und die im Verlauf der Arbeit näher untersucht wurden.

Die thrombozytenständigen Integrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ sowie $\alpha_2\beta_1$ vermitteln eine Adhäsion an Proteine der EZM und fördern die anschließende Aggregation der Thrombozyten (195). $\alpha_2\beta_1$ vermittelt zusammen mit GPVI eine Adhäsion an verschiedene Kollagen-Typen. Hierbei scheint die adhäsive Funktion eher von $\alpha_2\beta_1$ auszugehen, wohingegen GPVI eher für eine Kollagen-vermittelte intrazelluläre Signaltransduktion und eine daraus resultierende Aktivierung der Thrombozyten verantwortlich zu sein scheint (196–198).

2.3.3.1.1 Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$

$\alpha_{IIb}\beta_3$ nimmt eine zentrale Rolle bei der Querverknüpfung von Thrombozyten innerhalb eines Thrombus ein. Bei ruhenden Thrombozyten liegt $\alpha_{IIb}\beta_3$ in einer inaktiven Konformation vor, die nicht in der Lage ist, makromolekulare Liganden wie z.B. Fibronectin, Fibrinogen, vWF, Thrombospondin oder Vitronectin zu binden (196,199,200). Nach einer initialen Aktivierung der Thrombozyten kommt es zu einem *inside-out signaling*, in dessen Folge sich die Konformation des Integrins in eine von zwei aktiven Zuständen ändert. Diese beiden aktiven Konformationen, in denen das Integrin zur Ligandbindung befähigt ist, unterscheiden sich dennoch in ihrer Affinität zu Fibrinogen (201).

Auch zur Interaktion mit Tumorzellen scheint das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ einen entscheidenden Beitrag zu leisten. Eine Reihe von Arbeiten konnte den engen Bezug zwischen $\alpha_{IIb}\beta_3$ und der Interaktion von Tumorzellen mit Thrombozyten bzw. der TCIPA belegen (202–204). So inhibierte ein gegen $\alpha_{IIb}\beta_3$ gerichtetes Fab-Fragment eines monoklonalen Antikörpers die Interaktionen von Thrombozyten und Melanomzellen und verhinderte eine TCIPA. Ebenso verhielt es sich, wenn anstelle voll funktionsfähiger Thrombozyten, Thrombozyten von Spendern verwendet wurden, welche unter einer Glanzmann-Thrombasthenie litten. Aufgrund eines Gendefekts exprimieren diese Thrombozyten keine oder defekte $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrine (205). Diese Beobachtungen konnten in *in vivo* Studien bestätigt werden, im Rahmen derer gezeigt wurde, dass die Gabe eines $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Antagonisten vor der Injektion von *Lewis lung carcinoma* Zellen die Ausbildung von Metastasen signifikant reduzierte (206).

Ein Counterrezeptor für thrombozytäres $\alpha_{IIb}\beta_3$ scheint das, beispielsweise von Melanomzellen exprimierte, Integrin $\alpha_v\beta_3$ zu sein. Über die Bindung von Fibrin(ogen) oder Fibrin-Fibronectin bildet $\alpha_{IIb}\beta_3$ eine feste Brücke mit Tumorzell-assoziierten $\alpha_v\beta_3$ Molekülen (207–209). Fibrin wird dabei entweder von den Tumorzellen selber generiert oder entsteht infolge einer TF-induzierten Aktivierung der Gerinnungskaskade und der daraus resultierenden Thrombin-Generierung.

Die Blockade der α_v Untereinheit mittels eines Antikörpers führte im Mausmodell zu einer signifikanten Abnahme der Lungenmetastasen nach i.v. Injektion von B16 Melanomzellen (210). Das Integrin $\alpha_v\beta_3$, das auf Tumorzellen exprimiert wird, ist mit der Regulation diverser zellulärer

Funktionen im Tumorgeschehen assoziiert, wie beispielsweise dem Zellüberleben sowie der Zellmigration (207,211).

Weiterhin bietet das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ einen interessanten therapeutischen Ansatzpunkt, der schon seit Jahren zur Vermeidung ischämischer, kardialer Komplikationen bei Patienten, die sich einer perkutanen Koronarintervention unterziehen, sowie bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom (z.B. instabiler Angina pectoris) genutzt wird. Derzeit sind drei $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Inhibitoren in Deutschland zugelassen. Abciximab (ReoPro[®]), das Fab-Fragment eines chimären monoklonalen Antikörpers gegen $\alpha_{IIb}\beta_3$, Tirofiban (AGGRASTAT[®]), ein nicht peptidischer, niedermolekularer $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Inhibitor, sowie Eptifibatid (Integrilin[®]), ein synthetisch hergestelltes Heptapeptid. Alle drei verfügbaren Wirkstoffe werden in Kombination mit Heparinen und ASS eingesetzt und müssen parenteral appliziert werden (212–214). Kononczuk und Kollegen zeigten eine antitumorgene und proapoptotische Wirkung von Eptifibatid (und eingeschränkt für Abciximab) in einer *in vitro* Studie mit MCF-7 Brustkrebszellen. Sie untersuchten jedoch die Wirkung der Wirkstoffe auf tumorständiges $\alpha_{IIb}\beta_3$ (215). Eine weitere Studie zeigte unter Verwendung von Eptifibatid die Relevanz thrombozytären $\alpha_{IIb}\beta_3$, sowie Tumorzell-ständigen $\alpha_v\beta_3$ für die Invasion sowie Migration von MDA-MB-231 Brustkrebszellen während der Metastasierung (216). Die Auswirkung einer Blockade thrombozytären $\alpha_{IIb}\beta_3$ mithilfe der genannten Inhibitoren auf die Interaktion zwischen Tumorzellen und Thrombozyten könnte als ein weiterer interessanter therapeutischer Ansatzpunkt in der antimetastatischen Therapie untersucht werden.

2.3.3.1.2 Integrin $\alpha_6\beta_1$

Neben dem Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ wird auch das Integrin $\alpha_6\beta_1$ auf Thrombozyten exprimiert. Dieses wurde im Kontext der Interaktion mit Tumorzellen allerdings nur ansatzweise untersucht. 2016 zeigten Mammadova-Bach und Kollegen, dass das thrombozytäre Integrin $\alpha_6\beta_1$ direkt an den Tumorzell-ständigen Rezeptor ADAM9 bindet und dadurch einerseits die Aktivierung der Thrombozyten und andererseits die Extravasation von Tumorzellen vorantreibt. Dies konnte sowohl für AT-3 Brustkrebszellen, MC38 Kolonkarzinomzellen, B16F10 Melanomzellen als auch für MDA-MB-231 Brustkrebszellen gezeigt werden (217). ADAM9 besitzt eine intrazelluläre Domäne, an die sich die Disintegrin- sowie die Metalloprotease-Domäne anschließen. Abschließend folgt die N-terminale Prodomäne. Diese Prodomäne muss für die Aktivierung der enzymatischen Fähigkeiten abgespalten werden. ADAM9 ist an einer Reihe zellbiologischer Vorgänge unmittelbar beteiligt. Dazu gehören beispielsweise das *ectodomain-shedding* sowie die proteolytische Spaltung verschiedener Transmembranproteine (218). Durch den Einsatz eines Antikörpers gegen die Integrin α_6 -Untereinheit konnte eine Reduktion der Zahl der Lungenmetastasen im Mausmodell erzielt werden. Diese Untersuchungen unterstreichen die potentielle Relevanz des thrombozytären $\alpha_6\beta_1$ im Geschehen der hämatogenen Metastasierung (217). Weitere Untersuchungen, die die Rolle des thrombozytäre Integrins $\alpha_6\beta_1$ sowohl im Zusammenhang mit einer Thrombus-Formation als auch

im metastatischen Geschehen beleuchten, sind zur Evaluation als Target-Struktur einer antimetastatischen Therapie unabdingbar.

2.3.3.2 GPIb-IX-V

Der Glykoprotein Ib-IX-V Komplex (GPIb-IX-V) ist ausschließlich auf Thrombozyten und Megakaryozyten exprimiert. Nach einer Gefäßverletzung sorgt GPIb-IX-V für ein initiales Anheften der Thrombozyten an die Gefäßwand. Diese Anheftung findet selbst unter starkem Scherstress in Arteriolen über die Bindung von GPIb-IX-V an subendotheliale vWF statt (219). Der GPIb-IX-V Komplex besteht aus vier verschiedenen Untereinheiten: GPIb α , GPIb β , GPIX und GPV. Diese Untereinheiten gehören alle zur Klasse der Typ I transmembranären Proteine und enthalten *leucin-rich repeat* (LRR)-Motive. GPIb α ist über Disulfid-Brücken mit zwei GPIb β Untereinheiten verbunden und über nicht kovalente Bindungen mit der GPIX Untereinheit verknüpft. Dieser stabile Komplex ist schwach in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 mit GPV assoziiert (220). Neben vWF als primärem Liganden konnten zahlreiche weitere Liganden des GPIb-IX-V Komplexes identifiziert werden. Dazu gehören beispielsweise Thrombin, P-Selektin, das leukozytenständige Integrin $\alpha_4\beta_2$, hochmolekulares Kininogen, sowie die Gerinnungsfaktoren XI und XII (221–224). Alle bekannten Bindungsstellen der Liganden sind in der GPIb α -Untereinheit lokalisiert (220). Eine Aktivierung des GPIb-IX-V-Komplexes führt über ein *outside-in signaling* schlussendlich zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration und Aktivierung der PKC. Dies induziert eine TXA₂-Synthese, Granulasekretion, Veränderungen am Zytoskelett, sowie ein *inside-out signaling*, das zu einer Aktivierung des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ führt (225–228).

Die Rolle des GPIb-IX-V Komplexes während der hämatogenen Metastasierung wird in der Literatur kontrovers diskutiert. GPIb α *knockout* Mäuse zeigten eine reduzierte Neigung zu Lungenmetastasen (229). Auch zeigten die Thrombozyten von Patienten mit Bernard-Soulier Syndrom (GPIb-IX-defizient) nach dem Kontakt mit Osteosarkomzellen funktionelle Einschränkungen, die sich in einer reversiblen Aggregation mit Ausbleiben einer sekundären Aggregation widerspiegeln (204). Die Expression von vWF konnte für verschiedenen Krebszellen gezeigt werden (230). Dementsprechend liegt die Vermutung nahe, dass GPIb α an vWF auf Tumorzellen bindet und so die TCIPA und somit die Metastasierung fördert.

Interessanterweise zeigten Studien aber ebenso, dass ein gegen GPIb α gerichteter Antikörper die Metastasierung von Melanomzellen förderte (231). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Bindung verschiedener Antikörper einen aktivierenden Effekt auf GPIb α und damit auf Thrombozyten ausübt und somit die TCIPA vorantreibt (232–235). Auch könnte die Metastasierung von Tumorzellen in verschiedene Organe durch eine Blockade des GPIb unterschiedlich beeinflusst werden. Zur abschließenden Beurteilung der Rolle von GPIb bei der Tumorprogression sind weiterführende Untersuchungen vonnöten.

2.3.3.3 CLEC-2

Bei dem thrombozytenständigen Adhäsionsrezeptor CLEC-2 handelt es sich um ein Typ II transmembranäres Glykoprotein, welches eine extrazelluläre *C-type lectin-like domain* besitzt. Intrazellulär weist CLEC-2 eine einzelne YXXL Sequenz auf, ein sogenanntes *hem-immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (hemITAM). Die Aktivierung von CLEC-2 erfolgt über die Bindung an Podoplanin. Podoplanin besitzt extrazellulär drei Thrombozyten-stimulierende Regionen, die sich durch eine O-Glykosylierung an Threoninresten auszeichnen (236). In gesundem Gewebe wird Podoplanin unter anderem von lymphatischen Endothelzellen, Podozyten, Osteozyten, Keratinozyten und Myofibroblasten exprimiert (237). Die Überexpression von Podoplanin konnte für verschiedene maligne Neoplasien gezeigt werden. Dazu gehören beispielsweise Plattenepithelkarzinome, Glioblastome, Osteosarkome, Seminome und Mesotheliome (238–242).

Die Bindung von CLEC-2 an Podoplanin führt zu einer *src family kinase* (SFK)-vermittelten Phosphorylierung von Tyrosin im hemITAM sowie zur Dimerisierung von CLEC-2. Infolgedessen kommt es zur Rekrutierung der *spleen tyrosine kinase* (Syk) via ihrer SH2 Domäne und zu deren Autophosphorylierung (243,244). Diese wiederum induziert die weitere Phosphorylierung von hemITAM. Syk phosphoryliert und aktiviert *linker for activation of T cells* (LAT) sowie *SH2 domain-containing leukocyte-specific protein of 76 kDa* (SLP-76) (245). Infolge dessen kommt es zur Aktivierung von PI3K und Phospholipase C γ 2, die in der Aktivierung der Thrombozyten mündet (246).

Über die Bindung von Podoplanin, welches von metastasierenden Tumorzellen präsentiert wird, trägt CLEC-2 so zu einer TCIPA bei (247). Riedl und Kollegen zeigten, dass eine erhöhte Expression von Podoplanin in Hirntumoren bei Patienten mit einer verstärkten Neigung zur Thrombozytenaggregation und einem erhöhten Risiko für venöse Thromboembolien assoziiert ist (248).

Nach der Injektion von Podoplanin-exprimierenden CHO-Zellen stellten Kunita und Kollegen im Mausmodell einen Podoplanin-abhängigen verlängerten Arrest der Tumorzellen im Gefäßsystem der Lunge sowie die vermehrte Bildung spontaner Metastasen fest. Die Größe des primären Tumors oder der gebildeten Metastasen war hingegen von der Anwesenheit des Podoplanins unbeeinflusst. War Podoplanin aufgrund von Punktmutationen nicht mehr befähigt, CLEC-2 zu binden, war sowohl die TCIPA als auch die Bildung von Metastasen signifikant reduziert (249). Anhand dieser Erkenntnisse lässt sich eine potentielle Rolle von CLEC-2 und Podoplanin als Zielstruktur in der antimetastatischen Therapie von Podoplanin-positiven Tumoren postulieren. Als Beispiel für eine therapeutische Strategie zeigten Cheng und Kollegen eine verminderte Podoplanin-induzierte Thrombozytenaktivierung unter Verwendung eines neuartigen CLEC-2-Inhibitors. Sie konnten zeigen, dass der Einsatz des Inhibitors eine TCIPA verminderte sowie in Kombination mit einer

Cisplatin-Therapie die Überlebenszeit im Mausmodell verlängerte, ohne mit einem erhöhten Blutungsrisiko einherzugehen (250).

2.3.3.4 FcγRIIa

Humane Thrombozyten exprimieren im Gegensatz zu murinen Thrombozyten den ITAM-Rezeptor FcγRIIa (251). Dieser gehört zur Familie der Immunrezeptoren und bindet an IgG, das von Antigen-Antikörper-Komplexen sowie von Bakterien, die einer Opsonierung unterliegen, präsentiert wird (252). Er besitzt eine geringe Affinität zu monomeren IgG-Molekülen, jedoch eine hohe Avidität gegenüber IgG-präsentierenden Immunkomplexen (253). Zudem wurde eine IgG-unabhängige Beteiligung von FcγRIIa an der Aktivierung von Thrombozyten über die Interaktionen mit GPCRs, GPVI, GPIb-IX-V und $\alpha_{IIb}\beta_3$ beschrieben (252,254–257). FcγRIIa besitzt extrazellulär zwei Ig-ähnliche Domänen, an die sich intrazellulär eine ITAM Domäne anschließt. Eine ITAM Domäne enthält zwei Tyrosin-Reste, die infolge einer Clusterbildung der Rezeptoren phosphoryliert werden (258). Analog zu anderen ITAM-assoziierten Rezeptoren erfolgt die Signalweiterleitung und letztlich die Aktivierung der Thrombozyten unter anderem über die Phosphorylierung von syk, einer Aktivierung von Phospholipase C γ 2 und der Proteinkinase C (252). Die Beteiligung der FcγRIIa an einer Tumorzell-vermittelten Thrombozytenaktivierung wurde 2014 von Mitrugno und Kollegen postuliert. Sie konnten zeigen, dass eine Antikörper-induzierte Blockade von FcγRIIa zu einer reduzierten TCIPA und Granulasekretion infolge der Inkubation der Thrombozyten mit Prostatakarzinomzellen (PC3M) führte (259). Die Autoren postulierten eine Antikörper-unabhängige Aktivierung des FcγRIIa über Wechselwirkungen mit $\alpha_{IIb}\beta_3$ (259). 2019 postulierten Miao und Kollegen zudem, dass von Tumorzellen sezerniertes IgG an der Aktivierung der Thrombozyten über die direkte Bindung an FcγRIIa beteiligt ist. Sie untermauerten so die Diskussion um FcγRIIa als potentielles Target einer antimetastatischen bzw. antikoagulativen Therapie (260).

2.3.3.5 GPVI

Das Glykoprotein VI (GPVI) ist ein Kollagen-Rezeptor, der ausschließlich auf Megakaryozyten und Thrombozyten exprimiert wird. Bei GPVI handelt es sich um ein transmembranäres Protein. Die extrazelluläre Domäne besteht aus zwei Immunoglobulin C2-ähnlichen Abschnitten, die im 90 °-Winkel zueinander angeordnet und über einen Mucin-ähnlichen Anker mit der Zellmembran verbunden sind. Die extrazelluläre Domäne von GPVI fungiert als Bindungsstelle für Kollagen (Typ I). (261). Die transmembranäre Domäne, welche aus 19 Aminosäuren besteht, besitzt das Potential, über ionische Wechselwirkungen eine Dimerisierung mit FcR γ zu bewirken (262). Es konnte gezeigt werden, dass lediglich Heterodimere aus GPVI und FcR γ befähigt sind, Kollagen mit einer hohen Affinität zu binden (263,264). Der zytoplasmatische Teil des GPVI weist eine Prolin-reiche Domäne auf, die als Bindestelle für SFKs (insbesondere Lyn und Fyn) dient (265). Nach Ligandbindung kommt es zu einer Clusterbildung von GPVI-Molekülen (266). Infolgedessen wird die ITAM-Region

der GPVI assoziierten FcR γ -Kette freigelegt. Es folgt eine Phosphorylierung des ITAM durch Lyn und Fyn und eine Rekrutierung und Aktivierung von Syk. Syk initiiert - wie oben schon erläutert - die Bildung eines *signaling*-Komplexes mit dem transmembranären Protein LAT und den zytosolischen Proteinen SPL-76 und GADS. Die Bildung dieses Komplexes führt über die Aktivierung von PLC γ 2 schlussendlich zur Aktivierung der Thrombozyten (245,267).

Liegt infolge einer Gefäßverletzung die subendotheliale Matrix frei, sorgt GPVI in Verbindung mit $\alpha_2\beta_1$ für die stabile Adhäsion der Thrombozyten an Kollagen. Zuvor fand eine erste, lediglich vorübergehende Adhäsion der Thrombozyten im geschädigten Gewebe über den thrombozytären GPIb-IX-V-Rezeptor an vWF statt (197,268). Neben Kollagen sind beispielsweise Fibronectin, Fibrin und Laminin weitere Liganden des GPVI (269–271).

Ein weiterer Ligand des GPVI, der essentiell für die Bindung und Aktivierung des GPVI durch Tumorzellen zu sein scheint, ist Galectin 3 (272). So zeigten Dovizio und Kollegen, dass Kolonkarzinomzellen, die Galectin 3 exprimieren, Thrombozyten über GPVI aktivieren, was die Sekretion der α -Granula zur Folge hatte (273). Die Bindung von GPVI an Galectin 3 führte jedoch nicht nur zu einer Aktivierung der Thrombozyten, sondern initiierte zudem in Anwesenheit von PDGF eine Hochregulierung von COX-2 in den Tumorzellen und eine daraus resultierende vermehrte Freisetzung von Prostaglandin E2 (273). Die Freisetzung von Prostaglandin E2 induzierte über eine autokrine Stimulation schlussendlich eine Verminderung der Apoptoseeigung der Zelle und eine erhöhte Expression von EMT-assoziierten Proteinen (274). Volz und Kollegen unterstrichen zudem die Rolle des GPVI als Regulator der vaskulären Integrität. Sie inhibierten GPVI mit Hilfe eines Antikörper-Fragments und konnten das vermehrte Auftreten intratumoraler Blutungen beobachten, in deren Folge das Tumorstadium signifikant reduziert war. Zudem zeigte sich bei gleichzeitiger Verabreichung des Antikörper-Fragments und der Zytostatika Doxorubicin und Paclitaxel eine Akkumulation beider Zytostatika im Tumorgewebe (275). Aus dieser Vielzahl an Wechselwirkungen wird erneut ersichtlich, dass die Interaktion zwischen Tumorzellen und Thrombozyten nicht nur eine Thrombozytenaktivierung zur Folge hat, sondern auch, dass das Überleben und die metastatischen Eigenschaften der Tumorzelle direkt von der Bindung an Thrombozyten determiniert werden kann.

2.3.3.6 P-Selektin

Bei Selektinen handelt es sich um membrangebundene Glykoproteine. Der Name leitet sich von den Lektinen ab und verweist auf deren Eigenschaft calciumabhängig spezifisch an Kohlenhydratstrukturen zu binden (276). Die Familie der Selektine lässt sich in drei C-Typ-Lektine unterteilen, die entsprechend ihrer zellulären Lokalisation E- (Endothel), L- (Leukozyten) und P-Selektin (Thrombozyten und Endothel) genannt werden (277,278). Alle drei Selektine besitzen eine homologe Struktur, die aus fünf Domänen bestehen. Dem kleinen, zytoplasmatischen Rest (17-35 Aminosäuren je nach Selektin-Subtyp), schließt sich eine transmembranäre Domäne an. Extrazellulär folgen, je nach Selektin, eine unterschiedliche Anzahl von *short consensus repeats*

(SCRs). Humanes L-Selektin besitzt zwei SCRs, E-Selektin sechs und P-Selektin neun SCRs. Jede SCR besteht aus 60 Aminosäuren (279,280). Die SCRs verleihen der Ligandbindungsstelle ihre exponierte Lage auf der Zellmembran. Auf die SCRs folgt eine EGF-ähnliche Domäne. Die eigentliche Kohlenhydratbindungsstelle (Lektindomäne) schließt sich daran an. Diese Lektindomäne alleine ist ausreichend für eine spezifische Bindung an Selektin-Liganden (281). L-, E- und P-Selektin weisen eine hohe Sequenzhomologie (60-65 %) innerhalb der N-terminalen Lektindomäne auf (278). Die Ligandbindungsfähigkeit der Lektindomäne wird allosterisch von der EGF-Domäne beeinflusst (282). So zeigten Phan und Kollegen, dass die EGF-Domäne durch Aufrechterhaltung einer bestimmten Konformation zu einer Affinitätserhöhung des Rezeptors führt (283).

P-Selektin wird konstitutiv exprimiert und findet sich sowohl in den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen, als auch in den α -Granula der Thrombozyten. Infolge einer Aktivierung der Zellen migrieren die P-Selektin-haltigen Zellkompartimente zur Zellmembran und verschmelzen mit dieser, sodass P-Selektin auf der Zelloberfläche präsentiert wird (284). Sowohl für P- als auch für E-Selektin wurde eine Aktivierung der Tyrosinkinase Syk sowie verschiedener SFKs beschrieben, die über die zytoplasmatischen Resten der Selektine vermittelt wird (285,286).

2.3.3.6.1 Liganden des P-Selektin

Selektine erkennen und binden Mucin-ähnliche Glykoproteine. Diese bestehen aus einem Proteingrundgerüst, an das O-glykosidisch Kohlenhydratketten gebunden sind. Die Bindung der Kohlenhydratketten findet post-translational mittels Glykosyltransferasen statt. Das minimale Bindungsmotiv für alle Selektine besteht aus der sialylierten Blutgruppenderminante „sialyl-Lewis^x“ (sLe^x) (Sia α 2,3-Gal β 1,4-(Fuc α 1,3-)GlcNAc β 1) und ihrem Isomer „sialyl-Lewis^a“ (sLe^a) (Sia α 2,3-Gal β 1,3-(Fuc α 1,4-)GlcNAc β 1). Die Synthese dieser Kohlenhydratstrukturen erfolgt mittels α 1,3-Fucosyltransferasen (FucTIV und FucTVII), α 2,3-Sialyltransferasen, β 1,4-Galaktosyltransferasen (GalT-I) und β 1-Glucosaminyltransferasen (277,287). Durch Akkumulation vieler sLe^x-Epitope an einem Serin oder Threonin-reichen Proteingrundgerüst, das eine Clusterbildung der Liganden ermöglicht, wird eine Affinitätserhöhung gegenüber den Selektinen erreicht (288). Diese Anordnung der Selektinbindungsepitope führt dazu, dass Selektin-Liganden häufig eine Mucin-ähnliche Struktur aufweisen. Von den „echten“ Mucinen unterscheidet sie das Fehlen sogenannter *tandem-repeats*, einer bestimmten Abfolge von sich wiederholenden Aminosäuren (289,290). Durch die Präsentation vieler Bindungsepitope binden Mucin-ähnliche Liganden im nanomolaren Bereich an Selektine, während sich die Affinität isolierten sLe^x im millimolaren Bereich befindet (193,291).

Der prominenteste Vertreter unter den P-Selektin Liganden ist *P-selectin glycoprotein ligand-1* (PSGL-1). Das sialinsäurehaltige Glykoprotein wurde bereits 1992 von Moore und Kollegen aus der Zellmembran myeloider Zellen gewonnen und charakterisiert (292). Strukturell handelt es sich bei PSGL-1 um ein Disulfid-verknüpftes Homodimer. Seine Fähigkeit der Selektinbindung erlangt die

extrazelluläre Domäne des transmembranären PSGL-1 infolge zweier post-translationaler Modifikationen. Diese beinhalten einerseits die Sulfatierung freier Tyrosinreste und andererseits eine O-Glykosylierungen des Proteins in Form der beschriebenen sLe^x-Motive (293,294). PSGL-1 wird eng mit dem sogenannten „Leukozytenrollen“ entlang des Endothels assoziiert. Leukozyten exprimieren PSGL-1, welches an P-Selektin bindet, das von aktivierten Endothelzellen exprimiert wird und sich in einer exponierten Lokalisation auf den Spitzen der Mikrovilli des Endothels befindet. Durch die Bindung von P-Selektin an PSGL-1 werden die Leukozyten abgebremst und die feste Bindung über weitere Adhäsionsrezeptoren (z.B. Integrine) ermöglicht. Andererseits trägt es zur Interaktion zwischen Leukozyten bei, da auch L-Selektin befähigt ist, PSGL-1 mit hoher Affinität zu binden (292,295). PSGL-1 vermittelt nicht nur ein „Abbremsen“ der Leukozyten über direkte Bindungen, es ist zudem an intrazellulären Signalkaskaden beteiligt, die zur Aktivierung von β_2 -Integrinen beitragen. β_2 -Integrine ermöglichen wiederum eine stabile Interaktion mit Endothelständigem ICAM-1 und verlangsamen so das Zellrollen weiter (296). Neben der konstitutiven Expression von PSGL-1 auf Leukozyten konnte eine Präsentation von PSGL-1 auf der Oberfläche von Tumorzellen, beispielsweise Prostatakarzinomzellen, gezeigt werden (297). Gong und Kollegen bewiesen, dass ein *knockdown* des PSGL-1 in den Tumorzellen zu einer signifikant reduzierten Aggregatbildung zwischen aktivierten Thrombozyten und Lungenkarzinomzellen (A549) führte (298).

Bei CD24 handelt es sich um ein Glykoprotein, dessen Proteingrundgerüst stark glykosyliert vorliegt. Die Struktur und der Glykosylierungsgrad unterscheiden sich je nach Gewebelokalisation des CD24. Humanes CD24 weist eine hohe Dichte an N- und O-Glykosylierung auf und besitzt infolgedessen ebenfalls Mucin-ähnliche Charakteristika (299). CD24, auch unter dem Namen *heat-stable antigen* (HAS) bekannt, ist über einen Glykosyl-Phosphatidylinositol (GPI-) Anker mit der Zellmembran verbunden und in *lipid rafts* organisiert (300). Innerhalb dieser *lipid rafts* konnten Interaktionen von CD24 mit src-Kinasen, G-Proteinen (beispielsweise CXCR4) und Calciumkanälen gezeigt werden (301–303). Die Funktion von CD24 unterscheidet sich je nach betrachtetem Gewebe und reicht von der Beteiligung an der B- und T-Zellentwicklung über Autoimmunerkrankungen sowie der Neurogenese bis hin zu diversen Tumorerkrankungen (88,299,304).

Die Expression von CD24 konnte für eine Reihe verschiedener Tumorentitäten nachgewiesen werden. Dazu gehören beispielsweise B-Zell-Lymphome, Prostatakarzinome, Kolonkarzinome, Ovarial- und Brustkrebs (299). Die Expression von CD24 konnte dabei mit einer schlechteren Prognose und einer kürzeren Gesamtüberlebenszeit der Patienten assoziiert werden (305–307). Salnikov und Kollegen zeigten, dass der Einsatz eines gegen CD24-gerichteten Antikörpers (SWA11) sowohl die Tumorzellproliferation als auch die Tumor-assoziierte Angiogenese im Mausmodell signifikant reduzierte und zudem den antitumoralen Effekt einer Therapie mit Gemcitabin verstärkte (308).

Als weiterer P-Selektin Ligand soll an dieser Stelle CD44 genannt werden. Zwar konnte gezeigt werden, dass Kolonkarzinomzell-assoziiertes CD44 unter Flussbedingungen an der P-Selektin vermittelten Bindung von Thrombozyten beteiligt ist, die Avidität der Bindung ist jedoch gegenüber der Bindung von PSGL-1 an P-Selektin um den Faktor sieben schwächer (309). Hinzu kommt der Umstand, dass CD44 neben der Bindung an P-Selektin auch befähigt ist als Fibrin-Rezeptor auf Tumorzellen zu fungieren. Alves und Kollegen zeigten, dass die Bindung von Fibrin an CD44 mit dessen Bindung an P-Selektin interferiert und die Bildung von Tumorzell-Thrombozyten-Heteroaggregaten infolge dessen vermindert ist (309).

Abschließend soll das sulfatierte Galaktocerebrosid SM4 genannt werden, das beispielsweise auf MC-38 Kolonkarzinomzellen als Ligand für P-Selektin identifiziert werden konnte (310). Die physiologische Relevanz der P-Selektin SM4 Interaktion ist noch weitgehend unbekannt.

2.3.3.6.2 Rolle des P-Selektins im metastatischen Geschehen

Selektine sind an diversen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen, beispielsweise im Entzündungs- und Krebsgeschehen, beteiligt. Alle drei Mitglieder der Selektinfamilie tragen zum metastatischen Geschehen bei. P-Selektin ist an Interaktionen zwischen Tumorzellen, Thrombozyten und dem Endothel beteiligt und fördert die Adhäsion der Tumorzellen im Zielgewebe. L-Selektin erleichtert die Rekrutierung myeloider Zellen in das metastatische Geschehen und fördert zusammen mit E-Selektin die Extravasation der Tumorzellen (311–313). Die erhöhte Expression von sLe^x und sLe^a seitens der Tumorzellen wird mit einer schlechteren Prognose für betroffene Patienten assoziiert. Dies konnte an Patienten gezeigt werden, die an Tumoren in Kolon, Magen, Prostata, Niere, Pankreas oder Lunge litten (314–316). Zu den mit einer schlechten Prognose für Patienten assoziierten Selektin-Liganden zählen neben diversen Mucinen (z.B. MUC1, MUC2, MUC4 und MUC6) auch die bereits näher betrachteten Moleküle CD44, CD24 und PSGL-1 (60,297,317).

Die Blockade von P-Selektin oder ein induziertes P-Selektin-Defizit führte in diversen *in vivo* Studien zu einer verminderten Bindung von Thrombozyten an Tumorzellen und einer signifikanten Reduktion der Bildung von Metastasen in Mäuselungen (318–320). Zudem vermindert die Inhibition von P-Selektin die Akkumulation von Leukozyten und Fibrin in wachsende Thromben (321).

Neben den adhäsiven Eigenschaften des P-Selektins, die auf vielfältige Weise das metastatische Geschehen fördern, konnten bereits weitere Funktionen beschrieben werden. Becker und Kollegen zeigten beispielsweise, dass die Bindung von Melanomzellen (B16F10) an thrombozytäres P-Selektin zu einer Aktivierung des p38 MAPK-Signalweges führte. Infolgedessen konnte die Freisetzung saurer Sphingomyelinasen aus den Thrombozyten beobachtet werden. In P-Selektin-defizienten Mäusen wurden im metastatischen Modell signifikant weniger pulmonal lokalisierte Melanomzellen gefunden, was sich durch die Injektion von rekombinanter saurer Sphingomyelinase als reversibel erwies (322). Qi und Kollegen zeigten zudem, dass der

zytoplasmatische Teil von P-Selektin an Talin-1 bindet und so die Aktivierung von $\alpha_{IIb}\beta_3$ initiiert. Diese Interaktion von P-Selektin und $\alpha_{IIb}\beta_3$ führte zur Infiltration des soliden Tumors mit Thrombozyten und trieb das Tumorwachstum sowie die Neoangiogenese voran (323). Die Ergebnisse dieser Studien deuten bereits an, dass P-Selektin befähigt ist, eine aktive Signalweiterleitung in den Thrombozyten zu induzieren.

P-Selektin spielt auch in späteren Schritten der metastatischen Kaskade eine große Rolle, beispielsweise in der Rekrutierung körpereigener Zellen und der Extravasation der metastasierenden Zellen. Die Bindung von P-Selektin an PSGL-1 auf Leukozyten führt zu einer Rekrutierung von Monozyten und Neutrophilen hin zu inflammatorischen Prozessen, wie sie beispielsweise in metastatischen Nischen auftreten (324). P-Selektin trägt über die Bindung an PSGL-1 auf Monozyten zur Bildung von Aggregaten aus Thrombozyten und Monozyten bei. Die in diese Komplexe eingebundenen Monozyten zeigen eine erhöhte Bindungsaffinität zu aktivierten Endothelzellen. Es zeigte sich, dass infolge der Bindung von P-Selektin an PSGL-1 die Expression von $\alpha_4\beta_1$ und $\alpha_M\beta_2$ -Integrinen in Monozyten erhöht und die Affinität der Integrine gegenüber endothelialer Adhäsionsmolekülen gesteigert ist (325).

Shao und Kollegen konnten zeigen, dass Karzinom-assoziierte Mucine an P-Selektin auf Thrombozyten und L-Selektin auf Neutrophilen binden, diese Zellen räumlich dicht zusammenbringen und auf diesem Wege eine gegenseitige Aktivierung fördern. Die Interaktionen thrombozytären P-Selektins mit PSGL-1 auf der Oberfläche von Neutrophilen induziert die Freisetzung von Cathepsin G aus den Neutrophilen, welches wiederum die Aktivierung von Thrombozyten verstärkt (326).

Anhand der dargestellten Beispiele wird die vielfältige Bedeutung der Selektine und besonders des P-Selektins in verschiedenen Prozessen der Tumorprogression sowie des metastatischen Geschehens deutlich, die weit über die Funktionen der Selektine als Adhäsionsmoleküle hinausgehen. Um die Selektine als therapeutisch relevante Targetstrukturen zu evaluieren, sind weitergehende *in vivo* aber auch *in vitro* Untersuchungen nötig.

2.3.3.6.3 Heparine und ihre Rolle in der Blockade der Selektine

Heparine sind polysulfatierte Glykosaminoglykane, die neben ihrer physiologischen Rolle seit vielen Jahrzehnten therapeutisch zur Antikoagulation genutzt werden. Natürliche Heparine werden aus der Dünndarmmukosa des Schweins extrahiert und gegebenenfalls chemisch gespalten und fraktioniert. Heparin ist ein polydisperses Gemisch linearer Glykosaminoglykane. Diese bestehen aus einem Disaccharid-Grundbaustein, der aus D-Glucosamin und einer Uronsäure (D-Glucuronsäure oder L-Iduronsäure) besteht. Die Disaccharide sind über eine α -1-4-Bindung glykosidisch miteinander verknüpft. Als Modifikation der Disaccharide sind eine Deacetylierung und Sulfatierung am Stickstoffatom des Glucosamins, eine Sulfatierung am Sauerstoffatom in Position 2 der Uronsäure

oder eine Sulfatierung am Sauerstoffatom in Position 3 oder 6 des Glucosamins möglich (327). Der grundsätzliche Aufbau der Heparine und die Möglichkeiten der Modifikation des Grundgerüsts wird beispielhaft in der Abbildung 2.8 dargestellt. Heparine werden anhand ihrer mittleren Molekülmasse in unfraktioniertes Heparin (UFH) und fraktionierte, niedermolekulare Heparine (*low molecular weight heparin* (LMWH)) unterteilt. UFH weist ein Molekulargewicht zwischen 4 und 40 kDa (mittleres Molekulargewicht 15 kDa) auf. Seine antikoagulatorische Wirkung vermittelt es vor allem als Cofaktor von Antithrombin III im Rahmen der Blutgerinnung. Die Bindung von Heparin führt zu einer Konformationsänderung des Antithrombin III. Dies verstärkt die Komplexbildung mit verschiedenen Faktoren der Gerinnungskaskade (Faktor IIa, IXa, Xa, XIa, XIIa), die durch die Assoziation mit Antithrombin III in ihrer proteolytischen Aktivität gehemmt werden (328,329). Durch chemische und enzymatische Prozesse werden aus UFH verschiedene LMWH hergestellt. Ein Beispiel dafür ist Enoxaparin, welches durch eine alkalische β -Elimination von Heparin-Benzylestern gewonnen wird und ein mittleres Molekulargewicht von 4,5 kDa aufweist (330). Enoxaparin vermittelt seine antikoagulativen Eigenschaften ebenfalls über die Bindung an Antithrombin III. Die Enoxaparin-vermittelte Hemmung der Gerinnungsfaktoren weist jedoch im Vergleich zu UFH eine hohe Faktor Xa-Affinität auf. Die Faktor Xa-Inhibition ist im Vergleich zur Faktor IIa-Inhibition im Mittel um den Faktor 3,6 erhöht (330). Der Vollständigkeit halber soll an dieser Stelle auch Fondaparinux nicht unerwähnt bleiben. Dabei handelt es sich um einen synthetisch hergestellten Faktor Xa-Inhibitor. Fondaparinux entspricht der kleinsten noch pharmakologisch wirksamen Struktur der Heparine, die aus einem polysulfatierten Pentasaccharid besteht. Dieses setzt sich aus drei D-Glucosaminen, einer D-Glucuronsäure und einer L-Iduronsäure zusammen. Fondaparinux verstärkt durch die Bindung an Antithrombin III dessen Faktor Xa- inhibierende Wirkung um den Faktor 300 (331).

Obwohl Heparine strukturell eine Ähnlichkeit zu P-Selektin Liganden vermissen lassen, konnte gezeigt werden, dass sie effektiv an P- und L-Selektin binden (332,333). Der Grund für die Bindung scheint in der Dichte negativer Ladungen innerhalb des Heparins begründet zu sein, die die natürlichen Liganden der Selektine imitieren (334). Obwohl PSGL-1 eine höhere Assoziationskonstante im Vergleich zu Heparin besitzt, beruht die inhibitorische Wirkung des Heparins scheinbar auf einer 1000-fach verlängerten Verweildauer am P-Selektin (335). Simonis und Kollegen konnten zeigen, dass sowohl UFH als auch verschiedene LMWH (Enoxaparin sowie Nadroparin) an immobilisiertes P- und L-Selektin binden. Dabei wies UFH eine höhere Affinität zu P- und L-Selektin als die beiden LMWH auf (336). Diese Tatsache begründete sich auf einer höheren Assoziationskonstanten des UFH und einer vergleichbaren Dissoziationskonstanten (336).

Entsprechend der *in vitro* gezeigten Bindungsfähigkeit von Heparinen an P-Selektin konnte in zahlreichen *in vivo* sowie *in vitro* Studien gezeigt werden, dass Heparine effektiv eine Selektin-vermittelte Interaktion mit Tumorzellen blockieren (337–339). Geht einer Injektion von Tumorzellen eine Injektion von Heparin voraus, ist die Reduktion gebildeter Metastasen in Wildtyp-Mäusen auf

das gleiche Maß reduziert wie bei der Injektion von Tumorzellen in P-Selektin-defiziente (P-sel^{-/-}) Mäuse (311,337). Ein Grund für die verminderte Zahl gebildeter Metastasen nach Heparin-Gabe scheint die Blockade der P-Selektin-vermittelten Interaktion zwischen Tumorzellen und Thrombozyten bzw. dem vaskulären Endothel zu sein (338).

Um die Einflüsse, die Heparin über die direkte Bindung und Inhibition von P-Selektin auf das metastatische Geschehen ausübt, von den gerinnungshemmenden Eigenschaften noch deutlicher abzugrenzen, wurden verschiedene chemisch modifizierte Heparine generiert. Diese unterscheiden sich deutlich in ihren antikoagulativen Eigenschaften und der Fähigkeit Selektine zu binden. Die Grundstruktur der Heparine, sowie zwei modifizierte Heparine werden in Abbildung 2.8 visualisiert und die Eigenschaften, die sich aus den Modifikationen ergeben, im Folgenden näher erläutert.

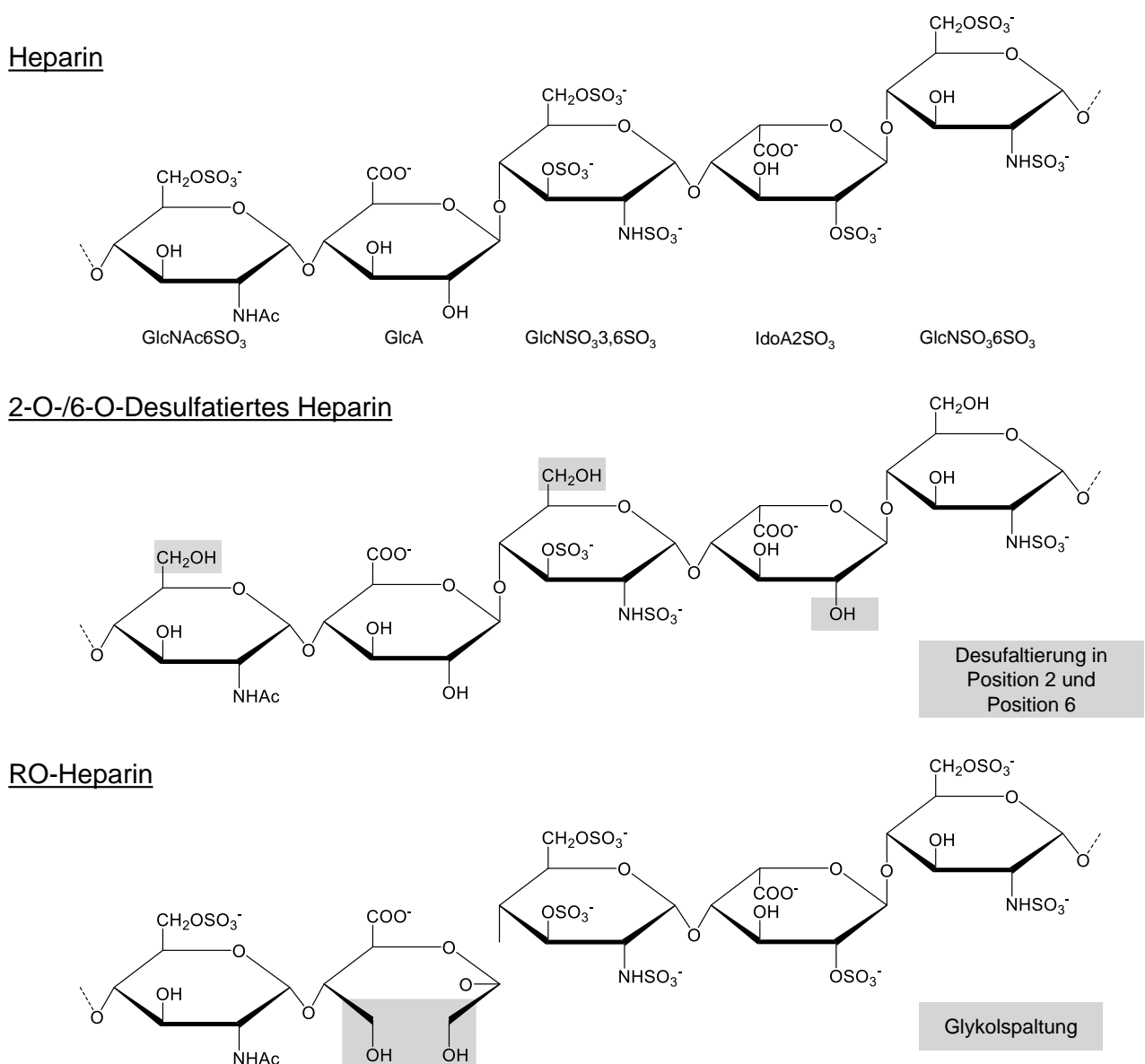


Abbildung 2.8 - Exemplarische Struktur verschiedener Heparine. Oben: kleinste, pharmazeutisch aktive Einheit des Heparins [(4)- α -D-GlcNAc(6SO₃)-(1→4)- α -D-GlcA-(1→4)- α -D-GlcNSO₃(3,6diSO₃)-(1→4)- α -L-IdoA(2SO₃)-(1→4)- α -D-GlcNSO₃(6SO₃)-(1-)]. Mitte: 2-O- bzw. 6-O-Desulfatiertes Heparin (verminderte antikoagulative sowie P-Selektin-inhibierende Eigenschaften). Unten: RO-Heparin (verminderte antikoagulative Eigenschaften).

Eine spezifische 2-O- bzw. 6-O-Desulfatierung erhöht, bei verminderter antikoagulativer Aktivität, den inhibitorischen Effekt auf Heparanase (340–342). Der blockierende Effekt des Heparins an P-Selektin wird durch die Desulfatierung jedoch nahezu vollständig aufgehoben (343). Auch eine Oxidation mit Periodat und eine anschließende Reduktion durch Borhydrid hat einen stark reduzierenden Effekt auf die antikoagulativen Eigenschaften des Heparins (341,344). Das auf diese Weise generierte *reduced oxyheparin* (RO-Heparin) weist die originale Kettenlänge des UFH auf, jedoch sind infolge der Glykospaltung alle C(2)-C(3)-Bindungen nicht-sulfatierter Uronsäuren gespalten (343). Daraus resultiert eine wesentlich höhere Flexibilität innerhalb der Heparinstruktur (342). Es konnte gezeigt werden, dass RO-Heparin trotz der Abwesenheit antikoagulativer Eigenschaften in der Lage ist, die Bildung von Lungenmetastasen im Mausmodell zu reduzieren (341,345). Begründet liegt dieser Effekt wohl in einer im Vergleich zum UFH gesteigerten Inhibition des P-Selektins (343). Auch in P-Selektin-abhängigen Entzündungsmodellen konnte ein anti-inflammatorischer Effekt des RO-Heparins durch P-Selektin Blockade nachgewiesen werden (346).

Neben Heparinen und Heparin-ähnlichen Molekülen wurden weitere, synthetische Selektin-Inhibitoren entwickelt. Exemplarisch soll an dieser Stelle kurz das Molekül Bimosiamose als ein Vertreter der Selektin-Inhibitoren beschrieben werden, das keine Oligosaccharid-Struktur aufweist. Stattdessen wird Bimosiamose zu den phenolischen Glykosiden gezählt. Bimosiamose, auch TBC-1296 genannt, zählt zu den Pan-Selektin-Antagonisten.

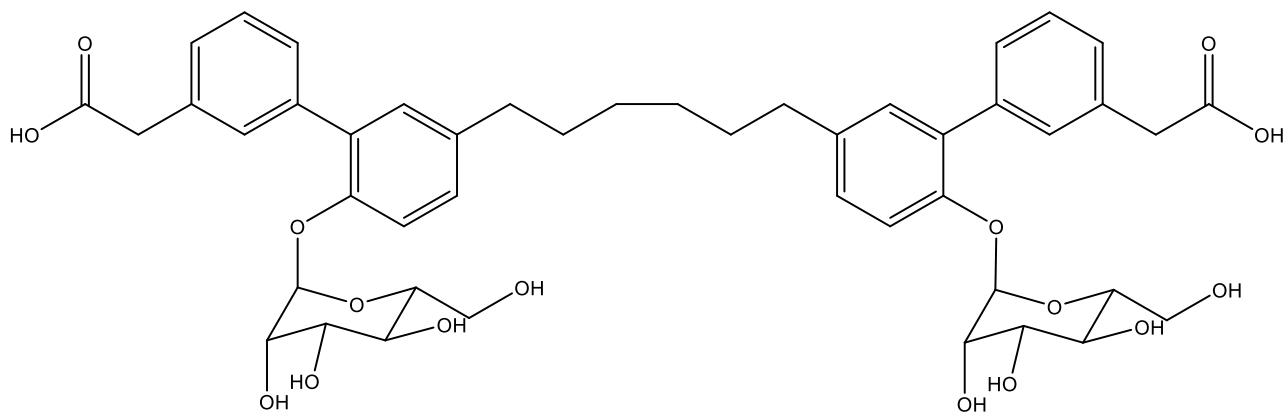


Abbildung 2.9 - Chemische Struktur des synthetischen Pan-Selektin Inhibitors Bimosiamose. Molekulargewicht: 862,94 g/mol (347).

Es bindet als sLe^x-Mimetikum sowohl P-Selektin als auch E- und L-Selektin. Entsprechende IC₅₀-Werte betragen 20 µM, 88 µM sowie 86 µM (348). Bimosiamose wurde ursprünglich für den therapeutischen Einsatz bei Psoriasis und chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) entwickelt. Die anti-inflammatorischen Effekte der Bimosiamose beruhen vor allem auf der Inhibition von Selektin-abhängigem Leukozytenrollen im Entzündungsgeschehen (347–349). Die anti-inflammatorischen Effekte von Bimosiamose waren allerdings in klinischen Untersuchungen nicht überzeugend, deshalb wurde die Entwicklung von Bimosiamose letztlich eingestellt. Um eine abschließende Aussage über den Einfluss der Bimosiamose auf das metastatische Geschehen treffen zu können, bedarf es hingegen weiterer Untersuchungen.

3 Ziel der Arbeit

Die Interaktion von Tumorzellen und Thrombozyten ist essentiell für die erfolgreich ablaufende hämatogene Metastasierung. Dieser Umstand ist seit Jahrzehnten grundsätzlich akzeptiert und Inhalt vielfältiger Forschungsprojekte. Dennoch ist bis heute wenig über die mechanistischen Hintergründe der Tumorzell-vermittelten Thrombozytenaktivierung bekannt, welche eine Voraussetzung für viele prometastatische Effekte der Thrombozyten darstellen. Vorhergehende Arbeiten beleuchteten, sowohl *in vivo* als auch *in vitro*, häufig einzelne Aspekte der Interaktionen zwischen Tumorzellen und Thrombozyten. Es fehlt jedoch zunehmend an einer systematischen und globaleren Herangehensweise, die den durch viele kleine Erkenntnisse entstandenen „Flickenteppich“ der letzten Jahre in einen entsprechenden Kontext rückt. Darüber hinaus ist wenig darüber bekannt, wie die unterschiedlichen Mechanismen während der verschiedenen Phasen der Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung ineinandergreifen.

Die Ziele sowie der schematische Aufbau der Arbeit werden in Abbildung 3.1 veranschaulicht.

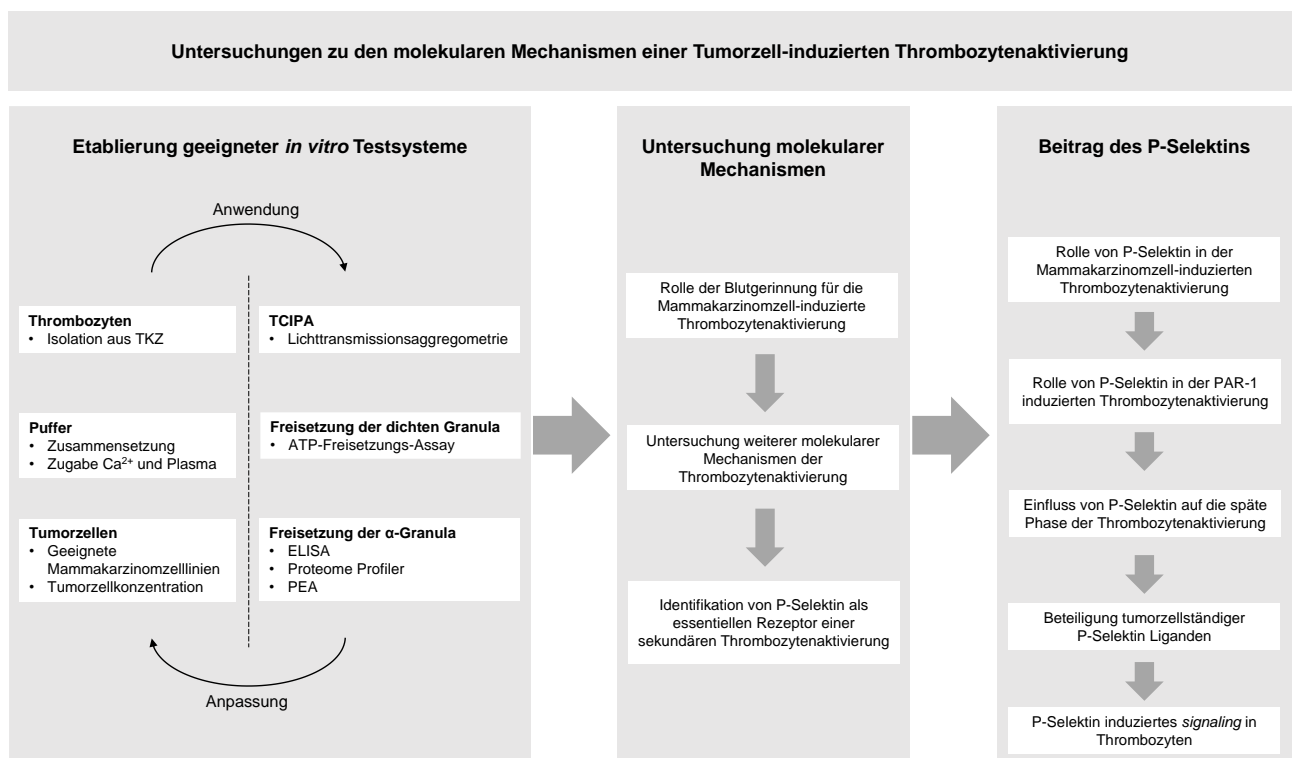


Abbildung 3.1 – Schematische Übersicht über die Ziele der Arbeit.

Ziel dieser Arbeit ist es zunächst, ein universell einsetzbares *in vitro* Testsystem zu entwickeln, mit dem gezielt die molekularen Mechanismen der Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung untersucht werden können. Wichtig ist es dabei, ein artifizielles Modell zu etablieren, in dem eine Interaktion von Tumorzellen und Thrombozyten unter kontrollierten Bedingungen stattfinden kann. Der Fokus der Arbeit liegt daher eingangs auf einer schonenden Isolation der Thrombozyten aus dem Blut, um durch diese eine Beeinflussung der Thrombozyten durch weitere Blutbestandteile auszuschließen. Die isolierten Thrombozyten sind für weitere Untersuchungen in einem geeigneten

Puffer zu resuspendieren. Hierfür erwies sich die Zugabe von Calcium-Ionen sowie einer geringen Menge Plasma als essentiell.

Unter Verwendung verschiedener Assays soll die Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung und der Einfluss verschiedener Inhibitoren, z.B. thrombozytärer Oberflächenstrukturen, auf Aktivierung untersucht werden. Um die Freisetzung der dichten Granula zu evaluieren, wird ein Lumineszenz-basierter ATP-Freisetzungs-Assay verwendet. Des Weiteren sind die molekularen Mechanismen einer Tumorzell-induzierten Thrombozytenaggregation zu untersuchen. Hierzu wird die in der klinischen Diagnostik bereits verwendete Methode der Lichttransmissionsaggregometrie nach Born so modifiziert, dass sie unter den im Puffer-basierten Modell herrschenden Bedingungen eingesetzt werden kann. Die Freisetzung der α -Granula wird mithilfe verschiedener Assays untersucht, sodass in der Gesamtheit ein breites Bild der Konsequenzen einer Tumorzell-vermittelten Aktivierung der Thrombozyten entsteht. Es werden sowohl Unterschiede im Einfluss verschiedener Mammakarzinomzelllinien auf die einzelnen Phasen der Thrombozytenaktivierung als auch die Effekte verschiedenartiger Inhibitionsstrategien untersucht.

Erste Untersuchungen zeigten, dass der direkte Kontakt der Mammakarzinomzellen MDA-MB-231 oder MCF-7 mit Thrombozyten allein nicht ausreicht, um diese zu aktivieren. Eine initiale Aktivierung des Blutgerinnungssystems durch die Tumorzellen und die Generierung aktiven Thrombins als Konsequenz daraus sind essentiell für die weitere Interaktion der betrachteten Mammakarzinomzellen und Thrombozyten.

Weitergehende Untersuchungen geben Aufschluss darüber, über welche exakten Mechanismen das, durch die Zugabe von Mammakarzinomzellen generierte, Thrombin die Thrombozyten zu Beginn der Interaktionen von Tumorzellen mit Thrombozyten aktiviert. Hierzu wird der Einfluss der drei bekannten Thrombin-Rezeptoren auf Thrombozyten, PAR-1, PAR-4 sowie des GP-Ib-IX-V Komplexes, auf die initiale Phase der Tumorzell-vermittelten Thrombozytenaktivierung untersucht.

Für eine antimetastatische Therapie sind mögliche Angriffspunkte von besonderem Interesse, an denen eine Therapie ohne Einfluss auf die Blutgerinnung und die damit einhergehenden Blutungsrisiken für Patienten ansetzen können. Um jene Angriffspunkte zu identifizieren liegt der Fokus dieser Arbeit im Weiteren auf den Mechanismen der Tumorzell-vermittelten Thrombozytenaktivierung, die sich an die initiale, Thrombin-induzierte Aktivierung anschließen.

Um die Mechanismen der sekundären Thrombozytenaktivierung zu identifizieren, wird ein Screening verschiedener Inhibitoren von diversen thrombozytären Oberflächenrezeptoren durchgeführt. Diese sind beispielsweise der ADP-Rezeptor P2Y₁₂, der Thromboxan A₂-Rezeptor, Integrine, der Fc γ -Rezeptor IIa und TLR4.

Die Verwendung modifizierter Heparin-Derivate lieferte erste Hinweise auf eine Beteiligung von P-Selektin an der Tumorzell-induzierten sekundären Thrombozytenaktivierung. Zur Untermauerung

dieser These werden weitere Untersuchungen z.B. mit dem spezifischen P-Selektin Inhibitor Bimosiamose vorgenommen. Um detaillierte Einblicke in die molekularen Mechanismen der Beteiligung von P-Selektin an der Aktivierung von Thrombozyten zu erhalten, wird der Einfluss verschiedener Tumorzell-ständiger P-Selektin Liganden untersucht. Daneben soll der Ligand-unabhängige Beitrag von P-Selektin zur sekundären Thrombozytenaktivierung evaluiert werden. Abschließend soll diese Arbeit erste Einblicke in ein P-Selektin induziertes *signaling* in Thrombozyten bieten.

Ziel der Arbeit ist es, das Verständnis der Rolle von sekundären Mechanismen der Thrombozytenaktivierung in der Interaktion von Tumorzellen und Thrombozyten zu vertiefen. Ein tiefgreifendes Verständnis der molekularen Mechanismen der Tumorzell-vermittelten Thrombozytenaktivierung eröffnet Optionen, in Zukunft gezielt in die verschiedenen Phasen der zellulären Wechselwirkungen zwischen Tumorzellen und Thrombozyten einzugreifen und so einen elementaren Schritt der hämatogenen Metastasierung zu beeinflussen oder gar zu unterbinden.

4 Material

4.1 Chemikalien und Reagenzien

4.1.1 Allgemeine Chemikalien und Ausgangsstoffe

Bezeichnung	Vertreiber
1-Step® Ultra TMB-ELISA Substrat-Lösung	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Adenosintriphosphat	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Adenosindiphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Apyrase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Bacillo® AF	Paul Hartmann AG Heidenheim, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Calcein-AM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Calciumchlorid-Dihydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
CASY®ton	Schärfe Systems GmbH, Steinheim, Deutschland
Cell Extraction Buffer	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Clarity™ Western ECL Blotting Substrate	BioRad, Hercules, CA, USA
Corn Trypsin Inhibitor	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Dithiothreitol	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
D-Luciferin	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Dulbecco's modified eagles medium (DMEM)- High Glucose	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Dulbecco's Phosphate Buffer Salin ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺ pH 7.4, steril	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Ethanol absolut ≥99.8 %	VWR International, Radnor, PA, USA
Fötale Kälberserum (FKS)	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 (PIC) (100x)	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
HEPES	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Isopropanol	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Laemmli Probenpuffer Konzentrat (2x)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
L-Glutamin-Lösung (200 mM)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Luciferase, firefly recombinant	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Mycoplasma Off™	Minerva Biolabs GmbH, Berlin, Deutschland
Natriumazid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcitrat-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid (1 mol/L)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumpyruvat (100 mM)	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Natronlauge (1M)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Penicillin-Streptomycin-Lösung (10.000 I.E. /mL, 10 mg/mL)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standard	BioRad, Hercules, CA, USA
Precision Protein™ StrepTactin-HRP Conjugate	BioRad, Hercules, CA, USA
Reaction Buffer ATP-Assay (20x)	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Salzsäure (1 M)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Schwefelsäure 96 % (v/v)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Sterillium®	Bode Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland
Stickstoff	Linde AG, Düsseldorf, Deutschland
Technothrombin® TGA CAL Set	Technoclone GmbH, Wien, Österreich
Technothrombin® TGA RC high (TF)	Technoclone GmbH, Wien, Österreich
Technothrombin® TGA Sub	Technoclone GmbH, Wien, Österreich
Tris-Base	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Triton® X 100	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tween™ 20	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 4.1 - Informationen zu den verwendeten allgemeinen Chemikalien und Ausgangsstoffen.

4.1.2 Antikörper und rekombinante Proteine

Bezeichnung	Antigen	Eigenschaft (Verwendung)	Vertreiber
anti-CD24 Antikörper	CD24	Maus, mAb, IgG, Klon: SWA11, (DFZ,TA)	Prof. Dr. Altevogt
Mouse Anti-FCGR2A Recombinant Antibody (NEUT-790CQ)	FcγRIIa	Maus, mAb, IgG, Klon: IV.3, (TA)	Creative Biolabs Inc.
CD42b/GPIb alpha Antibody (NB500-511)	GPIbα	Maus, mAb, IgG, Klon: HIP1, (TA)	Novus Biologicals
goat anti-human IgG- FITC (Cat. 62-8411)	Human-IgG	Ziege, pAb, sekundär, FITC-konjugiert, (DFZ)	ThermoFisher Scientific Inc.
Anti-Integrin alpha 6 Antibody (ab105669)	Integrin α6	Ratte, mAb, IgG, Klon: GoH3, (TA)	Abcam plc.

Mouse IgG1 kappa Isotype Control, FITC (Cat. 11-4714-81)	Isotypkontrolle	Maus, mAb, IgG, FITC-konjugiert, Isotypkontrolle für Klon:AK-4, (DFZ)	ThermoFisher Scientific Inc.
goat anti-mouse IgG-FITC (BD554001)	Maus-IgG	Ziege, pAb, sekundär, FITC-konjugiert, (DFZ)	BD Biosciences
m-IgGk BP-HRP (sc-516102)	Maus-IgGk leichte Kette	Maus, HRP-konjugiert, (WB)	Santa Cruz Biotech. Inc.,
Anti phospho-tyrosine/threonine/serine Antibody (ABIN153445)	phospho-Tyrosin/Threonin/Serin	Maus, mAb, IgG, Klon: SPM101, (WB)	antibodies-online GmbH,
CD62P Monoclonal Antibody (AK-4), FITC (Cat. 11-0628-42)	P-Selektin	Maus, mAb, IgG, FITC-konjugiert, Klon: AK-4, (DFZ)	ThermoFisher Scientific Inc.
rek. P-Selectin (137-PS-050)	P-Selektin Liganden	humane P-Sel.-Fc Chimäre (hum. IgG), (DFZ, TA)	R&D systems
mouse anti-human CD162 (556053)	PSGL-1	Maus, mAb, IgG, (DFZ)	BD Biosciences
anti-human TF Antibody (AF2339)	Tissue Factor	Ziege, pAb, IgG, (DFZ)	R&D systems
rabbit anti-goat IgG-FITC (sc-2777)	Ziegen-IgG	Hase, IgG, sekundär, FITC-konjugiert, (DFZ)	Santa Cruz Biotech. Inc.

Tabelle 4.2 - Informationen zu den verwendeten Antikörpern und weiteren rekombinanten Proteinen. DFZ: Durchflusszytometrie, TA: Experimente zur Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung, WB: Western Blot.

4.1.3 Thrombozyten-Agonisten

Bezeichnung	Vertreiber
ADP	Haemochrom Diagnostica GmbH, Essen, Deutschland
Kollagen Typ I	Haemochrom Diagnostica GmbH, Essen, Deutschland
Thrombin	R&D systems, Minneapolis, MN, USA
TRAP-6	Tocris Bioscience, Bristol, UK
U46619	Tocris Bioscience, Bristol, UK

Tabelle 4.3 – Informationen zu den verwendeten Thrombozyten-Agonisten.

4.1.4 Thrombozyten-Inhibitoren

4.1.4.1 *small molecule* Inhibitoren

Bezeichnung	Vertreiber
Argatroban	Tocris Bioscience, Bristol, United Kingdom
BAY-386	Bayer AG, Leverkusen, Deutschland
BAY61-3606	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Bimosiamose	Revotar Biopharmaceuticals AG, Hennigsdorf, Deutschland
BMS 986120	Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA
Eptifibatid Acetat	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA
2F-Peracetyl-Fucose (Fucosyltransferase-Inhibitor)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Losartan-Kalium	Bio-Techne Corporation, Minneapolis, MN, USA
Seratrodast	Enzo Life Science, Lausen, Schweiz
TAK-242	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Ticagrelor	MyBioSource, San Diego, CA, USA

Tabelle 4.4 – Informationen zu den verwendeten *small molecule* Thrombozyten-Inhibitoren.

4.1.4.2 Heparin-Derivate

Bezeichnung	Vertreiber
UFH (Heparin-Natrium-5000-ratiopharm®)	ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
Fondaparinux (Arixtra® 2,5 mg/0,5 mL)	Aspen Pharma Trading Limited, Dublin, Irland
RO-Heparin	Ronzoni Institute, Mailand, Italien
2-O-Desulfatiertes Heparin	Ronzoni Institute, Mailand, Italien
Daltecdecasaccharid	Ronzoni Institute, Mailand, Italien

Tabelle 4.5 – Informationen zu verwendeten Heparin-Derivaten.

4.1.5 enzyme-linked immunosorbent assay Kits

Protein	Bezeichnung	Vertreiber
EGF	Human EGF Mini ABTS ELISA Development Kit	PeptoTech Inc. Rocky Hill, NJ, USA
TIMP-1	Human TIMP-1 Standard ABTS ELISA Development Kit	PeptoTech Inc. Rocky Hill, NJ, USA
VEGF-A	Human VEGF ₁₆₅ Standard ABTS ELISA Development Kit	PeptoTech Inc. Rocky Hill, NJ, USA

Tabelle 4.6 – Informationen zu verwendeten enzyme-linked immunosorbent assay Kits.

4.1.6 Proteome Profiler Array Kits

Bezeichnung	Vertreiber
Proteome Profiler Human XL Cytokine Array Kit	R&D systems, Minneapolis, MN, USA
Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Array Kit	R&D systems, Minneapolis, MN, USA

Tabelle 4.7 – Informationen zu verwendeten Proteome Profiler Array Kits.

4.1.7 Hergestellte Reagenzien

4.1.7.1 Zellkultur

Bezeichnung	Zusammensetzung
Kryomedium	FKS 45,0 mL
	DMSO 5,0 mL
Nährmedium A375 Zellen	DMEM-high glucose 500 mL
	FKS 50,0 mL
	Penicillin/Streptomycinlösung (10.000 I.E., 10 mg/mL) 5,0 mL
	L-Glutaminlösung (200 mM) 5,0 mL
Nährmedium MCF-7 Zellen	DMEM-high glucose 500 mL
	FKS 50,0 mL

	Penicillin/Streptomycinlösung (10.000 I.E., 10 mg/mL)	5,0 mL
	L-Glutaminlösung (200 mM)	5,0 mL
Nährmedium MDA-MB-231 Zellen	DMEM-high glucose	500 mL
	FKS	50,0 mL
	Penicillin/Streptomycinlösung (10.000 I.E., 10 mg/mL)	5,0 mL
	L-Glutaminlösung (200 mM)	5,0 mL
	Na-Pyruvatlösung (100 mM)	5,0 mL

Tabelle 4.8 – Informationen zu in der Zellkultur verwendeten Nährmedien und Lösungen.

4.1.7.2 Aufarbeitung der Thrombozyten

Bezeichnung	Zusammensetzung	
Apyrase-Lösung	Apyrase (1000 u / 250 mg)	25,0 mg
	Aqua millipore	0,1 mL
Calcium-Lösung (0,5 M)	Calciumchlorid-Dihydrat	1,47 g
	Aqua millipore	10,0 mL
Thrombozyten-Puffer	HEPES	238,3 mg
	NaCl	798,8 mg
	KCl	19,4 mg
	MgCl ₂	9,5 mg
	NaHCO ₃	115,9 mg
	NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	4,9 mg
	D-Glucose	99,1 mg
	Aqua millipore	100,0 mL
	HCl / NaOH	pH auf 7,4 einstellen

Thrombozyten-Waschpuffer	HEPES	119,2 mg
	NaCl	798,8 mg
	KCl	19,4 mg
	NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	7,46 mg
	D-Glucose	50,0 mg
	Aqua millipore	100,0 mL
	HCl / NaOH	pH auf 6,5 einstellen
Triton™ X 100-Arbeitslösung (1 % (m/v))	Triton™ X 100	1,0 g
	Aqua millipore	100,0 mL

Tabelle 4.9 – Informationen zu Puffern und Lösungen, die zur Aufbereitung von Thrombozyten verwendet wurden.

4.1.7.3 ATP-Freisetzungs-Assay

Bezeichnung	Zusammensetzung	
Lumineszenz-Reagenz	Reaction Buffer (20 x)	0,5 mL
	Dithiothreitol (0,1 M)	0,1 mL
	D-Luciferin (0,01 M)	0,5 mL
	Luciferase, firefly recombinant	2,5 µL
	Aqua dem.	8,9 mL

Tabelle 4.10 – Informationen zu Lösungen, die für den ATP-Freisetzungs-Assay verwendet wurden

4.1.7.4 enzyme-linked immunosorbent assay

Bezeichnung	Zusammensetzung	
Blockierungslösung	BSA	1,2 g
	DPBS	40,0 mL
Stopplösung	Schwefelsäure 96 % (v/v)	11,1 mL
	Aqua dem.	ad 100,0 mL

Waschpuffer	Tween™ 20	250 µL
	DPBS	ad 500,0 mL

Tabelle 4.11 – Informationen zu Lösungen und Puffern, die für enzyme-linked immunosorbend assays (ELISA) verwendet wurden.

4.1.7.5 Adhäsionsassay

Bezeichnung	Zusammensetzung	
Calcein-AM-Lösung	Calcein-AM	50,0 µg
	DMSO	50,0 µL

Tabelle 4.12 – Informationen zu Lösungen, die für den Adhäsionsassay verwendet wurden.

4.1.7.6 Durchflusszytometrie

Bezeichnung	Zusammensetzung	
Blockierungspuffer	BSA	1,0 g
	Aqua dem.	10,0 mL
Waschpuffer	BSA	0,15 mg
	Aqua dem.	10,0 mL

Tabelle 4.13 – Informationen zu Puffern und Lösungen, die für durchflusszytometrische Experimente verwendet wurden.

4.1.7.7 Untersuchung thrombozytärer Signalprozesse

Bezeichnung	Zusammensetzung	
BCA-Lösung	BCA-Reagenz B	196,1 µL
	BCA-Reagenz A	ad 10,0 mL
	(beide enthalten im Pierce™ BCA Protein Assay Kit)	
Blockierungslösung	Magermilchpulver	5,0 g
	TBS-T Puffer	100,0 mL
Elektrodenpuffer (10x)	Glycin	72,0 g
	Tris-Base	15,0 g

	SDS	5,0 g
	Aqua millipore	500,0 mL
Elektrodenpuffer (1x)	Elektrodenpuffer (10 x)	100,0 mL
	Aqua millipore	ad 1000,0 mL
Luminol-Peroxid-Reagenz	Clarity™ Western Peroxid-Reagenz	4,0 mL
	Clarity™ Western Luminol-Reagenz	4,0 mL
	(enthalten in Clarity™ Western ECL Blotting Substrate)	
Lysepuffer	Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (100x)	25,0 µL
	Phenylmethylsulfonylfluorid (0,3 M)	17,0 µL
	Cell Extraction Buffer	ad 5,0 mL
Prim. Antikörper-Lösung	Natriumazid	10 mg
	BSA	500 mg
	TBS-T	10 mL
	anti-phospho-Tyrosin/Threonin/Serin-Ak	40 µL (10 µg)
Sek. Antikörper-Lösung	Magermilchpulver	0,5 g
	TBS-T Puffer	10,0 mL
	m-IgGk BP-HRP	1,0 µL
	Precision Protein™ StrepTactin	0,5 µL
TBS-Puffer (1x)	TBS-Puffer (10 x)	100,0 mL
	Aqua millipore	ad 1000,0 mL

TBS-T Puffer	Aqua millipore	720,0 mL
	TBS-Puffer (10 x)	80,0 mL
	Tween™ 20	1,6 mL
TBS-Puffer (10x)	Natriumchlorid	40,0 g
	Tris-Base	6,06 g
	Aqua millipore	500,0 mL
	HCl (1 M)	pH auf 7,3 einstellen
Transferpuffer (10x)	Glycin	72,0 g
	Tris-Base	15,0 g
	Aqua millipore	500,0 mL
Transferpuffer (1x)	Transferpuffer (10 x)	100,0 mL
	Aqua millipore	ad 1000,0 mL

Tabelle 4.14 – Informationen zu Lösungen und Puffern, die zur Analyse thrombozytärer Signalprozesse (mittels Western Blot und Proteome Profiler Array) verwendet wurden.

4.2 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Vertreiber
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® Zentrifugenröhrchen, 15 mL, Polypropylen, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Cellstar® Zentrifugenröhrchen, 50 mL, Polypropylen, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
CytoOne® 96-well-Platte, steril, F-Form	Starlab GmbH, Ahrensburg, Deutschland

Einmalspritze Braun Luer Solo (10 mL)	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Kryogefäß Cryo.S®	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Mini Tans-Blot® Filter Paper	BioRad, Hercules, CA, USA
Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gel (10 %)	BioRad, Hercules, CA, USA
Nunc-Immuno™ MicroWell™ 96-well solid plate	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Nunc™ F96-MicroWell™ Polystyrolplatte, schwarz	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Nunc™ F96-MicroWell™ Polystyrolplatte, weiß	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
PARAFILM® M	Bemis Company, Inc. Neenah, WIS, USA
Pasteurpipette, Glas	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Pipettenspitze Plastibrand® (5 mL), natur	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Pipettenspitze TipOne® (10 µL), natur	Starlab GmbH, Ahrensburg, Deutschland
Pipettenspitze TipOne® (1000 µL), blau	Starlab GmbH, Ahrensburg, Deutschland
Pipettenspitze TipOne® (200 µL), gelb	Starlab GmbH, Ahrensburg, Deutschland
Pipettierreservoirs, 50 mL, PS, steril	Ratiolab GmbH, Dreieich, Deutschland
Pipettierreservoirs, 50 mL, PS, unsteril	Ratiolab GmbH, Dreieich, Deutschland
Reagiergefäße (0,6 mL)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Reagiergefäße (1,5 mL)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Reagiergefäße (1,5 mL), Safe Seal, braun	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Reagiergefäße (2,0 mL)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Reagiergefäße (5,0 mL)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Roti®-PVDF, 0,45 µm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Serologische Pipetten (10 mL)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten (25 mL)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Spitzenvorsatzfilter, steril	Berrytec GmbH, Harthausen, Deutschland
TC-Platte, 96-well, Standard, F	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland

Untersuchungshandschuhe GentleSafe® NT 240	DACH Schutzbekleidung GmbH & Co. KG, Rastatt, Deutschland
Zellkulturflaschen, CELLSTAR® TC, 250 mL, 75 cm ² , PS, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturflaschen, CELLSTAR® TC, 50 mL, 25 cm ² , PS, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

Tabelle 4.15 – Informationen zu den verwendeten Verbrauchsmaterialien

4.3 Geräte

Bezeichnung	Vertreiber
Apact 4004	LabiTech GmbH, Ahrensburg, Deutschland
Accu-Jet® Pro	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
ChemiDoc™ XRS+ System	BioRad, Hercules, CA, USA
Durchlusszytometer Guava® easyCyte HT Flow Cytometer	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
Fluoroskan Ascent®	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Laborschüttler KS-15	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland
Magnetrührer IKA RCT Basic	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Mini-PROTEAN® Tetra Cell Mini Trans-Blot® Module and PowerPac Basic Supply	BioRad, Hercules, CA, USA
Multiscan® EX	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Multiwell Reader FLUOstar™ OPTIMA	BMG Labtech GmbH, Ortenberg, Deutschland
Neubauer improved® Zählkammer	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

pH-Meter S20 SevenEasy™ pH	Mettler-Toledo GmbH, Giessen, Deutschland
Pipette (1-5 mL) Finnpipette®	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Pipette (10 µL) Research® plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette (100 µL) Research® plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette (200 µL) Research® plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette (200 µL) Transferpipette® S-12	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Pipette (10 µL) Transferpipette® S	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Pipette (100 µL) Transferpipette® S	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Pipette (200 µL) Transferpipette® S	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Purelab® Plus Wasseraufbereitungsanlage	ELGA LabWater, Celle, Deutschland
Trockenschrank 60 °C	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Zellzähler CASY® 1 Model TT	OMNI Life Science GmbH & Co. KG, Bremen, Deutschland
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
Orbital Shaker, Benchtop 4530	Thermo Forma Inc., Marietta, Ohio, USA
Laborschüttler Vortex Genie	Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA
Zentrifuge Avanti™ J-25 high performance	Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA

CO ₂ -Brutschrank ICO 105	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland
Mikroskop Axiovert25	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Zentrifuge 5417 C	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Autoklav Laboklav 55	SHP Steriltechnik AG, Detzel Schloss, Deutschland
Laminar-Air-Flow-Werkbank Holton safe 2010	Heto-Holton A/S, Allerød, DK

Tabelle 4.16 – Informationen zu verwendeten Geräten

4.4 Software

Bezeichnung	Urheberrechte
APACT LPC-Software	© LABITec GmbH, Ahrensburg, Deutschland
Ascent Software™ v2.6	© Thermo Labsystems Oy
ChemDraw® Prime Version 16.0.1.4	© PerkinElmer Informatics, Inc.
GraphPad Prism 8	© GraphPad Software, La Jolla, CA, USA
guavaSoft™ 3.1	© Merck Millipore, Burlington, MA, USA
Image Lab Version 6.0.1	© Bio-Rad Laboratories
Inkscape 0.92	© GNU General Public License
Microsoft® Office 2016 für Windows	© Microsoft Corporation , Redmond, WA, USA
THERMO Fluoroskan Ascent TGA Evaluation Software	© Technoclone GmbH, Wien, Österreich
Zotero 5.0.96.2	© Roy Rosenzweig Center for History and New Media

5 Methoden

5.1 Zellkultur

Alle Arbeiten mit lebenden Zellen wurden stets unter aseptischen Bedingungen durchgeführt, um die verwendeten Zellkulturen vor Kontaminationen mit Bakterien oder Pilzen zu schützen. Hierzu wurde eine Laminar Air Flow Bank genutzt. Alle benötigten Materialien wurden vor ihrer Verwendung autoklaviert oder mit einem adäquaten Desinfektionsmittel behandelt. Zur Kultivierung wurde ein Inkubator verwendet, der eine konstante Temperatur von 37 °C und einen CO₂-Gehalt der Umgebungsluft von 5 % gewährleistete. Um eine Kontamination mit Mykoplasmen zu vermeiden, wurden die Werkbank vor Gebrauch mit Mycoplasma Off™ behandelt und die Zellkulturen in regelmäßigen Abständen mittels PCR-Test auf eine Verunreinigung mit Mykoplasmen getestet.

5.1.1 Kryokonservierung und Inkulturnahme

Zur Lagerung der Zellen über einen längeren Zeitraum wurde eine Kryokonservierung der Zellen in flüssigem Stickstoff bei -196 °C vorgenommen. Zur Vorbereitung wurden die Zellen, wie in Abschnitt 5.1.2.1 beschrieben, gewaschen, abgelöst, gezählt, zentrifugiert und zu 2×10^6 Zellen pro Milliliter resuspendiert. Zur Resuspension wurde ein Gefriermedium verwendet, das zu 90 % (V/V) aus fötalem Kälberserum (FKS) und zu 10 % aus DMSO bestand. Jeweils 1 mL der Zellsuspension wurde in ein Kryogefäß überführt. Dieses wurden über 12 Stunden in einem, mit Isopropanol gefüllten, Behältnis gleichmäßig bis auf -80 °C heruntergekühlt. Anschließend wurden die Kryogefäße in einen, mit flüssigem Stickstoff gefüllten, Lagerungstank überführt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Kryogefäße oberhalb des Stickstoffs standen, um eine Kontamination mit eventuell darin befindlichen Mykoplasmen zu vermeiden.

Zur Inkulturnahme kryokonservierter Zellen wurden diese dem Stickstofftank entnommen und bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen unverzüglich in eine T75-Zellkulturflasche überführt, welche zuvor mit 15 mL frischem Zellkulturmedium gefüllt wurde. Über Nacht wurde die Kulturflasche im Inkubator gelagert, um ein Anwachsen der Zellen am Boden zu ermöglichen. Am nächsten Tag wurde das Nährmedium durch frisches ersetzt, um DMSO und abgestorbene Tumorzellen zu entfernen. Sobald der Boden der Zellkulturflasche zu 90 % konfluent bewachsen war, wurden die Zellen, entsprechend Abschnitt 5.1.2.1, abgelöst und weiterkultiviert sowie für anschließende Experimente verwendet.

5.1.2 Zelllinien und ihre entsprechende Kultivierung

5.1.2.1 MDA-MB-231 Zellen

Die adhärente Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 wurde 1973 aus dem Pleuraerguss einer 51-jährigen kaukasischen Brustkrebspatientin isoliert und kultiviert. Die Zellen epithelialen Phänotyps

weisen sehr aggressive und invasive Eigenschaften auf. Charakteristisch ist eine Abwesenheit von Progesteron- und Estrogen-Rezeptoren sowie des humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (HER2). Die Zelllinie wird somit als triple-negative Brustkrebszelllinie eingestuft (350,351). Die Zellen wurden über Dr. Zeisig von der EPO GmbH Berlin bezogen.

Die Kultivierung der MDA-MB-231 Zellen fand in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*- (DMEM-) *high glucose* statt, welches mit 10 % (V/V) FKS, 1 % (V/V) L-Glutamin (200 mM), 1 % (V/V) Natriumpyruvat (100 mM) sowie 1 % (V/V) Penicillin-Streptomycin (10.000 IE/mL, 10 mg/mL) versetzt wurde. Das Nährmedium wurde abhängig von der Färbung des enthaltenen Indikators Phenolrot gewechselt. Sobald eine 80-90 %ige Konfluenz des Zellrasens vorlag, wurde eine Subkultivierung der Zellkultur durchgeführt. Hierzu wurden das Medium entfernt, der Boden der Zellkulturflasche mit 15 mL *Dulbecco's Phosphate- Buffered Saline* (DPBS) gewaschen und die Zellen mittels 3 mL 0,5 M EDTA-Lösung abgelöst. Nach zehnminütiger Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen durch Klopfen auf den Zellkulturflaschenboden und Abspülen mit DPBS aus der Zellkulturflasche entnommen und zentrifugiert (312 g, 4 min, 4 °C). Das entstandene Zellpellet wurde in einem Milliliter Medium resuspendiert, am CASY-Counter gezählt (Abschnitt 5.1.3) und je nach Bedarf in eine neue Zellkulturflasche überführt, in welche zuvor 15 mL Medium vorgelegt wurden.

5.1.2.2 MCF-7 Zellen

MCF-7 Zellen entstammen einer 69-jährigen Brustkrebspatientin, die an einem Adenokarzinom litt. 1970 wurden die Endothelzellen des Brustgewebes von Dr. Soule und Kollegen aus einer Metastase in der Pleurahöhle isoliert. Die Abkürzung MCF-7 steht für Michigan Cancer Foundation-7. MCF-7 Mammakarzinomzellen exprimieren auf ihrer Oberfläche Estrogenrezeptoren und weisen eine stark Estrogen-abhängige Proliferation auf (352). Die Zellen wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Leibniz Institut DSMZ GmbH) bezogen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in DMEM-High Glucose. Dem Medium wurden 10 % (V/V) FKS, 1 % (V/V) L-Glutamin (200 mM) sowie 1 % (V/V) Penicillin-Streptomycin (10.000 I.E./mL, 10 mg/mL) zugesetzt. Die Handhabung der MCF-7 Zellen erfolgte entsprechend den Ausführungen in Abschnitt 5.1.2.1.

5.1.2.3 A375 Zellen

A375 Zellen sind Melanomzellen, die aus einer 54-jährigen Patientin isoliert werden konnten. In dieser Arbeit wurden zudem transduzierte A375 Zellen verwendet, die sich durch eine stabile Überexpression des Oberflächenproteins CD24 auszeichneten (A375-CD24). Die Transduktion wurde, wie von Hüser und Kollegen beschrieben, mittels lentiviraler Vektoren durchgeführt (353). Sowohl der Wildtyp (A375wt) als auch A375-CD24 wurden freundlicherweise durch Prof. Dr. Altevogt vom DKFZ in Heidelberg zur Verfügung gestellt. Es wurden regelmäßig durchflusszytometrische

Untersuchungen unter Verwendung eines gegen CD24 gerichteten Antikörpers (Klon SWA11) durchgeführt, um die Überexpression von CD24 zu gewährleisten.

Die Kultivierung sowohl von A375-wt als auch von A375-CD24 wurde in DMEM- High Glucose vorgenommen, welches mit 10 % (V/V) FKS, 1 % (V/V) L-Glutamin (200 mM) sowie 1 % (V/V) Penicillin-Streptomycin (10.000 IE/mL, 10 mg/mL) versetzt wurde. Die Handhabung und die Kultivierung der adhärennten Zelllinien fanden entsprechend des Abschnitts 5.1.2.1 statt.

5.1.3 Zellzahlbestimmung

Die Tumorzellzahl wurde mithilfe eines CASY[®] 1 Modell TT Cell Counter bestimmt. Die Funktionsweise dieses Geräts basiert auf dem Coulter Counter Verfahren. Hierbei wird in einer mit Elektrolytlösung gefüllten Kapillare zwischen zwei Platinelektroden eine Spannung angelegt. Befindet sich reine Elektrolytlösung zwischen den Elektroden, entsteht ein konstanter Stromfluss mit definiertem Widerstand. Während der Messung wird die zu vermessende Suspension aus Zellen in Elektrolytlösung durch die Kapillare geleitet. Die Zellen schränken den Stromfluss ein und verändern so in Abhängigkeit von Anzahl und Größe den Widerstand zwischen den Elektroden. Die detektierte Veränderung des Widerstands ist proportional zur Zellgröße und erlaubt die Unterscheidung zwischen lebendigen und toten Zellen. Das Ergebnis der Messung wird in Form einer Zellgrößenverteilung dargestellt. Die Zellzahl der zuvor definierten Größenpopulation wird pro Milliliter angegeben.

Vor der Durchführung einer Zellzahlbestimmung wurden die Zellen, wie in Abschnitt 5.1.2.1 beschrieben, gewaschen und mittels EDTA vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Die Zellen wurden in 10 mL DPBS resuspendiert und der Zellkulturflasche entnommen. Von dieser Zellsuspension wurden 20 µL in ein CASY[®]-Röhrchen überführt, in dem zuvor 10 mL steril filtrierte CASY[®]- Elektrolytlösung vorgelegt wurde. Diese Verdünnung (1:500) wurde im Anschluss in zwei Messzyklen vermessen.

5.2 Thrombozytenisolation und -präparation aus Thrombozytenkonzentrat

In der überwiegenden Zahl der Experimente wurde mit Thrombozyten gearbeitet, welche aus Thrombozytenkonzentraten (TKZ) isoliert wurden. Die TKZ wurden von dem Institut für experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin am Uniklinikum Bonn zur Verfügung gestellt. Dort wurden sie im Rahmen der Plasmaspende von freiwilligen Spendern durch maschinelle Apherese hergestellt. Das gewonnene, aufkonzentrierte, Thrombozyten-reiche Plasma wurde im Rahmen dieses Verfahrens mit Acid-Citrate-Dextrose-A Lösung (ACD-A Lösung) versetzt, um eine Aktivierung der Thrombozyten zu verhindern und die Lagerung über mehrere Tage zu ermöglichen. Die Lagerung fand bei stetiger Durchmischung mittels Rotationsschüttler und bei 21 °C statt. Die verwendeten, sterilen Kunststoffbeutel gewährleisteten einen optimalen Gasaustausch mit der

Umgebung. Die Thrombozytenzahl der TKZ wurde routinemäßig im Anschluss an die Plasmaspende bestimmt. Nach der Spende standen die TKZ 4 Tage der Transfusion in Patienten zur Verfügung (wobei der Tag der Spende als Tag 0 gezählt wurde). Nach Ablauf der 4 Tage gab es am Patienten keine Verwendung mehr für die TKZ, sodass diese für Forschungszwecke zur Verfügung gestellt wurden. Im Zuge der Etablierung der verschiedenen Experimente wurde die jeweilige Verwendungsdauer der TKZ evaluiert. So konnte gezeigt werden, dass in der überwiegenden Zahl der Experimente eine Verwendung bis Tag 7 ohne Qualitätseinbußen der Thrombozyten möglich war.

5.2.1 Herstellung von Thrombozyten-reichem Puffer (TRP)

Sofern nicht anders gekennzeichnet fanden die Experimente in Thrombozyten-reichem Puffer (TRP) statt.

Zur Herstellung diesen TRP's wurden zunächst Thrombozyten mittels Zentrifugation aus TKZ isoliert. Hierzu wurde zunächst errechnet, in welchem Volumen TKZ die gewünschte Zahl Thrombozyten enthalten ist. Wenn nicht anders gekennzeichnet, wurde mit einer Endkonzentration von 400×10^6 Thrombozyten pro Milliliter Puffer gearbeitet. Dementsprechend wurden für 10 mL TRP 400×10^7 Thrombozyten zentrifugiert (670 g, 10 min, 21 °C). Der aus Thrombozyten-armen Plasma bestehende Überstand wurde nach der Zentrifugation abgenommen und das Pellet in Thrombozyten-Puffer resuspendiert. Um eine optimale Aktivierbarkeit der Thrombozyten zu gewährleisten, wurde der Puffer vor Verwendung durch Zusatz von NaOH bzw. HCl auf pH 7,4 eingestellt. Der verwendete Puffer wurde, wie in Abschnitt 4.1.7.2 aufgeführt, ohne den Zusatz von Ca^{2+} hergestellt und verwendet. Calcium ist für eine Aktivierung der Thrombozyten essentiell, führt aber während der Aufbereitung und Resuspension der Thrombozyten zu einer Hyperaktivierbarkeit eben jener. Um dies zu verhindern, wurde der TRP calciumfrei hergestellt und unmittelbar vor Verwendung recalcifiziert. Die Endkonzentration Ca^{2+} betrug, entsprechend der physiologischen Calciumkonzentration im Blut, 1 mM.

5.2.2 Herstellung von gewaschenen Thrombozyten in Puffer (wTRP)

Für einzelne Experimente wurde TRP verwendet, der gewaschene Thrombozyten enthielt. Die Thrombozyten dafür stammten ebenfalls aus TKZ. Nach der initialen Isolation mittels Zentrifugation (670 g, 10 min, 21 °C), wurden der Überstand verworfen und das aus Thrombozyten bestehende Pellet in Thrombozyten-Waschpuffer resuspendiert. Das Volumen wurde so gewählt, dass es dem Fünffachen des Ursprungsvolumens (TKZ) entsprach. Der Waschpuffer wurde vor Verwendung auf pH 6,5 eingestellt. Dies reduzierte die Aktivierbarkeit der Thrombozyten während der sich anschließenden Zentrifugationsschritte. Zudem wurde dem Puffer Apyrase (2 u/mL) zugesetzt. Apyrase ist ein Enzym, das ATP zu ADP und AMP hydrolysiert. Es wird bei *in vitro* Experimenten eingesetzt, um die Aktivierung der Thrombozyten über ADP zu unterbinden (354). Die in Waschpuffer resuspendierten Thrombozyten wurden erneut zentrifugiert (670 g, 10 min, 21 °C) und

der Überstand abgenommen. Der beschriebene Waschschrift wurde ohne den Zusatz von Apyrase wiederholt, um im anschließenden Experiment eine optimale Aktivierbarkeit der Thrombozyten zu gewährleisten. Anschließend wurden die Thrombozyten so in Thrombozyten-Puffer (pH 7,4) resuspendiert, dass eine Konzentration von 400×10^6 Thrombozyten pro Milliliter resultierte. Wie schon in Abschnitt 5.2.1 erläutert, wurde der wTRP unmittelbar vor der Verwendung recalcifiziert (Endkonzentration: 1 mM).

In ausgewählten Experimenten wurde der wTRP mit 1 % (V/V) Thrombozyten-armen Plasma (TAPI) versetzt. Zur Herstellung dieses TAPI wurde TKZ wie oben beschrieben zentrifugiert (670 g, 10 min, 21 °C) und der Überstand verwendet. Der Überstand wurde erneut zentrifugiert (1000 g, 20 min, 21 °C), um eventuell im Plasma verbliebene Thrombozyten zu entfernen, und im Anschluss als TAPI verwendet.

5.3 Einsatz verschiedener Inhibitoren zur Evaluation der Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung

Um den Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung zu evaluieren, wurden, je nach Fragestellung, Thrombozyten oder Tumorzellen mit den entsprechenden Inhibitoren inkubiert. Es wurden stets Kontrollexperimente unter Verwendung des äquivalenten Volumens des entsprechenden Lösungsmittels durchgeführt. Zur Positivkontrolle der Aktivierbarkeit der Thrombozyten sowie zur Kontrolle der Effekte der Inhibitoren wurden unterschiedliche Aktivatoren verwendet, die wie in Abschnitt 5.4 beschrieben eingesetzt wurden.

5.3.1 Inkubation der Thrombozyten mit Inhibitoren

In diversen Experimenten wurden die Thrombozyten vor der Aktivierung mit Tumorzellen oder weiteren Thrombozytenaktivatoren mit verschiedenen Inhibitoren präinkubiert. Ziel war es, die Auswirkung der Inhibition sowohl thrombozytärer Oberflächenstrukturen als auch intrazellulärer Proteine auf die Thrombozytenaktivierung zu untersuchen.

Zur Vorbereitung wurde der TRP, wie in Abschnitt 5.2 beschrieben, hergestellt und in verschiedene Ansätze aufgeteilt. Zu diesen Ansätzen wurden anschließend, wie in Tabelle 5.1 bis Tabelle 5.3 aufgeführt, verschiedene Inhibitoren zugesetzt. Als Kontrolle fungierten stets Ansätze, die mit dem Volumen Lösungsmittel inkubiert wurden, in welchem der entsprechende Inhibitor gelöst war. Die Ansätze wurden vor den entsprechenden Aktivierungsexperimenten für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit den jeweiligen Inhibitoren präinkubiert. Als Inhibitoren wurden sowohl *small molecules* (Tabelle 5.1 - Informationen über die Inkubation von TRP mit verschiedenen Inhibitoren (small molecules)), als auch Heparin-Derivate (Tabelle 5.2) und Antikörper (Tabelle 5.3) genutzt.

Inhibitor	Zielstruktur	LM	Konz. SL	Verd.	Zugabe / mL TRP	Endkonz.
Argatroban	Thrombin	DMSO	5 mg/mL	1:50	5 µL	0,5 µg/mL
BAY-386	PAR-1	DMSO	10 mM	1:10	10 µL	10 µM
BAY61-3606	Syk	H ₂ O	10 mM	-	10 µL	100 µM
				1:10	5 µL	10 µM
				1:100	5 µL	0,1 µM
Bimosiamose	P-Selektin	H ₂ O	10 mg/mL	-	10 µL	100 µg/mL
BMS 986120	PAR-4	DMSO	10 mM	1:10	10 µL	10 µM
Eptifibatid	$\alpha_{IIb}\beta_3$	H ₂ O	5 mg/mL	-	20 µL	100 µg/mL
				1:10	20 µL	10 µg/mL
				1:100	20 µL	1 µg/mL
Losartan	GPVI	H ₂ O	44,25 mM	-	4,5 µL	200 µM
				1:10	4,5 µL	20 µM
				1:100	4,5 µL	2 µM
Seratrodast	TXA ₂ -Rezeptor	DMSO	10 mg/mL	-	10 µL	100 µg/mL
				1:10	10 µL	10 µg/mL
				1:100	10 µL	1 µg/mL
TAK-242	TLR4	DMSO	10 mM	1:10	10 µL	10 µM
				1:100	10 µL	1 µM
				1:1000	10 µL	0,1 µM
Ticagrelor	P2Y ₁₂	DMSO	10 mM	1:10	10 µL	10 µM
				1:100	10 µL	1 µM
				1:1000	10 µL	0,1 µM

Tabelle 5.1 - Informationen über die Inkubation von TRP mit verschiedenen Inhibitoren (small molecules).

Heparin-Derivat	LM	Konz. SL	Verd.	Zugabe / mL TRP	Endkonz.
2-O-Desulf. Heparin	H ₂ O	10 mg/mL	-	10 µL	100 µg/mL
Dalstedecasaccharid	H ₂ O	6,3 mg/mL	-	15,9 µL	100 µg/mL
RO-Heparin	H ₂ O	10 mg/mL	-	10 µL	100 µg/mL
UFH	H ₂ O	25 IE/µL	1:100	4 µL	1 I.E./mL
Fondaparinux	H ₂ O	5 mg/mL	1:40	6,25 µL	0,78 µg/mL

Tabelle 5.2 – Informationen über die Inkubation von TRP mit verschiedenen Heparin-Derivaten.

Klon	Zielstruktur	LM	Konz. SL	Zugabe	Endkonz.
HIP1	GPIb α	DPBS	0,5 mg/mL	60 µL/mL TRP	30 µg/mL
GoH3	Integrin α 6	DPBS	0,5 mg/mL	20 µL/mL TRP	10 µg/mL
IV.3	Fc γ RIIa	DPBS	5,62 mg/mL	2,3 µL/mL TRP	13 µg/mL

Tabelle 5.3 – Informationen über die Inkubation von TRP mit verschiedenen Antikörpern.

5.3.2 Inkubation der Tumorzellen mit Inhibitoren

Neben der Inkubation der Thrombozyten mit diversen Inhibitoren wurden auch die Tumorzellen in einzelnen experimentellen Ansätzen mit verschiedenen Reagenzien inkubiert, um die Beteiligung von Liganden des P-Selektins auf der Oberfläche der Tumorzellen an der Thrombozytenaktivierung zu untersuchen. Es wurde rekombinantes P-Selektin verwendet, welches an unterschiedliche Liganden des P-Selektins auf den Tumorzellen binden und so wiederum die Bindung der Tumorzellen an thrombozytäres P-Selektin minimieren sollte. Um die Bindung von P-Selektin an entsprechende Liganden zu ermöglichen, wurde der Tumorzellsuspension 1 mM Ca²⁺ und 1 mM Mg²⁺ zugesetzt. Zudem wurden die Thrombozyten mit einem Antikörper gegen Fc γ RIIa inkubiert (Klon IV.3, 13 µg/mL), um eine eventuelle Bindung des, an das rekombinante P-Selektin gekoppelte, Fc-Fragments zu verhindern. Zum anderen wurde ein spezifischer Antikörper gegen den P-Selektin Liganden CD24 verwendet (Klon SWA11). Vor der Inkubation wurden die Tumorzellen, wie in Abschnitt 5.1.2 beschrieben, aufgearbeitet und zu 1×10⁵ Tumorzellen/mL in DPBS resuspendiert. Die oben genannten Proteine wurden entsprechend Tabelle 5.4 zugesetzt und die Ansätze für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Bezeichnung	Zielstruktur	LM	Konz. SL	Zugabe	Endkonz.
Rekombinantes P-Selektin	P-Selektin Liganden	DPBS	0,4 mg/mL	62,5 μ L/ 10^5 TZ	25 μ g/ 10^5 TZ
SWA11 (Ak)	CD24	DPBS	2 mg/mL	5 μ L/ 10^5 TZ	10 μ g/ 10^5 TZ

Tabelle 5.4 – Informationen zur Inkubation der Tumorzellen mit rekombinatem P-Selektin oder mit einem Antikörper gegen CD24.

5.3.2.1 Behandlung der Tumorzellen mit einem Fucosyltransferase-Inhibitor

Neben den eingesetzten Inhibitoren, Antikörpern und Proteinen wurde die Bindung von Tumorzellen an thrombozytäres P-Selektin zudem mithilfe eines Fucosyltransferase-Inhibitors (FTI) untersucht. Das minimale Bindungsmotiv für alle Selektine besteht aus sLe^x (Abschnitt 2.3.3.6.1). Die Synthese von sLe^x erfolgt unter anderem durch α 1,3-Fucosyltransferase (277,287). Durch die Verwendung eines Inhibitors dieser Fucosyltransferase konnten dementsprechend Tumorzellen generiert werden, die sich durch eine Reduktion oberflächenständiger P-Selektin Liganden auszeichneten. Als FTI wurde 2F-Peracetyl-Fucose verwendet. Diese wird nach der Aufnahme in die Zelle zu einem fluorierten GDP-Fucose-Analogon metabolisiert, das als kompetitiver Antagonist der Fucosyltransferase fungiert (355).

Zur Inkubation der Tumorzellen mit FTI wurden jeweils 2×10^5 MDA-MB-231 Zellen bzw. 5×10^5 MCF-7 Zellen, wie in Abschnitt 5.1.2 beschrieben, in jeweils zwei T25-Zellkulturflaschen ausgesät. Nach 72 Stunden wurde das Medium in den Zellkulturflaschen ausgewechselt. Jeweils einer Zellkulturflasche wurde dabei der in DMSO gelöste FTI zugesetzt. Die Endkonzentration FTI betrug 200 μ M. Als Kontrolle wurde der anderen Flasche die gleiche Menge DMSO zugesetzt.

Nach einer 72-stündigen Inkubation mit FTI bzw. DMSO wurden die Tumorzellen entsprechend Abschnitt 5.1.2 gewaschen, abgelöst, zentrifugiert, in DPBS resuspendiert und für entsprechende Experimente genutzt.

5.4 Aktivierung der Thrombozyten zur Untersuchung der thrombozytären Granulafreisetzung

Zu den Charakteristika der Thrombozyten gehört die Sekretion thrombozytärer Granula infolge einer Aktivierung. Zu den thrombozytären Granula gehören die α -Granula, die dichte Granula sowie Lysosomen (356). Im Zuge dieser Arbeit wurde die Freisetzung von ATP aus der dichten Granula als Maß für den Grad der Thrombozytenaktivierung evaluiert. Dazu wurde ein Luciferin-Luciferase-Assay angewendet. Zudem wurde die Freisetzung der α -Granula mittels eines *enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA), eines Dot-Blot basierten *Proteome Profiler Arrays* und eines *Proximity Extension Assays* (PEA) charakterisiert.

Die Probengenerierung zur Quantifizierung der Freisetzung sowohl der dichten als auch der α -Granula erfolgte nach einem ähnlichen Schema.

Die Aktivierung der Thrombozyten erfolgte in TRP. Dieser wurde, wie in Abschnitt 5.2 beschrieben, vorbereitet, recalcifiziert und je nach Versuchsaufbau mit Inhibitor oder Lösungsmittel präinkubiert (siehe Abschnitt 5.3.1).

Die Tumorzellen wurden in der Zellkulturflasche mit DPBS gewaschen, mit EDTA abgelöst, in DPBS suspendiert, gezählt, zentrifugiert und in DPBS resuspendiert. In Experimenten, in denen eine Endkonzentration von 1×10^4 Zellen/mL angestrebt war, wurde das DPBS-Volumen so gewählt, dass die Tumorzellkonzentration 1×10^5 Tumorzellen/mL betrug. In einigen Experimenten wurden die so vorbereiteten Tumorzellen, wie in Abschnitt 5.3.2 beschrieben, mit Inhibitoren präinkubiert.

Die unterschiedlichen mit oder ohne Inhibitor präinkubierten, recalcifizierten TRP-Ansätze wurden gleichmäßig auf mehrere Reagiergefäße aufgeteilt. In diesen wurde die Aktivierung der Thrombozyten, entsprechend dem in Abbildung 5.1 dargestellten Schema, durchgeführt.

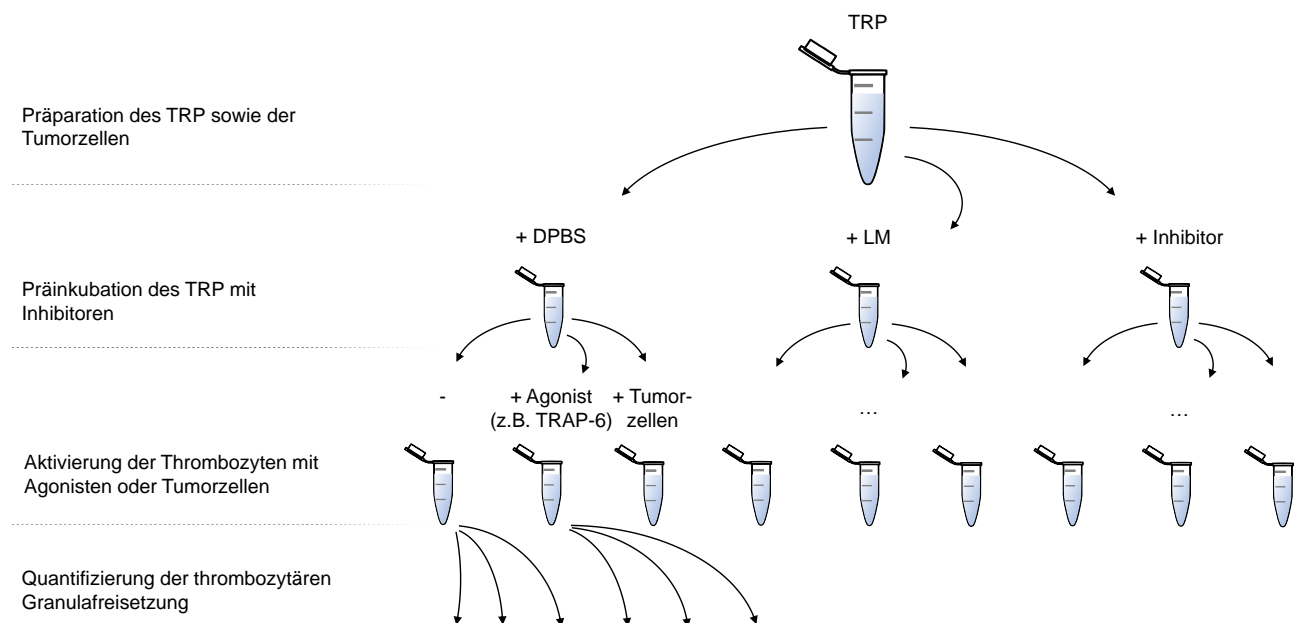


Abbildung 5.1 – Schematische Darstellung der Präinkubation des TRP mit oder ohne Inhibitor sowie der anschließenden Thrombozytenaktivierung mit Tumorzellen bzw. Thrombozyten-Agonisten.

Als Maß für die Spontanaktivierung wurde ein Ansatz ohne Aktivator inkubiert. Um einen Volumenausgleich vorzunehmen, wurde das entsprechende Volumen DPBS zugesetzt. Neben der Tumorzell-vermittelten Aktivierung wurde die Aktivierung mit weiteren Thrombozyten-Aktivatoren getestet. Diese Aktivatoren fungierten in den verschiedenen Experimenten als Positivkontrollen. Die Tumorzellen bzw. weiterer Aktivatoren wurden in den in Tabelle 5.5 dargestellten Konzentrationen eingesetzt.

Agonist	Zielstruktur	LM	Konz. Stammlsg.	Verd.	Zugabe /mL TRP	Endkonz.
TRAP-6	PAR-1	H ₂ O	3,3 mM	-	12,5 µL	41 µM
Thrombin	PAR-1, PAR-4, GPIIb	H ₂ O	1000 NIH/mL	1:10	5 µL	0,5 NIH/mL
ADP	P2Y ₁₂	H ₂ O	10 mM	1:10	25 µL	25 µM
Kollagen	GPVI	H ₂ O	100 µg/mL	-	50 µL	5 µg/mL
U46619	TXA ₂ -Rezeptor	H ₂ O	4 mM	1:10	25 µL	10 µM
Tumorzellen		DPBS	1×10 ⁵ /mL	-	100 µL	1×10 ⁴ /mL

Tabelle 5.5 – Informationen zur Aktivierung der Thrombozyten mit Tumorzellen bzw. weiteren Thrombozyten-Aktivatoren.

Je nach Aktivatorzusatz wurden die Ansätze unterschiedlich lange inkubiert. Die Inkubationszeit wurde anhand der Kinetik der ATP-Freisetzung je nach Art der Aktivierung festgelegt. Die Kinetik der ATP-Freisetzung wurde in Vorversuchen über 70 Minuten aufgenommen. Die für nachfolgende Experimente angewendete Inkubationszeit entsprach dem Zeitpunkt, an dem eine maximale ATP-Konzentration detektiert werden konnte. Die jeweiligen Inkubationszeiten sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

Aktivator	Inkubationszeit
MCF-7 (1×10 ⁴ /mL)	30 min
MDA-MB-231 (1×10 ⁴ /mL)	25 min
A375 (1×10 ⁴ /mL)	25 min
ADP (25 µM)	15 min
Kollagen (5 µg/mL)	15 min
U46619 (10 µM)	10 min
TRAP-6 (41 µM)	5 min
Thrombin (0,5 NIH/mL)	5 min

Tabelle 5.6 – Inkubationszeiten der Thrombozyten mit den entsprechenden Aktivatoren.

Nach der Aktivierung der Thrombozyten wurden die Proben unverzüglich für die entsprechenden Experimente verwendet.

5.5 Quantifizierung der ATP-Freisetzung aus der thrombozytären dichten Granula

Sowohl TRP als auch Tumorzellen wurden entsprechend dem Abschnitt 5.3 vorbereitet und mit Inhibitor inkubiert.

Nach der jeweiligen Inkubation des TRP mit Tumorzellen bzw. weiteren Aktivatoren (siehe Abbildung 5.1 sowie Tabelle 5.6) wurden die Ansätze im Triplikat à 50 µL auf eine weiße NuncTMF96 MicroWellTM Platte aufgetragen.

Die Quantifizierung der freigesetzten Menge ATP wurde mittels eines Luciferin-Luciferase-Assays vorgenommen. Das Prinzip dieses Assays basiert auf einer ATP-abhängigen Umwandlung von D-Luciferin zu Oxiluciferin. Die in Abbildung 5.2 dargestellte Reaktion wird durch das Enzym Firefly Luciferase katalysiert und generiert Biolumineszenz.

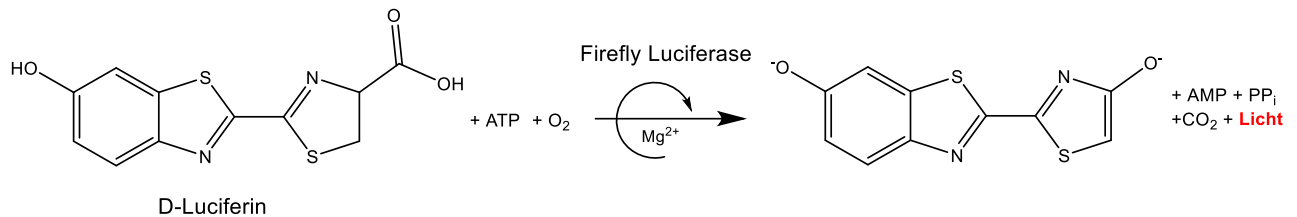


Abbildung 5.2 – Umwandlung von D-Luciferin zu Oxiluciferin durch Firefly Luciferase (357).

Während der Reaktion wird unter ATP-Verbrauch ein angeregtes Luciferinadenylat gebildet, welches unter CO₂-Verbrauch und Lichtemission in Oxiluciferin zerfällt. Die Lichtintensität ist proportional zur gebildeten Menge Oxiluciferin, die wiederum proportional zur vorhandenen Menge ATP ist (357).

Zur Durchführung der ATP-Quantifizierung wurde das ATP-Determination Kit der Firma ThermoFisher verwendet. Die Herstellung des Lumineszenz-Reagens erfolgte stets kurz vor Durchführung des Assays unter Lichtausschluss nach Herstellerangaben (siehe Abschnitt 4.1.7.3).

Zu den, wie zuvor beschrieben, vorbereiteten und in eine 96-Well Platte vorgelegten Proben wurden pro Well 40 µL Lumineszenz-Reagenz zugesetzt. Unmittelbar im Anschluss wurde die Biolumineszenz mit einer Wellenlänge von 560 nm an einem FLUOstar Optima Platereader vermessen. Die Ergebnisse wurden, je nach Fragestellung, auf den Nullwert ruhender Thrombozyten oder auf die Tumorzell-induzierte ATP-Freisetzung normalisiert.

5.6 Quantifizierung der Freisetzung verschiedener Proteine aus der thrombozytären α-Granula

Zur Quantifizierung der Freisetzung verschiedener Proteine aus der α-Granula infolge einer Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung wurden in dieser Arbeit verschiedene Methoden verwendet. Zum einen wurde die Konzentration von VEGF-A, EGF, sowie TIMP-1 im Überstand von aktivierten Thrombozyten mittels eines *enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA) ermittelt. Mithilfe eines membranbasierten *Proteome Profiler* (*Proteome Profiler Human XL Cytokine Array Kit*) wurden die relativen Konzentrationen der Proteine PDGF-AA, PDGF-AB/BB, PAI-1, CXCL5, CCL3/CCL4, BDNF, MIF sowie Angiopoetin-1 ermittelt. Zudem wurden diverse weitere Proteine

mittels des *Proximity Extension Assays* (PEA) durch die Firma OLINK quantifiziert. Zur Durchführung dieses Assays wird an dieser Stelle auf die Ausführungen des Herstellers verwiesen (358).

Die Probenvorbereitung erfolgte für alle drei verwendeten Assays identisch. Zunächst wurde TRP, vorbereitet, recalcifiziert und je nach Ansatz mit verschiedenen Inhibitoren oder dem entsprechenden Lösungsmittel inkubiert (Abschnitt 5.3). Nach der 30-minütigen Inkubation wurden die Ansätze aufgeteilt und mit MCF-7 Zellen ($1 \times 10^4/\text{mL}$, 30 min), MDA-MB-231 Zellen ($1 \times 10^4/\text{mL}$, 25 min) oder TRAP-6 (41 μM , 5 min) aktiviert (siehe Abschnitt 5.4). Zusätzlich wurde TRP als Maß für die spontane Freisetzung der Proteine ohne Behandlung inkubiert. Nach der Aktivierung wurden die Proben zentrifugiert (1000 g, 10 min, 21 °C). Diese Zentrifugationsbedingungen wurden gewählt, um einerseits ein quantitatives Abscheiden der Thrombozyten zu gewährleisten und andererseits eine weitere Aktivierung der Thrombozyten zu vermeiden. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und zur Durchführung der Assays verwendet.

5.6.1 Durchführung des *enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA)

Die infolge einer Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung aus der thrombozytären α -Granula freigesetzten Proteine VEGF-A, EGF sowie TIMP-1 wurden mithilfe eines Sandwich-ELISA quantifiziert. Bei der Durchführung eines Sandwich-ELISA werden zwei Antikörper verwendet, die an unterschiedliche Epitope der zu quantifizierenden Proteine binden. Der erste Antikörper (*capture*-Antikörper) wird zu Beginn des Assays auf dem Boden der Wells immobilisiert. Das zu detektierende Protein bindet an diesen Antikörper. Ein zweiter Antikörper erkennt das gebundene Protein und bindet es mit seinem Fab-Fragment. Das Fc-Fragment des Antikörpers ist biotinyliert. In einem nächsten Schritt wird eine an Avidin gekoppelte Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase* (HRP)) zugesetzt. Das Avidin geht dabei eine feste Bindung mit dem biotinylierten Detektions-Antikörper ein. Die Meerrettich-Peroxidase setzt in einer enzymatischen Oxidation ein farbloses Substrat, z.B. 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), zu einem farbigen Produkt um. Die Reaktion wird durch den Zusatz von Schwefelsäure gestoppt. Das farbige Reaktionsprodukt der Oxidation von TMB weist ein Absorptionsmaximum für eine Wellenlänge von 450 nm auf. Die Menge des Produkts und damit auch die Färbung der Lösung sind proportional zur Menge der gebundenen Peroxidase und damit zur vorhandenen Menge des zu detektierenden Proteins.

Die Proben, die mittels ELISA quantifiziert werden sollten, wurden entsprechend des Abschnitts 5.6 hergestellt. Es wurde der Einfluss der Inhibitoren Argatroban, BAY-386, BMS986120 sowie eines Antikörpers gegen GPIIb α auf die Tumorzell-induzierte Freisetzung von EGF, VEGF-A sowie TIMP-1 aus der α -Granula untersucht.

Die ELISA wurden gemäß den Hersteller-Angaben durchgeführt. Abweichend von diesen wurde zur Auswertung der ELISA nicht 2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS), sondern TMB verwendet.

Es wurde eine Nunc-Immuno[®]MicroWell[®]96-Well-Platte über Nacht mit einem *capture*-Antikörper beschichtet. Am nächsten Tag wurden überschüssige Antikörper durch dreimaliges Waschen mit Waschpuffer entfernt. Anschließend wurden eine Stunde mit einer Blockierungslösung inkubiert. Diese enthielt bovines Serumalbumin (BSA), das zur Blockade unspezifischer Bindungsstellen in den Wells diente. Nach erneutem Waschen mit Waschpuffer wurden 50 µL der Proben bzw. der Kalibrierlösungen im Triplikate in die Wells pipettiert. Die Kalibrierlösungen enthielten das zu quantifizierende Protein in linear abfallender Konzentration. Insgesamt wurden sieben Verdünnungen des Proteins sowie ein Nullwert, bestehend aus DPBS, hergestellt und auf die Platte aufgetragen. Die verwendeten Konzentrationen orientierten sich an den zu erwartenden Quantitäten der Proteine in Thrombozyten. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Morgen wurde erneut drei Mal mit Waschpuffer gewaschen und der Detektions-Antikörper in die Wells pipettiert. Nach einer zweistündigen Inkubation bei Raumtemperatur und erneutem Waschen wurde Avidin-HRP zugeben, das wie oben beschrieben an den biotinylierten Detektions-Antikörper band. Um die Avidin-HRP vollständig zu entfernen, wurde die Platte nach einer 30-minütigen Inkubation fünf Mal mit Waschpuffer gewaschen. Abschließend wurden pro Well 100 µL einer TMB-Lösung hinzugefügt. Dies fand unter Lichtausschluss statt. Die durch die Zugabe von TMB induzierte Farbreaktion wurde nach maximal 15 Minuten durch die Zugabe von 50 µL Schwefelsäure (2 M) unterbrochen. Die Platte wurde unmittelbar nach Beendigung der Reaktion photometrisch bei einem Absorptionsmaximum von 450 nm an einem Multiskan[®] Ex Platereader ausgewertet. Um die unspezifische Absorption, die nicht aus der Enzym-Substrat-Reaktion resultierte, zu vermessen, wurde zudem die Absorption bei 570 nm gemessen und die Differenz der beiden Werte gebildet. Aus den Werten der Kalibrierlösungen wurden Kalibriergraden erstellt, anhand derer die Proteinkonzentrationen der Proben ermittelt wurden. Die Ergebnisse wurden auf den jeweils gewählten Thrombozytenaktivator (Thrombin bzw. Tumorzellen) normalisiert dargestellt.

5.6.2 Durchführung des *Proteome Profiler Arrays*

Die membranbasierten *Proteome Profiler Arrays* ermöglichen eine Antikörper-basierte, parallele Detektion diverser Proteine aus einer Probe. Es handelt sich um einen Dot-Blot, bei dem die Antikörper in Duplikaten auf zwei Nitrocellulosemembranen vorfixiert sind. Der Array wird nach der Beschickung mit Proben gewaschen, mit einem Cocktail biotinylierter Detektionsantikörper inkubiert und mit Streptavidin-HRP sowie einem Chemilumineszenz-Reagenz detektiert. Anschließend kann aus der Pixeldichte der detektierten *Dots* eine semi-quantitative Aussage über das Mengenverhältnis bestimmter Proteine in verschiedenen Proben getroffen werden.

Um die infolge einer Thrombozytenaktivierung freigesetzten Inhaltstoffe der α -Granula zu charakterisieren, wurde ein *Proteome Profiler Human XL Cytokine Array* Kit der Firma R&D Systems verwendet. Auf jeder der Membranen befinden sich 105 unterschiedliche Antikörper gegen verschiedene Cytokine. Von diesen 105 Cytokinen befinden sich jedoch nur acht Proteine

nachgewiesenermaßen in der thrombozytären α -Granula, sodass sich die Auswertung auf diese Cytokine beschränkte. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Die Probengenerierung erfolgt analog zu Abschnitt 5.6. Es wurde TRP mit Bimosiamose (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) oder mit der entsprechenden Menge DPBS für 30 Minuten präinkubiert. Die anschließende Aktivierung wurde mit 1×10^4 MDA-MB-231 Zellen bzw. MCF-7 Zellen pro Milliliter induziert.

Nach der Aktivierung wurden die Proben, wie in Abschnitt 5.6 beschrieben, zentrifugiert, der Überstand abgenommen und zur Durchführung des *Proteome Profilers* verwendet. Pro Membran wurden 200 μL Überstand verwendet.

Der nach der Detektion am ChemiDoc™ XRS+ System erhaltene Dot-Blot wurde mittels der Image Lab Software hinsichtlich der Pixeldichte der einzelnen *Dots* ausgewertet, wobei alle Membranen nach der gleichen Entwicklungszeit ausgewertet wurde. Auf jeden *Dot* wurde eine gleichgroße, runde Fläche gelegt.

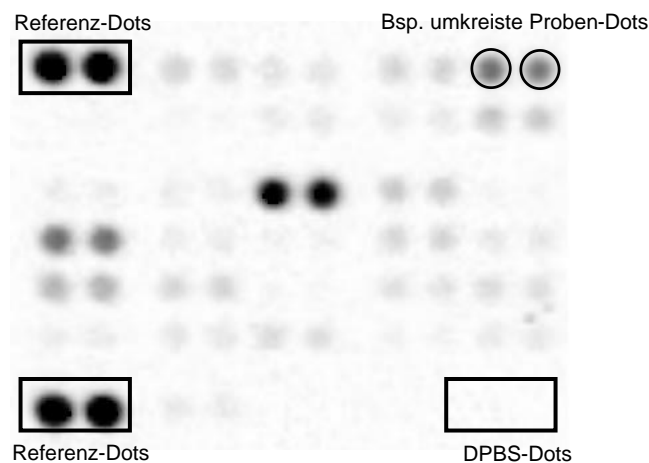


Abbildung 5.3 – Beispielbild der Membran eines Dot-Blots nach Probenzugabe und Detektion.

Auf der Membran befinden sich drei verschiedene Arten *Dots*, jeweils im Duplikat. Zum einen die Proben-*Dots*, auf denen die verschiedenen, spezifischen Antikörper immobilisiert sind. Zudem befinden sich sogenannte DPBS-*Dots* auf der Membran, auf denen sich als Negativkontrolle keine Antikörper befinden. Von allen Messwerten wurde nach ihrer Detektion die Pixeldichte der Negativkontrolle subtrahiert, um die Daten bei der Auswertung von einem möglichen Hintergrundrauschen zu bereinigen. Des Weiteren befinden sich Referenz-*Dots* auf der Membran, die als Orientierungspunkte, als Überprüfung der allgemeinen Funktionalität des Assays und als Normalisierung dienen. Der Mittelwert der Pixeldichte der Referenz-*Dots* einer der Membranen wurde willkürlich als Wert 1 festgelegt. Als diese Bezugsmembran wurde jene Membran verwendet, welche mit der Probe behandelt wurde, die aus unbehandelten Thrombozyten generiert wurde. Die Pixeldichte der Referenz-*Dots* der übrigen Membranen wurde darauf normalisiert. Die Proben-*Dots* befinden sich im Duplikat auf der Membran, wobei im Zuge der Auswertung jeweils der Mittelwert aus diesen Duplikaten gebildet und zur Darstellung der Ergebnisse herangezogen wurde.

5.7 Lichttransmissionsaggregometrie

Eine Folge der Interaktionen zwischen Tumorzellen und Thrombozyten ist eine *tumor cell induced platelet aggregation* (TCIPA). Zur Untersuchung dieser wurde die Lichttransmissionsaggregometrie nach Born angewendet. Es handelt sich dabei um eine turbidimetrische Methode, bei der durch Messung der Lichttransmission die Trübung einer Suspension detektiert wird. Hierzu werden plan geschliffene Küvetten verwendet, in denen sich die zu vermessende Suspension befindet. Diese wird kontinuierlich gerührt, damit in der Lösung befindliche Zellen sowie entstehende Aggregate nicht zu Boden sinken. Durch die Küvette wird ein Lichtstrahl geleitet. Hinter der Küvette wird die durchgetretene Lichtintensität mittels eines LED-Photometers detektiert. Die Messung erfolgte mittels eines APACT 4004 4-Kanal Aggregometers. Die Messung der TCIPA beruht auf dem Umstand, dass eine Suspension von Thrombozyten in Plasma oder Puffer durch die Bildung von Aggregaten insgesamt klarer wird. Diese Abnahme der Trübung über die Zeit wurde wie oben beschrieben turbidimetrisch bestimmt. Das Prinzip der Messung wird in Abbildung 5.4 schematisch dargestellt.

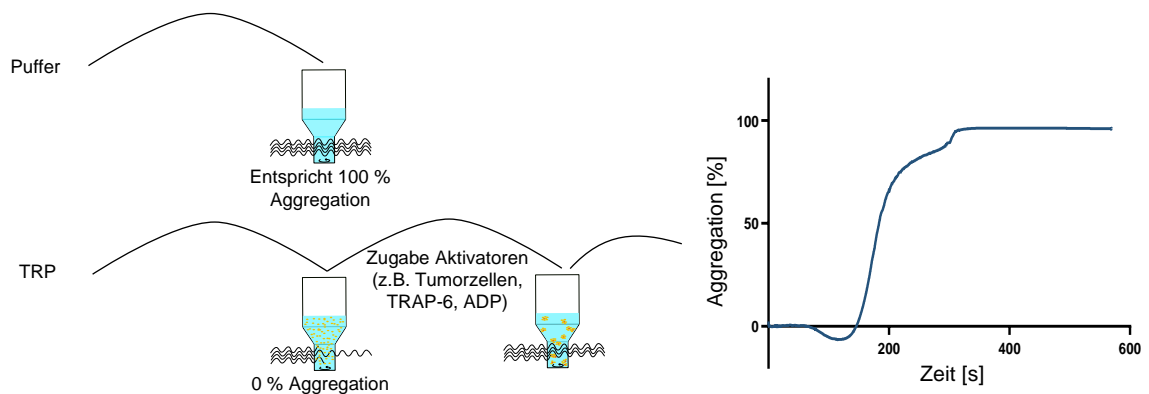


Abbildung 5.4 – Prinzip der turbidimetrischen Messung der Thrombozytenaggregation nach Born.

Anders als bei der klinisch eingesetzten Aggregometrie nach Born, die zur Differentialdiagnostik oder für das Medikamentenmonitoring eingesetzt wird, wurde nicht in Plasma, sondern erneut mit TRP gearbeitet. Der verwendete TRP wurde je nach Versuch mit verschiedenen Inhibitoren inkubiert. Auch die benötigte Tumorzellsuspension wurde wie zuvor erläutert hergestellt.

Zur Vorbereitung des Aggregometers wurde ein Nullabgleich mit Thrombozyten-armem Puffer vorgenommen. Dieser simulierte eine vollkommen aggregierte Thrombozytensuspension und ermöglichte eine vollständige Transmission (100 % Aggregation). Vor jeder Messung wurden 200 μ L TRP in einer Küvette vorgelegt und in einen Kanal des Aggregometers eingesetzt. Wiederum erfolgte ein Abgleich, welcher diesmal 0 % Aggregation repräsentierte und der Basislinie der Messung entsprach. Nach diesem Abgleich wurden 20 μ L der Tumorzellsuspension zugegeben und die Messung gestartet. Neben der TCIPA wurde auch die Thrombozytenaggregation als Folge der Zugabe von Agonisten wie beispielsweise TRAP-6 gemessen. Die Konzentration der Agonisten

entsprach dabei der in Tabelle 5.5 genannten Konzentrationen. Neben diesen Positivkontrollen wurde an jedem Versuchstag die Neigung der Thrombozyten zur spontanen Aggregation erfasst. Dazu wurde recalcifizierter TRP ohne den Zusatz eines Aktivators unter ständigem Rühren über 60 Minuten im Aggregometer vermessen. Sowohl die Spontanaggregation als auch die Positivkontrollen dienten als Qualitätskontrolle der aufbereiteten Thrombozyten. Es gingen nur solche Versuche in die weitere Betrachtung ein, die sich hinsichtlich Aktivierbarkeit sowie Spontanaggregation unauffällig zeigten.

Die Messung wurde mithilfe der AFACT LPC-Software evaluiert und ausgewertet.

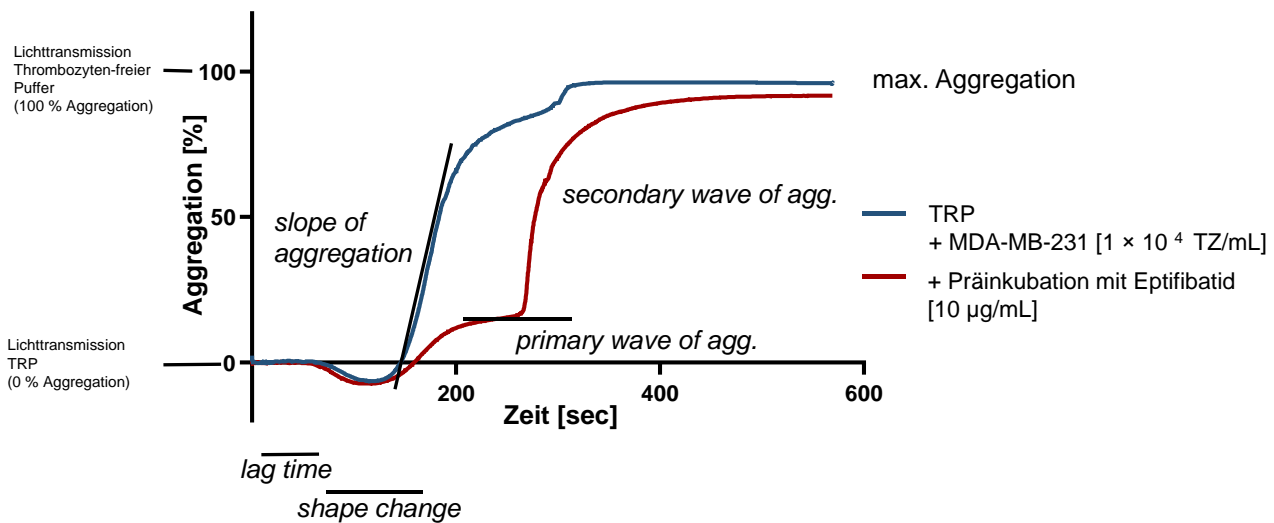


Abbildung 5.5 – Beispiel für die Auswertung eines Aggregogramms.

Die Auswertung wurde unter Berücksichtigung verschiedener Parameter vorgenommen. Zunächst wird die sogenannte *lagtime* beobachtet. Diese beschreibt die Zeit zwischen Beginn der Messung und dem Beginn des sogenannten *shape changes*. Der *shape change* kann infolge eines charakteristischen Verhaltens der Thrombozyten nach initialer Aktivierung beobachtet werden. Inaktive Thrombozyten weisen eine discoide Form mit einer kleinen Oberfläche auf. Infolge einer initialen Aktivierung ändert sich die Form der Thrombozyten und es werden sogenannte Pseudopodien ausgebildet (359). Diese vergrößern die Oberfläche der Thrombozyten und lassen die Suspension optisch dichter erscheinen. Dies wird im Aggregometer erfasst und spiegelt sich in einem initialen Abfall der Kurve nach Beginn der Thrombozytenaktivierung wider. Gleichzeitig bilden aktivierte Thrombozyten dichte Aggregate. Die Suspension beginnt dementsprechend klarer zu werden.

Die Geschwindigkeit der Aggregatbildung wird durch die Steigung der Kurve (*slope of aggregation*) beschrieben. Unter Umständen kommt es zur Bildung reversibler Aggregate, die, auch als Folge des stetigen Rührens, wieder in kleinere Fragmente zerfallen. Dies spiegelt sich in einem Abflachen der Kurve nach der initialen Aggregation (*primary wave of aggregation*) wider.

Während der *secondary wave of aggregation* bilden sich stabile Aggregate, wodurch die Suspension klarer und die Transmission größer wird. Die Kurve steigt infolge dessen weiter an, bis die maximale Aggregation erreicht ist. Da die Messungen verschiedener Tage, unter Verwendung unterschiedlicher TKZ und Tumorzellkulturflaschen, untereinander schlecht vergleichbar sind, wurden die Experimente in n=3 durchgeführt, aber in dieser Arbeit jeweils nur ein repräsentativer Graph gezeigt.

5.8 Thrombin-Generierungs-Assay

Der hier beschriebene Thrombin-Generierungs-Assay wurde verwendet, um das endogene Thrombinbildungspotential von Plasmaproben zu bestimmen. Dabei lag der Fokus einerseits auf dem grundsätzlichen Potential der verwendeten Tumorzelllinie eine Thrombin-Generierung zu induzieren. Andererseits wurde der Hypothese nachgegangen, ob die Zugabe von 1 % Plasma zu Thrombozyten-armen Puffer ausreichend ist, um eine Aktivierung von Thrombin zu ermöglichen.

Der im Folgenden beschriebene Assay stammt aus der routinemäßigen Diagnostik in der Hämatologie. Er dient der Abschätzung des Blutungs- oder Thromboserisikos, sowie der Evaluation einer antikoagulativen Therapie oder einer Substitutionstherapie mit verschiedenen Gerinnungsfaktoren (360). Der Assay beruht auf der Bestimmung der amidolytischen Aktivität von Thrombin anhand der Kinetik der Spaltung eines fluorogenen Substrats. Dieses Substrat besteht aus drei Aminosäuren, die an einen Indikator gebunden sind. Diese Aminosäuresequenz besitzt eine hohe Affinität und Spezifität gegenüber Thrombin. Als Indikator fungiert das fluorogene Molekül 7-Amino-4-Methylcoumarin (AMC). Die Gesamtstruktur des synthetisch hergestellten Substrats ist Z-Gly-Gly-Arg-AMC (361). Aufgrund der proteolytischen Spaltung des Substrats durch aktives Thrombin wird der Indikator freigesetzt und kann fluorimetrisch vermessen werden. Dazu wird die freigesetzte Indikatorgruppe mit Licht einer Wellenlänge von 360 nm angeregt. Diese emittiert eine Fluoreszenzstrahlung mit einer Wellenlänge von 460 nm. Sofern ein Substratüberschuss vorliegt, ist die Fluoreszenzemission pro Zeiteinheit proportional zur enthaltenen Menge Thrombin (362,363).

Bei den in dieser Arbeit dargestellten Experimenten handelte es sich um Kontrollversuche zur Evaluation der Möglichkeit der Thrombin-Generierung im verwendeten Testsystem. Daher wurde mit Thrombozyten-armem Plasma (TAPI) gearbeitet, welches aus TKZ isoliert wurde. Zur Herstellung dieses TAPI wurde TKZ zentrifugiert (670 g, 10 min, 21 °C) und der Überstand verwendet. Der Überstand wurde erneut zentrifugiert (1000 g, 20 min, 21 °C), um eventuell im Plasma verbliebene Thrombozyten zu entfernen, und im Anschluss als TAPI verwendet

Eine Thrombinaktivierung kann, wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben, sowohl über das intrinsische als auch über das extrinsische Blutgerinnungssystem induziert werden. Da lediglich eine Aktivierung über das extrinsische Gerinnungssystem betrachtet werden sollte, wurden die Plasmaproben mit einem Faktor XIIa-Inhibitor behandelt. Bei diesem handelte es sich um einen Corn-Typsin-Inhibitor

(CTI). Er wurde in einer Endkonzentration von 50 µg/mL verwendet. Es wurden Experimente mit unverdünntem TAPI oder mit Thrombozyten-armen-Puffer (TAP), dem 1 % (V/V) TAPI (Endkonzentration) zugesetzt wurde, durchgeführt (siehe Tabelle 5.7).

Die Tumorzellen wurden, entsprechend Abschnitt 5.1.2, gewaschen, abgelöst, suspendiert, gezählt, zentrifugiert und resuspendiert. Die Konzentration der Tumorzellsuspension betrug 1×10^5 Zellen/mL. Nach der Vorbereitung der Tumorzellen und des Thrombozyten-armen Plasmas wurden die Proben im Duplikat auf eine schwarze 96F Non-Treated Black Microwell Platte vorgelegt. Je nach Probe wurden dem Plasma entsprechend Tabelle 5.7 entweder DPBS (Nullkontrolle), TF-Reagenz (Positivkontrolle) oder Tumorzellsuspension (Probe) zugegeben.

		TAPI	TAP	DPBS	TF-Reag.	TZ-Susp.	Substrat
Plasma Endkonz.: 40 %	Nullwert	40 µL	-	10 µL	-	-	50 µL
	TF-Kontrolle	40 µL	-	-	10 µL	-	50 µL
	Probe	40 µL	-	-	-	10 µL	50 µL
Plasma Endkonz.: 1 %	Nullwert	1 µL	39 µL	10 µL	-	-	50 µL
	TF-Kontrolle	1 µL	39 µL	-	10 µL	-	50 µL
	Probe	1 µL	39 µL	-	-	10 µL	50 µL

Tabelle 5.7- Die Zusammensetzung der Proben, die für den Thrombin-Generierungsassay verwendet wurden.

Unmittelbar vor der Messung wurde das calciumhaltige fluorogene Substrat zugesetzt. Da das enthaltene Calcium essentiell für eine quantitativ ablaufende Gerinnung ist, dient dieses als Initiator der Reaktion. Direkt im Anschluss an die Zugabe wurde die Platte in einem Thermo Fluorocan Ascent® Reader vermessen. Die Thrombin-Generierung wurde in Form einer Kinetik über 90 Minuten verfolgt, wobei die Fluoreszenzintensität alle 60 Sekunden quantifiziert wurde.

Um von der gemessenen Fluoreszenzintensität auf die absolute Menge Thrombin zu schließen, wurde eine Kalibrierung mit Standards durchgeführt, deren Thrombin-Aktivität bekannt ist. Die Kalibrierung wurde mithilfe des Technothrombin® TGA CAL Sets der Firma Technoclone GmbH durchgeführt. Die Stammlösung des Kalibrators wurde entsprechend der Herstelleranweisung verdünnt (siehe Tabelle 5.8). Als Nullwert wurde TGA Puffer verwendet.

Verdünnung	Volumen Kalibratorlösung	Volumen TGA Puffer
Verdünnung 1 (1:2)	200 µL Stammlösung	200 µL
Verdünnung 2 (1:4)	100 µL Verdünnung 1	100 µL
Verdünnung 3 (1:20)	20 µL Stammlösung	380 µL
Verdünnung 4 (1:200)	20 µL Verdünnung 3	180 µL
Nullwert	-	200 µL

Tabelle 5.8 - Zusammensetzung der Kalibrierlösungen des Thrombin-Generierungs-Assays.

Pro Well wurden 40 µL der entsprechend verdünnten Kalibrierlösung verwendet. Diese wurden mit 50 µL Substratlösung versetzt und direkt im Anschluss analog zu den Proben vermessen. Über einen Zeitraum von zehn Minuten wurde alle 30 Sekunden die Fluoreszenzintensität detektiert. Mithilfe dieser Kalibrierung konnten Rückschlüsse auf die absolute Menge aktiven Thrombins in den Proben gezogen werden.

5.9 Adhäsionsassay

Um das Ausmaß möglicher adhäsiver Wechselwirkungen zwischen Tumorzellen und Thrombozyten zu evaluieren, wurde ein Calcein-basierter Adhäsionsassay durchgeführt. Neben dem generellen Ausmaß der adhäsiven Wechselwirkungen in Abhängigkeit von den verwendeten Zelllinien wurden mithilfe des Assays auch anti-adhäsive Eigenschaften verschiedener Heparin-Derivate untersucht.

Der Assay wurde über zwei Tage durchgeführt. Am ersten Tag wurden die Tumorzellen für den Versuch vorbereitet. Dazu wurden sie gewaschen, abgelöst, zentrifugiert und in dem entsprechenden Zellkulturmedium resuspendiert. Dabei wurde eine Konzentration von 5×10^5 Tumorzellen/mL eingestellt. Anschließend wurden pro Well 100 µL der Tumorzellsuspension auf eine 96-Well Platte aufgetragen. Die Zellen wuchsen über 24 Stunden im Inkubator an und bildeten innerhalb der Wells Monolayer aus.

Am zweiten Tag wurden zunächst die Thrombozyten vorbereitet. Dazu wurde das Volumen TKZ so gewählt, dass es die benötigte Anzahl Thrombozyten enthielt. Anschließend wurde das TKZ mit Calcein-Acetoxy-methylester-Lösung (Calcein-AM-Lösung, 1 mM) versetzt, sodass eine finale Konzentration von 2 µM Calcein-AM im TKZ resultierte. Es folgte eine Inkubation auf einem Laborschüttler unter Lichtausschluss für 30 Minuten.

Als lipophiles Molekül überwindet Calcein-AM mittels passiver Diffusion die Zellmembran der Thrombozyten. Nach der intrazellulären Aufnahme des Calcein-AM wird der Acetoxy-methylester mittels Esterasen abgespalten. Zudem kommt es zu einer Öffnung des Lacton-Ringes im Molekül. Aus dieser enzymatischen Umwandlung, die nur in lebendende Zellen möglich ist, resultiert die Ausbildung eines fluoreszierenden, konjugierten π -Elektronen-Systems und eine Calcium-

Chelatisierung. Als Folge der Zunahme der Hydrophilie durch die Esterhydrolyse und der Komplexbildung kann das Molekül die Zellmembran nicht mehr überwinden. Es verbleibt daher selektiv in lebendigen Zellen und ermöglicht eine Fluoreszenz-basierte Detektion der Zellen (364).

Das mit Calcein-AM inkubierte TKZ wurde im Anschluss an die Inkubation zentrifugiert (670 g, 10 min, 21 °C) und in Thrombozyten-Puffer resuspendiert (400×10^6 Thrombozyten/mL). Nach der Recalcifizierung des TRP (Endkonzentration: 1 mM) wurde das TRP auf verschiedene Ansätze in braune Reagiergefäße aufgeteilt und nach der Zugabe der zu untersuchenden Heparin-Derivate bzw. des entsprechenden Lösemittels (Tabelle 5.2) für 30 Minuten bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss inkubiert.

Während der Inkubationszeit wurden die, sich in der 96-Well-Platte befindlichen, Tumorzellen vorbereitet. Dazu wurde das Zellkulturmedium entfernt und die Wells drei Mal mit DPBS gewaschen, wobei darauf geachtet wurde, denn Zellrasen nicht zu beschädigen. Anschließend wurde im Triplikat pro Well 100 µL des Calcein-markierten TRP zugegeben, das zuvor mit bzw. ohne den entsprechenden Inhibitor inkubiert wurde. Nach einer 20-minütigen Inkubation wurden Thrombozyten, die nicht an die Tumorzellen adhärirt waren, durch Entfernen des TRP sowie dreimaliges Waschen mit DPBS entfernt.

Die Tumorzellen sowie daran adhärente Thrombozyten wurden mit 150 µL/Well einer 1 %igen Triton™ X 100-Lösung über 15 Minuten lysiert. Anschließend wurden pro Well 100 µL entnommen und auf eine schwarze Nunc™ F96 MicroWell™ Platte überführt. Die Messung der Fluoreszenzintensität wurde an einem FLUOstar™ OPTIMA Multiwell Reader (Exzitation 485 nm, Emission 520 nm) quantifiziert. Die Fluoreszenzintensität verhielt sich proportional zur Zahl der an Tumorzellen gebundenen Thrombozyten.

5.10 Untersuchung von zellulären Oberflächenstrukturen mittels Durchflusszytometrie

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methodik der Durchflusszytometrie genutzt, um sowohl Tumorzellen als auch Thrombozyten hinsichtlich spezieller Oberflächenstrukturen zu charakterisieren. Für durchflusszytometrische Experimente wurde ein Guava® easyCyte HT Flow Cytometer verwendet.

5.10.1 Detektion von P-Selektin auf der Oberfläche von Thrombozyten

Im Kontext der Thrombozytencharakterisierung wurde die Durchflusszytometrie verwendet, um P-Selektin auf der Thrombozytenoberfläche zu detektieren und zu quantifizieren. P-Selektin ist in ruhenden Thrombozyten in der α -Granula gespeichert. Als Folge einer Thrombozytenaktivierung gelangt P-Selektin an die Oberfläche und wird dort als Adhäsionsmolekül der Umgebung präsentiert (365).

Zur Vorbereitung der Experimente wurden Thrombozyten aus TKZ per Zentrifugation (660 g, 10 min, 21 °C) isoliert und in Thrombozyten-armem Puffer resuspendiert. Die Konzentration wurde dabei auf 1×10^6 Thrombozyten pro Milliliter eingestellt. Der TRP wurde recalcifiziert (Endkonzentration: 1 mM). Je Well wurden 100 μ L des TRP in eine 96-Well Platte pipettiert. Für jeden Versuchsansatz wurden neun Wells vorbereitet, wobei je drei Wells ohne Antikörper oder mit einem FITC-gelabelten anti-P-Selektin Antikörper oder mit einer entsprechenden IgG1k Isotyp-Kontrolle inkubiert wurden. Je Antikörper wurde 1 μ g pro Well verwendet. Nach der Zugabe wurden die Thrombozyten 15 Minuten inkubiert. Es wurde sowohl das Basallevel an P-Selektin auf ruhenden Thrombozyten quantifiziert als auch die Menge P-Selektin, die nach einer Aktivierung der Thrombozyten auf deren Oberfläche präsentiert wurde. Die Aktivierung wurde durch die Zugabe von entweder 41 μ M TRAP-6 oder Tumorzellen induziert. Die Tumorzellen wurden dazu, wie in Abschnitt 5.1.2 beschrieben, vorbereitet und in DPBS resuspendiert. Die Endkonzentration der Tumorzellen betrug 5×10^4 pro Well.

Nach Zusatz der Aktivatoren wurde erneut 30 Minuten inkubiert. Auf einen Waschschrift zur Entfernung der überschüssigen Antikörper wurde bewusst verzichtet, um die Thrombozyten nicht durch zusätzliche Zentrifugationen weiter zu aktivieren und so das Ergebnis zu verfälschen.

Im unmittelbaren Anschluss an die Inkubation wurde die Messung am Durchflusszytometer vorgenommen. Es wurden je Well 1×10^5 Thrombozyten hinsichtlich ihrer Fluoreszenz untersucht.

5.10.2 Detektion von Liganden des P-Selektins und TF auf Tumorzellen

Die Methode der Durchflusszytometrie wurde zur Charakterisierung der Oberflächenstruktur verschiedener Tumorzelllinien verwendet.

Zur Vorbereitung der Tumorzellen wurden die adhärennten Zellen entsprechend dem Abschnitt 5.1.2 gewaschen, von dem Boden der Zellkulturflasche abgelöst und in DPBS resuspendiert. Die Zellen wurden zentrifugiert (312 g, 4 min, 4 °C), zwei Mal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend am CASY® 1 Model TT quantifiziert. Nach einer erneuten Zentrifugation wurden die Zellen so in Blockierungspuffer resuspendiert, dass eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/mL resultierte. Die Zellen wurden für 15 Minuten in Blockierungspuffer inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen vor der Zugabe der Antikörper abzusättigen. Die Zellsuspension wurde à 1×10^5 Zellen/100 μ L in zehn braune 1,5 mL Reagiergefäße aufgeteilt. Die zehn Ansätze unterteilten sich in zwei Ansätze ohne Zusatz, zwei mit primären Antikörpern, drei mit sekundären Antikörpern und drei Ansätze mit der Kombination aus beiden Antikörpern.

Zunächst erfolgte die Zugabe des primären Antikörpers (Tabelle 5.9). Die Zellen wurden anschließend 45 Minuten bei 4 °C inkubiert, wobei die Suspension alle 15 Minuten durchmischt wurde, um ein Sedimentieren der Tumorzellen zu verhindern. Anschließend wurde der überschüssige primäre Antikörper in zwei Waschschriften entfernt. Dazu wurden die Zellen zunächst zentrifugiert (500 g, 5 min, 4 °C), der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 200 μ L

Waschpuffer resuspendiert. Nach dem zweiten Waschschrift wurden die Zellen in 100 μL Waschpuffer resuspendiert und der sekundäre, fluoreszenzmarkierte Antikörper zugegeben (Tabelle 5.9).

Zielstruktur	Prim. Antikörper	Endkonz.	Sek. Antikörper	Endkonz.
TF	goat anti-TF pAb	1 $\mu\text{g}/10^5$ TZ	rabbit anti-goat IgG-FITC mAb	0,5 $\mu\text{g}/10^5$ TZ
CD24	mouse anti-CD24 mAb	1 $\mu\text{g}/10^5$ TZ	goat anti-mouse IgG-FITC pAb	0,5 $\mu\text{g}/10^5$ TZ
PSGL1	mouse- anti-PSGL-1 mAb	1 $\mu\text{g}/10^5$ TZ	goat anti-mouse IgG-FITC pAb	0,5 $\mu\text{g}/10^5$ TZ

Tabelle 5.9 - Informationen zu den verwendeten primären bzw. sekundären Antikörpern.

Es folgte eine erneute Inkubationszeit von 35 Minuten bei 4 °C. Die Zellen wurden anschließend erneut zwei Mal gewaschen und in 100 μL Waschpuffer resuspendiert. Die Proben wurden auf eine 96-Well Platte überführt und am Durchflusszytometer vermessen. Es wurden $1,5 \times 10^4$ Tumorzellen hinsichtlich der Fluoreszenzintensität untersucht.

Neben der spezifischen Detektion von Oberflächenstrukturen wie beispielsweise den beiden P-Selektin Liganden CD24 und PSGL-1 wurde mittels der Durchflusszytometrie auch die grundsätzliche Bindung von P-Selektin an Tumorzellen untersucht. Da sich die Bindung von P-Selektin durch die Abhängigkeit von zweiwertigen Kationen auszeichnet, wurden der Tumorzellsuspension jeweils 1 mM Ca^{2+} und Mg^{2+} zugesetzt. Zur Quantifizierung möglicher P-Selektin-Bindungspartner wurde anstelle eines primären Antikörpers eine rekombinante humane P-Selektin-Fc-Chimäre zu den Tumorzellen hinzugegeben (Endkonzentration: 1 $\mu\text{g}/1 \times 10^5$ TZ). Die molekulare Struktur der Chimäre ist in Abbildung 5.6 verdeutlicht.



Abbildung 5.6 – Molekulare Struktur der P-Selektin-Fc-Chimäre, die zur Detektion von Liganden des P-Selektins verwendet wurde (366).

Das rekombinante P-Selektin bindet an die Tumorzellen, wobei das Ausmaß dieser Bindungen von der Menge der vorhandenen Liganden und Bindungspartner auf der Oberfläche der Tumorzellen abhängt. Das an das P-Selektin gekoppelte humane Fc-Fragment (IgG₁) ermöglicht die Detektion des an die Tumorzellen gebundenen P-Selektins unter Zuhilfenahme eines gegen humanes IgG₁ gerichteten, FITC-markierten Antikörpers (Endkonzentration: 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Da die Bindungen von P-Selektin natürlicherweise keine stabile Bindungskinetik aufweisen, wurde zwischen der Zugabe von rekombinantem P-Selektin und sekundärem Antikörper auf ein Waschen verzichtet. So wurde

verhindert, dass schwach gebundenes P-Selektin von der Oberfläche der Tumorzellen heruntergewaschen wurde. Auch nach Zugabe des sekundären Antikörpers wurde lediglich ein Waschschrift durchgeführt. Anschließend wurden die Proben in einer 96-Well Platte im Durchflusszytometer vermessen. Es wurden $1,5 \times 10^4$ Tumorzellen hinsichtlich der Fluoreszenzintensität untersucht.

5.11 Untersuchungen zu thrombozytären Signalprozessen

Zur Analyse intrazellulär ablaufender Signalprozesse während einer Thrombozytenaktivierung wurden die entsprechend behandelten und aktivierten Thrombozyten lysiert. Die im Lysat befindlichen Signalproteine wurden hinsichtlich ihres Phosphorylierungsgrades untersucht. Dazu wurden die Proteine einerseits mittels SDS-Page aufgetrennt und anschließend mithilfe eines Western Blots detektiert. Andererseits wurde ein *Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Array* durchgeführt.

5.11.1 Thrombozytenlyse und Bestimmung der Gesamtproteinmenge

Die Präinkubation des TRP mit 100 µg/mL Bimosiamose sowie die Aktivierung mit 41 µM TRAP-6 und 1×10^4 MDA-MB-231 Zellen bzw. MCF-7 Zellen erfolgten Analog zu Abschnitt 5.6. Anders als bei der Analyse freigesetzter Proteine wurde nun jedoch der Überstand verworfen und das Zellpellet lysiert. Da während der Lyse auch die in den Proben enthaltenen Tumorzellen erfasst wurden und deren Proteom dementsprechend ebenfalls mit analysiert wurde, wurde eine Kontrollprobe angefertigt, um den Einfluss des Tumorzellproteoms auf das Ergebnis berücksichtigen zu können. Zur Anfertigung dieser Proben wurde Thrombozyten-armer Puffer verwendet, welcher mit 1×10^4 Tumorzellen/mL versetzt und im Weiteren wie die übrigen Proben behandelt wurde. Um eine etwaige Spontanaktivierung zu evaluieren, wurden nicht-aktivierte Thrombozyten lysiert, nachdem sie ansonsten wie die übrigen Proben behandelt wurden.

Das Zellpellet, bestehend aus Thrombozyten und je nach Probe Tumorzellen, wurde in kaltem Lysepuffer resuspendiert, der zuvor mit einem Protease-Inhibitor-Cocktail (PIC) und Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) versetzt wurde (Abschnitt 4.1.7.7). Das Lysepuffervolumen richtete sich nach dem anfänglichen Probenvolumen. Es wurden 200 µL Lysepuffer/mL TRP verwendet. Die Proben wurden für 30 Minuten bei 2 °C auf einem ThermoMixer® bei 800 U/min lysiert. Anschließend wurden alle nicht solvatisierten Zellbestandteile mittels Zentrifugation entfernt (20.000 g, 10 min, 4 °C) und der erhaltene Überstand à 50 µL aliquotiert. Die Lysate wurden bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

Die Gesamtproteinmenge der hergestellten Lysate wurde mithilfe eines BCA-Assays quantifiziert. In diesem Assay wird die Biuret-Reaktion genutzt, bei der in alkalischer Lösung zweiwertige Kupferionen von Molekülen mit zwei Peptidbindungen komplexiert werden. Die in den Proteinen

enthaltene Aminosäuren Cystin, Cystein, Tryptophan und Tyrosin reduzieren die zweiwertigen Kupferionen zu einwertigen. Letztere werden durch die Bicinchoninsäure (BCA) komplexiert. Die gebildeten Komplexe zeichnen sich durch eine violette Färbung aus. Die Intensität der Färbung korreliert mit der Proteinkonzentration. Dementsprechend kann durch Messung der Absorption auf die Gesamtproteinmenge geschlossen werden (367).

Zur Durchführung des BCA-Assays wurde das Pierce™ BCA Protein Assay Kit nach Herstelleranweisung verwendet. Um sicherzustellen, dass innerhalb der Grenzen des Lambert-Beer'schen Gesetzes gearbeitet wurde, wurden die Lysate 1:20, 1:50 und 1:100 verdünnt. Diese Verdünnungen wurden in Duplikaten à 20 µL auf eine durchsichtige 96-Well-Platte aufgetragen. Zudem wurden verschiedene Referenzen (0-400 µg/mL) zur Erstellung einer Kalibriergrade und drei Qualitätskontrollen (150 µg/mL, 250 µg/mL und 350 µg/mL) auf die Platte aufgetragen. Der Korrelationskoeffizient der Kalibriergrade sollte bei 0,99 liegen und die Qualitätskontrollen um maximal 5 % abweichen. Je Well wurden 200 µL BCA-Lösung zugegeben und die Platte für 60 Minuten bei 60 °C inkubiert. Nachdem die Platte auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 570 nm in einem Multiscan® EX Platereader vermessen.

5.11.2 SDS-Page und Western Blot

Um beurteilen zu können, ob die Präinkubation der Thrombozyten mit Bimosiamose und die anschließende Aktivierung mit Tumorzellen bzw. TRAP-6 einen Einfluss auf thrombozytäre Signalprozesse hat, wurde die Methode der SDS-PAGE und des anschließenden Western Blots verwendet. Um generelle Änderungen im Phosphoproteom der Thrombozyten zu detektieren wurde ein Antikörper gegen Phosphoserin/Phosphothreonin/Phosphotyrosin verwendet.

Das Verfahren der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) zählt zu den gelelektrophoretischen Verfahren und ermöglicht es, mit Hilfe elektrischen Stroms Proteine über ihre Ladungen und ihre alternierenden Größen innerhalb eines polymerisierten SDS-Gels aufzutrennen. Je nach Größe des targetierten Proteins ist es möglich die Porenweite des Trenngels während der Polymerisierung des Acrylamids variabel zu gestalten. Für die vorliegenden Experimente wurde ein Gel mit einem Polymerisationsgrad von 10 % gewählt. Die Proben wurden in einem Laemmli-Puffer verdünnt, der β-Mercaptoethanol enthält, welches die Schwefelbrücken zwischen Cysteinresten reaktiv spaltet. Somit verlieren die Proteine in Sekundär- und Tertiärstruktur und liegen in ihrer Primärstruktur vor.

Es wurde anhand des BCA-Assays das Lysatvolumen berechnet, in welchem 25 µg Gesamtprotein vorlagen. Dieses wurde zur Vorbereitung der SDS-PAGE in einem äquivalenten Volumen Laemmli-Puffer verdünnt und fünf Minuten bei 55 °C auf einem ThermoMixer® bei 100 U/min inkubiert.

Die Elektrophoresekammer wurde mit Elektrodenpuffer befüllt und die Polyacrylamidgele in die Kammer eingesetzt. Nach mehrmaligem Spülen der Geltaschen wurden diese mit den in Laemmli-

Puffer inkubierten Proben befüllt. Zusätzlich wurde eine Geltasche mit 2 µL Precision Plus Protein™ Standard befüllt. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 200 V für 45 Minuten durchgeführt.

Anschließend wurden die Gele aus der Halterung herausgelöst und in Transferpuffer gelagert. Zur Inprozess-Kontrolle und späteren Normalisierung auf die tatsächlich aufgetragene Proteinmenge wurde anschließend eine *stainfree* Detektion (Einstellung: *Good sensitivity* 2,5 min am ChemiDoc™ XRS+ System) vorgenommen. Dabei verbindet sich eine durch den Hersteller nicht näher klassifizierte Trihalo-Komponente unter UV-Bestrahlung mit den Tryptophanen der in der Probe enthaltenen Proteine und ermöglicht somit eine Fluoreszenzdetektion. Es ergibt sich eine Gesamtaufnahme aller Proteine.

Mithilfe des sich anschließenden Western-Blots wurden die im Gel aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) übertragen. Dazu wurde die PVDF-Membran 20 Sekunden in Methanol aktiviert und zusammen mit dem Elektrophoresegel in ein sogenanntes Blot-Sandwich gebaut. Das Blot-Sandwich, von außen nach innen bestehend aus zwei Schwämmen, zwei Filterpapieren, der Membran und dem Gel, wurde bei 100 V für eine Stunde geblotted. Die Probe wurde so aus dem Gel auf die Membran transferiert. Dieser Schritt erfolgte unter Eiskühlung und stetigem Rühren in der mit Transferpuffer befüllten Elektrophoresekammer. Um unspezifische Bindungsstellen auf der Oberfläche der PVDF-Membran abzusättigen, wurde die Membran anschließend aus der Kammer entnommen und eine Stunde mit Blockierungslösung inkubiert. Um die Blockierungslösung zu entfernen, wurde die Membran im Anschluss drei Mal für zehn Minuten in TBS-T Puffer gewaschen.

Zur Visualisierung wurden die Proteine mit spezifischen Antikörpern markiert. Dazu erfolgte eine einstündige Inkubation mit primärer Antikörper-Lösung bei Raumtemperatur. Bei dem primären Antikörper handelte es sich um den bereits erwähnten Antikörper gegen Phosphoserin/Phosphothreonin/Phosphotyrosin. Anschließend wurde die Inkubation über Nacht im Kühlschrank fortgesetzt.

Am nächsten Morgen wurde die Antikörper-Lösung entfernt und die Membran erneut drei Mal mit TBS-T Puffer gewaschen. Im nächsten Schritt wurde die Membran für 90 Minuten mit 10 mL sekundärer Antikörper-Lösung versetzt. Der sekundäre Antikörper bindet den primären Antikörper und ermöglicht eine Detektion der Probe mittels der an den sekundären Antikörper gekoppelten HRP. Nach einer 90-minütigen Inkubation wurden die Antikörper-Lösung entfernt und überschüssige Antikörper in zwei Waschsritten mit TBS-T Puffer entfernt. Zur Detektion wurde die Membran für fünf Minuten mit 4 mL eines Luminol-Peroxidreagenzes inkubiert und anschließend am ChemiDoc™ XRS+ System ausgewertet. Dabei wurde die ablaufende Chemilumineszenz Reaktion vom Gerät detektiert, bei der Luminol durch das enthaltende Peroxid oxidiert wird. Die HRP katalysiert die

Oxidation des Luminols mit Wasserstoffperoxid über ein Epoxid-Zwischenprodukt zu 3-Aminophthalat.

Die aus dieser Reaktion resultierende Lumineszenz wurde über 30 Minuten bei einer Wellenlänge von 430 nm detektiert. Die Auswertung der so entstandenen Bilder erfolgte mittels der Image Lab Software. Es wurden die einzelnen Banden hinsichtlich ihrer Pixeldichte ausgewertet. Es wurde stets die Detektion des Gesamtproteins der *stainfree*-Auswertung als Normalisierungsparameter herangezogen. So konnten Unterschiede in den eingesetzten Proteinmengen demaskiert werden. Es werden repräsentative Bilder der Banden sowie Histogramme der Pixeldichten, bezogen auf unbehandelte Thrombozyten, dargestellt.

5.11.3 Phospho-Kinase Array

Neben SDS-PAGE und Western Blot wurde ein *Phospho-Kinase Array Kit* zur Untersuchung thrombozytärer Signalprozesse verwendet. Mithilfe des *Proteome Profiler™ Human Phospho-Kinase Array Kit* lassen sich 43 verschiedene Kinasen des humanen Proteomes in ihrer phosphorylierten Konfiguration bestimmen. Für die Signaltransduktion in Thrombozyten sind von den 43 detektierbaren Kinasen jedoch nur 12 von nachgewiesener Relevanz. Die Auswertung wurde daher auf diese 12 beschränkt.

Der *Proteome Profiler™ Human Phospho-Kinase Array* wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Das Funktionsprinzip des membranbasierten Arrays wurde in Abschnitt 5.6.2 beschrieben. Die Thrombozytenaktivierung und -lyse erfolgten analog zu Abschnitt 5.11.1. Mit 100 µg/mL Bimosiamose bzw. der entsprechenden Menge DPBS präinkubierte Thrombozyten wurden mit 1×10^4 /mL MCF-7 Zellen aktiviert und anschließend lysiert. Zudem wurden zur Normalisierung der erhaltenen Ergebnisse unbehandelte Thrombozyten als Kontrolle lysiert. Im Anschluss an die Herstellung der Lysate wurde die Gesamtproteinmenge mittels BCA-Assay quantifiziert (Abschnitt 5.11.1). Für die Inkubation jeder Membran wurde ein Probenvolumen verwendet, welches 500 µg Gesamtprotein entsprach.

5.12 Statistik

Die in dieser Arbeit gezeigten Experimente wurden, mit Ausnahme der jeweils nur einmal durchgeführten *Proteome Profiler Arrays* sowie der durch die Firma OLINK durchgeführte PEA, mit einer Stichprobenanzahl (n) von drei durchgeführt. Hierzu wurden an drei unterschiedlichen Tagen unter der Verwendung von unterschiedlichen TKZ sowie Tumorzellkulturflaschen identische Messungen durchgeführt.

Die Versuche zur ATP-Freisetzung, ELISA, Adhäsion-Assays und Durchflusszytometrie wurden jeweils im Triplikat durchgeführt. Versuche zur Thrombozytenaggregation im Duplikat.

Zur Darstellung der Ergebnisse der Aggregometrie, des Thrombin-Generierungs-Assays, der Durchflusszytometrie sowie des Western-Blots wurden aus den jeweiligen Messungen repräsentative Darstellungen gewählt.

Alle weiteren Ergebnisse wurden in Form von Histogrammen dargestellt. Diese repräsentieren den Mittelwert der gesamten Stichprobenanzahl sowie die Standardabweichung. Erfolgte eine Normalisierung der Messwerte, wurde diese innerhalb der Ergebnisse eines Versuchstages durchgeführt. Mithilfe des ungepaarten Student'schen t-Tests wurden signifikante Unterschiede ermittelt. Die Signifikanzniveaus sind den jeweiligen Darstellungen zu entnehmen, dabei gilt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

6 Ergebnisse und Diskussion

6.1 Etablierung eines *in vitro*-Testsystems zur Evaluation der Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung

Die Interaktion zwischen Tumorzellen und Thrombozyten ist essentiell für einen erfolgreichen Verlauf der Metastasierung über den Blutkreislauf. Dabei erfolgt eine Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten. In der wissenschaftlichen Literatur sind zahlreiche Aktivierungsmechanismen für unterschiedliche Tumorentitäten beschrieben, systematische Untersuchungen der relevanten Aktivierungsmechanismen für einzelne Tumorentitäten, wie beispielsweise Brustkrebszellen, sind hingegen nicht verfügbar.

Um die molekularen Mechanismen der Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung *in vitro* zu evaluieren, wurde zunächst ein geeignetes Testsystem etabliert. Ziel war es, ein artifizielles pufferbasiertes Testmedium für die Untersuchung der molekularen Mechanismen der Interaktionen der beiden Mammakarzinomzelllinien MDA-MB-231 und MCF-7 mit Thrombozyten unabhängig von weiteren Blutbestandteilen zu entwickeln. Als Parameter für die Tumorzell-induzierte Aktivierung der Thrombozyten wurden, wie im Folgenden beschrieben, einerseits die Freisetzung von ATP aus der dichten Granula und andererseits das Aggregationsverhalten der Thrombozyten nach Zugabe von Tumorzellen untersucht.

6.1.1 Evaluation verschiedener Methoden der Aufbereitung von Thrombozyten aus Thrombozytenkonzentrat

Zunächst wurde eine geeignete Aufarbeitung der Thrombozyten aus dem Thrombozytenkonzentrat (TKZ) erarbeitet. Die Thrombozyten wurden aus dem TKZ durch Zentrifugation isoliert und zweimal mit Thrombozyten-Puffer gewaschen (siehe Abschnitt 5.2). Anschließend wurde die Aktivierung der Thrombozyten mit Tumorzellen (TZ) in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (1×10^5 TZ/mL sowie 1×10^6 TZ/mL) induziert.

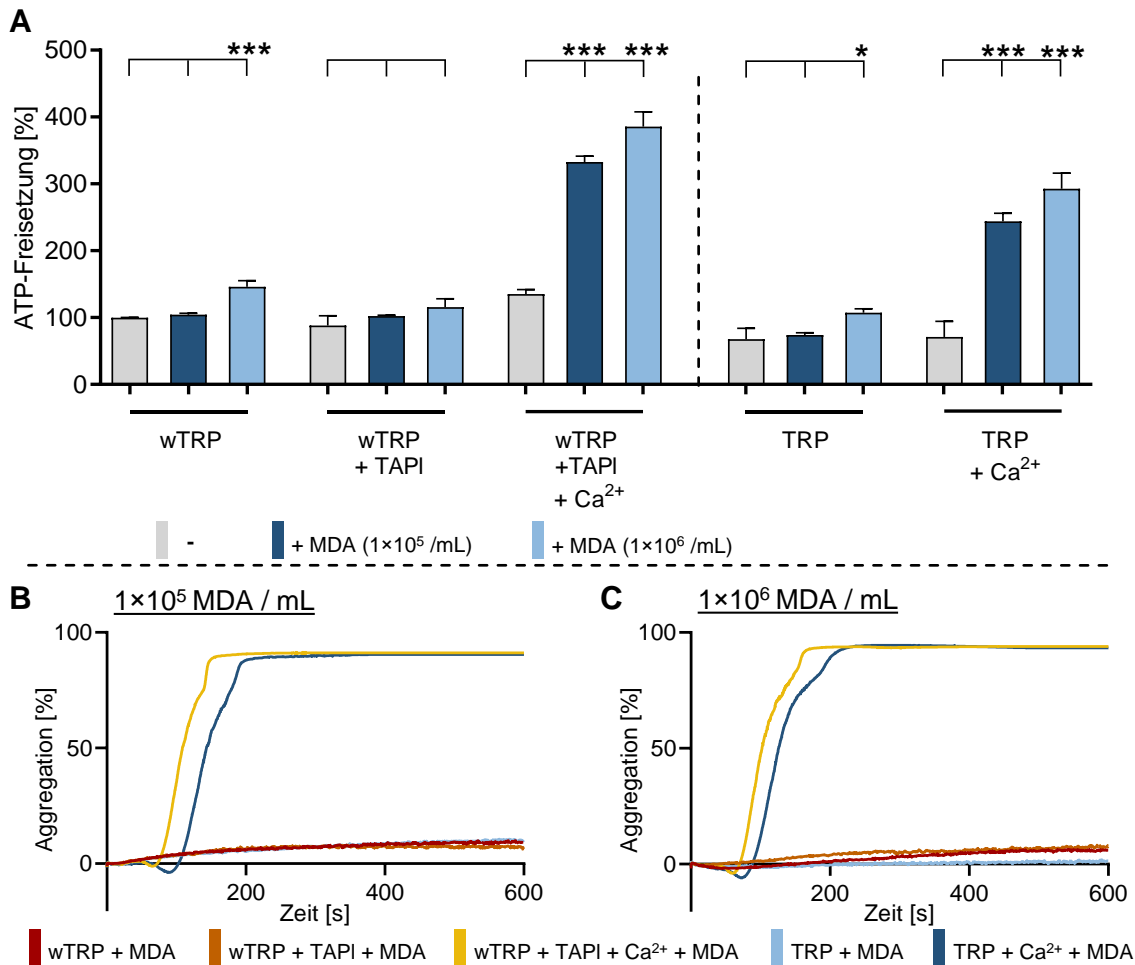


Abbildung 6.1 - **Evaluation verschiedener Thrombozyten-Puffersysteme hinsichtlich ihrer Eignung für eine MDA-MB-231 induzierte Thrombozytenaktivierung.** **A:** MDA-MB-231 Zell-induzierte ATP-Freisetzung aus gewaschenen Thrombozyten in Puffer (wTRP) nach Zusatz von Thrombozyten-armen Plasma (TAPI) und Calcium-Ionen (Ca²⁺). Zudem wird die ATP-Freisetzung aus ungewaschenen Thrombozyten in Puffer (TRP) mit und ohne Zugabe von Ca²⁺ gezeigt. Die Aktivierung wurde mit 1×10^5 sowie 1×10^6 MDA-MB-231 Zellen/mL (w)TRP durchgeführt. **B** und **C:** TCIPA in den zuvor genannten Puffersystemen. **B:** TCIPA nach Zugabe von 1×10^5 MDA-MB-231 Zellen/mL. **C:** TCIPA nach Zugabe von 1×10^6 MDA-MB-231 Zellen/mL.

Abbildung 6.1 zeigt die Aktivierung von Thrombozyten in Puffer nach Zugabe von 1×10^5 bzw. 1×10^6 MDA-MB-231-Zellen pro Milliliter Thrombozyten-reichem Puffer (TRP). Wurden die Thrombozyten vor der Resuspension in Puffer gewaschen, wie in Abschnitt 5.2.2 beschrieben, werden sie als wTRP bezeichnet.

Zunächst wurde die MDA-MB-231 Zell-induzierte ATP-Freisetzung bestimmt (Abbildung 6.1 A) mittels eines Lumineszenz-basierten Luciferin-Luciferase-Assays untersucht. Dargestellt ist stets die normalisierte ATP-Freisetzung, wobei die detektierte Lumineszenz unbehandelter Thrombozyten (in diesem Fall wTRP) als 100 % festgelegt wurde. In grau ist die spontane ATP-Freisetzung aus Thrombozyten dargestellt, in blau die ATP-Freisetzung infolge der Tumorzell-induzierten Aktivierung der Thrombozyten. Nach Zugabe von 1×10^6 MDA-MB-231 Zellen pro Milliliter konnte eine Erhöhung der ATP-Konzentration in wTRP verzeichnet werden. Es kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob das ATP vollständig aus den Thrombozyten freigesetzt wurde oder ob die Sezernierung von ATP aus den Tumorzellen einen Beitrag zur erhöhten Konzentration leistete.

Die Zugabe von 1 % (V/V) thrombozytenarmem Plasma (TAPI) führte zu keiner Erhöhung der ATP-Konzentration. Die zusätzliche Recalcifizierung des Puffers hingegen führte zu einer Vervierfachung der freigesetzten Menge ATP. Die Endkonzentration von ionisiertem Calcium im Puffer (1 mM) entsprach der physiologischen Calciumkonzentration im Blut.

Neben wTRP wurden Thrombozyten verwendet, die nach ihrer Isolation aus TKZ nicht gewaschen wurden. Nach der Resuspension in Puffer werden diese als TRP bezeichnet. Vorangehende Arbeiten konnten mittels eines IgG-ELISA zeigen, dass TRP, welcher unter Verwendung ungewaschener Thrombozyten hergestellt wurde, ca. 0,8 % Plasma enthält. Es wurde ohne die Zugabe von Calcium-Ionen, äquivalent zu wTRP nach Zugabe von TAPI, lediglich nach Zugabe von 1×10^6 Tumorzellen pro Milliliter eine Erhöhung der ATP-Konzentration beobachtet. Nach Recalcifizierung war eine Verdreifachung der ATP-Freisetzung nach einer Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung detektierbar. Das Vorhandensein eines geringen Anteils Plasma sowie von Calcium-Ionen in einer physiologischen Konzentration schien dementsprechend essentiell für die MDA-MB-231 Zell-induzierte ATP-Freisetzung zu sein.

Zusätzlich zur ATP Freisetzung wurde auch die Aggregation als zweiter Parameter für eine Tumorzell-vermittelte Thrombozytenaktivierung herangezogen. Auch hier zeigte sich, dass für eine Aktivierung der Thrombozyten sowohl TAPI als auch Calcium-Ionen anwesend sein müssen (Abbildung 6.1 B und C). Anders als bei der ATP-Freisetzung war ohne Recalcifizierung auch nach Zugabe von 1×10^6 Tumorzellen pro Milliliter keine Aktivierung der Thrombozyten durch die Tumorzellen zu beobachten.

Analog zur ATP-Freisetzung scheint die TCIPA unabhängig davon zu sein, ob in wTRP nach Zugabe von TAPI und Calcium-Ionen oder in recalcifiziertem TRP gearbeitet wurde. In beiden Fällen führte die Zugabe von MDA-MB-231 Zellen innerhalb kurzer Zeit zu einer vollständigen Aggregation der Thrombozyten. Eine Konzentrationsabhängigkeit war dabei nicht zu beobachten.

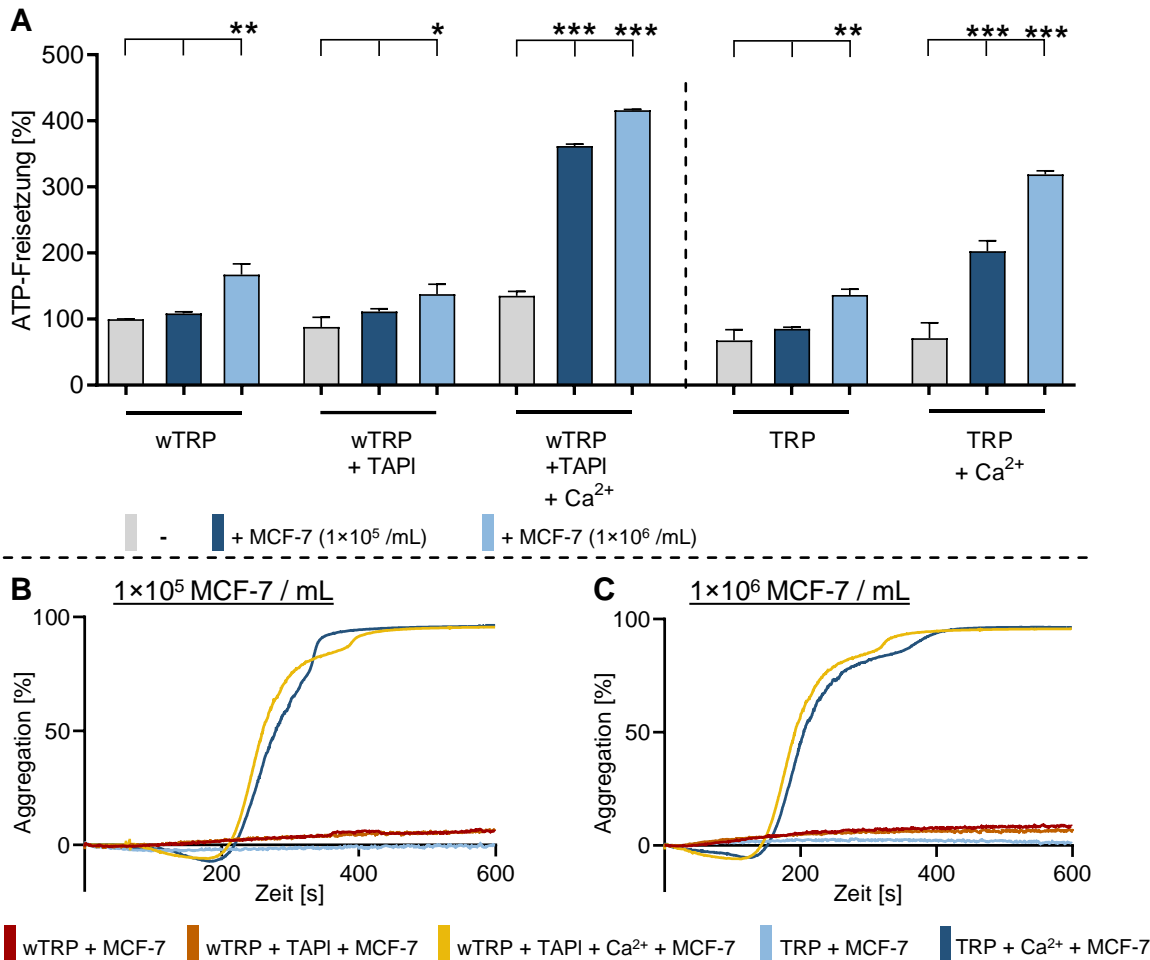


Abbildung 6.2 - **Evaluation verschiedener Thrombozyten-Puffersysteme hinsichtlich ihrer Eignung für eine MCF-7 Zell-induzierte Thrombozytenaktivierung.** **A:** MCF-7 Zell-induzierte ATP-Freisetzung aus gewaschenen Thrombozyten in Puffer (wTRP) nach Zusatz von Thrombozyten-armen Plasma (TAPI) sowie Calcium-Ionen (Ca²⁺). Zudem wird die ATP-Freisetzung aus ungewaschenen Thrombozyten in Puffer (TRP) mit und ohne Zugabe von Ca²⁺ gezeigt. Die Aktivierung wurde mit 1×10⁵ sowie 1×10⁶ MCF-7 Zellen/mL (w)TRP durchgeführt. **B** und **C:** TCIPA in den zuvor genannten Puffersystemen. **B:** TCIPA nach Zugabe von 1×10⁵ MCF-7 Zellen/mL, **C:** TCIPA nach Zugabe von 1×10⁶ MCF-7 Zellen/mL.

Neben MDA-MB-231 Zellen wurde als zweite Mammakarzinomzelllinie MCF-7 hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Thrombozytenaktivierung *in vitro* untersucht. Abbildung 6.2 zeigt, analog zu Abbildung 6.1, die MCF-7 Zell-induzierte ATP-Freisetzung sowie die TCIPA von Thrombozyten in unterschiedlichen Puffersystemen.

In Versuchen zur TCIPA verhielten sich gewaschene und ungewaschene Thrombozyten (wTRP bzw. TRP) ähnlich (Abbildung 6.2 B und C). Analog zu MDA-MB-231 Zellen scheint einzig das Vorhandensein von Plasma und Calcium-Ionen maßgeblich für eine MCF-7 Zell-induzierte TCIPA zu sein. Eine Abhängigkeit von der eingesetzten Tumorzellkonzentration konnte nur in geringem Ausmaß beobachtet werden.

Ähnlich verhielt es sich bei der MCF-7 Zell-induzierten ATP-Freisetzung aus der dichten Granula der Thrombozyten. In wTRP nach Zusatz von TAPI sowie Calcium-Ionen zeigte sich nach Zugabe von MCF-7 Zellen eine, im Vergleich zu recalcifiziertem TRP, leicht erhöhte ATP-Freisetzung.

Die erhöhte ATP-Konzentration könnte auf einer Hyperaktivierbarkeit der Thrombozyten in wTRP beruhen, die aus den zusätzlichen Waschschrritten mit Zentrifugation und Resuspension resultierte. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung gestützt, dass die ATP-Konzentration auch in TRP ohne Zugabe von Tumorzellen geringer war als in wTRP (Abbildung 6.2 A). Die spontane ATP-Freisetzung aus Thrombozyten scheint dementsprechend durch die Aufbereitung des wTRP begünstigt.

Auch der Umstand, dass durch die Verwendung eines TKZ, das bereits über mehrere Tage gelagert wurde, ATP in nennenswerten Mengen in den TRP eingetragen werden könnte, welches durch die Waschschrritte entfernt werden würde, scheint in Anbetracht der niedrigen ATP-Konzentration in TRP ohne Aktivatorzugabe vernachlässigbar.

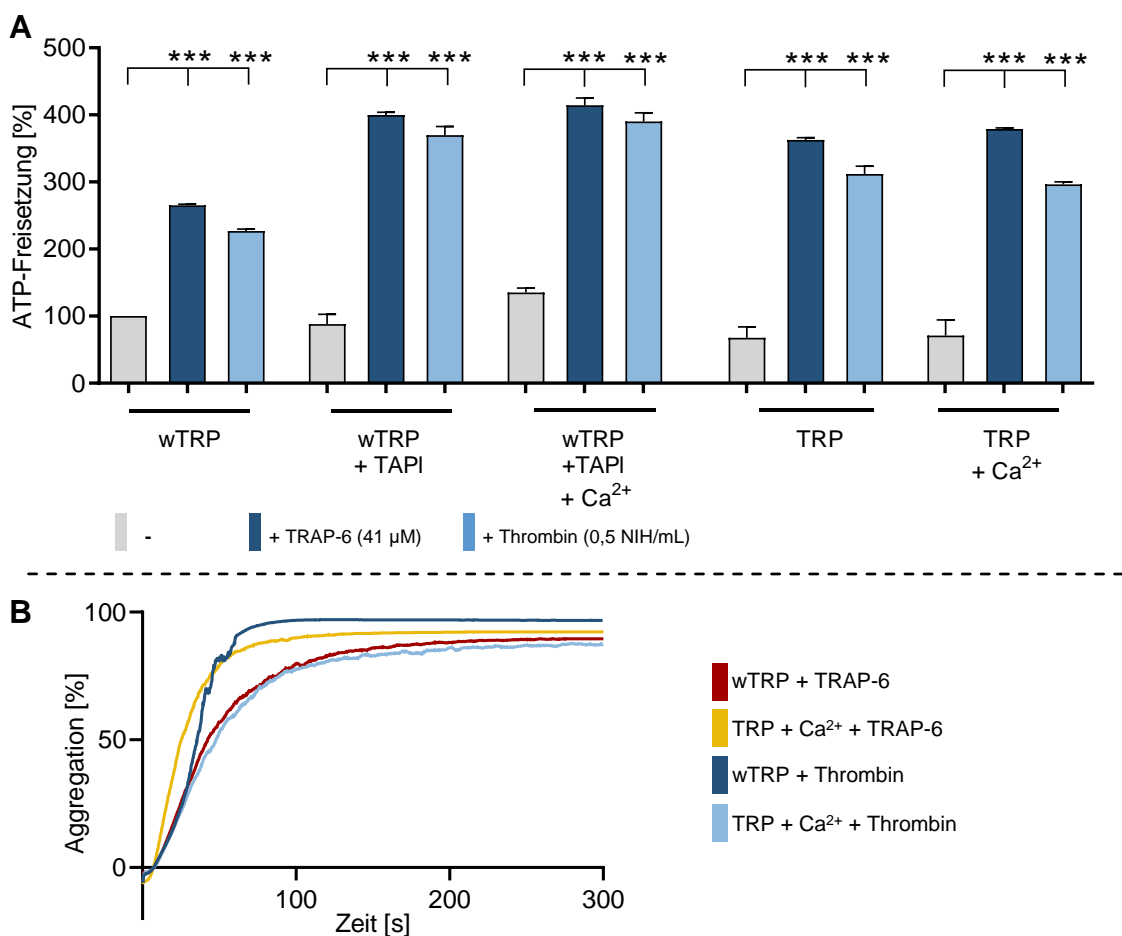


Abbildung 6.3 - Evaluation verschiedener Thrombozyten-Puffersysteme hinsichtlich ihrer Eignung, eine Aktivierung der Thrombozyten mit verschiedenen Agonisten zu ermöglichen. A: Agonist-induzierte ATP-Freisetzung aus gewaschenen Thrombozyten in Puffer (wTRP) nach Zusatz von 1 % Thrombozyten-armen Plasma (TAPI) sowie 1 mM Ca²⁺. Zudem wird die ATP-Freisetzung aus ungewaschenen Thrombozyten in Puffer (TRP) nach Zugabe von 1 mM Ca²⁺ gezeigt. Untersucht wurde die ATP-Freisetzung aus Thrombozyten infolge der Zugabe eines PAR-1 Agonisten (TRAP-6, 41 μ M) sowie von Thrombin (0,5 NIH/mL) **B:** wTRP sowie von ungewaschenen, recalcifizierten Thrombozyten nach Zugabe der oben genannten Agonisten.

Um die generelle Aktivierbarkeit der Thrombozyten ohne den Zusatz von TAPI sowie Calcium-Ionen abschließend zu bewerten, wurden die ATP-Freisetzung und die Thrombozytenaggregation nach

Zugabe der Thrombozytenaktivatoren TRAP-6 bzw. Thrombin in den beschriebenen Puffersystemen evaluiert (Abbildung 6.3).

Sowohl 41 μM des selektiven PAR-1 Agonisten TRAP-6 als auch 0,5 NIH/mL Thrombin induzierten eine ausgeprägte Thrombozytenaktivierung. Diese schien unabhängig von der Verwendung von TRP oder wTRP zu sein. Es war keine Steigerung der ATP-Freisetzung nach Recalcifizierung zu beobachten. Einzig wTRP ohne den Zusatz von Plasma oder Calcium-Ionen wies nach Zugabe der beiden Agonisten eine verminderte ATP-Konzentration im Vergleich zu den übrigen Puffersystemen auf (Abbildung 6.3 A).

Sowohl die Zugabe von Thrombin als auch von TRAP-6 führte zu einer vollständigen Aggregation von Thrombozyten in wTRP oder in recalcifiziertem TRP (Abbildung 6.3 B).

Zusammenfassend lässt sich zur Etablierung eines geeigneten Modells für die Untersuchung einer Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung feststellen, dass für diese die Aufarbeitung der Thrombozyten sowie die Zusammensetzung des verwendeten Puffers essentiell waren. Um den Zentrifugationsstress und die damit einhergehende Hyperaktivierbarkeit der Thrombozyten während der Versuche zu minimieren und den Zustand der Thrombozyten möglichst physiologisch abzubilden, wurde in allen nachfolgenden Versuchen mit ungewaschenen Thrombozyten in Puffer gearbeitet. Diesen wurde, nach der Resuspension, 1 mM Calcium-Ionen zugesetzt. Abweichend von der bisherigen Nomenklatur wird dieser recalcifizierte Thrombozyten-reiche Puffer im Folgenden als TRP bezeichnet. Es wurde dabei grundsätzlich mit einer physiologischen Konzentration von 400×10^6 Thrombozyten pro Milliliter gearbeitet.

Das in TRP vorhandene Restplasma (ca. 1 %) scheint essentiell für die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung sowie, in geringerem Maße, auch für die generelle Aktivierbarkeit der Thrombozyten mittels der Agonisten TRAP-6 oder Thrombin zu sein. Ursächlich könnten verschiedene Inhaltsstoffe des Plasmas, zu denen beispielsweise Fibrinogen gehört, sein. Dieses ermöglicht zum einen eine Quervernetzung der Thrombozyten und trägt zum anderen z.B. über die Bindung an $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ zu einer Verstärkung der initialen Aktivierung bei (368).

Die Addition von Calcium-Ionen scheint auf die generelle Aktivierbarkeit der Thrombozyten mittels spezifischer Agonisten keinen Einfluss zu haben. Für eine Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung ist eine Recalcifizierung des TRP hingegen unabdingbar. Calcium-Ionen dienen physiologisch als Cofaktoren verschiedener Adhäsionsrezeptoren wie beispielsweise E-Cadherin oder P-Selektin (369,370). Zudem sind sie als Cofaktoren verschiedener Gerinnungsfaktoren für die Hämostase unabdingbar (siehe Abschnitt 2.3.1).

6.1.2 Evaluation verschiedener Tumorzellkonzentrationen zur Induktion einer Thrombozytenaktivierung

Nach der Etablierung eines geeigneten Testsystems hinsichtlich der Aufarbeitung der Thrombozyten und Zusammensetzung des Puffers wurde in einem nächsten Schritt die Aktivierung der Thrombozyten mit Tumorzellen optimiert. Hierbei wurde ein besonderes Augenmerk auf die Konzentration der jeweiligen Tumorzellen sowie die Inkubationszeit der Thrombozyten mit den Tumorzellen gelegt.

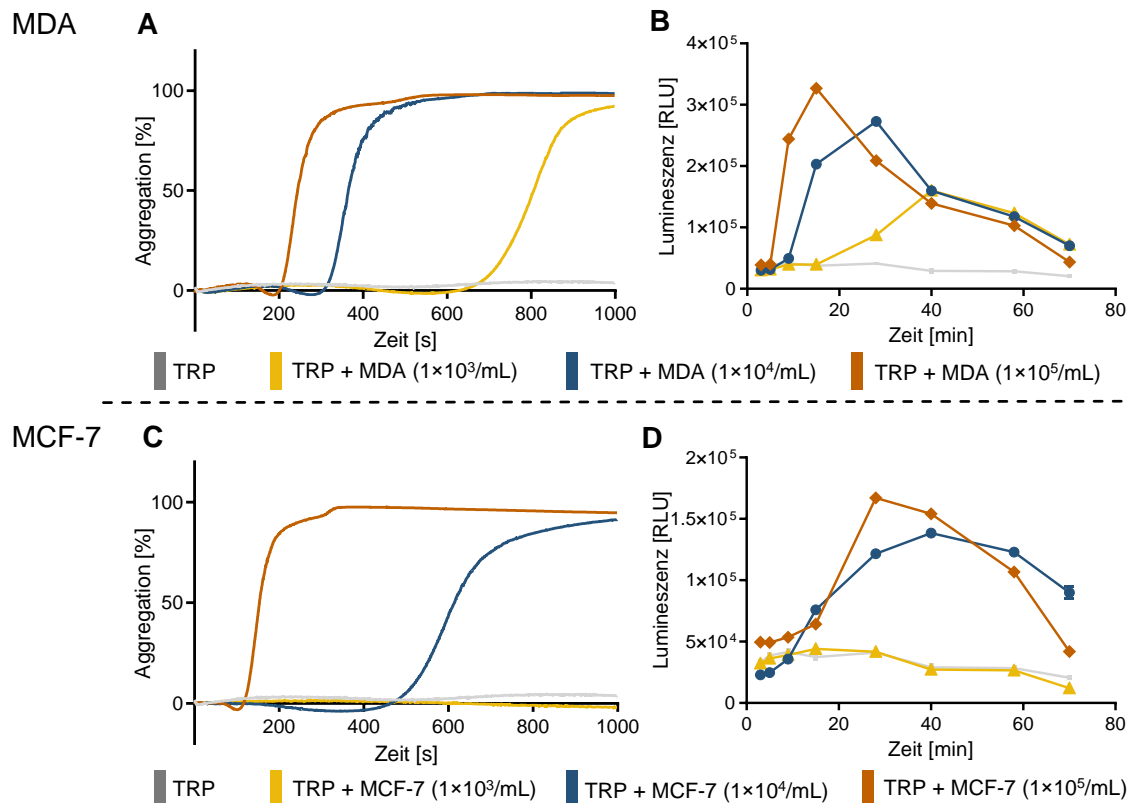


Abbildung 6.4 - **Abhängigkeit der Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung von der Tumorzellkonzentration.** A und C zeigen die TCIPA nach Zugabe von verschiedenen Konzentrationen MDA-MB-231 bzw. MCF-7 Zellen. Zusätzlich wird die spontane Aggregation von recalcifizierten Thrombozyten über den gleichen Zeitraum dargestellt. B und D zeigen die ATP-Freisetzung aus den Thrombozyten nach Zugabe verschiedener Tumorzell-Konzentrationen. Die dargestellte Lumineszenz verhält sich proportional zur in den Proben enthaltenen ATP-Konzentration. Gemessen wurde die ATP-Konzentration an acht verschiedenen Zeitpunkten über einen Zeitraum von 70 Minuten. Zudem wird die spontane Freisetzung von ATP aus Thrombozyten ohne Tumorzell-Zugabe dargestellt.

Sowohl die Tumorzell-induzierte ATP-Freisetzung als auch die TCIPA zeigten eine ausgeprägte Abhängigkeit von Tumorzellkonzentration (Abbildung 6.4).

Zunächst wurde die TCIPA nach Zugabe von 1×10^3 /mL, 1×10^4 /mL oder 1×10^5 /mL MDA-MB-231 Zellen (Abbildung 6.4 A) untersucht. Bereits die geringste Konzentration MDA-MB-231 Zellen (1×10^3 Zellen/mL) induzierte eine Vollaggregation der Thrombozyten. Jedoch verlängerte sich die *lagtime* im Vergleich zu der *lagtime* nach Zugabe von 1×10^5 MDA-MB-231 Zellen/mL von 200 auf 700 Sekunden (Abbildung 6.4 A).

Die Zugabe von 1×10^5 MCF-7 Zellen/mL führte, ähnlich der zuvor beschriebenen Zugabe von MDA-MB-231 Zellen, zu einer Vollaggregation der Thrombozyten nach einer *lagtime* von 100 Sekunden. Eine Reduktion der Tumorzellzahl auf 1×10^4 MCF-7 Zellen/mL führte zu einer Verlängerung der *lagtime* auf 500 Sekunden. Eine weitere Reduktion auf 1×10^3 MCF-7 Zellen/mL hatte ein Ausbleiben der TCIPA über den gesamten Detektionszeitraum von 30 Minuten zur Folge (Abbildung 6.4 C).

Zusammenfassend führten die Zugaben von sowohl MDA-MB-231 als auch die von MCF-7 Zellen zu einer ausgeprägten TCIPA, wobei sich MDA-MB-231 Zellen als die potentere Zelllinie präsentierte, die auch schon in der niedrigsten Konzentration eine Vollaggregation induzierte. Zudem wurde exemplarisch die Messung der Neigung der Thrombozyten zur Spontanaggregation dargestellt. Über den gesamten Detektionszeitraum wurde, auch nach Recalcifizierung, keine Spontanaggregation festgestellt. Um eine tagesaktuelle Hyperreaktivität der Thrombozyten auszuschließen, wurde die Spontanaggregation an jedem Versuchstag erneut evaluiert. Die Ergebnisse der Versuche wurden nur dann für die vorliegende Arbeit verwendet, wenn keine Spontanaggregation detektierbar war.

Neben der TCIPA wurde auch die Tumorzell-induzierte ATP-Freisetzung hinsichtlich ihrer Konzentrationsabhängigkeit untersucht. Hierfür wurden wiederum die drei gewählten Konzentrationen Tumorzellen mit 400×10^6 Thrombozyten/mL inkubiert. Die Freisetzung von ATP aus der thrombozytären dichten Granula wurde über einen Zeitraum von 70 Minuten mittels eines Luciferase-Assays untersucht (Abbildung 6.4 B, D). Dargestellt ist eine repräsentative Messung der ATP-Freisetzung ($n=3$).

Eine spontane ATP-Freisetzung aus den Thrombozyten wurde nicht detektiert. Die Kinetik der MDA-MB-231 Zell-induzierten ATP-Freisetzung zeigte, dass geringere Tumorzellkonzentrationen sowohl zu einem zeitlich verzögerten Anstieg der ATP-Konzentration führten, als auch eine Erniedrigung der im System befindlichen Maximalkonzentration ATP zur Folge hatten.

Anders als die Zugabe von MDA-MB-231 Zellen induzierte die Zugabe von 1×10^3 MCF-7 Zellen/mL keine Sekretion der dichten Granula. Auch nach der Zugabe von 1×10^4 oder 1×10^5 MCF-7 Zellen/mL war die maximale Konzentration an ATP im direkten Vergleich zu MDA-MB-231 Zellen vermindert und wurde zu einem späteren Zeitpunkt erreicht.

Für die weiteren *in vitro* Untersuchungen der Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung wurden folgende Parameter hinsichtlich der Zugabe von Tumorzellen zusätzlich zur bereits etablierten Verwendung recalcifizierten TRP festgehalten. Die Tumorzellkonzentration wurde für weitere Experimente auf 1×10^4 Tumorzellen/mL festgelegt, sodass beide Mammakarzinomzelllinien jeweils in der Lage waren eine Thrombozytenaktivierung zu induzieren. Da metastasierende Tumorzellen zumeist einzeln oder als Zellcluster verschiedener Größe, sogenannte zirkulierenden Tumormikroemboli, in den Blutstrom eintreten, bildete die gewählte Konzentration das pathophysiologische Geschehen während der hämatogenen Metastasierung genauer ab, als eine

mögliche, höhere Tumorzellkonzentration. Der Zeitpunkt der Bestimmung der im System vorliegenden ATP-Konzentration wurde für MDA-MB-231 Zellen auf 30 Minuten, sowie für MCF-7 Zellen auf 40 Minuten festgelegt, sodass immer die maximal erfolgte ATP-Freisetzung erfasst wurde. Durch die unterschiedlich gewählten Zeiträume wurde die Tumorzelllinien-abhängige Zeitkomponente nivelliert, die die Versuchsergebnisse beeinflusst hätte, wenn die Aktivierung mit MDA-MB-231 und MCF-7 Zellen jeweils über einen einheitlichen Zeitraum betrachtet worden wäre.

6.1.3 Beitrag des Tumorzell-sezernierten ATP zur Gesamtkonzentration

Um systematische Fehler bei den Untersuchungen der Tumorzell-induzierten ATP-Freisetzung auszuschließen, die aus der Freisetzung von ATP aus den Tumorzellen statt aus den Thrombozyten resultieren würden, wurde diese im Folgenden quantifiziert.

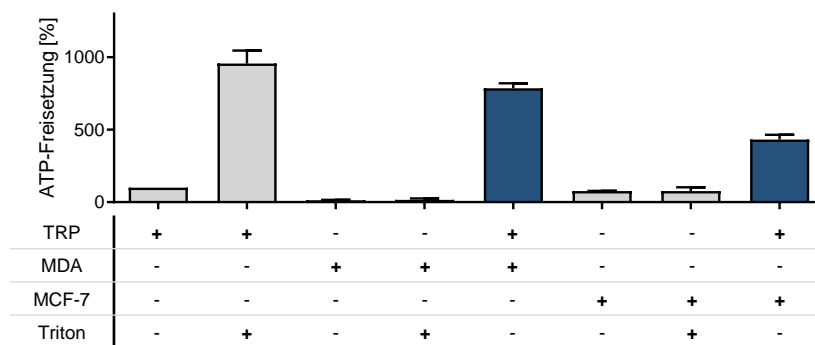


Abbildung 6.5 – Vergleich der Tumorzell-induzierten ATP-Freisetzung mit der Gesamtmenge des in Thrombozyten und Tumorzellen enthaltenen ATP. Es wurde die spontane Freisetzung von ATP pro mL TRP gemessen (400×10^6 Thrombozyten/mL). Die Gesamtmenge ATP/mL TRP wurde durch die Zugabe von 1 % (V/V) Triton bestimmt. Um eine Aussage über die Menge an ATP treffen zu können, die theoretisch aus den Tumorzellen freigesetzt werden könnte, wurden 1×10^4 Tumorzellen/mL ebenfalls mit Triton lysiert und ATP quantifiziert. Auch die spontane Freisetzung aus Tumorzellen wurden im Puffer ohne Thrombozyten vermessen. In blau ist die ATP-Freisetzung in TRP nach Zugabe von 1×10^4 Tumorzellen/mL dargestellt.

Wie zuvor festgelegt, wurde TRP (400×10^6 Thrombozyten/mL) mit 1×10^4 Tumorzellen/mL inkubiert und die ATP-Konzentration nach 30 Minuten (MDA-MB-231 Zellen) bzw. 40 Minuten (MCF-7 Zellen) detektiert. Über den gleichen Zeitraum wurde die Sekretion von ATP aus den Tumorzellen in Thrombozyten-freiem Puffer quantifiziert. Daneben wurde die spontane ATP-Freisetzung aus Thrombozyten über einen Zeitraum von 40 Minuten erfasst.

Weder Thrombozyten noch Tumorzellen setzten nennenswerte ATP Mengen frei (Abbildung 6.5). Um diese Beobachtung zu untermauern, wurden zudem 1×10^4 Tumorzellen mit 1 % Triton lysiert, um die Gesamtmenge ATP zu quantifizieren, die maximal aus den Tumorzellen hätte sezerniert werden können.

Nach der Coinkubation der Thrombozyten mit MDA-MB-231 Zellen ist die ATP-Konzentration im Vergleich zur spontanen Freisetzung um das Siebenfache erhöht. Die Coinkubation mit MCF-7 Zellen führte zu einer Vervierfachung der ATP-Konzentration. Um zu evaluieren, ob die thrombozytäre ATP-Freisetzung nach der Coinkubation mit MDA-MB-231 Zellen der maximal

möglichen ATP-Freisetzung entspricht, wurden zudem 400×10^6 Thrombozyten mit 1 % Triton lysiert. Hier betrug die detektierte Menge ein Neunfaches der spontanen ATP-Freisetzung. Es kann jedoch keine Aussage darüber getroffen werden, ob das gesamte erfasste ATP aus der dichten Granula stammte und nach einer Aktivierung theoretisch hätte sezerniert werden können oder ob ein Teil des ATP aus anderen Zellkompartimenten sowie dem Stoffwechsel der Thrombozyten stammte. Die Ergebnisse bestätigen jedoch die gewählte Tumorzellkonzentration, da keine nennenswerte Menge ATP aus den Tumorzellen sezerniert wurden. Zudem bleibt die nach der Aktivierung mit Tumorzellen detektierte Konzentration ATP unterhalb der Gesamtmenge des in Thrombozyten gespeicherten ATP.

6.2 Die Rolle der Gerinnung für die Thrombozytenaktivierung im etablierten *in vitro*-Testsystem

Wie in Abschnitt 6.1 geschildert, ist für die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung in einem pufferbasierten Testsystem die Addition von TAPI und Calcium-Ionen essentiell. Da in dem zugefügten Plasma neben anderen löslichen Faktoren auch Gerinnungsfaktoren enthalten sind, wurde im nächsten Schritt evaluiert, ob die geringe Menge zugegeben Plasmas ausreicht, um eine Gerinnung in dem verwendeten TRP zu ermöglichen.

6.2.1 Quantifizierung der Tumorzell-induzierten Thrombin-Generierung im entwickelten Testsystem

Um die generelle Möglichkeit einer Thrombin-Generierung nach Zugabe von 1 % Plasma in Puffer zu überprüfen, wurden Thrombin-Generierungs-Assays durchgeführt.

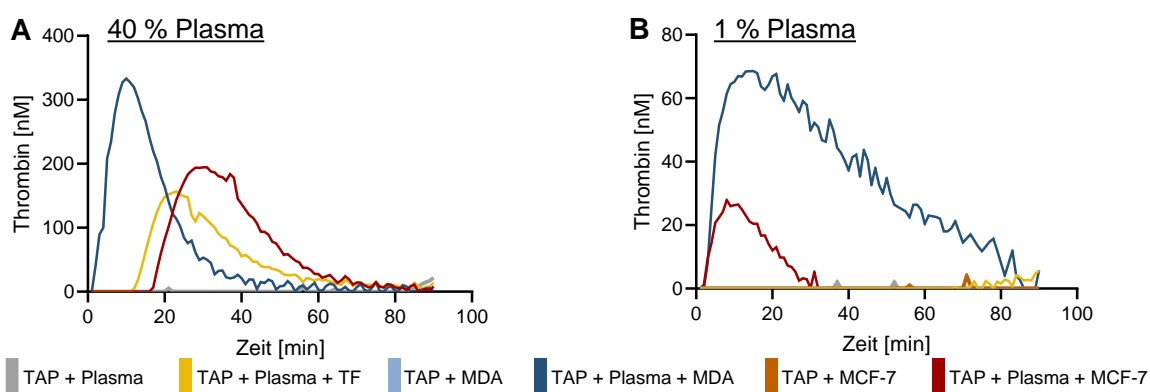


Abbildung 6.6 – **Thrombin-Generierung in Thrombozyten-armen Puffer (TAP) in Abhängigkeit von der Menge zugesetzten Plasmas.** **A** zeigt die Thrombin-Generierung in Proben, die 40 % Plasma enthalten, nach Zugabe von TF (5 pM), MDA-MB-231 sowie MCF-7 Zellen (1×10^4 /mL). In grau ist die spontan gebildete Menge Thrombin ohne den Zusatz eines Aktivators dargestellt. Zudem ist die Sekretion aktiven Thrombins aus Tumorzellen in TAP dargestellt. **B** zeigt die Thrombin-Generierung in Proben, die 1 % Plasma enthalten. Die Zugabe der Aktivatoren erfolgte analog zu A.

Zunächst wurde das generelle Thrombin-Generierungspotential der beiden Mammakarzinomzelllinien MDA-MB-231 und MCF-7 in Thrombozyten-armem Plasma getestet. Dazu wurde Thrombozyten-armes Plasma mit 5 pM TF (Positivkontrolle), oder 1×10^4 /mL MDA-MB-231

bzw. MCF-7 Zellen inkubiert und mit einem fluorogenen Thrombin-Substrat versetzt (Abschnitt 5.8). Die Thrombin-Generierung wurde nach der Recalcifizierung der Proben anhand der Abspaltung des fluorogenen Substrates über einen Zeitraum von 90 Minuten verfolgt.

Aufgrund der Zugabe der Tumorzellsuspension und des Substrats beträgt die Endkonzentration an Plasma während der Messung 40 % (V/V) (Abbildung 6.6 A). Die Zugabe von 1×10^4 MDA-MB-231 Zellen pro Milliliter führte sofort nach der Zugabe des Substrats zu einer ausgeprägten Thrombin-Generierung, die zur maximalen Thrombinkonzentration von $350 \mu\text{M}$ nach 10 Minuten führte. Die mittels MCF-7 Zellen induzierte Thrombin-Generierung wies eine längere *lagtime* und eine geringere Maximalkonzentration sowie AUC auf. Es konnte weder eine spontane Thrombin-Generierung durch die Zugabe von Calcium detektiert werden, noch sezernierten die beiden Mammakarzinomzelllinien ohne Plasmazugabe Thrombin.

Sowohl MDA-MB-231 als auch MCF-7 Zellen schienen demzufolge befähigt, eine Aktivierung des Gerinnungssystems zu induzieren. Da in dem zuvor entwickelten TRP-basierten Testsystem jedoch nicht 40 %, sondern lediglich 1 % Plasma enthalten war, wurde der Thrombin-Generierungs-Assay in Puffer nach Zugabe von 1 % Plasma wiederholt (Abbildung 6.6 B). Sowohl die Zugabe von MDA-MB-231 als auch von MCF-7 Zellen führte auch bei geringer Plasmakonzentration sofort nach Zugabe zu einem Anstieg der Thrombinkonzentration. Die erreichte Maximalkonzentration war jedoch im Vergleich zu Thrombin-Generierungsversuchen mit 40 % Plasma deutlich vermindert. Nach der Zugabe von 5 pM TF konnte keine Thrombin-Generierung zu verzeichnet werden.

Die Zugabe von 1 % TAPI zu TRP ist folglich ausreichend, um die Generierung aktiven Thrombins durch MDA-MB-231 bzw., in einem geringeren Ausmaß, durch MCF-7 Zellen zu ermöglichen.

6.2.2 Durchflusszytometrischer Nachweis der TF-Expression auf Mammakarzinomzellen

Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass eine Thrombin-Generierung im TRP durch die Zugabe von TAPI ermöglicht wurde und dass die beiden untersuchten Mammakarzinomzelllinien diese induzierten, wurde die molekulare Grundlage der Tumorzell-induzierten Thrombin-Generierung evaluiert.

Tumorzellen können die physiologische Blutgerinnungskaskade auf verschiedene Weise anstoßen (siehe Abschnitt 2.3.1). Eine zentrale Rolle in der Tumorzell-induzierten Aktivierung der Blutgerinnung nimmt TF ein. Es konnte in diversen malignen Geweben eine Expression von TF nachgewiesen werden. Tumore epithelialen Ursprungs exprimierten dabei häufig mehr TF als Tumore nicht-epithelialen Ursprungs (127).

Um die beiden untersuchten Mammakarzinomzelllinien MDA-MB-231 sowie MCF-7 hinsichtlich einer TF-Expression zu charakterisieren, wurden durchflusszytometrische Experimente, wie in Abschnitt 5.10.2 beschrieben, durchgeführt.

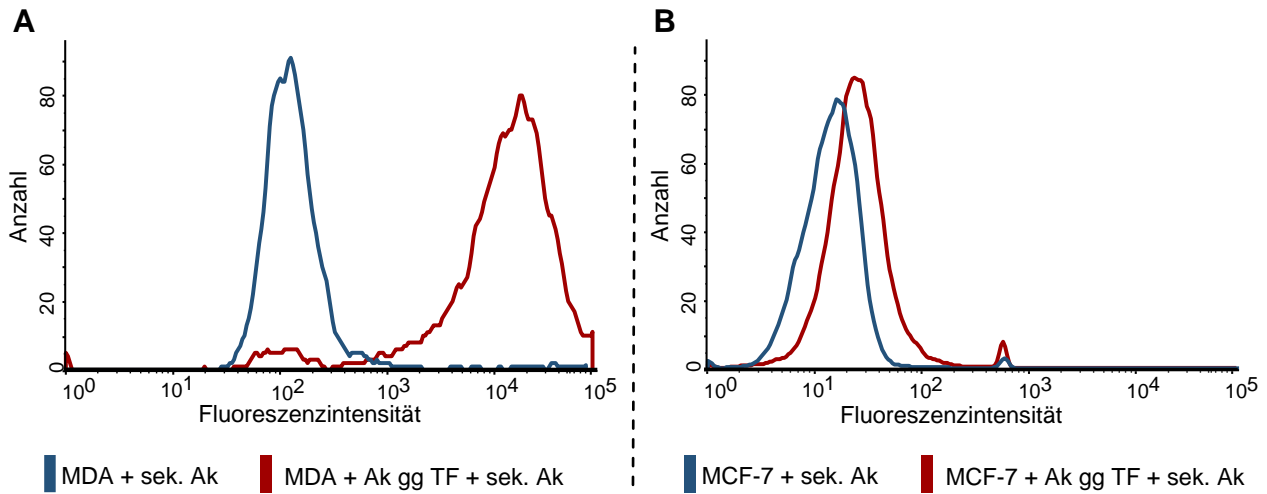


Abbildung 6.7 – **Durchflusszytometrischer Nachweis der TF-Expression auf MDA-MB-231 bzw. MCF-7 Zellen.** **A:** TF-Präsentation auf der Oberfläche von MDA-MB-231 Zellen. **B:** TF-Präsentation auf der Oberfläche von MCF-7 Zellen.

Durchflusszytometrische Experimente belegten eine TF-Expression sowohl auf MDA-MB-231 als auch auf MCF-7 Zellen (Abbildung 6.7). Jedoch exprimierten MDA-MB-231 Zellen wesentlich größere Mengen TF als MCF-7 Zellen. Diese Beobachtung untermauert die Ergebnisse der Versuche zur Thrombin-Generierung (Abschnitt 6.2.1), im Rahmen derer sich MDA-MB-231 Zellen hinsichtlich des Ausmaßes und der Geschwindigkeit der induzierten Thrombin-Generierung im Vergleich mit MCF-7 Zellen als potenter erwiesen.

6.2.3 Beitrag von Thrombin zur Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchungen legten nahe, dass der Tumorzell-induzierten Thrombin-Generierung eine durch die Expression von TF induzierte Aktivierung des extrinsischen Gerinnungssystems zugrunde lag. Um die Relevanz des Thrombins für die Aktivierung der Thrombozyten in TRP weiter zu beleuchten, wurde der Einfluss des Thrombin-Inhibitors Argatroban auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung untersucht. Bei Argatroban handelt es sich um einen Antithrombin-unabhängigen Thrombin-Inhibitor, der direkt im aktiven Zentrum des Thrombins bindet und so reversibel die proteolytische Wirkung des Thrombins hemmt (140).

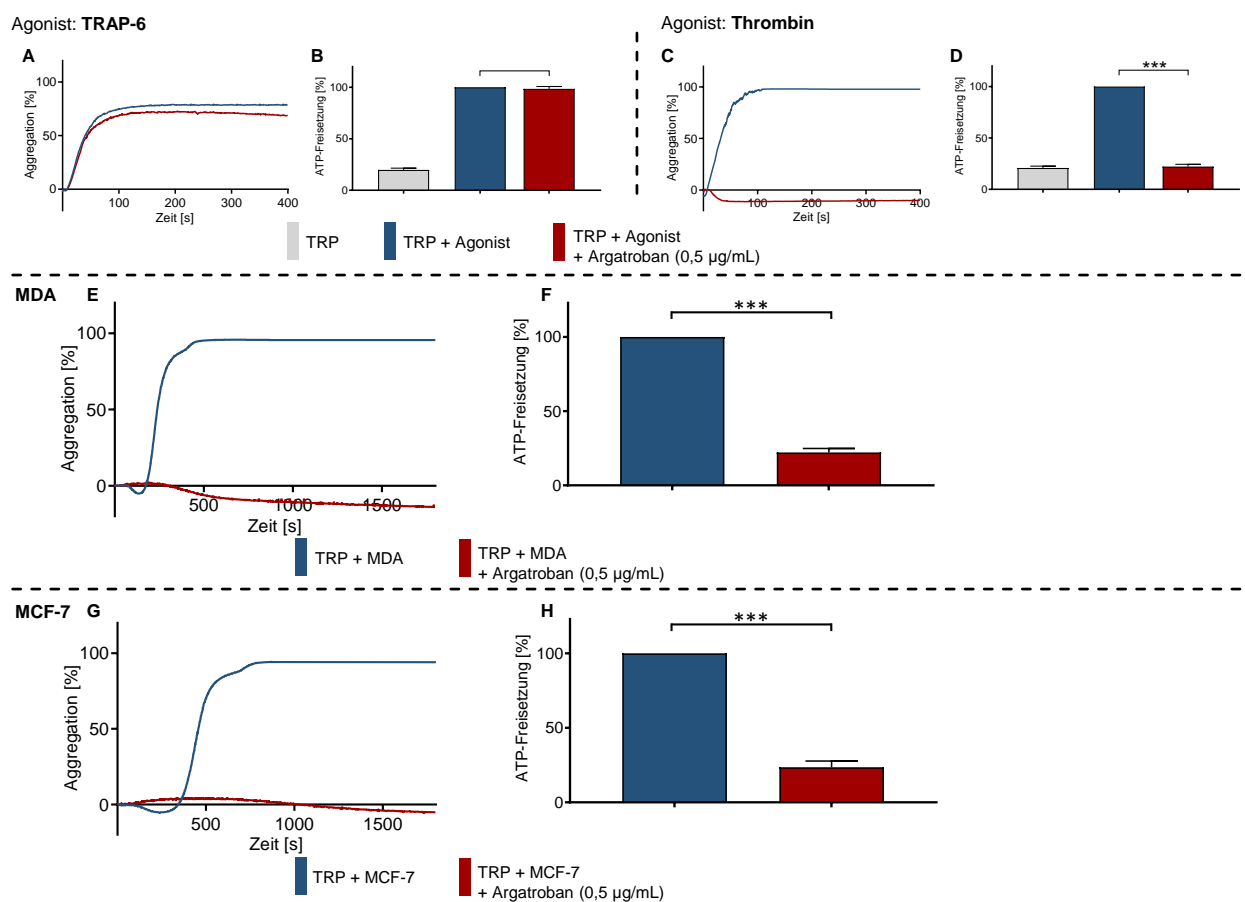


Abbildung 6.8 – Einfluss der Inhibition von Thrombin auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung in TRP. Präinkubation des TRP für 30 Minuten mit einem Thrombin-Inhibitor (Argatroban; 0,5 µg/mL) oder der entsprechenden Menge Lösungsmittel (DMSO). **A-D:** Kontrollversuche. **A** und **B:** Aggregation bzw. ATP-Freisetzung nach Präinkubation mit bzw. ohne Argatroban und Aktivierung der Thrombozyten mit TRAP-6 (41 µM). **C** und **D:** Aktivierung mit Thrombin (0,5 NIH/mL). **E** und **F:** TCIPA bzw. ATP-Freisetzung nach der Zugabe von MDA-MB-231 Zellen (1×10^4 /mL) zu TRP. **G** und **H:** TCIPA bzw. ATP-Freisetzung nach Zugabe von MCF-7 Zellen (1×10^4 /mL) zu TRP.

Eine Präinkubation des TRP mit Argatroban (0,5 µg/mL) führte im beobachteten Zeitraum von 30 Minuten zum vollständigen Ausbleiben einer Tumorzell-induzierten TCIPA (Abbildung 6.8 E und G). Auch die Tumorzell-induzierte ATP-Freisetzung aus der thrombozytären dichten Granula konnte

durch die Präinkubation mit Argatroban um 83 % (MDA-MB-231 Zellen) bzw. 79 % (MCF-7 Zellen) reduziert werden (Abbildung 6.8 F und H).

Um mögliche, unerwartete Effekte des Argatroban auszuschließen, wurde zudem der Einfluss einer Präinkubation mit Argatroban auf die Aktivierung der Thrombozyten mittels TRAP-6 bzw. Thrombin untersucht. Wie bei einem selektiven Thrombin-Inhibitor zu erwarten, zeigte die Präinkubation mit Argatroban keinen Einfluss auf die TRAP-6 induzierte Thrombozytenaktivierung. Eine Thrombin-induzierte Aggregation bzw. ATP-Freisetzung wurde durch die Inkubation des TRP mit Argatroban hingegen vollständig inhibiert (Abbildung 6.8 A-D).

Die vollständige Hemmung der Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung durch den Einsatz eines direkten Thrombin-Inhibitors unterstreicht die Relevanz einer Aktivierung der Thrombozyten in TRP durch das Blutgerinnungssystem. Ob die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung alleine über das Blutgerinnungssystem induziert wird, oder es sich dabei lediglich um eine initiale Aktivierung handelt, die von weiteren Aktivierungsmechanismen unterstützt wird, werden weitere in dieser Arbeit beschriebene Untersuchungen zeigen.

6.2.4 Beitrag verschiedener thrombozytärer Zielstrukturen des Thrombins zur Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung

Um die molekularen Mechanismen der initialen Aktivierung von Thrombozyten in TRP über eine Tumorzell-induzierte Thrombin-Generierung weiter aufzuklären, wurden verschiedene Inhibitoren bekannter Zielstrukturen des Thrombins auf Thrombozyten angewendet.

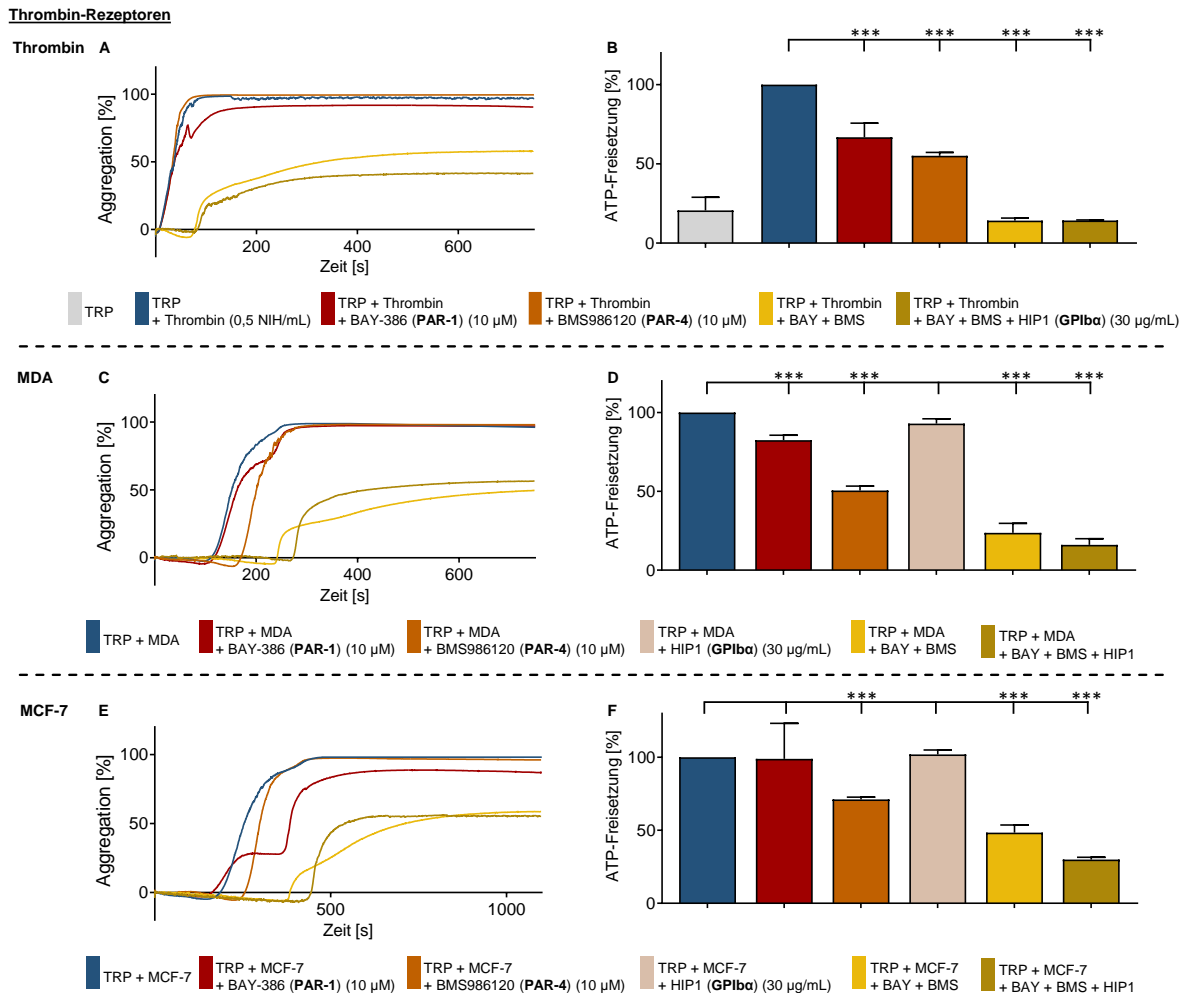


Abbildung 6.9 – **Einfluss der Inhibition verschiedener thrombozytärer Zielstrukturen des Thrombins auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung.** Präinkubation des TRP für 30 Minuten mit einem PAR-1 Inhibitor (BAY-386, 10 µM), PAR-4 Inhibitor (BMS986120, 10 µM), einem Antikörper gegen GPIIb (HIP1, 30 µg/mL), oder Kombinationen der Inhibitoren. Die jeweiligen Kontrollen ohne Inhibitor wurden mit dem entsprechenden Lösungsmittel (BAY, BMS: DMSO, HIP1: DPBS) präinkubiert. **A und B:** Aggregation bzw. ATP-Freisetzung nach Präinkubation mit Inhibitoren bzw. Lösungsmittel und Aktivierung der Thrombozyten mit Thrombin. **C und D:** TCIPA bzw. ATP-Freisetzung nach der Zugabe von MDA-MB-231 Zellen (1×10^4 /mL) zu TRP. **E und F:** TCIPA bzw. ATP-Freisetzung nach Zugabe von MCF-7 Zellen (1×10^4 /mL) zu TRP.

Es wurden drei thrombozytäre Zielstrukturen des Thrombins hinsichtlich ihrer Beteiligung an der Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung untersucht. Dies waren zum einen die beiden Protease-aktivierbaren Rezeptoren PAR-1 sowie PAR-4 und zum anderen GPIIb als Bestandteil des GPIIb-IX-V Komplexes. Für GPIIb konnte eine Beteiligung an der Thrombin-vermittelten Aktivierung von Thrombozyten unabhängig vom aktiven Zentrum des Thrombins gezeigt werden (146).

Zunächst wurde die Aktivierung der Thrombozyten mittels Thrombin untersucht. TRP wurde mit Inhibitoren gegen PAR-1 bzw. PAR-4 (BAY-386 (BAY) bzw. BMS986120 (BMS)) präinkubiert. Die Zugabe von 0,5 NIH/mL Thrombin zu TRP führte ohne Inhibitorzugabe nach kurzer Zeit zu einer Vollaggregation der Thrombozyten (Abbildung 6.9 A), sowie zu einer ausgeprägten ATP-Freisetzung (Abbildung 6.9 B). Die Inkubation des TRP mit Inhibitoren gegen PAR-1 oder PAR-4 zeigte keinen Effekt auf die Thrombozytenaggregation, reduzierte die Thrombin-induzierte ATP-Freisetzung jedoch um 35 %, bzw. 45 %. Eine Maximierung des inhibitorischen Effekts wurde durch die Kombination der beiden Inhibitoren erreicht. Das Aggregogramm zeigt eine deutliche Verlängerung der *lagtime* sowie eine Reduktion der maximalen Aggregation um knapp 50 %. Die ATP-Freisetzung wurde auf das Niveau der spontanen ATP-Freisetzung aus Thrombozyten reduziert. Der zusätzliche Einsatz eines Antikörpers gegen GPIIb α (Klon HIP1) führte wiederum zu einer weiteren Reduktion der maximalen Aggregation, zeigte aber keinen additiven Effekt auf die ATP-Freisetzung (Abbildung 6.9 A und B).

Anschließend wurde der Effekt einer Inhibition von PAR-1, PAR-4 und GPIIb α auf die MDA-MB-231 Zell-induzierte Thrombozytenaggregation sowie ATP-Freisetzung untersucht (Abbildung 6.9 C und D). Die Ergebnisse sind ähnlich denen der Thrombin-induzierten Thrombozytenaktivierung. Die Inhibition von PAR-1 zeigte keinen Effekt auf die TCIPA, reduzierte die ATP-Freisetzung jedoch leicht. Eine leichte Verlängerung der *lagtime* sowie eine Reduktion der ATP-Freisetzung um 50 % wurde durch die Inhibition von PAR-4 erzielt. Die alleinige Coinkubation des TRP mit einem Antikörper gegen GPIIb α hatte keinen signifikanten Effekt auf die Tumorzell-induzierte ATP-Freisetzung. Die Inkubation des TRP mit einer Kombination aus einem PAR-1 sowie PAR-4 Inhibitor zeigte einen starken additiven Effekt auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung. Dieser wurde durch den zusätzlichen Einsatz von HIP1 nicht signifikant verstärkt (Abbildung 6.9 C und D).

Auch die MCF-7 Zell-induzierte Thrombozytenaktivierung wurde durch die Inhibition von PAR-4 leicht beeinflusst. Die Inhibition von PAR-1 führte zu einem Plateau zwischen primärer und sekundärer Aggregation der Thrombozyten, hatte jedoch keinen signifikanten Effekt auf die ATP-Freisetzung. Der additive Effekt der beiden PAR-Inhibitoren ähnelte jenem in den Versuchen mit MDA-MB-231 Zellen. Zusätzlich war eine weitere Reduktion der ATP-Freisetzung durch die Addition von HIP1 zu beobachten (Abbildung 6.9 E und F).

Die im Zuge der Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung beobachtete Rolle des Thrombins scheint sich nicht auf die Aktivierung eines speziellen Targets auf Thrombozyten zu beschränken. Im Rahmen der isolierten Inhibition der verschiedenen Rezeptoren zeigte sich ausschließlich durch die Inhibition von PAR-4 ein ausgeprägter Effekt auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung. Eine vollständige Hemmung der Thrombozytenaktivierung wurde durch die Inhibition einzelner Zielstrukturen des Thrombins nicht erreicht. Der in Abschnitt 2.3.1.1 beschriebenen Theorie folgend, dass die Aktivierung von PAR-4 im Gegensatz zu einer PAR-1

Aktivierung eine hohe Konzentration Thrombin am Rezeptor voraussetzt, sprechen diese Beobachtungen erneut für eine ausgeprägte, durch die beiden Mammakarzinomzelllinien angestoßene, Thrombin-Generierung (142–145).

Wurden zeitgleich beide auf humanen Thrombozyten ständige PAR inhibiert, zeigte sich eine deutliche Reduktion der Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung. Im Falle von MCF-7 Zellen konnte dieser Effekt durch die parallele Inhibition der beiden PAR und GPIIb/IIIa noch einmal verstärkt werden. Diese Beobachtungen decken sich mit Untersuchungen von Estevez und Kollegen, die zeigen konnten, dass die drei beschriebenen Thrombin-Rezeptoren synergistische Effekte aufweisen, die für eine vollständige Aktivierung der Thrombozyten unabdingbar sind (371).

6.2.5 Einfluss der Inhibition verschiedener thrombozytärer Zielstrukturen des Thrombins auf die Freisetzung von Proteinen aus der α -Granula

Neben dem Einfluss einzelner Zielstrukturen des Thrombins auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung wurde die Beeinflussung der Sekretion der α -Granula durch Thrombin untersucht. Es konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass nach einer Thrombozytenaktivierung hunderte bioaktive Proteine aus der α -Granula freigesetzt werden (372). Obwohl die molekularen Mechanismen der Granulasekretion seit einigen Jahren im Fokus der Forschung stehen, kann die Frage nach der Regulation der Freisetzung einzelner Proteine bis heute nicht abschließend beantwortet werden. Es wird diskutiert, dass Untergruppen von Proteinen in verschiedenen α -Granula gespeichert sind, deren Freisetzungen unterschiedlich reguliert werden (99,107,108). Einer anderen Hypothese folgend könnten die verschiedenen Proteine aber auch in unterschiedlichen Bereichen der gleichen Granula gespeichert sein, welche in Folge einzelner Stimuli differenziert sezerniert werden (109,110).

Im Folgenden wird auf den Einfluss der Inhibition verschiedener Zielstrukturen des Thrombins auf die Sekretion unterschiedlicher Proteine näher eingegangen. Da Thrombozyten über die Sekretion der α -Granula ein unter anderem proinflammatorisches und proangiogenetisches Mikromilieu fördern können, könnte die differenzierte Beeinflussung der Granulafreisetzung einen interessanten Ansatzpunkt für eine antitumorale Therapie darstellen.

Die sich infolge einer Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung im Thrombozytenüberstand befindlichen Proteine wurden, wie in Abschnitt 5.6 beschrieben, mithilfe des OLINK Bioscience Inflammation Panels quantifiziert und in einer relativen Einheit aufgetragen, die keine Rückschlüsse auf die absolute Proteinmenge zulässt.

Die Sekretion der thrombozytären α -Granula wurde exemplarisch für zehn Proteine evaluiert. Diese können in Wachstumsfaktoren (Abbildung 6.10 A), Chemokine (Abbildung 6.10 B) und zwei weitere Proteine (Abbildung 6.10 C) unterteilt werden. Zu den dargestellten Wachstumsfaktoren zählen VEGF-A als ein proangiogenetischer Wachstumsfaktor und HGF, der mit einem aggressiven

Tumorwachstum, der Infiltration von Geweben sowie der Metastasierung von Tumorzellen assoziiert wird. Als dritter Wachstumsfaktor ist TGF β dargestellt, der beispielsweise in der EMT eine entscheidende Rolle einnimmt (373).

Die Quantifizierung der Chemokine umfasste GRO α (CXCL1), das über die Bindung an beispielsweise CXCR2 den Arrest von Monozyten in der metastatischen Nische fördert (374), sowie ENA-78 (CXCL5), das zur Neutrophilenrekrutierung beiträgt (375). MIP-1 α (CCL3) wird aufgrund seiner protumoralen Eigenschaften als prognostischer Biomarker genutzt. Es trägt zu Rekrutierung von Monozyten sowie Makrophagen bei und fördert die Extravasation von Tumorzellen (376). IL8 (CXCL8) moduliert neben der Proliferation auch die Migration sowie Invasion der Tumorzellen und ist an Prozessen der Neovaskularisation beteiligt (377). MCP-1 (CCL2) induziert eine starke Chemotaxis von Monozyten hin zu entzündlichen Prozessen und in das Tumorgewebe (378).

Neben den genannten Wachstumsfaktoren und Chemokinen wurden die Proteine uPA und MMP-1 quantifiziert. Die Protease uPA ist an der Degeneration der EZM beteiligt und in Prozesse der Tumorzell-Invasion und -Migration integriert. Erhöhte Konzentrationen von uPA und PAI-1 im Tumorgewebe werden bei Brustkrebspatientinnen mit einer schlechten Prognose assoziiert (379). Die Rolle von MMP-1 als Vertreter der Matrix-Metalloproteasen wurde in Abschnitt 2.1 erläutert.

Grundsätzlich wurde die Freisetzung der α -Granula nach Induktion der Thrombozytenaktivierung mit 41 μ M TRAP-6 oder 1×10^4 MDA-MB-231 bzw. MCF-7 Zellen pro Milliliter analysiert. Vor der Aktivierung wurden die Thrombozyten für 30 Minuten mit verschiedenen Inhibitoren präinkubiert (siehe Abschnitt 5.6.1). Zudem wurde die spontane Freisetzung des jeweiligen Proteins aus den Thrombozyten oder aus Tumorzellen in Thrombozyten-freien-Puffer quantifiziert. Aufgrund der Fülle der Daten wird im Folgenden nur auf ausgewählte, in Abbildung 6.10 gelb markierte, Beobachtungen eingegangen.

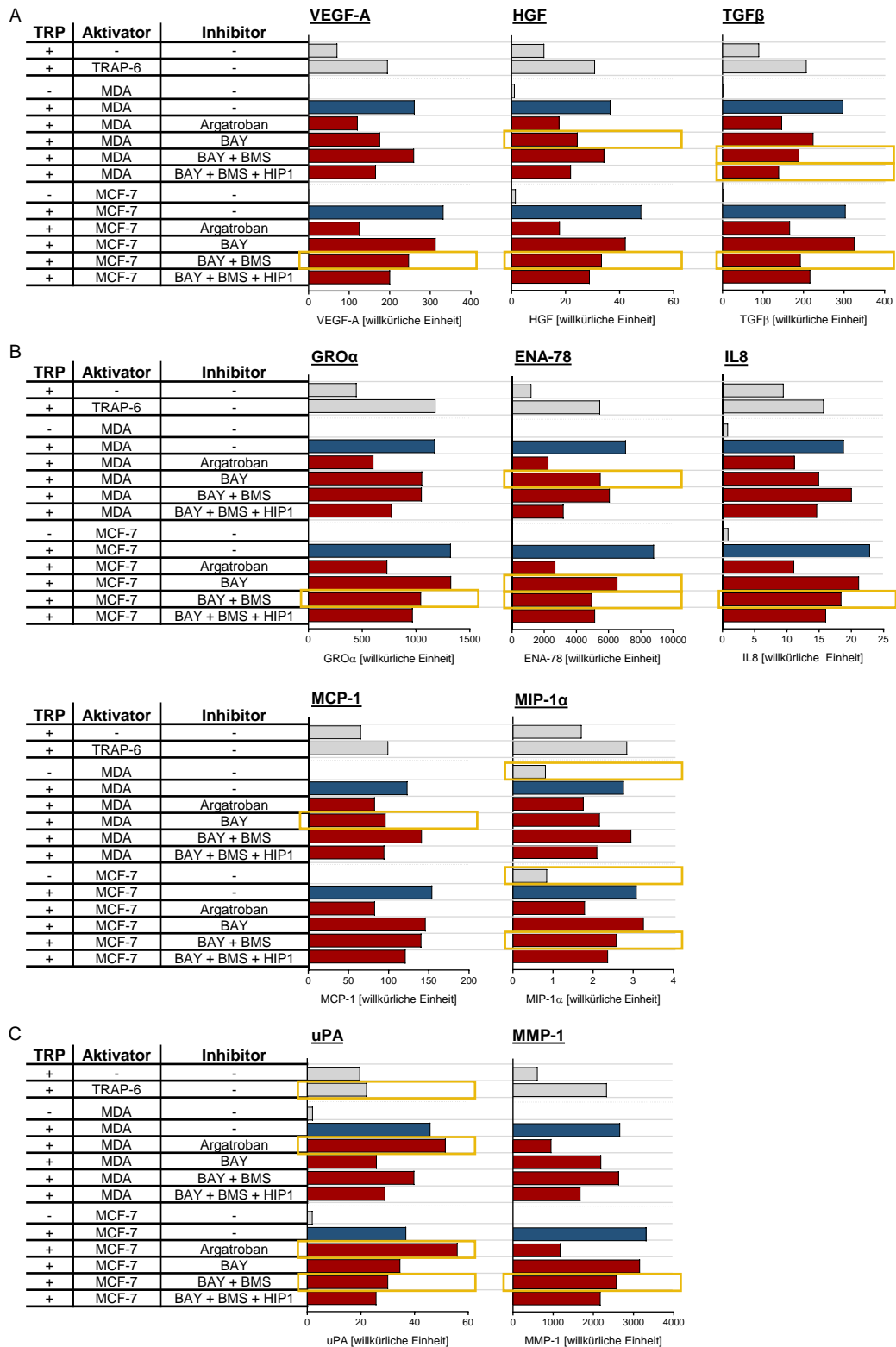


Abbildung 6.10 – Quantifizierung der Freisetzung verschiedener Proteine aus der thrombozytären α-Granula und der Einfluss der Inhibition verschiedener Zielstrukturen des Thrombins auf diese. Präinkubation des TRP für 30 Minuten mit einem PAR-1 Inhibitor (BAY-386, 10 µM), PAR-4 Inhibitor (BMS986120, 10 µM), einem Antikörper gegen GPIIb/IIIa (HIP1, 30 µg/mL), oder Kombinationen der Inhibitoren. Aktivierung der Thrombozyten wurde durch Zugabe von TRAP-6 (41 µM), MDA-MB-231 oder MCF-7 Zellen (1×10⁴/mL) induziert. Die Konzentration der Proteine im Überstand der Thrombozyten ist jeweils in einer relativen Einheit dargestellt. **A:** Quantifizierung der Wachstumsfaktoren VEGF-A, HGF, TGFβ. **B:** Quantifizierung der Chemokine GROα, ENA-78, IL8, MCP-1 und MIP-1α. **C:** Quantifizierung weiterer Proteine (uPA, MMP-1).

Die Detektion der Proteinfreisetzung aus den Tumorzellen selber zeigte, dass bis auf MIP-1 α kein Protein in nennenswerter Konzentration aus den Tumorzellen sezerniert wird.

Die Coinkubation der Thrombozyten sowohl mit TRAP-6 als auch mit den beiden Mammakarzinomzelllinien führte bei den meisten Proteinen zu einer verstärkten Sekretion aus der α -Granula. Das Ausmaß der Sekretion variierte dabei deutlich und reichte von einer geringen Freisetzung (z.B. MCP-1 und MIP-1 α) bis hin zu einer Versiebenfachung des Thrombozytennullwertes (ENA-78) nach Tumorzellzugabe. Dies könnte ein erster Hinweis auf die unterschiedliche Regulation der Granulasekretion infolge der Aktivierung der Thrombozyten mit unterschiedlichen Tumorzelllinien sein. Grundsätzlich führte die Inkubation der Thrombozyten mit MCF-7 Zellen entgegen der Erwartungen zu einer stärkeren Granulasekretion als die Inkubation mit MDA-MB-231 Zellen. Dies könnte aus der Abhängigkeit der Thrombozytenaktivierung von der Tumorzellkonzentration resultieren. Da die Granulafreisetzung nur in einem Versuch evaluiert wurde, könnte eine Varianz in der Tumorzellkonzentration dazu geführt haben, dass die mittels der beiden Tumorzelllinien induzierte Freisetzung der thrombozytären Granula nicht miteinander vergleichbar waren.

Die Präinkubation der Thrombozyten mit Argatroban führte bei vielen Proteinen zu einer Verminderung der Tumorzell-induzierten Freisetzung auf das Niveau des Thrombozytennullwertes. Wie in Abbildung 6.10 zu erkennen, trifft diese Beobachtung besonders im Kontext der MCF-7 induzierten Granulafreisetzung nicht auf alle Proteine zu. In Bezug auf GRO α , ENA-78, uPA und MMP-1 schien eine Freisetzung durch die Inhibition von Thrombin nicht vollständig inhibierbar. In Bezug auf uPA wird diese Beobachtung durch den Umstand untermauert, dass eine Aktivierung von PAR-1 mittels TRAP-6 keine Erhöhung der uPA-Konzentration zur Folge hat. Dies spricht für eine Thrombin-unabhängige Induktion der uPA-Sekretion nach einer Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung.

Hinsichtlich der differenzierten Inhibition verschiedener Zielstrukturen des Thrombins lässt sich zusammenfassen, dass die Inhibition von PAR-1 alleine in den seltensten Fällen einen deutlichen Effekt auf die Granulasekretion ausübte. Ausnahmen davon stellten beispielsweise MCP-1, ENA-78 oder HGF dar. Die kombinierte Inhibition von PAR-1 und PAR-4 zeigte bei vielen quantifizierten Proteinen einen deutlichen Effekt auf die Sekretion. Darunter fiel, nach Induktion der Thrombozytenaktivierung mit MDA-MB-231 oder MCF-7 Zellen, beispielsweise TGF β . In Bezug auf diverse andere Proteine kann die MDA-MB-231 Zell-induzierte Freisetzung durch die zusätzliche Inhibition von PAR-4 nicht weiter gemindert werden. Auf die MCF-7 Zell-induzierte Freisetzung zeigte die Kombination der Inhibitoren im Gegensatz dazu einen additiven Effekt auf die Freisetzung dieser Proteine. Zu diesen Proteinen zählten VEGF-A, HGF, GRO α , ENA-78, IL8, MIP-1 α , uPA und MMP-1.

Die dreifache Inhibition der von Thrombin adressierten Rezeptoren PAR-1, PAR-4 und GPIIb_a induzierte eine weitere Minderung der Granulasekretion. Dieses Phänomen konnte, in unterschiedlichen Ausprägungen, bei allen untersuchten Proteinen beobachtet werden.

Hinsichtlich der Rolle des Thrombins auf die Tumorzell-induzierte Freisetzung der α -Granula kann zusammengefasst werden, dass die Regulation der Freisetzung verschiedener Proteine von verschiedenen Thrombinrezeptoren abzuhängen schien. Die reversible Inhibition des aktiven Zentrums von Thrombin mittels Argatroban führte in Bezug auf die meisten der untersuchten Proteine zu einer deutlich verminderten Freisetzung.

Adam et al. konnten zeigen, dass die GPIIb-vermittelte Thrombozytenaktivierung unabhängig vom aktiven Zentrum des Thrombins zu sein scheint und somit von der Coinkubation der Thrombozyten mit Argatroban nicht beeinflusst werden sollte (146). Der ausgeprägte Effekt der Thrombozyteninkubation mit Argatroban spricht daher für eine untergeordnete Rolle des GPIIb in der Tumorzell-induzierten Granulasekretion. Estevez und Kollegen zeigten zudem eine ausgeprägte gegenseitige Beeinflussung und Abhängigkeit der PAR- sowie GPIIb-IX-induzierten Signalwege (371).

Der Protein-übergreifende, additive Effekt des Antikörpers HIP1 in Kombination mit der Inhibition von PAR-1 und PAR-4 zeigte, dass GPIIb, zumindest in Kombination mit weiteren Aktivierungsmechanismen des Thrombins, einen Beitrag zur Granulasekretion leistet. Die Diversität der Proteinsekretion bezogen auf die Tumorzell-induzierte Freisetzung sowie die Möglichkeiten der Einflussnahme über den Einsatz verschiedener Inhibitoren unterstreicht zum einen die allgemeine Relevanz der Tumorzell-induzierten Thrombin-Generierung für die Granulasekretion. Zum anderen zeigt sie aber auch, dass die mechanistischen Hintergründe der Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung äußerst komplex sind und dass Thrombozyten, je nach Art der Aktivierung (z.B. durch die Zugabe von Tumorzellen) oder nach Einsatz verschiedener Inhibitoren, verschiedene Freisetzungsprofile aufweisen und so unterschiedlichen Einfluss auf ihr zelluläres Mikromilieu nehmen können.

6.2.6 Einfluss der Inhibition verschiedener thrombozytärer Zielstrukturen des Thrombins auf die Freisetzung von pro- und antiangiogenetischen Wachstumsfaktoren

Die Quantifizierung der Sekretion verschiedener Proteine aus der thrombozytären α -Granula infolge der Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung unterstreicht die Diversität der Granulafreisetzung hinsichtlich verschiedener Proteine und die Möglichkeit der differenzierten Einflussnahme über den Einsatz verschiedener Inhibitoren. Um diese Beobachtung im Hinblick auf ihre Bedeutung für die hämatogene Metastasierung zu vertiefen, wurde die Freisetzung verschiedener Wachstumsfaktoren näher untersucht, deren Bedeutung für die Tumor-assoziierte

Angiogenese bekannt ist. Es wurde die Sekretion der proangiogenetischen Wachstumsfaktoren VEGF-A und EGF sowie die Sekretion des antiangiogenetisch wirksamen TIMP-1 mittels ELISA quantifiziert. Eine Zusammenfassung und statistische Auswertung der in Abbildung 6.11 bis Abbildung 6.13 dargestellten Ergebnisse erfolgt in Abbildung 6.14.

Zunächst wurde die Freisetzung von VEGF-A (im Folgenden VEGF genannt) aus der thrombozytären α -Granula infolge einer Thrombozytenaktivierung mit MDA-MB-231 bzw. MCF-7 Zellen (1×10^4 /mL) oder Thrombin (0,5 NIH/mL) evaluiert (Abbildung 6.11).

VEGF-A

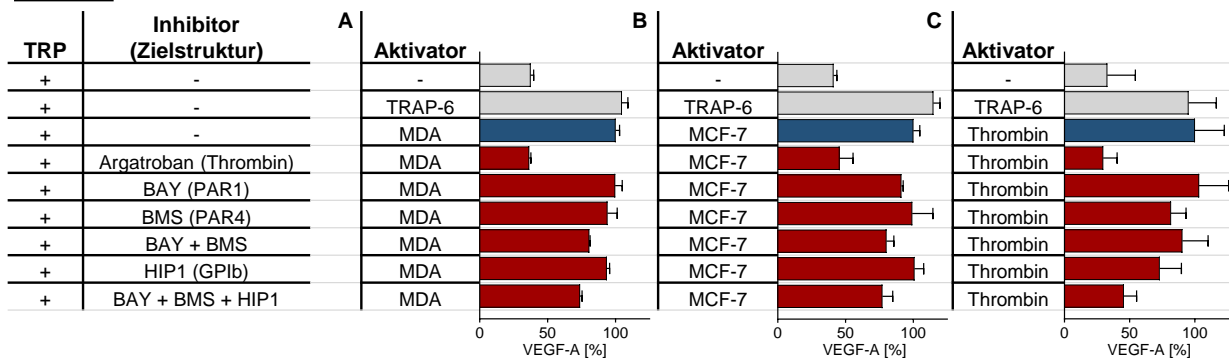


Abbildung 6.11 - **Quantifizierung der Freisetzung von VEGF-A aus der thrombozytären α -Granula mittels ELISA und der Einfluss der Inhibition verschiedener Zielstrukturen des Thrombins auf die VEGF-Freisetzung.** Präinkubation des TRP für 30 Minuten mit einem Thrombin-Inhibitor (Argatroban 0,5 μ g/mL), PAR-1 Inhibitor (BAY-386, 10 μ M), PAR-4 Inhibitor (BMS986120, 10 μ M), einem Antikörper gegen GPIba (HIP1, 30 μ g/mL), oder Kombinationen der Inhibitoren. Aktivierung der Thrombozyten wurde durch Zugabe von TRAP-6 (41 μ M) sowie **A:** MDA-MB-231 Zellen (1×10^4 /mL); **B:** MCF-7 Zellen (1×10^4 /mL); **C:** Thrombin (0,5 NIH/mL) induziert. Die Konzentration von VEGF ist auf die jeweilige Aktivierung normalisiert.

Sowohl die Aktivierung der Thrombozyten durch Coinkubation mit Tumorzellen, als auch die durch Thrombin führte zu einer ausgeprägten VEGF-Freisetzung, die durch die Inkubation der Thrombozyten mit Argatroban vollständig unterbunden werden konnte. Weder die alleinige Blockade von PAR-1 noch von PAR-4 reduzierten die VEGF-Freisetzung signifikant. Die kombinierte Inhibition der beiden Thrombin-Rezeptoren zeigte einen ausgeprägten Effekt auf die Tumorzell-induzierte Freisetzung, der durch die zusätzliche Blockade des GPIba weiter verstärkt werden (Abbildung 6.11 A und B) konnte.

Die Blockade der beiden Protease-aktivierbaren Rezeptoren hatte keinen signifikanten Effekt auf die Thrombin-induzierte VEGF-Freisetzung. Hier konnte lediglich die Inhibition von GPIba bzw. die kombinierte Blockade aller drei Thrombin-relevanten Rezeptoren eine signifikante Hemmung der VEGF-Freisetzung herbeiführen (Abbildung 6.11 C).

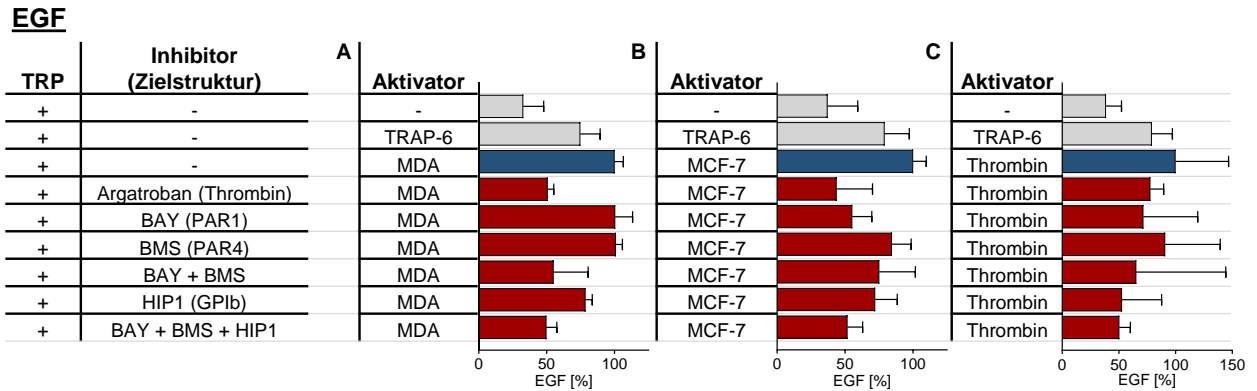


Abbildung 6.12 - **Quantifizierung der Freisetzung von EGF aus der thrombozytären α -Granula mittels ELISA und der Einfluss der Inhibition verschiedener Zielstrukturen des Thrombins auf die EGF-Freisetzung.** Präinkubation des TRP für 30 Minuten mit einem Thrombin-Inhibitor (Argatroban, 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), PAR-1 Inhibitor (BAY-386, 10 μM), PAR-4 Inhibitor (BMS986120, 10 μM), einem Antikörper gegen GPIIb (HIP1, 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) oder Kombinationen der Inhibitoren. Aktivierung der Thrombozyten wurde durch Zugabe von TRAP-6 (41 μM) sowie **A**: MDA-MB-231 Zellen ($1 \times 10^4/\text{mL}$); **B**: MCF-7 Zellen ($1 \times 10^4/\text{mL}$); **C**: Thrombin (0,5 NIH/mL) induziert. Die Konzentration von EGF ist auf die jeweilige Aktivierung normalisiert.

Der proangiogenetische Wachstumsfaktor EGF wurde nach der Inkubation der Thrombozyten mit Tumorzellen verstärkt freigesetzt (Abbildung 6.12 A und B). Argatroban führte wiederum zum beinahe vollständigen Ausbleiben der Sekretion. Die Blockade von PAR-1 reduzierte die MCF-7 Zell-induzierte EGF-Sekretion um 45 %, während die MDA-MB-231 Zell-induzierte Sekretion unbeeinflusst blieb. Durch die kombinierte Inhibition von PAR-1, PAR-4 sowie GPIIb wurde die MCF-7 Zell-induzierte Freisetzung von EGF noch einmal leicht reduziert. Die kombinierte Inhibition der drei Zielstrukturen verminderte auch eine MDA-MB-231 Zell-induzierte Freisetzung um 50 %. Hinsichtlich der Thrombin-vermittelten EGF-Sekretion konnte aufgrund der großen Standardabweichung der Messungen keine abschließende Bewertung getroffen werden (Abbildung 6.12 C). Aber auch hier schien eine Kombination der Inhibition von PAR-1, PAR-4 sowie GPIIb die Freisetzung von EGF stark zu beeinträchtigen.

Der antiangiogenetische Einfluss von TIMP-1 beruht besonders auf der Inhibition von Matrix-Metalloproteasen sowie der Migration von Endothelzellen, einem essentiellen Schritt der Angiogenese (380). Neben der Hemmung von MMP scheint TIMP-1 die Migration auch unabhängig von MMP zu reduzieren (381). Zwar konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Überexpression von TIMP-1 mit einer Minderung von Tumorzellimplantation, Tumorwachstum, Metastasenbildung und Angiogenese assoziiert werden kann (382). Jedoch scheinen erhöhte Gewebskonzentrationen an TIMP-1 bei Patienten verschiedener Tumorentitäten mit einer schlechteren Gesamtprognose einherzugehen (383). Dabei scheint nicht nur der Einfluss auf die Angiogenese eine Rolle zu spielen, sondern auch die Beteiligung von TIMP-1 an der Rekrutierung Tumor-assoziiertes Fibroblasten (384).

TIMP-1

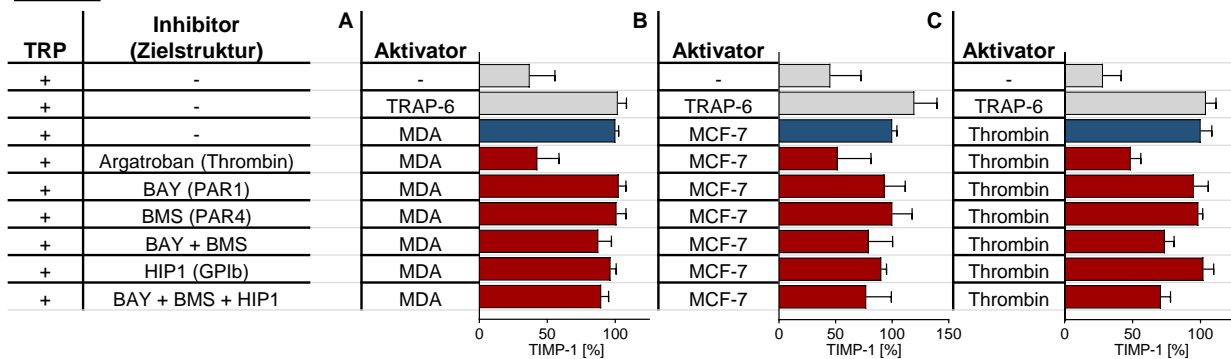


Abbildung 6.13 – Quantifizierung der Freisetzung von TIMP-1 aus der thrombozytären α -Granula mittels ELISA und der Einfluss der Inhibition verschiedener Zielstrukturen des Thrombins auf die TIMP-1 Freisetzung. Präinkubation des TRP für 30 Minuten mit einem Thrombin-Inhibitor (Argatroban, 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), PAR-1 Inhibitor (BAY-386, 10 μM), PAR-4 Inhibitor (BMS986120, 10 μM), einem Antikörper gegen GPIb α (HIP1, 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) oder Kombinationen der Inhibitoren. Aktivierung der Thrombozyten wurde durch Zugabe von TRAP-6 (41 μM) sowie **A**: MDA-MB-231 Zellen ($1 \times 10^4/\text{mL}$); **B**: MCF-7 Zellen ($1 \times 10^4/\text{mL}$); **C**: Thrombin (0,5 NIH/mL) induziert. Die Konzentration von TIMP-1 ist auf die jeweilige Aktivierung normalisiert.

Sowohl Thrombin als auch Tumorzellen induzierten eine TIMP-1 Sekretion, die durch Argatroban reduziert werden konnte (Abbildung 6.13). Die Thrombin-induzierte TIMP-1-Freisetzung konnte durch den Einsatz einer Kombination aus PAR-1 sowie PAR-4 Inhibitoren signifikant reduziert werden. Diese Kombination hatte auf die Tumorzell-induzierte Freisetzung keinen bzw. kaum einen Effekt.

Die unterschiedlichen Effekte der verwendeten Inhibitoren auf die Tumorzell- bzw. Thrombin-induzierte Freisetzung der drei Proteine aus der thrombozytären Granula wird in Abbildung 6.14 deutlich.

MDA							
	Ø Erhöhung im Vgl. zu TRP [%]	Arga	BAY	BMS	BAY / BMS	HIP1	BAY / BMS / HIP1
VEGF	267	***	-	-	***	*	***
EGF	306	***	-	-	*	*	**
TIMP-1	259	-	-	-	-	-	-

MCF-7							
	Ø Erhöhung im Vgl. zu TRP [%]	Arga	BAY	BMS	BAY / BMS	HIP1	BAY / BMS / HIP1
VEGF	243	**	-	-	**	-	*
EGF	269	**	**	-	-	-	***
TIMP-1	221	*	-	-	-	-	-

Thrombin							
	Ø Erhöhung im Vgl. zu TRP [%]	Arga	BAY	BMS	BAY / BMS	HIP1	BAY / BMS / HIP1
VEGF	305	***	-	-	-	*	***
EGF	259	-	-	-	-	-	-
TIMP-1	356	***	-	-	***	-	***

Abbildung 6.14 - **Zusammenfassung der mittels ELISA quantifizierten Freisetzung von EGF, VEGF-A sowie TIMP-1.** Die Zusammenfassung bezieht sich auf die in Abbildung 6.11 - Abbildung 6.13 dargestellten Ergebnisse. Dargestellt sind die Erhöhung des Proteingehaltes infolge der Tumorzell- bzw. Thrombin-induzierten Thrombozytenaktivierung sowie die Ergebnisse des zweiseitigen t-Tests hinsichtlich der Einflüsse der oben genannten Inhibitoren.

Die Aktivierung der Thrombozyten durch Zugabe von MDA-MB-231 Zellen führte zu einer intensiven Freisetzung der α -Granula. Besonders die EGF-Konzentration war nach Zugabe der MDA-MB-231 Zellen um das Dreifache im Vergleich zur spontanen Freisetzung aus den Thrombozyten erhöht. Die Präinkubation der Thrombozyten mit Argatroban inhibierte die Freisetzung der beiden proangiogenetischen Wachstumsfaktoren VEGF sowie EGF höchst signifikant. Im Gegensatz dazu zeigte Argatroban keinen Einfluss auf die Freisetzung von TIMP-1 aus der α -Granula. Die Inhibition von PAR-1 bzw. PAR-4 hatte keinen Einfluss auf die Freisetzung der untersuchten Proteine. Wurden die beiden PAR-1 und PAR-4 Inhibitoren kombiniert, kam es zu einer verminderten Freisetzung der untersuchten proangiogenetischen Wachstumsfaktoren. Die Freisetzung von TIMP-1 war, ähnlich den Beobachtungen nach Präinkubation mit Argatroban, nicht signifikant beeinflusst. Wurde neben den beiden Protease-aktivierbaren Rezeptoren auch GPIIb/IIIa mittels eines Antikörpers blockiert, war der inhibitorische Effekt der PAR-1 und PAR-4 Inhibitoren noch einmal verstärkt. Auch die alleinige Blockade von GPIIb/IIIa zeigte einen signifikanten Effekt auf die Freisetzung der beiden proangiogenetischen Wachstumsfaktoren nach einer MDA-MB-231 Zell-induzierten Thrombozytenaktivierung. Die Freisetzung von TIMP-1 konnte auch durch den kombinierten Einsatz verschiedener Inhibitoren nicht signifikant beeinflusst werden.

Die Aktivierung der Thrombozyten mittels MCF-7 Zellen führte ebenfalls zu einer starken Sekretion der thrombozytären α -Granula, auch wenn die Freisetzung im direkten Vergleich zum Effekt der MDA-MB-231 Zellen leicht vermindert war. Hinsichtlich des Einflusses einer Inhibition verschiedener Thrombinrezeptoren lässt sich zusammenfassen, dass die reversible Blockade des aktiven Zentrums von Thrombin mittels Argatroban eine verminderte Freisetzung aller drei untersuchten Proteine zur Folge hatte. Dabei zeigte sich, wie schon bei der MDA-MB-231 Zell-induzierten Freisetzung, ein größerer Einfluss des Argatrobans auf die Freisetzung der proangiogenetischen Wachstumsfaktoren als auf TIMP-1. Den stärksten inhibitorischen Effekt auf die Sekretion von VEGF sowie EGF wurde erneut durch die Kombination verschiedener Inhibitoren erzielt. Die Freisetzung von TIMP-1 konnte auch hier durch keine Kombination verschiedener Inhibitoren signifikant beeinflusst werden. Die generelle Thrombin-Abhängigkeit der Sekretion von TIMP-1 aus der thrombozytären α -Granula zeigte sich jedoch nach Aktivierung der Thrombozyten mit Thrombin. Die Konzentration von TIMP-1 im TRP war nach der Zugabe von Thrombin durchschnittlich um mehr als 3,5-fache erhöht. Die Präinkubation des TRP mit Argatroban verminderte die Thrombin-induzierte TIMP-1 Freisetzung höchst signifikant und unterstreicht die generelle Thrombin-Abhängigkeit der TIMP-1-Sekretion. Auch der kombinierte Einsatz der Inhibitoren von PAR-1, PAR-4 sowie GPIIb/IIIa zeigte einen höchst signifikanten Einfluss auf die Thrombin-induzierte Sekretion von TIMP-1, der im Zuge einer Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung nicht beobachtet werden konnte.

Anhand der ELISA-basierten Evaluation der Freisetzung der drei exemplarisch gewählten, sowohl pro- als auch antiangiogenetisch wirkenden Proteine aus der α -Granula lässt sich zusammenfassen, dass sich durch den Einsatz verschiedener Inhibitoren die Zusammensetzung des angiogenetischen Milieus unterschiedlich beeinflussen lässt. Es konnte gezeigt werden, dass die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung zu einer ausgeprägten Sekretion der α -Granula führte, die je nach Tumorzelllinie in ihrem Ausmaß variierte. Obwohl auch die Zugabe von Thrombin zu TRP eine ausgeprägte Granulasekretion zur Folge hatte, scheint die Tumorzell-induzierte Sekretion nicht ausschließlich auf der Tumorzell-vermittelten Thrombin-Generierung zu beruhen. Dies wurde in den durchgeführten Versuchen besonders hinsichtlich der Tumorzell-induzierten Sekretion von TIMP-1 deutlich, die weder durch den Einsatz von Argatroban noch durch die Inhibition verschiedener Zielstrukturen des Thrombins signifikant gemindert wurde. Dies kann als Indiz für weiterführende, Thrombin-unabhängige Mechanismen der Tumorzell-induzierten Granulasekretion gedeutet werden.

6.3 Beitrag verschiedener Aktivierungsmechanismen zur Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung

Im Zuge der Etablierung eines Puffer-basierten Testsystems zur Untersuchung der Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung kristallisierte sich die Relevanz einer initialen Aktivierung der

Thrombozyten über das Gerinnungssystem heraus. Weitere Untersuchungen, besonders jene zur Tumorzell-induzierten Freisetzung der α -Granula, lassen jedoch einen multifaktoriellen Charakter der Interaktionen zwischen Tumorzellen und Thrombozyten vermuten, der über die bloße Aktivierung des Gerinnungssystems durch die Tumorzellen hinausgeht. Um den mechanistischen Hintergrund dieser, Thrombin-unabhängigen, Interaktionen weiter zu beleuchten, wurde der Einfluss der Inhibition verschiedener bekannter thrombozytärer Oberflächenrezeptoren auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung untersucht.

6.3.1 Beteiligung des TXA_2 -Rezeptors an der Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung

Um die Rolle von löslichen Mediatorstoffen im Kontext der Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung zu evaluieren, wurde zunächst die Beteiligung des Thromboxan A_2 -Rezeptors (TXA_2 -Rezeptor) untersucht. Dazu wurde der TRP vor der Aktivierung mit dem TXA_2 -Rezeptor-Antagonisten Seratrodist präinkubiert.

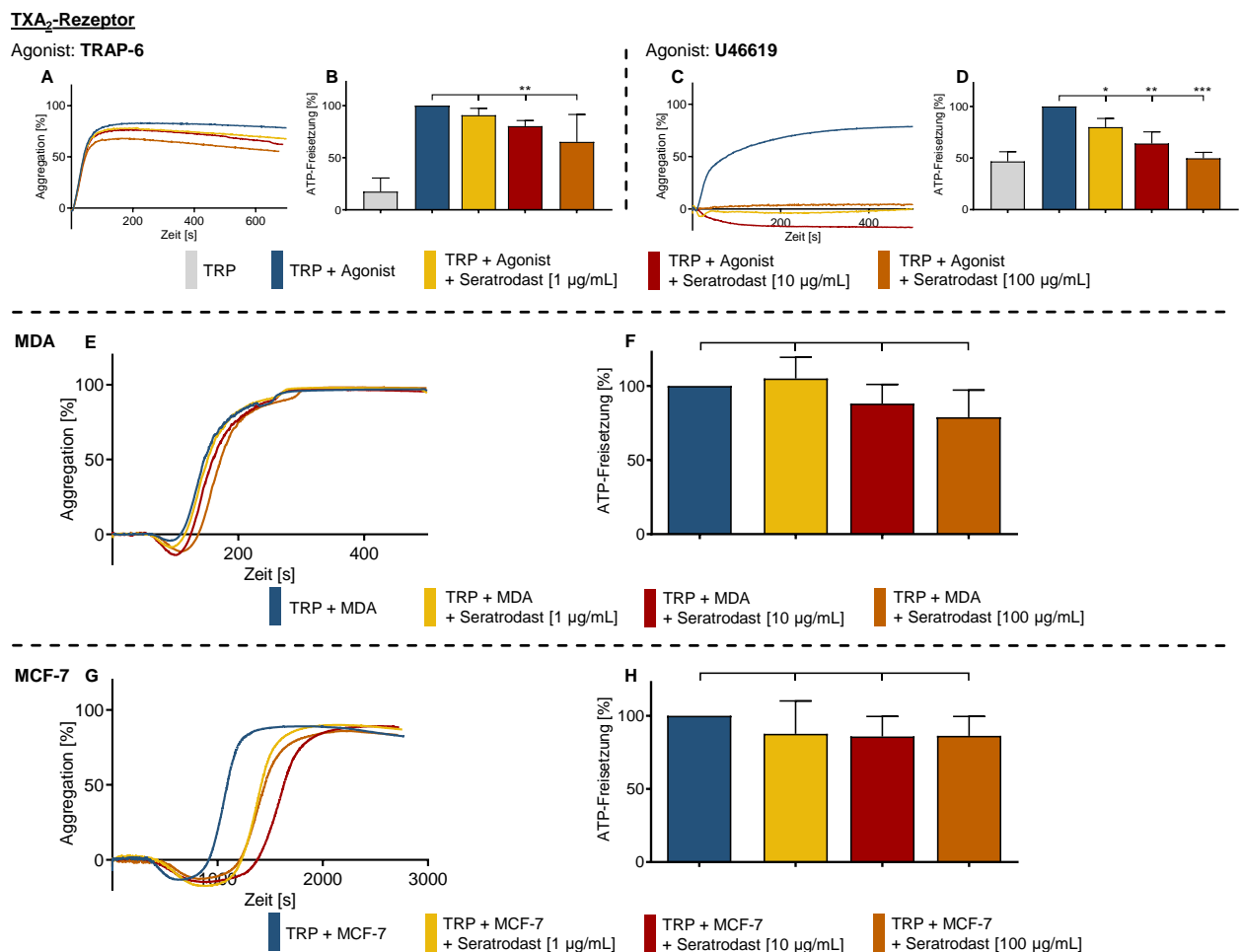


Abbildung 6.15 – **Beitrag des TXA_2 -Rezeptors zur Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung.** Präinkubation des TRP für 30 Minuten mit Seratrodist (1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL) oder der entsprechenden Menge DMSO. **A-D:** Kontrollversuche. Aggregation bzw. ATP-Freisetzung nach Präinkubation des TRP mit Seratrodist bzw. DMSO und Aktivierung der Thrombozyten mit TRAP-6 (41 µM) (**A, B**) bzw. U46619 (TXA_2 -Rezeptoragonist; 10 µM) (**C, D**). **E und F:** TCIPA bzw. ATP-Freisetzung nach Präinkubation mit Seratrodist bzw. DMSO und Zugabe von MDA-MB-231 Zellen

(1×10^4 /mL). **G** und **H**: TCIPA bzw. ATP-Freisetzung nach Präinkubation mit Seratrodast bzw. DMSO und Zugabe von MCF-7 Zellen (1×10^4 /mL).

Zur Kontrolle des Effektes von Seratrodast wurden die Thrombozyten nach entsprechender Präinkubation durch die Zugabe eines PAR-1 Agonisten (TRAP-6) bzw. des TXA₂-Analogons U46619 aktiviert. Es wurden die Freisetzung von ATP aus der dichten Granula und die Aggregation evaluiert. Der inhibitorische Effekt des Seratrodast auf den TXA₂-Rezeptor zeigte sich nach der Aktivierung der Thrombozyten mit U46619. Die Zugabe von U46619 führte zu einer raschen Aggregation der Thrombozyten und einer Verdopplung der ATP-Konzentration im Vergleich zu ruhenden Thrombozyten. Die Präinkubation der Thrombozyten mit Seratrodast unterband bereits in der geringsten getesteten Konzentration (1 µg/mL) die Aggregation vollständig (Abbildung 6.15 C). Die ATP-Freisetzung wurde, abhängig von der eingesetzten Seratrodast-Konzentration, stark beeinflusst bzw. vollständig unterbunden (Abbildung 6.15 D). Im Kontext der PAR-1 vermittelten Thrombozytenaktivierung zeigte sich ein leichter Effekt des Seratrodast auf die maximale Aggregation und auf die ATP-Freisetzung (Abbildung 6.15 A und B). Der Grund für diese Beobachtung könnte eine Reduktion des *positive feedback loops* sein, den die Freisetzung von TXA₂ aus der dichten Granula als Folge einer initialen Thrombozytenaktivierung initiiert (192). Durch die Blockade des TXA₂-Rezeptors könnte dieser *positive feedback loop* reduziert werden.

Die Blockade des TXA₂-Rezeptors zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die, durch die Zugabe von MDA-MB-231 Zellen induzierte, Thrombozytenaktivierung (Abbildung 6.15 E und F). Die MCF-7 Zell-induzierte TCIPA wurde durch den Einsatz von Seratrodast leicht beeinflusst, was sich in einer konzentrationsabhängigen Verlängerung der *lagtime* widerspiegelte (Abbildung 6.15 G). Die MCF-7 Zell-induzierte ATP-Freisetzung aus der thrombozytären dichten Granula wurde durch die Präinkubation des TRP mit Seratrodast nicht signifikant beeinflusst (Abbildung 6.15 H).

Der geringe Einfluss des Seratrodast auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung wird durch die Erkenntnisse von Zára und Kollegen untermauert, die zeigen konnten, dass die Inhibition der TXA₂-Synthese mittels ASS keinen signifikanten Einfluss auf die MDA-MB-231 bzw. MCF-7 Zell-induzierte TCIPA haben (49). Der durch die Freisetzung von TXA₂ induzierte *positive feedback loop* scheint dementsprechend im Kontext der Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung lediglich eine untergeordnete Rolle einzunehmen.

6.3.2 Beteiligung des P2Y₁₂-Rezeptors an der Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung

Neben der Beteiligung von TXA₂ sollte der Beitrag des löslichen Mediatorstoffes ADP zur Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung untersucht werden. ADP wird infolge einer initialen Thrombozytenaktivierung aus der dichten Granula freigesetzt und ruft über purinerge Rezeptoren eine Autoaktivierung der Thrombozyten hervor (172). Dieser Effekt des *positive feedback loops* könnte die Beobachtung begründen, dass die Präinkubation der Thrombozyten mit dem P2Y₁₂-Rezeptor-Antagonisten Ticagrelor eine konzentrationsabhängige Inhibition der PAR-1 vermittelten Thrombozytenaktivierung zur Folge hatte (Abbildung 6.16 A und B).

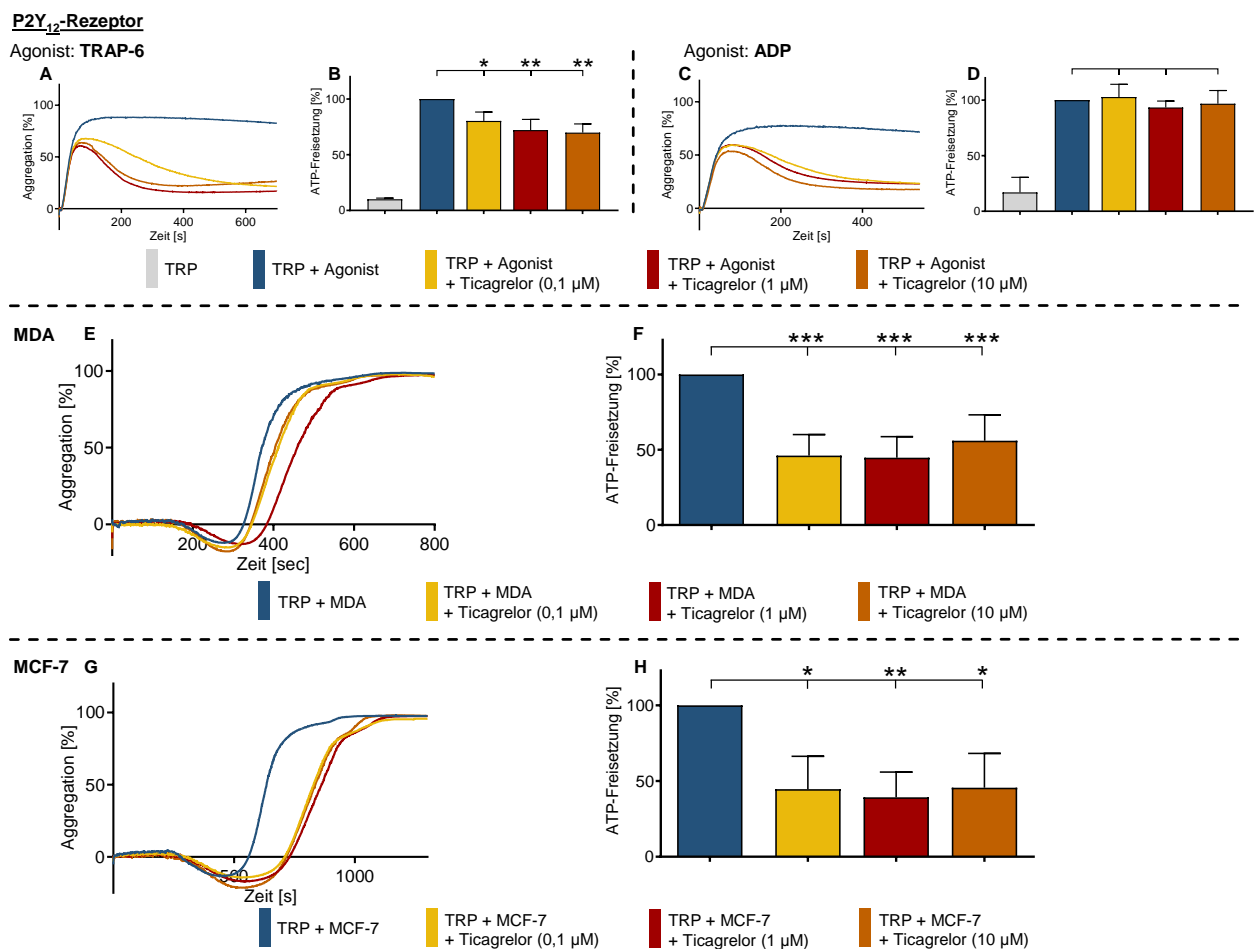


Abbildung 6.16 - **Beitrag des P2Y₁₂-Rezeptors zur Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung.** Präinkubation des TRP für 30 Minuten mit Ticagrelor (0,1 μM, 1 μM, 10 μM) oder der entsprechenden Menge DMSO. **A-D:** Kontrollversuche. Aggregation bzw. ATP-Freisetzung nach Präinkubation des TRP mit Ticagrelor bzw. DMSO und Aktivierung der Thrombozyten mit TRAP-6 (41 μM) (**A, B**) bzw. ADP (P2Y₁₂-Rezeptoragonist; 25 μM) (**C, D**). **E und F:** TCIPA bzw. ATP-Freisetzung nach Präinkubation mit Ticagrelor bzw. DMSO und Zugabe von MDA-MB-231 Zellen (1×10⁴/mL). **G und H:** TCIPA bzw. ATP-Freisetzung nach Präinkubation mit Ticagrelor bzw. DMSO und Zugabe von MCF-7 Zellen (1×10⁴/mL).

Auch das Maximum der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation konnte durch den Einsatz von Ticagrelor deutlich vermindert, jedoch nicht vollständig inhibiert werden. Zudem schien es lediglich zu einer reversiblen Aggregation zu kommen, was sich im Abfall der Kurven im Aggregogramm widerspiegelt (Abbildung 6.16 C). Im Gegensatz dazu wurde die ATP-Freisetzung nicht wie erwartet

beeinflusst (Abbildung 6.16 D). Das Ausbleiben eines inhibitorischen Effekts auf die ADP-induzierte ATP-Freisetzung reduziert die Aussagekraft der weiteren Untersuchungen, da ein P2Y₁₂-unabhängiger Effekt des Ticagrelors nicht ausgeschlossen werden konnte.

In Bezug auf den Effekt von Ticagrelor auf die TCIPA kann dennoch festgehalten werden, dass die Präinkubation der Thrombozyten mit dem P2Y₁₂-Inhibitor zu einer Verlängerung der *lagtime* nach Zugabe der beiden Mammakarzinomzelllinien führte. Diese Verlängerung war nach der Aktivierung mit MCF-7 Zellen ausgeprägter als nach der Aktivierung mit MDA-MB-231 Zellen. Im Gegensatz zu einer TRAP-6 bzw. ADP-induzierten Aktivierung verlief die TCIPA in beiden Fällen jedoch vollständig und irreversibel (Abbildung 6.16 E und G). Die Tumorzell-induzierte ATP-Freisetzung wurde bereits durch die Präinkubation mit der geringsten verwendeten Konzentration Ticagrelor (0,1 µM) signifikant reduziert (Abbildung 6.16 F und H). Aufgrund des unerwarteten Ausbleibens einer Inhibition der ADP-induzierten ATP-Freisetzung kann die Rolle des ADP und des P2Y₁₂-Rezeptors in der Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung jedoch nicht abschließend beurteilt werden.

6.3.3 Beteiligung des GPVI an der Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung

Zur Untersuchung der Beteiligung des Kollagen-Rezeptors GPVI an einer Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung wurde TRP mit Losartan präinkubiert, das als Angiotensin II-Rezeptor-Subtyp-1 (AT₁-Rezeptor) -Antagonist in der Blutdrucktherapie Verwendung findet. Losartan zeigte in Studien neben der Blockade des AT₁-Rezeptors auch inhibitorische Effekte auf GPVI (385). Dieser Effekt scheint auf der Blockade einer Clusterbildung von GPVI zu beruhen (386). Jiang und Kollegen zeigten zudem eine Losartan-induzierte Inhibition des TXA₂-Rezeptors (387). Der generelle Effekt von Losartan auf die Agonist-induzierte Aggregation sowie ATP-Freisetzung wurde dementsprechend unter Verwendung von Kollagen sowie des TXA₂-Agonisten U46619 untersucht.

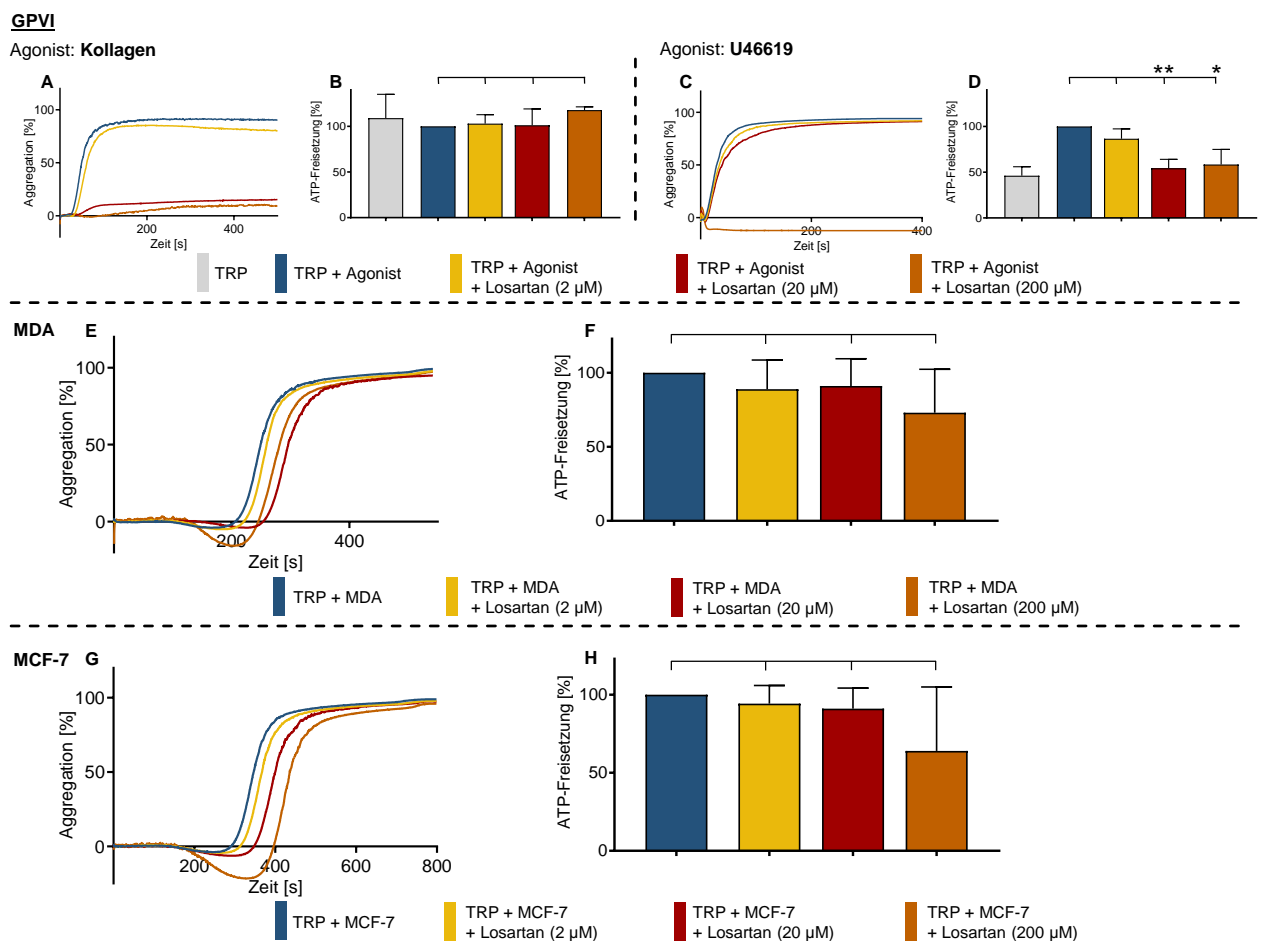


Abbildung 6.17 - **Beitrag des GPVI zur Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung.** Präinkubation des TRP für 30 Minuten mit Losartan (2 µM, 20 µM, 200 µM) oder der entsprechenden Menge DPBS. **A-D:** Kontrollversuche. Aggregation bzw. ATP-Freisetzung nach Präinkubation des TRP mit Losartan bzw. DPBS und Aktivierung der Thrombozyten mit Kollagen (5 µg/mL) (**A, B**) bzw. U46619 (10 µM) (**C, D**). **E und F:** TCIPA bzw. ATP-Freisetzung nach Präinkubation mit Losartan bzw. DPBS und Zugabe von MDA-MB-231 Zellen (1×10^4 /mL). **G und H:** TCIPA bzw. ATP-Freisetzung nach Präinkubation mit Losartan bzw. DPBS und Zugabe von MCF-7 Zellen (1×10^4 /mL).

Eine Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation wurde durch die Präinkubation mit 20 µM Losartan vollständig inhibiert (Abbildung 6.17 A). Die Kollagen-induzierte ATP-Freisetzung wurde

entgegen dieser Beobachtung auch durch die Inkubation mit 200 μM Losartan nicht beeinflusst (Abbildung 6.17 B).

Die Thrombozytenaggregation, die aus der Aktivierung des TXA_2 -Rezeptors mittels U46619 resultierte, wurde durch den Einsatz von 200 μM Losartan vollständig unterbunden (Abbildung 6.17 C). Die U46619-induzierte ATP-Freisetzung wurde ab einer Konzentration von 20 μM Losartan signifikant beeinflusst (Abbildung 6.17 C).

Weder die TCIPA noch die Tumorzell-induzierte ATP-Freisetzung wurden durch die Präinkubation mit Losartan signifikant beeinflusst (Abbildung 6.17 E-H). Untersuchungen zur TCIPA zeigten lediglich eine leichte Verlängerung der *lagtime* sowie des *shape changes* unter Einsatz hoher Konzentrationen (200 μM) Losartan. Die Aktivierung über GPVI scheint dementsprechend keine ausgeprägte Rolle in der Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung einzunehmen. Zudem unterstreicht dieses Ergebnis den geringen Effekt einer Inhibition des TXA_2 -Rezeptors auf die Interaktion zwischen MDA-MB-231 sowie MCF-7 Zellen und Thrombozyten (Abbildung 6.15).

6.3.4 Beteiligung des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ an der Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung

Das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ liegt bei ruhenden Thrombozyten in einer inaktiven Konformation vor, die infolge eines *inside-out-signalings* nach einer initialen Aktivierung der Thrombozyten in eine aktive Konformation übergeht, die in der Lage ist makromolekulare Liganden, wie beispielsweise Fibrinogen oder Fibronectin, zu binden (388).

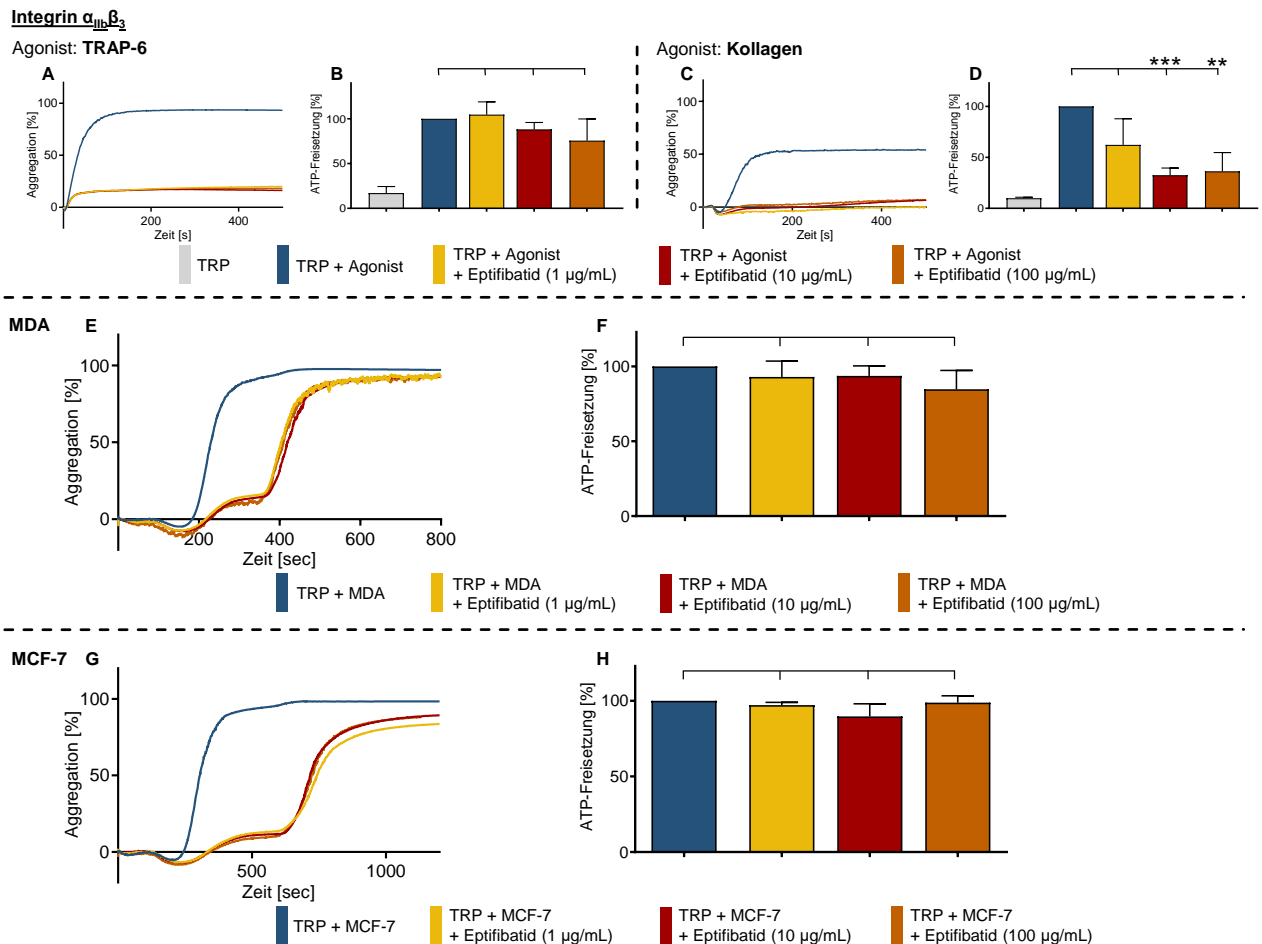


Abbildung 6.18 - **Beitrag des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ zur Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung.** Präinkubation des TRP für 30 Minuten mit Eptifibatid (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) oder der entsprechenden Menge DPBS. **A-D:** Kontrollversuche. Aggregation bzw. ATP-Freisetzung nach Präinkubation des TRP mit Eptifibatid bzw. DPBS und Aktivierung der Thrombozyten mit TRAP-6 (41 μM) (**A, B**) bzw. Kollagen (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (**C, D**). **E und F:** TCIPA bzw. ATP-Freisetzung nach Präinkubation mit Eptifibatid bzw. DPBS und Zugabe von MDA-MB-231 Zellen ($1 \times 10^4/\text{mL}$). **G und H:** TCIPA bzw. ATP-Freisetzung nach Präinkubation mit Eptifibatid bzw. DPBS und Zugabe von MCF-7 Zellen ($1 \times 10^4/\text{mL}$).

Durch eine Präinkubation der Thrombozyten mit dem $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Antagonisten Eptifibatid wurde die maximale TRAP-6 induzierte Thrombozytenaggregation um 80 % gesenkt. Bemerkenswert ist der initiale Verlauf der Aggregationskurve der Eptifibatid-enthaltenden Proben. Dieser ist deckungsgleich mit dem der Positivkontrolle, die anstelle des Eptifibatids lediglich DPBS enthält. Nach einem Anstieg auf 20 % Aggregation flachen die Kurven der Proben, die Inhibitor enthielten, jedoch ab. Ein weiterer Anstieg der Aggregation konnte über den gesamten Beobachtungszeitraum nicht detektiert werden (Abbildung 6.18 A). Ähnlich verhielt es sich nach der Aktivierung der

Thrombozyten mit Kollagen (Abbildung 6.18 D). Hier konnte bei allen vermessenen Proben ein *shape change* detektiert werden. Nach dem *shape changes* flachen die Kurven für die Proben die Eptifibatid enthielten jedoch ab, und es konnte keine weitere Aggregation beobachtet werden.

Die initiale Aktivierung der Thrombozyten sowohl über PAR-1 als auch über entsprechende Kollagen-Rezeptoren schien dementsprechend unabhängig von dem Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ zu verlaufen. Für den anschließenden Verlauf der Aggregation schien das Integrin jedoch eine wichtige Rolle in der weiteren Aktivierung bzw. in der Querverknüpfung der Thrombozyten und damit in der Ausbildung eines stabilen Thrombus zu spielen.

Anders verhielt es sich bei der untersuchten ATP-Freisetzung nach Aktivierung der Thrombozyten mit TRAP-6 bzw. Kollagen (Abbildung 6.18 B und D). Die TRAP-6 induzierte ATP-Freisetzung konnte durch die Zugabe von Eptifibatid nicht signifikant reduziert werden (Abbildung 6.18 B). Dies könnte in der schnell verlaufenden Aktivierung der Thrombozyten über PAR-1 begründet liegen, auf die, unabhängig von einer sich anschließenden Quervernetzung der Thrombozyten, unmittelbar die Freisetzung der dichten Granula folgt. Dementsprechend wäre die Rolle des, zu Beginn der Thrombozytenaktivierung inaktiv vorliegenden, $\alpha_{IIb}\beta_3$ für die schnell ablaufende Sekretion der dichten Granula untergeordneter Natur. Wurde zur Aktivierung der Thrombozyten ein schwächerer Thrombozyten-Agonist als TRAP-6, wie beispielsweise Kollagen, genutzt, hatte die Präinkubation mit Eptifibatid einen konzentrationsabhängigen Effekt auf die ATP-Freisetzung aus der dichten Granula (Abbildung 6.18 D).

Die Tumorzell-vermittelte ATP-Freisetzung wurde, ähnlich der TRAP-6 induzierten Freisetzung, durch die Präinkubation mit Eptifibatid nicht signifikant gehemmt (Abbildung 6.18 F und H). Auch hier könnte die Zeitkomponente dadurch der entscheidende Faktor sein, dass die Freisetzung der dichten Granula vor der vollständigen *inside-out* Aktivierung des Integrins abgeschlossen ist. Eine alternative Erklärung ist eine untergeordnete Rolle des $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrins für die eigentliche Aktivierung der Thrombozyten im Kontext der Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung. Die Relevanz des $\alpha_{IIb}\beta_3$ könnte eher bei der, für eine Vollaggregation unabdingbaren, Quervernetzung der Thrombozyten liegen.

Die TCIPA wurde, im Gegensatz zur Freisetzung der dichten Granula, durch die Präinkubation der Tumorzellen mit Eptifibatid beeinflusst (Abbildung 6.18 E und G). Wiederum durchliefen die Thrombozyten, unabhängig von der Zugabe des Inhibitors, sowohl nach Aktivierung mittels MDA-MB-231 als auch mittels MCF-7 Zellen einen *shape change*. Danach resultierte aus der Hemmung von $\alpha_{IIb}\beta_3$ jedoch ein Plateau, das nach der MCF-7 Zell-induzierten TCIPA länger verlief als nach der MDA-MB-231 induzierten TCIPA. Die sich an das Plateau anschließende sekundäre Aggregation mündete in beiden Fällen in einer Vollaggregation. Die beobachtete charakteristische Kurve kann als Indiz für den unterschiedlichen Ablauf von TCIPA und Agonist-induzierter Thrombozytenaggregation gesehen werden. In beiden Fällen schien es eine $\alpha_{IIb}\beta_3$ -unabhängige

initiale Aktivierung der Thrombozyten zu geben, die zu einem *shape change* und einer initialen Aggregation führte. Im Falle der TCIPA könnte dies z.B. durch eine Tumorzell-induzierte Thrombin-Generierung erfolgen. Nach der initialen Aktivierung würde das aktivierte $\alpha_{IIb}\beta_3$ zu einer weiteren Aggregation beitragen. Da dieses jedoch in seiner aktiven Konformation von Eptifibatid gebunden und inhibiert wurde, kam es zu einem Plateau im Verlauf des Aggregogramms. Im Gegensatz zur Agonist-induzierten Thrombozytenaggregation schienen im Falle der TCIPA andere Mechanismen der Thrombozytenaktivierung bzw. der Quervernetzung der Thrombozyten das inhibierte $\alpha_{IIb}\beta_3$ zu kompensieren, sodass es nach einer erneuten *lagtime* zu einer Vollaggregation kam. Zur Aufklärung der mechanistischen Hintergründe dieser, $\alpha_{IIb}\beta_3$ -unabhängigen, sekundären Aggregation sind weitere Untersuchungen von Nöten.

6.3.5 Untersuchung des Einflusses weiterer Inhibitoren auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurden neben den bereits erörterten Antagonisten thrombozytärer Oberflächenrezeptoren weitere Inhibitoren getestet. Da diese jedoch keinen signifikanten Effekt auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung hatten, oder konträre Ergebnisse hinsichtlich der entsprechenden Positivkontrollen aufwiesen, fasst an dieser Stelle ein tabellarischer Überblick die die verwendeten Inhibitoren zusammen, ohne näher auf die Ergebnisse einzugehen (Abbildung 6.19).

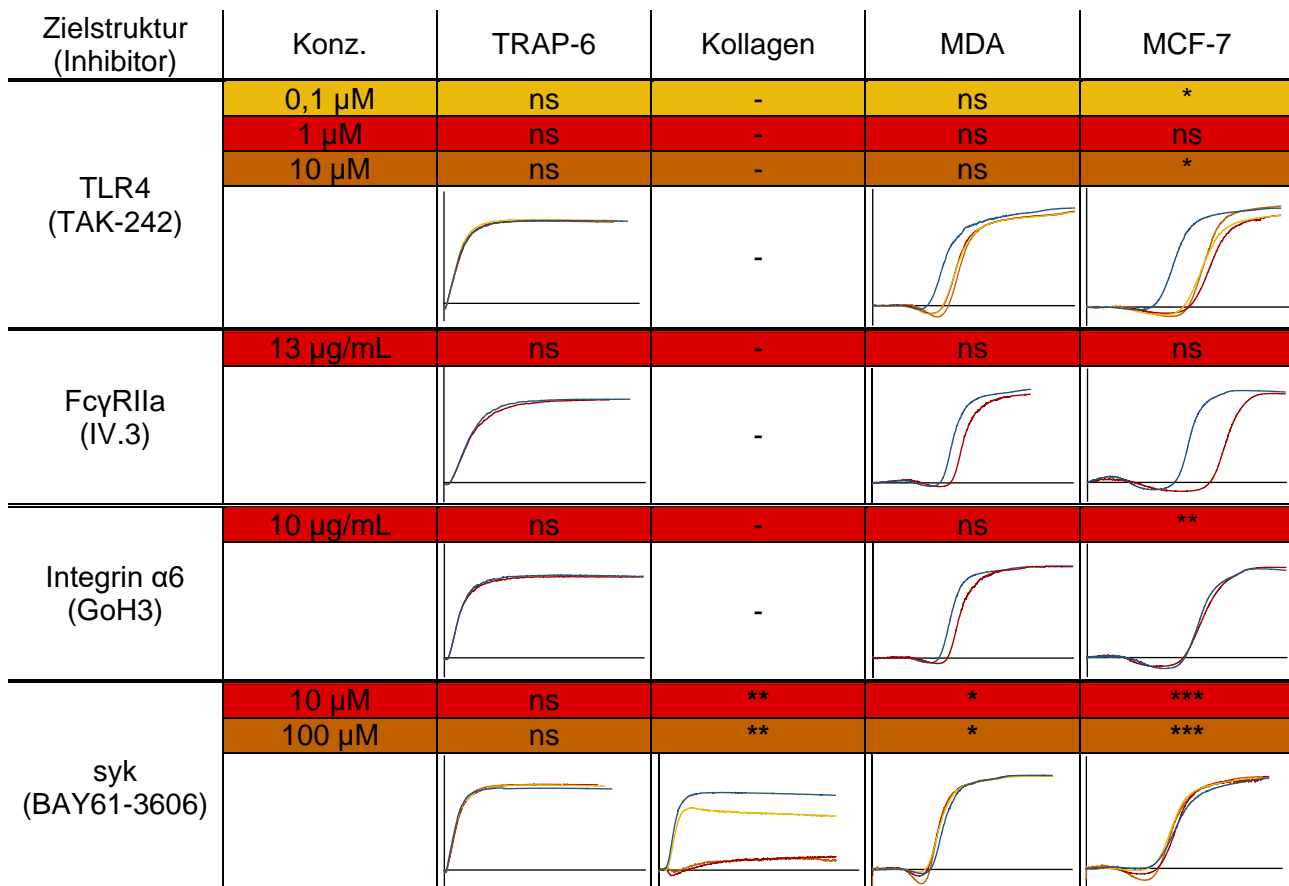


Abbildung 6.19 – **Der Einfluss weiterer Inhibitoren auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung.** Dargestellt sind die Einflüsse der jeweiligen Inhibition der Thrombozyten-ständigen Oberflächenrezeptoren TLR4, Fc γ RIIa, Integrin α 6, sowie des intrazellulären Proteins syk auf die Aktivierung der Thrombozyten. Die Aktivierung der Thrombozyten wurde nach 30-minütiger Inkubation mit den entsprechenden Inhibitoren (TAK-242, BAY-61-3606) und Antikörpern (IV.3, GoH3) durch die Zugabe von TRAP-6 (41 μ M), Kollagen (5 μ g/mL) bzw. MDA-MB-231 und MCF-7 Zellen (1×10^4 /mL) induziert. Dargestellt ist jeweils die statistische Zusammenfassung des Einflusses der Inhibitoren auf die ATP-Freisetzung. Darunter ist in der, der ATP-Freisetzung entsprechenden, Farbe, die jeweilige Aggregation abgebildet.

Es wurde TAK-242 als Inhibitor des thrombozytären Oberflächenrezeptors TLR4 eingesetzt. Zudem wurden zwei Antikörper verwendet, die entweder gegen den Fc γ RIIa (Klon IV.3) oder gegen die α 6-Untereinheit von Integrinen (Klon GoH3) gerichtet sind. Neben Substanzen, die der Inhibition thrombozytärer Oberflächenstrukturen dienen, wurde zudem BAY61-3606 verwendet, das der Inhibition der Tyrosinkinase syk diene. Der Effekt der Inhibitoren kann der Abbildung 6.19 entnommen werden.

6.3.6 Untersuchung des Einflusses von UFH auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung

Neben den bisher vorgestellten selektiven Antagonisten thrombozytärer Oberflächenrezeptoren wurde der Einfluss des UFH auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung untersucht. UFH verfügt über pleiotrope Wirkmechanismen, die aus der polysulfatierten Glykosaminoglykanstruktur des Heparins resultieren. Zum einen vermittelt es einen Antithrombin III-abhängigen antikoagulatorischen Effekt (329). Zum anderen bindet und inhibiert UFH aufgrund der hohen Dichte negativer Ladungen Adhäsionsmoleküle wie beispielsweise Selektine (332,333).

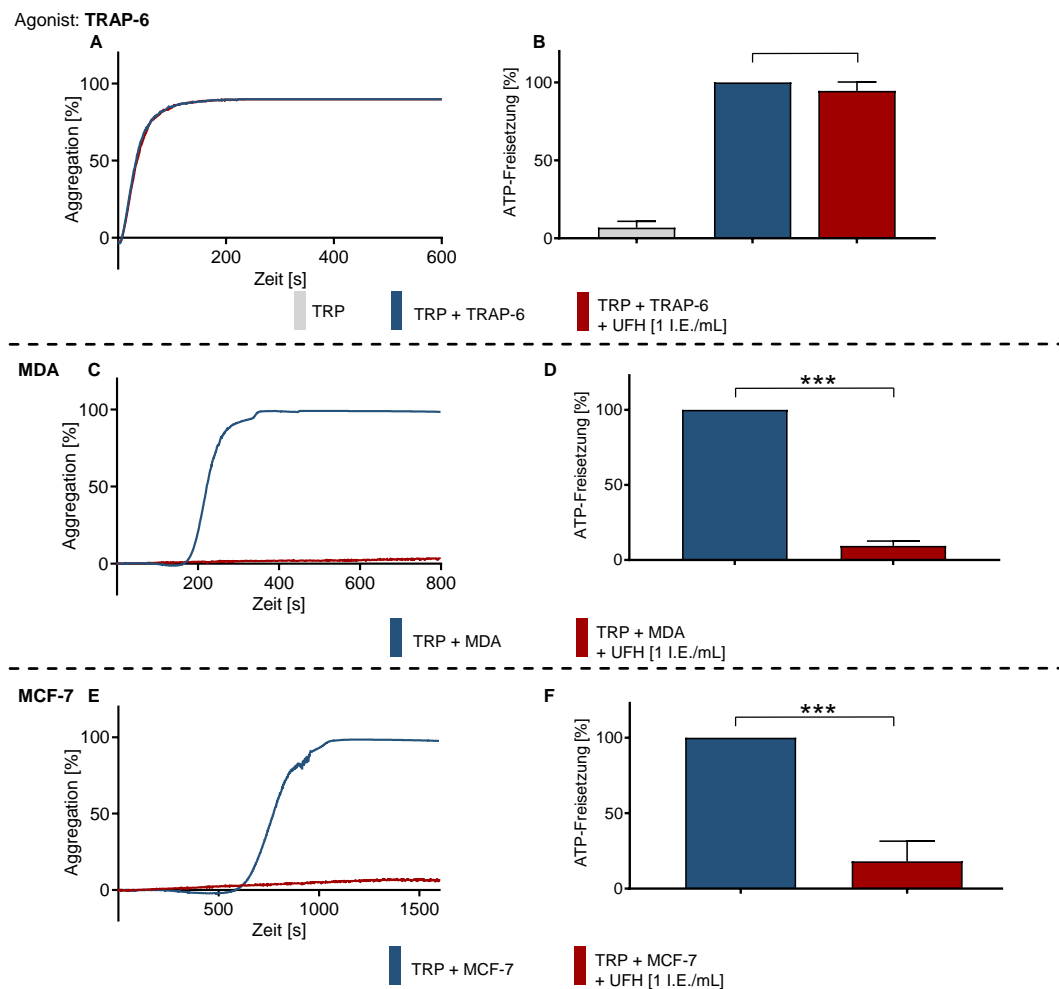


Abbildung 6.20 – **Der Einfluss von UFH auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung.** Präinkubation des TRP für 30 Minuten mit UFH (1 I.E./mL) oder der entsprechenden Menge DPBS. **A und B:** Kontrollversuche. Aggregation bzw. ATP-Freisetzung nach Präinkubation des TRP mit UFH bzw. DPBS und Aktivierung der Thrombozyten mit TRAP-6 (41 μ M). **C und D:** TCIPA bzw. ATP-Freisetzung nach Präinkubation mit UFH bzw. DPBS und Zugabe von MDA-MB-231 Zellen (1×10^4 /mL). **E und F:** TCIPA bzw. ATP-Freisetzung nach Präinkubation mit UFH bzw. DPBS und Zugabe von MCF-7 Zellen (1×10^4 /mL).

Die Präinkubation des TRP mit UFH (1 I.E./mL) hatte keinen Effekt auf die PAR-1 vermittelte Aggregation der Thrombozyten oder auf die Freisetzung der dichten Granula (Abbildung 6.20 A und B).

Die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung wurde im Gegensatz zur TRAP-6 induzierten Aktivierung durch die Zugabe von UFH nahezu vollständig inhibiert. Dies traf auf eine Aktivierung der Thrombozyten sowohl durch die Zugabe von MDA-MB-231 als auch von MCF-7 Zellen zu und spiegelte sich in einem vollständigen Ausbleiben der TCIPA (Abbildung 6.20 C und E) und einer Reduktion der ATP-Freisetzung auf das Niveau ruhender Thrombozyten wider (Abbildung 6.20 D und F).

In der vorliegenden Arbeit wurde bereits die essentielle Rolle einer Tumorzell-induzierten Aktivierung des Gerinnungssystems evaluiert. Jedoch konnten erste Hinweise auf weitere Mechanismen gefunden werden, die nach einer initialen Aktivierung der Thrombozyten über Tumorzell-generiertes Thrombin die Aktivierung der Thrombozyten weiter vorantreiben. Dies spiegelte sich beispielsweise in einer Freisetzung unterschiedlicher Proteine aus der α -Granula wider, die durch den Einsatz des direkten Thrombin-Inhibitors Argatroban nicht beeinflusst wurde (Abschnitt 6.2.5). Auch die Möglichkeit einer Kompensation der Blockade des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ im Zuge der TCIPA lässt Tumorzell-spezifische Mechanismen einer sekundären Thrombozytenaktivierung vermuten. Dementsprechend könnte der ausgeprägte Effekt des UFH auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung nicht nur auf der bekannten antikoagulatorischen Wirkung des UFH beruhen, sondern unter Umständen auf einen weiteren, Gerinnungs-unabhängigen Mechanismus hinweisen, der durch den Einsatz von UFH ebenfalls inhibiert wird. Zur Untermauerung dieser These sind weitere Untersuchungen notwendig.

6.4 Einfluss von P-Selektin auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung

Um der Hypothese eines Gerinnungs-unabhängigen Aktivierungsmechanismus der Thrombozyten infolge des Kontaktes mit Mammakarzinomzellen nachzugehen, wurde in verschiedenen Experimenten der inhibitorische Effekt unterschiedlicher Heparine auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung evaluiert. Wie in Abschnitt 2.3.3.6.3 erläutert, werden Heparine diverse antimetastatische Effekte zugeschrieben, die sich auf unterschiedliche Bereiche der hämatogenen Metastasierung erstrecken. Dazu gehören neben dem antikoagulatorischen Effekt der Heparine beispielweise die Inhibition verschiedener Tumor-assoziiierter Enzyme wie MMP's oder Heparanase, die Bindung unterschiedlicher Wachstumsfaktoren oder Chemokine, sowie die Blockade verschiedener Adhäsionsmoleküle, wie P-Selektin oder VLA-4 (389–391). Dementsprechend sollte in den im Folgenden dargestellten Versuchen der Beitrag einer Heparin-vermittelten Blockade des direkten Kontakts von Tumorzellen und Thrombozyten zu dem inhibitorischen Effekt von UFH (Abbildung 6.20) evaluiert werden.

6.4.1 Einfluss verschiedener Heparin-Derivate auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung

Um den antikoagulativen Effekt des UFH von der Inhibition des direkten Kontaktes zwischen Tumorzellen und Thrombozyten abzugrenzen, wurden verschiedene Derivate des Heparins bzw. strukturverwandte Substanzen, wie beispielsweise Fondaparinux, hinsichtlich ihres Einflusses auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung untersucht. Die Derivate des Heparins unterschieden sich von UFH hinsichtlich ihrer Molekülgröße, dem Grad der Sulfatierung und Oxidation.

Das synthetisch hergestellte Pentasaccharid Fondaparinux entspricht der kleinsten pharmakologisch wirksamen Struktur der Heparine. Fondaparinux inhibiert über die Bindung an Antithrombin III, anders als UFH, ausschließlich den Faktor Xa (392). Aufgrund der geringen Kettenlänge und dem Vorhandensein lediglich einer 2-O-Sulfo- α -L-Iduronsäure im Molekül ist Fondaparinux nicht befähigt signifikanten Einfluss auf Adhäsionsmoleküle, wie beispielsweise P-Selektin, zu nehmen (393).

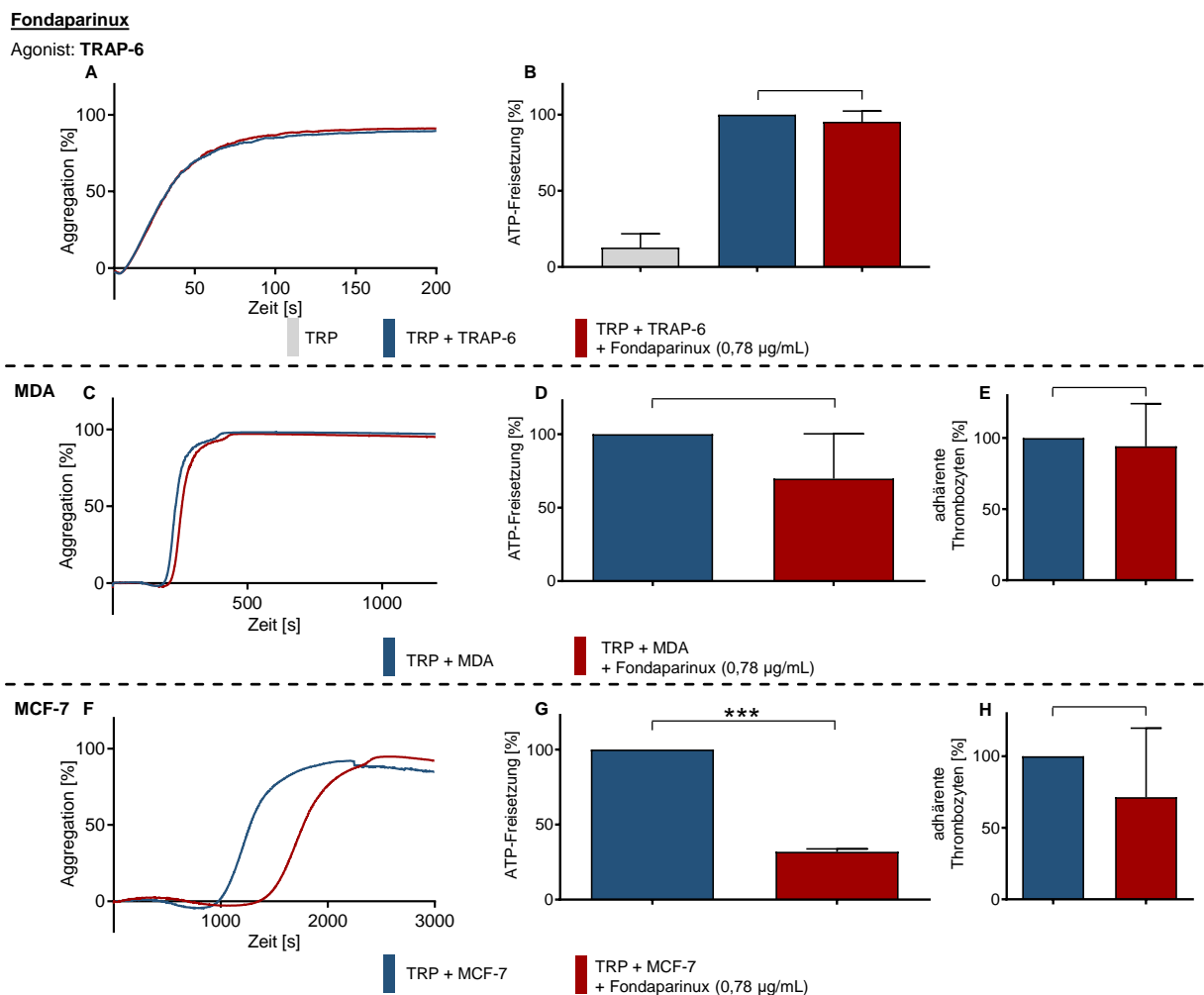


Abbildung 6.21 - Der Einfluss von Fondaparinux auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung. Präinkubation des TRP für 30 Minuten mit Fondaparinux (0,78 µg/mL) oder der entsprechenden Menge DPBS. **A** und **B**: Kontrollversuche. Aggregation bzw. ATP-Freisetzung nach Präinkubation des TRP mit Fondaparinux bzw. DPBS und

Aktivierung der Thrombozyten mit TRAP-6 (41 μM). **C** und **D**: TCIPA bzw. ATP-Freisetzung nach Präinkubation mit Fondaparinux bzw. DPBS und Zugabe von MDA-MB-231 Zellen ($1 \times 10^4/\text{mL}$). **E**: Quantifizierung adhärenter Thrombozyten, welche mit Fondaparinux bzw. DPBS präinkubiert wurden, an MDA-MB-231 Zellen. **F** und **G**: TCIPA bzw. ATP-Freisetzung nach Präinkubation mit Fondaparinux bzw. DPBS und Zugabe von MCF-7 Zellen ($1 \times 10^4/\text{mL}$). **H**: Quantifizierung adhärenter Thrombozyten, welche mit Fondaparinux bzw. DPBS präinkubiert wurden, an MCF-7 Zellen.

Die Präinkubation des TRP mit Fondaparinux hatte keinen Einfluss auf eine TRAP-6 induzierte Thrombozytenaktivierung (Abbildung 6.21 A und B). Auch die, durch Zugabe von MDA-MB-231 Zellen induzierte TCIPA bzw. ATP-Freisetzung konnte durch den Einsatz von 0,78 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Fondaparinux nur nicht signifikant beeinflusst werden (Abbildung 6.21 C und D). Die MCF-7 Zell-induzierte ATP-Freisetzung war nach Präinkubation mit Fondaparinux zwar signifikant reduziert (Abbildung 6.21 G), der Effekt auf eine MCF-7 Zell-vermittelte TCIPA beschränkte sich jedoch auf eine Verlängerung der *lagtime*. Eine Reduktion der maximalen Aggregation konnte nicht beobachtet werden (Abbildung 6.21 F). Der geringe Effekt des Fondaparinux könnte darin begründet sein, dass Faktor Xa, der bereits im Prothrombinase-Komplex gebunden ist, vor einer Fondaparinux-vermittelten Inhibition über Antithrombin III, geschützt ist (394). Ein weiterer Grund könnte jedoch die mangelnde Bindungsfähigkeit des Fondaparinux an Adhäsionsmoleküle sein. Diese Hypothese wird von den Ergebnissen des durchgeführten Adhäsions-Assays untermauert (Abbildung 6.21 E und H). Die Präinkubation mit Fondaparinux verminderte weder die Zahl adhärenter Thrombozyten an MDA-MB-231 noch an MCF-7 Zellen. Fondaparinux schien dementsprechend keinen inhibitorischen Effekt auf beteiligte Adhäsionsmoleküle zu haben.

Um eine Bindung mit P-Selektin eingehen zu können, benötigen polysulfatierte Glykosaminoglykane eine Kettenlänge von mindestens sechs Saccharideinheiten (332). Um dieser Anforderung Genüge zu leisten wurde in einem nächsten Versuch der Einfluss eines Heparin-Fragmentes untersucht, das aus zehn Saccharideinheiten bestand. Dieses Decasaccharid wurde aus dem LMWH Dalteparin isoliert (395).

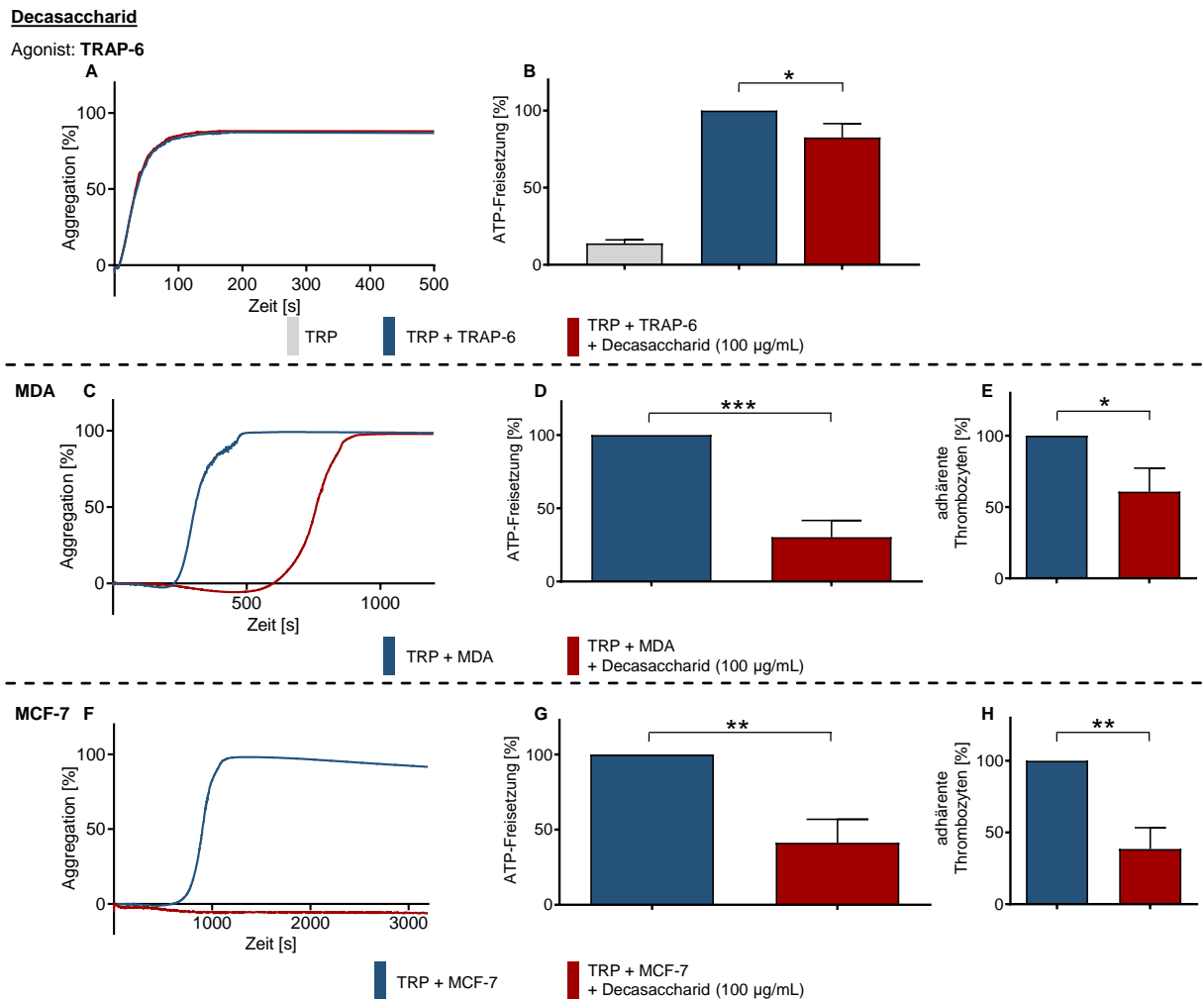


Abbildung 6.22 - Der Einfluss eines Decasaccharids auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung. Präinkubation des TRP für 30 Minuten mit Decasaccharid (100 µg/mL) oder der entsprechenden Menge DPBS. **A und B:** Kontrollversuche. Aggregation bzw. ATP-Freisetzung nach Präinkubation des TRP mit Decasaccharid bzw. DPBS und Aktivierung der Thrombozyten mit TRAP-6 (41 µM). **C und D:** TCIPA bzw. ATP-Freisetzung nach Präinkubation mit Decasaccharid bzw. DPBS und Zugabe von MDA-MB-231 Zellen (1×10^4 /mL). **E:** Quantifizierung adherenter Thrombozyten, welche mit Decasaccharid bzw. DPBS präinkubiert wurden, an MDA-MB-231 Zellen. **F und G:** TCIPA bzw. ATP-Freisetzung nach Präinkubation mit Decasaccharid bzw. DPBS und Zugabe von MCF-7 Zellen (1×10^4 /mL). **H:** Quantifizierung adherenter Thrombozyten, welche mit Decasaccharid bzw. DPBS präinkubiert wurden, an MCF-7 Zellen.

Die Präinkubation der Thrombozyten mit 100 µg/mL Decasaccharid hatte keinen Einfluss auf die TRAP-6 induzierte Aggregation (Abbildung 6.22 A). Die TRAP-6 vermittelte Freisetzung von ATP war hingegen leicht reduziert (Abbildung 6.22 B).

Der Einfluss des Decasaccharids auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung war jedoch deutlich ausgeprägter. Eine MDA-MB-231 Zell-induzierte TCIPA zeigte sich zwar hinsichtlich der erreichten Maximalaggregation unbeeinflusst, die *lagtime* war jedoch nach der Präinkubation mit

dem Oligosaccharid deutlich verlängert (Abbildung 6.22 C). Ausgeprägter war der inhibitorische Effekt auf die MCF-7 Zell-induzierte TCIPA. Diese konnte durch den Einsatz des Decasaccharids über den gesamten Detektionszeitraum vollkommen unterbunden werden (Abbildung 6.22 F).

Der Einfluss des Decasaccharids auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung erstreckte sich auch auf die Freisetzung der dichten Granula, die nach Präinkubation der Thrombozyten mit dem Oligosaccharid und der Aktivierung mittels der verwendeten Mammakarzinomzelllinien signifikant reduziert war (Abbildung 6.22 D und G).

Neben der Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung war auch die Adhäsion von, mit Decasaccharid präinkubierten, Thrombozyten an die beiden Mammakarzinomzelllinien signifikant reduziert (Abbildung 6.22 E und H).

Die Beobachtungen hinsichtlich des Effektes des verwendeten Decasaccharids auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung sowie auf die Adhäsion der Thrombozyten an Tumorzellen können als Hinweis auf eine Beteiligung von P-Selektin an der Interaktion zwischen Tumorzellen und Thrombozyten betrachtet werden, die durch den Einsatz weiterer Heparin-Derivate weiter untersucht werden sollte.

Um den Effekt der Heparine auf eine mögliche Beteiligung des P-Selektins an einer Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung deutlich von antikoagulativen Eigenschaften der Heparine abzugrenzen, wurden chemisch modifizierte Heparin-Derivate, wie beispielsweise RO-Heparin, verwendet. Dieses weist die originale Kettenlänge von UFH auf, jedoch sind infolge einer Glykospaltung alle C(2)-C(3)-Bindungen nicht-sulfatierter Uronsäuren gespalten (343). Dies führt zu einer, im Vergleich zu UFH gesteigerten Inhibition von P-Selektin bei gleichzeitigem Verlust der antikoagulativen Eigenschaften (343,346).

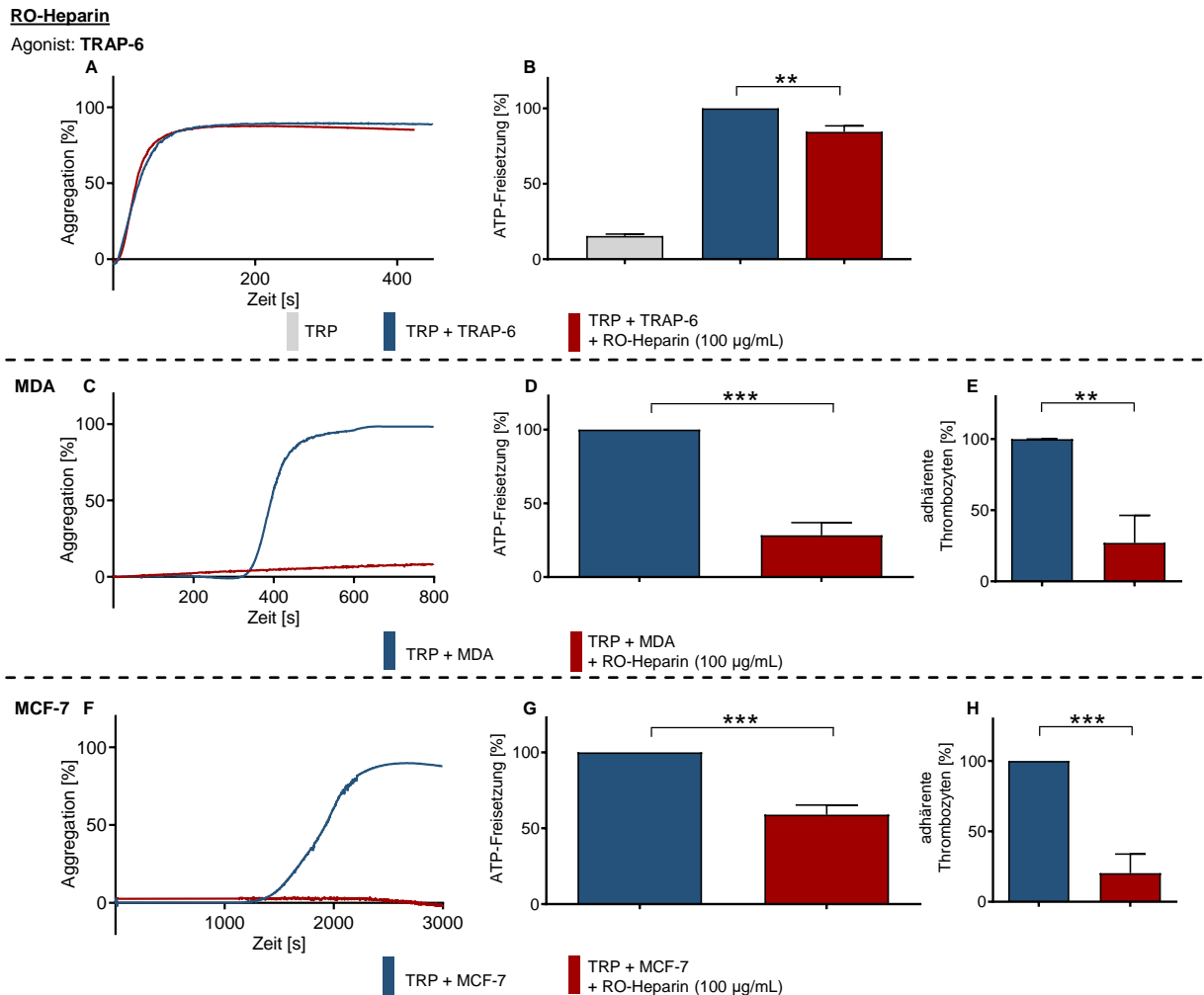


Abbildung 6.23 - Der Einfluss von RO-Heparin auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung. Präinkubation des TRP für 30 Minuten mit Reduced Oxyheparin (RO-Heparin, 100 µg/mL) oder der entsprechenden Menge DPBS. **A** und **B**: Kontrollversuche. Aggregation bzw. ATP-Freisetzung nach Präinkubation des TRP mit RO-Heparin bzw. DPBS und Aktivierung der Thrombozyten mit TRAP-6 (41 µM). **C** und **D**: TCIPA bzw. ATP-Freisetzung nach Präinkubation mit RO-Heparin bzw. DPBS und Zugabe von MDA-MB-231 Zellen (1×10^4 /mL). **E**: Quantifizierung adhärenter Thrombozyten, welche mit RO-Heparin bzw. DPBS präinkubiert wurden, an MDA-MB-231 Zellen. **F** und **G**: TCIPA bzw. ATP-Freisetzung nach Präinkubation mit RO-Heparin bzw. DPBS und Zugabe von MCF-7 Zellen (1×10^4 /mL). **H**: Quantifizierung adhärenter Thrombozyten, welche mit RO-Heparin bzw. DPBS präinkubiert wurden, an MCF-7 Zellen.

Die gesteigerte Bindungsaffinität des RO-Heparin an Adhäsionsmoleküle spiegelte sich in der signifikant verminderten Zahl adhärenter Thromozyten an MDA-MB-231 bzw. MCF-7 Zellen nach Präinkubation mit RO-Heparin wider (Abbildung 6.23 E und H).

Die Präinkubation des TRP mit 100 µg/mL RO-Heparin blockierte eine TCIPA über den gesamten Detektionszeitraum vollständig (Abbildung 6.23 C und F). Auch die Tumorzell-induzierte ATP-Freisetzung war signifikant reduziert (Abbildung 6.23 D und G).

Ein Ausbleiben der TCIPA könnte mit der Eigenschaft des P-Selektins als Adhäsionsmolekül zusammenhängen. Eine Blockade des P-Selektins könnte seine Funktion in der Quervernetzung aggregierender Thrombozyten mit Tumorzellen beeinträchtigen, wodurch die Bildung stabiler Aggregate unterbunden würde. Neben der Thrombozytenaggregation war jedoch auch die Freisetzung der dichten Granula signifikant beeinflusst (Abbildung 6.23 D und G). Dies spricht für eine direkte Beeinflussung der Thrombozytenaktivierung durch die Blockade von P-Selektin mittels RO-Heparin.

Die Rolle eines vermeintlichen Adhäsionsrezeptors in der eigentlichen Aktivierung der Thrombozyten infolge des Kontaktes mit Tumorzellen wurde umso bemerkenswerter, wenn man sie mit den Beobachtungen vergleicht, die im Zuge der Blockade des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ gemacht wurden (Abbildung 6.18). Auch hier konnte durch die Inhibition eines Adhäsionsmoleküls eine Beeinflussung der TCIPA beobachtet werden. Jedoch war hier die sekundäre Aggregation stärker betroffen als die initiale Aktivierung und die Freisetzung der dichten Granula.

Der Einsatz von RO-Heparin beeinflusste zudem signifikant die TRAP-6 induzierten ATP-Freisetzung (Abbildung 6.23 B). P-Selektin schien auch nach der Aktivierung der Thrombozyten über PAR-1 einen verstärkenden Effekt auf die Freisetzung der Granula zu haben. Die TRAP-6 induzierte Thrombozytenaggregation war hingegen von der Blockade des P-Selektins unbeeinflusst (Abbildung 6.23 A).

Um den Beitrag des P-Selektins zur Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung zu verifizieren und mögliche, unbekannte Nebeneffekte des RO-Heparins auszuschließen, wurde ein weiteres Heparin-Derivat, 2-O-Desulfatiertes Heparin, zur Kontrolle verwendet. Durch die spezifische 2-O-Desulfatierung sind sowohl die antikoagulativen Eigenschaften als auch die Selektin-Bindungsfähigkeit des Heparins nahezu vollständig aufgehoben (343).

2-O-Desulfatiertes Heparin

Agonist: TRAP-6

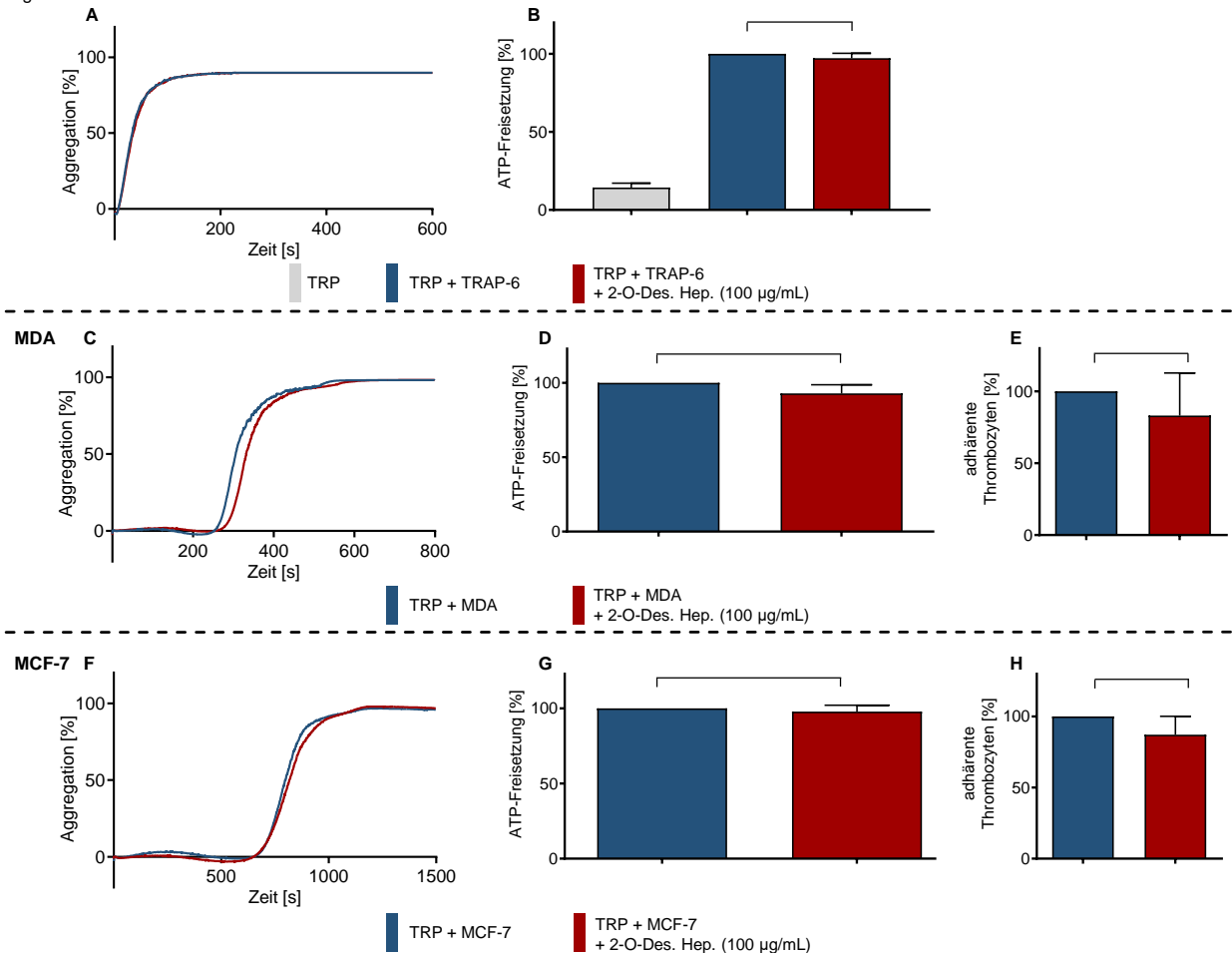


Abbildung 6.24 - **Der Einfluss von 2-O-Desulfatiertem Heparin auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung.** Präinkubation des TRP für 30 Minuten mit 2-O-Desulfatiertem Heparin (2-O-Des. Hep.) (100 µg/mL) oder der entsprechenden Menge DPBS. **A** und **B**: Kontrollversuche. Aggregation bzw. ATP-Freisetzung nach Präinkubation des TRP mit 2-O-Des. Hep. bzw. DPBS und Aktivierung der Thrombozyten mit TRAP-6 (41 µM). **C** und **D**: TCIPA bzw. ATP-Freisetzung nach Präinkubation mit 2-O-Des. Hep. bzw. DPBS und Zugabe von MDA-MB-231 Zellen (1x10⁴/mL). **E**: Quantifizierung adhärenter Thrombozyten, welche mit 2-O-Des. Hep. bzw. DPBS präinkubiert wurden, an MDA-MB-231 Zellen. **F** und **G**: TCIPA bzw. ATP-Freisetzung nach Präinkubation mit 2-O-Des. Hep. bzw. DPBS und Zugabe von MCF-7 Zellen (1x10⁴/mL). **H**: Quantifizierung adhärenter Thrombozyten, welche mit 2-O-Des. Hep bzw. DPBS präinkubiert wurden, an MCF-7 Zellen.

Die fehlende Bindungsfähigkeit des 2-O-Desulfatierten Heparins an Adhäsionsmoleküle spiegelte sich im durchgeführten Adhäsions-Assay wider (Abbildung 6.24 E und H). Die Präinkubation mit dem chemisch modifizierten Heparin-Derivat hatte weder Einfluss auf die Adhäsion von Thrombozyten an MDA-MB-231 Zellen noch an MCF-7 Zellen.

Entsprechend der Erwartungen aufgrund der fehlenden antikoagulativen Aktivität des 2-O-Desulfatierten Heparins und der aufgehobenen Bindungsfähigkeit an P-Selektin wurden durch die

Präinkubation des TRP mit 100 µg/mL des Heparin-Derivats weder die TCIPA (Abbildung 6.24 C und F) noch die Tumorzell-induzierte ATP-Freisetzung beeinflusst (Abbildung 6.24 D und G). Auch die TRAP-6 induzierte Thrombozytenaktivierung wurde durch den Einsatz von 2-O-Desulfatiertem Heparin nicht beeinträchtigt (Abbildung 6.24 A und B).

Um den Beitrag von P-Selektin zur Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung klar herausstellen zu können wurde neben der Untersuchung verschiedener Heparin-Derivate der Einfluss des selektiven Selektin-Inhibitors Bimosiamose untersucht. Bimosiamose ist ein glykosidisch-substituiertes Biphenylderivat und weist anders als die verwendeten Derivate des Heparins keine Oligosaccharid-Struktur auf (348).

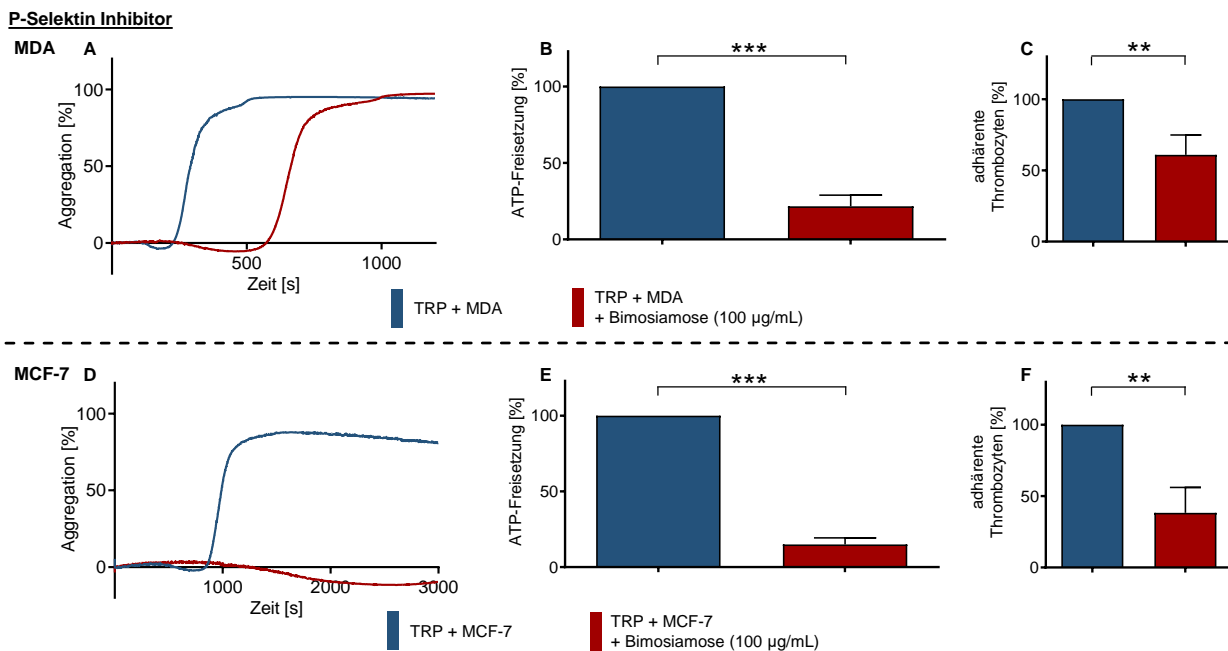


Abbildung 6.25 - Der Einfluss der Inhibition von P-Selektin auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung. Präinkubation des TRP für 30 Minuten mit einem P-Selektin Inhibitor (Bimosiamose, 100 µg/mL) oder der entsprechenden Menge DPBS. **A und B:** TCIPA bzw. ATP-Freisetzung nach Präinkubation mit Bimosiamose bzw. DPBS und Zugabe von MDA-MB-231 Zellen (1×10^4 /mL). **C:** Quantifizierung adhärenzter Thrombozyten, welche mit Bimosiamose bzw. DPBS präinkubiert wurden, an MDA-MB-231 Zellen. **D und E:** TCIPA bzw. ATP-Freisetzung nach Präinkubation mit Bimosiamose bzw. DPBS und Zugabe von MCF-7 Zellen (1×10^4 /mL). **E:** Quantifizierung adhärenzter Thrombozyten, welche mit Bimosiamose bzw. DPBS präinkubiert wurden, an MCF-7 Zellen.

Die Präinkubation des TRP mit 100 µg/mL Bimosiamose zeigte einen deutlichen Effekt auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung. Die *lagtime* der MDA-MB-231 induzierten TCIPA war mehr als verdoppelt und die Freisetzung von ATP aus der dichten Granula war um 80 % reduziert (Abbildung 6.25 A und B). Die MCF-7 Zell-induzierte TCIPA wurde durch die Präinkubation mit Bimosiamose über den gesamten Detektionszeitraum unterbunden (Abbildung 6.25 D). Die ATP-Freisetzung war um mehr als 85 % gesenkt und lag damit auf dem Niveau des detektierbaren ATP bei der Verwendung ruhender Thrombozyten (Abbildung 6.25 E). Auch die Zahl adhärenzter Thrombozyten an die beiden Mammakarzinomzelllinien war durch die Präinkubation des TRP mit Bimosiamose signifikant gemindert (Abbildung 6.25 C und F).

Die Rolle des P-Selektins scheint sich nicht auf die eines Adhäsionsmoleküls zu beschränken, das die Bildung von Tumorzell-Thrombozyten-Heteroaggregaten unterstützt. Vielmehr deuten insbesondere die Ergebnisse der ATP-Freisetzung darauf hin, dass P-Selektin einen essentiellen Beitrag zur Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung leistet. Ob es sich dabei um einen Ligand-vermittelten Effekt handelte oder ob der Beitrag des P-Selektins zur Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung unabhängig von dem Vorhandensein potentieller P-Selektin Liganden ist, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

6.4.2 Einfluss einer Inhibition von P-Selektin auf die PAR-1 vermittelte Thrombozytenaktivierung

Um den allgemeinen Einfluss des P-Selektins auf die Aktivierung von Thrombozyten näher zu untersuchen, wurden die Versuche mit TRAP-6 als selektivem PAR-1 Agonisten wiederholt.

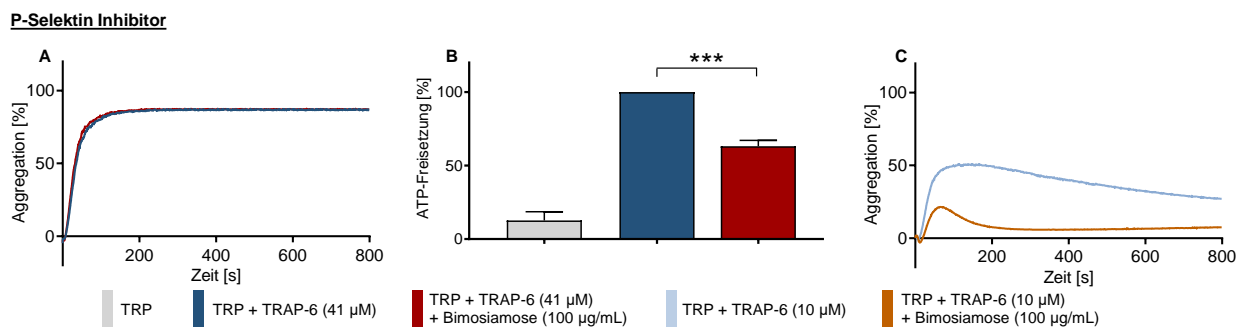


Abbildung 6.26 - Der Einfluss der Inhibition von P-Selektin auf die TRAP-6 induzierte Thrombozytenaktivierung. Präinkubation des TRP für 30 Minuten mit Bimosiamose (100 µg/mL) oder der entsprechenden Menge DPBS. **A:** Thrombozytenaggregation nach Präinkubation des TRP mit Bimosiamose bzw. DPBS und Zugabe von TRAP-6 (41 µM). **B:** ATP-Freisetzung nach Präinkubation des TRP mit Bimosiamose bzw. DPBS und Zugabe von TRAP-6 (41 µM). **C:** Thrombozytenaggregation nach Präinkubation des TRP mit Bimosiamose bzw. DPBS und Zugabe von TRAP-6 (10 µM).

Der Einsatz von Bimosiamose hatte keinen Effekt auf die Thrombozytenaggregation, die durch die Zugabe von 41 µM TRAP-6 induziert wurde (Abbildung 6.26 A). Die ATP-Freisetzung aus Thrombozyten, die durch Zugabe der gleichen Konzentration TRAP-6 aktiviert wurden, war jedoch signifikant reduziert (Abbildung 6.26 B). Da 41 µM eine recht hoch gewählte Konzentration des PAR-1 Agonisten ist, die unmittelbar nach Zugabe zu einer Vollaggregation der Thrombozyten führte, wurde in einem nächsten Experiment eine geringere Konzentration eingesetzt (Abbildung 6.26 C). Die Zugabe von 10 µM TRAP-6 führte zu einer maximalen Thrombozytenaggregation von 50 %. Durch Präinkubation des TRP mit Bimosiamose wurde die maximale Aggregation auf 25 % gesenkt. Zudem bildeten sich scheinbar nur instabile Thrombozytenagglomerate, sodass die Aggregation reversibel war (Abbildung 6.26 C). Diese Ergebnisse werden von den zuvor dargestellten Effekten der unterschiedlichen Heparin-Derivate auf die TRAP-6 induzierte Thrombozytenaktivierung unterstützt. Fondaparinux (Abbildung 6.21) sowie 2-O-Desulfatiertes Heparin (Abbildung 6.24) hatten keinen Effekt auf die TRAP-6 vermittelte ATP-Freisetzung. Im Gegensatz dazu verminderte die Präinkubation des TRP mit dem P-Selektin inhibierenden Decasaccharid (Abbildung 6.22) bzw. RO-Heparin (Abbildung 6.23) die ATP-Freisetzung nach

Aktivierung der Thrombozyten mit TRAP-6 signifikant. Die Rolle des P-Selektins scheint sich dementsprechend nicht auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung zu beschränken.

Auch im Zuge einer PAR-1 vermittelten Aktivierung der Thrombozyten scheint P-Selektin, anders als bisher angenommen, einen additiven Effekt auf die Aktivierung zu haben, die über seine bekannten Eigenschaften als Adhäsionsmolekül hinausgehen. Vorhergehende Arbeiten unterstreichen die Hypothese eines Beitrags von P-Selektin zur allgemeinen Aktivierung von Thrombozyten. Beispielsweise wiesen P-Selektin defiziente Mäuse im Vergleich zum Wildtyp eine um 40 % verlängerte Blutungszeit nach einer Amputation der Schwanzspitze auf (396).

Der Einfluss von P-Selektin auf die PAR-1 vermittelte Thrombozytenaktivierung in Abwesenheit von Tumorzellen als potentielle Träger von P-Selektin Liganden kann als Hinweis auf einen Ligand-unabhängigen Effekt des P-Selektins auf die Thrombozytenaktivierung gewertet werden. Qi und Kollegen zeigten, dass P-Selektin mit intrazellulärem Talin-1 interagiert, was eine Aktivierung des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ zur Folge hat und in der Bildung eines P-Selektin- $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Talin-1 Komplexes mündet. Die Bildung dieses Komplexes führt zur Akkumulation von Thrombozyten im Tumorgewebe. Die Ergebnisse von Qi und Kollegen lieferten eindeutige Hinweise für ein P-Selektin induziertes Ligand-unabhängiges *signaling* in Thrombozyten und die Interaktion von P-Selektin mit weiteren Adhäsionsrezeptoren (323). Auch Barkalow und Kollegen beobachteten die Bildung von P-Selektin Heterodimeren mit weiteren Proteinen als Folge einer initialen Aktivierung der Thrombozyten (397). Um beurteilen zu können, inwieweit die Assoziation mit weiteren Proteinen und die Ausbildung von Heterokomplexen essentiell für den Beitrag des P-Selektins zur vollständigen Thrombozytenaktivierung ist, sind in Zukunft weitere Untersuchungen von Nöten.

6.4.3 Nachweis von P-Selektin auf der Oberfläche von ruhenden Thrombozyten, sowie nach einer Tumorzell-induzierten Aktivierung

Physiologisch befindet sich P-Selektin in ruhenden Thrombozyten in der α -Granula. Infolge einer Aktivierung der Thrombozyten und der sich anschließenden Sezernierung der α -Granula verschmelzen die α -Granula mit der äußeren Zellmembran der Thrombozyten, sodass P-Selektin auf der Zelloberfläche präsentiert wird (284). Um die Rolle des P-Selektins während der Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung näher charakterisieren zu können, wurde mittels durchflusszytometrischer Untersuchungen das Basallevel von P-Selektin auf ruhenden Thrombozyten bestimmt. Zudem wurde untersucht, wie sich die Menge von, auf der Oberfläche präsentem, P-Selektin nach Aktivierung der Thrombozyten mittels TRAP-6 bzw. durch Zugabe der Mammakarzinomzellen veränderte.

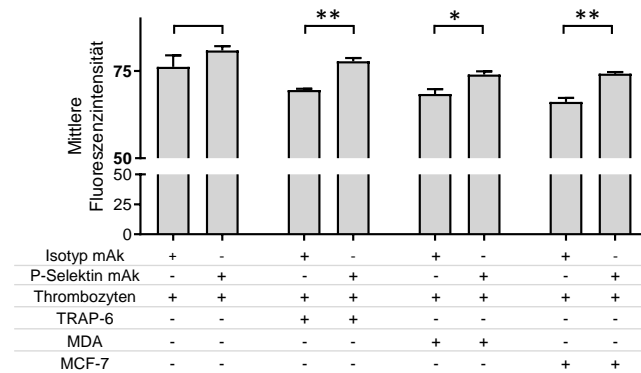


Abbildung 6.27 – **Durchflusszytometrischer Nachweis von P-Selektin auf der Oberfläche von Thrombozyten im ruhenden Zustand und nach der Aktivierung mit TRAP-6 oder MDA-MB-231 bzw. MCF-7 Zellen.** Der TRP wurde jeweils vor der Aktivierung mit einem FITC-markierten Antikörper gegen P-Selektin oder einer entsprechenden Isotypkontrolle inkubiert.

Die durchflusszytometrischen Untersuchungen zeigten ein geringes Basallevel P-Selektin auf der Oberfläche der Thrombozyten in recalcifiziertem TRP (Abbildung 6.27). Die Zugabe von Calcium schien dementsprechend keine nennenswerte Präaktivierung der Thrombozyten auszulösen, die unabhängig von einer Aktivierung mit Tumorzellen eine Präsentation von P-Selektin auf der thrombozytären Oberfläche zur Folge gehabt hätte. Die Zugabe von 41 μ M TRAP-6 oder 1×10^4 MDA-MB-231 bzw. MCF-7 Zellen pro Milliliter führten zu einem signifikanten Anstieg detektierbaren P-Selektins auf der Oberfläche der Thrombozyten (Abbildung 6.27).

Es wurde dementsprechend postuliert, dass P-Selektin infolge einer initialen Aktivierung der Thrombozyten aus der α -Granula an die Oberfläche gelangt und dort, im Zuge einer sekundären Aktivierung, eine weiterführende Rolle in der Thrombozytenaktivierung übernimmt.

6.4.4 Einfluss des P-Selektins auf die späte Phase der TCIPA

Mittels Durchflusszytometrie konnte nachgewiesen werden, dass zu Beginn der Experimente die Thrombozyten im recalcifizierten TRP keine signifikanten Mengen P-Selektin auf ihrer Oberfläche exprimierten und P-Selektin demzufolge nicht an einem initialen Kontakt mit den Tumorzellen und der initialen Tumorzell-induzierten Aktivierung beteiligt war. Um die Rolle des P-Selektins in der späten Phase der TCIPA zu evaluieren, wurden entsprechende Experimente im Aggregometer durchgeführt.

Der TRP wurde ohne eine Präinkubation mit den verwendeten Inhibitoren vorbereitet. Die TCIPA wurde durch die Zugabe von MDA-MB-231 bzw. MCF-7 Zellen in jeweils zwei Proben induziert. Nach Durchlaufen des *shape changes*, also nach der initialen Aktivierung der Thrombozyten, wurden jeweils einer Probe der entsprechende Inhibitor (100 µg/mL 2-O-Desulfatiertes Heparin, 100 µg/mL RO-Heparin oder 100 µg/mL Bimosiamose) zugegeben und der weitere Verlauf der Aggregation beobachtet.

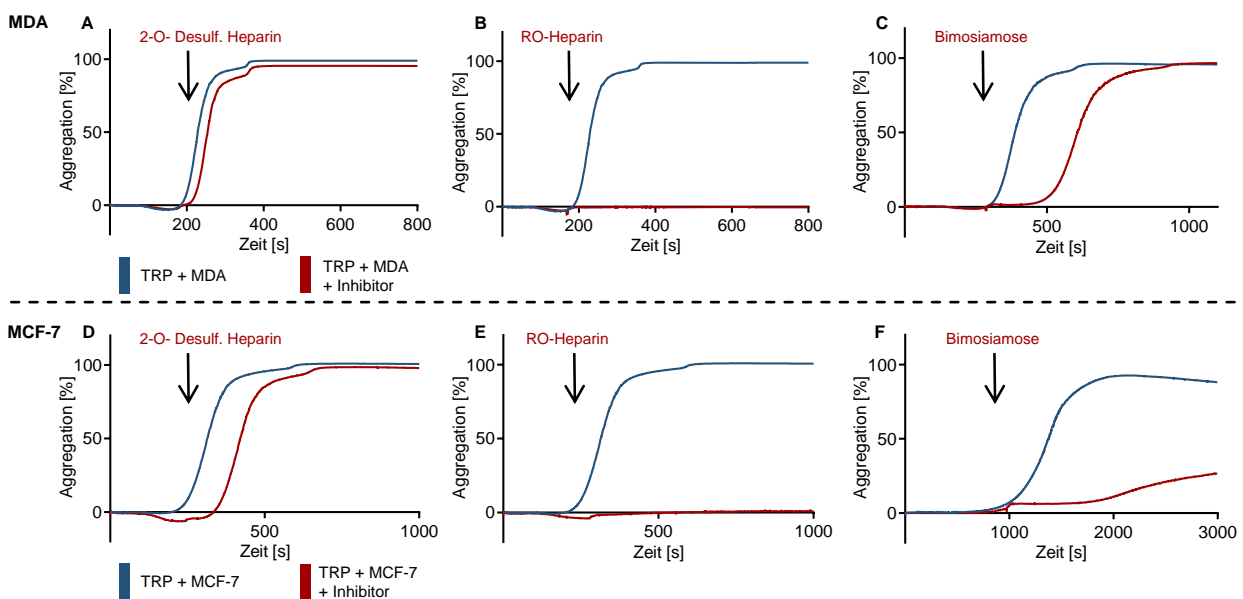


Abbildung 6.28 – **Einfluss des P-Selektins auf die späte Phase der TCIPA.** **A-C:** Induktion der TCIPA durch Zugabe von MDA-MB-231 Zellen (1×10^4 /mL). **D-E:** Induktion der TCIPA durch Zugabe von MCF-7 Zellen (1×10^4 /mL). Zugabe der jeweiligen Inhibitoren nach Durchlaufen des *shape changes*. Zeitpunkt der Zugabe durch Pfeile gekennzeichnet. **A, D:** Zugabe von 2-O-Desulfatiertem Heparin (100 µg/mL). **B, E:** Zugabe von RO-Heparin (100 µg/mL). **C, F:** Zugabe von Bimosiamose (100 µg/mL).

Die Zugabe von 2-O-Desulfatiertem Heparin nach Durchlaufen des *shape changes* hatte keinen Einfluss auf die weiterführende MDA-MB-231 Zell-induzierte Thrombozytenaggregation (Abbildung 6.28 A). Auch der Effekt auf die MCF-7 Zell-induzierte TCIPA war sehr gering (Abbildung 6.28 D). Die Zugabe von RO-Heparin verhinderte im Gegensatz dazu die weitere TCIPA vollständig (Abbildung 6.28 B und E). Auch der P-Selektin Inhibitor Bimosiamose führte zu einer Verzögerung der MDA-MB-231 induzierten TCIPA (Abbildung 6.28 C) und einem Ausbleiben der weiteren Aggregation im Falle der MCF-7 induzierten TCIPA (Abbildung 6.28 F). Die Ergebnisse korrelieren mit denen jener Versuche, in denen der TRP vor der Zugabe der Tumorzellen mit Bimosiamose

präinkubiert wurde (Abbildung 6.25). Es scheint dementsprechend irrelevant, ob P-Selektin bereits während der initialen Aktivierung der Thrombozyten blockiert ist, oder erst inhibiert wird, wenn die initiale Thrombozytenaktivierung bereits erfolgt ist.

Die Möglichkeit der Einflussnahme auf die späte TCIPA durch Einsatz von P-Selektin inhibierenden Substanzen unterstreicht die Rolle von P-Selektin für die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung. Die initiale Aktivierung der Thrombozyten scheint unabhängig von P-Selektin, beispielsweise durch eine Tumorzell-induzierte Thrombin-Generierung angestoßen zu werden (siehe Übersichtsabbildung Abbildung 6.29).

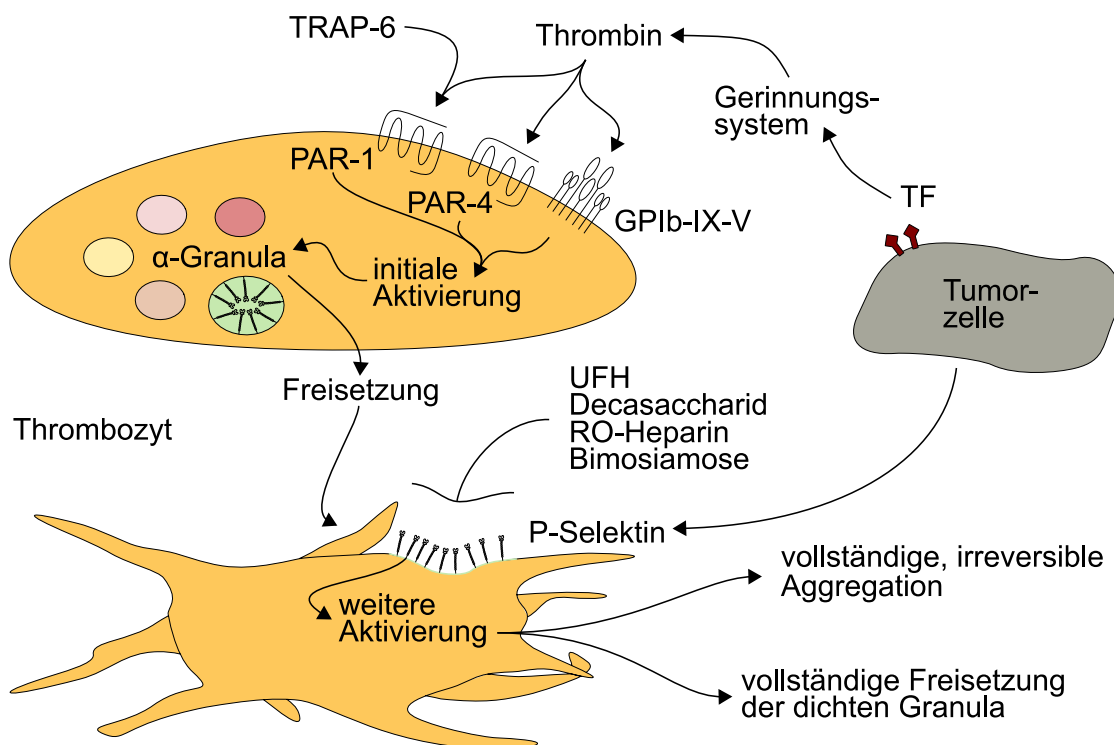


Abbildung 6.29 – Übersicht zur Verdeutlichung der Hypothese des Einflusses von P-Selektin auf die sekundäre Thrombozytenaktivierung und einer möglichen Inhibition dieser.

Im Zuge einer initialen Aktivierung gelangt P-Selektin aus der α-Granula an die Thrombozyten-Oberfläche und nimmt eine wichtige Rolle in der weiteren Thrombozytenaktivierung und -aggregation ein, sodass eine Blockade von P-Selektin eine fortschreitende Aktivierung der Thrombozyten nahezu vollständig unterbindet. Der inhibierende Effekt der Bimosiamose auf die PAR-1 vermittelte Thrombozytenaktivierung legt die Vermutung nahe, dass sich die Rolle des P-Selektins nicht auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung beschränkt (Abbildung 6.26).

6.4.5 Einfluss der Inhibition von P-Selektin auf die Tumorzell-induzierte Freisetzung verschiedener Proteine aus der thrombozytären α -Granula

Nachdem die Bedeutung des P-Selektins für die TCIPA und für die Tumorzell-induzierten ATP-Freisetzung gezeigt werden konnte, wurde in einem nächsten Schritt der Einfluss des Selektin-Inhibitors Bimosiamose auf die Freisetzung der α -Granula evaluiert. Dazu wurde ein *Proteome Profiler Array* durchgeführt (Abschnitt 5.6.2).

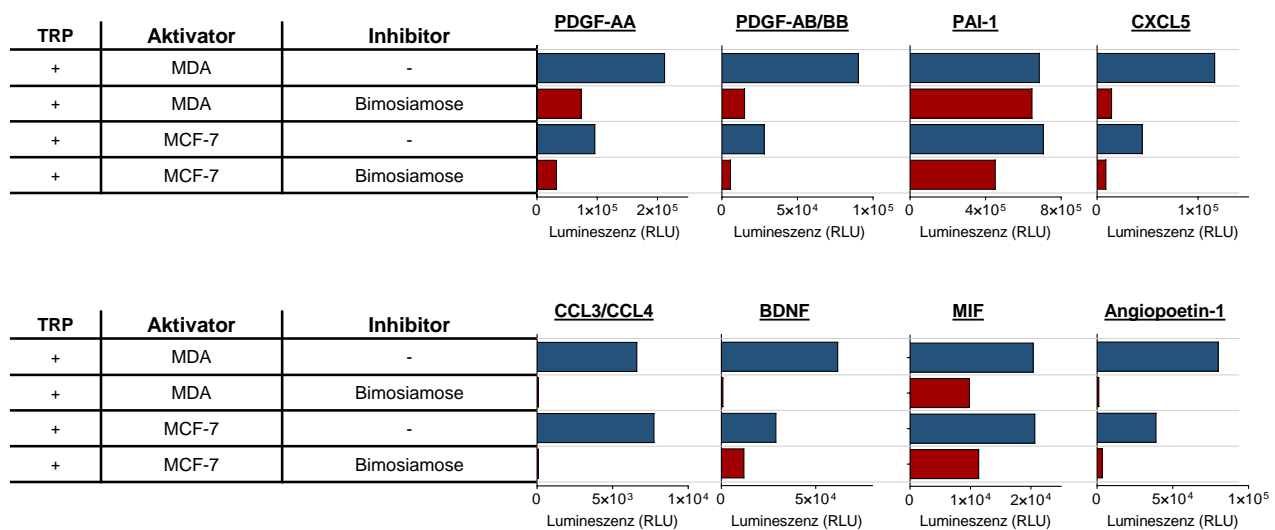


Abbildung 6.30 - Quantifizierung der Freisetzung verschiedener Proteine aus der thrombozytären α -Granula und der Einfluss der Inhibition von P-Selektin auf diese. Präinkubation des TRP für 30 Minuten mit Bimosiamose (100 μ g/mL) oder DPBS. Aktivierung der Thrombozyten wurde durch Zugabe von MDA-MB-231 oder MCF-7 Zellen (1×10^4 /mL) induziert. Die relative Konzentration der Proteine im Überstand der aktivierten Thrombozyten wurde mittels eines membran-basierten Antikörper-Arrays bestimmt. Dargestellt ist die mit der Proteinmenge korrelierende Lumineszenz (RLU).

Es wurde die Freisetzung von acht Tumor-assoziierten Proteinen aus der thrombozytären α -Granula untersucht. Diese waren die Wachstumsfaktoren PDGF, BDNF und Angiopoetin-1, die Zytokine CXCL5, CCL3/CCL4 und MIF sowie PAI-1 (Abbildung 6.30).

Beide untersuchten Mammakarzinomzelllinien induzierten eine ausgeprägte Freisetzung aller Proteine. Interessanterweise wurden die Proteine PDGF, CXCL5, BDNF und Angiopoetin-1 nach einer MDA-MB-231 Zell-induzierten Thrombozytenaktivierung in größerem Ausmaß freigesetzt als nach einer MCF-7 induzierten Aktivierung. Im Gegensatz dazu wurden PAI-1, CCL3/CCL4 und MIF unabhängig von der verwendeten Zelllinie in ähnlichem Maß sezerniert.

Die Präinkubation des TRP mit Bimosiamose hatte je nach betrachtetem Protein unterschiedlich ausgeprägte Effekte auf dessen Freisetzung aus der α -Granula. Während die Freisetzung der meisten Proteine durch die Blockade von P-Selektin deutlich reduziert wurde, wurde die Sekretion von PAI-1 nur wenig beeinflusst. Experimente mit Thrombozyten von P-Selektin defizienten Mäusen zeigten analog zu den hier gezeigten Ergebnissen eine Beeinflussung der Sekretion der α -Granula

aufgrund eines Mangels an P-Selektin und eine verminderte Sekretion von VEGF nach Aktivierung der Thrombozyten mit B16F10 Melanomzellen (398).

Die unterschiedliche Beeinflussung der Freisetzung verschiedener Proteine durch die Inhibition von P-Selektin könnte durch das Vorhandensein verschiedener Subpopulationen der α -Granula in Thrombozyten zu erklären sein, die sich in ihrem Sekretionsverhalten unterscheiden (399).

Es kann postuliert werden, dass P-Selektin mit verschiedenen Proteinen, z.B. PAI-1 in den α -Granula colokalisiert vorliegt. Diese α -Granula werden im Zuge einer initialen Thrombozytenaktivierung sezerniert, sodass die Inhibition von P-Selektin keinen Einfluss auf die Freisetzung dieser colokalisierten Proteine zeigte. Andere Subpopulationen der α -Granula werden hingegen erst zu späteren Zeitpunkten der Thrombozytenaktivierung sezerniert, sodass die Blockade des P-Selektins und die damit einhergehende Inhibition der sekundären Thrombozytenaktivierung eine verminderte Freisetzung dieser α -Granula zur Folge hatte.

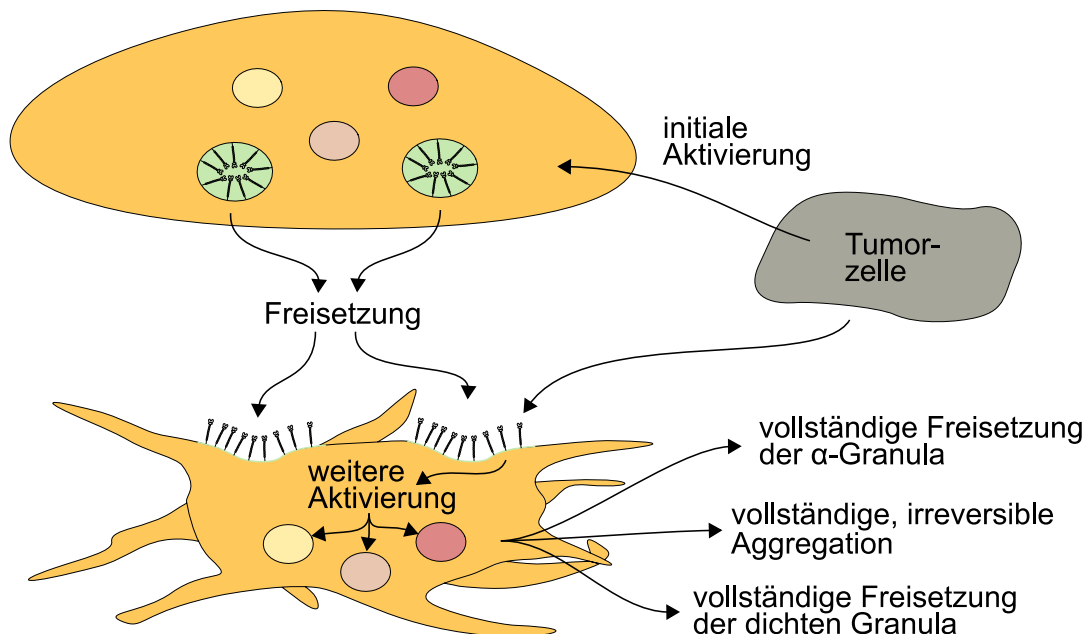


Abbildung 6.31 – Erweiterung der in Abbildung 6.29 dargestellten Hypothese zur Rolle des P-Selektins in der sekundären Thrombozytenaktivierung. Differenzierte Freisetzung der P-Selektin enthaltenden α -Granula.

Abbildung 6.31 verdeutlicht die zuvor erörterte Hypothese des Einflusses von P-Selektin auf die sekundäre Thrombozytenaktivierung (Abbildung 6.29) und die Erweiterung der Hypothese aufgrund der Ergebnisse zur differenzierten Freisetzung von unterschiedlichen Subtypen der α -Granula.

6.5 Beitrag von Tumorzell-ständigen Liganden des P-Selektins zur TCIPA

Die Relevanz des P-Selektins gerade in der späten Phase der Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung konnte anhand der vorausgegangenen Versuche mit verschiedenen Heparin-Derivaten und P-Selektin Inhibitoren belegt werden. Der Einfluss einer Inhibition von P-Selektin auf die PAR-1 vermittelte Thrombozytenaktivierung legte die Vermutung nahe, dass die

Rolle des P-Selektins in der Aktivierung der Thrombozyten zumindest teilweise unabhängig von etwaigen Liganden zu sein scheint. Um die Interaktionen zwischen thrombozytärem P-Selektin und Tumorzellen dennoch näher zu charakterisieren und etwaige Einflüsse Tumorzell-assoziiierter P-Selektin Liganden aufzudecken, wurde deren Rolle in einem nächsten Schritt näher beleuchtet.

6.5.1 Nachweis der Bindung von P-Selektin an Tumorzellen

Um die generelle Bindungsfähigkeit von P-Selektin an den verwendeten Mammakarzinomzellen zu untersuchen, wurden durchflusszytometrische Experimente unter Verwendung von rekombinatem P-Selektin durchgeführt. Dieses rekombinante P-Selektin war an humanes IgG₁ gekoppelt, sodass gebundenes P-Selektin mittels eines gegen dieses Fc-Fragment gerichteten sekundären Antikörpers detektiert werden konnte.

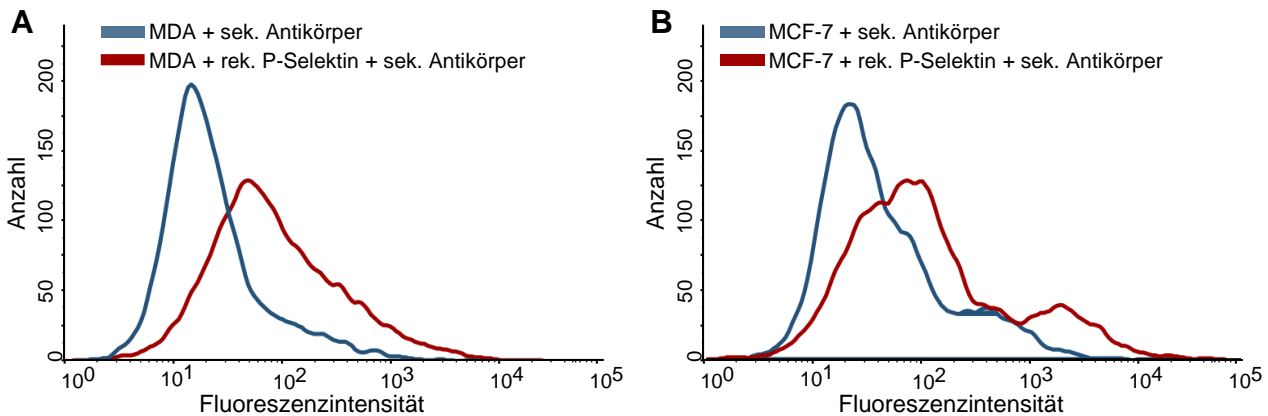


Abbildung 6.32 – **Durchflusszytometrische Untersuchung potentieller P-Selektin Liganden auf der Oberfläche von Tumorzellen.** Inkubation von MDA-MB-231(A) bzw. MCF-7 Zellen (B) mit rekombinatem P-Selektin (Fc-Chimäre) sowie einem FITC-markiertem sekundären Antikörper gegen das Fc-Fragment. Die Kontrollproben wurden nur mit dem sekundären Antikörper inkubiert.

Sowohl an MDA-MB-231 als auch an MCF-7 Zellen konnte eine Bindung von rekombinatem P-Selektin detektiert werden (Abbildung 6.32). Die im Vergleich zu Antikörper-basierten durchflusszytometrischen Experimenten geringe Rechtsverschiebung der Kurven ist in der vergleichsweise hohen Dissoziationskonstante von P-Selektin an seine Liganden begründet, sodass in den Proben während der Messung ein Gleichgewicht aus gebundenem und ungebundenem P-Selektin vorlag (193). Dennoch konnte auf Basis der durchflusszytometrischen Versuche von einem Vorhandensein von P-Selektin Liganden auf der Oberfläche der untersuchten Mammakarzinomzellen ausgegangen werden.

6.5.2 Einfluss der P-Selektin Liganden auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung

Um den Einfluss von potentiell auf Mammakarzinomzellen exprimierten Liganden des P-Selektins auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung zu evaluieren, wurden Tumorzellen mit rekombinatem P-Selektin inkubiert und anschließend hinsichtlich einer Tumorzell-induzierten

Thrombozytenaktivierung untersucht. Die Inkubation mit rekombinantem P-Selektin diente der Absättigung der entsprechenden Bindungspartner, sodass diese der Interaktion mit thrombozytärem P-Selektin entzogen wurden. Sowohl die so behandelten Tumorzellen als auch die Kontrollproben ohne rekombinantes P-Selektin wurden mit einem Antikörper gegen FcγRIIIa inkubiert (Klon IV.3, 13 µg/mL), um eine eventuelle Bindung des, an das rekombinante P-Selektin gekoppelten, Fc-Fragments zu unterbinden.

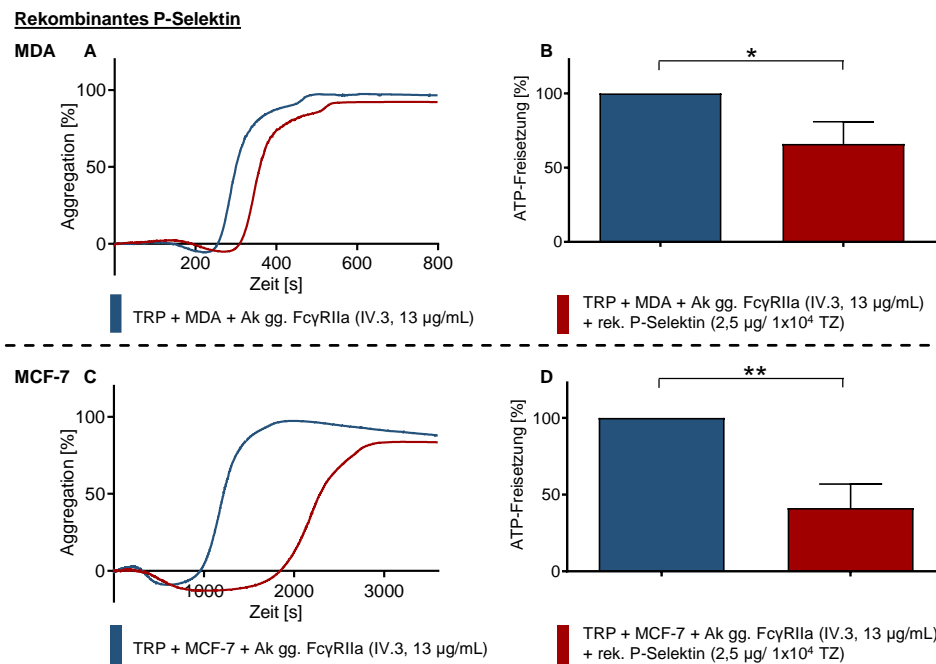


Abbildung 6.33 - Der Einfluss der Absättigung von Tumorzell-ständigen P-Selektin Liganden auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung. Präinkubation des TRP für 30 Minuten mit einem Antikörper gegen FcγRIIIa (IV.3, 13 µg/mL). Inkubation der Tumorzellen mit rekombinantem P-Selektin (Fc-Chimäre, 2,5 µg/1x10⁴ TZ) bzw. DPBS. **A** und **B**: TCIPA bzw. ATP-Freisetzung, die durch Zugabe von entsprechend präinkubierten MDA-MB-231 Zellen (1x10⁴/mL) induziert wurden. **C** und **D**: TCIPA bzw. ATP-Freisetzung, die durch Zugabe von entsprechend präinkubierten MCF-7 Zellen (1x10⁴/mL) induziert wurden.

Die Absättigung von P-Selektin Liganden auf der Oberfläche von Mammakarzinomzellen hatte einen Einfluss auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung, der je nach betrachteter Zelllinie unterschiedlich ausgeprägt war (Abbildung 6.33). Die Inkubation von MDA-MB-231 Zellen mit rekombinantem P-Selektin zeigte keinen ausgeprägten Effekt auf die TCIPA, reduzierte die Tumorzell-induzierte ATP-Freisetzung jedoch signifikant (Abbildung 6.33 A und B). In Bezug auf die MCF-7 Zell-induzierte Thrombozytenaktivierung konnte ein ausgeprägter Effekt einer Absättigung von P-Selektin Liganden detektiert werden. Die *lagtime* der TCIPA verlängerte sich nach der Inkubation der Tumorzellen mit rekombinantem P-Selektin auf das doppelte (Abbildung 6.33 C). Die ATP-Freisetzung wurde um mehr als 50 % reduziert (Abbildung 6.33 D).

Diese Beobachtungen decken sich mit den Beobachtungen nach Präinkubation der Tumorzellen mit dem P-Selektin Inhibitor Bimosiamose (Abbildung 6.25). Sowohl die Blockade von thrombozytärem P-Selektin als auch die Absättigung von Liganden des P-Selektins auf der Oberfläche von

Tumorzellen zeigte einen Effekt auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung, wobei dieser bei MCF-7 Zellen stärker ausgeprägt war als bei MDA-MB-231 Zellen.

Zur weiteren Untersuchung der Rolle von P-Selektin Liganden in der Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung wurden Tumorzellen mit 2F-Peracetyl-Fucose, einem Fucosyltransferase-Inhibitor (FTI), behandelt. Daraus resultierten Zellen, die sich durch die Abwesenheit von sLe^x auf ihrer Oberfläche auszeichneten. Diese Tumorzellen wurden zunächst hinsichtlich ihrer Bindungsfähigkeit von P-Selektin im Durchflusszytometer vermessen. Anschließend wurden Versuche zur TCIPA sowie zur Tumorzell-induzierten ATP-Freisetzung durchgeführt.

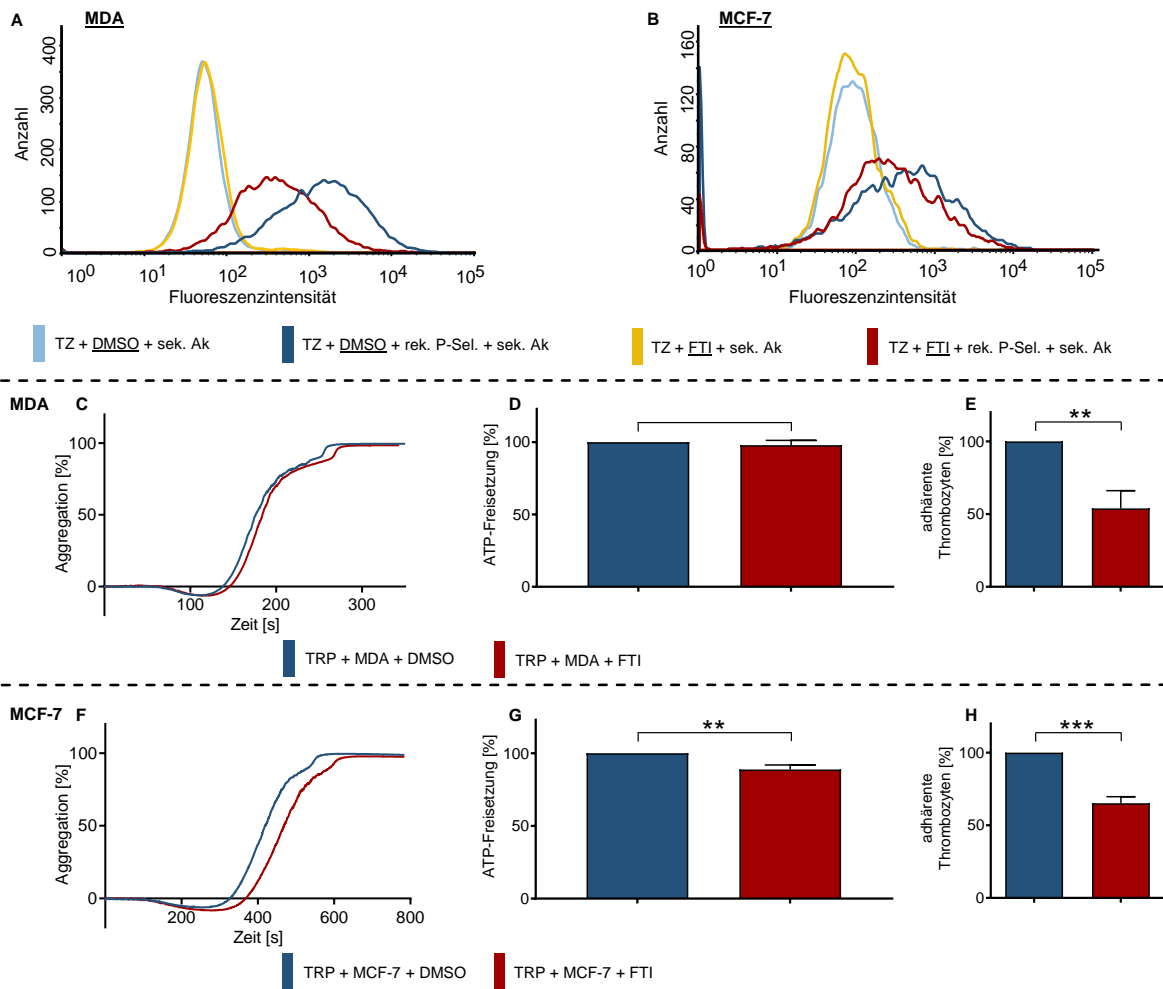


Abbildung 6.34 – Einfluss der Inhibition der Synthese von P-Selektin Liganden auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung. **A und B:** Durchflusszytometrische Untersuchung von MDA-MB-231 bzw. MCF-7 Zellen, die über 72 Stunden mit einem Fucosyltransferase-Inhibitor (FTI) bzw. DMSO inkubiert wurden. Inkubation der Zellen mit rekombinantem P-Selektin (Fc-Chimäre) sowie einem FITC-markiertem, sekundären Antikörper, der gegen das Fc-Fragment gerichtet ist. Die Kontrollproben wurden nur mit dem sekundären Antikörper inkubiert. **C und D:** TCIPA bzw. ATP-Freisetzung nach Präinkubation von MDA-MB-231 Zellen über 72 Stunden mit FTI bzw. DMSO und Zugabe von 1×10⁴/mL Tumorzellen zu TRP. **E:** Quantifizierung adhärenz Thrombozyten an MDA-MB-231 Zellen, welche mit FTI oder DMSO präinkubiert wurden. **F und G:** TCIPA bzw. ATP-Freisetzung nach Präinkubation von MCF-7 Zellen über 72 Stunden mit FTI bzw. DMSO und Zugabe von 1×10⁴/mL Tumorzellen zu TRP. **H:** Quantifizierung adhärenz Thrombozyten an MCF-7 Zellen, welche mit FTI oder DMSO präinkubiert wurden.

Die Inkubation der beiden Mammakarzinomzelllinien mit einem FTI führte zu einer detektierbaren Abnahme gebundenen P-Selektins, besonders an MDA-MB-231 Zellen (Abbildung 6.34 A und B).

Die reduzierte Präsentation von P-Selektin Liganden führte zudem zu einer signifikanten Abnahme adhärenter Thrombozyten an den mit FTI inkubierten Tumorzellen (Abbildung 6.34 E und H).

Entgegen den Erwartungen konnte jedoch kein, bzw. lediglich ein geringer Effekt einer Inhibition der Fucosyltransferase auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung festgestellt werden. Die TCIPA zeigte sich weder nach Inkubation von MDA-MB-231 Zellen noch von MCF-7 Zellen jeweils mit dem FTI beeinflusst (Abbildung 6.34 C und F). Auch die ATP-Freisetzung nach Aktivierung der Thrombozyten mit MDA-MB-231 Zellen war durch den Einsatz eines FTI unbeeinflusst. Lediglich die MCF-7 Zell-induzierte ATP-Freisetzung war durch die Inhibition der Fucosyltransferase signifikant reduziert. Möglicherweise war die Inkubation mit 2F-Peracetyl-Fucose nicht ausreichend, um die Expression von sLe^x-haltigen Liganden vollständig zu unterbinden, sodass zwar die Adhäsion der Thrombozyten an entsprechend behandelte Tumorzellen signifikant gemindert war, eine Aktivierung der Thrombozyten jedoch nur in geringem Maße (bei MCF-7 Zellen) beeinflusst wurde. Eventuell wurde die inhibierte Expression von P-Selektin Liganden seitens der Tumorzellen auch durch alternative Mechanismen der Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung kompensiert.

Um gezielt den Einfluss unterschiedlicher, potentiell auf den beiden Tumorzelllinien exprimierten, Liganden näher charakterisieren zu können, wurden im Folgenden die beiden P-Selektin Liganden CD24 und PSGL-1 untersucht. Dazu wurde zunächst die Expression der beiden Oberflächenproteine auf den MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen mittels Durchflusszytometrie evaluiert.

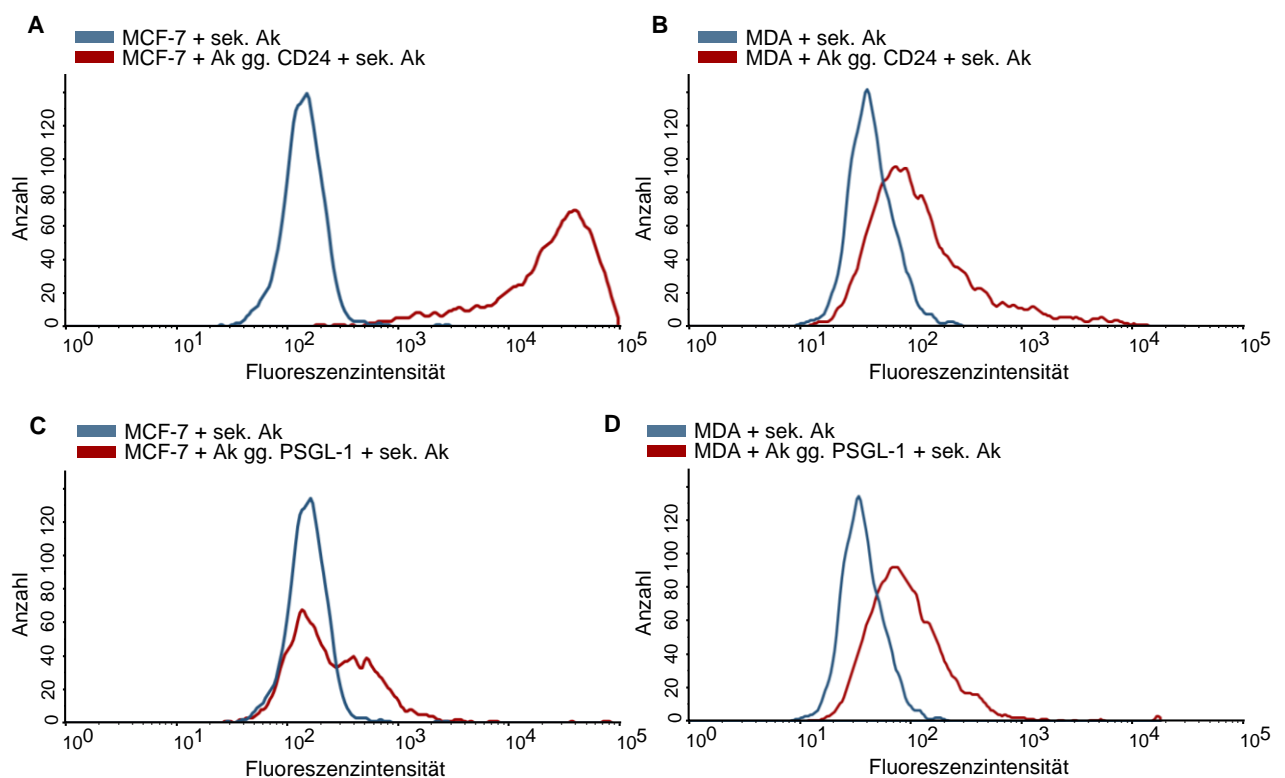


Abbildung 6.35 – **Durchflusszytometrische Untersuchung der Expression von PSGL-1 sowie CD24 auf der Oberfläche von MDA-MB-231 bzw. MCF-7 Zellen.** A und B: Präsentation von PSGL-1 auf der Oberfläche von MDA-MB-231 bzw. MCF-7 Zellen. C und D: Präsentation von CD24 auf der Oberfläche von MDA-MB-231 bzw. MCF-7 Zellen. Es handelt sich um repräsentative Graphen einer Messung (n=3).

CD24 wird als prognostischer Marker im Zuge diagnostischer Verfahren bei Brustkrebspatientinnen verwendet (307). Die Expression von CD24 zeigte sich bei invasiven Karzinomen im Vergleich zu lokalen Läsionen signifikant erhöht (400). Die Beteiligung von CD24 an der Bildung von Metastasen wurde bereits mit seiner Funktion als Ligand von P-Selektin assoziiert (401).

MCF-7 Zellen werden als CD44⁺/CD24⁺ beschrieben (402). Ma und Kollegen konnten zeigen, dass ein *knockdown* von CD24 in MCF-7 Zellen die Proliferation sowie Invasion der Tumorzellen minderte und ihre Sensitivität gegenüber Tamoxifen steigerte (403). Die durchflusszytometrischen Untersuchungen untermauerten die hohe Dichte an CD24 auf der Oberfläche von MCF-7 Zellen, die sich in einer starken Rechtsverschiebung der mit dem entsprechendem Antikörper inkubierten Proben manifestierte (Abbildung 6.35 A).

Im Vergleich zu MCF-7 Zellen wiesen MDA-MB-231 Zellen eine geringe CD24 Expression und damit einhergehend eine geringe Rechtsverschiebung auf (Abbildung 6.35 B). MDA-MB-231 Zellen werden in der Literatur als CD44⁺/CD24^{low/-} beschrieben (404). Dieses Profil scheint mit Stammzell-ähnlichen Eigenschaften der Tumorzellen und einem deutlich erhöhten tumorigenen Potential einherzugehen (405).

Thèorêt und Kollegen zeigten bereits, dass P-Selektin infolge der Interaktion mit seinem Liganden PSGL-1 zu der Aktivierung von Thrombozyten sowie zur Thrombozytenadhäsion und zur Bildung von Mikroaggregaten beiträgt (406). Hinsichtlich PSGL-1 konnte im Zuge der durchflusszytometrischen Untersuchungen jedoch weder für MCF-7 noch für MDA-MB-231 eine Expression festgestellt werden (Abbildung 6.35 C und D), sodass die Beteiligung von PSGL-1 an der MDA-MB-231 bzw. MCF-7 Zell-induzierten Thrombozytenaktivierung ausgeschlossen werden konnte.

6.5.2.1 Einfluss von CD24 auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung

Da mittels durchflusszytometrischer Versuche gezeigt werden konnte, dass sich MCF-7 Zellen im Vergleich zu MDA-MB-231 Zellen durch eine hohe Dichte von CD24 auf ihrer Oberfläche auszeichnen (Abbildung 6.35), wird im Folgenden der Einfluss dieses P-Selektin Liganden auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung näher beleuchtet.

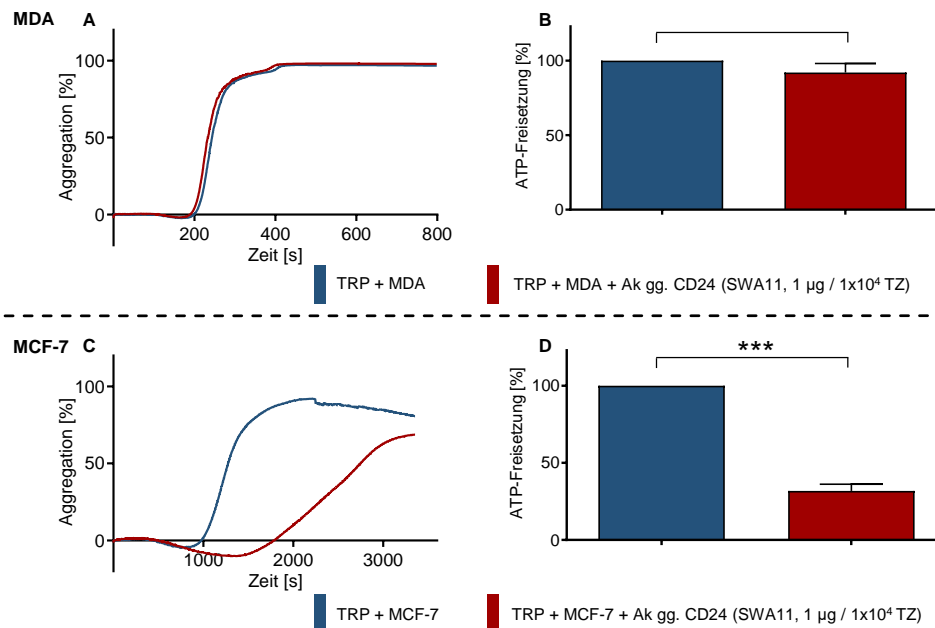


Abbildung 6.36 – **Beitrag von CD24 zur Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung.** Präinkubation der Tumorzellen für 30 Minuten mit einem Antikörper, der gegen CD24 gerichtet ist (SWA11, 1 µg/1x10⁴ TZ) bzw. DPBS. **A** und **B:** TCIPA bzw. ATP-Freisetzung nach Präinkubation von MDA-MB-231 Zellen mit SWA11 bzw. DPBS und Zugabe von 1x10⁴/mL Tumorzellen zu TRP. **C** und **D:** TCIPA bzw. ATP-Freisetzung nach Präinkubation von MCF-7 Zellen mit SWA11 bzw. DPBS und Zugabe von 1x10⁴/mL Tumorzellen zu TRP.

Die beiden untersuchten Mammakarzinomzelllinien wurden mit einem Antikörper gegen CD24 (Klon: SWA11) präinkubiert und anschließend für Experimente zur Evaluation der Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung verwendet. Die Blockade von CD24 auf MDA-MB-231 Zellen hatte keinen Einfluss auf die Thrombozytenaktivierung (Abbildung 6.36 A und B). Diese Beobachtung entspricht den Erwartungen, da zuvor mittels Durchflusszytometrie gezeigt werden konnte, dass MDA-MB-231 Zellen keine nennenswerte CD24-Expression aufweisen (Abbildung 6.35 B) und CD24 dementsprechend in Bezug auf Interaktionen zwischen MDA-MB-231 Zellen und Thrombozyten irrelevant zu sein scheint.

Die Präinkubation von MCF-7 Zellen mit einem gegen CD24-gerichteten Antikörper führte zu einer Verdoppelung der *lagtime* während der TCIPA (Abbildung 6.36 C) und zu einer Reduktion der Tumorzell-induzierten ATP-Freisetzung um 70 %. Die Interaktion zwischen CD24 auf MCF-7 Zellen und P-Selektin, das nach einer initialen Aktivierung der Thrombozyten auf der Oberfläche der Thrombozyten präsentiert wird, scheint dementsprechend ein elementarer Mechanismus der MCF-7 induzierten Thrombozytenaktivierung zu sein.

Um ein tieferes Verständnis der allgemeinen Rolle von CD24 in der Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung, abseits von MCF-7 Zellen, zu erlangen, wurden die Versuche mit A375 Melanomzellen wiederholt. Dabei wurden A375 Zellen verwendet, die sich durch eine stabile Überexpression von CD24 auszeichneten (A375-CD24). Diese wurden mit dem Wildtyp (A375wt) verglichen, sodass der direkte Einfluss von CD24 auf die A375 Zell-induzierte Thrombozytenaktivierung evaluiert werden konnte.

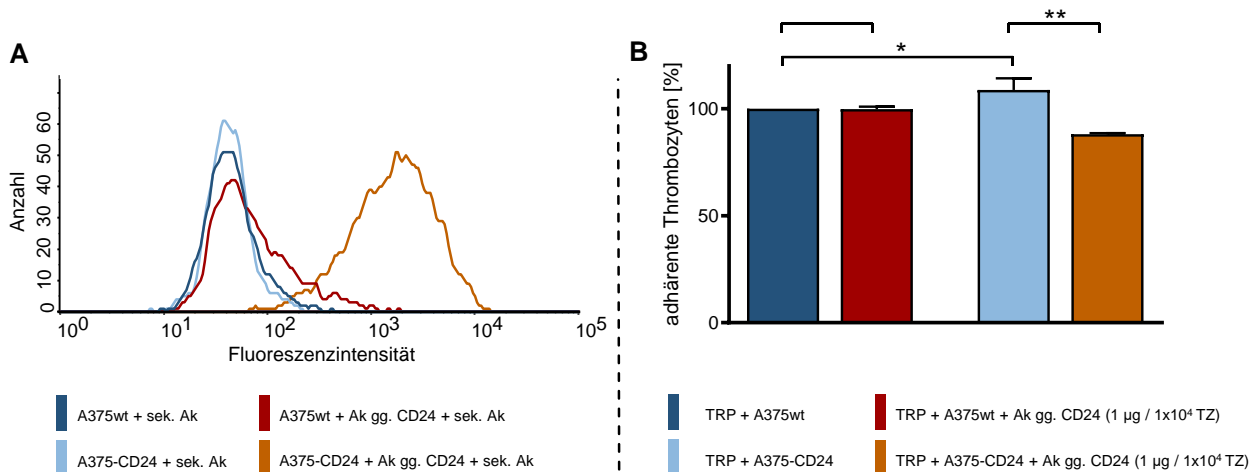


Abbildung 6.37 – Charakterisierung von A375wt sowie A375-CD24 Zellen hinsichtlich ihrer CD24-Expression und der Adhäsion an Thrombozyten. **A:** Durchflusszytometrische Untersuchung von A375wt sowie A375-CD24 Zellen hinsichtlich der Expression von CD24 auf ihrer Oberfläche. **B:** Quantifizierung adhärenter Thrombozyten an A375wt bzw. A375-CD24 Zellen, welche mit einem Antikörper gegen CD24 (SWA11; 1 µg/1x10⁴ TZ) oder DPBS präinkubiert wurden.

Routinemäßig wurde die Transfektion der A375 Zellen mit CD24 mithilfe des Durchflusszytometers sichergestellt. A375-CD24 Zellen zeichneten sich durch eine, im Vergleich zu A375wt Zellen, deutlich gesteigerte Expression von CD24 auf ihrer Oberfläche aus (Abbildung 6.37 A). Im nächsten Schritt wurde der Einfluss von CD24 auf die Adhäsion der Tumorzellen an Thrombozyten untersucht (Abbildung 6.37 B). Die Relevanz von CD24 als Bindungspartner des P-Selektins für eine stabile Adhäsion von Tumorzellen und Thrombozyten konnte in vorhergehenden Arbeiten bereits gezeigt werden (407). Dies korreliert mit den Beobachtungen, dass die Überexpression von CD24 zu einer signifikanten Steigerung der Zahl adhärenter Thrombozyten an A375-CD24 Zellen im Vergleich zu A375wt Zellen führte (Abbildung 6.37 B). Die Präinkubation von A375-CD24 Zellen mit einem Antikörper gegen CD24 führte entsprechend zu einer signifikanten Abnahme der Zahl adhärenter Thrombozyten. CD24 ist dementsprechend an der Adhäsion von Thrombozyten an A375 Zellen beteiligt. Inwiefern das Oberflächenprotein auch zu der A375 Zell-induzierten Thrombozytenaktivierung beiträgt, wurde in weiteren Experimenten zu TCIPA und Tumorzell-induzierten ATP-Freisetzung untersucht.

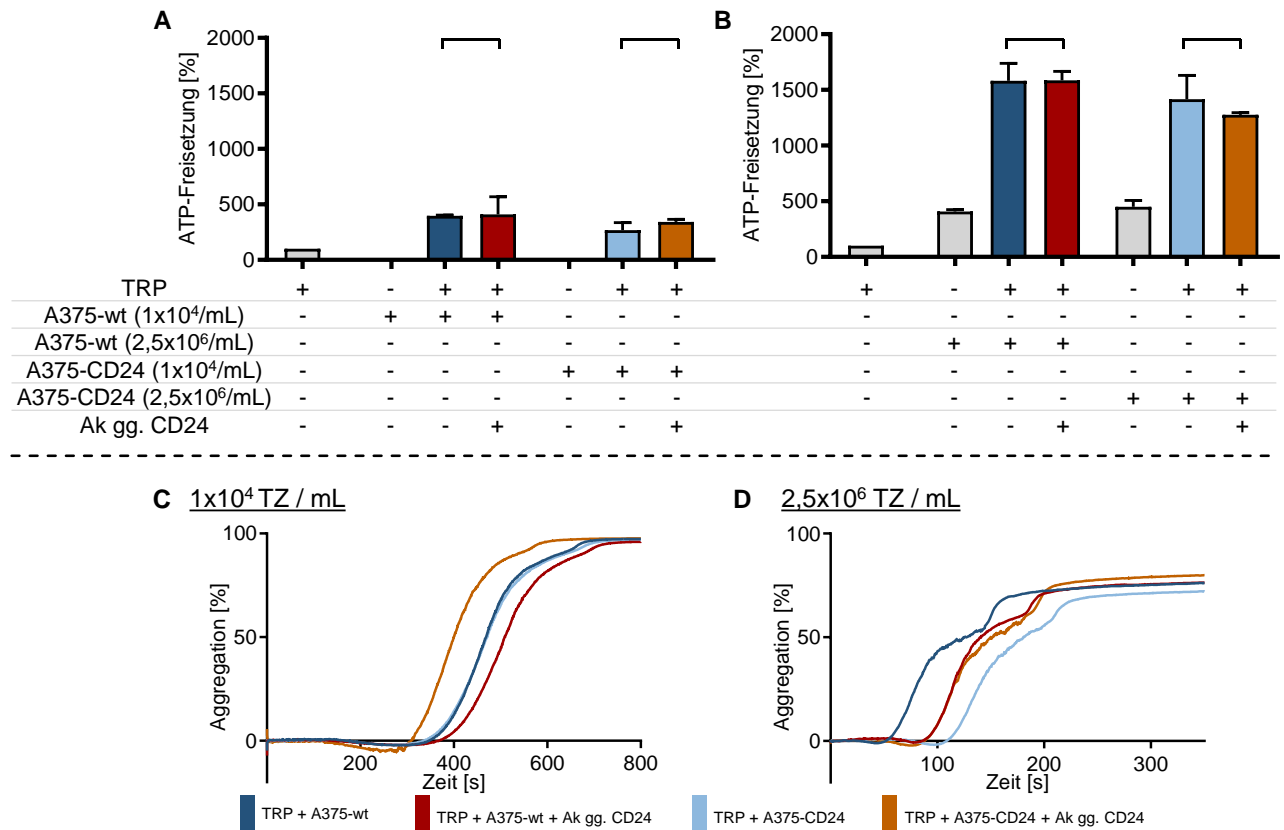


Abbildung 6.38 – **Einfluss der Überexpression von CD24 auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung.** **A:** ATP-Freisetzung nach Präinkubation von A375wt bzw. A375-CD24 Zellen mit einem Antikörper gegen CD24 (SWA11; $2 \mu\text{g}/1 \times 10^6$ TZ). Quantifizierung von ATP nach der Zugabe von 1×10^4 oder $2,5 \times 10^6$ Tumorzellen/mL TRP. Zudem Kontrolle der ATP-Freisetzung aus den Tumorzellen in Puffer (grau). **B** und **C:** TCIPA nach Präinkubation von A375wt und A375-CD24 Zellen mit SWA11 ($2 \mu\text{g}/1 \times 10^6$ TZ) oder DPBS und Zugabe der Tumorzellen zu TRP. **B:** Zugabe von 1×10^4 TZ/mL TRP. **C:** Zugabe von $2,5 \times 10^6$ TZ/mL TRP.

Die Zugabe von 1×10^4 A375 Zellen pro Milliliter TRP führte zu einer ausgeprägten ATP-Freisetzung aus der thrombozytären dichten Granula (Abbildung 6.38 A). Die Menge an detektierbarem ATP war sowohl nach Zugabe von A375wt Zellen als auch nach Zugabe von A375-CD24 Zellen im Vergleich zu TRP um das Vierfache erhöht. Dies entsprach ungefähr der ATP-Freisetzung nach Zugabe von 1×10^4 MDA-MB-231 Zellen pro Milliliter (Abbildung 6.1). Eine Steigerung der ATP-Freisetzung durch Überexpression von CD24 konnte nicht beobachtet werden. Ein Einfluss des CD24-inhibierenden Antikörpers konnte ebenfalls nicht detektiert werden (Abbildung 6.38 A). Auch auf die TCIPA hatte die Überexpression von CD24 sowie die Blockade von CD24 keinen Einfluss (Abbildung 6.38 C).

Um die hämatogene Metastasierung möglichst physiologisch abzubilden, wurden in allen Experimenten 400×10^6 Thrombozyten pro Milliliter aber lediglich 1×10^4 Tumorzellen verwendet. Dieses Verhältnis von 1:40.000 ermöglicht nur wenigen Thrombozyten den direkten Kontakt mit Tumorzellen. Um die direkte Interaktion zwischen P-Selektin und CD24 für eine größere Anzahl Thrombozyten zu ermöglichen wurde die Konzentration an A375 Zellen auf $2,5 \times 10^6$ /mL TRP erhöht. Die Erhöhung der Tumorzell-Konzentration führte zu einer Steigerung der ATP-Konzentration um das Dreieinhalb-fache (Abbildung 6.38 B). Dabei ist zu beachten, dass auch die Freisetzung von ATP aus den Tumorzellen selber signifikant anstieg. Allerdings war auch bei $2,5 \times 10^6$ Tumorzellen

pro Milliliter TRP kein Unterschied zwischen A375wt und A375-CD24 Zellen detektierbar. Auch der Einsatz des CD24-neutralisierenden Antikörpers hatte keinen Einfluss auf die Tumorzell-induzierte ATP-Freisetzung. Ähnlich verhielt es sich bei der A375 Zell-induzierten Thrombozytenaggregation (Abbildung 6.38 D). Leichte Unterschiede in der detektierten *lagtime* könnten aus Ungenauigkeiten der Tumorzell-Quantifizierung resultieren. Bei der Verwendung hoher Tumorzellkonzentrationen wurden die natürlichen Limitierungen der Lichttransmissionsaggregometrie deutlich. Die Suspension wurde durch die große Zahl Tumorzellen so getrübt, dass keine vollständige Aggregation detektiert werden konnte.

Der fehlende Einfluss von CD24 auf die A375 Zell-induzierte Thrombozytenaktivierung entsprach nach den vorhergehenden Experimenten mit MCF-7 Zellen nicht den Erwartungen, da die Rolle für CD24 im Zuge der MCF-7 induzierten Thrombozytenaktivierung belegt werden konnte.

Eine Erkenntnis aus den vorausgehenden Experimenten war jedoch, dass eine intensive Tumorzell-induzierte Thrombin-Generierung eine schnelle, vollständige Aktivierung der Thrombozyten zur Folge hatte, die weitere Aktivierungsmechanismen einer sekundären Thrombozytenaktivierung überdeckte. Um zu überprüfen, ob auch A375 Zellen in der Lage waren, eine Aktivierung des Gerinnungssystems zu induzieren, wurde ein Thrombin-Generierungs-Assay durchgeführt.

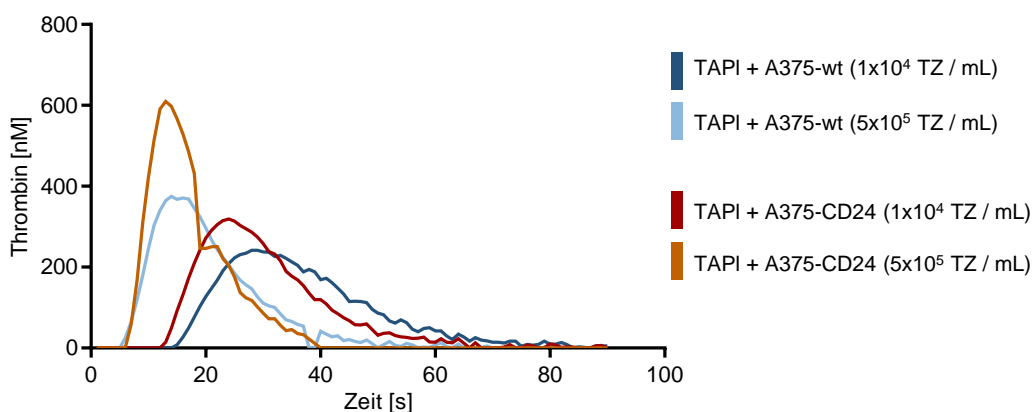


Abbildung 6.39 – **Fähigkeit von A375wt sowie A375-CD24 Zellen eine Thrombin-Generierung in Thrombozyten-armen Plasma zu induzieren.** Vergleich der Thrombin-Generierung in Thrombozyten-armen-Plasma (TAPI), die durch die Zugabe von A375wt bzw. A375-CD24 Zellen induziert wurde. Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der Thrombin-Generierung (1×10^4 bzw. 5×10^5 TZ/mL TAPI).

A375 Zellen führten nach Zugabe zu Thrombozyten-armen Plasma zu einer Konzentrations-abhängigen, intensiven Generierung aktiven Thrombins (Abbildung 6.39). Das Ausmaß der Thrombin-Generierung entsprach in *lagtime* und AUC einer MDA-MB-231 Zell-induzierten Thrombin-Generierung.

Diese Beobachtung stützt die Hypothese, dass die Tumorzell-induzierte Thrombin-Generierung einen elementaren Beitrag zu einer Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung leistet. Bei Tumorzellen, die befähigt sind große Mengen aktiven Thrombins zu generieren, schienen weitere Aktivierungsmechanismen keinen relevanten Beitrag zur Tumorzell-induzierten

Thrombozytenaktivierung zu leisten. Tumorzellen, die eine geringe TF-Expression aufwiesen, wie beispielsweise MCF-7 Zellen, nutzten additive Mechanismen der Thrombozytenaktivierung, die sich, nach einer initialen Aktivierung mittels Thrombin, als unabdingbar für die sekundäre Aktivierung der Thrombozyten zeigten.

Einen elementaren Bestandteil der sekundären Thrombozytenaktivierung repräsentiert thrombozytäres P-Selektin. P-Selektin schien in höchstem Maße sowohl Ligand-abhängig (im Falle einer MCF-7 induzierten Thrombozytenaktivierung) als auch Ligand-unabhängig (im Falle einer PAR-1 vermittelten Thrombozytenaktivierung) zur weiteren Aktivierung von präaktivierten Thrombozyten beizutragen. Die Blockade von P-Selektin mittels polysulfatierter Glykosaminoglykane oder durch den selektiven Selektin-Inhibitor Bimosiamose reduzierte in besonderem Maße die MCF-7 induzierte Thrombozytenaktivierung. Auch die mittels MDA-MB-231 Zellen oder TRAP-6 induzierte Aktivierung der Thrombozyten war durch die Blockade von P-Selektin vermindert.

Diese Beobachtungen untermauern erneut die Hypothese, dass P-Selektin, anders als bisher vermutet, nicht nur als Adhäsionsmolekül für eine Bindung der Thrombozyten an Leukozyten und die Bildung von Heteroaggregaten mit Tumorzellen verantwortlich ist, sondern darüber hinaus aktiv an der Aktivierung von Thrombozyten beteiligt ist. Diese Beteiligung an einer Tumorzell-vermittelten Thrombozytenaktivierung lässt ein P-Selektin induziertes thrombozytäres *signaling* vermuten, dass weiter charakterisiert werden sollte.

6.6 Beteiligung von P-Selektin am thrombozytären *signaling* infolge einer Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung

Besonders der in der vorliegenden Arbeit gezeigte Effekt der Inhibition von P-Selektin auf die Freisetzung von ATP aus der thrombozytären dichten Granula kann als deutliches Indiz für einen Einfluss von P-Selektin betrachtet werden, der über seine bloße Funktion als Adhäsionsmolekül hinausgeht und ein P-Selektin vermitteltes *signaling* in den Thrombozyten vermuten lässt. Um dieses P-Selektin vermittelte *signaling* näher charakterisieren zu können, wurde zunächst ein Western Blot unter Verwendung eines Antikörpers gegen phosphoryliertes Serin, Threonin und Tyrosin durchgeführt. Dieser Antikörper ermöglichte erste Hinweise auf Unterschiede im Phosphoproteom von Thrombozyten, die vor der Aktivierung mittels Tumorzellen oder TRAP-6 mit dem P-Selektin Inhibitor Bimosiamose präinkubiert wurden. Um sicherzustellen, dass lediglich das Phosphoproteom der Thrombozyten erfasst wurde, wurden zudem 1×10^4 MDA-MB-231 bzw. MCF-7 Zellen pro Milliliter in Thrombozyten-freiem Puffer lysiert. Das Proteom der eingesetzten Tumorzellzahl hatte keinen Einfluss auf das Ergebnis des Western Blots (Abbildung 6.40 A rechts). Die detektierten Änderungen im Phosphoproteom resultierten dementsprechend alleine aus der Tumorzell-induzierten Aktivierung der Thrombozyten und nicht aus der bloßen Lyse der Tumorzellen.

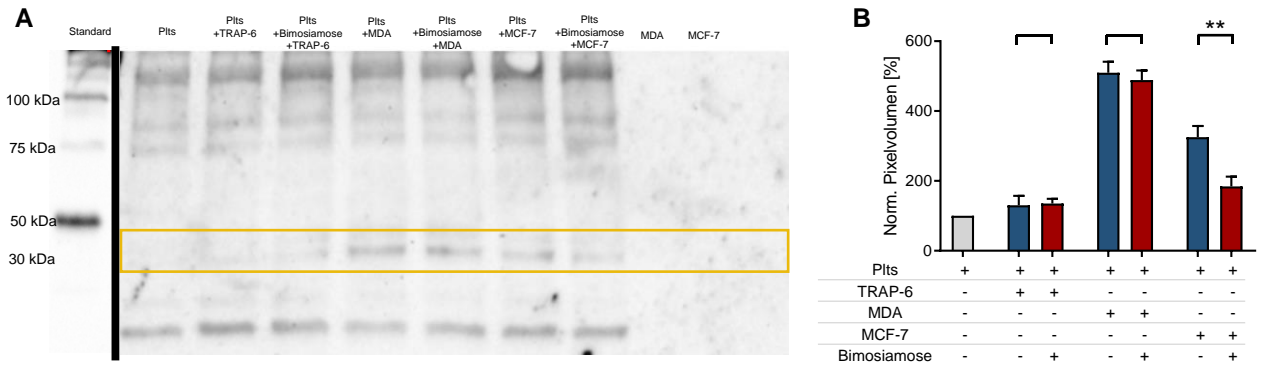


Abbildung 6.40 – **Der Einfluss einer Inhibition von P-Selektin auf das thrombozytäre signaling.** A: Western Blot unter Verwendung eines anti-phospho-Tyrosin/Threonin/Serin Antikörpers. Aktivierung von TRP (nach Präinkubation mit Bimosiamose (100 µg/mL) oder DPBS) mit TRAP-6 (41 µM), MDA-MB-231 oder MCF-7 Zellen (1x10⁴/mL). Das normalisierte Pixelvolumen der gelb markierten Bande wird in B dargestellt (n=3).

Die Aktivierung der Thrombozyten mit TRAP-6 oder Mammakarzinomzellen führte zu Änderungen im thrombozytären Phosphoproteom (Abbildung 6.40). Besonders bei einer Proteingröße von ungefähr 30 kDa war nach Aktivierung der Thrombozyten mit MDA-MB-231 oder MCF-7 Zellen eine Bande zu detektieren, deren Intensität bei Proben, die mit Bimosiamose präinkubiert wurden, geringer war. Besonders ausgeprägt war die aus der Präinkubation mit Bimosiamose resultierende Abnahme der Bandenintensität nach einer Aktivierung der Thrombozyten mit MCF-7 Zellen (Abbildung 6.40). Diese Abnahme der Bandesintensität war ein deutliches Indiz für ein MCF-7 Zell-induziertes P-Selektin *signaling* in Thrombozyten. Um weitere Aufschlüsse über die an diesem *signaling* beteiligten Kinasen zu erlangen, wurde ein *Proteome Profiler™ Human Phospho-Kinase Array* durchgeführt.

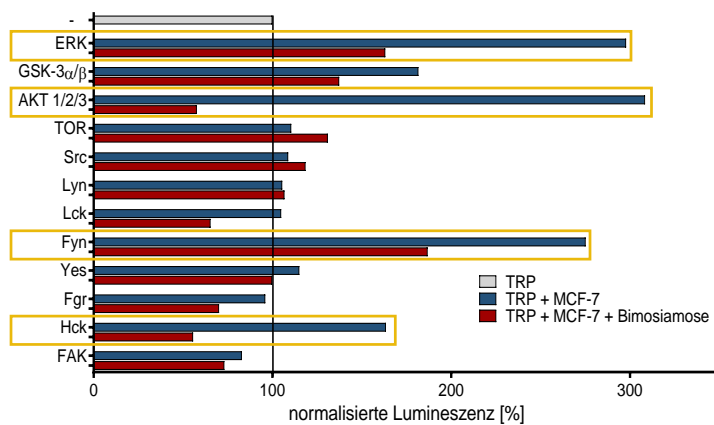


Abbildung 6.41 – **Phospho-Kinase Array zur Beteiligung von P-Selektin an einem Tumorzell-induzierten signaling in Thrombozyten.** Lysate von Thrombozyten, die mit 100 µg/mL Bimosiamose oder entsprechender Menge DPBS inkubiert und mit MCF-7 Zellen (1x10⁴/mL) aktiviert wurden. Gelb gekennzeichnete Kinasen wurden durch Präinkubation mit Bimosiamose deutlich beeinflusst.

Alle betrachteten Kinasen wurde auf die entsprechende Phosphorylierung in ruhenden Thrombozyten normalisiert (Abbildung 6.41). Es zeigte sich, dass von den zwölf nachweislich in Thrombozyten enthaltenen Kinasen besonders die beiden SFK Hck und Fyn aber auch GDK-3α/β, AKT1/2/3 sowie ERK1/2 nach einer Aktivierung der Thrombozyten mit MCF-7 verstärkt

phosphoryliert vorlagen. Die deutlich verminderte Phosphorylierung nach Präinkubation der Thrombozyten mit Bimosiamose wies auf eine Beteiligung der Kinasen ERK1/2, AKT1/2/3, Fyn sowie Hck an einem P-Selektin vermittelten *signaling* hin. Es wurde bereits gezeigt, dass die Phosphorylierung von ERK eine Grundvoraussetzung für die Sekretion der thrombozytären Granula sowie der finalen Thrombozytenaggregation ist (408).

Schon 1997 berichteten Bradley und Kollegen, dass die Expression von Glykoproteinen oder Glykolipiden mit funktionellen Sialinsäureresten sowie N-verknüpften Kohlenhydratresten an der Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung beteiligt sind. Retrospektiv könnte dies ein Hinweis auf die Beteiligung von P-Selektin an der Thrombozytenaktivierung sein, da die von Bradley und Kollegen beschriebenen Strukturen P-Selektin Liganden sind (409). Qi und Kollegen zeigten, dass P-Selektin mit intrazellulärem Talin-1 interagiert, was eine Aktivierung des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ zur Folge hatte und in der Bildung eines P-Selektin- $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Talin-1 Komplexes mündete. Die Bildung dieses Komplexes führte zur Akkumulation von Thrombozyten im Tumorgewebe. Die Ergebnisse von Qi und Kollegen lieferten eindeutige Hinweise für ein P-Selektin induziertes *signaling* in Thrombozyten und die Interaktion von P-Selektin mit weiteren Adhäsionsrezeptoren (323).

Die Hinweise dieser vorangehenden Arbeiten sowie die Ergebnisse der Analyse des Phosphoproteoms sowie des Kinase Arrays weisen eindeutig auf ein P-Selektin induziertes *signaling* in Thrombozyten hin. Weitere Untersuchungen werden zukünftig zeigen, ob dieses P-Selektin induzierte *signaling* direkt Einfluss auf die Aktivierung der Thrombozyten nimmt oder ob die Rolle des P-Selektins besonders in der Assoziation mit weiteren Proteinen und der Beeinflussung derer liegt.

7 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Einblicke in die molekularen Mechanismen einer Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung zu erlangen und so potentielle Angriffspunkte für eine antimetastatische Therapie zu identifizieren. Die Interaktion von Thrombozyten mit Tumorzellen wurde am Beispiel der beiden Mammakarzinomzelllinien MDA-MB-231 und MCF-7 untersucht. Um molekulare Mechanismen der Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung unabhängig von weiteren Blutbestandteilen zu betrachten, wurden die Thrombozyten isoliert und anschließend wurde in einem Puffer-basierten Testsystem gearbeitet. Dabei wurde ersichtlich, dass für die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung die Zugabe einer geringen Menge Plasma sowie der physiologischen Konzentration Calcium-Ionen unabdingbar war, die nachweislich eine Tumorzell-induzierte Thrombin-Generierung im pufferbasierten Testsystem ermöglichte.

Der durchflusszytometrische Nachweis von TF auf der Oberfläche der Tumorzellen unterstrich die Bedeutung der Tumorzell-induzierten Aktivierung des extrinsischen Gerinnungssystems für die initiale Aktivierung der Thrombozyten.

Hinsichtlich der beiden Mammakarzinomzelllinien wurde festgehalten, dass MDA-MB-231 Zellen mehr TF exprimieren als MCF-7 Zellen und dadurch eine intensivere Thrombin-Generierung induzieren. Zusätzlich präsentierten sich MDA-MB-231 Zellen in Versuchen zur Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung als die potentere der beiden Zelllinien. Letzteres wurde sowohl in Versuchen zur ATP-Freisetzung aus der thrombozytären dichten Granula als auch im Zuge der Lichttransmissionsaggregometrie gezeigt.

Um den Einfluss einer Tumorzell-induzierten Thrombin-Generierung auf molekularer Ebene zu evaluieren, wurde der Beitrag der drei Thrombozyten-ständigen Thrombin-Rezeptoren PAR-1, PAR-4 sowie GPIb zur initiale Aktivierung der Thrombozyten untersucht.

Im Rahmen einer isolierten Inhibition der verschiedenen Rezeptoren zeigte ausschließlich die Inhibition von PAR-4 einen ausgeprägten Effekt auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung. Dies unterstreicht erneut die potente Thrombin-Generierung durch die beiden untersuchten Mammakarzinomzelllinien, da in vorangehenden Arbeiten gezeigt werden konnte, dass die Aktivierung von PAR-4 im Gegensatz zu einer PAR-1 Aktivierung eine hohe Konzentration Thrombin am Rezeptor voraussetzt (142,143). Eine vollständige Hemmung der Thrombozytenaktivierung wurde durch die Inhibition einzelner Zielstrukturen des Thrombins nicht erreicht.

Eine kombinierte Inhibition der beiden PAR reduzierte sowohl die Tumorzell-induzierte ATP-Freisetzung als auch die TCIPA maßgeblich. Eine zusätzliche Blockade des GPIIb/IIIa reduzierte die Thrombozytenaktivierung weiter, sodass eine Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung nahezu vollständig unterbunden wurde. Die beobachteten synergistischen Effekte der drei

Thrombozyten-ständigen Thrombin-Rezeptoren entsprechen vorangegangenen Beobachtungen von Estevez und Kollegen (371).

Um die mit einer Thrombozytenaktivierung einhergehende Sekretion der α -Granula zu untersuchen, wurden Thrombozyten mit jeweils einer der beiden Mammakarzinomzelllinien coinkubiert. Die resultierende, verstärkte Sekretion der Mehrheit der dabei betrachteten Proteine variierte in ihrem Ausmaß deutlich zwischen den einzelnen Proteinen. Die Variation führte zur Annahme einer differenzierten Freisetzung der Inhalte der α -Granula. Diese Annahme wurde dadurch untermauert, dass der Einsatz des direkten Thrombin-Inhibitors Argatroban die Freisetzung einiger Proteine vollständig unterband (z.B. ENA-78, VEGF-A und EGF), die Sekretion anderer Proteine aber weniger beeinflusste (z.B. uPA und TIMP-1).

Die differenzierte Freisetzung indizierte weiterführende, Thrombin-unabhängige Mechanismen der Tumorzell-induzierten Granulasekretion, die sich einer initialen, Thrombin-abhängigen, Thrombozytenaktivierung anschließen.

Um diese sekundären Mechanismen der Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung genauer zu untersuchen und hinsichtlich potentieller Angriffspunkte für eine Gerinnungs-unabhängige antimetastatischen Therapie zu evaluieren, wurde die Beteiligung verschiedener bekannter Aktivierungsmechanismen an der Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung untersucht. Entsprechend gezielte Inhibitionen zeigten, dass lösliche Mediatorstoffe (z.B. ADP und Thromboxan A_2), die nach initialer Aktivierung aus den Thrombozyten freigesetzt werden und eine weitere Aktivierung forcieren (*positive feedback loop*), an der Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung lediglich eine untergeordnete Rolle einnehmen.

Auch die Inhibition der thrombozytären Oberflächenrezeptoren GPVI, TLR4, Fc γ RIIa sowie der Integrinuntereinheit α_6 zeigte keinen Einfluss auf die Mammakarzinomzell-induzierte Thrombozytenaktivierung.

Das in ruhenden Thrombozyten inaktiv vorliegende Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ scheint für die initiale Aktivierung der Thrombozyten keine Rolle zu spielen. Nach dem Übergang in eine aktive Konformation infolge der initialen Aktivierung der Thrombozyten nimmt das Adhäsionsmolekül jedoch eine wichtige Rolle in der weiteren Aktivierung bzw. in der Querverknüpfung der Thrombozyten und damit in der Ausbildung eines stabilen Thrombus ein. Nach einer Aktivierung der Thrombozyten mit TRAP-6 oder Kollagen verhinderte die Blockade des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ nach initialer Aktivierung und Durchlaufen des *shape changes* eine weitere Aggregation der Thrombozyten vollständig. Auch die TCIPA wurde durch die Blockade des Integrins beeinflusst. Wiederum durchliefen die Thrombozyten, unbeeinflusst von der Zugabe des Inhibitors, einen *shape change*. Danach resultierte aus der Inhibition von $\alpha_{IIb}\beta_3$ jedoch ein Plateau. Die sich an das Plateau anschließende sekundäre Aggregation mündete trotz Blockade des Adhäsionsmoleküls in einer Vollaggregation. Die sekundären Mechanismen der TCIPA forcierten die weiterführende Aktivierung der Thrombozyten

und kompensierten folglich eine Blockade des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ auf einem anderen Weg als die isolierte Aktivierung der Thrombozyten über PAR-1 oder Kollagen-Rezeptoren.

Um den Einfluss der Gerinnung auf die Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung deutlich von der des direkten Kontaktes zwischen Tumorzellen und Thrombozyten über Adhäsionsmoleküle abzugrenzen, wurden Heparin-Derivate eingesetzt, die sich in ihrer strukturellen Beschaffenheit und den daraus resultierenden Charakteristika voneinander unterschieden.

Die Zugabe von UFH unterband die Thrombozytenaktivierung mittels MDA-MB-231 bzw. MCF-7 Zellen vollständig. Das synthetische hergestellte Pentasaccharid Fondaparinux hatte hingegen keinen Einfluss. Während UFH sowohl einen Antithrombin III-abhängigen antikoagulatorischen Effekt vermittelt als auch Adhäsionsmoleküle inhibiert, hemmt Fondaparinux vorwiegend den Faktor Xa, ist jedoch nicht befähigt signifikanten Einfluss auf Adhäsionsmoleküle, wie beispielsweise P-Selektin, zu nehmen (329,332,333,393). Zur Beeinflussung von Selektinen ist eine Kettenlänge von mindestens sechs Sacchariden von Nöten (332). Der Einsatz eines Heparin-Fragments, das aus zehn Saccharid-Einheiten besteht, beeinflusste nicht nur die Anzahl an Tumorzellen adhärenter Thrombozyten, sondern reduzierte auch die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung signifikant.

Der Einsatz verschiedener, modifizierter Heparin-Derivate unterstrich die Relevanz des P-Selektins für die späte Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung. RO-Heparin weist bei Verlust der antikoagulativen Eigenschaften eine im Vergleich zu UFH gesteigerte Inhibition von P-Selektin auf und unterband die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung vollständig.

Daneben hatte 2-O-Desulfatiertes Heparin keinen Einfluss auf die Aktivierung der Thrombozyten. Die spezifische 2-O-Desulfatierung dieses Heparin-Derivats hebt sowohl die antikoagulativen Eigenschaften als auch die Selektin-Bindungsfähigkeit des Heparins nahezu vollständig auf (343). Die Ergebnisse wurden durch die Verwendung des spezifischen Selektin-Inhibitors Bimosiamose untermauert, der analog zu UFH und RO-Heparin die Aktivierung der Thrombozyten vollständig unterband.

Die Bedeutung von P-Selektin für die hämatogene Metastasierung ist bekannt (318–321). Bisher wurde jedoch davon ausgegangen, dass sich die Funktion des P-Selektins während der hämatogenen Metastasierung auf adhäsive Interaktionen mit entsprechenden Liganden auf Tumorzellen und dem Endothel beschränkt (311,410). Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse weisen hingegen auf eine Funktion des P-Selektins in der Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung hin, die weit über seine bloße Rolle als Adhäsionsmolekül hinausgeht.

Durchflusszytometrische Untersuchungen zeigten, dass P-Selektin nach einer initialen Aktivierung der Thrombozyten aus der α -Granula an die Oberfläche gelangt und infolgedessen seinen Einfluss auf die sekundäre Aktivierung der Thrombozyten entfaltet. Dieser Einfluss auf die späte Phase der

TCIPA konnte unter Verwendung verschiedener Heparin-Derivate sowie Bimosiamose nachgewiesen werden: Die Zugabe der P-Selektin-inhibierenden Substanzen zu präaktivierten Thrombozyten, die den *shape change* nach einer initialen Aktivierung bereits durchlaufen hatten, unterband eine weitere Aggregation vollständig. Untersuchungen des Sekretoms der thrombozytären α -Granula nach der Inhibition von P-Selektin deuteten darauf hin, dass P-Selektin mit verschiedenen Proteinen (z.B. PAI-1) in der α -Granula colokalisiert vorliegt. Diese α -Granula werden im Zuge einer initialen Thrombozytenaktivierung sezerniert, sodass die Inhibition von P-Selektin keinen Einfluss auf die Freisetzung dieser colokalisierten Proteine zeigte. Andere Subpopulationen der α -Granula werden hingegen erst zu späteren Zeitpunkten der Thrombozytenaktivierung sezerniert, sodass die Blockade des P-Selektins und die resultierende Inhibition der sekundären Thrombozytenaktivierung eine verminderte Freisetzung dieser Subpopulationen zur Folge hatten.

Ein inhibierender Effekt verschiedener P-Selektin blockierender Substanzen auf die PAR-1 vermittelte Aktivierung der Thrombozyten legte eine allgemeine Beteiligung des P-Selektins an der Aktivierung von Thrombozyten jenseits der Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung nahe, deren genauer mechanistischer Hintergrund in weiterführenden Arbeiten näher zu untersuchen ist. Der Effekt lässt zudem vermuten, dass die Rolle des P-Selektins in der Aktivierung der Thrombozyten zumindest teilweise unabhängig von etwaigen Liganden des P-Selektins ist. Gestützt wird diese Hypothese durch den Umstand, dass in Experimenten zur Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung das Verhältnis von Tumorzellen zu Thrombozyten 1:40.000 betrug, sodass davon ausgegangen werden kann, dass nur ein geringer Teil der Thrombozyten mit den Tumorzellen in direktem Kontakt stand.

Um die Interaktionen zwischen thrombozytärem P-Selektin und Tumorzellen dennoch näher zu charakterisieren, wurden Untersuchungen zu etwaigen Einflüssen Tumorzell-assoziiertes P-Selektin Liganden angestellt. Vorangegangene Arbeiten zeigten bereits, dass die Überexpression von sialylierten, fucosylierten Muzinen, die Liganden des P-Selektins repräsentieren, auf Karzinomzellen mit einer schlechten Gesamtprognose der Patienten assoziiert wird (410).

Die Blockade des P-Selektin Liganden CD24 auf MCF-7 Zellen führte zu einer stark verminderten Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung. Ein allgemeiner Einfluss des CD24 auf die Aktivierung von Thrombozyten konnte jedoch unter Verwendung von CD24 überexprimierenden Melanomzellen (A375) nicht bestätigt werden. Die Relevanz einer Ligand-vermittelten Interaktion von Tumorzellen und Thrombozyten scheint von dem Thrombinbildungspotential der jeweiligen Tumorzelllinie abzuhängen. Bei Tumorzellen, die befähigt sind große Mengen aktiven Thrombins zu generieren, schienen weiterführende Ligand-vermittelte Aktivierungsmechanismen keinen relevanten Beitrag zur Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung zu leisten. Bei Tumorzellen, die hingegen eine geringe TF-Expression aufwiesen, beispielsweise MCF-7 Zellen, leisten additive

Mechanismen der Thrombozytenaktivierung, besonders über P-Selektin, einen elementaren Beitrag zur Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung.

Diese Beobachtungen untermauern erneut die Hypothese, dass P-Selektin nicht nur als Adhäsionsmolekül für eine Bindung der Thrombozyten an das aktivierte Endothel oder an Leukozyten zur Bildung von Heteroaggregaten mit Tumorzellen verantwortlich ist, sondern darüber hinaus aktiv an der Aktivierung von Thrombozyten beteiligt ist. Diese Beteiligung an einer Tumorzell-vermittelten Thrombozytenaktivierung lässt ein P-Selektin induziertes thrombozytäres *signaling* vermuten, das weiter charakterisiert werden sollte.

Es konnte mittels eines *Proteome Profiler™ Human Phospho-Kinase Array* gezeigt werden, dass die Inkubation der Thrombozyten mit MCF-7 Zellen zu einer verstärkten Phosphorylierung der Kinasen Hck und Fyn, sowie GDK-3 α/β , AKT1/2/3 und ERK1/2 führte. Die deutlich verminderte Phosphorylierung nach Präinkubation der Thrombozyten mit Bimosiamose wies auf eine Beteiligung der Kinasen ERK1/2, AKT1/2/3, Fyn sowie Hck an einem P-Selektin vermittelten *signaling* hin. Weitere Untersuchungen werden zukünftig zeigen, in welchem Rahmen P-Selektin auf dieses *signaling* direkt, über die Bildung von Clustern oder über die Assoziation mit weiteren Proteinen und deren Beeinflussung einwirkt.

Die Identifikation von P-Selektin als essentiellm Rezeptor in der sekundären Aktivierung der Thrombozyten durch Tumorzellen eröffnet Optionen, in Zukunft gezielt in die verschiedenen Phasen der zellulären Wechselwirkungen zwischen Tumorzellen und Thrombozyten einzugreifen. So könnte ein elementarer Schritt der hämatogenen Metastasierung beeinflusst oder gar unterbunden und neue Optionen einer antimetastatischen Therapie ohne Beeinflussung des hämostaseologischen Systems eröffnet werden.

8 Literaturverzeichnis

1. Koch-Institut R. Krebs in Deutschland | 2015/2016. :163.
2. Labelle M, Hynes RO. The initial hours of metastasis: the importance of cooperative host-tumor cell interactions during hematogenous dissemination. *Cancer Discov.* Dezember 2012;2(12):1091–9.
3. Gasic GJ, Gasic TB, Stewart CC. Antimetastatic effects associated with platelet reduction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* September 1968;61(1):46–52.
4. 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.* 31. Mai 2016;7(22):32462–77.
5. Nieswandt B, Hafner M, Echtenacher B, Männel DN. Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets. *Cancer Res.* 15. März 1999;59(6):1295–300.
6. Maurer S, Kropp KN, Klein G, Steinle A, Haen SP, Walz JS, u. a. Platelet-mediated shedding of NKG2D ligands impairs NK cell immune-surveillance of tumor cells. *Oncoimmunology* [Internet]. 27. November 2017 [zitiert 8. April 2020];7(2). Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5749664/>
7. Franco AT, Corken A, Ware J. Platelets at the interface of thrombosis, inflammation, and cancer. *Blood.* 30. Juli 2015;126(5):582–8.
8. 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.* 8. Juli 2013;24(1):130–7.
9. Qian B, Deng Y, Im JH, Muschel RJ, Zou Y, Li J, u. a. A distinct macrophage population mediates metastatic breast cancer cell extravasation, establishment and growth. *PloS One.* 10. August 2009;4(8):e6562.
10. 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.
11. Lee AYY, Levine MN. Venous thromboembolism and cancer: risks and outcomes. *Circulation.* 17. Juni 2003;107(23 Suppl 1):I17-21.
12. Lee AYY. Management of thrombosis in cancer: primary prevention and secondary prophylaxis. *Br J Haematol.* Februar 2005;128(3):291–302.
13. Prandoni P, Lensing AWA, Piccioli A, Bernardi E, Simioni P, Girolami B, u. a. Recurrent venous thromboembolism and bleeding complications during anticoagulant treatment in patients with cancer and venous thrombosis. *Blood.* 15. November 2002;100(10):3484–8.
14. Thorat MA, Cuzick J. Role of aspirin in cancer prevention. *Curr Oncol Rep.* Dezember 2013;15(6):533–40.

15. Cuzick J, Thorat MA, Bosetti C, Brown PH, Burn J, Cook NR, u. a. Estimates of benefits and harms of prophylactic use of aspirin in the general population. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. Januar 2015;26(1):47–57.
16. Joharatnam-Hogan N, Cafferty F, Hubner R, Swinson D, Sothi S, Gupta K, u. a. Aspirin as an adjuvant treatment for cancer: feasibility results from the Add-Aspirin randomised trial. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. November 2019;4(11):854–62.
17. Wong SY, Hynes RO. Lymphatic or hematogenous dissemination: how does a metastatic tumor cell decide? *Cell Cycle Georget Tex*. April 2006;5(8):812–7.
18. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the „seed and soil“ hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(6):453–8.
19. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer*. August 2002;2(8):563–72.
20. Cox TR, Gartland A, Erler JT. The pre-metastatic niche: is metastasis random? *BoneKEy Rep*. 2012;1:80.
21. Butler TP, Gullino PM. Quantitation of cell shedding into efferent blood of mammary adenocarcinoma. *Cancer Res*. März 1975;35(3):512–6.
22. Liotta LA, Kleinerman J, Saidel GM. Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation. *Cancer Res*. Mai 1974;34(5):997–1004.
23. Weiss L. Metastatic inefficiency. *Adv Cancer Res*. 1990;54:159–211.
24. Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, Kerkvliet N, Morris VL, Chambers AF, u. a. Multistep Nature of Metastatic Inefficiency. *Am J Pathol*. September 1998;153(3):865–73.
25. Fidler IJ, Kripke ML. Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science*. 26. August 1977;197(4306):893–5.
26. Brooks SA, Lomax-Browne HJ, Carter TM, Kinch CE, Hall DMS. Molecular interactions in cancer cell metastasis. *Acta Histochem*. 1. Januar 2010;112(1):3–25.
27. Christofori G, Semb H. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci*. Februar 1999;24(2):73–6.
28. Cavallaro U, Christofori G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer*. Februar 2004;4(2):118–32.
29. Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, u. a. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol*. April 1991;113(1):173–85.
30. Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer*. Mai 2003;3(5):362–74.
31. Duffy MJ. The urokinase plasminogen activator system: role in malignancy. *Curr Pharm Des*. 2004;10(1):39–49.

32. Price JT, Bonovich MT, Kohn EC. The biochemistry of cancer dissemination. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1997;32(3):175–253.
33. Blood CH, Zetter BR. Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis. *Biochim Biophys Acta.* 1. Juni 1990;1032(1):89–118.
34. Gilmore AP. Anoikis. *Cell Death Differ.* November 2005;12 Suppl 2:1473–7.
35. 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;2012:306879.
36. Alanko J, Mai A, Jacquemet G, Schauer K, Kaukonen R, Saari M, u. a. Integrin endosomal signalling suppresses anoikis. *Nat Cell Biol.* November 2015;17(11):1412–21.
37. Weiss L. Metastatic inefficiency. *Adv Cancer Res.* 1990;54:159–211.
38. Brooks SA, Lomax-Browne HJ, Carter TM, Kinch CE, Hall DMS. Molecular interactions in cancer cell metastasis. *Acta Histochem.* 2010;112(1):3–25.
39. Umer M, Vaidyanathan R, Nguyen N-T, Shiddiky MJA. Circulating tumor microemboli: Progress in molecular understanding and enrichment technologies. *Biotechnol Adv.* August 2018;36(4):1367–89.
40. Carlsson A, Nair VS, Lutgen MS, Keu KV, Horng G, Vasanaawala M, u. a. Circulating tumor microemboli diagnostics for patients with non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer.* August 2014;9(8):1111–9.
41. Aceto N, Bardia A, Miyamoto DT, Donaldson MC, Wittner BS, Spencer JA, u. a. Circulating Tumor Cell Clusters are Oligoclonal Precursors of Breast Cancer Metastasis. *Cell.* 28. August 2014;158(5):1110–22.
42. Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer.* April 2009;9(4):239–52.
43. Gil-Bernabé AM, Ferjancic S, Tlalka M, Zhao L, Allen PD, Im JH, u. a. Recruitment of monocytes/macrophages by tissue factor-mediated coagulation is essential for metastatic cell survival and premetastatic niche establishment in mice. *Blood.* 29. März 2012;119(13):3164–75.
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. Heeke S, Mograbi B, Alix-Panabières C, Hofman P. Never Travel Alone: The Crosstalk of Circulating Tumor Cells and the Blood Microenvironment. *Cells [Internet].* 13. Juli 2019 [zitiert 1. April 2020];8(7). Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6678604/>
46. Gasic GJ, Gasic TB, Galanti N, Johnson T, Murphy S. Platelet-tumor-cell interactions in mice. The role of platelets in the spread of malignant disease. *Int J Cancer.* Mai 1973;11(3):704–18.
47. 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.* Oktober 1995;30(10):1008–16.

48. 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. *J Oral Pathol Med Off Publ Int Assoc Oral Pathol Am Acad Oral Pathol*. Mai 2009;38(5):434–40.
49. 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.
50. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer*. August 2002;2(8):563–72.
51. Al-Mehdi AB, Tozawa K, Fisher AB, Shientag L, Lee A, Muschel RJ. Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: a new model for metastasis. *Nat Med*. Januar 2000;6(1):100–2.
52. Felding-Habermann B, O'Toole TE, Smith JW, Fransvea E, Ruggeri ZM, Ginsberg MH, u. a. Integrin activation controls metastasis in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 13. Februar 2001;98(4):1853–8.
53. Orr FW, Wang HH. Tumor cell interactions with the microvasculature: a rate-limiting step in metastasis. *Surg Oncol Clin N Am*. April 2001;10(2):357–81, ix–x.
54. Wang H, Fu W, Im JH, Zhou Z, Santoro SA, Iyer V, u. a. Tumor cell alpha3beta1 integrin and vascular laminin-5 mediate pulmonary arrest and metastasis. *J Cell Biol*. 15. März 2004;164(6):935–41.
55. Brown DM, Ruoslahti E. Metadherin, a cell surface protein in breast tumors that mediates lung metastasis. *Cancer Cell*. April 2004;5(4):365–74.
56. Hu G, Chong RA, Yang Q, Wei Y, Blanco MA, Li F, u. a. MTDH activation by 8q22 genomic gain promotes chemoresistance and metastasis of poor-prognosis breast cancer. *Cancer Cell*. 6. Januar 2009;15(1):9–20.
57. Labelle M, Hynes RO. The initial hours of metastasis: the importance of cooperative host-tumor cell interactions during hematogenous dissemination. *Cancer Discov*. Dezember 2012;2(12):1091–9.
58. Hiratsuka S, Goel S, Kamoun WS, Maru Y, Fukumura D, Duda DG, u. a. Endothelial focal adhesion kinase mediates cancer cell homing to discrete regions of the lungs via E-selectin up-regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1. März 2011;108(9):3725–30.
59. Iwai K, Ishikura H, Kaji M, Sugiura H, Ishizu A, Takahashi C, u. a. Importance of E-selectin (ELAM-1) and sialyl Lewis(a) in the adhesion of pancreatic carcinoma cells to activated endothelium. *Int J Cancer*. 30. Juli 1993;54(6):972–7.
60. Aigner S, Sthoeger ZM, Fogel M, Weber E, Zarn J, Ruppert M, u. a. CD24, a mucin-type glycoprotein, is a ligand for P-selectin on human tumor cells. *Blood*. 1. Mai 1997;89(9):3385–95.
61. 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*. 8. Dezember 2005;438(7069):820–7.

-
62. Hiratsuka S, Watanabe A, Aburatani H, Maru Y. Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis. *Nat Cell Biol.* Dezember 2006;8(12):1369–75.
 63. Hiratsuka S, Watanabe A, Sakurai Y, Akashi-Takamura S, Ishibashi S, Miyake K, u. a. The S100A8-serum amyloid A3-TLR4 paracrine cascade establishes a pre-metastatic phase. *Nat Cell Biol.* November 2008;10(11):1349–55.
 64. Erler JT, Bennewith KL, Cox TR, Lang G, Bird D, Koong A, u. a. Hypoxia-induced lysyl oxidase is a critical mediator of bone marrow cell recruitment to form the premetastatic niche. *Cancer Cell.* 6. Januar 2009;15(1):35–44.
 65. Psaila B, Lyden D. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(4):285–93.
 66. Aguado BA, Bushnell GG, Rao SS, Jeruss JS, Shea LD. Engineering the pre-metastatic niche. *Nat Biomed Eng.* 2017;1.
 67. Gomes AM, Stelling MP, Pavão MSG. Heparan sulfate and heparanase as modulators of breast cancer progression. *BioMed Res Int.* 2013;2013:852093.
 68. Janda E, Lehmann K, Killisch I, Jechlinger M, Herzig M, Downward J, u. a. Ras and TGF[β] cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways. *J Cell Biol.* 21. Januar 2002;156(2):299–313.
 69. Del Pozo Martin Y, Park D, Ramachandran A, Ombrato L, Calvo F, Chakravarty P, u. a. Mesenchymal Cancer Cell-Stroma Crosstalk Promotes Niche Activation, Epithelial Reversion, and Metastatic Colonization. *Cell Rep.* 22. Dezember 2015;13(11):2456–69.
 70. Labelle M, Begum S, Hynes RO. Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis. *Cancer Cell.* 15. November 2011;20(5):576–90.
 71. Li N. Platelets in cancer metastasis: To help the „villain“ to do evil. *Int J Cancer.* 1. Mai 2016;138(9):2078–87.
 72. Cho MS, Bottsford-Miller J, Vasquez HG, Stone R, Zand B, Kroll MH, u. a. Platelets increase the proliferation of ovarian cancer cells. *Blood.* 6. Dezember 2012;120(24):4869–72.
 73. Janowska-Wieczorek A, Wysoczynski M, Kijowski J, Marquez-Curtis L, Machalinski B, Ratajczak J, u. a. Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer. *Int J Cancer.* 20. Februar 2005;113(5):752–60.
 74. 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. *J Oral Pathol Med Off Publ Int Assoc Oral Pathol Am Acad Oral Pathol.* Mai 2009;38(5):434–40.
 75. Egan K, Cooke N, Kenny D. Living in shear: platelets protect cancer cells from shear induced damage. *Clin Exp Metastasis.* August 2014;31(6):697–704.
 76. Haemmerle M, Taylor ML, Gutschner T, Pradeep S, Cho MS, Sheng J, u. a. Platelets reduce anoikis and promote metastasis by activating YAP1 signaling. *Nat Commun.* 21 2017;8(1):310.

-
77. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 4. März 2011;144(5):646–74.
 78. Burkhalter RJ, Westfall SD, Liu Y, Stack MS. Lysophosphatidic Acid Initiates Epithelial to Mesenchymal Transition and Induces β -Catenin-mediated Transcription in Epithelial Ovarian Carcinoma. *J Biol Chem*. 4. September 2015;290(36):22143–54.
 79. Ha JH, Ward JD, Radhakrishnan R, Jayaraman M, Song YS, Dhanasekaran DN. Lysophosphatidic acid stimulates epithelial to mesenchymal transition marker Slug/Snail2 in ovarian cancer cells via Gai2, Src, and HIF1 α signaling nexus. *Oncotarget*. 21. Juni 2016;7(25):37664–79.
 80. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. Juni 2009;119(6):1420–8.
 81. 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*. 18 2018;45(6):681-695.e4.
 82. Mani SA, Guo W, Liao M-J, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, u. a. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 16. Mai 2008;133(4):704–15.
 83. Palumbo JS, Talmage KE, Massari JV, La Jeunesse CM, Flick MJ, Kombrinck KW, u. a. Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells. *Blood*. 1. Januar 2005;105(1):178–85.
 84. Kopp H-G, Placke T, Salih HR. Platelet-derived transforming growth factor-beta down-regulates NKG2D thereby inhibiting natural killer cell antitumor reactivity. *Cancer Res*. 1. Oktober 2009;69(19):7775–83.
 85. Placke T, Örgel M, Schaller M, Jung G, Rammensee H-G, Kopp H-G, u. a. Platelet-derived MHC class I confers a pseudonormal phenotype to cancer cells that subverts the antitumor reactivity of natural killer immune cells. *Cancer Res*. 15. Januar 2012;72(2):440–8.
 86. Placke T, Salih HR, Kopp H-G. GITR ligand provided by thrombopoietic cells inhibits NK cell antitumor activity. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1. Juli 2012;189(1):154–60.
 87. Rachidi S, Metelli A, Riesenber B, Wu BX, Nelson MH, Wallace C, u. a. Platelets subvert T cell immunity against cancer via GARP-TGF β axis. *Sci Immunol*. 5. Mai 2017;2(11).
 88. Chen M, Geng J-G. P-selectin mediates adhesion of leukocytes, platelets, and cancer cells in inflammation, thrombosis, and cancer growth and metastasis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. April 2006;54(2):75–84.
 89. Simon DI, Chen Z, Xu H, Li CQ, Dong J f, McIntire LV, u. a. Platelet glycoprotein Iba1 is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J Exp Med*. 17. Juli 2000;192(2):193–204.
 90. Mayadas TN, Johnson RC, Rayburn H, Hynes RO, Wagner DD. Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice. *Cell*. 13. August 1993;74(3):541–54.
 91. Xu XR, Yousef GM, Ni H. Cancer and platelet crosstalk: opportunities and challenges for aspirin and other antiplatelet agents. *Blood*. 19. April 2018;131(16):1777–89.

-
92. Labelle M, Begum S, Hynes RO. Platelets guide the formation of early metastatic niches. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 29. Juli 2014;111(30):E3053-3061.
 93. Ponert JM, Schwarz S, Haschemi R, Müller J, Pötzsch B, Bendas G, u. a. The mechanisms how heparin affects the tumor cell induced VEGF and chemokine release from platelets to attenuate the early metastatic niche formation. *PLoS One*. 2018;13(1):e0191303.
 94. Zhao L, Lim SY, Gordon-Weeks AN, Tapmeier TT, Im JH, Cao Y, u. a. Recruitment of a myeloid cell subset (CD11b/Gr1 mid) via CCL2/CCR2 promotes the development of colorectal cancer liver metastasis. *Hepatology*. Februar 2013;57(2):829–39.
 95. Gay LJ, Felding-Habermann B. Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nat Rev Cancer*. Februar 2011;11(2):123–34.
 96. Lopes-Bastos BM, Jiang WG, Cai J. Tumour-Endothelial Cell Communications: Important and Indispensable Mediators of Tumour Angiogenesis. *Anticancer Res*. März 2016;36(3):1119–26.
 97. Kim YJ, Borsig L, Han HL, Varki NM, Varki A. Distinct selectin ligands on colon carcinoma mucins can mediate pathological interactions among platelets, leukocytes, and endothelium. *Am J Pathol*. August 1999;155(2):461–72.
 98. Semple JW, Italiano JE, Freedman J. Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol*. April 2011;11(4):264–74.
 99. Battinelli EM, Markens BA, Italiano JE. Release of angiogenesis regulatory proteins from platelet alpha granules: modulation of physiologic and pathologic angiogenesis. *Blood*. 4. August 2011;118(5):1359–69.
 100. Möhle R, Green D, Moore MAS, Nachman RL, Rafii S. Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 21. Januar 1997;94(2):663–8.
 101. Farooqi AA, Siddik ZH. Platelet-derived growth factor (PDGF) signalling in cancer: rapidly emerging signalling landscape. *Cell Biochem Funct*. Juli 2015;33(5):257–65.
 102. Johnson KE, Forward JA, Tippy MD, Ceglowski JR, El-Husayni S, Kulenthirarajan R, u. a. Tamoxifen Directly Inhibits Platelet Angiogenic Potential and Platelet-Mediated Metastasis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37(4):664–74.
 103. Ben-Ezra J, Sheibani K, Hwang DL, Lev-Ran A. Megakaryocyte synthesis is the source of epidermal growth factor in human platelets. *Am J Pathol*. Oktober 1990;137(4):755–9.
 104. Deryugina EI, Quigley JP. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. März 2006;25(1):9–34.
 105. Zaslavsky A, Baek K-H, Lynch RC, Short S, Grillo J, Folkman J, u. a. Platelet-derived thrombospondin-1 is a critical negative regulator and potential biomarker of angiogenesis. *Blood*. 3. Juni 2010;115(22):4605–13.
 106. Wang Z, Huang H. Platelet factor-4 (CXCL4/PF-4): an angiostatic chemokine for cancer therapy. *Cancer Lett*. 1. Mai 2013;331(2):147–53.

107. Italiano JE, Richardson JL, Patel-Hett S, Battinelli E, Zaslavsky A, Short S, u. a. Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet alpha granules and differentially released. *Blood*. 1. Februar 2008;111(3):1227–33.
108. Chatterjee M, Huang Z, Zhang W, Jiang L, Hultenby K, Zhu L, u. a. Distinct platelet packaging, release, and surface expression of proangiogenic and antiangiogenic factors on different platelet stimuli. *Blood*. 7. April 2011;117(14):3907–11.
109. Kamykowski J, Carlton P, Sehgal S, Storrie B. Quantitative immunofluorescence mapping reveals little functional coclustering of proteins within platelet α -granules. *Blood*. 4. August 2011;118(5):1370–3.
110. Heijnen H, van der Sluijs P. Platelet secretory behaviour: as diverse as the granules ... or not? *J Thromb Haemost JTH*. Dezember 2015;13(12):2141–51.
111. Holmes CE, Levis JE, Schneider DJ, Bambace NM, Sharma D, Lal I, u. a. Platelet phenotype changes associated with breast cancer and its treatment. *Platelets*. November 2016;27(7):703–11.
112. Peterson JE, Zurakowski D, Italiano JE, Michel LV, Connors S, Oenick M, u. a. VEGF, PF4 and PDGF are elevated in platelets of colorectal cancer patients. *Angiogenesis*. Juni 2012;15(2):265–73.
113. Zimmerman GA, Weyrich AS. Signal-dependent protein synthesis by activated platelets: new pathways to altered phenotype and function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. März 2008;28(3):s17-24.
114. Best MG, Sol N, Kooi I, Tannous J, Westerman BA, Rustenburg F, u. a. RNA-Seq of Tumor-Educated Platelets Enables Blood-Based Pan-Cancer, Multiclass, and Molecular Pathway Cancer Diagnostics. *Cancer Cell*. 9. November 2015;28(5):666–76.
115. Klement GL, Yip T-T, Cassiola F, Kikuchi L, Cervi D, Podust V, u. a. Platelets actively sequester angiogenesis regulators. *Blood*. 19. März 2009;113(12):2835–42.
116. Ho-Tin-Noé B, Goerge T, Cifuni SM, Duerschmied D, Wagner DD. Platelet granule secretion continuously prevents intratumor hemorrhage. *Cancer Res*. 15. August 2008;68(16):6851–8.
117. Provost P. The clinical significance of platelet microparticle-associated microRNAs. *Clin Chem Lab Med*. 1. Mai 2017;55(5):657–66.
118. Kim HK, Song KS, Park YS, Kang YH, Lee YJ, Lee KR, u. a. Elevated levels of circulating platelet microparticles, VEGF, IL-6 and RANTES in patients with gastric cancer: possible role of a metastasis predictor. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. Januar 2003;39(2):184–91.
119. Helley D, Banu E, Bouziane A, Banu A, Scotte F, Fischer A-M, u. a. Platelet microparticles: a potential predictive factor of survival in hormone-refractory prostate cancer patients treated with docetaxel-based chemotherapy. *Eur Urol*. September 2009;56(3):479–84.
120. Skog J, Würdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, u. a. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol*. Dezember 2008;10(12):1470–6.
121. Fendler A, Stephan C, Yousef GM, Kristiansen G, Jung K. The translational potential of microRNAs as biofluid markers of urological tumours. *Nat Rev Urol*. 2016;13(12):734–52.

-
122. Nilsson RJA, Balaj L, Hulleman E, van Rijn S, Pegtel DM, Walraven M, u. a. Blood platelets contain tumor-derived RNA biomarkers. *Blood*. 29. September 2011;118(13):3680–3.
 123. Nilsson RJA, Karachaliou N, Berenguer J, Gimenez-Capitan A, Schellen P, Teixido C, u. a. Rearranged EML4-ALK fusion transcripts sequester in circulating blood platelets and enable blood-based crizotinib response monitoring in non-small-cell lung cancer. *Oncotarget*. 5. Januar 2016;7(1):1066–75.
 124. Meehan K, Vella LJ. The contribution of tumour-derived exosomes to the hallmarks of cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2016;53(2):121–31.
 125. Langer F, Holstein K, Eifrig B, Bokemeyer C. [Haemostatic aspects in clinical oncology]. *Hamostaseologie*. Dezember 2008;28(5):472–80.
 126. Abdol Razak NB, Jones G, Bhandari M, Berndt MC, Metharom P. Cancer-Associated Thrombosis: An Overview of Mechanisms, Risk Factors, and Treatment. *Cancers*. 11. Oktober 2018;10(10).
 127. Callander NS, Varki N, Rao LV. Immunohistochemical identification of tissue factor in solid tumors. *Cancer*. 1. September 1992;70(5):1194–201.
 128. Vrana JA, Stang MT, Grande JP, Getz MJ. Expression of tissue factor in tumor stroma correlates with progression to invasive human breast cancer: paracrine regulation by carcinoma cell-derived members of the transforming growth factor beta family. *Cancer Res*. 1. November 1996;56(21):5063–70.
 129. 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.
 130. Förster Y, Meye A, Albrecht S, Schwenzer B. Tissue factor and tumor: clinical and laboratory aspects. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. Februar 2006;364(1–2):12–21.
 131. 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 Off J Am Assoc Cancer Res*. 15. Mai 2007;13(10):2870–5.
 132. Uno K, Homma S, Satoh T, Nakanishi K, Abe D, Matsumoto K, u. a. Tissue factor expression as a possible determinant of thromboembolism in ovarian cancer. *Br J Cancer*. 29. Januar 2007;96(2):290–5.
 133. Gardiner C, Harrison P, Belting M, Böing A, Campello E, Carter BS, u. a. Extracellular vesicles, tissue factor, cancer and thrombosis - discussion themes of the ISEV 2014 Educational Day. *J Extracell Vesicles*. 2015;4:26901.
 134. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 19. Dezember 2002;420(6917):860–7.
 135. Kirchhofer D, Tschopp TB, Hadváry P, Baumgartner HR. Endothelial cells stimulated with tumor necrosis factor-alpha express varying amounts of tissue factor resulting in inhomogenous fibrin deposition in a native blood flow system. Effects of thrombin inhibitors. *J Clin Invest*. Mai 1994;93(5):2073–83.

136. Huntington JA. Molecular recognition mechanisms of thrombin. *J Thromb Haemost JTH*. August 2005;3(8):1861–72.
137. Higgins DL, Lewis SD, Shafer JA. Steady state kinetic parameters for the thrombin-catalyzed conversion of human fibrinogen to fibrin. *J Biol Chem*. 10. August 1983;258(15):9276–82.
138. Sheehan JP, Sadler JE. Molecular mapping of the heparin-binding exosite of thrombin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 7. Juni 1994;91(12):5518–22.
139. Gan ZR, Li Y, Chen Z, Lewis SD, Shafer JA. Identification of basic amino acid residues in thrombin essential for heparin-catalyzed inactivation by antithrombin III. *J Biol Chem*. 14. Januar 1994;269(2):1301–5.
140. McKeage K, Plosker GL. Argatroban. *Drugs*. 2001;61(4):515–22; discussion 523-524.
141. Wojtukiewicz MZ, Hempel D, Sierko E, Tucker SC, Honn KV. Protease-activated receptors (PARs)—biology and role in cancer invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 2015;34:775–96.
142. Duvernay MT, Temple KJ, Maeng JG, Blobaum AL, Stauffer SR, Lindsley CW, u. a. Contributions of Protease-Activated Receptors PAR1 and PAR4 to Thrombin-Induced GPIIb/IIIa Activation in Human Platelets. *Mol Pharmacol*. Januar 2017;91(1):39–47.
143. Kahn ML, Nakanishi-Matsui M, Shapiro MJ, Ishihara H, Coughlin SR. Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. *J Clin Invest*. März 1999;103(6):879–87.
144. Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*. 22. März 1991;64(6):1057–68.
145. Candia ED, Hall SW, Rutella S, Landolfi R, Andrews RK, Cristofaro RD. Binding of Thrombin to Glycoprotein Ib Accelerates the Hydrolysis of Par-1 on Intact Platelets. *J Biol Chem*. 16. Februar 2001;276(7):4692–8.
146. Adam F, Guillin M-C, Jandrot-Perrus M. Glycoprotein Ib-mediated platelet activation. A signalling pathway triggered by thrombin. *Eur J Biochem*. Juli 2003;270(14):2959–70.
147. Wojtukiewicz MZ, Hempel D, Sierko E, Tucker SC, Honn KV. Thrombin-unique coagulation system protein with multifaceted impacts on cancer and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. Juni 2016;35(2):213–33.
148. Reitter E-M, Kaider A, Ay C, Quehenberger P, Marosi C, Zielinski C, u. a. Longitudinal analysis of hemostasis biomarkers in cancer patients during antitumor treatment. *J Thromb Haemost JTH*. Februar 2016;14(2):294–305.
149. Guo R-R, Liu Y, Lu W-L, Zhao J-H, Wang X-Q, Zhang H, u. a. A recombinant peptide, hirudin, potentiates the inhibitory effects of stealthy liposomal vinblastine on the growth and metastasis of melanoma. *Biol Pharm Bull*. April 2008;31(4):696–702.
150. Tsopanoglou NE, Maragoudakis ME. Thrombin's central role in angiogenesis and pathophysiological processes. *Eur Cytokine Netw*. Dezember 2009;20(4):171–9.

-
151. 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.
 152. Sahni A, Francis CW. Vascular endothelial growth factor binds to fibrinogen and fibrin and stimulates endothelial cell proliferation. *Blood.* 1. Dezember 2000;96(12):3772–8.
 153. Schachtrup C, Ryu JK, Helmrick MJ, Vagena E, Galanakis DK, Degen JL, u. a. Fibrinogen triggers astrocyte scar formation by promoting the availability of active TGF-beta after vascular damage. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 28. April 2010;30(17):5843–54.
 154. Hu L, Roth JM, Brooks P, Luty J, Karpatkin S. Thrombin up-regulates cathepsin D which enhances angiogenesis, growth, and metastasis. *Cancer Res.* 15. Juni 2008;68(12):4666–73.
 155. Hu L, Roth JM, Brooks P, Ibrahim S, Karpatkin S. Twist is required for thrombin-induced tumor angiogenesis and growth. *Cancer Res.* 1. Juni 2008;68(11):4296–302.
 156. Beausoleil MS, Schulze EB, Goodale D, Postenka CO, Allan AL. Deletion of the thrombin cleavage domain of osteopontin mediates breast cancer cell adhesion, proteolytic activity, tumorigenicity, and metastasis. *BMC Cancer.* 19. Januar 2011;11:25.
 157. Nierodzik ML, Karpatkin S. Thrombin induces tumor growth, metastasis, and angiogenesis: Evidence for a thrombin-regulated dormant tumor phenotype. *Cancer Cell.* November 2006;10(5):355–62.
 158. Tuck AB, Chambers AF, Allan AL. Osteopontin overexpression in breast cancer: knowledge gained and possible implications for clinical management. *J Cell Biochem.* 1. November 2007;102(4):859–68.
 159. Senger DR, Ledbetter SR, Claffey KP, Papadopoulos-Sergiou A, Peruzzi CA, Detmar M. Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the alphavbeta3 integrin, osteopontin, and thrombin. *Am J Pathol.* Juli 1996;149(1):293–305.
 160. 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. *Int J Cancer.* 15. November 2014;135(10):2294–304.
 161. Gaddes ER, Lee D, Gydush G, Wang Y, Dong C. Regulation of fibrin-mediated tumor cell adhesion to the endothelium using anti-thrombin aptamer. *Exp Cell Res.* 10. Dezember 2015;339(2):417–26.
 162. Ozdemir T, Zhang P, Fu C, Dong C. Fibrin serves as a divalent ligand that regulates neutrophil-mediated melanoma cells adhesion to endothelium under shear conditions. *Am J Physiol Cell Physiol.* 15. April 2012;302(8):C1189-1201.
 163. Zhang P, Feng S, Liu G, Wang H, Zhu H, Ren Q, u. a. Mutant B-Raf(V600E) Promotes Melanoma Paracellular Transmigration by Inducing Thrombin-mediated Endothelial Junction Breakdown. *J Biol Chem.* 29. Januar 2016;291(5):2087–106.
 164. Konstantoulaki M, Kouklis P, Malik AB. Protein kinase C modifications of VE-cadherin, p120, and beta-catenin contribute to endothelial barrier dysregulation induced by thrombin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* August 2003;285(2):L434-442.

-
165. Tsopanoglou NE, Maragoudakis ME. Role of thrombin in angiogenesis and tumor progression. *Semin Thromb Hemost.* Februar 2004;30(1):63–9.
 166. Haralabopoulos GC, Grant DS, Kleinman HK, Maragoudakis ME. Thrombin promotes endothelial cell alignment in Matrigel in vitro and angiogenesis in vivo. *Am J Physiol.* Juli 1997;273(1 Pt 1):C239-245.
 167. Tsopanoglou NE, Maragoudakis ME. On the mechanism of thrombin-induced angiogenesis. Potentiation of vascular endothelial growth factor activity on endothelial cells by up-regulation of its receptors. *J Biol Chem.* 20. August 1999;274(34):23969–76.
 168. Tsopanoglou NE, Andriopoulou P, Maragoudakis ME. On the mechanism of thrombin-induced angiogenesis: involvement of $\alpha\beta 3$ -integrin. *Am J Physiol-Cell Physiol.* 1. November 2002;283(5):C1501–10.
 169. Koolwijk P, van Erck MG, de Vree WJ, Vermeer MA, Weich HA, Hanemaaijer R, u. a. Cooperative effect of TNF α , bFGF, and VEGF on the formation of tubular structures of human microvascular endothelial cells in a fibrin matrix. Role of urokinase activity. *J Cell Biol.* 15. März 1996;132(6):1177–88.
 170. Mittermayr R, Slezak P, Haffner N, Smolen D, Hartinger J, Hofmann A, u. a. Controlled release of fibrin matrix-conjugated platelet derived growth factor improves ischemic tissue regeneration by functional angiogenesis. *Acta Biomater.* Januar 2016;29:11–20.
 171. 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.* 02 2016;126(5):1885–96.
 172. McNicol A, Israels SJ. Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis. *Thromb Res.* 1. Juli 1999;95(1):1–18.
 173. Gachet C. Regulation of platelet functions by P2 receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2006;46:277–300.
 174. Ballerini P, Dovizio M, Bruno A, Tacconelli S, Patrignani P. P2Y12 Receptors in Tumorigenesis and Metastasis. *Front Pharmacol* [Internet]. 2. Februar 2018 [zitiert 10. Mai 2020];9. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5801576/>
 175. Kunapuli SP, Dorsam RT, Kim S, Quinton TM. Platelet purinergic receptors. *Curr Opin Pharmacol.* April 2003;3(2):175–80.
 176. Nguyen TA, Diodati JG, Pharand C. Resistance to clopidogrel: a review of the evidence. *J Am Coll Cardiol.* 19. April 2005;45(8):1157–64.
 177. Wang Y, Sun Y, Li D, Zhang L, Wang K, Zuo Y, u. a. Platelet P2Y12 is involved in murine pulmonary metastasis. *PLoS One.* 2013;8(11):e80780.
 178. Cattaneo M. New P2Y(12) inhibitors. *Circulation.* 5. Januar 2010;121(1):171–9.
 179. Kolandaivelu K, Bhatt DL. 55 - Novel Antiplatelet Therapies. In: Michelson AD, Herausgeber. *Platelets (Fourth Edition)* [Internet]. Academic Press; 2019 [zitiert 8. Mai 2020]. S. 991–1015. Verfügbar unter: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128134566000552>

-
180. Elaskalani O, Domenichini A, Abdol Razak NB, E Dye D, Falasca M, Metharom P. Antiplatelet Drug Ticagrelor Enhances Chemotherapeutic Efficacy by Targeting the Novel P2Y₁₂-AKT Pathway in Pancreatic Cancer Cells. *Cancers*. 20 2020;12(1).
181. Kanzler H, Barrat FJ, Hessel EM, Coffman RL. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nat Med*. Mai 2007;13(5):552–9.
182. Yu L-X, Yan H-X, Liu Q, Yang W, Wu H-P, Dong W, u. a. Endotoxin accumulation prevents carcinogen-induced apoptosis and promotes liver tumorigenesis in rodents. *Hepatology*. 2010;52(4):1322–33.
183. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, u. a. Toll-like receptor 4–dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med*. September 2007;13(9):1050–9.
184. Stros M. HMGB proteins: interactions with DNA and chromatin. *Biochim Biophys Acta*. Februar 2010;1799(1–2):101–13.
185. Andersson U, Erlandsson-Harris H. HMGB1 is a potent trigger of arthritis. *J Intern Med*. März 2004;255(3):344–50.
186. 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 Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*. September 2016;124(9):741–7.
187. Andersson U, Tracey KJ. HMGB1 Is a Therapeutic Target for Sterile Inflammation and Infection. *Annu Rev Immunol*. 22. März 2011;29(1):139–62.
188. Andonegui G, Kerfoot SM, McNagny K, Ebbert KVJ, Patel KD, Kubes P. Platelets express functional Toll-like receptor-4. *Blood*. 1. Oktober 2005;106(7):2417–23.
189. 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.
190. 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*. 28. Oktober 2014;5(1):1–13.
191. 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.
192. Nakahata N. Thromboxane A₂: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. *Pharmacol Ther*. April 2008;118(1):18–35.
193. Mehta P, Cummings RD, McEver RP. Affinity and kinetic analysis of P-selectin binding to P-selectin glycoprotein ligand-1. *J Biol Chem*. 4. Dezember 1998;273(49):32506–13.
194. Huttenlocher A, Horwitz AR. Integrins in cell migration. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 1. September 2011;3(9):a005074.

195. Xu XR, Carrim N, Neves MAD, McKeown T, Stratton TW, Coelho RMP, u. a. Platelets and platelet adhesion molecules: novel mechanisms of thrombosis and anti-thrombotic therapies. *Thromb J*. 2016;14(Suppl 1):29.
196. Humphries JD, Byron A, Humphries MJ. Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci*. 1. Oktober 2006;119(Pt 19):3901–3.
197. Nieswandt B, Brakebusch C, Bergmeier W, Schulte V, Bouvard D, Mokhtari-Nejad R, u. a. Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen. *EMBO J*. 1. Mai 2001;20(9):2120–30.
198. Pugh N, Simpson AMC, Smethurst PA, de Groot PG, Raynal N, Farndale RW. Synergism between platelet collagen receptors defined using receptor-specific collagen-mimetic peptide substrata in flowing blood. *Blood*. 17. Juni 2010;115(24):5069–79.
199. Tuszynski GP, Kowalska MA. Thrombospondin-induced adhesion of human platelets. *J Clin Invest*. April 1991;87(4):1387–94.
200. Thiagarajan P, Kelly K. Interaction of thrombin-stimulated platelets with vitronectin (S-protein of complement) substrate: inhibition by a monoclonal antibody to glycoprotein IIb-IIIa complex. *Thromb Haemost*. 22. Dezember 1988;60(3):514–7.
201. Bennett JS. Regulation of integrins in platelets. *Biopolymers*. Juli 2015;104(4):323–33.
202. Grossi IM, Fitzgerald LA, Kendall A, Taylor JD, Sloane BF, Honn KV. Inhibition of human tumor cell induced platelet aggregation by antibodies to platelet glycoproteins Ib and IIb/IIIa. *Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y N*. Dezember 1987;186(3):378–83.
203. Bastida E, Almirall L, Ordinas A. Tumor-cell-induced platelet aggregation is a glycoprotein-dependent and lipoxygenase-associated process. *Int J Cancer*. 15. Juni 1987;39(6):760–3.
204. Clezardin P, Drouin J, Morel-Kopp MC, Hanss M, Kehrel B, Serre CM, u. a. Role of platelet membrane glycoproteins Ib/IX and IIb/IIIa, and of platelet alpha-granule proteins in platelet aggregation induced by human osteosarcoma cells. *Cancer Res*. 1. Oktober 1993;53(19):4695–700.
205. 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.
206. Amirkhosravi A, Mousa SA, Amaya M, Blaydes S, Desai H, Meyer T, u. a. Inhibition of tumor cell-induced platelet aggregation and lung metastasis by the oral GpIIb/IIIa antagonist XV454. *Thromb Haemost*. September 2003;90(3):549–54.
207. Felding-Habermann B, Fransvea E, O'Toole TE, Manzuk L, Faha B, Hensler M. Involvement of tumor cell integrin alpha v beta 3 in hematogenous metastasis of human melanoma cells. *Clin Exp Metastasis*. 2002;19(5):427–36.
208. Desgrosellier JS, Cheresh DA. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer*. Januar 2010;10(1):9–22.

-
209. Bakewell SJ, Nestor P, Prasad S, Tomasson MH, Dowland N, Mehrotra M, u. a. Platelet and osteoclast beta3 integrins are critical for bone metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 25. November 2003;100(24):14205–10.
210. Lonsdorf AS, Krämer BF, Fahrleitner M, Schönberger T, Gnerlich S, Ring S, u. a. Engagement of α IIB β 3 (GPIIb/IIIa) with α v β 3 integrin mediates interaction of melanoma cells with platelets: a connection to hematogenous metastasis. *J Biol Chem*. 13. Januar 2012;287(3):2168–78.
211. Nemeth JA, Nakada MT, Trikha M, Lang Z, Gordon MS, Jayson GC, u. a. Alpha-v integrins as therapeutic targets in oncology. *Cancer Invest*. Oktober 2007;25(7):632–46.
212. Online GL. Fachinformation INTEGRILIN® 0,75 mg/ml, Infusionslösung | Gelbe Liste [Internet]. Gelbe Liste Online. [zitiert 30. März 2020]. Verfügbar unter: https://www.gelbe-liste.de/produkte/INTEGRILIN-0-75-mg-ml-Infusionsloesung_353780/fachinformation
213. Online GL. Fachinformation Tirofiban Ibisqus 50 Mikrogramm/ml Infusionslösung | Gelbe Liste [Internet]. Gelbe Liste Online. [zitiert 30. März 2020]. Verfügbar unter: https://www.gelbe-liste.de/produkte/Tirofiban-Ibisqus-50-Mikrogramm-ml-Infusionsloesung_914660/fachinformation
214. Online GL. ReoPro® 2 mg/ml Injektionslösung oder Infusionslösung, 5 ml | Gelbe Liste [Internet]. Gelbe Liste Online. [zitiert 30. März 2020]. Verfügbar unter: https://www.gelbe-liste.de/produkte/ReoPro-2-mg-ml-Injektionsloesung-oder-Infusionsloesung-5-ml_355280
215. Kononczuk J, Surazynski A, Czyzewska U, Prokop I, Tomczyk M, Palka J, u. a. α IIB β 3-integrin Ligands: Abciximab and Eptifibatide as Proapoptotic Factors in MCF-7 Human Breast Cancer Cells. *Curr Drug Targets*. 2015;16(13):1429–37.
216. Zhao F, Li L, Guan L, Yang H, Wu C, Liu Y. Roles for GP IIB/IIIa and α v β 3 integrins in MDA-MB-231 cell invasion and shear flow-induced cancer cell mechanotransduction. *Cancer Lett*. 1. März 2014;344(1):62–73.
217. Mammadova-Bach E, Zigrino P, Brucker C, Bourdon C, Freund M, De Arcangelis A, u. a. Platelet integrin α 6 β 1 controls lung metastasis through direct binding to cancer cell-derived ADAM9. *JCI Insight*. 08 2016;1(14):e88245.
218. Oria VO, Lopatta P, Schilling O. The pleiotropic roles of ADAM9 in the biology of solid tumors. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2018;75(13):2291–301.
219. Berndt MC, Gregory C, Kabral A, Zola H, Fournier D, Castaldi PA. Purification and preliminary characterization of the glycoprotein Ib complex in the human platelet membrane. *Eur J Biochem*. 16. September 1985;151(3):637–49.
220. Li R, Emsley J. The organizing principle of the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex. *J Thromb Haemost JTH*. April 2013;11(4):605–14.
221. 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*. 1. September 1982;27(5):549–54.

-
222. Romo GM, Dong JF, 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.
223. Bradford HN, Pixley RA, Colman RW. Human factor XII binding to the glycoprotein Ib-IX-V complex inhibits thrombin-induced platelet aggregation. *J Biol Chem*. 28. Juli 2000;275(30):22756–63.
224. Berndt MC, Shen Y, Dopheide SM, Gardiner EE, Andrews RK. The vascular biology of the glycoprotein Ib-IX-V complex. *Thromb Haemost*. Juli 2001;86(1):178–88.
225. Menter DG, Tucker SC, Kopetz S, Sood AK, Crissman JD, Honn KV. Platelets and cancer: a casual or causal relationship: revisited. *Cancer Metastasis Rev*. März 2014;33(1):231–69.
226. Garcia A, Quinton TM, Dorsam RT, Kunapuli SP. Src family kinase-mediated and Erk-mediated thromboxane A2 generation are essential for VWF/GPIb-induced fibrinogen receptor activation in human platelets. *Blood*. 15. November 2005;106(10):3410–4.
227. Li Z, Xi X, Du X. A mitogen-activated protein kinase-dependent signaling pathway in the activation of platelet integrin α IIb β 3. *J Biol Chem*. 9. November 2001;276(45):42226–32.
228. Canobbio I, Balduini C, Torti M. Signalling through the platelet glycoprotein Ib-V-IX complex. *Cell Signal*. Dezember 2004;16(12):1329–44.
229. Jain S, Zuka M, Liu J, Russell S, Dent J, Guerrero JA, u. a. Platelet glycoprotein Ib alpha supports experimental lung metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 22. Mai 2007;104(21):9024–8.
230. Mojiri A, Stoletov K, Carrillo MAL, Willetts L, Jain S, Godbout R, u. a. Functional assessment of von Willebrand factor expression by cancer cells of non-endothelial origin. *Oncotarget*. 21. Februar 2017;8(8):13015–29.
231. Erpenbeck L, Nieswandt B, Schön M, Pozgajova M, Schön MP. Inhibition of platelet GPIb alpha and promotion of melanoma metastasis. *J Invest Dermatol*. Februar 2010;130(2):576–86.
232. Li C, Piran S, Chen P, Lang S, Zarpellon A, Jin JW, u. a. The maternal immune response to fetal platelet GPIb α causes frequent miscarriage in mice that can be prevented by intravenous IgG and anti-FcRn therapies. *J Clin Invest*. November 2011;121(11):4537–47.
233. Li J, van der Wal DE, Zhu G, Xu M, Yougbare I, Ma L, u. a. Desialylation is a mechanism of Fc-independent platelet clearance and a therapeutic target in immune thrombocytopenia. *Nat Commun*. 17. Juli 2015;6:7737.
234. Bergmeier W, Rackebrandt K, Schröder W, Zirngibl H, Nieswandt B. Structural and functional characterization of the mouse von Willebrand factor receptor GPIb-IX with novel monoclonal antibodies. *Blood*. 1. Februar 2000;95(3):886–93.
235. Quach ME, Dragovich MA, Chen W, Syed AK, Cao W, Liang X, u. a. Fc-independent immune thrombocytopenia via mechanomolecular signaling in platelets. *Blood*. 15 2018;131(7):787–96.

-
236. Toyoshima M, Nakajima M, Yamori T, Tsuruo T. Purification and characterization of the platelet-aggregating sialoglycoprotein gp44 expressed by highly metastatic variant cells of mouse colon adenocarcinoma 26. *Cancer Res.* 15. Februar 1995;55(4):767–73.
237. Dang Q, Liu J, Li J, Sun Y. Podoplanin: a novel regulator of tumor invasion and metastasis. *Med Oncol Northwood Lond Engl.* September 2014;31(9):24.
238. Schacht V, Dadras SS, Johnson LA, Jackson DG, Hong Y-K, Detmar M. Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin-type transmembrane glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors. *Am J Pathol.* März 2005;166(3):913–21.
239. Peterziel H, Müller J, Danner A, Barbus S, Liu H-K, Radlwimmer B, u. a. Expression of podoplanin in human astrocytic brain tumors is controlled by the PI3K-AKT-AP-1 signaling pathway and promoter methylation. *Neuro-Oncol.* April 2012;14(4):426–39.
240. Kunita A, Kashima TG, Ohazama A, Grigoriadis AE, Fukayama M. Podoplanin is regulated by AP-1 and promotes platelet aggregation and cell migration in osteosarcoma. *Am J Pathol.* August 2011;179(2):1041–9.
241. Kimura N, Kimura I. Podoplanin as a marker for mesothelioma. *Pathol Int.* Februar 2005;55(2):83–6.
242. Kato Y, Sasagawa I, Kaneko M, Osawa M, Fujita N, Tsuruo T. Aggrus: a diagnostic marker that distinguishes seminoma from embryonal carcinoma in testicular germ cell tumors. *Oncogene.* 4. November 2004;23(52):8552–6.
243. 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.
244. Hughes CE, Sinha U, Pandey A, Eble JA, O’Callaghan CA, Watson SP. Critical Role for an Acidic Amino Acid Region in Platelet Signaling by the HemITAM (Hemi-immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) Containing Receptor CLEC-2 (C-type Lectin Receptor-2). *J Biol Chem.* 15. Februar 2013;288(7):5127–35.
245. Hughes CE, Auger JM, McGlade J, Eble JA, Pearce AC, Watson SP. Differential roles for the adapters Gads and LAT in platelet activation by GPVI and CLEC-2. *J Thromb Haemost JTH.* Dezember 2008;6(12):2152–9.
246. Bauer B, Steinle A. HemITAM: A single tyrosine motif that packs a punch. *Sci Signal.* 5. Dezember 2017;10(508).
247. Shirai T, Inoue O, Tamura S, Tsukiji N, Sasaki T, Endo H, u. a. C-type lectin-like receptor 2 promotes hematogenous tumor metastasis and prothrombotic state in tumor-bearing mice. *J Thromb Haemost JTH.* 2017;15(3):513–25.
248. Riedl J, Preusser M, Nazari PMS, Posch F, Panzer S, Marosi C, u. a. Podoplanin expression in primary brain tumors induces platelet aggregation and increases risk of venous thromboembolism. *Blood.* 30. März 2017;129(13):1831–9.
249. Kunita A, Kashima TG, Morishita Y, Fukayama M, Kato Y, Tsuruo T, u. a. The platelet aggregation-inducing factor aggrus/podoplanin promotes pulmonary metastasis. *Am J Pathol.* April 2007;170(4):1337–47.

-
250. Chang Y-W, Hsieh P-W, Chang Y-T, Lu M-H, Huang T-F, Chong K-Y, u. a. Identification of a novel platelet antagonist that binds to CLEC-2 and suppresses podoplanin-induced platelet aggregation and cancer metastasis. *Oncotarget*. 30. Oktober 2015;6(40):42733–48.
 251. McKenzie SE, Taylor SM, Malladi P, Yuhan H, Cassel DL, Chien P, u. a. The role of the human Fc receptor Fc gamma RIIA in the immune clearance of platelets: a transgenic mouse model. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1. April 1999;162(7):4311–8.
 252. Arman M, Krauel K. Human platelet IgG Fc receptor FcγRIIA in immunity and thrombosis. *J Thromb Haemost JTH*. Juni 2015;13(6):893–908.
 253. Karas SP, Rosse WF, Kurlander RJ. Characterization of the IgG-Fc receptor on human platelets. *Blood*. Dezember 1982;60(6):1277–82.
 254. Gao C, Boylan B, Bougie D, Gill JC, Birenbaum J, Newman DK, u. a. Eptifibatide-induced thrombocytopenia and thrombosis in humans require FcγRIIa and the integrin β3 cytoplasmic domain. *J Clin Invest*. März 2009;119(3):504–11.
 255. Pain S, Falet H, Saci A, Bachelot-Loza C, Rendu F. Tyrosine phosphorylation and association of FcγRII and p72(Syk) are not limited to the FcγRII signalling pathway. *Cell Signal*. März 2000;12(3):165–71.
 256. Boylan B, Gao C, Rathore V, Gill JC, Newman DK, Newman PJ. Identification of FcγRIIa as the ITAM-bearing receptor mediating αIIbβ3 outside-in integrin signaling in human platelets. *Blood*. 1. Oktober 2008;112(7):2780–6.
 257. Canobbio I, Stefanini L, Guidetti GF, Balduini C, Torti M. A new role for FcγRIIA in the potentiation of human platelet activation induced by weak stimulation. *Cell Signal*. Juni 2006;18(6):861–70.
 258. Daëron M. Fc receptor biology. *Annu Rev Immunol*. 1997;15:203–34.
 259. Mitrugno A, Williams D, Kerrigan SW, Moran N. A novel and essential role for FcγRIIa in cancer cell-induced platelet activation. *Blood*. 9. Januar 2014;123(2):249–60.
 260. Miao S, Shu D, Zhu Y, Lu M, Zhang Q, Pei Y, u. a. Cancer cell-derived immunoglobulin G activates platelets by binding to platelet FcγRIIa. *Cell Death Dis*. 28 2019;10(2):87.
 261. Horii K, Kahn ML, Herr AB. Structural basis for platelet collagen responses by the immune-type receptor glycoprotein VI. *Blood*. 1. August 2006;108(3):936–42.
 262. Tsuji M, Ezumi Y, Arai M, Takayama H. A novel association of Fc receptor gamma-chain with glycoprotein VI and their co-expression as a collagen receptor in human platelets. *J Biol Chem*. 19. September 1997;272(38):23528–31.
 263. Miura Y, Takahashi T, Jung SM, Moroi M. Analysis of the interaction of platelet collagen receptor glycoprotein VI (GPVI) with collagen. A dimeric form of GPVI, but not the monomeric form, shows affinity to fibrous collagen. *J Biol Chem*. 29. November 2002;277(48):46197–204.
 264. Jung SM, Tsuji K, Moroi M. Glycoprotein (GP) VI dimer as a major collagen-binding site of native platelets: direct evidence obtained with dimeric GPVI-specific Fabs. *J Thromb Haemost JTH*. August 2009;7(8):1347–55.

-
265. Suzuki-Inoue K, Tulasne D, Shen Y, Bori-Sanz T, Inoue O, Jung SM, u. a. Association of Fyn and Lyn with the proline-rich domain of glycoprotein VI regulates intracellular signaling. *J Biol Chem.* 14. Juni 2002;277(24):21561–6.
266. Poulter NS, Pollitt AY, Owen DM, Gardiner EE, Andrews RK, Shimizu H, u. a. Clustering of glycoprotein VI (GPVI) dimers upon adhesion to collagen as a mechanism to regulate GPVI signaling in platelets. *J Thromb Haemost JTH.* 2017;15(3):549–64.
267. Watson SP, Auger JM, McCarty OJT, Pearce AC. GPVI and integrin alphaIIb beta3 signaling in platelets. *J Thromb Haemost JTH.* August 2005;3(8):1752–62.
268. Zahid M, Mangin P, Loyau S, Hechler B, Billiald P, Gachet C, u. a. The future of glycoprotein VI as an antithrombotic target. *J Thromb Haemost JTH.* Dezember 2012;10(12):2418–27.
269. Bültmann A, Li Z, Wagner S, Peluso M, Schönberger T, Weis C, u. a. Impact of glycoprotein VI and platelet adhesion on atherosclerosis--a possible role of fibronectin. *J Mol Cell Cardiol.* September 2010;49(3):532–42.
270. Alshehri OM, Hughes CE, Montague S, Watson SK, Frampton J, Bender M, u. a. Fibrin activates GPVI in human and mouse platelets. *Blood.* 24. September 2015;126(13):1601–8.
271. Inoue O, Suzuki-Inoue K, McCarty OJT, Moroi M, Ruggeri ZM, Kunicki TJ, u. a. Laminin stimulates spreading of platelets through integrin alpha6beta1-dependent activation of GPVI. *Blood.* 15. Februar 2006;107(4):1405–12.
272. Mammadova-Bach E, Gil-Pulido J, Sarukhanyan E, Burkard P, Shityakov S, Schonhart C, u. a. Platelet glycoprotein VI promotes metastasis through interaction with cancer cell-derived galectin-3. *Blood.* 2. April 2020;135(14):1146–60.
273. Dovizio M, Maier TJ, Alberti S, Di Francesco L, Marcantoni E, Münch 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.* Juli 2013;84(1):25–40.
274. Ye X, Weinberg RA. Epithelial-Mesenchymal Plasticity: A central regulator of cancer progression. *Trends Cell Biol.* November 2015;25(11):675–86.
275. Volz J, Mammadova-Bach E, Gil-Pulido J, Nandigama R, Remer K, Sorokin L, u. a. Inhibition of platelet GPVI induces intratumor hemorrhage and increases efficacy of chemotherapy in mice. *Blood.* 20 2019;133(25):2696–706.
276. Cummings RD, McEver RP. C-Type Lectins. 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 28. März 2020]. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK453028/>
277. Kansas GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood.* 1. November 1996;88(9):3259–87.
278. Crockett-Torabi E. Selectins and mechanisms of signal transduction. *J Leukoc Biol.* Januar 1998;63(1):1–14.

-
279. Tedder TF, Steeber DA, Chen A, Engel P. The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. Juli 1995;9(10):866–73.
280. Chou K-C. The convergence-divergence duality in lectin domains of selectin family and its implications. *FEBS Lett*. 17. April 1995;363(1):123–6.
281. Kolbinger F, Patton JT, Geisenhoff G, Aenis A, Li X, Katopodis AG. The Carbohydrate-Recognition Domain of E-Selectin Is Sufficient for Ligand Binding under Both Static and Flow Conditions. *Biochemistry*. 1. Januar 1996;35(20):6385–92.
282. Springer TA. Structural basis for selectin mechanochemistry. *Proc Natl Acad Sci*. 6. Januar 2009;106(1):91–6.
283. Phan UT, Waldron TT, Springer TA. Remodeling of the lectin-EGF-like domain interface in P- and L-selectin increases adhesiveness and shear resistance under hydrodynamic force. *Nat Immunol*. August 2006;7(8):883–9.
284. Geng JG, Bevilacqua MP, Moore KL, McIntyre TM, Prescott SM, Kim JM, u. a. Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature*. 22. Februar 1990;343(6260):757–60.
285. Evangelista V, Pamuklar Z, Piccoli A, Manarini S, Dell'elba G, Pecce R, u. a. Src family kinases mediate neutrophil adhesion to adherent platelets. *Blood*. 15. März 2007;109(6):2461–9.
286. Simon SI, Hu Y, Vestweber D, Smith CW. Neutrophil tethering on E-selectin activates beta 2 integrin binding to ICAM-1 through a mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15. April 2000;164(8):4348–58.
287. Rosen SD. Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:129–56.
288. Varki A. Selectin ligands: will the real ones please stand up? *J Clin Invest*. 15. Januar 1997;99(2):158–62.
289. Perez-Vilar J, Hill RL. The structure and assembly of secreted mucins. *J Biol Chem*. 5. November 1999;274(45):31751–4.
290. Rhodes JM. Mucins and inflammatory bowel disease. *QJM Mon J Assoc Physicians*. Februar 1997;90(2):79–82.
291. Hensley P, McDevitt PJ, Brooks I, Trill JJ, Feild JA, McNulty DE, u. a. The soluble form of E-selectin is an asymmetric monomer. Expression, purification, and characterization of the recombinant protein. *J Biol Chem*. 30. September 1994;269(39):23949–58.
292. Moore KL, Stults NL, Diaz S, Smith DF, Cummings RD, Varki A, u. a. Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells. *J Cell Biol*. Juli 1992;118(2):445–56.
293. Xia L, Ramachandran V, McDaniel JM, Nguyen KN, Cummings RD, McEver RP. N-terminal residues in murine P-selectin glycoprotein ligand-1 required for binding to murine P-selectin. *Blood*. 15. Januar 2003;101(2):552–9.

-
294. Kappelmayer J, Nagy B. The Interaction of Selectins and PSGL-1 as a Key Component in Thrombus Formation and Cancer Progression. *BioMed Res Int* [Internet]. 2017 [zitiert 18. April 2020];2017. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5478826/>
295. Moore KL. Structure and function of P-selectin glycoprotein ligand-1. *Leuk Lymphoma*. März 1998;29(1-2):1-15.
296. Miner JJ, Xia L, Yago T, Kappelmayer J, Liu Z, Klopocki AG, u. a. Separable requirements for cytoplasmic domain of PSGL-1 in leukocyte rolling and signaling under flow. *Blood*. 1. September 2008;112(5):2035-45.
297. Dimitroff CJ, Descheny L, Trujillo N, Kim R, Nguyen V, Huang W, u. a. Identification of leukocyte E-selectin ligands, P-selectin glycoprotein ligand-1 and E-selectin ligand-1, on human metastatic prostate tumor cells. *Cancer Res*. 1. Juli 2005;65(13):5750-60.
298. Gong L, Cai Y, Zhou X, Yang H. Activated platelets interact with lung cancer cells through P-selectin glycoprotein ligand-1. *Pathol Oncol Res POR*. Oktober 2012;18(4):989-96.
299. Kristiansen G, Sammar M, Altevogt P. Tumour biological aspects of CD24, a mucin-like adhesion molecule. *J Mol Histol*. März 2004;35(3):255-62.
300. Pierres M, Naquet P, Barbet J, Marchetto S, Marics I, Devaux C, u. a. Evidence that murine hematopoietic cell subset marker J11d is attached to a glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor. *Eur J Immunol*. Dezember 1987;17(12):1781-5.
301. Bretz NP, Salnikow AV, Perne C, Keller S, Wang X, Mierke CT, u. a. CD24 controls Src/STAT3 activity in human tumors. *Cell Mol Life Sci CMLS*. November 2012;69(22):3863-79.
302. Schabath H, Runz S, Joumaa S, Altevogt P. CD24 affects CXCR4 function in pre-B lymphocytes and breast carcinoma cells. *J Cell Sci*. 15. Januar 2006;119(Pt 2):314-25.
303. Tarhriz V, Bandehpour M, Dastmalchi S, Ouladsahebmadarek E, Zarredar H, Eyvazi S. Overview of CD24 as a new molecular marker in ovarian cancer. *J Cell Physiol*. 2019;234(3):2134-42.
304. Wang H, Zhou X-M, Xu W-D, Tao T, Liu G-J, Gao Y-Y, u. a. Inhibition of Elevated Hippocampal CD24 Reduces Neurogenesis in Mice With Traumatic Brain Injury. *J Surg Res*. 2020;245:321-9.
305. Kristiansen G, Denkert C, Schlüns K, Dahl E, Pilarsky C, Hauptmann S. CD24 is expressed in ovarian cancer and is a new independent prognostic marker of patient survival. *Am J Pathol*. Oktober 2002;161(4):1215-21.
306. Kristiansen G, Pilarsky C, Pervan J, Stürzebecher B, Stephan C, Jung K, u. a. CD24 expression is a significant predictor of PSA relapse and poor prognosis in low grade or organ confined prostate cancer. *The Prostate*. 1. Februar 2004;58(2):183-92.
307. Kristiansen G, Winzer K-J, Mayordomo E, Bellach J, Schlüns K, Denkert C, u. a. CD24 Expression Is a New Prognostic Marker in Breast Cancer. *Clin Cancer Res*. 15. Oktober 2003;9(13):4906-13.

308. Salnikov AV, Bretz NP, Perne C, Hazin J, Keller S, Fogel M, u. a. Antibody targeting of CD24 efficiently retards growth and influences cytokine milieu in experimental carcinomas. *Br J Cancer*. 16. April 2013;108(7):1449–59.
309. Alves CS, Burdick MM, Thomas SN, Pawar P, Konstantopoulos K. The dual role of CD44 as a functional P-selectin ligand and fibrin receptor in colon carcinoma cell adhesion. *Am J Physiol Cell Physiol*. April 2008;294(4):C907-916.
310. Garcia J, Callewaert N, Borsig L. P-selectin mediates metastatic progression through binding to sulfatides on tumor cells. *Glycobiology*. Februar 2007;17(2):185–96.
311. 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 U S A*. 19. Februar 2002;99(4):2193–8.
312. Läubli H, Borsig L. Selectins promote tumor metastasis. *Semin Cancer Biol*. Juni 2010;20(3):169–77.
313. Häuselmann I, Roblek M, Protsyuk D, Huck V, Knopfova L, Grässle S, u. a. Monocyte induction of E-selectin-mediated endothelial activation releases VE-cadherin junctions to promote tumor cell extravasation in the metastasis cascade. *Cancer Res*. 15. September 2016;76(18):5302–12.
314. Häuselmann I, Borsig L. Altered tumor-cell glycosylation promotes metastasis. *Front Oncol*. 2014;4:28.
315. Kim YJ, Varki A. Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. *Glycoconj J*. August 1997;14(5):569–76.
316. Kannagi R. Molecular mechanism for cancer-associated induction of sialyl Lewis X and sialyl Lewis A expression-The Warburg effect revisited. *Glycoconj J*. 2004;20(5):353–64.
317. Hollingsworth MA, Swanson BJ. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat Rev Cancer*. Januar 2004;4(1):45–60.
318. Kim YJ, Borsig L, Varki NM, Varki A. P-selectin deficiency attenuates tumor growth and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 4. August 1998;95(16):9325–30.
319. Läubli H, Borsig L. Selectins as mediators of lung metastasis. *Cancer Microenviron Off J Int Cancer Microenviron Soc*. 27. Februar 2010;3(1):97–105.
320. Mannori G, Crottet P, Cecconi O, Hanasaki K, Aruffo A, Nelson RM, u. a. Differential colon cancer cell adhesion to E-, P-, and L-selectin: role of mucin-type glycoproteins. *Cancer Res*. 1. Oktober 1995;55(19):4425–31.
321. 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.
322. 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*. 2017;34(1):25–35.

-
323. Qi C, Wei B, Zhou W, Yang Y, Li B, Guo S, u. a. P-selectin-mediated platelet adhesion promotes tumor growth. *Oncotarget*. 9. Februar 2015;6(9):6584–96.
324. Zuchtriegel G, Uhl B, Pühr-Westerheide D, Pörnbacher M, Lauber K, Krombach F, u. a. Platelets Guide Leukocytes to Their Sites of Extravasation. *PLoS Biol*. 2016;14(5):e1002459.
325. da Costa Martins PA, van Gils JM, Mol A, Hordijk PL, Zwaginga JJ. Platelet binding to monocytes increases the adhesive properties of monocytes by up-regulating the expression and functionality of beta1 and beta2 integrins. *J Leukoc Biol*. März 2006;79(3):499–507.
326. Shao B, Wahrenbrock MG, Yao L, David T, Coughlin SR, Xia L, u. a. Carcinoma mucins trigger reciprocal activation of platelets and neutrophils in a murine model of Trousseau syndrome. *Blood*. 13. Oktober 2011;118(15):4015–23.
327. Onishi A, St Ange K, Dordick JS, Linhardt RJ. Heparin and anticoagulation. *Front Biosci Landmark Ed*. 01 2016;21:1372–92.
328. Online GL. Fachinformation Heparin-Natrium-5000-ratiopharm®, Amp. | Gelbe Liste [Internet]. Gelbe Liste Online. [zitiert 7. Mai 2020]. Verfügbar unter: https://www.gelbe-liste.de/produkte/Heparin-Natrium-5000-ratiopharm-Amp_13580/fachinformation
329. Falanga A, Marchetti M. Heparin in tumor progression and metastatic dissemination. *Semin Thromb Hemost*. Oktober 2007;33(7):688–94.
330. Online GL. Fachinformation Clexane® 4.000 I. E. (40 mg)/0,4 ml Injektionslösung | Gelbe Liste [Internet]. Gelbe Liste Online. [zitiert 22. April 2020]. Verfügbar unter: https://www.gelbe-liste.de/produkte/Clexane-4-000-I-E-40-mg-0-4-ml-Injektionsloesung_498197/fachinformation
331. Ralay-Ranaivo B, Desmaële D, Bianchini EP, Lepeltier E, Bourgaux C, Borgel D, u. a. Novel self assembling nanoparticles for the oral administration of fondaparinux: Synthesis, characterization and in vivo evaluation. *J Controlled Release*. 28. November 2014;194:323–31.
332. Nelson RM, Cecconi O, Roberts WG, Aruffo A, Linhardt RJ, Bevilacqua MP. Heparin oligosaccharides bind L- and P-selectin and inhibit acute inflammation. *Blood*. 1. Dezember 1993;82(11):3253–8.
333. Koenig A, Norgard-Sumnicht K, Linhardt R, Varki A. Differential interactions of heparin and heparan sulfate glycosaminoglycans with the selectins. Implications for the use of unfractionated and low molecular weight heparins as therapeutic agents. *J Clin Invest*. 15. Februar 1998;101(4):877–89.
334. Borsig L. Antimetastatic activities of modified heparins: selectin inhibition by heparin attenuates metastasis. *Semin Thromb Hemost*. Juli 2007;33(5):540–6.
335. Simonis D, Fritzsche J, Alban S, Bendas G. Kinetic analysis of heparin and glucan sulfates binding to P-selectin and its impact on the general understanding of selectin inhibition. *Biochemistry*. 22. Mai 2007;46(20):6156–64.
336. Simonis D, Christ K, Alban S, Bendas G. Affinity and kinetics of different heparins binding to P- and L-selectin. *Semin Thromb Hemost*. Juli 2007;33(5):534–9.

-
337. Ludwig RJ, Boehme B, Podda M, Henschler R, Jager E, Tandi C, u. a. Endothelial P-selectin as a target of heparin action in experimental melanoma lung metastasis. *Cancer Res.* 15. April 2004;64(8):2743–50.
338. 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 U S A.* 13. März 2001;98(6):3352–7.
339. 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.
340. Vlodavsky I, Mohsen M, Lider O, Svahn CM, Ekre HP, Vigoda M, u. a. Inhibition of tumor metastasis by heparanase inhibiting species of heparin. *Invasion Metastasis.* 1995 1994;14(1–6):290–302.
341. 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.* April 1996;6(3):355–66.
342. 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.
343. Hostettler N, Naggi A, Torri G, Ishai-Michaeli R, Casu B, Vlodavsky I, u. a. P-selectin- and heparanase-dependent antimetastatic activity of non-anticoagulant heparins. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* November 2007;21(13):3562–72.
344. Casu B, Vlodavsky I, Sanderson RD. Non-Anticoagulant Heparins and Inhibition of Cancer. *Pathophysiol Haemost Thromb.* Januar 2009;36(3–4):195–203.
345. Yoshitomi Y, Nakanishi H, Kusano Y, Munesue S, Oguri K, Tatematsu M, u. a. Inhibition of experimental lung metastases of Lewis lung carcinoma cells by chemically modified heparin with reduced anticoagulant activity. *Cancer Lett.* 1. April 2004;207(2):165–74.
346. Gao Y, Li N, Fei R, Chen Z, Zheng S, Zeng X. P-Selectin-mediated acute inflammation can be blocked by chemically modified heparin, RO-heparin. *Mol Cells.* 30. Juni 2005;19(3):350–5.
347. Davenpeck KL, Berens KL, Dixon RAF, Dupre B, Bochner BS. Inhibition of adhesion of human neutrophils and eosinophils to P-selectin by the sialyl Lewis x antagonist TBC1269: Preferential activity against neutrophil adhesion in vitro. *J Allergy Clin Immunol.* 1. April 2000;105(4):769–75.
348. Palma-Vargas JM, Toledo-Pereyra L, Dean RE, Harkema JM, Dixon RA, Kogan TP. Small-molecule selectin inhibitor protects against liver inflammatory response after ischemia and reperfusion. *J Am Coll Surg.* Oktober 1997;185(4):365–72.
349. Abraham WM, Ahmed A, Sabater JR, Lauredo IT, Botvinnikova Y, Bjercke RJ, u. a. Selectin Blockade Prevents Antigen-induced Late Bronchial Responses and Airway Hyperresponsiveness in Allergic Sheep. *Am J Respir Crit Care Med.* 1. April 1999;159(4):1205–14.
350. Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res BCR.* 2011;13(4):215.

-
351. 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. *Breast Dis.* 2010;32(1–2):35–48.
352. Brandes LJ, Hermonat MW. Receptor status and subsequent sensitivity of subclones of MCF-7 human breast cancer cells surviving exposure to diethylstilbestrol. *Cancer Res.* Juni 1983;43(6):2831–5.
353. Hüser L, Sachindra S, Granados K, Federico A, Larribère L, Novak D, u. a. SOX2-mediated upregulation of CD24 promotes adaptive resistance toward targeted therapy in melanoma. *Int J Cancer.* 15. Dezember 2018;143(12):3131–42.
354. Pérez de León AA, Tabachnick WJ. Apyrase activity and adenosine diphosphate induced platelet aggregation inhibition by the salivary gland proteins of *Culicoides variipennis*, the North American vector of bluetongue viruses. *Vet Parasitol.* Februar 1996;61(3–4):327–38.
355. Rillahan CD, Antonopoulos A, Lefort CT, Sonon R, Azadi P, Ley K, u. a. Global metabolic inhibitors of sialyl- and fucosyltransferases remodel the glycome. *Nat Chem Biol.* Juli 2012;8(7):661–8.
356. Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets.* August 2001;12(5):261–73.
357. Morciano G, Sarti AC, Marchi S, Missiroli S, Falzoni S, Raffaghello L, u. a. Use of luciferase probes to measure ATP in living cells and animals. *Nat Protoc.* August 2017;12(8):1542–62.
358. Proximity Extension Assay (PEA) Technology [Internet]. Olink. [zitiert 31. März 2021]. Verfügbar unter: <https://www.olink.com/data-you-can-trust/technology/>
359. Cohen I. The contractile system of blood platelets and its function. *Methods Achiev Exp Pathol.* 1979;9:40–86.
360. Duarte RCF, Ferreira CN, Rios DRA, Reis HJ dos, Carvalho M das G. Thrombin generation assays for global evaluation of the hemostatic system: perspectives and limitations. *Rev Bras Hematol E Hemoter.* 2017;39(3):259–65.
361. van Berkel SS, van der Lee B, van Delft FL, Wagenvoord R, Hemker HC, Rutjes FPJT. Fluorogenic peptide-based substrates for monitoring thrombin activity. *ChemMedChem.* April 2012;7(4):606–17.
362. Castoldi E, Rosing J. Thrombin generation tests. *Thromb Res.* Februar 2011;127 Suppl 3:S21–25.
363. TECHNOTHROMBIN® TGA für Fluoreszenz Mikrotiterplatten Reader | technoclone.com [Internet]. [zitiert 31. März 2021]. Verfügbar unter: <https://www.technoclone.com/de/product/technothrombinr-tga-fuer-fluoreszenz-mikrotiterplatten-reader>
364. Bratosin D, Mitrofan L, Palii C, Estaquier J, Montreuil J. Novel fluorescence assay using calcein-AM for the determination of human erythrocyte viability and aging. *Cytometry A.* 2005;66A(1):78–84.

-
365. Rinder HM, Snyder EL, Bonan JL, Napychank PA, Malkus H, Smith BR. Activation in stored platelet concentrates: correlation between membrane expression of P-selectin, glycoprotein IIb/IIIa, and beta-thromboglobulin release. *Transfusion (Paris)*. Januar 1993;33(1):25–9.
366. Recombinant Human P-Selectin/CD62P Fc Chimera Protein, CF [Internet]. www.rndsystems.com. [zitiert 20. April 2021]. Verfügbar unter: https://www.rndsystems.com/products/recombinant-human-p-selectin-cd62p-fc-chimera-protein-cf_137-ps
367. Noble JE, Bailey MJA. Quantitation of protein. *Methods Enzymol*. 2009;463:73–95.
368. Sivaraman B, Latour RA. Delineating the roles of the GPIIb/IIIa and GP-Ib-IX-V platelet receptors in mediating platelet adhesion to adsorbed fibrinogen and albumin. *Biomaterials*. August 2011;32(23):5365–70.
369. Heimark RL. Calcium-dependent and calcium-independent cell adhesion molecules in the endothelium. *Ann N Y Acad Sci*. 1991;614:229–39.
370. de Bruijne-Admiraal LG, Modderman PW, Von dem Borne AE, Sonnenberg A. P-selectin mediates Ca(2+)-dependent adhesion of activated platelets to many different types of leukocytes: detection by flow cytometry. *Blood*. 1. Juli 1992;80(1):134–42.
371. Estevez B, Kim K, Delaney MK, Stojanovic-Terpo A, Shen B, Ruan C, u. a. Signaling-mediated cooperativity between glycoprotein Ib-IX and protease-activated receptors in thrombin-induced platelet activation. *Blood*. 4. Februar 2016;127(5):626–36.
372. Blair P, Flaumenhaft R. Platelet α -granules: Basic biology and clinical correlates. *Blood Rev*. Juli 2009;23(4):177–89.
373. Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res*. Februar 2009;19(2):156–72.
374. Gleissner CA, von Hundelshausen P, Ley K. Platelet chemokines in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. November 2008;28(11):1920–7.
375. Begley LA, Kasina S, Mehra R, Adsule S, Admon AJ, Lonigro RJ, u. a. CXCL5 promotes prostate cancer progression. *Neoplasia N Y N*. März 2008;10(3):244–54.
376. Ntanasis-Stathopoulos I, Fotiou D, Terpos E. CCL3 Signaling in the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1231:13–21.
377. Liu Q, Li A, Tian Y, Wu JD, Liu Y, Li T, u. a. The CXCL8-CXCR1/2 pathways in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2016;31:61–71.
378. Yoshimura T. The chemokine MCP-1 (CCL2) in the host interaction with cancer: a foe or ally? *Cell Mol Immunol*. 2018;15(4):335–45.
379. Duffy MJ, McGowan PM, Harbeck N, Thomssen C, Schmitt M. uPA and PAI-1 as biomarkers in breast cancer: validated for clinical use in level-of-evidence-1 studies. *Breast Cancer Res*. 22. August 2014;16(4):428.

-
380. Ikenaka Y, Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Noguchi R, Tsujinoue H, u. a. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) inhibits tumor growth and angiogenesis in the TIMP-1 transgenic mouse model. *Int J Cancer*. 20. Juni 2003;105(3):340–6.
381. Akahane T, Akahane M, Shah A, Connor CM, Thorgeirsson UP. TIMP-1 inhibits microvascular endothelial cell migration by MMP-dependent and MMP-independent mechanisms. *Exp Cell Res*. 10. Dezember 2004;301(2):158–67.
382. Bloomston M, Shafii A, Zervos EE, Rosemurgy AS. TIMP-1 overexpression in pancreatic cancer attenuates tumor growth, decreases implantation and metastasis, and inhibits angiogenesis. *J Surg Res*. Januar 2002;102(1):39–44.
383. Pesta M, Kulda V, Kucera R, Pesek M, Vrzalova J, Liska V, u. a. Prognostic Significance of TIMP-1 in Non-small Cell Lung Cancer. *Anticancer Res*. 1. November 2011;31(11):4031–8.
384. Gong Y, Scott E, Lu R, Xu Y, Oh WK, Yu Q. TIMP-1 Promotes Accumulation of Cancer Associated Fibroblasts and Cancer Progression. *PLOS ONE*. 15. Oktober 2013;8(10):e77366.
385. Taylor L, Vasudevan SR, Jones CI, Gibbins JM, Churchill GC, Campbell RD, u. a. Discovery of novel GPVI receptor antagonists by structure-based repurposing. *PloS One*. 2014;9(6):e101209.
386. Onselaer M-B, Nagy M, Pallini C, Pike JA, Perrella G, Quintanilla LG, u. a. Comparison of the GPVI inhibitors losartan and honokiol. *Platelets*. 2020;31(2):187–97.
387. Jiang P, Loyau S, Tchitchinadze M, Ropers J, Jondeau G, Jandrot-Perrus M. Inhibition of Glycoprotein VI Clustering by Collagen as a Mechanism of Inhibiting Collagen-Induced Platelet Responses: The Example of Losartan. *PloS One*. 2015;10(6):e0128744.
388. Fullard JF. The role of the platelet glycoprotein IIb/IIIa in thrombosis and haemostasis. *Curr Pharm Des*. 2004;10(14):1567–76.
389. Schlesinger M, Simonis D, Schmitz P, Fritzsche J, Bendas G. Binding between heparin and the integrin VLA-4. *Thromb Haemost*. November 2009;102(5):816–22.
390. Ornstein DL, Zacharski LR. The use of heparin for treating human malignancies. *Haemostasis*. Dezember 1999;29 Suppl S1:48–60.
391. 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*. 2007;120 Suppl 2:S107-111.
392. Bauer KA, Hawkins DW, Peters PC, Petitou M, Herbert J-M, van Boeckel CAA, u. a. Fondaparinux, a synthetic pentasaccharide: the first in a new class of antithrombotic agents - the selective factor Xa inhibitors. *Cardiovasc Drug Rev*. 2002;20(1):37–52.
393. Stevenson JL, Choi SH, Varki A. Differential metastasis inhibition by clinically relevant levels of heparins--correlation with selectin inhibition, not antithrombotic activity. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 1. Oktober 2005;11(19 Pt 1):7003–11.
394. Brufatto N, Ward A, Nesheim ME. Factor Xa is highly protected from antithrombin-fondaparinux and antithrombin-enoxaparin when incorporated into the prothrombinase complex. *J Thromb Haemost JTH*. Juni 2003;1(6):1258–63.

-
395. Bisio A, Urso E, Guerrini M, de Wit P, Torri G, Naggi A. Structural Characterization of the Low-Molecular-Weight Heparin Dalteparin by Combining Different Analytical Strategies. *Mol J Synth Chem Nat Prod Chem* [Internet]. 24. Juni 2017 [zitiert 28. April 2021];22(7). Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6152074/>
396. Subramaniam M, Frenette PS, Saffaripour S, Johnson RC, Hynes RO, Wagner DD. Defects in hemostasis in P-selectin-deficient mice. *Blood*. 15. Februar 1996;87(4):1238–42.
397. Barkalow FJ, Barkalow KL, Mayadas TN. Dimerization of P-selectin in platelets and endothelial cells. *Blood*. 1. November 2000;96(9):3070–7.
398. 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. *PloS One*. 2014;9(3):e91320.
399. Peters CG, Michelson AD, Flaumenhaft R. Granule exocytosis is required for platelet spreading: differential sorting of α -granules expressing VAMP-7. *Blood*. 5. Juli 2012;120(1):199–206.
400. Athanassiadou P, Grapsa D, Gonidi M, Athanassiadou A-M, Tsipis A, Patsouris E. CD24 expression has a prognostic impact in breast carcinoma. *Pathol Res Pract*. 2009;205(8):524–33.
401. Friederichs J, Zeller Y, Hafezi-Moghadam A, Gröne H-J, Ley K, Altevogt P. The CD24/P-selectin Binding Pathway Initiates Lung Arrest of Human A125 Adenocarcinoma Cells. *Cancer Res*. 1. Dezember 2000;60(23):6714–22.
402. Onishi H, Suyama K, Yamasaki A, Oyama Y, Fujimura A, Kawamoto M, u. a. CD24 Modulates Chemosensitivity of MCF-7 Breast Cancer Cells. *Anticancer Res*. Februar 2017;37(2):561–5.
403. Ma Z-L, Chen Y-P, Song J-L, Wang Y-Q. Knockdown of CD24 inhibits proliferation, invasion and sensitizes breast cancer MCF-7 cells to tamoxifen in vitro. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. Juli 2015;19(13):2394–9.
404. Hero T, Bühler H, Kouam PN, Priesch-Grzeszowiak B, Lateit T, Adamietz IA. The Triple-negative Breast Cancer Cell Line MDA-MB 231 Is Specifically Inhibited by the Ionophore Salinomycin. *Anticancer Res*. 1. Juni 2019;39(6):2821–7.
405. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1. April 2003;100(7):3983–8.
406. Théorêt J-F, Yacoub D, Hachem A, Gillis M-A, Merhi Y. P-selectin ligation induces platelet activation and enhances microaggregate and thrombus formation. *Thromb Res*. September 2011;128(3):243–50.
407. Chen C, He Z, Sai P, Faridi A, Aziz A, Kalavar M, u. a. Inhibition of human CD24 binding to platelet-bound P-selectin by monoclonal antibody. *Proc West Pharmacol Soc*. 2004;47:28–9.
408. Estevez B, Du X. New Concepts and Mechanisms of Platelet Activation Signaling. *Physiol Bethesda Md*. März 2017;32(2):162–77.

-
409. Bradley CJ, Dauer RJ, Thurlow PJ, Connellan JM. Characterization of platelet aggregation induced by the human carcinosarcoma Colo 526: role of platelet activation, tumor cell cytoskeleton and tumor cell plasma membrane. *Pathology (Phila)*. Mai 1997;29(2):189–95.
410. Varki NM, Varki A. Heparin inhibition of selectin-mediated interactions during the hematogenous phase of carcinoma metastasis: rationale for clinical studies in humans. *Semin Thromb Hemost*. Februar 2002;28(1):53–66.

9 Anhang

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1 Schematische Übersicht über den zeitlichen Ablauf der Interaktionen von metastasierenden Tumorzellen mit ihrer zellulären Mikroumgebung im Zuge der hämatogenen Metastasierung. Modifiziert nach Labelle et al. (2).....	5
Abbildung 2.2 Überblick über die hämatogene Metastasierung und die Beteiligung von Thrombozyten an dieser. Genaue Erläuterungen in den Abschnitten 2.1 sowie 2.2.	8
Abbildung 2.3 Beitrag der Thrombozyten zur hämatogenen Metastasierung	9
Abbildung 2.4 Übersicht über das Blutgerinnungssystem und den Einfluss von Tumorzellen auf dieses. Möglichkeit der Tumorzell-vermittelten Aktivierung des Gerinnungssystems über Tumorzell-ständigen TF, TF-präsentierende Mikropartikel sowie indirekt über die Aktivierung des Endothels und eine TF-Präsentation infolge dessen.....	15
Abbildung 2.5 Effekte des Thrombins auf das Tumorgeschehen sowie im Zuge der hämatogenen Metastasierung. Modifiziert nach (147).	18
Abbildung 2.6 Schematische Darstellung der Thrombozytenaktivierung infolge der Tumor-assoziierten löslichen Mediatorstoffe ADP, TXA ₂ sowie HMGB1.....	21
Abbildung 2.7 Überblick über Adhäsionsrezeptoren, die eine Relevanz für die direkten Interaktionen von Thrombozyten mit Tumorzellen besitzen.....	25
Abbildung 2.8 Exemplarische Struktur verschiedener Heparine. Oben: kleinste, pharmazeutisch aktive Einheit des Heparins ([4- α -D-GlcNAc(6SO ₃ ⁻)-(1→4)- α -D-GlcA-(1→4)- α -D-GlcNSO ₃ ⁻ (3,6diSO ₃ ⁻)-(1→4)- α -L-IdoA(2SO ₃ ⁻)-(1→4)- α -D-GlcNSO ₃ ⁻ (6SO ₃ ⁻)-(1-)]. Mitte: 2-O- bzw. 6-O-Desulfatiertes Heparin (verminderte antikoagulative sowie P-Selektin- inhibierende Eigenschaften). Unten: RO-Heparin (verminderte antikoagulative Eigenschaften).	37
Abbildung 2.9 Chemische Struktur des synthetischen Pan-Selektin-Inhibitors Bimosiamose. Molekulargewicht: 862,94 g/mol (347).	38
Abbildung 3.1 – Schematische Übersicht über die Ziele der Arbeit.	39
Abbildung 5.1 – Schematische Darstellung der Präinkubation des TRP mit oder ohne Inhibitor sowie der anschließenden Thrombozytenaktivierung mit Tumorzellen bzw. Thrombozyten-Agonisten. ..	67
Abbildung 5.2 – Umwandlung von D-Luciferin zu Oxiluciferin durch Firefly Luciferase (357).....	69
Abbildung 5.3 – Beispielbild der Membran eines Dot-Blots nach Probenzugabe und Detektion.	72

Abbildung 5.4 – Prinzip der turbidimetrischen Messung der Thrombozytenaggregation nach Born.	73
Abbildung 5.5 – Beispiel für die Auswertung eines Aggregogramms.....	74
Abbildung 5.6 – Molekulare Struktur der P-Selektin-Fc-Chimäre, die zur Detektion von Liganden des P-Selektins verwendet wurde (366).....	80
Abbildung 6.1 - Evaluation verschiedener Thrombozyten-Puffersysteme hinsichtlich ihrer Eignung für eine MDA-MB-231 induzierte Thrombozytenaktivierung.....	88
Abbildung 6.2 - Evaluation verschiedener Thrombozyten-Puffersysteme hinsichtlich ihrer Eignung für eine MCF-7 Zell-induzierte Thrombozytenaktivierung.....	90
Abbildung 6.3 - Evaluation verschiedener Puffersysteme hinsichtlich ihrer Eignung, eine Aktivierung der Thrombozyten mit verschiedenen Agonisten zu ermöglichen.....	91
Abbildung 6.4 - Abhängigkeit der Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung von der Tumorzell-konzentration.....	93
Abbildung 6.5 – Vergleich der Tumorzell-induzierten ATP-Freisetzung mit der Gesamtmenge des in Thrombozyten und Tumorzellen enthaltenen ATP.....	95
Abbildung 6.6 – Thrombin-Generierung in Thrombozyten-armen Puffer (TAP) in Abhängigkeit von der Menge zugesetzten Plasmas.....	96
Abbildung 6.7 – Durchflusszytometrischer Nachweis der TF-Expression auf MDA-MB-231 bzw. MCF-7 Zellen.....	98
Abbildung 6.8 – Einfluss der Inhibition von Thrombin auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung in TRP.....	99
Abbildung 6.9 – Einfluss der Inhibition verschiedener thrombozytärer Zielstrukturen des Thrombins auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung.....	101
Abbildung 6.10 – Quantifizierung der Freisetzung verschiedener Proteine aus der thrombozytären α -Granula und der Einfluss der Inhibition verschiedener Zielstrukturen des Thrombins auf diese.....	105
Abbildung 6.11 - Quantifizierung der Freisetzung von VEGF-A aus der thrombozytären α -Granula mittels ELISA und der Einfluss der Inhibition verschiedener Zielstrukturen des Thrombins auf die VEGF-Freisetzung.....	108
Abbildung 6.12 - Quantifizierung der Freisetzung von EGF aus der thrombozytären α -Granula mittels ELISA und der Einfluss der Inhibition verschiedener Zielstrukturen des Thrombins auf die EGF-Freisetzung.....	109

Abbildung 6.13 – Quantifizierung der Freisetzung von TIMP-1 aus der thrombozytären α -Granula mittels ELISA und der Einfluss der Inhibition verschiedener Zielstrukturen des Thrombins auf die TIMP-1 Freisetzung.....	110
Abbildung 6.14 - Zusammenfassung der mittels ELISA quantifizierten Freisetzung von EGF, VEGF-A sowie TIMP-1.....	111
Abbildung 6.15 – Beitrag des TXA ₂ -Rezeptors zur Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung..	113
Abbildung 6.16 - Beitrag des P2Y ₁₂ -Rezeptors zur Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung.	115
Abbildung 6.17 - Beitrag des GPVI zur Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung.	117
Abbildung 6.18 - Beitrag des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ zur Tumorzell-induzierten Thrombozytenaktivierung.	119
Abbildung 6.19 – Der Einfluss weiterer Inhibitoren auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung.....	122
Abbildung 6.20 – Der Einfluss von UFH auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung.	123
Abbildung 6.21 - Der Einfluss von Fondaparinux auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung.....	125
Abbildung 6.22 - Der Einfluss eines Decasaccharids auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung.....	127
Abbildung 6.23 - Der Einfluss von RO-Heparin auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung.....	129
Abbildung 6.24 - Der Einfluss von 2-O-Desufatiertem Heparin auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung.....	131
Abbildung 6.25 - Der Einfluss der Inhibition von P-Selektin auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung.....	132
Abbildung 6.26 - Der Einfluss der Inhibition von P-Selektin auf die TRAP-6 induzierte Thrombozytenaktivierung.....	133
Abbildung 6.27 – Durchflusszytometrischer Nachweis von P-Selektin auf der Oberfläche von Thrombozyten im ruhenden Zustand und nach der Aktivierung mit TRAP-6 oder MDA-MB-231 bzw. MCF-7 Zellen.....	135
Abbildung 6.28 – Einfluss des P-Selektins auf die späte Phase der TCIPA.	136

Abbildung 6.29 – Übersicht zur Verdeutlichung der Hypothese des Einflusses von P-Selektin auf die sekundäre Thrombozytenaktivierung und einer möglichen Inhibition dieser.	137
Abbildung 6.30 - Quantifizierung der Freisetzung verschiedener Proteine aus der thrombozytären α -Granula und der Einfluss der Inhibition von P-Selektin auf diese.....	138
Abbildung 6.31 – Erweiterung der in Abbildung 6.29 dargestellten Hypothese zur Rolle des P-Selektins in der sekundären Thrombozytenaktivierung. Differenzierte Freisetzung der P-Selektin enthaltenden α -Granula.....	139
Abbildung 6.32 – Durchflusszytometrische Untersuchung potentieller P-Selektin Liganden auf der Oberfläche von Tumorzellen.	140
Abbildung 6.33 - Der Einfluss der Absättigung von Tumorzell-ständigen P-Selektin Liganden auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung.....	141
Abbildung 6.34 – Einfluss der Inhibition der Synthese von P-Selektin Liganden auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung.....	142
Abbildung 6.35 – Durchflusszytometrische Untersuchung der Expression von PSGL-1 sowie CD24 auf der Oberfläche von MDA-MB-231 bzw. MCF-7 Zellen	143
Abbildung 6.36 – Beitrag von CD24 zur Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung.	145
Abbildung 6.37 – Charakterisierung von A375wt sowie A375-CD24 Zellen hinsichtlich ihrer CD24-Expression und der Adhäsion an Thrombozyten.....	146
Abbildung 6.38 – Einfluss der Überexpression von CD24 auf die Tumorzell-induzierte Thrombozytenaktivierung.	147
Abbildung 6.39 – Fähigkeit von A375wt sowie A375-CD24 Zellen eine Thrombin-Generierung in Thrombozyten-armen Plasma zu induzieren.....	148
Abbildung 6.40 – Der Einfluss einer Inhibition von P-Selektin auf das thrombozytäre signaling... 150	
Abbildung 6.41 – Phospho-Kinase Array zur Beteiligung von P-Selektin an einem Tumorzell-induzierten signaling in Thrombozyten.	150

9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 4.1 - Informationen zu den verwendeten allgemeinen Chemikalien und Ausgangsstoffen.	45
Tabelle 4.2 - Informationen zu den verwendeten Antikörpern und weiteren rekombinanten Proteinen	46
Tabelle 4.3 – Informationen zu den verwendeten Thrombozyten-Agonisten.	46
Tabelle 4.4 – Informationen zu den verwendeten small molecule Thrombozyten-Inhibitoren.....	47

Tabelle 4.5 – Informationen zu verwendeten Heparin-Derivaten.	47
Tabelle 4.6 – Informationen zu verwendeten enzyme-linked immunosorbent assay Kits.	48
Tabelle 4.7 – Informationen zu verwendeten Proteome Profiler Array Kits.	48
Tabelle 4.8 – Informationen zu in der Zellkultur verwendeten Nährmedien und Lösungen.	49
Tabelle 4.9 – Informationen zu Puffern und Lösungen, die zur Aufbereitung von Thrombozyten verwendet wurden.	50
Tabelle 4.10 – Infomartionen zu Lösungen, die für den ATP-Freisetzung-Assay verwendet wurden	50
Tabelle 4.11 – Informationen zu Lösungen und Puffern, die für enzyme-linked immunosorbend assays (ELISA) verwendet wurden.	51
Tabelle 4.12 – Informationen zu Lösungen, die für den Adhäsionsassay verwendet wurden.	51
Tabelle 4.13 – Informationen zu Puffern und Lösungen, die für durchflusszytometrische Experimente verwendet wurden.	51
Tabelle 4.14 – Informationen zu Lösungen und Puffern, die zur Analyse thrombozytärer Signalprozesse (mittels Western Blot und Proteome Profiler Array) verwendet wurden.	53
Tabelle 4.15 – Informationen zu den verwendeten Verbrauchsmaterialien	55
Tabelle 4.16 – Informationen zu verwendeten Geräten	57
Tabelle 5.1 - Informationen über die Inkubation von TRP mit verschiedenen Inhibitoren (small molecules).	64
Tabelle 5.2 – Informationen über die Inkubation von TRP mit verschiedenen Heparin-Derivaten. .	65
Tabelle 5.3 – Informationen über die Inkubation von TRP mit verschiedenen Antikörpern.	65
Tabelle 5.4 – Informationen zur Inkubation der Tumorzellen mit rekombinantem P-Selektin oder mit einem Antikörper gegen CD24.	66
Tabelle 5.5 – Informationen zur Aktivierung der Thrombozyten mit Tumorzellen bzw. weiteren Thrombozyten-Aktivatoren.	68
Tabelle 5.6 – Inkubationszeiten der Thrombozyten mit den entsprechenden Aktivatoren.	68
Tabelle 5.7- Die Zusammensetzung der Proben, die für den Thrombin-Generierungsassay verwendet wurden.	76
Tabelle 5.8 - Zusammensetzung der Kalibrierlösungen des Thrombin-Generierungs-Assays.	77
Tabelle 5.9 - Informationen zu den verwendeten primären bzw. sekundären Antikörpern.	80

9.3 Publikationsliste

Schwarz S, Schlesinger M, Bendas G.

Detection of tumor cell-induced platelet aggregation and granule secretion.

Methods Mol Biol. 2021; 2294:181-195

DOI: 10.1007/978-1-0716-1350-4_13.

Schwarz S, Gockel LM, Naggi A, Barash U, Gobec M, Bendas G, Schlesinger M.

Glycosaminoglycans as tools to decipher the platelet tumor cell interaction: A focus on P-Selectin.

Molecules. 2020 Feb 26;25(5):1039.

DOI: 10.3390/molecules25051039.

Gockel LM, Ponert JM, Schwarz S, Schlesinger M, Bendas G.

The low molecular weight heparin tinzaparin attenuates platelet activation in terms of metastatic niche formation by coagulation-dependent and independent pathways.

Molecules. 2018 Oct 24;23(11):2753

DOI: 10.3390/molecules23112753

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

Pro-angiogenic effects of latent heparanase and thrombin receptor-mediated pathways - do they share a common ground in melanoma cells?

Thromb Haemost. 2018 Oct;118(10):1803-1814.

DOI: 10.1055/s-0038-1669922.

Ponert JM, 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 Jan 18;13(1):e0191303

DOI: 10.1371/journal.pone.0191303