

Aus der medizinischen Klinik I  
Bereich Experimentelle Onkologie, Palliativmedizin und Ethik in der  
Onkologie

Bereichsleiter: Prof. Dr. med. Frank Gieseler

Klinikleitung: Prof. Dr. med. Hendrik Lehnert

---

# **Hemmung der Mikrovesikel-induzierten Tumorzellmigration durch das niedermolekulare Heparin Tinzaparin**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von

**Hans Gamperl**

aus München

Lübeck 2018

1. Berichterstatter : Prof. Dr. med. Frank Gieseler

2. Berichterstatterin : Priv.-Doz. Dr. med. Anke Leichtle

**Tag der mündlichen Prüfung : 14.11.2018**

**Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 14.11.2018**

**-Promotionskommission der Sektion Medizin-**

Gefördert von

- LEO Pharma GmbH, Ballerup, Dänemark
- Annelise-Asmussen-Stiftung, Lübeck, Deutschland

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis .....	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis .....	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Tumorerkrankungen .....	1
1.1.1 Tumorzellmigration.....	1
1.1.2 Interaktion von Tumorzellen und Gerinnung.....	3
1.2 Gerinnung.....	5
1.2.1 Übersicht .....	5
1.2.2 Extrinsischer Gerinnungsweg .....	7
1.2.3 Tissue Factor (TF).....	8
1.2.4 Extrazelluläre Vesikel (EV) .....	11
1.2.4.1 Exosomen.....	12
1.2.4.2 Ektosomen/Mikrovesikel .....	13
1.2.4.3 Apoptotische Körperchen .....	15
1.2.4.4 Große Onkosomen (GO).....	16
1.2.5 Protease-activated-receptors (PAR) .....	17
1.3 Gerinnungshemmung.....	22
1.3.1 Physiologische Antikoagulation.....	22
1.3.1.1 Übersicht .....	22
1.3.1.2 Tissue factor pathway inhibitor (TFPI).....	24
1.3.2 Medikamentöse Antikoagulation .....	25

1.3.2.1	Übersicht .....	25
1.3.2.2	Unfraktioniertes Heparin (UFH) und Niedermolekulare Heparine (NMH) .....	25
1.3.2.3	Tinzaparin .....	27
1.4	Fragestellung .....	28
2	Material und Methoden .....	29
2.1	Material .....	29
2.1.1	Geräte .....	29
2.1.2	Medien, Puffer, Chemikalien und Reagenzien .....	30
2.1.3	ELISA-Kits .....	31
2.1.4	Ergüsse und Zellen .....	31
2.1.5	Sonstige Materialien .....	32
2.2	Methoden .....	33
2.2.1	Zellkultur .....	35
2.2.1.1	Umsetzen der Zellen – Zellen passagieren .....	35
2.2.2	Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) – Durchflusszytometrie .....	36
2.2.2.1	Durchflusszytometrie - Allgemeines .....	36
2.2.2.2	Probenvorbereitung .....	39
2.2.2.3	Geräteeinstellung .....	40
2.2.2.4	Messung .....	40
2.2.2.5	Analyse der Ergebnisse .....	41
2.2.3	Enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) .....	41
2.2.3.1	Imubind Total TFPI ELISA .....	42
2.2.3.2	MP-TF-Activity Assay .....	46
2.2.4	Migrationshemmung durch Tinzaparin und TFPI .....	49
2.2.4.1	Systematik des xCELLigence-Systems .....	49
2.2.4.2	Versuchsablauf .....	50
2.2.5	Statistik .....	55

3	Ergebnisse .....	56
3.1	Ergebnisse der FACS-Analyse .....	56
3.1.1	Nachweis von Mikrovesikeln in malignen Ergüssen .....	56
3.1.2	Tissue Factor-Nachweis an isolierten Mikrovesikeln .....	57
3.2	Identifikation und Charakterisierung von Subpopulationen durch high speed-Zentrifugation .....	58
3.3	Migrationsinduktion bei Tumorzellen durch Mikrovesikel.....	59
3.4	Hemmung der Mikrovesikel-induzierten Zellmigration durch Tinzaparin .....	61
3.5	Induktion der TFPI-Produktion in Tumorzellen durch Tinzaparin .....	62
3.6	Hemmung der Mikrovesikel-induzierten Zellmigration durch TFPI .....	63
4	Diskussion.....	65
4.1	Identifikation von Mikrovesikel-Populationen und Nachweis von TF-tragenden extrazellulären Vesikeln in malignen Ergüssen.....	67
4.2	Migrationsinduktion bei Tumorzellen durch TF-tragende Mikrovesikel.....	71
4.3	Hemmung der Mikrovesikel-induzierten Zellmigration durch Tinzaparin .....	72
4.4	Induktion der TFPI-Produktion in Tumorzellen durch Tinzaparin .....	74
4.5	Hemmung der Mikrovesikel-induzierten Zellmigration durch TFPI .....	75
5	Zusammenfassung.....	80
6	Literatur.....	82
7	Anhang .....	98
8	Danksagung.....	101
9	Lebenslauf.....	102
	Publikationen, Abstracts, Poster.....	103
	Erklärung zu §11 Abs. 1 Nr. 9 der Promotionsordnung.....	104

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Gerinnungskaskade des Menschen .....	6
Abbildung 2: Mögliche PAR1-Aktivierungen .....	18
Abbildung 3: PAR-Interaktionsmöglichkeiten.....	19
Abbildung 4: Körper eigene Antikoagulation .....	23
Abbildung 5: Funktionsweise eines Durchflusszytometers .....	37
Abbildung 6: Funktionsweise des xCELLigence-Systems .....	50
Abbildung 7: Nachweis von Mikrovesikeln (MV) in malignen Ergüssen.....	56
Abbildung 8: Nachweis von TF auf Mikrovesikeln (MP) in malignen Ergüssen.....	57
Abbildung 9: Verteilung von EV-Populationen bei low speed- gegenüber high speed- Zentrifugation mittels CytoFLEX-Messung .....	58
Abbildung 10: MP-TF-Activity-Assay berechnet auf $10^6$ Partikel .....	59
Abbildung 11: Verlauf der Migrationsinduktion in Tumorzellen durch Mikrovesikel (MV) ..	60
Abbildung 12: Hemmung der Mikrovesikel (MV)-induzierten Migrationsinduktion in Colo357- Zellen durch Tinzaparin (3 Stunden Vorinkubation) .....	61
Abbildung 13: TFPI-Produktionsinduktion durch das NMH Tinzaparin (0,4IU/ml, 0,8IU/ml und 2IU/ml) nach 8 Stunden .....	62
Abbildung 14: Hemmung der Mikrovesikel (MV)-induzierten Migrationsinduktion in Colo357- Zellen durch rekombinanten tissue factor pathway inhibitor (rTFPI).....	64
Abbildung 15: Möglicher Zusammenhang zwischen PAR-Aktivierung und Tumorzellmetastasierung, -proliferation und -progression .....	78

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der EV-Subpopulationen .....	16
Tabelle 2: Geräte .....	30
Tabelle 3: Substanzen.....	30
Tabelle 4: ELISA-Kits .....	31
Tabelle 5: Ergüsse und Zellkultur .....	31
Tabelle 6: Sonstige Materialien.....	32
Tabelle 7: Übersicht der Ergüsse .....	33
Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Abkürzungen und zugehöriger Methoden.....	34
Tabelle 9: FACS-Laser und dazugehörige Wellenlänge und Fluoreszenzkanäle .....	36
Tabelle 10: Beispiel-Pipettierschema Imubind Total TFPI ELISA .....	45
Tabelle 11: Verdünnungsreihe MP-TF-Activity ELISA.....	47
Tabelle 12: Beispiel-Pipettierschema für xCELLigence-Messung .....	52
Tabelle 13: EV-Populationen bei low speed- gegenüber high speed-Zentrifugation .....	58



# Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Erläuterung</b>
°C	Grad Celsius
AB+	<i>anti body positive</i>
accEV	<i>accumulated extracellular vesicles</i>
ADP	Adenosindiphosphat
AE	<i>assay enhancer</i>
ALK	activin A receptor type II-like kinase; TGFβ-Rezeptor1
AP	alkalische Phosphatase
APC	aktiviertes Protein C
ASS	Acetylsalicylsäure
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.
BC	<i>breast cancer</i> , Mamma Karzinom
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BMI	<i>body mass index</i>
bspw.	Beispielsweise
bzw.	Beziehungsweise
c	Konzentration
C(-Terminus)	Carboxy(-Terminus)
CAL	calibration faktor
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
capEV	<i>captured extracellular vesicles</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CIM	<i>cell invasion/migration</i>
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COX	Cyclooxygenase
CP	<i>cancer procoagulant</i> , Krebsprokoagulans
CRC	<i>colorectal carcinoma</i> , kolorektales Karzinom
CRP	C-reaktives Protein

d	Schichtdicke des durchstrahlten Körpers
Da	Dalton
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DVT	<i>deep vein thrombosis</i>
ECACC	European Collection of Authenticated Cell Cultures
ECM	<i>extracellular matrix</i> , extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>endothelial growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinase</i>
ESCRT	<i>endosomal sorting complex required for transport</i>
ect.	et cetera
et al.	et alia
EV	Extrazelluläre Vesikel
$E_{\lambda}$	Extinktion des Materials für das Licht der Wellenlänge $\lambda$
F()	Gerinnungsfaktoren
F(a)	Aktivierter Gerinnungsfaktor
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> , Durchflusszytometrie
FL	Fluoreszenz
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FPA	Fibrinopeptid A
FS	<i>forward scatter</i>
GP	Glycoprotein
GPCR	<i>G-protein coupled receptor</i>
GPgR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GPI	Glycophosphatidylinositol
G-Protein	Guanylnukleotid-Proteine
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HIT	Heparin-induzierte Thrombozytopenie

HRP	Meerrettich-Peroxidase (horse raddish peroxidase)
hsEV	<i>high speed extracellular vesicles</i>
IE	Internationale Einheit
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
ILV	Intraluminaler Vesikel
inc.	incorporated
ISTH	International Society on Thrombosis and Haemostasis
IU	<i>international units</i>
i.v.	intravenös
I <sub>0</sub>	Intensität des einfallenden Lichts
I <sub>1</sub>	Intensität des transmittierten Lichts
K (1,2,3)	Kunitz-Domäne
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter
lsEV	<i>low speed extracellular vesicles</i>
M	Molar
MACS	<i>magnetic cell separation</i>
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
MAPK	<i>mitogen-activated-protein-kinase</i>
MAPKKK	<i>mitogen-activated-protein-kinase-kinase-kinase</i>
MDR	<i>multi-drug-resistance</i>
MEK/MAPKK	<i>mitogen-activated-protein-kinase-kinase</i>
mg	Milligramm
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute
ml	Milliliter
MLCK	Myosin Leicht-Ketten Kinase
mM	Millimolar
MMP	Matrix Metalloproteinase
MP	Mikropartikel
MV	Mikrovesikel

n	Stoffmenge
N(-Terminus)	Amino(-Terminus)
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NMDA receptor	<i>N-methyl-D-aspartate receptor</i>
NMH	Niedermolekulares Heparin
NOD	<i>nucleotid oligomerization domain receptor</i>
P2Y1, P2Y12	Purin Rezeptoren
PAI	Plasminogenaktivatorinhibitor
PAK	<i>P21-activated kinase</i>
PAR	Protease-aktivierter-Rezeptor
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
pg	Pikogramm
PGI <sub>2</sub>	Prostacyclin 2
P-Lip	Phospholipid
PP5	Plazentares Protein 5
PS	Phosphatidylserin
RAF-K	<i>rapidly-accelerated-fibrosarcoma-kinase</i>
RAS-K	<i>rat-sarcoma-kinase</i>
Rho-K	rho-kinase
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI-Medium	Roswell Park Memorial Institute-Medium
RSTK	<i>receptor serine/threonine kinase</i>
rTFPI	rekombinanter <i>Tissue-factor-pathway-inhibitor</i>
RTCA	<i>real time cell analysis</i>
RTK	<i>receptor tyrosine kinase</i>
SCLC	<i>small cell lung cancer</i> , kleinzelliges Lungenkarzinom
SD	<i>sample diluent</i>
S-NACH	Sulfatierte nicht antikoagulatorisch wirksame Heparine
SS	<i>sideward scatter</i>
t	Zeit (Sekunde, Minute, Stunde)

TAFI	Thrombin-aktivierter Fibrinolyseinhibitor
TAT	Thrombin-Antithrombin-Komplexe
TE	Trypsin-EDTA
TF	<i>tissue factor</i>
TF-FITC	<i>tissue factor</i> bindendes Fluorescein Isothiocyanat
TFPI	<i>tissue-factor-pathway-inhibitor</i>
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor</i>
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Factor Alpha
t-PA	tissue-type-Plasminogenaktivator
TrpC5	<i>transient receptor potential canonical 5</i>
TSG	<i>tumor susceptibility gene</i>
TVT	tiefe Venenthrombose (siehe DVT)
TXA <sub>2</sub>	Thromboxansynthese
u.a.	unter anderem
UFH	unfraktioniertes Heparin
uPA	Urokinase-Plasminogen-Aktivator
V	Volumen
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	<i>vascular endothelial growth factor receptor</i>
VSSC	<i>violet side scatter</i>
VTE	venöse Thrombembolie
vWF	von Willebrand-Faktor
WS	<i>wash solution</i>
Z	Impedanz
$\epsilon_\lambda$	dekadischer Extinktionskoeffizient
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{m}$	Mikrometer

# 1 Einleitung

## 1.1 Tumorerkrankungen

Im Jahr 2012 war Krebs mit 25,5% die zweithäufigste Todesursache in der Bundesrepublik Deutschland; an erster Stelle standen die Herz-Kreislaufferkrankungen mit 40,2%. Bei Frauen traten am häufigsten Brusttumoren und beim Mann Prostatumoren auf. Zum Tode führten am häufigsten bösartige Neubildungen der Verdauungsorgane, gefolgt von Brustkrebserkrankungen bei Frauen und Bronchialkrebs bei Männern (1, 2).

Die Zahl der Krebspatienten steigt stetig an. Dies ist nicht auf eine zunehmende Inzidenz zurückzuführen, denn die Zahl der Neuerkrankungen in allen Altersgruppen nimmt fortlaufend ab, ebenso wie die Sterblichkeitsrate. Es kommt jedoch zu einer steigenden Prävalenz, also einer wachsenden Zahl an Krebserkrankungen, die diagnostiziert und behandelt werden können. Zu verdanken ist dies den Fortschritten in der Diagnostik, der Krebsfrüherkennung und der Prävention sowie wirksameren Medikamenten. Positive Veränderungen im Lebensstil gepaart mit einem größeren Gesundheitsbewusstsein tragen ebenfalls zu einer Abnahme der Neuerkrankungen bei. Bei der Inzidenz wurden große Unterschiede sowohl in geographischer als auch sozioökonomischer Hinsicht festgestellt (3).

### 1.1.1 Tumorzellmigration

Jegliches Tumorwachstum birgt die Gefahr der Ablösung und Ausstreuung von Tochterzellen in umgebendes oder auch entferntes Gewebe bzw. Organe. Dieser Vorgang wird als Metastasierung bezeichnet (4). Begünstigt wird er durch genetische und/oder epigenetische Veränderungen, die dazu führen, dass Tumorzellen Proteasen, adhäsive Moleküle und angiogene Faktoren synthetisieren. Proteasen ermöglichen das Durchdringen von Zellverbänden, adhäsive Faktoren erlauben den Metastasen das Anhaften an der Gefäßwand und angiogene Faktoren stellen zudem die Blutversorgung der sich neu bildenden Metastase sicher (5, 6).

Ähnliche Abläufe wie in Tumorzellen sind aus dem komplexen Vorgang der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) bekannt. EMT nennt man den Prozess, bei dem sich

Epithelzellen während der Embryogenese von ihrer Umgebung lösen und einen motilen mesenchymalen Phänotyp annehmen (7). Physiologisch betrachtet ist diese Umwandlung unter anderem für die Embryogenese und Organentwicklung von zentraler Bedeutung. EMT wird durch verschiedene Faktoren ausgelöst, wie bspw. durch PDGF (*platelet-derived growth factor*), FGF (*fibroblast growth factor*), TGF- $\beta$  (*transforming growth factor*) und TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor*) (8-10). Nicht nur in der Embryonalentwicklung, sondern auch bei der Wundheilung spielt EMT eine wichtige Rolle. Wird ein Gewebe beschädigt, werden die dem Defekt umliegenden Zellen diversen EMT-induzierenden Signalen ausgesetzt (9), was dazu führt, dass Zellen (z.B. Fibroblasten) zur Defektdeckung in die Wunde einwandern. Genau wie bei Wunden ist in Tumorgewebe eine EMT-Induktion feststellbar. Aus diesem Grund wird das Tumormilieu von Wissenschaftlern auch als „Wunde, die niemals heilt“ bezeichnet (8). Kennzeichnend für die epithelial-mesenchymale Transition ist der Wechsel von Adhäsionsmolekülen, welche für die Zell-Zell-Bindung in einem Zellverband zuständig sind; namentlich von E-Cadherin zu N-Cadherin. Die Familie der Cadherine bildet knopfartige Verbindungen zwischen Zellen, sogenannte Desmosomen. Diese Verbindungen beschränken sich jedoch nicht nur auf die Übergänge von Zelle zu Zelle, sondern sind über Intermediärfilamente, strukturgebende Faserproteine, auch intrazellulär verankert. Der Cadherin-Wechsel durch die EMT geht einher mit einer Verschiebung in der Gewebeaffinität. Während E-Cadherin in epithelialen Geweben vorkommt, ist N-Cadherin in beweglicheren, mesenchymalen Zellen wie Fibroblasten und vaskulärem Endothel vertreten. Mit einer erhöhten N-Cadherin-Expression ist somit auch eine vermehrte Zellmigration und -invasion verbunden. Darüber hinaus wurde erst kürzlich bekannt, dass eine Abhängigkeit von EMT von *tissue factor* (TF), einem wichtigen Faktor in der Blutgerinnung, hinsichtlich einer erhöhten Persistenz von Tumorzellen in der Lunge von Mäusen besteht ((11); 2016). Diese Erkenntnis ist für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit von großer Bedeutung.

### 1.1.2 Interaktion von Tumorzellen und Gerinnung

Bereits 1865 haben Trousseau et al. einen Zusammenhang zwischen Tumorerkrankungen und Thromboseneigung postuliert (12). Das Vorhandensein einer wechselseitigen Beziehung konnte inzwischen mehrfach bestätigt, und ihre Ursachen besser erforscht werden (13-18). Bei über 50% der Krebspatienten und bei bis zu 90% der Patienten mit metastasierten Tumorerkrankungen können Irregularitäten der Gerinnung nachgewiesen werden. Dies zeigt sich meistens in einer subklinischen disseminierten intravaskulären Koagulation (DIC) (19). Bei Krebspatienten wurde in diesem Sinne bereits von einer „erworbenen Thrombophilie“ gesprochen (20). Eine Neoplasie kann eine Entzündungsreaktion induzieren, die eine Zytokin-Ausschüttung und eine Aktivierung von Endothelzellen, Leukozyten und Blutplättchen hervorruft (21). Weiterhin wird die Angiogenese angestoßen und Koagulationshemmung sowie Fibrinolyse heruntergefahren. Der Tumor reagiert mit der Sekretion von inflammatorischen Zytokinen (TNF, IL-1, VEGF) und schüttet in einer Interaktion mit Monozyten, Makrophagen, Blutplättchen und dem Gefäßendothel TF aus (22). TF und Krebsprokoagulans (CP) rufen eine direkte prokoagulatorische Wirkung hervor (19, 21, 22). Daher erfüllt TF in diesem Setting mehrere Funktionen: Er stößt die extrinsische Gerinnungskaskade an, beeinflusst als Rezeptor über verschiedene Signalwege den Überlebensmechanismus des Tumors und verstärkt die Transkription von VEGF. Dies hat sowohl eine Gefäßneubildung als auch eine erhöhte TF-Expression zur Folge. Auf TF wird im Folgenden ausführlicher eingegangen, da er unserer Meinung nach eine wichtige Rolle in der extrazellulären Vesikel (EV)-vermittelten Induktion der Migration bei Tumorzellen spielt. Im Gegensatz zu TF ist CP eine Cystein-Protease mit prokoagulatorischer Aktivität, welche ausschließlich in malignen Tumoren nachgewiesen wird. Sie kann Vitamin K-abhängig und TF-unabhängig FX zu FXa spalten sowie Blutplättchen aktivieren (19).

Als Thrombose wird die Blutgerinnung und Bildung eines Gerinnsels innerhalb eines Gefäßes bezeichnet. Für ihre Entstehung sind nach Virchow et al. drei Faktoren ausschlaggebend, welche als Virchow-Trias bezeichnet werden: [1] Endothelschaden, [2] Veränderungen der Strömungsverhältnisse bis hin zur Stase und [3] eine Änderung in der Blutzusammensetzung (23). Je nach Entstehungsort unterscheidet man arterielle von venösen Thrombosen. Die arterielle Thrombose wird vorwiegend durch Verletzungen der Gefäßwand oder Einbringung von thrombogenem Material (z.B. arterieller Katheter) verursacht, die venöse Thrombose dagegen hauptsächlich durch Immobilisierung oder eine



Störung des Gerinnungssystems (24). Lebensgefährliche Embolien entstehen, wenn sich ein Thrombus in einer peripheren Blutbahn löst, weiterwandert, sich in einer Endstrombahn eines Organs wie bspw. dem Herzen oder der Lunge festsetzt, und dort zu einer Störung bis hin zur Unterbrechung der Blutversorgung führt. Das Risiko, eine Thrombose zu erleiden, ist abhängig von angeborenen und erworbenen Risikofaktoren. Zu den angeborenen Faktoren zählen die Thrombophilie auf Grund von FV-Leiden, Antithrombin-, Protein C-, Protein S-, Plasminogen- oder FXII-Mangel sowie Dysfibrinogenämie. Zu den erworbenen Risikofaktoren zählen z.B. ein vorausgegangenes thrombotisches Ereignis, große chirurgische Eingriffe, zentralvenöse Katheter, Traumata, Immobilisierung, maligne Prozesse, Schwangerschaft, der Gebrauch von oralen Kontrazeptiva, Nierenerkrankungen und das Antiphospholipid-Syndrom (25). Patienten, welche ihr erstes idiopathisches thromboembolisches Ereignis erleiden, haben mit einer ca. 10%-igen Wahrscheinlichkeit einen okkulten Tumor (26).

Das Risiko an einer venösen Thrombose zu erkranken, ist bei Krebspatienten 4-5-mal höher als bei Patienten ohne Krebserkrankung (26). Ob man als Krebspatient eine Thrombose entwickelt, hängt von mehreren Faktoren ab. Hierzu gehören die Tumorart, Lokalisation, das Stadium sowie die Dauer der Erkrankung und Art der Therapie. Eine Einschätzung der klinischen Wahrscheinlichkeit kann z.B. durch den Khorana-Score vorgenommen werden (27). Zudem wurde festgestellt, dass es eine zeitliche Korrelation zwischen der Diagnose Krebs und venös thromboembolischen Erkrankungen gibt. Wie bereits erwähnt, weisen ca. 10% der Patienten mit einer idiopathischen venösen Thrombose einen Tumor auf. Laut Leitlinie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF) sollte deshalb beim Auftreten einer tiefen Venenthrombose (TVT) auch eine Umfelddiagnostik erfolgen, um ein Malignom auszuschließen (28). Des Weiteren wurde gezeigt, dass 44% der Patienten mit einem nachgewiesenen Tumor zum Zeitpunkt des thromboembolischen Ereignisses, im Gegensatz zu 35% ohne thromboembolischem Ereignis, bereits Metastasen hatten. Laut Blom et al. (29) steigt das Risiko für eine TVT bei metastasierten Tumoren um das 20-fache im Gegensatz zum Auftreten bei lokalisierten Tumorleiden (26). Zusätzlich wurde ermittelt, dass bei einer Krebsdiagnose zum gleichen Zeitpunkt wie oder bis zu ein Jahr nach Erleiden eines venös thromboembolischen Vorfalls, das Stadium der Krebserkrankung weiter fortgeschritten ist, und die Prognose für den Patienten schlechter ausfällt (30).

## 1.2 Gerinnung

### 1.2.1 Übersicht

Die Blutgerinnung beim Menschen wird in zwei Phasen unterteilt: eine primäre und eine sekundäre Hämostase. Der Vorgang der primären Blutstillung, nach einer Verletzung oder Schädigung, läuft innerhalb weniger Sekunden ab: Er führt zu einer Thrombozytenadhäsion über Glycoprotein (GP) Ib und den von Willebrand-Faktor (vWF) des Kollagens sowie zu einer Bindung von GP IIa und Ia an freiliegendes Kollagen. Durch Bindung von Fibrinogen an aktivierte GPIIb/IIIa-Rezeptoren können die Thrombozyten an dieser Stelle verklumpen (Thrombozytenaggregation). Weitere Faktoren, die bei der primären Gerinnung eine Rolle spielen, sind u.a. Adenosindiphosphat (ADP), purine Rezeptoren (P2Y1, P2Y12), Cyclooxygenase (COX)-abhängige Thromboxansynthese (TXA<sub>2</sub>) und Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>). Die sekundäre Blutstillung besteht wiederum aus zwei Prozessen, welche zwar unabhängig voneinander aktiviert werden können, jedoch im Verlauf der Gerinnungskaskade ineinandergreifen (31).

Das Verständnis des Gerinnungssystems hat sich in den letzten Jahren verändert. Es hat sich vom alten Modell eines getrennten extrinsischen und intrinsischen Systems zu einem integrierten Modell mit einem zellbiologischen Modell gewandelt. Das ursprüngliche Modell basiert auf einem extrinsischen System, welches durch Verletzungen des Gefäßsystems aktiviert wird, und einem intrinsischen System, in welchem die Gerinnung als Reaktion auf Fremdkörper innerhalb eines intakten Gefäßes ausgelöst wird (z.B. zentralvenöser Katheter, Abb. 1). Endpunkt der Gerinnungskaskade ist der Verschluss des Defekts bzw. die Isolierung von unerwünschten Partikeln im Blutgefäß durch die Bildung eines festen Fibrinthrombus. Die sekundäre Blutstillung läuft innerhalb von Minuten ab (31).

Auf Grund der Fokussierung dieser Arbeit auf TF wird im Folgenden hauptsächlich auf den extrinsischen Gerinnungsweg eingegangen.

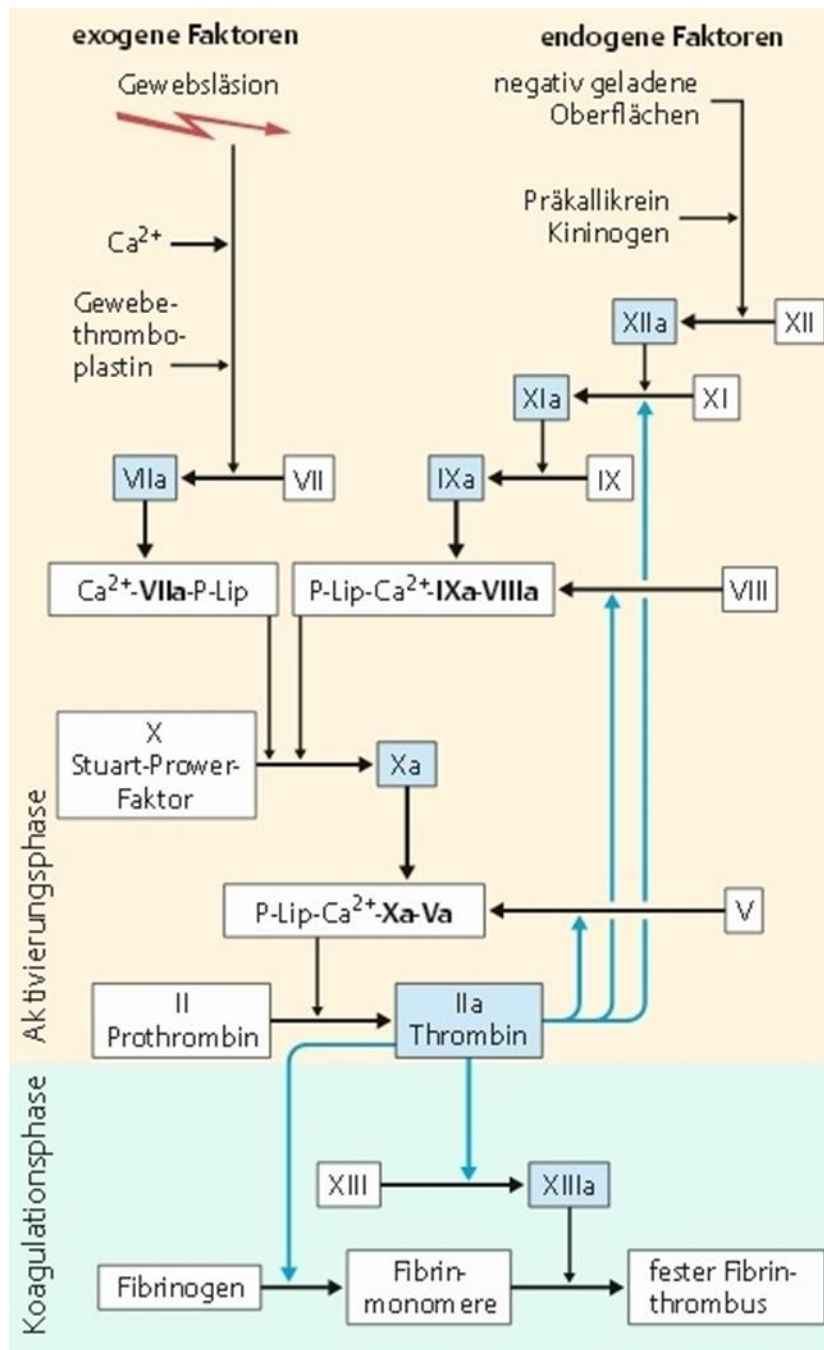


Abbildung 1: Gerinnungskaskade des Menschen; Schematische Darstellung der sekundären Gerinnungskaskade (32). P-Lip (Phospholipide), „exogene Faktoren“ entsprechen dem extrinsischen Weg, „endogene Faktoren“ entsprechen dem intrinsischen Weg. Der extrinsische Weg beginnt mit einer Gewebeerletzung, was eine Aktivierung von FVII zu FVIIa durch TF (Gewebethromboplastin) ermöglicht; TF, FVIIa, Kalzium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) und Phospholipide (P-Lip) bilden zusammen den Tenasekomplex, welcher FX zu FXa aktivieren kann. Der intrinsische Weg beginnt mit einer negativ geladenen Oberfläche (Fremdkörper), welcher mit Präkallikrein und Kininogen FXII aktiviert; FXIIa aktiviert FXI und dieser FIX; FIXa bildet mit FVIIIa,  $\text{Ca}^{2+}$  und P-Lip den Tenasekomplex. FXa, FVa,  $\text{Ca}^{2+}$  und P-Lip können als Prothrombinasekomplex Prothrombin zu Thrombin (FIIa) spalten. FIIa allein spaltet Fibrinogen zu Fibrinmonomeren und aktiviert FXIII, welcher es ermöglicht, dass aus Fibrinmonomeren ein fester Fibrinthrombus entsteht.

## 1.2.2 Extrinsischer Gerinnungsweg

Kommt es zu einer penetrierenden Verletzung eines Gefäßes, wird die Trennung des Intra- und Extravasalraums aufgehoben, und TF tritt in Kontakt mit den im Blut zirkulierenden Gerinnungsfaktoren. Es resultiert die oben beschriebene Kaskade von aufeinander folgenden Aktivierungen dieser Proenzyme. Die Gefäßwand als Barriere, welche einer Koagulation im gesunden Gefäß entgegenwirkt, ist jedoch auch ohne Verletzung teilweise durchlässig. Eine Interaktion von TF mit den im Intravasalraum zirkulierenden Gerinnungsfaktoren kann z.B. bei Sepsis, chronischen Krankheitsbildern wie Krebs, anatomischen Veränderungen der Gefäßwand und Hyperpermeabilität, auch ohne Verletzung des Gefäßes eintreten (33-35).

Am Anfang der extrinsischen Gerinnungskaskade steht die hochaffine Bindung von TF (Gewebethromboplastin) an FVII, welches FVII in seine aktive Form FVIIa überführt (Abb. 1). Der Komplex aus TF und FVIIa aktiviert darauffolgend die Faktoren FIX und FX zu FIXa und FXa, wobei FX bzw. der Tenasekomplex als eine Verbindung zwischen extrinsischem und intrinsischem Weg gesehen werden kann. Anschließend bilden FXa, FVa, welches durch in geringen Mengen im Plasma vorkommendes Thrombin aktiviert wird, Kalzium und Phospholipide den sogenannten Prothrombinasekomplex. Dieser Komplex kann im intrinsischen System ebenfalls entstehen; hier führen die Faktoren FXII, FXI, FIX und FVIII zu einer Aktivierung von FX.

Der Prothrombinasekomplex aktiviert in der jetzt folgenden Koagulationsphase aus Prothrombin Thrombin (FIIa). Thrombin löst zum einen die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrinmonomeren aus, und aktiviert zum anderen die lokalen Thrombozyten. Die Fibrinmonomere polymerisieren im weiteren Verlauf zu einem Fibrinpfropf, welcher durch FXIIIa stabilisiert wird (31, 36). Der Fibrinthrombus verschließt den Defekt (Abb. 1).

Das neue, zellbiologische Modell basiert auf Gerinnungsabläufen, die stärker ineinandergreifen und sich komplementieren. Hier wird die Gerinnungskaskade in vier Phasen eingeteilt: (I) Initiation, (II) Amplifikation, (III) Propagation und (IV) Stabilisation (37). Als Voraussetzung für eine funktionsfähige Gerinnungskaskade müssen Kalzium und Phospholipide zur Verfügung stehen (24). Die Initiationsphase beginnt, wie die extrinsische Gerinnung, mit der Bindung von TF an FVII und dessen Aktivierung zu FVIIa und führt über die darauffolgende Aktivierung von FX zu FXa, schließt aber, wie zuvor beim intrinsischen Weg, auch die Aktivierung von FIX zu FIXa ein. Den Abschluss der Initiationsphase bildet die Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin. Die

Thrombinaktivierung kann in dieser Phase effektiv mit dem körpereigenen *tissue factor pathway inhibitor* (TFPI) gehemmt werden. In der Amplifikationsphase werden durch positive Rückkopplung die Thrombinaktivierung und die Bindung von Thrombin an Thrombozyten verstärkt. Zusätzlich aktiviert Thrombin FV und FVIII, die beide Kofaktoren im Tenasekomplex (FIXa-FVIIIa-FX) und im Prothrombinasekomplex (FXa-FVa) sind. Die Propagationsphase gewährleistet die Bereitstellung einer ausreichenden Menge an Tenase- und Prothrombinasekomplexen und somit einer kontinuierlichen Thrombinproduktion und Aktivierung von Fibrinogen. Während der abschließenden Stabilisationsphase aktiviert Thrombin zum einen FXIII, welcher Fibrinpolymere stabilisiert und verstärkt, und zum anderen Thrombin-aktivierten Fibrinolyse Inhibitor (TAFI), welcher den entstehenden Thrombus vor Fibrinolyse, also vorzeitiger Auflösung schützt (37).

### 1.2.3 Tissue Factor (TF)

#### Übersicht zu TF

TF, auch als Gewebethromboplastin und FIII bekannt, ist ein transmembranöses Glykoprotein (38), welches der Zytokin-Rezeptor-Superfamilie zugeordnet wird (39). Es besteht in seiner aktiven Form aus 263 Aminosäuren und gliedert sich in eine zytoplasmatische, eine transmembranöse und eine extrazelluläre Domäne, wobei der größte Anteil mit 219 Aminosäuren extrazellulär lokalisiert ist (40).

#### Vorkommen

TF liegt grundsätzlich membrangebunden vor. Es wird diskutiert, dass eine sehr kleine Menge an freiem TF vorliegt, welcher keine koagulatorische Aktivität aufweist (41), aber eine Rolle bei artherosklerotischen Plaques, Sepsis, Diabetes mellitus, Sichelzellanämie und dem Myokardinfarkt spielt (36, 42).

Der größte Teil des TF befindet sich gebunden in Geweben und außerhalb der Blutgefäße. Hohe TF-Aktivität wurde in diversen Geweben nachgewiesen, wie bspw. in der Adventitia von Gefäßen, in Organkapseln, im Hautepithel, in der Mukosa, in der Bowman-Kapsel der Nierenglomeruli, in den Astrozyten im Gehirn und im Endometrium. Aufgrund dieser spezifischen Verteilung wurde postuliert, dass durch TF eine hämostatische Hülle gebildet wird (40), welche streng vom Intravasalraum getrennt ist. Neben den oben erwähnten Gewebearten werden auch Thrombozyten und Monozyten als Syntheseorte für TF

kontrovers diskutiert (43, 44). Im weiteren Verlauf dieser Arbeit liegt der Fokus auf dem TF, der auf extrazellulären Vesikeln präsentiert wird.

### Aktivierung und Regulierung

Die TF-Synthese wird durch diverse Agenzien ausgelöst. Hierzu gehören inflammatorische Zytokine (IL-1, TNF $\alpha$ ), Mitogene (EGF, Insulin, TGF $\beta$ 1, VEGF), Interferone, Endotoxine, virale Infektionen, Thrombin und Immunkomplexe. Auch wenn eine funktionierende Gerinnung überlebenswichtig ist, so kann eine ungebremste Koagulation sehr schädliche Auswirkungen wie bspw. Thrombose haben. Um dieses Missverhältnis zu verhindern, sind Regulationsmechanismen vorhanden, welche die Synthese und Aktivität von TF begrenzen und hemmen. Die TF-Produktionsinduktion kann unter anderem durch cAMP, IL-4, IL-10 und IL-13 gehemmt werden. TFPI1, TFPI2, Annexin V, Antithrombin III, Sphingosin und Plättchenfaktor 4 inhibieren den TF-FVIIa-Komplex. Wenn keine TF-Aktivität mehr vonnöten ist, kann das Glykoprotein über verschiedene Wege abgebaut werden. An erster Stelle steht die Internalisierung durch die TF-exprimierende Zelle. Danach kann TF entweder wiederverwertet oder durch Exozytose aus der Zelle ausgeschieden werden (40).

### Physiologische Funktion

Die wichtigste physiologische Funktion von TF ist die Initialisierung der Gerinnungskaskade bei Gefäßverletzungen. Durch die Störung der Gefäßintegrität kommen die im Blut ubiquitär vorkommenden Gerinnungsfaktoren in Kontakt mit TF. Durch die hochspezifische Bindung von FVII an TF und dessen proteolytische Spaltung zu seiner aktiven Form FVIIa wird die extrinsische Gerinnungskaskade ausgelöst. Die TF-Aktivität ist hier jedoch stark abhängig vom Vorhandensein von Kalzium und der Nähe zu Phosphatidylserin (PS). PS ist ein Membranlipid, welches normalerweise nur in einem sehr geringen Maß an der Membranoberfläche repräsentiert wird. Zur Aufrechterhaltung der Membranintegrität ist PS nach innen orientiert. Dies wird durch die Aktivität der Scramblase sichergestellt (45). Die Membransymmetrie ändert sich jedoch stark bei Apoptose mit dem Ergebnis, dass PS auf der Oberfläche der Apoptosekörperchen stark exprimiert wird (40). Außerdem war bereits beschrieben, dass MV häufig eine PS-Aktivität auf der Membranoberfläche aufweisen (46).

TF kann durch seine intrazelluläre Domäne auch als Rezeptor fungieren, da durch Bindung von FVIIa oder durch die Aktivierung von FX zu FXa intrazelluläre Signalkaskaden angestoßen werden können.

Diese Kaskaden sind meist mit einer vorübergehenden Veränderung der intrazellulären Kalziumkonzentration gekoppelt und beinhalten im Verlauf Inositol-spezifische Phospholipase C, Proteinkinase C (40), *mitogen-activated protein* (MAP)-Kinase (Serin/Threonin-Kinasen) (34) und PAR (47). Es zeigte sich auch, dass TF eine Relevanz für die embryonale Gefäßentwicklung hat (39).

#### Pathologische Funktion

Neben seinen physiologischen Aufgaben spielt TF auch in Verbindung mit Entzündungsreaktionen, Sepsis, immunologischen Erkrankungen, Artherosklerose und Malignitäten eine Rolle (36, 38, 40, 42, 48). Der Zusammenhang zwischen TF und Tumorerkrankungen rückt immer näher in den Fokus der Krebsforschung, da unter dem Einfluss von TF das Tumorwachstum gefördert wird, sowie die mitogene Aktivität der Zellen, die Transkription, die Gefäßpermeabilität und das vaskuläre Endothelwachstum erhöht sind. Zusätzlich unterdrückt TF antiangiogene Substanzen wie Thrombospondin, welche Tumorwachstum begrenzen könnten. Dies wurde in der Arbeit von Zhang et al. gezeigt, in der Sarkomzellen mit DNA transfiziert wurden, was entweder zu TF-Überexpression oder TF-Unterexpression führte (49).

Des Weiteren induziert der Vorgang der EMT (siehe 1.1.1) eine vermehrte Expression von TF auf Tumorzellen, und dies ist entscheidend für das Überleben der Krebszelle und für den Prozess der Metastasierung (11). Dabei exprimieren Tumorzellen TF einerseits direkt auf ihrer Zellmembran, andererseits exozytieren sie Vesikel, extrazelluläre Vesikel, welche TF auf der Oberfläche tragen (50).

#### 1.2.4 Extrazelluläre Vesikel (EV)

Der Vorgang der Zell-Zell-Kommunikation wurde ursprünglich ausschließlich auf den direkten Kontakt von freigesetzten Molekülen einer Senderzelle mit spezifischen Rezeptoren der Empfängerzelle zurückgeführt (46). In jüngerer Zeit konnte man eine weitere Möglichkeit der Zellkommunikation nachweisen. Diese beruht auf kleinen extrazellulären Vesikeln (EV), die von diversen Zellen in physiologischen sowie pathologischen Situationen sezerniert werden (51, 52). Sie tragen von ihrer Mutterzelle spezifische Proteine an ihrer Lipidmembranoberfläche und beeinflussen ihre Umgebung durch horizontalen Transfer von bioaktiven Molekülen, Proteinen, Lipiden, DNA sowie RNA (53). 2007 konnte das Vorhandensein von RNA in EV nachgewiesen werden (54). Es stellte sich heraus, dass die in EVs transportierte RNA zu funktionsfähigen Proteinen translatiert werden kann (z.B. *multi-drug-resistance (MDR)*-Gen) (53). Ma et al. zeigten, dass resistente Zellen durch den Transfer des MDR-1-Gens in sensitiven Zellen einen resistenten Phänotypen hervorrufen konnten. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass der Transfer von Kalziumkanälen (*TrpC5, transient receptor potential canonical 5*) via Exosomen auch zu einer Medikamentenresistenz führt (55).

Im Übrigen ist das Sezernieren von EV nicht nur auf den Menschen beschränkt, wodurch theoretisch die Möglichkeit einer trans-Spezies-Kommunikation besteht (56).

Extrazelluläre Vesikel werden nach ihrer Größe und ihrem Produktionsmechanismus in vier Kategorien eingeteilt: (I) Exosomen, (II) Ektosomen (Mikrovesikel, Mikropartikel), (III) apoptotische Körperchen und (IV) große Onkosomen (46, 53, 57-59).

Da in dieser Arbeit der Fokus auf Exosomen und Ektosomen liegt, wird in 1.2.4.3 und 1.2.4.4 nur kurz auf apoptotische Körperchen bzw. große Onkosomen eingegangen.



#### 1.2.4.1 Exosomen

##### Definition

Exosomen sind Vesikel mit einem Durchmesser von 30-150 nm (46), welche sich aus multivesikulären Körperchen formen und von einer Lipidmembran umgeben sind. Historisch galten sie als 5'-Nukleotidase-Aktivität enthaltende Mikrovesikel einer neoplastischen Zelllinie (60) bzw. als ein Abfallprodukt wachsender Retikulozyten (61).

##### Entstehung

Exosomen entstehen durch Einstülpung endosomaler Membranen, wobei sich Anhäufungen intraluminaler Vesikel (ILV) in multivesikulären Körperchen (MVK) bilden. Diese können entweder über Lysosomen verarbeitet werden oder die intraluminalen Vesikel über Fusion mit der Plasmamembran an den Extrazellularraum abgeben (46). Einer der Mechanismen, welche für Biogenese und Sekretion von Exosomen verantwortlich sind, ist der *endosomal sorting complex required for transport* (ESCRT). Er ist übergreifend zuständig für Bindung, Sortierung und Zusammenführung von ubiquitinierten Proteinen und Rezeptoren (62). Die Bildung der ILV beginnt mit der Reorganisation der endosomalen Membran. Auf diesen Vorgang nehmen u.a. CD9 und CD63 Einfluss (63). Neben dem ESCRT besteht noch ein ESCRT-unabhängiger Weg der Exosomen-Bildung. Dieser beinhaltet sogenannte *lipid rafts* sowie eine Konversion von Sphingomyelin zu Ceramid über Sphingomyelinasen (64).

##### Oberflächenmarker

Da Exosomen von Organellen abstammen, können Proteine der Exosomenformation (z.B. Alix, TSG101), des Membrantransports (z.B. Annexine, GTPasen), der Adhäsion (z.B. Integrine), der Antigenpräsentation (MHC-Klasse-Moleküle) und weitere auf ihrer Membranoberfläche nachgewiesen werden. Abgesehen von Proteinen sind auch Ceramide, Cholesterol, Phosphatidylserin, Sphingolipide sowie TF hier zu finden (65-67). Als Exosomen-spezifische Oberflächenmarker wurden Alix, TSG101, CD9 und CD63 identifiziert (59).

##### Physiologische und pathologische Funktion

Über die Funktionen von Exosomen *in vivo* ist bislang wenig bekannt. Ursprünglich wurde angenommen, dass Exosomen als Entsorgungslösung fungieren, wenn bestimmte Proteine nicht lysosomal in der Zelle abgebaut werden können (52). Inzwischen konnte gezeigt werden, dass Exosomen andere Zellen auch zelluläre Signale vermitteln können. B-Zell-Exosomen stimulierten z.B. CD4<sup>+</sup> T-Zell-Klone (68). Des Weiteren geben Exosomen

Antigene von Tumorzellen an dendritische Zellen über MHC-Klasse I-Moleküle weiter (69). Über Exosomen können z.B. mehrere Liganden auf einmal mit einer Zelle interagieren. Sie können über Bindung an einer Zelle deren Rezeptor- bzw. Ligandenprofil erweitern oder Membranproteine sowie Zytosol zwischen zwei verschiedenen Zellen austauschen.

#### 1.2.4.2 Ektosomen/Mikrovesikel

##### Definition

Ektosomen werden in der Literatur auch mit den Synonymen Mikropartikel (MP) oder Mikrovesikel (MV) belegt. In der vorliegenden Arbeit wird der Begriff Mikrovesikel (MV) verwendet (46, 53, 57).

MV sind 0,1-1 µm große vesikuläre Körperchen (Tab. 1), welche im Blut und in diversen Körperflüssigkeiten von gesunden und kranken Menschen nachgewiesen wurden (46, 70). Sie bestehen aus Proteinen der Membran und Zelloberfläche sowie zytosolischem Material ihrer Mutterzelle (57, 58). MV können ihre Umgebung durch horizontalen Transfer von bioaktiven Molekülen, Proteinen, Lipiden, DNA sowie RNA beeinflussen (53). Eine Vielzahl von Zellen produziert MV: u.a. Endothelzellen, Leukozyten, Erythrozyten, Monozyten, Granulozyten, glatte Muskelzellen der Gefäße, Kardiomyozyten und Thrombozyten (57, 70). Ein erster Hinweis auf die Existenz von MV zeigte sich, als Wolf 1967 den sogenannten *platelet dust* beschrieb. Diese Entdeckung erfolgte nachdem eine Verlängerung der Plasmagerinnungszeit durch ultrazentrifugiertes Material gezeigt wurde. Dies ließ auf Komponenten im Plasma schließen, welche prokoagulatorische Eigenschaften aufweisen (57, 71). Erhöhte MV-Mengen im Serum sind bei verschiedenen Erkrankungen detektierbar. Dazu gehören Diabetes mellitus, chronische Nierenerkrankung, Präeklampsie, Bluthochdruck und verschiedene Krebsarten (70, 72). Im Einzelnen sind erhöhte Werte beim Glioblastom sowie Brust-, Lungen-, Ovarial-, Prostata-, Kolorektal- und Magenkrebs bekannt (73).

##### Entstehung

Allgemein kann jegliche Form von zellulärem Stress zur Entstehung von MV führen. Die Synthese von MV verläuft über eine bläschenförmige Zellprotrusion bzw. Zellmembran-Ausstülpung der Mutterzelle, das sogenannte *blebbing*. Dies führt zu einer Reorganisation der Membran-Symmetrie, unterstützt durch Flippase, Floppase, Scramblase (57) und Phosphatidylserin, ein an der Zellmembrannenseite lokalisiertes Lipid, das durch diesen

Vorgang an die Außenseite der Membran gelangt (74). Die genaue Signalkaskade, welche die MV-Produktion induziert, ist noch nicht entschlüsselt. Als mögliche Komponenten werden die Rho-Kinase, ein Regulator der Myosin-Leichte-Ketten Kinase (MLCK) (75), und die Transglutaminase 2, welche Einfluss auf Proteinquervernetzung und Reorganisation des Zytoskeletts hat (76), diskutiert. Es ist inzwischen bekannt, dass es zahlreiche Stimuli gibt, die die MV-Produktion anregen. Offensichtlich spielen proinflammatorische Faktoren, wie Lipopolysaccharide (77), Zytokine wie Interleukin-1 $\alpha$  (78), Tumornekrosefaktor alpha (TNF $\alpha$ ) (79), C-reaktives Protein (CRP) (80) eine besondere Rolle. Zusätzlich haben erhöhte intrazelluläre Kalziumspiegel (81), prokoagulatorische Faktoren wie Thrombin (82), Urämie-Toxine wie Homocystein (83), Angiotensin II (75) und hohe Glukosewerte im Blut (84) einen Einfluss.

### Abbau

Die Elimination von MV ist noch nicht vollständig verstanden. Die am weitesten verbreitete These beschreibt die Phagozytose als Eliminationsweg, das externalisierte Phosphatidylserin kann hier einen wichtigen Faktor darstellen. Eine andere Möglichkeit ist die Oponisierung der MV durch IgM (84-87).

### Pathologische Funktion

Wie bereits erwähnt sind MV nicht nur Produkte diverser Vorgänge, sondern sie verstärken und verursachen selbst biologische Effekte. Inflammatorische Prozesse sind ein wichtiger Auslöser der MV-Produktion, gleichzeitig zeigen Untersuchungen, dass MV selbst Entzündungsreaktionen unterstützen und sogar hervorrufen. Da eine solche Entzündung ohne das Einwirken von Erregern ausgelöst wird, wurde sie auch als „sterile Entzündung“ bezeichnet (88). Erhöhte MV-Serumspiegel werden mit dem Schutz vor Immunreaktionen, Zerstörung der extrazellulären Matrix (ECM), Metastasierung sowie dem Tumorwachstum und -überleben, was die Angiogenese einschließt, assoziiert (46, 72-74, 89). MV, welche bei Extremitätenischämie in Mäusen freigesetzt wurden, führten in mononuklearen Zellen des Knochenmarks zur Differenzierung eines endothelialen Phänotyps und zu Neovaskularisation *in vivo* (90). Zusätzlich spielen MV eine wichtige Rolle in der Blutgerinnung und sind vermehrt im Zusammenhang mit hyperkoagulatorischen Krankheiten nachweisbar. Diese prokoagulatorische Qualität ist darauf zurückzuführen, dass MV eine große Menge negativ geladener Phospholipide an ihrer Membranoberfläche aufweisen, welche die Interaktion mit Gerinnungsfaktoren erleichtern, und dass zudem bestimmte MV-Populationen TF an ihrer Membranoberfläche exprimieren (91).

TF-Expression wurde bei MV, welche von Monozyten, Endothelzellen und vor allem Thrombozyten abstammen, detektiert (57, 92). In einem *in vitro*-Experiment wurde durch Sinauridze et al. 2007 festgestellt, dass die Oberfläche dieser MV um den Faktor 50-100 stärker prokoagulatorisch agiert als die von aktivierten Thrombozyten (72, 93). Laut diverser Veröffentlichungen (16, 94) ist der Effekt von MV unter anderem abhängig von dem Adhäsionsmolekül P-Selektin, welches ebenfalls für die Bindung der MV an das Endothel verantwortlich ist. Des Weiteren wird über eine Beteiligung von P-Selektin am Mechanismus der Metastasierung diskutiert (94).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass MV gleichzeitig das Produkt und der Mitauslöser diverser Reaktionen und Erkrankungen sein können. Daher besteht neben ihrer Aufgabe als Transportvesikel für bioaktive Stoffe auch eine Assoziation zu Entzündungen, Hyperkoagulabilität, insbesondere bei Tumorerkrankungen. Das Schlüsselement für MV, um an diesen Prozessen mitwirken zu können, ist der an der Membranoberfläche exprimierte TF, denn ein Zusammenhang zwischen Thromboseinzidenz, MV-Konzentration in Patientenplasma und Tumorerkrankung ist bekannt und bedarf lediglich einer genaueren Aufschlüsselung (15, 57).

Ein Mechanismus im Zusammenhang mit Tumorausbreitung, nämlich die Aktivierung von Protease-aktivierten-Rezeptoren (PAR) ist bereits bekannt. Dabei handelt es sich vor allem um PAR2, der durch den TF-FVIIa-Komplex, Thrombin oder FXa (95) aktiviert wird und so wichtige Vorgänge wie die Angiogenese und Zellmigration beeinflussen kann (36). Hierauf wird in Kapitel 1.2.5 genauer eingegangen.

#### 1.2.4.3 Apoptotische Körperchen

Diese Vesikel entstehen im Verlauf der Apoptose, des von der Zelle selbst gesteuerten Zelluntergangs (72). Die Größe der apoptotischen Körperchen variiert stark von 0,05 bis 5  $\mu\text{m}$  (46, 53, 72, 96). In der Apoptose durchlaufen Zellen eine Serie von Veränderungen, um ihre potentiell für die Umgebung toxisch wirksamen Komponenten in Vesikel zu verpacken. Die entstandenen Vesikel enthalten nukleäre Fragmente, stark verpackte zelluläre Organellen und Plasmamembran- sowie Zytosolbestandteile (72). Anschließend können die Vesikel von Phagozyten abgebaut werden. Apoptose kann über den intrinsischen oder den extrinsischen Weg verlaufen. Beide Pfade gehen in Cytochrom c-, Caspase- und p53-vermittelte Prozesse über.

#### 1.2.4.4 Große Onkosomen (GO)

Große Onkosomen verdanken ihren Namen ihrer Größe, die von 1-10  $\mu\text{m}$  reicht sowie ihrem onkogenen Inhalt (bspw. Metalloproteasen, RNA, Caveolin-1, ADP-Ribosylationsfaktor 6 (97); Tab. 1). Ähnlich wie Ektosomen entstehen auch diese Vesikel durch blasenförmige Membranprotrusion. Der Nachweis von großen Onkosomen wurde mit diversen Tumorarten assoziiert, wie u.a. dem Prostata-, Mamma- und Lungenkarzinom. Auch ein Zusammenhang zwischen großen Onkosomen und hoch aggressiven und migratorisch aktiven Tumorzellen konnte hergestellt werden (53).

<b>Vesikel-Art</b>	<b>Größe [<math>\mu\text{m}</math>]</b>	<b>Entstehung</b>
Exosomen	0,03-0,150	Exozytose, MVK-Fusion mit der Zellmembran
Ektosomen	0,1-1	Bläschenförmige Zellprotrusion
Apoptotische Körperchen	0,5-5	Bläschenförmige Zellprotrusion
Große Onkosomen	1-10	Bläschenförmige Zellprotrusion

*Tabelle 1: Übersicht der EV-Subpopulationen (46, 53)*

### 1.2.5 Protease-activated-receptors (PAR)

Ein Weg für freien oder im Komplex gebundenen TF, um Tumor-assoziierte Prozesse zu beeinflussen, führt über PAR. Hierbei handelt es sich um eine Gruppe G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (GPgR), welche aus PAR1-4 besteht (98). PAR sind an diversen Vorgängen wie Hämostase, Embryonalentwicklung, Entzündung und Tumorprogression beteiligt. Wie alle G-Protein-gekoppelten Rezeptoren bestehen PAR aus sieben transmembranösen Domänen, welche durch drei intra- und drei extrazelluläre Schleifen verbunden sind. Für die Interaktion mit dem Rezeptor ist der extrazelluläre N-Terminus und für die Signalweiterleitung der intrazelluläre C-Terminus verantwortlich (99).

#### Vorkommen

PAR sind in einer Vielzahl von Zellen und Geweben nachweisbar. Hierzu gehören u.a. Thrombozyten, Fibroblasten, Monozyten, T-Zellen, Zellen des Epithels, Endothels, der glatten Muskulatur, des Herzens, des Gehirns, der Lunge, der Nieren, der Leber, des Pankreas, der Lymphknoten, des Gastrointestinaltrakts, der Plazenta und der Hoden sowie bestimmte Tumorzell-Linien (epitheliale Karzinome, Astrozytom, hepatozelluläres Karzinom) (98, 100, 101). PAR1, PAR3 und PAR4 sind überwiegend im Gefäßsystem repräsentiert und PAR2 in den Zellen der Atemwege, des Intestinaltrakts und des Gefäßsystems (95).

#### Aktivierung und Regulierung

PAR sind für die zelluläre Antwort auf Proteasen wie Thrombin, FXa, Kallikrein, aktiviertem Protein C (APC), neutrophiler Protease 3, TF/FVIIa/FXa und anderer verantwortlich, wobei Thrombin nur mit PAR1, 3 und 4 interagiert, nicht mit PAR2 (98).

PAR weisen einen speziellen Aktivierungsmechanismus auf. Bei GPgR binden hydrophile Moleküle als Liganden reversibel am Rezeptor, um eine intrazelluläre Antwort hervorzurufen. PAR hingegen werden durch Proteasen, vor allem Serin-Proteasen, aktiviert (99). Diese binden an für sie charakteristische loci und demaskieren einen *tethered ligand*, welcher am Rezeptor gebunden bleibt. Erst dieser *tethered ligand* kann die intrazelluläre Kaskade aktivieren, indem er die Konformation des Rezeptors verändert (Abb. 3). Für gewöhnlich weist jeder Ligand einen definierten, für ihn charakteristischen Effekt auf. Bei PAR kann es durch ein Ansetzen der Proteasen an verschiedenen loci am N-Terminus zu unkonventionellen *tethered ligands* kommen, welche dadurch einen alternativen

intrazellulären Signalweg einleiten. Diese Art von Liganden-Ansatzselektivität wird als *biased signalling* bezeichnet (98) (Abb. 2).

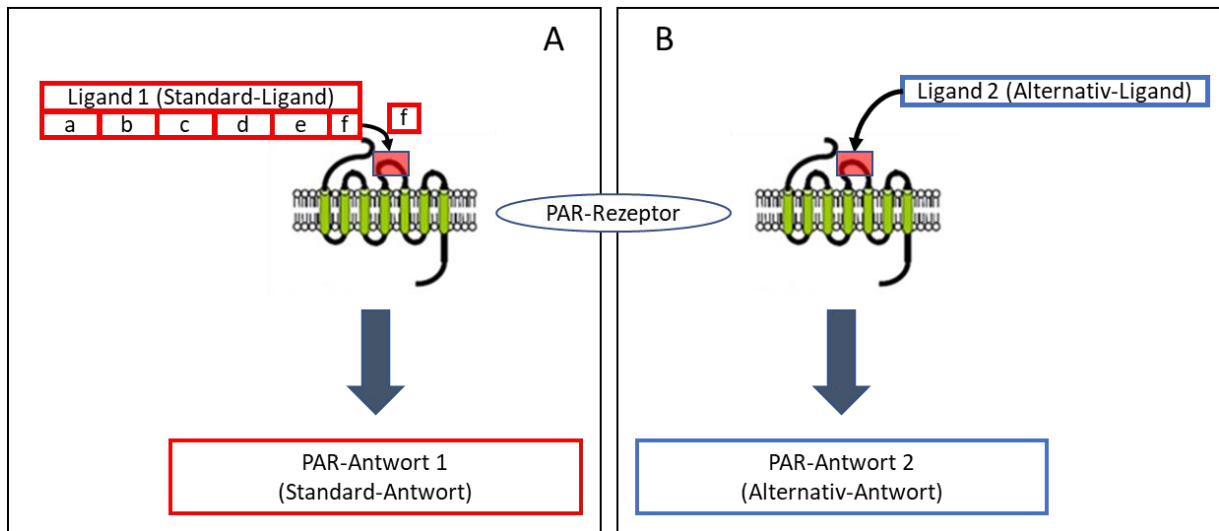


Abbildung 2: Mögliche PAR1-Aktivierungen; Abbildung modifiziert nach Gieseler et al. (98). Gezeigt werden zwei Möglichkeiten der PAR1-Aktivierung. Die konventionelle Art der Aktivierung wird durch Abbildung A dargestellt. Durch Proteolyse wird ein tethered ligand (f) gebildet, welcher im Zuge an den Rezeptor bindet und eine spezifische Antwort bewirkt. Dem entgegen kann wie in Abbildung B der Rezeptor an der gleichen Stelle auch durch einen Liganden, wie z.B. ein synthetisches Peptid, aktiviert werden, welcher den tethered ligand nur imitiert und die Proteolyse umgeht

Die PAR-Aktivierung ist irreversibel und kann mehrere Signalkaskaden induzieren. Der klassische Weg führt über eine heterotrimere Antwort, welche über Guaninnukleotid-bindende-Proteine (G-Proteine) verläuft. Zusätzlich kann über einen Beta-Arrestin-Weg signalisiert werden, der über ein Liganden-abhängiges Gerüst und einen Transaktivationsweg agiert, welcher eine Varietät weiterer Rezeptoren und Transmitter enthält (bspw. PAR2 – Beta-Arrestin – Raf-1 – aktivierte ERK1/2 (102)). Des Weiteren kann über Transaktivierung diverser anderer Rezeptoren eine Signalkette aufgebaut werden (siehe Abb. 3; (98)).

Der Abbau der PAR beinhaltet drei Schritte. Der erste Schritt ist die Desensibilisierung durch eine schnelle Phosphorylierung und Arrestin-Bindung. Dies führt innerhalb von Sekunden zur Entkopplung des Rezeptors vom G-Protein-abhängigen Signalweg. Der zweite Schritt besteht aus der Internalisierung des aktiven Rezeptors und läuft innerhalb weniger Minuten ab. Ein dritter Schritt ist bislang nur für PAR1 bekannt. Dieser führt zur lysosomalen

Zersetzung des Rezeptors. So wird sichergestellt, dass die aktivierten Rezeptoren, im Gegensatz zu anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, nicht mehr weiterverwendet werden können (95). Es sind Unterschiede bei der Wirkweise der PAR bekannt. So wurde z.B. bei PAR4 festgestellt, dass eine verlangsamte Internalisierung und Phosphorylierung vorliegt (103, 104).

PAR können über diverse Interaktionen Prozesse beeinflussen. Hierzu gehören zum einen die Aktivierung von PAR untereinander, zum anderen die Aktivierung von *toll-like*-Rezeptoren (TLR), Ionen-Kanal-Rezeptoren, anderer G-Protein-gekoppelter-Rezeptoren (GPgR), Rezeptor-Thyrosin-Kinasen (RTK) und Rezeptor-Serin/Threonin-Kinasen (RSTK) (98) (Abb. 3).

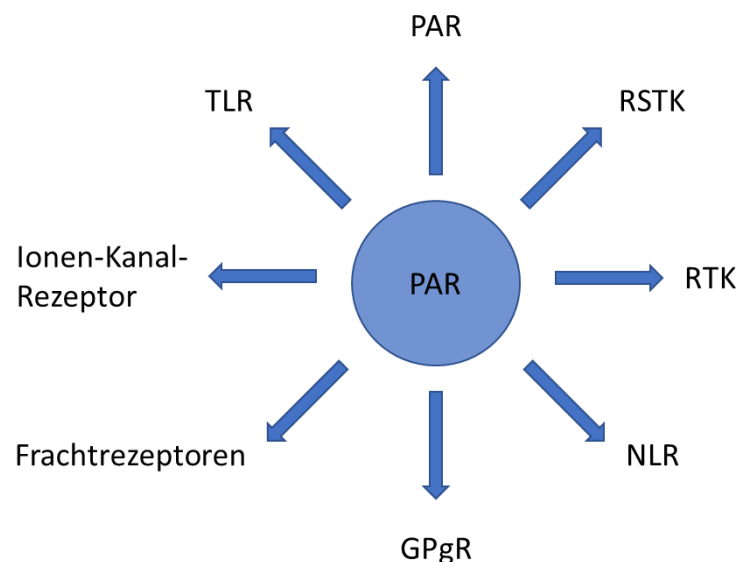


Abbildung 3: PAR-Interaktionsmöglichkeiten; Abbildung modifiziert nach Gieseler et al. (98). Hier wird die Vielzahl an Interaktionen aufgezeigt, zu denen PAR fähig sind, wie bspw. von verschiedenen PAR untereinander, mit Ionen-Kanal-Rezeptoren oder Rezeptor-Thyrosin-Kinasen. [GPgR: G-Protein-gekoppelter Rezeptor; PAR: proteinase-activated-receptor; RTK: Rezeptor-Thyrosin-Kinase; RSTK: Rezeptor-Serin/Threonin-Kinase; TLR: toll-like-Rezeptor; NLR: nucleotid oligomerization domain receptors]



### Physiologische Funktion

PAR1 (ursprünglich als Thrombin-Rezeptor bezeichnet) tritt über Thrombin in verschiedenen Prozessen hinsichtlich Entzündungen, Gewebeumbau und -heilung auf. PAR2 spielt bei der Reaktion auf Gefäßschäden eine Rolle. PAR3 ist der sogenannte zweite Thrombin-Rezeptor. Bislang ist über ihn bekannt, dass er in Thrombozyten als Kofaktor zur Aktivierung von PAR4 agiert (105). PAR4 hat mit PAR2 Bedeutung für die menschliche Embryogenese, da das PAR2-PAR4-Dimer in embryonalen Nierenzellen für den Membrantransport verantwortlich ist (106).

### Pathologische Funktion

Neben den physiologischen Aufgaben der PAR wurden auch pathophysiologische Wirkungsweisen identifiziert. Eine Signalkaskade mit PAR1, PAR4 und *epidermal growth factor receptor* (EGFR) wurde bei kardiovaskulären Erkrankungen nachgewiesen, welche über gegenseitige Transaktivierung pathologische Funktionen wie *remodeling* zur Folge hat (98). Weiterhin wurde herausgefunden, dass über PAR2 und dessen Regulation von PAR1 hyperplastische Reaktionen hervorgerufen werden, welche zu arterieller Gefäßschädigung und Stenose führen. Interessanterweise spielt PAR2 hier eine protektive Rolle, indem es die Reperfusion einst ischämischer Areale antreibt (98, 107). Im Krankheitsbild der Lungenfibrose haben PAR und EGFR einzeln oder in Kombination auch eine pathophysiologische Bedeutung. Hier spielen PAR1, 2 und 4 eine wichtige Rolle, indem sie durch Umwandlung von zellulären Phänotypen und Sezernierung von profibrotischen Faktoren Verletzungen im umliegenden Gewebe verursachen (108-110). Bei Arthritis wird ein Zusammenhang zur PAR1-EGFR-Interaktion vermutet (111).

In verschiedenen medizinischen Bereichen wurde eine Beteiligung von PAR beschrieben, unter anderem bei Entzündungsmechanismen, Schmerz und Infektion. Offensichtlich sind unterschiedliche PAR-Isotyphen bei verschiedenen pathophysiologischen Vorgängen beteiligt. Z.B. hat PAR4 hat einen starken proinflammatorischen Effekt (112, 113). Die Interaktion von PAR1 mit PAR3 verändert die Selektivität von PAR1 für G<sub>13</sub>, einem Teil der G-Protein-Signalkaskade, was im Verlauf eine Dysfunktion der endothelialen Barriere fördert. PAR1 alleine wiederum zeigt bei Aktivierung durch Protein C einen protektiven Effekt durch eine Verbesserung der endothelialen Barrierefunktion (114, 115). PAR2 wird vornehmlich mit Schmerz in Verbindung gebracht. Beispiele hierfür sind Arthritis (116), Pankreatitis (117) und Paclitaxel-induzierter neuropathischer Schmerz (118).

Für diese Arbeit ist der Zusammenhang zwischen PAR und Tumorprogression wichtig. Mit Thrombin und TF als starke Aktivatoren von PAR konnte bereits eine Korrelation zwischen Hyperkoagulation und der Progression von Tumorerkrankungen hergestellt werden. Es stellte sich heraus, dass die Signalkaskaden, welche zur Koagulation führen, auch in der Tumorprogression eine wichtige Rolle spielen (119, 120). Tesfamariam et al. stellten 2016 fest, dass Tumorzellen/Metastasen bspw. in der Blutbahn mit Thrombozyten oder Fibrin interagieren, um sich vor einer Immunreaktion bzw. vor Detektion durch das Immunsystem zu schützen (121). Fibrinthrombi werden ebenfalls mit der Bildung von metastatischen Kolonien und dem Prozess der Angiogenese in Verbindung gebracht. PAR-Expression konnte bei diversen Tumorarten nachgewiesen werden (122), wie bspw. PAR1 in aggressivem Melanom, Kolon- und Prostata-Karzinom sowie invasivem Brustkrebs. PAR1 und 2 sind in Stroma-Fibroblasten malignen Gewebe, jedoch nicht im Gesunden detektierbar (123). Tumoren sind mit Proteasen gesättigt, welche PAR aktivieren können, wie z.B. Urokinase-Plasminogen-Aktivator (uPA) und Matrix-Metalloproteasen (MMP). Eine Hochregulation von uPA wird mit einer schlechten Überlebensprognose der Krebspatienten verbunden (124), da Plasminogen zu Plasmin aktiviert wird, welches extrazelluläre Matrixproteine zerstören kann (125) und PAR1 aktiviert (98). PAR1 unterstützt wiederum die Zellmotilität über Aktivierung von EGFR.

Ein weiterer wichtiger Faktor in diesem Szenario ist TF. Dessen Expression liegt bei Tumorzellen hochreguliert vor (126). In Verbindung mit FVII und FX ist TF in der Lage PAR zu aktivieren. Der TF-FVII-Komplex agiert hier über PAR2, FXa sowohl über PAR1 als auch PAR2 (127). Die Aktivierung von PAR1 sowie von PAR2 kann eine Phosphorylierung von *extracellular-signal regulated kinase* (ERK) 1/2 initialisieren (128). Vor allem ERK2 kann mit Tumorzell-Migration und –Invasivität in Verbindung gebracht werden (129). Es zeigte sich, dass PAR1 einen starken Effekt auf die Angiogenese hat, so waren 50% der PAR1-null Mäuse im Mausmodell während des zweiten Trimenon aufgrund abnormaler Gefäßentwicklung verstorben. Bei Wiederherstellung der PAR1-Expression überlebten die Tiere einer Vergleichsgruppe den Beobachtungszeitraum (130, 131). Zudem wurde festgestellt, dass bei einer PAR1-Induktion Tumorwachstum und Angiogenese vermehrt auftraten (111), und die VEGF-Produktion zunahm (132). PAR2 spielt ebenfalls eine wichtige Rolle für die Tumorprogression. Erhöhte Mengen Trypsin, eines starken PAR2-Aktivators, sind bei Magen-, Kolon-, Ovarial- und Lungenkarzinom ermittelt worden (133). Die Migrationsinduktion über PAR2 beinhaltet eine Arrestin-abhängige ERK1/2-Aktivierung (134). Zudem stimuliert PAR2 die EGFR-Aktivität und zelluläre Proliferation.

Die vermehrte PAR-Aktivität lässt sich unter anderem darauf zurückführen, dass die in normalen Zellen vorhandenen Regulationsmechanismen in Tumorzellen geschwächt sind oder ganz ausfallen. In Brustkrebszellen fehlte die Herabregulation der PAR-Expression an der Zelloberfläche und die Internalisierung, das Recycling und der lysosomale Abbau der Rezeptoren waren verlangsamt (135).

Tesselaar et al. zeigten 2007 eine Verbindung zwischen Krebserkrankungen und Hyperkoagulabilität auf (15). PAR können durch Gerinnungsfaktoren einzeln oder in Kombination aktiviert werden und dann Tumor-erhaltende Prozesse, wie die Metastasierung und Angiogenese nach sich ziehen. Daher stellt sich die Frage, ob nicht die bei Tumorpatienten Leitlinien gerecht durchgeführte antithrombotische Therapie ebenfalls eine antiproliferative/antimetastatische sein kann. Dieser mögliche Zusammenhang und die mit dieser Fragestellung durchgeführten klinischen Studien werden in der Diskussion besprochen. Im Vordergrund der antithrombotischen Therapie stehen dabei unfraktioniertes Heparin (UFH) und niedermolekulare Heparine (NMH) (136).

## 1.3 Gerinnungshemmung

### 1.3.1 Physiologische Antikoagulation

#### 1.3.1.1 Übersicht

Die körpereigene Antikoagulation konzentriert sich zum größten Teil auf eine Hemmung der Gerinnungsfaktoren durch Blockierung des aktiven Zentrums der Serinproteasen. Antithrombin III spielt hier eine wichtige Rolle, da es die Faktoren IIa, Xa, IXa, XIa, XIIa sowie Kallikrein einschränkt, was in einer Hemmung der Thrombinsynthese resultiert (31). Ein weiterer Inhibitor ist Protein C. Dieses wird aktiviert, wenn Thrombin an Thrombomodulin bindet, welches auf intaktem Endothel exprimiert wird. Durch die Kopplung von Protein C an Protein S werden die Faktoren Va und VIIIa gehemmt. Die Fibrinolyse wird durch Plasmin bestimmt, welches aus dem Plasmaglobulin Plasminogen aktiviert wird. Dazu tragen zum einen Gewebe-gebundene Faktoren (t-PA, *tissue-type*-Plasminogenaktivator; uPA, Urokinase) und zum anderen Blutaktivatoren (FXIIa, Präkallikrein) bei (31, 32).

Als Letztes zu nennen ist der *tissue factor pathway inhibitor* (TFPI) auf den im nächsten Abschnitt näher eingegangen wird (Abb. 4).

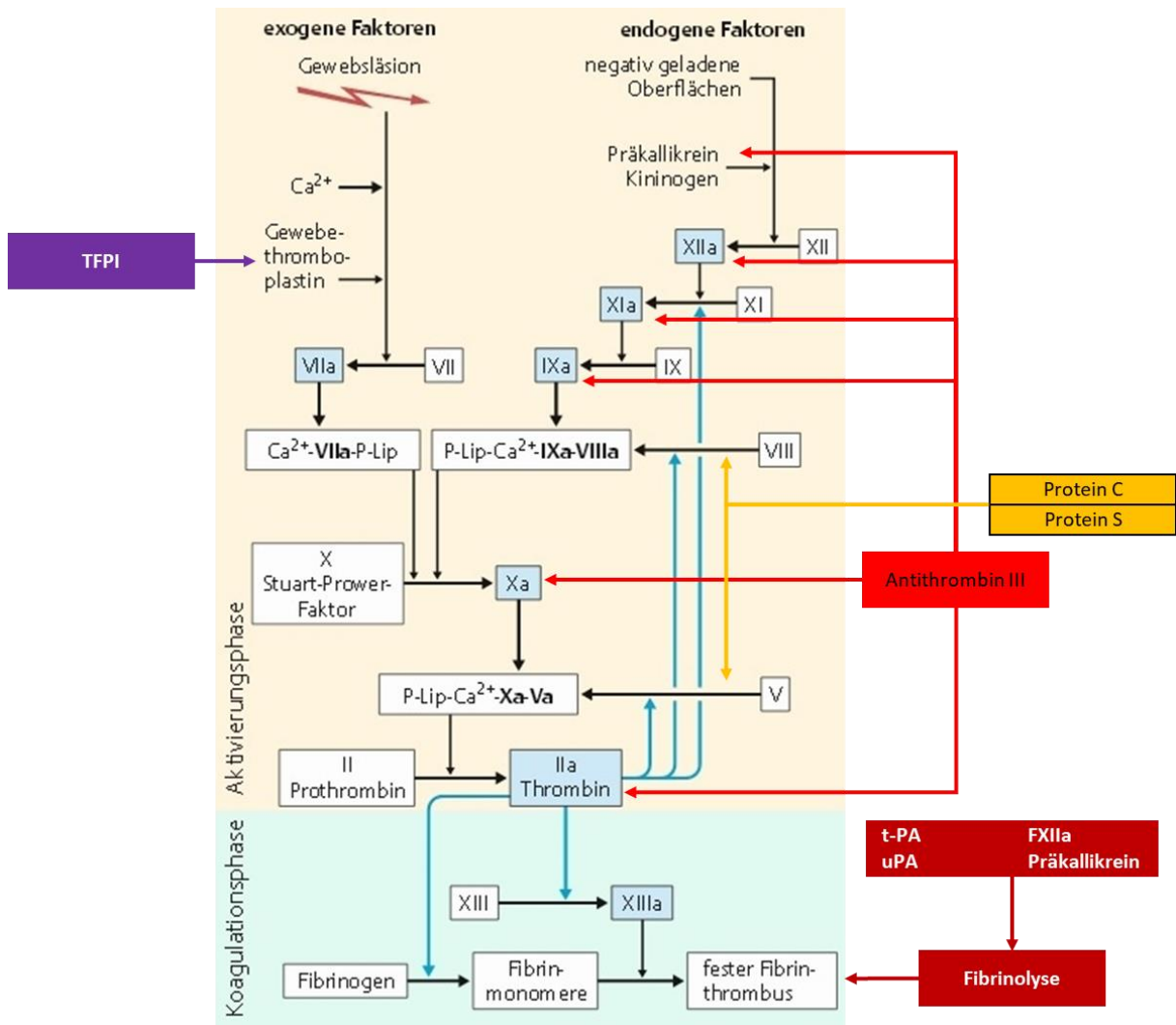


Abbildung 4: Körpereigene Antikoagulation; modifiziert nach Behrends et al. 2010 (32); durch Antithrombin III werden FIIa, FXa, FIXa, FXIa, FXIIa und Kallikrein gehemmt; Protein C gekoppelt mit Protein S blockiert FVa und FVIIIa; die Fibrinolyse kann durch t-PA, uPA, FXIIa und Präkallikrein eingeleitet werden; Gewebethromboplastin (TF) kann durch TFPI gehemmt werden (31, 32)

### 1.3.1.2 Tissue factor pathway inhibitor (TFPI)

TFPI ist ein natürliches Antikoagulans (137), welches als mehrsegmentiges Protein aus einem sauren Amino- oder N-Terminus, drei Kunitz-Typ-Domänen (K1-3) und einem basischen Carboxy- oder C-Terminus besteht (138-140). 80% des TFPI sind mit der Gefäßwand assoziiert, 20% zirkulieren im Kreislauf. Von den 20% Plasma-TFPI sind wiederum 80% an diverse Lipoproteine gebunden, nur 10% liegen ungebunden vor (141). Eine Produktion von TFPI wurde in Endothelzellen, Zellen der glatten Muskulatur, Fibroblasten, Keratinozyten und Urothel nachgewiesen (142). Die mRNA von TFPI (TFPI-1) kann alternativ gespleißt werden, um die Isoformen TFPI $\alpha$  und TFPI $\beta$  zu produzieren (143-146). TFPI $\alpha$  besteht aus allen drei Kunitz-Domänen sowie dem C-Terminus und TFPI $\beta$  nur aus K1, K2 und einem veränderten C-Terminus (140, 144, 145). K1 hemmt den TF-FVIIa-Komplex durch Bildung eines quartären Inhibitor-Komplexes aus FVIIa, TF, TFPI und FXa. Die Domäne K2 hemmt spezifisch FXa. In verschiedenen Untersuchungen stellte sich heraus, dass zuerst die FXa-Hemmung über K2 vollendet sein muss, damit K1 den TF-FVIIa-Komplex hemmen kann (138, 144, 145). K3 kann Protein S als Kofaktor binden, was die K2-FXa-Bindung stark verbessern kann (147). K3 und der C-Terminus enthalten Heparinbindungsstellen (144, 145). TFPI $\alpha$  und TFPI $\beta$  sind über Glycophosphatidylinositol (GPI) mit dem Endothel verbunden. TFPI $\alpha$  ist nur indirekt über einen GPI-verankerten Korezeptor, K3 und den C-Terminus verbunden. TFPI $\beta$  ist direkt über den alternativen C-Terminus verbunden (145, 146). Beide Isoformen können den TF-FVIIa-Komplex sowie FXa hemmen. Seit kurzem ist bekannt, dass TFPI $\alpha$  zusätzlich frühe Formen des Prothrombinase-Komplexes hemmen kann (148). TFPI wird bei der Aktivierung der extrinsischen Koagulationskaskade parallel zu TF freigesetzt, ist jedoch auch an der antikoagulatorischen Wirkung von Heparin beteiligt. Heparin veranlasst die Ausschüttung von TFPI aus den Speichern der Endothelzellen (149). In gesunden Menschen lässt sich eine TFPI-Konzentration von 35-90 ng/ml nachweisen, die nach einmaliger Gabe von 75 IU/kg Tinzaparin auf Werte von 150-230 ng/ml erhöht werden kann (150). Es ist allerdings unklar, wie hoch die TFPI-Konzentration im Gewebe ist.

## 1.3.2 Medikamentöse Antikoagulation

### 1.3.2.1 Übersicht

Gerinnungshemmung kann sowohl die primäre, als auch die sekundäre Gerinnung betreffen. Eine medikamentöse Hemmung der primären Gerinnung erfolgt über Thrombozytenaggregationshemmer. Bekannte Mechanismen sind ADP-Hemmung (z.B. Clopidogrel, Prasugrel), COX-Hemmung (z.B. Acetylsalicylsäure, ASS), GPIIb/IIIa-Antagonisierung (z.B. Tirofiban, Eptifibatid) sowie die Hemmung der Phosphodiesterase (z.B. Dipyridamol, Trapidil).

Auch zu einer Hemmung der sekundären Gerinnungskaskade führen verschiedene therapeutische Ansätze. Mittels Hemmung von Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren (z.B. Phenprocoumon, Warfarin), direkter Thrombininhibition (z.B. Argatroban, Dabigatran), selektiver FXa-Hemmung (z.B. Fondaparinux, Rivaroxaban) und Hemmung von Thrombin sowie FXa (UFH, NMH) kann Einfluss auf diese Blutstillung genommen werden (31).

Da in dieser Arbeit der Fokus auf einem Vertreter der niedermolekularen Heparine (NMH, Tinzaparin) liegt, werden diese in Verbindung mit unfraktioniertem Heparin (UFH) im Folgenden genauer betrachtet.

### 1.3.2.2 Unfraktioniertes Heparin (UFH) und Niedermolekulare Heparine (NMH)

Heparin ist ein Glykosaminoglykan (151), welches aus sulfatiertem D-Glucosamin und Glucuronsäure besteht und dessen Molekulargewicht von 5 bis 30 kDa (Mittel 15 kDa) reicht. Vereint unter dem Überbegriff Heparin sind UFH und NMH. Die Unterscheidung wird durch die Kettenlänge des Polysaccharids bestimmt. Ab <18 Sacchariden bezeichnet man das Molekül als NMH (31).

Die erste Form des Heparins wurde 1916-17 entdeckt und die erste kommerzielle Herstellung von Heparin gelang 1924 (152). Heparin ist eines der ältesten, immer noch klinisch verwendeten Arzneimittel (151). In den 1980er Jahren folgte die Entwicklung von NMH (153, 154). Es gibt viele Möglichkeiten NMH herzustellen. Im Mittelpunkt steht die chemische und die enzymatische Depolymerisation von unfraktioniertem Heparin.

UFH ist seit über 60 Jahren Teil des klinischen Alltags und das Mittel der Wahl zur Prävention und Behandlung von venösen Thrombosen (154). Seit den 1980er Jahren haben sich jedoch die NMH als primäres Arzneimittel zur Prävention von postoperativer

Thrombose durchgesetzt. Mit der Zeit wurden ihnen immer weitere Indikationen zugesprochen. So sind sie heute nicht nur bei Venenthrombosen indiziert, sondern auch zur Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen, thrombotischen oder ischämischen Schlaganfällen, Krebs und neurodegenerativen Krankheiten (155). Sie überzeugen mit erhöhter Bioverfügbarkeit durch geringere Proteinbindung, einem geringeren Nebenwirkungsrisiko, was stationäre Überwachung unnötig werden lässt, und einer erhöhten Plasmahalbwertszeit, die eine tägliche Gabe ausreichend macht (156). NMH sind dem UFH nicht nur wirkungsbezogen ebenbürtig. Es hat sich zusätzlich gezeigt, dass die Gesamtmortalität bezogen auf alle betroffenen Patienten bei einer Therapie mit NMH im Vergleich signifikant zurückgeht (157, 158) und das Osteoporoserisiko verringert ist (159). Auch im Bereich der Dialyse übersteigt ihr klinischer Nutzen den des UFH. Dieser zeigt sich, indem die extrakorporale Antikoagulation wie mit UFH aufrechterhalten, jedoch das Risiko für Blutungen und Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT) mit NMH minimiert werden kann (160). Ein zusätzliches Argument zu ihren Gunsten ist der Kostenvorteil gegenüber UFH, da NMH günstiger in der Herstellung sind und von Patienten selbst zu Hause subkutan appliziert werden können (161-163).

UFH hemmt FXa und FIIa. Für die FXa-Hemmung reicht die Bindung zu Antithrombin aus, wohingegen die FIIa-Hemmung über eine Zweifachbindung des Heparins erfolgt. Hier wird Antithrombin und, nur möglich ab 18 Polysacchariden (154, 164), zusätzlich FVIIa (31) gebunden.

NMH dagegen besitzen eine geringere durchschnittliche Größe von 4-9 kDa (Mittel 4-6 kDa) und sind auf Grund ihrer Länge selektive FXa-Hemmer. Je nach Länge besteht zusätzlich eine geringe Thrombin-Hemmung (31). Zusätzlich kann eine TFPI-Ausschüttung induziert werden (165), welche insbesondere in dieser Arbeit von Bedeutung ist.

Im Fall von Tumor-assoziierten venösen Thromboembolien ist laut S2-Leitlinie, veröffentlicht durch das AWMF 2015, für die ersten 3-6 Monate nach einem thromboembolischen Vorfall und vorliegender Tumorerkrankung eine Therapie mit NMH durchzuführen (28). Die Therapie hat den Vorteil gegenüber der Therapie mit UFH, dass die Einstellung der Patienten einfacher zu möglich ist.

Des Weiteren ist laut der Leitlinie eine Therapie mit NMH aus den oben erläuterten Gründen weniger risikobehaftet als eine Therapie mit UFH (28). In dieser Arbeit wird das NMH Tinzaparin (Innohep, LEO Pharma GmbH) näher untersucht, weil es über besondere Eigenschaften verfügt, die für die vorliegende Fragestellung relevant sind.

### 1.3.2.3 Tinzaparin

Tinzaparin ist ein 5,5-7,5 kDa großes Molekül (166), welches über enzymatische Depolymerisation aus unfraktioniertem Heparin mithilfe des Bakteriums *Flavobacterium heparinum* gewonnen wird (155, 162). Es stoppt die Blutgerinnung durch Hemmung der Gerinnungsfaktoren FXa und FIIa. Zusätzlich induziert es die Ausschüttung von TFPI aus Endothelzellen (167).

Tinzaparin ist für die Behandlung von akuter symptomatischer Thrombose der tiefen Beinvenen (TVT) mit oder ohne Lungenembolie, bei gleichzeitiger Gabe von Warfarin-Natrium (166, 168) zugelassen. Zusätzlich zu den Eigenschaften, welche Tinzaparin mit den anderen NMH teilt, kann es auch Patienten mit stark eingeschränkter Nierenfunktion (Kreatinin-Clearance bis 20ml/min) verabreicht werden. Auch ist eine Dosis-Anpassung bei Patienten mit einem BMI > 25 nicht notwendig (169).

Es gibt Studienergebnisse, die darauf hinweisen, dass Tinzaparin neben seinen antithrombotischen Eigenschaften auch antiangiogene und antimetastatische Wirkung hat (167, 170). Zudem zeigte die Verwendung von Tinzaparin in einem Mausmodell mit B16-Melanomzellen die Reduktion einer Lungenmetastasierung um 96% (167).

In die Pathophysiologie von Krebserkrankung kann Tinzaparin über TFPI eingreifen. Es bewirkt in der Gruppe der NMH die höchste Ausschüttung von TFPI (165). Diese Eigenschaft könnte auch die Unterschiede zu den anderen NMH erklären.



## 1.4 Fragestellung

In der Literatur wurde ein Zusammenhang zwischen der Thromboseinzidenz bei Tumorpatienten, deren Tumorstadium und der Mikrovesikel (MV)-Konzentration im Patientenblut beschrieben. Des Weiteren wurden MV mit Tumorzellmigration assoziiert (46, 72-74, 89).

In dieser Arbeit wurden zwei Thesen untersucht:

1. Extrazelluläre Vesikel (EV), insbesondere MV, induzieren die Migration von Tumorzellen.
2. Diese Migrationsinduktion kann durch das niedrigmolekulare Heparin (NMH) Tinzaparin inhibiert werden.

Dazu wurden MV aus malignen Ergüssen von Patienten mit kolorektalem, Mamma- und kleinzelligem Lungenkarzinom gewonnen.

Als Testzellen wurde die humane Pankreaskarzinomzelllinie Colo357 *in vitro* verwendet.

Die Hypothesen wurden nach folgendem Schema untersucht:

1. Nachweis von TF-tragenden MV in malignen Ergüssen
2. Identifikation und Charakterisierung der Subpopulationen durch *high speed*-Zentrifugation
3. Nachweis der Migrationsinduktion bei Tumorzellen durch TF-tragende MV in malignen Ergüssen
4. Nachweis der Migrationshemmung durch das NMH Tinzaparin
5. Nachweis der TFPI-Produktionsinduktion durch das NMH Tinzaparin in Tumorzellen
6. Nachweis der Migrationshemmung durch TFPI in Tumorzellen

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
xCELLigence RTCA DP System®	Acea Biosciences Inc., San Diego, CA, USA
CIM-Plate® (Cell Invasion/Migration)	
Durchflusszytometer Navios®	Beckmann Coulter Inc., Krefeld, Deutschland
ELISA Washstation	Dade Behring, Inc., Westwood, MA 02090, USA
MRX TC Revelation® (Version 4.22)	Dynex Technologies GmbH, Denkendorf, Deutschland
Centrifuge 5417 R®	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Multipipette plus	
Centrifuge 5430 R®	
Gelaire BSB 4A®	Gelaire Pty Ltd, Sydney, Australien
Schüttelplatte, Titramax 100®	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Pipettus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
μ Columns®, Order No. 130-042-701	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, Deutschland
MACS MultiStand®	
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Heracell 150®	Thermo Fisher Scientific Inc., Pinneberg, Deutschland
Heraeus Megafuge 1.0 Centrifuge®	
Heraeus Labofuge 400®	
MS 2 Minishaker	Werner Hassa Laborbedarf GmbH, Lübeck, Deutschland
Mikroskop	ZEISS, Oberkochen, Deutschland

GFL 1083® Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland
---------------------	---

Tabelle 2: Geräte

### 2.1.2 Medien, Puffer, Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Hersteller
F3/Tissue-Factor Mouse anti-Human Monoclonal (FITC) Antibody – LS-C44960-100	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, Deutschland
Human Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI)	
Cytocount	
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Natrium-Pyruvat 100 mM	
Megamix	BioCytex, Marseille, Frankreich
Tinzaparin; Innohep® 20.000 IU/ml	LEO Pharma GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland
PBS, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, No Ca <sup>2+</sup> and Mg <sup>2+</sup>	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
TE, Trypsin-EDTA	
Rekombinantes, humanes TGF-β <sub>1</sub>	ReliaTech GmbH, Wolfenbüttel, Deutschland
Kollagen, Cat. No. C9791	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA
Trypan-Blue Solution (0,4 %)	
Medium (Lonza RPMI 1640)	Thermo Fisher Scientific Inc., Pinneberg, Deutschland
PSG (Penizillin-Streptomycin-Glutamin) 100 ml	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 3: Substanzen

### 2.1.3 ELISA-Kits

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
Imubind® Total TFPI ELISA Kit, Product No. 849	American Diagnostica GmbH, Pfungstadt, Deutschland
Annexin V MicroBead® Kit	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, Deutschland
MP-TF-Activity Assay	Aniara, West Chester OH, USA

*Tabelle 4: ELISA-Kits*

### 2.1.4 Ergüsse und Zellen

<b>Ergüsse</b>	
Pleuraerguss eines metastasierten kolorektalen Karzinoms (Erguss Nr. 612, CRC)	
Pleuraerguss eines metastasierten Mammakarzinoms (Erguss Nr. 599, BC)	
Pleuraerguss eines kleinzelligen Lungenkarzinoms (Erguss Nr. 575, SCLC)	
<b>Zellkultur</b>	
Colo357	European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC; Inventarnummer 94072245; nicht mehr käuflich erwerbbar)

*Tabelle 5: Ergüsse und Zellkultur*

## 2.1.5 Sonstige Materialien

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
Test Tube, 12 x 75 mm, blue	Beckmann Coulter Inc., Krefeld, Deutschland
Pasteur-Pipette	Brand GmbH + Co KG, Wertheim, Deutschland
Pipetten (1000µl, 500µl, 200µl, 100µl, 50µl, 20µl)	Eppendorf AG., Hamburg, Deutschland
Pipetten (100-1000µl, 10-100µl, 20-100µl)	
Cellstar®, 5ml, 10ml, 25ml	Greiner Bio One International GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitze 100 gelb, 1000 farblos	
PP-Röhrchen, steril, 15ml, 17,0/120mm	
PP-Röhrchen, steril, 50ml, 30,0/115mm	
Kulturflasche, Tissue Culture Flask, 75 cm <sup>2</sup> , non-pyrogenic, non-cytotoxic	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitze 10µl, farblos	
Combitips Advanced® 2,5ml	Th. Geyer GmbH & Co. KG, 53340 Meckenheim, Deutschland
Ampuwa® Spüllösung 1000ml Plastipur	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland

*Tabelle 6: Sonstige Materialien*

## 2.2 Methoden

### Probenentnahme vom Patienten - maligne Ergüsse

Die in dieser Arbeit untersuchten extrazellulären Vesikel wurden aus malignen Ergüssen (Aszites) von Patienten mit einem Karzinom isoliert. Hier wurde das Material von drei Patienten mit jeweils metastasiertem Kolon-Karzinom, metastasiertem Mamma-Karzinom und kleinzelligem Lungenkarzinom verwendet (Tab. 7). Für diese Arbeit relevant ist, dass eine Peritonealkarzinose einen malignen Aszites hervorrufen kann (4). Es ist bekannt, dass das Vorhandensein von malignem Aszites die Prognose verschlechtert und das Überleben erheblich verkürzt (171, 172).

Das Arbeiten mit anonymisiertem biologischem Patientenmaterial (Restmaterial) wurde durch die Ethikkommission der Universität zu Lübeck (AZ 11-206, 29.04.2013, siehe Anhang) genehmigt.

<b>Ergussnummer</b>	<b>Alter des/der Patient/in</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Karzinom-Art</b>
575	63	m	Kleinzelliges Lungenkarzinom
599	79	w	Mammakarzinom
612	95	w	Kolonkarzinom

*Tabelle 7: Übersicht der Ergüsse*

### Aufreinigung der malignen Ergüsse – EV-Isolierung

Um die EV von Zellen und großen zellulären Bestandteilen zu trennen, wurden die Ergüsse nach Entnahme bei -80°C eingefroren, was keine Auswirkungen auf MV hat (173). Vor weiterer Verwendung wurden die Proben zwei Mal bei 2.500 xg für 15 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieses Schema wurde von der *International Society on Thrombosis and Haemostasis* 2010 zur Bearbeitung von MV enthaltenden Medien empfohlen (58, 173-175). Die durch diese Zentrifugationsschritte erhaltene Präparation wird in dieser Arbeit als *low speed extracellular vesicles* (lsEV) bezeichnet. Um die Spezifität der vorgenommenen Messungen zu erhöhen, wurde eine Vorbearbeitung der Ergüsse nach Gieseler et al. (176) vorgenommen. Hier wurden über magnetische, 50 nm große, mit Annexin-V bestückte Kügelchen, sogenannte *magnetic beads*, MV durch die

hochspezifische Bindung zwischen Annexin-5 und Phosphatidylserin, welches auf der Oberfläche von MV lokalisiert ist, gebunden. Nach drei Waschgängen mit einem vom Hersteller mitgelieferten Waschpuffer wurden die verbleibenden *magnetic beads* mit den daran gebundenen MV durch kurze Zentrifugation (Aufzentrifugation auf 200 xg) isoliert. Die hieraus entstandene Präparation wird hier *captured extracellular vesicles* (capEV) genannt, da im Gegensatz zu MV, eine Bindung an Annexin-V durch Exosomen nur begrenzt stattfindet (177). Um eine weitere Trennung von MV von Exosomen zu erreichen, wurden lsEV bei 10.000 xg für 30 Minuten bei 4°C ultrazentrifugiert (178). Im Gegensatz zu den lsEV werden ultrazentrifugierte EV in dieser Arbeit als *high speed extracellular vesicles* (hsEV) bezeichnet (Tab. 8).

<b>Abkürzung</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Methode</b>	<b>Konsequenz</b>
<b>lsEV</b>	Extrazelluläre Vesikel nach <i>low speed</i> Zentrifugation von malignen Ergüssen	Gewonnener Überstand nach zwei aufeinanderfolgenden Zentrifugationsschritten mit 2.500 xg (58, 173- 175)	Entfernung von Zellen, großen Zellfragmenten und einem großen Anteil der apoptotischen Körperchen
<b>capEV</b>	Extrazelluläre Vesikel nach <i>low speed</i> Zentrifugation von malignen Ergüssen und Aufreinigung mit <i>magnetic beads</i>	Gewonnener Überstand nach zwei aufeinanderfolgenden Zentrifugationsschritten mit 2.500 xg (58, 173- 175) und Aufreinigung nach Gieseler et al. (176)	Zusätzliche Aufreinigung nach PS- Bindungskapazität
<b>hsEV</b>	Extrazelluläre Vesikel nach <i>high speed</i> Zentrifugation von malignen Ergüssen	Gewonnener zellulärer Rest nach <i>low speed</i> Zentrifugation und zusätzlicher Zentrifugation bei 10.000 xg (178)	Entfernung löslicher Faktoren und kleiner Vesikel (<0,5µm) inklusive Exosomen

Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Abkürzungen und zugehöriger Methoden

## 2.2.1 Zellkultur

Die in einem Teil der Versuche verwendeten Zellen entstammen der Zellreihe Colo357. Dies sind Epithelzellen aus einem metastasierten, pankreatischen, humanen Adenokarzinom. Diese Zelllinie lässt sich sehr lange in Kultur halten und hat eine Verdopplungszeit von etwa 21 Stunden (179).

Das Medium, welches als Nährsubstanz zur Zellkultivierung verwendet wurde, bestand aus vier Komponenten, welche in der 500 ml Flasche Lorza RPMI 1640 zusammengeführt wurden. Zu 500 ml Medium wurden 50 ml fetales Kälberserum, 5 ml Natrium-Pyruvat und 5 ml Penizillin-Streptomycin-Glutamin hinzugefügt. Aufbewahrt wurde diese Lösung bei 4°C. Vor der Verwendung in der Zellzucht wurde das Nährmedium auf Raumtemperatur mittels eines Wasserbades, was auf 37°C eingestellt war, erwärmt.

### 2.2.1.1 Umsetzen der Zellen – Zellen passagieren

Die in dieser Arbeit verwendete Zellreihe Colo357 wurde in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen kultiviert. Hierzu wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 80% in eine neue Kulturflasche überführt, um Platz- und Nährstoffmangel vorzubeugen. Die Aufbewahrung der Zellen bedarf eines feuchten Milieus bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank.

1. Medium und TE (Trypsin-EDTA) auf Raumtemperatur erwärmen
2. Medium mit Pasteurpipette aus den Kulturflaschen absaugen. Um Beschädigung des Nährbodens zu vermeiden, wurden die Kulturflaschen quer gehalten, sodass sich das Medium an einer Kante sammelte
3. 10 ml Trypsin-EDTA wurde in die Kulturflasche hinzugegeben und diese in den Brutschrank gestellt bis die Flüssigkeit in der Flasche milchig wurde (ca. 10 Minuten)
4. In der Wartezeit wurden zwei neue Kulturflaschen beschriftet (Zelltyp, Datum)
5. Jeweils 18 ml Medium wurden in die neuen Kulturflaschen gefüllt
6. Die Kulturflasche mit Trypsin-EDTA wurde aus dem Brutschrank entnommen und anschließend sanft mit dem Boden der Zellkulturflasche gegen die Handfläche geklopft, um das Lösen der Zellen zu beschleunigen
7. 4 ml Medium wurden in die Kulturflasche gefüllt, um die Reaktion des Trypsins zu stoppen
8. Den Inhalt der Kulturflasche wurde in ein 50 ml Röhrchen umpipettiert



9. Zentrifugation dieses Röhrchens bei 1300 rpm für 5 Minuten (Entstehung eines Zellpellets am Boden des Röhrchens)
10. Nach Zentrifugation wurde der Überstand mit einer Pasteurpipette abgesaugt, ohne das Zellpellet zu zerstören
11. 10 ml Medium wurden zum Zellpellet hinzugegeben und das Pellet darin resuspendiert
12. Je nach Größe des Zellpellet wurden 0,5-3 ml aus der Suspension in die neue Kulturflasche pipettiert. Das Ziel war eine Verdünnung des Zellbestandes in einer neuen Zellkulturflasche auf ein Drittel der ursprünglichen Zellzahl.

## 2.2.2 Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) – Durchflusszytometrie

### 2.2.2.1 Durchflusszytometrie - Allgemeines

Die Durchflusszytometrie dient der Identifizierung und Differenzierung von diversen Blutbestandteilen. Dies geschieht durch Bestrahlung der Proben mit Lasern verschiedener Wellenlängen (Rot-638nm, Blau-488nm, Violett-405nm; Tab. 9), wobei jede Zelle bzw. jedes Zellfragment einzeln untersucht wird. Je nach Beschaffenheit der Zellen oder Zellbestandteile werden die Strahlen ganz oder teilweise reflektiert oder resorbiert. Die Auswertung des hieraus reflektierten Lichts wird an für die Laser spezifischen Detektoren durchgeführt. Zusätzlich können Antikörper hinzugegeben werden, welche eine definierte Fluoreszenz emittieren. Für jeden der drei Laser gibt es eine Bandbreite von Fluoreszenzmarkierten Antikörpern.

<i>Laser</i>	<i>Wellenlänge (nm)</i>	<i>Fluoreszenzkanäle</i>
<i>Blau</i>	488	<i>FS, SS, FL-1 bis 5</i>
<i>Rot</i>	638	<i>FL-6 bis 8</i>
<i>Violett</i>	405	<i>FL-9 und 10</i>

*Tabelle 9: FACS-Laser und dazugehörige Wellenlänge und Fluoreszenzkanäle; (180)*

Die erhaltenen Messwerte können in der folgenden Auswertung nach drei Kategorien interpretiert werden (Abb. 5):

1. *Forward scatter* (FS):
  - a. Entspricht der Größe eines Teilchens
  - b. Hier wird der Laserstrahl in einem relativ kleinen Winkel reflektiert
2. *Sideward scatter* (SS):
  - a. Entspricht der Granularität eines Teilchens
  - b. Hier wird der Laserstrahl in einem 90°-Winkel reflektiert
3. Fluoreszenz: Durch gebundene Antikörper hervorgerufen (180)

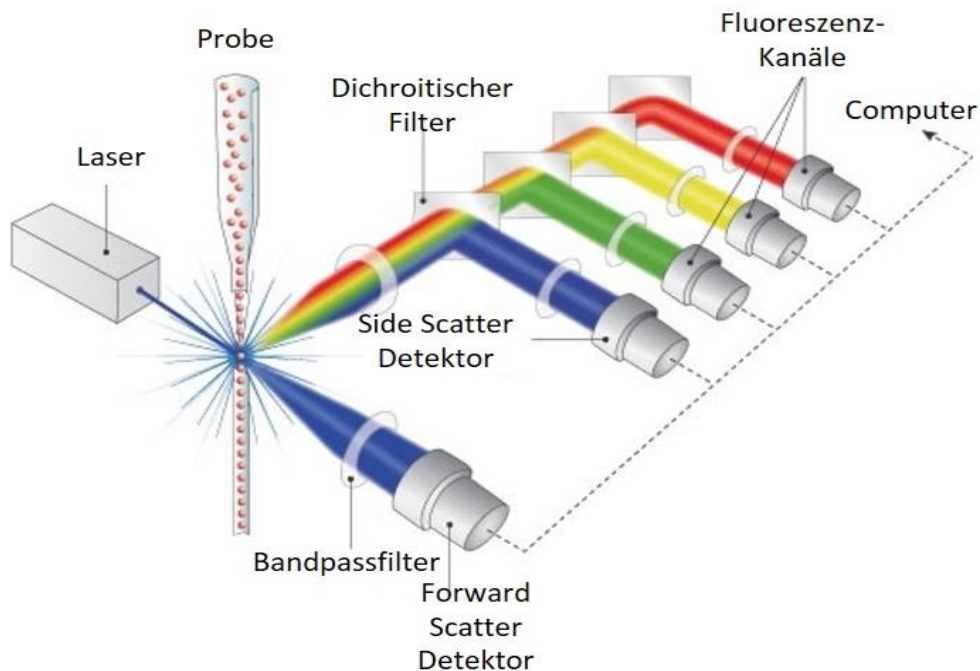


Abbildung 5: Funktionsweise eines Durchflusszytometers; Modifiziert nach (181); ein untersuchtes Partikel reflektiert bestimmte Wellen des Lasers. Diese Strahlung wird von den zugehörigen Kanälen aufgegriffen und analysiert

Messwerte werden im Durchflusszytometer gewonnen, indem ein Laser definierter Wellenlänge auf ein Partikel fällt und je nach Beschaffenheit des Partikels resorbiert und reflektiert wird. Die Probe wird hierzu durch eine Säule geleitet, welche möglichst nur ein Partikel zur Messung zur Verfügung stellt. Die reflektierte Strahlung wird je nach ihrer Wellenlänge in definierten Fluoreszenz-Kanälen detektiert und die gesammelte Information gebündelt analysiert (Abb. 5).

Unsere Forschung beschäftigt sich mit von Tumorzellen abgeschiedenen MV. Diese MV zeigen folgende Charakteristika: (I) sie sind zwischen 0,1  $\mu\text{m}$  und 1  $\mu\text{m}$  groß, (II) sie präsentieren PS an ihrer Membranoberfläche und (III) weisen Antigene ihrer Ursprungszelle auf (58). Zwei dieser Eigenschaften haben wir zur Filterung verwendet, um sicher zu stellen, dass auch wirklich MV und nicht sonstige Vesikel oder Membranbestandteile in unseren Messungen untersucht wurden. Der erste Filter stellte das PS dar, welches bei der Isolierung mittels *magnetic beads* verwendet wurde (176). Der zweite Filter war die Größe der MV, welche bei der Messung über definierte Bereiche, auch *gates* genannt, begrenzt wurde.

Die letzte Instanz unserer Messung fokussierte sich auf die Beantwortung der Frage, ob die von uns isolierten MV TF auf ihrer Oberfläche tragen. Hierzu wurde ein Fluoreszenzfilter für die Fluoreszenz von Fluorescein Isothiocyanat (FITC) verwendet, was mit einem Antikörper gegen TF gekoppelt ist.

Das erste von uns verwendete Gerät war ein NAVIOS-Durchflusszytometer von Beckman Coulter Inc. Dieses Durchflusszytometer wurde zur Zählung und Fluoreszenzmarkierung verwendet und Teilchen bis zu einer Größe von 0,404  $\mu\text{m}$  wurden untersucht (180).

Das zweite verwendete Durchflusszytometer war ein CytoFLEX Durchflusszytometer von Beckman Coulter Inc. Mit diesem Gerät konnten wir durch eine spezielle Schaltung und hohe Auflösung Teilchen  $<0,3 \mu\text{m}$  (SSC, *side scatter*) bzw.  $<0,2 \mu\text{m}$  (VSSC, *violet side scatter*) wahrnehmen (182). Dieses Gerät wurde zur genauen Identifikation der einzelnen Subpopulationen, welche im Überbegriff EV inbegriffen sind, verwendet.

#### 2.2.2.2 Probenvorbereitung

Die Ergüsse wurden, wie oben beschrieben, innerhalb von zwei Stunden nach Abnahme zentrifugiert und anschließend in 1 ml Eppendorfgefäßen bei -80°C eingefroren.

#### NAVIOS-Durchflusszytometer

Parallel zur Isolierung der EV aus den Ergüssen nach Gieseler et al. (176) (capEV) wurde das 1,5-fache der benötigte Antikörpermenge 10 Minuten lang bei 4°C mit 15.000 xg zentrifugiert. Dies führte dazu, dass sich im Aufbewahrungsbehältnis gebildete Antikörperkomplexe absetzen, welche sonst als Artefakte die FACS-Messung stören könnten.

Anschließend wurde folgender Ansatz pipettiert:

30 µl Probe + 5 µl Antikörper + 5 µl PBS

Dieser Ansatz inkubierte für 20 Minuten bei 4°C auf der Schüttelplatte bei leichter Agitation. Auf die 5 µl Antikörper sowie die leichte Agitation kann bei reiner Zählung ohne Auswertung von Fluoreszenz verzichtet werden.

Kurz vor der Messung wurden 150 µl PBS und 30 µl *cytcount* hinzugefügt.

*Cytocount* ist eine Lösung, welche eine definierte Anzahl von 5,2 µm großen, fluoreszierenden Kügelchen enthält. Durch Zugabe eines vom Hersteller je nach Charge vorgegebenen Volumens zum Versuchsansatz und Einstellung des sogenannten CAL (Kalibrierungs)-Faktors im Messprogramm, konnte die NAVIOS-Software genau berechnen, wie viele Partikel pro ml untersucht wurden.

Um eine gute Verteilung der Partikel in der Lösung zu erhalten und eine Ablagerung dieser an der Röhrchenwand zu vermeiden, wurden die Ansätze vor der Messung 1 Minute lang auf einem Vortexmischer geschüttelt.

### CytoFLEX-Durchflusszytometer

Für diese Versuchsreihe wurden 33 ml Erguss durch zweimalige, 15-minütige Zentrifugation bei 2.500 xg bei 4°C aufbereitet (lsEV). Vom Überstand wurden drei Mal 5 ml abpipettiert und in *high-speed*-Röhrchen gegeben. Diese wurden 30 Minuten lang bei 10.000 xg und 4°C zentrifugiert und anschließend der Überstand abpipettiert sowie das entstandene Pellet in 300 µl Lösepuffer (MACS, Annexin V MicroBead Kit, Miltenyi Biotech) gelöst (hsEV). Zur CytoFLEX-Analyse wurden 200 µl und für die MP-TF-ELISAs die restlichen 100 µl der Ansätze verwendet. Die Methode zur *high speed*-Zentrifugation wurde durch Annika Freund in einer anderen Arbeitsgruppe (Prof. Gieseler, Universität zu Lübeck) im Rahmen einer medizinischen Dissertation entwickelt (Publikation bei der Zeitschrift "*Cancers*" eingereicht).

#### 2.2.2.3 Geräteeinstellung

Um das Gerät auf unsere Messbereiche einzustellen, wurde ein Megamix (BioCytex, Marseille, Frankreich) verwendet. Dieser bestand aus einer Lösung mit Kügelchen, sogenannten *beads*, definierter Größe (0,5 µm, 0,9 µm, 3,0 µm). Mit Hilfe dieser *beads* und der mitgelieferten Anleitung (183) wurde das Gerät genau auf den entsprechenden Messbereich tariert.

Zusätzlich zu den durch die Megamix-Anleitung vorgegebenen Fenstern (*plots*), welche unter anderem ein MV-Fenster beinhalteten, wurden noch weitere von uns hinzugefügt. Die wichtigsten zwei Plots waren Histogramm-Plots. Sie beschreiben über die Fluoreszenz die Anwesenheit von gemessenen Partikeln, die als Anzahl (*count*) angegeben wurden. Sie unterschieden sich in der betrachteten Informationsmenge. Das erste Fenster zeigt alle gemessenen *events*, das zweite Fenster nur die *events*, welche nach Größe schon im MV-*Gate* eines anderen *plots* selektiert wurden.

#### 2.2.2.4 Messung

Die Messung verlief in zwei Schritten. Zuerst wurde eine Negativprobe betrachtet. Diese bestand nur aus der vorbereiteten Probe sowie PBS und beschränkte das in den folgenden Messungen verwendete Antikörper (+)-*Gate*, indem die Autofluoreszenz der in den Proben vorhandenen Partikel ausgeschlossen wurde. Als nächstes wurde die Probe mit Antikörpern gemessen.

### 2.2.2.5 Analyse der Ergebnisse

Die gewonnenen Ergebnisse wurden mittels Kaluza® Flow Analysis Software (Beckman Coulter Inc.) zur bildlichen Darstellung bearbeitet. Die statistischen Auswertungen sowie die Mittelwert-, Standardabweichung- und p-Wert-Berechnungen wurden mit Microsoft Excel Professional 2013 vorgenommen.

### 2.2.3 Enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA)

Dieses Verfahren wurde in dieser Arbeit verwendet, um in einem Versuchsansatz spezifisch TFPI und TF-Aktivität zu identifizieren.

Die Basis des ELISA ist die Mikrotiterplatte, welche meist 96 Vertiefungen, sogenannte *wells*, enthält. Diese beschichteten *wells* werden als solide Phase bezeichnet. Sie dienen zur Immobilisierung des untersuchten Antigens oder Antikörpers. Nach Zugabe der zu untersuchenden Probe und einer definierten Bindungszeit, werden die *wells* gewaschen. Dies dient zur Entfernung der Bestandteile der Probe, welche unbrauchbar für diesen Versuch waren. Um das Vorhandensein eines Antikörpers oder Antigens messen zu können, werden Enzym-konjugierte Antikörper verwendet. Der letzte Schritt besteht darin, ein für das Enzym spezifisches Substrat, Meerrettich-Peroxidase (HRP) oder Alkalische Phosphatase (AP), hinzuzufügen, dessen darauffolgende Umsetzung einen messbaren Farbumschlag bedingt. Dieser Farbumschlag kann photometrisch gemessen und in Relation zu einer Standardreihe analysiert werden. Die Messung folgt dem Lambert-Beerschen Gesetz:

$$E_{\lambda} = \lg \left( \frac{I_0}{I_1} \right) = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$$

$E_{\lambda}$  : Extinktion des Materials für das Licht der Wellenlänge  $\lambda$

$I_0$  : Intensität des einfallenden Lichts

$I_1$  : Intensität des transmittierten Lichts

$\varepsilon_{\lambda}$  : Dekadischer Extinktionskoeffizient

$c$  : Konzentration der absorbierenden Substanz in der Flüssigkeit

$d$  : Schichtdicke des durchstrahlten Körpers

### 2.2.3.1 Imubind Total TFPI ELISA

Die Versuche wurden entsprechend der Anleitung von American Diagnostica GmbH durchgeführt.

Der Boden der Mikrotiterplattenvertiefungen war mit einem *capture antibody* bestückt, welcher sehr spezifisch TFPI, alleine vorliegend oder im Komplex, bindet. Hierdurch wurde TFPI immobilisiert. Die Spezifität wurde mittels Western Blot-Analyse vom Hersteller garantiert. Das immobilisierte TFPI wurde anschließend von einem biotinylierten, monoklonalen Antikörper, dem *detection antibody*, gebunden, welcher für die Kunitz-1-Domäne des TFPI spezifisch war. Über die Kunitz-1-Domäne wird normalerweise der TF/FVIIa-Komplex gebunden. Um den entscheidenden enzymatischen Komplex zu vervollständigen, hat an den monoklonalen Antikörper noch eine mit Streptavidin konjugierte Meerrettich-Peroxidase, das Enzym-Konjugat, gebunden. Das anschließend hinzugefügte TMB (Tetramethylbenzidin)-Substrat führte zu einer Blaufärbung, welche nach Zugabe von Schwefelsäure nach Gelb umschlug. Das Resultat wurde bei 450 nm photometrisch gemessen.

Um eine statistisch signifikante Auswertung der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden jeweils mindestens vier Messungen durchgeführt. Des Weiteren wurde eruiert, welche Tinzaparinkonzentration die höchste Potenz zur TFPI-Produktionsinduktion aufwies. Hierzu wurden die Konzentrationen 0,4 IU/ml, 0,8 IU/ml und 2 IU/ml verwendet. Die verwendete Zellzahl pro Versuchsansatz betrug  $1 \times 10^6$  Zellen.

Die Vorbereitung für den ELISA nahm zwei Tage in Anspruch. An Tag 1 wurden die Colo357-Zellen aus einer 20 ml Zellkulturflasche gewonnen. Nachdem die Zellen in einem 50 ml PP-Röhrchen zu einem Pellet zentrifugiert und darauffolgend resuspendiert wurden, wurden sie in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Es wurde der Durchschnitt der Zellzählungen aus den vier Quadranten verwertet. Diese Zahl multipliziert mit  $10^5$  entspricht der Zellzahl in 1 ml. Anschließend musste das aus den 50 ml-PP-Röhrchen zu entnehmende Volumen auf  $1 \times 10^6$  Zellen zurückgerechnet werden. Das errechnete Volumen  $x$  aus der Zellsuspension wurde anschließend mit RPMI-Medium in einem Gesamtvolumen von 2 ml in die 6 wells pro Platte ausgesät und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> über Nacht kultiviert. Vor dem Fortfahren des Versuches wurde sichergestellt, dass sich ein homogener Zellrasen gebildet hat. An Tag 2 wurden die Tinzaparin-Verdünnungen angesetzt und 2 ml den Versuchsansätzen nach Entnahme des alten Nährmediums zugegeben.

Insgesamt wurden vier Ansätze in diesem Versuch verwendet. Der erste Ansatz diente der Kontrolle und bestand aus RPMI-Medium. Um die erwähnten Konzentrationen in 2 ml Nährlösung mit Tinzaparin aus einer Ausgangslösung von 20.000 IU/ml Tinzaparin zu erreichen, mussten folgende drei Ansätze vorbereitet werden.

1. 2 IU/ml : 1,5 µl Tinzaparin (20.000 IU/ml) + 14.998,5 µl RPMI-Medium
2. 0,8 IU/ml : 0,5 µl Tinzaparin (20.000 IU/ml) + 12.499,5 µl RPMI-Medium
3. 0,4 IU/ml : 3 ml Tinzaparin (2 IU/ml) + 12 ml RPMI-Medium

Beispielrechnung:

$$c_{\text{Fläschchen}} = 20.000 \text{ IU/ml};$$

$$\text{gewollte Endkonzentration } c_{\text{Kulturflasche}} = 2 \text{ IU/ml};$$

$$\text{Endvolumen } V_{\text{Kulturflasche}} = 15 \text{ ml}$$

$$n_{\text{Kulturflasche}} = c_{\text{Kulturflasche}} \times V_{\text{Kulturflasche}} = 2 \text{ IU/ml} \times 15 \text{ ml} = 30 \text{ IU}$$

$$V_{\text{zu entnehmen}} = n_{\text{Kulturflasche}} / c_{\text{Fläschchen}} = 30 \text{ IU} / 20.000 \text{ IU/ml} = 0,0015 \text{ ml} = 1,5 \mu\text{l}$$

$$c = \text{Konzentration (IU/ml)}; n = \text{Stoffmenge (Mol)}; V = \text{Volumen (ml)}$$

Nach Zugabe des Tinzaparin wurden zu fünf Zeitpunkten ( $t=0\text{h}$ ,  $t=2\text{h}$ ,  $t=4\text{h}$ ,  $t=6\text{h}$ ,  $t=8\text{h}$ ) die Überstände der Versuchsansätze (2 ml) abgenommen und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Bei der Durchführung des ELISA wurde darauf geachtet, dass nur die Reagenzien vorbereitet bzw. gelöst wurden, welche an demjenigen Tag auch unmittelbar verwendet wurden.

Tag 1:

An Tag 1 wurden die Mikrotiterplatte, Standards, TFPI Referenzplasma und die Proben nach Herstellervorgaben vorbereitet.

Zur Vorbereitung der Standards musste zu Beginn das *TFPI depleted plasma*, welches in gefriergetrocknetem Zustand vorlag, in 0,5 ml kaltem destillierten Wasser gelöst werden. Anschließend musste es für 1 Minute auf Eis gelagert werden. Um eine vollständige Lösung zu erreichen, wurde das Fläschchen leicht geschüttelt. Danach musste ein 5%-iger Ansatz



der entstandenen Lösung vorbereitet werden. Dies wurde erreicht, indem 170 µl der vorhandenen Lösung in einem 50 ml Röhrchen mit 3230 µl *sample buffer* vermischt wurden. Dieser Ansatz wurde für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde der TFPI Standard hergestellt, indem dieser in 2 ml 5%-igem *TFPI depleted plasma* gelöst wurde. Der Ansatz hatte eine Standardkonzentration von 5 ng/ml. Dies repräsentierte den Standard mit der höchsten Konzentration. Zur Vorbereitung der restlichen Standards wurden vier 1 ml Eppendorfgefäße jeweils mit 2,5 ng/ml, 1,25 ng/ml, 0,625 ng/ml und 0,312 ng/ml beschriftet. In jedes Gefäß wurde 0,5 ml des 5%-igen *TFPI depleted plasma* pipettiert. Als Nächstes wurden 0,5 ml des 5 ng/ml Standards in das Eppendorfgefäß mit der Aufschrift 2,5 ng/ml pipettiert. Dieses wurde verschlossen und gut gemischt. Dann wurde aus diesem Gefäß 0,5 ml entnommen und dem Eppendorfgefäß mit der Aufschrift 1,25 ng/ml zugeführt. Dies wurde für die Gefäße mit der Aufschrift 0,625 ng/ml und 0,312 ng/ml wiederholt. Der sechste Standard bestand aus 5%-igem *TFPI depleted plasma*.

Das TFPI Referenzplasma lag in gefriergetrocknetem Zustand vor. Vor Verwendung musste es mit 1 ml kaltem destilliertem Wasser gelöst und 2 Minuten inkubiert werden.

Die verwendeten Proben wurden entgegen der Herstellerempfehlungen, auf Grund vermutet niedriger Messwerte, unverdünnt verwendet.

Das Pipettieren verlief nach folgendem Schema:

1. Zwei *wells* wurden frei gelassen und als *blank* verwendet
2. Sechs Standards mit aufsteigender Konzentration
3. Referenzplasma
4. Proben

Es wurden jeweils 100 µl in die *wells* pipettiert. Die Standards sowie das Referenzplasma wurden in jeweils 2 *wells* pipettiert und die Proben wurden in vierfacher Ausführung hinzugegeben (Tab. 10).

Beispiel-Pipettierschema:

blank	blank	Probe 1; t=0h	Probe 1; t=0h	Probe 1; t=8h	Probe 1; t=8h
0,000 ng/ml	0,000 ng/ml	Probe 1; t=0h	Probe 1; t=0h	Probe 1; t=8h	Probe 1; t=8h
0,312 ng/ml	0,312 ng/ml	Probe 1; t=2h	Probe 1; t=2h	Probe 2; t=0h	Probe 2; t=0h
0,625 ng/ml	0,625 ng/ml	Probe 1; t=2h	Probe 1; t=2h	Probe 2; t=0h	Probe 2; t=0h
1,25 ng/ml	1,25 ng/ml	Probe 1; t=4h	Probe 1; t=4h	Probe 2; t=2h	Probe 2; t=2h
2,5 ng/ml	2,5 ng/ml	Probe 1; t=4h	Probe 1; t=4h	Probe 2; t=2h	Probe 2; t=2h
5 ng/ml	5 ng/ml	Probe 1; t=6h	Probe 1; t=6h	Probe 2; t=4h	Probe 2; t=4h
Referenzplasma	Referenzplasma	Probe 1; t=6h	Probe 1; t=6h	Probe 2; t=4h	Probe 2; t=4h

Tabelle 10: Beispiel-Pipettierschema Imubind Total TFPI ELISA

Beim Pipettieren wurde darauf geachtet, dass der Boden der *wells* nicht berührt wurde und keine Bläschen entstanden.

Der entstandene Ansatz wurde mit einer Schutzfolie abgedeckt und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Tag 2:

An Tag 2 wurden die Reagenzien *detection antibody*, *enzyme conjugate* sowie die Waschlösung vorbereitet (Vorgang entsprechend der Herstelleranleitung).

Der *detection antibody* lag als Konzentrat (10x) vor und wurde vor Benutzung 1:10 mit *conjugate buffer* verdünnt.

Das *enzyme conjugate* lag als Konzentrat (100x) vor und zur Verdünnung wurden 100 µl Konjugat zu 10 ml *conjugate buffer* gegeben.

Die Waschlösung wurde hergestellt, indem 950 ml destilliertes Wasser zum *wash buffer* hinzugefügt wurden.

Anschließend wurden die *wells* 4 Mal mit dem *wash buffer* gewaschen. Der Waschgang wurde beendet, indem aus den *wells* durch leichtes Klopfen jeglicher Rest Waschlösung entfernt wurde.

Als Nächstes wurde in jedes *well* 100 µl *detection antibody* pipettiert und die Schutzfolie erneut aufgelegt. Der entstandene Ansatz wurde bei Raumtemperatur eine Stunde inkubiert.

Danach wurden die *wells* erneut 4 Mal gewaschen.

Im Anschluss wurden 100 µl verdünntes *enzyme conjugate* in jedes *well* pipettiert, die Schutzfolie wieder aufgelegt und bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert.

Anschließend wurden die *wells* erneut 4 Mal gewaschen und danach 100 µl Substrat-Lösung hinzugegeben, mit Schutzfolie für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bis ein Farbumschlag sichtbar wurde.

Um die Farbreaktion zu stoppen wurden 50 µl *stop solution* (Citrat-Stop-Lösung) in die *wells* pipettiert und die Intensität der Färbung photometrisch bei 450nm gemessen.

#### 2.2.3.2 MP-TF-Activity Assay

Die Versuche wurden entsprechend der Anleitung von Anlara durchgeführt.

Als Erstes wurden die *AE-MP-TF*-Lösung und die Proben in die *wells* der Mikrotiterplatte gegeben. Der Boden dieser Vertiefungen war mit einem murinen monoklonalen Antikörper bestückt, welcher spezifisch humanen TF bindet, jedoch nicht die TF-Aktivität beeinflusst. Die Bindung entstand über ein Epitop an der extrazellulären Domäne von TF. Nach einer 24-stündigen Inkubation und Waschgängen wurden FVIIa (R1) und FX (R2) hinzugegeben. Über eine TF-FVIIa-Interaktion wurde FX aktiviert. Über die Zugabe eines FX-spezifischen Substrats entstand eine gelbe Färbung, welche photometrisch bei 405 nm gemessen wurde. Die Stärke der Färbung war direkt proportional zur Menge an MP-TF in den Proben.

Tag 1:

An Tag 1 wurden die Mikrotiterplatte, *MP-TF sample diluent (SD-MP-TF)/Assay Enhancer (AE-MP-TF)*, *MP-TF Controls CI/CII*, *MP-TF Calibrator* sowie die Proben vorbereitet. Idealerweise wurden die Proben schon im Rahmen einer durchflusszytometrischen Messung vorbereitet, welche zeitlich direkt vor Verwendung im ELISA stattfand (siehe Punkt 2.2.2.2 CytoFLEX). Die *MP-TF Controls* wurden jeweils mit 2 ml *SD-MP-TF* verdünnt, um ein *control high* (16 pg/ml TF) und ein *control low* (5 pg/ml TF) zu ergeben. Der *MP-TF Calibrator* wurde mit 2 ml *SD-MP-TF* verdünnt, um eine Konzentration von 25 pg/ml TF zu repräsentieren. Des Weiteren wurden folgende Schritte durchgeführt, um 6 Verdünnungen herzustellen (Tab. 11):

MP-TF (pg/ml)	C	C:2	C:4	C:10	C:20	0
Vol. <i>Calibrator</i>	1,0ml	0,5ml	0,25ml	0,10ml	0,05ml	0ml
Vol. <i>SD-MP-TF</i>	0ml	0,5ml	0,75ml	0,90ml	0,95ml	1ml

Tabelle 11: Verdünnungsreihe *MP-TF-Activity ELISA*

Um die Versuchsreihe zu starten, wurden in die *wells* 200 µl *AE-MP-TF* gegeben und jeweils 20 µl *MP-TF Calibrator*, Probe, Kontrollen oder *SD-MP-TF* hinzugefügt. Diese Ansätze wurden über Nacht bei Raumtemperatur und unter Abdichtung inkubiert.

Tag 2:

An Tag 2 wurden die *wash solution*, R1-3 sowie die *stop-solution (citric acid)* vorbereitet. Die *wash solution* wurde 15-30 Minuten in einem Wasserbad bei 37°C erwärmt, bis alle festen Bestandteile gelöst waren. Dann wurde die 50 ml *wash solution* 1:20 mit 1.000 ml destilliertem Wasser verdünnt. R1 und R2 wurden in jeweils 1,5 ml destilliertem Wasser gelöst und anschließend für 30 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Vor Gebrauch wurde die Lösung bei 37°C für 15-30 Minuten prä-inkubiert. R3 wurde mit 3 ml destilliertem Wasser wiederhergestellt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Vor Verwendung wurde R3 bei 37°C für 30 Minuten prä-inkubiert.

Die verwendeten *wells* wurden 5 Mal mit 300 µl *wash solution* gewaschen. Um die Waschgänge zu beenden, wurden 100 µl *wash solution* in den *wells* belassen. Anschließend wurden jeweils 25 µl R1 und R2 hinzugegeben. Dieser Ansatz wurde für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach dieser Zeit wurden 50 µl R3 hinzugegeben und der Inkubationsschritt wiederholt. Abschließend wurden 50 µl *stop-solution* in die *wells* pipettiert, um die Substratreaktion zu stoppen. Nach 10 Minuten wurde die photometrische Messung bei 405nm durchgeführt.

Die gewonnenen Ergebnisse wurden mit der zuvor im CytoFLEX gemessenen *event*-Menge verrechnet, um eine Angabe in  $\text{pg}/10^6$  Partikel zu erhalten.

Um sicher zu gehen, dass die verwendeten Reagenzien nicht unwirksam waren, wurde vor der Auswertung überprüft, ob die Standardreihe korrekte Werte angenommen hatte. Dies wurde an dem  $R^2$ -Wert abgelesen. Dieser zeigte die Qualität der Standardkurve, indem er anhand eines gemessenen Zahlenwerts die Abweichung der gemessenen Standardkurve von der vorgegebenen Standardkurve angab. Dieser Wert kann eine Zahl zwischen 0 und 1 betragen, wobei 0 kein linearer Zusammenhang und 1 perfekter linearer Zusammenhang der zwei erwähnten Kurven bedeutet.

Versuche mit einem  $R^2$ -Wert kleiner 0,9 wurden wiederholt.

## 2.2.4 Migrationshemmung durch Tinzaparin und TFPI

### 2.2.4.1 Systematik des xCELLigence-Systems

Um das Migrationsvermögen der Colo357-Zellen zu untersuchen, wurde das xCELLigence RTCA DP System von Roche verwendet. Es bietet die Möglichkeit über einen längeren Zeitraum verschiedene Proben in Echtzeit auf ihre Migrationsfähigkeit zu untersuchen.

Aufgebaut ist dieses System aus zwei Kammern, welche durch eine Membran getrennt sind. Diese Membran ist ein mikroelektronisches Sensor-System. Durch Veränderung des Widerstands an den Sensorelektroden werden Rückschlüsse auf Milieu, Zellzahl, Zellmorphologie sowie Ausmaß der Zelladhäsion an der Membran gezogen. Befinden sich keine Zellen an der Membran, entspricht der dort gemessene Widerstand der der Negativkontrolle. Setzte sich bei Zugabe von Zellen eine solche auf die Membran, erhöhte sich der Widerstand spezifisch für eine Zelle. Dementsprechend verdoppelte sich dieser Widerstand, wenn sich eine zweite Zelle auf die Membran setzte bzw. erhöhte sich der Widerstand entsprechend der Menge der Zellen auf der Membran (Abb. 6).

In unserem Modell wurden Zellen in der oberen Kammer ausgesät, wanderten durch die Membran und setzten sich an deren Unterseite ab. Dadurch wurde der Widerstand der Membran erhöht, was wiederum in Echtzeit als Datenpunkt in einem Graph festgehalten wurde.

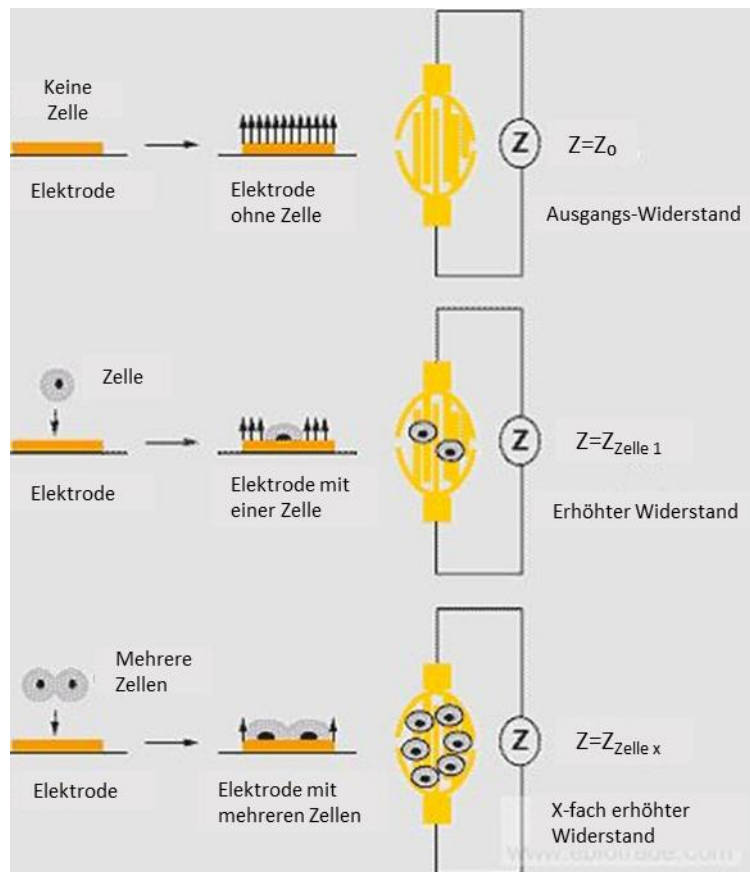


Abbildung 6: Funktionsweise des xCELLigence-Systems; modifiziert nach (184); (oben) ohne Zellen an der Membran entspricht der dort gemessene Widerstand der der Negativkontrolle; (Mitte, unten) je nach Anzahl der Zellen an der Membran erhöht sich der gemessene Widerstand entsprechend der Menge.

#### 2.2.4.2 Versuchsablauf

Für diesen Versuch benötigten die Zellen noch eine Matrix, welche es ihnen ermöglichte, sich nach ihrer Migration durch die Membran festzusetzen. Diese Matrix bestand in unserem Modell aus Kollagen. Zur Herstellung wurden 10 mg des Kollagenpulvers in 10 ml 0,1 M Essigsäure gelöst. Dieser Ansatz wurde 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf 25 ml mit sterilem PBS aufgefüllt. Dies ergab eine Endkonzentration von 20  $\mu\text{g}/50\text{ ml}$  Kollagen. Die Beschichtung der Membran wurde 2 Stunden vor Beginn der Pipettierung mit 30  $\mu\text{l}$  Kollagen pro Aussparung begonnen.

Durch mehrere unabhängige Versuche stellte sich heraus, dass durch die Inkubation der Colo357-Zellen mit Tinzaparin über 3 Stunden die besten Ergebnisse erzielt werden konnten (Ergebnisse nicht dargestellt). Die verwendete Tinzaparinkonzentration von 2 IU/ml entsprach der *plasma-peak*-Konzentration von 1,8 IU/ml (185). Diese Konzentration wurde in der Kulturflasche sowie in den entsprechenden Versuchsansätzen erzielt.

Die verwendete TFPI-Konzentration von 100 ng/ml ergab sich einerseits aus den in der Einleitung erwähnten Werten (150) und andererseits aus Migrationsassays, in denen eine Konzentrationsreihe mit TFPI-Konzentrationen von 1 ng/ml bis 500 ng/ml durchgeführt wurde.

Mit Hilfe des xCELLigence-Systems wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt. Beide Reihen bestätigten die Inhibierung der Migrationsinduktion durch MV. In der ersten Reihe wurde das NMH Tinzaparin (Leo Pharma) verwendet und in der zweiten Reihe rTFPI. Der Versuchsablauf beruhte auf der gleichen Basis, hatte jedoch spezifische Unterschiede (Tinzaparin/TFPI).

In diesen Versuchsreihen wurde eine Zellzahl von 60.000 Zellen pro *well* verwendet. Dies gelang am besten, wenn die Zellgewinnung bei einer Zellkonfluenz von 80% stattfand.

Im ersten Schritt wurde TGF $\beta$  (1:2.000) und der im jeweiligen Versuch untersuchte Faktor (Tinzaparin oder TFPI) verdünnt. Die Verdünnung von TGF $\beta$  wurde über zwei Schritte vollzogen, da beide Zwischenprodukte einzeln im Verlauf des Versuchs gebraucht wurden.

1. TGF $\beta$ 1 : 2  $\mu$ l TGF $\beta$  + 18  $\mu$ l Medium
  2. TGF $\beta$ 2 : 5  $\mu$ l TGF $\beta$ 1 + 995  $\mu$ l Medium
- Tinzaparin-Versuchsreihe
    - Tinzaparin1 : 10  $\mu$ l Tinzaparin + 990  $\mu$ l Medium
  - TFPI- Versuchsreihe
    - Stock-Solution (SS)
      - 1 ml steriles PBS in das mit 10  $\mu$ g gefüllte Fläschchen geben
      - Konzentration = 10 ng/ $\mu$ l



Im zweiten Schritt wurde ein 1 ml Ansatz hergestellt. Dieser bestand grundsätzlich aus zwei konstanten Bestandteilen und einem zusätzlichen Bestandteil (Tinzaparin oder TFPI), je nach Ansatz. Die konstanten Bestandteile waren Medium und Erguss (IsEV) in einem 1:1 Verhältnis, hier 500 µl von beidem. Zu den IsEV-beinhaltenden Ansätzen wurden noch zwei zusätzliche Ansätze vorbereitet: Negativ- und Positivkontrolle. Die Negativkontrolle enthielt Colo357-Zellen und Medium. Die Positivkontrolle bestand aus Colo357-Zellen, Medium und TGFβ2.

Von diesen Ansätzen wurden 170 µl in die untere Kammer pipettiert (Tab. 12). Anschließend wurde die obere Kammer, an welcher die Membran befestigt war, darauf aufgesetzt. Danach wurden 50 µl des verbliebenen Ansatzes in die verfügbaren Aussparungen pipettiert. Des Weiteren wurden jeweils 70 µl PBS in die äußeren Aussparungen der Kammern pipettiert, um den Ansatz vor Austrocknung in der folgenden Äquilibrierung/Anpassung der Membran bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Sättigung zu schützen. Diese betrug mindestens eine Stunde.

Beispiel-Pipettierschema (1 CIM-Plate):

Negativkontrolle	Ansatz ohne gesonderten Zusatz („pur“)
Negativkontrolle	Ansatz ohne gesonderten Zusatz („pur“)
Negativkontrolle	Ansatz ohne gesonderten Zusatz („pur“)
Negativkontrolle	Ansatz ohne gesonderten Zusatz („pur“)
Positivkontrolle	Ansatz mit spezifischem Zusatz (Zusatz mit Konzentrationsangabe)
Positivkontrolle	Ansatz mit spezifischem Zusatz (Zusatz mit Konzentrationsangabe)
Positivkontrolle	Ansatz mit spezifischem Zusatz (Zusatz mit Konzentrationsangabe)
Positivkontrolle	Ansatz mit spezifischem Zusatz (Zusatz mit Konzentrationsangabe)

Tabelle 12: Beispiel-Pipettierschema für xCELLigence-Messung

Währenddessen wurden die Zellen aus der Kulturflasche gewonnen und gezählt.

1. Absaugen des Nährmediums mit Pasteur-Pipetten
2. Hinzufügen von 10 ml Trypsin-EDTA
3. Inkubation im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Sättigung
4. Beschleunigung der Zellablösung durch Klopfen der Flasche
5. Ablösen der Zellen nach ca. 10-15 Minuten und Entstehung einer Trübung der Flüssigkeit in der Flasche
6. Stoppen der Trypsin-Wirkung durch Hinzufügen von 4 ml Medium
7. Abpipettierung dieser Lösung in ein 50 ml *flacon*
8. Zentrifugation bei 1.300 xg für 5 Minuten
9. Absaugen des Überstandes mit einer Pasteur-Pipette
10. Resuspendierung des entstandenen *pellet* mit 4-6 ml Medium
11. 4 µl dieser Suspension zu 36 µl *Trypan-Blue* geben und gut vermischen (Vortexmischer)
12. Einen Tropfen (ca. 20 µl) auf die Zählkammer geben
13. Errechnen des Anteils am nächsten Ansatz anhand der Zählung

Zellzählung und Berechnung der zu verwendenden Menge Zellsuspension:

Allgemeiner Vorgang:

1. Zählung der Zellen in den äußeren vier Quadranten der Neubauer-Zählkammer
2. Bildung eines Mittelwerts (Teilung durch die Anzahl der verwendeten Quadranten)
  - ⇒ Multiplikation mit 10<sup>5</sup> repräsentiert die Anzahl der Zellen in 1 ml Suspension
3. Berechnung des zu entnehmenden Volumens aus der Zellsuspension, um eine Zellzahl von 6x10<sup>5</sup> in 1 ml zu erreichen
4. Berechnung des Volumens x für eine 500 µl Lösung
5. Berechnung der restlichen Komponenten des weiterverwendeten Ansatzes x µl Zellsuspension

250 µl            Erguss (immer 50% des entstehenden Ansatzes)

y µl            Medium (y = 500 µl – 250 µl Erguss – x µl Zellsuspension)

Beispielrechnung:

1. Gezählte Zellen in 4 Quadranten: 66
2. Mittelwert:  $\frac{66}{4} = 16,5 (*10^5)$
3. Volumen Zellsuspension auf 1 ml berechnet:  $\frac{6*10^5}{16,5*10^5} = 364 \mu\text{l}$
4. Volumen Zellsuspension auf 500  $\mu\text{l}$  berechnet:  $\frac{0,364}{2} = 182 \mu\text{l}$
5. Aufteilung für den 500  $\mu\text{l}$  Ansatz:
 

182 $\mu\text{l}$	Zellsuspension
250 $\mu\text{l}$	Erguss
68 $\mu\text{l}$	Medium

Nach der Zählung wurde der zweite Ansatz pipettiert. Dieser bestand aus folgenden Bestandteilen je nach Ansatz:

- Tinzaparin-Versuchsreihe
  - Ansatz ohne Tinzaparin  
250  $\mu\text{l}$  Erguss + x  $\mu\text{l}$  Zellsuspension + (500-(x+250))  $\mu\text{l}$  Medium
  - Ansatz mit Tinzaparin  
250  $\mu\text{l}$  Erguss + x  $\mu\text{l}$  Zellsuspension + (500-(x+250))  $\mu\text{l}$  Medium +  
5  $\mu\text{l}$  Tinzaparin1
- TFPI-Versuchsreihe
  - Ansatz ohne TFPI  
250  $\mu\text{l}$  Erguss + x  $\mu\text{l}$  Zellsuspension + (500-(x+250))  $\mu\text{l}$  Medium
  - Ansatz mit TFPI  
247,5  $\mu\text{l}$  Erguss + x  $\mu\text{l}$  Zellsuspension + (495-(x+247,5))  $\mu\text{l}$  Medium + 5  $\mu\text{l}$   
SS

Als Negativkontrolle wurde Medium mit Zellsuspension (die errechnete Menge Zellsuspension aus dem Ansatz ohne Zusatz von Tinzaparin oder TFPI; ,x' + (500  $\mu\text{l}$  – x)) verwendet, als Positivkontrolle die gleiche Kombination wie bei der Negativkontrolle mit zusätzlicher Zugabe von 2,5  $\mu\text{l}$  TGF $\beta$ 1 (1:2.000).

Aus diesen Ansätzen wurden nach mindestens einer Stunde Äquilibriumierung der Membran 100  $\mu\text{l}$  in die entsprechenden oberen Kammern pipettiert.

Anschließend verblieben die Platten 20 Minuten bei Raumtemperatur unter dem Abzug. In dieser Zeit wurde die Software gestartet und die benötigten Daten sowie die Messdauer und Messintervalle eingestellt.

Unsere Messungen beliefen sich auf mindestens 36 Stunden bei Messintervallen von 15 Minuten.

### 2.2.5 Statistik

Alle statistischen Berechnungen und Tabellen wurden mit Microsoft Excel 2013 (MS Office 365) bearbeitet. Zur Berechnung der Werteverteilung wurden Mittelwert und Standardabweichung verwendet. Um die statistische Signifikanz zu bestimmen, wurde der t-Test angewendet und ein  $p < 0,05$  als signifikant und  $p < 0,01$  als hochsignifikant gewertet.

Die Verwendung des t-Tests verlief mit folgenden Parametern:

- (1) gepaart, da die Proben aus der gleichen Population entnommen wurden und
- (2) einseitig, da die Fragestellung „Hemmung“ oder „keine Hemmung“ lautete.

Alle Ergebnisse zur statistischen Signifikanz wurden mit mindestens drei unabhängig durchgeführten Versuchen erhoben.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Ergebnisse der FACS-Analyse

#### 3.1.1 Nachweis von Mikrovesikeln in malignen Ergüssen

Um die Hypothesen zu untersuchen, ob MV die Migration von Tumorzellen induzieren und ob durch das NMH Tinzaparin diese Migrationsinduktion gehemmt werden kann, musste zunächst nachgewiesen werden, dass MV in den entnommenen malignen Ergüssen von Krebspatienten vorhanden sind. Dieser Nachweis wurde mittels Durchflusszytometrie durchgeführt.

MV wurden in allen malignen Ergüssen von kolorektalem (CRC, Erguss 612), Mamma- (BC, Erguss 595) und kleinzelligem Karzinom (SCLC, Erguss 575) quantitativ nachgewiesen (Abb. 7). Die Gesamtzahl der *events* belief sich auf  $15.878 \pm 1.334,9$  *events*/ $\mu$ l wobei  $13.438 \pm 1.001,4$  *events*/ $\mu$ l in das MP-Fenster fielen (n=3). Durchschnittlich befanden sich  $84,7 \pm 0,8\%$  Partikel innerhalb des MP-Fensters, bezogen auf alle gemessenen *events* (n=3).

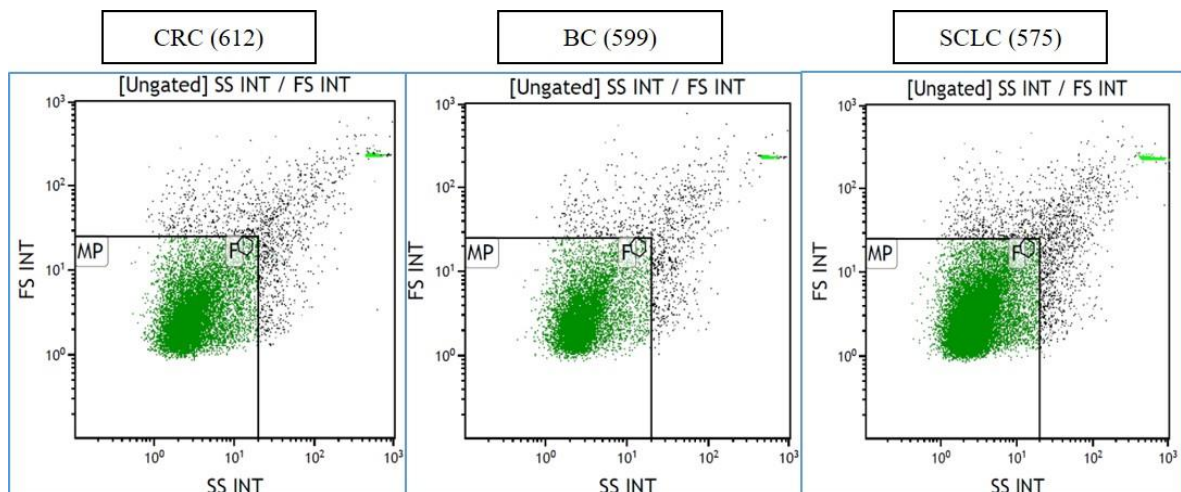


Abbildung 7: Nachweis von Mikrovesikeln (MV) in malignen Ergüssen; Dot-plot; forward-scatter (FS) über side-scatter (SS); grün, Mikrovesikel,  $0,5\mu\text{m} < \text{Mikropartikel} = \text{MV (MP)} < 0,9\mu\text{m}$ ; schwarz, Partikel  $> 0,9\mu\text{m}$ ; hellgrün, cytocount; die Darstellung dient als Repräsentation; CRC = kolorektales Karzinom; BC = Mammakarzinom; SCLC = kleinzelliges Lungenkarzinom, SS = side scatter, FS = forward scatter

### 3.1.2 Tissue Factor-Nachweis an isolierten Mikrovesikeln

Mittels Durchflusszytometrie konnte nachgewiesen werden, dass sich MV in den malignen Ergüssen befanden. Des Weiteren galt es zu detektieren, ob diese MV TF auf ihrer Oberfläche trugen. Die abgebildeten Fluoreszenz-definierten (TF-FITC) Histogramme bezogen ihre Information ausschließlich von Partikeln, welche sich im oben gezeigten MP-Fenster [MP] befanden (Abb. 7). Das AB+ betitelte *gate* definierte die TF-positiven Partikel in Abgrenzung zur Autofluoreszenz der Partikel. Die Anzahl der Antikörper-positiven Partikel belief sich auf  $12.253 \pm 1.072,8$  *events*/ $\mu$ l (n=3). Der prozentuelle Anteil der Antikörper-positiven Partikel an der durch das MP-Fenster definierten Population betrug  $91,1 \pm 1,2\%$  (n=3) (Abb. 8).

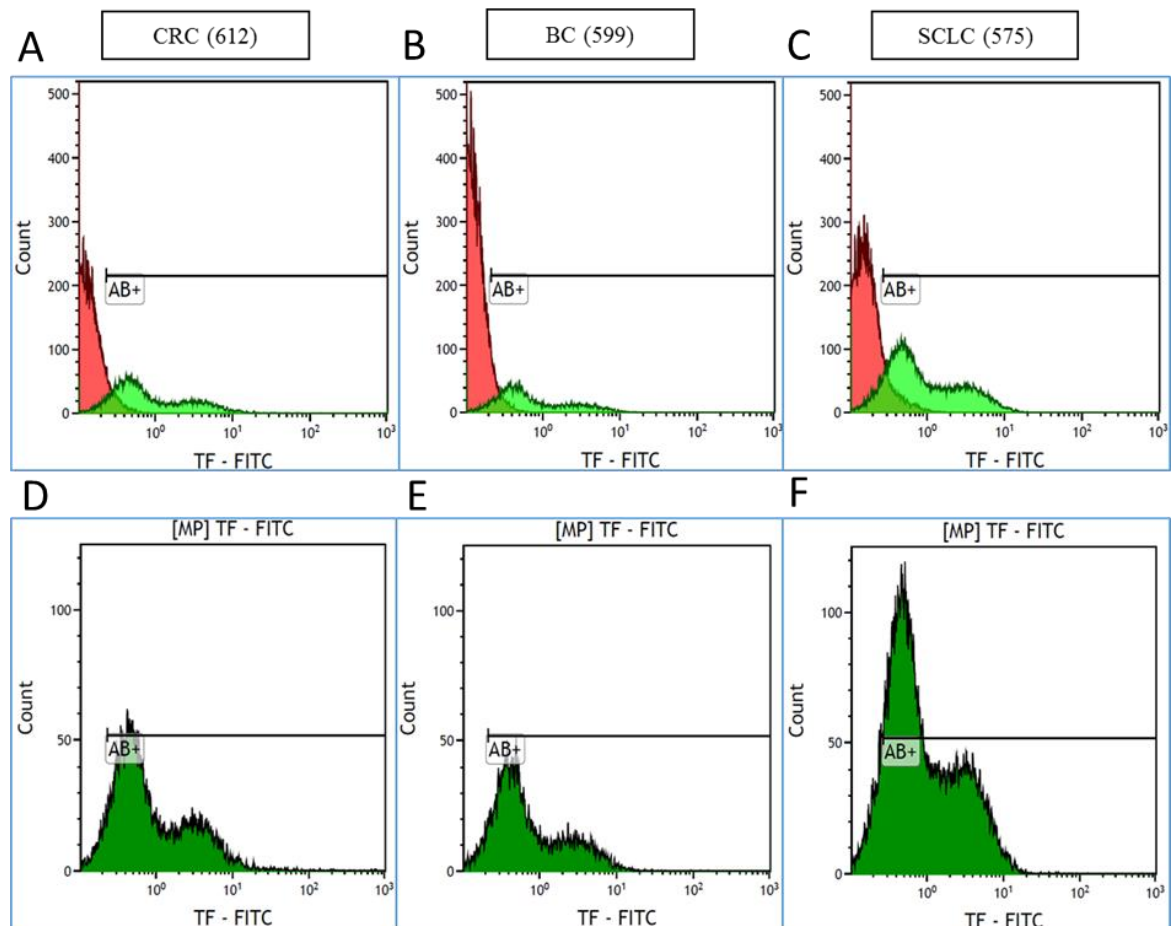


Abbildung 8: Nachweis von TF auf Mikrovesikeln (MP) in malignen Ergüssen; Histogramm; event-Zahl (Count) über Fluoreszenz (TF-FITC); (A-C) Negativproben im Vergleich zu mit Antikörper inkubierten Proben; Einstellung des AB+ Fensters an der Schnittstelle; (D-E) Nachweis von TF-tragenden Mikrovesikeln in MP-Fenster. Erläuterungen: Grün = Probe mit Antikörper; Rot = Negativprobe, CRC = kolorektales Karzinom; BC = Mammakarzinom; SCLC = kleinzelliges Lungenkarzinom; repräsentative Darstellungen

### 3.2 Identifikation und Charakterisierung von Subpopulationen durch *high speed*-Zentrifugation

Um die einzelnen MV-Populationen im Größenspektrum  $<1 \mu\text{m}$  näher zu charakterisieren, wurde nach der *low speed*-Zentrifugation eine *high speed*-Zentrifugation durchgeführt. Hier konnte ein starker Unterschied zwischen den zwei Zentrifugationsschritten detektiert werden. Nach der *high speed*-Zentrifugation konnten in dem übrig gebliebenen Pellet ca. doppelt so viele Partikel  $>0,5 \mu\text{m}$  als  $<0,5 \mu\text{m}$  gefunden werden, was den Anteil von Exosomen stark reduzierte (Abb. 9, Tab. 13).

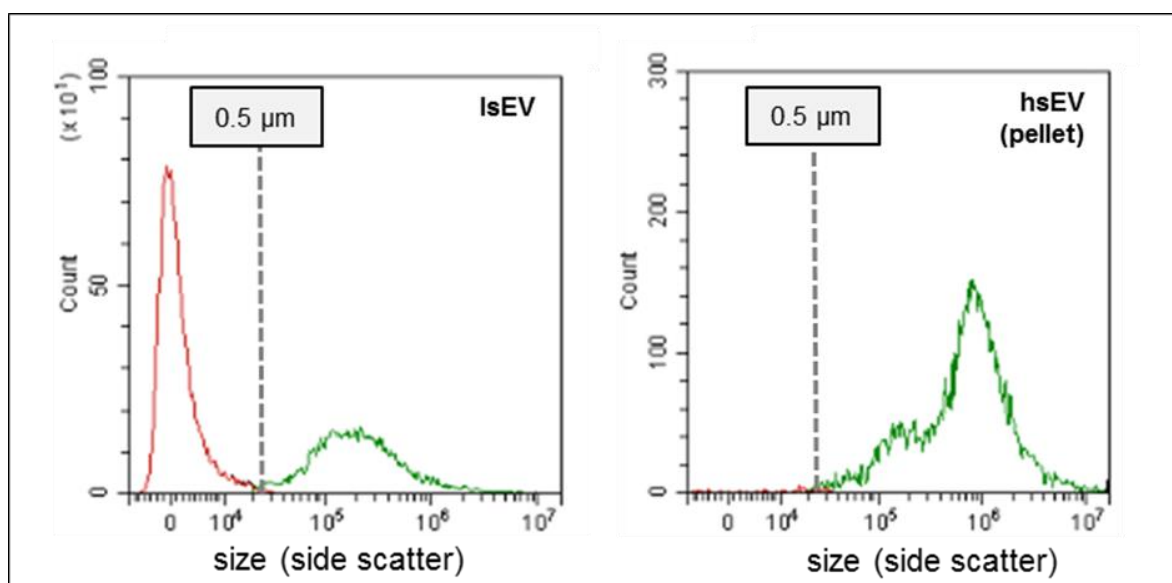


Abbildung 9: Verteilung von EV-Populationen bei *low speed*- gegenüber *high speed*-Zentrifugation mittels CytoFLEX-Messung; Histogramm; event-Zahl über side scatter; Populationen  $<0,5\mu\text{m}>$  Erläuterungen: lsEV = *low speed extracellular vesicles*; hsEV = *high speed extracellular vesicles*; pellet = beim Zentrifugieren entstandener Zellrückstand; die unterschiedliche Skalierung der y-Achse hat keine Auswirkung auf die Auswertung

	Größenspektrum	Mittelwert [EV/ $\mu\text{l}$ ]	Standardabweichung [EV/ $\mu\text{l}$ ]
lsEV	$< 0,5\mu\text{m}$	30,18	6,96
	$> 0,5\mu\text{m}$	36,88	5,76
Überstand (hsEV)	$< 0,5\mu\text{m}$	24,95	2,91
	$> 0,5\mu\text{m}$	31,24	3,02
Pellet (hsEV)	$< 0,5\mu\text{m}$	48,02	5,01
	$> 0,5\mu\text{m}$	95,91	2,49

Tabelle 13: EV-Populationen bei *low speed*- gegenüber *high speed*-Zentrifugation; accEV = *accumulated extracellular vesicles*; lsEV = *low speed extracellular vesicles*; hsEV = *high speed extracellular vesicles*

Anschließend wurden der Überstand und das gelöste Pellet nach *high speed*-Zentrifugation auf MP-TF-Aktivität getestet. Hier wurde eine signifikant höhere MP-TF-Aktivität des *pellet* von  $8,90 \pm 0,5$  pg/ $10^6$  Partikeln im Überstand gegenüber  $27,69 \pm 4,89$  pg/ $10^6$  Partikeln im *pellet* ( $p < 0,05$ ) festgestellt (Abb. 10).

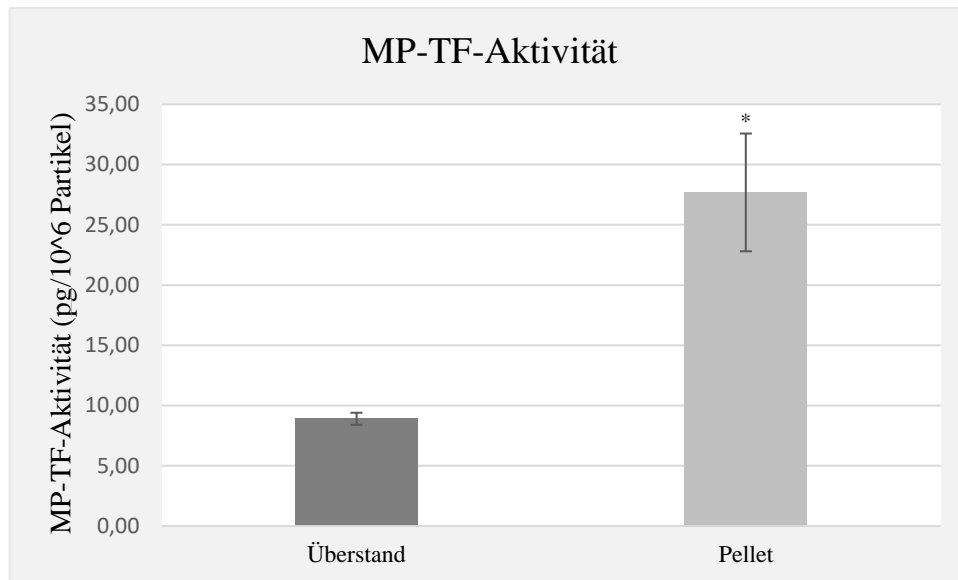


Abbildung 10: MP-TF-Activity-Assay berechnet auf  $10^6$  Partikel; Überstand gegenüber gelöstem pellet bei *high speed*-Zentrifugation;  $n=3$ ; \* entspricht  $p < 0,05$  verglichen mit dem Überstand

### 3.3 Migrationsinduktion bei Tumorzellen durch Mikrovesikel

Der nächste Schritt bestand darin, festzustellen, ob die verwendeten Ergüsse, bzw. deren MV-spezifisch aufbereitete Verarbeitungsprodukte, in der Karzinomzelllinie Colo357 Migration induzieren können.

Um dies zu testen, wurden den Ansätzen MV enthaltende maligne Ergüsse von Mamma-(BC), kolorektalem (CRC) und kleinzelligem Lungenkarzinom (SCLC) hinzugefügt. Nach 36 Stunden wurde die MV-induzierte Migrationsinduktion in Colo357-Zellen mittels Migrationsassays untersucht. Die Migrationsinduktion der Zellen erhöhte sich nach Zugabe aller malignen Ergüsse signifikant (Abb. 11). Am höchsten war die Induktion nach Gabe des malignen Ergusses aus CRC (ca. 260%), gefolgt von BC (ca. 250%) und dem SCLC (ca. 200%), verglichen mit der Kontrolle.



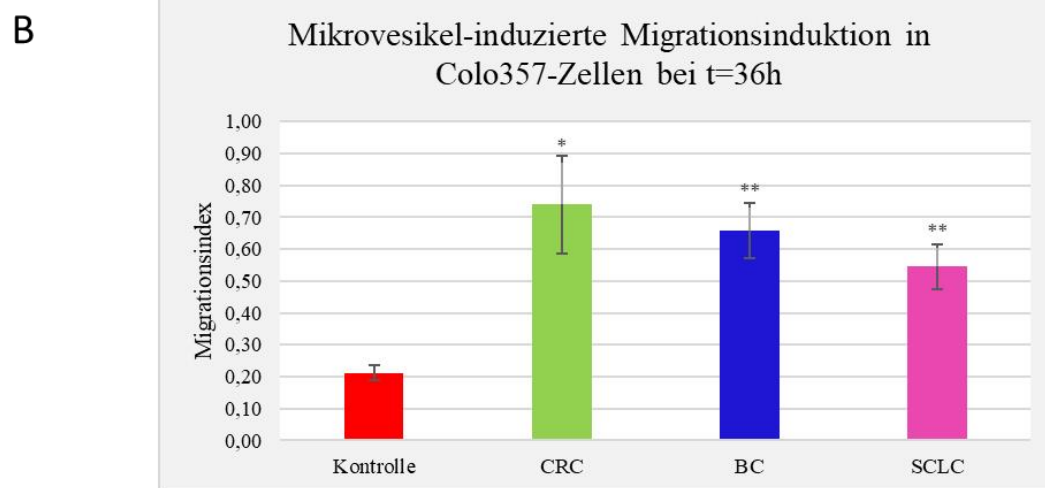
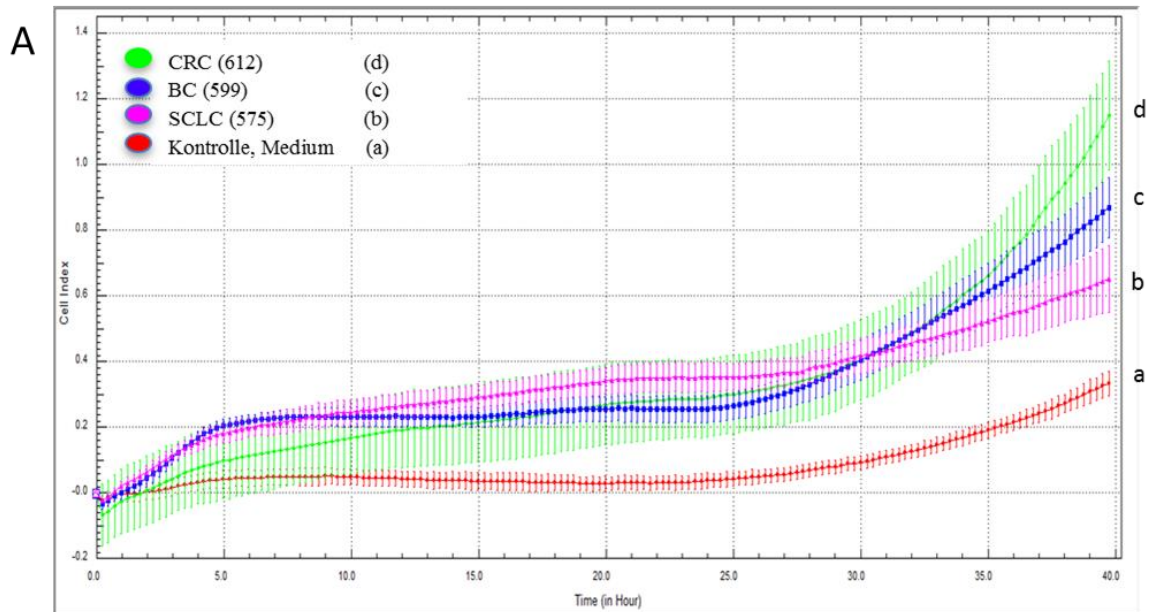


Abbildung 11: Verlauf der Migrationsinduktion in Tumorzellen durch Mikrovesikel (MV); Dargestellt ist die MV-induzierte Migrationsinduktion in Colo357-Zellen durch Zugabe von malignen Ergüssen verschiedener Tumorerkrankungen, wie CRC = kolorektalem Karzinom, BC = Mammakarzinom, SCLC = kleinzelligem Lungenkarzinom; (A): Migrationsverlauf; Migrationsindex über Zeit in Stunden; rot (a), Colo357-Zellen mit Medium (Negativkontrolle); Magenta (b), Colo357-Zellen mit SCLC (Erguss 575); Blau (c), Colo357-Zellen mit BC (Erguss 599); Grün (d), Colo357-Zellen mit CRC (Erguss 612); (B): Darstellung der Migrationsindices bei t=36h; n=3, \* entspricht  $p < 0,05$ , \*\* entspricht  $p < 0,01$  zur Kontrolle

### 3.4 Hemmung der Mikrovesikel-induzierten Zellmigration durch Tinzaparin

Es zeigte sich, dass die in malignen Ergüssen enthaltenen MV die Migration von den Karzinomzellen Colo357 signifikant erhöhten. Da die Krebszellmigration in der Tumorthherapie verhindert werden soll, um die Streuung eines Krebsgeschwürs zu verhindern, sollte getestet werden, ob das NMH Tinzaparin die Zellmigration bereits *in vitro* unterbinden kann.

Um dies zu testen, wurden die Zellen mit 2 IU/ml Tinzaparin für drei Stunden vorinkubiert und der Migrationsassay wiederholt. Die Versuche wurden über mindestens 36 Stunden aufgezeichnet und zeigen, dass die Gabe von Tinzaparin durch MV-induzierte Zellmigration von allen malignen Ergüssen CRC (ca. -70%), BC (ca. -64%) und SCLC (ca. -37%) signifikant reduzierte (Abb. 12).

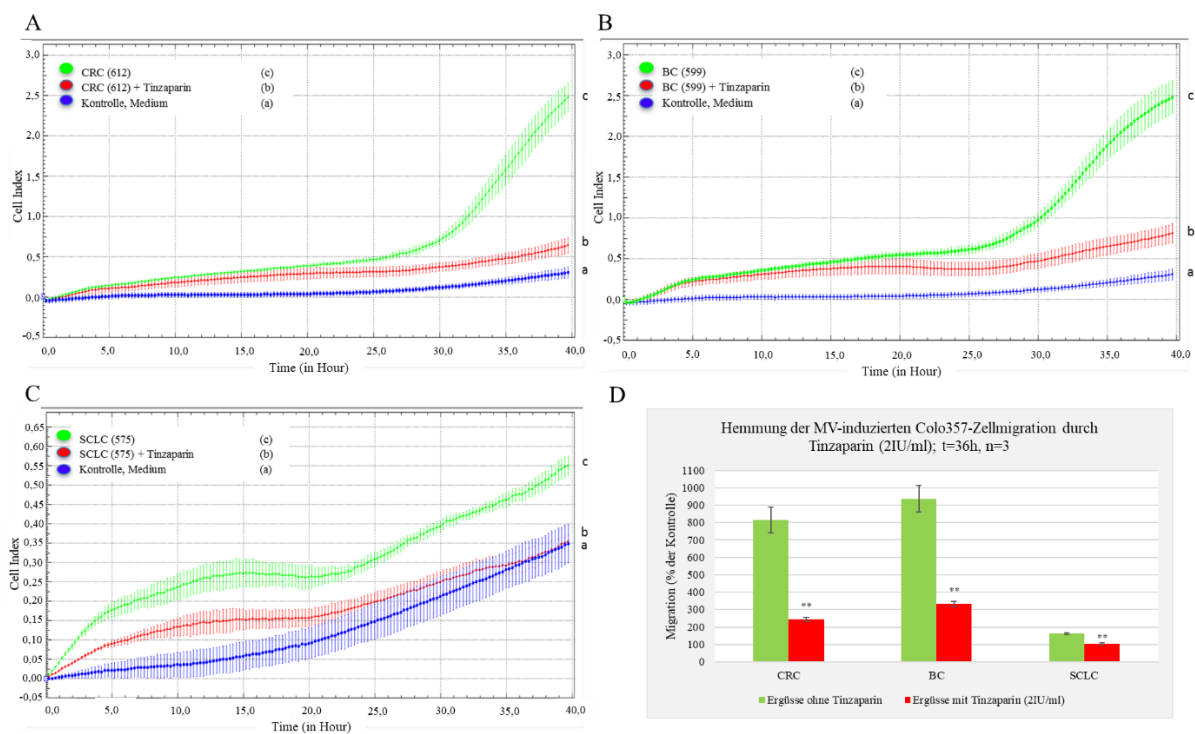


Abbildung 12: Hemmung der Mikrovesikel (MV)-induzierten Migrationsinduktion in Colo357-Zellen durch Tinzaparin (3 Stunden Vorinkubation); die Karzinomzellen Colo357 wurden über 36 Stunden mit malignen Ergüssen von Patienten erkrankt an (A) kolorektalem (CRC, Erguss 612), (B) Mamma- (BC, Erguss 599) und (C) kleinzelligem Lungenkarzinom (SCLC, Erguss 575) ohne ((c), grüne Linie) und mit Tinzaparin (2 IE/ml, (b), rote Linie) inkubiert und mit der Kontrolle (Zellkulturmedium, (a), blaue Linie) verglichen. In (D) sind die Daten der Kurven nach 36 Stunden graphisch dargestellt. n=3; \*\* entspricht  $p < 0,01$  verglichen mit der jeweiligen unbehandelten Kontrolle

### 3.5 Induktion der TFPI-Produktion in Tumorzellen durch Tinzaparin

Um die Theorie zu untermauern, dass die den MV zugehörigen TF-FVII-Komplexe an der Migrationsinduktion beteiligt sind, wurde der körpereigene Gerinnungshemmer TFPI verwendet, um den TF-FVII-Komplex in Colo357-Zellen zu blockieren.

Die TFPI-Produktion der Colo357-Zellen wurde durch 2 IU/ml Tinzaparin nach 8 Stunden Inkubation statistisch signifikant um ca. 60-72% gesteigert ( $p < 0,01$ ). Es wurde kein Konzentrationseffekt von 0,4 IU/ml, 0,8 IU/ml und 2 IU/ml Tinzaparin detektiert (Abb. 13).

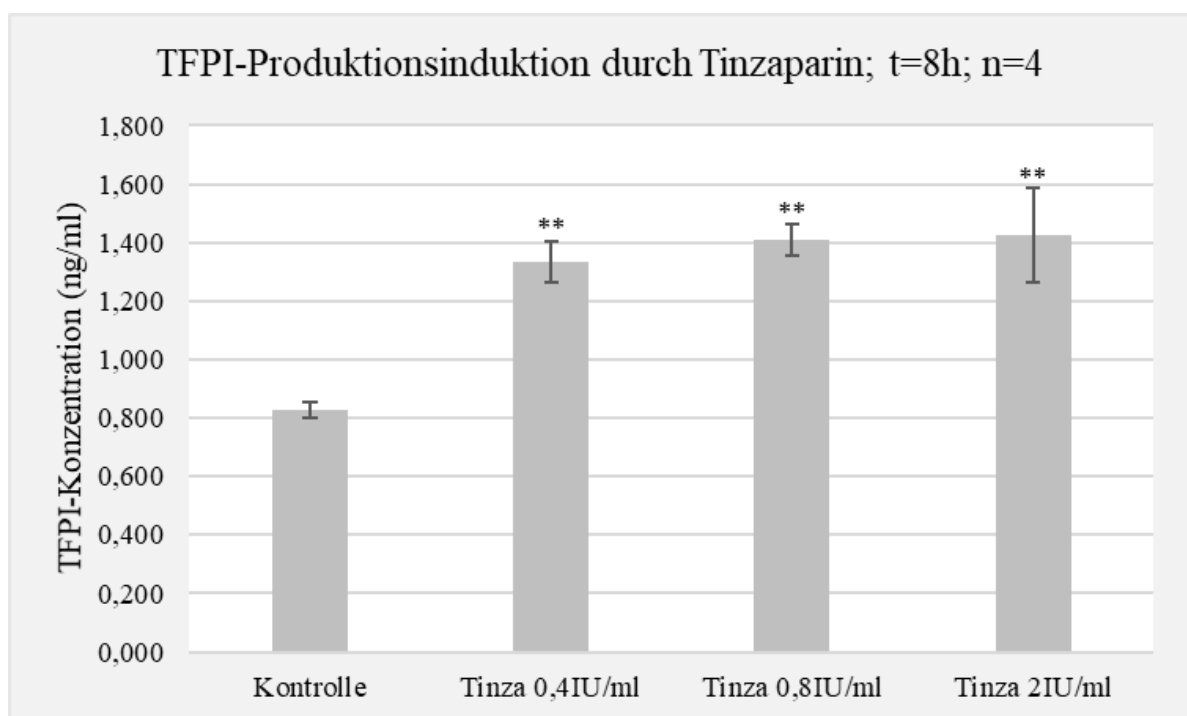


Abbildung 13: TFPI-Produktionsinduktion durch das NMH Tinzaparin (0,4IU/ml, 0,8IU/ml und 2IU/ml) nach 8 Stunden; Analyse mittels ELISA während Inkubation mit n=4, \*\* entspricht  $p < 0,01$  gegenüber der Kontrolle

### 3.6 Hemmung der Mikrovesikel-induzierten Zellmigration durch TFPI

Um zu untersuchen, ob die durch Tinzaparin induzierte Migrationshemmung aus einer Erhöhung der zelleigenen TFPI-Produktion der Colo357-Zellen resultiert, und ob somit Tinzaparin indirekt auf den TF-FVII-Komplex einwirkt, wurde ein TFPI-ELISA durchgeführt. Dafür wurde eine TFPI-Konzentration gewählt, welche ein Mittel zwischen unprovozierten Basiskonzentrationen und Maximalkonzentration nach Stimulation mit Tinzaparin darstellt (150).

Die Behandlung der Colo357-Zellen mit rTFPI wurde über 36 Stunden durchgeführt. Nach bereits 20 Stunden Inkubation wurde die MV-induzierte Migrationsinduktion durch den Einsatz von rTFPI gehemmt. Dieser Unterschied vergrößerte sich bis zum Endzeitpunkt von 36 Stunden Inkubation, um die Migrationsinduktion final um ca. 25% ( $p < 0,01$ ) zu reduzieren (Abb. 14).

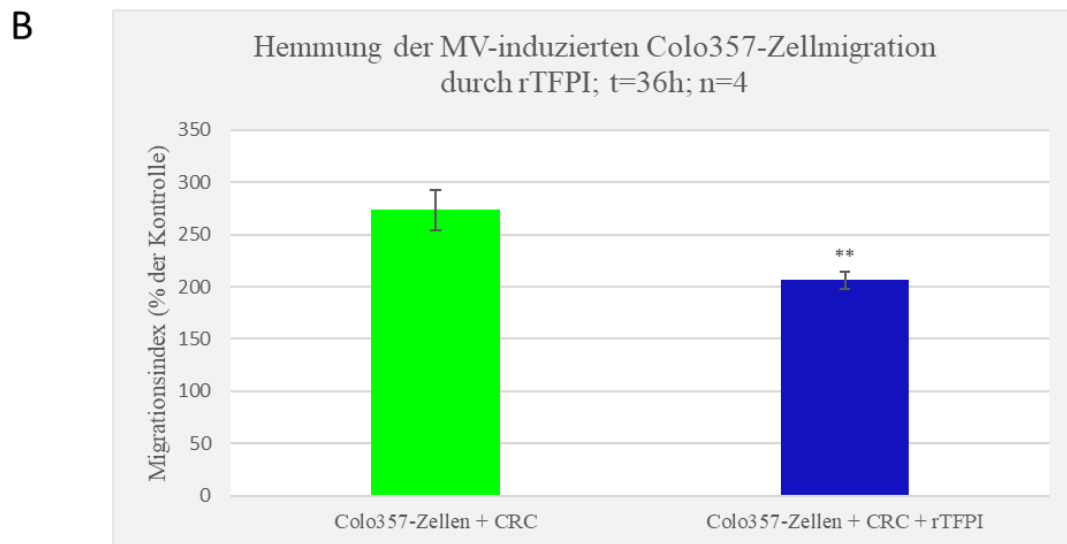
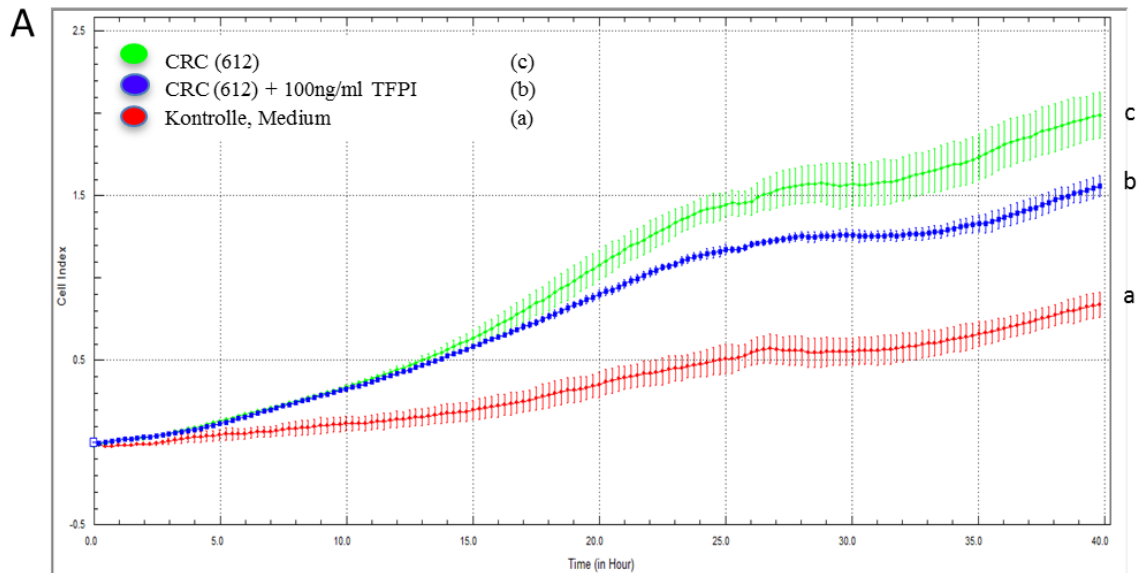


Abbildung 14: Hemmung der Mikrovesikel (MV)-induzierten Migrationsinduktion in Colo357-Zellen durch rekombinanten tissue factor pathway inhibitor (rTFPI); (A): Rot, Kontrolle; Blau, Colo357-Zellen mit kolorektalem Karzinom (CRC) und 100ng/ml TFPI; Grün, Colo357-Zellen mit kolorektalem Karzinom (CRC) ohne TFPI; (B): Vergleich zwischen Behandlung der Colo357-Zellen mit Erguss und zusätzlicher Gabe von TFPI nach 36h; n=4; \*\* entspricht  $p < 0,01$

## 4 Diskussion

Seit den 1930er Jahren wird an den Auswirkungen von Antikoagulanzen auf Krebserkrankungen geforscht. Diverse *in vitro*- und *in vivo*-Studien zeigten, dass die Aktivierung der Blutgerinnung durch einen Tumor eine wichtige Rolle in der Bildung von Tumorgewebe und Metastasierung spielt (186). Des Weiteren konnte in präklinischen Studien ein signifikanter antiangiogener sowie antimetastatischer Effekt von Gerinnungshemmern beobachtet werden. Im Mausmodell wurde zum einen gezeigt, dass Tinzaparin und andere NMH die *tube*-Formation durch  $TNF\alpha$  und FGF herbeiführen und zum anderen eine Lungenmetastasierung verhindern können (170, 187). In einem ähnlichen Modell konnten Amirkhosravi et al. eine Reduktion der Tumor-Neubildung nach Tinzaparin-Injektion demonstrieren (167).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass extrazelluläre Vesikel mit koagulatorischer Potenz in malignen Ergüssen nachweisbar sind. Diese Vesikel konnten mittels *high speed*-Zentrifugation und Durchflusszytometrie in ihre Subgruppen aufgeteilt werden. Dadurch konnte eine Zuordnung der relevanten TF-Aktivität erfolgen. Durch Verwendung von IsEV wurde die Migration von humanen Pankreaskarzinomzellen ausgelöst. Diese Migrationsinduktion konnte jedoch durch eine Behandlung mit Tinzaparin und speziell durch TFPI gehemmt werden.

Aktuelle Meta-Analysen über alle Patienten bestätigen lediglich einen marginalen Überlebensvorteil der Therapie mit NMH bei Tumorpatienten, im Vergleich zur Behandlung mit UFH. Betrachtet man jedoch Subgruppen dieser Patientenkollektive, ist durchgehend ein statistisch signifikanter Vorteil bei Patienten mit *limited disease* (SCLC) oder lokal beschränktem Tumorleiden ersichtlich (188, 189). Die von Akl et al. durchgeführte Cochrane-Analyse schloss 15 Studien mit insgesamt 7662 Patienten ein. Ziel war es, die Effektivität von Heparinen gegenüber einem Placebo oder keiner Intervention bei ambulanten Krebspatienten zu evaluieren (188). Primäre Endpunkte waren Mortalität während des Studienzeitraums, nach 12 Monaten und nach 24 Monaten. Sekundäre Endpunkte waren venöse Thromboembolien, leichte Blutungen, schwerwiegende Blutungen, Einschränkungen der Lebensqualität und Thrombozytopenie. Die Meta-Analyse zeigte, wie zu erwarten, eine signifikante Reduktion des Risikos für venöse Thromboembolien. Bezüglich der Mortalität gab es über alle Patienten hinweg zwar keine Verbesserung nach 12 oder 24 Monaten, jedoch eine statistisch signifikante Reduktion des

Todesrisikos in einer Verlaufsdatenanalyse (*time-to-event*) (188). Diese Ergebnisse untermauern die Resultate einer vorausgehenden Analyse aus dem Jahr 2011 (190). Bereits hier stellte sich ein Vorteil einer UFH-Therapie dar, jedoch gab es eine Diskrepanz bezüglich der Mortalitätsreduktion bei 12 und 24 Monaten. Die *hazard ratio* zeigte einen Überlebensvorteil mit Heparintherapie während der Studiendauer und bei 24 Monaten, aber keinen Vorteil bei 12 Monaten. Die Heparinbehandlung erbrachte zudem eine bessere *hazard ratio* hinsichtlich des Überlebens bei Patienten mit einer Überlebenswahrscheinlichkeit von länger als sechs Monaten, verglichen mit den Patienten, denen weniger als sechs Monate Überlebenschance gegeben wurden.

Eine 2014 veröffentlichte Cochrane Meta-Analyse (186) mit der gleichen Fragestellung zeigte im Gegensatz dazu keinen Vorteil bezüglich der Mortalität, bei erhöhtem Risiko für leichte und schwerwiegende Blutungen unter der Therapie mit oralen Antikoagulanzen (Warfarin, Apixaban).

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob die Einstellung einer klinisch relevanten Konzentration Tinzaparin (2 IU/ml) in einer *in vitro*-Kultur mit Tumorzellen eine hemmende Wirkung auf MV-induzierte Zellmigration ausübt. Diese These wurde unter Verwendung der humanen Pankreaskarzinomzelllinie Colo357 sowie drei maligner Ergüsse (Aszites-Punktate; CRC - kolorektales Karzinom, BC - Mamma-Karzinom, SCLC - kleinzelliges Lungenkarzinom) bestätigt. Durch die Verwendung von Patientenmaterial ergab sich ein starker klinischer Bezug.

## 4.1 Identifikation von Mikrovesikel-Populationen und Nachweis von TF-tragenden extrazellulären Vesikeln in malignen Ergüssen

In der hier vorgestellten Forschungsarbeit wurden maligne Ergüsse von Krebspatienten verwendet. Durch die vorgenommenen Zentrifugationsschritte enthielten diese nur sehr wenige Thrombozyten (173, 175). Dieser Umstand vereinfacht nicht nur die Isolierung von extrazellulären Vesikeln, sondern verringert auch eine mögliche Interaktion der gerinnungsrelevanten Bestandteile mit Thrombozyten.

In den letzten Jahren hat sich die Nomenklatur im Bereich der jetzt als extrazelluläre Vesikel bezeichneten Partikel stark verändert. Durch verbesserte technische Möglichkeiten führte eine genauere Klassifizierbarkeit zur Aufspaltung der anfangs großen Gruppe der MP und EV. In dieser Arbeit wurde auf die Arbeiten von Ciardiello et al. und Kalra et al. 2016 verwiesen. Diesen Autoren folgend dient der Ausdruck extrazelluläre Vesikel als Überbegriff für Exosomen (30-300 nm), Ektosomen (MV, MP; 0,1-1 µm), apoptotische Körperchen (0,05-4 µm) und große Onkosomen (1-10 µm) (46, 53). Bei der Interpretation der Publikationen ist diese Definition zu berücksichtigen.

Die extrazellulären Vesikel, speziell MV, wurden in unseren Untersuchungen durch ein von der *International Society on Thrombosis and Haemostasis* empfohlenes Protokoll von den restlichen im Erguss befindlichen Bestandteilen getrennt (174). Die gewonnene Präparation wurde lsEV genannt (Tab. 8). Anschließend wurde sie durch eine von Gieseler et al. (176) etablierte Methode nach Annexin V-PS-Bindungskapazität selektioniert. Diese Präparation wurde als capEV bezeichnet. Annexin V ist Teil einer Gruppe von Proteinen, welche Kalzium-abhängig an negativ geladene Membranproteine binden. Von Bedeutung für diese Arbeit ist die spezifische Bindung an PS, welches sich auf der Oberfläche von MV befindet. Die Annexin-gekoppelten *magnetic beads* wurden ursprünglich entwickelt, um PS-präsentierende Zellen in der Apoptose zu selektionieren (191, 192).

Für diese Arbeit war die Spezifität der Annexin V-PS-Bindung von großer Relevanz, da Exosomen im Gegensatz zu Ektosomen und apoptotischen Körperchen eine stark reduzierte Annexin V-Bindungskapazität aufweisen (177). Diese Eigenschaft könnte daraus resultieren, dass im Gegensatz zu Ektosomen Exosomen durch den Prozess der Exozytose entstehen und somit keine Veränderung der Membranasymmetrie verursachen (46). Wie



oben beschrieben, bindet Annexin V hochspezifisch an PS, welches erst an die Membranoberfläche tritt, wenn die Membranasymmetrie gestört oder verändert wird (74). Die unterschiedlichen EV-Populationen wurden zunächst mithilfe des Durchflusszytometers charakterisiert und nach ihrer Größe den Subpopulationen zugeordnet (Abb. 8; Abb. 9, Tab. 13).

Zum jetzigen Zeitpunkt ist eine genauere Einteilung von Exosomen und Ektosomen einer bestimmten Größe nicht möglich, da sich nach Definition deren Größenspektren überschneiden und hochspezifische biochemische Marker für die Bestimmung der einzelnen Populationen fehlen. Die Größeneinschätzung der Vesikel basiert in dieser Arbeit auf einer Kalibrierung durch Megamix (BioCytex, Marseille, Frankreich). Diese Methode wurde diskutiert, da die Größe eines Vesikels oder Partikels offensichtlich nur unzuverlässig mittels einer Kugel, also der *beads*, abgeschätzt werden kann (193).

Allerdings konnten wir mittels Durchflusszytometrie definierte Populationen darstellen (Abb. 8; Abb. 9, Tab. 13) und gehen aktuell davon aus, dass der größte Teil der Migrationsinduktion über den PAR/ERK-Signalweg durch TF-tragende MV angestoßen wird.

Es stellte sich heraus, dass durch die Zentrifugationsschritte mit 2.500 xg (*low speed*) überwiegend große Partikel entfernt wurden, die wir apoptotischen Körperchen oder großen Onkosomen zuordnen (Abb. 9). Anschließend lagen demnach vorwiegend Exosomen und Ektosomen in den Versuchsansätzen vor. Durch die Zentrifugation bei 10.000 xg (*high speed*) konnte eine Trennung der kleinen Partikel  $<0,5 \mu\text{m}$ , nach unserer Interpretation Exosomen, vom Rest  $>0,5 \mu\text{m}$ , vermutlich Ektosomen und apoptotische Körperchen, erzielt werden (Abb. 9; hsEV). Zusätzlich befanden sich nach der *high speed*-Zentrifugation alle löslichen Faktoren, welche zu einer Partikel-unabhängigen Migrationsinduktion hätten beitragen können, im Überstand. Sie beeinflussten somit die nachfolgenden funktionellen Experimente nicht. Die hohe TF-Aktivität im Überstand (Abb. 10) ließ darauf schließen, dass bei einer Migrationsinduktion über den TF-Signalweg der größte Teil der Induktion über TF-tragende MV stattfand.

Dem gegenüber zu stellen sind die Befunde mehrerer Autoren, welche Exosomen in den Vordergrund der Migrationsinduktion rücken. Christianson et al. zeigten, dass Exosomen zu einer ERK1/2 Phosphorylierung und Migrationsinduktion führen, welche durch den spezifischen Inhibitor U0126 gehemmt werden konnte. Zusätzlich konnte die Migrationsinduktion durch Heparinderivate wie Tinzaparin gehemmt werden (194). Weidle

et al. belegten 2017, dass Exosomen aufgrund diverser Funktionen den Brennpunkt von Metastasierung und Invasion darstellen (195). Hierzu gehören u.a. die Apoptoseinduktion in zytotoxischen T-Zellen, der Transport von Migration-induzierender RNA sowie MDR-Proteine und eine direkte Interaktion mit PAR2 (195). Ferner stellte sich heraus, dass die Hemmung von CD9 und CD63 durch spezifische humane Antikörper die Metastasierung in Lunge, Lymphknoten und in den Thorax signifikant reduziert, ohne auf das Wachstum des Primärtumors einzuwirken. Diese Marker können hauptsächlich auf Exosomen nachgewiesen werden (196), sind jedoch nicht spezifisch für diese Population (197). Die beteiligten Forschungsgruppen verwendeten zur Trennung der EV diverse Zentrifugationsschritte. Zur speziellen Isolierung der Exosomen wurde von den genannten Autoren allerdings eine Ultrazentrifugation bei 10.000 xg durchgeführt. Eine genauere Betrachtung der Daten legt nahe, dass die gemessene Population mengenmäßig zwar abnimmt, sich jedoch das Maximum an Zellen pro Milliliter bei ca. 200 nm befindet. Es ist also davon auszugehen, dass in diesen Präparationen nicht nur Exosomen, sondern auch Mikrovesikel zu finden waren. Wir gehen davon aus, dass die von uns verwendeten Methoden zu einer wesentlich genaueren Trennung der Vesikelklassen führen (Abb. 9).

Wir konnten in unserem Projekt zum einen konstatieren, dass in den verwendeten malignen Ergüssen viele Exosomen/MV vorhanden waren. Dieses Ergebnis korreliert mit Veröffentlichungen, welche darstellen, dass MV im Plasma von Krebskranken detektierbar sind bzw. in erhöhter Konzentration vorliegen (38, 70). Zum anderen konnte nachgewiesen werden, dass in malignen Ergüssen mehrere Populationen extrazellulärer Vesikel vorkommen, die eindeutig voneinander zu trennen sind. Darunter waren unterschiedliche Mengen MV und spezifische TF-tragende MV. Diese Erkenntnisse werden von weiteren Veröffentlichungen bestätigt (15, 18, 38, 46, 48, 53, 57, 58, 70, 72-74, 91, 198) und belegen erneut die Heterogenität der MV sowie die Notwendigkeit einer weitergehenden Erforschung der extrazellulären Vesikel und ihrer Verbindung zu Tumorerkrankungen.

Es stellte sich u.a. die Frage, ob eine Korrelation zwischen MV-Menge oder -beschaffenheit und Krankheitsverlauf oder -stadium besteht, oder ob Unterschiede zwischen den MV verschiedener Tumoren nachweisbar sind. Falls dies der Fall ist, könnte die Analyse von MV als Surrogatparameter für Prognose und Stadium einer Krebserkrankung entwickelt werden. Dieser Frage geht unsere Arbeitsgruppe aktuell mit Analysen von MV aus biologischem Material (Ergüsse, Plasma und Urin) definierter Patientengruppen nach.

Im Zuge der Suche nach Surrogatparametern konnten beim größten Teil der Patienten erhöhte Spiegel bei Markern für aktivierte Gerinnung (Fibrinopeptid A (FPA), Prothrombin-Fragmente, Thrombin-Antithrombin-Komplexe (TAT)) identifiziert werden. Jedoch stellte sich kein Gerinnungsparameter als zuverlässiger Prädiktor heraus (19, 21), um einen Tumor möglichst früh erkennen zu können. Eine einzige Korrelation präsentiert sich zwischen der TF-Expression auf Tumorzellen und der Neigung zu hämatogener Metastasierung in Melanomzellen (199).

Bevor jedoch in dieser Richtung konstruktiv weitergeforscht werden kann, muss sich eine einheitliche Nomenklatur für extrazelluläre Vesikel durchsetzen. In diesem Zusammenhang wurde 2012 die *International Society of Extracellular Vesicles* (ISEV) gegründet. Eine ihrer grundsätzlichen Fragestellungen ist die physiologische und pathophysiologische Funktion der unterschiedlichen Vesikelklassen im klinischen Kontext. Hieraus ergibt sich auch die Diskussion zur Rolle der Gerinnungsaktivierung bei entzündlichen Erkrankungen und Tumorerkrankungen, denn TF-tragende MV sind starke Induktoren der extrinsischen Tenase (57, 72, 92, 93). Die hier vorgelegten Ergebnisse dienen als weiterer Baustein für diese klinisch bedeutsame Forschungsrichtung. In den folgenden Abschnitten werden funktionell relevante Untersuchungen mit aufgereinigten MV dargestellt.

## 4.2 Migrationsinduktion bei Tumorzellen durch TF-tragende Mikrovesikel

In dieser Arbeit wurden MV in malignen Ergüssen nachgewiesen. Ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von MV und Tumorerkrankungen wurde bereits von diversen Autoren beschrieben. Laut Literatur werden erhöhte MV-Spiegel mit Tumorwachstum und -überleben in Verbindung gebracht. Des Weiteren werden sie mit Angiogenese, Schutz vor Immunreaktion, Zerstörung von ECM und Metastasierung assoziiert (46, 72-74, 89).

Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit eine Krebszelllinie mit malignen Ergüssen inkubiert, die lsEV enthielten. Zur Messung wurde das xCELLigence System von Roche eingesetzt, um die Zellmigration in Echtzeit beobachten zu können.

Bei der Untersuchung nach 36 Stunden zeigte sich bereits eine Migrationsinduktion durch die Zugabe von malignen Ergüssen aller drei Tumorpatienten. Die leichten Unterschiede zwischen den Tumorarten bezüglich der Migrationsinduktion lassen sich beispielsweise auf unterschiedliche Zusammensetzungen der lsEV-Populationen oder auf heterogene TF-Exposition der EV zurückführen. Der stärkere Anstieg des Migrationsindex bei über 25 Stunden lässt Rückschlüsse auf eine einsetzende Proliferation zusätzlich zur schon bestehenden Migration zu (Abb. 11).

## 4.3 Hemmung der Mikrovesikel-induzierten Zellmigration durch Tinzaparin

Für das Überleben eines Krebspatienten ist es besonders wichtig, dass der Primärtumor nicht metastasiert. Ein metastasierter Tumor verschlechtert die Überlebensprognose des Patienten drastisch und geht zusätzlich mit einem deutlich erhöhten Thromboserisiko einher (19, 20, 30). Die Migration von Tumorzellen stellt eine notwendige Voraussetzung für deren Metastasierungsfähigkeit dar. Deshalb wurde hier getestet, ob das NMH Tinzaparin eine Migrationsinduktion von Krebszellen *in vitro* hemmen kann (Abb. 12). Bei der Inkubation von Colo357-Zellen mit MV aus malignen Ergüssen und Tinzaparin bestätigte sich die Annahme, dass eine Zellmigration durch das NMH reduziert werden kann. Es wurde eine Tinzaparin-Konzentration verwendet, die dem in der Fachinformation (veröffentlicht von LEO Pharma, 2011) (185) angegebenen *plasma-peak*-Wert der anti-Xa-Aktivität durch Gabe von 75 IU/kg Tinzaparin subkutan bei normalgewichtigen Patienten entspricht. Allerdings gelang die Hemmung der Migration nur, wenn die Tumorzellen mindestens 3 Stunden vor der Applikation von MV mit Tinzaparin prä-inkubiert wurden. Dies spricht dafür, dass das Tinzaparin keine direkte Wirkung auf die Migration hat, sondern vielmehr indirekt einen zellulären Effekt auslöst. Es ist bekannt, dass Tinzaparin eine im Vergleich zu anderen NMH hohe Potenz zur Induktion einer TFPI-Ausschüttung von epithelialen Zellen hat.

Die partielle Hemmung der Migration durch Tinzaparin kann unterschiedlich interpretiert werden. Eine Möglichkeit wäre, dass die Zellpopulation sowie die Ergüsse durch die Aufbereitung in Mitleidenschaft gezogen worden sein könnten. Es könnte auch sein, dass die Migrationsinduktion nicht ausschließlich auf extrazelluläre Vesikel zurückzuführen ist. Man könnte ferner annehmen, dass die Tinzaparin-Konzentration nicht für eine komplette Hemmung der heterogenen EV-Aktivität ausreicht, da der TF-Signalweg möglicherweise nur einen Signalweg repräsentiert.

Es ist bekannt, dass eine aktivierte Hämostase, zum Teil auch durch das Vorhandensein von freiem TF, förderlich für maligne Erkrankungen ist (200), bzw. dass eine durch Tumore erhöhte prokoagulatorische Aktivität den Vorgang der Metastasierung unterstützt (201). Zudem haben diverse *in vivo*-Versuche eine hemmende Auswirkung von Heparinen und NMH auf Tumorprogression gezeigt (202). Ihre antiangiogene und antiproliferative Potenz

scheint vom Molekulargewicht abhängig zu sein. Khorana et al. präsentierten 2003 Ergebnisse, welche Wirkungsmaxima bei durchschnittlich 3 kDa sowie 6 kDa zeigten (203).

Für die Wirkung von NMH auf das Krebsgeschehen werden aktuell diverse Mechanismen diskutiert. Dazu gehört die Hemmung der Tumorangiogenese durch Runterregulation von TF, VEGF, *basic fibroblast growth factor* (bFGF), Thrombin und Fibrin (200). Wir erinnern uns, dass TF von den meisten Tumoren exprimiert wird und nachgewiesenermaßen über PAR, vor allem PAR2, auf die Migration, Invasion und Angiogenese einwirken kann (200). Durch den aktiven TF wird Thrombin produziert, welches u.a. eine Anreicherung des von Willebrand Faktors (vWF) in Gefäßlumina induzieren kann (202) sowie PAR auf diversen Zellen aktiviert. vWF stellte sich als essentiell für eine erfolgreiche Metastasierung heraus, da es die Thrombusbildung sowie Adhäsion von Zellen z.B. an das Endothel vereinfacht (201). VEGF(-A), welches auch durch diverse Tumore sezerniert wird, spielt eine wichtige Rolle in Tumorprogression und -angiogenese, indem es über vWF zur Endothelaktivierung beiträgt, welche sehr wichtig für die Metastasierung ist (201, 202). Des Weiteren wurde eine Unterstützung der Immunabwehr durch gesteigerte Aktivität von natürlichen Killerzellen, antiproliferative Wirkung auf Fibroblasten, Endothel-, Epithelzellen, Zellen der glatten Muskulatur sowie antiadhäsive Wirkung über die Blockade von P- und L-Selektin durch NMH nachgewiesen (200). Über eine Hochregulation von E-Cadherin (204) aber auch durch Hemmung der Heparinase und Blockade von extrazellulären Matrixproteinen, TFPI- und anti-Selectin-Induktion sowie antiinflammatorische Potenz (187, 198, 200, 205, 206) können NMH hemmend auf Migration, Invasion und Angiogenese wirken.

Die Wirkung von Tinzaparin ist also heterogen und beruht auf diversen Mechanismen. Es hemmt FXa und FIIa (Thrombin) (185) und induziert TFPI (162, 207). FXa im Komplex mit TF und FVIIa sowie Thrombin sind in der Lage PAR zu aktivieren (98). Es hemmt VEGF und führt zu einer reduzierten vWF-assoziierten Endothelaktivierung (201, 202). Tinzaparin weist Potenzial zur P- und L-Selektin-Hemmung auf und kann eine Hochregulierung von E-Cadherin einleiten (204, 208, 209). Eine weitere Erkenntnis ist, dass durch Tinzaparin transkriptionales Umprogrammieren eingeleitet werden kann, welches möglicherweise eine positive Auswirkung auf Chemotherapeutikaresistenzen ausübt. In einer Studie von Pfankuchen et al. reagierten 3776 Gene in dieser Form auf die Tinzaparin-Therapie (210).

Ein potentieller Nachteil bei der klinischen Verwendung von gerinnungsaktiven Substanzen zur Tumorbekämpfung bleibt die erhöhte Blutungsgefahr, obwohl sich in den bisherigen Studien kein klinisch relevantes Risiko zeigte. Seit geraumer Zeit wird an

gerinnungsinaktiven Heparinderivaten geforscht. Hier müssen sulfatierte, nicht antikoagulatorisch wirksame Heparine (S-NACH) erwähnt werden. Laut Sudha et al. zeigen die sulfatierten, nicht antikoagulatorisch wirksamen Heparine antimetastatische sowie antiangiogene Wirkung ohne ein erhöhtes Blutungsrisiko (209). Alyahya et al. veröffentlichten, dass S-NACH sowie Tinzaparin die Metastasierung eines implantierten Tumors in Mäusen unterdrücken können. Darüber hinaus waren beide Substanzen in der Lage, eine Metastasierung nach Exzision des Tumors sowie die Masse des Primärtumors zu reduzieren. Im Vergleich zu Tinzaparin konnten nach S-NACH-Therapie größere Tumornekroseareale festgestellt werden. Im Gegensatz zu Tinzaparin wurde auch durch Verdoppelung der S-NACH-Konzentration keine Verlängerung der Blutungszeit festgestellt (204). Diese Initiative zeigt, dass die molekularen Mechanismen der Gerinnungshemmung und der antitumoralen Wirkung unterschiedlich sein können.

#### 4.4 Induktion der TFPI-Produktion in Tumorzellen durch Tinzaparin

Ein wichtiger Bestandteil der Zellmigrationsinduktion ist TF bzw. der TF-FVIIa(-FXa)-Komplex. Um den assoziierten Signalweg zu hemmen, kann auf TFPI, einen körpereigenen Antagonisten von TF und somit ein natürliches Antikoagulans (137), zurückgegriffen werden. Wie wir wissen, ist TFPI ein mehrsegmentiges Protein, bestehend aus einem sauren Amino- oder N-Terminus, drei Kunitz-Typ-Domänen (K1-3), und einem basischen Carboxy- oder C-Terminus (139). TFPI wird in mindestens zwei Isoformen produziert: TFPI $\alpha$  und TFPI $\beta$ . Beide Isoformen können den TF-FVIIa-Komplex sowie FXa hemmen. Seit kurzem ist bekannt, dass TFPI $\alpha$  frühe Formen des Prothrombinasekomplexes hemmen kann (148).

Nach einer Studie von Fareed et al. (165) ist Tinzaparin ein starker Induktor für die TFPI-Ausschüttung, was durch weitere wissenschaftliche Arbeiten untermauert wird (162, 167). In gesunden Menschen lässt sich eine TFPI-Konzentration von 35-90 ng/ml im Serum nachweisen. Mousa et al. stellten fest, dass sich die TFPI-Konzentration nach einmaliger Gabe von 75 IU/kg Tinzaparin auf Werte von 150-230 ng/ml erhöhen kann (150).

In unserer Versuchsreihe wurde nachgewiesen, dass Tinzaparin auch in den von uns verwendeten Tumorzellen eine statistisch signifikante TFPI-Ausschüttung induzierte. Wir konnten zeigen, dass ansteigende Tinzaparinkonzentrationen bis hin zur *plasma-peak*-Konzentration die ausgeschüttete Menge an TFPI aus Colo357-Zellen nicht zusätzlich

beeinflussten. Dies lässt darauf schließen, dass ein on/off-Mechanismus bei der TFPI-Produktion vorliegt oder dass ein konzentrationsunabhängiger Mechanismus am zuständigen Rezeptor zur Produktion führt (Abb. 13).

## 4.5 Hemmung der Mikovesikel-induzierten Zellmigration durch TFPI

Wir konnten zeigen, dass die Migrationsinduktion durch lsEV aus CRC-Erguss in Colo357-Zellen mit rTFPI (-1) statistisch signifikant gehemmt werden konnte (Abb. 14).

Die rTFPI-Konzentration von 100 ng/ml wurde als Kompromiss der Maxima/Minima der von Mousa et al. (150) veröffentlichten TFPI-Konzentrationen vor und nach Gabe von 75 IU/kg Körpergewicht Tinzaparin gewählt (35-90 ng/ml bis 150-230 ng/ml).

Die Hemmung der Migrationsinduktion durch rTFPI war nicht komplett und nicht so stark wie die Hemmung durch Tinzaparin, was vermuten lässt, dass es sich bei der Migrationshemmung durch rTFPI um einen von mehreren Wegen der Hemmung durch Tinzaparin handeln könnte. Es ist auch nicht auszuschließen, dass die Wirkung des verwendeten rTFPI schwächer ist als die des natürlichen TFPI.

In den letzten Jahren wurden immer mehr Beweise für eine hämostaseunabhängige tumorsuppressive Aktivität von TFPI erbracht. Es wurde gezeigt, dass TFPI Apoptose induziert, Proliferation hemmt sowie antiangiogene und antimigratorische Kompetenzen aufweist (140, 146). Tinholt et al. zeigten (140) an Mäusen, dass die Gabe von TFPI das Tumorstadium und die Lungenmetastasierung verlangsamt. Wang et al. veröffentlichten (211), dass ein TFPI-Mangel im Endothel die Lungenmetastasierung fördert, was unter anderem mit einer gesteigerten Gefäßpermeabilität und verändertem Lungenmikroenvironment einhergeht. Diese Untersuchung bestätigt Ergebnisse einer Studie von Amirkhosravi et al., in der ebenfalls in einem Mausmodell eine Hemmung der Gerinnungsaktivierung und eine signifikante Reduktion der Lungenmetastasierung festgestellt wurde (212).

TFPI-1 ist etabliert als natürlicher Gegenspieler des TF. Koagulationsunabhängig ist es jedoch auch in der Lage den TF-abhängigen PAR-Signalweg zu kontrollieren (138). Als Isoform von TFPI-1 erschwert TFPI $\alpha$  die Angiogenese durch Hemmung der



Phosphorylierung vom VEGFR-2 (140). Zudem wurde TFPI $\beta$  mit einer reduzierten TF-Signalweiterleitung und Brustkrebszellprogression in Verbindung gebracht (146). Diese Aspekte sind für die Interpretation der von uns erhobenen Ergebnisse besonders interessant, da sie unsere Schlussfolgerungen eines Teils des migrationshemmenden Mechanismus untermauern.

TFPI-2 besteht wie TFPI-1 aus 3 Kunitz-Typ-Protease-Inhibitor-Domänen, einem N-terminus sowie einem C-Terminus und konnte in der ECM diverser Gewebe nachgewiesen werden. Die Hauptaktivität beruht auf der Hemmung von Serin-Proteasen wie Plasmin, Plasma-Kallikrein, Trypsin, Chymotrypsin sowie Gerinnungsfaktor FXIa. TFPI-2 wird in zahlreichen Veröffentlichungen mit Tumorerkrankungen in Verbindung gebracht (213). Zudem ist eine reduzierte TFPI-2-Expression für mehrere Tumoren beschrieben (214, 215).

In vielen Tumoren ist eine Dysregulation der MMP/MMP-Inhibitor-Balance detektierbar, welche für die Aufrechterhaltung der ECM und für die Inhibierung der Metastasierung entscheidend ist (214, 215). TFPI-2 blockiert die ECM-Hydrolyse durch Hemmung von Plasmin und MMPs (216, 217). Zhai et al. stellten eine inverse Korrelation zwischen MMP-Expression und TFPI-2-Expression in Pankreaskarzinomzellen fest (214). Es wurde gezeigt, dass die Expression des TFPI-2-Gens das Tumorwachstum und die Metastasierung durch Beeinflussung des ECM-Umbaus und der Angiogenese *in vivo* hemmen kann (212, 217).

Mehrere Publikationen erbrachten Beweise, dass entweder die Methylierung des TFPI-2-Gens (217, 218) oder eine verringerte Expression von TFPI-2 (215, 219) mit einer schlechten Prognose bzw. einem gesenkten krankheitsfreien Überleben und Gesamtüberleben für Patienten einhergehen.

Neben TFPI-1 bietet sich TFPI-2 als valide Alternative in der Kategorie jener körpereigenen Substanzen an, welche gegen das Fortschreiten einer Krebserkrankung verwendet werden könnten. Im Vergleich zu TFPI-1 wirkt TFPI-2 kaum über die Gerinnungsachse, sondern eher über Mechanismen in der ECM. In diesem Forschungsbereich werden in der nächsten Zeit klinisch relevante Ergebnisse erwartet.

Auf Grund der partiellen Hemmung der Migrationsinduktion durch Tinzaparin und TFPI kann angenommen werden, dass die Migrationsinduktion nicht ausschließlich von MV ausgeht. Eine weitere Interpretationsmöglichkeit wäre, dass andere Membranstrukturen, die nicht durch TFPI beeinflussbar sind, dafür verantwortlich sind. Wie bereits gezeigt, sind in den malignen Ergüssen nicht nur MV, sondern auch Vertreter der anderen Hauptgruppen der

extrazellulären Vesikel, hauptsächlich Exosomen und apoptotische Körperchen sowie nicht-vesikuläre Effektoren detektierbar. Als alternative Induktoren stehen demnach Exosomen, apoptotische Körperchen oder Membranbestandteile wie z.B. P-Selektin zur Debatte. Keerthikumar et al. postulieren z.B., dass Exosomen im Gegensatz zu MV eine signifikant höhere onkogene Potenz aufweisen (59). P-Selektin, ein Adhäsionsprotein, wurde nicht nur mit MV-assoziiierter Thrombophilie in Tumorpatienten, sondern auch mit Tumorwachstum und Metastasierung (16, 220, 221) in Verbindung gebracht.

In klinischen Studien zeichnete sich ein Zusammenhang zwischen Tumorerkrankung und thromboembolischen Erkrankungen ab, welcher eine Beeinflussung in beide Richtungen zeigte – ein prothrombotischer Zustand durch die Tumorerkrankung und eine Unterstützung der Proliferation, Angiogenese und Entzündung, zum Teil über PAR und durch Produkte der aktivierten Gerinnung, wie Thrombin und Fibrinogen. Hier wurde diskutiert, ob nicht andersherum eine Hyperkoagulabilität die Entstehung von Tumoren in ihrer Transition von Dysplasien zur vollen Entartung unterstützt (21).

Vor allem PAR2 kann unter anderem über den TF-FVIIa-FXa-Komplex intrazellulär agieren. Die hieraus resultierende Signalkaskade kann in Verbindung mit Tumormigration und –invasion gebracht werden (127). Diese Signalkaskade kann durch Tinzaparin direkt, durch Hemmung von FXa (185), oder indirekt über die durch Tinzaparin induzierte TFPI-Sezernierung beeinflusst werden (148). Unter den NMH kann Tinzaparin die stärkste TFPI-Sezernierung induzieren (165). Zusätzlich hat es die ideale molekulare Masse um antiproliferative und antiangiogene Wirkung auszuüben (203). PAR2 ist auf ca. 80% aller Tumoren nachweisbar (122), unter anderem auch auf den in dieser Arbeit verwendeten Colo357-Zellen (Migrationsinduktion in Colo357-Zellen durch Verwendung des spezifischen PAR-Agonisten SLIGKVN<sub>2</sub> (AnaSpec, Inc., Fremont, CA, USA), (222)). Ein wichtiger Signalweg, welcher PAR-Aktivierung und Zellmigration verbindet, führt über ERK1/2-Phosphorylierung und Snail zu E-Cadherin-Herunterregulierung und so zu EMT und Metastasierung (Abb. 15).

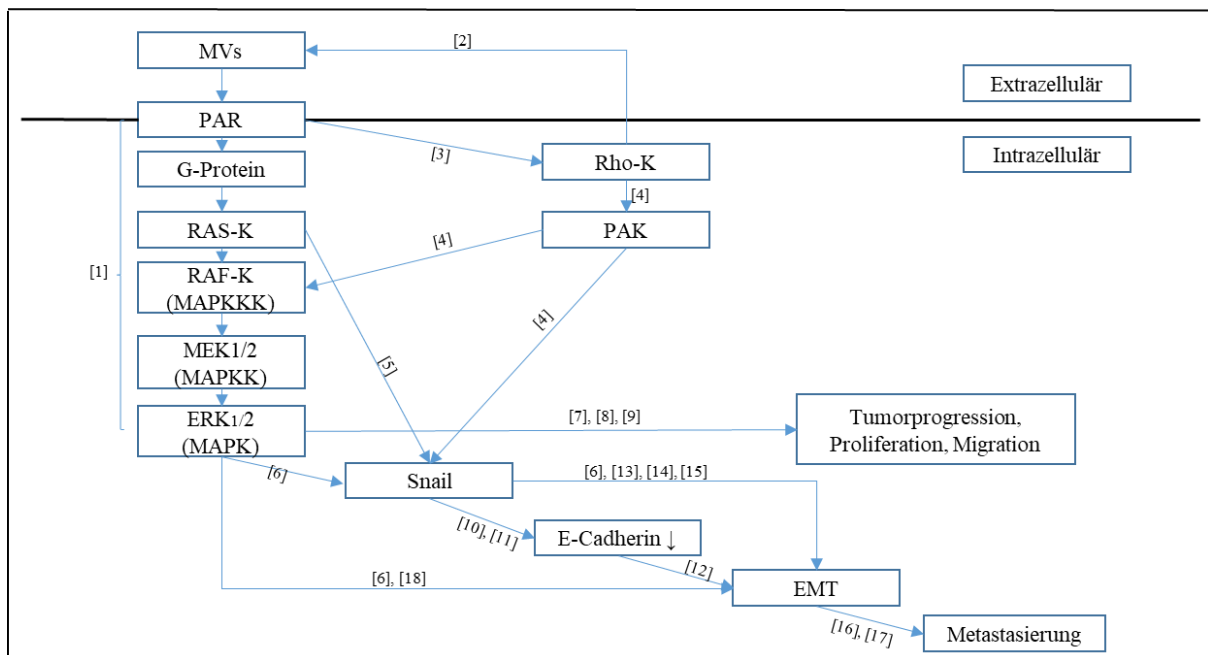


Abbildung 15: Möglicher Zusammenhang zwischen PAR-Aktivierung und Tumorzellmetastasierung, -proliferation und -progression; [1], (223); [2], (75); [3], (224); [4], (225); [5], (226); [6], (227); [7], (228); [8], (129); [9], (229); [10], (230); [11], (231); [12], (232); [13], (233); [14], (234); [15], (235); [16], (236); [17], (237); [18], (238); Abkürzungen: MV, Mikrovesikel; PAR, protease-activated-receptor; RAS-K, rat-sarcoma-Kinase; RAF-K, rapidly-accelerated-fibrosarcoma-Kinase; MAPKKK, mitogen-activated-protein-Kinase-Kinase-Kinase; MEK/MAPKK, mitogen-activated-protein-Kinase-Kinase; ERK, extracellular-regulated-protein-Kinase; MAPK, mitogen-activated-protein-Kinase; Rho-K, Rho-Kinase; PAK, p21-activated-Kinase; EMT, epithelial-mesenchymale-Transition

Neben den fachlich fundierten Untersuchungen, weist die hier vorlegte Arbeit auch Limitationen auf. Um das Patientenmilieu so gut wie möglich zu simulieren, wurden in dieser Arbeit klinisch relevante Konzentrationen für Tinzaparin und TFPI gewählt, jedoch kann die genaue Kinetik der Wirkstoffe in einer Laborumgebung von der im menschlichen Körper abweichen. Außerdem wurde in dieser Arbeit kein Vergleich verschiedener NMH vorgenommen, da eine Aufklärung des zu Grunde liegenden Mechanismus im Vordergrund stand. Die verwendete Anzahl an Proben lässt nur einen Grundsatzbeweis (*proof of principle*) zu, keine allgemeine Aussage zur antitumoralen Wirkung von Tinzaparin.

Wie schon erwähnt, konnte in den Versuchen zur Hemmung der Migrationsinduktion von Tumorzellen durch Tinzaparin und TFPI eine statistisch signifikante, jedoch keine komplette Hemmung erzielt werden (Abb. 12, Abb. 14). Aus diesem Grund müssen konzentrationsbedingte und kinetische Ursachen tiefergehend in folgenden Experimenten untersucht werden.

Wie bereits angesprochen, kann die Arbeit lediglich einen möglichen Mechanismus für die Antitumorpotenz von Tinzaparin als Standardtherapeutikum bei Thrombose-gefährdeten Tumorpatienten vorlegen. Um eine klinisch nützliche Signifikanz zu erbringen, müssten mehrere Schritte unternommen werden.

Um die aufgestellte These zu verfestigen müssen die untersuchten Proben weiter gefasst werden. Wie schon erwähnt, spielt die molekulare Masse der NMH eine wichtige Rolle hinsichtlich ihrer antitumoralen Leistungsfähigkeit. Diese Beobachtung muss auf das gesamte Kollektiv der NMH übertragen werden, um diejenigen NMH aufzuspüren, welche für weitere Versuche von Bedeutung sein könnten. Eine erneute Analyse der diversen vorliegenden Studien zu Überlebensvorteilen durch NMH-Therapie bei Tumorpatienten muss Unterschiede in den Patientensubpopulationen berücksichtigen. Ein besonderes Augenmerk sollte auf Patienten mit lokal begrenzten, nicht metastasiertem Tumorleiden liegen. Es muss weitere Aufklärung des zu Grunde liegenden Mechanismus in die Wege geleitet werden. Der wichtigste Nachteil einer NMH-Therapie ist die bestehende Blutungsgefahr. Es stellt sich die Frage, welcher Koagulationsunabhängige Signalweg genutzt wird und ob dieser direkt angesteuert werden kann. Abschließend muss eine Differenzierung der Rollen einzelner Subpopulationen der EV vorgenommen werden – sie könnte die Türen zu einer neuen Klasse antitumoraler Therapeutika öffnen.

Zusammenfassend konnte die vorliegende Arbeit die zuvor aufgestellten Thesen, dass MV die Migration von Tumorzellen induzieren und dass diese Migration durch Tinzaparin inhibiert werden kann, durch eine methodenreiche Untersuchung belegen. Die verwendeten malignen Ergüsse von Patienten mit CRC, BC und SCLC enthielten TF-tragende MV, die eine Tumorzellmigration von Colo357-Zellen *in vitro* induzierten. Diese Migrationsinduktion konnte durch das NMH Tinzaparin sowie durch TFPI reduziert werden.

## 5 Zusammenfassung

Die Korrelation von fortgeschrittenen Tumorerkrankungen mit thromboembolischen Ereignissen ist jedem klinisch tätigen Onkologen wohl bekannt. Einerseits ist dieser Zusammenhang für die Patienten sehr beeinträchtigend - thromboembolische Ereignisse sind die dritthäufigste Todesursache bei Tumorpatienten -, andererseits ist aber auch die Prognose in Bezug auf die Tumorerkrankung bei Patienten mit einer Thrombophilie schlechter. Aus diesen Gründen wurde schon von Virchow im 19. Jahrhundert ein pathophysiologischer Zusammenhang zwischen Thrombophilien und Tumorerkrankungen postuliert. Erst seit der Entwicklung hochauflösender Durchflusszytometer, mit denen auch Partikel unter 500 nm dargestellt werden können, wurde klar, dass extrazelluläre Vesikel (EV) als pathophysiologisches Agens diese Wissenslücke schließen können. Wir wissen inzwischen, dass EV eine Mischung verschiedener Vesikel darstellen, die durch ihre Größe, ihre Zusammensetzung und ihre pathophysiologische Bedeutung unterschieden werden können. EV können offensichtlich prinzipiell von allen Zellen gebildet werden, wobei insbesondere eine Induktion durch Zytokine, wie z.B. TNF-alpha im Rahmen von Entzündungsvorgängen, nachgewiesen wurde.

In dieser Arbeit fokussieren wir auf Mikrovesikel (MV), eine Subpopulation der EV, die durch Ausstülpung der äußeren Zellmembran entstehen (Exosomen). MV sind für die Erforschung der oben genannten Zusammenhänge zwischen Gerinnungssystem und Tumorprogression besonders interessant, da sie in großen Mengen von Tumorzellen freigesetzt werden, insbesondere im entzündlichen Mikromilieu von Tumoren und die Oberflächenstrukturen der Ursprungszelle (Krebszelle) präsentieren, u.a. *Tissue-Factor* als Aktivator der extrinsischen Tenase. Um der klinischen Situation möglichst nahe zu kommen, haben wir MV aus malignen Ergüssen von Krebspatienten isoliert, denn die Zusammensetzung der Ergüsse entspricht am ehesten dem Mikromilieu von Tumoren. Durch eine Sequenz von Zentrifugationsschritten konnten wir unterschiedliche Subpopulationen der EV aus den malignen Ergüssen voneinander trennen und schließlich die für uns besonders interessanten MV anreichern. Diese MV wurden *ex-vivo* mit Hilfe eines hochauflösenden Durchflusszytometers charakterisiert und auf ihre gerinnungsinduzierende und migrationsinduzierende Potenz untersucht. Dazu verwendeten wir verschiedene ELISA-Techniken und einen Migrationsassay, mit dem die Induktion der Tumorzellmigration durch MV eindrucksvoll gezeigt werden konnte. Klinisch interessant ist, dass diese Induktion der Tumorzellmigration durch eine Vorinkubation der verwendeten

Test-Tumorzelllinie mit Tinzaparin, einem handelsüblichen niedermolekularen Heparin, signifikant gehemmt werden konnte. Wir konnten weiterhin zeigen, dass die Inkubation mit Tinzaparin zu einer TFPI-Ausschüttung der Zellen führt und dass rekombinantes TFPI die gleiche inhibitorische Wirkung auf die Migrationsinduktion durch MV hat. Die verwendeten Konzentrationen von Tinzaparin und TFPI orientierten sich dabei an *Plasma-Peak*-Konzentrationen, die bei Patienten nach s.c.-Gabe gefunden wurden.

Diese Arbeit erlaubt aufgrund der kleinen Probenzahl keine allgemeingültigen Rückschlüsse, zeigt aber einen Grundsatzbeweis (*proof of principles*) und weist auf mögliche Therapieoptionen hin. Die Verwendung von NMH als Thromboseprophylaxe bei Tumorpatienten könnte über die antimetastatische und antiangiogene Wirkung einen zusätzlichen Nutzen für Patienten bieten, insbesondere dann, wenn ein NMH eingesetzt wird, das zu einer hohen TFPI-Ausschüttung führt, wie dies bei Tinzaparin der Fall ist. Dieser potentiell zusätzliche Nutzen müsste in folgenden klinischen Studien geklärt werden, da die bisher vorliegenden klinischen Studien zu diesem Thema keine Korrelation zur TFPI-Ausschüttung durch die Behandlung untersucht haben.

## 6 Literatur

1. Bundesamt S. Anstieg der Todesfälle im Vergleich zum Vorjahr um 2 % (letzter Zugriff: 08.01.2018) 2013. Available from: [https://www.destatis.de/DE/PresseService/Presse/Pressemitteilungen/2013/12/PD13\\_422\\_232.html](https://www.destatis.de/DE/PresseService/Presse/Pressemitteilungen/2013/12/PD13_422_232.html).
2. Krebshilfe D. Krebs in Deutschland (letzter Zugriff: 08.01.2018) 2013. Available from: [http://www.krebshilfe.de/wir-informieren/ueber-krebs/krebszahlen.html?L=0no\\_cache%3DB%D8%29%A7%F0%DB%D8tttitle%3DSeminare](http://www.krebshilfe.de/wir-informieren/ueber-krebs/krebszahlen.html?L=0no_cache%3DB%D8%29%A7%F0%DB%D8tttitle%3DSeminare).
3. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin*. 2015 Jan-Feb;65(1):5-29. PubMed PMID: 25559415.
4. Roessner AP, U.; Müller-Hermelink, H. K. . *Allgemeine Pathologie und Grundlagen der Speziellen Pathologie*: Elsevier (Urban & Fischer); 2008. 546 p.
5. Jiang WG, Sanders AJ, Katoh M, Ungefroren H, Gieseler F, Prince M, et al. Tissue invasion and metastasis: Molecular, biological and clinical perspectives. *Semin Cancer Biol*. 2015 Dec;35 Suppl:S244-75. PubMed PMID: 25865774.
6. Stephens FOA, K. R. *Basics of oncology*. Berlin u.a.: Springer; 2009. XXIV, 375 p.
7. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 2009 Nov 25;139(5):871-90. PubMed PMID: 19945376.
8. Biddle A, Mackenzie IC. Cancer stem cells and EMT in carcinoma. *Cancer metastasis reviews*. 2012 Feb 3. PubMed PMID: 22302111.
9. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation*. 2009 Jun;119(6):1420-8. PubMed PMID: 19487818. Pubmed Central PMCID: 2689101.
10. Yilmaz M, Christofori G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer metastasis reviews*. 2009 Jun;28(1-2):15-33. PubMed PMID: 19169796.
11. Bourcy M, Suarez-Carmona M, Lambert J, Francart ME, Schroeder H, Delierneux C, et al. Tissue Factor Induced by Epithelial-Mesenchymal Transition Triggers a Procoagulant State That Drives Metastasis of Circulating Tumor Cells. *Cancer research*. 2016 Jul 15;76(14):4270-82. PubMed PMID: 27221703.
12. Trousseau A. Phlegmasia alba dolens. *Lectures on clinical medicine, delivered at the Hotel-Dieu, Paris*. 1865;5:281-332.
13. Piccioli A, Prandoni P, Ewenstein BM, Goldhaber SZ. Cancer and venous thromboembolism. *American heart journal*. 1996 Oct;132(4):850-5. PubMed PMID: 8831376.
14. Rickles FR, Edwards RL. Activation of blood coagulation in cancer: Trousseau's syndrome revisited. *Blood*. 1983 Jul;62(1):14-31. PubMed PMID: 6407544.
15. Tesselaar ME, Romijn FP, Van Der Linden IK, Prins FA, Bertina RM, Osanto S. Microparticle-associated tissue factor activity: a link between cancer and thrombosis? *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2007 Mar;5(3):520-7. PubMed PMID: 17166244. Epub 2006/12/15. eng.
16. Thomas GM, Panicot-Dubois L, Lacroix R, Dignat-George F, Lombardo D, Dubois C. Cancer cell-derived microparticles bearing P-selectin glycoprotein ligand 1 accelerate thrombus formation in vivo. *The Journal of experimental medicine*. 2009 Aug 31;206(9):1913-27. PubMed PMID: 19667060. Pubmed Central PMCID: 2737159.
17. Xie WZ, Leibl M, Clark MR, Dohrmann P, Kunze T, Gieseler F. Activation of the coagulation system in cancerogenesis and metastasation. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2005 Apr;59(3):70-5. PubMed PMID: 15795099.

18. Zwicker JI, Liebman HA, Neuberger D, Lacroix R, Bauer KA, Furie BC, et al. Tumor-derived tissue factor-bearing microparticles are associated with venous thromboembolic events in malignancy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009 Nov 15;15(22):6830-40. PubMed PMID: 19861441. Pubmed Central PMCID: 2783253. Epub 2009/10/29. eng.
19. De Cicco M. The prothrombotic state in cancer: pathogenic mechanisms. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2004 Jun;50(3):187-96. PubMed PMID: 15182825.
20. Falanga A, Rickles FR. Pathophysiology of the thrombophilic state in the cancer patient. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 1999;25(2):173-82. PubMed PMID: 10357085.
21. ten Cate H, Falanga A. Overview of the postulated mechanisms linking cancer and thrombosis. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2008;36(3-4):122-30. PubMed PMID: 19176985.
22. Ikushima S, Ono R, Fukuda K, Sakayori M, Awano N, Kondo K. Trousseau's syndrome: cancer-associated thrombosis. *Jpn J Clin Oncol*. 2016 Mar;46(3):204-8. PubMed PMID: 26546690.
23. Virchow R. *Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medicin*. Frankfurt a.M.: Verlag von Meidinger Sohn; 1856. 1024 p. p.
24. Schmidt RF. *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie ; mit 85 Tabellen ; mit herausnehmbarem Repetitorium*. 31., ©\*berarb. und aktualisierte Aufl. ed. Heidelberg: Springer; 2010. XXI, 979 S. p.
25. Goldhaber SZ. Risk factors for venous thromboembolism. *J Am Coll Cardiol*. 2010 Jun 29;56(1):1-7. PubMed PMID: 20620709.
26. Fennerty A. Venous thromboembolic disease and cancer. *Postgraduate medical journal*. 2006 Oct;82(972):642-8. PubMed PMID: 17068274. Pubmed Central PMCID: 2653906.
27. Lyman GH, Khorana AA, Kuderer NM, Lee AY, Arcelus JI, Balaban EP, et al. Venous thromboembolism prophylaxis and treatment in patients with cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*. 2013 Jun 10;31(17):2189-204. PubMed PMID: 23669224.
28. Fachgesellschaften AdWM. S2 Leitlinien: Diagnostik und Therapie der Venenthrombose und der Lungenembolie. Leitlinien-Register Nr 065/002 1-10-2010. 2015;9.
29. Blom JW, Doggen CJ, Osanto S, Rosendaal FR. Malignancies, prothrombotic mutations, and the risk of venous thrombosis. *JAMA*. 2005 Feb 9;293(6):715-22. PubMed PMID: 15701913.
30. Sorensen HT, Mellekjaer L, Olsen JH, Baron JA. Prognosis of cancers associated with venous thromboembolism. *The New England journal of medicine*. 2000 Dec 21;343(25):1846-50. PubMed PMID: 11117976.
31. Karow T, Lang-Roth R. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie vorlesungsorientierte Darstellung und klinischer Leitfaden für Studium und Praxis, 2011 ; [Markierung der Prüfungsfakten des "Hammerexamens" bis 04/2010 ; Therapieempfehlungen deutscher und internationaler Fachgesellschaften ; umfassende Dosierungen]*. 19. Aufl. ed. Pulheim: Karow; 2011. 1266 S. p.
32. Behrends JCB, Josef; Deutzmann, Rainer; Ehmke, Heimo; Frings, Stephan; Grissmer, Stephan; Hoth, Markus; Kurtz, Armin; Leipziger, Jens; Müller, Frank; Pedain, Claudia; Rettig, Jens; Wagner, Charlotte; Wischmeyer, Erhard. *Physiologie*. Stuttgart: Thieme; 2010. XXI, 830 S. p.
33. Levi M. Hemostasis in the 21st century. *The Netherlands journal of medicine*. 1999 Dec;55(6):280-6. PubMed PMID: 10628175.



34. Morrissey JH. Tissue factor: an enzyme cofactor and a true receptor. *Thrombosis and haemostasis*. 2001 Jul;86(1):66-74. PubMed PMID: 11487043.
35. Rickles FR, Patrierno S, Fernandez PM. Tissue factor, thrombin, and cancer. *Chest*. 2003 Sep;124(3 Suppl):58S-68S. PubMed PMID: 12970125.
36. Mackman N. Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2004 Jun;24(6):1015-22. PubMed PMID: 15117736.
37. Palta S, Saroa R, Palta A. Overview of the coagulation system. *Indian journal of anaesthesia*. 2014 Sep;58(5):515-23. PubMed PMID: 25535411. Pubmed Central PMCID: 4260295.
38. Key NS, Geng JG, Bach RR. Tissue factor; from Morawitz to microparticles. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*. 2007;118:165-73. PubMed PMID: 18528500. Pubmed Central PMCID: 1863600.
39. Carmeliet P, Mackman N, Moons L, Luther T, Gressens P, Van Vlaenderen I, et al. Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. *Nature*. 1996 Sep 5;383(6595):73-5. PubMed PMID: 8779717.
40. Camerer E, Kolsto AB, Prydz H. Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation. *Thromb Res*. 1996 Jan 1;81(1):1-41. PubMed PMID: 8747518.
41. Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B, Kling D, Roque M, Fallon JT, et al. Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999 Mar 2;96(5):2311-5. PubMed PMID: 10051638. Pubmed Central PMCID: 26780.
42. Toschi V, Gallo R, Lettino M, Fallon JT, Gertz SD, Fernandez-Ortiz A, et al. Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation*. 1997 Feb 4;95(3):594-9. PubMed PMID: 9024145.
43. Mezzano D, Matus V, Saez CG, Pereira J, Panes O. Tissue factor storage, synthesis and function in normal and activated human platelets. *Thromb Res*. 2008;122 Suppl 1:S31-6. PubMed PMID: 18691497.
44. Key NS. Platelet tissue factor: how did it get there and is it important? *Seminars in hematology*. 2008 Apr;45(2 Suppl 1):S16-20. PubMed PMID: 18544418.
45. Segawa K, Nagata S. An Apoptotic 'Eat Me' Signal: Phosphatidylserine Exposure. *Trends in cell biology*. 2015 Nov;25(11):639-50. PubMed PMID: 26437594.
46. Kalra H, Drummen GP, Mathivanan S. Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing. *Int J Mol Sci*. 2016;17(2). PubMed PMID: 26861301. Pubmed Central PMCID: PMC4783904.
47. Knight V, Lourensz D, Tchongue J, Correia J, Tipping P, Sievert W. Cytoplasmic domain of tissue factor promotes liver fibrosis in mice. *World journal of gastroenterology*. 2017 Aug 21;23(31):5692-9. PubMed PMID: 28883694. Pubmed Central PMCID: 5569283.
48. Rak J, Milsom C, May L, Klement P, Yu J. Tissue factor in cancer and angiogenesis: the molecular link between genetic tumor progression, tumor neovascularization, and cancer coagulopathy. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 2006 Feb;32(1):54-70. PubMed PMID: 16479463.
49. Zhang Y, Deng Y, Luther T, Muller M, Ziegler R, Waldherr R, et al. Tissue factor controls the balance of angiogenic and antiangiogenic properties of tumor cells in mice. *The Journal of clinical investigation*. 1994 Sep;94(3):1320-7. PubMed PMID: 7521887. Pubmed Central PMCID: 295218.
50. Gardiner C, Harrison P, Belting M, Boing A, Campello E, Carter BS, et al. Extracellular vesicles, tissue factor, cancer and thrombosis - discussion themes of the ISEV 2014 Educational Day. *J Extracell Vesicles*. 2015;4:26901. PubMed PMID: 25773446. Pubmed Central PMCID: PMC4359985.

51. Cossetti C, Iraci N, Mercer TR, Leonardi T, Alpi E, Drago D, et al. Extracellular vesicles from neural stem cells transfer IFN-gamma via Ifngr1 to activate Stat1 signaling in target cells. *Mol Cell*. 2014 Oct 23;56(2):193-204. PubMed PMID: 25242146. Pubmed Central PMCID: PMC4578249.
52. Thery C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nature reviews Immunology*. 2002 Aug;2(8):569-79. PubMed PMID: 12154376.
53. Ciardiello C, Cavallini L, Spinelli C, Yang J, Reis-Sobreiro M, de Candia P, et al. Focus on Extracellular Vesicles: New Frontiers of Cell-to-Cell Communication in Cancer. *Int J Mol Sci*. 2016;17(2). PubMed PMID: 26861306. Pubmed Central PMCID: PMC4783909.
54. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 2007 Jun;9(6):654-9. PubMed PMID: 17486113.
55. Ma X, Cai Y, He D, Zou C, Zhang P, Lo CY, et al. Transient receptor potential channel TRPC5 is essential for P-glycoprotein induction in drug-resistant cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012 Oct 02;109(40):16282-7. PubMed PMID: 22988121. Pubmed Central PMCID: 3479621.
56. Samuel M, Bleackley M, Anderson M, Mathivanan S. Extracellular vesicles including exosomes in cross kingdom regulation: a viewpoint from plant-fungal interactions. *Front Plant Sci*. 2015;6:766. PubMed PMID: 26442078. Pubmed Central PMCID: PMC4585280.
57. Burnier L, Fontana P, Kwak BR, Angelillo-Scherrer A. Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine. *Thrombosis and haemostasis*. 2009 Mar;101(3):439-51. PubMed PMID: 19277403. Epub 2009/03/12. eng.
58. Gyorgy B, Szabo TG, Pasztoi M, Pal Z, Misjak P, Aradi B, et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2011 Aug;68(16):2667-88. PubMed PMID: 21560073. Pubmed Central PMCID: 3142546.
59. Keerthikumar S, Gangoda L, Liem M, Fonseka P, Atukorala I, Ozcitti C, et al. Proteogenomic analysis reveals exosomes are more oncogenic than ectosomes. *Oncotarget*. 2015 Jun 20;6(17):15375-96. PubMed PMID: 25944692. Pubmed Central PMCID: PMC4558158.
60. Trams EG, Lauter CJ, Salem N, Jr., Heine U. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim Biophys Acta*. 1981 Jul 6;645(1):63-70. PubMed PMID: 6266476.
61. Pan BT, Johnstone RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell*. 1983 Jul;33(3):967-78. PubMed PMID: 6307529.
62. Colombo M, Moita C, van Niel G, Kowal J, Vigneron J, Benaroch P, et al. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *Journal of cell science*. 2013 Dec 15;126(Pt 24):5553-65. PubMed PMID: 24105262.
63. Pols MS, Klumperman J. Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Exp Cell Res*. 2009 May 15;315(9):1584-92. PubMed PMID: 18930046.
64. Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, Rajendran L, Wenzel D, Wieland F, et al. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science*. 2008 Feb 29;319(5867):1244-7. PubMed PMID: 18309083.
65. Garnier D, Magnus N, Lee TH, Bentley V, Meehan B, Milsom C, et al. Cancer cells induced to express mesenchymal phenotype release exosome-like extracellular vesicles carrying tissue factor. *The Journal of biological chemistry*. 2012 Dec 21;287(52):43565-72. PubMed PMID: 23118232. Pubmed Central PMCID: PMC3527943.

66. Subra C, Laulagnier K, Perret B, Record M. Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. *Biochimie*. 2007 Feb;89(2):205-12. PubMed PMID: 17157973.
67. Wubbolts R, Leckie RS, Veenhuizen PT, Schwarzmann G, Mobius W, Hoernschemeyer J, et al. Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. *The Journal of biological chemistry*. 2003 Mar 28;278(13):10963-72. PubMed PMID: 12519789.
68. Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, Melief CJ, et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *The Journal of experimental medicine*. 1996 Mar 1;183(3):1161-72. PubMed PMID: 8642258. Pubmed Central PMCID: PMC2192324.
69. Wolfers J, Lozier A, Raposo G, Regnault A, They C, Masurier C, et al. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med*. 2001 Mar;7(3):297-303. PubMed PMID: 11231627.
70. Zwicker JJ, Trenor CC, 3rd, Furie BC, Furie B. Tissue factor-bearing microparticles and thrombus formation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2011 Apr;31(4):728-33. PubMed PMID: 21252066. Epub 2011/01/22. eng.
71. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *British journal of haematology*. 1967 May;13(3):269-88. PubMed PMID: 6025241.
72. Burger D, Schock S, Thompson CS, Montezano AC, Hakim AM, Touyz RM. Microparticles: biomarkers and beyond. *Clin Sci (Lond)*. 2013 Apr;124(7):423-41. PubMed PMID: 23249271. Epub 2012/12/20. eng.
73. van Doormaal FF, Kleinjan A, Di Nisio M, Buller HR, Nieuwland R. Cell-derived microvesicles and cancer. *The Netherlands journal of medicine*. 2009 Jul-Aug;67(7):266-73. PubMed PMID: 19687520.
74. D'Souza-Schorey C, Clancy JW. Tumor-derived microvesicles: shedding light on novel microenvironment modulators and prospective cancer biomarkers. *Genes & development*. 2012 Jun 15;26(12):1287-99. PubMed PMID: 22713869. Pubmed Central PMCID: 3387656.
75. Burger D, Montezano AC, Nishigaki N, He Y, Carter A, Touyz RM. Endothelial microparticle formation by angiotensin II is mediated via Ang II receptor type I/NADPH oxidase/ Rho kinase pathways targeted to lipid rafts. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2011 Aug;31(8):1898-907. PubMed PMID: 21597004.
76. van den Akker J, van Weert A, Afink G, Bakker EN, van der Pol E, Boing AN, et al. Transglutaminase 2 is secreted from smooth muscle cells by transamidation-dependent microparticle formation. *Amino acids*. 2012 Feb;42(2-3):961-73. PubMed PMID: 21830119. Pubmed Central PMCID: 3266506.
77. Stahl AL, Sartz L, Karpman D. Complement activation on platelet-leukocyte complexes and microparticles in enterohemorrhagic *Escherichia coli*-induced hemolytic uremic syndrome. *Blood*. 2011 May 19;117(20):5503-13. PubMed PMID: 21447825.
78. Abid Hussein MN, Boing AN, Sturk A, Hau CM, Nieuwland R. Inhibition of microparticle release triggers endothelial cell apoptosis and detachment. *Thrombosis and haemostasis*. 2007 Nov;98(5):1096-107. PubMed PMID: 18000616.
79. Brown MD, Fairheller DL, Thakkar S, Veerabhadrapa P, Park JY. Racial differences in tumor necrosis factor-alpha-induced endothelial microparticles and interleukin-6 production. *Vascular health and risk management*. 2011;7:541-50. PubMed PMID: 21966220. Pubmed Central PMCID: 3180509.
80. Devaraj S, Kumaresan PR, Jialal I. C-reactive protein induces release of both endothelial microparticles and circulating endothelial cells in vitro and in vivo: further evidence of endothelial dysfunction. *Clinical chemistry*. 2011 Dec;57(12):1757-61. PubMed PMID: 21980169.

81. Pap E, Pallinger E, Pasztoi M, Falus A. Highlights of a new type of intercellular communication: microvesicle-based information transfer. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]*. 2009 Jan;58(1):1-8. PubMed PMID: 19132498.
82. Simoncini S, Njock MS, Robert S, Camoin-Jau L, Sampol J, Harle JR, et al. TRAIL/Apo2L mediates the release of procoagulant endothelial microparticles induced by thrombin in vitro: a potential mechanism linking inflammation and coagulation. *Circulation research*. 2009 Apr 24;104(8):943-51. PubMed PMID: 19265041.
83. Sekula M, Janawa G, Stankiewicz E, Stepień E. Endothelial microparticle formation in moderate concentrations of homocysteine and methionine in vitro. *Cellular & molecular biology letters*. 2011 Mar;16(1):69-78. PubMed PMID: 21161416.
84. Terrisse AD, Puech N, Allart S, Gourdy P, Xuereb JM, Payrastre B, et al. Internalization of microparticles by endothelial cells promotes platelet/endothelial cell interaction under flow. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2010 Dec;8(12):2810-9. PubMed PMID: 21029362.
85. Bilyy RO, Shkandina T, Tomin A, Munoz LE, Franz S, Antonyuk V, et al. Macrophages discriminate glycosylation patterns of apoptotic cell-derived microparticles. *The Journal of biological chemistry*. 2012 Jan 2;287(1):496-503. PubMed PMID: 22074924. Pubmed Central PMCID: 3249103.
86. Faille D, El-Assaad F, Mitchell AJ, Alessi MC, Chimini G, Fusai T, et al. Endocytosis and intracellular processing of platelet microparticles by brain endothelial cells. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2012 Aug;16(8):1731-8. PubMed PMID: 21883894.
87. Willekens FL, Werre JM, Kruijt JK, Roerdinkholder-Stoelwinder B, Groenen-Dopp YA, van den Bos AG, et al. Liver Kupffer cells rapidly remove red blood cell-derived vesicles from the circulation by scavenger receptors. *Blood*. 2005 Mar 1;105(5):2141-5. PubMed PMID: 15550489.
88. Chen GY, Nunez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nature reviews Immunology*. 2010 Dec;10(12):826-37. PubMed PMID: 21088683. Pubmed Central PMCID: 3114424.
89. Muralidharan-Chari V, Clancy JW, Sedgwick A, D'Souza-Schorey C. Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *Journal of cell science*. 2010 May 15;123(Pt 10):1603-11. PubMed PMID: 20445011. Pubmed Central PMCID: PMC2864708.
90. Leroyer AS, Ebrahimian TG, Cochain C, Recalde A, Blanc-Brude O, Mees B, et al. Microparticles from ischemic muscle promotes postnatal vasculogenesis. *Circulation*. 2009 Jun 2;119(21):2808-17. PubMed PMID: 19451354.
91. Owens AP, 3rd, Mackman N. Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circulation research*. 2011 May 13;108(10):1284-97. PubMed PMID: 21566224. Pubmed Central PMCID: 3144708.
92. Shet AS, Aras O, Gupta K, Hass MJ, Rausch DJ, Saba N, et al. Sick blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood*. 2003 Oct 1;102(7):2678-83. PubMed PMID: 12805058.
93. Sinauridze EI, Kireev DA, Popenko NY, Pichugin AV, Panteleev MA, Krymskaya OV, et al. Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets. *Thrombosis and haemostasis*. 2007 Mar;97(3):425-34. PubMed PMID: 17334510.
94. Ludwig RJ, Boehme B, Podda M, Henschler R, Jager E, Tandi C, et al. Endothelial P-selectin as a target of heparin action in experimental melanoma lung metastasis. *Cancer research*. 2004 Apr 15;64(8):2743-50. PubMed PMID: 15087389.

95. Arora P, Ricks TK, Trejo J. Protease-activated receptor signalling, endocytic sorting and dysregulation in cancer. *Journal of cell science*. 2007 Mar 15;120(Pt 6):921-8. PubMed PMID: 17344429. Epub 2007/03/09. eng.
96. Ban LA, Shackel NA, McLennan SV. Extracellular Vesicles: A New Frontier in Biomarker Discovery for Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Mol Sci*. 2016;17(3). PubMed PMID: 26985892.
97. Di Vizio D, Morello M, Dudley AC, Schow PW, Adam RM, Morley S, et al. Large oncosomes in human prostate cancer tissues and in the circulation of mice with metastatic disease. *The American journal of pathology*. 2012 Nov;181(5):1573-84. PubMed PMID: 23022210. Pubmed Central PMCID: 3483805.
98. Gieseler F, Ungefroren H, Settmacher U, Hollenberg MD, Kaufmann R. Proteinase-activated receptors (PARs) - focus on receptor-receptor-interactions and their physiological and pathophysiological impact. *Cell communication and signaling : CCS*. 2013;11:86. PubMed PMID: 24215724. Pubmed Central PMCID: 3842752.
99. Macfarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, Hunter GD, Plevin R. Proteinase-activated receptors. *Pharmacological reviews*. 2001 Jun;53(2):245-82. PubMed PMID: 11356985. Epub 2001/05/18. eng.
100. Dery O, Corvera CU, Steinhoff M, Bunnett NW. Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases. *The American journal of physiology*. 1998 Jun;274(6 Pt 1):C1429-52. PubMed PMID: 9696685.
101. Xu WF, Andersen H, Whitmore TE, Presnell SR, Yee DP, Ching A, et al. Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998 Jun 9;95(12):6642-6. PubMed PMID: 9618465. Pubmed Central PMCID: 22580.
102. DeFea KA, Zalevsky J, Thoma MS, Dery O, Mullins RD, Bunnett NW. beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *The Journal of cell biology*. 2000 Mar 20;148(6):1267-81. PubMed PMID: 10725339. Pubmed Central PMCID: 2174299.
103. Covic L, Gresser AL, Kuliopulos A. Biphasic kinetics of activation and signaling for PAR1 and PAR4 thrombin receptors in platelets. *Biochemistry*. 2000 May 9;39(18):5458-67. PubMed PMID: 10820018.
104. Shapiro MJ, Weiss EJ, Faruqi TR, Coughlin SR. Protease-activated receptors 1 and 4 are shut off with distinct kinetics after activation by thrombin. *The Journal of biological chemistry*. 2000 Aug 18;275(33):25216-21. PubMed PMID: 10837487.
105. Nakanishi-Matsui M, Zheng YW, Sulciner DJ, Weiss EJ, Ludeman MJ, Coughlin SR. PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin. *Nature*. 2000 Apr 6;404(6778):609-13. PubMed PMID: 10766244.
106. Cunningham MR, McIntosh KA, Padiani JD, Robben J, Cooke AE, Nilsson M, et al. Novel role for proteinase-activated receptor 2 (PAR2) in membrane trafficking of proteinase-activated receptor 4 (PAR4). *The Journal of biological chemistry*. 2012 May 11;287(20):16656-69. PubMed PMID: 22411985. Pubmed Central PMCID: 3351358.
107. Sevigny LM, Austin KM, Zhang P, Kasuda S, Koukos G, Sharifi S, et al. Protease-activated receptor-2 modulates protease-activated receptor-1-driven neointimal hyperplasia. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2011 Dec;31(12):e100-6. PubMed PMID: 21940952. Pubmed Central PMCID: 3241440.
108. Ando S, Otani H, Yagi Y, Kawai K, Araki H, Fukuhara S, et al. Proteinase-activated receptor 4 stimulation-induced epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells. *Respiratory research*. 2007;8:31. PubMed PMID: 17433115. Pubmed Central PMCID: 1855055.
109. Jenkins RG, Su X, Su G, Scotton CJ, Camerer E, Laurent GJ, et al. Ligation of protease-activated receptor 1 enhances alpha(v)beta6 integrin-dependent TGF-beta

- activation and promotes acute lung injury. *The Journal of clinical investigation*. 2006 Jun;116(6):1606-14. PubMed PMID: 16710477. Pubmed Central PMCID: 1462943.
110. Moriyuki K, Nagataki M, Sekiguchi F, Nishikawa H, Kawabata A. Signal transduction for formation/release of interleukin-8 caused by a PAR2-activating peptide in human lung epithelial cells. *Regulatory peptides*. 2008 Jan 10;145(1-3):42-8. PubMed PMID: 17854923.
111. Huang Z, Miao X, Luan Y, Zhu L, Kong F, Lu Q, et al. PAR1-stimulated platelet releasate promotes angiogenic activities of endothelial progenitor cells more potently than PAR4-stimulated platelet releasate. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2015 Mar;13(3):465-76. PubMed PMID: 25495701.
112. Houle S, Papez MD, Ferazzini M, Hollenberg MD, Vergnolle N. Neutrophils and the kallikrein-kinin system in proteinase-activated receptor 4-mediated inflammation in rodents. *British journal of pharmacology*. 2005 Nov;146(5):670-8. PubMed PMID: 16100525. Pubmed Central PMCID: 1751199.
113. McDougall JJ, Zhang C, Cellars L, Joubert E, Dixon CM, Vergnolle N. Triggering of proteinase-activated receptor 4 leads to joint pain and inflammation in mice. *Arthritis and rheumatism*. 2009 Mar;60(3):728-37. PubMed PMID: 19248120.
114. Mosnier LO, Sinha RK, Burnier L, Bouwens EA, Griffin JH. Biased agonism of protease-activated receptor 1 by activated protein C caused by noncanonical cleavage at Arg46. *Blood*. 2012 Dec 20;120(26):5237-46. PubMed PMID: 23149848. Pubmed Central PMCID: 3537315.
115. Schuepbach RA, Madon J, Ender M, Galli P, Riewald M. Protease-activated receptor-1 cleaved at R46 mediates cytoprotective effects. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2012 Aug;10(8):1675-84. PubMed PMID: 22712885. Pubmed Central PMCID: 3419798.
116. Russell FA, McDougall JJ. Proteinase activated receptor (PAR) involvement in mediating arthritis pain and inflammation. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]*. 2009 Mar;58(3):119-26. PubMed PMID: 19184346.
117. Nishimura S, Ishikura H, Matsunami M, Shinozaki Y, Sekiguchi F, Naruse M, et al. The proteinase/proteinase-activated receptor-2/transient receptor potential vanilloid-1 cascade impacts pancreatic pain in mice. *Life sciences*. 2010 Nov 20;87(19-22):643-50. PubMed PMID: 20932849.
118. Chen Y, Yang C, Wang ZJ. Proteinase-activated receptor 2 sensitizes transient receptor potential vanilloid 1, transient receptor potential vanilloid 4, and transient receptor potential ankyrin 1 in paclitaxel-induced neuropathic pain. *Neuroscience*. 2011 Oct 13;193:440-51. PubMed PMID: 21763756.
119. Alexander ET, Minton AR, Hayes CS, Goss A, Van Ryn J, Gilmour SK. Thrombin inhibition and cyclophosphamide synergistically block tumor progression and metastasis. *Cancer Biol Ther*. 2015 Dec 2;16(12):1802-11. PubMed PMID: 26383051.
120. Chen KD, Huang KT, Tsai MC, Wu CH, Kuo IY, Chen LY, et al. Coagulation factor VII and malignant progression of hepatocellular carcinoma. *Cell Death Dis*. 2016;7:e2110. PubMed PMID: 26913602.
121. Tesfamariam B. Involvement of platelets in tumor cell metastasis. *Pharmacol Ther*. 2016 Jan;157:112-9. PubMed PMID: 26615781.
122. Elste AP, Petersen I. Expression of proteinase-activated receptor 1-4 (PAR 1-4) in human cancer. *J Mol Histol*. 2010 Apr;41(2-3):89-99. PubMed PMID: 20563836.
123. D'Andrea MR, Derian CK, Santulli RJ, Andrade-Gordon P. Differential expression of protease-activated receptors-1 and -2 in stromal fibroblasts of normal, benign, and malignant human tissues. *The American journal of pathology*. 2001 Jun;158(6):2031-41. PubMed PMID: 11395381. Pubmed Central PMCID: 1891970.

124. Leurer C, Rabbani SA. Plasminogen Activator System—Diagnostic, Prognostic and Therapeutic Implications in Breast Cancer. 2015.
125. McMahon BJ, Kwaan HC. Components of the Plasminogen-Plasmin System as Biologic Markers for Cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2015;867:145-56. PubMed PMID: 26530365.
126. Falanga A, Schieppati F, Russo D. Cancer Tissue Procoagulant Mechanisms and the Hypercoagulable State of Patients with Cancer. *Seminars in thrombosis and hemostasis.* 2015 Oct;41(7):756-64. PubMed PMID: 26408922.
127. Morris DR, Ding Y, Ricks TK, Gullapalli A, Wolfe BL, Trejo J. Protease-activated receptor-2 is essential for factor viia and xa-induced signaling, migration, and invasion of breast cancer cells. *Cancer research.* 2006;66(1):307-14.
128. McCoy KL, Traynelis SF, Hepler JR. PAR1 and PAR2 couple to overlapping and distinct sets of G proteins and linked signaling pathways to differentially regulate cell physiology. *Mol Pharmacol.* 2010 Jun;77(6):1005-15. PubMed PMID: 20215560. Pubmed Central PMCID: PMC2879918.
129. von Thun A, Birtwistle M, Kalna G, Grindlay J, Strachan D, Kolch W, et al. ERK2 drives tumour cell migration in three-dimensional microenvironments by suppressing expression of Rab17 and liprin-beta2. *Journal of cell science.* 2012 Mar 15;125(Pt 6):1465-77. PubMed PMID: 22328529.
130. Connolly AJ, Ishihara H, Kahn ML, Farese RV, Jr., Coughlin SR. Role of the thrombin receptor in development and evidence for a second receptor. *Nature.* 1996 Jun 6;381(6582):516-9. PubMed PMID: 8632823.
131. Griffin CT, Srinivasan Y, Zheng YW, Huang W, Coughlin SR. A role for thrombin receptor signaling in endothelial cells during embryonic development. *Science.* 2001 Aug 31;293(5535):1666-70. PubMed PMID: 11533492.
132. Etulain J, Mena HA, Negrotto S, Schattner M. Stimulation of PAR-1 or PAR-4 promotes similar pattern of VEGF and endostatin release and pro-angiogenic responses mediated by human platelets. *Platelets.* 2015;26(8):799-804. PubMed PMID: 26082997.
133. Ducroc R, Bontemps C, Marazova K, Devaud H, Darmoul D, Laburthe M. Trypsin is produced by and activates protease-activated receptor-2 in human cancer colon cells: evidence for new autocrine loop. *Life sciences.* 2002 Feb 8;70(12):1359-67. PubMed PMID: 11883712.
134. Ge L, Shenoy SK, Lefkowitz RJ, DeFea K. Constitutive protease-activated receptor-2-mediated migration of MDA MB-231 breast cancer cells requires both beta-arrestin-1 and -2. *The Journal of biological chemistry.* 2004 Dec 31;279(53):55419-24. PubMed PMID: 15489220.
135. Booden MA, Eckert LB, Der CJ, Trejo J. Persistent signaling by dysregulated thrombin receptor trafficking promotes breast carcinoma cell invasion. *Molecular and cellular biology.* 2004 Mar;24(5):1990-9. PubMed PMID: 14966279. Pubmed Central PMCID: 350540.
136. Haas S, Encke A, Kopp I. [German S3 practice guidelines on prevention of venous thromboembolism--New and established evidence]. *Deutsche medizinische Wochenschrift.* 2016 Apr;141(7):453-6. PubMed PMID: 26934866. S3-Leitlinie zur Prophylaxe der venösen Thromboembolie--Neues und Bewährtes.
137. Sandset PM. Tissue factor pathway inhibitor (TFPI)--an update. *Haemostasis.* 1996 Oct;26 Suppl 4:154-65. PubMed PMID: 8979119.
138. Ahamed J, Belting M, Ruf W. Regulation of tissue factor-induced signaling by endogenous and recombinant tissue factor pathway inhibitor 1. *Blood.* 2005 Mar 15;105(6):2384-91. PubMed PMID: 15550483.
139. Francischetti IM, Valenzuela JG, Andersen JF, Mather TN, Ribeiro JM. Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick,

- Ixodes scapularis: identification of factor X and factor Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/tissue factor complex. *Blood*. 2002 May 15;99(10):3602-12. PubMed PMID: 11986214.
140. Tinholt M, Vollan HK, Sahlberg KK, Jernstrom S, Kaveh F, Lingjaerde OC, et al. Tumor expression, plasma levels and genetic polymorphisms of the coagulation inhibitor TFPI are associated with clinicopathological parameters and survival in breast cancer, in contrast to the coagulation initiator TF. *Breast Cancer Res*. 2015;17:44. PubMed PMID: 25882602. Pubmed Central PMCID: PMC4423106.
141. Hackeng TM, Rosing J. Protein S as cofactor for TFPI. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2009 Dec;29(12):2015-20. PubMed PMID: 19661488.
142. Chand HS, Du X, Ma D, Inzunza HD, Kamei S, Foster D, et al. The effect of human tissue factor pathway inhibitor-2 on the growth and metastasis of fibrosarcoma tumors in athymic mice. *Blood*. 2004 Feb 1;103(3):1069-77. PubMed PMID: 14525759.
143. Chang JY, Monroe DM, Oliver JA, Roberts HR. TFPIbeta, a second product from the mouse tissue factor pathway inhibitor (TFPI) gene. *Thrombosis and haemostasis*. 1999 Jan;81(1):45-9. PubMed PMID: 9974373.
144. Lee KF, Salvaris EJ, Roussel JC, Robson SC, d'Apice AJ, Cowan PJ. Recombinant pig TFPI efficiently regulates human tissue factor pathways. *Xenotransplantation*. 2008 May-Jun;15(3):191-7. PubMed PMID: 18611227. Pubmed Central PMCID: PMC2517609.
145. Monroe DM, Key NS. The tissue factor-factor VIIa complex: procoagulant activity, regulation, and multitasking. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2007 Jun;5(6):1097-105. PubMed PMID: 17567444.
146. Stavik B, Tinholt M, Sletten M, Skretting G, Sandset PM, Iversen N. TFPIalpha and TFPIbeta are expressed at the surface of breast cancer cells and inhibit TF-FVIIa activity. *J Hematol Oncol*. 2013;6:5. PubMed PMID: 23320987. Pubmed Central PMCID: PMC3556101.
147. Wood JP, Bunce MW, Maroney SA, Tracy PB, Camire RM, Mast AE. Tissue factor pathway inhibitor-alpha inhibits prothrombinase during the initiation of blood coagulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013 Oct 29;110(44):17838-43. PubMed PMID: 24127605. Pubmed Central PMCID: PMC3816478.
148. Maroney SA, Mast AE. New insights into the biology of tissue factor pathway inhibitor. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2015 Jun;13 Suppl 1:S200-7. PubMed PMID: 26149025. Pubmed Central PMCID: PMC4604745.
149. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*. 1998 May 15;91(10):3527-61. PubMed PMID: 9572988.
150. Mousa SA, Johansen K. Pharmacodynamic effects of low molecular weight heparin in obese subjects following subcutaneous administration of 75 IU/kg on plasma tissue factor pathway inhibitor and nitric oxide. *Int Angiol*. 2005 Mar;24(1):40-2. PubMed PMID: 15876997.
151. Linhardt RJ, Gunay NS. Production and chemical processing of low molecular weight heparins. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 1999;25 Suppl 3:5-16. PubMed PMID: 10549711. Epub 1999/11/05. eng.
152. Wardrop D, Keeling D. The story of the discovery of heparin and warfarin. *British journal of haematology*. 2008 Jun;141(6):757-63. PubMed PMID: 18355382. Epub 2008/03/22. eng.
153. Bijsterveld NR, Hettiarachchi R, Peters R, Prins MH, Levi M, Buller HR. Low-molecular weight heparins in venous and arterial thrombotic disease. *Thrombosis and haemostasis*. 1999 Sep;82 Suppl 1:139-47. PubMed PMID: 10695506. Epub 2000/03/01. eng.



154. Gray E, Mulloy B, Barrowcliffe TW. Heparin and low-molecular-weight heparin. *Thrombosis and haemostasis*. 2008 May;99(5):807-18. PubMed PMID: 18449410. Epub 2008/05/02. eng.
155. Fared J, Walenga JM. Why differentiate low molecular weight heparins for venous thromboembolism? *Thrombosis journal*. 2007;5:8. PubMed PMID: 17578577. Pubmed Central PMCID: 1936420. Epub 2007/06/21. eng.
156. Valiukiene L, Naudziunas A, Unikauskas A. [Treatment and prophylaxis of deep venous thrombosis with low molecular weight heparins (meta-analysis of clinical trials)]. *Medicina (Kaunas)*. 2003;39(4):352-8. PubMed PMID: 12738903. Epub 2003/05/10. Giliuju venu trombozes gydymas bei profilaktika mazos molekulinės masės hepariniais (klinikinių tyrimų metaanalizė). lit.
157. Dolovich LR, Ginsberg JS, Douketis JD, Holbrook AM, Cheah G. A meta-analysis comparing low-molecular-weight heparins with unfractionated heparin in the treatment of venous thromboembolism: examining some unanswered questions regarding location of treatment, product type, and dosing frequency. *Archives of internal medicine*. 2000 Jan 24;160(2):181-8. PubMed PMID: 10647756. Epub 2000/01/27. eng.
158. Siragusa S, Cosmi B, Piovella F, Hirsh J, Ginsberg JS. Low-molecular-weight heparins and unfractionated heparin in the treatment of patients with acute venous thromboembolism: results of a meta-analysis. *The American journal of medicine*. 1996 Mar;100(3):269-77. PubMed PMID: 8629671. Epub 1996/03/01. eng.
159. Rajgopal R, Bear M, Butcher MK, Shaughnessy SG. The effects of heparin and low molecular weight heparins on bone. *Thromb Res*. 2008;122(3):293-8. PubMed PMID: 17716711.
160. Davenport A. Low-molecular-weight heparin for routine hemodialysis. *Hemodialysis international International Symposium on Home Hemodialysis*. 2008 Oct;12 Suppl 2:S34-7. PubMed PMID: 18837768. Epub 2008/12/05. eng.
161. Cheer SM, Dunn CJ, Foster R. Tinzaparin sodium: a review of its pharmacology and clinical use in the prophylaxis and treatment of thromboembolic disease. *Drugs*. 2004;64(13):1479-502. PubMed PMID: 15212562. Epub 2004/06/24. eng.
162. Mousa SA. The low molecular weight heparin, tinzaparin, in thrombosis and beyond. *Cardiovascular drug reviews*. 2002 Fall;20(3):199-216. PubMed PMID: 12397367. Epub 2002/10/25. eng.
163. Wilbur K, Lynd LD, Sadatsafavi M. Low-molecular-weight heparin versus unfractionated heparin for prophylaxis of venous thromboembolism in medicine patients--a pharmacoeconomic analysis. *Clinical and applied thrombosis/hemostasis : official journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*. 2011 Oct;17(5):454-65. PubMed PMID: 20699258. Epub 2010/08/12. eng.
164. Lane DA, Denton J, Flynn AM, Thunberg L, Lindahl U. Anticoagulant activities of heparin oligosaccharides and their neutralization by platelet factor 4. *The Biochemical journal*. 1984 Mar 15;218(3):725-32. PubMed PMID: 6721831. Pubmed Central PMCID: 1153400. Epub 1984/03/15. eng.
165. Fared J, Fu K, Yang LH, Hoppensteadt DA. Pharmacokinetics of low molecular weight heparins in animal models. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 1999;25 Suppl 3:51-5. PubMed PMID: 10549716.
166. Nutescu EA, Shapiro NL, Feinstein H, Rivers CW. Tinzaparin: considerations for use in clinical practice. *The Annals of pharmacotherapy*. 2003 Dec;37(12):1831-40. PubMed PMID: 14632588. Epub 2003/11/25. eng.
167. Amirhosravi A, Mousa SA, Amaya M, Francis JL. Antimetastatic effect of tinzaparin, a low-molecular-weight heparin. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2003 Sep;1(9):1972-6. PubMed PMID: 12941039.

168. Neely JL, Carlson SS, Lenhart SE. Tinzaparin sodium: a low-molecular-weight heparin. *American journal of health-system pharmacy : AJHP : official journal of the American Society of Health-System Pharmacists*. 2002 Aug 1;59(15):1426-36. PubMed PMID: 12166042. Epub 2002/08/09. eng.
169. Pineo GF, Hull RD. Tinzaparin in the treatment of venous thromboembolism. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2003 Dec;4(12):2355-62. PubMed PMID: 14640933. Epub 2003/12/04. eng.
170. Mousa SA, Mohamed S. Anti-angiogenic mechanisms and efficacy of the low molecular weight heparin, tinzaparin: anti-cancer efficacy. *Oncology reports*. 2004 Oct;12(4):683-8. PubMed PMID: 15375485.
171. Sidana A, Kadakia M, Friend JC, Krane LS, Su D, Merino MJ, et al. Determinants and prognostic implications of malignant ascites in metastatic papillary renal cancer. *Urologic oncology*. 2017 Mar;35(3):114 e9- e14. PubMed PMID: 27914873. Pubmed Central PMCID: 5318247.
172. Smolle E, Taucher V, Haybaeck J. Malignant ascites in ovarian cancer and the role of targeted therapeutics. *Anticancer research*. 2014 Apr;34(4):1553-61. PubMed PMID: 24692682.
173. Lacroix R, Judicone C, Poncelet P, Robert S, Arnaud L, Sampol J, et al. Impact of pre-analytical parameters on the measurement of circulating microparticles: towards standardization of protocol. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2012 Mar;10(3):437-46. PubMed PMID: 22212198.
174. Haemostasis TISoTa. 56th Annual Scientific Standardization Committee Meeting. 2010 May 22 - 25:75-6 pp.
175. Stagnara J, Garnache Ottou F, Angelot F, Mourey G, Seilles E, Biichle S, et al. Correlation between platelet-derived microparticle enumeration by flow cytometry and phospholipid-dependent procoagulant activity in microparticles: the centrifugation step matters! *Thrombosis and haemostasis*. 2012 Jun;107(6):1185-7. PubMed PMID: 22476436. Pubmed Central PMCID: 3902041.
176. Gieseler F, Gamperl H, Theophil F, Stenzel I, Quecke T, Ungefroren H, et al. Using annexin V-coated magnetic beads to capture active tissue factor-bearing microparticles from body fluids. *Cell Biol Int*. 2014 Feb;38(2):277-81. PubMed PMID: 24431236.
177. Heijnen HF, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood*. 1999 Dec 1;94(11):3791-9. PubMed PMID: 10572093.
178. Muralidharan-Chari V, Clancy J, Plou C, Romao M, Chavrier P, Raposo G, et al. ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles. *Current Biology*. 2009;19(22):1875-85.
179. Morgan RT, Woods LK, Moore GE, Quinn LA, McGavran L, Gordon SG. Human cell line (COLO 357) of metastatic pancreatic adenocarcinoma. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 1980 May 15;25(5):591-8. PubMed PMID: 6989766.
180. Beckman Coulter I. Gebrauchsanleitund\_deutsch - Navios-Durchflusszytometer. 2010:606 S.
181. www.semrock.com. Funktionsweise Durchflusszytometrie (letzter Zugriff: 08.01.2018) 2015. Available from: [https://www.semrock.com/Data/Sites/1/semrockimages/drawings/flow-cytometry\\_500.jpg](https://www.semrock.com/Data/Sites/1/semrockimages/drawings/flow-cytometry_500.jpg).
182. Beckman Coulter I. Instructions for Use; CytoFLEX, Flow Cytometer. 2015:360 p.
183. BioCytex. Megamix - Beads for cytometer settings in microparticle analysis 2011:2 p.
184. www.ebiotrade.com. xCELLigence\_Funktionsweise (letzter Zugriff: 08.01.2018) 2008. Available from: <http://www.ebiotrade.com/newsf/pic/200863163433.gif>.

185. LEO Pharma I. PRODUCT MONOGRAPH; Innohep®; tinzaparin sodium; Sterile solution for SC injection; 10,000 anti-Xa IU/mL and 20,000 anti-Xa IU/mL; Ph. Eur.; Anticoagulant / Antithrombotic. 2011 February 3, 2011:34 p. eng.
186. Akl EA, Kahale L, Terrenato I, Neumann I, Yosuiico VE, Barba M, et al. Oral anticoagulation in patients with cancer who have no therapeutic or prophylactic indication for anticoagulation. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014 Jun 04(6):CD006466. PubMed PMID: 24897382.
187. Mousa SA. Comparative pharmacodynamic assessment of the antiangiogenesis activity of heparin and low-molecular-weight heparin fractions: structure-function relationship. *Clinical and applied thrombosis/hemostasis : official journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis.* 2013 Jan-Feb;19(1):48-54. PubMed PMID: 22327829.
188. Akl EA, Kahale LA, Ballout RA, Barba M, Yosuiico VE, van Doormaal FF, et al. Parenteral anticoagulation in ambulatory patients with cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014;12:CD006652. PubMed PMID: 25491949.
189. Sanford D, Naidu A, Alizadeh N, Lazo-Langner A. The effect of low molecular weight heparin on survival in cancer patients: an updated systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2014;12(7):1076-85.
190. Akl EA, Gunukula S, Barba M, Yosuiico VE, van Doormaal FF, Kuipers S, et al. Parenteral anticoagulation in patients with cancer who have no therapeutic or prophylactic indication for anticoagulation. *Cochrane Database Syst Rev.* 2011 Apr 13(4):CD006652. PubMed PMID: 21491396.
191. Kuypers FA, Lewis RA, Hua M, Schott MA, Discher D, Ernst JD, et al. Detection of altered membrane phospholipid asymmetry in subpopulations of human red blood cells using fluorescently labeled annexin V. *Blood.* 1996 Feb 1;87(3):1179-87. PubMed PMID: 8562945.
192. Miltenyi Biotech. Annexin V MicroBead Kit (letzter Zugriff: 08.01.2018) 2017. Available from: <http://www.miltenyibiotec.com/en/products-and-services/macscell-separation/cell-separation-reagents/various-cell-types/annexin-v-microbead-kit.aspx>.
193. Cointe S, Judicone C, Robert S, Mooberry MJ, Poncelet P, Wauben M, et al. Standardization of microparticle enumeration across different flow cytometry platforms: results of a multicenter collaborative workshop. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH.* 2017 Jan;15(1):187-93. PubMed PMID: 27662257. Pubmed Central PMCID: 5280151.
194. Christianson HC, Svensson KJ, van Kuppevelt TH, Li JP, Belting M. Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2013 Oct 22;110(43):17380-5. PubMed PMID: 24101524. Pubmed Central PMCID: 3808637.
195. Weidle UH, Birzele F, Kollmorgen G, Ruger R. The Multiple Roles of Exosomes in Metastasis. *Cancer genomics & proteomics.* 2017 Jan 02;14(1):1-15. PubMed PMID: 28031234. Pubmed Central PMCID: 5267497.
196. Nishida-Aoki N, Tominaga N, Takeshita F, Sonoda H, Yoshioka Y, Ochiya T. Disruption of Circulating Extracellular Vesicles as a Novel Therapeutic Strategy against Cancer Metastasis. *Mol Ther.* 2017 Jan 04;25(1):181-91. PubMed PMID: 28129113.
197. Kowal J, Arras G, Colombo M, Jouve M, Morath JP, Primdal-Bengtson B, et al. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2016 Feb 23;113(8):E968-77. PubMed PMID: 26858453. Pubmed Central PMCID: 4776515.

198. Yu CJ, Ye SJ, Feng ZH, Ou WJ, Zhou XK, Li LD, et al. Effect of Fraxiparine, a type of low molecular weight heparin, on the invasion and metastasis of lung adenocarcinoma A549 cells. *Oncol Lett.* 2010 Jul;1(4):755-60. PubMed PMID: 22966375. Pubmed Central PMCID: PMC3436347.
199. Nierodzik M, Karpatkin S. Hypercoagulability preceding cancer. Does hypercoagulability awaken dormant tumor cells in the host? *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH.* 2005 Mar;3(3):577-80. PubMed PMID: 15748252.
200. Langer F. Haemostatic aspects in clinical oncology. *Hamostaseologie.* 2015;35(2):152-64; quiz 65. PubMed PMID: 25943078. Hamostaseologische Aspekte in der Onkologie.
201. Bauer AT, Suckau J, Frank K, Desch A, Goertz L, Wagner AH, et al. von Willebrand factor fibers promote cancer-associated platelet aggregation in malignant melanoma of mice and humans. *Blood.* 2015 May 14;125(20):3153-63. PubMed PMID: 25977583. Pubmed Central PMCID: PMC4432010.
202. Borsig L. VWF fibers induce thrombosis during cancer. *Blood.* 2015 May 14;125(20):3042-3. PubMed PMID: 25977579.
203. Khorana AA, Sahni A, Altland OD, Francis CW. Heparin inhibition of endothelial cell proliferation and organization is dependent on molecular weight. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2003;23(11):2110-5.
204. Alyahya R, Sudha T, Racz M, Stain SC, Mousa SA. Anti-metastasis efficacy and safety of non-anticoagulant heparin derivative versus low molecular weight heparin in surgical pancreatic cancer models. *Int J Oncol.* 2015 Mar;46(3):1225-31. PubMed PMID: 25530018.
205. Ilan N, Elkin M, Vlodavsky I. Regulation, function and clinical significance of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38(12):2018-39. PubMed PMID: 16901744.
206. Mousa SA, Petersen LJ. Anti-cancer properties of low-molecular-weight heparin: preclinical evidence. *Thrombosis and haemostasis.* 2009 Aug;102(2):258-67. PubMed PMID: 19652876.
207. Amirkhosravi A, Meyer T, Chang JY, Amaya M, Siddiqui F, Desai H, et al. Tissue factor pathway inhibitor reduces experimental lung metastasis of B16 melanoma. *Thrombosis and haemostasis.* 2002 Jun;87(6):930-6. PubMed PMID: 12083498.
208. Schlesinger M, Roblek M, Ortmann K, Naggi A, Torri G, Borsig L, et al. The role of VLA-4 binding for experimental melanoma metastasis and its inhibition by heparin. *Thromb Res.* 2014 May;133(5):855-62. PubMed PMID: 24636486.
209. Sudha T, Phillips P, Kanaan C, Linhardt RJ, Borsig L, Mousa SA. Inhibitory effect of non-anticoagulant heparin (S-NACH) on pancreatic cancer cell adhesion and metastasis in human umbilical cord vessel segment and in mouse model. *Clin Exp Metastasis.* 2012 Jun;29(5):431-9. PubMed PMID: 22415710.
210. Pfankuchen DB, Stolting DP, Schlesinger M, Royer HD, Bendas G. Low molecular weight heparin tinzaparin antagonizes cisplatin resistance of ovarian cancer cells. *Biochem Pharmacol.* 2015 Sep 15;97(2):147-57. PubMed PMID: 26239805.
211. Wang J, Xiao J, Wen D, Wu X, Mao Z, Zhang J, et al. Endothelial cell-anchored tissue factor pathway inhibitor regulates tumor metastasis to the lung in mice. *Mol Carcinog.* 2016 May;55(5):882-96. PubMed PMID: 25945811.
212. Amirkhosravi A, Meyer T, Amaya M, Davila M, Mousa SA, Robson T, et al. The role of tissue factor pathway inhibitor in tumor growth and metastasis. *Seminars in thrombosis and hemostasis.* 2007 Oct;33(7):643-52. PubMed PMID: 18000790.
213. Sierko E, Wojtukiewicz MZ, Kisiel W. The role of tissue factor pathway inhibitor-2 in cancer biology. *Seminars in thrombosis and hemostasis.* 2007 Oct;33(7):653-9. PubMed PMID: 18000791.

214. Zhai LL, Cai CY, Wu Y, Tang ZG. Correlation and prognostic significance of MMP-2 and TFPI-2 differential expression in pancreatic carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(1):682-91. PubMed PMID: 25755762. Pubmed Central PMCID: PMC4348899.
215. Zhai LL, Wu Y, Cai CY, Tang ZG. Upregulated matrix metalloproteinase-2 and downregulated tissue factor pathway inhibitor-2 are risk factors for lymph node metastasis and perineural invasion in pancreatic carcinoma. *Onco Targets Ther*. 2015;8:2827-34. PubMed PMID: 26504399. Pubmed Central PMCID: PMC4603725.
216. Herman MP, Sukhova GK, Kisiel W, Foster D, Kehry MR, Libby P, et al. Tissue factor pathway inhibitor-2 is a novel inhibitor of matrix metalloproteinases with implications for atherosclerosis. *The Journal of clinical investigation*. 2001 May;107(9):1117-26. PubMed PMID: 11342575. Pubmed Central PMCID: PMC209273.
217. Xu C, Wang H, He H, Zheng F, Chen Y, Zhang J, et al. Low expression of TFPI-2 associated with poor survival outcome in patients with breast cancer. *BMC Cancer*. 2013;13:118. PubMed PMID: 23497249. Pubmed Central PMCID: PMC3607852.
218. Wu D, Xiong L, Wu S, Jiang M, Lian G, Wang M. TFPI-2 methylation predicts poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2012 Apr;76(1):106-11. PubMed PMID: 21983100.
219. Chu X, Zhao P, Lv Y, Liu L. Decreased expression of TFPI-2 correlated with increased expression of CD133 in cholangiocarcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(1):328-36. PubMed PMID: 25755719. Pubmed Central PMCID: PMC4348830.
220. Ay C, Simanek R, Vormittag R, Dunkler D, Alguel G, Koder S, et al. High plasma levels of soluble P-selectin are predictive of venous thromboembolism in cancer patients: results from the Vienna Cancer and Thrombosis Study (CATS). *Blood*. 2008 Oct 1;112(7):2703-8. PubMed PMID: 18539899.
221. Becker KA, Beckmann N, Adams C, Hessler G, Kramer M, Gulbins E, et al. Melanoma cell metastasis via P-selectin-mediated activation of acid sphingomyelinase in platelets. *Clin Exp Metastasis*. 2017 Jan;34(1):25-35. PubMed PMID: 27744579.
222. Gamperl H, Plattfaut C, Freund A, Quecke T, Theophil F, Gieseler F. Extracellular vesicles from malignant effusions induce tumor cell migration: inhibitory effect of LMWH tinzaparin. *Cell Biol Int*. 2016 Oct;40(10):1050-61. PubMed PMID: 27435911.
223. Nguyen QD, De Wever O, Bruyneel E, Hendrix A, Xie WZ, Lombet A, et al. Commutators of PAR-1 signaling in cancer cell invasion reveal an essential role of the Rho-Rho kinase axis and tumor microenvironment. *Oncogene*. 2005 Dec 15;24(56):8240-51. PubMed PMID: 16091733.
224. Klarenbach SW, Chipiuk A, Nelson RC, Hollenberg MD, Murray AG. Differential actions of PAR2 and PAR1 in stimulating human endothelial cell exocytosis and permeability: the role of Rho-GTPases. *Circulation research*. 2003 Feb 21;92(3):272-8. PubMed PMID: 12595338.
225. Molli PR, Li DQ, Murray BW, Rayala SK, Kumar R. PAK signaling in oncogenesis. *Oncogene*. 2009 Jul 16;28(28):2545-55. PubMed PMID: 19465939. Pubmed Central PMCID: PMC2731678.
226. Horiguchi K, Shirakihara T, Nakano A, Imamura T, Miyazono K, Saitoh M. Role of Ras signaling in the induction of snail by transforming growth factor-beta. *The Journal of biological chemistry*. 2009 Jan 2;284(1):245-53. PubMed PMID: 19010789.
227. Smith BN, Odero-Marah VA. The role of Snail in prostate cancer. *Cell Adh Migr*. 2012 Sep-Oct;6(5):433-41. PubMed PMID: 23076049. Pubmed Central PMCID: PMC3496681.
228. Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*. 2007 May 14;26(22):3279-90. PubMed PMID: 17496922.
229. Whyte J, Bergin O, Bianchi A, McNally S, Martin F. Key signalling nodes in mammary gland development and cancer. Mitogen-activated protein kinase signalling in

experimental models of breast cancer progression and in mammary gland development. *Breast Cancer Res.* 2009;11(5):209. PubMed PMID: 19818165. Pubmed Central PMCID: PMC2790844.

230. Ji Q, Liu X, Han Z, Zhou L, Sui H, Yan L, et al. Resveratrol suppresses epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer through TGF-beta1/Smads signaling pathway mediated Snail/E-cadherin expression. *BMC Cancer.* 2015;15:97. PubMed PMID: 25884904. Pubmed Central PMCID: PMC4362662.

231. Galvan JA, Zlobec I, Wartenberg M, Lugli A, Gloor B, Perren A, et al. Expression of E-cadherin repressors SNAIL, ZEB1 and ZEB2 by tumour and stromal cells influences tumour-budding phenotype and suggests heterogeneity of stromal cells in pancreatic cancer. *Br J Cancer.* 2015 Jun 9;112(12):1944-50. PubMed PMID: 25989272. Pubmed Central PMCID: PMC4580384.

232. Bai L, Yu Z, Zhang J, Yuan S, Liao C, Jeyabal PV, et al. OLA1 contributes to epithelial-mesenchymal transition in lung cancer by modulating the GSK3beta/snail/E-cadherin signaling. *Oncotarget.* 2016 Mar 1;7(9):10402-13. PubMed PMID: 26863455.

233. Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell.* 2008 Jun;14(6):818-29. PubMed PMID: 18539112.

234. Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nature reviews Cancer.* 2007 Jun;7(6):415-28. PubMed PMID: 17508028.

235. Olmeda D, Jorda M, Peinado H, Fabra A, Cano A. Snail silencing effectively suppresses tumour growth and invasiveness. *Oncogene.* 2007 Mar 22;26(13):1862-74. PubMed PMID: 17043660.

236. van Zijl F, Zulehner G, Petz M, Schneller D, Kornauth C, Hau M, et al. Epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Future Oncol.* 2009 Oct;5(8):1169-79. PubMed PMID: 19852728. Pubmed Central PMCID: PMC2963061.

237. Firrincieli D, Boissan M, Chignard N. Epithelial-mesenchymal transition in the liver. *Gastroenterol Clin Biol.* 2010 Oct;34(10):523-8. PubMed PMID: 20615641.

238. Zucchini-Pascal N, Peyre L, Rahmani R. Crosstalk between beta-catenin and snail in the induction of epithelial to mesenchymal transition in hepatocarcinoma: role of the ERK1/2 pathway. *Int J Mol Sci.* 2013;14(10):20768-92. PubMed PMID: 24135872. Pubmed Central PMCID: PMC3821642.

## 7 Anhang

# UK SH

UNIVERSITÄTSKLINIKUM Schleswig-Holstein – Campus Lübeck  
Medizinische Klinik I  
Ratzeburger Allee 160 • 23538 Lübeck

An die  
Wissenschaftliche Ethikkommission  
der Universität zu Lübeck

- im Hause -

UNIVERSITÄTSKLINIKUM  
Schleswig-Holstein



Campus Lübeck – Medizinische Klinik I  
Direktor: Prof. Dr. med. Hendrik Lehnert

Experimentelle Onkologie,  
Palliativmedizin und Ethik in der Onkologie  
Prof. Dr. med. Frank Gieseler  
Tel: 0451 500-2670  
Fax: 0451 500-2410  
E-mail: frank.gieseler@uksh.de

Datum: 29.03.13



### Antrag auf Erweiterung des Ethikvotums vom 31.10.2011 (AZ 11-206)

Sehr geehrte Damen und Herren,

ich bitte darum, das oben genannte Ethikvotum auf die jetzt folgenden Forschungsprojekte zu erweitern. Das DFG-Projekt ist inzwischen beendet, wir haben aber noch eine große Zahl von eingefrorenen Patientenproben, die wir gerne für weitere Forschungsarbeiten verwenden möchten. Es handelt sich um benigne und maligne Ergüsse, die nach der klinisch notwendigen Punktion eingefroren wurden ("überschüssiges Restmaterial"). Zum Zeitpunkt der Punktion wurden zum Teil auch Laborwerte der Patientinnen und Patienten in einer Datenbank erfasst. Die Daten wurden dann sofort ("an der Quelle") durch die Vergabe einer laufenden Nummer im Labor anonymisiert. Eine Rückverfolgung ist nicht möglich.

Ich stelle hiermit den Antrag, dieses für die Forschung wertvolle Material über das DFG-Projekt hinaus verwenden zu dürfen.

Mit freundlichen Grüßen,

*Prof. Dr. med. Frank Gieseler*  
- Bereichsleiter -

Universitätsklinikum  
Schleswig-Holstein  
Anzahl der

Vorstandsmitglieder:  
Prof. Dr. Jens Scholz  
Datum: 29.03.13



Bestehender Titel:

"Molekulare Interaktionen zwischen dem aktivierten Gerinnungssystem von Tumorpatienten und der Progression und Metastasierung von Tumorzellen"

Weitere Beschreibung des Vorhabens:

Es handelt sich um ca. 350 tiefgefrorenen Ergussproben aus den Jahren 2002-2007, die Proben sind von Patienten, die in diesem Zeitraum in der onkologischen Ambulanz im UKSH, Campus Kiel behandelt wurden und haben sich einer Punktion unterzogen. Eine Einverständniserklärung der Patientinnen und Patienten für die Forschungsarbeiten wurde eingeholt. Parallel wurden zum Teil auch Laborwerte der Patienten gesammelt. Das Material und die Laborwerte wurden mit einer laufenden Nummer anonymisiert, eine Zuordnung ist retrospektiv nicht möglich.

In unsere Forschungsarbeiten gehen wir der Frage nach, welche Faktoren für die mutagenen Eigenschaften dieser Ergüsse verantwortlich sind. Hintergrund ist die hohe zelluläre Resistenz von Tumorzell-Linien, die mit den Ergüssen inkubiert werden, sowie die Induktion einer Tumorzellmigration durch die Ergüsse. Wir vermuten, dass Serinproteasen des Gerinnungssystems, die wir in diesen Ergüssen nachgewiesen haben, einen wichtigen Anteil an diesen Eigenschaften haben. Dies ist insofern interessant, als diese Faktoren mit modernen Antikoagulantien zum Teil blockiert werden können und somit ein therapeutischer Bezug besteht (Fremdnutzen). Der ursprüngliche Studientitel des abgeschlossenen DFG-Forschungsprojektes kann bestehen bleiben. Die Patienten werden durch diese Arbeiten in keiner Weise beeinträchtigt oder belästigt und wir erwarten eine wesentliche wissenschaftliche Erkenntnis. Die Ergüsse werden durch die Analysen komplett aufgebraucht. Geplant sind biochemische Analysen, sowie Aktivitätsbestimmungen der Faktoren in den Ergüssen mit und ohne spezifische Hemmstoffe. Eine weitere Definition oder Einschränkung der geplanten Arbeiten möchte ich nicht vornehmen, da sich die Forschungsrichtung nicht in allen Einzelheiten vorhersehen lässt.

Prof. Dr. med. Frank Gieseler

- Projektleiter -





UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Universität zu Lübeck - Ratzeburger Allee 160 - 23538 Lübeck

Herrn  
Prof. Dr. med. Frank Gieseler  
Medizinische Klinik I

im Hause

**Ethik-Kommission**

Vorsitzender:  
Herr Prof. Dr. med. A. Katalinic  
Stellv. Vorsitzender:  
Herr Prof. Dr. med. F. Gieseler  
Universität zu Lübeck  
Ratzeburger Allee 160  
23538 Lübeck

Geschäftsstelle: Dr. phil. A. Hüppe  
Tel.: +49 451 500 5854  
Fax: +49 451 500 3026  
ethikkommission@uni-luebeck.de

Aktenscheinen: 11-206  
Datum: 29. April 2013

**Antrag auf Amendment zum Votum 11-206, Schrieben vom 29.04.2013**

**Antragsteller: Herr Prof. Gieseler**

**Titel: Molekulare Interaktionen zwischen dem aktivierten Gerinnungssystem von Tumorpatienten und der Progression und Metastasierung von Tumorzellen**

Sehr geehrter Herr Prof. Gieseler,

Ihr Antrag an die Ethik-Kommission wurde im verkürzten Verfahren beraten.  
Die Ethik-Kommission hat **keine Bedenken** gegen die Verwendung des Biomaterials für die von Ihnen in Ihrem Anschreiben ausgeführten weiteren Forschungsarbeiten.

Mit freundlichem Gruß und besten Wünschen  
für den weiteren Verlauf Ihrer Forschung bin ich  
Ihr

Prof. Dr. med. A. Katalinic  
Vorsitzender

## 8 Danksagung

Meinem Doktorvater Prof. Frank Gieseler möchte ich für die Überlassung des Themas und die ausgezeichnete Betreuung danken. Die vielen Tipps und Tricks, die anregenden Diskussionen und die unzähligen Korrekturen waren unverzichtbar für eine erfolgreiche Abfassung.

Ein großes Dankeschön geht an Frau Vollmert und Frau Grammersdorf für die stete Hilfe und Lehre im Labor. Ohne Sie wäre die Arbeit von vorne herein nicht in die Gänge gekommen.

Für die freundliche Aufnahme und Betreuung im französischen Labor in Besancon (Inserm/ UFC/ EFS BFC) sowie für die reibungslose Organisation möchte ich mich bei Prof. Philippe Saas und Sarah Odrion bedanken. Ein spezielles Dankeschön für die Unterstützung, wissenschaftliche Betreuung und Geduld geht an Sabeha Biichle.

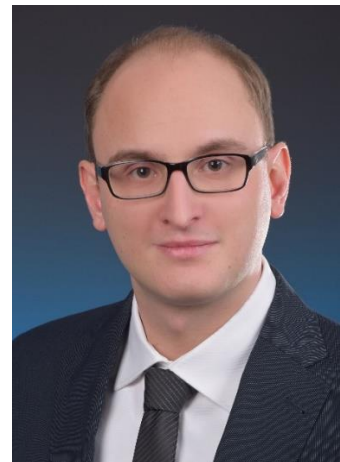
Für die unkomplizierte Einführung in das xCELLigence-System und für stete Hilfe während der Arbeit möchte ich mich bei Prof. Ungefroren bedanken.

Sehr herzlich möchte ich mich bei Friederike Theophil bedanken. Ohne Dich wäre die Arbeit doch sehr trocken gewesen. Ich hoffe Du hast ein gutes Promotionsthema gefunden. Zusätzlich möchte ich mich bei Corinna Plattfaut und Annika Freund für die unkomplizierte Hilfe und Unterstützung bedanken.

Als letztes möchte ich mich herzlichst bei meinen Eltern bedanken, welche mich subtil, aber stetig bei der Stange gehalten haben. Ohne Euch wäre diese Arbeit immer noch nicht fertig!

## 9 Lebenslauf

	Hans Peter Anton Gamperl
Adresse	Kleine Klosterkoppel 21 23562 Lübeck
Kontaktdaten	Tel.: 0174/2034565 hp.gamperl@hotmail.de
Geboren	06.01.1989 München



### Akademische und schulische Ausbildung

2008	Abitur am Luitpold-Gymnasium München
2009	Internationales Studium der Humanmedizin an der Riga-Stradins-University, Lettland (1 Semester)
2009-2016	Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
07/2016	Erteilung der Approbation als Arzt
08/2016	Assistenzarzt am UKSH-Lübeck, Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin

### Weitere Qualifikationen

	Sprachkenntnisse: Englisch, Französisch
2009	Ausbildung zum Rettungssanitäter
2014	Koautorenschaft; DOI: 10.1002/cbin.10216
2014/2015	NEF-Einsatzprotokoll-Korrektur, Score-Erhebung (Studenten-Arbeitsstelle der Anästhesie, Universität zu Lübeck)
2016	Erstautorenschaft; DOI: 10.1002/cbin.10645

# Publikationen, Abstracts, Poster

## Publikationen

Gamperl H, Plattfaut C, Freund A, Quecke T, Theophil F, Gieseler F. Extracellular vesicles from malignant effusions induce tumor cell migration: inhibitory effect of LMWH tinzaparin. *Cell Biol Int*. 2016 Oct;40(10):1050-61. PubMed PMID: 27435911.

Anteil: Erstellung des Konzepts, Durchführung der Experimente (mit Unterstützung durch MTA Frau Vollmert), Schreiben der Publikation, Korrektur der Publikation

Gieseler F, Gamperl H, Theophil F, Stenzel I, Quecke T, Ungefroren H. Using annexin V-coated magnetic beads to capture active tissue factor-bearing microparticles from body fluids. *Cell Biol Int*. 2014 Feb;38(2):277-81. PubMed PMID: 24431236.

Anteil: Erstellung des Konzepts, Beteiligung an der Durchführung der Experimente

## Abstracts (publiziert)

Plattfaut C, Gamperl H, Quecke T, Schwenke M, Gieseler F, editors. Inhibition of microparticle-induced PAR-activation by Rivaroxaban. *Oncology Research and Treatment*. 2016 Jan;39:158

Anteil: Beteiligung an der Erstellung des Konzepts

Gieseler F, Gamperl H, Plattfaut C, Theophil R, Quecke T. Inhibition of microparticle induced tumor cell migration by Lmwh tinzaparin. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2015 Jun;13:263.

Anteil: Erstellung des Konzepts, Durchführung der Experimente (mit Unterstützung durch MTA Frau Vollmert), Schreiben der Publikation, Korrektur der Publikation

Quecke T, Plattfaut C, Gamperl H, Theophil F, Schwenke M, Gieseler F, editors. Cellular microparticles are released from tumor cells under inflammatory stress and associate with plasma coagulation factor X to form PAR-activating complexes. *Oncology Research and Treatment*; 2015 Oct;38:208.

Anteil: Beteiligung an der Erstellung des Konzepts

## Poster

Gamperl H, Plattfaut C, Quecke T, Gieseler F

Induktion einer Tumorzellmigration durch zelluläre Mikropartikel aus malignen Ergüssen: Hemmung des Effekts durch das niedermolekulare Heparin „Tinzaparin“. *Oncology Research and Treatment*; 2016 Feb;39(suppl 1):1–175

## Erklärung zu §11 Abs. 1 Nr. 9 der Promotionsordnung

Ich versichere hiermit an Eides Statt, dass ich meine Dissertation mit dem Thema

*„Hemmung der Mikrovesikel-induzierten Tumorzellmigration durch das  
niedermolekulare Heparin Tinzaparin“*

abgesehen von den Ratschlägen meines Doktorvaters und meiner sonstigen akademischen Lehrer, nach Form und Inhalt meine eigene Arbeit ist, dass ich außer den in der Arbeit aufgeführten keine weiteren Hilfsmittel benutzt habe, und dass meine Arbeit bisher, weder ganz noch in Teilen, keiner anderen akademischen Stelle als Dissertation vorgelegen hat.

Hans Gamperl

RESEARCH ARTICLE

# Extracellular vesicles from malignant effusions induce tumor cell migration: inhibitory effect of LMWH tinzaparin

Hans Gamperl, Corinna Plattfaut, Annika Freund, Tabea Quecke, Friederike Theophil and Frank Gieseler\*

Experimental Oncology, Ethics and Palliative Care in Oncology, University Hospital and Medical School, UKSH, Luebeck, Germany

## Abstract

Elevated levels of extracellular vesicles (EVs) have been correlated with inflammatory diseases as well as progressive and metastatic cancer. By presenting tissue factor (TF) on their membrane surface, cellular microparticles (MPs) activate both the coagulation system and cell-signaling pathways such as the PAR/ERK pathway. We have shown before that malignant effusions are a rich source of tumor cell-derived EVs. Here, we used EVs from malignant effusions from three different patients after serial low-speed centrifugation steps as recommended by the ISTH (lsEV). Significant migration of human pancreatic carcinoma cells could be induced by lsEVs and was effectively inhibited by pre-incubation with tinzaparin, a low-molecular-weight heparin. Tinzaparin induced tissue factor pathway inhibitor (TFPI) release from tumor cells, and recombinant TFPI inhibited EV-induced tumor cell migration. EVs also induced ERK phosphorylation, whereas inhibitors of PAR2 and ERK suppressed EV-induced tumor cell migration. LsEVs have been characterized by high-resolution flow cytometry and, after elimination of smaller vesicles including exosomes, by further high-speed centrifugation (hsEV). The remaining population consisting primarily of MPs is indeed the main migration-inducing population with tenase activity. Compared to other LMWHs, tinzaparin is suggested to have high potency to induce TFPI release from epithelial cells. The migration-inhibitory effect of TFPI and the interruption of tumor cell migration by inhibitors of PAR2 and ERK suggest that lsEVs induce tumor cell migration by activating the PAR2 signaling pathway. Tinzaparin might inhibit this process at least partly by inducing the release of TFPI from tumor cells, which blocks PAR-activating TF complexes. The clinical relevance of the results is discussed.

**Keywords:** cell migration; G-protein-coupled receptors; signal peptide/recognition particle

## Introduction

In a much-cited paper, Amirkhosravi et al. (2003) reported that subcutaneous application of the low-molecular-weight heparin (LMWH) tinzaparin almost completely abolished lung metastases experimentally induced by intravenous injection of tumor cells (melanoma) in mice (Amirkhosravi et al., 2003). Analysis of the molecular mechanism of the beneficial side effect of heparin treatment in a preclinical model of human melanoma suggested that it is based on inhibition of tumor cell migration and neovascularization independent of the coagulation cascade (Bereczky et al., 2005). Experimental data pointed to the involvement of P- and L-selectins, tissue factor pathway inhibitor (TFPI)

released from endothelial cells, and tumor cell-host interactions. The pronounced effect of tinzaparin, as compared to other LMWHs, might be explained by its high-molecular-weight distribution and high TFPI-inducing potency (Khorana et al., 2003; Mousa and Mohamed, 2004). Nevertheless, the exact molecular mechanism of this interesting observation is still unclear.

Extracellular vesicles (EVs) are released by different cells into the extracellular space. One common feature of all EVs is their outer membrane, which consists of a double lipid layer, as well as the inclusion of biomolecules such as proteins or RNA. Based on their developmental processes, their size, and membrane structure, they can be divided into three groups (Kalra et al., 2016):

\*Corresponding author: e-mail: frank.gieseler@uksh.de

**Abbreviations:** EVs, extracellular vesicles; hsEVs, extracellular vesicles from high-speed centrifuged material; ISTH, International Society on Thrombosis and Hemostasis; LMWH, low molecular weight heparin; lsEVs, extracellular vesicles from low-speed centrifuged material; MPs, cellular microparticles; PAR, proteinase-activated receptor; TF, tissue factor; TFPI, tissue factor pathway inhibitor

1. Exosomes are formed intracellularly from multivesicular bodies and released by exocytosis; they have a size of 30–150 nm.
2. Ectosomes (also called microparticles or microvesicles) are formed by cells in response to external stimuli such as, for instance, inflammatory stimuli, restructuring and finally outward budding of the outer membrane; they have a size of 100–1,000 nm and are larger than exosomes.
3. Apoptotic bodies are released by dying cells in the late stage of apoptosis. This allows the immune system to eliminate the components of the dying cell. Their size ranges between 50 nm and 5,000 nm, but most of them are larger than exosomes and ectosomes.

Due to the different mechanisms of their formation, EVs differ not only in size but also in the structure of their membranes: microparticles (MP) and apoptotic bodies often present negatively charged phosphatidylserine (PS) on their outer leaflet ('chaotic structure'), whereas exosomes exhibit an ordered membrane structure (Heijnen et al., 1999; Rak, 2010). Various cell types, particularly those of epithelial origin including cancer cells, actively release EVs during their interaction within an inflammatory microenvironment (Burger et al., 2013; Herring et al., 2013). In particular, the tissue factor (TF) presented on the surface of MPs interacts with plasma coagulation factors, such as FVII and FX, enabling the formation of a complex with tenase activity. In clinical studies, the level of MPs correlated with the prothrombotic state of cancer patients (Zwicker et al., 2009; Thaler et al., 2014). This complex not only activates coagulation but also interacts with protease-activated receptors (PAR) expressed by tumor cells (Schaffner and Ruf, 2008; Gieseler et al., 2013).

In this study, we used malignant effusions from cancer patients as a source of EVs and MPs. The advantage over blood samples is the repeated availability and high volumes of samples as these patients require frequent therapeutic aspiration of effusions for clinical reasons. Others and we have shown before that malignant effusions contain large amounts of EVs, only few thrombocytes, and have low calcium concentrations resulting in the perseverance of active TF-associated complexes (Gieseler et al., 2007). Besides EVs, a number of growth factors and cytokines

that potentially interact with tumor cells can be found in malignant effusions (Shu et al., 2015). In order to find out whether the TF-activating and migration-inducing activities can be assigned to a specific subgroup, we further examined EVs after low-speed centrifugation (lsEV) using high-sensitivity flow cytometry and separated smaller vesicles including exosomes from MPs by high-speed centrifugation as described before (Muralidharan-Chari et al., 2009). This supports the assumption that not exosomes but MPs, thus derived, are responsible for the described effects. In the present study, we tested the hypothesis that the ability of tinzaparin to inhibit tumor cell migration induced by lsEVs from patients' malignant effusions is based upon its TFPI-releasing capacity. We propose that TF-bearing MPs induce tumor cell migration by activating the PAR2 signaling pathway, which can be blocked significantly by TFPI.

## Materials and methods

### Extracellular vesicles (EVs) from malignant effusions

Approval for research with human biological materials used in this study was obtained from the Ethics Committee of the University of Luebeck (AZ 11-206, 22.04.2013). Malignant effusions from three patients suffering from colorectal cancer (CRC), breast cancer (BC), and small cell lung cancer (SCLC), respectively, were used. For clinical reasons, patients required therapeutic aspiration of their effusions. Malignant effusions were collected as described before (Gieseler et al., 2007). In brief, they were centrifuged for 10 min at 470g to remove cells and cell debris, then kept frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until used. A previous study has shown that this procedure does not significantly affect EV characteristics, which is in agreement with our experience (Lacroix et al., 2010). EV preparations used in this project are summarized in Table 1: cell debris and larger apoptotic bodies in the effusions were removed using a protocol recommended by the ISTH, namely centrifugation with 2,500g for 15 min, decantation, and 2,500g for another 15 min (Stagnara et al., 2012). For separation of smaller EVs including exosomes as well as soluble growth factors and cytokines from MPs, we used high-speed centrifugation at

**Table 1** Preparation and designation of extracellular vesicles (EVs).

Abbreviation	Description	Method	Consequence
lsEV	Extracellular vesicles after low-speed centrifugation of material (effusion)	Supernatant after two sequential centrifugations at 2,500g (Stagnara et al., 2012 #9)	Loss of cells, cell debris, and larger apoptotic bodies
hsEV	Extracellular vesicles after additional high-speed centrifugation of material (effusion)	Pellet after additional centrifugation at 10,000g (Muralidharan-Chari et al., 2009 #45)	Loss of soluble factors, loss of smaller vesicles ( $<0.50\ \mu\text{M}$ ) including exosomes

10,000g for 30 min at 4°C as described before (Muralidharan-Chari *et al.*, 2009). The resulting EV preparations after low-speed and high-speed centrifugations are designated as lsEV and hsEV, respectively, as summarized in Table 1.

### Characterization of MPs

The tenase activity of TF-active MPs was determined using the MP-TF-Activity Assay (Aniara, West Chester OH, USA) according to the manufacturer's instructions. First, the AE-MP-TF solution and the sample were introduced into the wells of the microplate that were coated with a murine monoclonal antibody, specific for human Tissue Factor (TF, extracellular domain), and which does not interfere with TF activity. This resulted in MP-TFs binding to the solid phase through an epitope localized in the extracellular domain of TF. After overnight incubation and an automated washing step, wash solution was immediately introduced into the wells. Thereafter, Factor VIIa (R1) and Factor X (R2) were added, resulting in the formation of the TF-FVIIa complex. In the presence of calcium ions, this complex activated Factor X into activated Factor X (FXa), on the surface of the anionic phospholipids present in the microparticle, with the MP-TF concentration being the limiting factor. In a third step, a specific substrate for FXa was introduced that reacts with FXa producing a yellow color. The absorbance, recorded at 405 nm on a spectrophotometer, is directly proportional to the amount of MP-TF present in the sample.

The distribution of EV populations was determined by high-resolution cytometry using a Cytoflex S 13/3 (Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Germany). Cytometer configuration was carried out as recommended by the manufacturer for the analysis of nanoparticles. The Violet SSC 405/10 channel served as trigger channel; analysis time was 3 min, and flow rate 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  (lowest available). Size calibration was achieved with 0.5  $\mu\text{m}$ , 0.9  $\mu\text{m}$ , and 3  $\mu\text{m}$  'Megamix' fluorescent beads (Biotex, Marseille, France).

### Migration of COLO357 tumor cells

The real-time cell analysis (RTCA) assay on the xCELLigence DP, as we have described before (Mandel *et al.*, 2013), was employed to determine the migration capacity of tumor cells. For end-point measurements with hsEVs, we used the Oris Pro Cell Migration Assay system (Platypus Technologies, Madison, WI, USA). Human pancreatic adenocarcinoma COLO357 cells were used because of their stable expression of protease-activated receptors PAR1 and PAR2 and their low spontaneous migratory capacity (Meitner *et al.*, 1983). For examination of the migration-inducing

capacity of lsEV from the effusions, 50% medium (RPMI, panaxin) and 50% lsEVs were added to both the lower and the upper chamber of the wells of a CIM-Plate16, and 60,000 cells to the upper chamber. Assays were done in triplicate within one run. The main read-out of the xCELLigence System, Cell Index (CI), is a dimensionless parameter. It is derived as a relative change in measured electrical impedance to represent cell status. Following are the rules for CI determination: (1) When cells are not present or not adherent on the electrodes, the CI is 0; (2) Under the same physiological conditions, the greater the number of cells that are attached on the electrodes, the larger are the CI values. That is, CI is marginally a monotonic function of cell number; (3) Change in cell status, such as cell morphology, cell adhesion, or cell viability, will lead to a change in CI. We have described the use of the assay before (Mandel *et al.*, 2013). For statistical analyses, at least three independent migration experiments were performed (bar graphs).

To examine the effect of the LMWH tinzaparin on tumor cell migration, 2 IU/mL tinzaparin were added to the COLO357 cell culture 3 h prior to the start of the migration assay and were present during the entire assay period (additional 36 h).

For direct stimulation of PAR1, we used 100  $\mu\text{M}$  of the peptide TFLLRN-NH2 and for PAR2, 100  $\mu\text{M}$  of SLIGKV-NH2 (AnaSpec, Inc., Fremont, CA, USA) as recommended by the manufacturer (results for PAR-1 activator are not shown). For specific inhibition of PAR2, we employed GB88 (10  $\mu\text{M}$ ), a novel and specific antagonist (Lohman *et al.*, 2012; Suen *et al.*, 2012). For inhibition of ERK, we used U0126 (20  $\mu\text{M}$ ), which is a chemically synthesized organic compound that inhibits activation of ERK1/2 by inhibiting the activity of the upstream kinase MEK1 (Promega, Wisconsin, USA) (Said *et al.*, 1998).

For TFPI quantification in cell culture supernatant, IMUBIND<sup>®</sup> Total TFPI ELISA kit (American Diagnostica Inc., Stamford, CT, USA, Product No. 849) was used as described by the manufacturer. For stimulation, we added tinzaparin in clinically relevant concentrations (0.4, 0.8, and 2.0 IU/mL) to the cell culture. Recombinant TFPI for inhibitory experiments was purchased from USCN Business Co., Ltd. (Houston, USA).

Due to the small amount of recovered MPs after high-speed centrifugation, we used the end-point Oris Pro Cell Migration Assay in these experiments. The cell seeding stoppers were placed in the center of each well to create a 2 mm diameter detection zone, and cells were seeded at  $3 \times 10^4$  cells per well in Oris-compatible 96-well plates; overnight incubation was in a humidity chamber at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> to allow adherence of cells. After removal of stoppers, the cell monolayer was checked by microscopy and the cell culture medium was changed: negative control, RPMI 1640 plus panaxin (10%); positive



control, plus TGF-beta1 (5 ng/mL); sample, medium plus 50% lsEVs with adjustment of panexin concentration; 36–40 h incubation to allow cells to migrate into the detection zone. Then, the medium was removed and cells were fixed and stained. Wells were photographed with mask and the area covered by migrating cells was calculated using the Fiji package of ImageJ (public domain). At least four wells were analyzed to calculate mean and standard deviation.

### ERK1/2 ELISA assays

Activation of PARs by lsEVs from effusions is shown by the intracellular activation of the ERK1/2 pathway in COLO357 cells. Cells were seeded into the well 24 h prior to stimulation, stimulated with 0.1% FBS for the last 3 h, then exposed to lsEV for 10 min. After removal of stimulant, cells were fixed with the fixing solution of the kit. Further steps were performed according to the user manual. We used the Ray Bio Cell-Based Human/Mouse ERK1/2 (Thr202/Tyr204) Phosphorylation ELISA kit (RayBiotech, Inc., Norcross, GA, USA). Results are displayed as the ratio of phosphorylated over unphosphorylated ERK.

### Statistical analyses

All experiments have been performed at least in triplicate. Results are expressed in means and standard deviations. Statistical analyses (Student's *t*-tests) have been performed as two sample *t*-tests, alpha 0.5, unequal variance (in-silico, project support for life sciences, <http://in-silico.net/tools/statistics/ttest>).

## Results

We used malignant effusions as a source of cellular EVs as they contain only few thrombocytes and have low calcium concentrations resulting in the perseverance of active TF-associated complexes as described before (Gieseler et al., 2007). EVs in the effusions were prepared in accordance with the recommendations of the ISTH (Stagnara et al., 2012). The final supernatants after low-speed centrifugation protocols are designated as lsEV. These preparations have been used for all functional experiments presented in this paper. For further characterization, lsEVs were analyzed using high-resolution cytoflow technique and small polystyrene particles were used to define a Megamix Gate with the expected size of MPs (0.5–1.0  $\mu$ M) as shown in Figure 1. We did not look for the source of MPs, for example, epithelial cells, inflammatory cells, or tumor cells, as effusions probably contain a mixture of all of these. It has been described before that the amount of tumor-derived MPs is high in malignant effusions (Press et al., 2012).

### Characterization of EVs by high-resolution cytoflow

The dual low-speed centrifugation steps result in a reduction of larger apoptotic bodies as well as cell debris (Figure 1, upper panel, left side). In order to further characterize the components responsible for tenase and migration-inducing activities, MPs were separated from smaller EVs including exosomes by high-speed centrifugation at 10,000g (upper panel, right side). This step also separates MPs from soluble components within the effusions that might also be biologically active. As shown in the lower panel, the vast proportion of tenase activity as quantified by the MP-TF activity assay was found in the hsEV preparation. As compared to lsEVs, hsEVs had greater migration-inducing capacity: migration at 36 h lsEV,  $175.30 \pm 0.05$ ; hsEVs,  $126.76 \pm 0.09$  (mega-pixels<sup>2</sup>). Mean, standard deviation of three independent experiments.

### Induction of tumor cell migration by lsEVs from malignant effusions

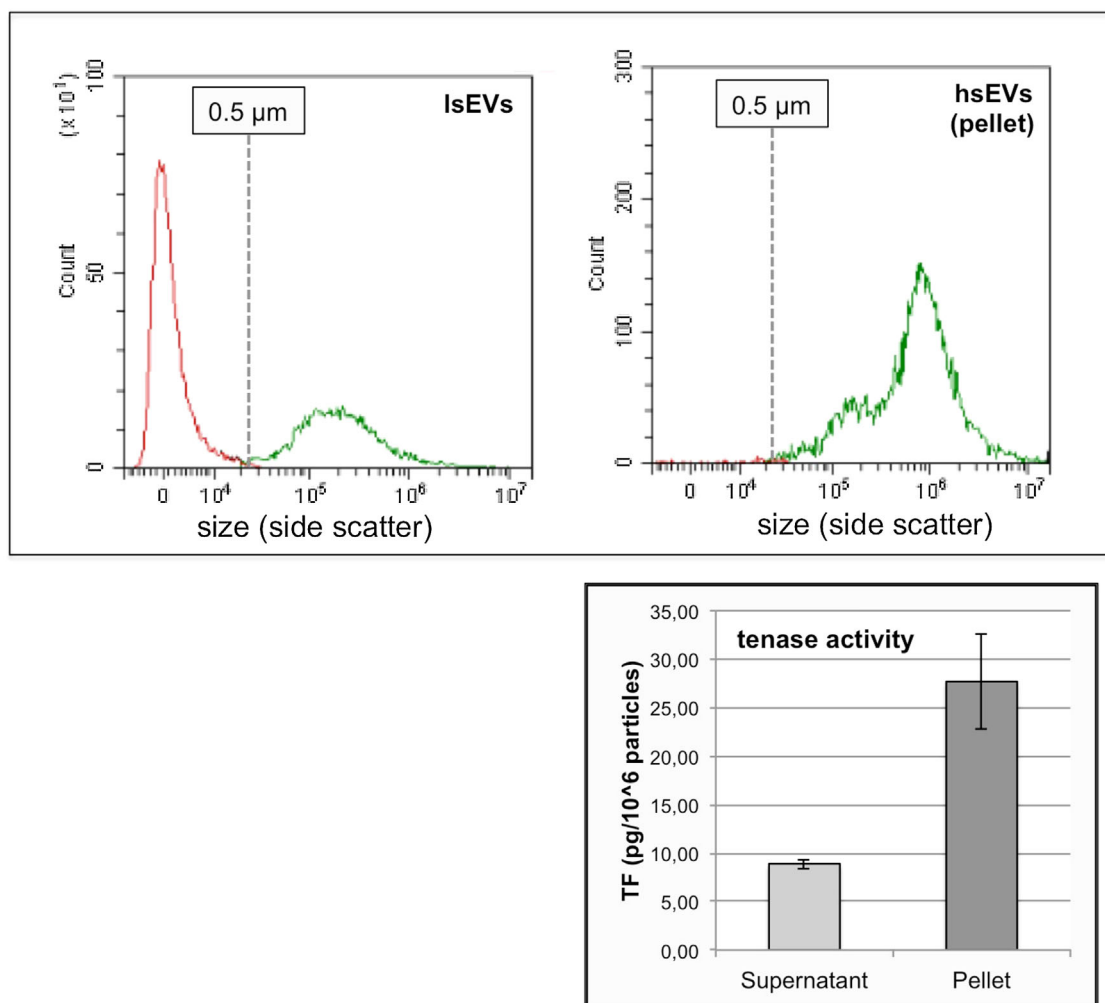
LsEVs from malignant effusions were examined using the real-time cell analysis (RTCA) assay on the xCELLigence DP system to determine their migration-inducing capacity. Figure 2 shows that lsEVs from all three patients induced migration with high statistical significance as compared to the basal spontaneous migration of tumor cells. Endpoint measurement at 36 h for cumulative analysis (lower panel) was chosen to exclude relevant proliferation influence upon the measured migration index.

### Tinzaparin significantly inhibits lsEV-induced tumor cell migration

In the experiments shown in Figure 3, the ability of tinzaparin to inhibit lsEV-induced cell migration was tested with the same lsEVs as those used in the experiments shown in Figure 2. We used the concentration of 2 IU/mL, which is in the range of plasma peak level after s.c. administration of the drug. Tinzaparin was added to the cells 3 h before they were exposed to the lsEVs from effusions, which then initiated the cell migration process. Due to the time needed for TFPI release from tumor cells as discussed later, pre-incubation of tumor cells with tinzaparin before starting the migration assays is crucial (not shown). LsEV-induced tumor cell migration was inhibited significantly though not completely.

### Tinzaparin induces TFPI release from tumor cells

TFPI is the major inhibitor of procoagulant activity of the TF/FVIIa complex and is constitutively expressed and secreted by endothelial cells (Sierko et al., 2007). The release of TFPI from endothelial cells in-vitro has been described



**Figure 1** Characterization of EVs by high-resolution cytoflow. LsEVs and hsEVs were prepared as described in Table 1. The proportion of EVs  $<0.5\ \mu\text{m}$  (including exosomes) was  $62.97 \pm 5.8\%$  in LsEV and  $1.71 \pm 0.94\%$  in the hsEV pellet (mean  $\pm$  standard deviation of three independent experiments). Using size as a discriminator, the population after high-speed centrifugation (right panel) contains mainly MPs; although apoptotic bodies are eliminated to a considerably extent by prior low-speed centrifugation, their presence cannot be completely excluded. The pellet contained most of the tenase activity as shown in the lower panel. As compared to LsEVs, the pellet also had most of migration-inducing capacity: migration at 36 h LsEV,  $175.30 \pm 0.05$ ; pellet,  $126.76 \pm 0.09$  (mega-pixels<sup>2</sup>).

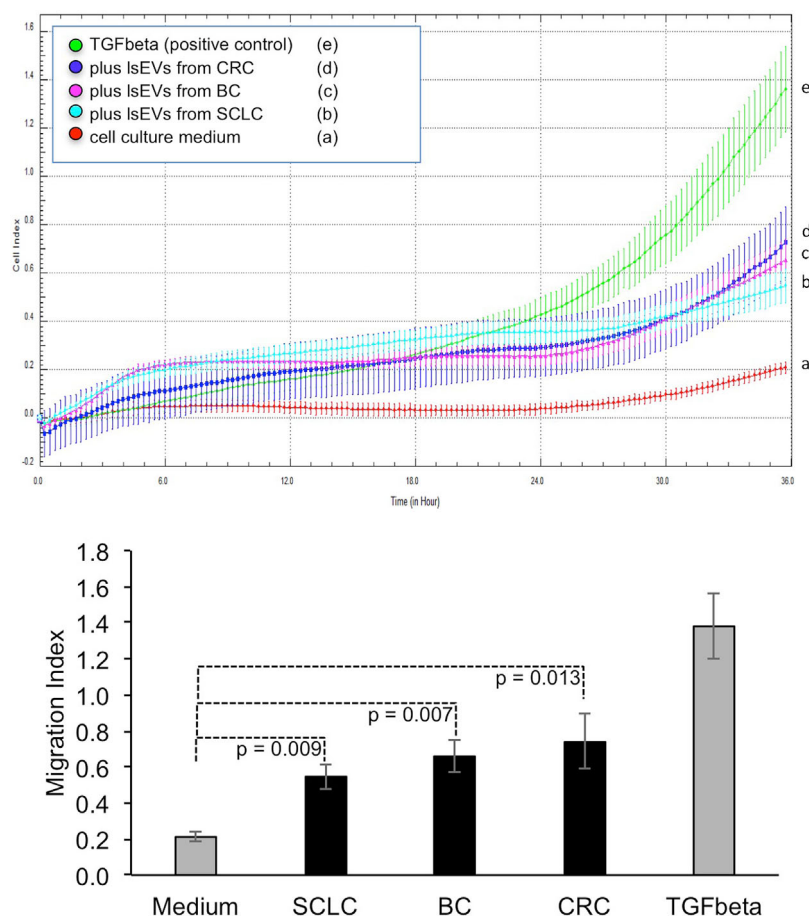
before (Amirkhosravi *et al.*, 2003; Stavik *et al.*, 2013). The addition of tinzaparin in clinically relevant concentrations (0.4, 0.8, and 2.0 IU/mL) induced TFPI release from COLO357 cells as well. As in the publications before, the resulting TFPI concentration in cell culture supernatant was in linear relation to the tumor cell number. As compared to the control without tinzaparin, we found a significant induction of TFPI release with a linear increase within the first 8 h ( $y = 0.18x + 0.04$ ,  $R^2 = 0.99$ ) for  $10^6$  cells and 2 mL medium (control without tinzaparin was  $y = 0.1x + 0.02$ ,  $R^2 = 0.99$ ).

Tinzaparin has the highest TFPI-releasing potency of all LMWHs in clinical use; the  $C_{\text{max}}$  after s.c. bolus injection of

75 IU/kg was  $242 \pm 28$  ng/mL (Mousa *et al.*, 2003). Therefore, we used the clinically relevant concentration of 100 ng/mL in the following inhibition experiments. Interestingly, we did not find a close dose-relation, as different concentrations of tinzaparin used (0.4, 0.8 and 2 IU tinzaparin/mL) did not result in substantial differences in the concentration of TFPI released by COLO357 cells.

#### Inhibition of LsEV-induced tumor cell migration by rTFPI

Migration was induced with LsEVs with and without the addition of recombinant TFPI (100 ng/mL). This concentration reflects the TFPI plasma level after clinical s.c.



**Figure 2** Induction of tumor cell migration by lEVs from malignant effusions. Upper panel: Time course of migration after addition of lEVs. Lower panel: Cumulative results at 36 h. Cell culture medium; SCLC, small cell lung cancer; BC, breast cancer; CRC, colorectal carcinoma. Means and standard deviations of three different runs within one experiment are shown. *P*-values calculated by Student's *t*-test as compared to control.

administration of tinzaparin as described above. lEV-induced tumor cell migration could be inhibited significantly ( $P < 0.001$ ) but not completely. We also performed dose-relation experiments (not shown) and could not find a clear dose relation, but rather an on/off effect.

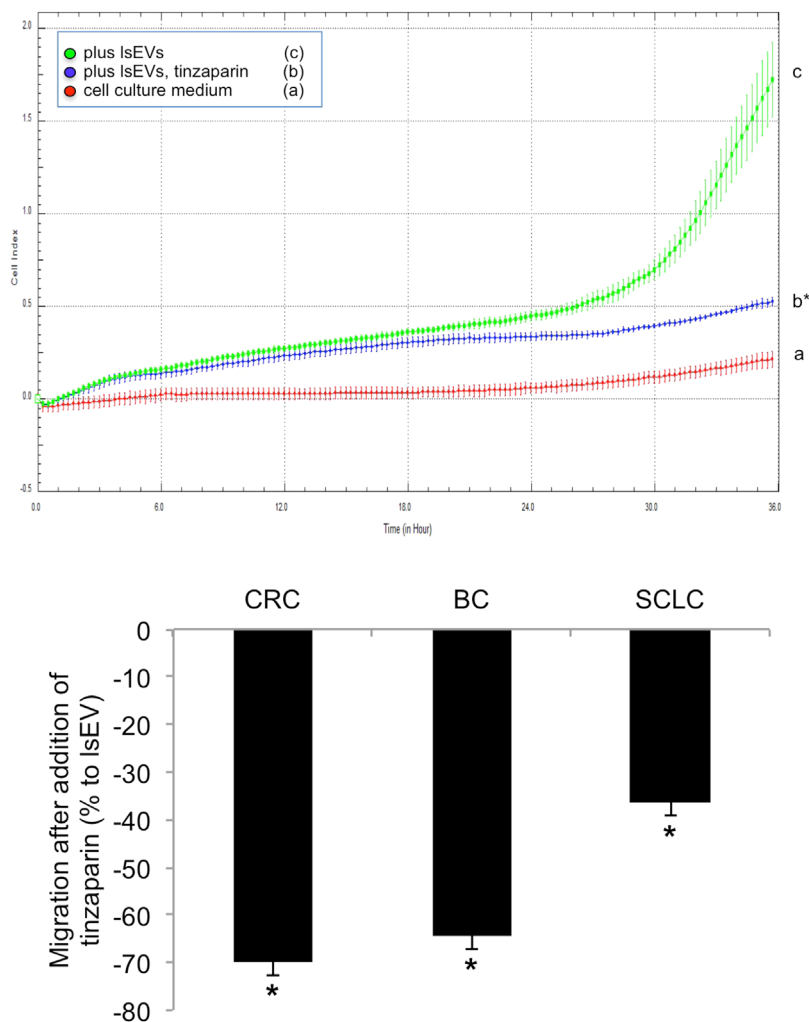
#### Requirement of PAR2 signaling pathway for lEV-induced tumor cell migration

The experiments shown in Figure 4 were performed in order to elucidate the signaling pathway activated by lEVs. The presentation of TF with tenase activity by EVs enables them to act as a PAR2 activator (Schaffner and Ruf, 2009). Here, we show that direct PAR2 activation by a specific activator indeed induces tumor cell migration in our system (e); PAR2 activation had a much more pronounced effect than PAR1 activation (not shown). This indicates a functioning PAR2 signaling pathway in COLO357 cells. PAR2 inhibition using a specific receptor inhibitor significantly reduced lEV-

induced tumor cell migration (c). PAR2 inhibitor as a control did not induce migration by itself (b). Line (a) with medium as a control shows the basic migration capacity of COLO357 cells and line (d) indicates the migration-inducing potency of lEVs.

#### Induction of ERK phosphorylation by lEVs

The experiments shown in Figure 5 were performed in order to evaluate the involvement of the PAR2/ERK signaling pathway in lEV-induced tumor cell migration. It has been described before that TF/FVIIa/PAR2 promotes cell proliferation and migration via an ERK-dependent pathway (Gieseler et al., 2013; Hu et al., 2013). It is shown that lEVs induce significant ERK phosphorylation. This effect can be effectively inhibited by U0126 and rTFPI (not shown). PAR2 agonist was used as positive control. ERK phosphorylation by PAR2 agonist also demonstrates a functioning signaling pathway in our system.



**Figure 3** Tinzaparin significantly inhibits lsEV-induced tumor cell migration. Upper panel: Example shown with lsEVs from CRC. Lower panel: Cumulative results with all effusions at 36 h. CRC, colorectal carcinoma; BC, breast cancer; SCLC, small cell lung cancer. Significant reduction of migration induced by lsEVs after 3 h pre-incubation and continuous presence of tinzaparin (2 IU/mL). Reduction is expressed in percent (%) of migration induced with lsEVs. N = 3, t = 36 h, means and standard deviations; *P*-values by Student’s *t*-test as compared to migration plus lsEVs w/o tinzaparin: CRC, *P* < 0.01; BC, *P* < 0.01; SCLC *P* < 0.01.

**Specific inhibition of ERK 1/2 kinase significantly reduces cancer cell migration induced by lsEVs**

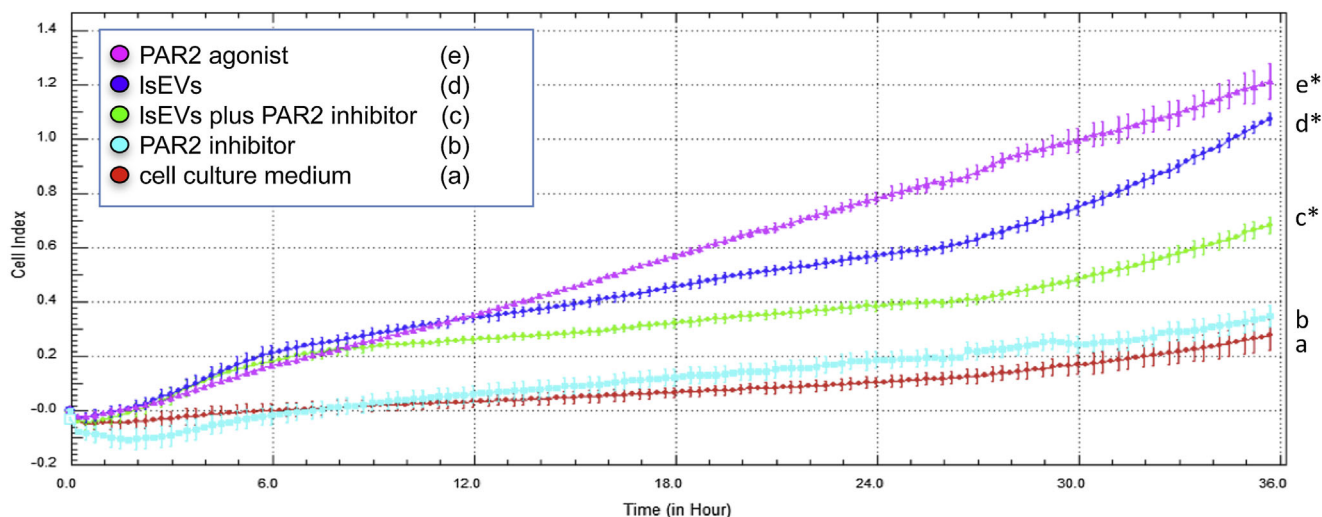
The experiments shown in Figure 6 were performed to test the hypothesis that the PAR2/ERK signaling cascade is decisive for lsEV-induced tumor cell migration. Here, we investigated the effect of a specific inhibitor of ERK1/2 on the migration-inducing ability of lsEVs. The addition of U0126, but not the solvent DMSO, significantly reduced effusion fluid-induced migration of COLO357 cells (*P* < 0.0001).

**Discussion**

It has been reported that s.c. administration of tinzaparin almost completely abolished lung metastases that developed

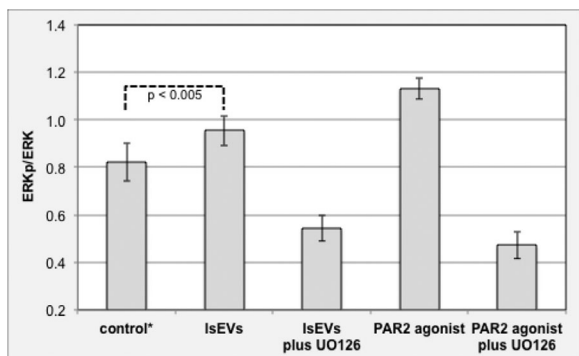
after intravenous injection of tumor cells in mice (Amirkhosravi *et al.*, 2003). Analysis of the molecular mechanisms underlying the beneficial effect of heparin treatment in preclinical human models of melanoma suggested that inhibition of tumor cell migration and neo-vascularization independent of the coagulation cascade are the decisive events (Bereczky *et al.*, 2005). TFPI release from epithelial cells seemed to be the crucial molecular event in the observed anti-migratory effect of tinzaparin (Lupu *et al.*, 1999; Amirkhosravi *et al.*, 2002; Mousa and Mohamed, 2004; Williams *et al.*, 2012).

As most of the previous studies have been performed in vitro or with animal models, we used human pancreatic carcinoma cells COLO357 as well as concentrations of LMWH and TFPI within the range of clinically relevant



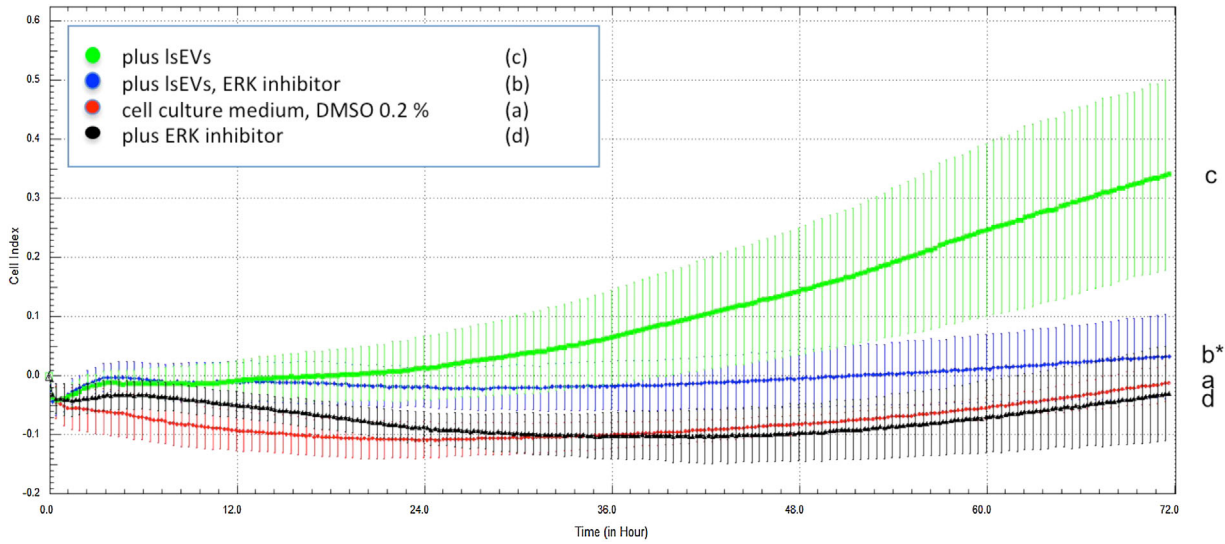
**Figure 4** Requirement of PAR2 signaling pathway for IsEV-induced tumor cell migration. Specific PAR2 agonist (SLIGKV-NH<sub>2</sub>) as well as IsEVs induced tumor cell migration significantly (e, d as compared to a). The specific PAR2 inhibitor GB88 significantly inhibited IsEV-induced migration [blue line (d) as compared to green line (c),  $P < 0.0001$ ]. Means and standard deviations of three runs within one assay are shown.

concentrations. Also, we used extracellular microvesicles prepared from patients' malignant effusions (IsEVs) to induce tumor cell migration. The rationale behind the use of this source of EVs is explained in the introduction. These IsEVs induced a strong and significant tumor cell migration, which could be significantly decreased by tinzaparin as shown in Figure 3. The experimental design that we used here might not reflect the clinical situation especially due to continuous exposure of the tumor cells to tinzaparin; however, it is not clear how high the concentration of tinzaparin in the tumor microenvironment is when this



**Figure 5** Induction of ERK phosphorylation by IsEVs. Incubation of pancreatic carcinoma COLO357 cells with IsEVs from patient with CRC for 10 min induced significant ERK phosphorylation as expressed by ERKp/ERK relation (Student's *t*-test, three independent experiments). ERK inhibitor UO126 and PAR2 agonist were used as negative and positive controls, respectively.

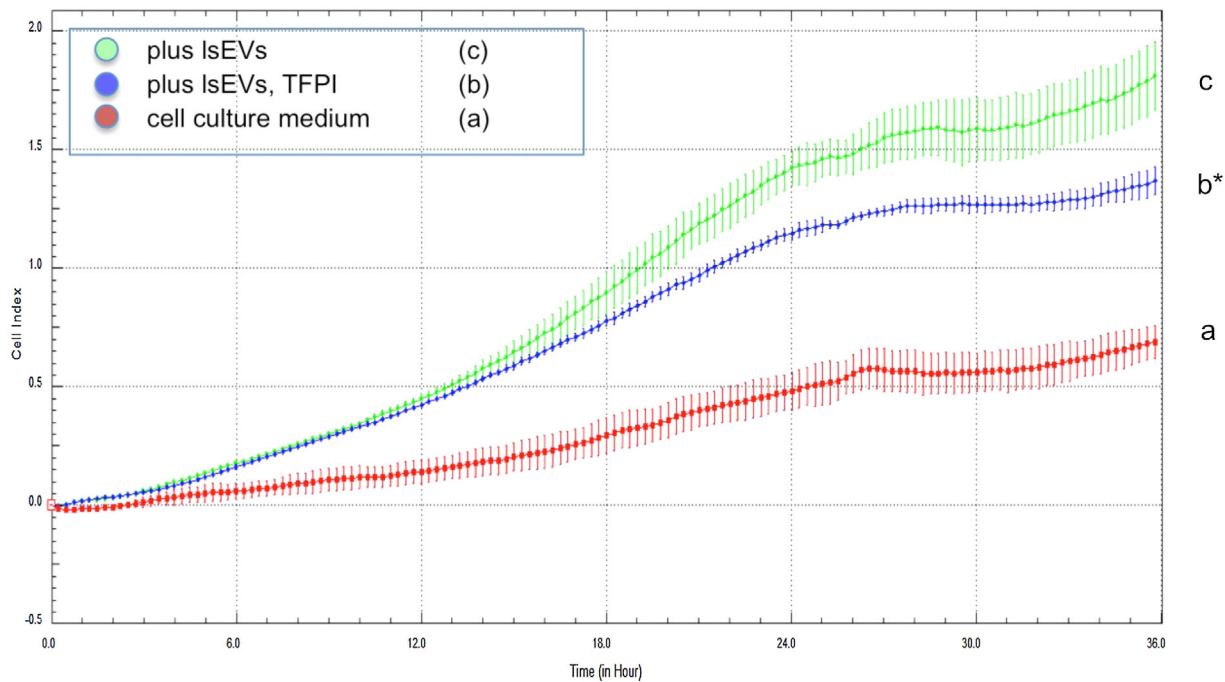
LMWH is administered to a cancer patient. As described in the Innohep<sup>®</sup> product monograph, patient treatment doses of 75 anti-Xa IU/kg resulted in peak anti-Xa activity of 0.4–1.8 IU/mL (Peter, 2011). Interestingly, the effect of tinzaparin could only be observed when the tumor cells had been pre-incubated with tinzaparin for at least 3 h, suggesting that a cell biological effect, such as TFPI-release, is induced. We did not examine different LMWHs, as we rather wanted to elucidate the underlying molecular mechanism of heparin activity than to characterize different heparins. Also, it has previously been described that tinzaparin has the highest TFPI-releasing capacity of all LMWHs approved for the treatment of cancer patients due to its high molecular weight distribution (Mousa et al., 2003). As shown in the results section, tinzaparin induces TFPI release in pancreas COLO357 cells in the same manner as it has been described before for breast cancer cells (Stavik et al., 2013). The resulting TFPI concentration in cell culture supernatant correlated with the amount of tumor cells. Interestingly, there was almost no difference in the levels of TFPI released after application of 0.4, 0.8, and 2 IU/mL of tinzaparin. These results are in line with a previous report that, after heparin treatment, TFPI $\alpha$  and TFPI $\beta$  are expressed on the surface of breast cancer cells, and inhibit TF-FVIIa activity (Stavik et al., 2013). Being the most potent physiological TF inhibitor, TFPI binds the active sites of TF-bound FVIIa and FXa and effectively blocks PAR2 activation (Maroney and Mast, 2015). As a result, recombinant TFPI was able to inhibit IsEV-induced migration as shown in Figure 7. The presumption that the TF/FXa/PAR2/ERK pathway is indeed responsible for the observed induction of



**Figure 6** Specific inhibition of ERK 1/2 kinase significantly reduces cancer cell migration induced by lsEVs. As the specific inhibitor U0126 is dissolved in DMSO, medium plus DMSO (0.2 %) was used as negative control (a). ERK 1/2 kinase inhibitor U0126 does not reduce spontaneous migration (d). Significant reduction of lsEV-induced cell migration [green line (c) as compared to blue line (b),  $P < 0.0001$ ]. Means and standard deviations of three runs within the same assays are shown.

migration by lsEVs is further supported by the induction of migration by PAR2 agonist, and the inhibition of lsEV-induced migration by PAR2 inhibitor, as well as by ERK inhibitor as shown in Figures 4 and 6. LsEVs induced

significant ERK phosphorylation as shown in Figure 5, which could be blocked by U0126, a specific ERK1/2 inhibitor. Although in a completely different system, it has been shown that glioblastoma-derived TF/VIIa-bearing EVs



**Figure 7** Inhibition of lsEV-induced tumor cell migration by rTFPI. Tumor cell migration induced by lsEVs (CRC) with and without the addition of TFPI in the clinically relevant concentration of 100 ng/mL was examined. Means and standard deviations of three independent experiments. \*Student's *t*-test lsEVs (c) versus lsEVs plus TFPI (b):  $P < 0.01$ .

triggered up-regulated PAR-2 on hypoxic vascular ECs, which resulted in increased levels of the proangiogenic growth factor HB-EGF (Svensson et al., 2011).

Further characterization of lsEVs by high-resolution flow cytometry revealed that they contain mainly exosomes and MPs but only a few bigger vesicles including apoptotic bodies as shown in Figure 1. The preceding centrifugation steps might have removed most of the bigger vesicles including apoptotic bodies. High-speed centrifugation with 10,000g separated smaller EVs including exosomes (<0.5 μM as defined by Megamix polystyrene particles) from MPs and apoptotic bodies. The resulting pellet (hsEVs) contained mainly MPs but the presence of smaller apoptotic bodies that were not removed by the preceding low-speed centrifugation steps cannot be excluded. Also, and most important, soluble factors that might contribute to the migration-inducing potency of lsEVs remain in the supernatant. The high tenase activity of hsEVs as shown in the lower panel of Figure 1 indicates that MPs are the functionally decisive fraction within the hsEV populations. The finding that most of the migration-inducing capacity is found within the pellet fraction excludes the role of soluble factors such as cytokines or growth factors in cell migration. These results underline the assumption that TF-presenting MPs are indeed the major contributing factor for the migration-inducing potency of lsEVs from malignant effusions. Other groups have shown that exosomes ("exosome like vesicles") from a glioblastoma multiforme cell line were able to induce ERK1/2 phosphorylation in WT CHO cells and that treatment with the specific ERK1/2 inhibitor U0126 attenuated exosome-mediated cell migration, suggesting an important role of this MAPK in the functional activity of exosomes. The group also found that exosome-mediated stimulation of cancer cell migration was significantly reduced by treatment of cancer cells with heparins such as tinzaparin suggesting that heparan sulfate proteoglycans might function as internalizing receptors of cancer cell-derived EVs (Christianson et al., 2013). These additional effects of tinzaparin might explain the incomplete although significant inhibitory effect of TFPI in our system as seen in Figure 7.

Although we used a human cancer cell line, malignant effusions from patients and therapeutically relevant concentrations of tinzaparin and TFPI, the clinical significance of these observations needs to be investigated further. Also, the number of examined malignant effusions is too small to draw generalized conclusions. The results might rather serve as a proof of principle and a model for further evaluation of clinical observations, where the additional application of LMWHs had an anti-tumor effect. Recent meta-analyses have shown that the survival benefit is only marginally in favor of LMWH treatment across all studies and patients, but some of the studies with

subgroups of patients have shown a clear and significant survival benefit for cancer patients treated with LMWHs (Akl et al., 2014; Sanford et al., 2014). Our suggestion that blocking the PAR2/ERK signaling pathway is involved in the inhibition of lsEV-induced tumor cell migration by tinzaparin is one explanation of the underlying molecular mechanism of action induced by the LMWH. This, of course, does not exclude the possible involvement of other signal transduction pathways. In our experimental setup, blocking of the pro-migratory effect of lsEVs from malignant effusions by pre-incubation with tinzaparin or direct incubation with TFPI was not complete but nonetheless statistically significant. This might be due to the heterogeneous composition of EVs from patients with different cancers and the complex effects of MPs that expose phospholipids, selectins as well as TF (Ay et al., 2008; Thomas et al., 2009). Further in-depth characterization of EVs and especially MPs from cancer patients with regard to their tenase and migration-inducing capacity are warranted.

### Acknowledgments and funding

We thank Monica Vollmert and Maren Hicken for excellent technical assistance. This project has been supported in part by Anelise-Asmussen-Stiftung, Luebeck [grant 141402], LEO Pharma Germany [grant 1500505], Bayer Vital GmbH [grant 121213].

### References

- Akl EA, Kahale LA, Ballout RA, Barba M, Yosucio VE, van Doormaal FF, Middeldorp S, Bryant A, Schünemann H (2014) Parenteral anticoagulation in ambulatory patients with cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 12: CD006652.
- Amirkhosravi A, Meyer T, Chang JY, Amaya M, Siddiqui F, Desai H, Francis JL (2002) Tissue factor pathway inhibitor reduces experimental lung metastasis of B16 melanoma. *Thromb Haemost* 87: 930–6.
- Amirkhosravi A, Mousa S, Amaya M, Francis J (2003) Antimetastatic effect of tinzaparin, a low-molecular-weight heparin. *J Thromb Haemost* 1: 1972–6.
- Ay C, Simanek R, Vormittag R, Dunkler D, Alguet G, Koder S, Kornek G, Marosi C, Wagner O, Zielinski C, Pabinger I (2008) High plasma levels of soluble P-selectin are predictive of venous thromboembolism in cancer patients: results from the Vienna Cancer and Thrombosis Study (CATS). *Blood* 112: 2703–8.
- Berezky B, Gilly R, Rásó E, Vágó A, Tímár J, Tóvári J (2005) Selective antimetastatic effect of heparins in preclinical human melanoma models is based on inhibition of migration and microvascular arrest. *Clin Exp Metastasis* 22: 69–76.
- Burger D, Schock S, Thompson CS, Montezano AC, Hakim AM, Touyz RM (2013) Microparticles: biomarkers and beyond. *Clin Sci* 124: 423–41.

- Christianson HC, Svensson KJ, van Kuppevelt TH, Li J-P, Belting M (2013) Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 17380–5.
- Gieseler F, Luhr I, Kunze T, Mundhenke C, Maass N, Erhart T, Denker M, Beckmann D, Tiemann M, Schulte C, Dohrmann P, Cavallé F, Godeau F, Gaspach C (2007) Activated coagulation factors in human malignant effusions and their contribution to cancer cell metastasis and therapy. *Thromb Haemost* 97: 1023–30.
- Gieseler F, Ungefroren H, Settmacher U, Hollenberg MD, Kaufmann R (2013) Proteinase-activated receptors (PARs)—focus on receptor-receptor-interactions and their physiological and pathophysiological impact. *Cell Commun Signal* 11: 86.
- Heijnen HFG, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ (1999) Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and granules. *Blood* 94: 3791–9.
- Herring JM, McMichael MA, Smith SA (2013) Microparticles in health and disease. *J Vet Intern Med* 27: 1020–33.
- Hu L, Xia L, Zhou H, Wu B, Mu Y, Wu Y, Yan J (2013) TF/FVIIa/PAR2 promotes cell proliferation and migration via PKC $\alpha$  and ERK-dependent c-Jun/AP-1 pathway in colon cancer cell line SW620. *Tumor Biol* 34: 2573–81.
- Kalra H, Drummen GPC, Mathivanan S (2016) Focus on extracellular vesicles: introducing the next small big thing. *Int J Mol Sci* 17: 170.
- Khorana AA, Sahni A, Altland OD, Francis CW (2003) Heparin inhibition of endothelial cell proliferation and organization is dependent on molecular weight. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 2110–5.
- Lacroix R, Robert S, Poncelet P, Dignat-George F (2010) Overcoming limitations of microparticle measurement by flow cytometry. *Semin Thromb Hemost* 36: 807–18.
- Lohman RJ, Cotterell AJ, Barry GD, Liu L, Suen JY, Vesey DA, Fairlie DP (2012) An antagonist of human protease activated receptor-2 attenuates PAR2 signaling, macrophage activation, mast cell degranulation, and collagen-induced arthritis in rats. *FASEB J* 26: 2877–87.
- Lupu C, Poulsen E, Roquefeuil S, Westmuckett AD, Kakkar VV, Lupu F (1999) Cellular effects of heparin on the production and release of tissue factor pathway inhibitor in human endothelial cells in culture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 2251–62.
- Mandel K, Seidl D, Rades D, Lehnert H, Gieseler F, Hass R, Ungefroren H (2013) Characterization of spontaneous and TGF-beta-induced cell motility of primary human normal and neoplastic mammary cells in vitro using novel real-time technology. *PLoS ONE* 8: e56591.
- Maroney SA, Mast AE (2015) New insights into the biology of tissue factor pathway inhibitor. *J Thromb Haemost* 13: S200–S7.
- Meitner PA, Kajiji SM, LaPosta-Frazier N, Bogaars HA, Jolly GA, Dexter DL, Calabresi P, Turner MD (1983) COLO 357, a human pancreatic adenocarcinoma: growth in artificial capillary culture and in nude mice. *Cancer Res* 43: 5978–85.
- Mousa SA, Bozarth J, Barrett JS (2003) Pharmacodynamic properties of the low molecular weight heparin, tinzaparin: effect of molecular weight distribution on plasma tissue factor pathway inhibitor in healthy human subjects. *J Clin Pharmacol* 43: 727–34.
- Mousa SA, Mohamed S (2004) Inhibition of endothelial cell tube formation by the low molecular weight heparin, tinzaparin, is mediated by tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost* ;92: 627–33.
- Muralidharan-Chari V, Clancy J, Plou C, Romao M, Chavrier P, Raposo G, D'Souza-Schorey C (2009) ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles. *Curr Biol* 19: 1875–85.
- Peter R (2011) Product update. *Can Pharm J* 144: 15–7.
- Press JZ, Reyes M, Pitteri SJ, Pennil C, Garcia R, Goff BA, Hanash SM, Swisher EM (2012) Microparticles from ovarian carcinomas are shed into ascites and promote cell migration. *Int J Gynecol Cancer* 22: 546–52.
- Rak J (2010) Microparticles in cancer. *Semin Thromb Hemost* 36: 888–906.
- Said A, Goueli K, Lu T, Simpson D (1998) U0126: a novel, selective and potent inhibitor of MAP kinase kinase (MEK). *Promega Notes* 69: 6.
- Sanford D, Naidu A, Alizadeh N, Lazo-Langner A (2014) The effect of low molecular weight heparin on survival in cancer patients: an updated systematic review and meta-analysis of randomized trials. *J Thromb Haemost* 12: 1076–85.
- Schaffner F, Ruf W (2008) Tissue factor and protease-activated receptor signaling in cancer. *Semin Thromb Hemost* 34: 147–53.
- Schaffner F, Ruf W (2009) Tissue factor and PAR2 signaling in the tumor microenvironment. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29: 1999–2004.
- Shu CC, Wang JY, Hsu CL, Keng LT, Tsui K, Lin JF, Lai HC, Yu CJ, Lee LN, Luh KT (2015) Diagnostic role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines and effector molecules of cytotoxic T lymphocytes in tuberculous pleural effusion. *Respirology* 20: 147–54.
- Sierko E, Wojtukiewicz MZ, Kisiel W (2007) The role of tissue factor pathway inhibitor-2 in cancer biology. *Semin Thromb Hemost* 33: 653–9.
- Stagnara J, Garnache Ottou F, Angelot F, Mourey G, Seilles E, Biichle S, Saas P, Racadot E (2012) Correlation between platelet-derived microparticle enumeration by flow cytometry and phospholipid-dependent procoagulant activity in microparticles: the centrifugation step matters! *Thromb Haemost* 107: 1185–7.
- Stavik B, Tinholt M, Sletten M, Skretting G, Sandset PM, Iversen N (2013) TFPI $\alpha$  and TFPI $\beta$  are expressed at the surface of breast cancer cells and inhibit TF-FVIIa activity. *J Hematol Oncol* 6: 5–19.
- Suen JY, Barry GD, Lohman RJ, Halili MA, Cotterell AJ, Le GT, Fairlie DP (2012) Modulating human proteinase activated



- receptor 2 with a novel antagonist (GB88) and agonist (GB110). *Br J Pharmacol* 165: 1413–23.
- Svensson KJ, Kucharzewska P, Christianson HC, Sköld S, Löfstedt T, Johansson MC, Mörgelin M, Bengzon J, Ruf W, Belting M (2011) Hypoxia triggers a proangiogenic pathway involving cancer cell microvesicles and PAR-2-mediated heparin-binding EGF signaling in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 13147–52.
- Thaler J, Koder S, Kornek G, Pabinger I, Ay C (2014) Microparticle-associated tissue factor activity in patients with metastatic pancreatic cancer and its effect on fibrin clot formation. *Transl Res* 163: 145–50.
- Thomas GM, Panicot-Dubois L, Lacroix R, Dignat-George F, Lombardo D, Dubois C (2009) Cancer cell-derived microparticles bearing P-selectin glycoprotein ligand 1 accelerate thrombus formation in vivo. *J Exp Med* 206: 1913–27.
- Williams L, Tucker TA, Koenig K, Allen T, Rao LV, Pendurthi U, Idell S (2012) Tissue factor pathway inhibitor attenuates the progression of malignant pleural mesothelioma in nude mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 46: 173–9.
- Zwicker JI, Liebman HA, Neuberger D, Lacroix R, Bauer KA, Furie BC, Furie B (2009) Tumor-derived tissue factor-bearing microparticles are associated with venous thromboembolic events in malignancy. *Clin Cancer Res* 15: 6830–40.

Received 15 May 2016; accepted 17 July 2016.  
Final version published online 4 August 2016.